

# 海水养殖含氮废水处理的复合微生态制剂研制

周鑫 王素英\* 宋霖霞

(天津商业大学生物技术与食品科学学院 天津市食品生物技术重点实验室 天津 300134)

**摘要:** 目前应用于海水养殖废水修复的微生态制剂不仅存在菌株针对性、适应性差的缺点,而且很少考虑功能微生物之间的相互作用,因此应用效果难以令人满意。本实验针对海水养殖过程中的氮素循环,选择分离自海水养殖废水环境的亚硝化细菌 ZW38、反硝化细菌 ZL5 和蛋白酶产生菌 ZS7 进行配伍实验,以混合培养体系中各种类型细菌的数量及氨态氮、亚硝态氮和蛋白质的含量变化为指标,发现 3 种功能细菌以 3:2:1 的比例混合,且使用量为  $10^9$  CFU/L 时,彼此之间可相互促进生长,经过 5 d 处理,海水养殖废水中的主要污染物质可溶性蛋白和氨态氮的去除率分别达到 94.0% 和 77.5%。

**关键词:** 复合微生态制剂, 氨态氮, 可溶性蛋白

## Developing Complex Probiotics Used in Treating Resoluble Nitrogen Wastewater from Seawater Culture

ZHOU Xin WANG Su-Ying\* SONG Lin-Xia

(College of Biotechnology and Food Science, Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, Tianjin 300134, China)

**Abstract:** At the present time, probiotics used in recovering sea culture wastewater has some defects, such as no good counter, adaptation and relationship of these strains, so the applying effect is not satisfying. In our experiment, nitrosobacteria ZW38, denitrobacteria ZL5 and secreting proteinase strain ZS7, which were isolated from wastewater of marine culture, were mixed according the nitrogen cycle of seawater culture, the number of various strain and the content of  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  were determined. The results showed that these strains grow well each other when the ratio of ZW38, ZL5 and ZS7 is 3:2:1, and the total inoculating number is  $10^9$  CFU/L. After 5 d for treating, the decomposed rate of resoluble protein and  $\text{NH}_4\text{-N}$  is 94.0% and 77.5% respectively.

**Keywords:** Complex probiotics, Ammonia nitrogen, Resoluble protein

随着人们对海产品消费需求的不断提高,我国沿海城市的海水养殖业发展迅速,随之而来的是含有大量蛋白氮的养殖废水的排放,致使附近海域生态环境退化、水域生物多样性急剧下降<sup>[1]</sup>。为此,人们开始探讨海水养殖废水的净化模式,发现与理化

处理方式相比,复合微生物制剂因成本低廉、无毒、无副作用、无残留污染等优点而备受关注<sup>[2-3]</sup>。国内也相继开发了多种微生态制剂,然而其应用效果难以令人满意,究其原因主要是菌株成分复杂,缺乏针对性且难于适应海水环境<sup>[4-5]</sup>。

\* 通讯作者: Tel: 86-22-26686254; ✉: wsying@tjcu.edu.cn  
收稿日期: 2009-11-24; 接受日期: 2010-01-13

本实验选用从海水养殖废水中筛选获得的高效蛋白酶产生菌、亚硝化细菌和反硝化细菌,旨在经过合理配伍研制一种专门针对海水养殖废水的微生态制剂,即利用蛋白酶产生菌分泌的蛋白酶将养殖废水中的可溶性蛋白分解成氨基酸,并经过其自身和废水中存在的大量异养细菌的氨化作用将氨基酸转化为氨氮,最后由亚硝化细菌和反硝化细菌的联合作用,将氨氮转化为无毒无害的气态氮从水中逸出。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

养殖废水水样:取自天津水产养殖研究所南美白对虾养殖池。

菌种:蛋白酶产生菌 ZS7、亚硝化细菌 ZW38 和反硝化细菌 ZL5。

### 1.2 培养基

蛋白酶产生菌液体发酵培养基参见文献[6]。

亚硝化细菌液体发酵培养基见参考文献[7]。

反硝化细菌液体发酵培养基见参考文献[8]。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 菌悬液的制备:**将 ZS7、ZW38 和 ZL5 分别接种于各自的液体发酵培养基中,振荡培养至对数生长期末,4000 r/min 离心 15 min 后用生理盐水洗涤 2-3 次,再将菌体重新悬浮于生理盐水,并调整菌悬液的浓度为  $10^{10}$  CFU/mL。

**1.3.2 配伍实验:**以接种量和菌株之间的比例为考察因素,通过实验确定复合微生态制剂的组成。接种量选取  $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$  CFU/L; ZW38、ZL5 和 ZS7 的比例选取 1:1:2、1:1:1、2:1:1、3:2:1、4:2:1。按照以上的接种量和比例将菌悬液接种于海水养殖废水中,5 d 后测定氨氮含量。

**1.3.3 制剂中菌株之间相互作用的研究:**将 3 株细菌按照确定的接种量和比例接种于海水养殖废水,培养 5 d,每隔 24 h 用平板菌落计数法测定废水中各菌株的活菌数。同时将 3 株细菌按照同一接种量分别接种于海水养殖废水作为对照组实验。

**1.3.4 制剂对海水养殖废水的降解效果:**将 3 株细菌按照确定的接种量和比例接种于海水养殖废水,每隔 8 h 测定废水中可溶性蛋白、氨态氮、亚硝态氮含量。可溶性蛋白的测定采用 Folin-酚法<sup>[9]</sup>;氨氮的测定采用改进的靛酚蓝光度法<sup>[10]</sup>;亚硝酸盐的测

定采用格里斯试剂比色法(GB/T 5009.33-1996)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 配伍实验结果

以接种量和接种比例为实验因素,接种复合菌剂 5 d 后,测定海水养殖废水中氨氮含量,结果见表 1。

表 1 不同接种量和菌种比例对氨氮降解的影响 Table 1 Effect of inoculated number and ratio of various strain on decomposed ammonia nitrogen			
编号 No.	接种量 Inoculated number (CFU/L)	接种比例 Inoculated ratio (ZW38:ZL5:ZS7)	氨态氮含量 Content of ammonia nitrogen (mg/L)
1	$10^8$	1:1:2	0.082
2	$10^8$	1:1:1	0.081
3	$10^8$	2:1:1	0.079
4	$10^8$	3:2:1	0.063
5	$10^8$	4:2:1	0.059
6	$10^9$	1:1:2	0.080
7	$10^9$	1:1:1	0.074
8	$10^9$	2:1:1	0.069
9	$10^9$	3:2:1	0.047
10	$10^9$	4:2:1	0.050
11	$10^{10}$	1:1:2	0.091
12	$10^{10}$	1:1:1	0.072
13	$10^{10}$	2:1:1	0.075
14	$10^{10}$	3:2:1	0.056
15	$10^{10}$	4:2:1	0.061

从表 1 可以看出,接种量为  $10^9$  CFU/L,接种比例为 3:2:1 时,经处理后的养殖废水氨氮含量最低。因此,后续实验选定复合微生态制剂的配方为 3:2:1 (ZW38:ZL5:ZS7)。

### 2.2 复合微生态制剂中不同菌株之间的相互关系

使用复合微生态制剂处理海水养殖废水,每隔 24 h 测定 3 种功能微生物的活菌数,结果见图 1。3 株功能菌株分别接种的对照组结果见图 2。

在实验组和对照组中, ZS7 都能够利用废水中的蛋白,使自身的生长量有显著的提高,最大生长量分别达到  $1.42 \times 10^9$  CFU/L 和  $1.39 \times 10^9$  CFU/L,但二者之间并无显著性差异( $P > 0.05$ )。对 ZL5 在废水中的生长情况进行方差分析( $\alpha = 0.05$ ),发现接种后 5 d 内,对照组 ZL5 的生长速度较慢,生长量与接种时无显著差异,这是因为废水中的硝酸盐和亚硝酸盐含量很低,反硝化细菌只能维持较低的生长量;

而在实验组中, ZL5 的生长量则与接种时有显著差异, 最大生长量可达  $8.8 \times 10^8$  CFU/L。同样对 ZW38 在废水中的生长情况进行方差分析( $\alpha = 0.05$ ), 结果发现无论是实验组还是对照组, ZW38 在 5 d 内的生长量均与接种时有显著差异, 且两者的最大生长量(分别为  $7.0 \times 10^8$  CFU/L 和  $5.9 \times 10^8$  CFU/L)之间也呈显著差异( $P < 0.05$ ), 这是由于可溶性蛋白转化的氨氮为亚硝化细菌提供了更为充分的营养。

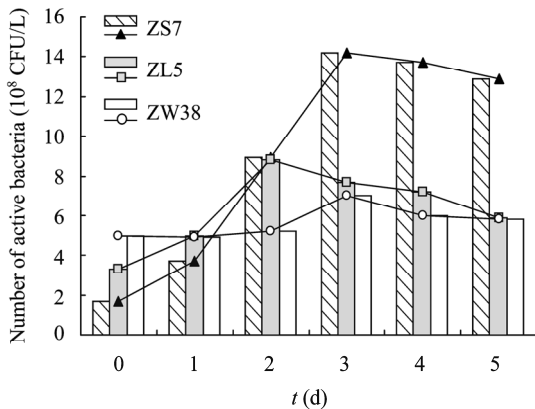


图1 混合接种各菌株的生长情况

Fig. 1 Number of various strain in mixed culture

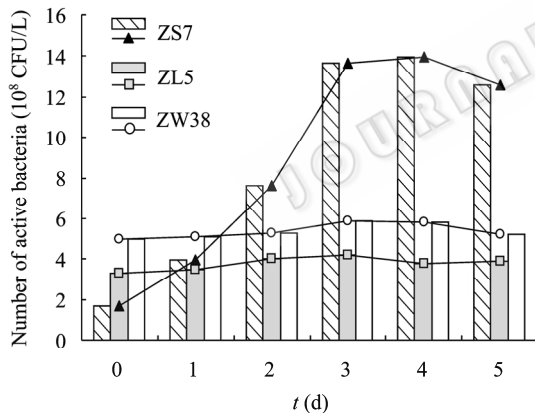


图2 单独接种各菌株的生长情况

Fig. 2 Number of various strain in culture respectively

综上所述, 经配伍后的微生态制剂, 功能微生物之间可以相互促进生长, 发挥更高的效率。蛋白酶产生菌分泌的胞外蛋白酶可以将可溶性的蛋白分解成氨基酸。废水中丰富的氨化细菌进一步将氨基酸分解利用, 形成氨氮。氨氮又会被亚硝化细菌转化为亚硝酸盐。最后, 反硝化细菌将亚硝酸盐转化成无毒无害的  $N_2O$  或  $N_2$ 。在整个氮素循环的过程中, 功能微生物在完成自身生长的同时, 也将海水养殖废水中的污染物质降解, 实现了水质净化的过程。

## 2.3 复合微生态制剂对海水养殖废水的降解效果实验

将复合微生态制剂接入海水养殖废水中, 检测其对可溶性蛋白质、氨态氮以及亚硝态氮的降解情况。结果如图 3、4、5 所示。

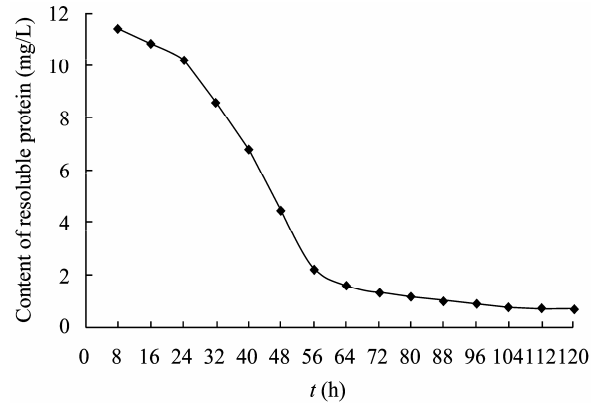


图3 接种后废水中可溶性蛋白含量变化

Fig. 3 Variation of resolvable protein content in wastewater after inoculation

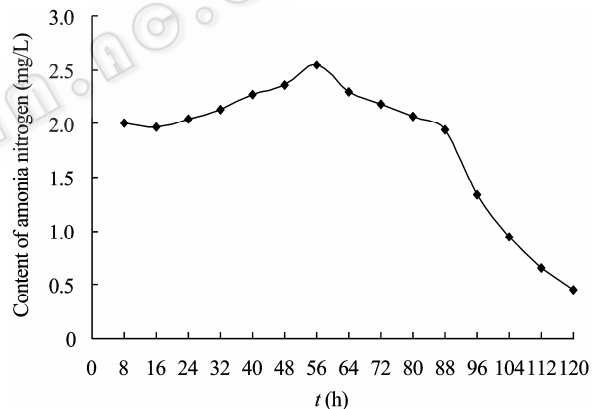


图4 接种后废水中氨氮含量变化

Fig. 4 Variation of ammonia nitrogen content in wastewater after inoculation

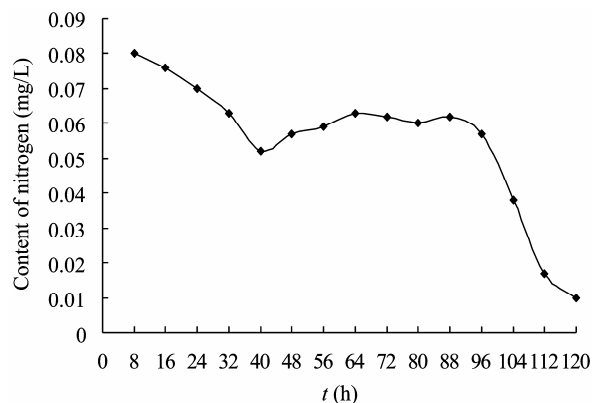


图5 亚硝酸盐含量变化

Fig. 5 Variation of nitrite content in wastewater after inoculation

从图 3 可以看出,接种复合菌剂后,养殖废水中的可溶性蛋白在蛋白酶产生菌分泌的蛋白酶的作用下迅速分解,废水中的可溶性蛋白含量持续下降到较低水平。

图 4 表明海水养殖废水的氨氮含量先缓慢上升,再迅速下降。其主要原因是接种前期亚硝化细菌 ZW38 菌株生长较为缓慢(图 1),ZS7 菌株及废水中的氨化细菌快速降解蛋白氮生成的氨态氮含量超过了亚硝化细菌的氧化作用。接种后期随着废水中可溶性蛋白含量不断减少,亚硝化细菌生长量不断提高,氨氮含量开始下降,96 h 以后亚硝化细菌进入对数生长期,氨氮含量也迅速下降至较低水平。

图 5 表明接种复合微生物制剂后,前 40 h 内亚硝酸盐含量缓慢下降,之后少许上升并维持在一个较高的水平,88 h 以后才开始迅速下降,主要是接种前期亚硝化细菌将氨氮氧化形成亚硝酸盐,同时存在于水体的厌氧反硝化细菌也将废水中的硝态氮转化成亚硝酸盐,致使水体中硝酸盐不断形成,从而抵消了接种的好氧反硝化细菌 ZL5 菌株还原亚硝酸盐为气态氮的作用,甚至当大量的氨氮被降解为亚硝态氮时,亚硝酸盐的含量还出现上升的情况。接种 88 h 后,随着水体中蛋白氮的彻底消耗,亚硝酸盐形成量不再增加,而反硝化细菌 ZL5 菌株保持了较高的还原亚硝态氮的能力,因此表现为废水中的亚硝酸盐含量迅速降低。

综上所述,复合微生态制剂对于海水养殖废水中的可溶性蛋白和氨氮具有很强的降解能力。经过 5 d 的处理时间,可溶性蛋白和氨氮的去除率分别达到 94.0%和 77.5%。

### 3 结论

本实验以分离自海水养殖废水的蛋白酶产生菌 ZS7、亚硝化细菌 ZW38 和反硝化细菌 ZL5 为材料,以海水养殖废水中含氮化合物的减少为指标进行菌株之间的配伍研究,发现以 3:2:1 (ZW38:ZL5:ZS7)的比例配制,使用量为  $10^9$  CFU/L 时,复合微生态制剂能达到最为有效的废水净化效果。对比实验证

明了 3 株功能菌株不但互不拮抗,而且可以相互促进生长。海水养殖废水中的主要污染物质可溶性蛋白和氨态氮经复合微生态制剂处理 5 d 后,去除率分别达到 94.0%和 77.5%。

这种新型的复合微生态制剂所选用的功能微生物均是从海水养殖废水中筛选而来,因此对于海水养殖废水具有天然的适应性。而且,选择的 3 种微生物针对废水中的氮素循环过程,联合应用最终将海水养殖废水中的可溶性蛋白质和氨氮降解到较低水平,经处理的海水养殖废水可以用于循环养殖或排入环境中。

### 参考文献

- [1] 贾晓平,蔡文贵,林钦,等.我国沿海水域的主要污染问题及其对海水增养殖的影响.中国水产科学,1997,4(4): 78-82.
- [2] 陈祖峰,郑爱榕.海水养殖自身污染及污染负荷估算.厦门大学学报,2004,43(1): 258-262.
- [3] 李来阳,谢卫兵.海水养殖废水处理技术研究进展.河北渔业,2009,185(5): 46-50.
- [4] 杨波,杨志恒,胡文容,等.亚硝化细菌处理氨氮废水研究.武汉理工大学学报,2007,29(3): 63-66.
- [5] 孟睿,何连生,席北斗,等.芽孢杆菌与硝化细菌净化水产养殖废水的试验研究.环境科学与技术,2009,32(11): 28-31.
- [6] 赵寿经,赵静,王辉,等.产中性蛋白酶菌种的选育及其在玉米淀粉生产浸泡工艺中的应用.生产与科研经验,2008,34(8): 79-82.
- [7] 张辉,李培军,胡筱敏,等.亚硝化细菌的筛选及培养条件的研究.化工环保,2006,26(5): 366-369.
- [8] Takaya N, Catalan-Sakairi MAB, Yasushi S, et al. Aerobic denitrification bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 68(6): 3152-3157.
- [9] 中华人民共和国轻工业部. QB 1805.3-1993, 中华人民共和国轻工行业标准. 北京: 中国轻工业出版社, 1993.
- [10] 王锋,李玉环.靛酚蓝光度法测定海水中的氨型氮.光谱实验室,2002,19(5): 631-633.