

# 應用綠球藻去除養豬廢水中氮磷與沼氣中二氧化碳<sup>(1)</sup>

蘇天明<sup>(2)(4)</sup> 翁義翔<sup>(2)</sup> 廖仁寶<sup>(2)</sup> 蕭庭訓<sup>(2)</sup> 程梅萍<sup>(3)</sup>

收件日期：110 年 4 月 21 日；接受日期：110 年 6 月 29 日

## 摘 要

養豬廢水經過三段式處理後水質的氮和磷濃度仍高，厭氧處理階段產生的沼氣含有高比例的二氧化碳，皆可提供藻類作為營養源。因此，本試驗旨在探討應用三段式處理後的養豬廢水，及厭氧階段產生的沼氣培養綠球藻 (*Chlorella* sp.)，對廢水中氮磷去除與沼氣中二氧化碳減量的效果，期予以資源再利用，並減輕對承受水體和溫室效應之負面影響。使用經三段式處理後氮和磷濃度分別為 324 mg/L 和 84 mg/L 的養豬廢水作為綠球藻培養液，採取靜置 (A 組)、空氣曝氣 (B 組)，及沼氣曝氣 (C 組) 等三種不同二氧化碳供應方式進行綠球藻培養。培養 2 週後，C 組培養液中所含氮 (200 mg/L) 和磷 (49 mg/L) 濃度顯著較 A 組及 B 組為低，氮和磷的去除率分別為 38.4% 和 41.4%，綠球藻產量較 A 組及 B 組為高 ( $P < 0.05$ )，每生產 1 g 綠球藻約消耗 4.84 L 的二氧化碳。各組生產的綠球藻乾基粗蛋白和磷含量分別介於 41 – 64% 及 2.18 – 2.68% 之間。綜上所述，使用三段式處理後的養豬廢水及沼氣培養綠球藻，可有效促進其生長並具有降低廢水中氮和磷含量及沼氣中的二氧化碳效果，且藻體之粗蛋白質及磷含量與大豆粕和魚粉相近，具供作飼糧原料之可能性。但需精進藻體收穫技術及細胞壁破壁技術方具實用性，而藻液以離心方法收穫藻體，培養液上層仍有藻體懸浮，必須再經適當處理。

關鍵詞：綠球藻、養豬廢水、氮磷去除。

## 緒 言

全球人口正快速增加，美國人口普查局預估 2050 年全球人口將達到驚人的 99 億，糧食需求將增加 70 – 100% (Prosekov and Ivanova, 2018)。豬肉是世界上消耗量最多的畜產品 (Dennehy *et al.*, 2017)，為了滿足人類對蛋白質需求的不斷增加，世界各地的養豬頭數都呈指數增加，因此也產生大量的養豬廢水 (Nagarajan *et al.*, 2019a)，致衍生廢水的處理問題 (Dennehy *et al.*, 2017)。養豬廢水所含的氮和磷濃度分別為 200 – 2,055 mg/L 和 100 – 620 mg/L (Cheng *et al.*, 2019)，經三段式廢水處理後氮和磷的濃度則大約介於 200 – 400 mg/L 和 20 – 100 mg/L 之間 (曾等, 2003；蔡及周, 2005；蘇等, 2020)，顯示經三段式處理後養豬廢水中仍富含高濃度的氮和磷等營養鹽。依照現行的放流水標準 (行政院環境保護署, 2019)，氨氮與正磷酸鹽之最大限值分別為 10.0 與 4.0 mg/L，雖然養豬業放流水目前尚不適用該項標準，但放流水氮、磷過高將衍生後續之環境污染與河川水質優養化等環保問題 (Giannuzzi *et al.*, 2011)，仍須加強放流水氮磷減量技術之研發。

養豬廢水若未妥善處理，將造成水源與土壤污染、溫室氣體排放，以及對人類健康產生負面影響 (Dennehy *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020)。Hu *et al.* (2021) 指出，厭氧處理是最有效的豬糞尿處理方法之一，包括沼氣的產生、溫室氣體的減量排放及病原體的減少等。De la Noüe and De Pauw (1988) 研究，以微藻進行生物處理可藉太陽能將二氧化碳及氮磷轉化為有用的生物質。由於藻類具有利用無機氮和磷以促進其生長的能力，故可利用藻類培養進行廢水的三級處理 (Larsdotter, 2006; Abdel-Raouf *et al.*, 2012)，Nagarajan *et al.* (2019a) 研究發現，微藻可耐受養豬廢水中的高氮含量，同時還可以去除磷。養豬廢水三段式處理在厭氧階段會有沼氣產生，Harasimowicz *et al.* (2007) 指出，沼氣含有 55 – 65% 的甲烷、30 – 45% 的二氧化碳 (carbon dioxide, CO<sub>2</sub>) 和微量的硫化氫及水氣。張等 (2015) 指出，自營性藻類具有光合作用色素可以行光合作用來捕獲與固定 CO<sub>2</sub>，且利用效率高，具有固碳及減少碳排的效果。利用 CO<sub>2</sub> 來培養微藻具有極大的發展潛力 (Abinandan and Shanthakuma, 2015)。廢水中有機物經過微生物分解消

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2670 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所主任秘書室。

(4) 通訊作者，E-mail: tmsu@mail.tlri.gov.tw。

化後，產生小分子的有機碳和無機鹽，為藻類極佳之營養物質 (Travieso *et al.*, 2006)。Nagarajan *et al.* (2019b) 指出，沼氣是在厭氧消化過程中獲得的氣態副產物，富含甲烷以及大量其他氣體，而 CO<sub>2</sub> 去除對於沼氣純化至關重要，利用微藻耐高 CO<sub>2</sub> 濃度的特性，藻液可供為 CO<sub>2</sub> 洗滌液。此外，Colla *et al.* (2007) 也指出，藻類富含蛋白質、脂質、維生素、礦物質、微量元素等營養素，可作為動物飼料原料，但微藻具有非常堅韌的細胞壁，單胃動物很難消化微藻細胞壁，必須開發適當的技術來提高動物體內微藻營養物的生物利用率 (Austic *et al.*, 2013; Lum *et al.*, 2013)。

將廢棄物資源化的循環經濟是時代所趨，為了利用養豬廢水的氮、磷，以及降低沼氣中 CO<sub>2</sub> 含量，本研究應用三段式處理後的養豬廢水和沼氣培養綠球藻，探討本程序對降低放流水氮磷及沼氣中 CO<sub>2</sub> 濃度的效果。

## 材料與方法

### I. 綠球藻來源

本試驗使用蘇等 (2016) 培養的綠球藻 (*Chlorella* sp.)。蘇等 (2016) 利用養豬廢水以專一性培養基 (BCRC Number: AL20008, 生物資源及研究中心; 表 1) 培養，再參考蔡等 (2010) 方法，取藻液以 DNA 套組萃取藻體 DNA，以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 進行 DNA 複製，而後以 18S rDNA 分子選殖 (clone)，選擇適當的勝任細胞，插入藻體的 DNA 片段，最後利用核酸自動定序儀定序，再將核酸序列與美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 資料庫比對得到與綠球藻核酸序列的相似度達 99%，確定培養的藻體為綠球藻。

表 1. 綠球藻培養基組成分

Table 1. The component of culture medium for *Chlorella* sp

Items	Usage amount/100 mL <sup>1</sup>
Medium	
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	15 mg
KNO <sub>3</sub>	10 mg
β-Na <sub>2</sub> glycerophosphate · 5H <sub>2</sub> O	5 mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4 mg
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	50 mg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.01 µg
Biotin	0.01 µg
Thiamine HCl	1 µg
P IV metals (components as follow)	0.3 mL
Distilled water	99.7 mL
-----	
P IV metals	
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	100 mg
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	100 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3.6 mg
ZnCl <sub>2</sub>	1.04 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.4 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25 mg
Distilled water	100 mL

<sup>1</sup> Refer to the medium formula of BCRC Biological Resources and Research Center (BCRC Number: AL20008).

### II. 綠球藻先期培養過程：如圖 1 所示。

- 將綠球藻液 40 mL 放入 1 L 螺旋蓋血清瓶，加入經過厭氧及曝氣處理後的養豬廢水 (培養液) 460 mL，以小型曝氣機輔以曝氣石，通入空氣進行培養。
- 培養 2 週後，將 (i) 綠球藻液倒入 8 L 裝的透明桶，加入 3.5 L 綠球藻培養液，進行培養。經培養 2 週後，約

獲得 4 L 藻液，平均分裝於 4 個 8 L 裝的透明桶，再加入 3 L 培養液。再經培養 2 週後，約獲得 16 L 藻液，再平均分裝於 16 個 8 L 裝的透明桶，加 3 L 培養液。再經培養 2 週後，於每一透明桶再加 3 L 培養液，期間皆以小型曝氣機輔以曝氣條提供空氣，共生產 100 L 的藻液。

- (iii) 將 (ii) 之藻液平均分裝於 4 個容量 100 L 培養桶 (每桶約 25 L) 後，加入 60 L 培養液，以曝氣條提供空氣培養 2 週供試驗用。

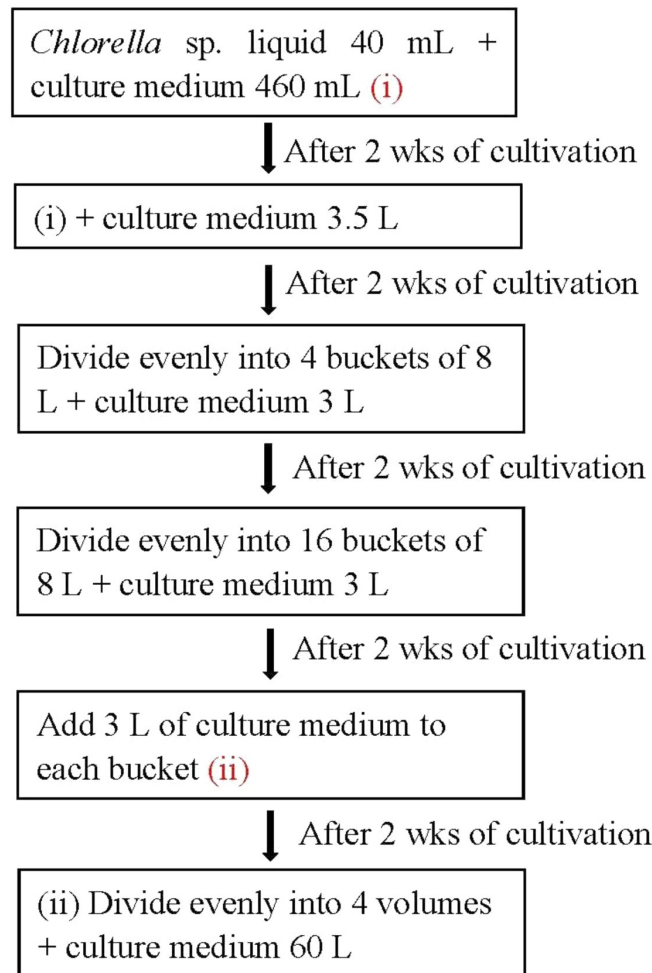


圖 1. 綠球藻先期培養過程。

Fig. 1. Culture process of *Chlorella* sp. in the pre-trial stage.

### III. 二氧化碳供應方式

- (i) 試驗開始將前述藻液集中並注入空氣混合均勻後，平均分裝於 6 個加入 25 L 培養液、容量 100 L 的培養桶 (每桶約 80 L)，分別採取靜置 (A 組)、以空氣供應 CO<sub>2</sub> (B 組) 及以沼氣供應 CO<sub>2</sub> (C 組) 等 3 種不同 CO<sub>2</sub> 供應方式培養 2 週，每組 2 重複。
- (ii) 二氧化碳供應濃度：A 組及 B 組培養桶上方皆不加蓋，A 組採取靜置方式僅表面可接觸空氣，故二氧化碳供應量以 0 估算，B 組以曝氣機注入空氣供應，二氧化碳供應量以空氣的二氧化碳含量 0.0412% (Buis, 2019) 估算。C 組沼氣源自畜產試驗所總廢水處理場，從污泥消化池恆壓筒接管路收集至容積約 12.723 m<sup>3</sup> 的貯氣袋 (長 × 直徑 = 5 m × 1.8 m)，試驗期間不再通入外源沼氣，培養桶底部放置曝氣條與貯氣袋連接，以塑膠軟管建置迴路，以加壓馬達抽取沼氣使沼氣循環於培養桶與貯氣袋間，通入培養桶內之曝氣條以供應二氧化碳並攪拌培養液，培養桶上方則加蓋並輔以迫緊使密合不洩氣。
- (iii) C 組 (以沼氣供應) 二氧化碳消耗量估算
  1. 以二氧化碳和甲烷的標準品，配製 5 種不同比例的混合氣體 (二氧化碳：甲烷 = 0：100、20：80、40：60、60：40、80：20、100：0)，以 500 μL 的氣密注射針將混合氣體注入氣相層析儀 (Trace 2000, Thermo Scientific, UK)，以 TCD 為偵測器、攜帶氣體 (carrier gas) 為氮氣，以積分儀計算峰面積 (peak area) 後製作檢量線 (圖 2)。

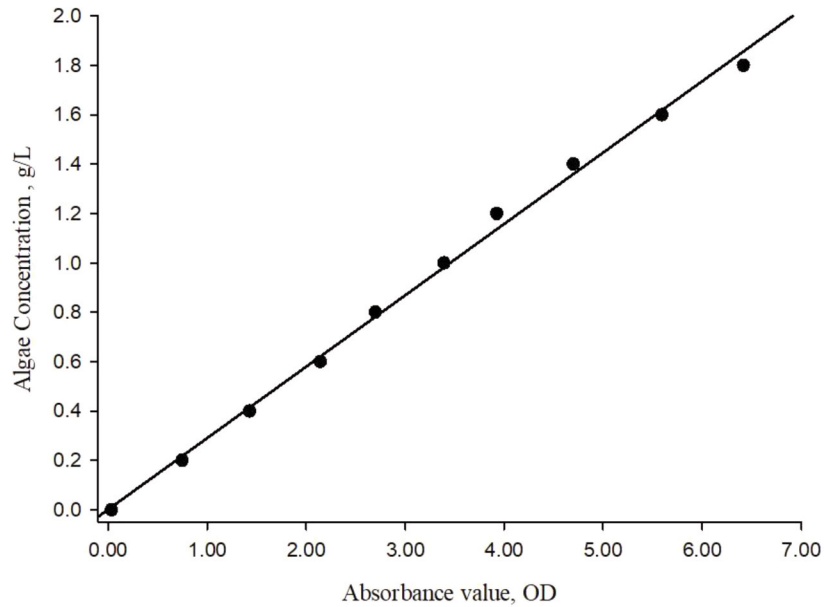


圖 2. 藻液吸光值及藻體質量之檢量線 ( $y = 0.2891x + 0.0015$ ;  $R^2 = 0.9967$ )。

Fig. 2. Calibration line of algae liquid absorbance value and biomass quantity.

2. 試驗前、後分別從貯氣袋與塑膠軟管連接處，以注射針筒採集沼氣樣品收集在 1 L 的氣體採樣袋中，試驗前後樣品各採集 3 袋後，立即攜回實驗室進行分析。

3. 樣品分析：以 500  $\mu\text{L}$  的氣密注射針抽取收集的氣體注入氣相層析儀，以積分儀計算峰面積，線性迴歸公式： $y$  (二氧化碳濃度, %) =  $8\text{E-}07x$  (峰面積) + 2.2437,  $R^2 = 0.9951$ ，估算排出氣體之二氧化碳濃度。

#### IV. 藻液綠球藻乾物量檢量線製作與乾物量估算

- (i) 從 C 組取 5 L 培養後藻液，以離心機 (Himac CR22G, Hitachi, Japan) 在 3,000 rpm 條件下離心 15 分鐘，收集下層藻體後，於  $105^\circ\text{C}$  下進行烘乾。
- (ii) 精秤乾物重 0.200、0.400、0.600、0.800、1.000、1.200、1.400、1.600 及 1.800 g 之藻體，先以 10 mL 綠藻液態培養基 (表 1) 浸泡 30 分鐘，而後以電磁攪拌器 (MS-11) 輔以攪拌石混合均勻後，再以綠藻液態培養基定量至 1 L 並繼續攪拌。
- (iii) 參考陳 (2013) 方法，利用分光光譜儀 (Hitachi U-2900, Japan) 在 682 nm 波長下，量測到的吸光值對應綠球藻濃度製作檢量線 (圖 3)，線性迴歸公式： $y$  (綠球藻濃度, g/L) =  $0.2891x$  (吸光值) + 0.0015,  $R^2 = 0.9967$ ，以吸光值估算藻液中綠球藻濃度。

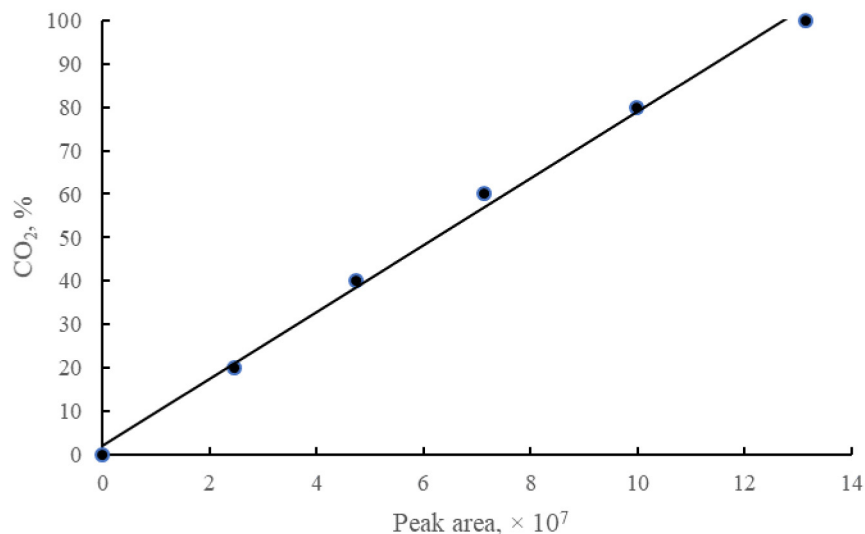


圖 3. 二氧化碳濃度檢量線 ( $y = 8\text{E-}07x + 2.2437$ ;  $R^2 = 0.9951$ )。

Fig. 3. Calibration curve of carbon dioxide concentration.



(iv) 試驗前、後取各組藻液，以「藻液中綠球藻濃度 × 藻液容積」公式，估算綠球藻乾物量。

## V. 二氧化碳消耗量估算

以下列公式估算試驗期間 C 組每生產 1 g 綠球藻之二氧化碳消耗量， $\text{CO}_2$  消耗量 ( $\text{L CO}_2/\text{g Chlorella sp.}$ ) =  $[(\text{試驗前沼氣中 CO}_2 \text{ 含量}(\%) - \text{試驗後沼氣中 CO}_2 \text{ 含量}(\%)) \div 100 \times 12,723 (\text{貯氣袋容積}(\text{L}))] \div (\text{試驗後藻體乾物重}(\text{g}) - \text{試驗前藻體乾物重}(\text{g}))$ ，其中沼氣容積皆以貯氣袋容積估算之。

## VI. 採集各處理組培養前、後之藻液樣品，經 105℃ 乾燥後，分析藻體之總氮、總磷、銅、鋅、鐵、錳含量，分析方法：

- (i) 總氮：參照行政院環境保護署環境檢驗所 NIEA W423.52C (2004) 方法計算之。水中總氮濃度 = 水中硝酸鹽氮濃度 + 水中亞硝酸鹽氮濃度 + 水中凱氏氮濃度。水中硝酸鹽氮、亞硝酸鹽氮及凱氏氮之測定，分別參照行政院環境保護署環境檢驗所 NIEA W419.51A (2006a)、NIEA W418.53C (2019) 及 NIEA W451.51A (2006b) 方法分析之。
- (ii) 總磷：參照行政院環境保護署公告之水中磷檢測方法—分光光度計 / 維生素丙法 (NIEA W423.52C27.53B；行政院環境保護署環境檢驗所，2010) 方法分析之。
- (iii) 礦物質濃度分析：精秤藻體乾重後，放入灰化爐 (NEYTECH-2-525)，在 550 – 650℃ 溫度下灰化約 6 小時。樣品灰化、冷卻、精秤，記錄灰分濃度後，加入 3 N 的鹽酸 10 mL，以鈹玻璃覆蓋置 350℃ 電熱板進行酸解、過濾並定量後，以原子吸收光譜儀 (Atomic absorption spectrometer Z8100, Hitachi, Japan) 測定銅、鋅、鐵及錳濃度。

## VII. 統計分析

二氧化碳供應方式對綠球藻產量、二氧化碳消耗量及藻體成分等分析資料，利用 SAS 統計分析套裝軟體的一般線性模式程序 (General linear model procedure) 進行變方分析 (SAS, 2002)，若有處理效應 ( $P < 0.05$ )，再以鄧肯新多域顯著性測驗法 (Duncan's new multiple range test)，檢定各處理組間的差異顯著性。

# 結果與討論

## I. 二氧化碳供應方式對綠球藻產量之影響

藻液濃度愈高，其吸光值相對愈高 (陳，2013)。試驗前各組每桶藻液量約 80 L，藻液吸光值在 0.631 – 0.664 間，以圖 2 公式 (綠球藻濃度， $\text{g/L} = 0.2891 \times \text{吸光值} + 0.0015$ ) 估算，各組培養前的藻液濃度在 0.202 – 0.213 g/L 間，每桶的綠藻乾物重則介於 16.2 – 17.1 g (表 2)。經 2 週培養後，A 組藻液量顯著地較 B 組及 C 組為多，係因 A 組未提供氣體靜置於培養桶，期間的藻液量僅因表面蒸發略減，C 組則為了瞭解試驗期間  $\text{CO}_2$  消耗量，故設計為加蓋密合，B 組藻液量較 C 組少，係因未加蓋並提供空氣，致蒸發量較大所致。試驗結束時，A 組、B 組及 C 組的藻液濃度分別為 0.409、0.794 及 1.492 g/L，估算藻體乾物重則為 32.6、61.5 及 117 g/桶，C 組藻體產量顯著地 ( $P < 0.05$ ) 較 A 組及 B 組為多，此與藻類具有光合作用色素可以行光合作用來捕獲與固定  $\text{CO}_2$  (張等，2015)，而沼氣含有 30 – 45% 的  $\text{CO}_2$  (Harasimowicz *et al.*, 2007)，空氣的  $\text{CO}_2$  含量僅約 0.0412% (Buis, 2019) 應有關係。

## II. 二氧化碳消耗量

張等 (2015) 指出，藻類培養因種類或生長環境的不同，人工培養可採取自營、異營或混營等方式。藻類大多僅利用溶在水中的  $\text{CO}_2$ ，自營培養最大的問題在於  $\text{CO}_2$  的溶解速率低，致藻類生長速率緩慢，異營培養是必須提供碳源與其他營養源致成本較高，而混營培養可同時進行自營生長和異營生長 (張等，2015)。本試驗 C 組利用養豬廢水及沼氣提供綠球藻培養所需之氮、磷及微量礦物質，並從培養桶底部通入沼氣希提高  $\text{CO}_2$  的溶解效率供作綠球藻營養源。採集 C 組試驗前、後沼氣進行二氧化碳濃度分析，結果試驗前  $\text{CO}_2$  濃度為 23.15%，較 Harasimowicz *et al.* (2007) 指出的 30 – 45% 為低，試驗後則為 7.94%，進行 2 週的綠藻培養約消耗 15.21% 的二氧化碳。本試驗未測定試驗後貯氣袋內的沼氣容積而以試驗前之容積再依照圖 3 的檢量線估算，獲得每生產 1 g 藻體乾物質約消耗 4.84 L 的  $\text{CO}_2$ ，而試驗期間  $\text{CO}_2$  去除率約 65.70% 的推論值。此與 Nagarajan *et al.* (2019b) 指出，微藻具有耐高  $\text{CO}_2$  濃度的特性，可利用沼氣所含  $\text{CO}_2$  供為藻類營養源之研究結果一致。

## III. 綠球藻培養前、後藻液成分變化

綠球藻培養前分析培養液 (經過厭氧及曝氣處理後的養豬廢水) 成分，結果其總氮、總磷、銅、鋅、鐵和錳的含量分別為 324、84、2.1、10.2、25.8 和 4.3 mg/L。經 2 週培養後，C 組培養液的氮和磷濃度皆顯著地較 A

組及 B 組為低 (表 3)，A 組經 2 週培養後培養液成分與培養前相近，而 B 組培養後之培養液除了 N 濃度較培養前為低 ( $P < 0.05$ ) 外，其他成分皆與培養前相近，此應與 C 組藻體產量顯著高於 A 組及 B 組有關，本結果與渠等研究指出藻類可耐受養豬廢水中的高氮含量，利用氮和磷作為營養物質之論述一致 (De la Noüe and De Pauw, 1988; Larsdotter, 2006; Abdel-Raouf *et al.*, 2012; Nagarajan *et al.*, 2019a)。C 組使用氮和磷濃度分別為 324 mg/L 和 84 mg/L 的養豬廢水作為綠球藻培養液，經培養 2 週後培養液中氮和磷濃度降為 200 mg/L 和 49 mg/L，期間去除約 124 mg/L 和 35 mg/L 的氮和磷，去除率分別為 38.4% 和 41.4%，顯示綠球藻具有利用氮和磷的能力 (Larsdotter, 2006; Abdel-Raouf *et al.*, 2012)，可利用於養豬廢水的氮磷去除。本試驗經培養綠球藻 2 週後，培養液氮和磷濃度仍高，後續將嘗試延長培養期間，以了解綠球藻去除養豬廢水氮磷的最佳效果。各組培養液在培養後的銅、鋅、鐵和錳含量差異皆相近，而去除率皆以 C 組顯著地較 A 組及 B 組顯著為高，與 C 組藻體產量較 A 組及 B 組皆高應有相關性。

表 2. 二氧化碳供應對綠球藻產量之影響

Table 2. Effect of carbon dioxide supply on *Chlorella* sp. production

Items	Group A <sup>1</sup>	Group B	Group C	SE
Volume, L/tub				
Before cultivation	80.1	80.2	80.1	0.1
After cultivation	79.6 <sup>a</sup>	77.4 <sup>c</sup>	78.5 <sup>b</sup>	0.1
Algae concentration <sup>2</sup> , g/L				
Before cultivation	0.212 <sup>a</sup>	0.202 <sup>b</sup>	0.213 <sup>a</sup>	0.01
After cultivation	0.409 <sup>c</sup>	0.794 <sup>b</sup>	1.492 <sup>a</sup>	0.02
Algae dry weight <sup>2</sup> , g/tub				
Before cultivation	16.98	16.20	17.06	0.05
After cultivation	32.58 <sup>c</sup>	61.47 <sup>b</sup>	117.09 <sup>a</sup>	0.07
Difference	15.59 <sup>c</sup>	45.27 <sup>b</sup>	99.98 <sup>a</sup>	0.06

<sup>1</sup> Group A: static state; Group B: CO<sub>2</sub> supplied by air bubbling; Group C: CO<sub>2</sub> supplied by biogas bubbling.

<sup>2</sup> Estimated value, algae concentration =  $0.2891 \times \text{absorbance value} + 0.0015$ ; algae dry weight = algae concentration  $\times$  volume.

<sup>a, b, c</sup> Means in the same row without the same superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

表 3. 綠球藻培養前後培養液成分變化

Table 3. Compositions of culture medium before and after cultivation of *Chlorella* sp

Items	Before cultivation	After cultivation			SE
		Group A <sup>1</sup>	Group B	Group C	
Concentration, mg/L					
Nitrogen	324 <sup>a</sup>	313 <sup>a</sup>	280 <sup>b</sup>	200 <sup>c</sup>	12.0
Phosphorus	84 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	49 <sup>b</sup>	6.0
Copper	2.1	2.0	1.9	1.8	0.2
Zinc	10.2	9.9	10.0	9.4	0.2
Iron	25.8	24.9	25.0	23.5	0.3
Manganese	4.3	4.0	3.9	3.6	0.2
Removal rate, %					
Nitrogen		3.37 <sup>c</sup>	13.54 <sup>b</sup>	38.36 <sup>a</sup>	4.30
Phosphorus		4.46 <sup>c</sup>	14.35 <sup>b</sup>	41.35 <sup>a</sup>	3.90
Copper		6.03 <sup>b</sup>	7.16 <sup>b</sup>	16.17 <sup>a</sup>	0.35
Zinc		2.48 <sup>b</sup>	1.91 <sup>b</sup>	7.58 <sup>a</sup>	0.21
Iron		3.56 <sup>b</sup>	3.04 <sup>b</sup>	8.93 <sup>a</sup>	0.33
Manganese		7.67 <sup>b</sup>	8.24 <sup>b</sup>	16.05 <sup>a</sup>	0.68

<sup>1</sup> Described as in Table 2.

<sup>a, b, c</sup> Means in the same row without the same superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## IV. 綠球藻乾物質成分

C 組乾物質氮、鐵和錳含量皆顯著地較 A 組及 B 組為高，磷含量也較 A 組為高 ( $P < 0.05$ )，而銅和鋅含量各組間相近 (表 4)，此與 C 組  $\text{CO}_2$  供應量較 A 組及 B 組皆多 (張等, 2015) 應有關係。各組乾物質氮含量達 6.61 – 10.3%，估算粗蛋白質含量介於 41 – 64% 間，與大豆粕及魚粉相近，而磷含量 (2.18 – 2.86%) 也與魚粉的 2.98% (行政院農業委員會畜產試驗所, 2011) 相近。銅、鋅、鐵和錳的含量分別為 20 – 22ppm、59 – 61 ppm、140 – 158 ppm 及 28 – 37 ppm。Marta *et al.* (2017) 整理了多篇研究報告指出，綠球藻的粗蛋白與磷分別為 37.7 – 47.8% 與 0.96 – 1.76%，而鐵、錳和鋅的含量則介於 400 – 5,500、20 – 100 和 6 – 50 mg/kg 間，本試驗綠球藻的磷含量較 Marta *et al.* (2017) 整理的文獻數據為高，而鐵的含量則明顯較低。Colla *et al.* (2007) 指出，藻類具供為畜禽飼糧原料之可行性，但由於單胃動物很難消化微藻細胞壁，必須開發適當的技術以提高營養分的生物可利用率 (Austic *et al.*, 2013; Lum *et al.*, 2013)。

表 4. 培養後綠球藻乾物質成分

Table 4. The dry matter composition of *Chlorella* sp. after cultivation

Items	Group A <sup>1</sup>	Group B	Group C	SE
Nitrogen, %	6.61 <sup>c</sup>	9.50 <sup>b</sup>	10.27 <sup>a</sup>	0.24
Phosphorus, %	2.18 <sup>b</sup>	2.58 <sup>ab</sup>	2.86 <sup>a</sup>	
Copper, ppm	20	21	22	1.3
Zinc, ppm	59	61	61	2.5
Iron, ppm	140 <sup>c</sup>	152 <sup>b</sup>	158 <sup>a</sup>	1.3
Manganese, ppm	28 <sup>c</sup>	34 <sup>b</sup>	37 <sup>a</sup>	1.6
Crude protein <sup>2</sup> , %	41.31	59.37	64.19	—

<sup>1</sup> Described as in Table 2.

<sup>2</sup> Estimated value, Crude protein = Nitrogen  $\times$  6.25.

<sup>a, b, c</sup> Means in the same row without the same superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 結 論

本試驗以三種不同二氧化碳供應方式 (靜置、空氣曝氣及沼氣曝氣)，發現應用沼氣供應二氧化碳組 (C 組) 在為期 2 週的培養期間藻體產量最高，而生產的綠球藻粗蛋白含量達 64%，總氮 (38.4%) 和總磷 (41.4%) 的去除率皆較 A 組及 B 組為高，每生產 1 g 綠球藻估計約消耗 4.84 L 二氧化碳，藻體粗蛋白含量與目前國內常用的蛋白質飼料原料相近。但藻液以離心方法收穫藻體，培養液上層仍有藻體懸浮，必須再經適當處理後始得放流，以符合放流水標準。研究結果後續在廢水處理方面，可嘗試應用於養豬廢水氨磷去除、利用藻液作為沼氣去除二氧化碳之洗滌液，以及藻體收穫後培養液處理模式的研究。在藻體應用方面，將朝精進藻體收穫技術與細胞壁破壁技術，並進一步將藻體開發作為畜禽飼糧替代原料方面進行研究。

## 參考文獻

- 生物資源及研究中心。綠藻培養基配方，取自 [https://catalog.brcr.firdi.org.tw/BSAS\\_cart/controller](https://catalog.brcr.firdi.org.tw/BSAS_cart/controller)。
- 行政院農業委員會畜產試驗所。2011。臺灣飼料成分手冊 (第三版)，pp. 5-17。行政院農業委員會畜產試驗所專輯第 147 號。
- 行政院環境保護署。2019。放流水標準，中華民國 108 年 04 月 29 日修正。取自 <https://law.moj.gov.tw/LawClass/LawAll.aspx?pcode=O0040004>。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2010。水中磷檢測方法—分光光度計 / 維生素丙法 (NIEA W427.53B)。中華民國 99 年 9 月 15 日環署檢字第 0990084224 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2004。水中總氮檢測方法 (NIEA W423.52C)。中華民國 93 年 8 月 9 日環署檢字第 0930057400 號公告。

- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006a。水中硝酸鹽氮檢測方法—分光光度計法 (NIEA W419.51A)。中華民國 95 年 8 月 8 日環署檢字第 0950062980 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006b。水中凱氏氮檢測方法 (NIEA W451.51A)。中華民國 95 年 3 月 31 日環署檢字第 0950025578 號公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2019。水中亞硝酸鹽氮檢測方法—比色法 (NIEA W418.54C)。中華民國 108 年 7 月 30 日環署授檢字第 1080004541 號公告。
- 曾四恭、吳建輝、鄭榮春、郭猛德、馬冀芳。2003。生物處理法去除養豬廢水中氮之研究 (上)。飼料營養雜誌 10: 84-92。 <http://www.miobuffer.com.tw/fnm/199210/06.htm>。
- 陳志義。2013。探討小球藻最適化醱酵培養條件。修平學報 26: 1-10。
- 張嘉修、陳俊延、林志生、楊勝仲、周德珍、郭子禎、顏宏偉、李澤民。2015。二氧化碳再利用—微藻養殖。科學發展 510: 12-16。
- 蔡政辰、童淑珠、邱郡鈴、蘇敏毅、溫筱玫。2010。螺旋藻淨化畜牧業放流水之研究。廢水處理技術研討會, pp.1-13。中華民國環境工程學會編印。
- 蔡孟潔、周楚洋。2005。豬糞尿水之生物去氮除磷。農業機械學刊 14: 1-12。
- 蘇天明、鄭閔謙、廖仁寶、翁義翔、蕭庭訓、程梅萍。2016。利用畜牧廢水培養綠藻。中畜會誌 45 (增刊): 126。
- 蘇天明、鍾承訓、蕭庭訓、程梅萍。2020。三段式處理對不同濃度養豬廢水之處理效果。畜產研究 53: 82-90。
- Abdel-Raouf, N., A. A. Al-Homaidan and I. B. M. Ibraheem. 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi J. Biol. Sci. 19: 257-275.
- Abinandan, S. and S. Shanthakuma. 2015. Challenges and opportunities in application of microalgae (*Chlorophyta*) for wastewater treatment: A review. Renew. Sust. Energ. Rev. 52: 123-132.
- Austic, R., A. Mustafa, B. Jung, S. Gatrell and X. Lei, 2013. Potential and limitation of a new defatted diatom microalgal biomass in replacing soybean meal and corn in diets for broiler chickens. J. Agric. Food Chem. 31: 7341-7348.
- Buis, A. 2019. The Atmosphere: getting a handle on carbon dioxide. NASA's Jet Propulsion Laboratory. <https://climate.nasa.gov/news/2915/the-atmosphere-getting-a-handle-on-carbon-dioxide/>.
- Cheng, D. L., H. H. Ngo, W. S. Guo, S. W. Chang, D. D. Nguyen and S. M. Kumar. 2019. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. Bioresour. Technol. 275: 109-122.
- Colla, L. M., C. O. Reinehr, C. Reichert and J. A. V. Costa. 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. Bioresour. Technol. 98: 1489-1493.
- De la Noüe, J. and N. De Pauw. 1988. The potential of microalgal biotechnology. A review of production and uses of microalgae. Biotechnol. Adv. 6: 725-770.
- Dennehy, C., P. G. Lawlor, Y. Jiang, G. E. Gardiner, S. Xie, L. D. Nghiem and X. Zhan. 2017. Greenhouse gas emissions from different pig manure management techniques: a critical analysis. Front. Environ. Sci. Eng. 11:11. <https://doi.org/10.1007/s11783-017-0942-6>.
- Giannuzzi, L., D. Sedan, R. Echenique and D. Andrinolo. 2011. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. Mar. Drugs 9: 2164-2175. doi:10.3390/md9112164.
- Harasimowicz, M., P. Orluk, G. Zakrzewska-Trznadel and A. G. Chmielewski. 2007. Application of polyimide membranes for biogas purification and enrichment. J. Hazard. Mater. 144: 698-702.
- Hu, Y., M. Kumar, Z. Wang, X. Zhan and D. B. Stengel. 2021. Filamentous microalgae as an advantageous co-substrate for enhanced methane production and digestate dewaterability in anaerobic co-digestion of pig manure. Waste Manage. 119: 399-407.
- Larsdotter, K. 2006. Wastewater treatment with microalgae—a literature review. Vatten. 62: 31-38.
- Lum, K., J. Kim and X. Lei. 2013. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. J. Anim. Sci. Biotechnol. 4:53. <http://www.jasbsci.com/content/4/1/53>.
- Marta, S. M., C. Cardoso, P. A. Lopes, D. Coelho, C. Afonso, N. M. Bandarra and J. A. M. Prates. 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. Livest. Sci. 205:111-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2017.09.020>.
- Nagarajan, D., A. Kusmayadic, H. W. Yenc, C. D. Dongd, D. J. Lee and J. S. Chang. 2019a. Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes. Bioresour. Technol. 289:121718. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121718>.



- Nagarajan, D., D. J. Lee and J. S. Chang. 2019b. Integration of anaerobic digestion and microalgal cultivation for digestate bioremediation and biogas upgrading. *Bioresour. Technol.* 290: 121804. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121804>.
- Prosekov, A. Y. and S. A. Ivanova. 2018. Food security: The challenge of the present. *Geoforum* 91: 73-77.
- SAS. 2002. SAS procedure guide for personal computers. Version 6th Ed. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Travieso, L., F. Benitez, E. Sanchez, R. Borja, A. Martin and M. F. Colmenarejo. 2006. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. *Ecol. Eng.* 28: 158-165.
- Wang, Z., Y. Jiang, S. Wang, Y. Zhang, Y. Hu, Z. H. Hu, G. Wu and X. Zhan. 2020. Impact of total solids content on anaerobic co-digestion of pig manure and food waste: Insights into shifting of the methanogenic pathway. *Waste Manage.* 114: 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.06.048>.

# Application of *Chlorella* sp. to the removal of nitrogen and phosphorus in pig wastewater and carbon dioxide in biogas <sup>(1)</sup>

Tein-Ming Su <sup>(2) (4)</sup> Yi-Hsiang Weng <sup>(2)</sup> Ren-Bao Liaw <sup>(2)</sup> Ting-Hsun Hsiao <sup>(2)</sup> and Mei-Ping Cheng <sup>(3)</sup>

Received: Apr. 21, 2021; Accepted: Jun. 29, 2021

## Abstract

After the three-stage treatment of pig wastewater, concentrations of nitrogen (N) and phosphorus (P) of the water were still high. The biogas produced in the anaerobic treatment stage contained a high proportion of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), which could provide algae as a carbon source. Therefore, the aim of this study was to explore the effects of application of the discharged pig wastewater from the three-stage treatment system and the biogas produced from the anaerobic stage to cultivate *Chlorella* sp., with regards to the removal of N and P in the wastewater and the consumption of CO<sub>2</sub> in the biogas. The reuse of resources is expected to reduce the negative impacts of the discharged wastewater on the water body and of the biogas on global warming. A sample of treated pig wastewater with N and P concentrations of 324 mg/L and 84 mg/L, respectively, was used as the culture medium for *Chlorella* sp. Three different carbon dioxide supply methods including static state (group A), forced air bubbling (group B) and forced biogas bubbling (group C) were used on the cultivation of *Chlorella* sp. After two weeks of cultivation, the concentration of N (200 mg/L) and P (49 mg/L) in the culture medium of group C was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than those of groups A and B. The removal efficacies of N and P of group C were 38.4% and 41.4%, respectively. The biomass production of algae of group C was higher ( $P < 0.05$ ) than those of groups A and B, and the carbon dioxide consumption of *Chlorella* sp. was estimated to be 4.84 L/g. Besides. The contents of crude protein (CP) and P of algae produced from all the three groups were between 41 to 64% and 2.18 to 2.86% on a dry matter basis, respectively. In summary, the use of the three-stage treated pig wastewater and biogas to cultivate *Chlorella* sp. can effectively promote its growth and reduce the N and P contents of wastewater and the CO<sub>2</sub> in the biogas. The CP and P content of *Chlorella* sp. are similar to those of soybean meal and fish meal, which could likely be used as one of feedstuff ingredients. However, it is necessary to refine the algae harvesting and the cell wall breaking technology, in practice, and there were still some algae suspended in the upper layer of harvested culture liquid after the centrifugation operation, which must be properly treated.

Key words: *Chlorella* sp., Pig wastewater, Nitrogen and phosphate removal.

(1) Contribution No. 2670 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Livestock Management Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Chief Secretary Office, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: tmsu@mail.tlri.gov.tw.