

不同环境下镉对小球藻吸收磷速率的影响

李定坚^{1,2}, 徐明芳³, 许忠能², 严国安⁴, 曹焕生²

(1. 广州市番禺区环境保护局, 广东 广州 511400; 2. 暨南大学 水生生物研究所, 广东 广州 510632; 3. 暨南大学 生物工程学系, 广东广州 510632; 4. 武汉大学 环境科学系, 湖北 武汉 430072)

摘要: 在人工配制的污水中进行静态模拟实验, 研究了不同光照强度及不同 pH 值下, 镉对小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 在悬浮和固定状态下对污水中正磷酸盐的吸收速率的影响。结果表明, 镉存在的情况下, 在实验所设的各光照强度内, 悬浮态小球藻对磷的吸收速率为 4~10 $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{个})$, 固定化小球藻为 12~16 $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{个})$; 而相同的镉浓度下, 在不同的 pH 范围中, 悬浮态小球藻对磷的吸收速率为 1.9~9.4 $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{个})$, 固定化小球藻为 5.7~12 $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{个})$ 。在不同光照强度下, 镉总体上降低了小球藻对磷的吸收速率, 其中使悬浮藻普遍下降 40%~60%, 而固定处理使藻受镉的影响较少, 至多下降 10%~20%, 但在个别光照强度下镉反而促进了小球藻对磷的吸收速率。不同 pH 值时, 无论悬浮态还是固定态, 镉在大多 pH 下使小球藻的磷吸收速率下降 20%~30%, 固定处理并没有减少镉的影响, 同样在个别 pH 下镉促进了对磷的吸收。

关键词: 小球藻 (*Chlorella vulgaris*); 镉; 磷; 光照强度; pH

中图分类号: X 171.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)04-0025-06

富营养化水体中磷的增加会引起植物过量生长及整个水体生态平衡的改变, 根据估算, 往水体里排放 6 mg/L 的磷就会产生 828 mg/L 的化学需氧量 (COD), 并且多余的磷会沉淀于水底, 长期缓慢释放持续产生影响, 因此在富营养化控制系统中, 最重要的在于从废水中去除磷^[1]。传统的污水处理技术虽然能够有效地去除污水中的 COD、生化需氧量 (BOD)、悬浮物 (SS) 等, 但对污水磷的去除率都不高。许春华等^[2]认为高效藻类塘的应用可以有效地去除磷。陈汉辉^[3]则应用水网藻进行除磷的研究, 取得初步成效。20 世纪 80 年代以来, 藻类固定化研究十分活跃, 用其作为污水净化处理是研究的主要内容之一, Chevalier 等^[4]利用海藻酸钙凝胶固定的栅藻能够从废水中吸收 90% 的氮和 100% 的磷; Wilkinson^[5]的研究表明, 固定化小球藻对汞的去除比悬浮态藻的去除效率高得多; Robison^[6]曾对固定化小球藻去除磷进行动力学分析。目前, 国内采用包埋法固定藻类处理污水的报道并不多, 严国安等^[7]曾对斜生栅藻进行固定化后研究了汞对其净化污水

的影响。薛嵘等^[8]用改进的 PVA-硫酸盐法固定蛋白核小球藻, 并对其在不同光照条件下去除磷做了研究。

镉是植物中非必需的一种重金属元素, 也是毒性最强的重金属元素之一。Roder 等^[9]曾于 1984 年报道了重金属对藻类细胞超微结构有一系列的影响, Siedleka^[10]认为镉能破坏植物体的水分平衡, 降低光合速率, 并能破坏光合器官及色素, 影响叶绿素的活力。但是镉对藻类个体定量除磷的研究尚未见有报道, 作者以小球藻为材料, 初步研究了小球藻在污水中含有 Cd^{2+} 的条件下对正磷酸盐的吸收速率, 并对固定化藻与未固定的藻 (悬浮藻) 进行比较, 为进一步深入研究打下基础。

收稿日期: 2003-11-15; 修回日期: 2004-07-20

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2KM 02501G); 广东省自然科学基金资助项目 (980022)

作者简介: 李定坚 (1973-), 女, 广东梅州人, 硕士, 研究方向为环境工程与技术, E-mail: lyiyi88@sina.com.cn

1 材料与方 法

1.1 藻种

普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供。藻的处理分为悬浮态及固定化两种。悬浮态处理方法为: 采用 K₂HPO₄ 液体培养基培养小球藻(培养基中增加 0.1% 葡萄糖, 灭菌自来水), 接种小球藻后在光照培养箱中培养, 温度 24℃ ± 3℃, 光照强度为 3 000 lx, 24 h 连续光照培养 7d。固定化方法如下: 培养好的小球藻采用离心法浓缩, 弃去上清液后与 4% 的海藻酸钠溶液混合均匀, 用滴管吸取滴入 0.1 mol/L 预冷的 CaCl₂ 溶液中形成海藻酸钙凝胶藻珠, 交联 2 h 后取出, 用

蒸馏水多次洗涤。

1.2 培养液

根据实际污水的有关成分配制人工污水作为培养液(表 1, 表 2)^[7]。

表 1 人工配制的污水成分

Tab 1 Compositions of domestic wastewater

试剂	用量(g)	试剂	用量(g)
NH ₄ Cl	0.544 0	NaNO ₃	0.022 5
尿素	0.335	KH ₂ PO ₄	0.173
葡萄糖	36	Tm 液	1.0 mL
蒸馏水	1 000 mL		

表 2 微量元素液(Tm)液配方

Tab. 2 Compositions of Tm solution

试剂	用量(g)	试剂	用量(g)
EDTA	5	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.2
H ₃ BO ₃	1.0	CaCl ₂	0.5
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.5	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.15	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.1
蒸馏水	1 000 mL		

1.3 不同条件下磷的吸收速率的测定

1.3.1 不同光照下镉对小球藻吸收磷的影响

培养好的小球藻采用离心法浓缩(4 000 r/min)后, 重新用配制的人工污水培养液使之悬浮, 藻密度为 8.89 × 10⁵ 个/L。用移液管准确量取 35.7 mL 的原藻液滴入实验用 500 mL 的锥形瓶中, 瓶中的培养液为 400 mL, 根据光照强度的不同分为 7 个组, 光照强度分别为 9 000, 6 000, 4 400, 1 300, 640, 300, 200 lx。每组分不含 Cd²⁺ 的对照组和含 1 × 10⁻⁶ Cd²⁺ 的处理组各 7 瓶。固定化藻瓶中的藻密度为 8.89 × 10⁵ 个/L, 其他与悬浮藻的设置一样。两层纱布将锥形瓶封口, 置于光照培养箱中, 24 h 连续光照培养, 温度控制在 24℃ ± 3℃, 培养液 pH 为 6.8。测定锥形瓶中实验初始的磷浓度 c₀(P) 和 24 h 后的磷浓度 c₂₄(P), 每批次做 3 个平行。正磷酸盐的浓度用钼锑抗法测定^[11]。

1.3.2 不同 pH 值下镉对小球藻吸收磷的影响

根据不同 pH 值将培养好的小球藻分成 7 个组, pH 值分别为 3, 4, 5, 6, 7, 8 和 9。光照强度为 3 000 lx, 其他设置与 1.3.1 同。

1.3.3 磷的吸收速率计算方法

$$\text{吸收速率} = \frac{c_0(P) - c_{24}(P) \times V_1}{24 \times N \times V_2}$$

其中, 吸收速率为小球藻对 P 的吸收速率, 单位为 μg/(h · 个); 体积 V₁ = 0.4 L 为培养液体积; 体积 V₂ = 0.035 7 L 为加入原藻液体积; c₀(P) 与 c₂₄(P) 分别为锥形瓶中实验初始的磷质量浓度和 24 h 后的磷质量浓度, 单位为 μg/L; N = 8.89 × 10⁵ 个/L, 为藻密度。

2 结果与分析

2.1 在不同的光照强度下, 镉对小球藻吸收磷速率的影响

在不同的光照强度下, 镉对小球藻吸收磷速率的影响见图 1。

从图 1a 可以看出, 镉对悬浮态小球藻对磷的吸收速率有显著的影响。除在 1 300 lx 下镉对小球藻吸收磷的速率的影响是正向及在 640 lx 下吸收速率略微有所提高外, 其余的光照强度下, 镉对悬浮态小球藻吸收磷的速率影响均为负向。在高光照强度

4 000~ 9 000 lx 条件下, 镉使悬浮态小球藻对磷的吸收速率降低到原来的 40% ~ 70%, 而在较低的光照强度 200~ 300 lx 下, 镉同样使吸收速率降低, 尤其是 300 lx 时镉使吸收速率从不含镉组的 $8 \times 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{个})$ 降到几乎为 0。也就是说, 在重金属镉存在的情况下, 悬浮态小球藻对磷的吸收速率比常态要低。

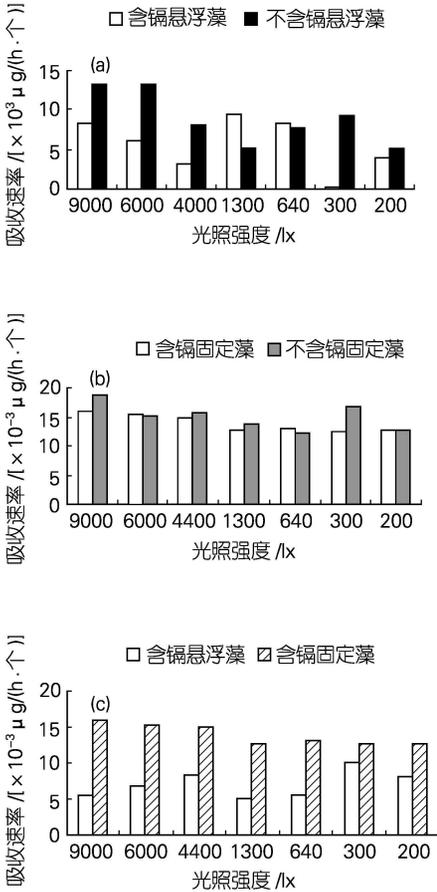


图 1 不同光照强度下镉对小球藻吸收磷速率的影响
a. 镉对悬浮态藻吸收磷速率的影响; b. 镉对固定化藻吸收磷速率的影响; c. 镉对悬浮态藻与固定化藻吸收速率的影响比较

Fig. 1 The effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by *Chlorella vulgaris* under different light intensities

a. the effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by free *C. vulgaris*; b. The effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by immobilized *C. vulgaris*; c. Comparison of the effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by free *C. vulgaris* and that by immobilized *C. vulgaris*

由图 1b 可以看出, 各光照强度下, 不含镉固定藻对磷的吸收速率在 $12 \times 10^{-3} \sim 19 \times 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{个})$ 之间, 而含镉固定藻则介于 $12 \times 10^{-3} \sim 16 \times 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{个})$ 之间, 总体而言, 在镉的影响下, 固定化小球藻对污水中磷的吸收速率有所降低, 但是程度不大。在 300 和 9 000 lx 下, 镉使吸收速率减少 10% ~ 20%, 而其它的光照强度下, 含镉固定藻与不含镉固定藻对磷的吸收速率没有显著的差别。

各光照强度下, 镉对悬浮小球藻的影响远大于其对固定化小球藻的影响, 所以在图 1c 中可以看到, 在镉存在的情况下, 经过固定化的小球藻对磷的吸收速率 ($12 \times 10^{-3} \sim 16 \times 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{个})$) 要比悬浮态的小球藻对磷的吸收速率 ($4 \times 10^{-3} \sim 10 \times 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{个})$) 大, 显示了固定化处理可减轻镉对藻吸收磷的影响。同时, 镉的这种影响在不同光照强度下有差异, 在 200~ 300 lx 时悬浮态小球藻的吸收速率为固定化的 70% ~ 90%, 在 640 lx 以上悬浮态小球藻对磷的吸收速率一般低于固定化的 50%。

2.2 在不同的 pH 值下, 镉对小球藻吸收磷速率的影响

在不同的光照强度下, 镉对小球藻吸收磷速率的影响见图 2。

由图 2a 可以看到, 在不同 pH 条件下镉对悬浮态小球藻对磷的吸收速率有显著影响, 但在不同的 pH 值下影响效果有差异。pH = 3 时镉促进了悬浮态小球藻对磷的吸收, pH = 4 时镉对磷的吸收速率无显著影响。其它 pH 下镉明显抑制悬浮态小球藻对磷的吸收, 除 pH = 5 时抑制作用较少外, 另外的 4 个 pH 下镉都使吸收速率下降 20% ~ 30%。

图 2b 中, 在不同 pH 条件下镉对固定化小球藻对磷的吸收速率有显著影响, 但影响效果在不同的 pH 值下有分别。pH = 8 时镉促进了固定化小球藻对磷的吸收, pH = 4 时镉对磷的吸收速率无显著影响。其它 pH 下镉明显抑制悬浮态小球藻对磷的吸收, 尤其在两个极端值 pH = 3 和 pH = 9 时, 镉使固定化藻吸收磷的速率降至原来的 40% ~ 60%。

由图 2c 可以看出, 在含镉情况下的各 pH 中, 固定藻对磷的吸收速率在 $5.7 \times 10^{-3} \sim 12 \times 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{个})$ 之间, 悬浮藻则介于 $1.9 \times 10^{-3} \sim 9.4 \times 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{个})$ 之间。各 pH 下, 镉对悬浮小球藻的影响大于其对固定化小球藻的影响, 所以在镉存在的情况下, 经过固定化的小球藻对磷的吸收速率要比悬

浮态的小球藻要大,显示固定化处理可减轻镉对小球藻吸收磷的影响。这种影响在不同 pH 值之间有差别,pH 为 3~ 6 时悬浮态小球藻对磷的吸收速率为固定化小球藻的 50% 以下,而 pH 为 7~ 9 时悬浮藻则为固定化小球藻的 80%~ 90%。

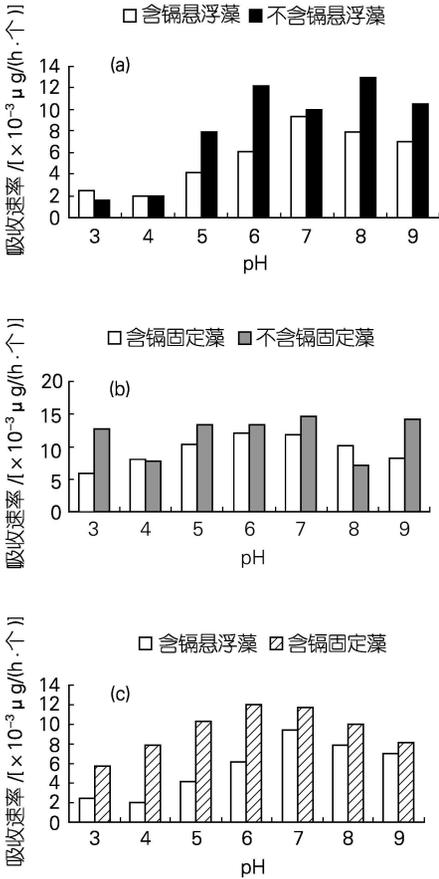


图 2 不同 pH 值下镉对小球藻吸收磷速率的影响
 a. 镉对悬浮态藻吸收磷速率的影响; b. 镉对固定化藻吸收磷速率的影响; c. 镉对悬浮态藻与固定化藻吸收磷速率的影响比较

Fig. 2 The effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by *Chlorella vulgaris* under different pH

a. The effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by free *C. vulgaris*; b. The effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by immobilized *C. vulgaris*; c. Comparison of the effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by free *C. vulgaris* and that by immobilized *C. vulgaris*

3 讨论

3.1 不同光照强度下镉对小球藻吸收磷的影响

藻类依靠光合作用生长,生长中不断消耗污水中的 P,由于光强对藻类光合活力的影响主要是通过影响藻胆体捕光色素的合成及其构成比例来实现的^[12],而镉对小球藻磷吸收速率的影响也因光强的不同而改变(图 1a)。实验所设的高光强 4 000~ 9 000 lx 条件下,镉的抑制效果明显。镉对叶绿素含量和光合作用有着不同程度的影响,叶绿素含量和光合强度随着镉浓度的增加而下降。杨丹慧等^[13]的研究结果表明,镉引起光系统捕光叶绿素蛋白质复合物解聚和总量减少,影响光系统的正常发挥,导致光合强度降低。在 200~ 300 lx 条件下,小球藻因光照强度不足只有较低的磷吸收速率,再加上镉这种环境胁迫,藻对磷的吸收就更少了。但是在 640~ 1 300 lx 下,镉反而成了普通小球藻吸收磷的促进剂。Greger^[14]曾报导低浓度的镉在特定条件下对藻类的生长短时间内会有一定的刺激作用,这与本研究结果相类似。但镉的剂量与光照强度之间的定量关系及其刺激的机理尚待进一步研究。

对于被包埋在海藻酸钙凝胶内的小球藻来说,可能是由于高浓度藻体相互之间的遮蔽作用以及凝胶的隔离作用,使得小球藻受光强及镉的影响较少,其对磷的吸收速率在各光强下都保持较高(图 1b 和图 1c)。同时,小球藻在缺 O₂ 的条件下能提高对 P 的吸收量,固定后的小球藻内部与 O₂ 接触几乎为 0,在缺氧条件下加快了对 P 的吸收。这是在镉存在及各种光强下固定化藻对 P 的吸收速率高于悬浮藻的另一个原因。

3.2 不同 pH 下镉对小球藻吸收磷的影响

介质的 pH 值对小球藻吸收磷酸盐的速率能够造成一定的影响,因为 pH 值能直接影响细胞壁膜的渗透性。镉对植物细胞膜有严重的破坏作用,结果表明细胞膜的透性与镉的浓度呈极显著的正相关^[15],因为镉能直接与膜蛋白的 -sh 结合或与磷酸乙醇胺和单分子层的磷脂线氨酸反应,从而引起细胞透性的增加^[16]。因此在大多数 pH 条件下,镉降低了小球藻对磷的吸收速率。

在图 2a 中 pH = 3 时及图 2b 中的 pH = 4 和 pH = 8 时,镉反而促进了小球藻对磷的吸收速率。藻类在重金属污染的环境中生长是因为藻类能够在重

金属的诱导下产生一种称为植物螯合素 (phytochelatins) 的金属结合蛋白和金属硫蛋白 MT (metallothioneins, 简称 MT), 这 2 种蛋白能够靠多肽结合有毒的金属离子, 解毒进而保护细胞免受伤害, 增强了藻类对重金属的耐受能力, 不过这 2 种蛋白在不同 pH 下的产生量及活性仍未清楚。已有的研究证明, 藻类对重金属的吸附分为物理吸附和化学吸附, 吸附能力与金属离子的浓度及环境因子, 如 pH 相关, 不同的吸附量会对藻类有不同的生理作用。一定条件下并且 Cd^{2+} 浓度较低时, Cd^{2+} 对小球藻的生长会有刺激作用^[14], 这与本实验某些结果相似, 因实验所使用的 Cd^{2+} 质量浓度为 1 mg/L, 不算太高, 使几个 pH 下不含镉的悬浮藻对 P 的吸收速率反而不如含镉悬浮藻大。

重金属对小球藻在不少情况是有毒害作用的, 固定化后的小球藻细胞受到载体凝胶的保护, 提高了其对重金属的抗性^[17]。但本实验中, 相对于悬浮藻而言, 不同 pH 值下镉对固定化藻的影响并没有因载体凝胶的存在而减弱(见图 2a 与图 2b), 这可能与不同 pH 下的载体凝胶对镉的透过率有关。而含镉条件下, 固定化藻对 $PO_4^{3-}-P$ 的吸收速率比悬浮态小球藻的高(见图 2c)的原因在于经海藻酸钙凝胶包埋固定后的小球藻长势良好, 为其高效、快速、稳定地去除污水中的 $PO_4^{3-}-P$ 提供了生理基础, 载体本身并没加强小球藻对重金属 Cd^{2+} 的抗性。

随着对重金属对藻的生理影响及细胞固定化技术研究的进一步加深, 藻类净化污水必会出现广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 张伟, 杨秀山. 水体的富营养化及其治理[J]. 生物学通报, 2001, 36(11): 20-22.
- [2] 许春华, 周琪. 高效藻类塘的研究与应用[J]. 环境保护, 2001, 8: 41-43.
- [3] 陈汉辉. 应用水网藻净化水源水质的初步试验[J]. 重庆环境科学, 1998, 20(4): 19-21.
- [4] Chevalier P., De la Noue J. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan [J]. *Enzyme Microbiology Technology*; 1985, 7: 621-624.
- [5] Wilkinson S C, Goulding K, Robinson P. Mercury accumulation and volatilization in algal cell system [J]. *Biotech Letters*, 1989, 11 (12): 861.
- [6] Robinson P K, Coberly S, Paul C E, et al. Phosphorus uptake kinetics of immobilized *Chlorella* in batch and continuous-flow culture[J]. *Enzyme Microbiology Technology*, 1989, 11(9): 590.
- [7] 严国安, 李益健, 张忠新, 等. 汞对固定化斜生栅藻净化污水及其生理特征的影响[J]. 应用生态学报, 1995, 6(3): 323-328.
- [8] 薛嵘, 黄国兰, 毛宇翔. 改进的 PVA-硫酸盐法固定蛋白核小球藻除磷研究[J]. 中国环境科学, 2002, 22(4): 351-354.
- [9] Roder G. On the toxic effects of tetraethyl lead and its derivatives on the chrysophyte *Pteridochromonas malhamensis* electron microscopically studies[J]. *Environ Experi Bot*, 1984, 24(1): 17-30.
- [10] Siedlek A, Baszynsky T. Inhibition of electron flow around photo system in chloroplasts of cadmium treated maize plants is due to cadmium induced iron deficiency[J]. *Physiology Plant*, 1993, 87: 199-202.
- [11] 中国国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 第5版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [12] 曾文炉, 丛威, 蔡昭铃, 等. 螺旋藻的营养方式及光合作用影响因素[J]. 植物学通报, 2002, 19(1): 70-77.
- [13] 杨丹慧. 重金属离子对高等植物光合膜结构与功能的影响[J]. 植物学通报, 1991, 8(3): 26-29.
- [14] Greger M, Lindberg S. Effects of Cd and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*) 1. Cd uptake and sugar accumulation[J]. *Physiol Plant*, 1986, 66: 69-74.
- [15] 杨居荣, 贺建群, 张国祥, 等. 农作物对 Cd 毒害的耐性机理探讨[J]. 应用生态学报, 1995, 6(1): 87-91.
- [16] 张金彪, 黄维南. 镉对植物的生理生态效应的研究进展[J]. 生态学报, 2000, 20(3): 514-523.
- [17] Dainty A L, Roinson, P K, Goulding K H, et al. Stability of alginate immobilized algal cells[J]. *Biotechnology Bioeng*, 1986, 28: 210.

The effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by *Chlorella vulgaris* under different conditions

LI Ding-jian^{1,2}, XU Ming-fang³, XU Zhong-neng², YAN Guo-an⁴, CAO Huan-sheng²

(1. Guangzhou Environmental Protection Bureau Panyu District, Guangzhou 511400, China; 2. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 4. Department of Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Received: Nov. , 15, 2003

Key words: *Chlorella vulgaris*; cadmium; phosphorus; light intensity; pH

Abstract: Experiments in laboratory using simulated settled domestic wastewater were employed to study the effect of cadmium on the uptake rates of phosphorus by *Chlorella vulgaris* in two forms, alga entrapped in calcium alginate as algal beads(AB) and free alga(FA), under different light intensities and different pH values. When cadmium was added, the uptake rates of phosphorus by FA and AB were 4~10 μ g/(h·cell) and 12~16 μ g/(h·cell), respectively, under different light intensities and under different pH values those by FA and AB were 1.9~9.4 μ g/(h·cell) and 5.7~12 μ g/(h·cell), respectively. Cadmium reduced the phosphorus uptake rates of the algae in most light intensities, rates of FA decreasing 40%~60% and rates of AB protected by calcium alginate decreasing 10%~20% at best. Under most pH values, inhibition of cadmium dropped 20%~30% of the phosphorus uptake rates of the algae, no matter FA or AB, calcium alginate works nothing. However, in some light intensities or pH, cadmium improved the phosphorus absorption of *C. vulgaris*.

(本文编辑:张培新)