



普通小球藻对水体 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 去除效果及 NO_2^- -N 的同化途径

沈雷¹, 高建操², 聂志娟², 郑兆伟³, 胡佳雯³,
邵乃麟², 孙毅², 徐钢春^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;
3. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为评估水产养殖中小球藻在调控水体氨氮(NH_4^+ -N)和亚硝酸盐氮(NO_2^- -N)的应用前景, 实验以普通小球藻为对象, 饲料废水为培养液, 首先检测了曝气、光照、光照+曝气条件下普通小球藻细胞密度及水体中 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 的时间变化规律, 其次分析了时间(X_1)、光照强度(X_2)或初始藻密度(X_3)对2种氮盐去除率(Y)的影响, 最后评估了普通小球藻去除水体中 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 的效果, 并解析了普通小球藻同化水体 NO_2^- -N 的潜在途径。结果显示, 普通小球藻在适宜的光照条件下具有极佳的氮盐去除能力, 其在 18 000 lx 时对 NH_4^+ -N 去除率高达 96.23%, 在 9 000 lx 时对 NO_2^- -N 去除率高达 99.19%; 初始藻密度在 2.5×10^5 个/mL 时对 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 去除率最高, 分别为 94.92% 和 99.05%。氮盐去除率与处理时间和光照强度的回归方程: $Y_{\text{NH}_4^+\text{-N}} = 1.189X_1 + 5.79 \times 10^{-4}X_2 + 24.158(R^2=0.664)$, $Y_{\text{NO}_2^-\text{-N}} = 1.562X_1 + 1.909 \times 10^{-3}X_2 - 26.078(R^2=0.762)$; 氮盐去除率与处理时间和初始藻密度的回归方程为: $Y_{\text{NH}_4^+\text{-N}} = 0.888X_1 + 1.02 \times 10^{-5}X_3 + 32.555(R^2=0.408)$, $Y_{\text{NO}_2^-\text{-N}} = 1.746X_1 + 1.64 \times 10^{-5}X_3 - 17.250(R^2=0.613)$ 。普通小球藻去除氮盐顺序为 NH_4^+ -N > NO_3^- -N > NO_2^- -N; NH_4^+ -N 同化阶段普通小球藻亚硝酸盐还原酶活性显著低于 NO_2^- -N 同化阶段。研究表明, 普通小球藻能显著降低水体 NH_4^+ -N 与 NO_2^- -N 含量, NO_2^- -N 可能是由藻细胞内亚硝酸盐还原酶还原成 NH_4^+ -N 而被普通小球藻同化吸收。该研究结果可为养殖水体原位生物修复提供科学依据。

关键词: 普通小球藻; 氨氮; 亚硝酸盐氮; 同化途径; 亚硝酸盐还原酶

中图分类号: S 949

文献标志码: A

氨氮(主要为非离子氨)、亚硝酸盐氮是养殖水体中主要的毒害物质, 对水产动物生存环境有至关重要的影响。水体中非离子氨与离子氨能够相互转化; 水温或 pH 越高, 水中非离子氨的含量也越高。而水体中 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 浓度过高

会造成养殖动物免疫力下降、发生病害甚至死亡^[1-5]。因此, 去除养殖水体中 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 对于保证养殖动物的健康意义重大^[6-7]。

对于养殖水体 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 的升高, 生产中常用化学氧化剂缓解。化学方法虽在短期内

收稿日期: 2021-11-23 修回日期: 2022-05-24

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFD0900301); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2021XT0701)

第一作者: 沈雷(照片), 从事菌藻相水质调控技术研究, E-mail: 154120119@qq.com

通信作者: 徐钢春, 从事水生动物苗种繁育及生态养殖研究, E-mail: xugc@ffrc.cn



具有较好的去除效果, 但同时会影响水体微生物群落组成, 扰乱池塘生态平衡^[8-11]。随着生态理念的推广和绿色养殖技术的普及, 越来越多的养殖户选择微生态制剂调控水质及改良底质; 在循环水养殖系统(RAS)等工厂化养殖中尤为明显^[12-13]。除微生物外, 藻类作为池塘中的初级生产者, 对维护养殖池塘生态平衡同样具有重要的作用。

普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)作为单细胞浮游植物, 以其繁殖迅速、生命力强被水产界广泛使用^[14-16]。目前, 多项研究关注小球藻对NH₄⁺-N和NO₂⁻-N的去除效果, 而忽略了二者之间的关联^[17-20]; 而实际养殖水体中NH₄⁺-N、NO₂⁻-N同时存在, 两者之间存在协同和转化。近年来, 多数研究表明小球藻具有净化养殖水体的功能, 但不同种类的小球藻去除NH₄⁺-N、NO₂⁻-N效果不尽相同。刘祥等^[21]研究发现普通小球藻在自养模式下无法去除NH₄⁺-N。而许元钊等^[22]发现索罗金小球藻(*C. sorokiniana*)能够去除NH₄⁺-N, 但无法去除NO₂⁻-N。我国常见的小球藻种类有普通小球藻、蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)和椭圆小球藻(*C. ellipsoidea*)等, 其中普通小球藻是水产养殖中广泛使用的一种。因此, 揭示普通小球藻对NH₄⁺-N、NO₂⁻-N去除效果及相关影响因子对于水产健康养殖意义重大。

目前, 小球藻对水体中NH₄⁺-N去除途径研究的比较透彻, 主要为小球藻直接同化吸收以及水体中pH变化导致NH₄⁺-N挥发^[23-24]; 而有关小球藻去除水体中NO₂⁻-N的研究较少。这也导致了养殖池塘亚硝酸盐浓度偏高时, 养殖户缺乏有效的生态应对措施。本研究以普通小球藻为研究对象, 检测了普通小球藻对水体中NH₄⁺-N、NO₂⁻-N的去除效果和规律, 同时探究了普通小球藻同化水体中NO₂⁻-N潜在途径。本研究结果将有助于进一步加深对小球藻去除NO₂⁻-N效果和途径的认知, 为小球藻在水产养殖中的科学使用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

普通小球藻由实验室制备, 接种于新鲜无菌的BG-11培养基, 于光照4 500 lx、光暗比12 h/12 h、温度26℃下恒温培养, 达到对数生长期的高密度藻液用于实验。实验水体由水产饲料在自来水

<https://www.china-fishery.cn>

中自然释放氮营养盐制得; 实验容器为3 L玻璃烧杯。

1.2 实验方法

将藻母液置以3 500 r/min离心10 min后, 弃去上清液, 用蒸馏水反复洗涤3次, 去除藻液中营养盐。饲料废水置以5 000 r/min离心5 min后, 取上清液用于实验。实验温度为28℃, 曝气量为2 L/min, 连续曝气与光照。

不同条件下小球藻对NH₄⁺-N、NO₂⁻-N的去除效果实验 取饲料废水15 L, 充分混匀后分成15份, 实验组添加普通小球藻至初始密度为2.5×10⁵个/mL, 光照强度为18 000 lx。设置A组: 对照, B组: 普通小球藻, C组: 普通小球藻+曝气, D组: 普通小球藻+光照, E组: 普通小球藻+光照+曝气, 每组3个平行, 每隔12 h检测各组水体中NH₄⁺-N、NO₂⁻-N质量浓度及小球藻细胞密度。

不同光照强度下普通小球藻对NH₄⁺-N、NO₂⁻-N的去除效果实验 取饲料废水15 L, 充分混匀后分成15份, 添加普通小球藻至初始密度为2.5×10⁵个/mL, 设置不同光照强度组: 0 lx(A组)、3 000 lx(B组)、6 000 lx(C组)、9 000 lx(D组)和18 000 lx(E组)5个组, 每组3个平行, 给予曝气条件, 每隔12 h检测水体中NH₄⁺-N、NO₂⁻-N质量浓度及藻细胞密度。

不同初始密度的普通小球藻对NH₄⁺-N、NO₂⁻-N的去除效果实验 取饲料废水12 L, 充分混匀后分成12份, 设置初始藻密度分别为对照(0)、低密度(5.0×10⁴个/mL)、中密度(2.5×10⁵个/mL)、高密度(1.25×10⁶个/mL)4个组, 每组3个平行, 给予18 000 lx光照与曝气条件, 每隔12 h检测水体中NH₄⁺-N、NO₂⁻-N质量浓度及藻细胞密度。

曝气对亚硝酸钠溶液中NO₂⁻-N浓度的影响实验 准确称取0.492 8 g亚硝酸钠(分析纯), 溶解于超纯水, 定容至1 L, 制成NO₂⁻-N质量浓度为0.100 mg/mL的标准液。分别取1、3和5 mL标准液, 用纯水稀释配置成质量浓度分别为0.1、0.3和0.5 mg/L的NO₂⁻-N溶液, 给予18 000 lx光照与曝气条件, 每隔6 h检测水体中NO₂⁻-N含量。

普通小球藻处理下NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N质量浓度的变化规律实验 取饲料废水6 L,

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

经高压蒸汽灭菌后充分混匀分成 6 份, 3 份添加普通小球藻为实验组, 设置初始藻密度为 5.0×10^5 个/mL, 对照组不添加普通小球藻。给予 18 000 lx 光照与曝气条件, 每隔 6 h 检测水体中 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 质量浓度及藻细胞密度。并分别在 6 h (NH_4^+ -N 吸附过程) 和 24 h (NO_2^- -N 吸附过程) 时检测普通小球藻亚硝酸盐还原酶 (NiR, 江苏酶免实业有限公司) 活性。

1.3 水质测定

NH_4^+ -N 测定采用纳氏试剂分光光度法, NO_2^- -N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法, NO_3^- -N 采用紫外分光光度法^[25], 溶解氧 (DO) 和 pH 采用水质分析仪测定 (Thremo Orion Star A329; Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, 美国)。普通小球藻采用血球计数板计数。去除率 r 计算公式:

$$r = (C_0 - C_1)/C_0 \times 100\%$$

式中, C_0 和 C_1 分别为某时刻对照组与处理组浓度 (mg/L)。

1.4 数据分析

结果以平均值±标准差 (mean±SD) 表示, 采用 SPSS 18.0 软件进行方差分析与回归分析, 其中 $P<0.05$ 和 * 表示差异显著, $P<0.01$ 和 ** 表示差异极显著。采用 Microsoft Excel 2019 软件绘图, 其中组内时间上差异显著性用大写字母标注, 组间差异用小写字母标注。

2 结果

2.1 不同条件下普通小球藻对 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 去除效果及藻密度变化

无光照组间 NH_4^+ -N 含量无显著差异 ($P>0.05$), 而有光照组从第 12 小时开始 NH_4^+ -N 含量显著低于无光照组 ($P<0.05$); 在第 24 和 48 小时, E 组 NH_4^+ -N 去除率显著高于 D 组 ($P<0.05$; 表 1); 表明光照是普通小球藻去除 NH_4^+ -N 的必要条件, 而曝气对 NH_4^+ -N 的去除有一定的促进作用。

无光照组 NO_2^- -N 含量有随时间逐步上升的趋势, 而 D、E 组 NO_2^- -N 含量分别在第 36 和 24 小时显著低于无光照组 ($P<0.05$; 表 1); 与 D 组相比, E 组在 24~72 h 具有更高的 NO_2^- -N 去除率。综上表明, 普通小球藻对 NO_2^- -N 去除明显滞后于 NH_4^+ -N 的去除; 合适的光照条件下, 普通小球

藻能有效去除 NO_2^- -N, 同时曝气可以显著提高普通小球藻对 NO_2^- -N 的去除速率与去除率 ($P<0.05$); 在缺乏光照的条件下, 曝气会诱导 NO_2^- -N 产生。

光照组普通小球藻数目迅速增加且显著高于无光照组 ($P<0.05$; 表 1); E 组藻密度略高于 D 组; 说明光照充足时, 普通小球藻能快速利用水体营养物质进行增殖, 曝气对普通小球藻生物量的增加有一定的促进作用。

2.2 不同光照强度下普通小球藻对 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 去除效果及藻密度变化

自实验开始, 各处理组 NH_4^+ -N 含量均显著低于 A 组 ($P<0.05$), B、C、D 三组在 0~24 h 随光照强度增加, NH_4^+ -N 去除速率显著加快 ($P<0.05$), D 组与 E 组无显著差异 ($P>0.05$); 36 h 后各处理组 NH_4^+ -N 去除率无显著差异 ($P>0.05$; 表 2); 表明光照强度增加有利于提高 NH_4^+ -N 去除速率, 光照强度为 9 000 lx 时即有较好的 NH_4^+ -N 去除效果。在第 48 小时时, E 组具有最高的 NH_4^+ -N 去除率, 为 96.23% (表 2); 经回归分析, NH_4^+ -N 去除率 (Y) 与时间 (X_1)、光照 (X_2) 关系: $Y_{\text{NH}_4^+ \text{-N}} = 1.189X_1 + 5.79 \times 10^{-4}X_2 + 24.158$, $R^2=0.664$ 。

B、C、D、E 组 NO_2^- -N 含量分别从第 60、36、24 和 24 小时显著低于 A 组 ($P<0.05$), 且 E 组 NO_2^- -N 去除率在第 36 小时显著高于 D 组 ($P<0.05$); 表明 NO_2^- -N 去除速率随光照强度增加而加快。在第 60 小时时, D 组具有最高的 NO_2^- -N 去除率, 为 99.19% (表 2); 经回归分析, NO_2^- -N 去除率 (Y) 与时间 (X_1)、光照 (X_2) 关系: $Y_{\text{NO}_2^- \text{-N}} = 1.562X_1 + 1.909 \times 10^{-3}X_2 - 26.078$, $R^2=0.762$ 。

A 组藻密度未显著升高, 而 B、C、D、E 组藻密度自实验开始即快速上升, 分别在第 60、60、36 和 24 小时达到平台期 (表 2)。表明在充足的营养条件下, 随着光照强度增加, 微藻繁殖速率加快。

2.3 不同普通小球藻密度去除 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 效果及藻密度变化

对照组 NH_4^+ -N 含量逐步下降, 低、中、高密度组 NH_4^+ -N 含量分别在第 24、12 和 12 小时显著低于对照组 ($P<0.05$), 且高密度组 NH_4^+ -N 去除率显著高于中密度组 ($P<0.05$); 表明 NH_4^+ -N 去除速率随藻密度增加而加快。在第 24 小时中密度组具有最高的 NH_4^+ -N 去除率, 为 94.92% (表 3); 经回归分析, NH_4^+ -N 去除率 (Y) 与时间 (X_1)、藻密

表 1 不同条件下小球藻去除 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 效果及藻密度变化Tab. 1 Removal effects of NH_4^+ -N and NO_2^- -N by *C. vulgaris* under different conditions and the changes of algal density

指标 index	时间/h time	对照(A组) control	小球藻(B组) <i>C. vulgaris</i>	藻+曝气(C组) <i>C. vulgaris</i> +aerate	藻+光照(D组) <i>C. vulgaris</i> +light	藻+光照+曝气(E组) <i>C. vulgaris</i> +light+aerate
浓度/(mg/L) concentration	0	2.819±0.027 ^A	2.830±0.045 ^A	2.833±0.042 ^A	2.838±0.041 ^A	2.849±0.046 ^A
	12	2.638±0.048 ^{AA}	2.616±0.058 ^{AA}	2.580±0.133 ^{AA}	0.199±0.048 ^{Cb}	0.140±0.066 ^{Bb}
	24	2.488±0.074 ^{ACa}	2.397±0.112 ^{AA}	2.192±0.197 ^{ABa}	0.349±0.118 ^{Cb}	0.078±0.040 ^{Dc}
	36	2.409±0.111 ^{ACa}	2.371±0.158 ^{ABa}	2.008±0.411 ^{ABCa}	0.199±0.058 ^{Cb}	0.148±0.017 ^{BCb}
	48	2.563±0.462 ^{ABa}	2.653±0.274 ^{AA}	2.323±0.530 ^{ABa}	0.580±0.154 ^{Bb}	0.217±0.028 ^{BCc}
	60	2.067±0.144 ^{BCa}	1.953±0.346 ^{BCa}	1.646±0.493 ^{BCa}	0.188±0.072 ^{Cb}	0.221±0.069 ^{BCb}
	72	2.060±0.161 ^{Ca}	1.745±0.413 ^{Ca}	1.565±0.531 ^{Ca}	0.258±0.025 ^{Cb}	0.232±0.019 ^{Cb}
	0	0.088±0.005 ^D	0.088±0.003	0.088±0.002 ^D	0.087±0.002 ^A	0.088±0.003 ^A
	12	0.085±0.002 ^{Db}	0.098±0.010 ^b	0.121±0.003 ^{Ca}	0.092±0.004 ^{Ab}	0.109±0.017 ^{Aa}
	24	0.089±0.003 ^{Db}	0.112±0.018 ^b	0.170±0.027 ^{Ba}	0.098±0.003 ^{Ab}	0.002±0.001 ^{Bc}
去除率/% removal rates	36	0.098±0.003 ^{Cb}	0.124±0.035 ^b	0.187±0.035 ^{Ba}	0.054±0.009 ^{Bc}	0.002±0.001 ^{Bd}
	48	0.104±0.003 ^{BCb}	0.130±0.036 ^b	0.220±0.052 ^{ABa}	0.017±0.003 ^{Cc}	0.005±0.004 ^{Bd}
	60	0.108±0.004 ^{Bb}	0.151±0.062 ^b	0.262±0.071 ^{ABa}	0.010±0.002 ^{Dc}	0.003±0.001 ^{Bd}
	72	0.116±0.002 ^{Ab}	0.168±0.088 ^b	0.332±0.108 ^{AA}	0.007±0.001 ^{Ec}	0.004±0.001 ^{Bd}
	0	—	-0.39±0.62	-0.49±0.73	-0.07±0.05	-1.06±0.83
	12	—	0.80±2.73 ^b	2.23±3.81 ^b	92.48±1.72 ^a	94.67±2.52 ^a
	24	—	3.60±6.16 ^c	11.77±9.95 ^c	85.89±5.05 ^b	96.89±1.49 ^a
	36	—	1.53±5.78 ^b	16.00±21.28 ^b	91.77±2.22 ^a	93.86±0.73 ^a
	48	—	-5.25±16.41 ^c	8.04±20.66 ^c	77.51±3.16 ^b	91.30±2.12 ^a
	60	—	5.50±14.89 ^b	20.44±22.18 ^b	90.72±4.23 ^a	89.31±3.16 ^a
普通小球藻密度/ <i>C. vulgaris</i> density	72	—	14.83±21.69 ^b	23.14±28.07 ^b	87.40±2.13 ^a	88.66±1.74 ^a
	0	—	-0.23±4.72	0.24±3.89	0.92±4.19	-0.14±2.47
	12	—	-15.11±10.36 ^a	-41.85±6.48 ^b	-7.34±6.45 ^a	-28.11±22.12 ^b
	24	—	-25.87±22.59 ^b	-91.18±34.15 ^c	-10.25±6.10 ^b	97.24±0.81 ^a
	36	—	-27.80±38.58 ^c	-91.66±38.26 ^d	44.50±7.76 ^b	97.50±0.89 ^a
	48	—	-24.97±35.69 ^c	-112.91±53.77 ^d	84.03±3.11 ^b	95.06±4.42 ^a
	60	—	-40.17±57.58 ^c	-144.22±69.41 ^d	90.90±1.89 ^b	97.04±0.61 ^a
	72	—	-45.03±77.47 ^c	-186.59±96.39 ^d	93.88±1.06 ^b	96.62±1.26 ^a
	0	—	25.33±2.80	25.33±2.80 ^A	25.33±2.80 ^D	25.33±2.80 ^D
	12	—	23.20±4.18 ^b	29.33±2.20 ^{AB}	189.33±20.53 ^{Ca}	206.00±26.46 ^{Ca}
	24	—	16.93±5.16 ^b	12.13±3.80 ^{BCb}	197.33±27.01 ^{BCa}	305.33±55.08 ^{Ba}
	36	—	24.13±1.97 ^b	17.33±3.80 ^{ABb}	300.67±67.72 ^{AA}	452.00±82.07 ^{AA}
	48	—	25.47±6.90 ^b	10.27±4.64 ^{CD}	288.67±63.00 ^{AA}	486.00±100.94 ^{AA}
	60	—	29.07±11.32 ^b	9.20±3.60 ^{CC}	273.67±54.24 ^{ABa}	444.67±85.70 ^{AA}
	72	—	24.67±8.78 ^b	4.93±1.89 ^{DC}	329.33±78.01 ^{AA}	507.33±117.65 ^{AA}

注：“—”表示处理组浓度大于对照组；不同大写字母表示组内不同时间点指标差异显著，不同小写字母表示同一时间点各处理组间差异显著($P<0.05$)，下同。

Notes: “—” means that the concentration in the treatment group is higher than that in the control group. Different uppercase letters indicated temporal differences in a given group, and different lowercase letters indicated significant differences among groups at the same time point ($P<0.05$), the same below.

度(X_3)关系为 $Y_{\text{NH}_4^+\text{-N}}=0.888X_1+1.02\times 10^{-5}X_3+32.555$, $R^2=0.408$ 。

低、中、高密度组 NO_2^- -N 含量分别在第 48、24 和 24 小时显著低于对照组，中、高密度组之

表 2 不同光照强度下小球藻去除 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 效果及藻密度变化Tab. 2 Removal effects of NH_4^+ -N and NO_2^- -N by *C. vulgaris* under different light intensities and the changes of algal density

指标 index	时间/h time	0 lx(A组)	3 000 lx(B组)	6 000 lx(C组)	9 000 lx(D组)	18 000 lx(E组)
浓度/(mg/L) concentration	0	4.836±0.044 ^A	4.832±0.020 ^A	4.860±0.053 ^A	4.869±0.045 ^A	4.829±0.055 ^A
	12	4.301±0.121 ^{Ba}	3.236±0.079 ^{Bb}	2.924±0.050 ^{Bc}	2.019±0.192 ^{Bd}	1.935±0.055 ^{Bd}
	24	4.063±0.067 ^{Ca}	1.265±0.198 ^{Cb}	0.573±0.040 ^{Cc}	0.166±0.029 ^{Cd}	0.177±0.029 ^{Cd}
	36	3.770±0.193 ^{CDa}	0.415±0.243 ^{Db}	0.225±0.052 ^{Db}	0.195±0.042 ^{Cb}	0.181±0.035 ^{Cb}
	48	3.279±0.274 ^{DEa}	0.217±0.175 ^{Db}	0.166±0.011 ^{Db}	0.155±0.022 ^{Cb}	0.122±0.040 ^{Cb}
	60	2.895±0.356 ^{EFa}	0.166±0.048 ^{Db}	0.122±0.029 ^{Db}	0.129±0.039 ^{Cb}	0.133±0.022 ^{Cb}
	72	2.649±0.277 ^{Fa}	0.144±0.058 ^{Db}	0.170±0.023 ^{Db}	0.155±0.050 ^{Cb}	0.148±0.028 ^{Cb}
	0	0.331±0.004 ^F	0.328±0.004 ^B	0.331±0.003 ^B	0.329±0.010 ^B	0.332±0.005 ^{AB}
	12	0.366±0.007 ^{Eab}	0.354±0.015 ^{ABb}	0.348±0.011 ^{ABb}	0.377±0.007 ^{Aa}	0.385±0.016 ^{Aa}
	24	0.380±0.012 ^{DEa}	0.372±0.004 ^{AA}	0.362±0.014 ^{AA}	0.313±0.007 ^{Cb}	0.294±0.034 ^{Bb}
去除率/% removal rates	36	0.391±0.014 ^{Da}	0.357±0.016 ^{AA}	0.294±0.044 ^{Bb}	0.012±0.002 ^{DC}	0.004±0.001 ^{CD}
	48	0.437±0.015 ^{Ca}	0.330±0.073 ^{ABCa}	0.005±0.001 ^{Cb}	0.004±0.001 ^{EB}	0.006±0.001 ^{CB}
	60	0.463±0.014 ^{Ba}	0.198±0.077 ^{CDb}	0.005±0.001 ^{Cc}	0.004±0.001 ^{Ec}	0.005±0.001 ^{Cc}
	72	0.488±0.012 ^{AA}	0.117±0.033 ^{Db}	0.005±0.001 ^{Cc}	0.005±0.001 ^{Ec}	0.004±0.002 ^{Cc}
	0	—	0.08±0.49	-0.49±0.37	-0.67±0.61	0.16±0.27
	12	—	24.77±0.63 ^c	31.96±3.11 ^b	53.09±3.63 ^a	54.98±1.98 ^a
	24	—	68.90±4.58 ^c	85.92±0.75 ^b	95.91±0.78 ^a	95.65±0.71 ^a
	36	—	89.08±6.33	94.08±1.11	94.82±1.08	95.17±1.20
	48	—	93.46±5.05	94.93±0.27	95.25±0.81	96.23±1.32
	60	—	94.29±1.32	95.80±0.76	95.48±1.41	95.41±0.40
	72	—	94.39±2.69	93.52±1.36	94.09±1.99	94.37±1.26
普通小球藻密度/ (1.0×10^4 个/mL) <i>C. vulgaris</i> density	0	—	0.89±1.89	-0.12±1.97	0.54±4.06	-0.46±2.51
	12	—	3.45±3.05 ^a	4.97±4.48 ^a	-2.98±1.39 ^b	-5.20±6.37 ^b
	24	—	1.94±4.03 ^b	4.55±2.03 ^b	17.59±0.92 ^a	22.74±6.54 ^a
	36	—	8.48±7.19 ^d	24.66±11.17 ^c	96.99±0.61 ^b	98.89±0.37 ^a
	48	—	24.60±14.81 ^b	98.97±0.22 ^a	99.02±0.24 ^a	98.53±0.25 ^a
	60	—	57.38±15.90 ^b	99.02±0.34 ^a	99.19±0.17 ^a	98.99±0.23 ^a
	72	—	76.00±6.05 ^b	99.08±0.29 ^a	98.96±0.32 ^a	99.12±0.33 ^a
	0	25.19±3.61 ^A	25.19±3.61 ^E	25.19±3.61 ^F	25.19±3.61 ^D	25.19±3.61 ^D
	12	38.60±4.00 ^{Bd}	122.60±15.55 ^{Ec}	182.60±20.03 ^{Eb}	316.00±41.40 ^{Ca}	336.00±40.73 ^{Ca}
	24	29.33±2.20 ^{BCd}	217.33±29.28 ^{Dc}	323.70±35.57 ^{Db}	540.67±102.89 ^{Ba}	674.33±56.62 ^{ABa}
	36	22.77±3.45 ^{CDc}	376.67±41.26 ^{Cb}	414.20±29.72 ^{Cb}	727.33±50.21 ^{Aa}	743.33±112.40 ^{Aa}
	48	17.17±4.27 ^{DEc}	450.67±66.49 ^{BCb}	514.00±55.03 ^{Bb}	780.00±87.18 ^{Aa}	740.00±124.90 ^{Aa}
	60	12.20±4.65 ^{EFc}	553.33±80.83 ^{Ab}	626.67±100.66 ^{Ab}	710.00±65.57 ^{Aa}	665.33±48.19 ^{ABab}
	72	9.90±2.62 ^{Ec}	527.33±76.43 ^{ABb}	620.00±52.92 ^{Ab}	760.00±96.44 ^{Aa}	580.00±40.00 ^{Bb}

间无显著差异 ($P<0.05$)；表明藻密度为 2.5×10^5 个/mL 即有较好的 NO_2^- -N 去除效果。在第 60 小时，中密度组具有最高的 NO_2^- -N 去除率，为 99.05% (表 3)；经回归分析， NO_2^- -N 去除率 (Y) 与时间 (X_1)、藻密度 (X_3) 关系为 $Y_{\text{NO}_2^- \text{-N}}=1.746X_1+1.64 \times 10^{-5}X_3-17.250$, $R^2=0.613$ 。

三个处理组藻密度均逐渐上升 (表 3)，低密

度与中密度组在第 48 小时达到平台期；高密度组在第 24 小时达到平台期，36 h 后开始下降；中密度组藻密度在第 48~72 小时显著高于其他 2 组 ($P<0.05$)，其他 2 组之间无显著差异 ($P>0.05$)。综上，在充足的营养条件下，微藻繁殖速度随藻密度增加而加快，而营养缺乏时，微藻生物量会迅速下降。

表 3 不同普通小球藻密度去除 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 效果及藻密度变化Tab. 3 Removal effects of NH_4^+ -N and NO_2^- -N by *C. vulgaris* at different densities and the changes of algal density

	指标 index	时间/h time	0 个/mL	5.0×10^4 个/mL	2.5×10^5 个/mL	1.25×10^6 个/mL
浓度/(mg/L) concentration	氨氮 (NH_4^+ -N) ammonia nitrogen	0	4.535±0.038 ^A	4.550±0.034 ^A	4.598±0.030 ^A	4.606±0.055 ^A
		12	3.910±0.151 ^{Ba}	3.723±0.122 ^{AA}	1.251±0.524 ^{Bb}	0.203±0.034 ^{Bc}
		24	3.400±0.349 ^{BCa}	0.734±0.255 ^{Bb}	0.170±0.034 ^{CDc}	0.173±0.052 ^{Bc}
		36	2.807±0.362 ^{Ca}	0.261±0.085 ^{Cb}	0.206±0.013 ^{CDb}	0.232±0.033 ^{Bb}
		48	1.858±0.267 ^{Da}	0.272±0.088 ^{BCb}	0.254±0.067 ^{Cb}	0.166±0.058 ^{Bb}
		60	1.126±0.108 ^{Ea}	0.148±0.066 ^{Db}	0.115±0.032 ^{Db}	0.155±0.029 ^{Bb}
		72	0.822±0.181 ^{Fa}	0.199±0.058 ^{CDb}	0.151±0.082 ^{CDb}	0.192±0.112 ^{Bb}
	亚硝酸盐氮 (NO_2^- -N) nitrite nitrogen	0	0.166±0.007 ^D	0.163±0.002 ^B	0.165±0.002 ^A	0.167±0.002 ^A
		12	0.179±0.015 ^{CD}	0.220±0.034 ^A	0.240±0.096 ^A	0.227±0.058 ^A
		24	0.197±0.029 ^{BCDa}	0.259±0.046 ^{AA}	0.007±0.005 ^{Bb}	0.016±0.013 ^{Bb}
		36	0.191±0.013 ^{CDa}	0.176±0.061 ^{ABA}	0.007±0.004 ^{BCb}	0.011±0.006 ^{Bb}
去除率/% removal rates	氨氮 (NH_4^+ -N) ammonia nitrogen	48	0.219±0.013 ^{BCa}	0.009±0.002 ^{Cb}	0.008±0.002 ^{Bb}	0.009±0.006 ^{Bb}
		60	0.238±0.013 ^{Ba}	0.004±0.002 ^{Cb}	0.002±0.001 ^{Cb}	0.010±0.008 ^{Bb}
		72	0.316±0.086 ^{AA}	0.011±0.007 ^{Cb}	0.006±0.002 ^{Bb}	0.012±0.006 ^{Bb}
	亚硝酸盐氮 (NO_2^- -N) nitrite nitrogen	0	—	-0.37±1.58	-1.38±0.30	-1.56±1.61
		12	—	4.72±3.48 ^c	67.66±14.31 ^b	94.79±0.96 ^a
		24	—	78.36±7.92 ^b	94.92±1.41 ^a	94.84±1.79 ^a
		36	—	90.70±3.01	92.55±1.24	91.64±1.76
		48	—	85.59±2.73	86.46±1.78	90.77±4.27
		60	—	87.16±4.94	89.94±1.96	86.26±1.89
		72	—	75.13±7.53	80.22±13.02	77.48±9.47
普通小球藻密度/(1.0×10^4 个/mL) <i>C. vulgaris</i> density	氨氮 (NH_4^+ -N) ammonia nitrogen	0	—	1.58±3.53	0.34±3.38	-0.67±3.88
		12	—	-24.08±29.28	-34.65±55.65	-27.74±38.19
		24	—	-35.32±43.88 ^b	96.53±2.31 ^a	91.56±7.95 ^a
		36	—	6.05±37.22 ^b	96.36±2.12 ^a	94.62±3.04 ^a
		48	—	95.78±1.13	96.32±0.92	95.79±2.66
		60	—	98.17±1.00	99.05±0.46	95.89±3.39
		72	—	96.22±2.66	97.92±1.08	95.74±2.82
	亚硝酸盐氮 (NO_2^- -N) nitrite nitrogen	0	—	5.40±1.25 ^{Ec}	24.70±6.26 ^{Db}	124.00±31.32 ^{Ea}
		12	—	28.53±2.34 ^{Dc}	168.67±70.44 ^{Cb}	490.00±60.83 ^{Ba}
		24	—	97.33±27.15 ^{Cc}	285.33±95.86 ^{BCb}	686.67±80.83 ^{AA}
		36	—	210.00±52.57 ^{Bc}	356.00±79.70 ^{Bb}	690.00±30.00 ^{AA}
		48	—	473.33±61.10 ^{Aab}	603.33±106.93 ^{AA}	356.67±70.95 ^{CDb}
		60	—	420.67±71.00 ^{Ab}	790.00±105.83 ^{AA}	410.00±45.83 ^{BCb}
		72	—	452.00±65.57 ^{Ab}	796.67±90.18 ^{AA}	396.67±40.41 ^{BCb}

2.4 曝气对 NO_2^- -N 的去除效果及水体溶解氧(DO)变化

图 1-a 为曝气对 NO_2^- -N 的去除效果, 3 种浓

<https://www.china-fishery.cn>

度 NO_2^- -N 均未呈现出下降趋势。而 12 h 后溶解氧含量达到 9 mg/L 以上(图 1-b), 说明短时曝气无法去除 NO_2^- -N, 即空气中的氧气无法直接氧化

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

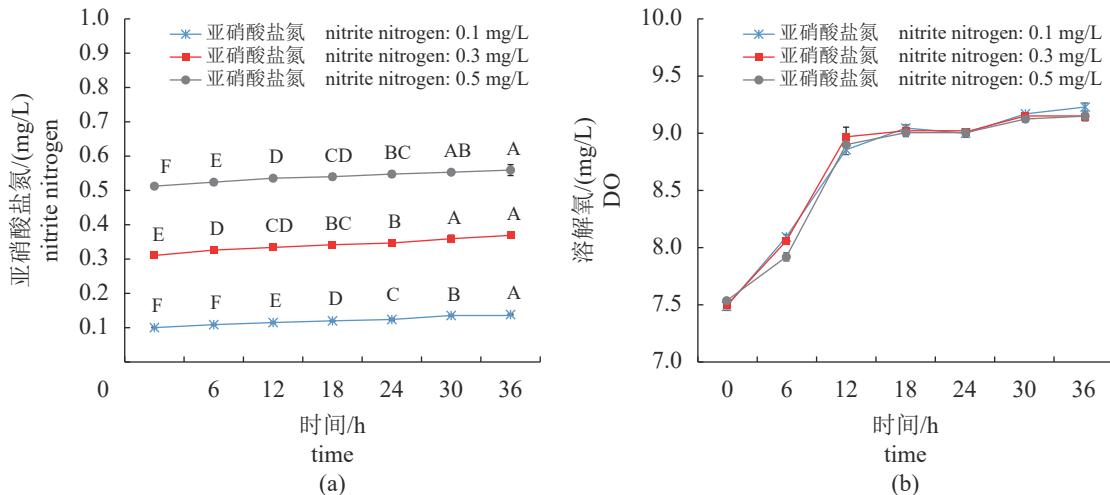


图 1 曝气对不同初始浓度 NO_2^- -N 含量、溶解氧的影响

不同大写字母表示组内不同时间点指标差异显著 ($P<0.05$), 下同。

Fig. 1 Effects of aeration on NO_2^- -N content and dissolved oxygen at different initial concentrations

Different uppercase letters indicated temporal differences in a given group ($P<0.05$), the same below.

NO_2^- -N。3 组 DO 变化趋势一致, 先快速上升, 随后在平台期上下波动 (图 1-b)。

2.5 普通小球藻对 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 的去除效果及其变化规律

藻组 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N 含量分别从 0、12 和 18 h 后开始下降 (图 2-a-c); 最高去除率分别为 94.73%、92.24% 和 98.99% (表 4)。表明普通小球藻能有效去除氮无机盐, 去除顺序为 NH_4^+ -N> NO_3^- -N> NO_2^- -N。结合 0~12 h 藻组溶解氧含量迅速升高 (图 2-d), 而此时间段 NO_3^- -N、 NO_2^- -N 浓度均未发生显著变化, 表明普通小球藻光合作用产生的氧气无法将 NO_2^- -N 氧化成 NO_3^- -N。

实验期间, 普通小球藻数目逐步上升 (图 2-f), 藻组与对照组 DO、pH 均显著上升 ($P<0.05$), 但藻组上升幅度大于对照组, 其中藻组 DO 含量在 12~30 h 均显著高于对照组 ($P<0.05$; 图 2-d), 藻组 pH 在 6~30 h 均显著大于对照组 ($P<0.05$; 图 2-e)。综上, 普通小球藻利用氮盐繁殖时有利于提高水体 DO 与 pH。

2.6 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 下降过程中普通小球藻亚硝酸盐还原酶活性变化

第 6 和 24 小时分别为 NH_4^+ -N 与 NO_2^- -N 下降过程, 小球藻细胞内亚硝酸盐还原酶活性分别为 (56.59 ± 3.56) ng/L 和 (130.62 ± 7.41) ng/L, 二者差异显著 ($P<0.05$; 图 3)。实验结果表明, 普通小球藻细胞内存在亚硝酸盐还原酶, NO_2^- -N 可能在该

酶的作用下被还原成氨氮, 由此造成 24~30 h 氨氮去除率轻微下降 (表 4)。

3 讨论

3.1 普通小球藻对水体中无机氮的去除

本研究发现在适宜的光照条件下, 普通小球藻能有效去除氮营养盐, 充足的碳源可能是必要保障。光照条件下, 曝气能够提高藻对 NO_2^- -N 的去除速率, 可能是 CO_2 作为额外碳源增加了水体碳氮比, 削弱了普通小球藻繁殖的碳限制 [26-27]。类似地, 王玮蔚等 [28] 发现, 随着 HCO_3^- 浓度的增加, 普通小球藻生长逐渐加快。研究表明, 普通小球藻在光照下能利用无机碳源进行自养繁殖, 同时普通小球藻还能够直接利用葡萄糖、D-果糖等有机碳源进行异养繁殖 [29-30]。Babaei 等 [31] 以葡萄糖为碳源, 在黑暗环境中异养培养普通小球藻能有效去除 NH_4^+ -N。综上, 在生产上同时提供无机和有机碳源可能加速小球藻去除无机氮的效果, 但具体效果还需要进一步的研究。

与 Syrett [32] 研究结果一致, 本研究发现普通小球藻对 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 均具有较强的去除能力, 且普通小球藻利用氮营养盐顺序为 NH_4^+ -N> NO_3^- -N> NO_2^- -N。在前人的研究中也有不同的报道, 杨坤等 [33] 研究小球藻净化养殖水体水质时, 发现 NO_3^- -N 无法去除。刘娥等 [34] 利用菌藻系统处理水产养殖尾水时, 发现单藻条件下无法去除 NO_2^- -N。秦璐等 [35] 研究小球藻对罗非鱼养

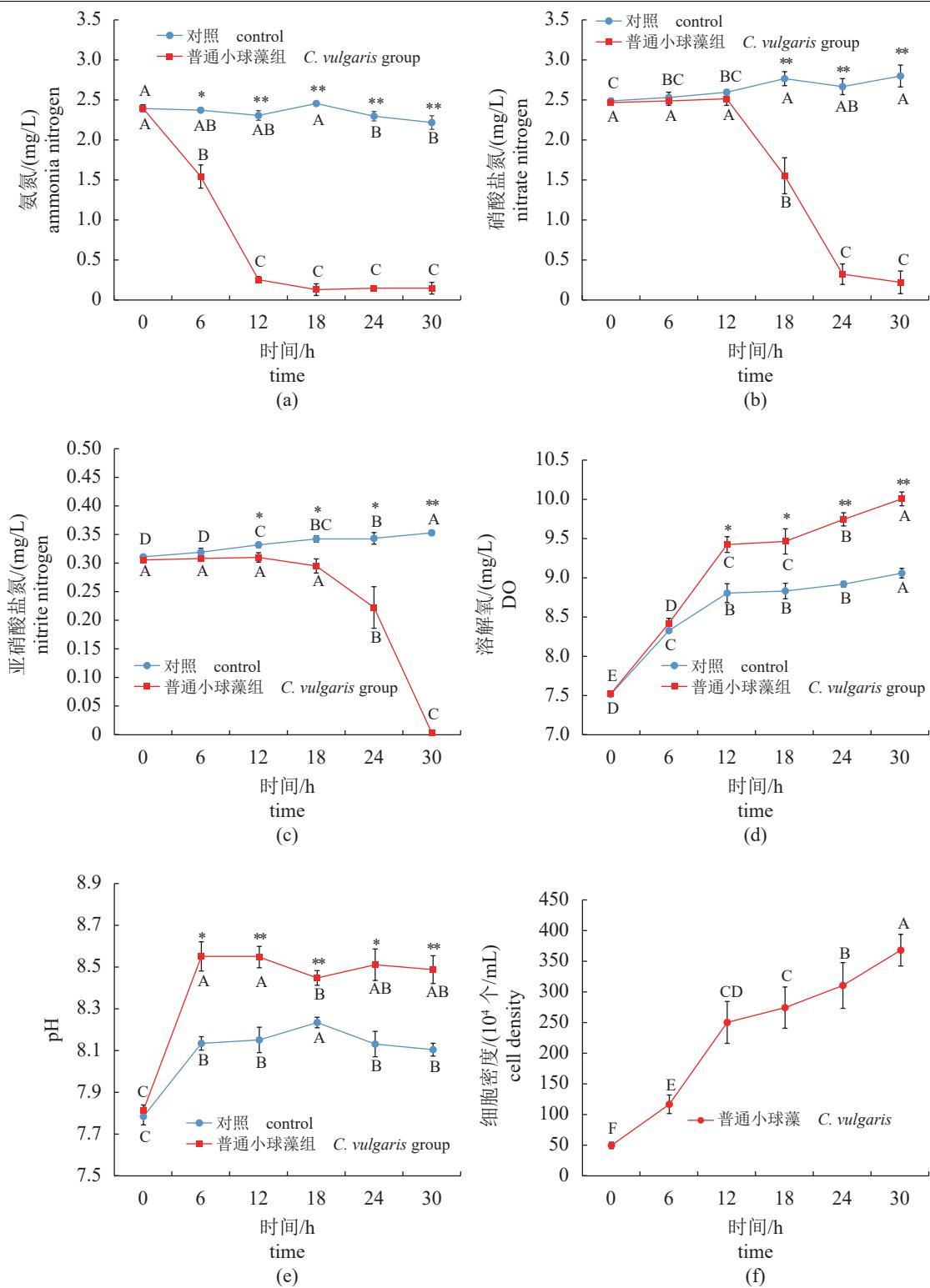


图 2 普通小球藻对 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 与 NO_3^- -N 去除效果及水体中 DO、pH、藻密度变化

“*”表示同一时间点各处理组间差异显著($P<0.05$)，“**”表示同一时间点各处理组间差异极显著($P<0.01$)，下同。

Fig. 2 Removal effects of *C. vulgaris* on NH_4^+ -N, NO_2^- -N and NO_3^- -N and the changes of DO, pH and algae density in water

"*" means significant difference between treatment groups at the same time point ($P<0.05$), "***" means extremely significant difference between treatment groups at the same time point ($P<0.01$), the same below.

表 4 普通小球藻对 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 与 NO_3^- -N 的去除率变化

Tab. 4 Removal rates of NH_4^+ -N, NO_2^- -N 与 NO_3^- -N by *C. vulgaris*

时间/h time	氨氮(NH_4^+ -N) ammonia nitrogen	硝酸盐氮(NO_3^- -N) nitrate nitrogen	亚硝酸盐氮(NO_2^- -N) nitrite nitrogen	%
0	$-0.15 \pm 1.40^{\text{C}}$	$0.79 \pm 1.11^{\text{C}}$	$0.54 \pm 0.37^{\text{C}}$	
6	$34.94 \pm 6.44^{\text{Ba}}$	$1.71 \pm 0.56^{\text{Cb}}$	$3.45 \pm 0.55^{\text{Cb}}$	
12	$88.99 \pm 1.34^{\text{Aa}}$	$3.15 \pm 3.87^{\text{Cb}}$	$6.62 \pm 3.76^{\text{Cb}}$	
18	$94.73 \pm 2.98^{\text{Aa}}$	$43.93 \pm 6.88^{\text{Bb}}$	$13.82 \pm 3.19^{\text{Cc}}$	
24	$93.57 \pm 0.29^{\text{Aa}}$	$88.02 \pm 4.76^{\text{Aa}}$	$35.24 \pm 12.69^{\text{Bb}}$	
30	$93.34 \pm 3.17^{\text{A}}$	$92.24 \pm 4.82^{\text{A}}$	$98.99 \pm 0.08^{\text{A}}$	

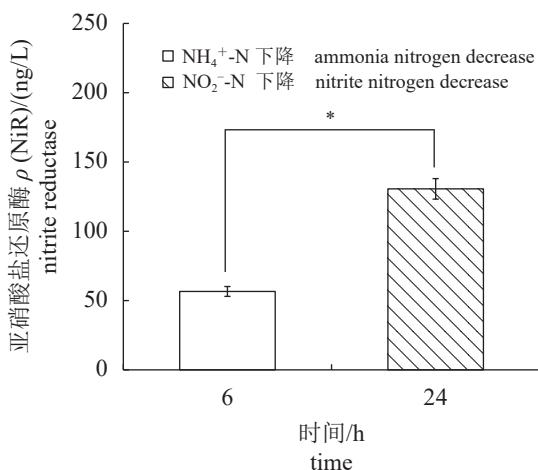


图 3 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 下降过程中普通小球藻亚硝酸盐还原酶活性变化

Fig. 3 Changes of nitrite reductase activity during NH_4^+ -N and NO_2^- -N descending process

殖水体水质的影响, 结果表明小球藻对 NO_2^- -N 与 NO_3^- -N 均无显著去除效果。上述研究与本研究结果不符的原因在于普通小球藻利用氮盐具有选择性, 当水体中 NH_4^+ -N 持续存在时, 普通小球藻仅优先利用 NH_4^+ -N, 导致 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 去除效果不显著。然而, 刘梅等^[36]利用蛋白核小球藻净化凡纳滨对虾养殖废水, 发现蛋白核小球藻优先去除 NO_2^- -N 与 NO_3^- -N, 这可能是由于 NH_4^+ -N 浓度超出了藻类的理想吸收范围导致的; Ohmori 等^[37]研究表明, 氨氮浓度降低到一定浓度时, 微藻对氨氮的吸收速率显著提高。

3.2 光照强度与初始藻密度对 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 的去除效果

本实验中对照组 NH_4^+ -N 含量降低与曝气导致的 NO_2^- -N 含量升高, 可能是 NH_4^+ -N 挥发与被氧化所致^[38-40]。在有氧环境下, 亚硝酸细菌将 NH_4^+ -N 氧化成 NO_2^- -N, 而硝酸细菌繁殖周期相

对较长, 不能及时将 NO_2^- -N 氧化成 NO_3^- -N, 因此导致 NH_4^+ -N 降低与 NO_2^- -N 堆积^[41-42]。

与郑娇莉等^[43]研究结果相似, 本实验结果显示, 光照强度为 18 000 lx 时 NH_4^+ -N 去除率可达 96.23%, 接种初始藻密度为 2.5×10^5 个/mL 时 NH_4^+ -N 去除率达 94.92%, 而对 NO_2^- -N 去除率均接近 100%; 效果优于刘盼等^[18]、杨坤等^[33]与焦蓉婷等^[44]实验中 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 的去除效果, 表明藻类去除氮盐效果与藻种类、环境等密切相关。本研究表明, 在 18 000 lx 时 NH_4^+ -N 去除率最高, 在 9 000 lx 时 NO_2^- -N 去除率最高, 初始藻密度在 2.5×10^5 个/mL 时对 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 去除率最高, 但光照与藻密度交互作用对氮盐的去除效果尚需进一步研究。

3.3 NO_2^- -N 的同化途径

本研究显示, 曝气条件下溶解氧含量达到 9 mg/L 以上 NO_2^- -N 含量未发生显著变化, 同时在普通小球藻快速产氧期 (0~12 h) 时水体中 NO_2^- -N 与 NO_3^- -N 含量未发生显著变化, 表明氧气无法氧化 NO_2^- -N, 这可能与 NO_2^- -N 自身具有一定强度的氧化性有关^[45-46]。在生产中, 开增氧机能降低养殖池塘 NO_2^- -N 含量, 其原因可能是硝化细菌将 NO_2^- -N 氧化所致, 因为在有氧环境中硝化细菌能够加速将 NO_2^- -N 氧化至 NO_3^- -N^[47]。本实验中 NH_4^+ -N 下降阶段 (6 h) 亚硝酸盐还原酶活性较低 [(56.59 ± 3.56) ng/L], 而在 NO_2^- -N 下降阶段 (24 小时) 亚硝酸盐还原酶活性升高了 2.3 倍。因此, 本实验中小球藻去除 NO_2^- -N 的机理: 藻细胞内亚硝酸盐还原酶将 NO_2^- -N 还原成 NH_4^+ -N 进而被同化吸收。

3.4 普通小球藻对水体 DO、pH 影响及藻密度变化

藻类通式为 $\text{C}_{106}\text{H}_{263}\text{O}_{110}\text{N}_{16}\text{P}^{[48]}$, 与其他藻类一样, 普通小球藻的扩增同时需要碳源和氮源, 二氧化碳作为小球藻光合作用的碳源被同化吸收, 导致水体中溶解 CO_2 含量变少, 其电离平衡向生成 CO_2 的方向移动, 造成水体中的 H^+ 大量消耗, pH 升高; 同时光合作用释放出大量的氧气, 增加水体中溶解氧含量, 因此, 本实验中普通小球藻组 DO 与 pH 显著高于对照组。本研究中小球藻在吸收无机氮源时, 生物量迅速增长, 消耗了水体中的营养盐, 限制了后期普通小球藻的增殖^[49-51], 表现为藻密度相对稳定。

3.5 普通小球藻在水产养殖产业上的应用

养殖水体添加普通小球藻后, 普通小球藻可以迅速同化吸收无机氮离子, 合成自身生物量, 此时氮的走向为无机氮→小球藻; 小球藻被滤食性鱼类或轮虫等浮游动物摄食, 氮走向变为小球藻(植物蛋白)→水生动物(动物蛋白)。通过普通小球藻对水体中氮营养盐的吸收利用, 可有效防止氮营养盐含量过高引起蓝藻爆发^[52-53]。普通小球藻通过光合作用将水体中溶解的CO₂作为碳源同化吸收, 保持水体弱碱性环境, 降低有害细菌繁殖^[54]; 同时光合作用释放氧气, 增加水体溶解氧含量, 为养殖动物提供生命保障, 也为硝化作用提供必要条件, 并有效预防NO₃⁻-N在缺氧环境下被反硝化为NO₂⁻-N, 减少对养殖动物的危害^[55-57]。光照条件下曝气可显著提高普通小球藻对NO₂⁻-N的去除速率与去除率, 同时可促进NH₄⁺-N的去除, 因此, 利用普通小球藻处理富营养化养殖水体时可配合使用增氧机。适当的藻密度增加有利于提高NH₄⁺-N与NO₂⁻-N去除速率, 因此, 应对养殖池塘NH₄⁺-N、NO₂⁻-N骤然升高, 应选择合理增加藻体密度, 而预防养殖池塘NH₄⁺-N、NO₂⁻-N升高, 选择较低藻密度处理即可。利用普通小球藻处理工厂化养殖尾水时, 通过合理提高光照强度与藻密度, 同时给予适当强度的曝气条件, 可加快水体中氮盐的去除以改善水质。

4 结论

光照条件下普通小球藻能够有效去除水体中NH₄⁺-N、NO₂⁻-N与NO₃⁻-N, 其利用顺序为NH₄⁺-N>NO₃⁻-N>NO₂⁻-N。普通小球藻吸收亚硝酸盐过程中, 其细胞内亚硝酸盐还原酶活性显著升高。光照增强与藻密度增加对氮盐的去除具有一定的促进作用, 光照条件下曝气可显著提高普通小球藻对NO₂⁻-N的去除速率与去除率。基于池塘水体原位生物修复, 本研究结果可为绿色健康养殖提供理论支撑。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 孙丽颖, 张木子, 黎明, 等. 急性氨氮胁迫对黄颡鱼组织抗氧化酶活性及HSP70和HSP90基因mRNA表达水平的影响[J]. 水产学报, 2020, 44(5): 707-714.

<https://www.china-fishery.cn>

Sun L Y, Zhang M Z, Li M, et al. Effects of acute ammonia stress on antioxidant enzyme activity and mRNA expression levels of HSP70 and HSP90 genes in tissues of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(5): 707-714 (in Chinese).

- [2] 王梦杰, 马本贺, 王玮欣, 等. 慢性氨氮胁迫对台湾泥鳅幼鱼生长、免疫及组织结构的影响[J]. *水生生物学报*, 2021, 45(2): 267-274.

Wang M J, Ma B H, Wang W X, et al. Effects of chronic ammonia stress on growth, immunity and histological structure of juvenile Taiwan loach (*Paramisgurnus dabryanus* ssp. Taiwan)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(2): 267-274 (in Chinese).

- [3] Cao S P, Zhao D F, Huang R, et al. The influence of acute ammonia stress on intestinal oxidative stress, histology, digestive enzymatic activities and PepT1 activity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100722.

- [4] Duan Y F, Liu Q S, Wang Y, et al. Impairment of the intestine barrier function in *Litopenaeus vannamei* exposed to ammonia and nitrite stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 279-288.

- [5] Yang X Z, Shi A Y, Song Y M, et al. The effects of ammonia-N stress on immune parameters, antioxidant capacity, digestive function, and intestinal microflora of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, and the protective effect of dietary supplement of melatonin[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C:Toxicology & Pharmacology*, 2021, 250: 109127.

- [6] 张云龙, 张海龙, 王凌宇, 等. 氨氮对鱼类毒性的影响因子及气呼吸型鱼类耐氨策略[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(5): 1157-1168.

Zhang Y L, Zhang H L, Wang L Y, et al. Impact factors of ammonia toxicity and strategies for ammonia tolerance in air-breathing fish: a review[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(5): 1157-1168 (in Chinese).

- [7] Ciji A, Akhtar M S. Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: a review[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(2): 878-908.

- [8] 张文伟, 黄忠, 段亚飞, 等. 不同消毒剂对凡纳滨对虾育苗水质和菌群结构的影响[J]. *南方水产科学*, 2021, 17(2): 1-10.

Zhang W W, Huang Z, Duan Y F, et al. Effects of different disinfectants on water quality and microbial community structure of *Litopenaeus vannamei*[J]. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(2): 1-10 (in Chinese).

- [9] Ghernaout D, Alghamdi A S, Ghernaout B. Microorganisms' killing: chemical disinfection vs. electrodisinfection[J]. *Applied Engineering*, 2019, 3(1): 13-19.
- [10] Sanawar H, Xiong Y H, Alam A, et al. Chlorination or monochloramination: balancing the regulated trihalomethane formation and microbial inactivation in marine aquaculture waters[J]. *Aquaculture*, 2017, 480: 94-102.
- [11] Powell A, Scolding J W S. Direct application of ozone in aquaculture systems[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(2): 424-438.
- [12] Carneiro W F, Castro T F D, Orlando T M, et al. Replacing fish meal by *Chlorella* sp. meal: effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters and digestive enzymes[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735612.
- [13] John E M, Krishnapriya K, Sankar T V. Treatment of ammonia and nitrite in aquaculture wastewater by an assembled bacterial consortium[J]. *Aquaculture*, 2020, 526: 735390.
- [14] Ruiz P, Vidal J M, Sepúlveda D, et al. Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(3): 1478-1494.
- [15] Ahmad M T, Shariff M, Yusoff F M, et al. Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(1): 328-346.
- [16] 马瑞阳, 葛成军, 王珺, 等. 藻-菌单一及共生系统对海水养殖尾水的净化作用[J]. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1126-1135.
- Ma R Y, Ge C J, Wang J, et al. Purification of mariculture wastewater by utilizing single and symbiotic systems of microalgae-bacteria treatment technology[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1126-1135 (in Chinese).
- [17] 周鸣, 汤红妍, 贾晓平, 等. 固化菌藻系统处理养殖废水中氨氮的研究[J]. *工业水处理*, 2016, 36(8): 20-23.
- Zhou M, Tang H Y, Jia X P, et al. Study on the treatment of ammonia nitrogen in aquacultural wastewater by the immobilized algal-bacterial system[J]. *Industrial Water Treatment*, 2016, 36(8): 20-23 (in Chinese).
- [18] 刘盼, 贾成霞, 杨慕, 等. 2种微藻对养殖水体中氨氮和亚硝态氮的净化作用[J]. 水产科学, 2018, 37(3): 389-393.
- Liu P, Jia C X, Yang M, et al. Removal of ammonia and nitrite nitrogen in aquaculture water by two species of microalgae[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(3): 389-393 (in Chinese).
- [19] Jia H J, Yuan Q Y. Ammonium removal using algae-bacteria consortia: the effect of ammonium concentration, algae biomass, and light[J]. *Biodegradation*, 2018, 29(2): 105-115.
- [20] Li S H, Zheng X C, Chen Y, et al. Nitrite removal with potential value-added ingredients accumulation via *Chlorella* sp. L38[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 123743.
- [21] 刘祥, 杨美娟, 散而复, 等. 不同营养模式下固定化斜生栅藻和普通小球藻氨氮去除能力对比分析[J]. *环境科学研究*, 2020, 33(8): 1869-1876.
- Liu X, Yang M J, San E F, et al. Comparative analysis of ammonia nitrogen removal capacity of immobilized *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* under different trophic modes[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33(8): 1869-1876 (in Chinese).
- [22] 许元钊, 张春梅, 毕永红, 等. 饲料溶失对养殖水质的影响及其处置技术[J]. *水产学杂志*, 2020, 33(4): 50-58.
- Xu Y Z, Zhang C M, Bi Y H, et al. Effects of feed dissolution on water quality and its treatment technique in aquaculture[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2020, 33(4): 50-58 (in Chinese).
- [23] Guerrero M G, Vega J M, Losada M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1981, 32(1): 169-204.
- [24] 余姗, 薛利红, 花昀, 等. 水热炭减少稻田氨挥发损失的效果与机制[J]. *环境科学*, 2020, 41(2): 922-931.
- Yu S, Xue L H, Hua Y, et al. Effect of applying hydrochar for reduction of ammonia volatilization and mechanisms in paddy soil[J]. *Environmental Science*, 2020, 41(2): 922-931 (in Chinese).
- [25] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 258-276.
- State Environmental Protection Administration of China. Monitoring and analytic methods of water and wastewater[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 258-276 (in Chinese).
- [26] Singhaswan S, Choorit W, Sirisansaneeyakul S, et al. Carbon-to-nitrogen ratio affects the biomass composition and the fatty acid profile of heterotrophically grown *Chlorella* sp. TISTR 8990 for biodiesel production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 216: 169-177.
- [27] Zheng H L, Liu M Z, Lu Q, et al. Balancing carbon/nitrogen ratio to improve nutrients removal and algal biomass production in piggery and brewery wastewaters[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 479-486.

- [28] 王玮蔚, 孙雪, 王冬梅, 等. 盐度和无机碳对蛋白核小球藻生长、胞外碳酸酐酶活性及其基因表达的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(7): 920-928.
- Wang W W, Sun X, Wang D M, et al. Effects of salinity and inorganic carbon on the growth, extracellular carbonic anhydrase activity and *ca* gene expression of *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(7): 920-928 (in Chinese).
- [29] 王军, 李元广, 王伟良, 等. 以异养细胞作为种子的椭圆小球藻产油脂光自养培养优化[J]. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1639-1643.
- Wang J, Li Y G, Wang W L, et al. Optimization of photoautotrophic lipid production of *Chlorella ellipsoidea* seeded with heterotrophic cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(10): 1639-1643 (in Chinese).
- [30] Chen T P, Liu J, Guo B B, et al. Light attenuates lipid accumulation while enhancing cell proliferation and starch synthesis in the glucose-fed oleaginous microalga *Chlorella zoefingiensis*[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 14936.
- Babaei A, Mehrnia M R, Shayegan J, et al. Evaluation of nutrient removal and biomass production through mixotrophic, heterotrophic, and photoautotrophic cultivation of *Chlorella* in nitrate and ammonium wastewater[J]. International Journal of Environmental Research, 2018, 12(2): 167-178.
- Syrett P J. Nitrogen metabolism of microalgae[M]//Platt T. Physiological bases of phytoplankton ecology. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Science, 1981: 182-210.
- [33] 杨坤, 卢文轩. 小球藻对养殖水体水质净化作用的研究[J]. 环境与发展, 2014, 26(7): 62-64,67.
- Yang K, Lu W X. Study on water quality purification of *Chlorella vulgaris* in aquaculture water[J]. Environment and Development, 2014, 26(7): 62-64,67 (in Chinese).
- [34] 刘娥, 刘兴国, 王小冬, 等. 固定化藻菌净化水产养殖废水效果及固定化条件优选研究[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(3): 422-431.
- Liu E, Liu X G, Wang X D, et al. Study on efficiency of purifying the aquacultural waste water with immobilized alga-bacteria system and immobilization conditions optimization[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(3): 422-431 (in Chinese).
- [35] 秦璐, 陈曦, 裴丽萍, 等. 小球藻对罗非鱼养殖水体水质及细菌群落结构的影响[J]. 中国农学通报, 2021, 37(12): 112-120.
- Qin L, Chen X, Qiu L P, et al. Effect of *Chlorella* on the quality and bacterial community structure of GIFT tilapia culture water[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(12): 112-120 (in Chinese).
- [36] 刘梅, 原居林, 何海生, 等. 微藻在南美白对虾养殖废水中的生长及净化效果[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(4): 866-872.
- Liu M, Yuan J L, He H S, et al. Removal of nitrogen and phosphorus by eight strains of microalgae and their growth characteristics in *Penaeus vannamei* sewage[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2018, 24(4): 866-872 (in Chinese).
- [37] Ohmori M, Ohmori K, Strotmann H. Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*[J]. Archives of Microbiology, 1977, 114(3): 225-229.
- [38] 乔卫龙. 曝气生物滤池工艺处理淡水养殖废水性能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- Qiao W L. Research on performance of biological aerated filter process for purification of fresh aquaculture wastewater[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019 (in Chinese).
- [39] García-González M C, Vanotti M B, Szogi A A. Recovery of ammonia from swine manure using gas-permeable membranes: effect of aeration[J]. Journal of Environmental Management, 2015, 152: 19-26.
- [40] 杜旭. 曝气对城市重污染河道水体氨挥发的影响 [D]. 南京: 南京师范大学, 2012.
- Du X. Effect of aeration on ammonia stripping in heavily polluted urban river[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2012 (in Chinese).
- [41] 乔昕, 王博, 郭媛媛, 等. 羟胺对氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌的竞争性选择[J]. 环境科学, 2020, 41(8): 3765-3772.
- Qiao X, Wang B, Guo Y Y, et al. Competitive selection of hydroxylamine on ammonia oxidizing bacteria and nitrite oxidizing bacteria[J]. Environmental Science, 2020, 41(8): 3765-3772 (in Chinese).
- [42] 马英, 钱鲁闽, 王永胜, 等. 硝化细菌分子生态学研究进展[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 872-879.
- Ma Y, Qian L M, Wang Y S, et al. Progress in molecular ecology of nitrifying bacteria[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(5): 872-879 (in Chinese).
- [43] 郑娇莉, 曹春霞, 黄大野, 等. 藻菌固定化对模拟养殖废水氮磷的去除效果[J]. 环境科学与技术, 2020, 43(S2): 107-112.
- Zheng J L, Cao C X, Huang D Y, et al. Effect of immobilized bacterial-algal on nitrogen and phosphorus

- removal in simulated aquaculture wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 43(S2): 107-112 (in Chinese).
- [44] 焦蓉婷, 沈强, 叶捷. 菌藻联合处理罗氏沼虾育苗废水的效果[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(12): 2286-2288.
- Jiao R T, Shen Q, Ye J. Effects of bacteria-algae treatment on wastewater from breeding of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2018, 59(12): 2286-2288 (in Chinese).
- [45] Cortese-Krott M M, Fernandez B O, Kelm M, et al. On the chemical biology of the nitrite/sulfide interaction[J]. *Nitric Oxide*, 2015, 46: 14-24.
- Villaverde A, Parra V, Estévez M. Oxidative and nitrosative stress induced in myofibrillar proteins by a hydroxyl-radical-generating system: impact of nitrite and ascorbate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(10): 2158-2164.
- [47] 王艺雅, 张其中. 一株光合细菌的分离鉴定及该菌对氨氮和亚硝态氮的去除作用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2512-2528.
- Wang Y Y, Zhang Q Z. Isolation and identification of a photosynthetic bacterium strain and removal of ammonia nitrogen and nitrite by the bacterium species in water[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2512-2528 (in Chinese).
- [48] Stumm W, Sulzberger B. The cycling of iron in natural environments: considerations based on laboratory studies of heterogeneous redox processes[J]. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1992, 56(8): 3233-3257.
- 高春蕾, 孙萍, 贾智慧, 等. 温度和营养盐限制对网状原角藻生长与产毒的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(12): 4217-4226.
- Gao C L, Sun P, Jia Z H, et al. Effects of temperature and nutrient limitation on growth and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(12): 4217-4226 (in Chinese).
- [49] 夏荣霜, 徐兆礼, 高倩. 东海原甲藻在氮、磷限制胁迫下的补偿生长[J]. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1200-1210.
- Xia R S, Xu Z L, Gao Q. Compensatory growth of *Prorocentrum donghaiense* Lu under nitrogen and phosphorus deficiency stress[J]. *Journal of Fishery Sciences* of China, 2014, 21(6): 1200-1210 (in Chinese).
- [50] Ratomski P, Hawrot-Paw M. Influence of nutrient-stress conditions on *Chlorella vulgaris* biomass production and lipid content[J]. *Catalysts*, 2021, 11(5): 573.
- Wagner N D, Quach E, Buscho S, et al. Nitrogen form, concentration, and micronutrient availability affect microcystin production in cyanobacterial blooms[J]. *Harmful Algae*, 2021, 103: 102002.
- [51] 杨柳燕, 杨欣妍, 任丽曼, 等. 太湖蓝藻水华暴发机制与控制对策[J]. *湖泊科学*, 2019, 31(1): 18-27.
- Yang L Y, Yang X Y, Ren L M, et al. Mechanism and control strategy of cyanobacterial bloom in Lake Taihu[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2019, 31(1): 18-27 (in Chinese).
- [52] 曹海鹏, 温乐夫, 杨移斌, 等. 克氏原螯虾源致病性豚鼠气单胞菌的分离及其生物学特性[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(6): 1047-1053.
- Cao H P, Wen L F, Yang Y B, et al. Isolation and biological characteristics of an *Aeromonas caviae* pathogen from *Procambarus clarkii*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1047-1053 (in Chinese).
- [53] 牛晚霞, 袁林江, 有小龙, 等. 进水亚硝氮限制下Anammox去除氨氮研究[J]. *中国环境科学*, 2021, 41(7): 3212-3220.
- Niu W X, Yuan L J, You X L, et al. Study on removal of ammonia nitrogen by Anammox with or free of nitrite nitrogen[J]. *China Environmental Science*, 2021, 41(7): 3212-3220 (in Chinese).
- [54] 申慧彦, 汪河, 姚亮, 等. 硝酸盐对短程反硝化过程中亚硝酸盐积累影响[J]. *环境科学与技术*, 2021, 44(5): 1-7.
- Shen H Y, Wang H, Yao L, et al. Influence of nitrate(NO_3^- -N) on nitrite(NO_2^- -N) accumulation in partial denitrification process[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 44(5): 1-7 (in Chinese).
- [55] 罗国芝, 邵李娜. 水产养殖活动中 N_2O 的排放研究进展[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 604-619.
- Luo G Z, Shao L N. Analysis of current research status and prospects of N_2O emission from aquaculture production[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 604-619 (in Chinese).

Removal effect of NH_4^+ -N and NO_2^- -N by *Chlorella vulgaris* and the assimilation pathway of NO_2^- -N

SHEN Lei¹, GAO Jiancao², NIE Zhijuan², ZHENG Zhaowei³, HU Jiawen³, SHAO Nailin², SUN Yi², XU Gangchun^{1,2,3*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

Abstract: Since the non-ionic ammonia and ionic ammonia can be converted into each other, in aquaculture, ammonia nitrogen (NH_4^+ -N) and nitrite nitrogen (NO_2^- -N) are the key factors that affect the growth and development of aquatic animals. Therefore, the removal of NH_4^+ -N and NO_2^- -N in aquaculture water is of great significance to ensure the health of aquaculture animals. As we all know, microorganisms and algae play important roles in maintaining the ecological balance of aquaculture ponds. It has been proved that *Chlorella* had the ability of purifying aquaculture water, with different *Chlorella* species different removal efficiency on NH_4^+ -N and NO_2^- -N. *Chlorella vulgaris* is widely used in aquaculture, however, we know little about the removal effect on nitrogen nutrient especially NO_2^- -N by *C. vulgaris*. Given the shortage of effective ecological control measures in aquaculture, it is of great significance to illustrate the removal effect of NH_4^+ -N and NO_2^- -N by *C. vulgaris* and related influencing factors. Aiming to evaluate the application prospect of *C. vulgaris* in purifying NH_4^+ -N and NO_2^- -N in water, in the present study, *C. vulgaris* was taken as the research object and feed wastewater was taken as the culture medium. We firstly detected the cell density of *C. vulgaris* and the temporal variations of NH_4^+ -N and NO_2^- -N in water under aeration, light, combined light and aeration conditions. Then we analyzed the effects of time (X_1), light intensity (X_2) or initial *C. vulgaris* density (X_3) on the removal rates of NH_4^+ -N and NO_2^- -N (Y). Finally, we evaluated the removal efficiency of NH_4^+ -N, NO_2^- -N and NO_3^- -N from water by *C. vulgaris*, and we analyzed the potential pathway of NO_2^- -N assimilation by *C. vulgaris*. The results showed that *C. vulgaris* could remove NH_4^+ -N, NO_2^- -N and NO_3^- -N significantly under suitable light conditions. The NH_4^+ -N removal rate reached up to 18 000 lx (96.23%), and NO_2^- -N removal rate reached up to 99.19% at 9 000 lx. The initial density of *C. vulgaris* at 2.5×10^5 cells/mL had the highest removal rates for NH_4^+ -N and NO_2^- -N, accounting 94.92% and 99.05%, respectively. The regression equation of NH_4^+ -N and NO_2^- -N removal rates with treatment time and light intensity was as follows: $Y_{\text{NH}_4^+\text{-N}} = 1.189X_1 + 5.79 \times 10^{-4}X_2 + 24.158$ ($R^2=0.664$), $Y_{\text{NO}_2^-\text{-N}} = 1.562X_1 + 1.909 \times 10^{-3}X_2 - 26.078$ ($R^2=0.762$). The regression equation of NH_4^+ -N and NO_2^- -N removal rates with treatment time and initial *C. vulgaris* density was as follows: $Y_{\text{NH}_4^+\text{-N}} = 0.888X_1 + 1.02 \times 10^{-5}X_3 + 32.555$ ($R^2=0.408$), $Y_{\text{NO}_2^-\text{-N}} = 1.746X_1 + 1.64 \times 10^{-5}X_3 - 17.250$ ($R^2=0.613$). The order of nitrogen removal by *C. vulgaris* was $\text{NH}_4^+\text{-N} > \text{NO}_3^-\text{-N} > \text{NO}_2^-$ -N, and the activity of nitrite reductase in *C. vulgaris* at NH_4^+ -N decline stage was significantly lower than that at NO_2^- -N decline stage. In conclusion, *C. vulgaris* can significantly reduce the contents of NH_4^+ -N and NO_2^- -N in water, and NO_2^- -N may be reduced to NH_4^+ -N by intracellular nitrite reductase and assimilated by *C. vulgaris*. These results provide scientific basis for in-situ bioremediation of aquaculture waters.

Key words: *Chlorella vulgaris*; ammonia nitrogen; nitrite nitrogen; assimilation pathway; nitrite reductase

Corresponding author: XU Gangchun. E-mail: xugc@ffrc.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900301); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2021XT0701)