DOI:10.3969/j.issn.1674－3644.2018.03.007

外源有机碳浓度对藻菌关系及氮磷去除的影响

秦攀伟[1,2],吴克明[1],刘俊琢[2],吴永红[2]

(1. 武汉科技大学资源与环境工程学院,湖北 武汉,430081;
2. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室,江苏 南京,210008)

摘要:采用实验室一次培养法,以葡萄糖为有机碳源,对地衣芽孢杆菌和丝藻进行单独及混合培养,研究了外源有机碳浓度对藻菌相互关系及氮磷去除效率的影响。结果表明,当水体中葡萄糖质量浓度不高于 20 mg/L 时,地衣芽孢杆菌能显著促进丝藻的生长。尤其当葡萄糖质量浓度为 20 mg/L 时,藻菌体系叶绿素荧光强度最大可达 5227,较纯丝藻体系相应值提高约 15%;当葡萄糖质量浓度为 50 mg/L 时,藻菌体系对水体中 NH_4^+-N 和 PO_4^{3-}-P 的去除率分别达到 27%和 60%,显著高于纯丝藻及纯菌体系相应值;当葡萄糖质量浓度高于 50 mg/L 时,藻菌体系和纯丝藻体系对氮磷的去除率无显著差异;当葡萄糖质量浓度高于 100 mg/L 时,地衣芽孢杆菌明显抑制丝藻的生长。

关键词:地衣芽孢杆菌;丝藻;藻菌关系;外源有机碳;葡萄糖;氮磷去除;水体净化

中图分类号:X703　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1674-3644(2018)03-0195-06

如何高效且环境友好地去除与回收水体中过量的氮、磷等营养物质从而净化水质一直是全球资源环境研究者关注的焦点问题[1]。藻类通过吸收水体中氮、磷等营养物质进行光合作用,可以净化水质并固定二氧化碳,减少温室气体的排放,该方法不仅经济高效,而且符合生态规律。

长期以来,利用藻类去除氮、磷的研究主要集中于藻种的筛选及其去除效果的比较,经常忽略异养细菌在其中所起的作用[2]。藻类和细菌间存在着共生、竞争、拮抗等相互关系,但这种相互关系如何影响藻类对水体氮、磷的去除能力还需开展深入研究。此外,可溶性有机碳含量对藻、菌相互关系具有显著影响,在藻菌体系中,虽然只有异养细菌的生长受可溶性有机碳的限制[3],但细菌的生长和代谢变化会使藻、菌相互关系发生变化,并改变水体中的 pH 和溶解氧等环境因子,进一步影响藻菌体系整体的生理和生态功能。本文以地衣芽孢杆菌和丝藻的复合体系为研究对象,重点研究了不同浓度有机碳条件下藻、菌关系及其氮、磷去除能力,探讨如何通过调控外源碳浓度来提升藻菌体系富集营养物的能力,以期为优化利用藻菌体系净化水质提供参考。

1　实验材料和方法

1.1　实验藻种与菌种

实验藻种选用丝藻(*Ulothrix sp.*,中国科学院水生生物研究所淡水藻种库,编号 FACHB-494),纯藻液使用灭菌处理后的 WC 培养基[4]在 25 ℃光照恒温培养箱中培养,光照度为 4000 lux,光暗比为 12 h∶12 h。实验菌种选用地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*,中国普通微生物菌种保藏中心,编号 CGMCC 1.807),经恢复培养后接种于 LB 培养基,放置在温度为 30 ℃、转速为 100 r/min 的培养箱中培养 24 h 后备用。

1.2　人工模拟含氮、磷废水制备

为避免诸多不确定因素对实验结果的干扰,以不含氮、磷的 WC 培养基为基础,加入 $(NH_4)_2SO_4$ 及 KH_2PO_4(均为分析纯)模拟含氮、磷废水,水体中主要化学物质质量浓度指标:TN 为 15 mg/L、TP 为 1.5 mg/L、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 为 36.76 mg/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为 36.79 mg/L、$NaHCO_3$ 为 12.6 mg/L、$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ 为 28.42 mg/L、H_3BO_3 为 24 mg/L。将模拟废水置于高温灭菌锅中 121 ℃灭菌处理 30 min,随后冷却至

收稿日期:2018-01-12
基金项目:国家自然科学基金资助项目(31600097).
作者简介:秦攀伟(1992-),男,武汉科技大学硕士生. E-mail: qpw1206@163.com
通讯作者:刘俊琢(1985-),男,中国科学院南京土壤研究所副研究员,博士. E-mail: jzhliu@issas.ac.cn

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

室温，再用0.1 mol/L的盐酸或氢氧化钠将其pH值调至7。

1.3 实验过程

1.3.1 有机碳的加入

将模拟废水分为5组，其中4组分别添加适量葡萄糖（分析纯）使水体中葡萄糖质量浓度ρ依次为20、50、100、150 mg/L。

1.3.2 接种处理

丝藻接种时取无菌培养的纯种丝藻，将其经镊子挤压至无明显水分析出后称取0.1 g转接至100 mL模拟废水中；地衣芽孢杆菌接种时吸取菌液2 mL（大约10^6 CFU/mL），以4000 r/min的速率离心处理10 min，去除上清液后，用无菌水洗涤2次，然后接种到100 mL模拟废水中；藻菌组合接种处理时按上述步骤分别将丝藻及地衣芽孢杆菌接种至同一装有100 ml模拟废水的锥形瓶中。5组模拟废水均按上述步骤分别进行丝藻、地衣芽胞杆菌以及藻菌组合的接种处理，每种处理重复3次。以上操作全部在无菌条件下进行，接种完成后锥形瓶覆以透气无菌封口膜，置于25 ℃光照培养箱中培养，光暗比为12 h∶12 h。

1.3.3 指标测定

用灭菌后的注射器每隔24 h分别在每组模拟废水中吸取水样，每组水样均经孔隙直径为0.22 μm的混合纤维滤膜过滤后取滤液2 mL，在黑暗环境暗适应15 min后借助AquaPen-P AP-P100型掌上水体叶绿素荧光仪测定丝藻细胞的叶绿素荧光参数[5]，以此表征丝藻的生物量，测量光源为波长455 nm的蓝光，检测波长675～750 nm，闪光脉冲占空比为30%，饱和脉冲占空比为70%；采用靛酚蓝比色法测定水样中NH_4^+-N浓度[6]；采用钼酸铵分光光度法测定水样中PO_4^{3-}-P浓度[2]。

1.4 数据处理与统计分析

所得实验数据借助SPSS 21.0统计软件进行比较和分析。模拟水体中氮、磷的去除率计算公式为

$$E=\frac{C_0-C_1}{C_0}\times 100\% \tag{1}$$

式中：E为氮或磷的去除率；C_0为模拟水体中NH_4^+-N或PO_4^{3-}-P的初始质量浓度；C_1为模拟水体经接种处理培养一定时间后其中的NH_4^+-N或PO_4^{3-}-P的实际质量浓度。地衣芽孢杆菌对丝藻生长的影响采用t检验分析，根据单因素方差分析比较纯藻、纯菌及藻菌体系对氮、磷的去除效果，以上分析均以$p<0.05$作为显著性差异水平。

2 结果与讨论

2.1 丝藻细胞叶绿素荧光值变化分析

水体中丝藻细胞的叶绿素荧光值测试结果如图1所示。由如图1(a)可以看出，在不含葡萄糖的模拟水体中，藻菌体系中丝藻细胞的叶绿素实时荧光值从实验开始一直高于纯丝藻体系相应值，并在实验第5日达到最大值5123，比纯丝藻体系相应值4537增加了12.9%，表明地衣芽孢杆菌促使丝藻的生物量显著增加（$p<0.05$），这与Liang等[7]的研究结果一致。然而到了实验第7日，藻菌体系中丝藻细胞的叶绿素实时荧光值明显下降，而纯藻体系中丝藻细胞的相应值持续增加最终超过前者。造成这种现象的原因可能是藻菌快速生长使培养基微环境发生变化，如有毒代谢物的产生、营养物不足或环境pH值的改变等，从而导致丝藻生长过程衰退[8]；从图1(b)可知，同样的现象发生在葡萄糖质量浓度为20 mg/L的水体环境中，藻菌体系的生物量从实验开始至实验第5日始终高于纯丝藻体系相应值（$p<0.05$），但二者差距较未添加葡萄糖时有所减小。实验第7日藻菌体系的生物量急剧下降，而纯丝藻体系中丝藻细胞的叶绿素实时荧光值继续上升达至最大值5108，这与藻菌体系在实验第5日获得的最大叶绿素荧光值5226无明显差异（$p>0.05$），上述结果表明，地衣芽孢杆菌在外加有机碳浓度较低时促进了丝藻的生长，缩短了丝藻的生长周期；由图1(c)可见，当模拟水体中葡萄糖质量浓度为50 mg/L时，纯丝藻和藻菌体系中丝藻细胞的叶绿素荧光值变化曲线基本重合，二者荧光强度无明显差异；当葡萄糖质量浓度增加到100 mg/L（图1(d)）和150 mg/L（图1(e)）时，纯丝藻和藻菌体系丝藻细胞的叶绿素荧光值又开始出现明显差异（$p<0.05$），但与图1(a)、1(b)测试结果不同的是，此时地衣芽孢杆菌明显抑制了丝藻的生长，表明细菌和藻类的相互作用并非一成不变，而是随着水体环境的变化而发生改变，这与Guo等[9]的研究结果一致，当培养条件从光合自养变为光合异养时，小球藻与假单胞菌的关系从共生转变为竞争。地衣芽孢杆菌对丝藻生长的抑制作用可能是因藻菌对限制性营养物质竞争所造成[10]，由于水体中葡萄糖浓度增加，细菌生长速度加快，它们的迅速增殖将消耗更多的营养物质，造成藻类生长所需的营养物质缺乏从而导致其生长受到限制，因此本文中高浓度葡萄糖添加条件下丝藻的叶绿素荧光值显著低于无葡萄糖

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

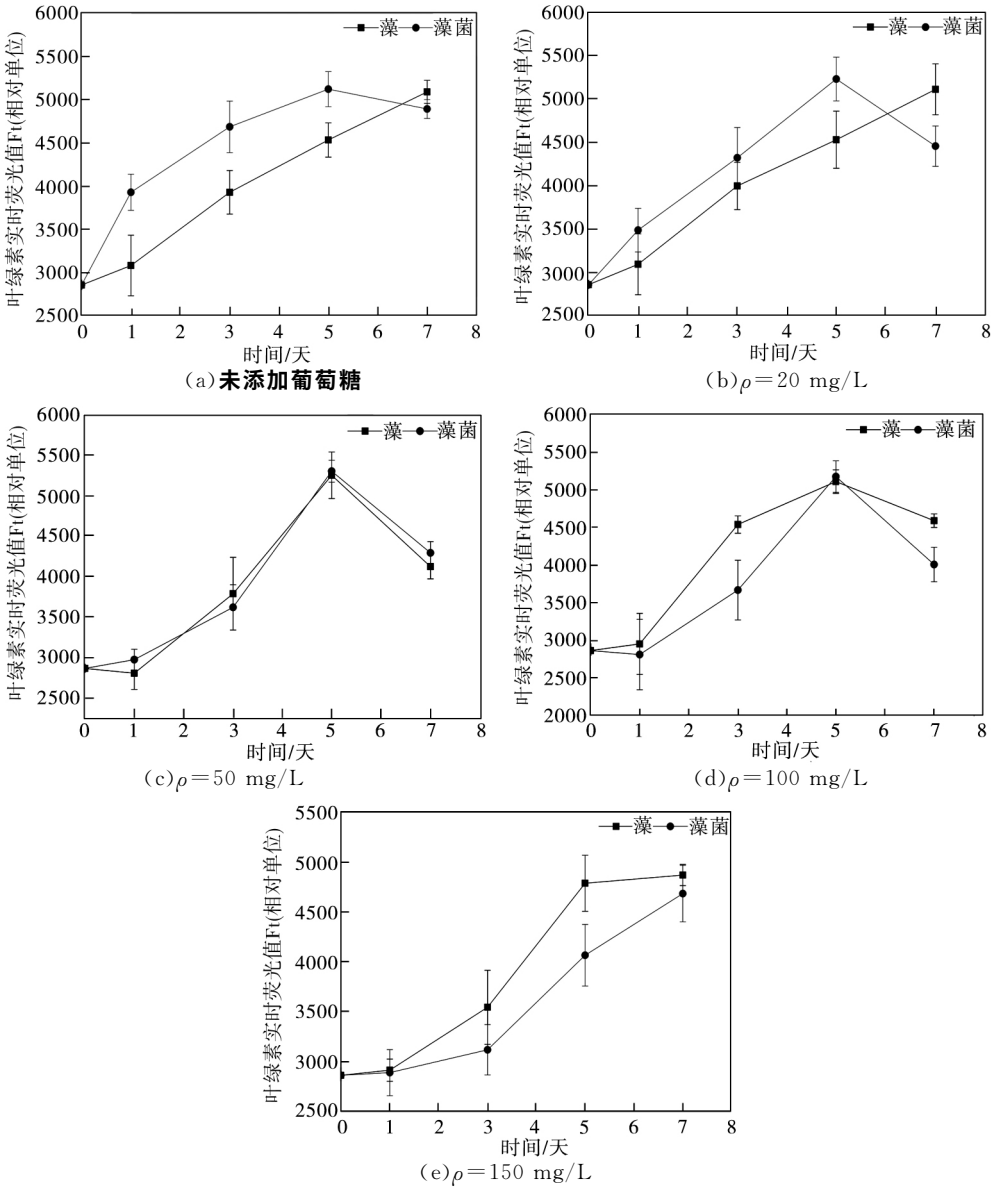

图 1　不同培养体系中丝藻细胞的叶绿素荧光值变化曲线

Fig.1 Chlorophyll fluorescence variation value curves of *Ulothrix sp*. in different cultivating systems

添加条件下的相应值($p<0.05$)。

2.2　水体中氮浓度的变化分析

在本文实验过程中，模拟废水 pH 值始终不高于 7，NH_4^+-N 减少的主要途径是被微生物吸收。在不同培养环境下，水体中的 NH_4^+-N 浓度变化如图 2 所示。由图 2 可见，在 5 种不同浓度有机碳条件下，纯菌接种处理的水体中 NH_4^+-N 浓度随培养时间增加反而有所上升，上升的部分可能源于细菌细胞分解有机物释放，另外根据 Krul 等[11]的报道，地衣芽孢杆菌为一株反硝化细菌，主要以硝态氮为氮素来源；在纯丝藻接种处理的模拟废水中，当无外源有机碳时，NH_4^+-N 浓度只是略微减少，随着水体葡萄糖浓度的增加，水体中 NH_4^+-N 浓度开始明显下降，并最终稳定在一定浓度范围内，表明有机碳有助于丝藻对 NH_4^+-N 的吸收利用。综合图 2(a)、2(b)、2(c)可见，当水体中葡萄糖浓度较低时，藻菌组合接种处理相比纯丝藻接种处理可以更有效地吸收水体中 NH_4^+-N，结合图 1 实验结果，这可能与丝藻的快速生长有关，此外一些特定的细菌能提高淡水微藻去除水体氮的能力，如 de-Bashan 等[12]发现在 NH_4^+-N 初始质量浓度为 3 mg/L 的条件下，纯种小球藻和藻菌复合体系对氮的去除率分别达到 87%和 98%，相较于纯藻体系，藻菌体系谷氨酸合成酶和谷氨酸脱氢酶活性增加是造成这一现象的主要原因。然而，从图 2(d)、2(e)中可见，随着水体中葡萄糖浓度的进一步增高，藻菌体系对 NH_4^+-N 的去除能力与纯丝藻体系基本持平，甚至在葡萄糖质量浓度为 150 mg/L 时，随着培养时间的增加，纯丝藻体系对 NH_4^+-N 的去除率反而超过藻菌体系相应值。造成这一现象的主要原因可能与丝藻的生长状态有关，如前所述，高浓度

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

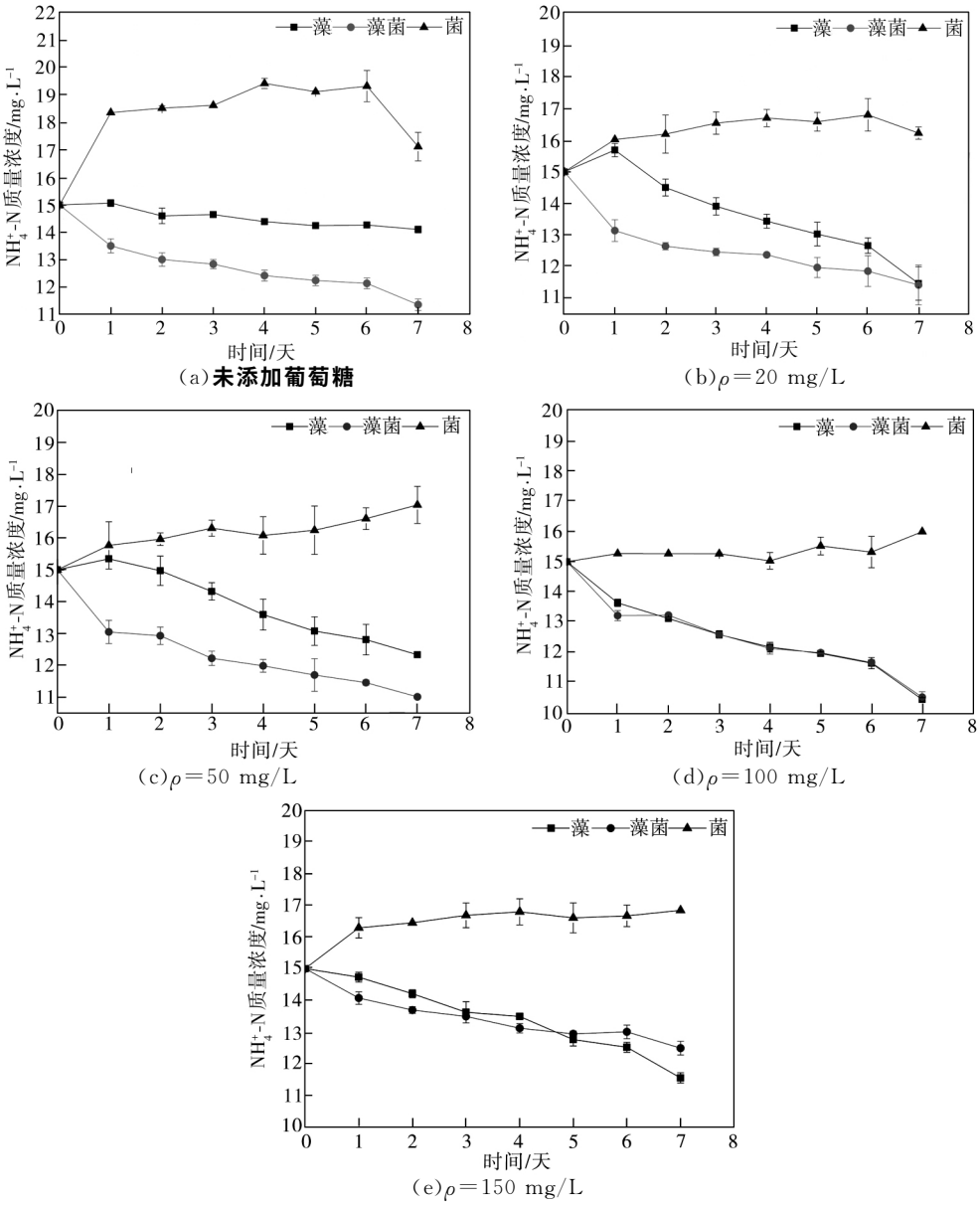

图 2 不同培养系中 NH_4^+-N 浓度变化曲线

Fig.2 Concentration variation curves of NH_4^+-N in different cultivating systems

有机碳条件下，地衣芽孢杆菌的存在抑制了丝藻的生长，从而减少了丝藻对 NH_4^+-N 的吸收，此外，菌藻体系中的丝藻细胞在生长末期叶绿素荧光强度下降，生物量减少，丝藻死亡释放的 NH_4^+-N 也可能是造成这一现象的部分原因[13]。

2.3 水体中磷浓度的变化分析

水体中的 PO_4^{3-}-P 浓度变化如图 3 所示。从图 3(a)可以看出，在没有添加葡萄糖的条件下，纯菌和纯丝藻处理对水体中 PO_4^{3-}-P 的最终去除率分别为 10.6%和 13%($p>0.05$)，去除效果差异不明显，而藻菌组合处理对水体中 PO_4^{3-}-P 的最终去除率达到 38%($p<0.05$)，这是因为在光合自养条件下，地衣芽孢杆菌促进了丝藻的生长，一部分磷被丝藻同化吸收合成自身物质，同时，丝藻光合作用释放出小分子有机物[14]如有机碳等有利于细菌增殖，细菌增殖的同时增加了对废水中磷的吸收；在葡萄糖质量浓度为 20 mg/L(图 3(b))和 50 mg/L(图 3(c))的水体中，藻菌组合处理对水体中 PO_4^{3-}-P 的去除能力也远大于纯丝藻和纯菌处理，并且其去除率随着葡萄糖浓度的增加而升高，当葡萄糖质量浓度为 50 mg/L 时，最终去除率高达 60%；由图 3(d)和图 3(e)可见，当水体葡萄糖浓度进一步增加，纯菌处理渐渐显示出对水体中 PO_4^{3-}-P 吸收的优势，其吸收效果明显高于纯丝藻和藻菌组合处理。当水体中葡萄糖质量浓度为150 mg/L时，纯菌处理对模拟废水中 PO_4^{3-}-P 的去除率最高可达 73%，这与生物对磷的吸收机理有关，水体中的磷一方面通过生物吸收同化合成自身物质，另一方面则通过吸附作用吸附在生物体表面[15]。而细菌细胞体积小，比

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

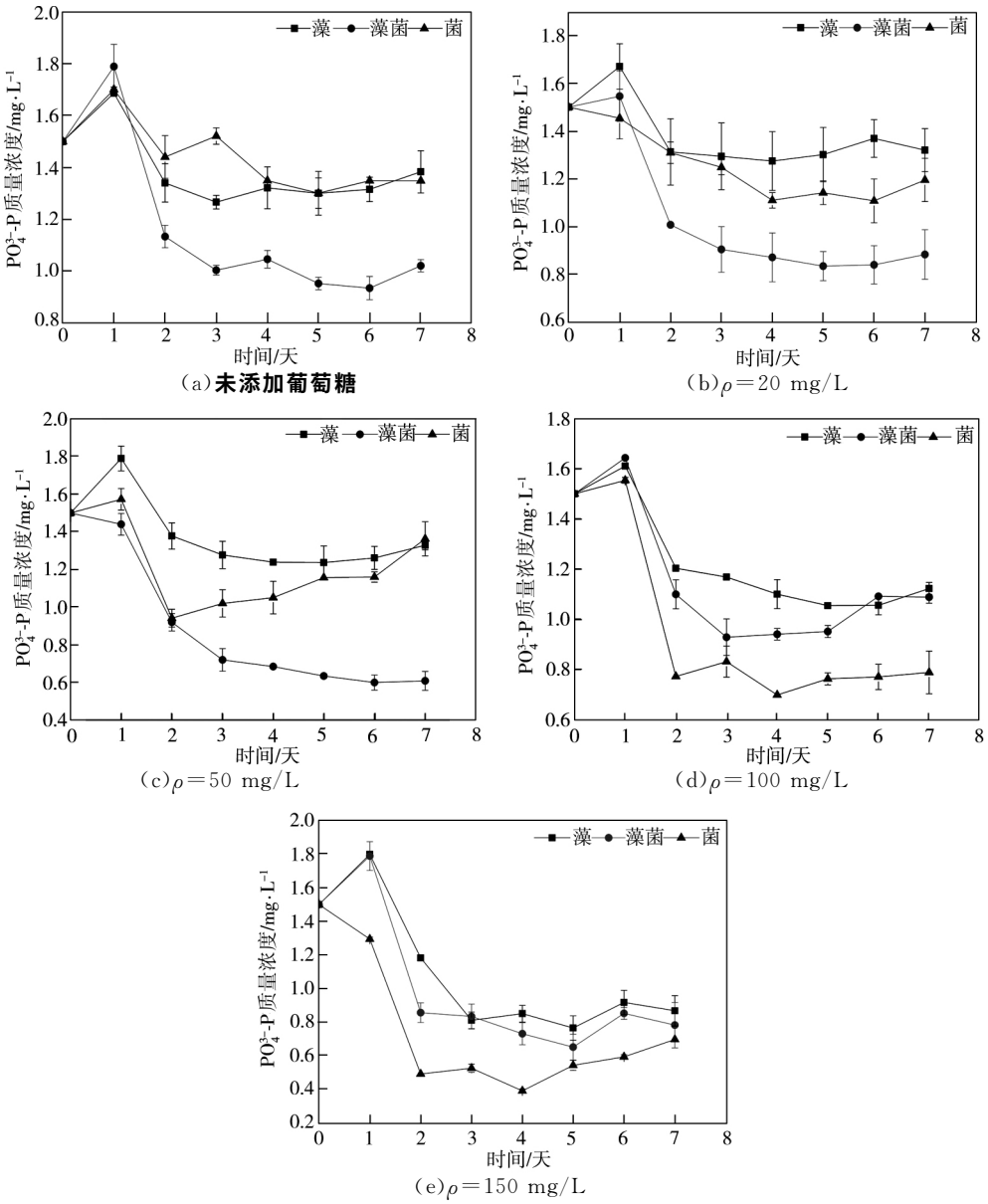

图 3　不同培养体系中 PO_4^{3-}-P 浓度变化曲线

Fig.3 Concentration variation curves of PO_4^{3-}-P in different cultivating systems

表面积大，能与环境进行有效的物质交换，相同条件下能吸收更多的磷[16]。实验结果还表明，随着葡萄糖浓度的增加，纯丝藻处理对水体中 PO_4^{3-}-P 的去除率也显著提高，但藻菌组合处理对水体中 PO_4^{3-}-P 的最高去除率却从先前的 60%（图 3(c)）降至 41%（图 3(d)），这与丝藻细胞的叶绿素荧光检测结果相吻合，即高浓度有机碳条件下，地衣芽孢杆菌抑制了丝藻的生长，从而降低了体系对磷的吸收能力。

3　结论

（1）当水体中葡萄糖质量浓度不高于 20 mg/L 时，藻菌组合体系中地衣芽孢杆菌可以促进丝藻生长，并能显著促进丝藻体系对水体中的氮、磷的去除；当水体中葡萄糖质量浓度高于 50 mg/L 时，地衣芽孢杆菌抑制丝藻生长，藻菌组合处理对水体中氮、磷的去除能力下降。

（2）通过改变外源有机碳浓度可以调控藻、菌相互关系，从而使藻菌组合体系在实际应用中能最大限度地发挥其污水净化能力。

参　考　文　献

[1] Liu J, Danneels B, Vanormelingen P, et al. Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae *Klebsormidium sp.*, *Stigeoclonium spp.* and their communities: from laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS) [J]. Water Research, 2016, 92:61-68.

[2] 章斐，陈秀荣，江子建，等. 不同氮磷浓度下 2 种无毒微藻的生长特性和脱氮除磷效能[J]. 环境工程学报，2015，9(2)：559-566.

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[3] 易齐涛. 海洋菌-藻关系及对营养盐的吸收作用研究[D].青岛:中国海洋大学,2006.

[4] Hametner C, Stocker-Wörgötter E, Rindi F, et al. Phylogenetic position and morphology of lichenized Trentepohliales (Ulvophyceae, Chlorophyta) from selected species of Graphidaceae[J]. Phycological Research, 2014, 62(3):170-186.

[5] 梁瑜,王朝晖. 应用叶绿素荧光法测定微藻生物量的方法[J]. 生态科学,2009,28(5):420-423.

[6] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业科技出版社,2000:129-130.

[7] Liang Z, Liu Y, Ge F, et al. Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*[J]. Chemosphere, 2013, 92(10):1383-1389.

[8] 王高学,姚嘉赟,王绥标. 复合藻-菌系统水质净化模型建立与净化养殖水体水质的研究[J]. 西北农业学报,2006,15(2):22-27.

[9] Guo Z, Tong Y W. The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions [J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(3): 1483-1492.

[10] Hyenstrand P, Burkert U, Pettersson A, et al. Competition between the green alga *Scenedesmus* and the cyanobacterium *Synechococcus* under different modes of inorganic nitrogen supply[J]. Hydrobiologia, 2000, 435(1-3):91-98.

[11] Krul J M, Veeningen R. The synthesis of the dissimilatory nitrate reductase under aerobic conditions in a number of denitrifying bacteria, isolated from activated sludge and drinking water[J]. Water Research, 1977, 11(1):39-43.

[12] de-Bashan L E, Moreno M, Hernandez J P, et al. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*[J]. Water Research, 2002, 36(12): 2941-2948.

[13] 张艳敏,王江涛,谭丽菊. 海水中藻菌共培养体系对碳氮磷的吸收转化[J]. 生态学报,2017,37(14): 4843-4851.

[14] 王荣昌,程霞,曾旭. 污水处理中菌藻共生系统去除污染物机理及其应用进展[J]. 环境科学学报, 2018,38(1):13-22.

[15] Lu H, Feng Y, Wu Y, et al. Phototrophic periphyton techniques combine phosphorous removal and recovery for sustainable salt-soil zone[J]. Science of the Total Environment, 2016, 568:838-844.

[16] 连子如,王江涛. 不同浓度碳源下中肋骨条藻和海洋异养细菌对磷酸盐的竞争吸收研究[J]. 中国海洋大学学报, 2009,39(S):237-241.

Effects of exogenous organic carbon concentration on the algae-bacteria relationship and removal of nitrogen and phosphorus

Qin Panwei[1,2], *Wu Keming*[1], *Liu Junzhuo*[2], *Wu Yonghong*[2]

(1. College of Resources and Environmental Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China; 2. Stake Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: In a batch culture experiment, different concentrations of glucose was used to study the effects of exogenous carbon source on the algae-bacteria relations and removal efficiency of nitrogen and phosphorus by *Bacillus licheniformis* and *Ulothrix sp.* separately or co-cultured. The results show that *Bacillus licheniformis* can significantly promote the growth of *Ulothrix sp.* at a glucose concentration of less than 20 mg/L. At the glucose concentration of 20 mg/L, chlorophyll fluorescence intensity of *Ulothrix sp.* can reach the maximum of 5227 , which is 15% higher than that of the monoculture of algae. When the concentration of glucose is 50 mg/L, the removal efficiency of nitrogen and phosphorus in algal-bacteria system is 27% and 60%, respectively, which are significantly higher than those in monoculture of algae or bacteria. When the concentration of glucose is higher than 50 mg/L, there is no significant difference in nitrogen and phosphorus removal efficiency between the mix-culture and monoculture. *Bacillus licheniformis* inhibits growth of *Ulothrix sp.* at glucose concentrations above 100 mg/L.

Key words: *Bacillus licheniformis*; *Ulothrix*; algae-bacteria relation; exogenous organic carbon; glucose; removal of nitrogen and phosphorus; water purification

[责任编辑 沈冬冬]

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net