

碳氮磷交互作用对高浓度氨氮鸡粪沼液培养小球藻的影响

贾侑臻^{1,2,3}, 卢海凤^{1,2,3*}, 董泰丽⁴, 孙颖财⁴, 李保明^{1,2,3}, 童勤^{1,2,3}, 胡国娜^{1,2,3}, 张东明⁴, 韩挺^{1,2,3}

(1. 中国农业大学 水利与土木工程学院, 北京 100083; 2. 农业农村部设施农业工程重点实验室, 北京 100083; 3. 北京市畜禽健康养殖环境工程技术中心, 北京 100083; 4. 山东民和生物科技股份有限公司, 山东 蓬莱 265600)

摘要: 为降低鸡粪沼液对环境污染的同时寻求资源的再生利用, 以鸡粪沼液膜过滤出水作为小球藻培养基, 研究了二氧化碳(CO₂)体积浓度(0.03%~10%)及氮磷比(N/P=10~260)对小球藻生物量与色素累积, 以及对氨氮、磷酸盐去除的影响。试验结果表明: 在CO₂体积浓度为7.5%、N/P=80的条件下, 小球藻干重最高可达3.38 g·L⁻¹, 叶绿素(Chlorophyll, Chl a+b)浓度为30.78 mg·L⁻¹, 氨氮去除率为68.6%。CO₂浓度对小球藻累积生物量的影响更大, 培养20 d后, 额外补偿CO₂的各处理组中磷酸盐去除率均>98%。研究为鸡粪沼液膜过滤出水培养微藻的工业化应用奠定了基础。

关键词: 小球藻; 氮磷比; 二氧化碳; 鸡粪沼液

中图分类号: S216.4; X712 文献标志码: A 文章编号: 1000-1166(2023)02-0029-10

DOI: 10.20022/j.cnki.1000-1166.2023020029

Interaction Effects of Carbon, Nitrogen and Phosphorus on *Chlorella* Cultivation of by Chicken Manure Biogas Slurry with High Ammonium Concentration / JIA Youzhen^{1,2,3}, LU Haifeng^{1,2,3*}, DONG Taili⁴, SUN Yingcai⁴, LI Baoming^{1,2,3}, TONG Qin^{1,2,3}, HU Guona^{1,2,3}, ZHANG Dongming⁴, HAN Ting^{1,2,3} / (1. College of Water Resources and Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Key Laboratory of Agricultural Engineering in Structure and Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the PRC, Beijing 100083, China; 3. Beijing Engineering Research Center for Livestock Poultry Healthy Environment, Beijing 100083, China; 4. Shandong Minhe Biotechnology Co Ltd, Penglai 265600, China)

Abstract: In order to reduce the pollution of chicken manure biogas slurry to the environment and reuse resource, the wastewater from chicken manure anaerobic fermentation biogas slurry membrane filtration was used as a medium for *Chlorella* cultivation. The carbon dioxide volume percentage (CO₂) (0.03%~10%) and nitrogen-to-phosphorus ratio (N/P=10~260) on the dry cell weight and pigments concentration of *Chlorella*, and the ammonium and phosphate removal were investigated. Results show that with 7.5% CO₂ and N/P=80, the dry cell weight and total chlorophyll (Chlorophyll, Chl a+b) concentration of *Chlorella* reached 3.38 g·L⁻¹ and 30.78 mg·L⁻¹, respectively. The ammonium removal reached 68.6%. The CO₂ volume percentage has a greater impact on biomass accumulation, especially after 20 days' cultivation, with additional CO₂ supplementation, phosphate removal in each group was >98%. This work provides the foundation for the industrial application of microalgae cultivation in chicken manure biogas slurry.

Key words: *Chlorella*; nitrogen-to-phosphorus ratio; carbon dioxide; chicken manure biogas slurry

微藻具有较高的生长速度与良好的环境适应性, 是一种公认的可持续的生物质, 广泛应用于食品、制药、化妆品、饲料、能源等行业^[1-3]。但高昂的生产成本在一定程度上限制了微藻生物技术的广泛

应用。采用废水培养微藻则提供了切实有效的思路和方法。自20世纪50年代Oswald提出微藻净化水质的理念以来^[4], 微藻处理废水一直备受关注: 废水中氮磷等无机盐可以作为微藻的养料, 同时微

收稿日期: 2022-07-24 修回日期: 2022-09-21

项目来源: 企业横向委托课题

作者简介: 贾侑臻(1997-)男, 汉, 四川南充人, 硕士, 研究方向为废水微藻资源化利用, E-mail: youzjia@163.com

通信作者: 卢海凤, E-mail: haifenglu@cau.edu.cn

藻可吸附或降解废水中的重金属、抗生素等污染物,降低培养成本的同时实现废水的净化;此外,微藻生长周期短、光合作用效率高,其固碳效率是一般陆生植物的10~50倍^[5]。已有研究表明,微藻通过光合作用每固定1800克CO₂,可生产1000克生物质^[6-7]。因此,利用微藻处理废水不仅能够实现其净化,还能获取微藻生物质用于下游高价值产品开发,进而形成基于微藻废水处理的新型绿色产业链。而微藻废水处理资源化效率与废水中的养分供应关系密切,其中碳氮磷浓度及比例对微藻对废水中养分的吸收利用,以及微藻自身的生长、生化组分影响较大^[8]。

CO₂的供应量对微藻产量及藻体组成成分影响较大。CO₂供应通常以其与空气混合的百分比作为计量单位。CO₂的通入比例亦因藻种、培养基中氮磷组分浓度等不同而异。通常0.03%~15%浓度的CO₂对螺旋藻、小球藻等生长有利;另外,较低的CO₂浓度更利于小球藻油脂积累^[11]。例如,Fan^[9]等研究发现随着CO₂浓度(0.03%~100%)升高,蛋白核小球藻生物量先增加后降低,在5%处取得最高值4.3 g·L⁻¹,且获得了最高的油脂累积量。另外,废水中的不同营养条件下,不同藻类生长的最佳CO₂供应量也有所不同。例如,刘锦上^[10]等在0.03%~15%CO₂浓度范围内利用酒精废水培养钝顶螺旋藻,在2.5%CO₂浓度下取得最高生物量1.62 g·L⁻¹。Liu^[11]等将生活污水作为小球藻培养基,探究0.03%~20%CO₂浓度的影响,结果发现在10%CO₂浓度下取得最高生物量1.12 g·L⁻¹。同时,环境中氮元素的存在形态与浓度,对微藻生长、代谢甚至是CO₂的利用产生一定的影响^[12]。例如,Li^[13]等研究发现,当NH₄⁺-N与NO₃⁻-N比例为1:4时,螺旋藻获得最高CO₂利用率(40.45%)。此

外,适量的CO₂浓度可降低溶液pH值,降低高氨氮溶液内游离氨含量,缓解氨对微藻的毒性作用^[14]。磷是限制微藻生产力的主要元素。环境中各种养分的可获得性影响着微藻生长代谢^[15-16],而氮磷摩尔比(N/P)为藻类细胞吸收养分的能力提供一个综合的衡量标准^[17-18],Nadiah^[19]等研究以F/2培养基作为基础配方,设置了5:1~120:1的N/P梯度,研究发现20:1的N/P有利于微藻的生长和蛋白质合成,N/P为5:1和120:1的情况下微藻碳含量较高。蔡敬^[20]等通过向猪场废水中添加NaH₂PO₄的方式调节N/P,研究发现当N/P为64:1时可获得最高生物量(0.49 g·L⁻¹)和氨氮去除率(74.94%);而在高浓度氨氮条件下溶液的磷浓度易随氮磷比(N/P)发生较大变化,甚至引入新的环境污染问题,降低了藻类培养的可持续性^[21]。

目前,有关CO₂浓度和N/P对在鸡粪沼液培养的小球藻生长特性和养分去除能力的综合影响的信息有限。基于以上背景,本研究利用高氨氮浓度的鸡粪沼液,探究不同N/P和CO₂浓度对小球藻生长、养分去除、色素合成的影响和交互作用。

1 材料与方法

1.1 藻种

研究所用小球藻(*Chlorella vulgaris*)从污水中分离纯化得到。其培养基为BG-11培养基(N/P=45:1),培养温度为25℃,光照强度3000 lux,光暗周期为12 h/光12 h暗。

1.2 废水特性

研究所采用的废水为山东某大型养鸡场沼气工程鸡粪厌氧发酵沼液经多级膜组合工艺制作水溶肥后的出水,其工艺流程图如图1所示。本试验所用沼液为经反渗透膜(RO膜)过滤后所得清液(RO清液)。

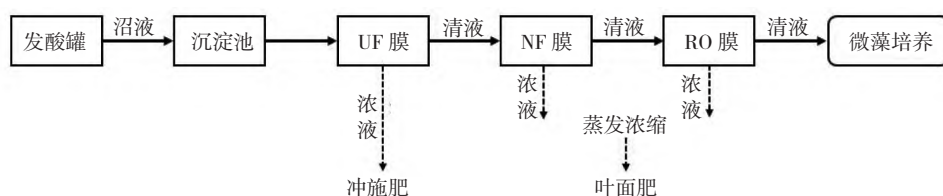


图1 试验废水来源

RO清液中氨氮浓度为367 mg·L⁻¹,磷酸盐浓度为3.1 mg·L⁻¹,COD浓度为104 mg·L⁻¹,溶液pH值为9.8,使用前需调节溶液pH值,使其维持在7.0~7.5。

1.3 试验方法

采用1.5 L高硼硅玻璃鼓泡柱状反应器进行小球藻培养。由于该废水中磷浓度较低,不能满足小球藻生长,因此采用向废水中添加磷酸二氢钾,以改

变废水 N/P 为微藻生长提供合适的营养水平。其中 N/P 共设置 5 个水平分,分别为 10、45、80、115、260。采用纯 CO₂ 与空气混合 (v/v) 的方式设置 CO₂ 浓度,设置 5 个水平,分别为 0.03%、2.5%、5%、7.5%、10%。随后开展两因素五水平的全面析因实验。

处理温度为 24°C ± 2°C。采用 LED 灯板作为光源,光照强度为 8000 lx,光暗周期为 12 h 光/12 h 暗。初始接种量为 220 mg·L⁻¹,气体经 0.22 μm 滤膜过滤后于反应器底部持续通气,通气比为 0.25 vvm。每隔 2 天定时取样,测定培养液中氨氮、磷酸盐浓度。培养周期为 20 d。

1.4 检测分析方法

1.4.1 生物量的测定

采用光密度法测定小球藻细胞生物量 (X, mg·L⁻¹),得出小球藻生物量与 OD₆₈₀ 值之间的线性关系见公式 (1):

$$X = 254.43 \times OD_{680} - 3.55 \quad (R^2 = 0.995) \quad (1)$$

1.4.2 比生长速率及日生产率

选择比生长速率 μ (d⁻¹) 和日生产率 P (mg·L⁻¹d⁻¹) 评价小球藻的生长情况,分别按照公式 (2) 和 (3) 计算:

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t_1 - t_0} \quad (2)$$

$$P = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0} \quad (3)$$

式中: t_0 和 t_1 分别为第 0 天和第 1 天, X_0 和 X_1 分别为 t_0 和 t_1 天对应的干重 mg·L⁻¹。

1.4.3 水质指标

取适量藻液置于 10 mL 离心管内,6000 rpm 离心 10 min 在将上层水样用 0.45 μm 孔径水系滤膜过滤备用。根据第四版《水和废水监测分析方法》^[22],采用纳氏试剂光度法测定溶液中氨氮 (NH₄⁺-N) 浓度;钼锑抗分光光度法测定溶液中正磷酸盐 (PO₄³⁻-P) 浓度。不同水质指标去除率 (RE, %) 以及日平均去除效率 (ARR, mg·L⁻¹d⁻¹) 分别按照公式 (4) 和 (5) 如下:

$$RE = \left(1 - \frac{C_1}{C_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

$$ARR = \frac{C_0 - C_1}{t_1 - t_0} \quad (5)$$

式中: C_0 为初始浓度, mg·L⁻¹; C_1 为时间 t_1 (d) 时的浓度, mg·L⁻¹。

按照公式 (6) 计算微藻对溶液氮磷的吸收比例,吸收氮磷比 (N/P uptake Ratio):

$$N/P_{UP} = \frac{(C_{N0} - C_{N1}) \times 31}{(C_{P0} - C_{P1}) \times 14} \quad (6)$$

式中: 14、31 分别为氮、磷元素摩尔质量, C_{N0} 、 C_{P0} 、 C_{N1} 、 C_{P1} 分别指 t_0 和 t_1 时刻的氮磷浓度, mg·L⁻¹。

1.4.4 色素测定

光合色素叶绿素 a (Chl a)、叶绿素 b (Chl b)、类胡萝卜素 (Car) 的测定依据《植物生理生化实验原理和技术》(第 2 版)^[23]。取一定量样品 (V mL) 于 6000 rpm 下离心 10 min,除去上清液,用蒸馏水冲洗,再次离心去除上清液,加入等量 95% 乙醇 (V mL) 并在 4°C 下静置萃取至藻体呈白色,置于紫外-可见光分光光度计内,以 95% 乙醇标定,分别测定波长 665 nm、649 nm 和 470 nm 的吸光度值,按照公式 (7)、(8)、(9) 和 (10) 分别计算叶绿 a、叶绿素 b、类胡萝卜素和总叶绿素 (Chl T) 浓度,计算公式如下:

$$Chl a = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649} \quad (7)$$

$$Chl b = 24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665} \quad (8)$$

$$Car = (1000 \times A_{470} - 2.05 \times Chl a - 114.8 \times Chl b) / 245 \quad (9)$$

$$Chl T = Chl a + Chl b \quad (10)$$

式中: Chl a 表示叶绿素 a 的浓度, mg·L⁻¹; Chl b 表示叶绿素 b 的浓度, mg·L⁻¹; Car 表示类胡萝卜素的浓度, mg·L⁻¹; Chl T 表示总叶绿素浓度, mg·L⁻¹。A₆₆₅、A₆₄₉、A₄₇₀ 分别表示波长为 665 nm、649 nm 和 470 nm 时的吸光度值。

1.4.5 动力学

对微藻的生长采用修正的 Gompertz 模型进行拟合,方程如下:

$$X = Ae^{-e^{-k(t-t_d)}} \quad (11)$$

$$\mu_{max} = \frac{A \times k}{e}; \lambda = t_c - \frac{1}{k} \quad (12)$$

式中: X 为 t 时刻生物量, mg·L⁻¹; A 为最高生物量, mg·L⁻¹; t_c 为达到相对最高生长速率所需时间, d; k 为 t_c 时刻的相对生长速率, d⁻¹; μ_{max} 为最大比生长速率, d⁻¹; λ 为迟滞期, d。

微藻对于氮磷的养分去除采用一级动力学进行拟合,其模型为:

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -kt + a \quad (13)$$

式中: C_t 为时间 t 时刻的氮磷浓度 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; C_0 为初始氮磷浓度 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; t 为时间 d ; k 为反应速率常数 ($k > 0$) d^{-1} ; a 为常数。

1.4.6 数据处理

试验结果以平均值 \pm 标准差形式呈现。使用 Origin2018 和 Excel2016 进行数据分析及制表绘图。

2 结果与分析

2.1 微藻生物量累积与生长特性

不同培养条件下小球藻的生长情况及生长曲线拟合见图 2~6 所示。以高氨氮含量的 RO 清液作为培养基, 小球藻不仅能够快速适应废水环境, 具有较短的迟滞期, 且能够借助废水中提供的养分以获取较高生物量。由图 2~图 6 可知, 在 CO_2 浓度为 7.5%、氮磷 = 80 时, 小球藻可取得最高生物量, 为 $3.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Kayla^[24] 利用超滤后的食品垃圾厌氧消化液培养 4 种微藻, 最高生物量为 $1.096 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本研究与上述研究结果相比, 所使用的废水中氨氮浓度更高, 获得的生物量也较高, 说明 RO 清液是培养小球藻的较好原料。

图 2~图 6 表明, 不同 CO_2 浓度下, 获得的小球藻最高生物量时, 最佳 N/P 不同: 当 CO_2 浓度为 2.5%、5.0%、7.5% 时, 最佳 N/P 为 80; 而当 CO_2 浓度为 0.03% 和 10% 时, 小球藻的最高浓度则分别在 N/P = 45 与 260 获得。另外, 各组生物量整体呈现出随 CO_2 浓度增加而先增加后降低的趋势。当 CO_2 浓度为 7.5% 时, N/P 为 45、80、115 组的生物量分别可以达到 3.23 、 3.38 、 $3.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别比 2.5% CO_2 组 (微藻培养常用 CO_2 浓度组) 提高了 40.43%、20.28% 和 43.22%。而当进一步提升 CO_2 浓度至 10% 后, 同一 N/P 组相比, 小球藻生长优势不显著。此外, 由图 2~6 和表 1 可知, 在同一 CO_2 浓度下, 不同 N/P 之间的生长速率 (斜率) 与比生长速率基本一致, 且同样表现出随 CO_2 浓度提高呈现出而先升高后降低的变化趋势; CO_2 浓度 = 7.5% 时, 小球藻比生长速率与日生产率几乎获得最高值, 分别为 $0.33 \sim 0.37 \text{ d}^{-1}$ 与 $73 \sim 158 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$, 比 $\text{CO}_2 = 0.03\%$ 组对应数据分别提高了 33%~56.8% 与 20%~59.2%。

上述研究结果与前人的研究结果相似^[25-26], 即低浓度 CO_2 不能满足小球藻的生长需要, 成为主要的限制因素, 当 CO_2 浓度升高, 增加了溶液中游离的 CO_2 以及无机碳浓度可以促进小球藻生长。此

外微藻活跃的 photosynthesis 会导致溶液 pH 值逐渐增高。向小球藻培养液内通入适宜浓度的 CO_2 气体

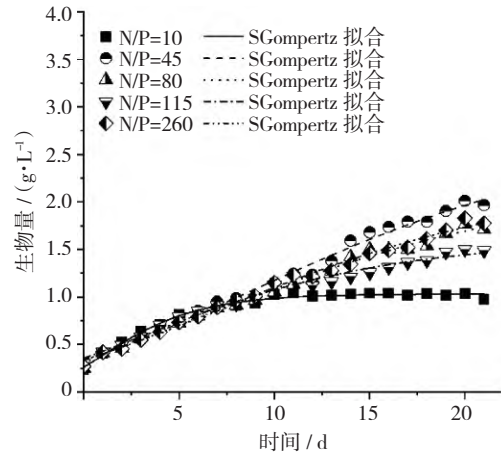


图 2 $\text{CO}_2 = 0.03\%$ 浓度及 N/P 条件下小球藻生长曲线及其拟合曲线

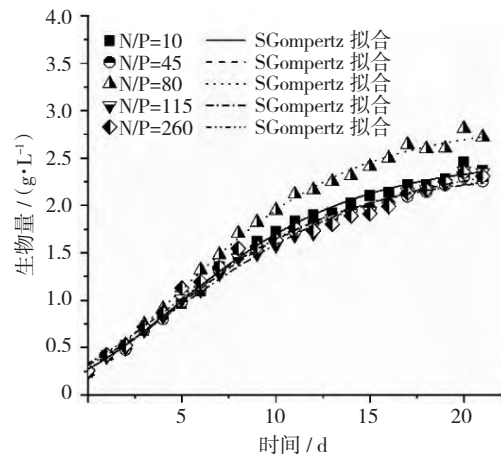


图 3 $\text{CO}_2 = 2.5\%$ 浓度及 N/P 条件下小球藻生长曲线及其拟合曲线

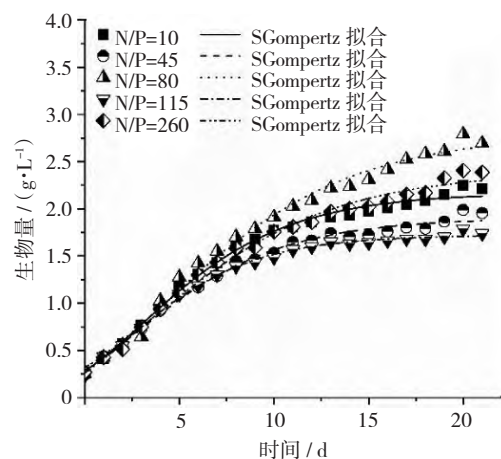


图 4 $\text{CO}_2 = 5\%$ 浓度及 N/P 条件下小球藻生长曲线及其拟合曲线

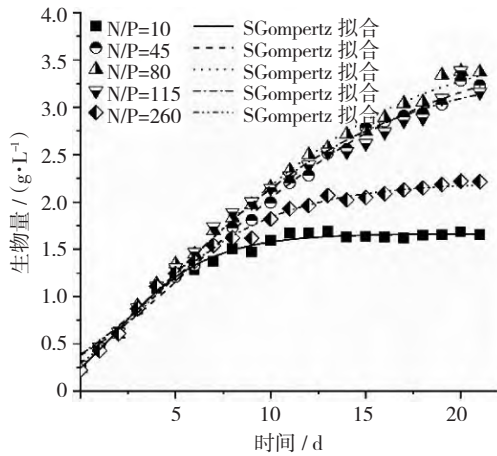


图5 $\text{CO}_2 = 7.5\%$ 浓度及 N/P 条件下
小球藻生长曲线及其拟合曲线

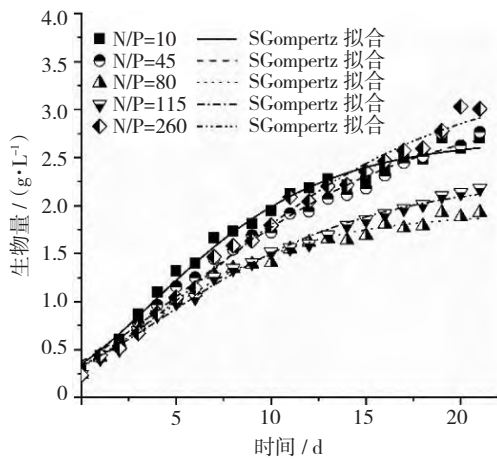


图6 $\text{CO}_2 = 10\%$ 浓度及 N/P 条件下
小球藻生长曲线及其拟合曲线

不仅能够提供充足的碳源,同时可以使得溶液 pH 值维持在小球藻适宜生长的范围^[11],使得各种关键酶如核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)、碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase, CA)等保持较高生物活性,促进生物量积累;而进一步提升 CO_2 浓度将导致培养基酸化,抑制小球藻的生长。

不同 N/P 使得小球藻生长的最佳 CO_2 浓度也有所不同。当 CO_2 浓度低于 7.5% 时, N/P 对小球藻生物量的影响整体呈现出先增加后降低的趋势。当 N/P 为 45、80、115 时,均在 CO_2 浓度 7.5% 处取得最高生物量;而 N/P 为 10 和 260 时,则均在 10% 处取得最高值。高 N/P 意味着相对较低的磷浓度,进而影响小球藻生长。此条件下,小球藻可以提高某些酶活性以破坏细胞内含磷分子结构,进而补偿

其磷需求。如磷饥饿条件下微藻胞内磷酸二酯酶活性升高,破坏核酸和磷脂等化合物中的磷酸二酯键^[27],导致脂质的积累和叶绿体及其膜器(类囊体系统)的减少,以至于影响微藻光合作用,限制微藻的生长^[28];而提高光照强度以及 CO_2 浓度有助于改善这一情况^[29],故而在本研究中,当 N/P = 260 时,10% 的 CO_2 浓度更有利于生物量累积。当 N/P 较低即环境中磷浓度过高时,同样不利于微藻生长。Xing^[16] 等研究结果表明,当磷浓度大 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,微藻的生长便开始受到抑制。若提高 CO_2 的浓度,则可增加碳源,有可能会通过改善系统中 C/N/P 比,促进微藻生长。本研究中, N/P = 10 和 45 组对应磷浓度分别可达 78.29 ± 3.33 、 $12.25 \pm 1.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,此时 10% 的 CO_2 体积浓度下获得了最高生物量。

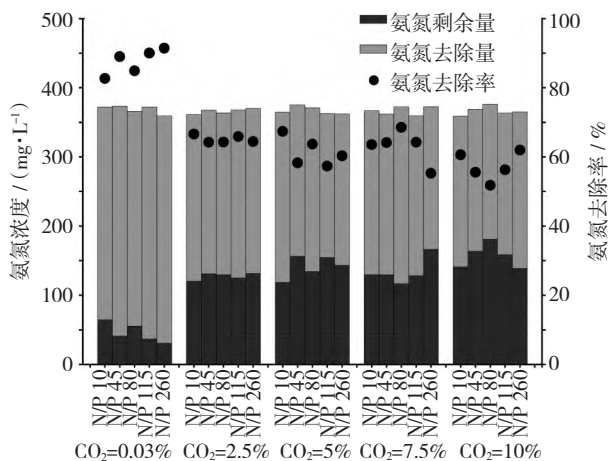
修正的 Gompertz 模型已被广泛应用于微藻生物量预测^[30],由表 1 可以看出不同条件下 Gompertz 模型参数的变化,各拟合曲线 R^2 均大于 0.98,最高生物量与实际值相吻合,拟合最大比生长速率同样表现出随 CO_2 浓度升高呈现先提高后降低的趋势,但整体低于实际值。而由于各处理组的小球藻在生长过程中并没有表现出明显的迟滞期,使得模型拟合所得 λ 值均为负数,因此也提示需要进一步优化该模型。

2.2 废水中氮磷去除率

由图 7 可知,培养 20 d 后,除不额外添加 CO_2 组外, CO_2 浓度为 7.5%, N/P = 80 时,可获得最高氨氮去除率(68.6%)。Jiang^[31] 等使用氨氮作为唯一氮源的 BG-11 培养基培养小球藻,设置 5 个氨氮浓度(50、120、240、360、500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 5 个 pH 值(6.5、7.5、8.5、9.5) 水平,结果表明,在氨氮浓度为 360 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 值为 7.5 时,氨氮最高除率仅为 $72.7\% \pm 2.16\%$,与本研究结果相似。同一 CO_2 浓度下氨氮浓度的变化趋势与生物量变化一致,表明去除的氨氮极有可能被小球藻吸收利用,转化为生物质而固定下来。而不额外添加 CO_2 ($\text{CO}_2 = 0.03\%$) 处理组中氨氮去除率($87.62\% \pm 3.68\%$) 整体上要显著高于额外添加 CO_2 组。微藻光合作用对 CO_2 的固定使得溶液中 OH^- 累积,导致 pH 值逐渐上升;在没有额外的 CO_2 供应下, pH 值会持续升高,RO 清液中氨态氮在碱性条件下可转化为游离 NH_3 ,此时氨氮的去除实际上为微藻生物量同化与游离 NH_3 逸散共同所致^[31]。

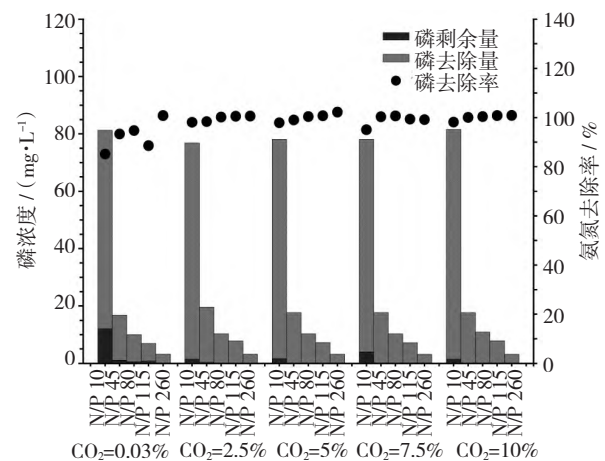
表1 不同 CO₂ 浓度及 N/P 条件下小球藻生长特性及其拟合参数

CO ₂ (% v/v)	N/P	日生产率 (mg·L ⁻¹ d ⁻¹)	μ _{max} (d ⁻¹)	SGompertz 模型参数					
				A/(g·L ⁻¹)	t _c /d	k/(d ⁻¹)	μ _{max} /(d ⁻¹)	λ/d	R ²
0.03	10	41	0.22	1.03	0.91	0.33	0.13	-2.12	0.987
	45	89	0.20	2.86	8.64	0.09	0.09	-2.47	0.988
	80	77	0.19	2.24	6.68	0.09	0.07	-4.43	0.990
	115	64	0.18	1.61	3.10	0.13	0.08	-4.59	0.983
	260	80	0.16	2.33	6.92	0.09	0.08	-4.19	0.993
2.5	10	112	0.25	2.49	4.51	0.18	0.16	-1.05	0.996
	45	103	0.28	2.35	4.29	0.18	0.16	-1.27	0.996
	80	129	0.31	2.87	4.71	0.18	0.19	-0.85	0.997
	115	107	0.28	2.49	4.75	0.15	0.14	-1.92	0.992
	260	106	0.28	2.38	4.02	0.17	0.15	-1.86	0.985
5	10	101	0.31	2.17	3.14	0.23	0.18	-1.21	0.993
	45	88	0.27	1.90	2.80	0.23	0.16	-1.55	0.990
	80	129	0.37	2.80	4.39	0.18	0.19	-1.17	0.989
	115	77	0.27	1.72	2.35	0.27	0.17	-1.35	0.996
	260	109	0.31	2.40	3.84	0.18	0.16	-1.72	0.990
7.5	10	73	0.33	1.66	1.81	0.36	0.22	-0.97	0.992
	45	153	0.34	3.69	6.11	0.13	0.18	-1.58	0.995
	80	158	0.37	3.73	5.72	0.14	0.19	-1.42	0.993
	115	157	0.34	3.42	5.08	0.15	0.19	-1.59	0.988
	260	100	0.37	2.21	2.92	0.24	0.20	-1.25	0.993
10	10	130	0.36	2.70	3.79	0.19	0.19	-1.47	0.989
	45	133	0.33	3.02	5.40	0.14	0.16	-1.74	0.988
	80	83	0.29	1.92	3.03	0.20	0.14	-1.97	0.990
	115	95	0.29	2.29	4.36	0.15	0.13	-2.31	0.993
	260	140	0.27	3.39	6.46	0.13	0.16	-1.23	0.990

图7 20 d时不同 CO₂ 及 N/P 条件下氨氮去除率

另外,由图8可知,额外添加 CO₂ 的各处理组基本可将溶液中的磷全部去除 (>98%),而在没有额外添加 CO₂ 的处理组中,磷的去除率仍然85%。微藻对废水中磷的直接去除能力不仅与磷浓度有关,还与 N/P 比有关^[28]。由表2可知,微藻能根据溶液的 N/P 调节自身氮磷吸收比例。本研究

中,各条件下小球藻对氨氮的吸收速率相差不大,而在低 N/P(高磷浓度, N/P=10)下,小球藻对废水中磷的吸收速率最高可以达到 6.0 mg·L⁻¹d⁻¹,高 N/P 比(低磷浓度, N/P=260)下,磷最高吸收速率仅为 0.6 mg·L⁻¹d⁻¹。这是因为在氮充足的情况下,微藻主要通过干预磷的吸收来调节比例^[32],同时小

图8 20 d时不同 CO₂ 及 N/P 条件下磷去除率

球藻可以通过“奢侈吸收”将溶液中多余的磷储存于体内。此外, Hu^[33]等持续向培养基中添加磷,使得栅藻在高磷浓度下生长,发现藻细胞可持续吸收磷,但对生物量的生产力并没有刺激作用。Taufikurahman^[34]等利用奶牛粪便厌氧消化液($\text{PO}_4\text{-P}$: $26.72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{NH}_4\text{-N}$: $4.48 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)培养小球藻,最终溶液中 $\text{PO}_4\text{-P}$ 与 $\text{NH}_4\text{-N}$ 去除率分别为 45.95% 与 78.24%。

2.3 色素浓度

微藻色素具有较高的应用价值,具有抗氧化、预防早期动脉粥样硬化、增强免疫力、抗病毒等功效,可应用于食品、医药和化妆品等行业^[2-3]。图 9 和 10 为小球藻在不同条件下,叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素的浓度。结果表明,最终小球藻在 CO_2 浓度为 7.5%, $\text{N/P}=80$ 的条件下,获得最高总叶绿素浓度,为 $30.78 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,其中,叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素的浓度分别为 22.73 、 8.05 与 $8.19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;较之培养小球藻的常用条件(即 CO_2 浓度为 2.5%, $\text{N/P}=45$),上述 3 种色素浓度分别对应高出 22.26%、23.98%、19.05%。本研究中,各处理组的叶绿素变化趋势与生物量相似,因此部分研究中也叶绿素作为反应生物量的指标,但这在一定程度上会受氮磷浓度的影响,即低磷胁迫下微藻细胞分裂会受到抑制,导致光合作用下调、蛋白质和叶绿素合成受限。王昭玉^[35]等探究了在磷限制条件下 7 种海洋微藻光系统 II 的最大光化学量子产量(F_v/F_m)变化情况。研究发现,缺磷条件下,7 株海洋微藻 F_v/F_m 均显著下降,随着限制性营养盐的重新添加,各微藻的 F_v/F_m 在 24 h 之内均明显升高($p < 0.05$),18 h ~ 72 h 之内恢复到营养盐充足时的水平。Rocha^[36]等评估了磷有效性对纤细月牙藻生化成分的影响,研究发现细胞干重、叶绿素、碳水化合物、脂质等均随磷浓度降低而降低。本研究中 CO_2 浓度 7.5%、 $\text{N/P}=115$ 组生物量较高,但由于磷浓度较低,致使总叶绿素、类胡萝卜素浓度比 $\text{N/P}=45$ 和 80 两组分别低 22.86%、30.43% 和 23.13%、24.91% ($p < 0.05$)。Taufikurahman^[34]等利用奶牛粪便厌氧消化液培养小球藻,最终获得的叶绿素 a、叶绿素 b 含量仅为 34.62 、 $9.82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与之相比较,利用鸡粪沼液膜过滤出水作为小球藻培养基可获取更高的色素浓度。

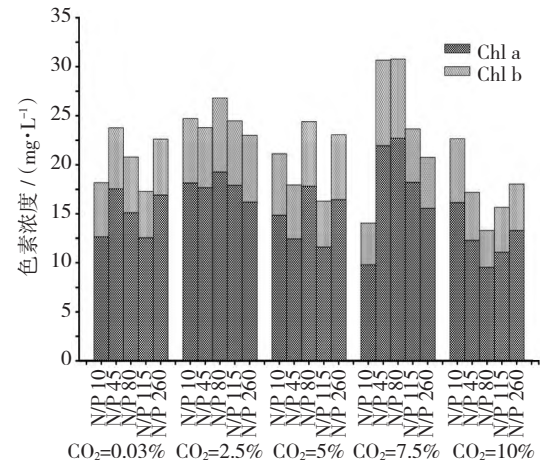


图 9 不同 CO_2 浓度及 N/P 条件下小球藻中叶绿素 a、叶绿素 b 浓度

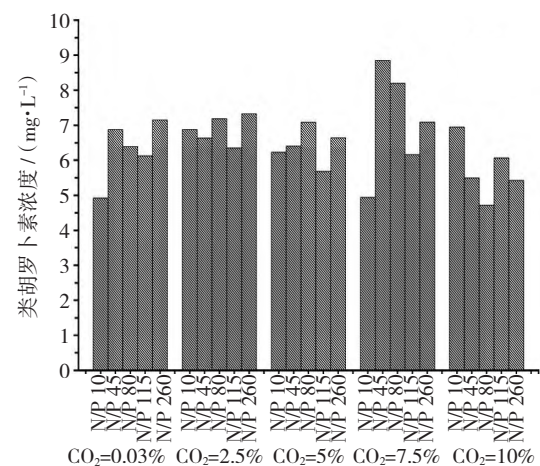


图 10 不同 CO_2 浓度及 N/P 条件下小球藻中类胡萝卜素浓度

2.4 动力学

一级动力学模型广泛应用于微藻对污染物去除的预测^[31, 37-38]。在本研究中运用一级动力学模型,结合所测得的氨氮、磷浓度实验数据,用于描述废水中氮磷元素去除情况。由表 3 可知,小球藻对废水中氨氮(R^2 : $0.92 \sim 0.98$)、磷(R^2 : $0.77 \sim 0.99$)的去除符合一级动力学模型中的 k 值反应了小球藻的对氮磷等元素去除的反应速率。与前期观察到的结果相似,额外添加 CO_2 的各处理组之间 k 值差异不显著,这是因为微藻对氨氮的去除主要受氨氮浓度的影响,即反应速率随氨氮浓度的增加而降低^[31]。而磷去除反应速率则与 N/P 呈现出了明显的相关性,即其随 N/P 升高而提高,这要是由于 N/P 的增加造成了溶液磷浓度降低,从而加速了微藻对磷的吸收^[39](见表 2)。

表2 废水中氮磷去除动力学模型

$\frac{\text{CO}_2}{\%}$	废水 N/P	吸收 N/P	ARR-N	ARR-P	氮氮去除动力学			磷去除动力学		
					k	a	R ²	k	a	R ²
0.03	10	8	22.3	6.0	0.09	0.06	0.97	0.11	—	0.96
	45	32	23.5	1.6	0.11	0.17	0.95	0.15	-0.03	0.94
	80	34	21.4	1.1	0.10	0.13	0.97	0.20	0.08	0.99
	115	43	22.2	1.0	0.11	0.21	0.92	0.15	-0.26	0.79
	260	74	22.3	0.5	0.12	0.24	0.92	0.50	0.35	0.89
2.5	10	8	20.2	5.7	0.06	-0.03	0.95	0.22	0.46	0.94
	45	13	16.4	2.6	0.05	-0.02	0.97	0.28	-0.10	0.96
	80	49	19.3	1.4	0.05	-0.03	0.96	0.36	0.32	0.91
	115	30	15.7	1.2	0.05	—	0.98	0.51	0.33	0.98
	260	70	18.4	0.6	0.05	—	0.96	0.50	0.25	0.95
5	10	7	18.8	5.7	0.06	-0.04	0.97	0.23	0.44	0.94
	45	17	15.4	2.1	0.04	-0.05	0.97	0.27	0.07	0.96
	80	35	16.3	1.5	0.05	-0.01	0.99	0.24	-0.06	0.90
	115	27	15.9	1.2	0.04	-0.02	0.95	0.47	0.48	0.95
	260	69	14.5	0.5	0.05	—	0.97	0.49	0.08	0.97
7.5	10	8	19.7	5.6	0.05	-0.04	0.95	0.16	0.24	0.98
	45	21	17.8	1.9	0.05	-0.06	0.94	0.30	-0.13	0.91
	80	31	20.4	1.6	0.06	-0.04	0.96	0.48	0.48	0.91
	115	31	17.8	1.1	0.05	-0.02	0.96	0.40	0.23	0.98
	260	65	16.0	0.5	0.04	-0.02	0.97	0.45	-0.06	0.97
10	10	7	18.2	5.6	0.05	-0.05	0.96	0.23	0.46	0.94
	45	14	16.7	2.4	0.04	-0.07	0.95	0.29	0.10	0.95
	80	23	15.7	1.4	0.04	-0.05	0.96	0.27	0.07	0.94
	115	30	15.8	1.1	0.04	-0.02	0.97	0.27	-0.03	0.91
	260	69	12.8	0.5	0.05	0.01	0.98	0.68	0.37	0.77

3 结论

(1) 采用鸡粪沼液膜过滤出水作为小球藻培养基, 溶液中原生生物少, 色度、浊度低; 培养微藻无需过多预处理, 具有一定优势。

(2) 在 CO_2 浓度为 7.5%, $\text{N/P} = 80$ 的条件下, 小球藻获得最高生物量为 $3.38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 最高总叶绿素浓度为 $30.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氮氮去除率为 68.6%, 相较于 $\text{N/P} = 10$ 、45, $\text{N/P} = 80$ 的条件下不仅有较高的生物量同时能够减少营养物投入, 具有一定经济效益。

(3) 小球藻在鸡粪沼液中的生长符合修正的 Gompert 模型。小球藻的最大比生长速率随着 CO_2 浓度的升高而先升高后降低, 而较低的氮磷比缩短了小球藻达到相对最高生长速率所需时间。

(4) 小球藻对鸡粪沼液中氮、磷的降解符合一级动力学模型。其中小球藻对氮氮的吸收速率受溶液氮磷比以及 CO_2 浓度的影响较小, 对磷的吸收速率主要受溶液氮磷比的影响且随着氮磷比增加而升

高。

参考文献:

- [1] Cheng F, Jarvis J M, Yu J, et al. Bio-crude oil from hydrothermal liquefaction of wastewater microalgae in a pilot-scale continuous flow reactor[J]. *Bioresource Technology* 2019 294: 122184.
- [2] Riccio G, Lauritano C. Microalgae with Immunomodulatory Activities[J]. *Marine Drugs* 2020 18(1): 2.
- [3] Ramaraj S, Jang-Seu K. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries[J]. *Marine Drugs*, 2018 16(1): 1856–1865.
- [4] Golueke C G, Oswald W J. Biological Conversion of Light Energy to the Chemical Energy of Methane [J]. *Applied Microbiology*, 1959, 7(4): 219.
- [5] Zhou W G, Rongsheng R. Biological mitigation of carbon dioxide via microalgae: Recent development and future direction[J]. *entia Sinica* 2014 44(1): 63–78.
- [6] Mousavi S, Najafpour G D, Mohammadi M et al. Cultiva-

- tion of newly isolated microalgae *Coelastrum* sp. in wastewater for simultaneous CO₂ fixation, lipid production and wastewater treatment [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2018 41(4): 1–12.
- [7] Nayak M, Karemora A, Sen R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application [J]. *Algal Research* 2016 16: 216–223.
- [8] Ghosh A, Sarkar S, Gayen K et al. Effects of carbon, nitrogen, and phosphorus supplements on growth and biochemical composition of *Podohedriella* sp. (MCC44) isolated from northeast India [J]. *Environmental Progress Sustainable Energy* 2020 39(4): e13378.
- [9] 刘锦上, 萧铭明, 黄翔鹤, 等. CO₂ 体积浓度对酒精废水培养微藻及其净化效果的影响 [J]. *渔业现代化*, 2020 47(02): 42–51.
- [10] Liu X, Ying K, Chen G, et al. Growth of *Chlorella vulgaris* and nutrient removal in the wastewater in response to intermittent carbon dioxide [J]. *Chemosphere*, 2017: 977.
- [11] Fan J, Xu H, Luo Y, et al. Impacts of CO₂ concentration on growth, lipid accumulation, and carbon-concentrating-mechanism-related gene expression in oleaginous *Chlorella* [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2015, 99(5): 2451–2462.
- [12] An M, Gao L, Zhao W, et al. Effects of Nitrogen Forms and Supply Mode on Lipid Production of Microalga *Scenedesmus obliquus* [J]. *Energies* 2020 13(3): 697.
- [13] Li S, Song C, Li M, et al. Effect of different nitrogen ratio on the performance of CO₂ absorption and microalgae conversion (CAMC) hybrid system [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 306: 123126.
- [14] Krichen E, Rapaport A, Floc H E L, et al. Demonstration of facilitation between microalgae to face environmental stress [J]. *Scientific Reports*, 2019, 10(1): 1–11.
- [15] Beuckels A, Smolders E, Muylaert K. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment [J]. *Water Research*, 2015, 77: 98–106.
- [16] Xing Y, Guo L, Wang Y, et al. An insight into the phosphorus distribution in extracellular and intracellular cell of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation [J]. *Algal Research* 2021 60: 102482.
- [17] Marcilhac C, Sialve B, Pourcher A M, et al. Control of nitrogen behaviour by phosphate concentration during microalgal-bacterial cultivation using digestate [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 175: 224–230.
- [18] Junzhuo, Liu, Wim, et al. Differences in nutrient uptake capacity of the benthic filamentous algae *Cladophora* sp., *Klebsormidium* sp. and *Pseudanabaena* sp. under varying N/P conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 234–242.
- [19] Rasdi N W, Qin J G. Effect of N: P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(6): 2221–2230.
- [20] 蔡敬, 赵陆敏, 黄旭雄, 等. 不同氮磷比条件下绿球藻对猪场污水的净化效率 [J]. *环境科学学报*, 2017, 37(010): 3696–3701.
- [21] Mayers J J, Flynn K J, Shields R J. Influence of the N: P supply ratio on biomass productivity and time-resolved changes in elemental and bulk biochemical composition of *Nannochloropsis* sp [J]. *Bioresource technology*, 2014, 169: 588–95.
- [22] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社 2002.
- [23] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社 2006.
- [24] Rude K, Yothers C, Barzee T J, et al. Growth potential of microalgae on ammonia-rich anaerobic digester effluent for wastewater remediation [J]. *Algal Research*, 2022, 62: 102613.
- [25] Gifuni I, Olivieri G, Pollio A et al. Identification of an industrial microalgal strain for starch production in biorefinery context: The effect of nitrogen and carbon concentration on starch accumulation [J]. *New Biotechnology*, 2018 41: 46–54.
- [26] Li C T, Trigani K, Zuiga C, et al. Examining the impact of carbon dioxide levels and modulation of resulting hydrogen peroxide in *Chlorella vulgaris* [J]. *Algal Research*, 2021 60: 102492.
- [27] Dyrhman S T. Nutrients and Their Acquisition: Phosphorus Physiology in Microalgae [J]. Springer International Publishing 2016 6: 155–183.
- [28] Solovchenko A, Khozin-Goldberg I, Selyakh I, et al. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited [J]. *Algal Research*, 2019, 43: 101651.
- [29] Kozowska Szerenos B, Bialuk I, Maleszewski S. Enhancement of photosynthetic O₂ evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO₂ concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency-ScienceDirect [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(5): 403–409.

- [30] Sousa C A , Sousa H , Vale F , et al. Microalgae-based bioremediation of wastewaters—Influencing parameters and mathematical growth modelling [J]. *Chemical Engineering Journal* ,2021 ,425: 131412.
- [31] Jiang R , Qin L , Feng S , et al. The joint effect of ammonium and pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and ammonium removal in artificial liquid digestate [J]. *Biore-source Technology* ,2021 ,325(1) : 124690.
- [32] Khazada Z T. Phosphorus Removal from Landfill Leachate by Microalgae [J]. *Biotechnology Reports* ,2020 , 25: e00419.
- [33] Wu Y H , Yin Y , Li X , et al. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition [J]. *Bioresource Technology* ,2012 , 112(none) : 193 –8.
- [34] Taufikurahman T , Suyono E A , Ardiansyah M A , et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Anaerobically Digested Dairy Manure Wastewater (ADDMW) for Protein and Chlorophyll Production [J]. *Sains Malaysiana* ,2020 ,49 (9) : 2035 –42.
- [35] 王昭玉 ,王江涛. 7 种海洋微藻叶绿素荧光对 N,P 限制的响应[J]. *海洋环境科学* 2013 ,32(2) : 6.
- [36] Rocha , Giseli , Swerts , et al. Biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Chlorophyceae) acclimated to different phosphorus concentrations [J]. *Journal of Applied Phycology* , 2018 ,30 (4) : 2167 – 2177.
- [37] Luo L Z , Shao Y , Luo S , et al. Nutrient removal from piggery wastewater by *Desmodesmus* sp. CHX1 and its cultivation conditions optimization [J]. *Environmental Technology* ,2019 40(21) : 2739 – 3746.
- [38] Xu P , Ma W , Han H , et al. Biodegradation and Interaction of Quinoline and Glucose in Dual Substrates System [J]. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* , 2015 ,94(3) : 365 – 369.
- [39] Ala B , Lm A , Tj A. Microalgae starvation for enhanced phosphorus uptake from municipal wastewater [J]. *Algal Research* ,2020 52: 102090.