

耐氮四尾栅藻在甲烷发酵流出液中的 生长及氮磷的脱除

官崎龍雄* 王选良** 原慶明* 前川孝昭*

(* 筑波大学, 日本茨城县)

(** 大连轻工业学院, 大连)

检查了耐氮四尾栅藻 (*Scenedesmus quadricauda*) 在甲烷发酵流出液中的生长情况。结果表明, 该绿藻在 1% 和 10% 流出液中生长良好, 而在 20% 流出液中不生长。在 1% 流出液中添加 $0 \pm 28 \text{ mM}$ 氨, 不影响该绿藻的生长速度常数, 也不影响对数生长期的光合活力。10% 流出液中的光合活力降低, 但仍比得上 1% 流出液的活力。从电子显微图中看到, 在不加氨 1% 流出液中生长的细胞, 其淀粉颗粒很明显, 并且随着加氨量的增加而变小。在 10% 流出液中生长的细胞的淀粉颗粒小, 而且细胞膨胀, 但是其叶绿体膜系统发育良好。这就是说, 虽然在形态学上发生了变化, 但是该绿藻在 1% 及 10% 流出液中的生长和生理学上, 却没有什么变化。该绿藻在 1% 和 10% 流出液中, 排除氨氮和磷酸磷的百分数, 前者分别为 99.7% 和 73.8%, 后者分别为 78.0% 和 62.8%。上述排除效率说明四尾栅藻可以用于家畜粪便甲烷发酵流出液的处理。

关键词 绿藻; 四尾栅藻; 流出液

应用甲烷发酵进行多种生物粪便的能量再生和粪便处理, 已为人所共知。关于甲烷发酵的最新进展, 有两个方面: 一是如何增加消化气体的产量, 二是如何更方便地应用于家畜粪便的发酵处理^[1]。但是, 甲烷发酵系统的流出液中含有高浓度的氨和磷酸。因此, 工厂规模的甲烷发酵系统, 必需脱除其中的氨和磷酸, 以保证环境的净化。可以利用细菌、高等植物和藻类来排除氨和磷酸。例如, 有人曾用红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas*) 作过这种脱除试验^[2]。光合细菌的脱除作用效率是比较高的。但是这类细菌的生长, 需要有机化合物作碳源。高等植物凤眼蓝 (*Eichhornia crassipes*) 的脱除试验表明, 该植物具有有效地脱除氨和磷酸的能力^[3]。大多数藻类的脱除试验表明, 在高浓度流出液中生长不良, 脱除效率也

低^[4]。如果能够找到在高浓度流出液中生长良好的藻类, 那末这种藻类就可以用来处理流出液。

在本研究中, 我们检查了耐氮绿藻 *S. quadricauda* 的生长及其脱除氨和磷酸的能力, 并且进一步讨论了将该绿藻用于处理流出液的可能性。

材料和方法

(一) 材料

耐氮绿藻四尾栅藻 (*S. quadricauda*) 是从甲烷发酵流出液贮池中分离到的。该株维持在 Bold 基础培养基^[5]中, 温度 20°C, 14L:10D 以下的光照条件。

本文于 1986 年 7 月 11 日收到。

本研究, 部分承蒙日本农林水产省拨款的支持。

Y. Ogawa 博士在光合测定中给予帮助, 特此致谢。

(二) 培养和检查

用猪粪便甲烷发酵流出液培养四尾栅藻时，流出液在 $11000 \times g$ ，离心10min，取上清液稀释到预定浓度备用。氯化铵、磷酸二氢钾按表1的数量添加。光源为日光灯，14L:10D，在温为 20°C 的条件下进行培养。

表1 四尾栅藻生长用培养基

Table 1 Media used for growth of *S. quadricauda*

| 试样 Sample No. | 流出液的浓度 Concentration of effluents (%) | 添加 KH_2PO_4 Added KH_2PO_4 (mM) | 添加 NH_4Cl Added NH_4Cl (mM) |
|---------------------|--|--|--|
| 1 | 1 | 144 | 0 |
| 2 | 1 | 144 | 4.7 |
| 3 | 1 | 144 | 9.3 |
| 4 | 1 | 144 | 18.7 |
| 5 | 1 | 144 | 28.0 |
| 6 | 10 | 144 | 0 |

生长检查：先用戊二醛（最终浓度10%）固定，然后在显微镜下做藻类细胞的细胞计数。

(三) 光合成活力的测定

用 ^{14}C 法测定。先把5ml包括藻类细胞在内的培养基注入30ml含有 KH_2PO_4 ($144\mu\text{M}$) 的1%流出液中。再向试样加 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (0.3ml 具有 $5\mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$)，然后将样品在一定光度下于 20°C 保温2h。保温之后用0.2ml 35%的甲醛中止生物活性，样品通过膜过滤器 (Milipore HA, $25\text{mm} \Phi$)，再使过滤面接触 HCl 气，然后用液闪计数器测量放射性。

(四) 电子显微镜学方法

样品在 $1700 \times g$ 离心2.5min，再用2.5%戊二醛溶液固定1h，用0.2M磷酸盐进行缓冲 (pH 7.4)。样品再置2% OsO_4 的磷酸缓冲液中，于 4°C ，后固定3—4h。固定后的材料通过50—100%

乙醇系列，进行脱水处理。然后用 Epon 812树脂包埋^[6]。超薄切片是在LKB Ultratome 2088超薄切片机上用金刚石刀切割的。后染色用醋酸双氧铀处理1h，再用柠檬酸铅处理10min。所得标本用电子显微镜 (JEM-100C, JOEL) 在80kV加速电压下进行检查。

(五) 氨和磷酸的测定

氨用Saji氏的方法测定^[7]。磷酸态磷用Murphy-Riley方法测定^[8]。

结 果

(一) 四尾栅藻 (*S. quadricauda*)

的生长

图1表示四尾栅藻在流出液中的生长。生长延滞期随1%流出液培养基 (添

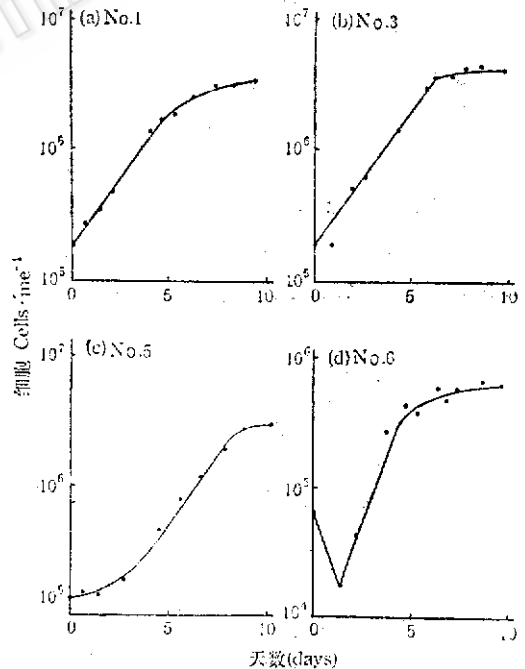


图1 四尾栅藻在甲烷发酵流出液中的生长
Fig.1 Growth of *S. quadricauda* in methane fermentation effluents

图中的序号与表1的一致
The number in the figures corresponds to that in table 1

加 NH_4Cl 0—28mM, 表1的No. 1—5) 中氨浓度的增加而延长。但是, 生长对数期的比例常数 ($K = 0.66—0.79$ 1/天; K 由方程式 $N = N_0 \times 2^{Kt}$ 求得) 以及静止期的最终细胞浓度 ($2—3 \times 10^6$ 细胞/ml) 与氨浓度的差异无关。

在10%流出液培养基(表1的No. 6) 中, 开始时生长曲线下倾一些, 而后增长。对数期的生长常数 (2.03 1/天) 大于在1%流出液中所取得的数值。最终细胞浓度 (1×10^6 细胞/ml) 则低于1%流出液(图1b)的数值。

四尾栅藻在20%流出液中不生长。

(二) 光合作用活性

我们测定了第3天和第9天的光合作用活性。第3天的光合作用活性, 对于生长在不同氨浓度的1%流出液中的细胞来说, 几乎是相同的(图2a)。当光强度低于 $50\text{J/m}^2 \cdot \text{sec}$ 时, 光合作用活性呈直线性增长。当光强度为 $50\text{J/m}^2 \cdot \text{sec}$ 时, 光合作用活性达到平衡, 饱和光合作用活性为 $3.5—4.1\text{mg}$ 碳/ mg 叶绿素 $\cdot \text{h}$ 。第9天, 生长在含9.3 (图2b的No. 3) 和 28.0mM NH_4Cl (图2b中的5) 的1%流出液中的藻细胞光合作用活性, 表现出类似于第3天的形式。生长在不加 NH_4Cl (No. 1) 的1%流出液中的细胞, 其光合作用活性降低。生长在10%流出液 (No. 6) 中的细胞, 其光合作用活性低于其他样品(图2b)。其光合作用活性低, 似与该生长实验培养基中的最终细胞浓度低相一致。

(三) 形态学

四尾栅藻的形态学示如图3。根据在湖水之类自然环境中观察的结果^[9], 本研究的四尾栅藻大多数为单生性生活(图4和图5), 不呈现集群状。图4表明添加氨对在1%流出液中生长的细胞的形态

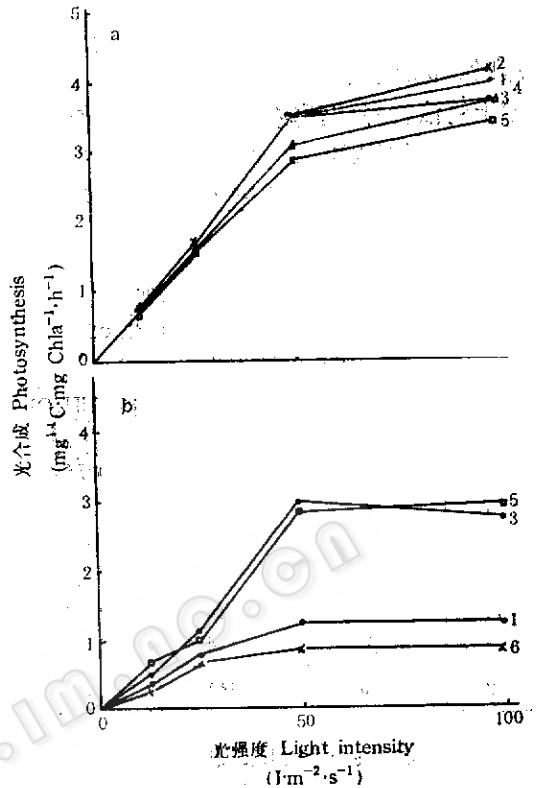


图2 生长在甲烷发酵流出液中四尾栅藻的光合成活性
Fig. 2 Photosynthetic activities of *S. quadricauda* grown in methane fermentation effluents

图中的序号与表1一致

The number in the figures corresponds to that in table 1

a. 3 days b. 9 days

影响。在不加氨的培养基中生长10天后的细胞(图4b), 淀粉颗粒明显, 可与一天后的细胞(图4a)相比。细胞生长在加氨 9.3mM (表1的No. 3) 和 18.7mM (表1的No. 4) 的流出液中, 淀粉颗粒体积小(图4c和4d)。细胞生长在不加氨培养基中, 则淀粉颗粒增大。这可能是由于氮素减少。因为一部分由光合作用生产的碳水化合物, 可能作为淀粉贮存起来, 并且可能因氮素耗尽, 而不直接用于合成蛋白质和核酸之类含氮化合物。

细胞生长在10%流出液 (No. 6) 中

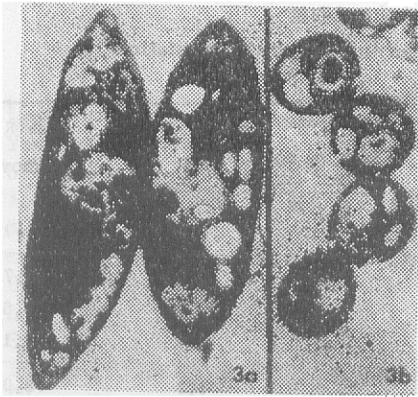


图3 四尾栅藻生长在不加氯化铵1%流出液中10天后的形态学

Fig.3 Morphology of *S. quadricauda* grown in 1% effluents without added ammonium chloride after 10 days

- a. 纵剖面 Longitudinal section ($\times 14000$)
 Ch; 叶绿体 Chloroplast; Nu; 核 Nucleus
 S; 淀粉颗粒 Starch granule; V; 液泡 Vacuole
 G; 高尔基体 Golgi apparatus
 b. 横切面 Cross section ($\times 10000$)



图4 四尾栅藻生长在不同 NH_4Cl 添加量流出液(1%)中的形态变化

Fig.4 Morphological changes of *S. quadricauda* grown in effluents (1%) with different additions of ammonium chloride ($\times 10000$)

- a. 生长1天的细胞(表1-No.1, 不加 NH_4Cl)
 A cell grown after 1 day (No.1 in table 1, without added ammonium chloride)
 b. 生长10天的细胞(表1-No.1, 不加 NH_4Cl)
 A cell grown after 10 days (No.1 in table 1, without added ammonium chloride)
 c. 生长10天的细胞(表1-No.3, 加 NH_4Cl 9.3mM)
 A cell grown after 10 days (No.3 in table 1, with 9.3mM ammonium chloride)
 d. 生长10天的细胞(表1-No.4, 加 NH_4Cl 18.7mM)
 A cell grown after 10 days (No.4 in table 1, with 18.7 mM ammonium chloride)

比生长在1%流出液中(图3及4)显得膨胀(图5)。但前者细胞的淀粉颗粒,不象在不加氨的1%流出液生长的细胞那样丰富。原因可能是它们消耗的氮素不象在1%流出液中那么多。在10%流出液中细胞叶绿体的膜系统似乎是健康的。上述特征表明,其整个细胞形态尽管异常膨胀,但是从生理学上看,还是正常的。

(四) 流出液的氨氮和磷酸磷的脱除

表2说明,四尾栅藻在流出液中生长10天后,脱除氨氮和磷酸磷的情况。对1%流出液来说,流出液的脱氨量,随外加氨量的增加而增加。但是就脱除百分数来说,则是加氨的流出液低于不加氨的流出液。磷酸磷的脱除跟氨氮脱除的趋势相类似。就10%流出液(No.6)来说,其脱除百分数,氨氮为78%,磷酸磷为63%。该数值高于在添加氨9.3mM(No.3)和28mM(No.5)的1%流出液中作生长实验所取得的数值。

讨 论

本研究的四尾栅藻(*S. quadricauda*)具有在30mM(表1、图1)高氨浓度中生长的能力。因此,可以利用它处理含有高浓度氨的家畜粪便。

我们还研究了其他藻类,其中包括菜

表 2 四尾栅藻排除甲烷发酵流出液的磷和氮

Table 2 Removal of phosphorus and nitrogen in methane fermentation effluents by *S. quadricauda*

| 试样 Sample No. | 培养基中磷酸磷的浓度 Conc. of phosphate-P in medium (μM) | | 排除 Removal (%) | 培养基中氮氨的浓度 Conc. of ammonium-N in medium (mM) | | 排除 Removal (%) |
|---------------------|---|-----------|----------------------|--|-----------|----------------------|
| | 天数 Day | 天数 Day | | 天数 Day | 天数 Day | |
| | 0 | 10 | | 0 | 10 | |
| 1 | 212 | 56 | 73.8 | 1.97 | 0.00 | 99.7 |
| 3 | 212 | 117 | 44.9 | 11.3 | 7.1 | 37.6 |
| 5 | 212 | 103 | 51.3 | 30.3 | 11.4 | 62.1 |
| 6 | 470 | 176 | 62.8 | 19.6 | 4.3 | 78.0 |

样品序号与表 1 一致

Sample number corresponds to that in table 1

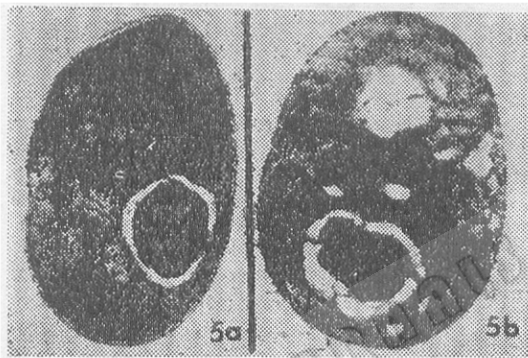


图 5 四尾栅藻在 10% 流出液中的生长

Fig. 5 *S. quadricauda* grown in 10% effluents
表 1 的 No. 6, No. 6 in table 1 ($\times 14000$)

a. 生长 1 天的细胞 A cell grown after 1 day

b. 生长 10 天的细胞 A cell grown after 10 days

因衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、一种卵囊藻 (*Oocystis* sp.) 及三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 等。它们都能在 1% 流出液中生长,但不能在 10% 流出液中生长。在一定程度上说,这可能是由于此流出液中的高浓度氨所致。迄今已研究的藻类中,只有四尾栅藻能在 10% 流出液中生长。其原因可能是该绿藻对高浓度氨具有一定的耐性。

虽然四尾栅藻能在含高浓度氨的流出液中生长,但是氨似仍影响生长。例如,当在 1% 流出液中增加氨时,生长开始的

延滞期也增长,而且在 10% 流出液中生长开始时的细胞数也下降 (图 1), 推测是由于氨的影响造成的。四尾栅藻可能适应于培养基中的高浓度氨。

但是,其他因子可能比氨更影响生长。在 10% 流出液中,比在含有 28.0mM NH_4Cl (表 1 的 No. 5、图 1) 的 1% 流出液中更受抑制。10% 流出液中光合作用的轻微下降和细胞膨胀与生长的下降相一致。然而添加 28.0mM NH_4Cl 的 1% 流出液的氨浓度,高于 10% 流出液,所以细胞的这些变化,可能不仅仅是由于氨浓度的不同。

尽管在 10% 流出液中生长有些变化,但其脱除氨和磷酸的能力并未受到大的影响,而且还可以和添加 9.3 和 28.0 mM NH_4Cl (表 1 的 No. 3 和 No. 5) 的 1% 流出液中的脱除能力相比。如果我们采用多级绿藻培养系统^[10],那么脱除效率会大大超过 90%。因此,四尾栅藻有可能实际用于处理流出液。

四尾栅藻的生长温度,可在较宽的范围 (5—38°C) 内变动,表明该藻类生长能力较强。因此该绿藻的生长和温度的依赖关系问题,应当作进一步地研究。

参 考 文 献

- [1] Maekawa, T. et al., *J. Soc. Agric. Structure, JP.* 14:7—21, 1984.
- [2] Yamanaka, K. et al., On the bio-degradation of agricultural Wastes and utilization of the biomass energy, pp.141—153, 1983.
- [3] Maekawa, T., et al., *Hoteiaoi Kenkyukai News Letters*, 5:11—12, 1984.
- [4] Miyazaki, T. et al., On the biodegradation of agricultural wastes and utilization of the biomass energy, pp.153—158, 1983.
- [5] Bischoff, H.W. and Bold, H.C., The Univ. of Texas Pub. No.6318, p.95, 1963.
- [6] Luft, J.H., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9:409—414, 1961.
- [7] Sagi, T., *Oceanogr. Mag.*, 18:43—51, 1966.
- [8] Murphy, J. and Riley, J.P., *Anal. Chem. Acta*, 27:31—36, 1962.
- [9] Hirose, H. et al., Illustrations of the Japanese Freshwater Algae, p. 993, Uchidarokakuho, Tokyo, 1977.
- [10] Hendricks, F. and Bosman, J., *Prog. Wat. Tech.* 12: 651—655, 1980.

GROWTH OF THE AMMONIUM-TOLERANT GREEN ALGA *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* IN METHANE-FER- MENTATION EFFLUENTS AND REMOVAL OF AMMONIUM AND PHOSPHATE IN THE EFFLUENTS BY THE ALGA

T. Miyazaki* Wang Xuanliang** Y. Hara* T. Maekawa*

(* University of Tsukuba; ** Dalian Institute of Light Industry)

Growth of ammonium-tolerant green alga *S. quadricauda* was examined in effluents from methane-fermentors which used swine wastes as a substrate. The alga grew well in 1% and 10% effluents but did not grow in 20% effluents. The addition of 0—28 mM of ammonium chloride to 1% effluents did not affect constants for growth, nor photosynthetic activities during the exponential phase of growth. Photosynthetic activities in the 10% effluents were lower, but were still comparable to the activity in the 1% effluents. Electron micrographs showed that starch granules were prominent in cells grown in 1% effluents without addition of ammonium, and became smaller with increased addition of ammonium. In the 10% effluents, the starch granules were small and the membrane of chloroplasts were well developed, although the cells were swollen. These results indicate that growth and physiology did not vary so much in the 1% and the 10% effluents, though the morphology changed a little. Percentages of removal of ammonium-nitrogen and phosphate-phosphorus in the 1% effluents were 99.7 and 73.8%, respectively. In the 10% effluents, the percentage of removal was 78.0% for ammonium and 62.8% for phosphate. The removal efficiency suggests that *S. quadricauda* can be used for the treatment of effluents after methane fermentation of livestock wastes.

Key words

Green alga; *Scenedesmus quadricauda*; effluents