

微藻在废水中的高密度培养研究进展

张 权¹, 常 春^{1,2*}, 李 斐¹, 白 净^{1,2}, 方书起^{1,2}

(1. 郑州大学化工与能源学院, 河南 郑州 450001;
2. 生物质炼制技术与装备河南省工程实验室, 河南 郑州 450001)

摘要:指出了微藻的培养决定着微藻生物质资源开发利用的生产成本,已成为规模化生产微藻的最大瓶颈。提出寻找廉价培养基、提高微藻培养密度能够有效地降低其规模化利用的生产成本。综述了微藻在废水中高密度培养的研究进展,并对其发展方向进行了展望。

关键词:微藻;废水;高密度培养

中图分类号:Q949.93

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2016)11-0037-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2016.11.009

Progress of high-density culturing of microalgae in wastewater-based medium

ZHANG Quan¹, CHANG Chun^{1,2*}, LI Fei¹, BAI Jing^{1,2}, FANG Shu-qi^{1,2}

(1. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
2. Engineering Laboratory of Henan Province for Biorefinery Technology and Equipment, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The culturing of microalgae has a direct impact on the production costs of microalgae biomass, which has become the bottleneck for the mass production of microalgae biomass as well. Seeking cheap mediums and increasing the culture density of microalgae are proposed to be the effective ways to decrease the costs of mass production and utilization. Research advances in high-density culturing of microalgae in wastewater-based medium are summarized. Furthermore, the development directions for high density culture of microalgae in wastewater-based medium are also prospected.

Key words: microalgae; wastewater; high-density culture

生物燃料作为未来化石燃料的替代能源备受关注。相比油料作物种子和餐饮废弃油等微藻因其生长周期短、占地面积小、油脂含量高等优点而成为生产生物柴油、乙醇和氢气等生物燃料的最佳原料。但是,较高的培养成本阻碍了其规模化生产。以微藻生物柴油为例,其生产工艺包括藻种的筛选、微藻的培养、收集脱水、酯化反应后生成生物柴油。其中,微藻的培养成本占微藻生物柴油总成本的70%以上^[1]。因此,如何降低微藻的培养成本已成为微藻规模化利用的关键问题。而寻找廉价培养基以及提高微藻的培养密度正是当前降低微藻培养成本的关键所在。

1 常见微藻及其应用

微藻是一类能进行光合作用的微小生物。其营养方式主要有光合自养、化能异养、混合营养3种。目前有超过72 500种的微藻分布在世界各地^[2]。现阶段微藻的研究主要集中在生物燃料方面,常见微藻及其应用如表1^[3-5]所示。

表1 常见微藻及其应用

微藻	所属门类	应用实例
小球藻(Chlorella)	绿藻门	食品饲料添加剂,生产生物柴油、乙醇
栅藻(Scenedesmus)	绿藻门	生产生物柴油、乙醇
衣藻(Chlamydomonas)	绿藻门	生产生物柴油
杜氏藻(Dunaliella)	绿藻门	生产 β -胡萝卜素和生物柴油
布朗葡萄藻(Botryococcus)	绿藻门	生产生物柴油
红球藻(Haematococcus)	绿藻门	生产虾青素
螺旋藻(Spirulina)	蓝藻门	生产蛋白质、生物柴油、甲烷
念珠藻(Nostoc)	蓝藻门	固氮、产氢
鱼腥藻(Anabaena)	蓝藻门	生产藻胆蛋白
裸藻(Euglena)	裸藻门	指示水体环境的健康状况

2 微藻在废水中培养的问题

微藻在废水中的高密度培养工艺如图1所示。常见营养方式有3种(表2^[3,6-7])。混养培养的生物物质产量大于自养培养和异养培养的总和。但是,

收稿日期:2016-03-11;修回日期:2016-09-11

基金项目:国家自然科学基金(21176227,U1404519)

作者简介:张权(1990-),男,硕士生;常春(1973-),男,博士,副教授,研究方向为生物质能源化工,通讯联系人, chunchang@zzu.edu.cn。

和异养培养一样,因需要严格的无菌条件和外加碳源而使培养成本很高。自养培养成本不高,但是培养密度较低。废水的高色度会抑制微藻对光的吸收。例如梅帅^[8]用沼液和 BG11 混合培养基培养小球藻,结果发现,当沼液比例达到 75% 时小球藻的生长受到了抑制。同时,废水成分的复杂、不稳定会降低微藻的培养密度。所以必须从微藻在废水中高密度培养工艺的各个方面入手来解决问题。



图 1 微藻在废水中的高密度培养工艺

表 2 微藻营养方式的比较

培养方式	无菌条件	外加碳源	培养密度	适合藻种
自养培养	不严格	不需外加碳源	低	几乎所以藻类
异养培养	严格无菌条件	葡萄糖、醋酸等	高	螺旋藻、小球藻、杜氏藻、红球藻等少数藻类
混养培养	严格无菌条件	葡萄糖、醋酸等	最高	螺旋藻、小球藻、杜氏藻、红球藻等少数藻类

3 微藻在废水中高密度培养工艺

3.1 筛选优良藻种

藻种的筛选是实现高密度培养的重要环节。筛选藻种时主要考虑微藻对废水的耐受性及其生物质含量。在富含油脂和碳水化合物的微藻中,小球藻和栅藻最适宜在多种类型的废水中生长。例如小球藻在经过 5 倍稀释的养猪废水中培养一段时间后,可以利用废水中 70% 的 COD 和 90% 的氨氮,同时生物量可以达到 3.96 g/L,碳水化合物的质量分数达到 58%^[9]。廖利民^[10]用城市生活污水培养富油栅藻,结果栅藻生物质产量达到了 1.08 g/L。在富含蛋白质的微藻中,螺旋藻最为常见。例如在体积分数为 10% 的厌氧发酵后的养猪废水中培养螺旋藻,其对废水中 COD、氨氮、总磷的利用率分别在 23%、92%、67% 左右,蛋白质量分数达到 55%^[5]。

废水中培养微藻往往需要采用驯化诱变技术来获得更加优良的藻株。诱变方法有物理诱变,如紫外线(UV)、激光、X 射线、γ 射线、快中子等以及化学诱变如甲基磺酸乙酯(EMS)、亚硝基胍(NTG)等。其中,UV 诱变和 EMS 诱变最为常见。但是 EMS 诱变效果比 UV 法好。例如刘宪夫^[11]用 UV 照射对小球藻进行诱变,结果正突变率达到了 16.7%,诱变株油脂质量分数提高了 5.63%;当用

(上接第 36 页)

[11] 蒋文俊, 方劲, 李哲器, 等. 可膨胀石墨的制备及谱学特性研究[J]. 功能材料, 2010, 41(2): 200-203.

[12] 赵国刚, 李爽, 付长璟. 膨胀石墨的制备与表征[J]. 黑龙江科技大学学报, 2014, 24(5): 492-495, 499.

[13] 苗艳, 苏永庆, 薛婷婷, 等. 膨胀石墨电极的研究和应用进展[J]. 炭素技术, 2012, 31(6): 48-51.

[14] 陈小伟. 低污染可膨胀石墨的制备及稳定性研究[D]. 青岛: 青岛大学化学化工与环境科学学院, 2009.

[15] 冷静. 低温低能耗可膨胀石墨的制备及其应用[D]. 南京: 南京理工大学化工学院, 2009.

[16] 郝宏艳, 张荣荣, 杨秀丽, 等. 高倍率膨胀石墨的制备及性能表征[J]. 材料科学与工程学报, 2014, 32(5): 716-720.

[17] Chen Y P, Li S Y, Luo R Y, et al. Optimization of initial redox potential in the preparation of expandable graphite by chemical oxidation[J]. New Carbon Materials, 2013, 28(6): 435-441.

[18] 吴会兰, 张兴华. 低温可膨胀石墨的制备[J]. 非金属矿, 2011, 34(1): 26-28, 32.

[19] 苏晖. 柔性石墨导热性的研究[D]. 武汉: 武汉理工大学资源与环境工程学院, 2010.

[20] 赖奇. 微波膨胀对石墨性能的影响[J]. 非金属矿, 2009, 32

(3): 33-34.

[21] Afanasov I M, Shornikova O N, Kirilenko D A, et al. Graphite structural transformations during intercalation by HNO₃ and exfoliation[J]. Carbon, 2010, 48(6): 1862-1865.

[22] 罗立群, 谭旭升, 田金星. 石墨提纯工艺研究进展[J]. 化工进展, 2014, 33(8): 2110-2116.

[23] Li J, Li J, Li M. Ultrasound irradiation prepare sulfur-free and lower exfoliate-temperature expandable graphite[J]. Materials Letters, 2008, 62(14): 2047-2049.

[24] Ying Z, Lin X, Qi Y, et al. Preparation and characterization of low-temperature expandable graphite[J]. Materials Research Bulletin, 2008, 43(10): 2677-2686.

[25] 田金星, 李春修. 无硫高抗氧化性膨胀石墨的制备[J]. 化工装备技术, 2005, 26(1): 69-71.

[26] 赵纪金, 李晓霞, 郭宇翔, 等. 分步插层法制备高倍膨胀石墨及其微观结构[J]. 光学精密工程, 2014, 22(5): 1267-1273.

[27] 魏旭, 李红莉, 王雄彪, 等. 高倍率可膨胀石墨的制备及表征[J]. 广州化工, 2014, (6): 76-78, 121.

[28] 郭垒, 张大志, 徐铭. 低温易膨胀石墨的制备工艺研究[J]. 非金属矿, 2011, 34(4): 29-31.

[29] 周丹凤. 低温可膨胀石墨的制备研究[D]. 武汉: 武汉理工大学资源与环境工程学院, 2012. ■

EMS 对小球藻进行诱变时,正突变率达到了 40%, 诱变株油脂质量分数提高了 7.29%。有人用 UV 和 EMS 复合的方法对微生物进行诱变,结果复合效果更好。例如卞承荫等^[12]用 UV、EMS 以及 UV 和 EMS 联合的方法对枯草芽孢杆菌进行诱变,结果复合诱变效果是 UV 诱变的 3 倍,是 EMS 诱变的 1.8 倍。

3.2 选择合适废水培养基

将废水用作微藻生长的培养基不仅能够降低微藻培养成本,而且对废水的净化也具有重要意义。根据来源不同,常见废水可分为生活废水、工业废水、畜牧养殖业废水(表 3^[4,13-15])3 种。不同类型的废水成分差别很大。即使同种废水取水工段或时间不同,废水成分也会有所差别。废水中碳源、氮源、磷源以及氮磷之间的比例会严重影响微藻的生长^[16]。所以,微藻在不同废水中的培养密度也不同。

表 3 不同类型废水的特征

废水类型	废水特点	实例
生活废水	氮磷 COD 含量以及微藻培养密度一般较低	生活污水、餐饮废水、粪便废水等
工业废水	大部分成分复杂,氮磷 COD 含量高,色度高,有害物质较多,一般需经过深度处理	乙醇废水、印染废水、造纸厂废水、糖蜜废水、屠宰场废水等
畜牧养殖	营养物质含量非常丰富,比较适合微藻培养,微藻培养密度较高	猪场养殖废水、奶牛场废水、水产养殖废水等

废水的选择必须综合考虑多个因素。首先,需要考虑培养微藻的用途。例如用于生产食品类产品时必须选择不含对人体有潜在危害物质的废水;用于生产生物柴油时往往选择能促进微藻细胞内脂类积累的废水。其次,必须考虑因选择某种废水而增加的成本。例如利用生活废水培养微藻,虽然培养密度较低,但是生活废水来源广泛、预处理成本低,所以仍具有很大的应用前景^[4]。最后,要尽可能选择一些绿色产业所产生的废水。例如纤维乙醇属于绿色产业。所以,尽管粮食乙醇废水能获得比纤维乙醇废水高的培养密度,但是选择纤维乙醇废水更符合绿色发展理念。

废水的高色度会抑制微藻对光的吸收。所以,必须对废水进行预处理。与废水直接排放所采用的标准不同,在对废水预处理时,必须保证处理后废水中的营养物质不能有太大损失以及处理后废水颜色

不能太深^[17]。所以必须找出废水预处理和营养物质损失之间的平衡点。但废水种类多、成分复杂,会极大地增加寻找平衡点的工作量。

3.3 开发高效光生物反应器

光生物反应器(PBR)是微藻的培养系统。主要有开放式(图 2)和封闭式 2 类。常见封闭式 PBR 有柱状、管式、板式 3 种[如图 3 中(a)、(b)、(c)所示]。开放式培养池培养密度一般较低^[18],封闭式 PBR 培养密度相对较高。Huang 等利用板式光生物反应器培养小球藻,优化条件后生物量提高了 24.7%^[15]。不同反应器各有优缺点,如表 4 所示。柱状和管式 PBR 放大相对较容易,但是在以太阳为光源时光的利用率较低,能耗也较高;板式 PBR 光程较小,在以色度较高的废水为培养基时更适宜微藻的高密度培养。但无论哪种反应器都存在培养密度和培养成本不协调的问题。所以必须开发高效的光生物反应器。

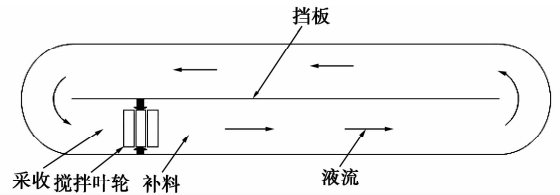


图 2 开放式跑道池

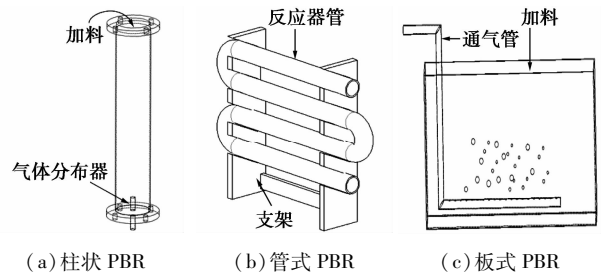


图 3 常见封闭式 PBR

表 4 各种反应器的比较

项目	开放式培养池	封闭式 PBR		
		柱状 PBR	管式 PBR	板式 PBR
比表面积	小	较大	较大	最大
培养条件	不可控	可控	可控	可控
光程大小	较大	大	大	小
培养密度	低	较高	较高	高
能否高密度培养	难	难	难	有望高密度培养
放大难易	易放大	易放大	易放大	难放大
培养成本	低	高	高	高
目前现状	已大规模应用	多用于实验室	有放大培养的报道	有放大培养的报道

开发高效 PBR 需要考虑到反应器的比表面积、混合传质效果、反应器的光程大小以及反应器放大的难易程度。板式 PBR 拥有最大的比表面积和较小的光程,能够更大地利用能,因此比较适合废水培养微藻。反应器的混合传质主要是通过通气实现的。添加隔板不仅能够增强传质效果,还能加强微藻培养过程中的“闪光效应”。反应器的放大难易程度决定了微藻培养能否实现工业化,受很多因素的影响,例如反应器的高径比、挡板以及升流区与降流区的比例等。而板式 PBR 因厚度限制,其放大了需要考虑的问题。本课题组设计出了一种柱状 PBR(图 4),该反应器内部有一个导流筒,气体从反应器底部通入后经气体分布器均匀地从反应器底部向上运动,从而带动培养液在反应器与导流筒之间循环流动。同时导流筒内安装有静态混合元件,极大地增强了藻液的混合传质。通过实验发现小球藻在低色度纤维乙醇废水中的生物量达到了 1.98 g/L。为了处理高色度的纤维乙醇废水,在现有反应器的基础上又改良设计了一种装有静态混合元件的气升式平板 PBR,如图 4 所示。

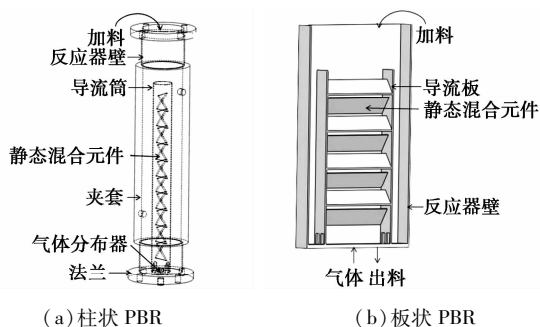


图 4 装有静态混合元件的气升式 PBR

3.4 优化培养条件

3.4.1 优化培养方式

微藻的培养方式主要有分批培养、流加培养、半连续培养和连续培养。不同培养方式对微藻生长、生物质积累和产率有很大的影响。流加培养可及时补充因微藻生长而消耗的营养物质,所以培养效果比分批培养好。例如 Liu 等^[19]通过流加培养的方式培养小球藻,结果脂质产量是分批培养的 3.9 倍。半连续培养可有效地解决培养液老化的问题,所以培养效果也比分批培养好^[20]。连续培养需要不停地更换培养基以及培养周期较长,在实际生产中并不多见。所以流加培养或半连续培养更适合微藻的高密度培养。另外,部分微藻与细菌之间能产生“协同效应”^[21]。培养密度往往比单一培养高,结合流加培养或是半连续培养可能会得到更好的培养

效果。

3.4.2 优化培养温度和 pH

温度是影响藻细胞内有关代谢酶的主要因素。所以,不同藻类有不同的生长代谢温度。例如曾蓓蓓等^[22]研究发现多芒藻、绿球藻 SHOU-F93、月牙藻、绿球藻 SHOU-F124 的最适生长温度分别为 29.5、19.3、21.5、24.3℃。

pH 不仅改变藻细胞内酶的活性,而且影响藻细胞表面所带的电荷以及培养液中营养物质的离子化程度。和温度一样,不同微藻有不同的生长 pH。例如马迪迪等研究发现,铜绿微囊藻在不同 pH 条件下生长状况不同,在 pH 为 8.0 时生长状况最好^[23],梅帅^[8]研究发现小球藻在 pH 为 6.0 时生长状况最好。

3.4.3 优化光照和扰动

光是微藻进行光合作用的必要条件。其中,光照强度和光暗周期是影响微藻生长的重要因素。光照强度存在光补偿点和光饱和点,低于光补偿点或高于光饱和点都会抑制微藻生长。微藻光合作用并非一直都需要光照,而是分为光反应和暗反应 2 个阶段。研究表明,微藻在光照区和黑暗区之间循环频率越大,光合作用效果越好。光照条件因藻种以及废水色度的不同有所差别。例如小球藻生长的最适光照强度为 42 ~ 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,栅藻为 106 ~ 350 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,杜氏藻为 80 ~ 160 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,布朗葡萄藻为 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 左右,螺旋藻为 166 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 左右,雨生红球藻为 80 ~ 120 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ^[24]。

扰动能够加强微藻与培养基之间的传质,同时还能防止培养过程中微藻的沉淀。通气和搅拌都能够产生扰动,但是通气产生的扰动比搅拌温和。所以更适合微藻的高密度培养。例如程海翔等^[25]通过对比发现,通气能够明显促进于栅藻细胞的生长、叶绿素积累和油脂生产。微藻的高密度培养过程中,往往需要同时提供光照和扰动。在细胞超高密度培养中,必须满足窄光程(约 1 ~ 2 cm)、强光源[大于 2 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]、及时去除微藻代谢过程中产生的废弃抑制物以及合适的扰动等条件。窄光程是增加微藻在光照区和黑暗区之间循环的最有效方法。

4 总结和展望

微藻因其生长速度快、生物质含量高、培养时占地面积小等优点而成为生物燃料和一些高附加值产

品的生产原料。微藻培养和废水处理的耦合能在一定程度上降低能源和环境压力,是一项极具发展前景的绿色产业。为实现微藻的高密度培养,可以根据废水类型选择合适的藻种,然后通过驯化诱变等方法获得优良藻株。在对废水进行选择时可以选择一些营养物质含量高、有害物质含量少的废水。同时也可以考虑营养物质含量高的废水与营养物质含量低的废水相结合使用。预处理时需要考虑预处理后营养物质的损失和废水色度去除之间的平衡,所以必须通过大量的试验来积累数据。然后在最优培养条件下很有希望实现微藻在废水中的高密度培养。要实现微藻在废水中高密度培养的规模化发展,可以:①结合基因工程等高新生物技术筛选能在多种废水中高密度培养的超级藻株;②建立不同废水详细信息的数据库,使培养基的选择更加方便、高效;③开发高效易于放大的光生物反应器,最后运用技术经济分析和生命周期分析等方法系统地评估微藻高密度培养产业化的成本。

参考文献

- [1] 李斐,白净,常春,等.微藻生物柴油成本控制技术进展[J].现代化工,2015,35(5):16-20.
- [2] Guiry M D. How many species of algae are there? [J]. Journal of Phycology,2012,48(5):1057-1063.
- [3] Liu J, Huang J, Fan K W, et al. Production potential of *Chlorella zofingiensis* as a feedstock for biodiesel[J]. Bioresource Technology,2010,101(22):8658-8663.
- [4] Xu X, Shen Y, Chen J. Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* for C/N/P removal and lipid production[J]. Electronic Journal of Biotechnology,2015,18(1):46-50.
- [5] Cheunbarn S, Peerapompisal Y. Cultivation of *Spirulina platensis* using anaerobically swine wastewater treatment effluent[J]. International Journal of Agriculture and Biology,2010,12(4):586-590.
- [6] Shen Y, Yuan W, Pei Z, et al. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid Production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2010,160(6):1674-1684.
- [7] 刘晃,吴凡.一种微藻封闭式兼养培养法及其培养系统:CN,201410254108.3[P].2014-08-13.
- [8] 梅帅.沼液污水培养产油小球藻技术研究[D].北京:中国农业机械化机械化学研究院,2014.
- [9] Wang Y, Guo W, Yen H, et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production [J]. Bioresource Technology,2015,198:619-625.
- [10] 廖利民.基于微藻培养技术的废水资源化利用研究[D].包头:内蒙古科技大学,2015.
- [11] 刘宪夫.高产油小球藻的诱变育种及其油脂提取研究[D].南京:南京农业大学,2013.
- [12] 卞承荫,黄舒婷,潘大仁,等.利用紫外线和EMS诱变选育高产枯草芽孢杆菌[J].福建农林大学学报:自然科学版,2014,43(3):312-315.
- [13] 高保燕,沈丹丹,何思思,等.富油微藻——尖状栅藻生物质生产与奶牛场废水处理相结合的效果研究[J].可再生能源,2014,32(5):673-679.
- [14] Yang L, Tan X, Li D, et al. Nutrients removal and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch wastewater and alcohol wastewater [J]. Bioresource Technology,2015,181:54-61.
- [15] Mischopoulou M, Naidis P, Kalamaras S, et al. Effect of ultrasonic and ozonation pretreatment on methane production potential of raw molasses wastewater [J]. Renewable Energy,2016,96:1078-1085.
- [16] Wang J, Qiu L, Meng S, et al. Influences of Nitrogen-phosphorus ratio on the growth and competition of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena* sp. strain PCC [J]. Agricultural Science & Technology,2015,16(8):1757-1762.
- [17] Krustok I, Odlare M, Truu J, et al. Inhibition of nitrification in municipal wastewater-treating photobioreactors: Effect on algal growth and nutrient uptake [J]. Bioresource Technology,2016,202:238-243.
- [18] Castine S A, Paul N A, Magnusson M, et al. Algal bioproducts derived from suspended solids in intensive land-based aquaculture [J]. Bioresource Technology,2013,131:113-120.
- [19] Liu J, Huang J, Fan K W, et al. Production potential of *Chlorella zofingiensis* as a feedstock for biodiesel [J]. Bioresource Technology,2010,101(22):8658-8663.
- [20] 蒋礼玲,张亚杰,范晓雷,等.不同培养模式对能源微藻生物质产率的影响[J].可再生能源,2010,28(2):83-86.
- [21] Lananan F, Abdul Hamid S H, Din W N S, et al. Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing effective microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.) [J]. International Biodeterioration & Biodegradation,2014,95:127-134.
- [22] 曾蓓蓓,黄旭雄,危立坤,等.4株淡水微藻的适宜温度、光照强度及其细胞组成[J].上海海洋大学学报,2014,23(6):856-862.
- [23] 李永富,孟范平,李祥雷,等.光照对光生物反应器中微藻高密度光自养培养的影响[J].中国生物工程杂志,2013,33(2):103-110.
- [24] Dogaris I, Welch M, Meiser A, et al. A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation [J]. Bioresource Technology,2015,198:316-324.
- [25] 程海翔,邵瑜,李建辉,等.曝气对栅藻 (*Desmodesmus* sp. CHX1) 细胞生长和油脂生产的影响[J].中国油料作物学报,2014,36(6):808-814. ■