

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00316

## 固定化微生物联合大型水生植物净化养殖废水的实验研究

伍华雯<sup>1</sup>, 陆开宏<sup>1</sup>, 钱伟<sup>2</sup>, 郑忠明<sup>1</sup>, 陈辉煌<sup>1</sup>, 万莉<sup>1</sup>

1. 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211;
2. 嘉兴市秀洲区水产技术推广站, 浙江 嘉兴 314001

**摘要:** 在实验室条件下, 以固定化菌种枯草芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、弯曲芽孢杆菌(*B. flexus*)和大型水生植物粉绿狐尾藻(*Myriophyllum aquaticum*)为实验材料, 研究微生物与水生植物两者单独或联合作用等不同处理模式对水体不同形态氮素的去除效果及氨化细菌(AB)、亚硝化细菌(NO<sub>B</sub>)、硝化细菌(NB)和反硝化细菌(DB) 4类氮循环细菌的动态分布情况, 实验阶段为 25 d。结果表明, 与固定化微生物(I)、粉绿狐尾藻(M)分别单独作用相比, 两者联合作用(I+M)对水体氮素和 COD<sub>Mn</sub> 的去除效果显著。比较实验前 15 天, I+M 对养殖废水亚硝态氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)和铵态氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)的去除率分别达 50.83%和 62.38%, 显著高于 I(39.55%和 51.17%)与 M(40.78%和 53.31%) ( $P < 0.05$ )。实验结束时, I+M 水体 COD<sub>Mn</sub> 的去除率达 67.23%, 显著高于 I(48.23%)与 M(33.35%)分别单独作用( $P < 0.05$ ); I+M 对养殖废水硝态氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)的去除率高达 88.74%, 显著高于 I(67.85%) ( $P < 0.05$ ), 但与 M 无显著差异。另外, I+M 植物根系表面 4 类氮循环细菌的数量相比 M 组均有不同程度的增加, 而载体表面的 4 类氮循环细菌数量实验后期整体呈现下降趋势, 其中 I+M 载体表面 AB 数量始终比 I 低 1.8~2.6 个数量级。主响应曲线分析(PRC)表明, 水体浊度、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、TN 等对造成组间差异的贡献较大, 实验前中期 I+M 组对养殖废水的净化效果强于两者分别单独作用, 但实验末期 I 组与 UC 组间的总体差异大幅度减小, 且 I+M 与 M 的差异很小。结论认为, 利用固定化微生物与粉绿狐尾藻联合处理循环养殖废水能有效提高对养殖水体 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、COD<sub>Mn</sub> 等的去除效果, 从而减轻氨氮和亚硝态氮等物质对养殖生物的毒害, 使得养殖生物能维持正常的物质代谢, 但在实际工厂化养殖生产中应综合考虑养殖废水的水质状况、固定化菌种组分及其生理生化特性、植物种类及搭配等因素, 使反应器的设计更加科学以确保系统稳定、高效、持久地运行。本研究旨在为构建高效、稳定的养殖废水生态净化模式提供科学依据。

**关键词:** 固定化微生物; 粉绿狐尾藻; 养殖废水; 氮循环细菌; 去除率; 污水净化

中图分类号: S949

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0316-11

大量的人工投饵、代谢产物积累导致水质恶化, 是目前工厂化循环养殖模式存在的主要问题。残饵、排泄物及有机碎屑等经水体微生物作用后释放的氨氮、亚硝态氮等有害物质, 易造成养殖动物中毒, 甚至死亡, 且养殖废水的直接排放易导致周围水体的富营养化, 故控制水体氮素的存在形式及浓度是养殖废水处理的关键环节<sup>[1-3]</sup>。

在水生生态系统中, 由微生物参与的氨化、硝化和反硝化作用在系统氮素循环、输出中起着

重要作用。由于游离的硝化和反硝化细菌生长率较低、对低温环境敏感, 系统硝化、反硝化的效率一般较低<sup>[4-5]</sup>。依靠微生物固定化技术能有效提高功能菌的抗冲刷能力以及对低温的忍受程度等, 从而有效提高功能菌对养殖水体氨氮、亚硝态氮等有害氮素的去除效果<sup>[6]</sup>。但单独的固定化微生物处理系统由于功能菌、载体及水环境等组成的微生态结构较简单, 抗干扰能力弱, 环境营养贫乏时功能微生物的生物量及活性下降, 难以长时

收稿日期: 2012-09-21; 修订日期: 2012-11-02.

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z409).

作者简介: 伍华雯, 女, 硕士研究生. E-mail: dcwhw@163.com

通信作者: 陆开宏, 教授. E-mail: lukaihong@nbu.edu.cn

期发挥作用。高等水生植物因根系发达, 可为根际微生物的繁殖创造相对稳定的固着微环境; 植物生长过程中根系向介质中分泌的低分子有机物(单糖、氨基酸、脂肪族化合物等), 可为根际微生物提供大量的营养和能量物质; 其根系发达通气组织分泌的氧气, 可有效增强并维持根际微生物的活性, 促进微生物对水体有机物的降解<sup>[7-8]</sup>; 水体氨氮( $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ )在异养硝化菌氨单加氧酶(AMO)、羟胺氧化还原酶(HAO)和亚硝酸氧化酶(NOR)的催化下, 转化成硝态氮( $\text{NO}_3^- - \text{N}$ ), 高浓度的硝态氮部分由微生物进一步反硝化, 部分经植物根系以主动运输的方式快速吸收<sup>[9]</sup>。故本研究在室内条件下, 采用固定化原位筛选的硝化菌种和高等水生植物粉绿狐尾藻(*Myriophyllum aquaticum*)联合净化循环养殖废水, 重点分析固定化微生物和粉绿狐尾藻联合作用与两者分别单独净化养殖废水效果的差异, 旨在通过本研究, 为构建高效、稳定的养殖废水净化模式提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验用水** 取自宁波大学水产养殖校内学生实习基地(29°54'N, 121°38'E)内的循环养殖系统。

**1.1.2 水生植物** 粉绿狐尾藻取自宁波大学水产养殖校内学生实习基地植物滤池, 于光照培养箱(GXZ 智能型, 上海一恒)中 28℃,  $10^4$  lx 光照条件下约 12 h, 经 1 h 的室温过度后, 再 14℃ 黑暗条件下约 11 h, 交替进行促根驯养, 7 d 后将根系洗净并挑选粗壮程度、根长(12~15 cm)、茎长(15~19 cm)均相当的植株用于实验。

**1.1.3 固定化载体** 挑选直径 1~1.5 cm, 比表面

积接近(约  $1 \times 10^4 \text{ m}^2/\text{g}$ )的椭球状陶粒<sup>[10]</sup>, 经纯水洗净、烘干, 用漆包网(孔径 1 cm×1 cm)包装成单层盒状(2 cm×15 cm×17 cm), 每网盒陶粒净重为 450 g, 灭菌。

### 1.1.4 培养基

**反硝化富集培养基<sup>[11]</sup>:**  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.6 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{KNO}_3$  0.72 g, 乙酸钠 2.04 g, 酒石酸钾钠 4.23 g,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.06 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.025 g, EDTA- $\text{Na}_2$  0.015 g,  $\text{MnSO}_4$  0.001 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 5 g, D-Biotin 0.015 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0~7.5。

**氨化细菌培养基<sup>[11]</sup>:** 牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.2~7.4。

**亚硝化细菌培养基<sup>[11]</sup>:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g, NaCl 0.3 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03 g,  $\text{CaCl}_2$  7.5 g, 蒸馏水 1 L, pH 自然。

**硝化细菌培养基<sup>[11]</sup>:**  $\text{NaNO}_2$  1.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.75g,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.0 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.01g, 蒸馏水 1 L, pH 自然。

**反硝化细菌培养基<sup>[11]</sup>:**  $\text{KNO}_3$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g, 酒石酸钾钠 20 g, 蒸馏水 1L, pH 7.2。

**1.1.5 固定化微生物** 实验用菌种巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和弯曲芽孢杆菌(*B. flexus*)由宁波大学水域生态与环境实验室提供, 菌种生化特性见参考文献[10], 如表 1 所示。取经活化的上述两种菌悬液( $\text{OD}_{600}$  为 0.4~0.5)各 200 mL 混合均匀, 接种到 7 L 的反硝化富集培养基中, 同时将载体浸没于培养基中, 28℃ 条件下固定。采用曝气 12 h、静置 48 h 交替进行的方式, 使以上菌种交替在有氧及厌氧条件下充分吸附于陶粒表面,

表 1 固定化菌种的生化反应特征<sup>[10]</sup>

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristic of immobilized bacteria<sup>[10]</sup>

| 异养硝化菌株<br>heterotrophic nitrification<br>strains | 硝酸盐还原<br>nitrate reduction test | 亚硝酸盐还原<br>nitrite reduction test | 厌氧反硝化<br>anaerobic denitrification<br>test | 好氧反硝化<br>aerobic denitrification<br>test |
|--|---------------------------------|----------------------------------|--|--|
| 巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>                      | +                               | +                                | -  | +  |
| 弯曲芽孢杆菌 <i>B. flexus</i>                          | +                               | +                                | -  | +  |

注: “+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应。

Note: “+” means positive reaction; “-” means negative reaction.

并通过增殖进入具有良好微孔生长环境的载体内部。固定时间为 5 d, 此时载体表面已形成肉眼可见的乳白色“黏膜”。

## 1.2 实验装置

实验在室内水族缸(30 cm×20 cm×25 cm)中进行, 实验设置 4 个处理和 1 个对照组, 见表 2。

表 2 不同处理组所用固定化微生物与水生植物的比例  
Tab.2 Immobilized bacteria and *Myriophyllum aquaticum* ratio in different treatments

| 处理方式<br>treatment<br>model | 空载陶粒/g<br>unloaded<br>ceramsites | 固定化载体/g<br>immobilized<br>bacteria | 粉绿狐尾藻/g<br><i>M. aquaticum</i> |
|----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| CK                         |                                  |                                    |                                |
| UC                         | 450.5                            |                                    |                                |
| I                          |                                  | 450.5                              |                                |
| M                          |                                  |                                    | 250.6                          |
| I+M                        |                                  | 450.5                              | 250.6                          |

注: 实验各组养殖废水均为 11 L.

Note: The volume of aquaculture wastewater in each treatment is 11 L.

## 1.3 采样与分析方法

实验时间为 2011 年 4 月 5~30 日, 此期间用加热棒维持水温约 28℃, 各组采用曝气 12 h、静置 12 h 交替进行, 并每天定时用超纯水补充蒸发水分以保持水族缸中水体积恒定。每隔 5 d 采样 1 次, 每次采集水样的同时, 采集陶粒及狐尾藻根系样品。分析指标包括 pH、温度、浊度、DO、COD<sub>Mn</sub>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、TN、TP 和 4 类氮循环相关细菌, 即氨化细菌(ammonifiers, AB)、亚硝化细菌(nitrosobacteria, NOB)、硝化细菌(nitrifiers, NB)和反硝化细菌(denitrifiers, DB)的数量。

**1.3.1 水质测定**<sup>[11]</sup> pH 用 pH 计(Mettler Toledo FE20, 上海梅特勒)测定; 浊度用浊度计(WGZ-1, 上海昕瑞)测定; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 采用全自动间断化学分析仪(Smart Chem 200, France); TN 用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(Unico UV-2000, 上海尤尼柯); COD<sub>Mn</sub> 采用高锰酸盐指数法(恒温水浴锅 HH-6, 常州国华)。

**1.3.2 氮循环细菌的测定——MPN 法**<sup>[11,13]</sup> 用最

大或然数法(MPN)测定样品中 AB、NOB、NB、DB 4 类细菌的数量。为便于比较, 参照杨凤娟<sup>[14]</sup>的方法, 根表面(root surface, R)、陶粒表面(surface area of ceramics, C)与水体(water, W)中 AB、NOB、NB、DB 4 类细菌的 MPN 值均以 MPN·mL<sup>-1</sup> 表示。陶粒、狐尾藻根系样品于适量无菌水中经涡旋混合器(Vortex Genius 3, IKA)充分振荡, 所得悬液与水样经梯度稀释后分别接种到氨化细菌(AB)、亚硝化细菌(NOB)、硝化细菌(NB)、反硝化细菌(DB)液体培养基<sup>[13]</sup>中(氨化与反硝化细菌培养基内倒置装满培养基的杜氏小管), 每一稀释度 3 个平行。28℃ 条件下, 氨化细菌和反硝化细菌培养 15 d, 亚硝化细菌和硝化细菌培养 30 d。

期间每天定时检测杜氏小管内产气情况, 杜氏小管内出现气泡的记为阳性。氨化细菌用奈氏试剂<sup>[11]</sup>检测, 若呈现棕色或褐色沉淀记为阳性; 亚硝化细菌用 Griess 试剂<sup>[11]</sup>检测, 显绛红色则记为阳性, 若无绛红色出现则进一步用浓硫酸及二苯胺试剂<sup>[11]</sup>检测, 显蓝色记为阳性; 硝化细菌用浓硫酸及二苯胺试剂检测, 若呈现蓝色则记为阳性; 反硝化细菌用 Griess 试剂检测, 显绛红色记为阳性, 若无红色出现则需进一步用浓硫酸和二苯胺检测, 若无色则记为阳性。据阳性试管数量查 MPN 表<sup>[11]</sup>, 用下式换算成样品中的 MPN 值: 1 mL 样品中菌数=菌近似值×数量指标第 1 位数的稀释倍数, 取细菌数量的常用对数作图分析<sup>[11,13]</sup>。

## 1.4 数据分析

实验数据在 Origin8.0 软件下拟合, 在 SPSS18.0 软件下统计分析。水体高锰酸盐指数、氮素浓度及水体和载体表面氮循环细菌的数量先经单因素方差分析(One-way ANOVA), 再进行 Duncan 比对以比较同一时间点不同处理间的差异, 不同小写字母表示同一时间点不同处理间存在显著差异, 相同或未标字母代表差异不显著; 根系表面氮循环细菌数量的差异经方差齐性检验后进行独立样本 *t* 检验(Independent-Samples *t*-test), 以  $P < 0.05$  作为差异显著水平。

采用多元变量的主响应曲线(PRC)分析不同

处理组间差异随着时间的变化情况, 并量化不同指标对此差异的贡献。多元统计分析在 CANOCO For Windows 4.5 软件下进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 水质指标的变化

**2.1.1 pH 和浊度的变化** 由图 1-A 可见, 随实验的进行, 有粉绿狐尾藻的两个处理组水体 pH 明显降低, 而其他各处理组 pH 变化不明显; 与 pH 变化相类似, M 和 I+M 组的浊度也显著低于对照组(CK), 但两者之间无显著差异(图 1-B)。实验

前、中期固定化微生物组(I)的浊度下降也十分明显, 但到实验后期(20 d 后)可能因 I 组的生物膜老化、藻类繁殖等原因, 其浊度又回升至 6.7 NTU, 而此时 M 和 I+M 组的浊度仅为 0.1 NTU(图 1-B)。

**2.1.2 COD<sub>Mn</sub> 的浓度变化** 从图 2 可以看出, 实验前期各处理组对 COD<sub>Mn</sub> 的去除效果均不明显, 随着实验的进行, 后期 I、M、I+M 组 COD<sub>Mn</sub> 浓度显著低于 CK 组和 UC 组( $P < 0.05$ ), 且 I 组 COD<sub>Mn</sub> 的去除率显著高于相应时期的 M 组( $P < 0.05$ )。第 25 天时 I、M、I+M 组对 COD<sub>Mn</sub> 的去除率分别达 48.23 %、33.35 %、67.23 %。

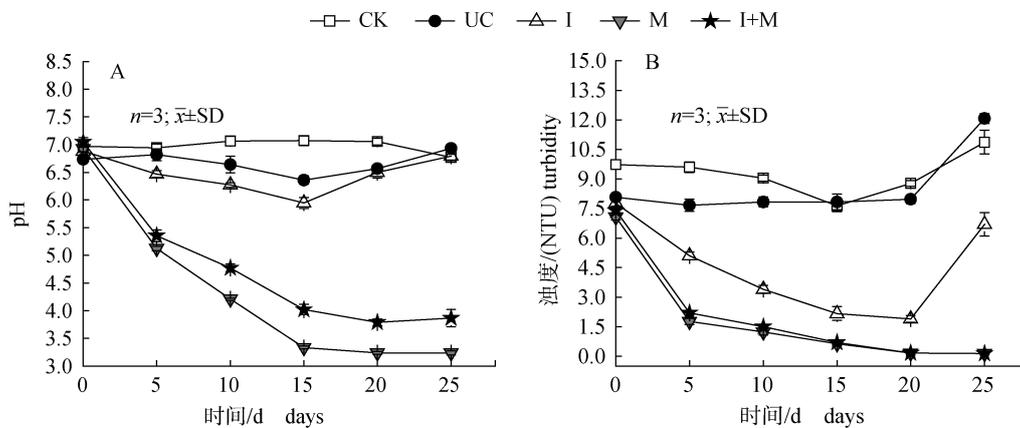


图 1 5 种处理方式下养殖废水 pH 和浊度随时间的变化

CK、UC、I、M、I+M 分别代表不同处理方式, 详见表 2。

Fig. 1 The variation of pH and Turbidity of aquaculture wastewater under different treatments as a function of time. CK, UC, I, M and I+M mean different treatments, referring to tab.2 for details.

**2.1.3 不同形态氮素的浓度变化** 图 3 可见, I、M、I+M 3 个处理组氮素的去除效果明显。第 15 天时 I 组 TN 质量浓度由初始的 14.78 mg·L<sup>-1</sup> 降至 4.15 mg·L<sup>-1</sup>, 去除率高达 71.91 %; 实验结束时 I+M 组 TN 的去除率高达 87.15 %, 而 I 组 TN 去除率较第 15 天时反而有所下降(图 3-A)。实验前、中期各处理组 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 去除效果明显, I 组在第 10 天时去除率最高达 48.09 %, M 组和 I+M 组则在第 15 天时最高, 分别达 40.78 %、50.83 %, 而后期则均有所下降(图 3-B)。图 3-C 和图 3-D 可见, I、M、I+M 3 个处理组对水体 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 这两种主要形态氮素的去除效果均十分显著。第 25 天时, I、M、I+M 3 个处理组对 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的去除率分别达 52.83 %、57.57 %、63.70 %, I+M 组对

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除率高达 88.74 %, 与 M 组(87.65 %) 无显著差异, 而 I 组的去除率较前 15 d 则有所下降, 实验后期 M 组和 I+M 组脱氮效果几乎无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 2.2 氮循环细菌的数量变化

**2.2.1 水体氮循环细菌的数量变化** 图 4 可见, 4 类细菌随时间的变化趋势各异。I、M、I+M 3 个处理组水体 AB 的数量差异较大, I 组的 AB 数量显著高于其他两组, I+M 组则几乎均介于 I 组和 M 组之间(图 4-A)。实验中、后期 M 组由于水体 pH 明显下降, 最适 pH 均为 7.0~7.5<sup>[15]</sup> 的 AB、NOB、NB、DB 的数量分别下降 4.7、2.1、1.4、2.0 个数量级, 而 I+M 组中菌体数量虽也有一定下降但不及 M 组明显。由图 4-B 和图 4-C 可知, 实验中期

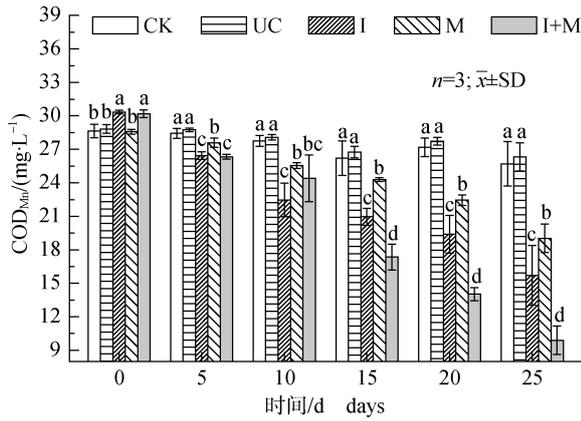


图 2 5 种处理方式下养殖废水 COD<sub>Mn</sub> 浓度随时间的变化

柱图上方不同字母表示同一时间不同处理之间 COD<sub>Mn</sub> 浓度存在显著差异 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 2 The variation of COD<sub>Mn</sub> of aquaculture wastewater under different treatments as a function of time.

Different letters on columns denote significant difference in concentration of COD<sub>Mn</sub> among treatments at the same sampling date ( $P < 0.05$ ).

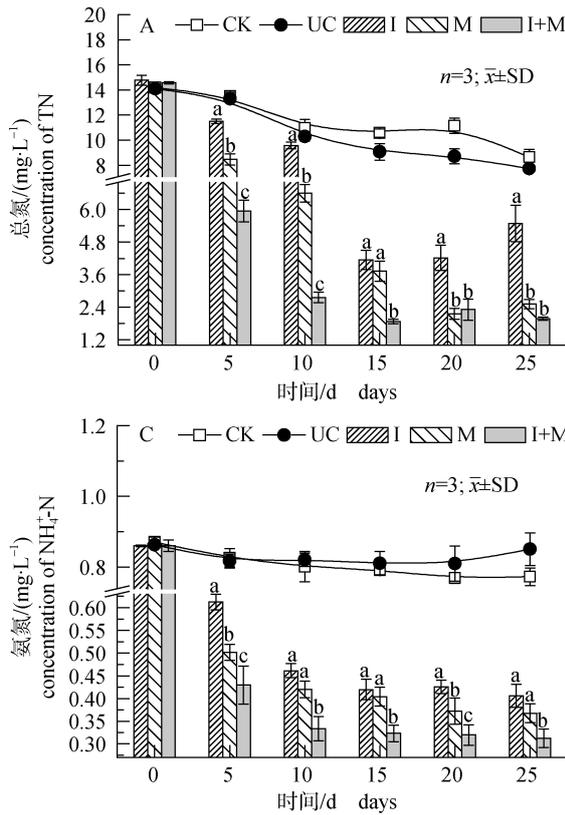


图 3 5 种处理方式下养殖废水不同形态氮素浓度随时间的变化

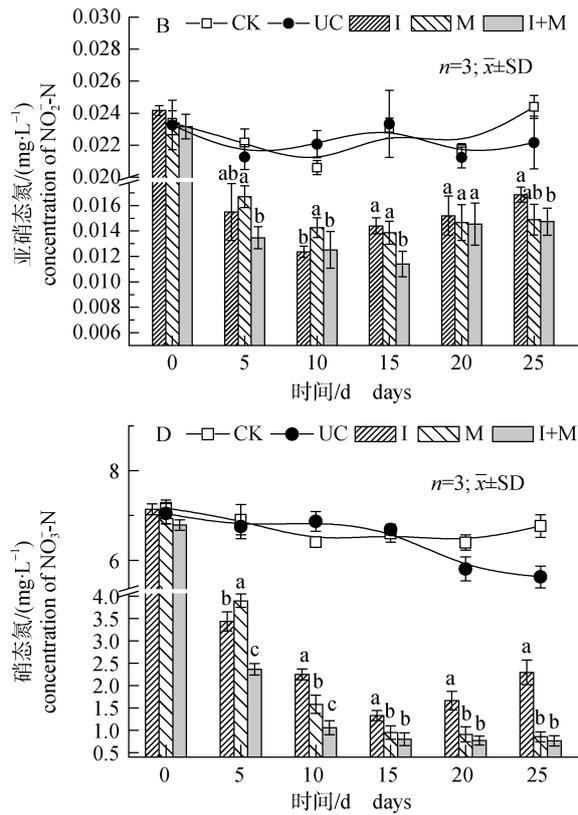
柱图上方不同字母表示同一时间不同处理间不同形态氮素浓度存在显著差异 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 3 The variation of different nitrogen concentrations of aquaculture wastewater under different treatments as a function of time.

Different letters on columns denote significant difference in different nitrogen concentrations among treatment I, M and I+M at the same sampling date ( $P < 0.05$ ).

I+M 组 NOB 和 NB 的数量均比 I、M 组高。固定化菌种为异养硝化菌种, 随时间延长, 水体原有的有机能源物质消耗殆尽, 各组 NOB、NB 的数量总体呈下降趋势。

2.2.2 载体表面氮循环细菌的数量变化 图 5-A 可见, I+M 组固定化载体表面 AB 的数量随实验时间的延长而降低, 约比 I 组低 1.9~3.4 个数量级, 表明粉绿狐尾藻对载体表面 AB 可能有一定的抑制作用。与 AB 变化趋势不同, 实验后期 I、I+M 两者载体表面 NOB 的数量虽都呈下降趋势, 但 I+M 载体表面 NOB 数量级仍显著高于 I 组(图 5-B) ( $P < 0.05$ )。图 5-C 可见, I 组载体表面 NB 数量自第 5 天开始下降, 而 I+M 组载体表面的 NB 在实验前中期维持在 4.4~4.8 个数量级, 后期 I+M 组 NB 的数量虽高于 I 组但差异不显著。I+M 组载体表面 DB 的数量实验第 5 天时最高, 约为 6.5 个



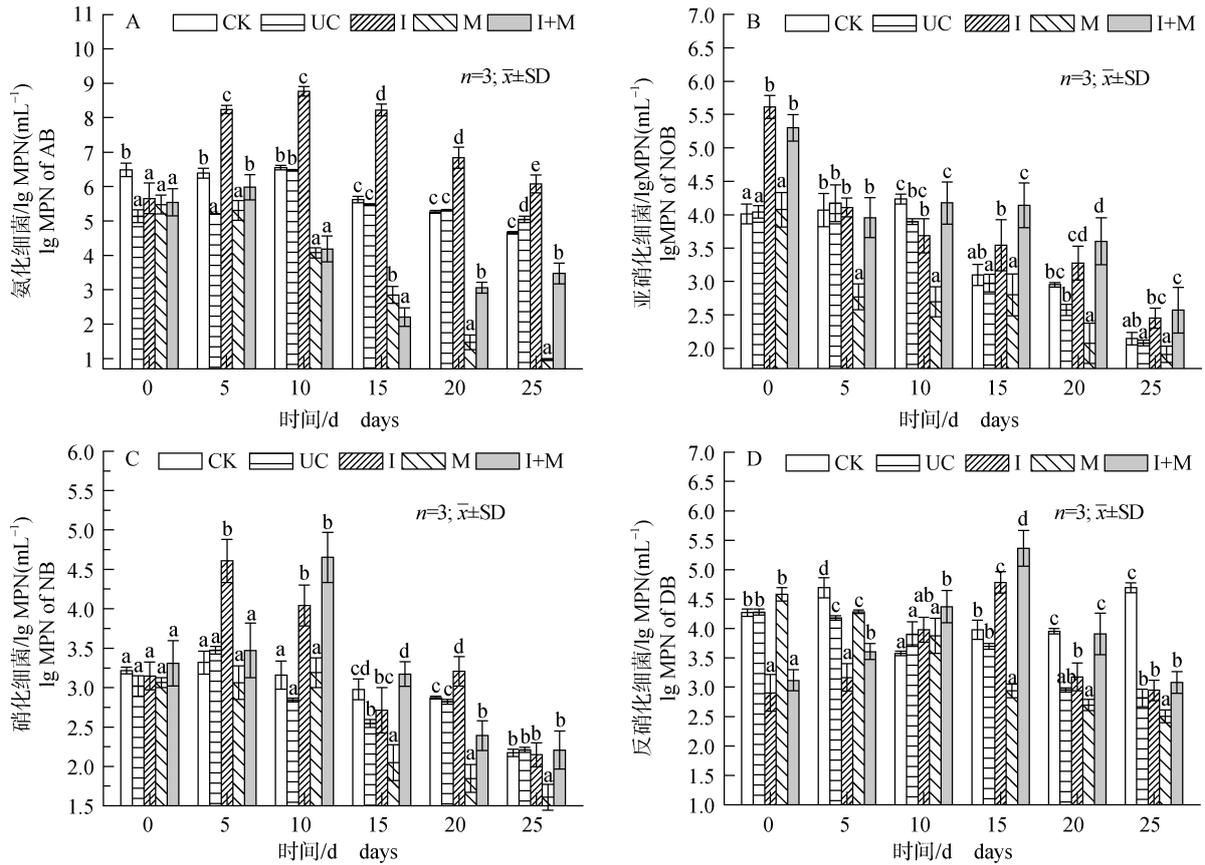


图 4 5 种处理方式下养殖废水体 4 类氮循环细菌数量随时间的变化

柱图上方不同字母表示同一采样时间不同处理之间水体氮循环细菌数量存在显著差异( $P < 0.05$ )。

Fig. 4 The variation of the most probable number of four kinds of N-cycle bacteria in aquaculture wastewater under different treatments as a function of time.

Different letters on columns denote significant difference in the most probable number of four kinds of N-cycle bacteria in wastewater among treatments at the same sampling date ( $P < 0.05$ ).

数量级, 而中期 I 组的 DB 数量显著高于 UC 组和 I+M 组。结果表明, 狐尾藻的介入在一定时期内对载体表面 NOB 和 NB 的活性、生物量有一定的促进作用, 其中对 NOB 活性的促进作用较显著, 而对 DB 活性的影响不明显, 但实验后期 4 种细菌的数量均呈下降趋势。

**2.2.3 植物根系表面氮循环细菌的数量变化** 由图 6 可知, 与 M 组相比, I+M 组狐尾藻根系表面 4 类氮循环细菌的数量均有不同程度的增加, 且在实验后期两组植物根系表面 AB 和 DB 的数量差异均达到显著水平( $P < 0.05$ ), 这表明固定化微生物与狐尾藻的联合作用对氮循环细菌的生态分布以及植物根表微生物的生物量有一定影响。

**2.3 主响应曲线分析**

以水质指标及水体氮循环细菌的数量为环境

变量, 以采样时间为协变量进行主响应曲线 (principle response curve, PRC) 分析, 得到 5 个处理组在冗余分析第一典范轴上建立的一组响应曲线 (以 CK 组为参比对照),  $B_k$  表示不同指标在 PRC 中的权重,  $B_k$  值离零点越远表明该指标对造成组间差异的贡献越大, 即该指标水平随时间的变化幅度较大。蒙特卡罗检验 (Monte Carlo permutation test (499 permutations)) 结果表明, 处理组与对照组之间存在显著差异 ( $F_{ratio} = 312.045, P = 0.002$ ), 该分析模型解释了总体差异的 72.1%, 其中第一典范轴解释了总体变化的 61.1%。

由图 7 可知, 水体浊度、 $NO_3^- - N$ 、TN 等对造成组间差异的贡献较大。UC 组与 CK 组之间无明显差异, 这表明实验期间未经固定化的陶粒表面所吸附的土著菌对水体各水化指标的影响不明

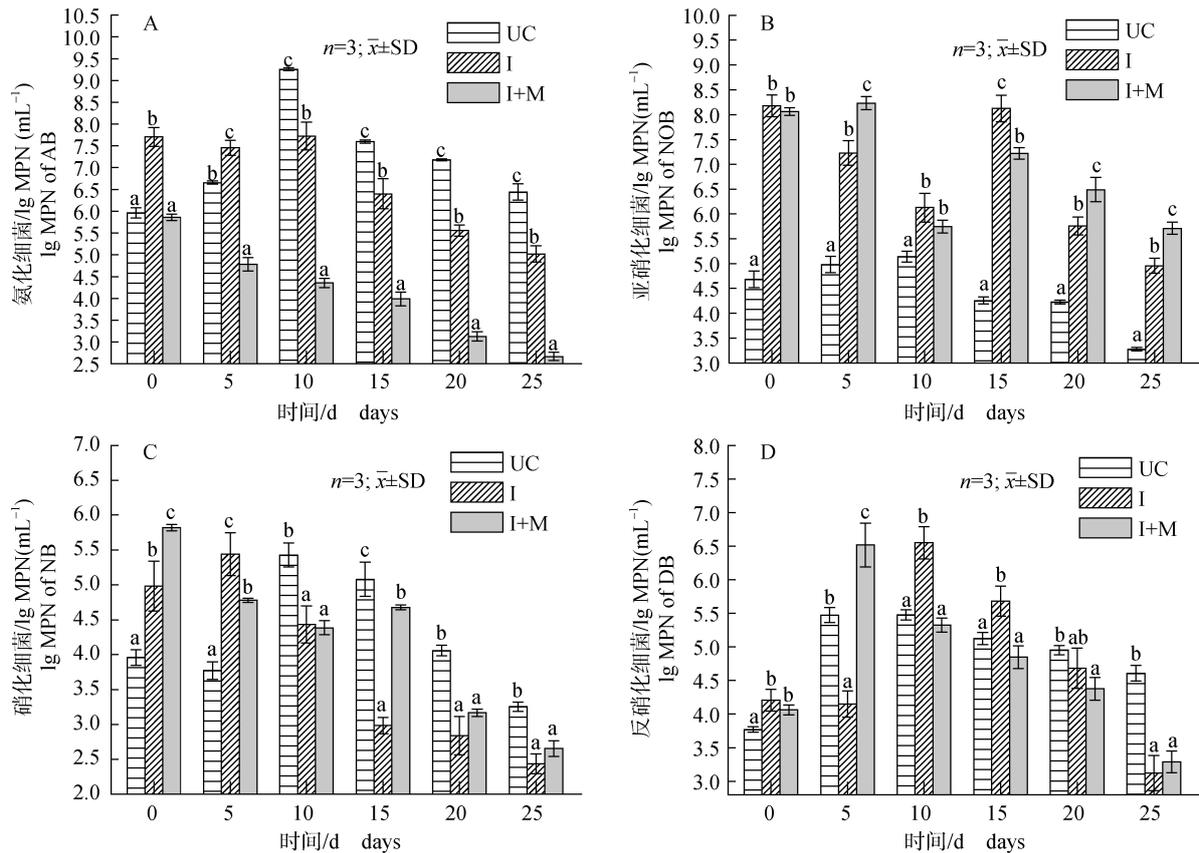


图 5 3 种处理方式下载体表面 4 类氮循环细菌数量随时间的变化

柱图上方不同字母表示同一时间不同处理之间载体表面氮循环细菌数量存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 5 The variation of the most probable number of four kinds of N-cycle bacteria on the surface of ceramsites under different treatments as a function of time.

Different letters on columns denote significant difference in the most probable number of four kinds of N-cycle bacteria on the surface of ceramsites among treatment UC, I and I+M at the same sampling date ( $P < 0.05$ ).

显。实验前期 I、M、I+M 组间的总体差异随时间增大；实验中期，I+M 组与 CK 组之间的总体差异大于 M 组和 I 组与 CK 组之间的差异，表明一定时期内 I+M 组对养殖废水的净化效果强于两者分别单独作用；实验末期由于载体表面生物膜活性降低，I 组与 CK 组间的总体差异大幅度减小，且 I+M 组与 M 组的差异很小，表明在本实验条件下，粉绿狐尾藻对养殖废水的净化时效较固定化微生物组更长，但在循环养殖系统中，因人工不断投饵等原因，固定化微生物可得到持续的营养供给，相信其净化时效会进一步延长。

### 3 讨论

#### 3.1 固定化微生物与粉绿狐尾藻对水体 pH 和浊度的影响

水体有机污染物、微型胶体悬浮颗粒(粒径

2.5  $\mu\text{m}$  以下)等的去除多是在高等水生植物与微生物的协同作用下完成的，如水生植物生长过程中因自身代谢产生的部分枯死、腐败的根系表皮细胞或组织，经微生物转化形成腐殖质(胡敏酸、富里酸、胡敏素等)，这些腐殖质因带有羧基、酚羟基、烯醇羟基等多种功能团，对水体胶体悬浮颗粒物有较强的吸附、沉降功能<sup>[16-18]</sup>，从而有效降低水体浊度。实验结束时联合处理系统水体浊度的去除率高达 98.65%。但由于本实验在室内相对封闭、静止的水体单元中进行，实验后期狐尾藻根系分泌物与部分根系组织腐烂的残体不断解离，使得单独的植物与联合处理系统水体 pH 均严重偏离淡水鱼类养殖水体的最适 pH 范围(7.0~8.5)。而单独的固定化微生物处理后期水体浊度虽呈现回升趋势，但其水体 pH 则相对稳定。工厂化循环养殖系统既要满足高效净化要求，又要保证

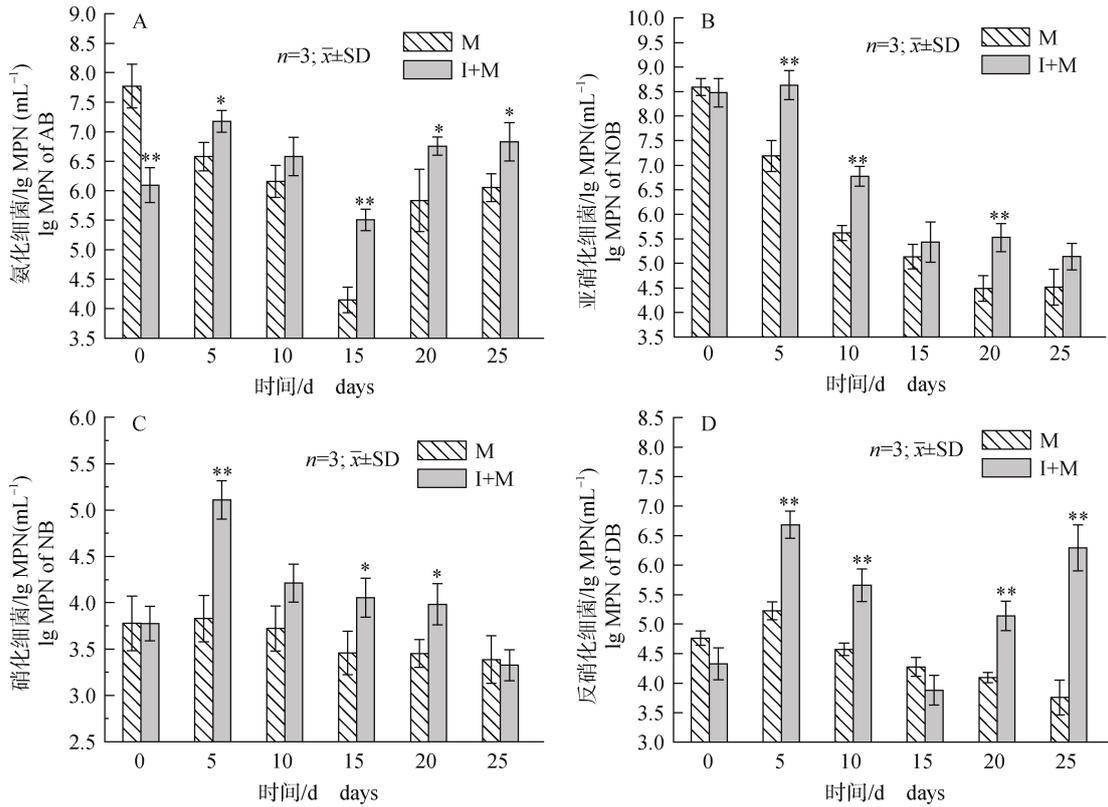


图 6 2 种处理方式下水生植物根系表面 4 类氮循环细菌数量随时间的变化

柱图上方星号表示同一时间两种处理水生植物根系表面 4 类氮循环细菌数量存在显著差异( $t$  检验,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ).

Fig. 6 The most probable number of four kinds of N-cycle bacteria on surface of *M. aquaticum* roots

Asterisks on columns denote significant difference in the most probable number of four kinds of N-cycle bacteria on roots surface between treatment M and I+M at the same sampling date ( $t$ -test,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ).

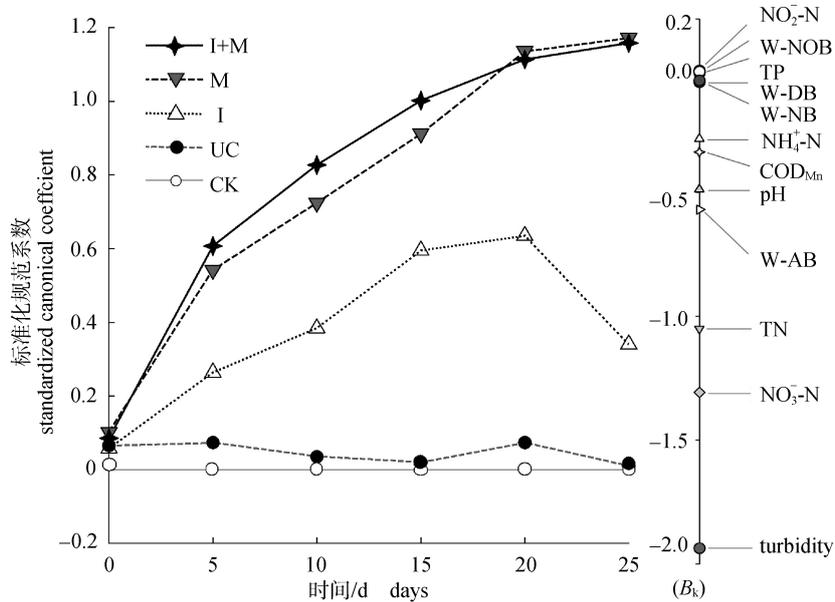


图 7 不同处理组水体 4 种氮循环菌及水化等监测指标的主响应曲线分析(PCR)

$B_k$  值表示不同监测指标的权重.

Fig. 7 Principal response curve (PRC) of microbial and chemical attributes evaluated at five sampling times as a function of time under different treatments

$B_k$  indicates the weight of different parameters measured in this experiment.

水体 pH 等指标适合养殖生物的生长,有资料指出,投撒适量的生石灰液可有效降低水体浑浊度,并将养殖水体 pH 控制在合适的范围<sup>[16]</sup>。

### 3.2 高等水生植物对氮循环细菌分布及其脱氮效果的影响

微生物作为营养物质的转化者和分解者,对水环境质量的变化起着重要指示作用<sup>[19]</sup>,而高等水生植物的根系分泌物影响着根际或根表微生物的活性、生物量及生态分布<sup>[20-24]</sup>。王国祥等<sup>[25]</sup>研究了不同生态类型高等水生植物群落水体与敞水区水体中氮循环细菌的分布情况及其脱氮效果,结果表明高等水生植物群落内水体的反硝化和亚硝化细菌较敞水区水体高 2~5 个数量级,除硝化菌外,反硝化、亚硝化及氨化细菌量均由根际向外呈现递减趋势,且根际氮循环菌的数量与水体氨化或反硝化产生气体的量显著相关,其中凤眼莲区水体反硝化产气量是敞水区的 6.2 倍。维管束植物粉绿狐尾藻根系具有发达的通气组织,根系分泌的氧气为根部营造了良好的微氧环境,另外,植物根系分泌的低分子有机化合物为微生物提供能量和营养物质,会刺激根际或根表 NOB、NB 等微生物的活性<sup>[26]</sup>,故联合处理系统中植物根系表面除了吸附系统水体土著菌体外,固定化载体表面的外源菌种因趋化作用也倾向于分布在植物根际或根表,使得联合作用系统植物根系表面 4 类氮循环细菌的数量均高于单独的水生植物系统。

另外,维管植物粉绿狐尾藻根际有氧区与缺氧区共同存在,为根区亚硝化、硝化等好氧菌群与氨化、反硝化等兼氧或厌氧菌群提供了各自所需的小生境<sup>[23]</sup>,故氧化层的硝化和还原层的反硝化及氨化这两种脱氮途径在植物根际得以同步进行,充分提高了固定化微生物和水生植物的联合脱氮效果。胡锦好等<sup>[27]</sup>研究表明固定化氮循环细菌结合凤眼莲原位修复富营养化水体  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  的去除率 49.2%,效果显著优于凤眼莲单独作用。与上述研究结果一致,本实验结果显示,与水生植物、固定化微生物分别单独的处理系统相比,两者的联合处理系统对  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  等的去

除效果也明显提高。此外, Ying Feng 等<sup>[28]</sup>研究表明,与芦苇(*Phragmites australis*)、鸭跖草(*Commelina communis*)、象草(*Pennisetum purpureum*)、水蓼菜(*Ipomoea aquatica*)、水浮莲(*Pistia stratiotes*) 等不同处理相比,沉水植物象草(*Pennisetum purpureum*)具有持续、高效脱氮的效果,这说明不同种植物对氮素的去除效果存在一定的种属差异,因此,选择生物亲和性较高的水生植物与固定化微生物联合处理作用,能促进两者之间的协同作用。

### 3.3 固定化微生物的持续脱氮效果

固定化载体表面丰富的立体结构,使得其表面的外源功能菌群充分吸收养殖废水中的富营养物质,从而提高了微生物对水体氮素等的去除效果。Sung-Koo 等<sup>[29]</sup>研究表明硝化菌经藻酸钙、藻酸钡固定后对人工合成养殖废水中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  的硝化效率显著提高。战培荣等<sup>[30]</sup>研究了固定化光合细菌对养殖水体的净化效果,结果表明固定化光合细菌组能显著提高水质净化效率,且鱼的成活率、个体大小及体质均显著优于游离光合细菌组。而生物膜上不同的菌种组成对不同营养程度的废水,净化效果也会有差异。本实验结果显示,实验末期单独的固定化微生物处理与联合处理中载体表面 4 类氮循环细菌的数量均明显降低,脱氮效率随之下降。有研究表明,当水体微生物可利用碳源或氮源等有机能源物质含量较低时,生物膜的修复效果较差,通过添加某种营养物质等强化技术可以加强生物修复<sup>[31]</sup>。而养殖废水中一般氮素含量较高,而碳源易成为生物膜脱氮效率的限制因素之一<sup>[32]</sup>。张海杰等<sup>[33-35]</sup>研究表明,添加葡萄糖等碳源,可促进功能微生物的增殖与代谢,可有效提高功能微生物对水体 COD、氨氮和亚硝态氮的去除率。实际生产中应综合考虑养殖废水的水质状况、生物膜上菌种的生化特性及其生长代谢周期,适时补充碳源等营养物质或功能菌剂,使载体表面生物膜上微生物细胞得以定期更新,从而维持生物反应器的持久净化效果。

## 4 结论

本实验根据微生物与高等水生植物在生态特

征及能量利用方面的互补性, 利用固定化微生物与粉绿狐尾藻联合处理循环养殖废水, 能有效提高了对养殖水体  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{COD}_{\text{Mn}}$  等的去除效果, 从而减轻氨氮和亚硝态氮等物质对养殖生物的毒害, 使得养殖生物能维持正常的物质代谢。另外, 虽然狐尾藻的介入使得植物根系表面氮循环细菌生物量有一定程度的增加, 但到实验后期系统载体表面生物膜的活性明显降低, 因此, 本实验的净化模式存在一定的不足之处。从持久净化的角度来看, 实际工厂化养殖生产中应综合考虑养殖废水的水质状况、固定化菌种组成及其生理生化特性、植物种类和搭配等因素, 使生物反应器的设计更加科学以确保系统稳定、高效、持久地运行。

#### 参考文献:

- [1] 钱伟, 陆开宏, 郑志明, 等. 生物强化反应器净化循环养殖废水的研究[J]. 水产学报, 2011, 35(1): 104-106.
- [2] 曹蓉, 刑海. 生物膜处理城市河道污染水体的挂膜实验研究[J]. 环境工程学报, 2008, 2(3): 374-377.
- [3] John F B, Patrick J W. The effect of acute and chronic ammonia exposure during early life stages of gulf toadfish, *Opsanus beta* [J]. AquToxicol, 2005, 75: 225-237.
- [4] Dokn Vna E, vna de Bund WJ. Impact of submerged macrophytes including choarphytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms[J]. Aqu Bot, 2002, 72: 261-274.
- [5] 常会庆. 水生植物和微生物联合修复营养化水体实验效果及机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006: 21-24.
- [6] 郑耀通, 胡开辉. 固定化光合细菌净化养鱼水质实验[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 54-58.
- [7] 谭洪新, 刘艳红, 朱学宝, 等. 闭合循环水产养殖—植物水栽培综合生产系统的工艺设计及运行效果[J]. 水产学报, 2004, 28(6): 690-694.
- [8] Brix H. Functions of macrophytes in constructed wetlands [J]. Wat Sci Technol, 1994, 29(4): 71-78.
- [9] 赵诣. 三株异养硝化细菌的分离、特征及其对水产养殖废水脱氮作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009, 5-12.
- [10] 谢丽凤. 固定化微生物与植物联合净化养殖废水的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2010: 21-37.
- [11] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. (第4版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [13] 王国祥, 濮培民, 黄宜凯, 等. 太湖反硝化、硝化、亚硝化及氨化细菌分布及其作用[J]. 应用与环境生物学报, 1998, 5(2): 190-194.
- [14] 杨凤娟. 不同工艺生态浮床技术对污染水体的净化效果、机制及示范研究[D]. 广州: 暨南大学, 2011: 60-62.
- [15] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 第3版, 北京: 高等教育出版社, 2011: 164-165.
- [16] 屠晓翠, 蔡妙珍, 孙建国. 大型水生植物对污染水体的净化作用和机理[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2843-2844.
- [17] 郭长城, 江亭桂, 潘国权, 等. 静态条件下水生植物对悬浮颗粒物沉积的影响[J]. 人民长江, 2007, 38(1): 320-321.
- [18] Kuzyakov Y, Jones D L. Glucose uptake by maize roots and its transformation in the rhizosphere [J]. Soil Biol Biochem, 2006, 38(5): 851-860.
- [19] 姚延丹, 李谷, 陶玲, 等. 复合池塘循环水养殖系统微生物群落结构分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 407-415.
- [20] 郑师章, 黄静娟, 何敏, 等. 异养细菌在凤眼莲根系和水体中的大类和数量比较研究[J]. 生态学杂志, 1987, 6(4): 30-32.
- [21] 张福锁, 曹一平. 根际动力过程与植物营养[J]. 土壤学报, 1992, 29(3): 239-264.
- [22] 高子勤, 张淑香. 连作障碍与根际微生物生态研究——根系分泌物及其生态效应[J]. 应用生态学报, 1998, 9(5): 549-554.
- [23] 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): 18-20.
- [24] Fennessy M S, Gonk J K, Mitsch W J. Macrophyte productivity and community development in created freshwater wetlands under experimental hydrological conditions [J]. Ecol Engin, 1994, 3(4): 469-484.
- [25] 王国祥, 濮培民, 黄宜凯, 等. 太湖反硝化、硝化、亚硝化及氨化细菌分布及其作用[J]. 应用与环境生物学报, 1998, 5(2): 190-194.
- [26] Sridhar S, Victor F M, Steven C M. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination [J]. Ecol Engin, 2002, 18: 647-658.
- [27] 胡绵好, 袁菊红, 常会庆, 等. 凤眼莲—固定化氮循环细菌联合作用对富营养化水体原位修复的研究 [J]. 环境工程学报, 2009, 12(3): 2163-2170.
- [28] Lin Y F, Jing S R, Wang T W, et al. Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands [J]. Environm Pollut, 2002, 119: 413-420.

- [29] 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, 3(21): 139–150.
- [30] 战培荣, 王丽华, 于沛芬, 等. 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.
- [31] 沈德中. 污染环境的生物修复[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 49–53.
- [32] 谭洪新, 刘艳红, 周琪, 等. 添加碳源对潜流+表面流组合湿地脱氮除磷的影响环境科学[J]. *环境科学*, 2007, 28(6): 1209–1205.
- [33] 张海杰, 陈建孟, 罗阳春, 等. 有机碳源和溶解氧对亚硝酸盐生物硝化的影响研究[J]. *环境污染与治理*, 2005, 27(9): 641–643.
- [34] 李洪鹏, 李秋芬, 张艳, 等. 浅海养殖环境复合生态净化菌群的筛选及其净化能力研究[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(2): 46–53.
- [35] 陈爱玲, 李秋芬, 张立通, 等. 添加营养物质提高商品水质净化菌剂净化能力的研究[J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 581–588.

## Effectiveness of remediating aquaculture wastewater by immobilized microorganisms and *Myriophyllum aquaticum*

WU Huawen<sup>1</sup>, LU Kaihong<sup>1</sup>, QIAN Wei<sup>2</sup>, ZHENG Zhongming<sup>1</sup>, CHEN Huihuang<sup>1</sup>, WAN Li<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China

2. Jiaxing Xiuzhou Fisheries Technology Extension Center, Jiaxing 314001, China

**Abstract:** This experiment was conducted by employing immobilized microorganisms (I) on ceramics and *Myriophyllum aquaticum* (M) and unloaded ceramics (UC) to purify aquaculture wastewater in the lab. Different nitrogen forms removed from aquaculture wastewater and the dynamic distribution of four groups of bacteria involved in nitrogen cycling, ammonifiers (AB), nitrosobacteria (NOB), nitrifiers (NB) and denitrifiers (DB), were evaluated. Our results revealed that the removal efficiency of nitrogen and chemical oxygen demand (COD<sub>Mn</sub>) performed by the combined treatment (I+M) was significantly higher than when used separately ( $P<0.05$ ). By the end of day 15, the nitrite and ammonium removal rate by the I+M treatment reached 50.83% and 62.38%, respectively, significantly higher than I (39.55% and 51.17%) or M (40.78% and 53.31%) separately ( $P<0.05$ ). At the end of the experiment, COD<sub>Mn</sub> removal by the I+M treatment was significantly higher (67.23%) than that of treatment I (48.23%) or M (33.35%) ( $P<0.05$ ); the nitrate removal rate (88.74%) was also significantly higher than I (67.85%), but there was a significant difference between I+M and M ( $P<0.05$ ). In addition, four groups of bacteria on the roots surface increased in certain extent compared with treatment M, and during the last period four groups of bacteria on the ceramic surfaces showed an overall downward trend, e.g. AB in treatment I+M were 1.8–2.6 magnitudes lower than in treatment I. Principal response curve analysis (PRC) showed that turbidity, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, TN contribute great to total difference, during the early and middle stages of this experiment the combined treatment was more efficient at removing nitrogen than treatment I or M, but the overall differences between I and UC decreased greatly in the later stage with differences between I+M and I becoming small. This purifying method has some drawbacks and therefore requires further optimization to ensure its effects are long lasting.

**Key words:** immobilized microorganism; *Myriophyllum aquaticum*; aquaculture wastewater; N-cycle bacteria; removal rate; sewage purification

**Corresponding author:** LU Kaihong. E-mail: lukaihong@nbu.edu.cn