

利用莱茵衣藻去除污水中氮磷的研究

邓旭, 魏斌, 胡章立

(深圳大学生命科学学院, 深圳 518060)

摘要:对莱茵衣藻去除废水中氮磷的性能进行了研究,考察了初始氮磷浓度、氮磷比、光照条件、pH值和细胞固定化等因素对去除效率的影响。结果表明,莱茵衣藻对氮磷的去除率在初始氮磷浓度分别在 $55\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下时接近100%,但初始氨氮浓度进一步升高至 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时会导致氨氮去除率急剧下降至50%。当氮磷比为5:1和10:1时,衣藻在3 d内完全吸收水体中的氨氮,而当氮磷比为25:1时则需要6 d;3种氮磷比下衣藻基本上4 d内能完全去除水体中的磷。2种光照条件下(L/D为24 h:0 h和12 h:12 h)衣藻对氮磷的去除率都能达到100%,但L/D为24 h:0 h时的去除速率更快。衣藻去除氮磷的最适pH范围为6~7。藻细胞固定化后对氨氮的去除能力显著提高,在初始氨氮浓度为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时去除率由游离细胞的50%提高到100%;对磷的去除率不变,但速率有所减慢。

关键词:莱茵衣藻;氨氮;磷;污水处理;固定化

中图分类号:X17 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)06-1489-05

Study on the Removal of Nitrogen and Phosphorus from Wastewater by *Chlamydomonas reinhardtii*

DENG Xu, WEI Bin, HU Zhang-li

(College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: *Chlamydomonas reinhardtii* was employed to remove nitrogen and phosphorus from wastewater. The effects of initial NH_4^+-N and TP concentrations, N/P ratios, Light/Darkness ratios, pH and immobilization on the removal of NH_4^+-N and TP were evaluated. The results showed that *C. reinhardtii* could almost 100% remove NH_4^+-N and TP as initial concentrations of NH_4^+-N and TP were no more than $55\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, whereas the removal ratio of NH_4^+-N decreased drastically to 50% with initial NH_4^+-N concentration coming up to $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Under N/P ratios of 5:1 and 10:1, *C. reinhardtii* could completely remove NH_4^+-N within 3 d, while 6 d was needed with N/P ratio being 25:1. Different from NH_4^+-N removal, the removal ratio of TP could reach almost 100% within 4 d under 3 N/P ratios. With L/D ratios of 24 h:0 h and 12 h:12 h, 100% removal of NH_4^+-N and TP could be achieved by *C. reinhardtii*, but the removal rate under L/D ratio of 24 h:0 h was relatively faster. The optimal pH range for *C. reinhardtii* to remove NH_4^+-N and TP was 6~7. After immobilization, the ability of *C. reinhardtii* to remove NH_4^+-N was significantly enhanced as the removal ratio of NH_4^+-N came up to 100% with initial NH_4^+-N concentration being $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The ability of immobilized *C. reinhardtii* to remove TP kept stable, whereas the removal rate was slowed slightly.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; NH_4^+-N ; phosphorus; wastewater treatment; immobilization

水体富营养化的根本原因是水体氮磷超标^[1]。传统的活性污泥生物处理法对COD去除率虽然能达90%以上,但脱氮率一般约为20%~50%,除磷率为20%~30%,致使出水氮磷的含量大大超过了富营养化的临界浓度,必须进一步进行脱氮除磷处理^[2]。Oswald等^[3]研究发现利用藻类可以去除污水中的氮、磷营养物质以及释放氧气供好氧微生物分解代谢所需。

目前已有学者对小球藻、栅藻、颤藻、硅藻等藻类吸收氮磷的能力进行了研究^[4,5],考察了初始氮磷浓度^[6,7]、氮磷比^[8]、光照条件^[9]等因素对藻细胞去除氮磷的影响,但至今鲜见利用莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)脱氮除磷的报道。莱茵衣藻是一种3套基因组都能进行遗传转化的单细胞

生物,遗传背景清楚,易于基因改造提高性能,而且具有培养条件简单、生长周期短、光合效率高等特点,被称为“光合酵母”^[10]。本实验对莱茵衣藻吸收水体中氮磷的性能及相应的影响因素进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种

莱茵衣藻 cc-124,购自美国衣藻中心(*Chlamydomonas* Center),本实验室保藏。

收稿日期:2009-08-16;修订日期:2009-11-08

基金项目:国家自然科学基金项目(30770340);深圳市南山区科技研发项目(南科院2009030)

作者简介:邓旭(1968~),男,教授,主要研究方向为环境生物技术, E-mail: dengxu@szu.edu.cn

1.1.2 培养基

TAP(Tris-acetate-phosphate)培养基,基本配方: Tris 2.42 g, 4 × Beijerinck salts 25 mL, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 1 mL, 冰乙酸 1 mL, 微量元素 1 mL, 去离子水定容至1 000 mL.

1.1.3 人工废水

实验废水参考一般市政污水氮磷含量配制^[11], 成分如下: 可溶性淀粉 0.05 g, 尿素 0.15 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.075 g, CaHPO_4 20.005 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g, NaHCO_3 0.30 g, FeCl_3 (1%) 0.15 mL, 奶粉 0.2 g, 自来水定容至1 000 mL. 灭菌后污水特征为: COD 150 ~ 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4^+-N 15 ~ 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TP 0.5 ~ 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 2 ~ 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Ca^{2+} 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 7.0 ~ 7.7. 实验过程中污水氨氮和总磷的浓度根据实验要求通过添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 CaHPO_4 控制.

1.2 实验方法

1.2.1 藻细胞预培养

无菌条件下选取保存在生长良好衣藻平板上的单一藻株接入 TAP 液体培养液, 维持温度 22 ~ 24℃、2 000 lx 持续光照条件进行逐级扩大培养, 获得足量衣藻细胞.

1.2.2 藻细胞吸收氮磷性能研究

将获得藻种在 $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min, 收集浓缩藻液并测定藻细胞浓度. 取若干支 250 mL 干净的锥形瓶, 分别配置 150 mL 待处理污水, 加入一定量的浓缩藻液, 使得每个实验条件下初始藻量在 10^6 个/mL 左右. 改变初始氮磷浓度、氮磷比、光照时间等实验条件, 考察对衣藻去除氮磷的影响. 每个实验设置 3 个平行样, 取平均值作为最终实验

结果.

1.2.3 藻细胞固定化

配制 3% 的海藻酸钠和 2% 的氯化钙溶液, 分别灭菌后冷却至室温. 将浓缩藻液与海藻酸钠溶液按比例混合(使得固定化小球含藻细胞浓度约为 10^6 个/mL)搅拌均匀后, 用针管或恒流泵逐滴滴入氯化钙溶液, 静置 2 ~ 4 h 后滤出颗粒, 用无菌生理盐水洗净备用. 考察藻细胞固定化后的脱氮除磷情况时, 通过对固定化小球的藻细胞计数使得加入废水中固定化藻球所含的初始藻细胞数与游离条件下藻细胞数相同.

1.2.4 分析方法

氨氮浓度测定采用纳氏试剂分光光度计法(GB 7479-87), 总磷浓度测定采用钼酸铵分光光度计法(GB 11893-89). 藻细胞浓度采用分光光度计法测定并换算成干重.

2 结果与讨论

2.1 初始氮磷浓度对莱茵衣藻吸收氮磷的影响

图 1(a) 的结果表明, 初始氨氮浓度在 $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时, 藻细胞几乎完全吸收水体中的氨氮, 但随着氨氮浓度的进一步升高, 氨氮的去除率急剧下降, 初始氨氮浓度升高到 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时氨氮的最终去除率由原来的 100% 降到 50% 左右, 说明藻细胞对氮的吸收已基本达到饱和. 况琪军等^[12]利用活性藻系统处理初始氨氮浓度在 14.66 ~ 47.36 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的人工废水, 平均氨氮去除率为 58% 左右, 相比而言莱茵衣藻对氨氮的吸收更显优势.

莱茵衣藻对磷的去除能力较强[图 1(b)]. 当水体中磷浓度高达 $7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 藻细胞对 TP 的去

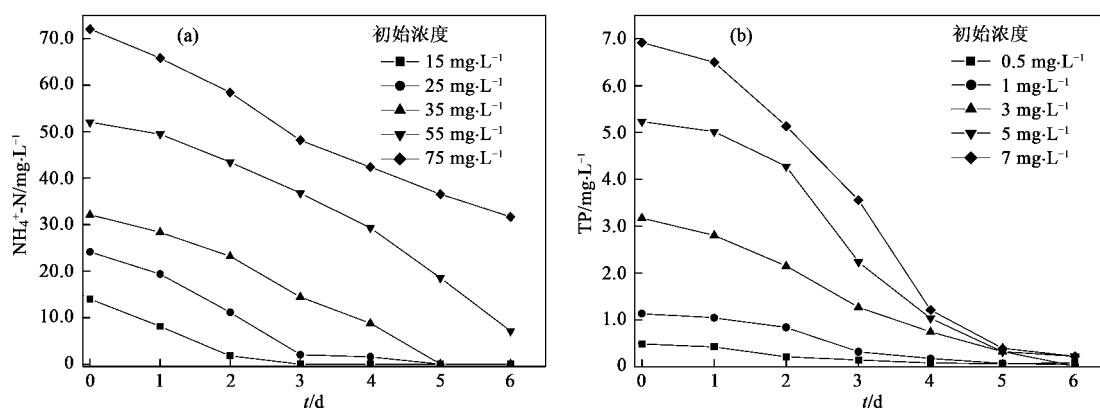


图 1 初始氮磷浓度对衣藻去除氨氮和总磷的影响

Fig. 1 Effects of initial NH_4^+-N and TP concentrations on removal of NH_4^+-N and TP by *C. reinhardtii*

除率仍能达到 100%。逯多^[13]比较了沙角衣藻、斜生栅藻、小型月牙藻和普通小球藻等 4 种藻在不同磷浓度下的除磷能力,结果表明沙角衣藻的除磷能力最强,在磷初始浓度 $5.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时去除率最高为 62.3%。磷的去除一直是污水处理的一个难题,莱茵衣藻超强的磷吸收能力展示了其在污水深度处理领域广泛的应用前景。

2.2 氮磷比

藻类对氮磷去除效率的高低不仅与污水中氮磷的初始浓度有关,还受到水体中氮磷比例的影响。Kunikanes 等^[8]发现适宜于藻类生长的氮磷比为 7:1 ~ 15:1,氮磷比 < 5:1 时就会引起氮限制,而当氮磷比 > 40:1 则会引起磷限制。

本实验考察了 3 个不同氮磷比下 (5:1、10:1 和 25:1) 莱茵衣藻对氮磷的去除情况。从图 2(a) 的结果来看,当氮磷比为 5:1 和 10:1 时 (磷初始浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 藻细胞在第 3 d 就完全去除了废水中的氨氮;而当氮磷比上升到 25:1 时,氨氮需要 6 d 才能全部被吸收。显然氮磷比高时,藻细胞自身的分子结构制约了对外界氮的吸收,衣藻就需要更长的时间增殖出更多的藻细胞才能吸收更多的氮。

不同氮磷比下 (氨氮初始浓度为 $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 藻细胞对磷的去除见图 2(b)。可以看出,藻细胞在 3 种氮磷比下都能实现对总磷的完全去除,所需时间基本都在 4 d 左右,表明莱茵衣藻在不同氮磷比下都能保持较强的磷去除能力。

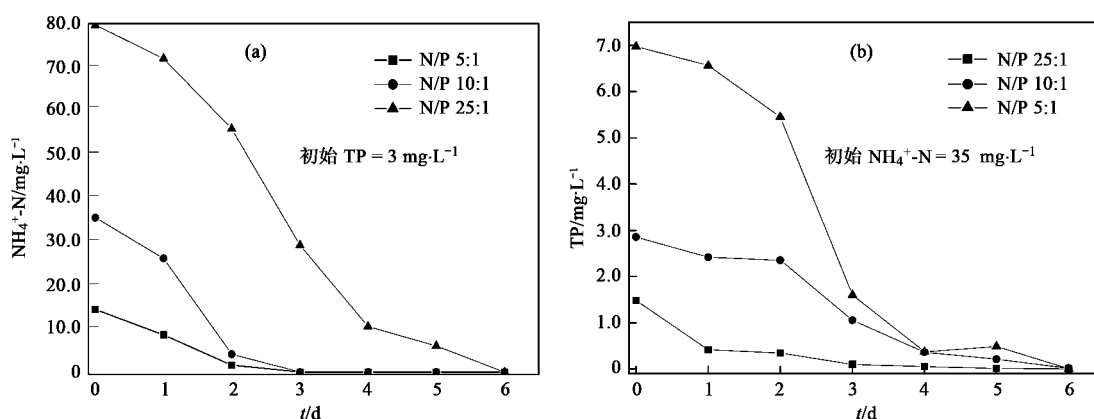


图 2 氮磷比对衣藻去除氨氮和总磷的影响

Fig. 2 Effects of N/P ratios on removal of NH_4^+-N and TP by *C. reinhardtii*

2.3 光照条件

与其它藻类相比,莱茵衣藻拥有更高的光合效率,因此适宜的光照对于衣藻吸收氮磷是必要的。Lee 等^[14]的研究表明,在连续光照 (24 h:0 h) 和光暗交替 (12 h:12 h) 2 种条件下 *Chorella kessleri* 对磷的去除效率均不高,但光暗交替条件下的磷去除率

略高于连续光照。

实验采取了 2 种光照方式,即连续 24 h 光照和 12 h:12 h 光暗交替,光照强度均为 2000 lx 。从实验结果来看,2 种光照方式下藻细胞对水体中氮磷的去除基本都发生在前 6 d,不同光照条件引起的差异主要体现在前面几天的降解速率上 (图 3)。当初始

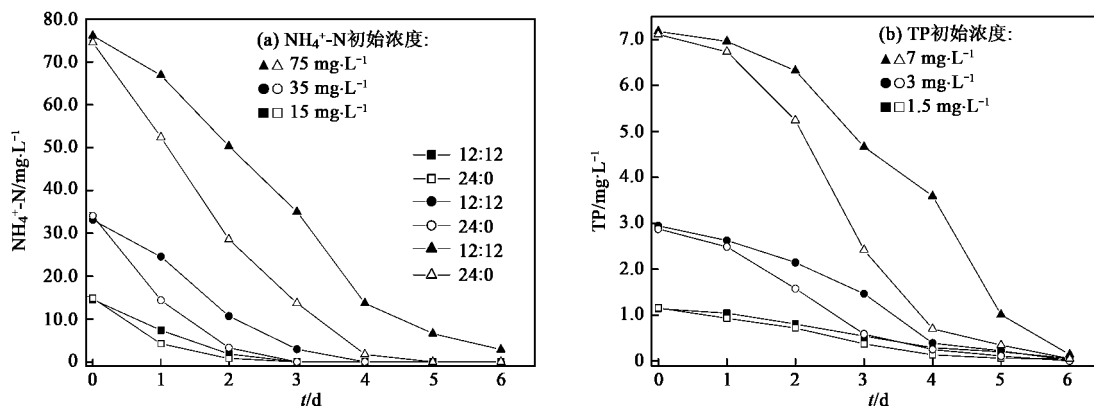


图 3 光暗比对衣藻去除氨氮和总磷的影响

Fig. 3 Effects of L/D ratios on removal of NH_4^+-N and TP by *C. reinhardtii*

氮磷浓度较高时,连续光照条件下衣藻对氮磷的降解明显快于光暗交替情况;但随着初始氮磷浓度的降低这种差异逐渐缩小.光暗交替的光照方式实际是自然环境光照的模拟,虽然这种光照方式下衣藻对高浓度氮磷的降解速率不及连续光照,但考虑到实际废水中氮磷的初始浓度一般达不到本实验涉及的最大浓度,因此这种在降解速率上的差异应该不会影响到实际应用.

2.4 pH 值

适宜藻类生长的 pH 应该在中性范围,但随着藻细胞的生长,水体的 pH 会有所升高.研究表明 pH 升高有利于氮磷的去除,但 pH 大于 8.5 时会对

藻类生长带来危害^[15].对莱茵衣藻的研究表明(图 4),藻细胞在 pH 为 6 时对氨氮的去除效果最好,pH 分别为 5、7 和 8 时衣藻虽然最终也能接近 100% 吸收氨氮,但前 4 d 波动较大,稳定性不如 pH 6.当 pH 升至 9 时去除效果明显变差.总磷的吸收情况与氨氮类似,在 pH 在 6~7 的范围内效果最佳,超出此范围衣藻对磷的吸收明显减弱.造成这种现象的原因显然与藻细胞本身的生长状况有关,即藻细胞只有在最适宜生长的 pH 范围内才能保证对氮磷的高效吸收.考虑到藻细胞的生长会导致 pH 的升高,在实际处理过程中就应对废水的 pH 变化进行适当监控.

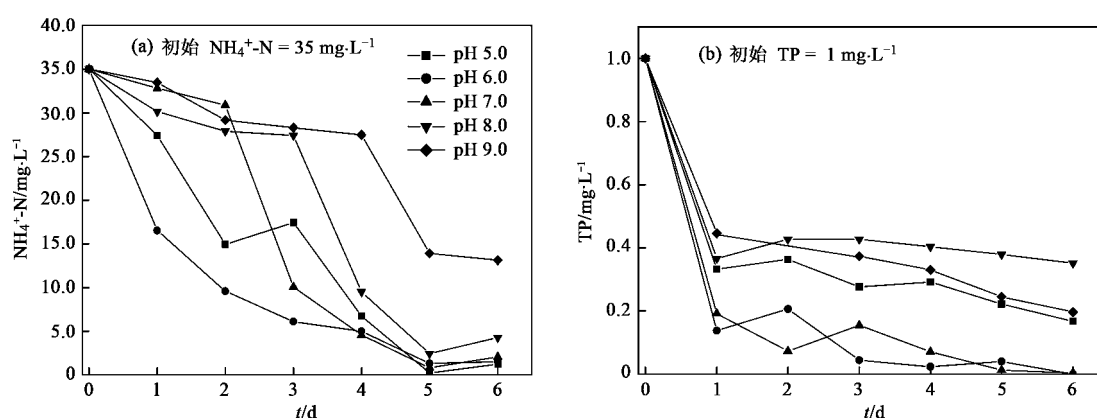


图 4 pH 对衣藻去除氨氮和总磷的影响

Fig. 4 Effects of pH on removal of NH_4^+-N and TP by *C. reinhardtii*

2.5 固定化

在初始氨氮浓度为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时(图 5),游离衣藻对氨氮的去除率只有 50% 左右,但藻细胞经固定化后对氨氮的去除率接近 100%. 对磷的去除,固定化藻细胞的最终去除率与游离衣藻基本没有差

别,但前几天的去除速率较游离细胞有所减慢,原因可能是藻细胞固定化后水体中的磷酸盐进入固定化颗粒的传质阻力增加所致.

固定化在提高藻细胞密度的同时也改变了藻细胞的生境,使其生理活动发生适应性改变.一般来说,固定化提高了藻类的合成代谢,并在一定程度上降低了藻类的分解代谢,能较长时间保持藻细胞活性,延迟衰老^[16,17]. Robinson 等^[18]发现固定化小球藻的平均呼吸率比自由的细胞低,这些自适应行为一定程度上可能导致固定化细胞对氮磷的去除能力增强.严国安等^[19]将斜生栅藻固定化后发现对氮磷的去除率分别较游离藻细胞提高 35% 和 10%. 本实验也得到了类似的结果.

3 结论

(1) 对利用莱茵衣藻去除废水中氮磷的能力进行了分析,考察了多种环境因素对氮磷去除能力的影响.结果表明,莱茵衣藻在多种操作条件下,如废

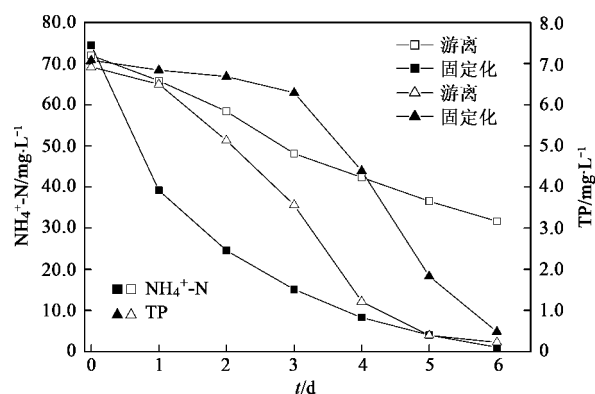


图 5 固定化衣藻与游离衣藻去除氨氮和总磷的比较

Fig. 5 Comparison of removal of NH_4^+-N and TP by immobilized and free *C. reinhardtii*

水初始氮磷浓度分别为 $55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下,3 种氮磷比(5:1、10:1 和 25:1)、2 种光照条件(L/D 分别为 24 h:0 h 和 12 h:12 h)、pH 在 6~7 范围内对氨氮和总磷的最终去除率基本都能达到 100%。

(2)藻细胞固定化后在高初始氨氮浓度下的氨氮去除率较游离细胞有显著提高,初始氨氮浓度 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时氨氮去除率由游离细胞的 50% 上升到 100%,同时固定化藻细胞的磷去除能力保持不变。本研究的实验结果表明莱茵衣藻具有较强的氮磷去除能力。

参考文献:

- [1] 张利平,夏军,胡志芳. 中国水资源状况与水资源安全问题分析[J]. 长江流域资源与环境,2009,18(2):116-120.
- [2] 易津湘. 城市污水生物脱氮除磷技术[J]. 科技创新导报,2008,11:4-5.
- [3] Oswald W J, Gotaas H B. Photosynthesis in sewage treatment [J]. Trans Am Soc Civ Eng,1957,122(1):73-105.
- [4] 凌晓欢,况琪军,胡征宇,等. 两种藻类对水体氮、磷去除效果[J]. 武汉大学学报(理学版),2006,52(4):487-491.
- [5] 吕福荣,杨海波,李英敏,等. 自养条件下小球藻净化氮、磷能力的研究[J]. 生物技术,2003,13(6):46-47.
- [6] Oswald W J. Micro-algae Biotechnology [M]. Florida: C. R. C Press,1988. 314-315.
- [7] Stross R G, Pemrick S M. Nutrient uptake kinetics in phytoplankton: a basis for niche separation [J]. J Hycol, 1974,10(2):164-169.
- [8] Kunidan S, Anekom M, Maehara R. Growth and nutrient uptake of green alga *Scenedesmus dimorphus*, under a wide range of nitrogen/phosphorus ratio [J]. Water Res, 1984,18(10):1299-1311.
- [9] Aziz M A. Industrial wastewater treatment using an activated algae-reactor [J]. Water Sci Tech,1993,8(7):71-76.
- [10] Rochaix J D. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast [J]. Annu Rev Genet,1995,29:209-230.
- [11] 王晓莲,彭永臻,王淑宝,等. 城市可持续污水生物处理技术[J]. 水处理技术,2004,30(2):106-109.
- [12] 况琪军,谭渝云. 活性藻系统对氮磷及有机物的去除研究[J]. 中国环境科学,2001,21(3):212-216.
- [13] 遯多. 利用藻类除去污水中的磷[D]. 成都: 四川大学,2001.
- [14] Lee K, Lee C G. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae [J]. Biotechnol Bioproc Eng,2001,6(3):194-199.
- [15] Bruce E R, McCarty P L. Environmental biotechnology: principles and applications (影印版) [M]. 北京: 清华大学出版社 2002. 412-413.
- [16] Mallick N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review [J]. BioMetals, 2002,15(2):377-390.
- [17] 彭明江,杨平,郭勇. 固定化藻类去除氮磷的研究进展[J]. 资源开发与市场,2005,21(6):507-510.
- [18] Robinson P K, Goulding K H, Mak A L, et al. Factors affecting the growth characteristics of alginate-entrapped *Chlorella* [J]. Enzyme Microbiol Technol, 1986,8(12):729-733.
- [19] 严国安,李益健,王志坚,等. 固定化栅藻对污水的净化及其生理特征的变化[J]. 中国环境科学,1995,15(1):10-13.