

# 3种细菌对小球藻生长和脱氮除磷效率的影响

肖伟<sup>1</sup>, 吴红艳<sup>1</sup>, 毕永红<sup>2</sup>

(1. 湖北工业大学土木建筑与环境学院, 湖北 武汉 430068;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点研究室, 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 鉴于水资源日益紧缺且水污染问题日渐加剧的现状, 藻菌共生系统作为一种节能环保的污水处理方式, 有助于提高污水处理效率。通过人工模拟城市污水, 选取3种污水处理中常用细菌地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)与小球藻构建藻菌共生系统, 探究了不同细菌对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* FACHB-5)生长以及污水脱氮除磷效率的影响。结果显示, 在3种藻菌共生系统中, 地衣芽孢杆菌为小球藻促生长菌, 而枯草芽孢杆菌对小球藻生长有抑制作用, 沼泽红假单胞菌对小球藻生长无显著影响( $P > 0.05$ ), 且沼泽红假单胞菌的生长受到小球藻的显著抑制( $P < 0.05$ )。在3个共生系统中, 地衣芽孢杆菌-小球藻共生系统中小球藻生物量最高, 第2天水体的总氮和总磷去除率分别达到79.84%和83.48%, 显著高于小球藻单独培养试验组( $P < 0.05$ )。研究表明, 3种藻菌共生系统中, 细菌与微藻间的关系具有特异性, 应选择适宜的促生菌与微藻共培养, 合适的藻菌共生系统可提高水体总氮和总磷的去除率。

**关键词:** 藻菌共生; 蛋白核小球藻; 污水处理

**中图分类号:** X506      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674-3075(2021)02-0124-07

由于人类社会不断增长的用水需求, 造成淡水资源日益紧缺且水污染问题逐渐加剧, 为了水资源的可持续利用, 有必要对污水进行深度处理以提高资源利用效率(Greenway, 2005); 而城市污水在中水回用方面具有巨大的潜力, 不仅可以用于景观用水, 提供人文价值, 还可用于工农业生产, 提高经济价值(Ak & Gunduz, 2014)。由于微藻对营养物质具有较高的吸收效率, 相关的污水处理技术受到关注(Wang et al, 2015)。Boelee等(2011)利用微藻处理城市污水, 水体中残余的氮磷含量分别可以达到2.2 mg/L和0.15 mg/L的极低浓度。由于使用单一微藻进行污水处理的培养时间长、系统不稳定, 近年来有研究藻菌共生系统作为污水处理手段, 有助于提高污水处理效率(Su et al, 2011); 但在人工构建的微藻-细菌共生系统中, 细菌与微藻的相互作用关系还有待进一步研究(Unnithan et al, 2014)。在自然生态系统中, 微藻和细菌之间相互影响且作用关系复杂(Geng & Belas, 2010)。为了构建高效

的藻菌共生系统用于污水处理, 需要选择适合的微藻和细菌进行共培养。因此, 其相互关系对污水处理效果的发挥极其重要。

本研究选用目前应用较为广泛的污水处理细菌以及微藻, 分别为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)以及蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* FACHB-5), 这3种细菌均为饲料添加菌种且属于有益菌, 美国在2018年豁免了在所有食品中地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的残留限量检测。蛋白核小球藻生长速率快、环境耐受力强, 且富含营养物质, 利用小球藻进行污水处理一方面有利于环境的绿色发展, 降低温室气体排放; 另一方面有利于小球藻商业化发展, 降低养殖成本。探究在模拟城市污水中细菌和微藻的脱氮除磷能力以及在藻菌共生系统中细菌对小球藻生长的影响, 旨在为细菌和微藻在城市污水处理方面提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种与菌种

小球藻来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库, 地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和沼泽红假单胞菌均来自华中农业大学微生物学国家重点实验室。

收稿日期: 2019-04-14

基金项目: “十三五”国家水专项(2017ZX07108-001)。

作者简介: 肖伟, 1993年生, 女, 硕士研究生, 研究方向为藻类生理生态。E-mail: smile35@yeah.net

通信作者: 毕永红。E-mail: biyh@ihb.ac.cn

## 1.2 研究方法

1.2.1 小球藻纯化和微生物预培养 取 50  $\mu\text{L}$  小球藻划线培养于含有 10 mg/L 的硫酸卡那霉素、10 mg/L 的四环素和 10 mg/L 氨苄青霉素的 BG11 固体培养皿中(琼脂含量为 15 g/L)(Kim et al, 2015),置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 9 600 lx、光暗比 12 h:12 h 的恒温光照培养箱中培养,至固体培养基上出现边界清晰、颜色鲜绿的小球藻单藻落,再次挑选小球藻划线培养于含有抗生素的 BG11 平板上培养,重复 5 次,以获得无菌小球藻。将纯化后的小球藻在荧光显微镜下进行 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)荧光染色镜检,以确保其无菌性。

分离纯化后的小球藻接种于经 121 $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min 的 BG11 培养基中,在恒温光照培养箱中连续通气培养,空气流速为 400 mL/min(经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后的空气从培养瓶底部曝气),其它培养条件与纯化培养相同,用 1 L 培养瓶(装液量 700 mL)培养 5 d,备用。3 种细菌分别接种于经 121 $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min 的 LB 培养基中(Xue et al, 2018),在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 100 r/min 恒温摇床中用 250 mL 锥形瓶(装液量 100 mL)培养 12 h,备用。

1.2.2 人工污水的配置与藻菌共培养 以不含氮(N)、磷(P)的 BG11 培养基为基底,加入  $\text{NaNO}_3$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,使  $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{PO}_4^{3-}$ -P 的浓度分别为 25 mg/L 和 3 mg/L,将 pH 调节至 7.0~7.5,121 $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min,冷却后在无菌操作台加入经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后的葡萄糖( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ),使其浓度为 400 mg/L,配置成模拟城市污水。

取培养至对数期的小球藻和细菌分别在 3 000 g/min 的条件下离心 10 min,去掉上清液,用蒸馏水洗涤离心 3 次,去除原培养液中的营养物质,接种到本次试验模拟污水中,使小球藻初始接种量为  $2 \times 10^6$  个/mL,3 种细菌初始接种量均为  $1 \times 10^7$  CFU/mL。在试验期间,培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ ,其它培养条件与微藻预培养时的条件相同,每隔 24 h 取样,连续培养 7 d,每组试验设 3 个平行样。

1.2.3 水质参数测定 小球藻生物量通过显微镜采用血球计数板计数法测定,细菌生物量通过平板菌落计数法测定。藻细胞和细菌的平均比生长速率( $\mu$ )计算公式如下:

$$\mu = (\ln B_t - \ln B_0) / t \quad \textcircled{1}$$

式中: $B_t$  为培养  $t$  时间后的生物量或浓度(个/mL 和 CFU/mL); $B_0$  为初始生物量或浓度(个/mL 和 CFU/mL); $t$  为培养时间(d)。

藻样暗适应 5 min,采用水样荧光仪测定微藻叶绿素荧光参数,记录 PSII 的最大光化学量子产量( $F_v/F_m$ ),以探究环境胁迫对光合作用影响。

每次取样 20 mL,3 000 g/min 离心 10 min,然后将上清液经过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,测其总氮(TN)和总磷(TP)含量。TN 测定采用碱性过硫酸钾-消解紫外分光光度法,TP 测定采用钼酸铵分光光度法。营养物质去除率( $R$ )计算公式如下:

$$R = (S_0 - S_t) / S_0 \times 100\% \quad \textcircled{2}$$

式中: $S_0$  为初始浓度(mg/L); $S_t$  为培养  $t$  时间后的营养物质浓度(mg/L); $t$  为培养时间(d)。

## 1.3 数据处理

采用 Excel 2016 和 IBM SPSS 19.0 软件进行数据统计分析,显著性水平设定为  $P < 0.05$ ,使用 Origin 8.5 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 微生物量与叶绿素荧光参数变化

从细菌生物量变化可见(图 1-a, c, e),在藻菌单独培养与共培养过程中,细菌生物量变化趋势一致。在单独培养条件下,地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)均在第 2 天达到最大生物量,但枯草芽孢杆菌最大生物量显著低于地衣芽孢杆菌( $P < 0.05$ ),从第 3 天开始细菌活细胞数逐渐减少,细菌进入衰亡期;而沼泽红假单胞菌(*R. palustris*)在整个试验期,均没有出现明显的衰亡期。在藻菌共培养条件下,3 种细菌的最大生物量均显著低于细菌单独培养( $P < 0.05$ ),地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和沼泽红假单胞菌最大生物量分别降低了 18.09%、16.45% 和 34.73%。

从小球藻(*C. pyrenoidosa*)生物量变化可以发现,在藻菌共培养条件下,3 种细菌对小球藻生长的影响表现出一定的差异性。图 1-a 表明,在第 0~3 天,地衣芽孢杆菌的存在可以促进小球藻生长,且在第 2 天小球藻最大生物量比单独培养体系提高了 14.70%,比增长速率显著高于小球藻单独培养( $P < 0.05$ )。从图 1-c 可以看出,第 2~4 天枯草芽孢杆菌对小球藻的生长具有一定的抑制作用,藻菌共培养条件下,小球藻生物量均显著低于单独培养( $P < 0.05$ );但在第 5 天,共培养条件下小球藻平均比增长速率与单独培养体系( $0.22 \text{ d}^{-1}$ )并无显著差异( $P > 0.05$ )。从图 1-e 可以看出,在藻菌共培养过程中,沼泽红假单胞菌对小球藻的生长并无显著影响( $P > 0.05$ )。

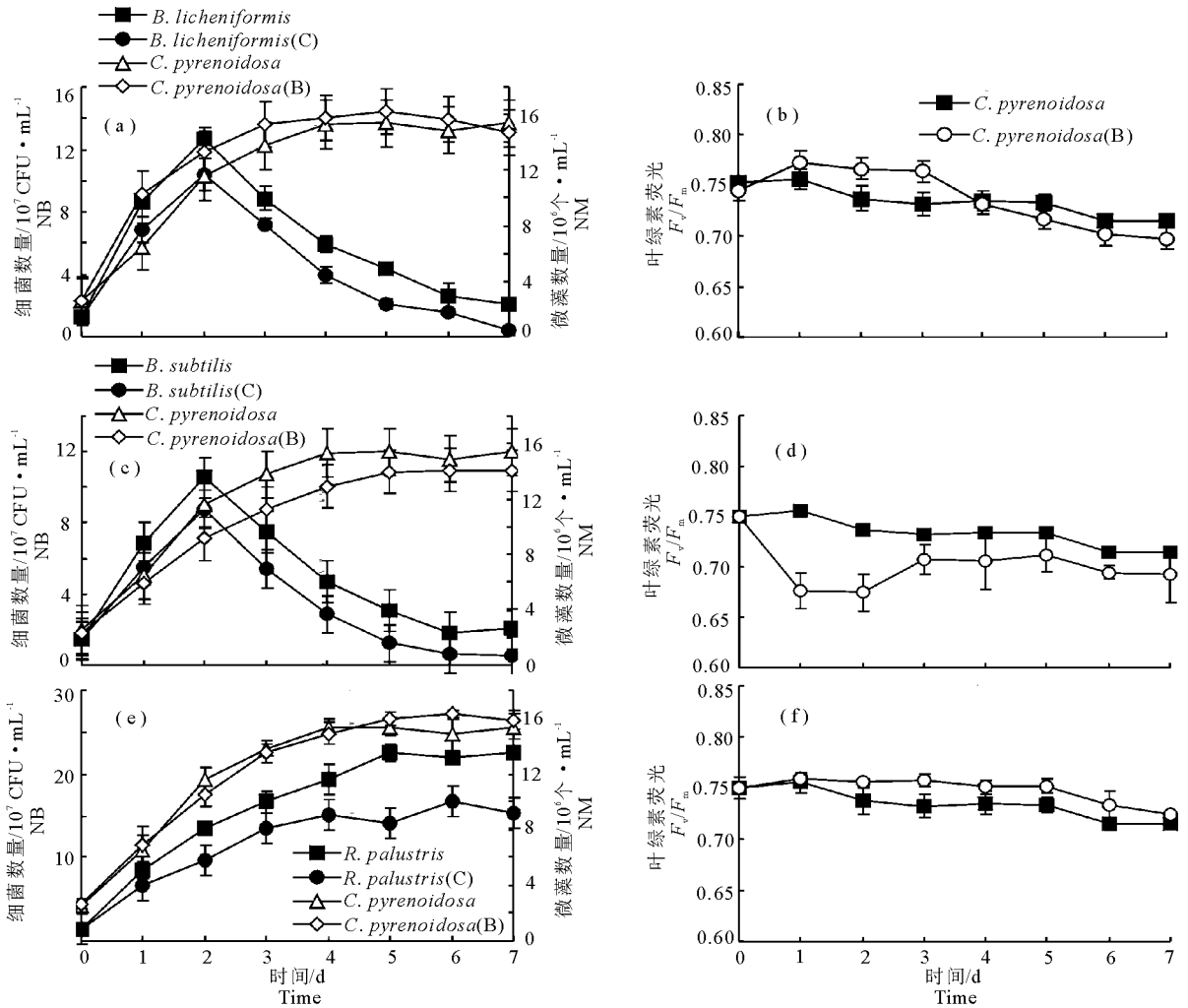


图1 不同培养条件下细菌与微藻生物量(a,c,e)及微藻最大光化学量子产量(b,d,f)变化

Fig.1 Dynamics of bacterial and microalgal biomass (a, c, e) and microalgal  $F_v/F_m$  (b, d, f) under different culture conditions

从小球藻 PS II 最大光化学量子产量( $F_v/F_m$ )可以看出,不同细菌对小球藻光合作用的影响与对小球藻生物量的影响表现基本一致。从图 1-b 可以看出,试验培养初期(第 0~3 天),混合体系中地衣芽孢杆菌的存在可以提高小球藻的光合活性,但随着培养时间延长,两种培养条件下小球藻的最大  $F_v/F_m$  均逐渐降低。图 1-d 表明,藻菌共培养过程初期(第 0~2 天)枯草芽孢杆菌的存在可以降低小球藻的光合活性,在第 2 天共培养条件下的小球藻光合活性显著低于单独培养( $P < 0.05$ );但从第 3 天开始,小球藻光合活性逐渐恢复并与单独培养没有显著差异( $P > 0.05$ )。从图 1-f 可以发现,试验期间沼泽红假单胞菌对小球藻的光合活性并无显著影响( $P > 0.05$ )。

## 2.2 总氮去除效果

从图 2-a 可以看出,在单独培养条件下,小球

藻(*C. pyrenoidosa*)和细菌均有一定的脱氮能力。培养至第 3 天,地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)脱氮效率达到稳定,分别为 44.73% 和 35.17%;而沼泽红假单胞菌(*R. palustris*)随着培养时间的延长,脱氮效率逐渐提高,在第 7 天达到 45.99%。在整个试验期间,小球藻的脱氮效率均显著高于 3 种细菌( $P < 0.05$ ),并在试验结束达到 88.22% 的去除率。

图 2-b 显示,3 种藻菌共培养条件下的最终脱氮效率与小球藻单独培养(88.22%)没有显著差异( $P > 0.05$ ),但在试验初期的第 0~3 天,不同藻菌共培养体的脱氮效率各不相同。试验第 2 天,地衣芽孢杆菌-藻菌共生系统的脱氮效率显著高于小球藻单独培养,达到 79.84%( $P < 0.05$ );而枯草芽孢杆菌-藻菌共生系统在第 0~3 天脱氮效率均显著低于小球藻单独培养( $P < 0.05$ ),之后藻菌共生系统

脱氮效率逐渐上升,并在试验的第5~7天与小球藻单独培养体系无显著性差异( $P>0.05$ )。在整个试

验期间,沼泽红假单胞菌-藻菌共生系统中的脱氮效率与小球藻单独培养均无显著差异( $P>0.05$ )。

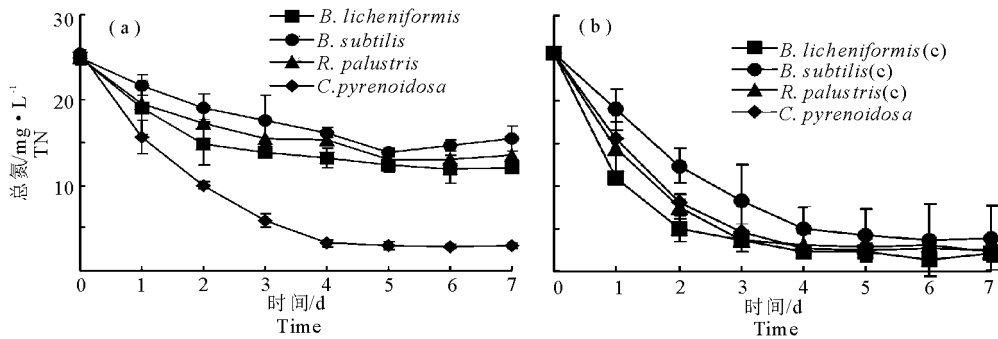


图2 单独培养(a)和共培养(b)条件下的总氮变化

Fig.2 Kinetics of TN removal under single culture conditions (a) and mixed culture conditions (b)

### 2.3 总磷去除效果

从3-a可以看出,在试验初期的第0~3天,地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)的总磷(TP)去除率优于其它两种细菌,在第3天达到38.13%;第4天,随着细菌进入衰亡期,TP含量出现回升。枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)表现出与地衣芽孢杆菌(*B. li-*

*cheniformis*)相同的除磷趋势,在第3天达到最大去除效率33.33%。沼泽红假单胞菌(*R. palustris*)随着时间的延长,TP含量持续下降,并在培养结束达到46.57%的去除率;而小球藻(*C. pyrenoidosa*)对TP的去除效率,在整个试验期间均显著高于细菌( $P<0.05$ )。

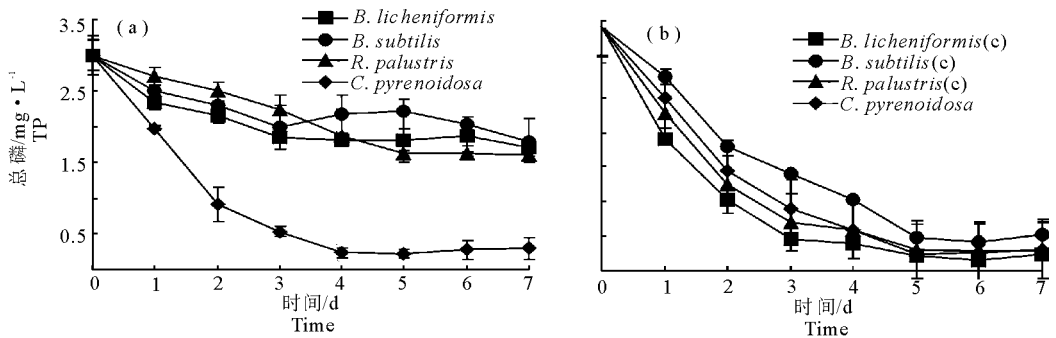


图3 单独培养(a)和共培养(b)条件下的总磷变化

Fig.3 Kinetics of TP removal under single culture conditions (a) and mixed culture conditions (b)

图3-b显示,在3组藻菌混合体系中,TP的去除与小球藻单独培养表现出相同的变化趋势。地衣芽孢杆菌-小球藻共生系统中,第0~3天,细菌的存在可以显著促进体系TP的去除( $P<0.05$ )。枯草芽孢杆菌-小球藻共生系统与小球藻单独培养相比,第2~4天,藻菌共培养下的除磷效率均显著低于小球藻单独培养( $P<0.05$ ),且在第3天藻菌共生系统的除磷效率比小球藻单独培养低19.12%;而沼泽红假单胞菌-小球藻共生系统中,TP的去除效率与小球藻单独培养没有显著差异( $P>0.05$ )。

度较高、细菌处于生长期时,地衣芽孢杆菌对小球藻生长的促进作用较明显。Ji等(2018)研究表明,在小球藻与地衣芽孢杆菌共生系统中,细菌主要通过粘附在小球藻表面,释放胞外感应物质AIP c-di-GMP促进了小球藻中叶绿素相关基因的表达,从而促进小球藻的生长;而在藻菌共培养条件下,小球藻的酶活性还受营养物质浓度影响,过低的营养物质浓度不利于酶的表达。当小球藻与微藻促生菌(*Azospirillum brasilense*)共同培养、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为8 mg/L时,小球藻谷氨酸脱氢酶(GDH)活性才会在细菌的影响下被提高(De-Bashan et al, 2008)。本试验后期,地衣芽孢杆菌对小球藻的促生长作用减弱也可能与细菌活性和营养物质浓度有关。

## 3 讨论

### 3.1 不同细菌对小球藻生长的影响

在本研究中,地衣芽孢杆菌对小球藻的促进作用主要体现在试验初期(第0~2天),当营养物质浓

度较高、细菌处于生长期时,地衣芽孢杆菌对小球藻生长的促进作用较明显。本试验中,培养初期枯草芽孢杆菌对小球藻表现出一定的抑制作用,而随着培养时间的延长,小球

藻生物量逐渐恢复,这可能与微藻自身修复以及枯草芽孢杆菌进入衰亡期代谢活性减慢有关。有研究表明,在适当的环境胁迫条件下,微藻可通过调节酶活性提高环境应激能力,而处于对数期的枯草芽孢杆菌可以通过释放胞外物质对微藻产生一定的抑制作用(张睿等,2015)。Ahn等(2003)研究结果显示,枯草芽孢杆菌所分泌枯草菌环肽在10 mg/L的浓度下,可在2 d内去除85%的微藻;Mu等(2007)筛选出的一株芽孢杆菌,可通过分泌具有耐热性的胞外物质促使微藻裂解,达到抑藻目的。沼泽红假单胞菌为兼性光合细菌,在有氧条件下可利用外源有机碳进行异养生长,而在厌氧光照条件下则合成菌绿素进行化能自养(吴盼,2015)。本试验中,由于一直保持稳定通气状态,因此沼泽红假单胞菌主要是以异养方式生长。试验期间,在两种培养条件下,沼泽红假单胞菌均没有出现明显的衰亡期,但在共培养条件下细菌生物量显著受到小球藻的抑制( $P < 0.05$ ),主要是由于以 $\text{NO}_3^-$ -N为氮源,随着小球藻对氮素的吸收以及光合作用,培养液pH逐渐升高,而沼泽红假单胞菌最适宜pH为中性(冯娟等,2008)。因此,共培养条件下过高的pH可能会对细菌的生长产生抑制;同时,由于对营养盐的竞争,微藻也可产生化感物质,抑制其他生物生长(Goncalves et al,2017)。

由微藻和细菌生物量变化可知,藻菌间存在复杂的相互作用关系,适宜的细菌对于藻类生长及其水处理作用的发挥具有显著的促进作用,生产应用中需要筛选微藻促生菌来提高水处理效率。在本试验中,地衣芽孢杆菌为小球藻促生长细菌,其藻菌共生系统有助于提高微藻生物量。

### 3.2 单一微生物的脱氮除磷效果

本研究中,地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌均具有一定的脱氮除磷能力,在好氧条件下,这两株芽孢杆菌均可利用 $\text{NO}_3^-$ -N,且芽孢杆菌可在有氧条件下高效脱氮(Zhang et al,2012)。Liang等(2015)研究表明,向污水中投加地衣芽孢杆菌,总氮去除率可达到35.95%;在以葡萄糖为碳源时,利用枯草芽孢杆菌处理模拟污水,总氮去除率可达到50%(Yang et al,2011);与本研究结果相似。在细菌单独培养过程中,沼泽红假单胞菌总磷去除效率优于另外两株芽孢杆菌,可见不同的菌剂对于污水处理效率存在差别(郑侠飞,2017)。Madukasi等(2010)利用光合细菌在悬浮生长光生物反应器内处理废水,发现光合细菌不仅具有较好的营养物质去除效率,还可以

收获生物质;Lu等(2010)使用光合细菌处理大豆废水,72 h后COD减少了95.7%。因此,在选用单一菌剂进行污水处理时,应根据水体营养物质含量选择适宜微生物,且对于衰亡较快的细菌,需要定期补充菌剂,以提高脱氮除磷效率。

本研究值得一提的是,在单独培养条件下,即使细菌初始接种量显著高于小球藻,但最终小球藻脱氮除磷效率却显著高于细菌,主要是因为本试验只进行了一次接种,由于细菌世代时间短,细菌很快进入衰亡期,不能持续对污水进行处理(Gallert & Winter,2008);由于微藻对环境耐受能力强,在一定条件下可持续吸收水体营养物质以维持自身生长代谢。已有研究表明,利用微藻处理城市污水可有效去除水体中营养物质,TN和TP的去除率分别达到94.9%和94.2%(韩松芳等,2017)。

### 3.3 藻菌共生系统的脱氮除磷效果

本研究表明,在地衣芽孢杆菌与小球藻的共生系统中,试验初期地衣芽孢杆菌可促进小球藻生长,且共生系统脱氮除磷效率显著优于细菌单独培养体系( $P < 0.05$ )。Wang等(2015)研究表明,藻菌共培养是一种新型的污水处理方式,有助于提高污水处理效率。藻菌共生系统处理污水减少了 $\text{O}_2$ 和 $\text{CO}_2$ 的交换损失,提高了生物质收获效率。地衣芽孢杆菌已被证明是一种微藻促生长细菌,可促进小球藻的生长, Ji等(2019)研究表明,利用小球藻和地衣芽孢杆菌聚生体处理城市污水,TN和TP的去除率可达到88.82%和84.87%。相比于传统活性污泥法,藻菌共生系统有助于提高污水的脱氮除磷效率,Tang等(2018)利用藻菌共生系统建立了序批式悬浮生物膜反应器处理生活污水,TN和TP的去除效率分别提高至69.91%和94.78%。因此,在污水处理中,利用藻菌共生系统脱氮除磷是一种可行的污水处理方式。由于微藻具有一定的经济价值。利用藻菌共生系统处理污水,不仅有助于以提高污水处理效率,还有利于经济的绿色发展。

### 参考文献

- 冯娟,李雪峰,刘艳,2008. pH值对紫色光合细菌*Rhodospirillum rubrum*外周捕光天线的影响[J]. 中国科学(C辑:生命科学),38(7):664-670.
- 韩松芳,金文标,涂仁杰,等,2017. 基于城市污水资源化的微藻筛选与污水预处理[J]. 环境科学,38(8):3347-3353.
- 吴盼,2015. 利用光合细菌Z08处理大豆蛋白废水效能研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学.

- 张睿,王广军,李志斐,等,2015.枯草芽孢杆菌对铜绿微囊藻抑制效果的研究[J].中国环境科学,35(6):1814-1821.
- 郑侠飞,2017.微生物制剂和碳源对水产养殖环境的影响及作用机制[D].杭州:浙江大学.
- Ahn C Y, Joung S H, Jeon J W, et al, 2003. Selective control of cyanobacteria by surfactin-containing culture broth of *Bacillus subtilis* C1[J]. Biotechnology Letters, 25(14): 1137-1142.
- Ak M, Gunduz O, 2014. Fate of nutrients in secondary treated municipal wastewater during percolation through the soil media[J]. CLEAN-Soil, Air, Water, 42(8): 1036-1043.
- Boelee N C, Temmink H, Janssen M, et al, 2011. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms[J]. Water Research, 45(18): 5925-5933.
- De-Bashan L E, Magallon P, Antoun H, et al, 2008. Role of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* [J]. Journal of Phycology, 44(5): 1188-1196.
- Gallert C, Winter J, 2008. Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment Systems[J]. Environmental Biotechnology Concepts & Applications, 57(8):78-87.
- Geng H, Belas R, 2010. Molecular mechanisms underlying Roseobacter-phytoplankton symbioses [J]. Current Opinion in Biotechnology, 21(3): 332-338.
- Goncalves A L, Pires J C M, Simoes M, 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment [J]. Algal Research, 24: 403-415.
- Greenway M, 2005. The role of constructed wetlands in secondary effluent treatment and water reuse in subtropical and arid Australia[J]. Ecological Engineering, 25(5): 501-509.
- Ji X, Jiang M, Zhang J, et al, 2018. The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater[J]. Bioresource Technology, 247: 44-50.
- Ji X, Li H, Zhang J, et al, 2019. The collaborative effect of *Chlorella vulgaris*-*Bacillus licheniformis* consortia on the treatment of municipal water[J]. Journal of Hazardous Materials, 365: 483-493.
- Kim H J, Choi Y K, Jeon H J, et al, 2015. Growth promotion of *Chlorella vulgaris* by modification of nitrogen source composition with symbiotic bacteria, *Microbacterium* sp. HJ1[J]. Biomass and Bioenergy, 74: 213-219.
- Liang Q, Zhang X, Lee K H, et al, 2015. Nitrogen removal and water microbiota in grass carp culture following supplementation with *Bacillus licheniformis* BSK-4 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(11): 1711-1718.
- Lu H, Zhang G, Dai X, et al, 2010. Photosynthetic bacteria treatment of synthetic soybean wastewater: direct degradation of macromolecules[J]. Bioresource Technology, 101(19): 7672-7674.
- Madukasi E I, Dai X, He C, et al, 2010. Potentials of phototrophic bacteria in treating pharmaceutical wastewater [J]. International Journal of Environmental Science & Technology, 7(1): 165-174.
- Mu R, Fan Z, Pei H, et al, 2007. Isolation and algae-lysing characteristics of the algicidal bacterium B5[J]. Journal of Environmental Sciences, 19(11): 1336-1340.
- Su Y, Mennerich A, Urban B, 2011. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture[J]. Water Research, 45(11): 3351-3358.
- Tang C C, Tian Y, He Z W, et al, 2018. Performance and mechanism of a novel algal-bacterial symbiosis system based on sequencing batch suspended biofilm reactor treating domestic wastewater[J]. Bioresource Technology, 265: 422-431.
- Unnithan V V, Unc A, Smith G B, 2014. Mini-review: a priori considerations for bacteri-algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters[J]. Algal Research, 4: 35-40.
- Wang M, Yang H, Ergas S J, et al, 2015. A novel shortcut nitrogen removal process using an algal-bacterial consortium in a photo-sequencing batch reactor (PSBR) [J]. Water Research, 87: 38-48.
- Xue L, Shang H, Ma P, et al, 2018. Analysis of growth and lipid production characteristics of *Chlorella vulgaris* in artificially constructed consortia with symbiotic bacteria [J]. Journal of Basic Microbiology, 58(4): 358-367.
- Yang X P, Wang S M, Zhang D W, et al, 2011. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1 [J]. Bioresource Technology, 102(2): 854-862.
- Zhang Q L, Liu Y, Ai G M, et al, 2012. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7 [J]. Bioresource Technology, 108: 35-44.

## Effects of Three Bacteria on the Growth and Nitrogen and Phosphorus Removal Efficiency of *Chlorella pyrenoidosa*

XIAO Wei<sup>1</sup>, WU Hong-yan<sup>1</sup>, BI Yong-hong<sup>2</sup>

(1.School of Civil Engineering, Architecture and Environment, Hubei University of Technology, Wuhan 430068,P.R.China;

2.State Key Laboratory of Fresh Water Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072,P.R.China)

**Abstract:** The interactions of algal-bacterial consortia can improve the efficiency of waste water treatment and are characterized by energy-saving and environmental friendliness. In this study, three commonly used bacteria (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Rhodospseudomonas palustris*) were selected to co-culture with *Chlorella pyrenoidosa* (FACHB-5) to construct the algal-bacterial symbiotic system. The effects of the different bacteria on the growth of *C. pyrenoidosa* and the efficiency of nitrogen and phosphorus removal from waste water were investigated and compared. *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *R. palustris* and *C. pyrenoidosa* (FACHB-5) in the exponential growth phase were mix-cultured in an artificially composed urban sewage, at initial concentrations of  $1 \times 10^7$  CFU/mL for the three bacteria and  $2 \times 10^6$  cells/mL for the algae. Each trial was run in triplicate with a control group, the trials lasted 7 days and the culture was sampled each 24 h. *B. licheniformis* promoted algal growth, *B. subtilis* inhibited algal growth, while *R. palustris* had no significant effect on algal growth ( $P > 0.05$ ). On the contrary, *C. pyrenoidosa* FACHB-5 significantly inhibited the growth of *R. palustris* ( $P < 0.05$ ). The maximum algal biomass appeared in the *C. pyrenoidosa*-*B. licheniformis* symbiotic system, and the removal rates of TN and TP in this system reached 79.84% and 83.48%, respectively, significantly higher than in the control (algae only) ( $P < 0.05$ ). Our study indicated that the interactions between bacteria and microalgae for the three algal-bacterial symbiotic systems were very different, so it is important to select suitable probiotics for the algal-bacterial consortium. The symbiotic interactions in a properly composed algal-bacterial consortia can remove TN and TP from water more efficiently than microalgae alone.

**Key words:** microalgal-bacterial symbiosis; *Chlorella pyrenoidosa*; waste water treatment