

# 固定化藻类对海水养殖废水中氨氮·无机磷的净化效果

张雪, 戴媛媛, 韩现芹, 高燕 (天津渤海水产研究所, 天津 300457)

**摘要** [目的]明确固定化藻类技术应用于净化海水养殖废水的可行性。[方法]采用海藻酸钙凝胶包埋固定的方法,将培养至对数末期的普通小球藻进行固定,制备3,4,5 mm不同粒径的固定化藻球,比较悬浮藻与不同粒径固定化藻球对海水养殖废水中氨氮和无机磷的去除率及微藻的生长特性。并选择直径为4 mm的藻球、空白胶球、悬浮藻液分别按10%和15%的填充率投入海水养殖废水中,研究不同填充率条件下藻球对海水养殖废水中氨氮和无机磷的净化效果。[结果]4 mm固定化藻球对海水养殖废水中氨氮、无机磷的去除率较高,填充率为15%条件下去除效果更佳,但藻细胞生长被延缓。[结论]该研究可为固定化小球藻处理海水养殖废水的工厂化应用提供科学依据。

**关键词** 固定化藻;海水养殖废水; $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ;  $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ ; 去除率

**中图分类号** S949 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)07-0047-03

## Research on Purification Effect for Nitrogen and Phosphorus in Mariculture Wastewater by Immobilized Algae

ZHANG Xue, DAI Yuan-yuan, HAN Xian-qin et al (Tianjin Bohai Sea Fisheries Research Institute, Tianjin 300457)

**Abstract** [Objective] The feasibility of the application of immobilized algae technology in the purification of mariculture wastewater was explored. [Method] Different diameter size of algae ball as 3, 4, 5 mm was made from the immobilized *Chlorella vulgaris* training to the end of logarithm with the method of embedding fixed calcium alginate gel, different diameter size algae ball with suspended algae on removal rate of ammonia nitrogen and inorganic phosphorus and the growth characteristic of the algae cell in mariculture wastewater were compared. And choosing the 4 mm diameter algae ball, putting them into the mariculture wastewater with blank plastic ball and suspended algae respectively according to the filling rate of 10% and 15%, the purification efficiency of ammonia nitrogen and inorganic phosphorus in aquaculture wastewater was studied. [Result] The results showed that the removal rate of nitrogen and phosphorus was higher under the condition of the immobilized algae ball in 4 mm diameter size and 15% filling rate in mariculture wastewater, but the growth of algae cells in fixed algal ball was delayed. [Conclusion] The study can provide scientific basis for factory application of the treatment of mariculture wastewater by immobilized algae technology.

**Key words** Immobilized algae; Mariculture wastewater;  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ;  $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ ; Removal rate

微藻固定化技术是利用载体将藻类细胞固定,形成固定化藻类系统,该系统不仅不溶解于水,并且细胞具有良好的生物活性,该技术起始于1969年日本生物学家千畑一郎创建的固定化技术。固定化技术早期用于固定化酶,随后用于细菌、酵母等微生物活细胞的固定化培养。1979年被Brodeur用于植物细胞的固定化培养<sup>[1]</sup>,到20世纪90年代才对固定化微藻培养展开一些探索性的研究<sup>[1-2]</sup>。早期研究表明,微藻固定化培养具有广阔的应用前景,如次生代谢物质的生产<sup>[3]</sup>、种质保存<sup>[4]</sup>、污水处理<sup>[5-14]</sup>等。其中,固定化藻类处理污水是近年发展起来的一项污水处理新技术,该技术应用于污水处理,具有藻细胞浓度高、反应速度快、藻细胞易于收获等优势<sup>[5-6]</sup>。藻类固定化以后,提高了对废水中氮、磷和重金属等废物的吸收和富集<sup>[7-8]</sup>,随着固定化微藻处理污水技术的成熟,学者开始进行一些深入性的研究,如固定剂的选择、藻类的筛选、影响固定化藻类对废水中氮、磷去除的理化因素等<sup>[7]</sup>。国内在这方面的研究多集中于对淡水微藻的固定化培养及其处理市政污水、印染废液等<sup>[10-13]</sup>,而对海洋微藻固定化方面的研究不多,只有Hertzberg等<sup>[2]</sup>和马志珍等<sup>[4,15]</sup>曾开展过一些重要的基础研究。

近年来,随着工厂化海水养殖业的不断发展壮大,养殖企业为降低成本将未经处理的养殖废水任意排放,废水中的氮、磷等营养物质流入河流、湖泊和大海,加剧了水体富营养

化,给水资源造成了严重威胁。因此,寻找一种廉价、快捷治理海水养殖废水的方法刻不容缓。笔者利用固定化藻类技术,研究去除海水养殖废水中氮、磷的方法,旨在为固定化小球藻处理海水养殖废水中氮、磷的工厂化应用提供基础数据。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)购自中国科学院海洋研究所。试验用水采自天津汉沽兴盛养殖场南美白对虾养殖废水池,经过滤、加热灭菌处理以排除试验中其他干扰因素。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 微藻培养。**在无菌条件下,用移液枪接种一定量的藻种于含300 mL f/2培养基的500 mL三角瓶中,使培养基的接种密度为 $1 \times 10^6$  个/mL,混匀,在温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、t(光):t(暗)=1:1、光强2 000 lx的条件下培养,定时摇动2次/d。

**1.2.2 藻类固定化方法。**将培养至对数期末的微藻在4 000 r/min转速下离心浓缩10 min,弃上清液,用灭菌蒸馏水冲洗并离心2~3次以去除附着在微藻表面的氮和磷,然后将离心后的浓缩液悬浮于灭菌蒸馏水中,用血球计数板计数后取一定体积浓缩液,与预先高压灭菌冷却的5%海藻酸钠等体积混匀,用无菌注射器吸取,滴入3%预冷的 $\text{CaCl}_2$ 液面,制成固定化藻球,放置12 h使海藻酸钠与 $\text{CaCl}_2$ 充分反应,无菌水或养殖废水洗涤2~3次。

**1.2.3 固定化藻球脱固定化方法。**固定化微藻中藻细胞的测定,是将固定化小球藻放入盛有3%柠檬酸钠溶液的小烧杯中,置于振荡器上振荡至胶球全部溶解,取一定量藻液至

**基金项目** 天津市水产局青年科技项目(J2014-06)。

**作者简介** 张雪(1985—),女,河南开封人,工程师,硕士,从事海洋浮游植物生态学研究。

**收稿日期** 2017-01-10

于血球计数板上,在倒置显微镜下计数,每组3次重复。

**1.2.4 营养盐测定方法。**参照国家《海洋监测规范》(GB 17378.4—2007),采用次溴酸盐氧化法测定氨态氮含量;采用磷钼蓝分光光度法测定无机磷含量。

### 1.3 试验设计

**1.3.1 不同粒径的固定化藻球制备方法。**利用藻类固定化方法,采用不同型号(0.8#、1.2#、1.6#)的注射器制备粒径分别为3、4、5 mm的固定化藻球。

**1.3.2 投放率影响试验。**选取直径为4 mm的固定化藻球、空白胶球(CK)与悬浮态小球藻,分别按固定化藻球、空白胶球及悬浮藻液体积占总体积的10%和15%的投放率放入盛有500 mL处理过的海水养殖废水的锥形瓶中,并且试验组和对照组(CK)都设3个平行试验,放入光照培养箱中培养。试验温度(25 ± 1) °C, t(光):t(暗) = 1:1,光强2 000 lx,定时摇动2次/d,每天定时测定海水养殖废水中氨氮和无机磷的含量。

**1.4 数据统计与处理** 运用IBM SPSS Statistics 20软件对试验数据进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

## 2 结果与分析

**2.1 悬浮藻与不同粒径固定化藻球对海水养殖废水中氨氮、无机磷的去除效果** 从图1、2可以看出,固定化藻球对氨氮、无机磷的去除率显著高于悬浮藻。不同粒径固定化藻球对氨氮、无机磷的去除效果也不同,4 mm固定化藻球的去除效果较显著,3 mm固定化藻球次之,5 mm固定化藻球稍差。

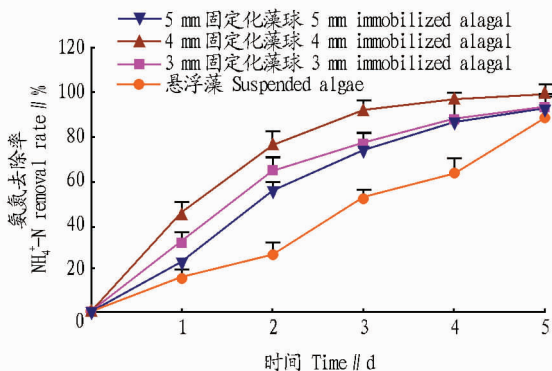


图1 悬浮藻与不同粒径固定化藻球对海水养殖废水中氨氮的去除率

Fig.1 Removal rate of ammonia nitrogen and inorganic phosphorus in aquaculture wastewater by suspended algae and immobilized algae with different particle size

图1显示,试验第1天,固定化藻球的去除效果优于悬浮藻,4 mm固定化藻球的去除效果最好,在40%以上。随后2 d悬浮藻与固定化藻球的去除效果逐渐拉开差距,且4 mm固定化藻球的去除率显著高于其他直径藻球。第4天,4 mm固定化藻球的去除率达到90%以上并趋于平稳,3、5 mm固定化藻球的去除率达到80%以上,悬浮藻的去除率逐渐增大,达80%左右。

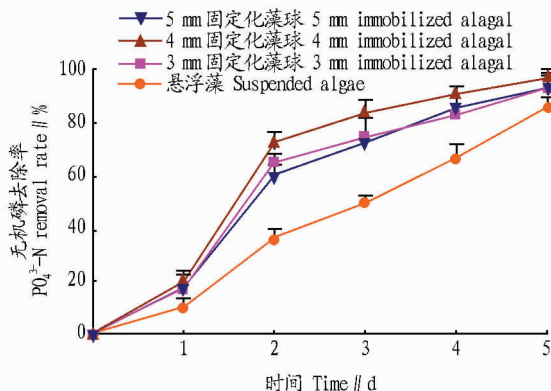


图2 悬浮藻与不同粒径固定化藻球对海水养殖废水中无机磷的去除率

Fig.2 Removal rate of ammonia nitrogen and inorganic phosphorus in aquaculture wastewater by suspended algae and immobilized algae with different particle size

图2显示,试验第1天,固定化藻球的去除率稍优于悬浮藻,不同粒径固定化藻球的去除率无明显差异;第2天悬浮藻与固定化藻球的去除率开始有明显差距,固定化藻球的去除率显著高于悬浮藻,且4 mm固定化藻球的去除率显著高于其他组,随后固定化藻球的去除率变缓,而悬浮藻对无机磷的去除率不断增大。

藻类固定化以后,提高了对氨氮及无机磷的吸收,这主要是由于固定化藻类的生产和生理特征发生了变化<sup>[16-17]</sup>。一般认为,固定化提高了藻类的合成代谢活性,使营养物质被充分吸收,提高了氨氮及无机磷的利用率。

**2.2 悬浮藻与不同粒径固定化藻球细胞生长情况** 从图3可见,悬浮藻细胞生长速度远远大于固定化藻球细胞。不同粒径固定化藻球细胞的生长速度有差别,5 mm固定化藻球细胞生长速度最快,3 mm固定化藻球次之,4 mm固定化藻球最慢。这说明固定化延缓了藻细胞的生长速度,延长了细胞的生长周期。Bailliez等<sup>[18]</sup>利用海藻酸钙固定丛粒藻(*Botryococcus braunii*),发现固定化藻的生长速度略低于悬浮自由态藻,细胞形状相同,大小约为悬浮藻的2.5倍。Robinson等<sup>[19]</sup>研究也发现,CO<sub>2</sub>在载体中难以扩散,使固定在载体中的细胞密集在载体胶珠的外围,限制了固定化细胞的生长增殖。

**2.3 不同投放率悬浮藻、固定化藻球与空白胶球对海水养殖废水中氨氮、无机磷的去除效果** 从图4、5可知,固定化藻球、空白胶球及悬浮藻对海水养殖废水中氨氮及无机磷的去除率差异极显著( $P < 0.05$ )。固定化藻球试验组中,去除率差异不显著( $P > 0.05$ ),第1天去除率差别小,第2天和第3天对氨氮及无机磷的去除率差别较明显,藻球投放量越多去除率越大,第4天、第5天对氨氮及无机磷的去除率逐渐达到饱和,15%固定化藻球去除率稍高,氨氮及无机磷最高去除效率分别达到95%、90%以上;空白胶球试验组与悬浮藻试验组中,不同投放量对氨氮的去除率无显著性差异。由此可知,空白胶球本身对氨氮有一定的去除效果,去除率达到15%左右。藻细胞被固定化后,对养殖海水中氨氮的去除

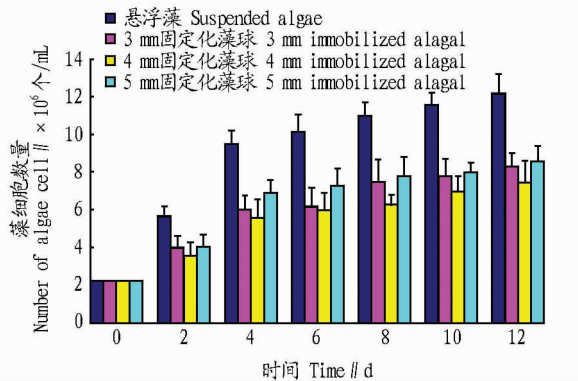


图3 悬浮藻与不同粒径固定化藻细胞的生长情况

Fig. 3 Growth characteristic of chlorella in different diameter size algae ball and suspended algae in mariculture wastewater

率显著提高,而且投放量越多,去除效果越好。

研究发现,褐藻胶微观结构具有四通八达的网络通道<sup>[20]</sup>,褐藻胶质把细胞粘附在基质表面,这种网络结构有利于胶球内小球藻对氮、磷营养物质的吸收,胶球内细胞密度越高,对氮、磷的去除率越高。固定化会改变藻细胞的生理特性和形态特征,张学成等<sup>[21]</sup>通过对固定化微藻的超微结果观察,发现亚心型扁藻藻细胞比游离培养的细胞大,且外表粗糙,凹凸不平,推测是由于固定化培养条件下藻细胞光合作用较强,而物质能量消耗较低。Gonzalez 等<sup>[22]</sup>研究发现,微藻固定化对藻类营养物质的吸收和代谢有影响。

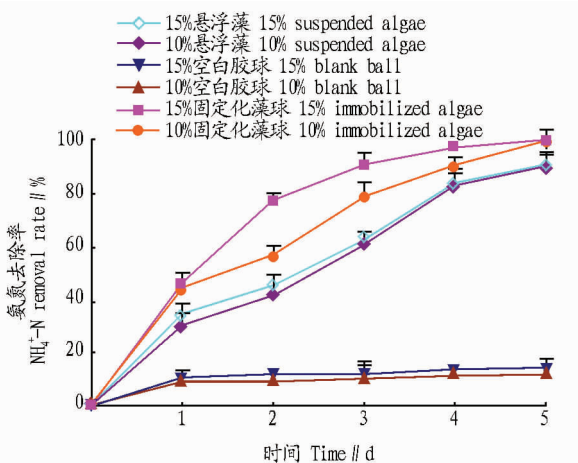


图4 海水养殖废水中氨氮的去除率

Fig. 4 Removal rate of ammonia nitrogen and inorganic phosphorus in aquaculture wastewater

### 3 结论

该研究结果表明,固定化藻球对海水养殖废水中氨氮和无机磷的去除率显著高于悬浮藻,但藻细胞生长被延缓。固定化藻球粒径的大小也会对氨氮、无机磷的去除效果产生影响,一定粒径大小时会促进氮、磷的吸收,直径过大或过小都会影响氮、磷的去除效果。直径为 4 mm 的固定化藻球对海水养殖废水中氨氮、无机磷的去除率较高。固定化藻类投放量的多少也会影响对氨氮、无机磷的去除效果,填充率为 15% 时去除效果更佳。

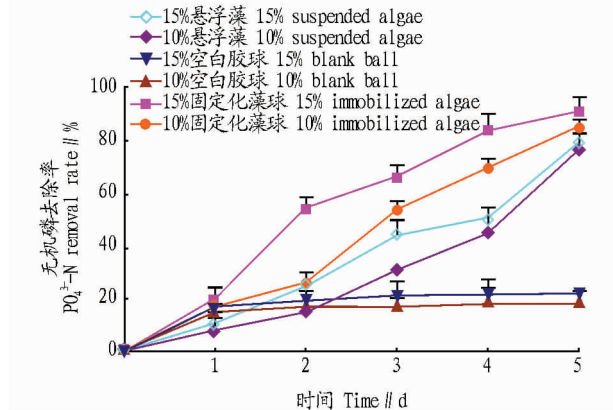


图5 海水养殖废水中无机磷的去除率

Fig. 5 Removal rate of ammonia nitrogen and inorganic phosphorus in aquaculture wastewater

### 参考文献

- [1] 件小南,谭桂英,周百成,等. 几种海洋微藻的固定化培养[J]. 海洋学报,1992,14(1):129-133.
- [2] HERTZBERG S, JENSEN A. Studies of alginate-immobilized marine microalgae[J]. Botanical marina, 1989, 32(4): 267-274.
- [3] ROBINSON P K, MAK A L, TREVAN M D. Immobilized algae: A review[J]. Process biochemistry, 1986, 21(4): 122-127.
- [4] 马志珍,张继红. 海产饵料微藻固定化保种技术[J]. 中国水产科学, 1998, 5(2): 57-61.
- [5] 马志珍. 微藻固定化培养技术及其应用前景[J]. 国外水产, 1993(3): 1-4.
- [6] 严国安,谭智群. 藻类净化污水的研究及其进展[J]. 环境科学进展, 1995, 3(3): 45-55
- [7] MALLICK N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review[J]. Biometals, 2002, 15(4): 377-390.
- [8] CHEVALIER P, DE LA NOÛE J. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan[J]. Enzyme microbial technology, 1985, 7(12): 621-624.
- [9] 孙杰. 几株海洋微藻固定化培养及在西施舌人工育苗中的应用研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2007: 18-26.
- [10] 李贺,王起华,周春影,等. 固定化小球藻对市政污水中 N, P 营养盐的深度处理II. 细胞负载和饥饿处理对氮磷去除率的影响[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2003, 26(2): 183-186.
- [11] 许丹妮. 固定化小球藻净化市政污水的初步研究[J]. 北方环境, 2004, 29(2): 14-18.
- [12] 黄国兰,孙红文,宋志慧,等. 固定化藻类的生理特征和对染料的脱色能力研究[J]. 环境科学学报, 2000, 20(4): 445-449.
- [13] 邢丽贞,张彦浩,孔进,等. 链丝藻的生长规律及其对污水中氨氮去除能力[J]. 城市环境与城市生态, 2003, 16(6): 246-247.
- [14] DARNALL D W, GREENE B, HENZL M T, et al. Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass[J]. Environ Sci Technol, 1986, 20(2): 206-208.
- [15] 马志珍,张继红. 海产底栖硅藻的固定化培养研究[J]. 中国水产科学, 1996, 3(2): 13-19.
- [16] 严国安,李益健,王志坚,等. 固定化栅藻对污水的净化及其生理特征的变化[J]. 中国环境科学, 1995, 15(1): 10-13.
- [17] MALLICK N, RAI L C. Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae[J]. World J Microbiol Biotechnol, 1994, 10(4): 439-443.
- [18] BAILLIEZ C, LARGEAU C, BERKALOFF C, et al. Immobilization of *Botryococcus braunii* in alginate: Influence on chlorophyll content, photosynthetic activity and degeneration during batch cultures[J]. Appl Microbiol and Biotechnol, 1986, 23(5): 361-366.
- [19] ROBINSON P K, GOULDING K H, MAK A L, et al. Factors affecting the growth characteristics of alginate-entrapped *Chlorella* [J]. Enzyme and Microbiol Technol, 1986, 8(12): 725-733.
- [20] 邢丽贞. 固定化藻类去除污水中氨氮及其机理的研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2005: 65-102.

的能力,进一步考察在利用阶段其释放有害物质和营养元素的能力。因此,研究重金属离子对 MAP 法结晶回收磷的影响具有重要意义。

在目前研究的基础上,未来探究 MAP 磷结晶过程重金属的影响可以从以下几方面开展:①进一步深入细化研究重金属的迁移机制,尤其是多种重金属的竞争干扰机制;②可以引入模型模拟的方法,为试验分析提供辅助理论支持;③探索 MAP 回收利用中的重金属转移通道阻断技术与方法,得到高品质安全的磷产品,打通磷的循环利用途径。

### 参考文献

- [1] CORDELL D, DRANGERT J O, WHITE S B. The story of phosphorus: Global food security and food for thought[J]. *Global environmental change*, 2009, 19(2): 292 – 305.
- [2] 于红. 防范化解资源环境风险财政对策研究[D]. 北京: 财政部财政科学研究所, 2014.
- [3] LATIFIAN M, LIU J, MATTIASSON B. Struvite-based fertilizer and its physical and chemical properties[J]. *Environmental technology*, 2012, 33(22/23/24): 2691 – 2697.
- [4] MA N, ROUFF AA, PHILLIPS B L. A<sup>31</sup>P NMR and TG/DSC-FTIR investigation of the influence of initial pH on phosphorus recovery as struvite[J]. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 2014, 2(4): 816 – 822.
- [5] LIU X N, HU Z Y, WANG J Z, et al. Effect of hydraulic retention time and seed material on phosphorus recovery and crystal size from urine in an air-agitated reactor[J]. *Water science and technology*, 2014, 69(7): 1462 – 1468.
- [6] LATIFIAN M, LIU J, MATTIASSON B. Recovery of struvite via coagulation and flocculation using natural compounds[J]. *Environmental technology*, 2014, 35(18): 2289 – 2295.
- [7] UYSAL A, YILMAZEL Y D, DEMIRER G N. The determination of fertilizer quality of the formed struvite from effluent of a sewage sludge anaerobic digester[J]. *Journal of hazardous materials*, 2010, 181(1/2/3): 248 – 254.
- [8] LIU Y H, KWAG J H, KIM J H, et al. Recovery of nitrogen and phosphorus by struvite crystallization from swine wastewater[J]. *Desalination*, 2011, 277(1): 364 – 369.
- [9] RONTELTAP M, MAURER M, GUJER W. The behaviour of pharmaceuticals and heavy metals during struvite precipitation in urine[J]. *Water research*, 2007, 41(9): 1859 – 1868.
- [10] SUZUKI K, TANAKA Y, KURODA K, et al. Removal and recovery of phosphorus from swine wastewater by demonstration crystallization reactor and struvite accumulation device[J]. *Bioresource technology*, 2007, 98(8): 1573 – 1578.
- [11] 黄颖. 重金属对鸟粪石法回收的沉淀物的组成和晶形的影响[J]. *化学工程与装备*, 2008(3): 21 – 25.
- [12] MA N, ROUFF A A. Influence of pH and oxidation state on the interaction of arsenic with struvite during mineral formation[J]. *Environmental science & technology*, 2012, 46(66): 8791 – 8798.
- [13] ROUFF A A, JUAREZ K M. Zinc interaction with struvite during and after

mineral formation[J]. *Environmental science & technology*, 2014, 48(11): 6342 – 6349.

- [14] ROUFF A A. Sorption of chromium with struvite during phosphorus recovery[J]. *Environmental science & technology*, 2012, 46(22): 12493 – 12501.
- [15] GALBRAITH S C, SCHNEIDER P A. Modelling and simulation of inorganic precipitation with nucleation, crystal growth and aggregation: A new approach to an old method[J]. *Chemical engineering journal*, 2014, 240: 124 – 132.
- [16] GALBRAITH S C, SCHNEIDER P A, FLOOD A E. Model-driven experimental evaluation of struvite nucleation, growth and aggregation kinetics[J]. *Water research*, 2014, 56: 122 – 132.
- [17] LAHAV O, TELZHENSKY M, ZEWUHN A, et al. Struvite recovery from municipal-wastewater sludge centrifuge supernatant using seawater NF concentrate as a cheap Mg(II) source[J]. *Separation and purification technology*, 2013, 108: 103 – 110.
- [18] CAPDEVIELLE A, S YKOROVÁ E, BÉLINE F, et al. Kinetics of struvite precipitation in synthetic biologically treated swine wastewaters[J]. *Environmental technology*, 2014, 35(9/10/11/12): 1250 – 1262.
- [19] 李秋成, 张涛, 丁丽丽, 等. 响应面法优化 MAP 沉淀去除回收尿液中磷的研究[J]. *环境科学学报*, 2012, 32(1): 129 – 136.
- [20] LEE S H, YOO B H, LIM S J, et al. Development and validation of an equilibrium model for struvite formation with calcium co-precipitation[J]. *Journal of crystal growth*, 2013, 372: 129 – 137.
- [21] MARKOVSKI J S, MARKOVIĆ D D, ĐOKIĆ V R, et al. Arsenate adsorption on waste eggshell modified by goethite,  $\alpha$ -MnO<sub>2</sub> and goethite/ $\alpha$ -MnO<sub>2</sub>[J]. *Chemical engineering journal*, 2014, 237: 430 – 442.
- [22] HO H H, SWENNEN R, CAPPUYNS V, et al. Speciation and mobility of selected trace metals (As, Cu, Mn, Pb and Zn) in sediment with depth in Cam River-Mouth, Haiphong, Vietnam[J]. *Aquatic geochemistry*, 2012, 19(1): 57 – 75.
- [23] MERRIKHPOUR H, JALALI M. Comparative and competitive adsorption of cadmium, copper, nickel, and lead ions by Iranian natural zeolite[J]. *Clean technologies and environmental policy*, 2013, 15(2): 303 – 316.
- [24] RAHMAN M M, LIU Y H, KWAG J H, et al. Recovery of struvite from animal wastewater and its nutrient leaching loss in soil[J]. *Journal of hazardous material*, 2011, 186: 2026 – 2030.
- [25] 王涌, 邱慧琴, 丁国际. 以缓释肥形式回收污泥溶解液中 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 的研究[J]. *环境污染与防治*, 2011, 33(7): 5 – 9.
- [26] RYU H D, LIM C S, KANG M K, et al. Evaluation of struvite obtained from semiconductor wastewater as a fertilizer in cultivating Chinese cabbage[J]. *Journal of hazardous materials*, 2012, 221/222: 248 – 255.
- [27] ANTONINI S, ARIAS M A, EICHERT T, et al. Greenhouse evaluation and environmental impact assessment of different urine-derived struvite fertilizers as phosphorus sources for plants[J]. *Chemosphere*, 2012, 89(10): 1202 – 1210.
- [28] 官贞珍, 陈德珍. 氨对垃圾焚烧飞灰浸出特性的影响及地球化学模拟[J]. *环境科学*, 2013, 34(6): 2464 – 2472.
- [29] LUKMAN S, ESSA M H, MU'AZU N D, et al. Coupled electrokinetics-adsorption technique for simultaneous removal of heavy metals and organics from saline-sodic soil[J]. *The scientific world journal*, 2013, 10: 1 – 9.

(上接第 49 页)

- [21] 张学成, 仵小南, 李永红. 固定化培养对亚心形扁藻生理功能及超微结构的影响[J]. *海洋学报*, 1994, 16(4): 96 – 101.
- [22] GONZALEZ L E, BASHAN Y. Increased growth of the microalga *Chlorella*

*vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2000, 66(4): 1527 – 1531.