DOI:10.12441/spyswjs.20220419004 [文章编号] 1673-1689(2024)07-0133-10

肝素钠生产废水对小球藻生长和营养物去除的影响

何雨晴[1,2] 王红霞[1] 胡 强[3] 韩丹翔[1] 王 岚[1*]

(1. 中国科学院水生生物研究所,湖北 武汉 430072; 2. 中国科学院大学现代农业科学学院,北京 100049;
3. 深圳大学高等研究院,广东 深圳 518000)

摘要:肝素钠生产废水含有丰富的营养物,是潜在的微藻培养基。为探究其培养微藻的可行性,利用不同体积分数(10%~40%)肝素钠生产废水培养 3 株索罗金小球藻 *Chlorella sorokiniana*(编号 GT1、XY3-3、CMBB276),筛选出高耐受性的藻株 CMBB276。探究该藻株在不同体积分数肝素钠生产废水中生长时的营养物去除过程、生化组成以及热值等参数变化,以期筛选出最适废水体积分数。结果表明,随着废水体积分数增加,藻株 CMBB276 的最高细胞密度、总氮(TN)去除率、碳水化合物和脂肪酸质量分数、蛋白质产率逐渐降低,而总有机碳(TOC)与 TN 去除速率以及蛋白质质量分数逐渐增加,TOC 去除率和热值基本保持不变。最终确定最适废水体积分数为 20%,培养结束时藻株 CMBB276 的细胞密度为 6.4×10^7 个/mL,TOC 和 TN 去除率分别为 83.3% 和 63.0%,蛋白质质量分数及产率为 52.5% 和 22.22 mg/(L·d),热值为 20.37 MJ/kg。因此,利用适宜体积分数的肝素钠生产废水培养小球藻能高效净化肝素钠生产废水中的 TOC 和 TN;同时,废水培养的藻株 CMBB276 具有高蛋白质和热值等特征,在资源化利用方面极具潜力。

关键词:肝素钠;生产废水;索罗金小球藻;蛋白质;净化;资源化利用

Effects of Heparin Sodium Production Wastewater on the Growth, Biochemical Compositions, and Nutrients Removal of *Chlorella sorokiniana*

HE Yuqing[1,2] *WANG Hongxia*[1] *HU Qiang*[3] *HAN Danxiang*[1] *WANG Lan*[1*]

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. College of Advanced Agriculture Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Institute for Advanced Study, Shenzhen University, Shenzhen 518000, China)

Abstract: Heparin sodium production wastewater (HSW) is rich in nutrients, making it a potential culture medium for microalgae. To explore its feasibility for microalgal cultivation, three strains of *Chlorella sorokiniana* (GT1, XY3-3, and CMBB276) were cultured in HSW at varying volume fractions (10%~40%), and *Chlorella sorokiniana* CMBB276 with high tolerance to HSW was screened. To determine the optimal volume fraction of wastewater, the author investigated the removal processes of nutrients, along with the variations in biochemical composition and calorific value, during the growth of the strain CMBB276 in HSW at different volume fractions. Results demonstrated that as the wastewater volume fraction increased, the maximum cell density, total nitrogen (TN) removal efficiency, mass fractions of carbohydrates and fatty acids, and protein productivity of CMBB276 gradually decreased, while the total organic carbon (TOC) and TN removal rates and protein mass fraction gradually increased. The TOC removal efficiency and calorific value remained relatively unchanged. The optimal wastewater volume fraction was determined to be 20%. At the end of cultivation, the cell density of CMBB276 was 6.4×10^7 cells/mL, with TOC and TN removal efficiencies of 83.3% and 63.0%, respectively. The mass

基金项目:国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项项目(2019YFD0900302);国家自然科学基金项目(32061133009)。
通信作者:王岚(1983—),女,博士,助理研究员,博士研究生导师,主要从事藻类生物技术研究。E-mail:wanglan@ihb.ac.cn
收稿日期:2022-04-19 **改回日期:**2022-10-19

fraction and productivity of protein was 52.5% and 22.22 mg/(L·d), respectively, with a calorific value of 20.37 MJ/kg. Therefore, cultivating *C. sorokiniana* in HSW at an appropriate volume fraction can efficiently remove TOC and TN from the wastewater, while the cultured CMBB276 strain, characterized by its high protein content and calorific value, holds significant potential for resource utilization.

Keywords: heparin sodium; production wastewater; *Chlorella sorokiniana*; protein; purification;resource utilization

肝素钠作为一种黏多糖硫酸酯类药物，具有抗凝血、降血脂、预防血栓和抗炎等功能，是治疗心血管疾病的主要药物，在临床中已经得到广泛应用[1-2]。肝素钠能促进人类摄食及体质量增加[3]，且在治疗 COVID-19 及其并发症中发挥重要作用[4]。鉴于其极高的临床价值，肝素钠的需求量和产量逐年增加。目前，肝素钠主要通过酶解法从猪或牛的肠黏膜中提取，生产过程中会产生大量废水，仅我国每年就会产生约 220 万 t 肝素钠生产废水[5]。此外，肝素钠生产废水具有高盐（25 000~35 000 mg/L）、高化学需氧量（15 800~25 500 mg/L）、高氨氮（800~24 000 mg/L）、高蛋白质、高色度等特点[6]，是难处理的工业废水之一，处理未达标的废水一旦排放到自然水体中会严重危害周围环境。

目前，肝素钠生产废水因含有较高的盐，会抑制污泥的活性，常规生化处理效果差，因此我国主要采用稀释或脱盐预处理后再絮凝沉淀，之后通过浓缩-焚烧或生物法处理肝素钠生产废水[7]。徐爱荣等先用生活污水和除臭废水混入肠衣废水，调节盐度后，采用升流式厌氧污泥床+水解酸化+接触氧化法处理废水[8]。邱信欣等对污泥进行耐盐驯化提高其在肝素钠生产废水中的活性后，采用气浮-2 级厌氧/好氧+膜生物工艺处理废水[9]。但现有处理技术步骤烦琐，加大了废水处理的成本和难度[5]。目前针对肝素钠生产废水的资源化利用多采用膜过滤、离心等方式回收废水中的悬浮蛋白质，但对废水中营养物的资源化利用较少。侍爱秋将处理后的废水用于水产动物养殖，可减少饲料的使用[10]。Fink 等将肝素钠生产废水作为肥料进行大豆和玉米的种植，可显著提高作物产量。但这些资源化利用方式都具有一定局限性而且占地面积较大[11]。鉴于肝素钠生产废水的特点及处理现状，急需开发新型高效处理工艺，以实现其高效净化及资源化利用。

微藻因生长速度快、光合效率高、环境耐受性强，且富含蛋白质、色素、油脂等高附加值产物而广受关注[12]。20 世纪 50 年代，Oswald 等最早提出使用废水来培养微藻[13]。目前通过废水培养的微藻主要包括绿藻门的小球藻、栅藻、微拟球藻、衣藻和蓝藻门的螺旋藻等。其中，小球藻已经在多种废水中成功培养，如畜禽养殖废水、乳制品加工废水、水产养殖废水和市政污水等。Chen 等利用猪粪废水培养索罗金小球藻 *C.sorokiniana* AK-1，发现在半连续培养条件下积累的蛋白质超过藻种干质量的 60%，且对化学需氧量（chemical oxygen demand，COD）、生物需氧量（biological oxygen demand，BOD）、TN 和总磷（total phosphorus，TP）的去除率达 94% 以上[14-15]。经过生物膜和好氧处理后的乳制品加工废水用于培养索罗金小球藻 *C. sorokiniana* UTEX 1230 后，COD、氨态氮和总凯氏氮（total kjeldahl nitrogen，TKN）的去除率高达 90% 以上，但 PO_4-P 的去除率仅为 49%，并获得质量分数为 54.6% 的高蛋白质藻粉[16]。这些结果表明，索罗金小球藻能够在多种废水中生长；利用废水培养索罗金小球藻，不仅能有效去除废水中的营养物，还能获得高蛋白质藻粉，实现废水的资源化利用。

目前，利用肝素钠生产废水培养微藻鲜有报道。因此，为探究肝素钠生产废水培养微藻的可行性，对肝素钠生产废水资源化利用进行探索。以索罗金小球藻为藻株，研究其在不同体积分数肝素钠生产废水中培养时的生长状况、蛋白质质量分数及对废水中 TOC 和 TN 的处理效果，以期为肝素钠生产废水的净化和资源化利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 *原料与试剂* 肝素钠生产废水：丰润生物科技股份有限公司，废水理化性质见表 1。废水静置 12 h 后取上清液于−80 ℃保存，试验前用无菌水稀释肝素钠生产废水至不同体积分数，试验所用肝素钠生产废水未经灭菌处理。索罗金小球藻 *C. sorokiniana* GT1（GT1）、*C. sorokiniana* XY3-3

（XY3-3）和 *C. sorokiniana* CMBB276（CMBB276）：中国科学院水生生物研究所藻类生物技术和生物能源研发中心藻种库。GT1 和 XY3-3 保存于 BG11 培养基，温度（23±2）℃；CMBB276 保存于改良 Endo 培养基[17]，温度（26±2）℃。冰乙酸、丙酮、硫酸、苯酚、*D*-葡萄糖、三氟乙酸、盐酸（均为分析纯），以及正己烷、甲醇、氯仿（均为色谱纯）：国药集团化学试剂有限公司；十三酸、十五烷：梯希爱（上海）化成工业发展有限公司；C_4~C_{24} 脂肪酸甲酯混标：美国 Sigma Aldrich 公司。

表 1 肝素钠生产废水的理化性质

Table 1 Physicochemical characteristics of heparin sodium production wastewater

指标	参数
TOC	（4 236.6±133.3）mg/L
TN	（1 510.5±49.4）mg/L
盐度	（2.13±0.06）%
pH	8.3±0.0

1.1.2 培养基 BG11 培养基：$NaNO_3$ 1.5 g/L、K_2HPO_4 0.04 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 0.075 g/L、$CaCl_2·2H_2O$ 0.036 g/L、柠檬酸 0.006 g/L、柠檬酸铁铵 0.006 g/L、Na_2EDTA 0.001 g/L、Na_2CO_3 0.02 g/L、H_3BO_3 2.86 mg/L、$MnCl_2·4H_2O$ 1.86 mg/L、$ZnSO_4·7H_2O$ 0.22 mg/L、$Na_2MoO_4·2H_2O$ 0.39 mg/L、$CuSO_4·5H_2O$ 0.08 mg/L、$Co(NO_3)_2·6H_2O$ 0.05 mg/L；改良版 Endo 培养基：葡萄糖 30 g/L、KNO_3 3 g/L、KH_2PO_4 1.2 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 1.2 g/L、柠檬酸三钠 0.2 g/L、$CaCl_2·2H_2O$ 0.105 g/L、$FeSO_4·7H_2O$ 0.016 g/L、EDTA 0.002 1 g/L、H_3BO_3 2.86 mg/L、$ZnSO_4·7H_2O$ 0.222 mg/L、$MnCl_2·4H_2O$ 1.81 mg/L、$Na_2MoO_4·2H_2O$ 0.021 mg/L、$CuSO_4·5H_2O$ 0.07 mg/L。

1.2 仪器与设备

JLBWW-T8T12F 型光照生物培养架：上海伽英公司；ZHJH-C115B 型超净工作台：中国智诚公司；CX31RTST 型普通显微镜：日本 Olympus 公司；Freezer 12 型真空冷冻干燥机：美国 Labconco 公司；ProQuarto 型多参数水质分析仪：美国 YSI 公司；TOC-L CPH/CPN 型总有机碳分析仪：日本 Shimadzu 公司；PE204E 型 CHNS 元素分析仪：美国 PerkinElmer 公司；DR 6000 型紫外分光光度计：美国 Hach 公司；7890B 型气相色谱质谱联用仪：美国 Agilent 公司。

1.3 方法

1.3.1 藻种筛选 在 250 mL 锥形瓶中分别加入 120 mL 不同体积分数（10%、20%、30% 和 40%）的肝素钠生产废水；将处于对数生长期的索罗金小球藻 XY3-3、GT1 和 CMBB276 用无菌水清洗 3 次，洗去残存培养基后，按照初始细胞密度 $5×10^6$ 个/mL 分别接种至以上 4 种体积分数的废水中，培养 14 d。每个处理设置 2 个重复，每天手动摇晃数次。培养条件：温度（23±2）℃，白光，光强度为 100 μmol/（m^2·s）。在 1、2、4、6、8、10、12、14 d 取样 2 mL 用于细胞计数。

1.3.2 水质理化指标测定 分别在 2、6、10、14 d 取 5 mL 索罗金小球藻 CMBB276 用于水质理化指标测定。

1.3.3 微藻生长测定 利用细胞密度反映微藻生长情况。使用血细胞计数板在普通显微镜下测定细胞数，根据 CMBB276 生物量与细胞密度之间的线性关系，按公式（1）~（2）计算生物产率。

$$N=\frac{X}{1\times10^8} \quad (1)$$

式中：

N——微藻生物量，mg/L；

X——微藻细胞密度，个/mL。

$$B=\frac{N_t-N_0}{t-t_0} \quad (2)$$

式中：

B——微藻生物产率，mg/（L·d）；

N_0——试验前微藻生物量，mg/L；

N_t——第 t 天微藻生物量，mg/L；

t_0——第 0 天；

t——第 t 天。

1.3.4 废水理化指标测定 样品离心（4 000 *g*、10 min）后取上清液测定理化指标。使用总有机碳分析仪测定 TOC 和 TN。营养物去除率和营养物去除速率按公式（3）~（4）计算。

$$R=\frac{C_0-C_t}{C_0}\times100\% \quad (3)$$

式中：

R——营养物去除率，%；

C_0——试验前微藻生物量，mg/L；

C_t——第 t 天微藻生物量，mg/L。

$$S=\frac{C_0-C_t}{t-t_0} \quad (4)$$

式中：

S——营养物去除速率，mg/(L·d)；

C_0——试验前微藻生物量，mg/L；

C_t——第 t 天微藻生物量，mg/L；

t_0——第 0 天；

t——第 t 天。

1.3.5 微藻生化组成测定 微藻蛋白质测定：采用元素分析法测定微藻蛋白质[18]。试验最后 1 d 离心（3 000 g、5 min）收集藻细胞，并用纯水清洗数次以去除残存营养物，冷冻干燥后获得藻粉。用锡杯称取 3 mg 藻粉，紧密包裹并压紧，将称量好的样品放入样品盘中。打开计算机、CHNS 元素分析仪和气阀，用乙酰苯胺作为标样，仪器运行后测定藻粉中的氮元素质量分数。通过公式（5）~（6）换算成蛋白质质量分数和蛋白质产率[19]。

$$\omega_P = 6.25 \times \omega_N \quad (5)$$

式中：

ω_p——藻粉的蛋白质质量分数（以藻粉干质量计），%；

ω_N——藻粉的氮元素质量分数，%。

$$O = B \times \omega_P \quad (6)$$

式中：

O——蛋白质产率，mg/(L·d)；

ω_p——藻粉的蛋白质质量分数（以藻粉干质量计），%；

B——生物产率，mg/(L·d)。

微藻碳水化合物测定：采用苯酚-硫酸显色法测定微藻中碳水化合物的质量分数[20]。称取 10 mg 藻粉至 15 mL 离心管中，3 000 g 离心 1 min；加入 0.5 mL 冰乙酸，85 ℃水浴 20 min；再加入 10 mL 丙酮，3 000 g 离心 10 min 后去除上清液；加入 2.5 mL 的 4 mol/L 三氟乙酸，100 ℃水浴 4 h，每 30 min 振荡混匀一次；水解后取样品置于冰上冷却，吸取 200 μL 水解液和 800 μL 蒸馏水至 1.5 mL 离心管中，12 000 g 离心 5 min；吸取 100 μL 上清液至 15 mL 离心管中，置于冰上；向标样中加入 4.5 mL 显色液（15 mL H_2SO_4、7.5 mL H_2O、0.15 g 苯酚），100 ℃水浴 20 min，室温放置，测定 490 nm 处的吸光度，根据吸光度计算碳水化合物的质量分数。

微藻脂肪酸测定：采用 GC-MS 法测定微藻细胞脂肪酸质量分数[21]。称取 10 mg 藻粉至 1.5 mL 样品瓶中，加入 200 μL 氯仿与甲醇混合液（体积比 2∶1）、300 μL 含 HCl（体积分数 5%）的甲醇溶液和 25 μL 的 10 mg/mL 十三酸溶液；85 ℃放置 1 h，室温冷却 15~60 min，加入 1 mL 正己烷，振荡混匀后室温静置 1~4 h；标记一组新的 1.5 mL 样品瓶，分别加入 960 μL 正己烷和 400 μL 静置上清液，加入 25 μL 的 1 mg/mL 十五烷，振荡混匀后上机测样。

1.3.6 热值测定 根据 1.3.5 中元素分析仪所测藻粉的碳元素质量分数、氢元素质量分数和氮元素质量分数，按照公式（7）计算热值。

$$H_v = (3.55 \times \omega_C^2 - 232 \times \omega_C - 2\,230 \times \omega_H + 51.2 \times \omega_C \times \omega_H + 131 \times \omega_N + 20\,600) \times 0.001 \quad (7)$$

式中：

H_V——热值，MJ/kg；

ω_C——藻粉的碳元素质量分数，%；

ω_H——藻粉的氢元素质量分数，%；

ω_N——藻粉的氮元素质量分数，%。

1.3.7 数据分析 数据用平均值±标准差表示，使用 Origin 8.5 绘图。利用 SPSS 16.0 进行方差分析，$P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 藻种筛选结果

3 株索罗金小球藻 GT1、XY3-3、CMBB276 在 4 种体积分数的肝素钠生产废水中培养 14 d 的细胞密度变化见图 1。结果表明，在体积分数 10% 的废水中，3 株小球藻均能生长。GT1 接种后有 1 d 延滞期，XY3-3 和 CMBB276 接种后，细胞可以快速分裂生长；培养结束时，CMBB276 细胞密度（7.1×10^7 个/mL）高于 XY3-3（5.1×10^7 个/mL）和 GT1（4.2×10^7 个/mL）。肝素钠生产废水体积分数为 20% 时，GT1 生长缓慢，培养第 10 天获得最大细胞密度 1.5×10^7 个/mL，继续培养则细胞密度减少，XY3-3 和 CMBB276 均能快速生长；培养结束时，CMBB276 和 XY3-3 的细胞密度（6.4×10^7、5.9×10^7 个/mL）高于 GT1（1.1×10^7 个/mL）。在废水体积分数为 30% 时，CMBB276 细胞密度最高，GT1 细胞密度最低，且明显低于其余两个藻种的细胞密度；XY3-3 在 0~2 d 为延滞期，结束时细胞密度为 3.6×10^7 个/mL；CMBB276 在体积分数 30% 的废水中无延滞期，结束时细胞密度为 3.9×10^7 个/mL，与 XY3-3 细胞密度相似。在体积分数 40% 的肝素钠生产废水中，GT1

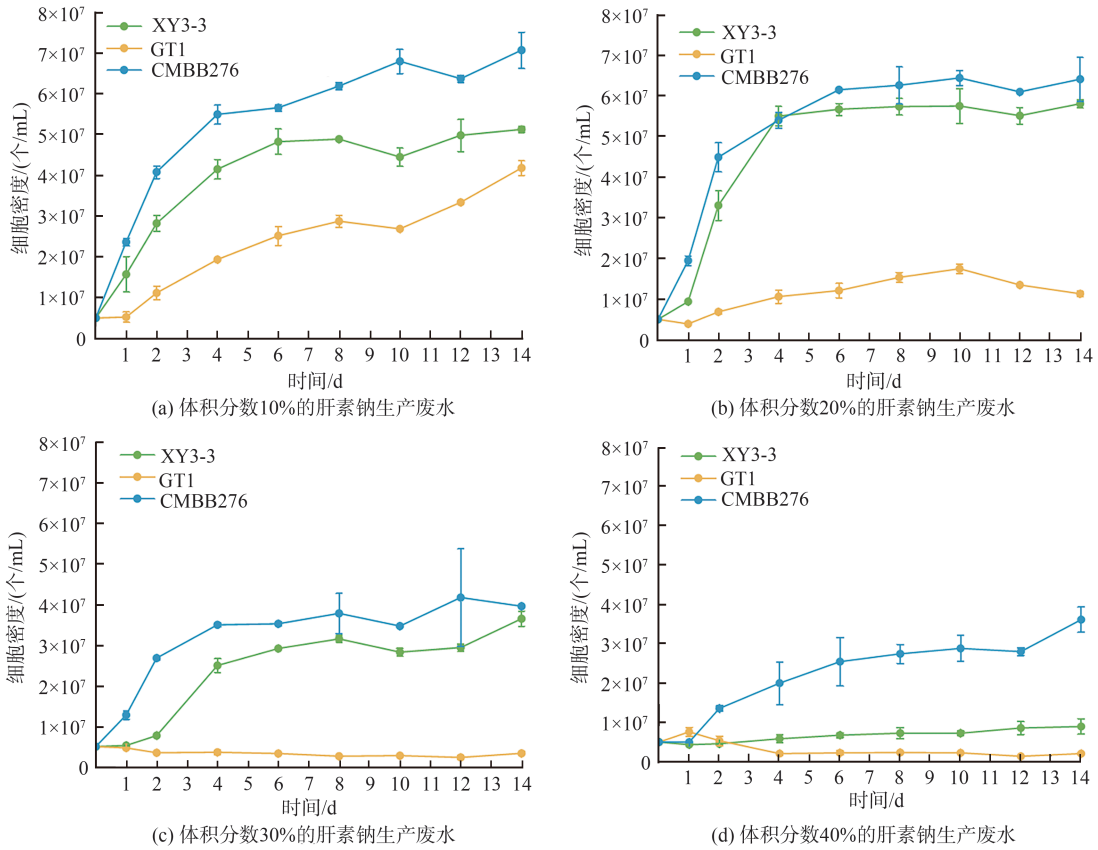


图 1 索罗金小球藻GT1、XY3-3和CMBB276在4种体积分数肝素钠生产废水中的生长情况

Fig 1 Growth of *C. sorokiniana* GT1, XY3-3 and CMBB276 in heparin sodium production wastewater at 4 volume fractions

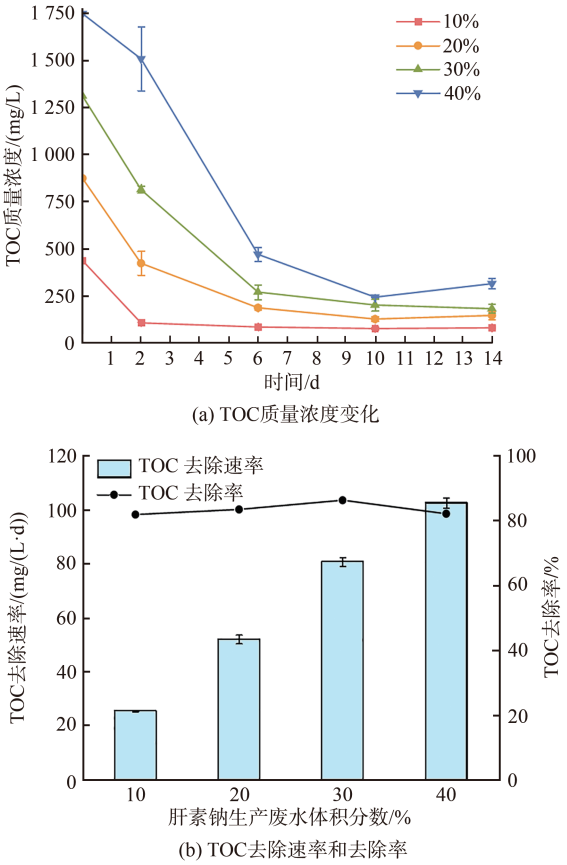
生长受到抑制，细胞密度降至2.1×10⁶个/mL，XY3-3细胞密度缓慢增加至9.0×10⁶个/mL，CMBB276细胞生长出现1 d延滞期，培养14 d后细胞密度明显高于GT1和XY3-3。

随着肝素钠生产废水体积分数升高，3株小球藻的生长表现出明显差异。结果表明，肝素钠生产废水的体积分数会直接影响细胞生长，不同微藻对不同废水的耐受性不同，GT1的耐受性最低，CMBB276耐受性最高。Li等在浓缩废水中培养14株不同种类的微藻，其中4株小球藻生物量能达到1 g/L，而栅藻、衣藻、雨生红球藻、绿球藻等生物量相对较低，证实了微藻在废水中的生长具有藻种特异性[22]。这可能是因为废水中高浓度的铵盐等化合物会抑制微藻生长[23]。在肝素钠生产废水中，氨态氮可能会通过同化作用影响pH，进而导致微藻生长受到抑制。但该试验结束时，废水的pH为5.5~8.0，pH对这3株小球藻的生长没有明显抑制作用。另一个原因可能是不同藻株对氨态氮的耐受性不同，具有藻株特异性。Jin等研究表明，以氨态氮为氮源时（TN约为400 mg/L），GT1生长受到显著抑制[17]，而当NH_4^+为150 mmol/L时，CMBB276仍能快速生长[24]。这些结果表明CMBB276对氨态氮有更高的耐受性，这与该试验结果一致。

在BG11中培养GT1获得的最大细胞密度为7.2×10⁷个/mL（接种密度为6×10⁶个/mL）[25]，较体积分数10%的肝素钠生产废水中获得的细胞密度高42%，表明体积分数10%的肝素钠生产废水可以作为GT1的潜在培养基，而具体的培养条件（如接种密度）需要进一步优化。XY3-3和CMBB276在体积分数10%~30%的肝素钠生产废水中获得的最大细胞密度高于在厌氧发酵的市政污水和屠宰场废水中培养的小球藻和栅藻的最大细胞密度[26]。此外，CMBB276能在体积分数40%的肝素钠生产废水中生长，对肝素钠生产废水具有较高的耐受性，表明CMBB276是利用肝素钠生产废水的优良藻种，体积分数10%和20%的肝素钠生产废水适宜CMBB276生长。

2.2 CMBB276 在不同体积分数废水中去除 TOC 和 TN 的效果

2.2.1 TOC 去除情况 选择 CMBB276 作为处理肝素钠生产废水的优良藻种，进一步研究其对不同体积分数废水中 TOC 和 TN 的去除情况。CMBB276 在不同体积分数肝素钠生产废水中培养时，TOC 变化过程、去除速率和去除率见图 2。采用体积分数 10% 的肝素钠生产废水时，培养前 2 d TOC 迅速降低，培养结束时 TOC 去除率和去除速率分别为 81.7% 和 25.1 mg/(L·d)；废水体积分数为 20% 时，前 6 d TOC 快速下降，培养 6 d 后 TOC 缓慢下降，培养结束时 TOC 的去除率和去除速率分别为 83.3% 和 52.0 mg/(L·d)；在废水体积分数为 30% 时，TOC 变化情况与体积分数 20% 时相似，培养前 6 d TOC 迅速降低，此时 TOC 去除率为 79.4%，结束时 TOC 降至 181.4 mg/L，去除率和去除速率分别为 86.2% 和 80.7 mg/(L·d)；在废水体积分数为 40% 时，培养前 6 d TOC 迅速降低，培养第 14 天 TOC 去除率和去除速率分别为 82.0% 和 102.4 mg/(L·d)。结果表明，TOC 去除速率随着肝素钠生产废水体积分数增加而增加，TOC 去除率基本保持稳定。肝素钠生产废水中含有大量有机物，微藻可以利用废水中的有机物进行混养或异养生长合成碳水化合物、脂肪酸和氨基酸等[27]。Qin 等利用小球藻处理乳制品加工废水，COD 去除率为 51.5%~74.8%，且添加微藻能够促进废水中 TOC 的去除[28]。该研究中所用废水均未灭菌，其中丰富的有机物利于细菌生长和繁殖，随着废水体积分数升高，微藻生长受到抑制，细菌可能会大量繁殖，消耗废水中的营养物，同时可能会分泌一些可溶性的微生物副产物，微藻可以利用环境中一些可溶性的微生物副产物，促进有机物降解。Li 等对肝素钠生产废水不进行任何处理时，COD 去除率可达 29.1%，其中有机物组成种类出现先增加后下降趋势，但 COD 水平下降，表明肝素钠生产废水中原生细菌等对 COD 具有去除作用[29]。余云龙等研究表明藻、菌、藻菌混合处理对模拟废水的 COD 去除率分别为 71.14%、53.69% 和 77.70%，证实细菌是废水中有机物降低的主要原因[30]，这与 Zhu 等的研究结果[31]相似。该试验在光照条件下进行，肝素钠生产废水中的有机污染物可能会被光转化为 CO_2、H_2O、N_2 等，加快了有机物的转化和降解[32]。



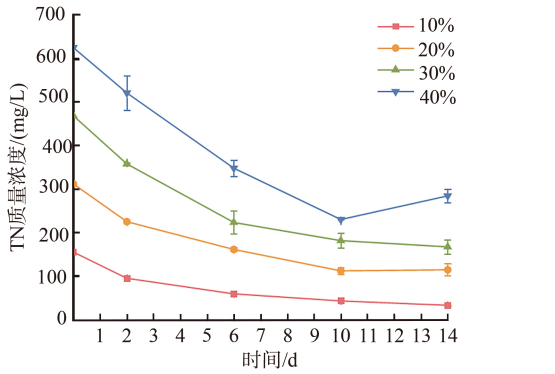
(a) TOC质量浓度变化

(b) TOC去除速率和去除率

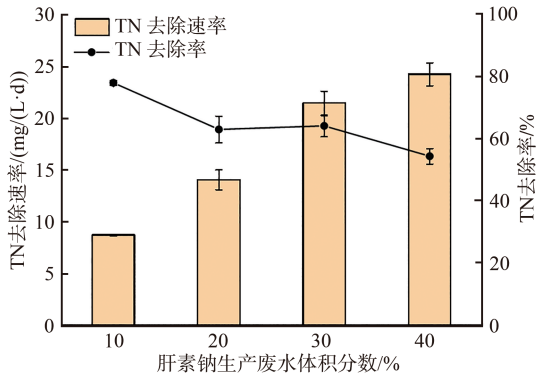
图 2 4 种体积分数肝素钠生产废水中 TOC 的变化

Fig 2 Changes of TOC in heparin sodium production wastewater at 4 volume fractions

2.2.2 TN 去除情况 CMBB276 在不同体积分数的肝素钠生产废水中培养时，TN 的变化过程、去除率和去除速率见图 3。废水体积分数为 10% 时，培养前 2 d TN 迅速降低，之后缓慢下降，培养结束时，TN 去除率和去除速率分别为 78.0% 和 8.7 mg/(L·d)；废水体积分数为 20% 时，培养前 10 d TN 迅速降低，培养结束时，TN 去除率和去除速率分别为 63.0% 和 14.0 mg/(L·d)；废水体积分数为 30% 时，TN 在前 6 d 快速下降，6~14 d 缓慢降低，TN 去除率和去除速率分别为 64.1% 和 21.4 mg/(L·d)；废水体积分数为 40% 时，TN 在培养前 10 d 迅速下降，此时 TN 去除率为 63.1%，培养 10~14 d TN 上升，培养结束时 TN 去除率和去除速率分别为 54.4% 和 24.2 mg/(L·d)，去除率低于体积分数 10% 废水中的去除率，与其他组无明



(a) TN质量浓度变化



(b) TN去除速率和去除率

图3　4种体积分数肝素钠生产废水中TN的变化

Fig 3　Changes of TN in heparin sodium production wastewater at 4 volume fractions

显差异。结果表明，微藻能够利用废水中的氮，促进肝素钠生产废水中TN的降低，可能包括直接利用和间接利用两种途径，间接利用可能是由于细菌活动使不溶性有机氮释放出来作为微藻生长的另一种氮源，从而促进氮的利用[33]。Cheng等利用不同稀释倍数的猪粪废水培养小球藻和黄丝藻，结果显示，随着废水稀释倍数增加，微藻生物量和TN去除率逐渐增加[34]，这与该试验结果相似；同时与小球藻相比，黄丝藻对TN的去除率更高，这可能是因为不同微藻对不同废水的适应性和处理效果有差异，因此在废水处理过程中筛选适宜的藻株不仅可以提高废水的处理效果，还能收获更高的生物产率[35]。

在一定体积分数范围内，CMBB276对TOC和TN的去除速率与废水体积分数呈线性关系，分别以初始TOC和TN质量浓度为x轴，去除速率为y轴，关系式的斜率、截距与R^2见表2。随着废水体积分数增加，CMBB276对TOC和TN的去除速率也不断增加，这可能是因为初始TOC和TN质量浓度的增加能够促进CMBB276对TOC和TN的吸收。这与孔佳等研究结果相似，即废水中氨态氮增加可促进小球藻对氨态氮的吸收[36]。

表2　CMBB276对TOC和TN的去除速率与其质量浓度的关系

Table 2　Correlation between the removal rates of TOC and TN and their mass concentration levels by CMBB276

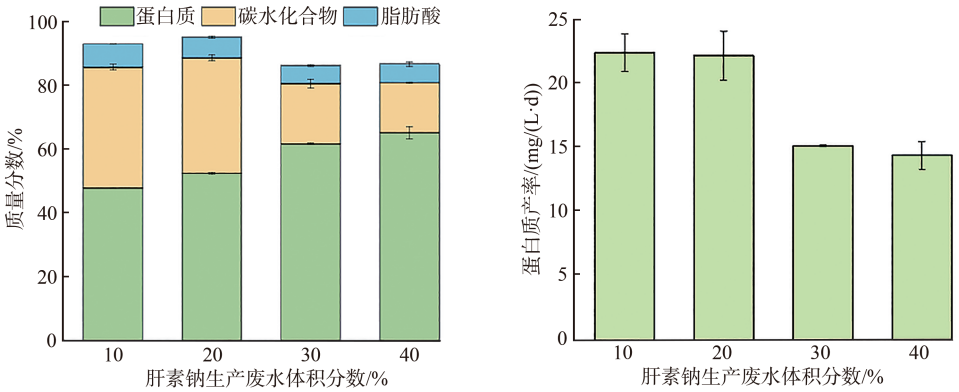
去除物质	斜率	截距	R^2
TOC	0.059 4	0.316 8	0.994 5
TN	0.034 6	3.592 9	0.951 9

2.3　CMBB276在不同体积分数废水中的生化组成

CMBB276在不同体积分数废水中的生化组成见图4。随着废水体积分数增加，CMBB276的生化组成呈规律性变化，蛋白质质量分数逐渐增加，碳水化合物和脂肪酸质量分数逐渐降低。在废水体积分数为10%、20%、30%和40%的条件下，蛋白质分别占细胞干质量的47.9%、52.5%、61.7%和65.2%；碳水化合物分别占细胞干质量的37.8%、36.1%、18.9%和15.6%；脂肪酸分别占细胞干质量的7.3%、6.5%、5.6%和5.9%。结果表明，利用肝素钠生产废水培养CMBB276可以积累大量蛋白质，以及一定的碳水化合物和少量脂肪酸。在不同体积分数肝素钠生产废水中CMBB276的蛋白质产率分别为22.46、22.22、15.18、14.44 mg/(L·d)，利用肝素钠生产废水获得微藻蛋白质的适宜添加量为体积分数10%和20%。微藻可以通过同化作用将NO_3-N和NO_2-N转化为NH_3-N，NH_3-N进入谷氨酸代谢途径最终合成蛋白质。肝素钠生产废水具有高氨氮，有利于微藻蛋白质的合成。Yang等利用厌氧发酵废水培养栅藻，随着废水体积分数增加，微藻蛋白质逐渐增加，表明高体积分数废水有利于微藻蛋白质积累[37]。Metsoviti等研究表明小球藻培养基中初始氮质量浓度会影响微藻生长和蛋白质质量分数，当初始氮质量浓度从10 mg/L增加至800 mg/L时，蛋白质增加了30%[38]。Xu等异养培养CMBB276时，蛋白质质量分数为33.6%~40.0%[24]，低于该试验中测得的蛋白质质量分数。因此，利用肝素钠生产废水培养CMBB276生产蛋白质是实现废水净化和资源化利用的有效途径。为减少稀释废水的淡水用量，体积分数20%

的肝素钠生产废水是生产微藻蛋白质的最适添加量。

CMBB276在不同体积分数肝素钠生产废水中的元素组成和热值见表3。在不同体积分数肝素钠生产废水中，CMBB276热值相近，为20.10~21.56 MJ/kg，且热值随体积分数增加呈增加趋势，但没有显著差异。热值是衡量生物质能量代谢的重要指标，与生物质的生化组成密切相关。该试验测得CMBB276在废水中的热值与黄豆相似（20.99 MJ/kg），远高于大米、玉米、红薯等农作物热值[39]。利用猪粪废水在不同培养条件下培养*Chlorella* sp. HL的最大热值为18.25 MJ/kg[40]。利用食品加工废水培养*Chlorella vulgaris* NIOCCV的最大热值为12.83 MJ/kg[41]。与以上结果对比可知，利用肝素钠生产废水培养的CMBB276具有相对较高的热值。



(a) 微藻生化组成　(b) 蛋白质产率

图4　4种体积分数肝素钠生产废水中的生化组成和蛋白质产率

Fig 4　Biochemical compositions and protein productivity in heparin sodium production wastewater at 4 volume fractions

表3　不同体积分数肝素钠生产废水中CMBB276的元素组成和热值

Table 3　Elemental compositions and calorific values of CMBB276 in heparin sodium production wastewater at different volume fractions

肝素钠生产废水体积分数/%	C元素质量分数/%	H元素质量分数/%	N元素质量分数/%	S元素质量分数/%	热值/(MJ/kg)
10	47.09±0.05^{a}	8.60±0.60^{a}	7.66±0.01^{a}	1.00±0.02^{a}	20.10±0.08^{a}
20	47.67±0.08^{a}	7.89±0.11^{a}	8.40±0.04^{b}	1.21±0.04^{b}	20.37±0.02^{a}
30	48.29±0.30^{a}	7.34±0.39^{a}	9.88±0.04^{c}	1.09±0.07^{ab}	20.75±0.23^{a}
40	48.70±0.10^{a}	9.84±0.19^{a}	9.51±0.04^{c}	1.16±0.05^{b}	21.56±0.11^{a}

注：同列不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

3　结论

作者使用肝素钠生产废水培养微藻，初步探索了3株索罗金小球藻的生长情况，筛选出能在废水中快速生长的优良藻种CMBB276。探究了在不同体积分数肝素钠生产废水中该菌株的生化组成及其对TOC和TN的去除效果。结果表明，20%为最适废水体积分数，在该条件下CMBB276的细胞密度最高为6.4×10^{7}个/mL，TOC和TN去除率分别为83.3%和63.0%，蛋白质质量分数和产率为52.5%和22.22 mg/(L·d)。利用适宜体积分数的肝素钠生产废水培养索罗金小球藻能够高效净化废水中的TOC和TN，废水培养的CMBB276具有高蛋白质和高热值等特征，研究结果为实现肝素钠生产废水的净化和资源化利用提供了借鉴。

参考文献

[1] 姬胜利，张天民. 肝素与低分子肝素的研究进展[J]. 中国生化药物杂志，1996，17(5)：216-219.
JI S L，ZHANG T M. Advanced studies on heparin and low molecular weight heparin[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics，1996，17(5)：216-219.(in Chinese)

[2] 高宁国，程秀兰，杨敬，等. 肝素结构与功能的研究进展[J]. 中国生物工程杂志，1999，19(5)：4-13.
GAO N G，CHENG X L，YANG J，et al. Progress in

heparin structure and function[J]. China Biotechnology，1999，19(5)：4-13.(in Chinese)

[3] ZHU C J，XU P W，HE Y L，et al. Heparin increases food intake through AgRP neurons[J]. Cell Reports，2017，20(10)：2455-2467.

[4] MAGNANI H N. Rationale for the role of heparin and related GAG antithrombotics in COVID-19 infection[J]. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis，2021，27：1076029620977702.

[5] 翟建，姜春华，鲁秀国.肠衣-肝素钠加工废水处理技术进展[J].食品工业，2013，34(8)：192-194.
ZHAI J，JIANG C H，LU X G. Progress on techniques for treating enteric coating and heparin sodium manufacturing wastewater[J]. The Food Industry，2013，34(8)：192-194.(in Chinese)

[6] 马彦峰.肝素钠废水水质解析[J].科技创新与应用，2015(15)：61-61，62.
MA Y F. Analysis of heparin sodium wastewater quality[J]. Technology Innovation and Application，2015(15)：61-61，62.(in Chinese)

[7] 赵丹，董延茂.肠衣加工废水处理技术进展[J].工业水处理，2012，32(7)：18-20.
ZHAO D，DONG Y M.Technical progress in the treatment of casing wastewater[J]. Industrial Water Treatment，2012，32(7)：18-20.(in Chinese)

[8] 徐爱荣，周晓惠.高盐度、高COD肠衣废水的治理研究[J].环境与发展，2019，31(12)：32-34.
XU A R，ZHOU X H. Study on treatment of high salinity and high COD casing wastewater[J]. Environment and Development，2019，31(12)：32-34.(in Chinese)

[9] 邱信欣，刘锋，郭德华，等.气浮-2级A/O+MBR处理高盐肝素钠废水研究[J].水处理技术，2019，45(9)：89-93.
QIU X X，LIU F，GUO D H，et al. Study on the treatment of high-salinity sodium heparin wastewater by air flotation-two stage A/O+MBR[J]. Technology of Water Treatment，2019，45(9)：89-93.(in Chinese)

[10] 侍爱秋.肠衣废水的综合利用[J].污染防治技术，2002，15(2)：35-36.
SHI A Q. Disposal and comprehensive utilization of intestines wastewater[J]. Pollution Control Technology，2002，15(2)：35-36.(in Chinese)

[11] FINK J，SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ A R，FROSI G，et al. Industrial saline wastewater in a corn-soybean rotation to enhance crop yield without compromising soil health in a subtropical soil[J]. Journal of Environmental Management，2021，296：113341.

[12] HU Q，SOMMERFELD M，JARVIS E，et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production：perspectives and advances[J]. The Plant Journal：for Cell and Molecular Biology，2008，54(4)：621-639.

[13] OSWALD W J，ASCE A M，GOTAAS M A. Photosynthesis in sewage treatment[J]. China Ship Repair，1957，74(4)：2052-2062.

[14] CHEN C Y，KUO E W，NAGARAJAN D，et al. Cultivating *Chlorella sorokiniana* AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production[J]. Bioresource Technology，2020，302：122814.

[15] CHEN C Y，KUO E W，NAGARAJAN D，et al. Semi-batch cultivation of *Chlorella sorokiniana* AK-1 with dual carriers for the effective treatment of full strength piggery wastewater treatment[J]. Bioresource Technology，2021，326：124773.

[16] ZKERI E，ILIOPOULOU A，KATSARA A，et al. Comparing the use of a two-stage MBBR system with a methanogenic MBBR coupled with a microalgae reactor for medium-strength dairy wastewater treatment[J]. Bioresource Technology，2021，323：124629.

[17] JIN H，CHUAI W H，LI K P，et al. Ultrahigh-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green *Alga Chlorella sorokiniana* for biomass production[J]. Biotechnology and Bioengineering，2021，118(10)：4138-4151.

[18] LÓPEZ C V，GARCÍA M D E L C，FERNÁNDEZ F G，et al.Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass[J]. Bioresource Technology，2010，101(19)：7587-7591.

[19] 程彦伟，李培睿，李宗义，等.饲料粗蛋白含量分析方法比较[J].饲料工业，2001(11)：36-37.
CHENG Y W，LI P R，LI Z Y，et al. Comparision of analysis methods for crude protein content in feed[J]. Feed Industry，2001(11)：36-37.(in Chinese)

[20] DUBOIS M，GILLES K A，HAMILTON J K，et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry，1956，28(3)：350-356.

[21] FRIGON J C，MEHTA P，GUIOT S R. Impact of mechanical，chemical and enzymatic pre-treatments on the methane yield from the anaerobic digestion of switchgrass[J]. Biomass and Bioenergy，2012，36：1-11.

[22] LI Y C，ZHOU W G，HU B，et al. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment：strains screening and significance evaluation of environmental factors[J]. Bioresource Technology，2011，102(23)：10861-10867.

[23] LV J P，LIU Y，FENG J，et al. Nutrients removal from

undiluted cattle farm wastewater by the two-stage process of microalgae-based wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2018, 264: 311-318.

[24] XU Q, HOU G L, CHEN J P, et al. Heterotrophically ultrahigh-cell-density cultivation of a high protein-yielding unicellular Alga *Chlorella* with a novel nitrogen-supply strategy[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 774854.

[25] WU M C, ZHANG H, SUN W C, et al. Metabolic plasticity of the starchless mutant of *Chlorella sorokiniana* and mechanisms underlying its enhanced lipid production revealed by comparative metabolomics analysis[J]. Algal Research, 2019, 42: 101587.

[26] VADIVELOO A, FOSTER L, KWAMBAI C, et al. Microalgae cultivation for the treatment of anaerobically digested municipal centrate (ADMC) and anaerobically digested abattoir effluent (ADAE)[J]. The Science of the Total Environment, 2021, 775: 145853.

[27] KONG W W, SHEN B X, LYU H H, et al. Review on carbon dioxide fixation coupled with nutrients removal from wastewater by microalgae[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 292: 125975.

[28] QIN L, SHU Q, WANG Z M, et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater pretreated by UV irradiation and sodium hypochlorite[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(2): 1121-1130.

[29] LI J, SHI W S, JIANG C W, et al. Evaluation of potassium as promoter on anaerobic digestion of saline organic wastewater[J]. Bioresource Technology, 2018, 266: 68-74.

[30] 余云龙, 邹华, 张强, 等. 黑暗条件下普通小球藻处理废水的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(9): 938-943.
YU Y L, ZOU H, ZHANG Q, et al. Study on wastewater treatment by *Chlorella vuganis* under dark condition[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(9): 938-943. (in Chinese)

[31] ZHU S N, QIN L, FENG P Z, et al. Treatment of low C/N ratio wastewater and biomass production using co-culture of *Chlorella vulgaris* and activated sludge in a batch photobioreactor[J]. Bioresource Technology, 2019, 274: 313-320.

[32] VALENCIA S, MARÍN J, VELÁSQUEZ J, et al. Study of pH effects on the evolution of properties of brown-water natural organic matter as revealed by size-exclusion chromatography during photocatalytic degradation[J]. Water Research, 2012, 46(4): 1198-1206.

[33] MIN M, WANG L, LI Y C, et al. Cultivating *Chlorella* sp. in a pilot-scale photobioreactor using centrate wastewater for microalgae biomass production and wastewater nutrient removal[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(1): 123-137.

[34] CHENG P F, CHENG J J, COBB K, et al. *Tribonema* sp. and *Chlorella zofingiensis* co-culture to treat swine wastewater diluted with fishery wastewater to facilitate harvest[J]. Bioresource Technology, 2020, 297: 122516.

[35] ZHOU W G, HU B, LI Y C, et al. Mass cultivation of microalgae on animal wastewater: a sequential two-stage cultivation process for energy crop and omega-3-rich animal feed production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(2): 348-363.

[36] 孔佳, 沈伯雄, 孔文文, 等. 微藻在不同氨氮条件下固定CO_2耦合净化废水实验[J]. 环境工程, 2022, 40(5): 9-17, 94.
KONG J, SHEN B X, KONG W W, et al. Experimental study on CO_2 fixation coupled with wastewater purification by *Chlorella vulgaris* under different ammonium concentrations[J]. Environmental Engineering, 2022, 40(5): 9-17, 94. (in Chinese)

[37] YANG S, XU J, WANG Z M, et al. Cultivation of oleaginous microalgae for removal of nutrients and heavy metals from biogas digestates[J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 164: 793-803.

[38] METSOVITI M N, KATSOULAS N, KARAPANAGIOTIDIS I T, et al. Effect of nitrogen concentration, two-stage and prolonged cultivation on growth rate, lipid and protein content of *Chlorella vulgaris*[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2019, 94(5): 1466-1473.

[39] 何萍, 张京京. 糖类及北方常见农作物热值的测定与分析[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(3): 79-81.
HE P, ZHANG J J. Determination and analysis of the calorific values of carbohydrates and common crops in the northern[J]. Cereals & Oils, 2018, 31(3): 79-81. (in Chinese)

[40] LIU X Y, HONG Y, ZHAO G P, et al. Microalgae-based swine wastewater treatment: strain screening, conditions optimization, physiological activity and biomass potential[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 807(3): 151008.

[41] JAIN D, GHONSE S S, TRIVEDI T, et al. CO_2 fixation and production of biodiesel by *Chlorella vulgaris* NIOCCV under mixotrophic cultivation[J]. Bioresource Technology, 2019, 273: 672-676.

(责任编辑:史润东东)