

适于集约化水产养殖的固定化微生物技术的初步研究

王雷¹, 王宝杰¹, 刘梅¹, 蒋克勇¹, 彭虹旒², 万奎吉², 万乃宝²

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 青岛康地恩生物科技有限公司, 山东青岛 266061)

摘要: 采用生物强化技术尝试建立高效、价廉、实用性强的固定化微生物水质处理技术。根据水产养殖特点, 选择了网片、波纹板、竹球等不同载体, 对有益微生物制剂进行吸附后, 比较其对人工模拟养殖废水处理的效果, 最终确定竹球为理想的吸附载体材料; 研究了最适母液浓度和吸附时间、水体中作用持续时间等; 进行了对不同的商业化微生物制剂与单纯芽孢菌的降解效果比较, 得到最佳制剂种类和优化的工艺参数。

关键词: 有益微生物制剂; 吸附; 固定化; 水质污染降解; 集约化水产养殖

中图分类号: S96; S969

文献标识码: A

文章编号: 1009-3096(2010)04-0001-05

自 20 世纪 90 年代以来, 中国海水养殖产量一直居世界首位, 已成为世界上唯一一个养殖产量超过捕捞产量的国家。目前的海水养殖业已趋向集约化、高密度、高产出的养殖模式, 然而随之带来的养殖水体自身污染也日趋严重: 养殖生物的残剩饲料、排泄物、死亡残体等大量有机物在厌氧微生物的分解作用下产生大量有害物质, 如氨态氮、亚硝酸、硫化氢等, 并引起 pH 值不适、化学耗氧量(COD) 过高、溶解氧含量过低等, 直接危害水产养殖动物^[1]。另外, 养殖污染物的排放、沉积可引起水体富营养化, 严重时导致海域生态系统失衡、紊乱乃至完全崩溃。为了实现健康养殖及保护海洋环境, 必须建立对育苗及养殖水质污染的有效处理技术^[1-3]。

水处理方法包括物理、化学、生物处理等^[3,4]。其中利用微生物处理由于安全、高效、不破坏生态平衡等特点而倍受重视; 尤其是在人们重视食品安全的今天, 可以避免化学药物和抗生素在动物体内残留以及破坏环境等严重问题, 保证水产养殖业的健康可持续发展。生物强化技术, 即生物增强技术(bioaugmentation), 是通过向废水处理系统中引入从自然界中筛选的优势菌种, 增加生物量, 以改善系统的处理能力, 达到对各种有害物质的去除目的^[3]。微生态制剂又称有益微生物、活菌制剂等, 是从天然环境中提取分离出来的微生物, 经培养扩增后形成的含有大量有益菌的制剂, 由一些对人类和养殖对象无致病危害并具有改良水质状况、抑制致病菌生长、改善动物体内和水环境生态平衡等功能的有益微生物制成, 主要有硝化细菌、光合细菌、芽孢杆菌、放线菌、乳酸菌、酵母菌、链球菌等^[2,5,6]。

目前经常采用的微生物固定化方法主要有吸附

法、包埋法、交联法和共价结合法。吸附法是利用微生物可附着到固体物质或其他细胞表面的能力, 将微生物吸附在载体表面的方法, 是一种非常廉价和有效、比较常用的微生物固定化方法^[7]。选择合适的固定化细胞载体是这项技术的关键。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) 性质稳定, 不易被生物降解; (3) 机械强度高, 使用寿命长; (4) 固定化操作简单; (5) 对其他生物的吸附小; (6) 价格低廉^[6]。吸附法常用载体有硅胶、活性炭、碎石、多孔砖、DEAE-纤维素等^[7], 本研究力求创新, 以海珍品育苗养殖中常用的一些附着基或低值原料为材料进行筛选, 以求寻找适宜的固定化载体。

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, 尚未建立实用工艺流程。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。中国水产养殖区域分布广泛, 养殖户分散经营, 养殖模式多样, 技术水平相对较低, 根据上述特点, 要有效解决水质处理和环境污染问题, 必须建立成本低廉、原料易得、工艺简单、操作容易、实用性强的固定化微生物水质处理方式, 这正是本研究的目的所在。

收稿日期: 2008-12-15; 修回日期: 2009-03-26

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2008AA100805)

作者简介: 王雷(1966-), 男, 山东青岛人, 博士, 研究员, 主要从事水产养殖环境与病害方面的研究, 电话: 0532-82898722, E-mail: wanglei@ms.qdio.ac.cn

1 材料与方 法

1.1 不同载体固定化微生物的效果比较研究

1.1.1 载体材料

聚乙烯纱网; 养殖用聚乙烯波纹板; 宽度 0.9 cm 的竹片编成的竹席。均切成 5 cm × 5 cm 的正方形, 备用。

1.1.2 微生物制剂

水产肠乐宝, 山东康地恩生物科技公司提供, 主要成分为水产芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌等, 棕色液体, 活菌浓度(标值) 大于 20 亿/mL。

1.1.3 污染海水

取自青岛汇泉湾的自然海水, 加入一定量的近岸底层黑色污泥, 配制成一定污染程度。

1.1.4 实验步骤

1.1.4.1 吸附

将微生物制剂用洁净海水稀释 10 倍后置于 5 L 的塑料桶内, 然后分别放入若干片经清洁海水浸泡并清洗干净的各种载体材料, 室温 20~ 22℃, 不通气, 自然光照, 溶液不搅动。初步设定浸泡时间为 96 h。

1.1.4.2 水质处理

取出已有菌膜的各种载体, 用清洁海水轻轻冲洗, 然后分别悬挂于 5 L/桶人工配制的污染海水中(全部浸入液面以下), 每桶 4 片, 分别设 3 个平行组, 空白对照组不加微生物及载体。自然光照, 不通气, 室温 20~ 22℃, 一定的时间间隔取水样进行分析测定。

1.1.4.3 水质分析测定

按照《海洋检测规范》进行^[8]。pH 测定采用 pH S-2C 型酸度计; 氨氮测定采用次氯酸盐氧化法; 亚硝酸氮测定采用萘乙二胺光度法; COD 测定采用高锰酸钾氧化法。

1.2 固定化微生物的水质处理效果与工艺初步研究

1.2.1 附着材料

考虑到水体流动便利等因素, 制作空心竹球作为附着基, 系采用 4 条竹片编成大空隙球, 竹片平均长度 24 cm, 平均宽度 0.9 cm, 单面总面积为 86 cm², 竹球总表面积(双面) 为 172 cm²。实验前用清洁天然海水浸泡竹球 5 d, 并清除表面污物, 备用。

1.2.2 微生物制剂

水产肠乐宝同 1.1.2; 中科院海洋所自行分离的两株芽孢菌 ZL-07 与 NO. 7 混合物, 菌浓度为

50 亿/mL; 河北某企业生产的水产用 EM 菌, 主要成分为乳酸杆菌、芽孢杆菌、硝化细菌、复合光合细菌等, 桔黄色液体, 活菌浓度(标示值) 大于 60 亿/mL。

1.2.3 实验步骤

1.2.3.1 实验分组与母液制备

在 5 L 塑料水桶中放入清洁天然海水, 按 10% 浓度比例分别加入各组微生物制剂, 搅匀后即 为挂膜母液。分组方案为: A 组: 肠乐宝; B 组: 活化肠乐宝(菌种: 红糖: 烧酒为 1: 0.5: 0.5); C 组: 自行分离混合芽孢菌; D 组: 河北水产 EM 菌。

1.2.3.2 吸附挂膜

在上述各塑料桶内分别放入 4 只经清洁海水浸泡并清洗干净的竹球, 使微生物自行在竹球上挂膜。室温 20~ 22℃, 不通气, 自然光照, 溶液不搅动, 挂膜时间为 4 d(96 h)。

1.2.3.3 降解实验

取出已有菌膜的竹球, 用清洁海水轻轻冲洗后, 放入人工配制的污染海水中(5 L/桶), 每桶 4 只竹球, 进行水质污染降解效果比较。实验在室内进行, 自然光照, 不通气, 室温 20~ 22℃, 每 48 h 进行一次水质主要参数检测。各组分别设 3 个平行组。空白组为不加竹球的人工配制污染海水。

1.2.3.4 后续实验

为检验降解效果的持久性, 于各组竹球放入污染海水中 25 d 后, 进行水质主要参数的测定。

1.3 固定化微生物工艺参数与降解效果的深入研究

1.3.1 材料

竹球同 1.2.1; 微生物制剂同 1.1.2。

1.3.2 实验步骤

1.3.2.1 吸附挂膜

挂膜母液制备同 1.2.3.1。挂膜操作同 1.2.3.2, 挂膜时间分别为 2、4、6 d。

1.3.2.2 水质污染降解

按不同挂膜时间分别取出已有菌膜的竹球 4 只, 轻轻冲洗后放入人工配制的污染海水中(5 L/桶)。实验在室内进行, 自然光照, 不通气, 室温 20~ 22℃, 每 48 h 进行一次水质主要参数检测。各组设 3 个平行组。空白组为不加竹球的人工配制污染海水。

2 结果与讨论

2.1 不同载体固定化微生物的效果比较研究

不同载体吸附微生物后对污染海水的降解效果

见图 1。图 1 中数据为 3 个平行组测定结果的平均值。

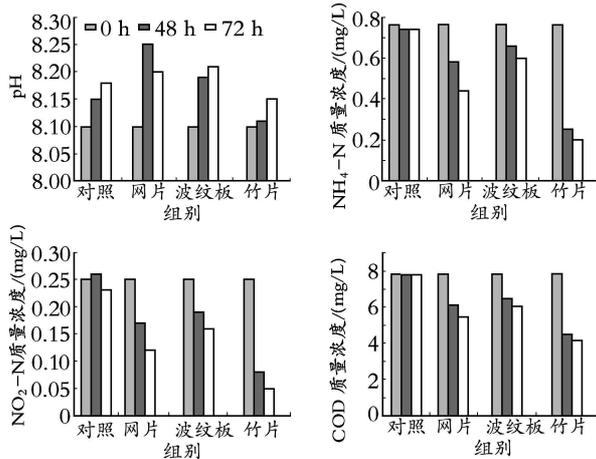


图 1 不同载体吸附微生物后对污染海水的降解效果

Fig. 1 Degradation effects on aquaculture sewage water of the microbe adsorbed by different materials

由上述结果可以看出, 将吸附有益微生物后的不同载体放入污染海水中后, 各项污染指标均有不同程度的降低, 说明微生物已吸附到载体上并保持原有活性。但是同等面积下的不同载体材料, 降解效果有显著差异。以 72 h 测定结果为例, 氨氮含量竹片组由 0.76 降至 0.20 mg/L, 而网片组为 0.44 mg/L, 波纹板组为 0.60 mg/L; 亚硝酸氮含量竹片组由 0.25 降至 0.05 mg/L, 而网片组为 0.12 mg/L, 波纹板组为 0.16 mg/L; COD 含量竹片组由 7.84 降至 4.16 mg/L, 而网片组为 5.49 mg/L, 波纹板组为 6.04 mg/L。可见竹片组的降解效果最佳, 网片次之, 波纹板较差。原因可能与材料的表面吸附性能有关。故选择竹片进行后续实验。

2.2 固定化微生物的水质处理效果与工艺初步研究

各组不同处理的水质污染降解效果见表 1 及图 2。竹球处理水质 25 d 后各组水质指标见表 2。图 2 和表 2 中数据均为 3 个平行组测定结果的平均值。

由实验结果可以看出, 经竹球吸附固定化后的不同微生物制剂的降解效果有显著差异, 水产肠乐宝的降解效果明显优于其他组。另外, 使用前活化与否, 其降解效果并无显著性差异, 这与作者在另文所发现的在水体中直接使用时的状况有所不同。

随着固定化微生物在水体中放置时间的延长 (近 1 个月), 各组微生物对水体污染指标仍有较好的降解作用。尤其是原先效果不明显的 C、D 组, 降解作用明显加强。

表 1 各组不同处理对水质污染指标消除率

Tab. 1 Elimination ratio of indicators for water pollution by different treatments

组别	时间 (h)	消除率 (%)		
		NH ₄ -N	NO ₂ -N	COD
原始水样	48	0.00	2.00	1.94
	96	0.85	6.00	1.94
	144	0.85	0.00	0.65
A	48	63.5	93.2	0.00
	96	3.80	6.80	23.1
	144	0.00	0.00	15.3
B	48	50.0	78.8	0.00
	96	11.0	21.2	19.0
	144	4.20	0.00	17.3
C	48	17.8	29.2	0.00
	96	1.70	4.80	7.99
	144	5.10	0.40	4.75
D	48	14.0	23.6	0.00
	96	3.40	1.60	7.56
	144	3.00	4.80	7.76

注: 氨氮、亚硝酸氮和 COD 去除率的计算方法: 若原先浓度为 A, 经过一定时间分别变为 A₁、A₂、A₃..., 则去除率分别为: (A - A₁)/A、(A - A₂)/A、(A - A₃)/A..., 依此类推。

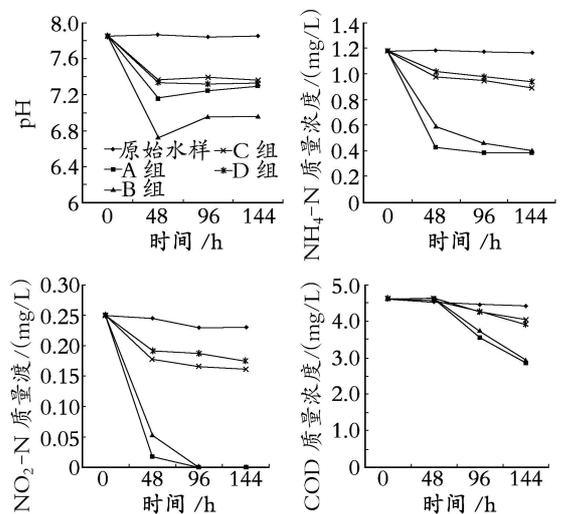


图 2 挂膜竹球对污染海水的降解情况

Fig. 2 Degradation effects of microbes absorbed by bamboo balls on sewage sea water

表 2 竹球处理水质 4 d 与 25 d 后各组水质指标

Tab. 2 Indicators of the sewage water by bamboo ball treatment after 4 and 25 days

组别	pH		质量浓度 (mg/L)					
			NH ₄ -N		NO ₂ -N		COD	
	4 d	25 d	4 d	25 d	4 d	25 d	4 d	25 d
A	7.30	7.37	0.385	0.31	未检出	0.029	2.85	2.64
B	6.96	7.20	0.41	0.32	未检出	0.027	2.95	2.73
C	7.33	7.39	0.89	0.35	0.16	0.01	4.04	3.18
D	7.36	7.37	0.94	0.31	0.18	0.01	3.92	2.83

2.3 固定化微生物工艺参数与降解效果的深入研究

根据以前的固定化微生物研究文献报道,微生物在海水中自然挂膜至少需要 21 d,且一般需要作用温度在 30℃,pH 7~8,曝气条件下才能起到对有机物的降解作用。而本实验利用人工筛选的高浓度微生物制剂强化挂膜,在较低的条件起到了较为明显的作用。推测与微生物菌种、母液浓度和附着材料等均有一定关系。

表 3 不同挂膜时间对水质污染指标消除率

Tab. 3 Elimination ratio of indicators for water pollution of different adsorption times

组别	时间 (h)	消除率 (%)		
		NH ₄ -N	NO ₂ -N	COD
原始水样	48	- 1.72	0.00	0.18
	96	- 3.45	- 7.14	1.06
	144	0.00	0.00	- 0.53
	192	1.72	7.14	- 0.35
挂膜 2 d	48	14.2	25.3	16.6
	96	40.0	64.7	29.7
	144	1.70	2.00	6.18
	192	10.0	0.70	7.42
挂膜 4 d	48	65.0	90.6	32.2
	96	- 5.00	- 0.70	16.7
	144	2.50	0.70	15.0
挂膜 6 d	48	59.2	92.6	37.7
	96	1.70	0.00	14.8
	144	0.83	0.70	9.48

由污染降解效果看,挂膜 4 d 的竹球降解效果明显优于 2 d 的,而与挂膜 6 d 的竹球效果接近。综合效果与时间考虑,4 d 应是较为理想的挂膜吸附时间。结果见表 3 及图 3。图 3 和表 3 中数据均为 3 个平行组测定结果的平均值。

挂膜后竹球在水体中的持续作用时间或有效期限,以及更为有效的微生物制剂组合筛选等有待进一步研究。

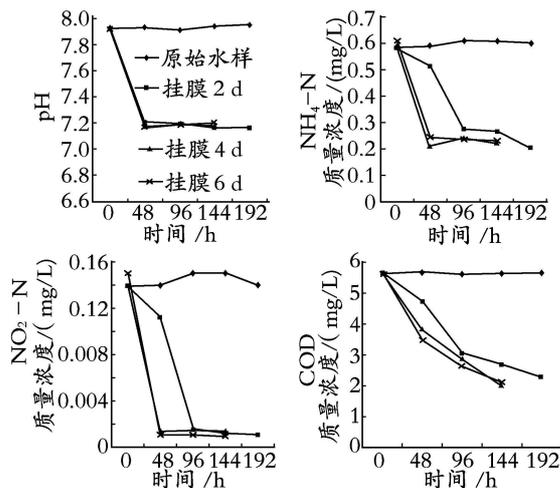


图 3 挂膜 2, 4, 6 d 的竹球对污染海水的降解情况

Fig. 3 Degradation effects of bamboo balls on sewage sea water with different microbe adsorption times of 2, 4, 6 days

3 结论

与已有的研究相比,以前研究多为实验室效果研究,未考虑实用工艺流程,另外对于包埋法的研究较多^[1,7,9~13],多数技术工艺相对复杂,效果不易稳定,实际应用于水产养殖存在一定障碍,而已有报道中吸附法研究所选择的一些载体,从污染降解效果评价,不如本研究。另外,上述研究多为针对单一菌株的研究^[1,10~12],尚无直接选用商品化复合微生物制剂的报道。对于本研究选定的竹球作为吸附材料,仅有一例报道,但其属于实验室内研究,是将竹球作为填料装柱后,采用自然挂膜培养方式,未采用生物强化方式进行固定化,21 d 方能达到稳定,氨氮去除率 50%,且对 COD 去除效果不佳^[14]。而本实验利用筛选的复合微生物制剂进行生物强化,所需时间仅为数天,对氨氮、亚硝酸盐、COD 的降解效果显著高于前述报道。

本研究从适合中国水产集约化养殖实际出发,尝试建立固定化微生物方式,选择适宜的商业化微生物制剂,并确定以操作方式简便、技术要求低的吸附法为主,对可适宜于海水养殖的几种附着材料进行了效果比较,最终选定价格价廉、使用寿命长、附

着效果好的竹球作为固定化材料。通过多项研究,初步建立了吸附固定化有益微生物的各项工艺参数,建立了可操作性强的工艺流程。为实际应用于中国的集约化水产养殖打下了基础。

参考文献:

[1] 齐素芳, 余煜棉, 赖子尼, 等. 复合载体固定化硝化细菌去除水体中氨氮的研究[J]. 广东工业大学学报, 2007, 24(2): 15-19.

[2] 万红, 宋碧玉, 杨毅, 等. 水产养殖废水的生物处理技术及其应用[J]. 水产科技情报, 2006, 33(3): 99-103.

[3] 宋志文, 王玮, 赵丙辰, 等. 海水养殖废水的生物处理技术研究进展[J]. 青岛理工大学学报, 27(1): 13-17.

[4] 单宝田, 王修林, 赵中华, 等. 海水工厂化养殖废水处理技术进展[J]. 海洋科学, 2002, 26(10): 36-38.

[5] 王兰, 廖丽华. 光合细菌固定化及对养殖水净化的研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 50-53.

[6] 任海波, 汝少国, 赵书云, 等. 养殖废水固定化微生物脱氮技术研究进展[J]. 海洋科学, 2004, 28(4): 66-69.

[7] 高红梅, 王明学. 固定化微生物技术及其在养殖水体

中的应用[J]. 饲料工业, 2005, 26(8): 16-18.

[8] 国家海洋局. 中华人民共和国行业标准 HY003.4-91, 《海洋检测规范》水质监测与分析[S]. 1991.

[9] 吴伟, 余晓丽. 固定化微生物对养殖水体中 NH_4^+-N 和 NO_2^--N 转化作用[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(2): 158-162.

[10] 张彤, 赵庆祥, 龚剑丽. 固定化微生物脱氮[J]. 环境科学, 2000, 19(5): 225-227.

[11] 冯本秀, 赖子尼, 陈俊彬, 等. 固定化硝化细菌去除水体中氨氮的研究[J]. 广东工业大学学报, 2006, 23(2): 29-33.

[12] 黄正, 范玮, 李谷, 等. 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): 18-22.

[13] 李谷, 黄正, 龙华, 等. 养殖水体氨氮去除的固定化微生物技术[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(4): 262-268.

[14] 张延青, 王森, 刘鹰. 利用竹球作为曝气生物滤池填料处理高浓度含氮海水的实验研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(4): 1 287-1 291.

Preliminary studies on immobilized-microbe technics for intensive aquaculture

WANG Lei¹, WANG Bao-jie¹, LIU Mei¹, JIANG Ke-yong¹, PENG Hong-ni²,
WAN Kui-ji², WAN Nai-bao²

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Qingdao Continent Biotech Comany Limitid, Qingdao 266061, China)

Received: Dec., 15, 2008

Key words: Microbial preparation; adsorption; immobilized-microbe; degradation of aquaculture pollution; intensive aquaculture

Abstract: An effective, cheap and practical method to improve water quality was developed by bioaugmentation and immobilized-microbe. After the microbe was adsorbed by different materials including plastic net, ripple plate and bamboo ball, their degradation effects on artificial aquaculture sewage water were compared and bamboo ball was the ideal material. The optimum microbial preparation concentration and adsorption time as well as the duration in water were also investigated. Thus the suitable microbial preparations and the optimized technologic parameters were obtained.

(本文编辑: 梁德海)