

斜生栅藻对低浓度无机磷去除和生长情况的研究

张莹¹, 李宝珍¹, 屈建航¹, 杨金水¹, 黄怀曾², 袁红莉^{1*}

(1. 中国农业大学生物学院, 北京 100193; 2. 国家地质实验测试中心, 北京 100037)

摘要: 研究分析了低磷浓度培养条件对斜生栅藻生长情况的影响, 以及斜生栅藻对磷的去除效果. 结果表明, 斜生栅藻在初始细胞浓度为 1×10^5 个/mL 时, 可以在 22 h 内将初始浓度 0.02 ~ 0.10 mg/L 的磷全部去除. 在初始磷浓度 0.02 ~ 0.10 mg/L 范围内, 随磷浓度的增加藻体的生长速度增加, 且最大生物量也明显增大. 研究发现磷浓度对斜生栅藻的形态有重要影响, 在外源磷充足的条件下, 斜生栅藻多为四聚体, 但随着磷浓度的逐渐下降, 藻细胞从四聚体, 分离为二聚体, 最后以单聚体为主要存在形式.

关键词: 微藻; 斜生栅藻; 磷; 细胞形态; 富营养化

中图分类号: X52 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2010)11-2661-05

Effect of Low Phosphorus Concentration on the Growth of *Scenedesmus obliquus* and Phosphorus Removal

ZHANG Ying¹, LI Bao-zhen¹, QU Jiang-hang¹, YANG Jin-shui¹, HUANG Huai-zeng², YUAN Hong-li¹

(1. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. National Research Center for Geoanalysis, Beijing 100037, China)

Abstract: Effects of phosphorus of low concentrations on the growth and the phosphorus removal efficiency of *Scenedesmus obliquus* were investigated in this study. Results showed that *Scenedesmus obliquus* achieved a phosphorus removal efficiency of 100% within 22 h when the initial algal cell concentration was 1×10^5 /mL and the initial phosphorus concentration was 0.02-0.10 mg/L. With the initial phosphorus concentration increased from 0.02 mg/L to 0.10 mg/L, both growth velocity of *Scenedesmus obliquus* and maximum biomass increased obviously. Research found that phosphorus concentration had a significant influence on cell morphology of algal. In the external phosphorus sufficient conditions, most of algae cell present as four cells gather round form, then transformed into two cells side by side form in the absence of external phosphorus in culture medium, Finally in single as the main form of existence.

Key words: microalgae; *Scenedesmus obliquus*; phosphorus; cell morphology; eutrophia

水体富营养化严重破坏生态平衡, 现已成为影响水体质量的主要问题之一. 氮和磷的过量排放都是造成富营养化的原因^[1], 近期研究证明磷是引发水体富营养化的限制因子, 治理富营养化控制磷污染是关键^[2]. 有效降低水体中的中磷含量是防治富营养化的关键环节^[3].

研究证明: 当水体中磷浓度达到 0.010 ~ 0.025 mg/L 水体即暴发“水华”^[4], 目前国家城镇污水处理厂排放标准中一级标准 A 的磷浓度为 0.5 ~ 1.0 mg/L, 远超过引起水华暴发的极限值. 故有效去除低浓度磷是防治富营养化的关键. 现有研究藻除磷的报道大多集中在去除高浓度磷, 少有研究低磷浓度对藻生长的影响及对低浓度磷的去除问题.

栅藻是淡水中常见的浮游藻类, 被认为是导致产生“水华”的藻种之一, 其中斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 是绿球藻目中定形群体类型的常见植物, 也是富营养化水体中甲型中污带的指示种^[5]. 本研究在实验室条件下分析了低磷浓度培

养对斜生栅藻的生长的影响, 及藻体去除磷的情况. 由于自然水体中磷浓度均比较低, 本实验的培养环境能更好地模拟自然水体中斜生栅藻的生长情况, 以期治理富营养化提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 藻种和培养基

(1) 藻种 斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 藻种购买自中国科学院武汉水生生物研究所, 编号为 FACHB-416.

(2) 藻细胞培养基 采用 BG11 培养基^[6]. 按实验要求调整磷含量(所有试剂均为分析纯).

(3) 无磷培养基 无磷元素成分, 其他成分同

收稿日期: 2009-10-09; 修订日期: 2010-05-10

基金项目: 中央高校基本科研业务专项基金项目 (2009-3-09); 国家自然科学基金项目 (30670071); 江苏省太湖水污染治理科技专项项目 (BK2007741); 农业生物技术国家重点实验室开放课题项目 (2010SKLAB06-8)

作者简介: 张莹 (1986 ~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: zhangying3409@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: hlyuan@cau.edu.cn

藻细胞培养液。

1.2 器皿的准备

实验磷浓度较低,玻璃器皿需用 10% 盐酸浸泡 24 h,蒸馏水充分冲洗,90℃ 烘干。

1.3 斜生栅藻扩大培养和饥饿处理

(1) 扩大培养 将藻细胞以 1×10^4 个/mL 接种到 250 mL 藻细胞培养基(磷浓度为 5 mg/L),置于恒温光照培养箱培养(3 000 lx,光暗时间比 12:12,25℃)。每 8 h 振荡 1 次,直至藻细胞数量达到实验所需。接种方法参照文献[7]。

(2) 藻的磷饥饿处理及对磷的去除能力 离心扩大培养完毕的藻液收集藻体,15 mg/L NaHCO_3 洗涤藻细胞。转接至无磷培养基连续光照 72 h 后再连续黑暗 72 h,进行磷饥饿处理,从而使大多数藻细胞达到磷饥饿状态。以饥饿后的藻细胞去除 1.0 mg/L 的磷观察其除磷能力。

1.4 不同磷浓度对藻生长的影响

分别配置 0.02、0.05、0.10 mg/L 这 3 个初始磷浓度的藻细胞培养基,分别接种经磷饥饿处理的斜生栅藻,藻细胞浓度为 1×10^5 个/mL。每个浓度设 3 个重复。置于恒温光照培养箱培养(3 000 lx,光暗时间比 12:12,25℃),每 8 h 振荡。培养过程中每 24 h 取样分析。

1.4.1 斜生栅藻生长曲线

(1) 藻细胞密度标准曲线 将细胞密度为 1×10^7 个/mL 的斜生栅藻培养液,依次稀释为 6 个浓度梯度(分别为 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 和 1×10^2 个/mL),测量各浓度藻液的 D_{650} 值。以 D_{650} 为横坐标,以藻细胞浓度值为纵坐标做标准曲线。

(2) 生长曲线的测定 取不同培养时间的藻液测定 D_{650} ,根据标准曲线推算藻浓度。以藻液浓度对时间的变化作图表征斜生栅藻生长情况。

1.4.2 斜生栅藻生长状态的观察

观察藻细胞形态并以血球计数板计数。每个浓度梯度样品计数 3 次。每次计数 25 个视野。以藻细胞各形态数量占藻细胞总数的百分比,表述磷浓度对藻细胞形态的影响。

1.4.3 斜生栅藻对溶液中磷的去除效率

(1) 初始磷浓度对除磷效果的影响 分别配置 0.02、0.05、0.10 mg/L 这 3 个初始磷浓度的藻细胞培养基,分别接入浓度为 1×10^5 个/mL 经磷饥饿处理的藻细胞。每个磷浓度设 3 个重复。

(2) 藻细胞浓度对除磷效果的影响 配置 0.10 mg/L 初始磷浓度的藻细胞培养基,接种入磷饥饿处理的斜生栅藻,藻细胞浓度分别为 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 个/mL。每个藻细胞浓度设 3 个重复。置于恒温光照培养箱培养(3 000 lx,光暗时间比 12:12,25℃),每 8 h 振荡。每隔约 5 h 取样。将藻培养液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清,以孔雀绿-磷钼杂多酸分光光度法检测上清液中活性磷的含量,以硫酸钾氧化消解处理后测定水样中总磷的含量^[8]。

2 结果与讨论

2.1 饥饿处理对藻细胞磷去除能力的影响

斜生栅藻是一种光合自养生物,依靠利用光子获得能量,本研究中关注的是藻对磷的吸收能力。Kaya 等^[9]认为不同生长状态的藻细胞由于代谢能力不同,会影响其吸磷效率和能力。实验在不提供光照和外源磷的情况下使藻体处于一种短时期的磷饥饿状态处理。希望能提高其除磷能力。处理和未经处理的 1×10^5 个/mL 藻对约 1.0 mg/L 溶液中磷的去除效果如图 1。

图 1 结果表明与未经磷饥饿处理的斜生栅藻相比,磷饥饿处理后的斜生栅藻对磷的去除率和去除能力有所提高,与 Kaya 和 Mallick 等^[9,10]的报道相似。故后续实验均以磷饥饿处理的藻细胞作为实验材料。

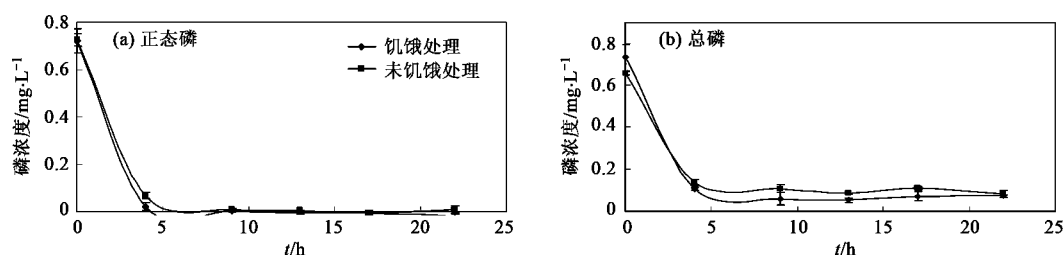


图 1 磷饥饿处理对斜生栅藻除磷能力的影响

Fig. 1 Influence of P removal ability of *Scenedesmus obliquus* by P starvation treatment

2.2 斜生栅藻对磷的去除

2.2.1 初始磷浓度对除磷速度的影响

藻细胞浓度为 1×10^5 个/mL,对 0.02、0.05、0.10 mg/L 初始磷浓度溶液中磷的去除效果如图 2 所示.

图 2(a) 结果表明,藻细胞分别可以在 4、17 和 22 h 将初始磷浓度为 0.02、0.05 和 0.1 mg/L 溶液中的正态磷基本完全去除,且至 25 d 水中磷浓度没有明显变化(图中未表示).由于 3 条曲线的变化趋势大致相同可以得知藻细胞对于此 3 种初始磷浓度溶液中正态磷的去除速率基本相同,相对于 4~22 h,藻细胞在前 4 h 对正态磷的去除速率明显较大.总磷的去除效果如图 2(b) 所示,22 h 内初始磷浓

度为 0.02、0.05 和 0.10 mg/L 溶液中的总磷浓度都有明显下降.与正态磷不同的是,藻细胞在 9~22 h 内去除总磷的速率比较大,尤其对于初始磷浓度为 0.05 mg/L 和 0.10 mg/L 这 2 种浓度溶液.到 48 h 此 3 种浓度溶液中的总磷基本均被去除.总磷的去除比正态磷慢可能是由于非正态磷需要转化为正态磷才可被生物吸收.

2.2.2 藻细胞浓度对除磷效果的影响

由于藻细胞是吸收磷的主体,推测藻浓度对磷的去除速率会造成影响,可以通过人为调整藻浓度控制除磷的速率.进一步研究了 1×10^4 、 1×10^5 和 1×10^6 个/mL 这 3 个藻细胞浓度对 0.10 mg/L 磷的去除效果,结果如图 3 所示.

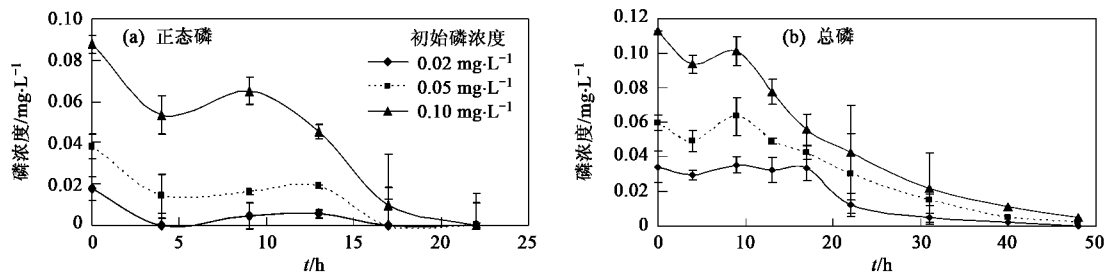


图 2 1×10^5 个/mL 斜生栅藻对不同初始磷浓度的去除效果
Fig. 2 P elimination efficiency of different initial P concentration when *Scenedesmus obliquus* was 1×10^5 cells/mL

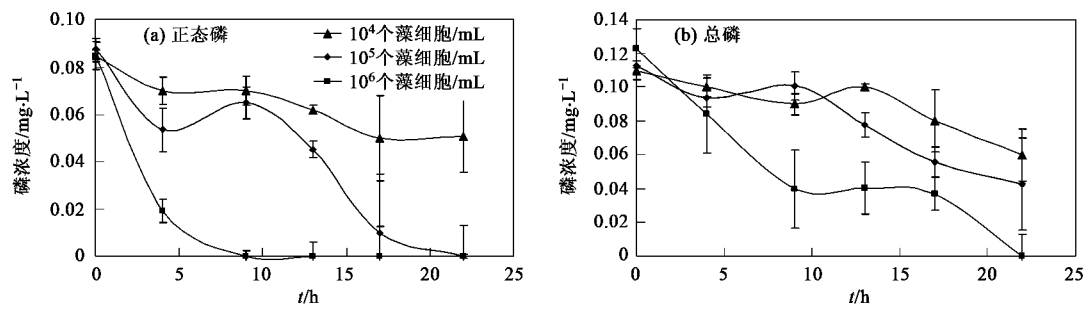


图 3 不同浓度斜生栅藻对磷去除的影响
Fig. 3 Influence of P eliminate efficiency by different cell concentration

由图 3(a) 可见藻浓度为 1×10^6 个/mL 时,9 h 完全去除 0.1 mg/L 正态磷, 1×10^5 个/mL 和 1×10^4 个/mL 藻浓度时,去除磷的效率与前者相比明显降低, 1×10^5 个/mL 藻浓度可在 22 h 完全去除相同浓度正态磷, 1×10^4 个/mL 藻浓度相同时间只能去除约二分之一初始磷.由图 3(b) 可见,此 3 种浓度藻细胞对总磷的去除效率,结果与正态磷效果趋势相同,随藻浓度增大,去除效果明显增强.表明藻浓度的增加会提高斜生栅藻去除同形态磷的效率.

2.3 磷浓度对斜生栅藻生长的影响

水体富营养化的结果是藻细胞大量繁殖,直至暴发.磷元素是一切生物体生命活动所必需的元素.培养液中磷浓度会影响斜生栅藻生长状况,本实验从斜生栅藻最大生长量、生长速度以及藻细胞形态 3 个方面探讨不同磷浓度对藻体生长的影响.

2.3.1 初始磷浓度对斜生栅藻细胞最大生长量和生长速率的影响

图 4 为斜生栅藻在 3 个不同初始磷浓度培养基

中的生长情况,结果表明斜生栅藻的生长曲线分为对数期和稳定期 2 个阶段,延滞期短.当初始磷浓度分别为 0.02、0.05 和 0.10 mg/L 时,藻类最终达到稳定生长期,所能达到的最大生物量分别为 6×10^5 、 7.5×10^5 和 10.5×10^5 个/mL,表明在实验所选的 3 个浓度中,培养液中初始磷浓度越高,藻体所能达到的最大生物量越大.随培养液初始磷浓度从 0.02 mg/L 增加至 0.10 mg/L,斜生栅藻指数生长期细胞增长率呈明显递增趋势.

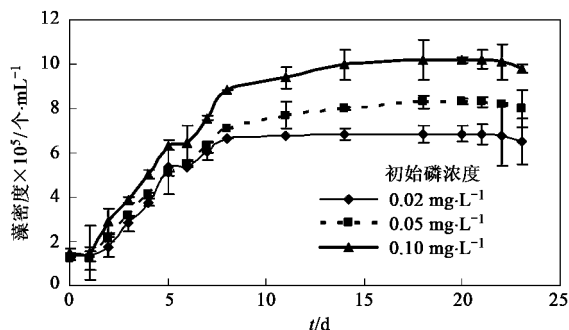


图 4 不同磷浓度培养液中斜生栅藻的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of *Scenedesmus obliquus* in different P concentration

对比斜生栅藻的生长情况曲线(图 4)与培养基中磷浓度的变化(图 2),可以发现,斜生栅藻对外源磷的吸收利用情况与其生长情况并不能达到完全一致:在外源磷充足的时候斜生栅藻呈现较大的生长速度,随着磷浓度的迅速下降藻体的生长速度变化并不显著,甚至当培养液中的磷浓度降至零时,斜生栅藻仍能在 2~9 d 以很快的生长速度持续一段时间.导致这种现象产生的原因可能是在外源磷供给匮乏时,藻类能够利用其自身体细胞内储存的磷进行生长^[11],藻体生长的潜力(生长速度以及最大生长量等)与培养液中的初始磷浓度有关.此现象与目前报道^[12-14]一致.目前关于导致“水华”暴发的磷的临界值数据大多是在水华已经暴发时(藻体已经大量生长时)测定的,可能与暴发时的磷浓度有一定差别,故真正导致“水华”暴发的磷的临界值需要深入研究.

2.3.2 磷浓度对斜生栅藻细胞形态的影响

从图 5(b)中可以看到,初始磷浓度为 0.05 mg/L 培养液中,在培养的前 5 d,藻体 60% 以上以四聚体的形态存在,以二聚体形态存在的约占 20%,只有不到 5% 的藻体呈现单细胞生存状态(另有多聚体随机出现未在图 5 中表示).第 5~15 d 期间,四聚体比例迅速下降,单细胞和二聚体比例均逐渐

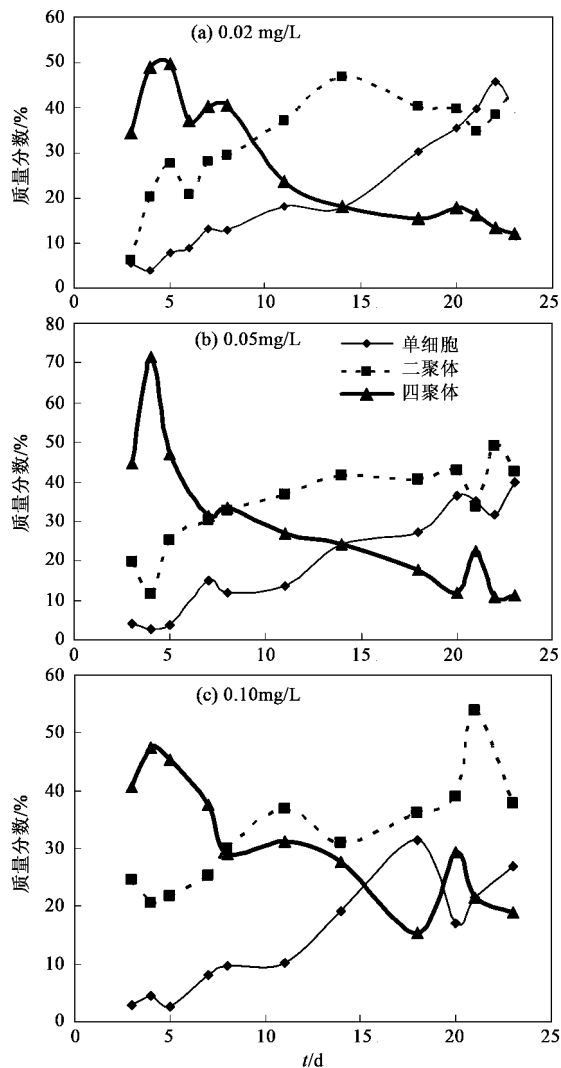


图 5 不同磷浓度条件下斜生栅藻生长形态分布

Fig. 5 Cell morphology of *Scenedesmus obliquus* in three different initial P concentration

上升.15 d 以后,只有单细胞比例维持着增长趋势,四聚体比例急剧降低,二聚体比例相对平稳.

图 5(a)和 5(c)分别显示初始磷浓度为 0.02 mg/L 和 0.10 mg/L 的结果.比较图 5 发现随着初始磷浓度增加,四聚体分裂为二聚体和单聚体的趋势略有降低.因为培养基中除了磷以外其他藻体生长所需元素都是充足供给的,故藻细胞各形态的变化趋势是由磷浓度变化所致.

进一步比较发现在藻生长初期主要为四聚体,而当培养的第 4 d,培养液中磷被藻体基本吸收完全,二聚体数目便开始增长.说明斜生栅藻对磷的利用主要在其形态为四聚体的阶段.这可能也是由于该阶段藻体生长繁殖快,所以大多呈现四聚体形态.将斜生栅藻细胞个数增长情况(图 4)与形态分布

(图 5)进行比较,可以发现当单个细胞的比例开始占优势时,斜生栅藻的个数增长基本已达到稳定,表现为增长缓慢.由此可推测,当斜生栅藻多数为单个细胞时,其繁殖分裂能力会下降甚至停止分裂,此时可能其体内的营养物质(如磷)已经不再能满足其分裂的需要.以上结果说明斜生栅藻细胞多聚体的状况可以反映低磷浓度环境中磷浓度的变化,当磷相对充足时藻体大多是四聚体形态,二聚体的出现和增多,反映外源磷的不足,单个细胞占优势地位则可能是藻细胞内磷储备也耗尽,已经无法再分裂.

斜生栅藻细胞的形态变化可能对富营养化水体中的磷含量有着一定的指示作用.目前对于磷浓度影响斜生栅藻细胞形态鲜见报道,本研究结果进一步阐明藻华暴发和磷的关系,为防控预警富营养化暴发奠定了一定的理论基础.

3 结论

(1)对于低浓度磷溶液, 1×10^5 个/mL 藻细胞分别可以在 4、17、22 h 将初始磷浓度为 0.02、0.05 和 0.10 mg/L 溶液中的正态磷基本完全去除.藻浓度的增加可以提高除磷效率.磷饥饿处理能够提高藻体的除磷能力.

(2)当培养液中初始磷浓度为 0.02 ~ 0.10 mg/L 时,斜生栅藻指数生长期的生长速度随磷浓度的增加而递增,其所能达到的最大生物量也明显增大.

(3)磷浓度对斜生栅藻生长的形态有重要影响.在外源磷充足的条件下,斜生栅藻多为四聚体,随着外源磷浓度的下降,藻的聚集形态从四聚体逐渐分离为二聚体,最后呈现以单聚体为主要形式存在.藻体形态对水体磷浓度具有一定的指示作用.

参考文献:

- [1] David W, Schindler R E, Hecky D L, et al. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment[J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, **105**: 11254-11258.
- [2] Carpenter S R. Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication[J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, **105**: 11039-11040.
- [3] Carpenter S R. Eutrophication of aquatic ecosystems: Bistability and soil phosphorus[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, **102**: 10002-10005.
- [4] 王濮, 潘兆橹, 翁玲宝, 等. 系统矿物学[M]. (第四版). 北京: 地质出版社, 1997. 38-39.
- [5] 任鹤云, 李月中. MBR 法处理垃圾滤液工程实例[J]. 给水排水, 2004, **10**(30): 36-38.
- [6] 刘静, 盛海君. Fe^{3+} 对铜绿微囊藻生长的影响[J]. 环境科学与技术, 2009, **32**: 35-39.
- [7] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 18-19.
- [8] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 246-248.
- [9] Kaya V M, Picard G. The viability of *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on alginate screens following nutrient starvation in air at 100% relative humidity[J]. Biotechnol Bioeng, 1995, **46**: 459-464.
- [10] Mallick N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review[J]. BioMetals, 2002, **15**: 377-390.
- [11] Martinez M E, Sanchez S, Jimenez J M. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*[J]. Bioresource Technology, 2000, **73**: 263-272.
- [12] Rhee G Y. A continuous culture study of phosphate uptake growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. [J]. Phycol, 1973, **9**: 495-506.
- [13] Droop M R. The nutrient status of algal cells in continuous culture[J]. Mar Biol Ass UK, 1974, **54**: 825-855.
- [14] Martinez M E, Jimenez J M. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*[J]. Bioresource Technol, 1999, **67**: 233-240.