

The Research of Cultivating *Chlorella vulgaris* as Biodiesel Feedstock by Using Municipal Wastewater

Jianqiang Liu^{1,2}, Yuhuan Liu^{1,2}, Qian Liu^{1,2}, Roger Ruan^{1,2*}, Jinsheng Zhang^{1,2}, Hong Peng^{1,2}, Xiaodan Wu¹

1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, China, 330047

2. Engineering Research Center for Biomass Conversion, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang, China, 330047

1. liujianqiang021@163.com, 2. liuyuhuan@ncu.edu.cn

Abstract: The objective of present research was to investigate the technical feasibility of using Nanchang municipal wastewater as culture media for large-scale cultivation of oil-rich microalgae to produce bio-diesel and treating the wastewater simultaneously. Collecting the municipal wastewater without any treatment from QingShanhu sewage plant as the culture medium for *Chlorella vulgaris* growth. The experiment monitored the specific growth rate and biomass yield of *Chlorella vulgaris* and associated ammonia nitrogen, total phosphorous, COD, TSS, and VSS removal during 10 days. The experimental results showed that the level of nutrients influenced algae growth significantly. The growth rate of *Chlorella vulgaris* reached a maximum of OD_{680nm} 2.856 after 8 days culturing and the algae biomass accumulation rate reached a maximum of 0.0100 $gdw.L^{-1}.day^{-1}$. The oil content of *Chlorella vulgaris* was 180 $mg g^{-1}$ in dry biomass weight. The removal rate of NH_4^+-N , TP and COD was 0.6123 $mg.L^{-1}.day^{-1}$, 0.0540 $mg.L^{-1}.day^{-1}$, and 2.6387 $mg.L^{-1}.day^{-1}$. The TSS and VSS removal rate were 0.0100 $mg.L^{-1}.day^{-1}$ and 0.0061 $mg.L^{-1}.day^{-1}$ respectively.

Keywords: *Chlorella vulgaris*; biomass production; oil yield; biodiesel; municipal wastewater treatment; nutrient removal

利用市政污水培养小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 作为生物柴油原料研究

刘建强^{1,2},刘玉环^{1,2},刘茜^{1,2} 阮榕生^{1,2*}, 张锦胜^{1,2}, 彭红^{1,2}, 巫小丹¹

1. 南昌大学生物质转化教育部工程研究中心, 江西 南昌 330047

2. 南昌大学食品科学与工程国家重点实验室, 江西 南昌 330047

1. liujianqiang021@163.com, 2. liuyuhuan@ncu.edu.cn

摘 要: 此项研究旨在探讨利用南昌市市政污水来规模化培养富油微藻以生产生物柴油, 同时达到净化污水目标的技术可行性。取南昌市青山湖污水处理厂未经任何处理的市政污水作为普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 生长的培养液。实验监测了普通小球藻在市政污水中连续培养 10 天的特定生长率、生物质产量以及与之相关的市政污水中氨氮 (NH_4^+-N)、总磷 (TP)、COD、总悬浮固体 (TSS) 和挥发性悬浮固体 (VSS) 的去除情况。实验结果显示营养物质的水平显著地影响了普通小球藻的生长。普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 的生长率在培养 8d 后达到最大, 此时 OD_{680nm} 为 2.856, 总的生物质产量日均最大积累速率为 0.0100 $g.L^{-1}.day^{-1}$, 油脂含量为干重的 18%(w/w)。培养 10 天内氨氮、总磷和 COD 的去除率分别为 50.0%、32.1%和 26.0%。总悬浮固体 (TSS) 和挥发性悬浮固体 (VSS) 的日平均去除速率分别为 0.0100 $g.L^{-1}.day^{-1}$ 和 0.0061 $g.L^{-1}.day^{-1}$ 。

关键词: 普通小球藻; 生物质产量; 油脂产量; 生物柴油; 市政污水处理; 营养物质去除

基金项目: 江西省自然科学基金 2008GZH0047; 江西省产业化关键技术攻关项目 (2007BN12100); 长江学者创新团队发展计划 IRT0540; 中国江西留学人员创业园专项 (2008718)

能源是保持经济发展, 维系社会生活必不可少的物质前提, 又是现实的重要污染源, 解决

好能源可持续发展战略问题是实现社会经济可持续发展的重要环节。近年来快速发展的生物质燃料工业对人类食物和动物饲料（主要是大豆和玉米）的供应以及农业用地带来了巨大的压力。为了维持生物燃料工业的可持续发展，新的非食品或非食用性生物质原料必须得到补充和开发^[1]。微藻是能够在海洋和淡水环境中快速生长的光合生物，微藻的油脂含量和生物质生产率远高于陆生植物（如大豆、玉米等）^[2-6]几倍甚至几十倍。且不会占用人类食物和饲料生产用耕地^[8-11]。

市政废水是城市居民生活废水、工业废水等的混合污水，含有大量藻类生长所需的氮、磷以及其它可被藻类利用的营养物质，而市政废水的化学处理成本十分昂贵且在技术上面临许多挑战，因此，利用微藻处理污水目前正成为一个可供选择的方法，它提供了一个可同时生产用于不同目的的潜在有价值生物质的三级生物处理方法^[12]，在改善水质的同时生产了可再生的能源，创造了一种双赢局面，提高了微藻生物柴油的经济可行性。本实验选用普通小球藻（*Chlorella vulgaris*）作为市政污水处理和生物柴油生产的候选藻种，探讨普通小球藻（*Chlorella vulgaris*）在南昌市政污水中的生长情况、生物质和油脂产率及市政污水氮磷等营养物质的去除情况。

1. 材料与方法

1.1 藻株

本项研究选用普通小球藻（*Chlorella vulgaris*），由中国科学院水生研究所提供。

1.2 藻类培养基

人工和市政污水培养基用在这项研究中。人工培养基 BG11 含如下成分： NaNO_3 , 1.5g/L; $\text{K}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.04g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.036g/L; 柠檬酸, 0.006 g/L; 柠檬酸铁铵, 0.006 g/L; EDTA, 0.001 g/L; Na_2CO_3 , 0.02 g/L。需添加的微量元素主要成分包括如下： H_3BO_3 , 0.00286g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.00181g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.000222g/L; $\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00039g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.000079g/L; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.000049g/L。

市政污水培养基：本实验使用的市政污水取自南昌市青山湖污水处理厂，该厂日处理污水 100 万吨，未作任何处理的市政污水主要由 60-70% 的工业废水和 30-35% 的城市居民生活污水组成。由于市政污水的

成分随采集时间的变化而变化，因此污水样应采集在一个大的容器中，本实验所用污水系采样时间介于 2010 年 5 月 19 日至 2010 年 5 月 26 日之间的混合样本。实验用的水样要求先贮存在 4℃ 的环境下。

1.3 藻类培养

普通小球藻（*Chlorella vulgaris*）在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、4000-4500lx 光强条件下连续光照培养。一体积按 20% 的藻种接种量先接种到 100ml BG11 培养基中并扩增到 500ml，为 2L 市政污水培养基锥形瓶培养提供足够的藻种，然后按 20% 接种量再接种到 2000ml 市政污水培养基中培养，每天摇匀 2-3 次。取另一个 2L 的锥形瓶装入 2L 的市政污水在相同条件下培养，作为空白对照。

1.4 水质特性

本实验水质指标主要测量总氮（TN）、氨氮（ NH_4^+-N ）、总磷（TP）、磷酸态磷（ $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ ）、化学需氧量（COD）、生化需氧量（ BOD_5 ）、总悬浮固体（TSS）、挥发性悬浮固体（VSS）以及一些微量元素钴（Co）、铜（Cu）、钼（Mo）、锌（Zn）、锰（Mn）、硼（B）的含量等参数。

1.5 实验分析方法

光密度（OD）用 UV9100 系列紫外可见分光光度计在 680nm 下测量^[1]。市政污水培养基的 pH 变化用 Mettler Toledo 320-S pH 计测量，并适时调整到 7.5 左右。总氮（TN）、氨氮（ NH_4^+-N ）、总磷（TP）、化学需氧量（COD）用 GB-2000 型多参数水质测定仪测定，磷酸态磷（ $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ ）用钼锑抗分光光度法测定，生化需氧量（ BOD_5 ）用 GBT 7488-87 水质—五日生化需氧量（ BOD_5 ）的测定方法（稀释与接种法）测定，总悬浮固体（TSS）、挥发性悬浮固体（VSS）用 CJ/T-1999 城市污水悬浮固体的测定—重量法测定，微量元素钴（Co）、铜（Cu）、钼（Mo）、锌（Zn）、锰（Mn）、硼（B）的含量用原子吸收分光光度法测定。

总的生物质干重用如下方法确定^[1]：沃特曼玻璃（2.5cm）过滤器在 80℃ 烘箱内经 4h 干燥后在分析天平上称重至小数点后四位；然后用一微孔过滤装置过滤 20ml 藻液直至过滤器干了为止；过滤器然后用 10ml 的 0.65M 铵溶液去除过量的盐并在 80℃ 下干燥 4h 后称重至 0.0001g。

总藻油含量的确定用有机溶剂石油醚索氏提取的

方法确定：取干的藻样 3-4g 在索氏提取器中用 300ml 石油醚提取，样品以每秒 3-4 滴的冷凝率提取 3 小时。提取油脂后的藻样在 80℃ 下干燥 4h 至恒重。油脂的含量通过质量差确定。

总悬浮固体（TSS）和挥发性悬浮固体（VSS）被检测用于计算生物质的产量^[7]。

2. 结果与讨论

2.1 市政污水特性

表 1 和表 2 列出了南昌市政污水的一般特性和微量元素含量。与 BG11 培养基相比较，南昌市政污水有更高的氨氮（ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ）含量，但总氮（TN）、总磷（TP）含量不足，N/P 比率不平衡，微量元素主要缺乏 Co、Mo、Mn 和 B。

Table 1. Characteristic of the Nanchang municipal wastewater (mg/L)

表 1 南昌市政污水特性 (mg/L)			
参数	浓度 / (mg/L)	参数	浓度 / (mg/L)
COD	101.491	$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	1.208
BOD_5	45.647	TP	1.682
TSS	120.000	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	12.246
VSS	80.000	TN	13.642

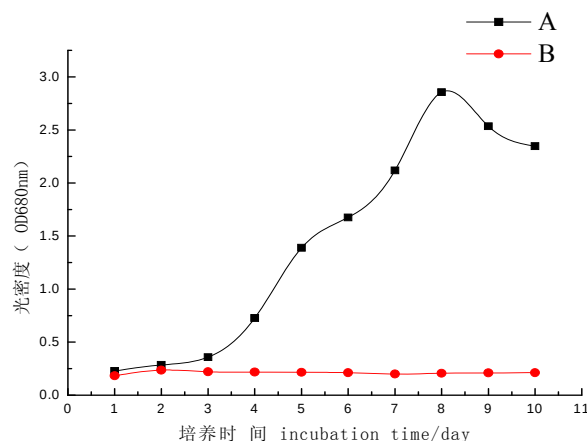
Table 2. The soluble micro-nutrient contents in the Nanchang municipal wastewater (mg/L)

表 2 南昌市政污水中溶解性微量营养素含量 (mg/L)			
微量元素	浓度 / (mg/L)	微量元素	浓度 / (mg/L)
钴 (Co)	<0.007	锌 (Zn)	0.065
铜 (Cu)	0.021	锰 (Mn)	0.103
钼 (Mo)	0.009	硼 (B)	<0.006

2.2 普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 在市政污水中的生长曲线

普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 在南昌市政污水中的生长曲线用光密度 (OD_{680}) 值显示在图 1 中。用一条仅有市政污水的基线作为控制曲线，因为市政污水在生长曲线中也占有一定的光密度 (OD_{680}) 值。市政污水在接种普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 后最初的 48 小时内光密度 (OD_{680}) 值没有明显的增加，普通小球藻处于对市政污水的适应期，接种 72 小时后小球藻细胞开始逐渐增殖，此时市政污水的 OD_{680} 值为 0.357，在培养到第 8 天后小球藻细胞密度达到最大， OD_{680} 值达 2.856，增殖最快时间段是在第 4 天到第 5

天和第 7 天到第 8 天之间，第 8 天后由于氮磷的消耗小球藻的生长受到影响增殖速率开始下降。



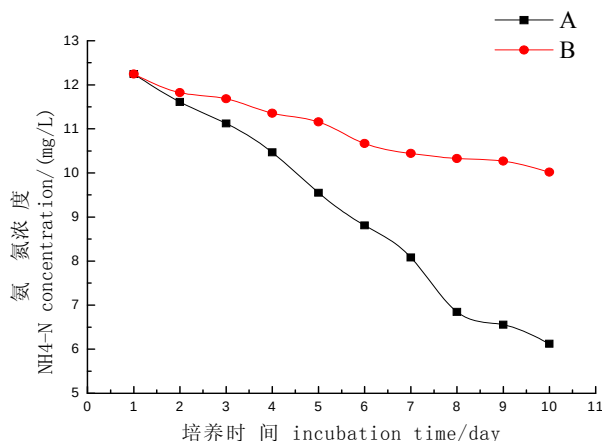
(A) *Chlorella vulgaris* in municipal wastewater ; (B) municipal wastewater

Figure 1. The growth curve of *Chlorella vulgaris* in municipal wastewater medium

(A) 普通小球藻在市政污水中;(B) 市政污水
图 1.普通小球藻在市政污水培养基中的生长曲线

2.3 营养物质去除和生物质产量

氮和磷是市政污水中两种主要的成分，也是支持藻类的生长的主要营养物质。普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 接种到南昌市政污水中培养 10 天后，污水中的氨氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、总磷 (TP) 的变化曲线如下图 2 和图 3 所示。市政污水中的氮磷浓度随着普通小球藻在污水中培养时间的延长而逐渐的下降。普通小球藻在南昌市政污水中培养 10 天后市政污水中的氨氮和总磷含量分别由最初的 12.246mg/L 和 1.682mg/L 下降到 6.123mg/L 和 1.142mg/L,氨氮和总磷的去除率分别为 50.0%和 32.1%。

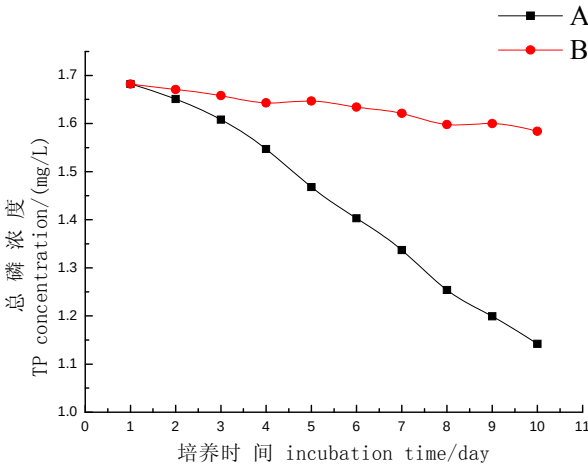


(A) municipal wastewater with *Chlorella vulgaris*; (B) municipal wastewater

Fig. 2. Changes in ammonia nitrogen *Chlorella vulgaris* growth in municipal wastewater medium

(A) 有小球藻的市政污水; (B) 市政污水

图 2. 市政污水培养基在普通小球藻培养过程中的氨氮变化



(A) municipal wastewater with *Chlorella vulgaris*; (B) municipal wastewater

Fig. 3. Changes in total phosphorus *Chlorella vulgaris* growth in municipal wastewater medium

(A) 有小球藻的市政污水; (B) 市政污水

图 3. 市政污水培养基在普通小球藻培养过程中的总磷变化

普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 接种到南昌市市政污水中培养 10 天后, 市政污水营养物质去除率和生物质产量如下表 3 所示。

Table 3. Nutrient removal rate of municipal wastewater and biomass yield

表 3. 市政污水营养物质去除速率和生物质产量

项目	数值
COD 去除速率 (mg.L ⁻¹ .day ⁻¹)	2.6387±0.2004
氨氮去除速率 (mg.L ⁻¹ .day ⁻¹)	0.6123±0.0211
TP 去除速率 (mg.L ⁻¹ .day ⁻¹)	0.0540±0.0058
TSS 产量 (g/day)	0.0200±0.0071
VSS 产量 (g/day)	0.0122±0.0063
TSS 产量 (g.L ⁻¹ .day ⁻¹)	0.0100±0.0052
VSS 产量 (g.L ⁻¹ .day ⁻¹)	0.0061±0.0024

——数据是六个重复组的平均值和标准偏差。

由表 3 结果显示普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 还能去除南昌市市政污水中 26.0% 的 COD, 总生物质产量 (TSS) 大约为 0.0100 (干物质) g.L⁻¹.day⁻¹, 易变生物质产量 (VSS) 大约为 0.0061 g.L⁻¹.day⁻¹。

2.4 藻油产量

本实验中的微藻普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*)

在锥形瓶培养达指数生长后期, 采样后测定微藻总干物质含量大约为 0.7678 g.L⁻¹, 油脂含量约为 18%, 小球藻油脂的平均日产量大约为 0.0018 g.L⁻¹.day⁻¹ (表 4)。油脂含量还达不到生物质燃料规模化生产所期望的要求。

Table 4. The total dry biomass and oil content of *Chlorella vulgaris* after 10 days cultivating in municipal wastewater

表 4. 普通小球藻市政污水培养 10 天后总干物质及油脂含量

项目	数值
总干物质含量 (g.L ⁻¹)	0.7678±0.0043
油脂含量 (g.L ⁻¹)	0.1382±0.0022
藻油平均日产量 (g.L ⁻¹ .day ⁻¹)	0.0018±0.0006

——数据是六个重复组的平均值和标准偏差。

3. 结论

研究表明南昌市市政污水中的养分状况相对贫乏。对于微藻生长要求的条件而言, 市政污水中总氮 (TN)、总磷 (TP) 含量不足, N/P 比率不平衡, 微量元素主要缺乏 Co、Mo、Mn 和 B。

普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 能够逐步适应南昌市市政污水的养分条件, 但是 10 天内微藻生物质的日平均积累速度仅为 0.0061 g.L⁻¹.day⁻¹; 藻油平均日积累速度仅为 0.0018 g.L⁻¹.day⁻¹。两项指标均大大低于预期, 达不到藻类生物质燃料规模化生产所期望的要求。

普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 10 天内氨氮和总磷的去除速率分别为 0.6123 mg.L⁻¹.day⁻¹ 和 0.0540 mg.L⁻¹.day⁻¹, 10 天内氨氮和总磷的去除率分别为 50.0% 和 32.1%。总的生物质生产效率为 0.0100 g (干物质) .L⁻¹.day⁻¹, 其中 61% 为易变性生物质, 油脂含量为 18%。10 天内污水中 COD 的去除率为 26.0%。

为了使微藻的繁殖速度能够满足污水排放的速度, 必须采用其它的藻种或多种生物共生组合来适应市政污水中的养分状况相对贫乏的现实, 以获得生物柴油生产所需的大量藻类生物质和油脂。

致 谢

这项研究得到了江西省科技厅, 国家教育部, 南昌大学食品科学与工程国家重点实验室和南昌大学生物质转化工程中心的支持。

References (参考文献)

- [1] Qing-xue Kong, Ling Li, Blanca Martinez, Paul Chen, Roger Ruan. Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production*. Appl Biochem

- Biotechnol, 2010,160(1):9–18.
- [2] Miao X L, Wu Q Y. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. Journal of Biotechnology, 2004, 110 (1):85–93.
- [3] Richmond A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: An overview*. Hydrobiologia, 2004b, 512 (1-3):33–37.
- [4] Ratledge C, Wynn J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms*. Applied Microbiology, 2002, 51:1–51.
- [5] Vasudevan P T, Briggs M. Biodiesel production—Current state of the art and challenges. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35 (5):421–430.
- [6] Behzadi S, Farid M M. Review: Examining the use of different feedstock for the production of biodiesel. Journal of Chemical Engineering, 2007, 2 (5):480–486.
- [7] Min Min, Liang Wang, Yifeng Chen, Yecong Li, Paul Chen, Roger Ruan. Using Wastewater for Mass Microalgae Production as an Energy Crop. An ASABE Meeting Presentation Paper, Grand Sierra Resort and Casino Reno, Nevada ,2009.6.21-6.24.
- [8] Borowitzka M A. Commercial production of microalgae:Ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, 1999, 35:313–321.
- [9] Cronar N J, Fallowfield H J. Effect of nutrient loading and retention tune on performance of high rate algal ponds. Journal of Applied Phycology, 1997,9:301–309.
- [10] Borowitzka M A. Algal biotechnology products and processes matching science and economics. Journal of Applied Phycology, 1992,4(3):267–279.
- [11] Ginzburg B. Liquid fuel (oil) from halophilic algae: A renewable source of nonpolluting energy*. Renewable Energy, 1993,3: 249–252.
- [12] Noûe J, Gilles Laliberte, Daniel Proulx.. Algae and wastewater. Journal of Applied Phycology, 1992,4 (3): 247-254.