

文章编号:1005-8737(2001)01-0033-04

牙鲆自净式养殖槽中异养细菌 和硝化细菌数量及硝化速率

马悦欣, 许兵玲, 何洁, 杨凤, 雷衍之
(大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘 要:对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)自净式养殖槽水层和过滤沙层的异养细菌和硝化细菌数量及硝化速率进行了研究,测得装有循环过滤装置的水槽水和沙粒上异养细菌平均数量分别为 2.32×10^4 CFU/ml和 2.89×10^6 CFU/ml(湿沙),亚硝酸细菌分别为 3.0×10^2 ml⁻¹和 2.0×10^4 ml⁻¹(湿沙),硝酸细菌分别为 2.0×10 ml⁻¹和 3.0×10^3 ml⁻¹(湿沙)。水和沙粒的氨氧化速率平均分别为0.032 mg/(L·d)和7.59 mg/(L·d)(湿沙),亚硝酸氧化速率分别为0.259和28.0 mg/(L·d)。无循环过滤装置的水槽水中异养细菌、亚硝酸细菌和硝酸细菌平均数量分别为 1.38×10^6 CFU/ml、 3.5×10^3 和 3.5×10^3 ml⁻¹,氨和亚硝酸氧化速率分别为0.712和1.56 mg/(L·d)。

关键词:循环过滤装置;异养细菌;硝化细菌;硝化速率

中图分类号:S965.3;S949

文献标识码:A

制约我国工厂化流水养殖发展的主要原因是耗水和耗能过大,养殖成本过高,同时养殖废水会对环境造成污染。因此,养殖废水的净化研究迫在眉睫。本文提出一种自净式养殖方式,期望在现有工厂化养鱼池的基础上经简单改造,使每个池都有净化能力,达到既节水省电,又减少对环境的污染的目的。自净式养殖方式的基本原理是在池底增设生物净化床,代谢产物被异养菌分解后,所得氨氮再被硝化细菌转化为硝酸盐。有关净化床中氨化细菌及其功能的研究已另文报道^[1],本文主要研究自净装置水层和沙层的异养细菌数量、硝化细菌数量及硝化速率,进而探讨这种水处理方法净化牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)池水质的效果及应用推广的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期:2000-07-26

作者简介:马悦欣(1963-),女,大连水产学院副教授,从事水环境微生物与病害微生物研究。

牙鲆取自大连湾海珍品养殖场,体长7~13 cm,体重4~8 g。海水取自大连海域,经沉淀、过滤,盐度30, pH 8.0~8.1。沙为建筑用河沙。饵料为专用牙鲆人工配合饵料。

1.2 装置

取规格为60 cm×24 cm×40 cm的水槽6个,容量约60 L,每组2个,依次编号为1#~6#组,将1#~4#水槽组装为循环过滤装置,在底部铺设厚60~70 mm的砾石(粒径6~10 mm),砾石上为60目筛绢网,网上铺厚50~60 mm经海水浸泡过的沙子。其中砾石中预埋了导水管,该管经一直立管通向水面,气石置于直立管中,通过气泵于直立管近底部充气,产生负压,使低层水不断由导水管出口流回槽内。装置中放养牙鲆,密度为70~80尾/m²,每日投喂3次。各槽温度控制在(18±2)℃。该装置熟化时间为15 d,实际运转时间为30 d。

1.3 沙粒上细菌数量及硝化速率的测定

生物膜熟化后,从循环装置沙层中取样进行细菌数量及硝化速率的测定。

20 ml 沙样 + 180 ml NaCl 无菌水(质量浓度为 30 g/L) + 无菌 Tween 溶液(1%)^[2], 振荡 30 min 后, 进行细菌数量测定。异养细菌用 PC 法^[3]; 硝化细菌用 MPN 3 管法^[3], 培养基为含有质量浓度为 30 g/L 的 NaCl 硝化细菌培养基 I、II^[4]。

氨氧化速率: 10 ml 沙样 + 500 ml 无菌海水 + 30 g/L NaCl 硝化培养基 I (最终 N 质量浓度 5~6 mg/L) + 抑制剂 NaClO₃ (终浓度 10 mmol/L)^[5], 以水中 NO₂⁻-N 质量浓度的增加计算。

亚硝酸氧化速率: 10 ml 沙样 + 500 ml 无菌海水 + 质量浓度为 30 g/L NaCl 硝化培养基 II (最终 N 质量浓度 5~6 mg/L) + 抑制剂烯丙基硫脲(ATU)(最终质量浓度 10 mg/L)^[5], 以水中 NO₂⁻-N 质量浓度的减少计算。ATU 和 NaClO₃ 的作用分别是抑制氨和亚硝酸的氧化^[5]。充分混匀后立即取出 100 ml 测其初始 NO₂⁻-N 质量浓度, 于(18 ± 2) °C 温度下培养 24 h 后, 其中 1# 沙样于不同温度不同培养时间测其最终 NO₂⁻-N 质量浓度。NO₂⁻-N 用奈乙二胺分光光度法测定^[2]。

硝化速率计算公式:

$$a = \Delta C \cdot V / (V' \cdot t)$$

其中: a —沙样的氨和亚硝酸氧化速率[mg/(L·h)或 mg/(L·d)], 以 N 计, 湿沙以体积计];

ΔC —水中的 NO₂⁻-N 初始和最终质量浓度差(mg/L);

V —沙样测定时加水体积, 此处为 0.500 L;

V' —湿沙体积(L);

t —作用时间(h 或 d)。

1.4 水样细菌数量及硝化速率的测定

无菌取 5 个点水样, 混匀后加入 Tween 溶液, 振荡 30 min 后进行细菌定量(同沙样)。

取 400 ml 水样, 加入质量浓度 30 g/ml NaCl 的硝化培养基 I、II 和抑制剂, 测定硝化速率(同沙样)。硝化速率计算公式: $b = \Delta C / t$;

其中: b —水样的氨和亚硝酸氧化速率[mg/(L·d)];

ΔC —水中的 NO₂⁻-N 初始和最终质量浓度差(mg/L);

t —作用时间(d)。

2 结果和讨论

2.1 养殖效果

净化槽试验期间始终未换水, 水质和鱼体状况均良好, 30 d 平均增重 88%。而 5#、6# 对照槽中有机的氧化分解只能靠水体中微生物的作用, 转化速度较慢, 尽管不定期换水, 水质还是较差, 牙鲆生长缓慢, 30 d 平均增重 62%。说明本文水处理装置可应用于生产中净化牙鲆池水质。

2.2 水中和沙粒上异养细菌数量

沙层生物膜熟化后, 水中和沙粒上异养细菌数量见表 1。

表 1 水和沙中异养细菌数量

Table 1 The numbers of heterotrophic bacteria in water and sand

		10 ⁴ CFU/ml					
日期	Date	水槽号 Tank no.					
		1#	2#	3#	4#	5#	6#
水中	05-08	4.45	3.60	3.74	5.50	1.12	2.30
	05-12	2.18	2.12	2.52	2.34	1.66	1.28
	05-19		1.12		0.96		1.17
	05-26		2.22		2.52		0.74
	05-31		0.83		0.72		
	06-03		0.77		1.47		
	05-13	240		108			
沙中	05-22		159		163		
	05-26		600		727		
	05-31		303		244		
	06-03		239		111		

注: 5#、6# 为对照组, 无过滤装置, 无砂。Ponds 5# and 6# are controls without sand.

生物膜熟化后, 自净水槽中的 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 均降至 1 mg/L 以下, 一般在 0.2 mg/L 左右。从表 1 中可看出, 1#~4# 水槽沙粒上异养细菌数量比水中要高出 2 个数量级, 这是净化功能的基础, 表明安装循环过滤装置后, 牙鲆的排泄物和残饵等有机物大部分被沙层和砾石层生物膜中的微生物吸附并氧化分解, 使其上层的水得以净化, 因而水中异养细菌较少。5#、6# 槽水中的异养细菌数量远高于净化槽中的, 比沙层少, 但基本处于同一数量级。5#、6# 水槽中有机物的分解只靠水体中微生物的作用, 污染物和鱼处于同一空间, 水质污浊。

2.3 水中和沙粒上亚硝酸和硝酸细菌数量

沙层生物膜熟化后, 水中和沙粒上亚硝酸、硝酸细菌数量见表 2。从表 2 可看出, 6# 槽水中亚硝酸细菌和硝酸细菌分别高出净化槽中的 1 个和 2 个数量级。2#、4# 槽沙粒上亚硝酸、硝酸细菌数量比净化槽水高出 2 个数量级, 比对照槽水高出 1 个数量

级。这表明净化槽硝化作用主要在沙层中进行,对照槽则在水中进行。

沙中亚硝酸细菌平均数量比方秀珍报道的鱼池淤泥中的最大值还要高出 2 个数量级^[6]。这说明在人工控制的环境下亚硝酸细菌、硝酸细菌可以更好的生长。若有更好的载体,应该还会有更大的生长潜力。水中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的转化主要取决于亚硝酸细菌的代谢活性。经监测,2[#]、4[#] 槽水中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 质量浓度在 0.15 mg/L 以下,说明由氨化作用产生的及鱼体排泄的 NH_4^+ 绝大部分可及时通过氨氧化

作用氧化成 NO_2^- 。

沙和水中硝酸细菌的活性可决定水中 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度的高低。经监测,2[#]、4[#] 槽水中 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 质量浓度接近于 0,表明净化装置中的硝酸细菌数量足以及时将 NO_2^- 氧化成 NO_3^- 。而 6[#] 槽水中的亚硝酸细菌、硝酸细菌数量虽然高于 2[#]、4[#] 槽,但由于没有底沙, NH_4^+ 和 NO_2^- 不能及时转化而有一定的积累。据测定,5[#]、6[#] 在第 9 天氨氮就达到 7 mg/L 左右,亚硝酸氮分别达到 1.1 和 1.9 mg/L。

表 2 水和沙中亚硝酸、硝酸细菌数量

Table 2 The numbers of nitrite and nitrate bacteria in water and sand		$\text{mL}^{-1}(\text{MPN})$							
菌种 Bacterium species	池号 Pond no.	日期 Date							
		05-19		05-26		05-31		06-03	
		水中 Water	沙中 Sand	水中 Water	沙中 Sand	水中 Water	沙中 Sand	水中 Water	沙中 Sand
亚硝酸细菌 $\text{NO}_2^- - \text{Bact.}$	2 [#]	3.0×10^2	2.0×10^4	3.0×10^2	1.2×10^4	4.0×10^2	1.5×10^4	3.5×10^2	2.0×10^4
	4 [#]	3.5×10^2	3.0×10^4	2.0×10^2	1.5×10^4	2.0×10^2	1.2×10^4	2.5×10^2	1.2×10^4
	6 [#]	3.5×10^3		3.5×10^3					
硝酸细菌 $\text{NO}_3^- - \text{Bact.}$	2 [#]	1.5×10	3.0×10^3	1.5×10	1.5×10^3	2.0×10	2.0×10^3	2.0×10	2.5×10^3
	4 [#]	1.5×10	4.0×10^3	2.0×10	1.5×10^3	4.0×10	3.5×10^3	2.0×10	3.5×10^3
	6 [#]	4.0×10^3		3.0×10^3					

2.4 水和沙粒的硝化速率

在不同温度下测定了 1[#] 沙样使氨和亚硝酸氧化的速率随培养时间的变化,结果见图 1、2。由图 1 可见,氨氧化速率随着温度的升高而增大,在培养了 6~10 h 时达到最大值,之后随着培养时间的延长反而下降。这显然是因为亚硝化作用产酸使 pH 下降造成的,因为在培养过程中没有调整 pH 值。由图 2 可见,亚硝酸氧化速率在 20℃ 和 25℃ 下随着培养时间的延长而升高(48 h 内),15℃ 下略有下降,但波动不大。表 3 是 $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ 测得的氨和亚硝酸氧化速

率。因为测定的速率是培养 24 h 的平均值。从数据看,2[#]、4[#] 沙样的氨氧化速率基本一致,4[#] 沙样的亚硝酸氧化速率是 2[#] 沙样的 1.8 倍。2[#]、4[#] 水样的氨氧化速率平均为 0.032 mg/(L·d),亚硝酸氧化速率为 0.259 mg/(L·d),而 6[#] 水样的氨和亚硝酸氧化速率分别是净化槽(2[#]、4[#]) 水的 22 倍和 6 倍,这与其硝化细菌数量较高有关。而沙粒的硝化速率远高于水的,进一步表明净化槽的净化功能由底沙来完成。

表 3 水和沙粒的氨和亚硝酸氧化速率

Table 3 Rates of ammonia and nitrite oxidation in water and sand		(N)mg/(L·d)					
项目 Item	池号 Pond no.	日期 Date					
		05-26		05-31		06-03	
		水中 Water	沙中 Sand	水中 Water	沙中 Sand	水中 Water	沙中 Sand
NH_4^+ 氧化 $\text{NH}_4^+ \text{ oxid.}$	2 [#]	0.028	7.97	0.036	10.28	0.031	6.17
	4 [#]	0.026	8.71	0.035	7.58	0.034	4.83
	6 [#]	0.712					
NO_2^- 氧化 $\text{NO}_2^- \text{ oxid.}$	2 [#]	0.380	20.6	0.213	19.6	0.194	20.0
	4 [#]	0.280	38.4	0.274	34.8	0.213	34.8
	6 [#]	1.56					

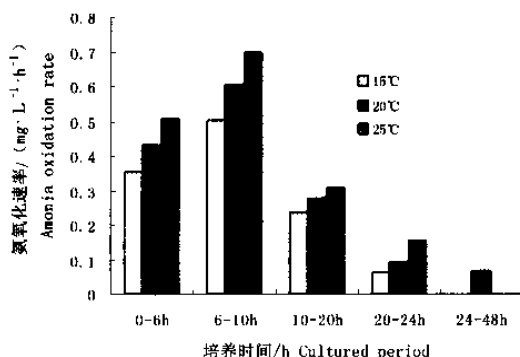


图1 不同温度不同培养时间1#沙样的氨氧化速率

Fig.1 Rate of ammonia oxidation at different temperature and culture time in sand sample 1[#]

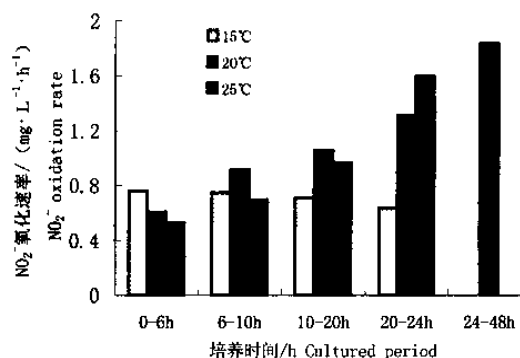


图2 不同温度不同培养时间1#沙样的亚硝酸氧化速率

Fig.2 Rate of nitrite oxidation at different temperature and culture time in sand sample 1[#]

参考文献:

- [1] 马悦欣, 洪明煜, 何洁, 等. 牙鲆自净式水槽氨化细菌数量及氨化速率的研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 115-116.
- [2] 国家海洋局. 海洋监测规范[M]. 北京: 海洋出版社, 1991. 270-703.
- [3] 陈绍铭, 郑福寿. 水生微生物学实验法[M]. 北京: 海洋出版社, 1985. 35-236.
- [4] 李阜康, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 36-308.
- [5] Bianchi M, Marty D, Teyssie J L, et al. Strictly aerobic and anaerobic associated with sinking particulate matter and zooplankton fecal pellets[J]. Mar Ecol Prog Ser, 1992, 88: 55-60.
- [6] 方秀珍, 郭贤机, 郁桐炳, 等. 鱼池淤泥中参与氮循环的细菌和淤泥活性[J]. 水产学报, 1988, 17(2): 137-145.

Numbers and nitrification rates of heterotrophic bacteria and nitrifiers in self-purification culture of *Paralichthys olivaceus*

MA Yue-xin, XU Bing-ling, HE Jie, YANG Feng, LEI Yan-zhi
(Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: Six ponds were designed for the test, each 60 cm×24 cm×40 cm with a density of *Paralichthys olivaceus* at 70~80 inds/m² and body weight 4~8 g. Among those, 4 ponds were equipped with recirculating filters and covered with sand on the bottoms and 2 ponds were controls without filters nor sand. All fish were fed 3 times per day with formulated feed for 30 d. The results show that in the test ponds the numbers of heterotrophic bacteria in water and sand were 2.32×10^4 CFU/ml and 2.89×10^6 CFU/ml (wet sand); the nitrite bacteria were 3.0×10^2 ml⁻¹ and 2.0×10^4 ml⁻¹ (wet sand), respectively. At water temperature 20°C, the ammonia oxidation rates in water and sand were 0.032 mg/(L·d) and 7.59 mg/(L·d) (wet sand); the nitrite oxidation rates were 0.259 mg/(L·d) and 28.0 mg/(L·d), respectively. While in the controls, the average numbers of heterotrophic bacteria, nitrite bacteria and nitrate bacteria were 1.38×10^6 CFU/ml, 3.5×10^3 and 3.5×10^3 ml⁻¹, respectively, and the oxidation rates of ammonia and nitrite were 0.712 mg/(L·d) and 1.56 mg/(L·d) in water, respectively.

Key words: recirculating filter apparatus; heterotrophic bacteria; nitrifiers; nitrification rate