

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.12.002

菌-藻体系中无机碳源 对小球藻生长和聚集的影响研究

吴雪菲, 陈国炜, 方志鹏, 贾伟, 刘丽

(合肥工业大学 土木与水利工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要:为了提高微藻生长速率、实现低成本高效收集,文章以小球藻(*Chlamydomonas microspiraera*)为研究对象,探究无机碳源对菌-藻体系中微藻生长和聚集的影响。结果表明:无机碳源能够显著提高菌-藻体系中微藻生物量,当初始菌藻数量比为 15:1 时,在低碳源(37.6 mg/L)水平下,经过 6 d 培养后微藻生物量可达 1.255×10^6 个/mL,较纯藻培养体系增加 30%;当碳源质量浓度升高至 188.0 mg/L 时,微藻数量较纯藻培养体系增加 68%,可达 1.681×10^6 个/mL;菌-藻体系也有助于微藻自聚集,随着无机碳源质量浓度增加,其聚集效果变得更明显,聚集率最高可达 66%,远高于纯培养体系中的 27%。研究结果可为微藻综合利用研究提供参考。

关键词:无机碳源;菌-藻体系;微藻生长;微藻聚集

中图分类号:X172

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2023)12-1595-08

Inorganic carbon sources significantly promoted growth and aggregation of *Chlamydomonas microspiraera* in bacterial-algal system

WU Xuefei, CHEN Guowei, FANG Zhipeng, JIA Wei, LIU Li

(School of Civil and Hydraulic Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: In order to improve the growth rate of microalgae and achieve low-cost and high-efficiency collection, this paper takes *Chlamydomonas microspiraera* as the research object to explore the effects of inorganic carbon sources on the growth and aggregation of microalgae in the bacterial-algal system. The results showed that inorganic carbon sources could significantly increase the biomass of microalgae in the bacterial-algal system. When the initial ratio of bacteria to algae was 15:1, the biomass of microalgae could reach 1.255×10^6 cells/mL after six days of culture under the low carbon source (37.6 mg/L), which was 30% higher than that in the pure algal culture system. When the carbon source mass concentration increased to 188.0 mg/L, the number of microalgae increased by 68% compared with that of pure algal culture system, reaching 1.681×10^6 cells/mL. The bacterial-algal system also contributed to the self-aggregation of microalgae. With the increase of the mass concentration of inorganic carbon source, the aggregation effect became more obvious, and the aggregation rate was up to 66%, which was much higher than 27% in the pure culture system. The results can provide reference for the comprehensive utilization of microalgae.

Key words: inorganic carbon source; bacterial-algal system; microalgae growth; microalgae aggregation

收稿日期:2022-05-26;修回日期:2022-08-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(42277298)

作者简介:吴雪菲(1998—),女,福建泉州人,合肥工业大学硕士生;

陈国炜(1976—),女,安徽无为,人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:gwchen@hfut.edu.cn;

刘丽(1972—),女,安徽寿县人,博士,合肥工业大学教授,硕士生导师。

为了应对化石燃料的不可持续问题及其引发的全球变暖和环境污染等问题,发展可持续能源是当前能源行业面临的主要挑战之一^[1-3]。微藻是生物质燃料的一种潜在来源,也是化石燃料的一种可替代品^[4-6]。微藻具有的生物量和脂质生产力,是传统作物生产生物柴油的 10~300 倍^[7-8],同时具有环境适应性强、生长周期短、产油率高、养殖面积小等优点^[9-13]。此外,微藻还可以吸收二氧化碳,储存光合能量,理论上每生成 1 kg 干微藻的生物量至少需要消耗 1.83 kg 二氧化碳^[14-15]。

尽管微藻具有这些明显的优点,但微藻体积较小、游离藻类的沉降能力较差,水力停留时间相对较长^[7,16],导致在藻类生物制品行业,微藻的收集成本占总生产成本^[17-18]的 20%~30%,大大增加了运营成本^[19-20]。因此,开发一种经济高效的微藻收集方法是一个艰巨的挑战^[21]。

目前,微藻可通过物理、化学和生物技术等方法进行收集。物理收集技术包括沉降、离心、浮选、过滤、电、磁和超声等方法,但由于高成本和操作技术要求较高,它们的应用潜力有限^[22-23]。化学絮凝技术是采用无机或有机絮凝剂进行微藻收集,其缺点是需要投加大剂量的化学絮凝剂,致使收集成本提高,还会产生不必要的副产品,甚至化学絮凝剂中的一些重金属离子很容易对环境造成一定的污染,这些缺点制约了其在微藻收集中的大规模使用^[24]。相对于上述物理、化学的方法,生物方法是最经济的,且不会对环境造成污染^[18]。藻类和细菌联合培养与单一藻类相比,可以降低微藻的收集成本^[25-26],而共培养体系水力停留时间较短^[27-28],与单一藻类相比具有较好的沉降性能,被认为是有效的解决方案之一。因此,本文从菌藻互作出发,以菌-藻共生体系为研究对象,选取生长快、产油高的小球藻和活性污泥细菌,探究无机碳源对菌-藻共生体系中小球藻生长规律和聚集趋势的影响,解析不同菌藻数量接种比例下碳源质量浓度对微藻生长和聚集的影响,以期对微藻的应用提供理论指导。

1 实验材料与方法

1.1 实验藻种

实验微藻为小球藻(*Chlamydomonas microspiraera*),编号 FACHB-52,购于中国科学院淡水藻种库,培养于 BDP-250 人工气候培养箱(上海百典仪器设备有限公司)中,设置温度为(25±1)℃,光照强度为 2 000 lux,光暗比为

12 h/12 h,接种后瓶口用已灭菌的透气膜进行封口处理。微藻培养时每天定时摇动 2~3 次,培养基为 SE(Selenite Enrichment)液体培养基。

1.2 实验菌种

采用活性污泥混合菌为实验菌种,以气单胞菌属 *Aeromonas*、邻单胞菌属 *Plesiomonas*、克雷白氏杆菌属 *Klebsiella* 为主,活性污泥取自合肥工业大学市政工程系序批式反应器(sequencing batch reactor, SBR)。取出 1 mL 活性污泥混合液,接种到 500 mL 内装有 250 mL 灭菌 LB 肉汤的锥形瓶中,37℃ 恒温培养 16 h 后,从中取 2 份上清液各 30 mL,分别放入 50 mL 的离心管中,在 5804 高速离心机(美国 Eppendorf 集团)中以 8 000 r/min 在 4℃ 下离心 10 min,弃去上清液,然后用培养液将每个离心管的底物溶解定容到 30 mL;重复上述操作 2 次后,各取 1 mL 分别稀释 500 倍、1 250 倍、2 500 倍,用于测试细菌的数量^[29]。

1.3 实验设计

为了考察无机碳源(inorganic carbon, IC)对菌-藻体系中微藻生长和聚集的影响,设置 2 个实验组和 1 个对照组,其中实验组 1 考察在初始菌藻数量比为 3:1 时无机碳质量浓度 ρ_{IC} 对菌-藻体系中微藻生长和聚集的影响,实验组 2 初始菌藻数量比为 15:1,对照组为纯藻,3 组实验的具体设计如下所述。

1) 实验组 1(菌藻数量比 3:1)。准备 3 个体积为 500 mL 的玻璃锥形瓶(其编号分别为 1[#]、2[#]、3[#]),向 3 个锥形瓶中各加入完全相同的 315 mL 且生长已经达到对数生长期的微藻(6.8×10^5 个/mL),然后向 3 个锥形瓶中各加入 0.25 mL 的细菌(8.5×10^8 个/mL),保证初始的菌藻数量比^[30]为 3:1。向 1[#] 瓶中加入培养液 350 mL(1[#] 瓶,不加 IC);向 2[#] 瓶中同时加入 7 mL 碳酸氢钠溶液($\rho_{IC} = 1\ 880.0$ mg/L)、343 mL 培养液,混匀,使 2[#] 瓶中 $\rho_{IC} = 37.6$ mg/L(2[#] 瓶, $\rho_{IC} = 37.6$ mg/L);向 3[#] 瓶中同时加入 35 mL 碳酸氢钠溶液($\rho_{IC} = 1\ 880.0$ mg/L)、315 mL 培养液,混匀,使得 3[#] 瓶中 $\rho_{IC} = 188.0$ mg/L(3[#] 瓶, $\rho_{IC} = 188.0$ mg/L)。在光照培养箱中培养观察,光照培养箱条件与微藻培养条件一致。

2) 实验组 2(菌藻数量比 15:1)。将初始菌藻数量比由 3:1 变成 15:1,其余条件与实验组 1 完全相同。

3) 对照组(纯藻)。初始无细菌,其余条件与

实验组 1 相同。

每组样品设置 3 个平行样,以减小实验误差。

培养液成分^[31]如下:

$$\rho(\text{NaNO}_3)=121.43 \text{ mg/L},$$

$$\rho(\text{KH}_2\text{PO}_4)=18.00 \text{ mg/L},$$

$$\rho(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})=90.00 \text{ mg/L},$$

$$\rho(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})=14.00 \text{ mg/L},$$

$$\varphi_{\text{组分A}}=1.25 \text{ mL/L}, \varphi_{\text{组分B}}=1.25 \text{ mL/L}.$$

组分 A、组分 B 的成分见表 1 所列^[31]。

表 1 组分 A 和组分 B 的成分

组分	成分	$\rho/(\text{g/L})$
组分 A	EDTA	5.00
	FeSO ₄	5.00
组分 B	EDTA	15.00
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.43
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.99
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.22
	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.19
	H ₃ BO ₄	0.014

1.4 分析方法

1.4.1 SEM 表征

采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察微藻聚集体表面和内部结构。吸取适量微藻样品置于 5 mm×5 mm 硅片(艾思科技有限公司)上,放入-4 °C 冰箱冷冻 4 h,然后放入 BT2KXL 真空冷冻干燥机(美国 VirTis 公司)冷干 8 h。冷干结束进行样品预处理^[32]。将处理好的样品置于 Supra 40 场发射扫描电子显微镜(德国 Zeiss 集团)下观察分析。

1.4.2 微藻聚集率

从反应器中取 50 μL 样品放在载玻片上,置于 BA410 光学显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司上海分公司)下观察拍摄,采用 Motic Images Plus 2.0 软件对微藻图像进行采集拍摄,并随机摄取 15 个视野进行图像分析,图像中 2 个及 2 个以上聚集在一起的微藻即判定为聚集体^[33],聚集率 G 计算公式为:

$$G = (B_1/B_0) \times 100\% \quad (1)$$

其中: B_1 为视野中聚集的藻细胞数; B_0 为视野中藻细胞总数。

1.4.3 微藻生物量

摇匀锥形瓶中样品后,取 4 mL 样品放入 5 mL 离心管中,在 8 000 r/min 下离心 10 min,弃去上清液,将剩余物重新悬浮在 4 mL 的 90% 丙

酮(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)中,放入冰箱,在 4 °C 下避光保存 24 h。以 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液用紫外分光光度法测定 630、645、663、750 nm 波长下的吸光度 A ,以 90% 丙酮溶液作为空白对照,叶绿素 a 的质量浓度计算公式^[34]为:

$$\rho_{\text{叶绿素a}} = [11.64(A_{663} - A_{750}) -$$

$$2.16(A_{645} - A_{750}) + 0.10(A_{630} - A_{750})]V \quad (2)$$

其中, V 为提取样品的体积。

由式(2)得到 $\rho_{\text{叶绿素a}}$ 后,再通过标准曲线将 $\rho_{\text{叶绿素a}}$ 换算成微藻的细胞数。

1.4.4 胞外聚合物的提取和分析

从锥形瓶中取 4 mL 样品放入 5 mL 的离心管中,先以 4 000 r/min 离心 5 min 后,去除上清液,再加入 4 mL 去离子水,然后在 80 °C 水浴加热 1 h,取出样品,以 8 000 r/min 离心 5 min 后,将上清液通过 0.22 μm 滤膜过滤,用于测量胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)中的多糖和蛋白质^[35]。

1) 多糖的测定。采用硫酸-蒽酮法,以葡萄糖作标准物质测定标准曲线^[36-37]。取 1 mL 合理稀释的滤后样品放入试管中,加入 3 mL 的 0.2% 蒽酮-硫酸溶液,然后放入冷水中冷却,充分振荡并立即放入沸水浴中,15 min 后取出,冷水浴 5 min;以超纯水空白样作参比,在 620 nm 波长下,使用 UV2600 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯科学仪器有限公司)测其吸光度。

2) 蛋白质的测定。采用 Lowry 法,以牛血清蛋白作标准物质测定标准曲线,在 750 nm 波长下测蛋白质质量浓度^[38]。

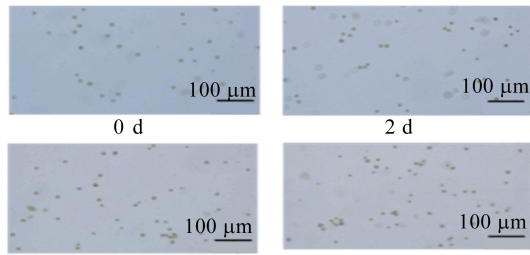
2 实验结果与分析

2.1 SEM 表征分析

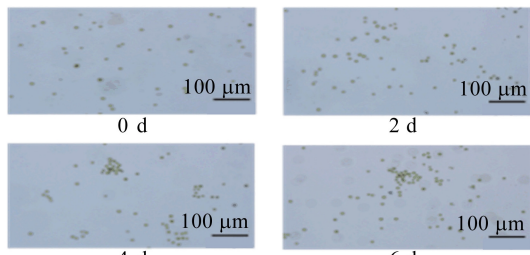
聚集体的形成过程和 SEM 下的菌藻聚集体如图 1 所示。

从图 1 可以看出,纯藻大多处于分散状态,而加入细菌后的微藻从第 2 天开始,具有明显的聚集趋势,此时没有较大的聚集体出现,到第 4 天时微藻形成的聚集体开始变大,聚集体尺寸约为 50 μm ,到第 6 天时聚集体变得更大,尺寸接近 100 μm 。这说明细菌有助于微藻的聚集,且随着时间增加,聚集体逐渐增大,有利于微藻的沉降和收集。

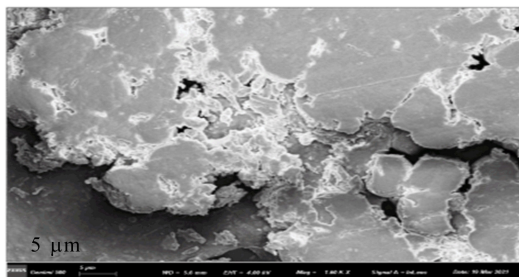
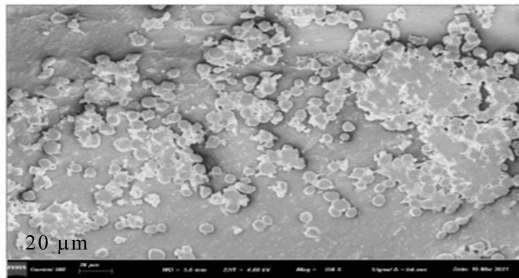
由此可知,细菌和 EPS 将藻细胞联系在一起,形成了菌藻聚集体。



(a) 纯藻培养中聚集体的形成过程



(b) 菌藻数量比3:1下聚集体的形成过程



(c) SEM下的菌藻聚集体

图 1 聚集体的形成过程和 SEM 下的菌藻聚集体

2.2 微藻聚集率分析

不同初始质量浓度碳酸氢钠下微藻的聚集率如图 2 所示。图 2 中, a、b、c 表示显著性差异。

从图 2 可以看出, 随着碳酸氢钠初始质量浓度增加, 微藻的聚集率增加。纯藻到第 6 天, 聚集率最大可达 27%; 菌-藻体系前 2 d 微藻的聚集率没有太大变化, 初始菌藻数量比 3 : 1 下到第 4 天时, 微藻的聚集率骤增, 最高可达 43%, 到第 6 天时增长到最大, 高达 60%; 初始菌藻数量比 15 : 1 下到第 4 天时, 微藻的聚集率骤增, 最高可达 52%, 到第 6 天时聚集率达到最大值 66%。由此可见, 初始投加碳酸氢钠对微藻的聚集率有一定的促进作用, 且对菌藻共培养时微藻聚集率的促

进效果要远大于纯藻培养时。

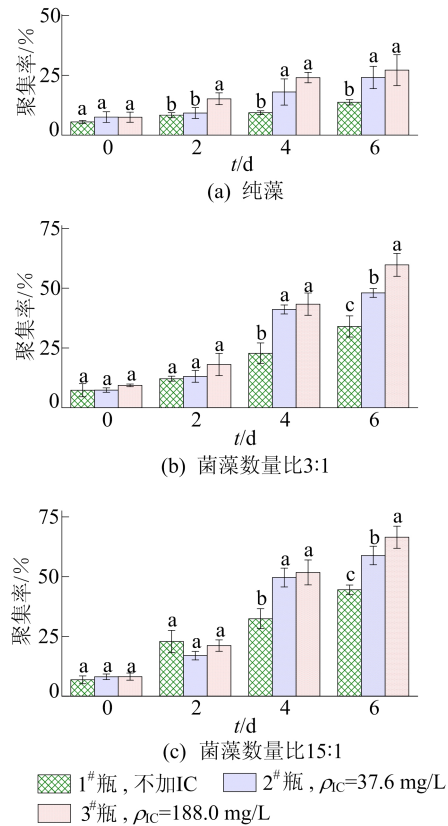


图 2 不同初始质量浓度碳酸氢钠下微藻的聚集率

2.3 微藻生物量分析

不同初始质量浓度碳酸氢钠下微藻的生长如图 3 所示。从图 3 可以看出, 初始碳酸氢钠质量浓度越大, 微藻的生物量越大。由图 3a 可知, 纯藻在第 6 天时微藻的生物量随着 ρ_{IC} 增加, 1#、2#、3# 瓶中依次为 1.028×10^6 、 1.065×10^6 、 1.103×10^6 个/mL, 第 5 天时 3# 瓶微藻生物量是 1# 瓶的 1.08 倍。由图 3b 可知, 初始菌藻数量比 3 : 1 下, 在第 6 天时微藻的生物量随着 ρ_{IC} 增加, 1#、2#、3# 瓶中依次为 0.998×10^6 、 1.140×10^6 、 1.355×10^6 个/mL, 第 5 天时 3# 瓶微藻生物量是 1# 瓶的 1.37 倍。由图 3c 可知, 初始菌藻数量比 15 : 1 下, 在第 6 天时微藻的生物量随着 ρ_{IC} 增加, 1#、2#、3# 瓶中依次为 0.967×10^6 、 1.255×10^6 、 1.681×10^6 个/mL, 2#、3# 瓶分别较纯藻培养体系增加 30%、68%。此外, 在第 5 天时 3# 瓶微藻生物量远高于 1# 瓶, 前者是后者的 1.81 倍。纯藻培养中, 微藻的生物量随着初始 ρ_{IC} 增加而增加的效果不显著 ($P > 0.05$), 而在菌藻共培养中, 微藻的生物量随着初始 ρ_{IC} 增加显著增加, 且初始菌藻数量比越大, 增加得越显著(初始菌藻数量比 3 : 1 下,

$P < 0.05$; 初始菌藻数量比 15 : 1 下, $P < 0.001$ 。

初始 ρ_{IC} 增加而减小, 到第 6 天时 3 个瓶中的蛋白质质量浓度已无明显差异。

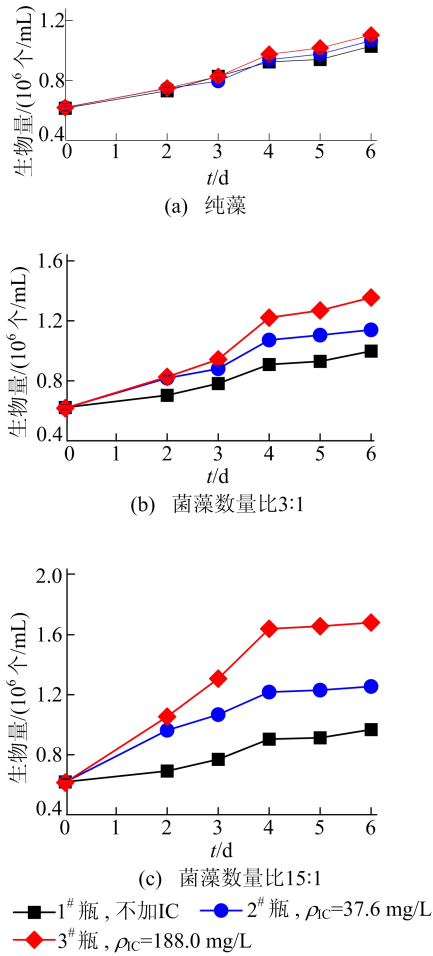


图 3 不同初始质量浓度碳酸氢钠下微藻的生长

2.4 EPS 质量浓度分析

不同初始质量浓度碳酸氢钠下蛋白和多糖的质量浓度如图 4 所示。

由图 4a 可知: 纯藻蛋白质量浓度随着初始 ρ_{IC} 增加而减小, 在第 6 天时组间差距最大, 此时最大是 1[#] 瓶, 为 54.54 mg/L, 最小是 3[#] 瓶, 为 14.77 mg/L; 多糖质量浓度大致随着初始 ρ_{IC} 增加而增加, 在第 4 天时多糖质量浓度达到最大, 为 67.66 mg/L。

由图 4b 可知, 初始菌藻数量比 3 : 1 下, 蛋白质量浓度随着初始 ρ_{IC} 增加而减小, 多糖质量浓度随着初始 ρ_{IC} 增加而增加, 第 6 天时多糖质量浓度达到最大值 82.45 mg/L。

由图 4c 可知: 初始菌藻数量比 15 : 1 下, 多糖质量浓度随着初始 ρ_{IC} 增加而增加, 第 4 天时达到最大值 87.35 mg/L; 蛋白质量浓度在第 1 天随着初始 ρ_{IC} 增加而增加, 第 2 天 1[#] 瓶的蛋白质量浓度最大, 其次是 3[#] 瓶, 2[#] 瓶最小, 第 4 天随着

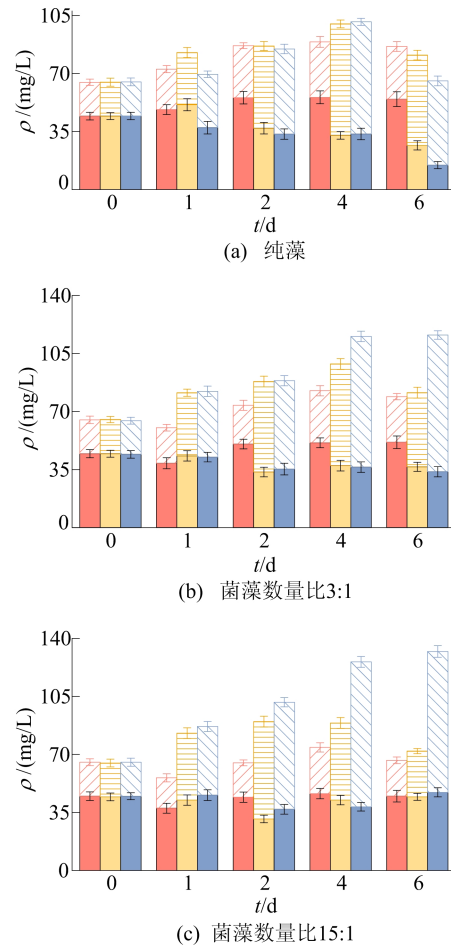


图 4 不同初始质量浓度碳酸氢钠下蛋白和多糖的质量浓度

3 讨 论

本文通过实验研究在不同初始菌藻数量比下, 外加不同质量浓度的碳酸氢钠对微藻生长和聚集的影响。实验结果表明, 污泥细菌可以加速小球藻的聚集, 且初始菌藻数量比越大, 聚集效果越好。一方面初始加入的细菌量越大, 细菌与微藻之间碰撞结合的几率变大, 更容易碰撞在一起形成聚集体^[39-40]; 另一方面, 细菌越多, 在无有机碳源的情况下, 促使更多的细菌去寻找有机碳源而与微藻结合在一起形成聚集体^[41]。研究发现, *Rhizobium* 可以通过固氮作用为微藻提供氮源, *Bacillus*、*Sphingomonas* 等可以刺激微藻分泌更多的色氨酸、鼠李糖等 EPS, 这些菌属的存在对微藻聚集有着重要作用^[42-44]。

由于碳酸氢盐在水中溶解度较高,且与 HCO_3^- 相比, CO_3^{2-} 对光合作用没有明显的促进或抑制作用,因而 HCO_3^- 易被微藻大量吸收利用^[45-46]。在加入碳酸氢钠后,微藻的生物量随着初始 ρ_{IC} 增加而增大,在纯藻培养时微藻的生物量增加得不显著,而在菌藻共培养时出现明显的大幅度增加。随着初始 ρ_{IC} 增加,微藻的生长和聚集都得到促进,一方面是由于在无机碳充足的情况下,微藻能够给细菌提供的营养物质相对变多,细菌本身在这种无有机碳环境下追寻微藻获取营养物质的程度加大,从而更多地与微藻结合在一起,因此对微藻生长和聚集都起到促进作用。

细菌会刺激微藻分泌多糖^[47],在无碳酸氢钠情况下,随着初始菌藻数量比增加,多糖的质量浓度不断减小,这是由于细菌数量越多,其消耗营养物质多糖的量会越大;初始加入低质量浓度碳酸氢钠后,微藻自身的营养条件变得更加充足,前 2 d 随着初始菌藻数量比增加,细菌刺激微藻分泌更多的多糖来作为其营养物,同时微藻也随着初始菌藻数量比的增加生长得更快,到第 4 天和第 6 天时,随着初始菌藻数量比增加,多糖的质量浓度不断减小,这是由于随着碳酸氢钠的消耗,微藻的生存压力相对增加,同时细菌的数量增加,加大了对多糖的消耗,分泌的多糖量少于细菌消耗的多糖量。多糖可能是引发菌藻聚集的主要原因,在以往的研究中,通常只关注了蛋白质质量浓度对微生物聚集的影响^[16,48-49],而忽视了多糖的作用^[50-51]。有研究采用激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)技术分析发现, β 多糖(即 β -(1,3)-葡萄糖的高聚物)均匀分布在聚集体内,对聚集体内部稳定性起到支撑作用^[52]。此外,微藻所分泌的胶鞘多糖与细胞表面密切相关,其所含有的纤维素可作为黏附剂帮助细胞附着^[53]。

4 结 论

1) 外源无机碳的出现对于纯培养小球藻的生长没有显著影响,但在菌-藻混合体系中可以显著促进微藻的生长。在低质量浓度 IC 水平下,初始菌藻数量比为 15 : 1 时,经过 6 d 培养,微藻生物量较纯藻培养体系增加 30%;当 ρ_{IC} 升高至 188.0 mg/L 时,微藻生物量较纯藻培养体系增加 68%。

2) 菌-藻共生体系有助于微藻发生聚集,并且随着体系中 ρ_{IC} 增加,其聚集效果变得更明显。

3) 在 IC 不充足时,菌-藻体系中 EPS 的质量浓度随初始菌藻数量比的增加而减小,当 IC 较充足时,菌-藻体系中 EPS 的质量浓度随初始菌藻数量比的增加而增大,细菌会促进微藻分泌多糖且利用多糖作为自身的营养物质,多糖质量浓度与微藻聚集有重大关系。

[参 考 文 献]

- [1] MA Y C, LIU S Y, WANG Y, et al. Direct biodiesel production from wet microalgae assisted by radio frequency heating[J]. Fuel, 2019, 256: 115994.
- [2] CHU S, MAJUMDAR A. Opportunities and challenges for a sustainable energy future[J]. Nature, 2012, 488: 294-303.
- [3] HILL J, NELSON E, TILMAN D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuel [J]. PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(30): 11206-11210.
- [4] ABOMOHR A E F, EL-SHEEKH M, HANELT D. Pilot cultivation of the chlorophyte microalga *Scenedesmus obliquus* as a promising feedstock for biofuel [J]. Biomass and Bioenergy, 2014, 64: 237-244.
- [5] LIU J X, ZHU Y, TAO Y J, et al. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease [J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6: 98.
- [6] DAY J G, SLOCOMBE S P, STANLEY M S. Overcoming biological constraints to enable the exploitation of microalgae for biofuels [J]. Bioresource Technology, 2012, 109: 245-251.
- [7] LIU L, HONG Y L, YE X, et al. Biodiesel production from microbial granules in sequencing batch reactor [J]. Biore-source Technology, 2018, 249: 908-915.
- [8] XU K W, ZOU X T, WEN H, et al. Buoy-bead flotation harvesting of the microalgae *Chlorella vulgaris* using surface-layered polymeric microspheres: a novel approach [J]. Bioresource Technology, 2018, 267: 341-346.
- [9] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae [J]. Biotechnology Advances, 2007, 25: 294-306.
- [10] PHUKAN M M, CHUTIA R S, KONWAR B K, et al. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock [J]. Applied Energy, 2011, 88: 3307-3312.
- [11] CHU H Q, YU H, TAN X B, et al. Extraction procedure optimization and the characteristics of dissolved extracellular organic matter (dEOM) and bound extracellular organic matter (bEOM) from *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015, 125: 238-246.
- [12] KONIG R B, SALES R, ROSELET F, et al. Harvesting of the marine microalga *Conticribra weissflogii* (Bacillariophyceae) by cationic polymeric flocculants [J]. Biomass and Bioenergy, 2014, 68: 1-6.
- [13] ALAM F, DATE A, RASJIDIN R, et al. Biofuel from Algae: is it a viable alternative? [J]. Procedia Engineering, 2012, 49: 221-227.

- [14] SLADE R, BAUEN A. Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2013, 53: 29-38.
- [15] MATAMOROS V, UGGETTI E, GARCIA J, et al. Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 301: 197-205.
- [16] ZHOU D D, ZHANG C F, FU L, et al. Responses of the microalga *Chlorophyta* sp. to bacterial quorum sensing molecules (*N*-acylhomoserine lactones); aromatic protein-induced self-aggregation [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(6): 3490-3498.
- [17] CHOI H J. Effect of eggshells for the harvesting of microalgae species[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29(4): 666-672.
- [18] KANDASAMY G, SHALEH S R M. Harvesting of the microalga *Nannochloropsis* sp. by bioflocculation with mung bean protein extract[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 182(2): 586-597.
- [19] CHRISTENSON L, SIMS R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29: 686-702.
- [20] MUJTABA G, LEE K. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge[J]. *Water Research*, 2017, 120: 174-184.
- [21] WANG S F, LIU J X, LI C, et al. Efficiency of *Nannochloropsis oculata* and *Bacillus polymyxa* symbiotic composite at ammonium and phosphate removal from synthetic wastewater [J]. *Environmental Technology*, 2019, 40(19): 2494-2503.
- [22] ROY M, MOHANTY K. Valorization of waste eggshell-derived bioflocculant for harvesting *T. obliquus*: process optimization, kinetic studies and recyclability of the spent medium for circular bioeconomy[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 307: 123205.
- [23] BOSMA R, VAN SPRONSEN W A, TRAMPER J, et al. Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2003, 15: 143-153.
- [24] VANDAMME D, FOUBERT I, MUYLEAERT K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production [J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(4): 233-239.
- [25] MUNOZ R, GUIEYSSSE B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants; a review [J]. *Water Research*, 2006, 40: 2799-2815.
- [26] SU Y Y, MENNERICH A, URBAN B. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture [J]. *Water Research*, 2011, 45: 3351-3358.
- [27] VALIGORE J M, GOSTOMSKI P A, WAREHAM D G, et al. Effects of hydraulic and solids retention times on productivity and settleability of microbial (microalgal-bacterial) biomass grown on primary treated wastewater as a biofuel feedstock [J]. *Water Research*, 2012, 46: 2957-2964.
- [28] TANG C C, ZUO W, TIAN Y, et al. Effect of aeration rate on performance and stability of algal-bacterial symbiosis system to treat domestic wastewater in sequencing batch reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 222: 156-164.
- [29] BOULOS L, PREVOST M, BARBEAU B, et al. LIVE/DEAD® *BacLight*™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 37: 77-86.
- [30] YE J F, LIANG J Y, WANG L, et al. Operation optimization of a photo-sequencing batch reactor for wastewater treatment; study on influencing factors and impact on symbiotic microbial ecology[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 252: 7-13.
- [31] MA B, QIAN W T, YUAN C S, et al. Achieving mainstream nitrogen removal through coupling anammox with denitrification[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(15): 8405-8413.
- [32] CHEN X H, ZHANG C, TAN L J, et al. Toxicity of Co nanoparticles on three species of marine microalgae [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 454-461.
- [33] CHEN G W, ZHU N, TANG Z B, et al. Resource availability shapes microbial motility and mediates early-stage formation of microbial clusters in biological wastewater treatment processes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(3): 1459-1467.
- [34] JI X Y, JIANG M Q, ZHANG J B, et al. The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 44-50.
- [35] HE Q L, CHEN L, ZHANG S J, et al. Natural sunlight induced rapid formation of water-born algal-bacterial granules in an aerobic bacterial granular photo-sequencing batch reactor [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359: 222-230.
- [36] LI X Y, YANG S F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge [J]. *Water Research*, 2007, 41: 1022-1030.
- [37] WILEN B M, JIN B, LANT P. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties [J]. *Water Research*, 2003, 37: 2127-2139.
- [38] SUN L, TIAN Y, ZHANG J, et al. A novel membrane bioreactor inoculated with symbiotic sludge bacteria and algae; performance and microbial community analysis [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 251: 311-319.
- [39] OGBONNA J C, YOSHIZAWA H, TANAKA H. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12: 277-284.
- [40] STAATS N, STAL L J, MUR L R. Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*; effects of nutrient conditions [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, 249(1): 13-27.

- dynamic data for Mn_3O_4 , Mn_2O_3 and MnO_2 [J]. High Temperature Materials and Processes, 2012, 30: 459-472.
- [14] ZHANG W S, CHENG C Y, PRANOLO Y. Investigation of methods for removal and recovery of manganese in hydrometallurgical processes [J]. Hydrometallurgy, 2010, 101: 58-63.
- [15] 王金保, 闫伟伟. 铁氧体沉淀法处理含锰废水的研究 [J]. 上海环境科学, 2007, 26(1): 31-33.
- [16] LE BOURRE B, NECULITA C M, COUDERT L, et al. Manganese removal processes and geochemical behavior in residues from passive treatment of mine drainage [J]. Chemosphere, 2020, 259: 127424.
- [17] 罗超, 陈小红. 运用铁氧体沉淀法处理含锰废水 [J]. 江西科学, 2006(5): 370-373.
- [18] PATIL D S, CHAVAN S M, OUBAGARANADIN J U K. A review of technologies for manganese removal from wastewaters [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2016, 4: 468-487.
- [19] TEBO B M, BARGAR J R, CLEMENT B G, et al. Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation [J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2004, 32: 287-328.
- [20] KIM S T, KANG J O, YUN S T, et al. Experimental studies of oxygen isotope fractionation between rhodochrosite ($MnCO_3$) and water at low temperatures [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2009, 73: 4400-4408.
- [21] WANG X M, LAN S, ZHU M Q, et al. The presence of ferrihydrite promotes abiotic formation of manganese (oxyhydr)oxides [J]. Soil Science Society of America Journal, 2015, 79(5): 1297-1305.
- [22] LAN S, WANG X M, XIANG Q J, et al. Mechanisms of Mn(II) catalytic oxidation on ferrihydrite surfaces and the formation of manganese (oxyhydr)oxides [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2017, 211: 79-96.
- [23] YU C, MEI Y, XUE Y H, et al. A novel approach for recovery of manganese from on-site manganese-bearing wastewater [J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 227: 675-682.
- [24] 马子川, 谢亚勃, 郑世钧. $Mn(OH)_2$ 空气氧化反应研究 [J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2000, 24(3): 353-355.
- [25] RODRIGUEZ-GALAN M, BAENA-MORENO F M, VAZQUEZ S, et al. Remediation of acid mine drainage [J]. Environmental Chemistry Letters, 2019, 17: 1529-1538.

(责任编辑 张淑艳)

(上接第 1601 页)

- [41] ZHAO R R, CHEN G W, LIU L, et al. Bacterial foraging facilitates aggregation of *Chlamydomonas microspheara* in an organic carbon source-limited aquatic environment [J]. Environmental Pollution, 2020, 259: 113924.
- [42] LEE J, CHO D H, RAMANAN R, et al. Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris* [J]. Bioresource Technology, 2013, 131: 195-201.
- [43] LIU Y P, CHEN L, ZHANG N, et al. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2016, 29(4): 324-330.
- [44] RIVAS M O, VARGAS P, RIQUELME C E. Interactions of *Botryococcus braunii* cultures with bacterial biofilms [J]. Microbial Ecology, 2010, 60(3): 628-635.
- [45] ANWAR M N, FAYYAZ A, SOHAIL N F, et al. CO_2 capture and storage: a way forward for sustainable environment [J]. Journal of Environmental Management, 2018, 226: 131-144.
- [46] GAO K S, MCKINLEY K R. Use of macroalgae for marine biomass production and CO_2 remediation: a review [J]. Journal of Applied Phycology, 1994, 6: 45-60.
- [47] JOHNSON M R, MONTERO C I, CONNERS S B, et al. Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* [J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(3): 664-674.
- [48] MA X C, ZHOU W G, FU Z Q, et al. Effect of wastewater-borne bacteria on algal growth and nutrients removal in wastewater-based algae cultivation system [J]. Bioresource Technology, 2014, 167: 8-13.
- [49] LIU L, FAN H Y, LIU Y H, et al. Development of algae-bacteria granular consortia in photo-sequencing batch reactor [J]. Bioresource Technology, 2017, 232: 64-71.
- [50] ADAV S S, LEE D J, SHOW K Y, et al. Aerobic granular sludge: recent advances [J]. Biotechnology Advances, 2008, 26: 411-423.
- [51] SARMA S J, TAY J H, CHU A. Finding knowledge gaps in aerobic granulation technology [J]. Trends in Biotechnology, 2017, 35: 66-78.
- [52] XIAO R, ZHENG Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications [J]. Biotechnology Advances, 2016, 34: 1225-1244.
- [53] 陈何舟, 左胜鹏, 秦伯强, 等. 微囊藻聚集与迁移机制的研究进展 [J]. 环境科学与技术, 2019, 42(1): 142-149.

(责任编辑 张淑艳)