

硝化细菌的纯菌株和野生菌群在生物膜构建中作用的初步研究*

COMPARATIVE PERFORMANCE OF PUREBRED NITROSOMONAS AND A POPULATION OF NITRIFIERS ON BIOLOGICAL FILTERS

鲍 鹰 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

关键词 亚硝酸细菌,硝酸细菌,驯化

亚硝酸细菌(*Nitrosomonas*)靠氧化氨生活,硝酸细菌(*Nitrobacter*)则依赖于氧化亚硝酸盐生活。这是两类完全不同的,却几乎是永远共生的细菌。它们都不能氧化其他基质,然而正是它们的联动完成了硝化作用。将海洋中硝化过程移到养殖系统中,尤其是封闭的养殖系统,人们需要高效地实现这一过程。至今所有的有机物生物降解装置的本质内容是依靠水中固型物表面的一层由微生物和小型动植物构成的生物膜的生物活动将有机物最终分解成无机物, NH_3 -N 的去除是其中的一部分。生物膜工作效率的内在因素主要有两点:一,生物膜的表面积;二,硝化菌潜在的硝化能力。对前者的研究集中于寻求多孔的天然材料或对具有更大比表面积和更好的附着效果的生物膜载体的造型设计及加工工艺的研究。而对后者的研究主要集中于硝化菌菌种的筛选和驯化。硝化细菌的纯培养非常困难,培养时生长速度极慢。即使获得了纯

硝化菌菌株,能否在各种类型的污水中都有稳定的高效硝化率,是一个重要的问题。这个问题的另一方面是野生的菌群通过驯化是否在特定的水体中也能达到最高的硝化率。本实验即针对这一问题而设计。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 硝化细菌

实验所采用的 7[#] 纯亚硝酸菌和 3[#] 纯硝酸菌菌株是根据工业微生物纯培养技术^[1]从城市污水入海处底层表面分离得到,接种时密度为 10^6 个细胞/ml。另外用死杂色蛤的体表液和海鲜市场的地表污水作为

* 中国科学院重大项目“典型湖泊、海湾渔业资源调控及优质高效模式研究”资助。

野生硝化菌菌种。

1.2 实验条件

1.2.1 生物球

从青岛某水族器材店购得,直径 3.9 mm, PVC 塑料质地,比表面积为 200 m²/m³。

1.2.2 培养容器

直立式管状塑料容器,高 50 cm,直径 10.4 cm,有效容积 4.25 L,放在自动控温水浴槽中,使培养容器内的水温保持在 20 ℃。每个容器内投放 60 个生物球。

1.2.3 实验水质

洁净的天然海水,实验期间每天加一些淡水以补充蒸发的水量。实验期间的基本水质指标为:盐度 28~32;pH 值 8.1~8.3;温度 20 ℃。

1.2.4 充气

表 1 实验设计

氮源	(处理 1) 死杂色蛤体表液	(处理 2) 海鲜市场地面污水	(处理 3) 纯菌株	(处理 4) 空白对照
(组 A) NH ₄	A1	A2	A3	A4
(组 B) NH ₄ + BP	B1	B2	B3	B4

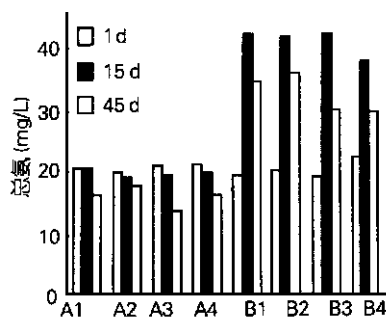


图 1 各样本总氮量

硝化过程需要在富氧的条件下进行。实验中在每个容器中设一个气头,充气量为 100~300 ml/min。

1.3 实验方法

1.3.1 实验设计

实验设 2 组,组 A 和组 B,每组设 4 个处理,每个处理 3 个重复。4 个处理中的 3 个分别加入上述 3 种菌液 5 ml,另一个不加菌液作为对照。组 A 只加硫酸铵标准溶液 850 ml,使海水中铵的浓度为 20 mg/L,组 B 除加同样量的硫酸铵外,还加 2 g 一种简称为 BP 的人工合成幼虾饵料,它的蛋白质含量为 60%,脂肪含量为 16%,纤维素含量为 1%,灰份含量为 5%,含钙量为 5%,亚磷酸盐含量为 4%。实验设计如表 1。由于光照对硝化细菌的生长有抑制作用,对容器进行遮盖。

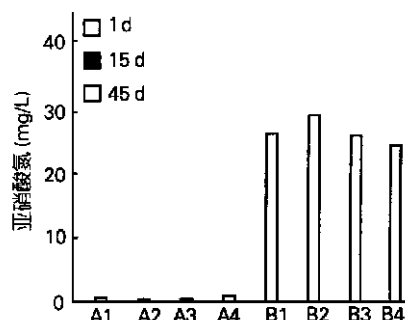


图 2 各样本亚硝酸氮含量

1.3.2 日常管理

每天检查水温和充气情况,添加淡水以补充蒸发的水量。

1.3.3 检测

分别于实验的第 1 天,第 15 天和第 45 天测定各样本中的总氮氮, NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N,结果见图 1,图 2 和图 3。测 NH₄⁺-N 用次溴酸盐氧化法;测 NO₂⁻-N 用萘乙二胺分光光度法^[1],分光光度计是 BECKMAN DU 650 型。实验在第 45 天结束。

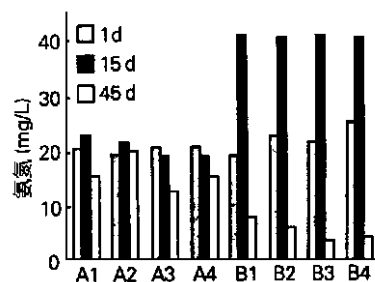


图 3 各样本氨氮含量

2 结果与讨论

2.1 纯硝化菌株在生物膜技术中应用的意义

从图 3 可以看出第 15 天时 A 组 4 种处理的

NH₄⁺-N 含量与实验开始时的含量基本相同,说明此时的生物膜尚未建成;而 B 组 4 种处理的 NH₄⁺-N 含量均大幅度提高,是因为添加的有机物 BP 经分解而

产生氨氮。第 45 天时 A 组的 NH_4^+ N 含量有小幅度的下降,同时 NO_2^- N 的增加不明显;而 B 组的 NH_4^+ N 含量有大幅度的下降,同时 NO_2^- N 含量则显著升高。为了分析纯硝化菌株和野生杂合菌群在生物膜中降解氨氮能力的差别,对第 45 天时 A 组的 NH_4^+ N 含量(表 2)进行方差分析。

表 2 A 组 4 个处理第 45 天的 NH_4^+ N 含量

重复	处理				
	A 1	A 2	A 3	A 4	
1	17.25	11.89	17.59	9.38	
2	10.77	17.61	11.05	21.58	
3	18.70	21.74	9.83	14.54	
总和 T_i	46.72	51.24	38.47	45.50	$T=181.93$
平均数 \bar{X}_i	15.57	17.08	12.82	15.17	$\bar{X}=15.16$

处理数 $k=4$, 重复数 $n=3$, $nk=12$

(1) 平方和计算

$$\text{矫正数 } C = \frac{T^2(181.93)^2}{nk \cdot 12} = 2758.21$$

$$\begin{aligned} \text{总平方和 } SS_T &= \sum x^2 - C = 17.25^2 + 11.89^2 + \\ &\dots + 14.54^2 - 2758.21 = 2980.59 - 2758.21 \\ &= 222.38 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{处理间平方和 } SS_t &= \frac{\sum T_i^2}{n} - C = 1/3(46.72^2 + \\ &51.24^2 + 38.47^2 + 45.50^2) - 2758.21 = 27.95 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{处理内平方和 } SS_e &= SS_T - SS_t = 222.38 - 27.95 \\ &= 194.43 \end{aligned}$$

(2) 自由度的计算

$$\text{总自由度 } df = nk - 1 = 12 - 1 = 11$$

$$\text{处理间自由度 } df = k - 1 = 4 - 1 = 3$$

$$\text{处理内自由度 } df = k(n - 1) = 4(3 - 1) = 8$$

(3) 计算方差

$$\text{处理间方差 } S_t^2 = \frac{SS_t}{df_t} = \frac{27.95}{3} = 9.32$$

$$\text{处理内方差 } S_e^2 = \frac{SS_e}{df_e} = \frac{194.43}{8} = 24.30$$

处理间方差小于处理内方差,显示 4 种处理的硝化功能并没有明显的区别。这说明纯化的单一硝化细菌菌株在用于污水处理的生物膜构建中作用不大。实际上从生物膜一开始构建,从海水中带来的各种各样

的硝化细菌便在生物膜上落户,生长繁殖。各种菌的生长率不同,菌与菌间的相互影响和环境因子的影响决定了生物膜的特征^[2]。在不同的系统中或同一系统不同的部位,生物膜中微生物的组成是不一样的。这种不同是因为任何两个不同的系统中水质的特征不会完全相同。另一方面生物膜的构建和发育是一个动态的过程。生物膜生长到一定的厚度由于底层形成厌氧层,生物膜会脱落。在脱落的地方新的生物膜又开始生长。而且随着水中有机物和无机成分的改变,生物膜的特性也在改变,这种改变总是朝着具有最大硝化率的方向进行。因此生物膜构建、成熟的过程也就是野生硝化菌通过竞争,变异逐渐适应于被处理水水质的过程。其结果是成熟的生物膜针对特定的被处理水的有机物组成具有硝化效率最高的硝化菌的组合。因此,在生物膜的培育中如何提高驯化野生菌的效率,缩短驯化时间,提高硝化率,是着重要抓的问题。

2.2 有机物在生物膜形成中的作用

虽然硝化细菌的纯培养是化能自养菌,但在生态环境中必须在有机物存在的条件下才能活动。从图 2 可以看出,在缺乏有机物的环境中(A 组)硝化菌的活动很弱,而在添加了有机物的环境中(B 组)硝化菌的活动明显提高。图 3 中 A 组第 1 天,第 15 天和第 45 天的 NH_4^+ N 含量基本相同,说明硝化菌的活动不明显。B 组中第 15 天的 NH_4^+ N 含量明显比第 1 天的高,这是因为异养菌分解了一部分有机物,产生 NH_4^+ N,同时生物膜还在构建初期,硝化菌的活动较弱。

图上显示的第 45 天的结果是异养菌产 NH_4^+ N 和硝化菌降 NH_4^+ N 的综合结果。看来异养菌分解有机物的活动对生物膜的发育是必需的,但其机制尚不清楚。

参考文献

- 1 中华人民共和国国家标准 GB HY003. 4-91
- 2 Hunter C. H., Senior E. et al. . WATERS. A. 1998, 24(1): 85-91
- 3 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京:中国轻工业出版社,1997,1~

(本文编辑:张培新)