

# 养殖废水固定化微生物脱氮技术研究进展

## The advances in the techniques of nitrogen removal from aquacultural wastewater using immobilized bacteria

任海波<sup>1</sup>, 汝少国<sup>1</sup>, 赵书云<sup>1</sup>, Haruo Saida<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. Toyama University of International Studies, Japan 930-1292)

中图分类号: X703; Q81 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)04-0066-04

20世纪80年代以来,中国在海水养殖业持续高速发展的同时,由于环境保护措施的滞后,致使养殖水域的水体富营养化现象日趋严重,从而导致了沿岸海域生态系统的退化、赤潮和大规模病害的频繁发生<sup>[1]</sup>。富营养化养殖海域最为突出的问题是氮、磷含量严重超标。国家环境保护“十五”计划指出,“十五”期间氨氮排放总量要控制在165万t以内,这就意味着今后中国的污水处理包括养殖废水处理必须进行脱氮。然而,传统的污水处理工艺多以有机物和悬浮物为主要处理目标,对氨氮等营养物质的去除率普遍不高,若原污水氨氮含量较高,则出水氨氮不能达标,而养殖废水中氨氮含量普遍较高。因此,养殖废水的脱氮已引起科学家的极大关注。养殖废水的脱氮方法很多,其中生物脱氮是最经济、有效的方法<sup>[2]</sup>。目前,采用固定化微生物脱氮研究已成为各国学者的研究热点<sup>[3]</sup>。固定化细胞技术最初主要用于发酵生产,70年代后期,被应用到水处理领域,但还极少应用在养殖废水的处理上。作者综述了固定化微生物脱氮技术研究进展,并展望了在养殖废水中应用前景。

### 1 固定化微生物技术

#### 1.1 固定化载体的制备方法

固定化微生物的方法多种多样,主要有表面吸附固定、交联固定化、包埋固定化和自身固定化等几种方法。应用于生物脱氮的微生物固定化方法主要是包埋固定化方法,该法操作简单,能保持多酶系统,对细胞活性影响较小,制作的固定化载体机械强度很高,是目前制备固定化微生物最常用、最广泛的

方法。

#### 1.2 固定化载体材料

适合于废水处理的固定化载体应具有以下性能:(1)对微生物无毒,生物滞留量高;(2)传质性能好;(3)性质稳定,不易被生物降解;(4)机械强度高,使用寿命长;(5)固定化操作简单;(6)对其他生物的吸附小;(7)价格低廉。用于包埋固定化的载体种类有很多,可分为天然高分子载体和有机合成高分子载体二类。

天然高分子载体(如琼脂、海藻酸钙、角叉菜胶等)一般传质性能较好,操作过程温和,细胞能较好地生长,但有明显的缺点。如以琼脂为材料的载体具有较大空隙,可以允许高分子物质的扩散,不需要其他离子,不带电荷,不会与底物或产物形成离子键,不影响细胞生长,但强度不够;海藻酸钙凝胶价格较低廉,应用广泛,但在含有高浓度的磷酸盐或葡萄糖酸盐的溶液中,或含有 $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$ 等微生物生长所必需的阳离子溶液中,海藻酸钙凝胶不稳定,易破碎和溶解<sup>[4]</sup>。为了避免磷酸盐的影响,可用低浓度的Tris/HCl或柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液调节pH(偏酸或中

收稿日期:2003-03-15;修回日期:2003-07-15

基金项目:国家“十五”科技攻关计划“工厂化养鱼关键技术及设施的研究与开发”(2001BA505B01);国家高新技术研究发展(863)计划项目“工厂化鱼类高密度养殖设施的工程优化”(2001AA620304)

作者简介:任海波(1979-),女,浙江象山人,硕士生,研究方向为海洋生态学;汝少国,通讯作者,E-mail:rusg@public.qd.sd.cn



性)；或将固定成形后的海藻酸钙凝胶置换成海藻酸铝,可提高其强度;或用聚乙烯亚胺溶液处理海藻酸钙凝胶,处理后也可提高其强度<sup>[5]</sup>。

有机合成高分子载体,如聚乙烯醇(PVA)凝胶、聚丙烯酰胺(ACAM)凝胶、聚乙二醇(PEG)、光硬化树脂等一般机械强度较高,化学稳定性好,但传质性能稍差,包埋后易造成细胞失活<sup>[6]</sup>。ACAM凝胶未聚合的单体对生物有毒以及凝胶交联过程中的放热,会使细胞在固定化的过程中失活,针对这个问题可用二次包埋来解决,即先用琼脂包埋细胞,再用ACAM凝胶进行包埋,大大改善了细胞活性。Sumino等<sup>[7]</sup>用大分子促凝剂和PEG一起固定微生物,减少了固定化过程对细胞活性的损伤。PVA凝胶是日本学者开发的一种新型包埋剂,主要有PVA-硼酸法和PVA-冷冻两种制备方法,因为PVA无毒,价格便宜,对细胞活性损伤小,抗微生物分解和机械强度高特点,被认为是目前最有效的固定化载体之一。蒋宇红等<sup>[8]</sup>比较了以海藻酸钙、琼脂、聚乙烯醇、丙烯酰胺、明胶为材料载体的性能,结果表明聚乙烯醇为材料的固定化小球比海藻酸钙与琼脂、明胶和丙烯酰胺等的具有明显的优点。黄霞<sup>[9]</sup>对几种常用固定化细胞载体的性能作了比较,指出PVA载体的固定化小球存在易粘连、传质阻力大、产气上浮及固定化的细胞活性丧失较大等缺陷。Amanda和Wisecarver<sup>[10]</sup>在PVA凝胶溶液中添加少量海藻酸钠有效地防止了PVA粘连现象;Chen等<sup>[11]</sup>采用磷酸化PVA固定化微生物以此缩短微生物与硼酸的接触时间,从而减少对细胞的损伤;郑耀通<sup>[12]</sup>以PVA为主要材料,通过添加海藻酸钠、二氧化硅、碳酸钙和铁粉末等添加剂,优化了PVA的包埋条件,解决了上述包埋方法存在的问题。

## 2 固定化微生物技术在废水生物脱氮中的应用

可用于废水生物脱氮的菌株很多,但研究较多的是硝化细菌。硝化细菌是生物硝化脱氮中起主要作用的微生物,直接影响着硝化的效果和生物脱氮的效率,但在废水中硝化细菌的含量较低,因此开发硝化细菌的富集技术,提高硝化细菌的产率,在废水处理方面具有重大意义。屈计宁等<sup>[13]</sup>用提高基质浓度的方式大幅度提高了硝化细菌的含量,当温度为30℃、pH为6.5~8.0、DO>2 mg/L时,经过12~13周的富集培养每克污泥中硝化菌数量是未经富集处理的12.5~20倍。

张玲华等<sup>[14]</sup>研究结果表明经富集后的硝化细菌的氨氮去除率由原来的54%提高到86%。Toh等<sup>[15]</sup>研究表明采用经富集的硝化细菌处理废水,氨氮和亚硝酸的消耗量是未经富集培养的4倍(由15 mg/d增加到60 mg/d)。

传统的生物脱氮一般包括硝化和反硝化两个阶段,分别由硝化细菌和反硝化细菌作用完成。但由于硝化菌(严格好氧)和反硝化菌(兼性厌氧)具有不同的生理特性,硝化和反硝化作用难以在空间和时间上统一,脱氮效果较差;而目前采用的固定化微生物载体,其内部空间具有氧扩散能力,可以自然形成由外向内的好氧区、缺氧区和厌氧区,实现了好氧条件下的同时硝化和反硝化(Simultaneous Nitrification and Denitrification, SND),从而实现单级生物脱氮<sup>[16-18]</sup>。SND与单纯的硝化与反硝化的传统污水处理过程相比,减少了反应容器的体积,缩短了反应时间,提高了氨的转化率<sup>[18-21]</sup>。固定化载体根据包埋方式和碳源供给方式不同,可分为硝化菌和反硝化菌分层包埋、硝化菌和反硝化菌混合包埋和碳源循环单级生物脱氮。但目前报道较多的为硝化菌和反硝化菌混合包埋。Dos santos等<sup>[22]</sup>采用分层固定硝化菌*Nitrosomonas europaea*和反硝化菌*Pseudomonas denitrificans*处理废水,在有氧的连续反应器中,氮的去除率高达5.1 mmol/m<sup>3</sup>。张彤等<sup>[23]</sup>应用固定化微生物技术开展了单级生物脱氮的研究,结果表明固定化硝化和反硝化混合污泥的单级生物脱氮效果好于未固定化污泥,固定化混合污泥的氨氮化速率和总无机氮的脱氮速率分别是未固定化混合污泥的1.7倍和13.4倍。Cao等<sup>[24]</sup>以PVA为载体,采用冷冻法混合固定硝化菌和反硝化菌,研究了硝化菌和反硝化菌的比例、pH值、温度、DO等因素对单级脱氮过程的影响,结论为反应的最适pH、温度和DO分别为8.2, 30℃, 2~6mg/L;所包埋的硝化菌和反硝化菌的菌量比例在1.5:1到3.6:1之间,氮的去除率较高。Etsuo等<sup>[25]</sup>用聚电解质复合物强化海藻酸钙的骨架结构后联合固定*Nitrosomonas europaea*和*Pseudomonas denitrificans*,试验结果与单独固定相比表明:(1)联合固定系统中的NH<sub>3</sub>初始氧化速度是单独固定系统中的3.4倍;(2)在联合固定的系统中可以使NH<sub>3</sub>完全氧化,而单独固定系统达不到要求;(3)联合固定系统的稳定性试验表明,在连续24 d的试验中,氨初始氧化活性保持稳定不变。

SND使硝化和反硝化同时发生,为简化生物脱氮工艺和设施提供了新思路,在废水生物脱氮中显示



出了良好的应用前景,但还有待于深入研究。

### 3 养殖废水生物脱氮的研究现状

近年来,微生物脱氮技术在养殖水质控制上的应用非常广泛,并取得了令人瞩目的成就。刘双江等<sup>[26]</sup>在养殖池中施洒筛选得到的PSB(*Rhodobacter* sp. S strain)菌株制成的菌剂,池中亚硝酸盐浓度降低了50%~80%,说明PSB菌株能有效地去除水中的 $\text{NO}_2^-$ 。吉海平等<sup>[27]</sup>在鱼、虾池中投光合菌的混合菌体,结果表明鱼、虾池中的pH值稳定,溶解氧增加,并大幅度降低了化学需氧量(COD)、生化需氧量(BOD)、硫化氢和氨态氮含量。刘文华等<sup>[28]</sup>利用光合细菌在实验室内处理废水,得到了类似的净化效果。但实际生产中直接使用游离微生物细胞进行废水处理弊端很多,如游离细胞在流水条件下易被水流冲走,在静水条件下易被其他生物所吞食、持续时间短、利用率低下等缺点。为了克服上述缺点,站荣培等<sup>[29]</sup>用不同的固定化材料包埋光合细菌,研究结果表明,PVA-沸石固定化光合细菌的水质净化效果较好。于沛芬等<sup>[30]</sup>用PVA作为载体包埋光合细菌,鱼池氨的去除率高达90%,与采用游离光合细菌相比,氨去除率有了明显的提高。黄正等<sup>[31]</sup>富集、培养硝化细菌污泥,选用PVA作为载体,添加适量粉末活性炭包埋固定硝化细菌污泥,处理养殖废水(COD=243 mg/L,  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ =45 mg/L),处理24 h后COD去除率为74.9%, $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 去除率达82.5%。吴伟等<sup>[32]</sup>采用PVA包埋固定的沼泽红假单胞菌、诺卡氏菌和假丝酵母菌3种菌株,研究其对养殖水体中 $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 和 $\text{NO}_2^-$ -N转化作用,结果表明菌株经固定后对养殖水体中 $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 和 $\text{NO}_2^-$ -N的转化效率明显优于其游离细胞。Hisashi等<sup>[33]</sup>比较了PVA和海藻酸2种材料固定化光合细菌对鱼池水质净化与反硝化的效果,结果表明固定化PVA球比海藻酸盐固定化球的水质净化能力强。Shan等<sup>[34]</sup>利用固定化的硝化细菌去除对虾养殖池中高浓度的氨氮,结果表明固定化细胞能有效去除养殖池中的总氨氮,去除率高达20 mg/L,即使投入的固定化颗粒密度较小,也能获得较高的总氨氮去除率。

由于开放式的养殖系统存在耗水量大、成本高、对环境污染大等不足,逐渐被闭合循环式养殖系统所取代。国内外学者已把固定化微生物技术应用在闭合养殖系统中<sup>[35-39]</sup>,Balderston等<sup>[36]</sup>在高密度、闭合式鲑鱼养殖池中,利用柱状固定化反硝化菌,有效地去除了养殖废水中的 $\text{NO}_3^-$ -N。Sauthier等<sup>[37]</sup>指出

颗粒状固定化反硝化菌在闭合养殖系统中的反硝化作用与废水中TOC/ $\text{NO}_3^-$ -N的比例有关,在两者的比例为1g/g左右时,反硝化速率最大。Kim等<sup>[39]</sup>报道了固定化硝化菌在循环养殖系统中去除氨氮的研究,在条件适宜,RHT为0.3 h时, $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 的每天最高去除率可达82 g/m<sup>3</sup>。

目前固定化微生物技术在水产养殖中的应用主要集中在室内模拟阶段。由于养殖废水成分复杂再加上环境因素的影响,把固定化微生物技术应用于水产养殖生产中还需做进一步的研究。

### 4 固定化微生物技术在水产养殖废水生物处理中的应用前景

固定化微生物技术以其特有的优点在废水生物处理领域受到关注:(1)有利于优势菌种的固定,提高难降解有机物的降解效率;(2)能在生物装置内维持高浓度的生物量,在无细胞冲出的前提下,液流量大,提高了处理负荷,减少了处理装置的容积;(3)易于固液分离;(4)微生物被高分子材料包埋后抗毒性能和耐受力明显增加。但是还存在着许多亟待解决的问题:(1)多种生物共生的固定化载体的开发;(2)包埋方式的改进;(3)高效固定化微生物体系的研究;(4)固定化微生物反应器的开发研究等。微生物固定化技术能够高效地使养殖水体脱氮,净化养殖水体。建立高度净化的废水处理系统,有利于减少或避免养殖废水的排出,降低环境污染,并有利于建立高效率的循环式高密度养殖系统,降低生产成本,从而促进养殖业的发展。因此微生物固定化技术在养殖废水处理中的应用前景十分广阔,相信通过不断的研究和改进,固定化微生物技术一定能在养殖废水生物处理的实际应用中发挥其巨大的潜力。

#### 参考文献:

- [1] Antonio T, Carlos M. Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters[J]. *Water Research*, 2000, 34(1):334-342.
- [2] 沈耀良, 黄勇. 固定化微生物污水处理技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 1-200.
- [3] Kuai L. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(1):4 500-4 506.
- [4] 张克旭, 张永志. 用海藻酸钠固定化赖氨酸菌增殖细胞的初步研究[J]. *生物工程学报*, 1986, 2(3):66-69.
- [5] Van ginkel C G, Tramper J, Luyben K C A M, et al. Characterization of *Nitrosomonas europaea* immobilized in



- calcium alginate[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1983(5):297-303.
- [6] Leenen E J T M, Dos Santos V A P, Grolle K C F, *et al.* Characteristics of and selection criteria for support material for cell immobilization in wastewater treatment[J]. *Water Research*, 1996, 30(12): 2 985-2 996.
- [7] Sumino T, Nakamura H, Mori N, *et al.* Immobilization of Nitrifying bacteria by polyethylene glycol prepolymer[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1992, 73:37-42.
- [8] 蒋宇红, 黄霞, 俞馨. 几种固定化细胞载体的比较[J]. *环境科学*, 1993, 14(2):11-15.
- [9] 黄霞, 俞毓馨, 王蕾. 固定化细胞技术在废水处理中的应用[J]. *环境科学*, 1993, 14(1):41-48.
- [10] Amanda Wu K Y, Wisecarver K D. Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 39:47-449.
- [11] Chen K C, Lin Y F. Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol(PVA) gel[J]. *Enzyme and Microbial Technology*[I]. 1994, 16:79-83.
- [12] 郑耀通. 固定化细胞处理有机废水的研究[J]. *污染防治技术*, 1995, 8(3):132-136.
- [13] 屈计宁, 金志刚, 何群彪. 高效硝化细菌的富集技术研究[J]. *同济大学学报*, 1999, 27(3):351-354.
- [14] 张玲华, 邝哲师, 张宝玲. 高效硝化细菌的富集与分离[J]. *浙江农业学报*, 2002, 14(6):348-350.
- [15] Toh S K, Webb R I, Ashbolt N J. Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters[J]. *Microbial Ecology*, 2002, 43(1):154-167.
- [16] Pochana K, Keller J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification(SND)[J]. *Water Science Technology*, 1999, 39(6):61-68.
- [17] Collivignarelli C, Bertanza G. Simultaneous nitrification and denitrification processes in activated sludge plants[J]. *Water Science Technology*, 1999, 40(4-5):187-194.
- [18] Kotlar E, Tartakovsky B, Argaman Y, *et al.* The nature of interaction between immobilized nitrification and denitrification bacteria[J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 51:251-258.
- [19] Lewandowski Z, Bakke R, Characklis W G. Nitrification and autotrophic denitrification in calcium alginate beads[J]. *Water Science Technology*, 1987, 19:175-182.
- [20] Sakairi M A. Nitrogen removal in seawater using nitrifying and denitrifying bacteria immobilized in porous cellulose carrier [J]. *Water Science Technology*, 1996, 34(7-8):267-274.
- [21] Tartakovsky B, Kotlar E. Coupled nitrification-denitrification processes in a mixed culture of coimmobilized cell: Analysis and experiment[J]. *Chemical Engineering Science*, 1996, 51(10):2 327-2 336.
- [22] Dos Santos V A P M, Bruijnse M, Tramper J, *et al.* The magic-bead concept: an integrated approach to nitrogen removal with co-immobilized micro-organisms[J]. *Applied Microbial Biotechnology*, 1996, 45:447-453.
- [23] 张彤, 赵庆祥, 龚剑丽. 固定化微生物脱氮[J]. *上海环境科学*, 2000, 19(5):225-227.
- [24] Cao G M, Zhao Q X, Sun X B, *et al.* Characterization of nitrifying and denitrifying bacteria coimmobilized in PVA and kinetics model of biological nitrogen removal by coimmobilized cells[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30:49-55.
- [25] Etsuo K. Simultaneously by polyelectrolyte complex-coimmobilized *Nitrosomonas europaea* and *Pseudomonas denitrificans* cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 31(4):382-384.
- [26] 刘双江, 孙燕, 岑运华. 采用光合细菌控制水体中亚硝酸盐的研究[J]. *环境科学*, 1995, 16(6):21-23.
- [27] 吉海平, 陈金山. 光合细菌在净化水质中的应用试验研究[J]. *生物工程进展*, 1998, 18(2):29-31.
- [28] 刘文华, 倪纯治, 叶德赞. 光合细菌净化对虾养殖水质的研究[J]. *台湾海峡*, 1997, 16(4):455-457.
- [29] 站培荣, 王丽华, 于沛芬. 光合细菌固定化及其净化养鱼水质的研究[J]. *水产学报*, 1997, 21(1):97-100.
- [30] 于沛芬, 王丽华, 站培荣. 光合细菌的分离、鉴定和固定化及其在净化鱼池水质中的应用研究[J]. *生物技术*, 1995, 5(3):35-36.
- [31] 黄正, 范玮, 李谷. 固定化硝化细菌去除养殖废水中氨氮的研究[J]. *华中科技大学学报*, 2002, 31(1):18-20.
- [32] 吴伟, 余晓丽. 固定化微生物对养殖水体中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的转化作用[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 7(2):158-162.
- [33] Hisashi N, Tasako H, Kenji T, *et al.* Treatment of aquarium water by denitrifying photosynthetic bacteria using immobilized polyvinyl alcohol beads[J]. *Journal of Bioscience and bioengineering*, 1999, 87(2):189-193.
- [34] Shan H, Obbard T P. Ammonia removal from prawn aquaculture water using immobilized nitrifying bacteria[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57:791-798.
- [35] 李辉华, 谭洪新, 罗国芝. 固定化微生物技术及其在闭合循环养殖系统水处理中的应用[J]. *水产科技情报*, 2001, 28(2):51-53.
- [36] Balderston W L, Sieburth J McN. Nitrate removal in closed-system aquaculture by columnar denitrification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1976, 32(6):808-818.
- [37] Sauthier N, Grasmick A, Blancheton J P. Biological denitrification applied to a marine closed aquaculture system[J]. *Water Research*, 1998, 32(6):1 932-1 938.
- [38] Seo J K, Jung H, Kim M R, *et al.* Nitrification performance of nitrifiers immobilized in PVA for a marine recirculating aquarium system[J]. *Aquacultural Engineering*, 2001(4):181-194.
- [39] Kim S K, Kong I, Lee B H, *et al.* Removal of ammonium-N from a recirculation aquacultural system using an immobilized nitrifier[J]. *Aquacultural Engineering*, 2000, 21:139-150.

(本文编辑: 张培新)