

不同营养源对人工湿地基质生物膜培养液 pH 值的影响

张金莲¹, 张丽萍², 武俊梅², 吴振斌²

(1.广西大学环境学院, 广西 南宁 530004; 2.中国科学院水生生物研究所淡水生态和生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要:采用恒温摇床培养方法,研究了不同营养源(处理 1:尿素+乙酸钠;处理 2:亚硝酸钠+乙酸钠;处理 3:硝酸钾+乙酸钠;处理 4:碳酸氢铵;处理 5:硫酸铵+碳酸氢钠;处理 6:磷酸二氢钾+碳酸氢钠)对复合垂直流人工湿地基质生物膜培养液 pH 值的影响,探讨了 pH 值变化过程中生物膜脱氢酶活性和多糖含量的变化规律。结果表明,处理 1、4 以及 5 中培养液 pH 值先下降然后再上升,但下降和上升的幅度不同。处理 2、3 以及 6 中培养液 pH 值添加碳源前在 7.30~7.40 之间缓慢变化,添加碳源后均上升至 9.00 左右。在培养液 pH 值变化的过程中,生物膜脱氢酶活性和多糖含量也发生改变。处理 1、2、3 中生物膜脱氢酶活性均在 pH 值上升的过程中达到最高值,而处理 4、5、6 中脱氢酶活性随 pH 值的变化呈下降趋势。对于所设 6 个处理,除处理 4 中多糖含量在整个试验过程中基本不变外,其余 5 个处理中多糖含量均在 pH 值上升过程中一直增加。

关键词:生物膜;营养源;脱氢酶活性;多糖含量;复合垂直流人工湿地

中图分类号:X703.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)06-1230-05

Effects of Different Nutrients on pH Value of Culture Solution of Substrate Biofilms in Constructed Wetland

ZHANG Jin-lian¹, ZHANG Li-ping², WU Jun-mei², WU Zhen-bin²

(1. School of Environment, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Effects of different nutrients (treatment 1: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{CH}_3\text{COONa}$; treatment 2: $\text{NaNO}_2 + \text{CH}_3\text{COONa}$; treatment 3: $\text{KNO}_3 + \text{CH}_3\text{COONa}$; treatment 4: NH_4HCO_3 ; treatment 5: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaHCO}_3$; treatment 6: $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$) on pH value of the culture solution of substrate biofilms in the integrated vertical-flow constructed wetland (IVCW), as well as the dehydrogenase activity and polysaccharide content of biofilms were studied. The results showed that pH values of the culture solution of substrate biofilms in treatment 1, 4 and 5 at first decreased then increased, but in different ranges. The lowest and highest pH values were about 7.00 and 9.00 in treatment 1, 7.10 and 7.50 in treatment 4, 6.70 and 9.00 in treatment 5. pH values of the culture solution of substrate biofilms in treatment 2, 3 and 6 varied slowly in the range from 7.30 to 7.40 without carbon sources, and increased to about 9.00 after carbon sources were added. The dehydrogenase activity and polysaccharide content of biofilms were found to be dependent on pH value. The dehydrogenase activities of biofilms in treatment 1, 2 and 3 reached their respective maxima during the increases of pH values, while those in treatment 4, 5 and 6 decreased with pH values. The polysaccharide contents of biofilms in all other treatments increased when pH values increased, except that the polysaccharide content in treatment 4 maintained constant through the experiment.

Keywords: biofilms; nutrient; dehydrogenase activity; polysaccharide content; integrated vertical-flow constructed wetland (IVCW)

人工湿地成熟以后,基质及植物根系表面由于大量微生物的生长而形成生物膜,在湿地净化污水过程中起着非常重要的作用^[1]。目前,在人工湿地处理污

水时,常以调节进水 pH 值作为减少对植物和微生物的毒性从而提高系统处理效率以及延长湿地使用寿命的手段之一。pH 值是生物膜生长环境的重要理化指标^[2]。生物膜酶活性和生物量在湿地系统发挥高效去污能力过程中起重要作用^[3-5],对包括 pH、温度等在内的环境条件变化很敏感。本试验通过向生物膜培养液中添加不同的氮源、磷源和碳源,探求不同营养源条件下生物膜培养液 pH 值的变化以及在此过程中生物膜酶活性和多糖含量的变化规律,为优化人工湿

收稿日期:2008-10-24

基金项目:广西大学科研基金资助项目(X081081);湖北省科技攻关重大项目(2006AA305A03);国家杰出青年科学基金资助项目(39925007)

作者简介:张金莲(1979—),女,博士,主要从事环境微生物学研究。

E-mail: zhangjinlian88@yahoo.com.cn

通讯作者:吴振斌 E-mail: wuzb@ihb.ac.cn

地净化功能提供思路。

1 材料和方法

1.1 试验场地及采样方法

复合垂直流人工湿地介绍详见文献[6], 基质生物膜采样方法见文献[7]。

1.2 试验方法

试验设6个处理:(1)尿素+乙酸钠;(2)亚硝酸钠+乙酸钠;(3)硝酸钾+乙酸钠;(4)碳酸氢铵;(5)硫酸铵+碳酸氢钠;(6)磷酸二氢钾+碳酸氢钠。配制微量矿物盐溶液,由一些无机盐组成($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): MgSO_4 10, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10, NaCl 10, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4。用微量矿物盐溶液分别稀释氮源、磷源贮备液,配成不同形态的含氮或者含磷的污水。其中,各种形态的氮的浓度均为 $6.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 磷的浓度为 $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。称取一定量湿地基质于 250 mL 锥形瓶中,以 2:1 的污水和基质比加入不同形态的含氮或者含磷的污水,放入 25℃ 恒温摇床,转速为 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。每间隔 3 h 取样 1 次测定培养液 pH 值,同时定期测定生物膜脱氢酶活性和多糖含量,待生物膜不再生长后再根据试验设计分别加入碳源,即碳酸氢钠或乙酸钠(以三水合乙酸钠的形式加入),继续进行试验。

1.3 分析方法

脱氢酶活性采用三苯基四氮唑氯化物(TTC)比色法测定^[8];多糖含量根据苯酚-硫酸法测定^[9];pH 值用 DELTA 320 型 pH 计测定。

2 结果

2.1 尿素+乙酸钠对培养液 pH 值的影响

本处理以尿素为氮源,以乙酸钠为碳源,所得结果见图 1a 和图 2a。在试验最初 48 h 内未添加碳源时,培养液 pH 值缓慢降低,27 h 后保持在 7.00 左右。在此期间,生物膜脱氢酶活性持续降低。生物膜利用尿素中所含的碳能维持 6 h 左右的生长,多糖含量从 $3\,592.3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 增至 $4\,615.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。培养至 48 h 时加入 0.1 g 乙酸钠,生物膜培养液 pH 逐渐升高至 9.00 左右。脱氢酶活性在 96 h 时升至最高值 $27.08\text{ }\mu\text{g TF}\cdot\text{g}^{-1}\cdot 12\text{ h}^{-1}$ 。加入乙酸钠后,多糖含量一直保持增加的趋势。

2.2 亚硝酸钠+乙酸钠对培养液 pH 值的影响

本处理以亚硝酸钠为氮源,以乙酸钠为碳源。如图 1b 所示,培养 48 h 内未添加碳源时,pH 值缓慢增加,最高与最低 pH 值之差仅为 0.10。脱氢酶活性在 6 h 时降至最低后变化缓慢。多糖含量在前 12 h 内下

降,经过一夜的培养,24 h 后多糖含量增至试验刚开始时的水平,见图 2b。48 h 时加入乙酸钠,培养液 pH 值一直升高,132 h 后基本不变。加入碳源后,生物膜多糖含量缓慢增加,脱氢酶活性则迅速升高,84 h 时达到最大值 $22.62\text{ }\mu\text{g TF}\cdot\text{g}^{-1}\cdot 12\text{ h}^{-1}$ 。

2.3 硝酸钾+乙酸钠对培养液 pH 值的影响

本处理以硝酸钾为氮源,培养 48 h 后加入乙酸钠作为碳源。如图 1c 和图 2c 所示,整个试验过程中培养液 pH 值、生物膜酶活性以及多糖含量的变化趋势和以亚硝酸钠为氮源,乙酸钠为碳源的处理相似。

2.4 碳酸氢铵对培养液 pH 值的影响

本处理以碳酸氢铵为氮源和碳源。碳酸氢铵所含的碳、氮可同时满足生物膜生长的需要。由图 1d 可见,生物膜培养液中添加与尿素含氮量相同的碳酸氢铵后,培养液 pH 值先迅速降低然后再升高,24 h 时有一个明显的低谷。整个试验过程中,多糖含量基本没有变化。生物膜脱氢酶活性持续下降,且 36 h 前下降迅速,36 h 后下降缓慢,至 144 h 时酶活性值下降了 49.1%,见图 2d。

2.5 硫酸铵+碳酸氢钠对培养液 pH 值的影响

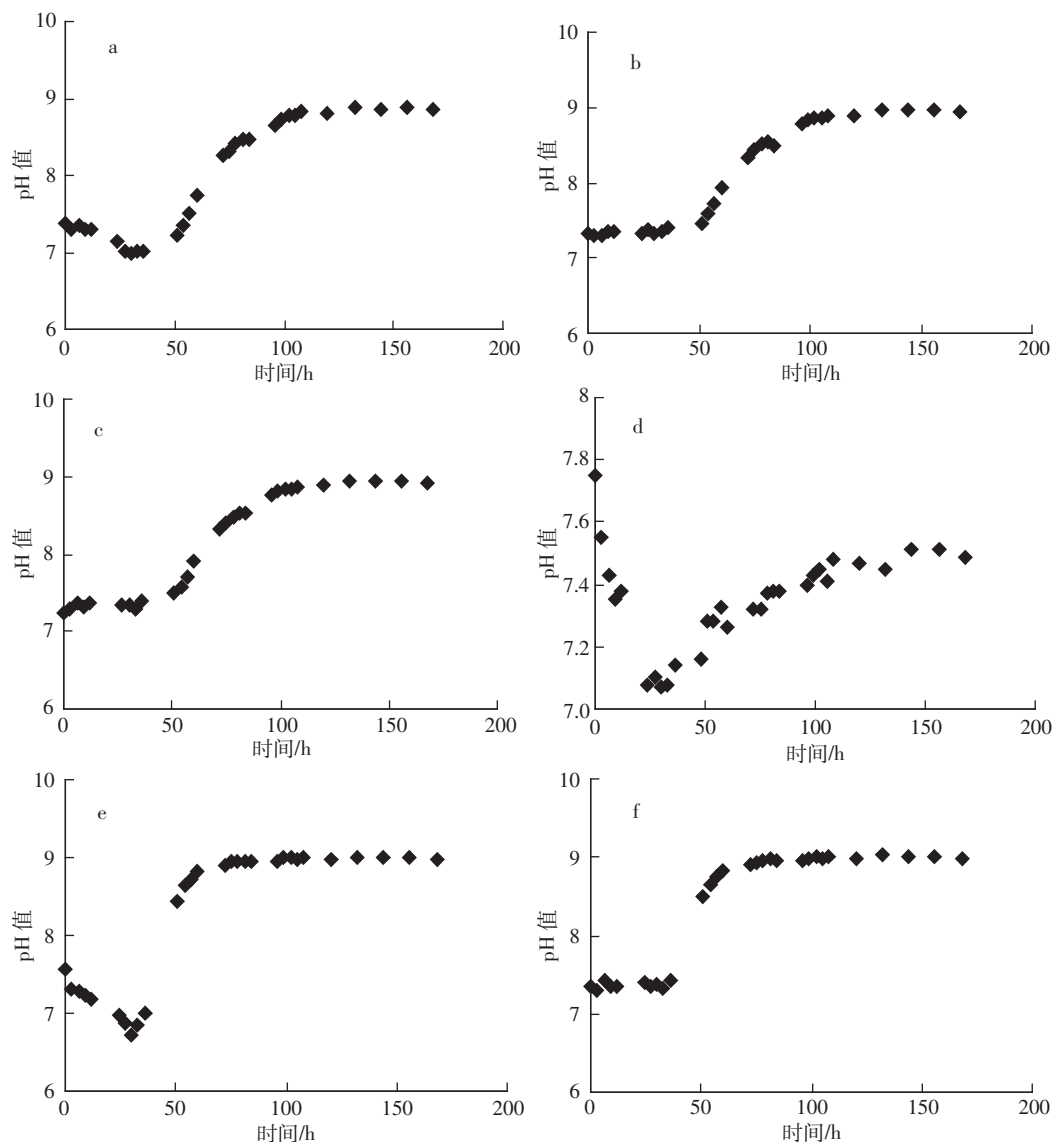
本处理以硫酸铵为氮源,以碳酸氢钠为碳源。由图 1e 可见,试验最初的 48 h 内只添加硫酸铵时,生物膜培养液 pH 值逐渐降至 7.00 以下,30 h 后有所回升。在此期间,脱氢酶活性从 $11.82\text{ }\mu\text{g TF}\cdot\text{g}^{-1}\cdot 12\text{ h}^{-1}$ 迅速下降至 $7.09\text{ }\mu\text{g TF}\cdot\text{g}^{-1}\cdot 12\text{ h}^{-1}$,见图 2e。添加碳酸氢钠后,生物膜培养液 pH 迅速升高至 9.00 左右。生物膜脱氢酶活性在整个试验过程中一直呈下降趋势,只是添加碳酸氢钠后下降速度较之前大大减慢,至 144 h 时酶活性仅比添加碳源前降低了 12.6%。多糖含量在添加碳源后逐渐增加。

2.6 磷酸二氢钾+碳酸氢钠对培养液 pH 值的影响

本处理以磷酸二氢钾为磷源,以碳酸氢钠为碳源。如图 1f 所示,培养前 48 h 内只添加磷源时,生物膜培养液 pH 值在 7.30~7.40 之间缓慢变化。由图 2f 可见,脱氢酶活性急剧下降,48 h 时酶活性值大约只有试验刚开始时的一半。生物膜多糖含量缓慢减少。添加碳酸氢钠后,培养液 pH 值迅速升高,至 60 h 时 pH 值已升至 8.83,之后上升缓慢,96 h 后基本不变。生物膜酶活性在添加碳源后的 6 h 内升高了 32.6%,之后缓慢下降。多糖含量在添加碳源后逐渐增加。

3 讨论

添加尿素、亚硝酸钠、硝酸钾、碳酸氢铵、硫酸铵



(a.尿素+乙酸钠;b.亚硝酸钠+乙酸钠;c.硝酸钾+乙酸钠;d.碳酸氢铵;e.硫酸铵+碳酸氢钠;f.磷酸二氢钾+碳酸氢钠),下同。

(a. $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{CH}_3\text{COONa}$; b. $\text{NaNO}_2 + \text{CH}_3\text{COONa}$; c. $\text{KNO}_3 + \text{CH}_3\text{COONa}$; d. NH_4HCO_3 ; e. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaHCO}_3$; f. $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHCO}_3$), the same below.

图1 不同营养源对人工湿地基质生物膜培养液 pH 值的影响

Figure 1 Effects of different nutrients on pH value of the culture solution of substrate biofilms in the IVCW system

等氮源后,生物膜培养液 pH 值的变化主要取决于氮素被利用后伴随离子在混合液中的水解反应。以尿素为氮源时,尿素先被水解成 NH_4HCO_3 。测定本研究中所采取的人工湿地基质 pH 发现,基质 pH 值在 7.00 以上,呈碱性,因而试验刚开始时有利于反应向生成更多 H^+ 的方向进行,生物膜培养液 pH 值表现为下降趋势。当 pH 值降至 7.00 附近时,随着 NH_4^+ 和 HCO_3^- 的利用产生 OH^- ,导致培养液的 pH 值升高。以亚硝酸钠和硝酸钾为氮源时, NO_2^- 和 NO_3^- 被利用后伴随离子 Na^+ 和 K^+ 留在培养液中以致 pH 值升高。以硫酸铵为

氮源时,由于伴随离子是 SO_4^{2-} ,因此,随着 NH_4^+ 的利用,培养液中的 H^+ 浓度越来越高,pH 值也越来越低。

以磷酸二氢钾为磷源时,一方面, H_2PO_4^- 水解生成 H_3PO_4 和 OH^- ;另一方面, H_2PO_4^- 电离产生 HPO_4^{2-} 和 H^+ 。此时,生物膜培养液中既存在 H_2PO_4^- ,同时也存在 H_3PO_4 和 HPO_4^{2-} ,三者相互影响、相互制约,形成一定的缓冲效果。因此,培养液中只添加磷酸二氢钾的 48 h 内 pH 值仅在 0.1 个单位内变化,变动幅度很小。但是,整个生物膜培养液中由于伴随离子 K^+ 的存在而呈碱性。

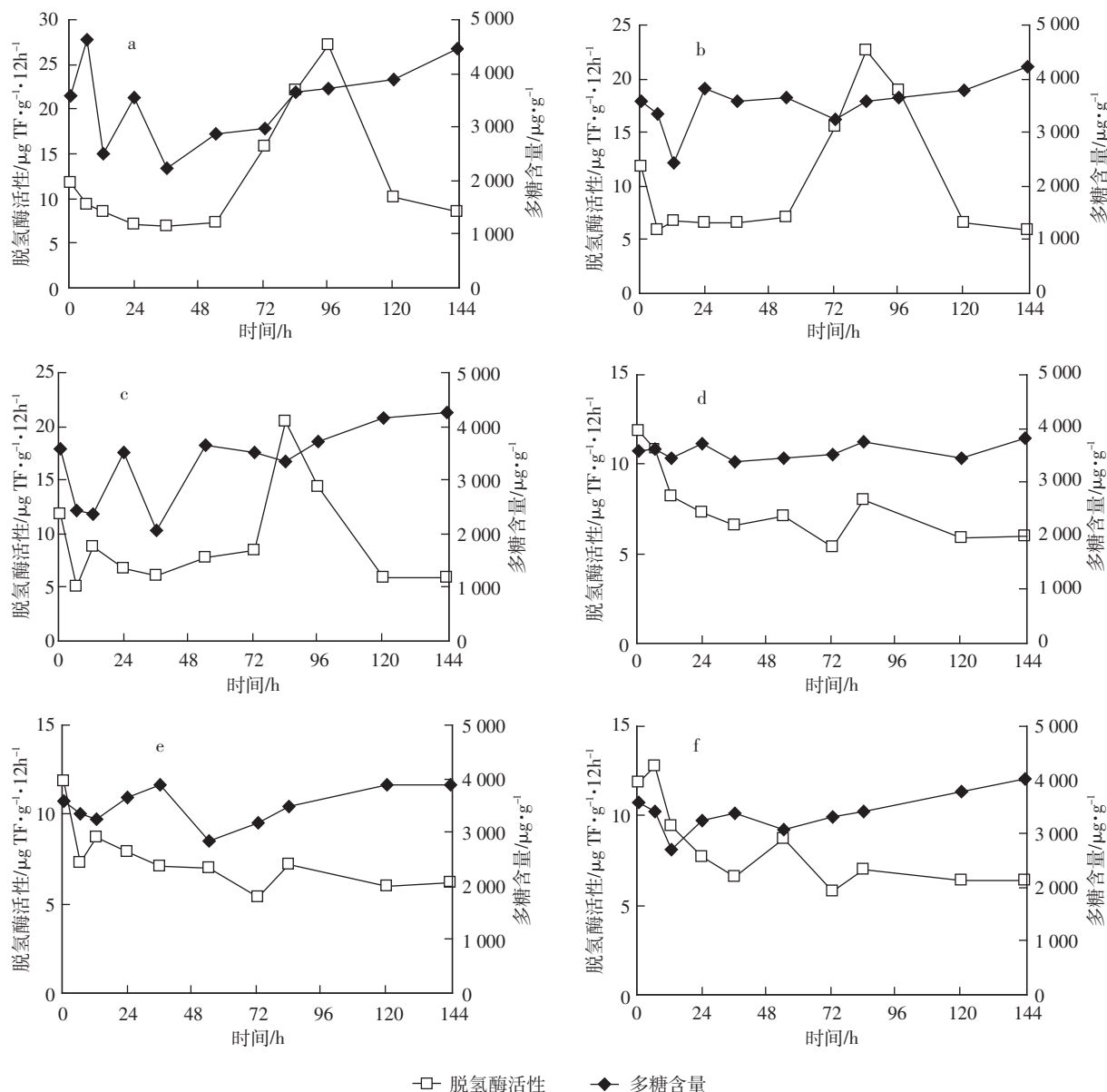


图2 人工湿地基质生物膜脱氢酶活性和多糖含量的变化

Figure 2 Changes of the dehydrogenase activity and polysaccharide content of substrate biofilms in the IVCW system

添加乙酸钠、碳酸氢钠等碳源,生物膜培养液 pH 的变化同样取决于碳素被利用后伴随离子在培养液中的水解反应。由于乙酸钠、碳酸氢钠本身呈化学碱性,而乙酸钠又是一种生理碱性盐,因此,随着碳素的利用,pH 可升至一个更高的水平。

pH 值的改变可能引起细胞膜电荷的变化,进而影响生物膜上微生物对营养物质的吸收和微生物代谢过程中酶的活性。因此,本试验中生物膜脱氢酶活性和多糖含量在培养液 pH 值变化的过程中也发生了改变。除此以外,生物膜脱氢酶活性和多糖含量的变化可能还与试验所添加的营养源有关。一般来讲,

生物膜上微生物所需要的营养物质应包括组成细胞的各种元素和产生能量的物质,主要是碳源、氮源,还有作为无机营养物质的磷源。本试验中,生物膜脱氢酶活性在加入碳源后变化不同,可能与生物膜对两种碳源乙酸钠(乙酸)和碳酸氢钠(碳酸)的利用情况不同有关。处理 1、2、3 中,生物膜酶活性在补充碳源后由下降转为升高趋势,说明乙酸钠很容易被生物膜用来作为提高自身活性的“营养”。处理 4 和 5 中生物膜脱氢酶活性在整个试验过程中持续下降,可能是因为高浓度的铵氮抑制生物膜细胞的生长或对其产生了毒副作用。另外,对于所设 6 个处理,除处理 4 以外,

其余 5 个处理中多糖含量均在添加碳源后呈增加趋势,说明碳源对生物膜的生长是很重要的,单一氮源或者磷源不能满足生物膜生长的需要。处理 4 中多糖含量基本保持不变,可能是因为碳酸氢铵不仅提供碳源(碳酸),而且提供氮源(NH_4^+),基本满足生物膜生长的需要。

添加营养源后,培养液的 pH 值以及生物膜脱氢酶活性、多糖含量均发生了变化。pH 值的变化与所添加的碳源、氮源和磷源有关,脱氢酶活性和多糖含量的变化则是 pH 值和添加的营养源等因素共同作用的结果。至于哪种因素占主导地位,以及它们作用于生物膜的机理还需要进一步研究。

4 结论

添加不同营养源均对人工湿地基质生物膜培养液 pH 值产生一定的影响。生物膜脱氢酶活性和多糖含量随培养液 pH 值的变化呈现不同的变化规律。在实际废水处理过程中,保持合适的 pH 范围是十分重要的。另外,本研究结果还表明,培养液 pH 值达到 9.00 时生物膜仍能正常生长,表现为多糖含量呈增加趋势。

参考文献:

- [1] Mayo A W, Bigambo T. Nitrogen transformation in horizontal subsurface flow constructed wetlands I: model development[J]. *Physics and Chemistry of the Earth*, 2005, 30(11-16): 658-667.
- [2] 董德明, 李 鱼, 花修艺, 等. pH 对湿地水环境中生物膜吸附铅和镉的影响[J]. 吉林大学学报(理学版), 2002, 40(3): 303-307.
DONG De-ming, LI Yu, HUA Xiu-yi, et al. Effect of pH on Pb and Cd adsorption to surface coatings developed in the aquatic environment of wetland[J]. *Journal of Jilin University (Science Edition)*, 2002, 40(3): 303-307.
- [3] Liang W, Wu Z B, Cheng S P, et al. Roles of substrate microorganisms and urease activities in wastewater purification in a constructed wetland system[J]. *Ecological Engineering*, 2003, 21(2-3): 191-195.
- [4] Shackle V J, Freeman C, Reynolds B. Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32(13), 1935-1940.
- [5] Shackle V J, Freeman C, Reynolds B. Exogenous enzyme supplements to promote treatment efficiency in constructed wetlands[J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 361(1-3): 18-24.
- [6] 詹德昊, 吴振斌, 徐光来. 复合垂直流构建湿地中有机质积累与基质堵塞[J]. 中国环境科学, 2003, 23(5): 457-461.
ZHAN De-hao, WU Zhen-bin, XU Guang-lai. Organic matter accumulation and substrate clogging in integrated vertical-flow constructed wetland[J]. *China Environmental Science*, 2003, 23(5): 457-461.
- [7] 张金莲, 贺 锋, 梁 威, 等. Zn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 对人工湿地基质生物膜的影响[J]. 中国环境科学, 2008, 28(2): 158-162.
ZHANG Jin-lian, HE Feng, LIANG Wei, et al. Effects of Zn^{2+} , Co^{2+} and Mn^{2+} on the substrate biofilms in the integrated vertical-flow constructed wetland[J]. *China Environmental Science*, 2008, 28(2): 158-162.
- [8] 朱南文, 闵 航, 陈美慈, 等. TTC-脱氢酶测定方法的探讨[J]. 中国沼气, 1996, 14(2): 3-5.
ZHU Nan-wen, MIN Hang, CHEN Mei-ci, et al. The study of determination on TTC-dehydrogenase activity[J]. *China Biogas*, 1996, 14(2): 3-5.
- [9] 刘 雨, 赵庆良, 郑兴灿. 生物膜法污水处理技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2000.
LIU Yu, ZHAO Qing-liang, ZHENG Xing-can. Biofilm technology for wastewater treatment[M]. Beijing: China Architecture & Building Press, 2000.