文章编号: 1674 − 7054(2020)03 − 0347 − 06

微藻对天然橡胶加工废水的处理效果

李兴涵[1], 钟朝霞[1], 方　虹[1], 李亚军[1], 郑子阳[1], 费小雯[2], 邓晓东[1]
(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/海南省海洋生物资源功能性成分研究与利用重点实验室, 海口 571101; 2. 海南医学院 基础医学与生命科学学院, 海口 571199)

摘　要: 为探索微藻对天然橡胶加工废水处理的可行性, 笔者进行了念珠藻(*Nostoc* sp.)、鱼腥藻(*Anabaena* sp.)、鞘丝藻 (*Lyngbya* sp.) 和小球藻(*Chlorella* sp.)在天然橡胶加工废水中的适应性试验, 检测了小球藻对不同处理阶段的天然橡胶加工废水的总氮(TN)、总磷 (TP)、化学需氧量(COD)的去除效果; 检测了废水培养小球藻至对数期后添加营养液后藻种密度、pH 及导电率的变化。结果表明: 4 种藻种中, 小球藻在天然橡胶加工废水中的适应性最强。废水中 TN, TP, COD 浓度越高, 微藻对其去除效果越好。去除效果依次为废水原液>厌氧发酵废水>处理后废水。小球藻可以高效去除天然橡胶加工废水中的 TN, TP, COD, 对橡胶加工废水原液 TN, TP, COD 去除率分别为 89.21%%, 70.00%, 49.33%。利用天然橡胶加工废水培养小球藻至对数期后添加营养液可以有效延长培养时间。

关键词: 微藻; 小球藻; 天然橡胶; 废水处理
中图分类号: S 794.1;X 703　　**文献标志码:** A　　DOI: 10.15886/j.cnki.rdswxb.2020.03.013

天然橡胶加工废水是指以天然胶乳或胶园凝胶为原料生产天然生胶, 以及以天然胶乳为原料生产浓缩胶乳和胶清橡胶的过程中排放的废水, 其主要污染物为可溶性有机物、氨氮、硫酸根以及泥沙、树叶等杂质。对天然橡胶加工废水排放主要控制标准项目有 pH 值、生化需氧量 (Biochemical Oxygen Demand, BOD)、化学需氧量 (Chemical Oxygen Demand, COD)、悬浮物和氨氮等[1]。天然橡胶加工废水直接排放会严重影响生态环境。目前, 国内外对天然橡胶加工废水的处理方法都以生物法为主体, 有好氧-氧化塘自然曝气法, 厌氧−活性污泥机械强制曝气氧化法, 氧化塘−活性污泥机械强制曝气法, 氧化塘自然曝气氧化法等, 但以上方法都具有占地面积大、处理周期长、并产生恶臭等缺点[2], 因此, 开展天然橡胶加工废水综合处理及利用技术的应用研究, 寻求更好的天然橡胶综合处理方式对保护环境, 废物资源的综合利用, 促进橡胶产业的可持续发展具有重要意义。微藻具有生长速度快, 环境适应性强, 单位产量高等特点, 可以有效去除污水中的氮、磷、金属离子及有毒物质等污染物[3]。与传统物理化学处理污水的方法相比, 微藻处理橡胶加工废水具有很大的优势, 微藻不仅对高浓度的氮、磷具有很好的去除效果[4], 一定程度降低污水中的 COD 和 BOD 含量, 而且不会带来 2 次污染[5]。微藻对污水的去除效果受到藻种类型, 培养条件, 废水营养等因素的影响。为探索不同藻种在污水中的适应性和小球藻对不同污水中总氮(TN)、总磷(TP)和化学需氧量(COD)的去除效率, 笔者用不同稀释倍数的天然橡胶加工废水养殖念珠藻(*Nostoc* sp.)、鱼腥藻(*Anabaena* sp.)、鞘丝藻 (*Lyngbya* sp.) 和小球藻(*Chlorella* sp.), 并测定了小球藻在橡胶加工废水中的叶绿素含量、生物量以及养殖藻种起始和终止时水的 TN, TP 和 COD 含量, 旨在为探索利用微藻处理天然橡胶加工废水提供依据。

收稿日期: 2020 − 01 − 15　　**修回日期:** 2020 − 02 − 16
基金项目: 海南省重点科技计划(ZDYF2018124); 国家自然科学基金(31870344); 农业农村部财政专项(NFZX2018); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(19CXTD-32)
第一作者: 李兴涵(1986−), 男, 研究实习员. 研究方向: 微藻生理生化及开发. E-mail: xingh_li14@163.com
通信作者: 邓晓东(1969−), 男, 研究员. 研究方向: 微藻生理生化及开发. E-mail: xiaodong9deng@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料 废水: 本实验所用废水于 2016—2018 年期间取样自海南省儋州市海南天然橡胶产业集团股份有限公司金联橡胶加工厂和金福橡胶加工厂。废水原液 (以下简称金联原液/金福原液), 即未经任何处理的废水, 含有大量的氮、磷和有机物。厌氧发酵后的废水(以下简称金联厌氧), 是经过厌氧、兼性 (厌氧和好氧) 两级氧化塘处理的废水, 含有大量的氮、磷。处理后废水(金联处理), 是经过化学脱磷, 脱氮处理的水, 即经厌氧、兼性 (厌氧和好氧) 两级氧化塘处理后化学脱磷, 脱氮处理的水, 仍含有超标的氮、磷。藻种: 念珠藻(*Nostoc* sp.)、鱼腥藻(*Anabaena* sp.)、鞘丝藻 (*Lyngbya* sp.)、小球藻(*Chlorella* sp.)均为本实验室藻种库分离纯化鉴定的淡水微藻。采用固体 Tris-Acetate-Phosphate(TAP)培养基划线保存, 培养温度为 25 ℃, 光照强度 110 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 光暗比 16 h∶8 h。液体培养时, 培养温度为 25 ℃, 光照强度 110 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 光暗比 16 h∶8 h, 摇床转速为 180 $r \cdot min^{-1}$。仪器: 景宏六合一水质测定仪(JH-TD602), 柯迪达笔式 pH 计(CT-6021A), 柯迪达电导率仪(CT-3031)。

1.2 不同微藻在天然橡胶加工废水中的适应性 TAP 液体培养念珠藻、鱼腥藻、鞘丝藻和小球藻至对数期, 4 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min 收集藻细胞, 加入 2 mL TAP 培养基重悬藻细胞作为种子液, 按 10% 的接种量接种于金联原液的稀释液废水中(稀释倍数为 5, 10, 15, 20, 30 倍), 连续培养 4 d, 观察其生长状况。

1.3 小球藻对天然橡胶加工废水氮磷的去除效果 用 100 mL TAP 液体培养基将小球藻培养至对数生长期, 4 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min 收集藻细胞, 加入 2 mL TAP 培养基重悬藻细胞作为种子液, 分别接种于 50 mL 稀释 10 倍的金联和金福橡胶加工废水原液的稀释液中, 连续振荡培养 6 d。于 2, 4, 6 d 取样测定叶绿素 a、叶绿素 b 和生物量, 测定起始和终止时的 TN, TP 和 COD 含量。

1.4 稳定期补充营养液实验 将小球藻种子液接种于稀释 10 倍的金联橡胶加工废水中, 连续培养 2 d, 再添加新的营养液培养 2 d, 每天测定藻细胞密度、pH 值、电导率, 并绘制变化曲线。

1.5 测定方法 取样样品经 0.22 μm 的微孔滤膜抽滤。叶绿素的测定采用丙酮提取法[6]: 取 5 mL 小球藻培养液, 4 ℃, 5 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min,蒸馏水洗涤 2 次, 加入 8 mL 80% 丙酮混匀, 4 ℃ 萃取 24 h 至藻细胞沉淀为白色, 4 ℃ 离心, 80% 丙酮定容至 25 mL 分别测定 663, 665 nm 处的吸光值。生物量的测定, 取正常培养的小球藻, 梯度稀释后测定 OD_{680}, 烘干后测定干质量, 绘制 OD_{680} 与细胞干质量的标准曲线。细胞密度的测定, 藻细胞数与 680 nm 处的光密度呈正相关, 测定分光光度计于 680 nm 波长处的吸光度(OD_{680})。总氮采用碱性过硫酸钾消解分光光度法(GB11894—89)。总磷采用钼锑抗分光光度法(GB11893—89)。COD 采用重铬酸钾法(GB11914—89)。电导率的测定采用测定培养液的电导率 (EC) 法, 取 5 mL 的藻液经 0.22 μm 的微孔滤膜抽滤, 所得滤液在室温下用电导仪测定其电导率。pH 的测定, 取 5 mL 的藻液经 0.22 μm 的微孔滤膜抽滤, 所得滤液在室温下用笔式 pH 仪测定。

1.6 数据处理 所有实验的测定均重复 3 次, 实验结果采用 SPSS 22.0 进行差异显著性分析(LSD 法), 养藻前后总氮、总磷、COD 采用 *t* 检验(Student's T-Test), 在图中 a 代表显著水平($P<0.05$), b 代表极显著水平($P<0.01$), 绘图采用 Origin 2019。

2 结果与分析

2.1 不同微藻在天然橡胶加工废水中的生长情况 将制备好的念珠藻、鱼腥藻、鞘丝藻、小球藻种子液接种于稀释不同倍数的金联橡胶加工厂的废水中连续培养。结果表明 (图 1): 培养第 4 天, 念珠藻除了在稀释 5 倍的污水中生长情况较差, 其余各倍数生长情况均较好; 鱼腥藻仅在稀释 30 倍的污水中生长较好; 鞘丝藻和小球藻除了在稀释 5 倍、10 倍的污水中生长情况较差, 其余各倍数生长情况较好。表明在一定稀释倍数范围内, 各藻种生长状况与稀释倍数呈现正相关。小球藻在污水中的适应性明显高于念珠藻, 鱼腥藻和鞘丝藻。

2.2　小球藻对天然橡胶加工废水氮、磷、COD 的去除效果

2.2.1　叶绿素含量和生物量变化　小球藻细胞内含有丰富的叶绿素, 光合作用非常强, 因而叶绿素含量的多少通常是直接体现光合能力大小的一个重要生理指标。笔者测定了小球藻在稀释 10 倍的橡胶加工废水中的叶绿素含量和生物量 (图 2)。结果显示, 随着培养时间的增加, 叶绿素 a+b 含量均出现不同程度的下降, 且达到显著水平(P<0.05), 其中, 金联处理组下降最明显, 第 6 天与第 2 天相比, 下降了 58.7%。生物量测定结果表明, 除金联处理组生物量先升高, 后降低外, 其余各组生物量明显增加, 金联原液组、金联厌氧组和金福处理组, 第 6 天与第 2 天相比分别增加了 2.51 倍, 1.41 倍和 0.34 倍, 金联原液组增加最显著。

图 1　微藻天然橡胶加工废水中的生长状况

Fig. 1　Growth of microalgae in the effluent of the natural rubber processing factories

2.2.2　对氮的去除效果　从表 1 可以看出, 金联橡胶原液总氮含量为 1 742.27 mg·L^{-1}, 金福橡胶原液总氮含量为 1 303.34 mg·L^{-1}, 说明橡胶加工废水原液含有超标的氮含量, 金联厌氧废水总氮含量为 35.9 mg·L^{-1}, 厌氧后化学脱氮后废水总氮含量为 12.30 mg·L^{-1}。养藻前后对比显示, 天然橡胶加工废水养殖小球藻后总氮含量均出现显著的降低, 对氮的去除效率金联原液组效果最佳为 89.21%, 依次是金联原液组>金福原液>金联厌氧>金联处理, 这说明利用小球藻净化天然橡胶加工废水对原液稀释后的去除效果最佳。

2.2.3　对磷的去除效果　对养殖小球藻前后的橡胶加工废水总磷含量测定显示 (表 2), 金联原液总磷含量为 23.75 mg·L^{-1}, 金福原液总磷含量为 23.79 mg·L^{-1}, 说明橡胶加工废水原液含有较高的磷, 养殖小球藻后, 金联原液总磷含量为 7.13 mg·L^{-1}, 总磷去除效率为 70%, 其次为金福原液, 去除效率为 69.60%。

2.2.4　对 COD 的去除效果　化学需氧量是指检测水样在强酸性条件下, 由氧化剂氧化 1 L 水中有机物

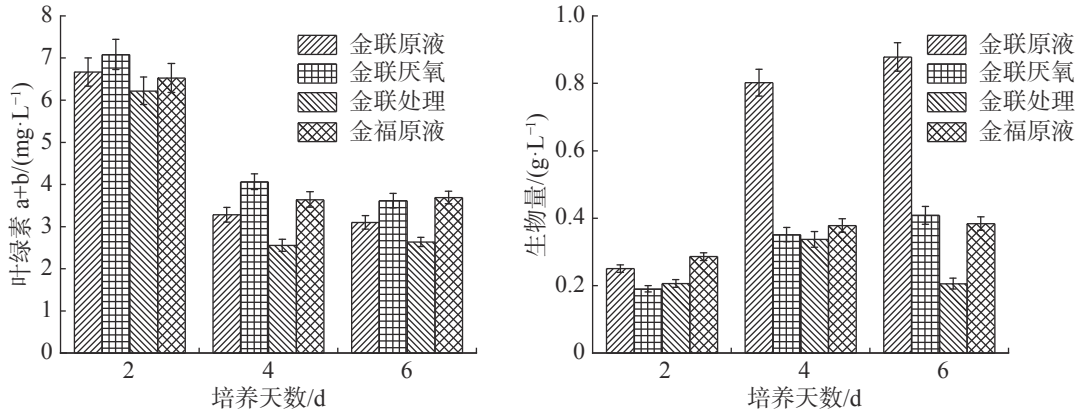

图 2　小球藻在橡胶加工废水中连续培养下叶绿素和生物量的测定

Fig. 2　Determination of chlorophyll and biomass of *Chlorella* sp. cultured continuously in the effluent of the NR processing factories

表 1 小球藻对天然橡胶加工废水氮的去除效果

Tab. 1 Effect of *Chlorella* sp. on removal of total nitrogen content from the effluent in the NR processing factories

废水类型 Source of effluent	TN起始浓度/(mg·L^{-1}) Initial concentration of total nitrogen (TN)	TN终止浓度/(mg·L^{-1}) Terminated concentration of TN	去除率/% TN removal rate
金联原液	1 742.27	188.39 b	89.21
金联厌氧	35.90	12.52 b	65.18
金联处理	12.30	6.5 a	47.15
金福原液	1 303.34	189 b	85.50

注: a, b分别表示在0.05和0.01水平上差异显著, 下同。

Note: a, b indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively, similarly hereinafter.

表 2 小球藻对天然橡胶加工废水磷的去除效果

Tab. 2 Effect of *Chlorella* sp. on removal of total phosphorus content of the effluent from the NR processing factories

废水类型 Source of effluent	TP起始浓度/(mg·L^{-1}) Initial concentration of total phosphorus (TP)	TP终止浓度/(mg·L^{-1}) Terminated concentration of TP	去除率/% TP removal rate
金联原液	23.75	7.13b	70.00
金联厌氧	11.87	7.97a	32.90
金联处理	4.20	3.30a	21.43
金福原液	23.79	7.23b	69.60

表 3 天然橡胶加工废水养殖小球藻前后 COD 变化

Tab. 3 Change of COD in the effluent before and after treatment with *Chlorella* sp.

废水类型 Source of effluent	起始COD/(mg·L^{-1}) Initial COD	终止COD/(mg·L^{-1}) Terminated COD	去除率/% COD removal rate
金联原液	238.40	120.80 b	49.33
金联厌氧	69.20	52.40 b	24.28
金联处理	59.20	42.40 a	28.38
金福原液	178.40	112.80 b	36.77

所需要的氧气量, 可以反映出水体中有机物的含量以及水体的有机物污染程度。从表 3 可以看出, 金联原液和金福原液养藻前 COD 分别为 238.40 , 178.40 mg·L^{-1}, 超出了天然橡胶加工污水排放标准, 经过养殖微藻后 COD 分别为 120.80 , 112.80 mg·L^{-1}, 达到天然橡胶一二级排放标准。养藻后与养藻前 COD 变化均达到显著水平(P<0.05), 去除效率依次是金联原液组>金福原液组>金联处理组>金联厌氧组。

2.3 培养稳定期添加营养液对小球藻生长的影响 微藻对污水中氮磷的去除受到营养液成分、有机负荷、pH 等因子的影响。从图 3 可以看出, 采用天然橡胶加工废水培养小球藻, 第 2 天细胞密度达到

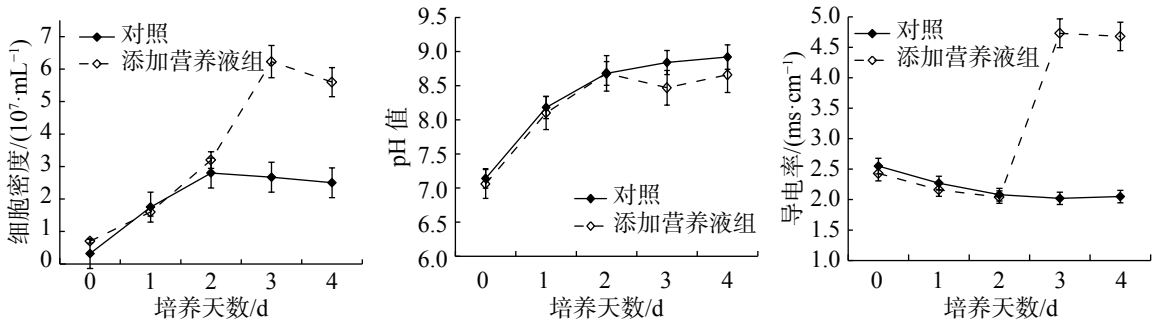

图 3 稳定期添加营养液对细胞密度、pH 和电导率的影响

Fig. 3 Effects of nutrient solution on cell density, pH value and conductivity after adding nutrient solution into medium at stationary phase

2.81×10^7 个·mL^{-1}, 添加营养液后细胞密度持续增加, 第 3 天达到最大值 6.32×10^7 个·mL^{-1}, 然后降低。添加营养液后藻细胞的终浓度高于对照, 这说明添加营养液可以有效延长培养时间, 提高微藻的产量。连续培养过程中培养液 pH 值逐渐增加, 培养至平台期后 pH 趋于稳定, 第 2 天添加营养液后溶液被稀释, pH 降低, 随后 pH 逐渐增加, 略低于对照。在连续培养过程中, 电导率从起始的 2.27 ms·cm^{-1}, 逐渐降低, 最终稳定在 2.0 ms·cm^{-1} 左右, 第 2 天添加营养液后, 溶液被稀释, 导电率急剧增加, 最后降低, 稳定于 4.5 ms·cm^{-1} 左右, 说明添加营养液后, 溶液 pH 和电导率的改变可能是导致微藻细胞密度增加的主要因素。

3　讨　论

微藻生长繁殖快, 光合效率高, 可以有效去除污水中的氮、磷、金属离子及有毒物质等污染物。微藻种类繁多, 不同藻种的污水处理能力差别很大, 李川等[6] 在研究蛋白核小球藻、鱼腥藻、双对栅藻和突变衣藻 4 种藻在固定和悬浮状态下对污水中氮的净化能力时发现, 小球藻和鱼腥藻对污水中氮的去除效果较好。据研究报道, 对污水中氮和磷吸收效果最好的微藻有螺旋藻、小球藻、栅藻、颤藻, 栅列藻, 其中小球藻是去除效率最高的藻类之一[7]。本研究涉及的 4 种藻, 在稀释相同倍数的天然橡胶加工废水中, 小球藻(*Chlorella* sp.)长势明显的优于念珠藻(*Nostoc* sp.)、鱼腥藻(*Anabaena* sp.)和鞘丝藻 (*Lyngbya* sp.)。这也验证了小球藻较强的适应污水能力。微藻生长受到生长因素的影响, 如光照、温度、氮、磷浓度及平衡。有机负荷大小, pH 值等其中有些会成为微藻的限制因子[8], 在小球藻处理污水过程中, 叶绿素含量随着培养时间的增加而降低, 说明小球藻生长受到一定的抑制, 这也说明废水中存在限制小球藻生长的抑制因子。污水氮和磷含量测定显示, 污水中氮、磷含量严重超标。对氮、磷的去除率随着氮、磷浓度的升高而增加。对金联橡胶加工原液废水氮、磷和 COD 的去除率分别为 89.71%, 70.00% 和 49.33%, 这说明小球藻对天然橡胶加工废水中的氮、磷、COD 去除效果较好, 这与之前报道的小球藻处理市政污水的氮磷效果结果一致[9]。

小球藻对废水氮、磷、COD 的去除效果, 因小球藻属存在差异, 而且受到起始接种浓度, 培养环境以及水体中营养成分比例的影响[10]。适宜藻类生长的氮磷比为(7∶17) ~ (15∶1), 当氮磷比<5∶1 时就会引起氮限制, 而当氮磷比>40∶1 则会引起磷限制[11]。小球藻对不同形态氮的吸收顺序为: 氨氮>简单有机氮>硝酸盐氮>亚硝酸盐氮, 对不同形态磷的吸收顺序为: 正磷酸盐>偏磷酸盐>焦磷酸盐>有机磷酸盐[12]。小球藻对氮磷的去除效果还受到溶液 pH 的影响, 据报道小球藻对氮磷去除效果最佳的 pH 范围为 7 ~ 8[13]。本研究不同处理阶段的天然橡胶加工废水的氮磷比例、pH 等具有较大差异, 导致了小球藻对氮、磷、COD 去除效率的差异。在培养小球藻至对数期后添加新的营养液, 微藻细胞浓度增加, 这可能是新添加的营养液补充了氮源和碳源, 也可能是有效降低溶液的 pH 和增加电导率等因素导致的结果。结果表明, 天然橡胶加工废水培养小球藻至对数期后, 适量添加营养液可以有效延长培养时间。

参考文献:

[1] 徐文, 张江雄, 唐文浩, 等. 海南省天然橡胶加工废水综合处理及利用技术分析[J]. 现代农业科技, 2014(1): 243 − 244.
[2] 方海雄, 臧小龙, 王高平, 等. 天然橡胶加工废水处理及利用现状[J]. 热带农业工程, 2017, 41(2): 16 − 21.
[3] 冯思然, 朱顺妮, 王忠铭. 微藻污水处理研究进展[J]. 环境工程, 2019, 37(4): 60 − 65.
[4] 农业部渔业局. 中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 203.
[5] 朱志伟. 微藻对污水净化效果及其生长情况研究[J]. 赤峰学院学报 (自然科学版), 2013(16): 39 − 40.
[6] 徐成滨, 王宇心, 孔伟浩, 等. 溴氰虫酰胺对羊角月牙藻的急性毒性效应[J]. 热带生物学报, 2019(2): 135 − 146.
[7] 陈春云, 庄源益, 方圣琼, 等. 小球藻对养殖废水中 N、P 的去除研究[J]. 海洋环境科学, 2009, 28(1): 9 − 11.
[8] 潘禹, 王华生, 刘祖文, 等. 微藻废水生物处理技术研究进展[J]. 应用生态学报, 2019, 30(7s): 2490 − 2500.
[9] 脱金华, 任洪艳, 刘方舟, 等. 利用实际市政污水培养小球藻及优化外加碳源[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(1): 184 − 190.
[10] 周连宁, 吴锋, 赵振业, 等. 重要环境因子对小球藻去除污水中氮磷的影响[J]. 生物技术进展, 2015(1): 60 − 65.

[11] VOLTOLINA D, HERLINDA G V, CORREA G. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle [J]. Bioresource Technology, 2005, 96(3): 359 − 362.
[12] 张向阳, 邢丽贞, 张彦浩, 等. 固定化小球藻去除污水中氮、磷的试验研究[J]. 中国给水排水, 2008, 24(1): 95 − 97.
[13] WANG B, ZHOU Y L. Study on the removing of nitrogen and phosphorus from wastewater by *Chlorella* [J]. Agricultural Science & Technology, 2014, 15(4): 631 − 634.

Effect of Microalgae on Treatment of the Effluent from Natural Rubber Processing Factories

LI Xinghan[1], ZHONG Zhaoxia[1], FANG Hong[1], LI Yajun[1], ZHENG Ziyang[1], FEI Xiaowen[2], DENG Xiaodong[1]
(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology/Hainan Key Laboratory for Development and Utilization of Functional Components of Marine Bio-resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. School of Basic Medical Sciences and Life Sciences, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571199, China)

Abstract: Microalgae *Nostoc* sp., *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp.and *Chlorella* sp. were cultured in the effluent from the natural rubber processing factories to observe their effect on the treatment of the effluent. The total nitrogen (TN), total phosphorus (TP) and chemical oxygen demand (COD) removed from the effluent at different treatment stages was determined, and the cell density, pH value and conductivity of the effluent were measured after adding of nutrient solution into the effluent treated with the microalgae at the late log phase. The results show that *Chlorella* sp. was most adaptable in treatment of the effluent among the 4 species of microalgae. The higher the concentrations of the TN and TP and the COD in the effluent, the better the removal efficiency. *Chlorella* sp. could effectively remove TN, TP and COD from the effluent in the order of the original effluent> the anaerobically fermented effluent> the treated effluent, and its removal rates of TN, TP and COD from the effluent in the Rubber Processing Factory were 89.21%%, 70.00% and 49.33%, respectively. Adding of nutrient solution in the effluent cultured at the late log phase prolonged effectively the culture time of *Chlorella* sp in the effluent.

Keywords: microalgae; *Chlorella* sp.; natural rubber; effluent treatment

(责任编辑:潘学峰)