

废水资源化小球藻对拟南芥生长的肥效研究

杨方浩, 侯利园*, 苑瑞东, 程晓磊, 黎滢静 (吉林大学, 长春 130012)

摘要 [目的]探究废水资源化小球藻在植物营养方面的高值化利用潜能。[方法]研究小球藻对污水中氨氮、磷的吸收率, 以及不同小球藻处理对拟南芥植株生长的生物肥效及对土壤酶活性的影响。[结果]供试水样中氨氮和正磷酸盐含量分别为 100 和 50 mg/L 时, 小球藻对其的去除率分别达到 80.12% 和 62.72%; 不同处理的废水培养小球藻藻液以追肥的形式施入拟南芥盆栽植物, 与 CK 相比, 藻液肥对拟南芥株高、根长及土壤酶活性均有不同程度的促进作用。[结论]小球藻对污水中氨氮、磷酸盐具有较高的吸收效率, 废水资源化小球藻对拟南芥的生长具有一定的生物肥效, 该新型肥料具备高值化的开发潜力。

关键词 小球藻; 富营养元素; 废水; 拟南芥; 生物肥料
中图分类号 S555+.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)09-0075-03

Evaluation of Wastewater-grown *Chlorella vulgaris* as a Biofertilizer for *Arabidopsis thaliana*
YANG Fang-hao, HOU Li-yuan, YUAN Rui-dong et al (Jilin University, Changchun, Jilin 130012)

Abstract [Objective] To explore the high value utilization potential of *Chlorella vulgaris* in plant nutrition. [Method] The absorption rate of ammonia nitrogen and phosphorus in sewage by *Chlorella vulgaris* was studied, and the effect of *Chlorella vulgaris* on the growth of *Arabidopsis thaliana* plants and the activities of soil enzymes were also studied. [Result] When the content of ammonia and phosphate in the sample was 100 and 50 mg/L, the removal rates of *Chlorella vulgaris* on ammonia and phosphate were 80.12% and 62.72%, respectively. The cultivation of *Chlorella vulgaris* processing wastewater with different liquid fertilizer to form into *Chlorella vulgaris* plants, compared with CK, algae fertilizer on *Arabidopsis* plant height, root length and soil enzyme activity had different promoting effects. [Conclusion] *Chlorella vulgaris* has high absorption efficiency for ammonia nitrogen and phosphate in sewage. The resource utilization of *Chlorella vulgaris* has certain bio-fertilizer effect on the growth of *Arabidopsis thaliana*. The new fertilizer has high potential of development.

Key words *Chlorella vulgaris*; Eutrophic elements; Wastewater; *Arabidopsis thaliana*; Bio-fertilizer

过去的几十年间, 我国化肥用量逐年递增, 而肥料利用率却仅有 30%~50%^[1], 过剩的富营养元素随着农田排水或地表径流进入河流湖泊, 对生态环境造成巨大威胁, 使我国各大水系均面临不同程度的富营养化。为了加强养分资源综合管理, 改善土壤质量、实现农业的可持续发展, 配方肥、生物有机肥、新型肥料等的开发等措施是满足粮食从高产高效到优质高产高效, 再到提质增效转型升级的有效手段。

藻类污水生物处理技术最早是在 1957 年由 Oswal 等^[2]提出, 截至目前, 挪威、日本已开展培养微藻进行环境保护研究^[3]。我国微藻处理污水已经应用于生活污水、味精废水、养殖场废水、工业废水等相当广泛的行业中^[4-7]。在众多微藻中, 小球藻在无光异养条件下将废水中的铵态氮转化为细胞中的蛋白质、叶绿素等含氮物质, 对氮、磷的最大吸收利用率达 80% 左右^[8-9], 很多学者已将上述微藻深度脱氮除磷与扩大微藻生物量、制备藻类油脂等技术进行了耦合^[10-12]。此外, 藻类又因其具有固氮特性而被作为肥料施用于粮食、果蔬、花卉和草坪等作物上, 达到促进种子萌发, 提高产量, 改善品质和土壤质量的目的^[13-16]。然而, 由于在利用过程中对蓝藻未经任何处理, 一些产毒的水华蓝藻释放的毒素对农业生产具有潜在威胁, 使其推广应用受到一定限制, 因此, 截至目前国内鲜有类似研究成果报道。笔者将微藻脱氮除磷与农业微藻肥料技术进行了耦合, 以生长速度快、固氮吸磷能力强, 且不分泌毒素的单细胞淡水微藻小球藻为供试

藻株, 开展废水-微藻体统中富营养元素富集效率及废水培养小球藻对拟南芥生长的影响, 旨在为揭示富营养元素在废水-微藻-作物系统中的循环利用机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 模拟浓缩污水的配置。根据北方污水成分特征, 污水厂二级出水中氮、磷平均含量分别以 50 和 5 mg/L 计算, 来配置 10 倍浓缩富营养化污水。结合微藻生长最适营养条件, 微藻废水培养液具体成分及含量为: Tris base 2.42 g/L, NH₄Cl 1.6 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 100 mg/L, CaCl₂ · 2H₂O 50 mg/L, K₃PO₄ 112 mg/L, Na₂EDTA · 2H₂O 50 mg/L, ZnSO₄ · 7H₂O 22 mg/L, H₃BO₃ 11.4 mg/L, MnCl₂ · 4H₂O 5 mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 5 mg/L, CoCl₂ · 6H₂O 1.6 mg/L, CuSO₄ · 5H₂O 1.6 mg/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 1.1 mg/L, Acetic acid 1 mL/L; 调整 pH 至 7.0, 于 121 °C 高压灭菌 20 min, 冷却至室温待用。

1.1.2 微藻的培养。蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidesa*), 购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库, 采用 TAP (Tris-Acetate-Phosphate) 固态培养基进行藻种的保存, 微藻的液态培养条件为: 智能人工气候培养箱内 25 °C 恒温振荡培养; 光照强度 3 000~6 000 LX; 光照周期 12 h: 12 h (光照: 黑暗)。小球藻生长曲线的测定: 每天取微藻培养液 2 mL, 采用血球计数板法, 显微镜下观察并计数小球藻的细胞浓度。

1.2 方法

1.2.1 废水中氨氮、全磷浓度的动态监测。每天从废水微藻混合体系中抽取水样, 并过滤微藻, 通过 AA3 连续流动分析仪对水样中剩余氨氮和全磷含量进行测定。

基金项目 吉林大学“大学生创新创业训练计划”国家级资助项目 (2016A82367)。

作者简介 杨方浩 (1995—), 男, 安徽安庆人, 本科生, 专业: 农业资源与环境。* 通讯作者, 讲师, 从事废水的生物处理及资源化研究。

收稿日期 2018-01-04

1.2.2 拟南芥的盆栽试验。供试土样为贫营养土壤,采集自吉林省松原市,其基本理化性质为:全氮含量(1.13 ± 0.14) g/kg,有效磷含量(12.43 ± 1.56) mg/kg,有效钾含量(100.55 ± 3.85) mg/kg,有机质含量(14.66 ± 1.59) g/kg。以拟南芥为供试植物,进行微藻肥效试验,共设置 4 个处理:处理①,不施加任何肥料(CK);处理②、③为浓缩废水培养后收集所得小球藻藻液,重悬于水溶液,含水率为 95% 左右,其中处理②藻液为鲜藻液,未经破碎处理,而处理③为超声波破碎藻液;处理④为 2.0 g 复合肥溶于 500 mL 水后的营养液。在拟南芥出苗后,每 5 d 用上述不同处理溶液浇灌 1 次,每次 50 mL,测定不同生长期的拟南芥植株高度,并测定成株的根系长度,每处理重复 3 次。

1.2.3 土壤酶活性的测定。对不同生长期的拟南芥进行根系周围土壤样本采样,每次处理采集 6 个土壤平行样本,其中 3 个样本进行含水率测定,对另外 3 个样本土壤中过转化酶和脲酶活性进行定量测定。土壤脲酶采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定;土壤蔗糖酶采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[17]测定。

2 结果与分析

2.1 小球藻生长曲线的绘制 从图 1 可见,蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)在异养条件下繁殖速度较快,每 6~8 h 翻倍 1 次,在培养第 4~6 天达到最大生物量。在高氮、磷模拟污水条件下,该藻的生长并未受到抑制,最高生物量出现在培养第 5 天,此时小球藻的细胞浓度最高值约为 3.3×10^7 个/mL,随后进入生长稳定期。前期试验在无氮源条件下培养小球藻,结果几乎无生物量增长(待发表数据),这验证了氮元素是小球藻生长的必须元素,外源氮的引入对小球藻的生长起到了促进作用。

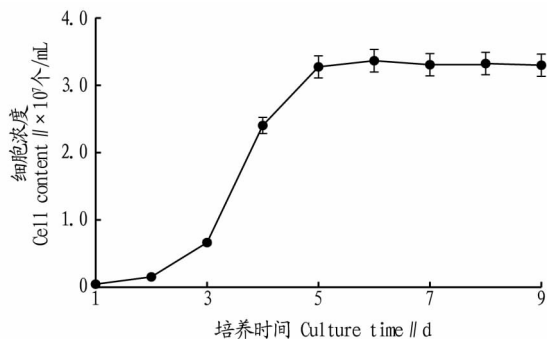


图 1 小球藻在高浓缩模拟污水条件下的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Chlorella pyrenoidosa* in high concentrated wastewater

2.2 小球藻对污水中氨氮的吸收率 根据以上生长周期状况,对整个繁殖期小球藻吸收消耗氨氮的情况进行研究,结果见图 2。从图 2 可见,随着培养时间的延长,小球藻的生物量不断积累,污水中氨氮浓度逐渐降低,并在培养后期达到吸附饱和状态,此时小球藻对高浓度含氮废水中氨氮的吸收去除率达到 80% 左右,表明小球藻对模拟污水中的氨氮有很强的去除能力,可用于实际污水中氨氮的去除,使污水经生物净化处理后可进行达标排放。

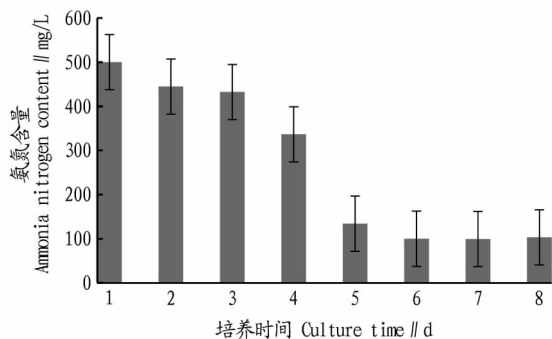


图 2 氨氮含量随小球藻培养时间的变化趋势

Fig. 2 The variation trend of NH_4^+-N content with culture time

2.3 小球藻对污水中磷的吸收率 生活废水中的磷主要来源于人体排磷和生活洗涤排磷,磷作为微藻生长繁殖的营养元素,部分可直接被其吸收利用,然而,微藻对污水中磷元素的去除率远远低于对氮的去除效率。该试验设置了正磷酸盐含量为 50 mg/L 的模拟水样,对小球藻在高浓度含磷废水中的生长情况及含磷量进行动态监测,结果表明,随着培养时间的延长,小球藻不断增殖,模拟污水中的总磷含量呈递减趋势,当生物量达到最大值时,小球藻对磷的吸附趋于饱和状态,最大去除率为 62.72%。普通生活污水中磷含量约在 10 mg/L,小球藻对磷有较强的吸附能力,可以用于实际污水的生物净化处理,且处理后可达到磷达标排放的标准。

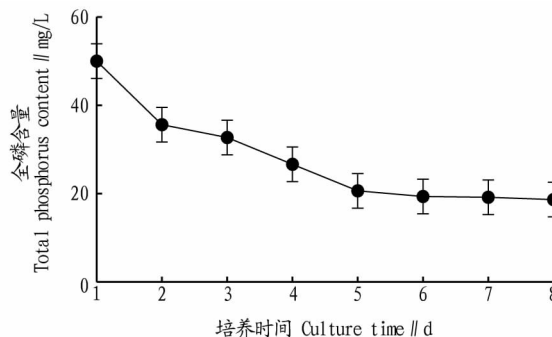


图 3 全磷含量随小球藻培养时间的变化趋势

Fig. 3 The variation trend of TP content with culture time

2.4 废水培养小球藻藻液肥对拟南芥植株生长的生物肥效 对于微藻废水资源化的后续利用,近几年的研究工作主要集中于微藻的生物质能源的制备和生物肥料的应用 2 个方面^[12,18-19]。该研究为了验证小球藻藻液的生物肥效,对拟南芥整个生长期的株高和根长进行了监测,结果见图 4、5。从图 4 可以看出,拟南芥生长株高曲线呈“S”型增长趋势,在藻液肥施用 20 d 内,与 CK 相比,不同藻液处理对拟南芥的生长并无显著的肥效;而后随着生长期的延长,株高长势明显,各处理的株高从大到小依次为处理④、处理③、处理②、处理①(CK);从图 5 可见,处理③小球藻藻液肥施用后,拟南芥平均根长比处理②的拟南芥平均根长要长出 12.7%,其肥效更显著,说明破碎细胞对于营养物质的释放相较未破碎小球藻细胞更迅速。小球藻可利用水中铵态氮将其转化为细胞中的含氮化合物,参与代谢途径,经高浓度富营养污水

培养后,小球藻体内累积了大量的氮磷营养盐,经破碎处理后,胞内基质得到彻底释放,对作物营养供给快,而未破碎小球藻藻液则通过活体代谢或死亡释放胞内养分,因此对植物供养较缓慢,且肥力较持久。

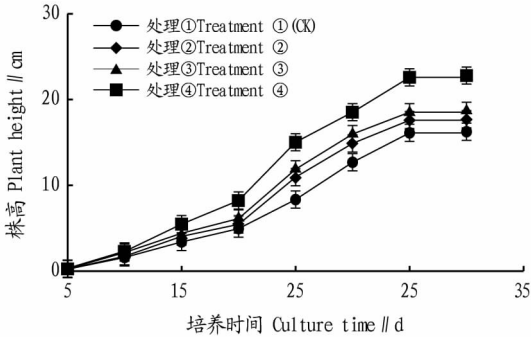


图4 不同处理藻液对拟南芥生长株高的影响

Fig.4 Effects of different treatments of algae on the plant height growth of *Arabidopsis thaliana*

2.5 小球藻藻液肥施用后对土壤酶活性的影响 从图6可以看出,加入普通有机肥后土壤中脲酶活性的变化最大,达到200 μg左右,与CK相比,不同处理藻液肥对土壤脲酶活性均起到不同程度的激活作用;而对于土壤蔗糖酶活性,培

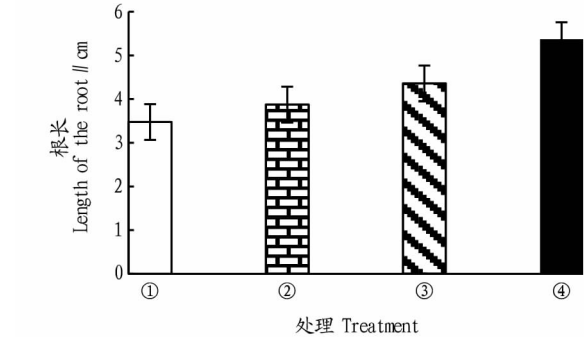
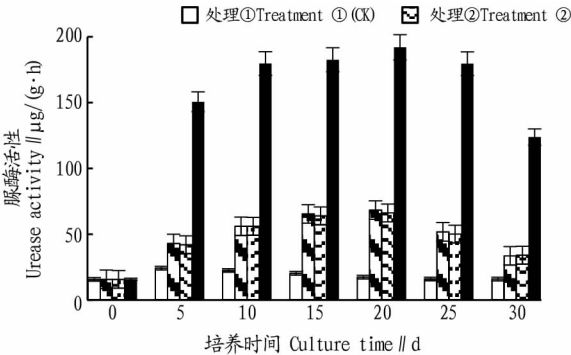


图5 不同处理藻液对拟南芥根长的影响

Fig.5 Effects of different treatments of algae on the root length of *Arabidopsis thaliana*

养前5 d,各处理间蔗糖酶活性无显著差异,随时间的延长,肥料中的营养元素在土壤中逐渐释放,土壤蔗糖酶活性随之升高,且施肥处理略高于对照组酶活性,但藻液肥与有机肥处理间酶活性无显著性差异,培养15 d后,蔗糖酶活性随培养时间的延长呈下降趋势,由于蔗糖酶的活性与土壤有机碳、全氮含量有一定相关性^[20],因此,在培养后期,土壤中碳氮不断被消耗导致其含量下降,使蔗糖酶因失去底物而降低活性。

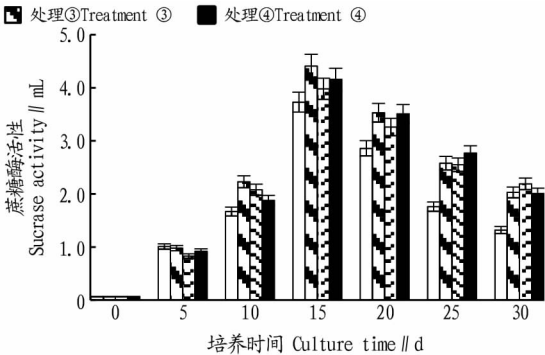


图6 不同处理藻液对土壤酶活性的影响

Fig.6 Effects of different treatments of algae on the activities of soil enzymes

3 讨论与结论

在对众多淡水微藻吸收氮、磷的能力的研究中发现,小球藻(*Chlorella vulgaris*)、栅藻(*Scenedesmus obliquus*)、衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的脱氮除磷能力相对较高^[21]。该研究结果表明,小球藻对富营养污水的净化效果较显著,且对高浓度富营养污水氨氮的吸附去除率高于对磷盐的富集效率,在有氧条件下,硝酸盐、亚硝酸盐和铵盐可以用于小球藻代谢过程中氨基酸和蛋白质等物质的合成;磷酸盐可以直接被藻细胞吸收,并通过多种磷酸化途径转化成ATP和磷脂等有机物,使得藻细胞能同化污水中过剩的营养盐转化为自身的生物量,从而降低污水中的氮、磷含量。

我国北方富营养化污水的污染物成分相对较简单,主要以氮、磷营养元素及无机盐类为主,废水培养微藻可以进行有效资源的后续利用。该研究结果显示,废水资源化小球藻对作为生物藻液肥对拟南芥的生长具有一定促进作用,从废水中吸收固定的富营养元素以肥料的形式释放到土壤中,经过土壤微生物的作用,供植物生长利用,土壤脲酶活性的测

定结果表明,藻液肥施用后土壤的氮素状况良好,拟南芥生长情况与氮肥释放效果有较强的一致性。基于富营养污水培养而得到的微藻之所以可被用作农业肥料,原因是一方面可以为农作物提供其生长所必须的氮、磷等营养元素,促使叶菜类、马铃薯等作物达到增产增收的效果,另一方面能够节约化肥施用量^[19,22]。

国外学者对微藻废水资源化的后续利用研究较多,主要围绕废水培养微藻来制备生物质肥料。Wuang等^[23]揭示了废水培养微藻所获取生物质可作为生物肥料促进小麦增收,且可节约土壤中25%的氮肥施用量;国内有关将微藻废水资源化与藻液肥在农业生产上的高值化利用相结合的报道较少。因此,未来的研究应将环境问题最小化和有限资源的合理回收利用更紧密地结合,为今后发展环境友好型节肥农业提供基础数据。

参考文献

[1] 江丽华,王梅,石璟.微生物肥料是农业可持续发展的必然选择[J].中 (下转第82页)

表 6 不同夏播青饲玉米品种产量

Table 6 The yield comparison of different summer-cropping silage corn varieties

品种 Variety	单株产量 Yield per plant//kg	产量 Yield//t/hm ²
KWS4574	0.890	66.75
KWS3564	0.904	67.80
郑丹 958 Zhengdan 958	0.754	56.55

3 结论与讨论

(1)在喀什地区巴楚县色力布亚镇 15 村种植的参试春播青饲玉米品种间的生育天数为 95 ~ 104 d, 新玉 13 号、kws5383 和新沃 1 号生育天数相差不大;参试夏播青饲玉米品种间的生育天数为 93 ~ 102 d。KWS3564 生育天数最长(102 d), KWS4574 次之(101 d), 郑丹 958 生育天数最短(93 d)。在光、热、水、肥满足的前提下各参试青饲玉米品种生长速度都比较快。因为喀什光照充足, 无霜期在 200 d 左右, 所以春播及夏播玉米均适合种植早、中熟的青饲玉米品种, 不适合晚熟品种。

(2)参试春播青饲玉米品种产量从高到低依次为奥玉青贮、kws5383、新沃 1 号、新玉 13 号;参试夏播青饲玉米品种产量从高到低依次为 KWS3564、KWS4574、郑丹 958。

综上所述,通过物候期观察以及对其高度、产量、茎重、

棒子重的测定结果,结合喀什地区当地气候特征,结果发现 4 个春播参试玉米品种中有 3 个品种适宜在当地春播种植,其中玉米品种 kws5383、新沃 1 号适应性强,表现最好,产量最高;3 个夏播参试玉米品种中有 2 个品种适宜在当地夏播种植,其中玉米品种 KWS3564 和 KWS4574 适应性强,表现最好,产量最高,但夏播玉米播种时间太晚,再加上 2017 年 10 月气温较低,导致玉米生长缓慢,夏播玉米产量低于春播玉米。kws5383、新沃 1 号、KWS3564、KWS4574 可作为喀什地区乃至新疆南疆各地区春播及夏播大面积推广的青贮饲料玉米品种。

参考文献

- [1] 卢雪宏. 新优玉米自交系 JA73-2 及其雄性不育系诱导选育[J]. 中国种业, 2012(4): 49-50.
- [2] 杨松, 海力且木, 帕孜来提. 南疆地区一年两熟青贮玉米高产品种选择研究[J]. 杂粮作物, 2006, 26(6): 411-413.
- [3] 殷超. 青贮玉米高产栽培技术[J]. 新疆农垦科技, 2005(6): 6-7.
- [4] 李璐. 南疆小麦-玉米“一年多熟”高产高效栽培模式及关键技术的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [5] 艾比布拉·阿布都沙拉木. 刀郎人——对维吾尔族一个特殊文化群体的人类学考察[D]. 兰州: 兰州大学, 2014.
- [6] 李蓓. 浅谈少数民族地区乡镇经济发展思路: 以喀什地区巴楚县色力布亚镇为例[J]. 新疆社科论坛, 2006(1): 48-51.
- [7] 赛里克·都曼, 沙吾列·沙比汗, 麦利亚·依尔别克, 等. 天山南坡牧区粮饲兼用玉米品种比较试验[J]. 草食家畜, 2014(4): 60-64.
- [8] 包和平. 玉米生育期的划分及注意事项[J]. 吉林农业, 2010(20): 24.
- [9] gy, 2018, 39(5): 581-582.
- [13] 隋战鹰. 海藻肥料的应用前景[J]. 生物学通报, 2006, 41(11): 19-20.
- [14] 李悦, 张淑平, 胡晓健, 等. 海藻废渣有机肥肥效的研究[J]. 应用化工, 2012, 41(3): 381-383.
- [15] 刘淑芳, 吕俊平, 冯佳, 等. 施用微藻对黄瓜生长及土壤质量的影响[J]. 山西农业科学, 2016, 44(9): 1312-1315, 1319.
- [16] 李美, 姜梦柔, 何林乾, 等. 小球藻提取物对几种十字花科蔬菜种子萌发的影响[J]. 江苏农业科学, 2010(4): 160-162.
- [17] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [18] 凌云, 陈姗, 石文宣, 等. 利用城市生活废水培养栅藻以生产生物柴油的研究[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(1): 121-127.
- [19] RENUKA N, PRASANNA R, SOOD A, et al. Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat [J]. Environmental science and pollution research, 2016, 23(7): 6608-6620.
- [20] 曹承绵, 李荣华, 张志明, 等. 红壤的酶活性与土壤肥力[J]. 土壤通报, 1986, 17(7): 15-19.
- [21] SU Y Y, MENNERICH A, URBAN B. Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species [J]. Bioresource technology, 2012, 124(3): 157-162.
- [22] COPPENS J, GRUNERT O, VAN DEN HENDE S, et al. The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels [J]. Journal of applied phycology, 2016, 28(4): 2367-2377.
- [23] WUANG S C, KHIN M C, PEI Q D C, et al. Use of Spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers [J]. Algal research, 2016, 15: 59-64.
- [2] 国农资, 2016(4): 18.
- [2] OSWALD W J, GOTAAS H B, GOLUEKE C G, et al. Algae in waste treatment [with discussion][J]. Sewage & industrial wastes, 1957, 29(4): 437-457.
- [3] DE-BASHAN L E, BASHAN Y. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997 - 2003) [J]. Water research, 2004, 38(19): 4222-4246.
- [4] 韩琳. 高产油脂微藻的筛选及其对生活污水脱氮除磷能力的研究[D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [5] 纪雁. 利用味精废水培养普通小球藻以及养藻废水的生物强化处理[D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [6] 许云, 梁文思, 刘志媛. 2 株微藻对养殖废水中氮磷去除率的影响[J]. 热带生物学报, 2014, 5(3): 228-232.
- [7] 李攀荣, 邹长伟, 王金保, 等. 微藻在废水处理中的应用研究[J]. 工业水处理, 2016, 36(5): 5-9.
- [8] 胡月薇, 邱承光, 曲春波, 等. 小球藻处理废水研究进展[J]. 环境科学与技, 2003, 26(4): 48-49.
- [9] 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.
- [10] PITTMAN J K, DEAN A P, OSUNDEKO O, et al. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources [J]. Bioresource technology, 2011, 102(1): 17-25.
- [11] 凌云, 陈姗, 石文宣, 等. 利用城市生活废水培养栅藻以生产生物柴油的研究[J]. 环境科学与技术, 2016(1): 121-127.
- [12] DE FRANCISI D, SU Y X, ITAL A, et al. Evaluation of microalgae production coupled with wastewater treatment [J]. Environmental technolo-

(上接第 77 页)

科技论文写作规范——工作单位

在圆括号内书写作者的工作单位(用全称)、城市名及邮政编码。若为外国的工作单位,则加国名。多个作者不同工作单位时,在名字的右上角分别加注“1”“2”,和地址前注“1.”“2.”。