

pH 及无机氮化合物对小浮萍生长的影响

种云霄, 胡洪营*, 钱易(清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点实验室, 北京 100084)

摘要:利用浮萍科植物吸收转化污水中的无机氮磷正在成为水处理研究的热点. 本研究以我国常见的小浮萍 (*Lemna minor* L.) 为研究对象, 在完全培养液的基础上模拟生活污水的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度和 pH 范围, 研究了培养条件对小浮萍生长的影响. 结果表明, 低 pH 对小浮萍的生长具有抑制作用, 小浮萍对 pH 耐受的低限在 5 ~ 6 之间, 在 6 ~ 9 的 pH 范围内, 能够正常生长. 水中非离子态的 NH_3 和 NH_4^+ 都会对小浮萍的生长产生抑制作用, 前者的抑制作用更明显. 在 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 为唯一氮源的条件下, 非离子态的 NH_3 浓度大于 0.2 mg/L 时就会对小浮萍的生长产生明显的抑制作用, 大于 2 mg/L 时, 小浮萍基本上不能生长. NO_3^- 在本研究的浓度范围内对小浮萍的生长没有影响, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度的增加可使小浮萍的鲜叶片的叶绿素含量增加, 另外在相同氮的浓度下, 由于生长受抑制, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 中生长的小浮萍过氧化物酶活性高于 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 中的活性.

关键词:小浮萍; $\text{NH}_4^+ - \text{N}$; $\text{NO}_3^- - \text{N}$; pH; 污水处理

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2003)04-06-0035

Effect of Inorganic Nitrogen Compounds and pH on the Growth of Duckweed

Chong Yunxiao, Hu Hongying, Qian Yi (Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The use of duckweed in domestic wastewater treatment was paid increasing attention recently. But inorganic nitrogen compounds and pH of wastewater possibly affect the growth of duckweed. The effect of ammonia, nitrate and pH on the growth of *Lemna minor* L., a common spiece in China, was assessed with laboratory scale experiments. The experiments used artificial culture with different levels of pH, ammonia and nitrate concentrations. The experimental results indicated that the lowest value of pH *Lemna minor* can tolerate was between 5 ~ 6, and it can grow well in pH from 6 to 9. The growth rate of *Lemna minor* was inhibited gradually with increasing concentration of ammonia. The toxicity of ammonia was a result of both forms, NH_3 and NH_4^+ . Compared to NH_4^+ , the effect of NH_3 was much stronger. Nitrate had few inhibitory on the growth of *Lemna minor*. The increases in ammonia and nitrate concentrations can increase the chloropyll content of *Lemna minor*. Activity of peroxidase of *Lemna minor* in ammonia culture was higher than that in nitrate culture because of the toxicity of ammonia.

Keywords: *Lemna minor*; ammonia; nitrate; pH; wastewater treatment; nitrogen removal

浮萍科植物可以漂浮生长在平静的水面上, 把它们放养在氧化塘中用于污水处理, 通称为浮萍处理系统, 该系统具有投资费用低、管理维护简单、能有效地提高氧化塘处理效率、并能回收植物资源等优点, 在许多国家已得到应用^[1~3]. 由于浮萍的生长速度快, 组织氮磷含量高, 生物量易于加工处理, 近年来利用其吸收转化废水中的无机氮磷逐渐成为水处理领域的研究热点^[4, 5].

但是废水中无机氮化合物可能会对浮萍的

生长产生影响. 废水中的无机氮主要以 3 种形式存在: 非离子态的氨 (NH_3)、离子态的氨 (NH_4^+) 和硝酸盐 (NO_3^-). 研究者已经发现, 许多浮萍科植物不能耐受水中高浓度的氨^[6, 7], 并且氨的毒害作用不完全是由 NH_3 引起的, 高浓度的 NH_4^+ 也有一定的影响^[8], 由于 NH_3 的

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (G1999045711)
作者简介: 种云霄 (1974 ~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为水污染治理.

收稿日期: 2002-10-30; 修订日期: 2003-01-21

* 通讯联系人

比例是与水中 pH 相关的,因此 pH 对氨的毒性也会有很大的影响^[9].对于 NO₃⁻,由于植物体内硝酸还原酶活性不同,不同种植物利用 NO₃⁻ 的能力也是不同的,其中有关浮萍科对 NO₃⁻ 的利用研究还比较少^[10].除了影响氨的毒性外,pH 本身过低或过高也会影响植物的生长^[11].小浮萍(*Lemna minor* L.)是在中国分布较广的几类浮萍种之一^[12],有关它对硝酸氮的利用及对 pH 和氨的耐受范围在我国研究较少.本文就废水中常见的 3 种形式无机氮和 pH 对小浮萍生长的影响进行了研究,以期对小浮萍在污水脱氮除磷中的应用提供依据.

1 材料与方法

1.1 萍种及培养条件

小浮萍采自云南滇池附近湿地,带回实验室后用经过曝气生物滤池处理的生活污水(pH:7~8,COD:10~50 mg/L,NH₄⁺-N:10 mg/L 左右,TN:40 mg/L 左右)驯化培养,生物量大量扩增后用作试验材料.

实验室培养条件:温度 26℃~30℃,光照 40~60 μmol·(m²·s)⁻¹,光暗时间比为 16h:8h.试验用培养基以用于青萍培养的完全培养液^[13](表 1)为基础,其中 pH、氮源按实验要求进行调整.

表 1 小浮萍培养液配方

化学药品	浓度/ mg·L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	20
CaCO ₃ ¹⁾	15
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50
K ₂ HPO ₄	40
FeSO ₄ ·7H ₂ O	50
Na ₂ -EDTA	1
H ₃ BO ₃	1.42
MnSO ₄ ·7H ₂ O	1.54
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	6.59
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.52
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.39
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.09

1) CaCO₃ 用浓盐酸溶解;培养液 pH 用 KOH 调节.

小浮萍培养在 250 mL 的塑料烧杯中进行,每个放入培养液 200 mL,实验开始时放入大小均一、生长健壮的小浮萍 20 片(鲜重平均

0.013 g),实验均设 2 个平行.

1.2 实验方法

(1) pH 对小浮萍生长的影响 完全培养液以 NH₄NO₃ 为氮源,氨浓度较低,既可以满足小浮萍生长需要又不会影响其生长,因此本试验以完全培养液为基础,依据废水常见的 pH 范围(6~9)设计 5 个 pH 值:5、6、7、8、9(变动范围±0.3)来考察 pH 对小浮萍生长的影响.完全培养液配制时 CaCO₃ 用稀盐酸溶解,因此 pH 约在 3~4,用 6 mol/L 的 KOH 溶液调整到实验的 pH 值.生长过程中溶液的 pH 由于小浮萍生理代谢的调节发生变动,因此每天用 HCl 和 KOH 调整到设定值.实验进行 18 d,每 5 d 换一次培养液(保证培养液各组分浓度稳定和防止藻类繁生),每 3 d 数一次叶片数.第 18 d 时捞出,称鲜重,取鲜叶片测定叶绿素含量.

(2) 氨和硝酸根在不同 pH 对小浮萍生长的影响 将完全培养液中的氮分别用 NH₄Cl 和 NaNO₃ 代替,使氮源分别为完全的 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N,依据生活污水的范围设计 2 个浓度:20 mg/L 和 40 mg/L,pH 值设计与调整与上相同.实验进行 24 d,每 5 d 天换一次培养液(保证培养液各组分浓度稳定和防止藻类繁生),每 3 d 数一次叶片数.第 24 d 时捞出称鲜重,测定鲜叶片的叶绿素含量和过氧化物酶活性.

1.3 分析方法

(1) 生物量测定 生物量采用叶片数(Fronds)和鲜重(Fresh weight,FW)2 种指标表示,叶片数通过直接计数获得,鲜重则是捞出后用滤纸吸干叶片表面水珠,晾干 10 min 后称量.生物量增加以相对生长率 R 来衡量,按(1)式计算^[14]:

$$R = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t}$$

(1)

式中,W₂:试验结束时的生物量,W₁:试验开始时的生物量,t:实验进行时间,R 为负值时表明小浮萍已受到毒害逐渐死亡,R 大于等于 0 时表明所设置条件小浮萍可以生长耐受.

(2) 鲜叶的叶绿素 叶绿素与植物光合作用有关,因此叶绿素含量可以反映小浮萍的生

理活性.叶绿素用 95 % 的乙醇提取后用比色法测量,单位为 $\text{mg/g}^{[15]}$.

(3) 过氧化物酶活性 过氧化物酶是植物体内普遍存在的一类氧化酶,它在植物体内具有多种生理功能,其中包括植物受到环境胁迫时的应激反应.本研究中采用愈创木酚法测定,以 A_{470}/min 变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活性单位(u),酶活性以单位时间单位鲜重的酶活单位表示,单位为 $\text{u}/(\text{g} \cdot \text{min})^{[15]}$

2 结果与讨论

2.1 pH 值对小浮萍生长的影响

由图 1、2 可见,生长在完全培养液中的小浮萍,在 pH 5 时叶片受到伤害逐渐死亡,18d 时只剩下 4 片,而在 pH 6、7、8、9 则生长较好,叶片数明显增加.由于受到毒害作用,生物量的相对增长率在 pH5 时为负值,但随 pH 增加抑制作用逐渐减弱,在 6 时相对增长率已变为正值并显著增加,在 7 和 8 达到最大,然后随 pH

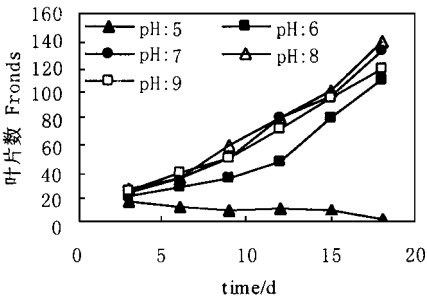


图 1 完全培养液中的小浮萍在不同 pH 的生长曲线
Fig.1 The growth of *Lemna minor* L. under balance medium at different pH

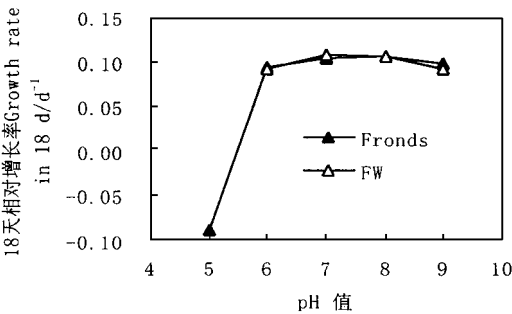


图 2 完全培养液中小浮萍的相对增长率随 pH 的变化
Fig.2 Specific growth rate of *Lemna minor* L. under balance medium at different pH

增加略有减小.小浮萍鲜叶片的叶绿素含量,在 6 ~ 9 范围内,随 pH 升高而下降(图 3).

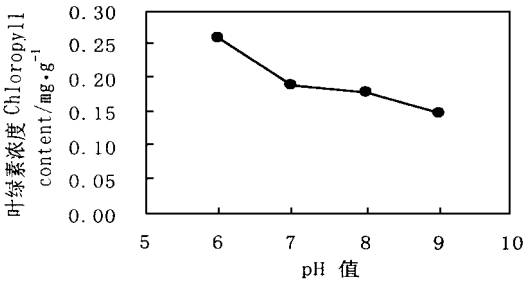


图 3 完全培养液中小浮萍的叶绿素含量随 pH 的变化
Fig.3 Chlorophyll content of *Lemna minor* L. under balance medium at different pH

由于培养液中除 H^+ 外,其它各离子浓度均在小浮萍生长的最适范围内,不会对其生长造成损害,因此在 pH 等于 5 时,小浮萍受到伤害.由于受到高浓度的 H^+ 造成.而在 pH 为 6 时小浮萍生长率已较高,生长速度较快,因此小浮萍能够耐受的 pH 低限在 5 ~ 6 之间.随 pH 升高到 9,小浮萍的相对增长率只略有下降,可以看出 OH^- 浓度的增加,对小浮萍的生长速度影响并不大,因此小浮萍可以在 pH 范围 6 ~ 9 内正常生长.

2.2 NO_3^- 的影响

由图 4 可见,小浮萍生长在含有 20 mg/L 和 40 mg/L NO_3^- -N 浓度下的培养液中,相对生长率及其随 pH 的变化趋势与在完全培养液中相同.在 pH5 时由于受到毒害,叶片逐渐死亡,相对生长率为负值,然后生长率随 pH 逐渐增加,7 ~ 8 时达到最高,然后减小.小浮萍在 NO_3^- -N 浓度 20 mg/L 和 40 mg/L 时相对生长率相差不大.与完全培养液不同的是以鲜重表示的相对生长率要高于叶片数的相对生长率.由图 5 可见,鲜叶片的叶绿素含量在 2 个 NO_3^- -N 浓度下明显高于完全培养液中生长的小浮萍,并且在 40 mg/L NO_3^- -N 中培养的叶绿素含量略高于 20 mg/L 的浓度,但在这 2 个浓度下,在 pH6 ~ 9 范围内叶绿素的含量变化不明显.而小浮萍的过氧化物酶活性在这 2 个 NO_3^- -N 浓度下则是随 pH 先下降后升高,在 7 最低,20 mg/L 时略高于 40 mg/L(图 6).

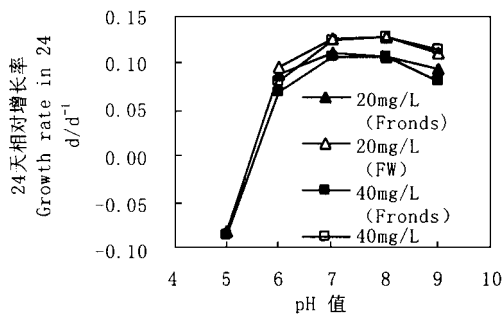
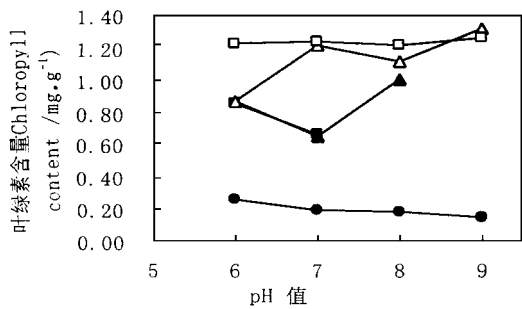


图 4 不同硝酸根浓度下小浮萍的相对增长率随 pH 的变化

Fig.4 Specific growth rate of *Lemna minor* L. under two nitrate concentrations medium at different pH



—▲—20 mg/L NH₄⁺-N —■—40 mg/L NH₄⁺-N
—△—20 mg/L NH₃-N —□—40 mg/L NH₃-N
—●—完全培养液

图 5 不同氮浓度下小浮萍的叶绿素含量随 pH 的变化

Fig.5 Chlorophyll content of *Lemna minor* L. under different concentration of nitrogen at different pH

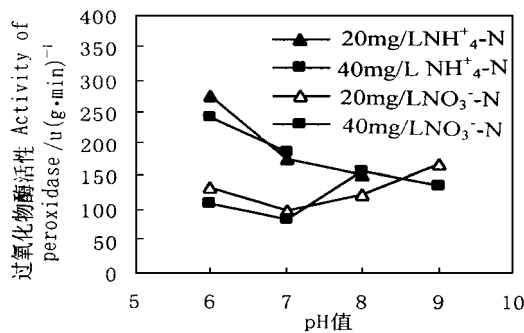


图 6 不同氮浓度下小浮萍的过氧化物酶活性随 pH 的变化

Fig.6 Activity of peroxidase of *Lemna minor* L. under different concentration of nitrogen at different pH

由于在植物体内,氮代谢与光合作用是耦联的,通常情况下吸收氮增多,植物叶绿素含量会增加,并且植物组织组成结构会发生变化,最后导致植物体干重的增加^[16].在本试验中,无论是 NO₃⁻-N 还是 NH₄⁺-N 浓度增加,小浮萍鲜叶的叶绿素含量都有明显的升高(图 5),并且随氮的浓度增加,小浮萍鲜重的相对生长率高于叶片数的相对生长率.这可能是由于氮的浓度增加使叶片合成的干物质含量增加,导致叶片重量的增加速度高于叶片数增加.

NO₃⁻ 是许多植物能够优先利用的无机氮源,它进入植物体后在叶绿体中经硝酸还原酶催化还原为氨,然后进入植物体的氮代谢系统^[16].本试验的结果表明,小浮萍可以利用 NO₃⁻-N 作为无机氮源.从小浮萍的生长速度来看,硝酸氮浓度从 20 mg/L 升高到 40 mg/L 生长率在最佳的 pH 下基本上没有变化,可见小于等于 20 mg/L NO₃⁻-N 就满足其生长需要,NO₃⁻-N 浓度再增加并不会影响其生长速度.进入植物体内的多余部分 NO₃⁻-N 会被储存在液泡中,以维持细胞内离子平衡,从而避免对细胞结构造成伤害^[16].这样由于液泡的调节作用,使得小浮萍在高的硝酸盐浓度下也可以生长较好,并且很可能由于液泡的储存作用,使小浮萍能够吸收水中更多的 NO₃⁻-N.经过二级处理的生活污水,大部分 NH₄⁺-N 已被转变为 NO₃⁻-N,浓度一般在 10 mg/L 到 40 mg/L 之间,本试验结果来看小浮萍在此 NO₃⁻-N 浓度范围内,生长速度可达到 0.12 g·(g·d)⁻¹ 到 0.14 g·(g·d)⁻¹.

2.3 氨的影响

由图 7 可见,在含有 20 mg/L 和 40 mg/L NH₄⁺-N 的培养液中,在 pH 为 5 时,小浮萍由于受到毒害叶片逐渐死亡,相对生长率均为负值,随 pH 增加,抑制作用减轻,相对生长率亦逐渐增加并变为正值,在 7 时最大,之后随 pH 和 NH₄⁺-N 浓度增加相对生长率又开始下降,在 pH8 时还可耐受 20 mg/L NH₄⁺-N,但已不能耐受 40 mg/L NH₄⁺-N,到 pH9 时对 2 个 NH₄⁺-N 浓度均不能耐受,相对生长率又都为负值.在相

同 pH 值下,与完全培养液和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 相比,在这 2 个 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度的培养液中小浮萍的相对生长率明显下降,并且小浮萍在 40 mg/L $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 下生长率也明显低于 20 mg/L . 在 $\text{pH} 6 \sim 8$ 范围内,鲜叶片的叶绿素含量先下降后上升,在相同 pH 下均高于完全培养液,但低于 20 mg/L 和 40 mg/L $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 培养液(图 5). 小浮萍在 $\text{pH} 6 \sim 8$ 范围内的过氧化物酶活性随 pH 升高而降低,在相同 pH 下高于 20 mg/L 和 40 mg/L $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 培养液.

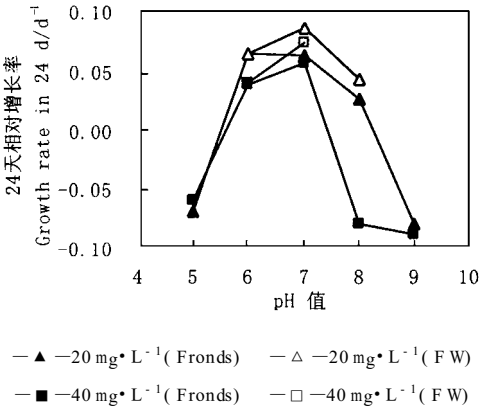


图 7 不同氨氮浓度下小浮萍的相对增长率随 pH 的变化
Fig. 7 Specific growth rate of *Lemna minor* L. under two concentration of ammonia at different pH

虽然 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 是可被植物直接利用氮的形式,但高浓度的 NH_3 和 NH_4^+ 都会对植物产生毒害作用,影响植物的生长,因此大部分的植物不能耐受高浓度的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ ^[16, 17]. 本试验的结果看,小浮萍在 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 培养液中的相对生长率明显低于完全培养液中,并且随 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度增加生长受抑制的程度也增大. 在同一 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度下受抑制程度则与 pH 明显相关,在 7 左右时受抑制程度最小,大于 7 时受到的抑制都增加. 由前面结果可知, pH 小于 6 时主要是 H^+ 的作用. 而随 pH 增大 NH_3 的解离会增加,由于 NH_3 可以通过扩散作用穿过植物细胞膜^[18],当大量的 NH_3 快速穿过时就会对膜造成伤害,因此高浓度的 NH_3 会对植物生长产生抑制作用^[16],因此 pH 大于 7 时小浮萍受到的

抑制作用主要是由于 NH_3 的作用. 根据以下公式^[9]可以计算出 3 个 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度(完全培养液 20 mg/L 、 40 mg/L)在不同 pH 下解离出的 NH_3 的浓度,温度取平均值 27°C .

$$\text{NH}_3(\%) = \frac{100}{1 + 10^{(\text{p}K_a - \text{pH})}} \quad (2)$$

K_a 为解离常数,与温度和 pH 有关,在确定的温度 T 和 pH 值下可以求出非离子态 NH_3 的百分数:

$$K_a = \frac{[\text{NH}_3][\text{H}^+]}{[\text{NH}_4^+]}$$
$$\text{p}K_a = \frac{0.09108 + 2729.92}{(273.2 + T)} \quad (3)$$

然后得出小浮萍相对生长率随 NH_3 浓度的变化(见图 8). 在 20 mg/L 和 40 mg/L $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度时,当解离的 NH_3 浓度超过 0.2 mg/L 时小浮萍的相对生长率开始急剧下降,在 2 mg/L 左右时其相对生长率已非常低. 另外与 20 mg/L 相比在 40 mg/L 时相对生长率下降趋势更快. 这个结果表明, NH_3 的解离增加到一定程度时就会对小浮萍生长产生强烈的抑制作用,并且随 NH_3 的浓度进一步增加,抑制作用增强,直至叶片受到毒害逐渐死亡. 但也可以看出 NH_3 的抑制程度与总体 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度有关,当解离出的 NH_3 浓度相同时,总体 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的浓度越高,抑制程度越大,这可能是由于高浓度的 NH_4^+ 也产生了较强的抑制作用. 图中 3.5 mg/L 是完全培养液的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度,可以看出在这

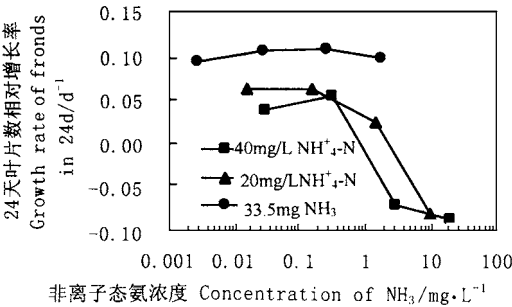


图 8 小浮萍的相对增长率随不同 pH 下解离出的氨浓度的变化
Fig. 8 Specific growth rate of *Lemna minor* L. under different concentration of free NH_3

个浓度下,解离出的非离子态氨对小浮萍的相对生长率影响不大.

3 结 论

(1)低 pH 对小浮萍的生长有较强的抑制作用,当 pH 低于 5~6 小浮萍不能生长.

(2)小于等于 40 mg/L 的 $\text{NO}_3^- \text{ - N}$ 对小浮萍的生长没有影响,但高浓度 $\text{NO}_3^- \text{ - N}$ 可提高叶绿素浓度.

(3)高浓度的 $\text{NH}_4^+ \text{ - N}$ 对小浮萍的生长有抑制作用,在氨为唯一氮源情况下,当非离子态氨浓度高于 0.2 mg/L 时对小浮萍生长产生抑制作用,高于 2 mg/L 小浮萍基本上不能生长.

(4) $\text{NH}_4^+ \text{ - N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{ - N}$ 的浓度增加可提高小浮萍的叶绿素含量.

参考文献:

1 Gijzen H J. Anaerobes, aerobes and phototrophs: A winning team for wastewater management. *Water science and technology*, 2001, **44** (8):123~132.

2 Gideon Oron, Louw R Wildschut, Dan Porath. Waste water recycling by duckweed for protein production and effluent renovation. *Water science and technology*, 1984, **17**:803~817.

3 Allinson G, Stagnitti F, Colville S. Hill J, Coates M. Growth of floating aquatic macrophytes in alkaline industrial wastewater. *Journal of environmental engineering*, 1999, **126**(12):1103~1107.

4 Bergman B A, Cheng J, Classen J, Stomp A M. Nutrient removal from swine lagoon effluent by duckweed. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineering*, 2000, **42**(2):263~269.

5 许万祥,周岩,胡宗则.不同加工储藏方法对浮萍营养成分的影响. *当代畜牧*, 1998, (3):35~36.

6 Clement B, Bouvet Y. Assessment of landfill leachate toxicity using duckweed *Lemna minor*. *The science of Total Environment*, 1993, **41**(supp):1179~1190.

7 Wang W. Ammonia toxicity to macrophyte (common duckweed and rice) using static and renewal method. *Environment toxicity and chemistry*, 1991, **10**:1173~1177.

8 Caicedo J R, Van der Steen, N P, Orce O, Gijzen H J. Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). *Wat. Res.*, 2000, **34**(15):3829~2835.

9 Korner S, Das S K, Veenstra S, Vermaat J E. The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquatic Botany*, 2001, **71**:71~78.

10 潘瑞炽,董愚得. *植物生理学*. 北京:高等教育出版社, 1984. 36.

11 连兆煌. *无土栽培原理与技术*. 北京:中国农业出版社, 1992. 46~47.

12 颜素珠. *中国高等水生植物图说*. 北京:科学出版社, 1983. 294~298.

13 中国科学院上海植物生理研究所等编. *现代植物生理学实验指南*. 北京:科学出版社, 1999. 76.

14 R·亨特著,陆宪辉译. *植物生长分析*. 北京:科学出版社, 1980. 12.

15 李合生 主编. *植物生理生化实验原理和技术*. 北京:高等教育出版社, 2000. 134~164.

16 H·马斯纳 著,曹一平 陆景陵 译. *高等植物的矿质营养*. 北京:北京农业大学出版社, 1988. 26~28.

17 Lauchli A, Bielek R L 著,张礼忠,毛知耘 译. *植物的无机营养*. 北京:农业出版社, 1990. 189~191.

18 吴平,印莉莉,张立平. *植物营养分子生理学*. 北京:科学出版社, 2001. 33.