

论述与研究

CO₂ 对可沉微藻油脂含量的影响

郝晓地^{1,2}, 吴宇涵^{1,2}, 胡沅胜^{1,2}

(1. 北京建筑大学 城市雨水系统与水环境省部共建教育部重点实验室, 北京 100044;
2. 中-荷未来污水处理技术研发中心, 北京 100044)

摘要: 作为一种光合自养微生物,微藻可以利用无机碳源和氮、磷在其细胞体内合成淀粉、多糖、蛋白质,甚至是油脂。然而,微藻与液体分离通常十分困难,否则,水体富营养化现象很容易得到解决。事实上,藻类中存在着可以自然沉降的种属,只不过在自然环境下难以成为优势种属。在实验室条件下,通过“冲淘”压力可以筛选出沉淀性能非常好的可沉藻,使培养藻类沉淀效率高达97% (SVI=17 mL/g)。问题是所培养出的可沉微藻种属油脂含量不高,不具有能源回收价值。为此,在前期富集培养出可沉藻基础上,采用通入CO₂ (5%) 方式刺激藻类生长,并试图获得较高的藻细胞油脂含量。间歇试验表明,通入CO₂ 可提高产油微藻(硅藻、绿藻)的稳定性,延长微藻增长时间(35 d→56 d),获得较高叶绿素a含量(5.3 mg/L→6.4 mg/L),强化污水脱氮除磷效率,增加藻细胞油脂(11.21%)、多糖(7.20%)含量。

关键词: 可沉微藻; 油脂; CO₂; 二级出水; 脱氮除磷; 叶绿素a; “冲淘”压力

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2018)11-0001-05

Effect of CO₂ Addition on Increasing Lipid Content Contained in Settleable Microalgae

HAO Xiao-di^{1,2}, WU Yu-han^{1,2}, HU Yuan-sheng^{1,2}

(1. Key Laboratory of Urban Stormwater System and Water Environment <Ministry of Education>, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044, China; 2. Sino-Dutch R & D Centre for Future Wastewater Treatment Technologies, Beijing 100044, China)

Abstract: As a photosynthetic and autotrophic microorganism, microalgae can use inorganic carbon sources and nitrogen & phosphorus to synthesize starch, polysaccharides, proteins, and even lipid in their cells. However, it is often difficult to separate microalgae from liquid. Otherwise, the phenomena of eutrophication can easily be resolved. In fact, there are naturally settleable species in microalgae, which however is difficult to become dominant species in the natural environment. Under laboratory conditions, settleable microalgae can be cultured by a selective pressure, “wash-out”. The settleable efficiency of cultured microalgae could reach to as high as 97% (SVI=17 mL/g). But cultured microalgae contained less lipid content, which had no value to be recovered as energy. With this study, culturing microalgae was stimulated by inputting CO₂ (5%) into reactors to obtain a higher lipid content in their cells. Inter-

mittent experiments demonstrated that introducing CO_2 into reactors could increase the stability of oil-producing microalgae (diatoms and green algae), prolong the growing time of microalgae (35 d \rightarrow 56 d), obtain a higher chlorophyll a content (5.3 mg/L \rightarrow 6.4 mg/L), improve the removal efficiencies of nutrients and enhance the contents of lipid (11.21%) and polysaccharide (7.20%).

Key words: settleable microalgae; lipid; CO_2 ; secondary effluent; nitrogen and phosphorus removal; chlorophyll a; wash-out

微藻可用于污水净化,特别是用于降低出水氮(N)、磷(P)含量的高级污水处理;收获的微藻如果油脂含量丰富,则可以用作生物柴油生产,以补充日益紧张的化石燃料供应^[1-4]。然而,微藻与水分分离较为困难,往往需要借助外力作用(如离心分离等),这就限制了微藻净化污水的实际应用。前期试验表明,通过“冲淘”压力可以筛选出沉淀性能非常好的可沉藻,使微藻沉淀效率达97%、SVI = 17 mL/g;对 $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ 与 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的去除率分别达99%和79%,使出水 $\text{PO}_4^{3-} - \text{P} < 0.1 \text{ mg/L}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N} = 2.2 \text{ mg/L}$ ^[1]。

目前选择工况下培养出的可沉藻油脂含量很低,仅有10%(藻细胞干质量),而不到多糖含量的6.5%^[1]。为此,笔者基于文献调研所获得的信息^[5-8],试图通过通入 CO_2 方式培养可沉状态下的含油微藻。试验以北京某污水处理厂二级出水作为原水,研究将 CO_2 通入微藻培养反应器对微藻生物量、沉降性能、种属特征、油脂/多糖含量等的影响。

1 材料与方法

1.1 试验水样

以北京某污水处理厂出水作为试验水样,pH值为 7.24 ± 0.3 ,其他水质指标如表1所示。因出水中 SiO_2 含量较低,所以在试验前人工投加 SiO_2 ,使其浓度为 20 mg/L 。

表1 原水水质

Tab.1 Raw wastewater quality used in experiments

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

项 目	数值	项 目	数值
TN	23.62 ± 0.7	Ca^{2+}	63.14 ± 3.0
TP	1.31 ± 0.2	Mg^{2+}	21.82 ± 2.3
$\text{NH}_4^+ - \text{N}$	0.58 ± 0.1	DIC(无机碳)	31.37 ± 11.02
$\text{NO}_3^- - \text{N}$	20.38 ± 1.5	SiO_2	7.83 ± 0.5
$\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$	1.16 ± 0.3	COD	72.08 ± 4.8

1.2 接种藻液与特性

接种藻液来源于所取水样污水处理厂二沉池池壁,置于阳光充足的实验室内窗台,藉所取出水自然

生长2个月后检测相关指标,微藻生物量已高达 0.32 g/L ,但沉降性能很差,沉降率仅为4.85%;显微镜观测表明,主要藻种包括栅藻、颤藻、硅藻、小球藻、色球藻等;VSS为 0.16 g/L ,叶绿素a占TSS的比例为0.39%。

1.3 试验方法

采用2个2 L烧杯作为反应器(见图1),采用间歇运行,每个运行周期为1 d(进水5 min、光反应1 420 min、静置5 min、排水10 min)。每周排出70%(1 400 mL)上清液,将沉降时间与体积交换比(VER,排出体积/总体积)定义为流体动力学“冲淘”压力。采用相同静置沉降时间,排出沉降性能较差的藻属,筛选滞留可沉优势种属。利用日光灯提供光照,调控pH值为7.5左右。装置通过定时器控制自动运行,进出水采用2台蠕动泵实现。

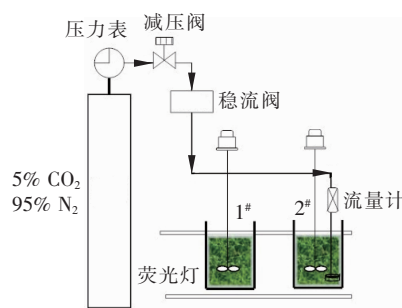


图1 试验装置示意

Fig.1 Schematic diagram of experimental setup

1#反应器未通入 CO_2 用作对比,2#反应器全程曝气,曝气方式为间歇式,即曝3 min、停2 min,流量为 6 mL/min ,除此之外两反应器运行条件均相同:连续光照,硅浓度为 20 mg/L ,光照强度为 $3 000 \text{ lx}$,周期开始时进水,沉淀时间为5 min,体积交换比为70%,以 $200 \sim 300 \text{ r/min}$ 连续搅拌,HRT为1.43 d。

1.4 分析方法

1.4.1 微藻生物量、种属结构与沉降性能

微藻生长状况采用总悬浮固体(TSS)和叶绿素a表征。以Whatman膜($0.45 \mu\text{m}$)过滤,采用APHA

标准方法测定 TSS。利用丙酮提取叶绿素 a (Chl-a),以分光光度法测定。细胞产率利用公式(1)计算,单位为 mg/(L·d)。

$$\text{细胞产率} = \frac{\text{TSS}_{t2} - \text{TSS}_{t1}}{\Delta t} \quad (1)$$

式中 TSS_{t1} 和 TSS_{t2} ——分别为 $t1$ 和 $t2$ 时刻的生物量

Δt ——间隔时间,即 $t2 - t1$

生物种属利用光学显微镜拍摄生物相,观察群落变化和种属形态特征,以鉴定微藻属。

微藻沉降率由公式(2)计算。

$$\text{沉降率} = (1 - \text{TSS}_e / \text{TSS}_r) \times 100\% \quad (2)$$

式中 TSS_e ——沉降后排出的 TSS 量

TSS_r ——每周期反应结束时混合液 TSS 量

1.4.2 细胞组分

在试验第 30~40 个周期内分别测定细胞组分中多糖、蛋白质与油脂含量。多糖采用苯酚-硫酸法测定;测定蛋白质前先行碱热水解,后采用考马斯亮蓝法测定;油脂使用氯仿/甲醇(2:1)提取总脂质,采用超声波加热法破壁,以重量法测其含量^[9];油脂测定以荧光生物相通过尼罗红染色法实施^[10]。

1.4.3 水质指标及其他

排出反应器液样通过 0.45 μm 膜过滤,以分析其中 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ 、 SiO_2 和无机碳(DIC)浓度。同时检测反应器运行周期始/末 pH 值、DO。其中, pH 值:pHS-3C 型精密 pH 计, COD:重铬酸钾法, $\text{NO}_3^- - \text{N}$:紫外分光光度法, TN:过硫酸钾氧化分光光度法, $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$:钼锑抗分光光度法, TP:过硫酸钾氧化分光光度法, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$:纳氏试剂分光光度法, SiO_2 :分光光度法, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} : ICP7200 分析仪, DIC:TOC 仪, DO:DO 仪。

2 结果与分析

2.1 种属特征

在反应器前 20 个运行周期,系统处于环境适应期,种群生态特性变化较大。在选择性压力培养条件下,沉降性能较差的微藻(如栅藻、小球藻等)逐渐被淘汰。运行至第 20 个周期,两系统分别出现不同的优势微藻种属:1[#]反应器富集大量硅藻,其中,舟形硅藻和直链硅藻较多;而 2[#]反应器除硅藻外还出现部分颤藻(蓝藻)。表明在前期 CO₂ 对两个反应器中微藻种属没有太大影响,也许是此时系统内微藻生物量较低,进水中的无机碳足以满足微生物

需要,补充 CO₂ 的作用并不明显。

至第 50 个周期 1[#]反应器出现微囊藻(蓝藻),长链硅藻断裂,残存少部分短链硅藻;2[#]反应器已富集出大量长链微胞藻(绿藻)和舟形硅藻,蓝藻全部被淘汰。到第 100 个周期时,1[#]反应器仍以微囊藻为主,2[#]反应器则出现大量直链硅藻,说明此时 1[#]反应器中碳源明显不足,产能硅藻较难富集;而 2[#]反应器因持续通入 CO₂,产能硅藻成为优势微藻。

蓝藻是一种低能微藻,几乎不含油脂成分,无机碳(DIC)浓度并非其生长的主要限制因素,致使后期随着生物量升高、无机碳匮乏,蓝藻与长链藻竞争并占据优势。而通入 CO₂ 的 2[#]反应器因存在稳定无机碳源,富集出更多长链藻,且以硅藻为主。

2.2 细胞产率与沉降性能

1[#]反应器中微藻生长可分为三个阶段:①线性增长阶段(0~35 d),该阶段系统生物量较低,无机碳浓度不足以限制细胞生长;②生物量下降阶段(35~60 d),因细胞密度增加,原水无机碳浓度不能维持藻细胞正常生长;③生物量回升阶段(60~100 d),该阶段生物量有所回升,但占比更高的是无机颗粒($\text{VSS}/\text{TSS} = 54\%$),叶绿素水平较低(见图 2)。

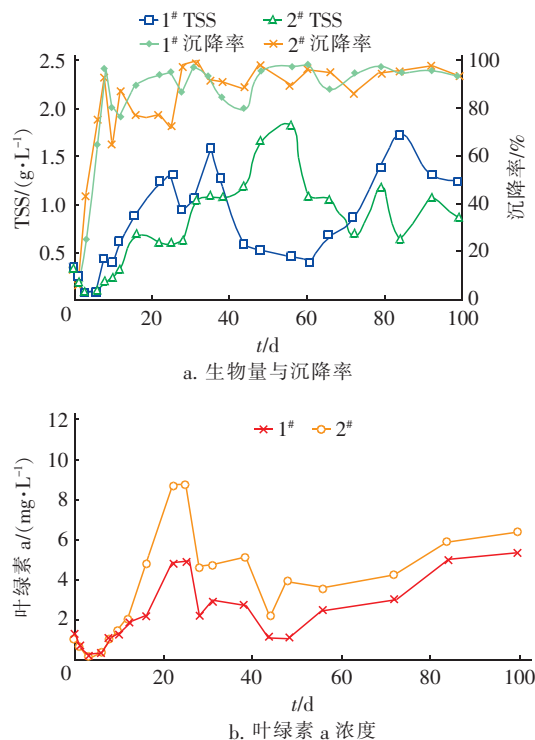


图2 生物量、沉降效率与叶绿素 a 浓度的变化

Fig. 2 Change of biomass, settleable efficiency and chlorophyll a concentration

在2[#]反应器中,第1阶段时间明显延长(0~56 d),主要是因为该阶段营养物质、无机碳充足,藻细胞大量繁殖;第2阶段持续时间较1[#]反应器缩短,主因是藻细胞增长迅速,高密度使得遮光效果明显,致藻细胞大量死亡。此后(第3阶段),2[#]反应器处于微藻动态平衡过程,光限制导致的藻细胞死亡下降与该部分藻死亡后提供给其他微藻冗余生存空间而继续增长形成稳定平衡。

图2(a)显示,1[#]反应器从第8个周期开始生物量(TSS)呈线性增长,到第25个周期时达到1.28 g/L,相应的细胞产率为52 mg/(L·d);2[#]反应器从第6个周期开始TSS便呈线性增长,至第56个周期时浓度达到1.81 g/L,相应细胞产率为35 mg/(L·d)。有一点要说明的是,1[#]反应器由于不通CO₂导致后期pH值升高到9~11,系统中含有大量无机颗粒,TSS上升。因此叶绿素a含量更能表征微藻细胞生长及光合速率情况。以上反映出CO₂对2[#]系统生物量的刺激增长作用。到第80个周期,两系统的沉降性能均趋于稳定,沉降率保持在90%以上,似乎CO₂对沉降性能并没有明显影响。

图2(b)显示,两反应器的叶绿素a变化趋势相似:前20个周期呈线性增长,至第25个周期均达到各自峰值,即4.89和8.69 mg/L。随后,因光遮蔽现象叶绿素a浓度急剧下降,然后又有所回升。两反应器的区别在于叶绿素a水平,2[#]反应器显然具有更高的叶绿素a含量,显示出更高的光合速率。至第100个周期结束时,两反应器中叶绿素a浓度分别为5.3和6.4 mg/L,通入CO₂使得叶绿素a浓度提升了20.8%。

微藻合成细胞原生质的能量来源为光能,但藻细胞具有一定的光饱和和极限(6 458 lx)^[11]。光在微藻培养中发挥着至关重要的作用,其需求取决于微藻培养深度和密度。试验后期由于生物量增长,细胞密度增加,导致光无法穿透整个液体,形成了光遮蔽现象,致大量微藻细胞死亡,并向水中释放出有机物,使出水TOC明显高于原水。

2.3 净化效果

前期1[#]系统不稳定,氮去除效率一直很低,后期虽有恢复但也不是很高,只维持在20%左右。2[#]系统虽然也出现一定波动,但最终氮去除率稳定在37%附近,意味着通入CO₂使氮去除率提高了约17%。两系统对磷的去除也经历了波动,1[#]反应器

在59%~95%变化,2[#]反应器的变化范围更大,处于40%~100%之间。系统对磷的去除除微藻细胞吸收外,还存在化学沉淀作用,因为系统存在高pH值现象(1[#]系统的pH值=9~11,化学除磷严重,出水中几乎检测不出Ca²⁺、Mg²⁺;2[#]反应器的pH值为7.5,主要为藻细胞吸磷)。在试验水质下,2[#]出水水质可以达到一级A标准。

2.4 细胞组分

在30~40个周期内获取藻样,分析细胞组分(多糖、蛋白质、油脂),结果如图3所示。通入CO₂的2[#]系统的油脂、多糖、蛋白质含量均高于未通CO₂的1[#]系统,油脂、多糖、蛋白质含量分别提高了11.21%、7.20%和0.29%。两反应器的细胞产率分别为33和46 mg/(L·d),据此计算1[#]与2[#]反应器的油脂产率分别为4.0和10.7 mg/(L·d),这与Wu等^[12]利用二级出水培养微藻的油脂产率为0.3~4.9 mg/(L·d)相比,该微藻含油量相当可观。

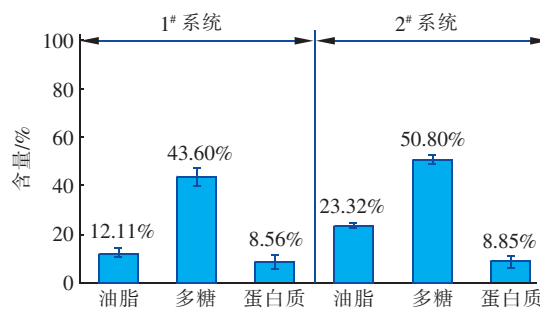


图3 微藻细胞组分含量

Fig.3 Cell components of cultured microalgae

为直观观测微藻细胞内油脂含量,通过尼罗红染色法观测其生物相,结果见图4。显微图像中金黄色亮点即为油脂,揭示出硅藻(1[#])和绿藻(2[#])均具有产油潜能。2[#]系统中的绿藻也富含油脂较为新奇,揭示出通常前期只富集淀粉的绿藻,在CO₂的作用下可促进微藻体内储存的淀粉向油脂转化。

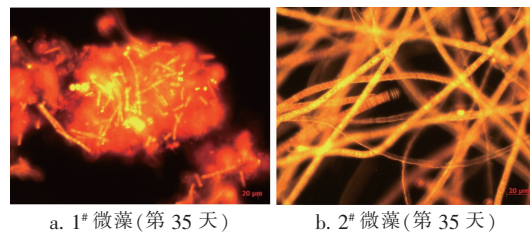


图4 微藻荧光显微照片(×200)

Fig.4 Microalgae fluorescence micrographs(×200)

总之,系统中通入CO₂可提高产能微藻(硅藻、

绿藻)的稳定性,延长其增长期持续时间(由35 d延长至56 d)、获得到更高的叶绿素a含量(从5.3 mg/L提高到6.4 mg/L)。与此同时,通入CO₂后反应器的除磷效果并未出现下降,反而持续上升。更重要的是CO₂的存在使微藻细胞油脂含量提升了11.21%,意味着CO₂可刺激油脂增加。

3 结论

通入CO₂对可沉微藻培养系统的微藻生物量、叶绿素a含量、净化效果及油脂含量影响很大。可沉微藻培养系统通入CO₂后可增加20.8%的细胞叶绿素a含量,提升脱氮(17%)除磷(26%)效率,使细胞组分中油脂、多糖、蛋白质含量分别提高了11.21%、7.20%和0.29%。研究表明,微藻在净化污水的同时,可以富集培养出富含油脂和多糖的可沉微藻,这为利用微藻处理污水并实现资源化、能源化目标带来了一线曙光。

参考文献:

- [1] Hu Y, Hao X, Van Loosdrecht M, *et al.* Enrichment of highly settleable microalgal consortia in mixed cultures for effluent polishing and low-cost biomass production [J]. *Water Res*, 2017, 125: 11–16.
- [2] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 621–639.
- [3] Li Y, Han D, Sommerfeld M, *et al.* Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (*Chlorophyceae*) under nitrogen-limited conditions [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(1): 123–129.
- [4] Fields M W, Hise A, Lohman E J, *et al.* Sources and resources; importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(11): 4805–4816.
- [5] 胡沅胜,程慧芹,郝晓地. 自然沉降藻-菌共生絮凝体研究进展[J]. *中国给水排水*, 2016, 32(18): 1–7.
Hu Yuansheng, Cheng Huiqin, Hao Xiaodi. Recent advances in naturally settleable microalgal-bacterial flocs [J]. *China Water & Wastewater*, 2016, 32(18): 1–7 (in Chinese).
- [6] Lohman E J, Gardner R D, Halverson L D, *et al.* Carbon partitioning in lipids synthesized by *Chlamydomonas reinhardtii*, when cultured under three unique inorganic carbon regimes [J]. *Algal Res*, 2014, 5(1): 171–180.
- [7] Hanifzadeh M M. Waste to energy from flue gas of industrial plants to biodiesel: Effect of CO₂ on microalgae growth [J]. *Int J Waste Resour*, 2017, 7: 3–10.
- [8] Mooij P R, de Jongh L D, van Loosdrecht M C M, *et al.* Influence of silicate on enrichment of highly productive microalgae from a mixed culture [J]. *J Appl Phycol*, 2016, 28(3): 1453–1457.
- [9] Song M, Pei H, Hu W, *et al.* Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 141(4): 245–251.
- [10] Fernandes B, Teixeira J, Dragone G, *et al.* Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri* [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 144(6): 268–274.
- [11] Wahidin S, Idris A, Shaleh S R. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 129(2): 7–13.
- [12] Wu Y H, Yang J, Hu H Y, *et al.* Lipid-rich microalgal biomass production and nutrient removal by *Haematococcus pluvialis* in domestic secondary effluent [J]. *Ecol Eng*, 2013, 60(11): 155–159.



作者简介:郝晓地(1960–),男,山西柳林人,博士,教授,主要研究方向为污水生物脱氮除磷技术、污水处理数学模拟技术、可持续环境生物技术。现为国际水协期刊《Water Research》区域主编(Editor)。

E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn

收稿日期: 2018–03–23