

DOI: 10.11835/j.issn.2096-6717.2022.038



开放科学(资源服务)标识码 OSID:



氮源水平对微藻深度脱氮除磷耦合生物大分子累积的影响及其细胞响应

丁婵, 秦然, 崔福义, 赵志伟, 梁志杰
(重庆大学环境与生态学院, 重庆 400045)

摘要: 比较普通小球藻、蛋白核小球藻和斜生栅藻在不同氮水平下的生长状况和污水深度脱氮除磷效能, 并从生物大分子累积角度解析氮源水平对微藻脱氮除磷的影响机制, 为实现污水深度脱氮除磷同时收获微藻生产能源以缓解能源危机提供理论依据。结果表明: 硝氮为唯一氮源时, 微藻生长状况和脱氮除磷效能明显优于以氨氮为唯一氮源的试验组, 叶绿素 a 含量也高于氨氮组; 各试验组中硝氮浓度越高, 藻细胞数量越多, 且小球藻细胞增长量明显高于斜生栅藻; 7 天内硝氮浓度 ≤ 8 mg/L 时氮的去除率均能达到 98% 以上, 但氨浓度低的试验组中叶绿素 a 含量低, 这是因为氮是叶绿素合成的重要元素。微藻通过调节细胞内大分子物质含量来适应不同的生存环境, 在营养受限制的条件下会消耗自身物质以满足生命活动的需要, 氮限制条件会引起细胞内脂质积累, 证实了氮源水平控制微藻污水深度脱氮除磷耦合生物大分子累积的可行性。

关键词: 微藻; 污水脱氮; 细胞响应; 生物大分子累积

中图分类号: X703.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-6717(2023)03-0183-13

Effects of nitrogen source level on macromolecular accumulation coupled with nitrogen and phosphorus removal in microalgae and its cellular response

DING Chan, QIN Ran, CUI Fuyi, ZHAO Zhiwei, LIANG Zhijie

(College of Environment and Ecology, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China)

Abstract: The growth status of *Chlorella vulgaris*, *Chlorella proteinosa* and *Scenedesmus obliquus* under different nitrogen levels and the efficiency of advanced nitrogen and phosphorus removal in sewage were compared, and the effect mechanism of nitrogen source level on nitrogen and phosphorus removal in microalgae was analyzed from the perspective of biomacromolecule accumulation, and a theoretical basis was provided for advanced nitrogen and phosphorus removal in wastewater and harvesting microalgae to produce energy to

收稿日期: 2022-03-07

基金项目: 中央高校基本科研业务费(2021CDJMRH-013); 国家自然科学基金(51808066)

作者简介: 丁婵(1996-), 女, 主要从事污水深度处理技术研究, E-mail: 2394481205@qq.com。

梁志杰(通信作者), 男, 副教授, 博士生导师, E-mail: zhjliang@cqu.edu.cn。

Received: 2022-03-07

Foundation items: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No.2021CDJMRH-013); National Natural Science Foundation of China (No. 51808066)

Author brief: DING Chan (1996-), main research interest: advanced wastewater treatment technology, E-mail: 2394481205@qq.com. LIANG Zhijie (corresponding author), associate professor, doctoral supervisor, E-mail: zhjliang@cqu.edu.cn.

alleviate energy crisis. The results showed that when nitrate is the only nitrogen source, the growth of microalgae and the efficiency of nitrogen and phosphorus removal were significantly better than that of the experimental group with ammonia nitrogen as the only nitrogen source, and the content of chlorophyll was also higher than that of the ammonia nitrogen group, because nitrogen is an important element of chlorophyll synthesis. The higher the nitrate concentration in each experimental group, the more the number of algae cells, and the growth of *Chlorella* cells was significantly higher than that of *Scenedesmus obliquus*. Within seven days, the nitrogen removal rate was above 98% when nitrate concentration ≤ 8 mg/L, but the chlorophyll-a content was low in the experimental group with low nitrogen concentration. Microalgae by adjusting the content of macromolecular substances in the cell to adapt to different living environment, under the condition of nutrition restricted consumes itself material to meet the needs of life activity, nitrogen limit conditions can lead to accumulation of lipid in cells, confirmed the possibility of nitrogen source level controlling on the depth of the wastewater biological nitrogen and phosphorus coupling feasibility of macromolecular accumulated.

Keywords: microalgae; wastewater denitrification; cell response; accumulation of biological macromolecules

污水处理厂二级处理出水中营养物质的含量(NH_4^+ 、 NO_3^- 和 PO_4^{3-})相对较低,但足以引起天然水体富营养化,甚至已成为天然水体富营养化的主要原因。因此,二级处理出水进入水体前进行深度脱氮除磷对控制水体富营养化显得尤为重要^[1]。微藻可通过光合作用高效利用水体中的氮、磷,其在污水深度处理与资源化领域的应用潜力已引起了广泛关注^[2]。微藻脱氮除磷受多种因素的影响,不同藻种脱氮除磷能力不同,小球藻的脱氮除磷能力优于斜生栅藻^[3];不同氮磷浓度对微藻生长、脱氮的影响不同,N/P比应控制在适当范围^[4]。尽管微藻能够实现污水深度脱氮除磷,但藻类在自然水体中是水体富营养化的重要指标。因此,藻类生长繁殖特性是微藻污水处理研究关注的重点之一^[5-6]。

微藻不仅是污水深度处理的一种有效措施,也可同步实现生物大分子物质累积,是生产生物能源的原料^[5, 7-8]。随着社会对可再生能源的需求日益增长,利用微藻生产可再生能源也引起了越来越多的关注^[9]。藻细胞中的淀粉和脂质作为对环境刺激的保护机制,在微藻细胞恢复活性的过程中发挥重要作用^[10]。因此,了解微藻中淀粉和脂类的调控机制具有重要意义。各种环境条件和操作因素都会影响微藻的光合作用性能、生物量及细胞组成^[11-12]。在最佳培养条件下,微藻表现出高生物量的生长,但不能大量积累储能物质(如碳水化合物或脂类)^[13]。通过控制培养条件,微藻可以积累大量的蛋白质或碳水化合物,具有很大的应用潜力。越来越多的增值化学品,如多不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、抗氧化剂、生物聚合物和其他营养药物,以及药物

化合物现已从微藻中形成商业化生产^[14-15]。因此,基于微藻的深度脱氮除磷及耦合生物大分子研究既具有环境效益,又具有经济效益。

笔者以普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)3种典型微藻为代表,研究不同氮源水平对微藻生长特性、脱氮除磷能力和生物大分子累积的影响,旨在为基于藻类的污水深度脱氮除磷耦合生物大分子生产技术提供理论支撑。

1 试验

1.1 试验材料

小球藻属中的普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、栅藻属中的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)分别作为单细胞绿藻、群体绿藻代表,购自中国科学院水生生物所藻种库,能有效去除各种无机污染物并产生生物量和油脂。在无菌条件下,将藻种转接到装有600 mL BG-11培养基的1 000 mL锥形瓶中,封上封口膜^[16-17],于光照培养箱中培养,每天手动摇动3次。光照培养箱条件设定为:温度(25 ± 0.1) °C;光照:黑暗=12 h:12 h;照度为2 300 lx。培养约30 d后,离心去掉上清液进行再次转接。新转接的藻液约7 d后进入对数生长期,7~30 d均处于对数生长期。采用人工配制的模拟污水为试验对象,在以无N、P的50%BG-11培养基的基础上添加 NaNO_3 、 NH_4Cl 和 K_2HPO_4 配制而成。

1.2 试验方案及测试方法

1.2.1 试验方案 根据藻液吸光度与藻细胞密度-

吸光度标线,取一定量处于对数生长期的藻液离心后弃去上清液,用超纯水清洗两次,然后悬浮至装有100 mL人工培养液的250 mL锥形瓶中,使得各藻种初始接种量为 1.7×10^6 cfu/mL,于光照摇床培养箱中培养7 d,条件设定为:温度(25 ± 0.1) °C,照度2 300 lx,光暗时间比为12 h:12 h,转速为130 r/min。

二沉池出水的无机营养元素含量通常相对较低(N:10~15 mg/L、P:0.5~1 mg/L)^[4]。因此,在研究初始N浓度影响时,为避免磷限制的干扰,初始P元素浓度设置为1.3 mg/L,N元素浓度由低到高依次设置为2、4、8、16、24 mg/L;在研究硝氮与氨氮初始比例的影响时,初始N元素浓度设为12 mg/L,初始P元素浓度为1.3 mg/L,硝氮与氨氮的比例依次设为1:2、1:1、2:1;每组试验设置3组平行样。

1.2.2 细胞密度的测定 将一定浓度藻液稀释成一系列吸光度为0.05~1的梯度,采用血球计数板,在显微镜下数出细胞个数之后,用分光光度计测定藻液在680 nm处的吸光值(OD_{680})。获得蛋白核小球藻、普通小球藻和斜生栅藻的细胞密度与 OD_{680} 之间的线性关系。

1.2.3 硝氮、氨氮和总磷(TP)含量的测定 硝氮含量的测定采用紫外分光光度法(HJ/T 346—2007)^[18];氨氮含量测定采用纳氏试剂分光光度法(HJ/T 535—2009)^[19];总磷含量的测定采用钼酸铵分光光度计法(GB 11893—89)^[20]。利用式(1)计算硝氮、氨氮和总磷(TP)的去除效率。

$$E_i = (S_0 - S_i) \times S_0^{-1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: E_i 为去除效率,%; S_0 为氮磷的初始浓度,mg/L; S_i 为氮磷的剩余浓度,mg/L。

1.2.4 叶绿素a含量的测定 叶绿素含量测定采用热乙醇法^[21-22]。过滤一定体积($V_{\#}$)的藻液(根据藻液叶绿素含量决定),将滤膜向内对折,放入5 mL的离心管,保存在-20 °C的冰箱里,24 h后取出样品,立即加入4 mL左右90%的热乙醇(在83 °C水浴锅中预热),水浴2 min(83 °C)。再将待萃取的样品放到室温下避光处,萃取4~6 h。萃取结束后,用25 mm的0.45 μm玻璃纤维有机滤膜过滤萃取液并定容至10 mL。在分光光度计上以90%乙醇作为参比液进行比色。先在665 nm波长下测消光率 E_{665} ,再在750 nm波长下测消光率 E_{750} ,然后在样品比色皿中加1滴1 mol/L盐酸进行酸化,加盖摇匀,1 min后重新在665 nm波长下测消光率 A_{665} ,再在750 nm波长下测消光率 A_{750} 。

叶绿素含量根据式(2)计算

$$\text{Chla} = 27.9V_1 \times [(E_{665} - E_{750}) - (A_{665} - A_{750})] \times V_{\#}^{-1} \quad (2)$$

式中:Chla为叶绿素a浓度,mg/L; V_1 为萃取液定容的体积,mL; $V_{\#}$ 为过滤水样的体积,mL。

1.2.5 傅里叶红外(FTIR)分析 采用傅里叶红外光谱(FTIR)分析仪对藻细胞粉末中含有的官能团进行识别、分析^[23],评价生物大分子累积情况。具体操作方法为^[24]:1)取初始藻细胞和反应第7天的藻细胞,在4 000 r/min下离心5 min,用去离子水洗涤2次,60 °C烘干并磨成粉末;2)将样品粉末与溴化钾颗粒按比例共混研磨,二者混合均匀后制成压片,即完成样品制备;3)波数范围设定为4 000~400 cm^{-1} ,将样品放入分析仪进行测定。

按照Meng等^[25]的方法进行峰值归因。脂类在1 740 cm^{-1} 左右有特征吸收带,代表酯C=O的拉伸带,约3 000~2 800 cm^{-1} 的峰代表酰基链中的C—H伸缩振动。这两个区域的吸收强度与脂质含量有关。在约1 740 cm^{-1} 处不考虑进行脂质含量的定量估计,因为该波段的强度并不会随着脂质含量的变化而发生显著变化。波段在3 000~2 800 cm^{-1} 左右能很好地表征油脂含量的变化,从而用于定量测定油脂含量。但这两个区域均可用于定性观察限养栽培过程中脂质含量的变化。1 650 cm^{-1} (酰胺I)和1 540 cm^{-1} (酰胺II)分别代表蛋白质C=O伸缩振动和N—H弯曲振动,吸收强度对应蛋白质含量。1 200~950 cm^{-1} 的波段表征多糖的C—O—C振动吸收,其吸收强度可用于定量总碳水化合物含量。根据Lambert-Beer定律,吸光度A与吸光物质的浓度C成正比,单个组分对特定吸收带的贡献是累加的,因此,可以通过相对吸光度与相对浓度成正比来计算相对组分变化。

1.2.6 透射电镜(TEM)分析 通过透射电镜观察分析不同时期、不同初始浓度藻细胞形态变化。在第1 d和第7 d,取各因素低、高水平下的蛋白核小球藻,在4 000 r/min下离心5 min,并用0.1 mol/L PBS溶液(pH值为7.0)洗涤两次后固定于2.5%的戊二醛电镜专用液中,放入4 °C冰箱冷藏。后续步骤依次为后固定、脱水、渗透、包埋切片、观察和采集图像^[26-28]。

2 试验结果与讨论

2.1 氮源对微藻生长的影响

2.1.1 不同初始氨氮水平的影响 不同初始氨氮

浓度对微藻生长的影响如图 1 所示,3 种微藻在不同氨氮浓度下均能生长。在第 1~4 天,3 种微藻在各氨氮浓度下均处于对数生长期,4 天后生长受到一定的抑制。其中,初始氨氮浓度越高,后期生长抑制越明显。由于藻类生长最适宜的 pH 值为中性范围,在试验过程中,pH 值大幅降低,藻细胞的正常生长受到抑制^[27]。分开来看,蛋白核小球藻的细胞增长量略高于普通小球藻,明显高于斜生栅藻。邓祥元等^[3]和章斐等^[29]分别发现蛋白核小球藻和椭圆小球藻生长均优于斜生栅藻,说明小球藻脱氮除磷时较栅藻生长更具优势。3 种微藻的生长差异可能与其对氮、磷的吸收利用速率不同有关^[30]。刘燕^[27]发现,小球藻的耐污能力强于斜生栅藻,说明 3 种微藻

的生长差异还和其耐污能力相关。

2.1.2 不同初始硝氮水平的影响 不同初始硝氮浓度对微藻生长的影响如图 2 所示,以硝氮为唯一氮源时,3 种微藻在各浓度下均生长迅速,且生长速率明显高于以氨氮为唯一氮源的情况(图 1)。随着硝氮浓度的增加,藻细胞生长速率增大。第 1 天藻细胞处于延迟期,微藻生物量生长缓慢,这可能是由于微藻细胞需要适应不同氮源的新培养基环境。同时,由于开始时藻细胞浓度较低且缺乏自遮光,可能会发生光抑制^[31]。硝氮为中高浓度(≥ 8 mg/L)时,第 2~7 天藻细胞均处于对数生长期;硝氮为低浓度(≤ 4 mg/L)时,第 1~5 天藻细胞生长处于对数期,第 5~7 天低浓度硝氮组藻细胞生长进入稳定期。

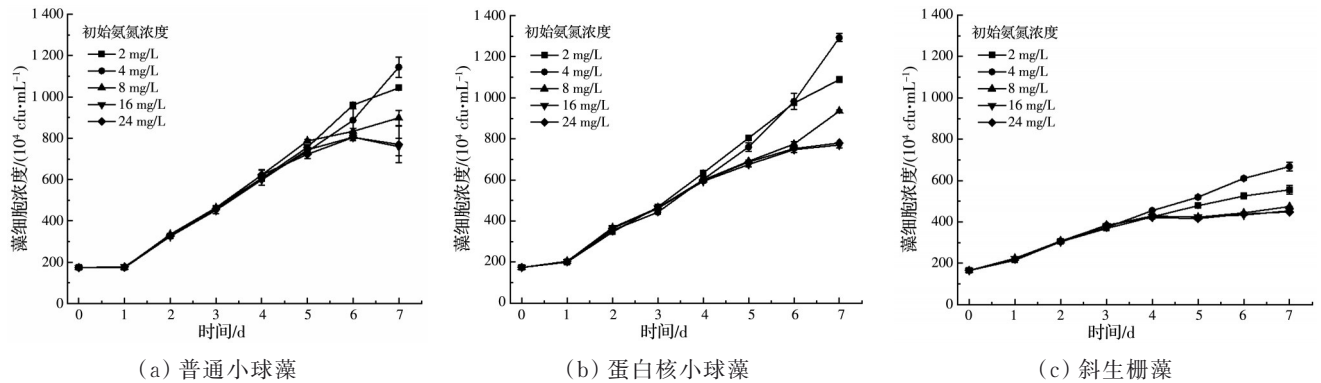


图 1 3 种微藻在不同氨氮浓度下的生长规律

Fig. 1 Growth law of three kinds of microalgae under different ammonia concentrations

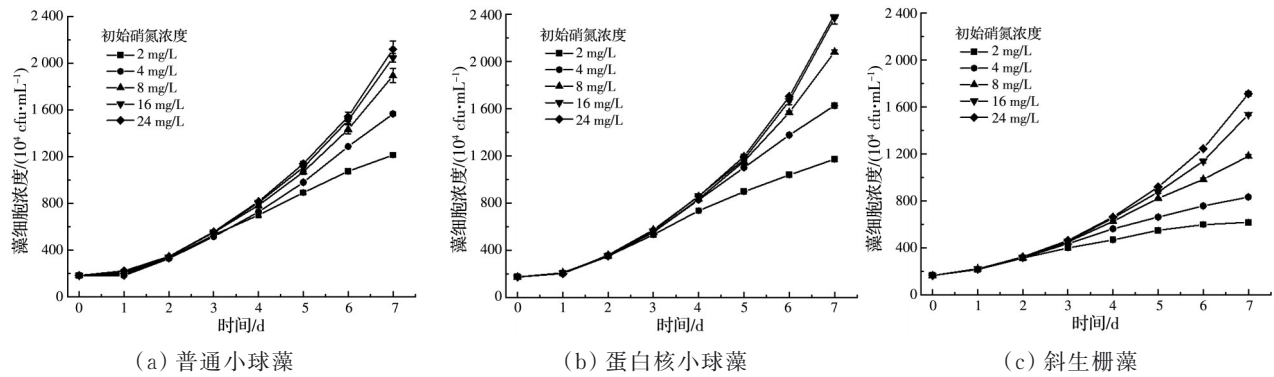


图 2 3 种微藻在不同硝氮浓度下的生长规律

Fig. 2 Growth law of three kinds of microalgae under different nitrate nitrogen concentrations

2.1.3 不同氮源比例的影响 由图 3 可知,3 种微藻在 3 种不同的硝氮与氨氮比例(总氮源浓度为 12 mg/L)下均能生长,并且硝氮比例高的试验组比单一氮源浓度为 16 mg/L 时生长速率更快(图 2)。Zhu 等^[31]发现,在 3 种氮源(氨氮、硝氮和尿素)培养基中培养的微藻比单一氮源培养基培养的微藻具有更高的生物量增加量和生产力。随着硝氮所含

比例的增加,藻细胞数量增长变快。其中,普通小球藻细胞数量增量略高于蛋白核小球藻,明显高于斜生栅藻。由于不同氨氮浓度试验组在试验第 7 天氨氮浓度高的藻细胞浓度反而小,将氨氮浓度为 8 mg/L 的试验组藻细胞浓度与本节藻细胞浓度最低的试验组(硝氮:氨氮=1:2)进行比较。由图 1 可知,3 种微藻第 7 d 的藻细胞浓度分别为 $898.7 \times$

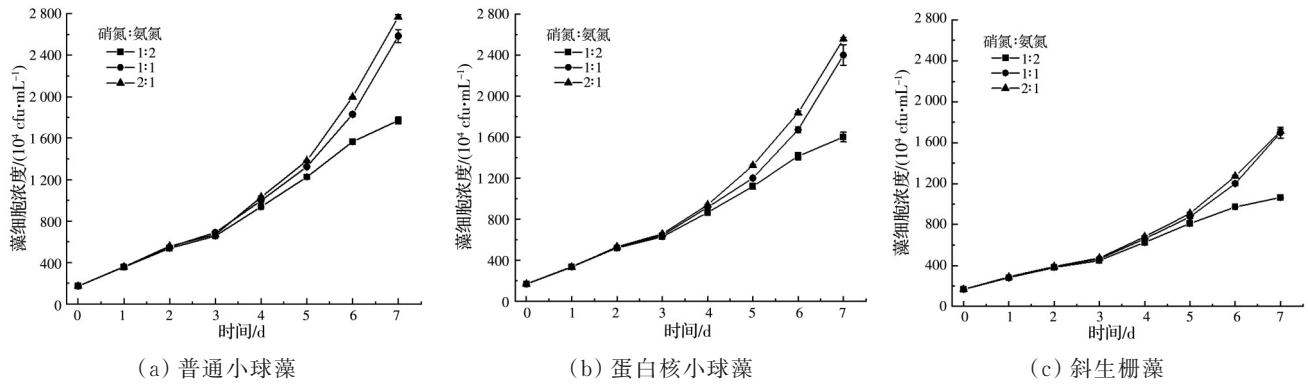


图 3 3种微藻在不同初始氮源比下的生长规律

Fig. 3 Growth law of three kinds of microalgae under different initial nitrogen source ratios

10^4 、 936.1×10^4 、 474.7×10^4 cfu/mL。由图 3 可知, 硝氮与氨氮比为 1:2 的试验组 3 种微藻第 7 d 的藻细胞浓度分别为 1770.1×10^4 、 1602.5×10^4 、 1065.199×10^4 cfu/mL。而不同硝氮浓度试验组第 7 天藻细胞浓度随着硝氮浓度的增加而增大。因此, 将硝氮浓度为 16 mg/L 的试验组藻细胞浓度与本节藻细胞浓度最高的试验组 (硝氮:氨氮=2:1) 进行比较。由图 2 可知, 3 种微藻第 7 天的藻细胞浓度分别为 2046.0×10^4 、 2368.5×10^4 、 1535.8×10^4 cfu/mL。硝氮与氨氮比为 2:1 的试验组 3 种微藻第 7 天的藻细胞浓度分别为 2770.6×10^4 、

2558.1×10^4 、 1710.9×10^4 cfu/mL。因此, 在不同氮源条件下, 不同藻种生长规律有所不同, 藻细胞浓度增量变化由高到低依次为混合氮源、硝氮、氨氮, 且小球藻细胞数量增量高于斜生栅藻。

2.2 氮源对微藻脱氮除磷的影响

2.2.1 不同初始氨氮水平的影响 由图 4 可以看出, 7 d 内 3 种微藻在低浓度氨氮 (≤ 8 mg/L) 组对氨氮去除效果较好, 去除率 $\geq 88\%$ ($N/P \leq 6$), 而在中高浓度氨氮组 (≥ 16 mg/L) 去除率较低, $\leq 66\%$ ($N/P \geq 12$)。微藻细胞的元素组成可以为污水的最佳营养配比提供依据, 微藻经验式为 $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$

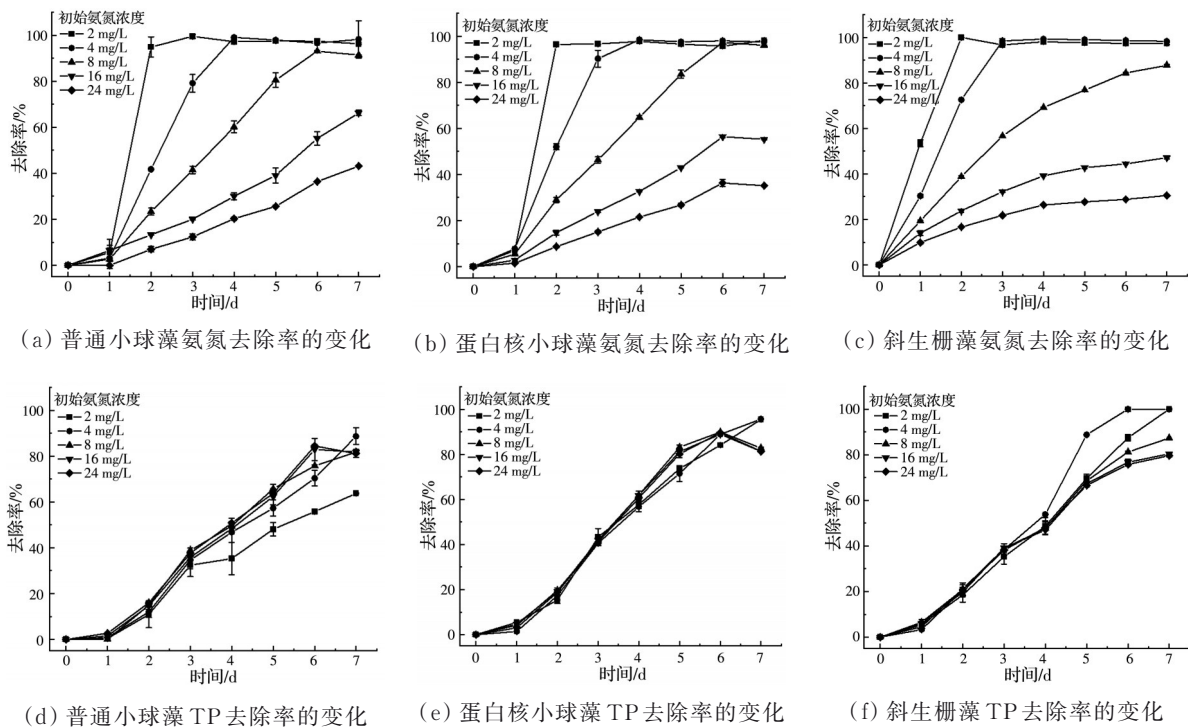


图 4 3种微藻在不同氨氮浓度下对 N、P 的去除

Fig. 4 Removal of N and P by three kinds of microalgae at different concentrations of ammonia nitrogen

(N/P=7.2:1),细胞的平均组成取决于菌株和生长条件。Li等^[4]报道了N/P对营养物去除有显著影响,发现*Scenedesmus* sp的最佳N/P为5:1~8:1。随着培养天数的增加,藻细胞由生长延迟期进入对数生长期再进入稳定期,对氨氮的去除速率也先增大后减缓。3种微藻对氨氮的去除效果差别不大,普通小球藻略优于蛋白核小球藻,斜生栅藻对氨氮的去除能力最弱。

在不同初始氨氮浓度下,7 d内3种微藻对TP均有较高的去除率($\geq 80\%$)。3种微藻相比,对TP的去除率由高到低依次为斜生栅藻>蛋白核小球藻>普通小球藻。

2.2.2 不同初始硝氮水平的影响 由图5可知,当硝氮初始浓度 ≤ 16 mg/L时,3种微藻都能将硝氮几乎完全去除,且中高浓度硝氮下的去除速率持续增大,与硝氮为唯一氮源时藻细胞7 d都处于对数生长期相关。低浓度硝氮组在第3天就已经将硝氮完全去除,但藻细胞还在继续增长,是由于藻细胞可通过消耗自身含氮物质(如叶绿素等)继续维持自身生命活动^[32-33]。由于叶绿素是一种富含氮的化合物,每个分子含有4个氮原子。有研究认为,当培养基中的氮耗尽时,细胞开始利用细胞内的含氮物质

来支持细胞物质的合成,以进行进一步的细胞分裂。叶绿素似乎是最容易获得的细胞内氮源之一,当外部氮库耗尽时,细胞开始利用它们^[33]。高浓度硝氮组由于生长营养充足,藻细胞一直处于对数生长期,初始硝氮浓度为24 mg/L的小球藻试验组氮有剩余,说明硝氮浓度不能太高,不然难以达到较好的脱氮效果。其中,斜生栅藻7 d内在各初始浓度下都几乎将硝氮完全去除,对硝氮的去除速率排序依次为:斜生栅藻>蛋白核小球藻>普通小球藻。在不同初始硝氮浓度下,7 d内3种微藻对TP均几乎完全去除。随着硝氮浓度的增加,微藻对TP的去除速率增大。其中,蛋白核小球藻对TP的去除速率最快且最完全。硝氮含量较充足的试验组(≥ 8 mg/L)中,随着反应的进行,TP的去除速率逐渐加快,这可能是因为硝酸盐消耗引起pH值升高,微藻细胞对磷酸盐的生物同化和非生物沉淀相结合,实现了磷酸盐的去除^[34]。N、P耗尽后细胞的生长(图2)可能是由于藻细胞开始利用细胞组分之前吸收的N、P^[32]。

2.2.3 不同初始氮源比的影响 由图6可知,3种微藻均在第1 d对氨氮有较高的去除率,之后对硝氮的去除速率增大,在第6天时,两种氮源均几乎完

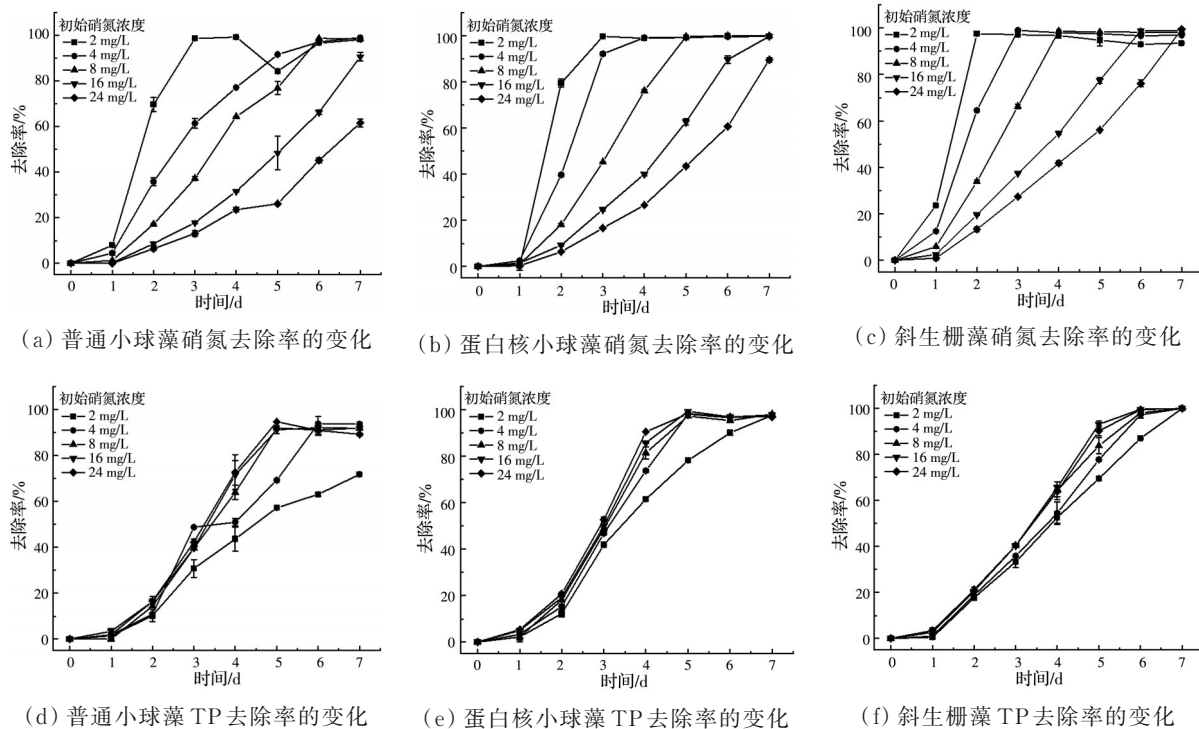


图5 3种微藻在不同硝氮浓度下对N、P的去除

Fig. 5 Removal of N and P by three kinds of microalgae at different nitrate concentrations

全去除。而在氨氮浓度为8 mg/L的单一氮源试验组,3种微藻需要6~7 d才能将氮去除(图4),由此可以推测,氨氮浓度为12 mg/L时脱氮速率不如混合氮源。不同的氮源可诱导不同的氮同化方式,导致培养过程中发生较大的理化变化^[35]。在氨氮与硝氮浓度为1:1的试验组可以发现,3种微藻对氨氮的

去除速率均高于硝氮,说明微藻优先利用氨氮为氮源。两种小球藻在第3天可以将TP完全去除,斜生栅藻在第4天可以将TP完全去除。不同的硝氮与氨氮比例对TP的去除影响不大。因此,可以配置相对高磷低氮的培养基。

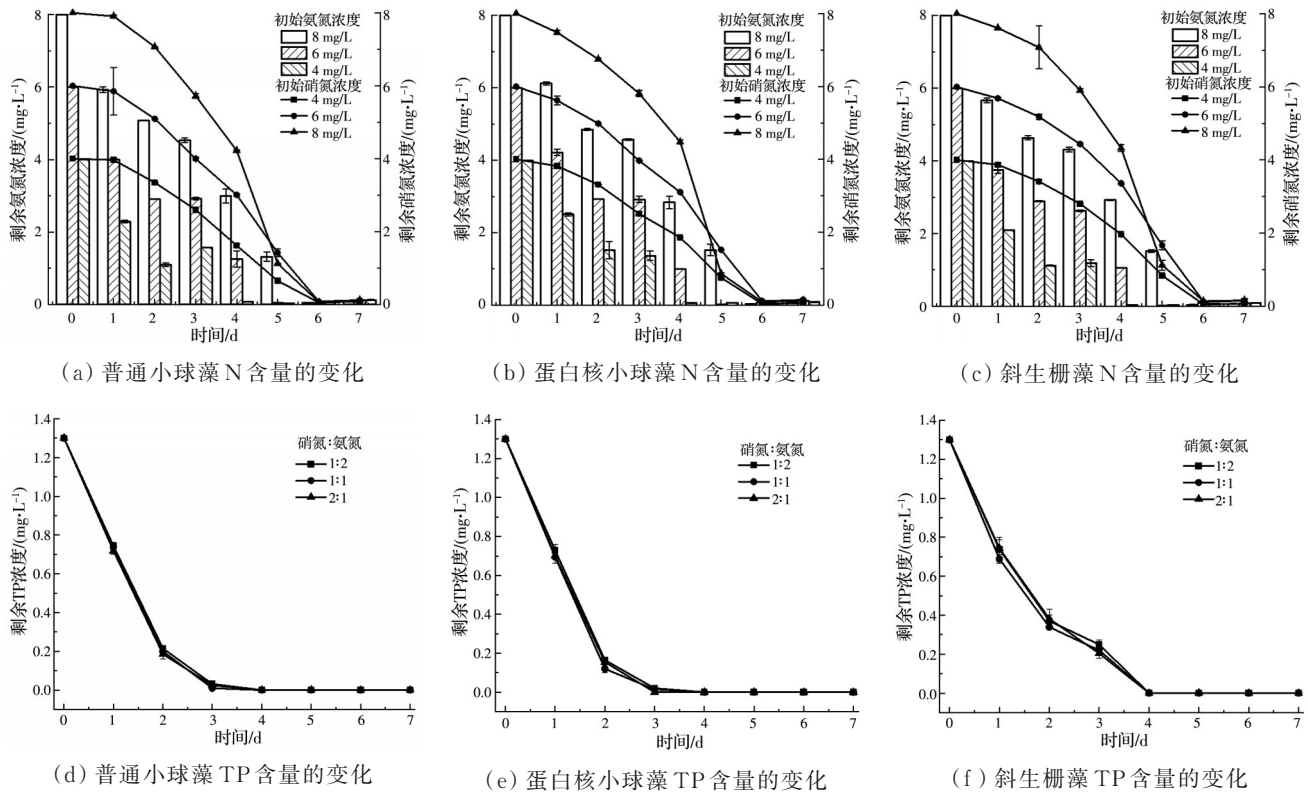


图6 3种微藻在不同氮源比下对N、P的去除

Fig. 6 Removal of N and P by three kinds of microalgae at different nitrogen source ratios

综合考虑在不同氮源下3种藻细胞的生长情况及其脱氮除磷效能,后续选择蛋白核小球藻为研究对象,探究其污水深度脱氮除磷过程中生物大分子物质变化与累积机制。

2.3 蛋白核小球藻脱氮除磷过程中生物大分子累积与细胞形态分析

2.3.1 不同氮源下蛋白核小球藻叶绿素a含量分析 不同氮源条件下蛋白核小球藻叶绿素a含量的变化如图7所示。由图7可知,不同氮源下藻细胞叶绿素a含量均随时间逐渐升高。7天后高浓度氨氮组藻细胞叶绿素a含量约为1.0 mg/L,而高浓度硝氮组约为3.5 mg/L,为前者的3.5倍。7天后低浓度硝氮与氨氮组叶绿素a含量均约为0.5 mg/L。氨氮组叶绿素a含量变化与3种藻生长规律不一致,

可能是培养液中环境因素(排泄物、pH值和含氮量等)抑制了叶绿素合成^[36],而硝氮组叶绿素含量则与其生长状况一致。不同氮源比组藻细胞叶绿素含量变化与其生长状况一致,硝氮所占比例越高,叶绿素含量增长越快。氮是蛋白质和核酸合成所必需的,也存在于叶绿素分子中^[37]。因此,可用氮源对光合作用至关重要,污水深度处理过程中氮的缺乏可能对藻类叶绿素的合成产生负面影响^[38]。

2.3.2 不同氮源下蛋白核小球藻红外光谱分析 蛋白核小球藻胞内大分子物质相对含量变化如图8、图9所示。蛋白核小球藻脱氮第4天和第7天红外光谱分析图如图10所示。在低浓度硝氮条件下,蛋白核小球藻深度脱氮除磷第4 d时,细胞内碳水化合物较初始值有所增加,增幅为10%~20%;其他试验组细胞内碳水化合物含量均有所降低,降幅

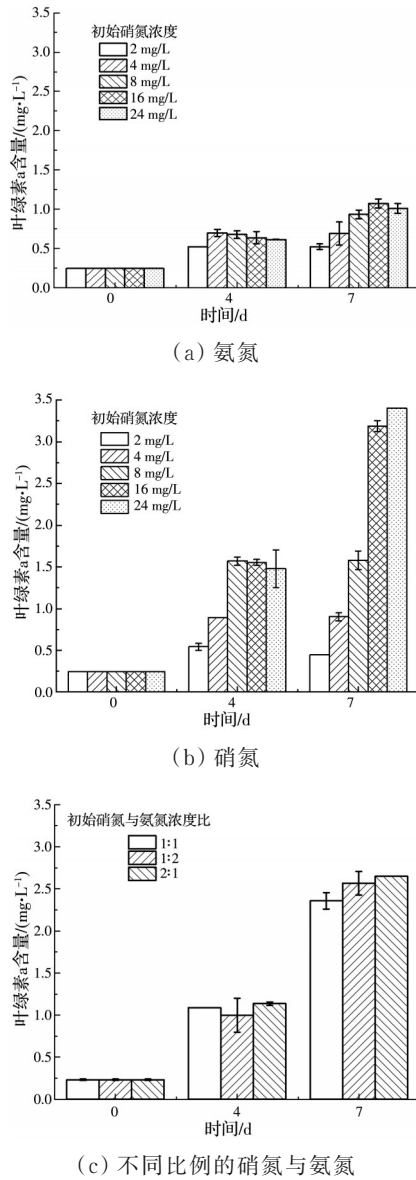


图7 蛋白核小球藻在不同氮源下的叶绿素 a 含量变化
Fig. 7 Chlorophyll-a content of *Chlorella pyrenoidosa* under different nitrogen sources

为 10%~25%。当第 7 天时,各条件下蛋白核小球藻的碳水化合物含量较第 4 天均有所增加;在高浓度氨氮和硝氮下,藻细胞内碳水化合物含量低于初始值(分别下降 13% 和 15%),其余条件下较初始值均有所增加。不同氮源比试验组第 4 天和第 7 天藻细胞内碳水化合物含量较初始值均下降,第 4 天降幅为 40%~50%,第 7 天降幅为 40%~60%。当硝氮与氨氮比为 1:2 和 1:1 时,第 7 天较第 4 天碳水化合物含量减少,比值为 2:1 时略有增加。

模拟污水深度处理第 4 天时,低浓度硝氮组藻细胞内蛋白质含量较第 1 天减少,其余试验组较初始值均有所增加。Yao 等^[39]发现,培养初期缺氮导

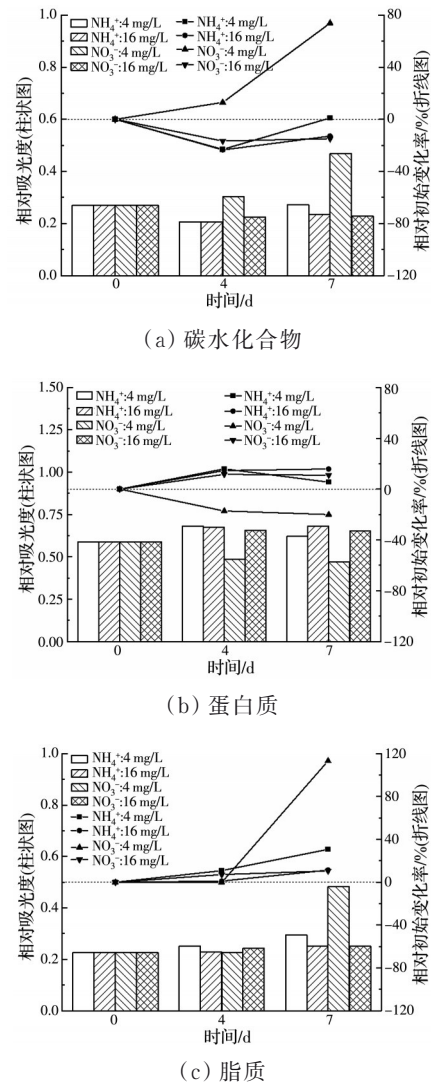


图 8 蛋白核小球藻在不同初始氮源浓度下的大分子物质含量相对变化

Fig. 8 Changes of macromolecule relative contents of *Chlorella proteinosa* under different initial nitrogen source concentrations

致细胞内淀粉积累量最高,蛋白质含量最低。硝氮与氨氮比值越低,蛋白质含量增加量越高,最大为 28%;而第 4~7 天,各试验组蛋白质含量均有所减少。第 4 天时,各试验组藻细胞脂质含量均大于等于初始值,比值为 1:1 组脂质含量较初始值有所降低。第 7 天时,脂质含量持续增长,其中低浓度硝氮组增长最明显,增长了 1.1 倍,比值为 1:1 组降幅达到最大(25%)。

以上结果表明,缺氮导致蛋白质合成受阻,使得光合作用中的固定碳更容易转向碳水化合物和脂质,这与 Meng 等^[25]的结果一致。Metsoviti 等^[30]发现,随着培养基中氮浓度的增加,小球藻蛋白质含

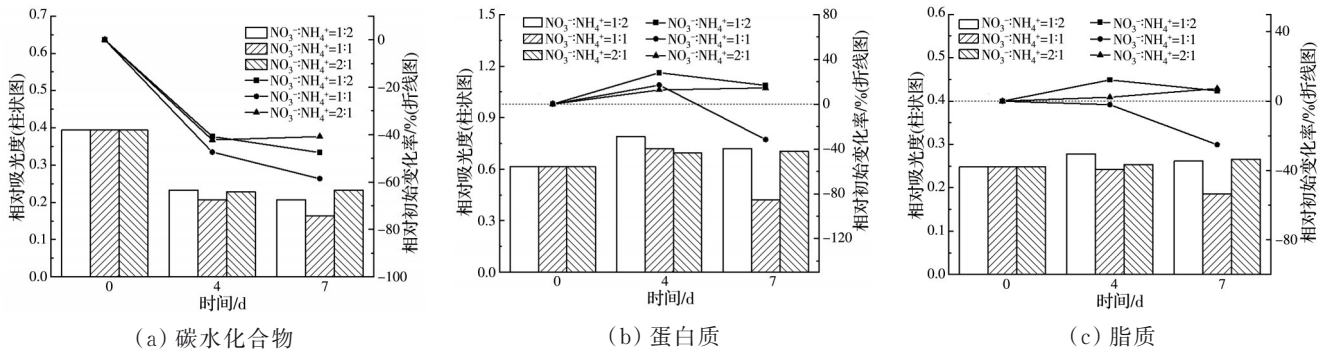


图9 蛋白核小球藻在不同氮源比例下的大分子物质含量相对变化

Fig. 9 Changes of macromolecule relative contents in *Chlorella proteinosa* under different nitrogen source ratios

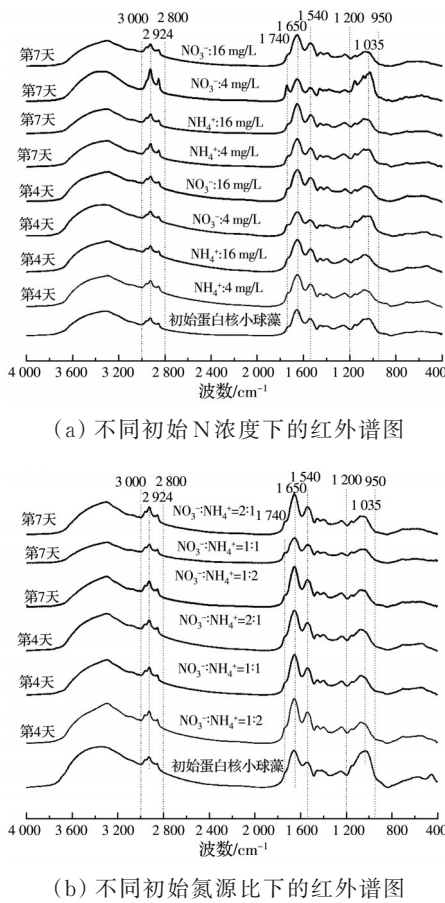


图10 蛋白核小球藻脱氮第4天和第7天红外光谱图

Fig. 10 Infrared spectrum of *Chlorella pyrenoidosa* on the fourth and seventh day of nitrogen removal

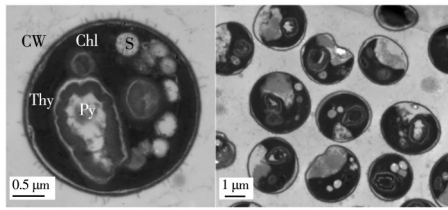
量增加,而脂质含量降低。Widjaja等^[40]也报道了随着培养基中氮浓度的降低,*C. vulgaris*中的脂质积累增加。综上所述,在不同初始氮源水平下,微藻特定生理状态、细胞成分之间发生了相对变化。

2.3.3 不同氮源下蛋白核小球藻细胞形态分析
在不同初始氮源水平下,蛋白核小球藻对模拟

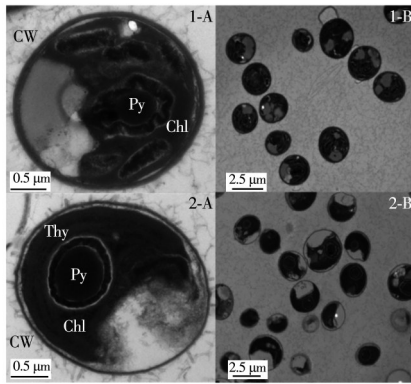
污水进行深度脱氮除磷第7天时的透射电镜图如图11所示(图中CW为细胞壁;CH1为叶绿素;S为淀粉粒;Py为蛋白核;L为脂滴;Thy为类囊)。从图11(a)可以看出,初始接种的高度分裂的微藻细胞结构完整,杯状色素体中含有一个蛋白核,叶绿体中充满淀粉颗粒,只有少量脂滴,且藻细胞表面有一些透明质酸纤维^[38]。

在脱氮除磷至第7天时,初始硝氮浓度为4 mg/L的试验组细胞中出现大脂体,淀粉颗粒大大减少,细胞壁增厚,但细胞结构完整(图11(b)1-A,1-B)。由于初始氮源浓度低,2 d后氮源消耗殆尽,后期藻细胞生长受到氮限制。虽然淀粉是大多数绿藻的主要储藏物质,但在营养缺乏的情况下,微藻能够将光合作用的碳通量重新定向到脂质生物合成途径,从而导致脂质在细胞胁迫下积累成为碳和能量储备^[42-43]。Přibyl等^[44]观察到,微藻细胞内淀粉消失的同时脂肪积累,且在营养限制条件下微藻优先利用淀粉而不是脂质。Li等^[39]、Ratomski等^[45]发现,*Pseudochlorococum* sp. 中淀粉转化为中性脂质。蛋白核小球藻利用淀粉和油脂作为储能物质,但因生长条件和阶段的不同而有所不同^[46]。

在氮、磷含量充足的试验组(图11(b)2-A、图11(d)5-A、7-A)中,蛋白核小球藻细胞结构完整且叶绿体含量丰富,主要储能物质含量和初始接种藻细胞类似。因营养缺失,图11(c)3-B中部分藻细胞消耗自身物质,呈现出空壳状态,图11(c)3-A中细胞外透明质酸纤维也显著减少。缺氮试验组细胞超微结构的改变可能是由于细胞消耗细胞壁上氨基糖作为氮源,并使得生长期延长^[47]。在缺氮条件下,微藻细胞可能重新吸收含有N-乙酰氨基葡萄糖的细胞结构层作为氮源,并表现为含有N-乙酰氨基葡萄糖的透明质酸纤维减少^[41]。图11(c)3-B、4-B和

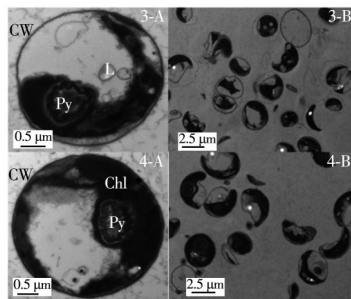


(a) 初始蛋白核小球藻(第0天)



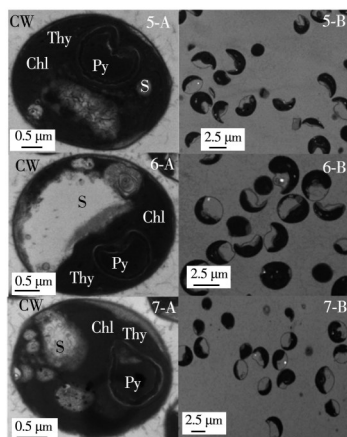
注: 1: A、1-B: 初始硝氮浓度为4 mg/L;
2: A、2-B: 初始硝氮浓度为16 mg/L。

(b) 不同硝氮浓度(第7天)



注: 3-A、3-B: 初始氨氮浓度为4 mg/L;
4-A、4-B: 初始氨氮浓度为16 mg/L。

(c) 不同氨氮浓度(第7天)



注: 5-A、5-B: 硝氮:氨氮=1:1; 6-A、6-B: 硝氮:
氨氮=1:2; 7-A、7-B: 硝氮:氨氮=2:1。

(d) 不同氮源比例(第7天)

图11 蛋白核小球藻透射电镜图

Fig. 11 Transmission electron microscopy of *Chlorella proteinosa*

图11(d)6-B中,部分细胞中均出现空壳且变形,可能是蛋白核小球藻利用氨氮为氮源,使得体系pH值降低到极低值,破坏了部分细胞器,抑制了细胞正常生长,甚至导致死亡。

以上结果表明,随着培养基中氮的消耗,蛋白核小球藻细胞内蛋白质和叶绿素含量会增加。而在氮消耗完之后,细胞会消耗内源氮源,同时储存能量以抵抗外界不利条件,从而维持自身生命活动。生物大分子水平呈现的结果就是蛋白质、叶绿素等含氮物质的减少和脂质、碳水化合物等储能物质的增加。

3 结论

1)以硝氮为唯一氮源时,藻细胞增长量明显高于以氨氮为唯一氮源的情况,最终藻细胞浓度为前者浓度的2倍。在不同初始氮源比例下,随着硝氮所占比例增大,藻细胞生长速率增大。7 d内3种微藻对硝氮的去除更完全,只在低浓度氮源(≤ 8 mg/L)组对氮去除效果较好。故选用硝氮为唯一氮源,浓度选为8~16 mg/L,设定为12 mg/L。

2)不同藻种在不同氮源条件下生长规律有所不同,且小球藻细胞数量增长量高于斜生栅藻。不同初始硝氮浓度下,3种微藻对硝氮的去除速率为:斜生栅藻>蛋白核小球藻>普通小球藻,其中蛋白核小球藻对TP的去除最快、最完全。因此,蛋白核小球藻脱氮除磷性能最稳定。

3)与氨氮作为氮源相比,硝氮为唯一氮源时,7 d后各藻细胞叶绿素含量明显更高,为前者的2~4倍,低浓度氮源组叶绿素含量低。不同初始氮源比下,3种藻细胞叶绿素含量变化与其生长状况一致,硝氮所占比例越高,叶绿素含量增长越快。

4)傅里叶红外光谱和透射电镜分析表明,微藻通过调节细胞内大分子物质来适应不同的生存环境。氮源含量充足时,藻细胞内蛋白质和叶绿素含量增加,在营养受限制的条件下会消耗自身物质以满足生命活动的需要。氮限制条件会引起细胞内脂质积累。

参考文献

- [1] RUIZ-MARIN A, MENDOZA-ESPINOSA L G, STEPHENSON T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-

- continuous cultures treating real wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 58-64.
- [2] 李川, 薛建辉, 赵蓉, 等. 4种固定化藻类对污水中氮的净化能力研究[J]. *环境工程学报*, 2009, 3(12): 2185-2188.
- LI C, XUE J H, ZHAO R, et al. Nitrogen removal from wastewater by four species of immobilized algae [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3(12): 2185-2188. (in Chinese)
- [3] 邓祥元, 丁婉婉, 樊玲波, 等. 2种微藻去除氮、磷能力的比较[J]. *吉林农业大学学报*, 2013, 35(6): 694-698, 726.
- DENG X Y, DING W W, FAN L B, et al. Comparative study on N and P removal ability of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2013, 35(6): 694-698, 726. (in Chinese)
- [4] LI X, HU H Y, GAN K, et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(14): 5494-5500.
- [5] RANI V, MARÓTI G. Assessment of nitrate removal capacity of two selected eukaryotic green microalgae [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2490.
- [6] HIGGINS B T, GENNITY I, FITZGERALD P S, et al. Algal-bacterial synergy in treatment of winery wastewater [J]. *npj Clean Water*, 2018, 1: 6.
- [7] CHANG H X, QUAN X J, ZHONG N B, et al. High-efficiency nutrients reclamation from landfill leachate by microalgae *Chlorella vulgaris* in membrane photobioreactor for bio-lipid production [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 266: 374-381.
- [8] GENG Y N, CUI D, YANG L M, et al. Resourceful treatment of harsh high-nitrogen rare earth element tailings (REEs) wastewater by carbonate activated *Chlorococcum* sp. microalgae [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423: 127000.
- [9] 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.
- HAN L. Screening of lipid-rich energy microalgae and study on its nitrogen and phosphorus removal properties in domestic sewage [D]. Jinan: Shandong University, 2015. (in Chinese)
- [10] DE JAEGER L, VERBEEK R E, DRAAISMA R B, et al. Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and characterization [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 69.
- [11] MARKOU G, DEPRAETERE O, MUYLEAERT K. Effect of ammonia on the photosynthetic activity of *Arthrospira* and *Chlorella*: A study on chlorophyll fluorescence and electron transport [J]. *Algal Research*, 2016, 16: 449-457.
- [12] LI X T, LI W, ZHAI J, et al. Effect of ammonium nitrogen on microalgal growth, biochemical composition and photosynthetic performance in mixotrophic cultivation [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 273: 368-376.
- [13] SHARMA K K, SCHUHMANN H, SCHENK P M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production [J]. *Energies*, 2012, 5(5): 1532-1553.
- [14] KHAN M I, SHIN J H, KIM J D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products [J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 36.
- [15] KALRA R, GAUR S, GOEL M. Microalgae bioremediation: A perspective towards wastewater treatment along with industrial carotenoids production [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 40: 101794.
- [16] JI X Y, JIANG M Q, ZHANG J B, et al. The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 44-50.
- [17] KALLA N, KHAN S. Effect of nitrogen, phosphorus concentrations, pH and salinity ranges on growth, biomass and lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* [J]. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2016, 7: 397-405.
- [18] 水质 硝酸盐氮的测定 紫外分光光度法: HJ/T 343—2007 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007.
- Water quality-Determination of nitrate-nitrogen-Ultraviolet spectrophotometry: HJ/T 343—2007 [S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2007. (in Chinese)
- [19] 水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法: HJ 535—2009 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010.
- Water quality-Determination of ammonia nitrogen-Nessler's reagent spectrophotometry: HJ 535—2009 [S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2010. (in Chinese)
- [20] 水质 总磷的测定 钼酸铵分光光度法: GB 11893—1989

- [S]. 北京: 中国标准出版社, 1989.
- Water quality-Determination of total phosphorus-Ammonium molybdate spectrophotometric method: GB 11893—1989 [S]. Beijing: Standards Press of China, 1989. (in Chinese)
- [21] 陈明华, 谢良国, 付志强, 等. 丙酮法和热乙醇法测定浮游植物叶绿素 a 的方法比对[J]. 环境监测管理与技术, 2016, 28(2): 46-48.
- CHEN M H, XIE L G, FU Z Q, et al. Comparison of two methods for measurement of phytoplanktonic chlorophyll-a [J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2016, 28(2): 46-48. (in Chinese)
- [22] 陈宇炜, 陈开宁, 胡耀辉. 浮游植物叶绿素 a 测定的“热乙醇法”及其测定误差的探讨[J]. 湖泊科学, 2006, 18(5): 550-552.
- CHEN Y W, CHEN K N, HU Y H. Discussion on possible error for phytoplankton chlorophyll-a concentration analysis using hot-ethanol extraction method [J]. Journal of Lake Sciences, 2006, 18(5): 550-552. (in Chinese)
- [23] 唐聪聪. 菌藻共生序批式泥膜系统脱氮除磷效能及作用机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- TANG C C. Performance and mechanism of algal-bacterial symbiosis system based on sequencing batch biofilm-sludge reactor for nitrogen and phosphorus removal [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2018. (in Chinese)
- [24] PISTORIUS A M A, DEGRIP W J, EGOROVA-ZACHERNYUK T A. Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 103(1): 123-129.
- [25] MENG Y Y, YAO C H, XUE S, et al. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions [J]. Bioresource Technology, 2014, 151: 347-354.
- [26] LIANG Z J, LIU Y, GE F, et al. Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis* [J]. Chemosphere, 2013, 92(10): 1383-1389.
- [27] 刘燕. 小球藻与地衣芽孢杆菌联合体系脱氮除磷效果的研究[D]. 湖南湘潭: 湘潭大学, 2012.
- LIU Y. The study on the removal of nitrogen and phosphorus by combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis* [D]. Xiangtan, Hunan: Xiangtan University, 2012. (in Chinese)
- [28] SADIQ I M, DALAI S, CHANDRASEKARAN N, et al. Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(5): 1180-1187.
- [29] 章斐, 陈秀荣, 江子建, 等. 不同氮磷浓度下 2 种无毒微藻的生长特性和脱氮除磷效能[J]. 环境工程学报, 2015, 9(2): 559-566.
- ZHANG F, CHEN X R, JIANG Z J, et al. Growth characteristics and removal efficiency of nitrogen and phosphorus of two kinds of non-toxic microalgae under different nitrogen and phosphorus concentrations [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(2): 559-566. (in Chinese)
- [30] METSOVITI M N, KATSOULAS N, KARAPANAGIOTIDIS I T, et al. Effect of nitrogen concentration, two-stage and prolonged cultivation on growth rate, lipid and protein content of *Chlorella vulgaris* [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2019, 94(5): 1466-1473.
- [31] ZHU L D, LI S X, HU T Y, et al. Effects of nitrogen source heterogeneity on nutrient removal and biodiesel production of mono- and mix-cultured microalgae [J]. Energy Conversion and Management, 2019, 201: 112144.
- [32] WANG B, LAN C Q. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 5639-5644.
- [33] LI Y Q, HORSMAN M, WANG B, et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(4): 629-636.
- [34] LALIBERTÉ G, LESSARD P, NOÛE J D L, et al. Effect of phosphorus addition on nutrient removal from wastewater with the cyanobacterium *Phormidium bohneri* [J]. Bioresource Technology, 1997, 59(2/3): 227-233.
- [35] PODEVIN M, DE FRANCISCI D, HOLDT S L, et al. Effect of nitrogen source and acclimatization on specific growth rates of microalgae determined by a high-throughput in vivo microplate autofluorescence method [J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 27(4): 1415-1423.
- [36] 孙凯峰, 肖爱凤, 刘伟杰, 等. 氮磷浓度对惠氏微囊藻

- 和斜生栅藻生长的影响[J]. 南方水产科学, 2017, 13(2): 69-76.
- SUN K F, XIAO A F, LIU W J, et al. Effect of nitrate and phosphate concentration on growth of *Microcystis wesenbergii* and *Scenedesmus obliquus* [J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(2): 69-76. (in Chinese)
- [37] LOURENÇO S O, BARBARINO E, MARQUEZ U M L, et al. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors [J]. Journal of Phycology, 1998, 34(5): 798-811.
- [38] FERREIRA V S, PINTO R F, SANT'ANNA C. Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(3): 661-670.
- [39] YAO C H, AI J N, CAO X P, et al. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation [J]. Bioresource Technology, 2012, 118: 438-444.
- [40] WIDJAJA A, CHIEN C C, JU Y H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* [J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2009, 40(1): 13-20.
- [41] GRAVES M V, BURBANK D E, ROTH R, et al. Hyaluronan synthesis in virus PBCV-1-infected chlorella-like green algae [J]. Virology, 1999, 257(1): 15-23.
- [42] LI Y T, HAN D X, SOMMERFELD M, et al. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 123-129.
- [43] WANG Z T, ULLRICH N, JOO S, et al. Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Eukaryotic Cell, 2009, 8(12): 1856-1868.
- [44] PŘIBYL P, CEPÁK V, ZACHLEDER V. Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris* [J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(2): 545-553.
- [45] RATOMSKI P, HAWROT-PAW M. Influence of nutrient-stress conditions on *Chlorella vulgaris* biomass production and lipid content [J]. Catalysts, 2021, 11(5): 573.
- [46] ZHU S N, FENG P Z, FENG J, et al. The roles of starch and lipid in *Chlorella* sp. during cell recovery from nitrogen starvation [J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 58-65.
- [47] GUARNIERI M T, NAG A, SMOLINSKI S L, et al. Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25851.

(编辑 黄廷)