

碳源及 C/N 对复合菌群净化循环养殖废水的影响

钱 伟, 陆开宏*, 郑忠明, 伍华雯, 邵路路, 陈辉煌

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为了解决循环养殖废水水质处理过程中存在的脱氮碳源不足问题, 从而提高整个循环养殖废水生物脱氮效率。实验以高 NO_3^- -N 降解能力和低 NO_2^- -N 积累量为碳源优化指标, 研究了乙醇、丙三醇、葡萄糖、蔗糖、乙酸钠和酒石酸钾钠 6 种碳源及不同碳氮比(C/N)对复合菌群净化循环养殖废水效果的影响。碳源初筛结果显示, 当以葡萄糖、蔗糖等糖类物质为外加碳源时, 实验过程中 NO_2^- -N 积累现象较明显, 最高可达 12.4 mg/L; 当以醇类物质为外加碳源时, NO_2^- -N 积累量较低, 最高也只有 1.3 mg/L。碳源复筛结果显示, 不同碳源及 C/N 对养殖废水的 NH_4^+ -N 去除率并无显著差异, 且各处理组的 NH_4^+ -N 去除率高达 98.2%, 显著地高于对照组($P < 0.05$); 以乙醇为外加碳源且 C/N 为 3:1 时, 复合菌群对养殖废水的 TN、 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 去除率分别高达 93.3%、98.9% 和 91.8%, 均显著地高于对照组($P < 0.05$)。综合考虑外加碳源的实用性和经济性等因素, 选取乙醇作为复合菌群净化养殖废水的外加碳源, 相应的 C/N 为 3:1。虽然外加碳源短期内会引起水体 COD_{Mn} 含量大幅升高, 但可被复合菌群迅速降解; 此外, 外加碳源还能改善水体 pH 值, 经处理组净化后的水体 pH 值维持在 7.2~7.8。结果表明, 循环养殖废水水质净化过程中添加相应的碳源并适当控制 C/N 能显著改善池水水质, 提高生物脱氮效率。

关键词: 养殖废水; 反硝化脱氮; 碳源; 碳氮比

中图分类号: X 172; S 917.1

文献标志码: A

水环境调控是水产养殖的重要技术环节, 充足、合乎要求的水源对各种养殖必不可少, 水质影响着养殖生物的繁殖、生长乃至生存。集约化养殖模式带来的养殖环境自身污染问题不容忽视, 大量的残饵和排泄物源源不断地进入水体, 在适宜条件下被迅速分解转化, 产生大量的氮磷物质, 导致养殖水体水质污染, 引起养殖动物病害频发, 严重时会导致整个养殖生态系统失衡^[1-4]。因此, 适当控制水体中氮磷, 减少其对水体的污染成为目前水处理研究中亟需解决的问题。

生物脱氮是从废水中去除氮素污染较为经济有效的方法之一^[5-6]。生物脱氮包括硝化和反硝化两个过程。反硝化是硝酸盐或亚硝酸盐被还原成气态氮的生物过程。这个过程可以用下列反应式表示: $\text{NO}_x^- + (2x-1)\text{H}$ (电子供体—有机物) $\rightarrow 1/2\text{N}_2 +$

$(x-1)\text{H}_2\text{O} + \text{OH}^-$ 。生物反硝化系统中, 反硝化细菌以碳源作为电子供体, NO_2^- 和 NO_3^- 作为电子受体, 将两者还原成氮气, 同时达到去除有机物的效果^[7-9]。碳源不足会导致反硝化作用不彻底, 引起硝酸盐的积累。虽然硝酸盐在一定范围内对水产动物无毒害, 渔业水质标准^[10]等国标也未对其进行限制。但较高的硝酸盐浓度(60 mg/L)不能及时被微生物转化为其他形式带走(N_2), 一旦水体溶解氧不足, 随时会转化成氨氮、亚硝酸盐等物质危害水生动物^[11]。20 世纪 90 年代我国的养鳗、养鳖产业大起大落, 就与水体有机质、硝酸盐氮转化不畅有直接关系^[12]。因此, 生物反硝化过程需要提供足够数量的碳源, 保证一定的碳氮比才能使反硝化反应顺利完成^[13-14]。

由于碳源的种类与浓度对反硝化的速率起着

收稿日期: 2012-03-13

修回日期: 2012-05-31

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2007AA10Z409); 宁波大学 2010 年研究生优秀学位论文培育基金(PY20100012)

通讯作者: 陆开宏, E-mail: lukaihong@nbu.edu.cn

关重要的作用, 循环养殖废水中的有机物主要以一些残饵、鱼类代谢物等慢速降解有机物为主。在生物反硝化处理高氨氮、硝酸盐氮废水过程中, 这类有机物不能及时地提供脱氮所需的碳源量, 导致生物脱氮效率并不是很理想^[1-2,9]。本实验考察了不同碳源及碳氮比对复合菌群脱氮性能的影响, 以期能筛选出经济、实用的外加碳源, 提高整个循环养殖废水的水质处理效果。

1 材料与方 法

1.1 培养基及模拟废水

反硝化富集培养基^[1,5](denitrifying medium, DM): Na₂HPO₄ 1.6 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, KNO₃ 0.72 g/L, 乙酸钠 2.04 g/L, 酒石酸钾钠 4.23 g/L, K₂SO₄ 0.06 g/L, MgCl₂·2H₂O 0.1 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.025 g/L, EDTA-Na₂ 0.015 g/L, MnSO₄ 0.001 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.0015 g/L, D-Biotin 0.016 g/L, 蒸馏水 1 L, pH 7.0~7.5。

人工废水^[15]: KNO₃ 0.72 g/L, KH₂PO₄ 0.023 g/L, K₂SO₄ 0.01 g/L, MgCl₂·2H₂O 0.01 g/L, CaCl₂·2H₂O

0.003 g/L, NaHCO₃ 0.063 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.0015 g/L, 曝气后的自来水 1 L, pH 7.0~7.5。

1.2 复合菌群的构建

由于在废水处理过程中, 单一菌株的生存能力较差、净化效果不完全, 且长期投用会破坏水体生态平衡。因此人们希望通过微生物间的协同作用形成一个较稳定的微生态系统, 以提高并持续发挥水处理效果^[1,15]。

本试验用于水处理的菌种见表 1, 产气肠杆菌和水杆菌属由浙江大学吕镇梅惠赠, 黄杆菌属和芽孢杆菌属由宁波大学水域生态与环境实验室提供, 基于菌种间不同的氮素去除能力, 构建了复合微生物菌群。不同菌种的菌悬液(OD₆₀₀ 在 0.8~1.0)各取 1 mL(等体积比)接种于 50 mL 反硝化富集培养基中, 在摇床培养箱中培养 24 h(32 ℃, 160 r/min)。8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 0.9% 的生理盐水重悬洗涤 2 次, 加无菌水后经漩涡混合器(Vortex Genius 3, IKA)震荡后(OD₆₀₀ 在 0.8~1.0)作为复合菌群的母液^[1, 16]。

表 1 构建复合菌群的菌种信息

Tab. 1 Information about the multiple bacteria used in the study

脱氮微生物 denitrifier	新陈代谢的异化作用类型 the dissimilation type of metabolism	氮素去除种类 ^[16-17] removal type of nitrogen
产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	兼性厌氧型 facultative anaerobic type	NO ₃ ⁻ -N、NO ₂ ⁻ -N
水杆菌属 <i>Aquabacterium</i> sp.	兼性厌氧型 facultative anaerobic type	NO ₃ ⁻ -N
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> sp.	好氧型 aerobic type	TN、NO ₂ ⁻ -N
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> sp.	好氧型 aerobic type	NO ₃ ⁻ -N、NH ₄ ⁺ -N

1.3 生物膜挂膜流程

在装有弹性纤维载体(30 mm×30 mm×30 mm, 孔径 1~3 mm)的 4 L 聚乙烯桶内注入一定量的反硝化富集培养基(以刚好没过填料为宜), 接种一定量的复合菌群母液, 基于各菌种新陈代谢的异化作用类型, 使用气泵进行间歇性曝气挂膜(2 h 一间隔), 培养温度为 30 ℃, 挂膜期间不定期添加反硝化富集培养基, 以利于菌群的生长繁殖, 挂膜时间持续 4 周左右^[18-19]。

1.4 生物膜扫描电镜观察

扫描电镜(Hitachi S3400, Japan)观察载体表面的生物膜样品, 预处理方法如下^[20]:

样品在 2.5% 戊二醛溶液中 4 ℃ 过夜, 按下列步骤处理样品: 倾去固定液, 用 0.1 mol/L 的磷酸

缓冲液(pH 7.0)漂洗样品 3 次, 每次 15 min; 用 1% 锇酸溶液固定样品 1~2 h; 倒掉固定液, 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.0)漂洗样品 3 次, 每次 15 min; 用 30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100% 浓度的乙醇溶液对样品进行梯度脱水, 每种浓度处理 15 min; 用乙醇与醋酸异戊酯的混合液(V/V=1/1)处理样品 30 min, 再用纯醋酸异戊酯处理样品 1~2 h; 临界点干燥, 镀膜, 观察。

1.5 水质监测指标

水质监测指标包括水温(WT)、pH、DO、COD_{Mn}、总有机碳(TOC)、TN、TP、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 等, 具体测定方法如下^[21]: WT、DO 采用便携式溶氧仪(YSI55, USA); pH 采用 Mettler Toledo FiveEasy; COD_{Mn} 采用高锰酸盐指数法(GB

11892-89); TOC 采用总有机碳分析仪(Element Li-
quic II, Germany); TN 采用碱性过硫酸钾消解紫外
分光光度法(GB 11894-89); TP 采用钼酸铵分光光
度法(GB 11893-89); NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 采
用全自动间断化学分析仪 (SmartChem 200,
France)。

1.6 碳源及 C/N 的初筛

乙醇、丙三醇、葡萄糖、蔗糖、乙酸钠和酒
石酸钾钠等不同碳源及 C/N(1 : 1、3 : 1、5 : 1、
7 : 1、9 : 1、11 : 1、15 : 1 和 20 : 1, 质量比)对
复合菌群脱氮性能的影响。试验以人工模拟废水
为对象(KNO₃ 为唯一氮源, 初始 NO₃⁻-N 浓度
为 100 mg/L), 碳源量以 TOC 计, 按不同的 C/N 向
废水中添加相应的碳源量(图 1)。将复合菌悬液
按 1% 的量(体积比)加入 400 mL 模拟废水中,
设不加碳源对照组, 每组设 3 个重复, 振荡培
养(32 °C, 160 r/min), 分别在 0、12、24、36、
48 和 72 h 取样, 立即测量样品的 OD₆₀₀(当
OD₆₀₀ 值大于 0.8 时, 进行适当的稀释, 使其
值为 0.1~0.8, 下同。), 接着将

样品离心(8000 r/min, 10 min), 取上清液测
量 NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 的浓度。最后挑选出复
合菌群对废水 NO₃⁻-N 降解能力高, 同时 NO₂⁻-
N 积累较少条件下的碳源及碳氮比。

1.7 碳源及 C/N 的复筛

在初步筛选出的 3 种碳源及 C/N 的基础上,
根据养殖废水中 NO₃⁻-N 的量(表 2), 投加相
应比例的碳源量。将挂膜后的载体按 3 % 的
量(体积比)加入 8 L 养殖废水中, 实验设不
加碳源对照组, 每组设 3 个重复, 每 2 小时
间隔进行间歇性曝气, 水温控制在 30 °C, 实
验持续 3 周。为了保证生物反硝化有充足的
碳源供给, 在试验期间根据废水中 NO₃⁻-N
的浓度, 于第 1、10 天按各处理组的 C/N 添
加相应的碳源量。实验 1~9 d 为阶段 I, 10~
17 d 为阶段 II, 定期取样, 将样品离心(8
000 r/min, 10 min), 取上清液测量 COD_{Mn}、
TN、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 的浓度。
最后筛选出经济有效的外加碳源, 以提高循
环养殖废水的水质处理效果。

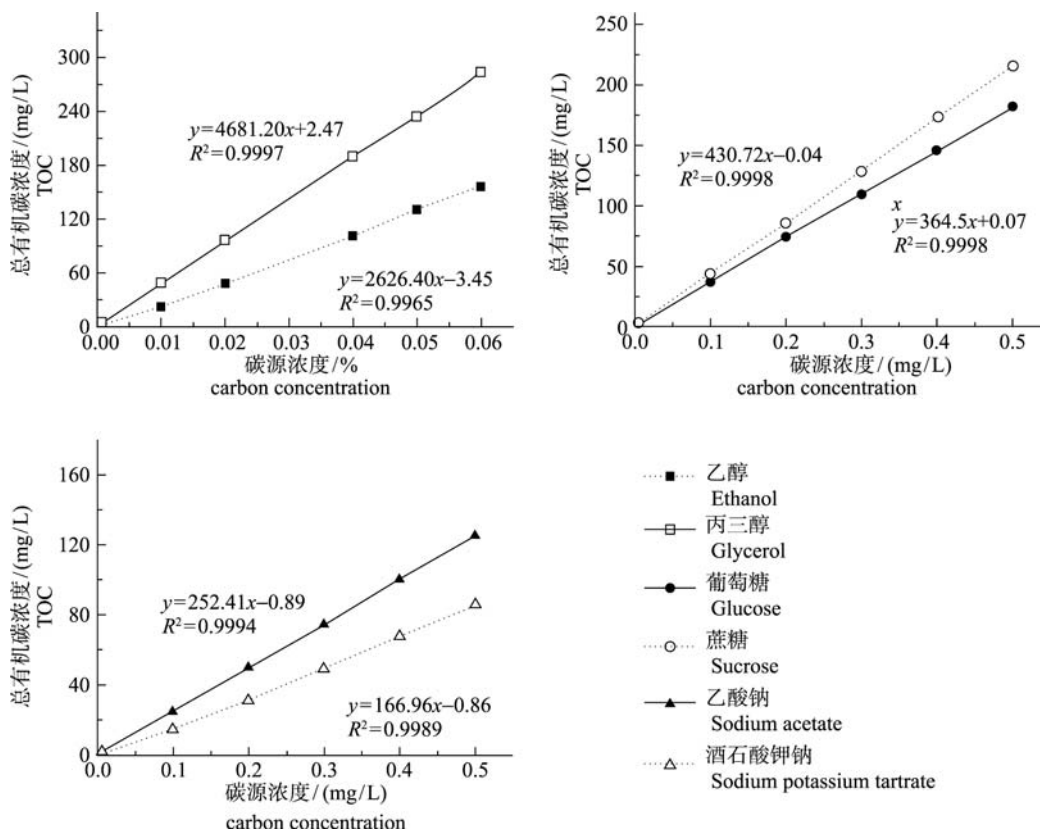


图 1 碳源浓度与总有机碳浓度间的关系
Fig.1 Relation between carbon concentration and total organic carbon concentration

表 2 封闭循环养殖废水水体的主要水质指标
Tab.2 The water characteristics of enclosed recirculating aquaculture wastewater

水质指标 parameters	测量值 value
pH	7.13±0.25
WT/°C	26.21±2.06
DO/(mg/L)	4.65±1.74
TN/(mg/L)	12.08±1.71
TP/(mg/L)	10.56±2.03
COD _{Mn} /(mg/L)	24.57±3.87
NH ₄ ⁺ -N/(mg/L)	4.34±0.51
NO ₃ ⁻ -N/(mg/L)	6.35±0.45
NO ₂ ⁻ -N/(mg/L)	0.45±0.06

注: 试验水体自 2011 年 4 月 26 日至 2011 年 5 月 10 日间断取样, 所有数据结果来自于 3 个独立平行水样的算术平均值。

Notes: The data was collected from 2011-04-26—2011-05-10 with I interruption, All analytical value are reported as an average of three independent measurements.

1.8 数据处理

统计分析等数据处理在 Origin 8.0 和 SPSS1 8.0 软件上进行, 不同处理间的指标值先进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 然后进行 LSD(L) 和 Duncan(D)多重比较。

2 结果

2.1 碳源及 C/N 的初筛

复合菌群在以硝酸钾为唯一氮源和不同碳源及 C/N 下的生长情况如图 2 所示。从图可以看出, 不同碳源下的复合菌群生长都要历经约 6 h 的生长延滞期, 而后进入对数生长期, 在 24 h 时达到生长稳定期。在相同的 C/N 条件下, 相对于醇类和糖类物质, 盐类物质作为碳源时(乙酸钠、酒石酸钾钠), 复合菌群的最大生物量较低。特别是以酒石酸钾钠作为碳源时(C/N 为 20 : 1), 菌体 24 h 时的

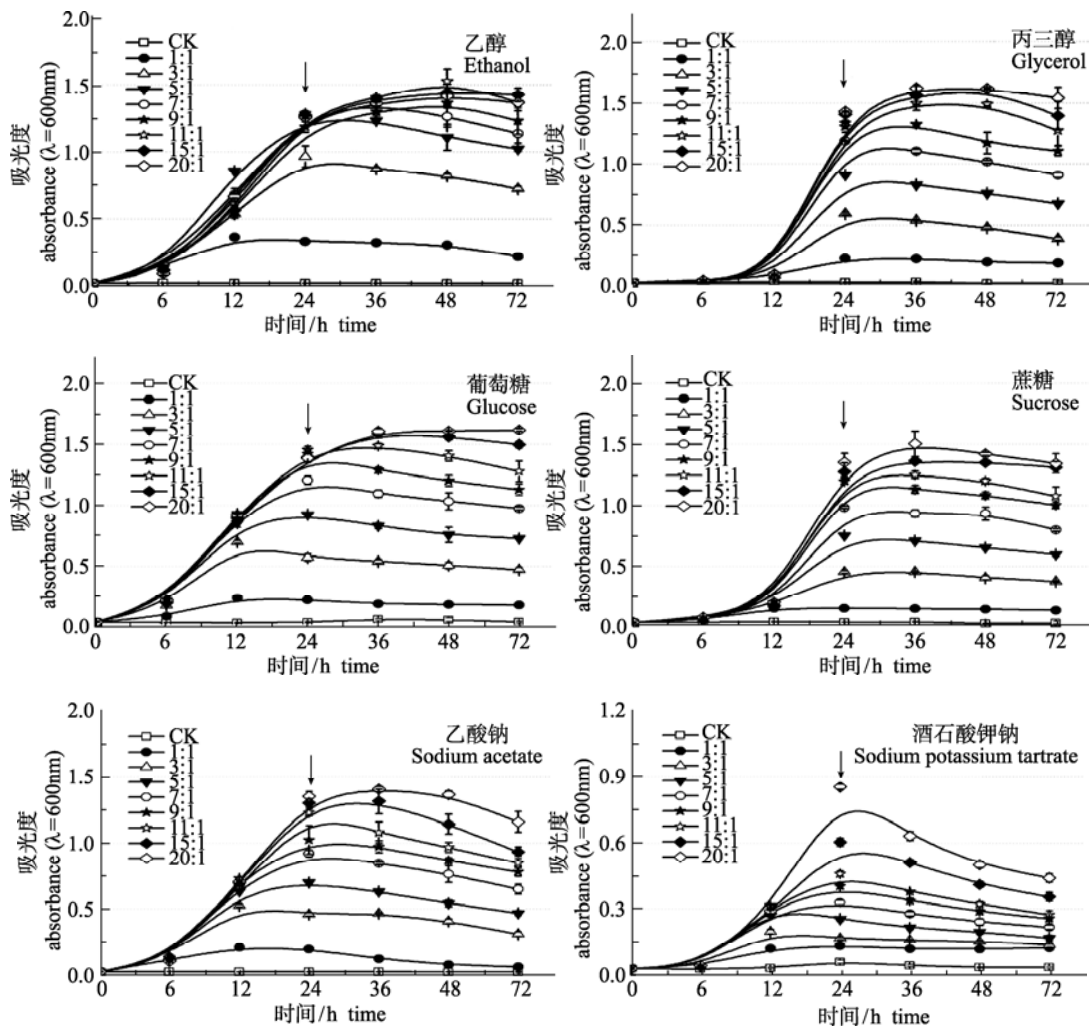


图 2 不同碳源及 C/N 下的菌体生长曲线

Fig.2 Growth of the multiple bacteria under different carbons and C/N

表 3 24 h 内, 不同碳源及 C/N 对复合菌群去除 NO_3^- -N 能力的影响
 Tab. 3 The effect of different carbons and C/N on removal rate of NO_3^- -N in 24 h %

碳氮比 C/N ratio	碳源类型 carbon source					
	乙醇 ethanol	丙三醇 glycerol	葡萄糖 glucose	蔗糖 sucose	乙酸钠 sodium acetate	酒石酸钾钠 sodium potassium tartrate
0 : 1	2.28±4.08	10.65±6.83	1.21±0.95	7.08±2.45	8.28±3.45	6.27±2.11
1 : 1	28.55±1.99	17.35±2.62	7.45±2.15	10.54±0.80	13.29±1.29	5.99±1.32
3 : 1	65.82±6.34 ^a	40.51±1.38 ^a	37.15±3.51 ^a	28.71±3.44	36.06±5.06	22.95±2.14
5 : 1	100.00 ^b	74.52±1.74 ^b	67.86±1.40 ^b	62.35±2.00	52.55±0.87	21.48±0.86
7 : 1	100.00 ^b	100.00 ^c	100.00 ^c	87.62±0.87	59.85±0.87	36.97±3.11
9 : 1	100.00	100.00	100.00	100.00±0.20	71.27±0.80	40.11±2.65
11 : 1	100.00	100.00	100.00	99.78±0.42	95.35±0.20	48.34±0.35
15 : 1	100.00	100.00	100.00	98.07±3.22	100.00	55.54±1.04
20 : 1	100.00	100.00	100.00	100.00±0.64	100.00	59.49±1.98

注: 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 数据结果以“算数平均值 ± 标准差(SD)”表示。

Notes: Letters indicate the differences between groups; results are presented as the mean ± standard deviation (SD).

OD_{600} 值只有 0.9 左右, 而以乙醇作为碳源时(C/N 为 20 : 1), 菌体 24 h 时的 OD_{600} 值高达 1.5。

由图 2 可知, 复合菌群在 24 h 时达到生长稳定期, 故以 24 h 时复合菌群对 NO_3^- -N 的去除率及 NO_2^- -N 的积累量作为筛选条件。表 3 为不同碳源及 C/N 对复合菌群去除 NO_3^- -N 能力的影响。从表 3 可以看出, 复合菌群对 NO_3^- -N 的去除率与 C/N 存在着显著相关关系。随着 C/N 的不断增加, 各处理组的 NO_3^- -N 去除率不断升高。当没有外加碳源时, 各处理组的 NO_3^- -N 去除率可以忽略不计; 当以乙醇为外加碳源且 $\text{C/N} \geq 5 : 1$ 时, 复合菌群对 NO_3^- -N 的去除率高达 100%; 当以酒石酸钾钠为外加碳源且 C/N 为 20 : 1 时, 复合菌群对 NO_3^- -N 的

去除率也只有 59.5%。从表 3 可以看出, 乙醇、丙三醇和葡萄糖为外加碳源时, 即使在较低的 C/N 条件下, 复合菌群也具有较高的 NO_3^- -N 去除率。

表 4 为复合菌群在不同碳源及 C/N 条件下的 NO_2^- -N 积累量, 当以酒石酸钾钠为外加碳源时, NO_2^- -N 的积累量几乎为零; 当以乙醇为外加碳源时, NO_2^- -N 的积累量最高也只有 0.1 mg/L; 而以蔗糖为外加碳源时, NO_2^- -N 的积累量可以达到 12.4 mg/L(表 4)。可见, 当以醇类物质为外加碳源时, 整个试验过程中 NO_2^- -N 积累量比较低。

以 24 h 时复合菌群对模拟废水具有较高的 NO_3^- -N 降解能力, 同时 NO_2^- -N 的积累量较少作为

表 4 24 h 内, 复合菌群在不同碳源及 C/N 条件下的 NO_2^- -N 积累量
 Tab. 4 The accumulation of NO_2^- -N under different carbon sources and C/N ratio in 24 h mg/L

碳氮比 C/N ratio	碳源类型 Carbon source					
	乙醇 ethanol	丙三醇 glycerol	葡萄糖 glucose	蔗糖 sucose	乙酸钠 sodium acetate	酒石酸钾钠 sodium potassium tartrate
0 : 1	0	0	0	0	0	0
1 : 1	0	0.47±0.46	0	3.56±0.14	0	0
3 : 1	0.09±0.02	1.20±0.64	0	12.37±0.40	0	0
5 : 1	0	1.32±0.42	3.68±0.87	11.09±1.00	0.99±0.55	0
7 : 1	0	0	0	6.96±0.61	2.75±0.15	0
9 : 1	0	0	0	0	8.15±0.11	0
11 : 1	0	0	0	0	3.68±0.15	0
15 : 1	0	0	0	0	0	0
20 : 1	0	0	0	0	0	0

注: 数据结果以“算数平均值 ± 标准差(SD)”表示。

Notes: Results are presented as the mean ± standard deviation (SD).

筛选条件, 初步筛选出乙醇、丙三醇和葡萄糖这 3 种碳源。当这 3 种碳源的 C/N 为 7:1 和 9:1 时, 彼此间的 NO₃⁻-N 去除率并无显著差异, 故选取 C/N 为 7:1。由于碳源初筛时用的是只添加了硝酸钾和微量元素的人工模拟废水, 水体成分较简单, 微生物往往在这种简单的环境中生长良好。但考虑到实际养殖废水水体中的氮源、碳源等成分更复杂多变, 所以又选取了 3:1、5:1 这两种 C/N, 以期通过后期的碳源复筛试验从上述 3 种 C/N 中筛选出经济、有效的碳源及 C/N。

2.2 碳源及 C/N 的复筛

碳源及 C/N 对 COD_{Mn} 去除效果的影响 高锰酸盐指数(COD_{Mn})通常作为水体受还原性有机物和无机物污染程度的综合指标。在不同的碳源和 C/N 条件下, 定期测量水体的 COD_{Mn}, 都可以得到相似的降解规律(图 3)。在阶段 I 和阶段 II 前期, 由于各处理组按比例添加碳源后, COD_{Mn} 在短期内升高, 但在第 3 天时, 各处理组的 COD_{Mn} 浓度已显著低于对照组。

碳源及 C/N 对复合菌群脱氮效果的影响 在生物脱氮过程中, 反硝化细菌以碳源作为电子供体, NO_x⁻-N 作为电子受体, 在硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)等一系列酶的催化下将 NO_x⁻-N 还原成氮气。试验以乙醇、丙三醇和葡萄糖为外加碳源, 根据养殖废水中 NO₃⁻-N 的浓度按比例添加相应的碳源量, 考察不同碳源及 C/N 对复合菌群脱氮效果的

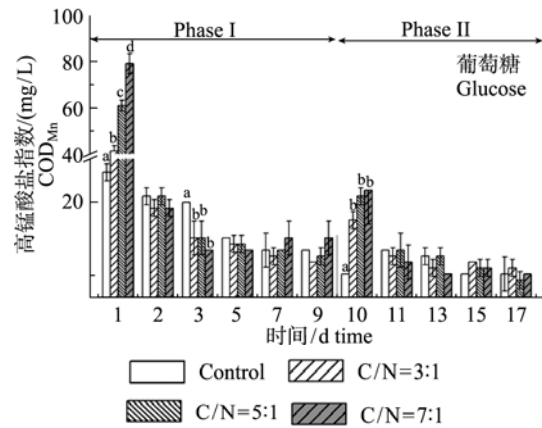


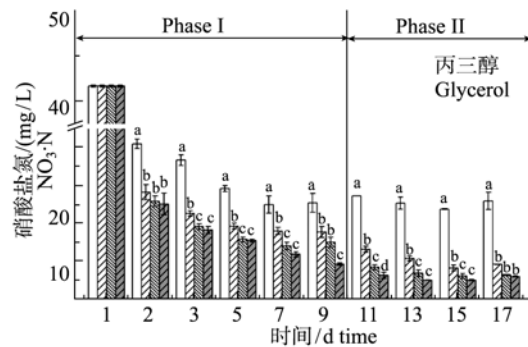
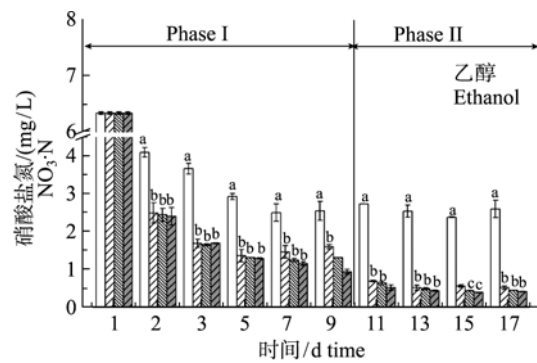
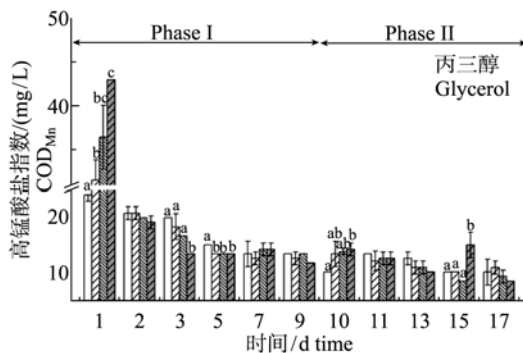
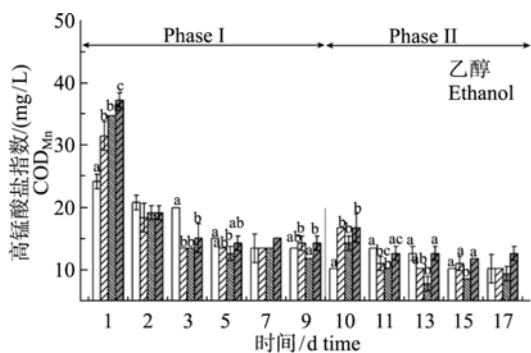
图 3 碳源及 C/N 对 COD_{Mn} 去除效果的影响

竖线表示标准差; 同一采样日内, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 未标字母的各组没有显著差异 ($P > 0.05$)。

Fig.3 The effect of carbons and C/N on removal rate of COD_{Mn}

Bars indicate S.D. Letters indicate the differences between groups within same sampling date. Means not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$), Non-labeled columns mean no difference at the significance level of $P > 0.05$.

影响(图 4)。从图 4 中可以看出, 对照组的 NO₃⁻-N 浓度呈缓慢下降, 试验后期稳定在 2.5 mg/L, 去除率只有 60.0%; 相对地, 处理组的 NO₃⁻-N 浓度呈快速下降, 显著地低于对照组 ($P < 0.05$)。当以乙醇为外加碳源时, 不同 C/N 的 NO₃⁻-N 去除率无显著差异, 试验后期各处理组的 NO₃⁻-N 浓度均稳定在 0.9 mg/L, 去除率达 93.2%左右; 当以丙三醇外加为碳源且 C/N ≥ 5:1 时, C/N 与 NO₃⁻-N 去除率之间无显



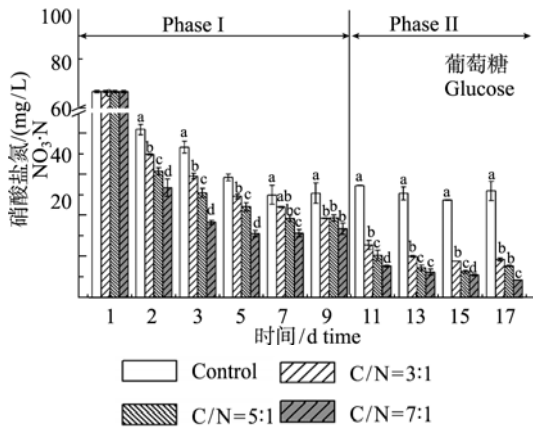


图4 碳源及 C/N 对 NO₃⁻-N 去除效果的影响
竖线表示标准差；同一采样日内，不同字母表示差异显著 (P<0.05)，未标字母的各组没有显著差异(P>0.05)。

Fig.4 The effect of carbons and C/N on removal rate of NO₃⁻-N

Bars indicate S.D. Letters indicate the differences between groups within same sampling date. Means not sharing a common letter are significantly different (P<0.05), Non-labeled columns mean no difference at the significance level of P>0.05.

著相关；当以葡萄糖为外加碳源时，不同 C/N 的 NO₃⁻-N 去除率之间存在显著差异(P<0.05)，C/N 分别为 3 : 1、5 : 1 和 7 : 1 时，相应的 NO₃⁻-N 去除率为 85.4 %、87.8 % 和 93.2 %。可见，NO₃⁻-N 的去除率与 C/N 呈一定的正相关。

碳源及 C/N 的优选 养殖废水中的氮主要以 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 为主(表 2)，由于不同碳源及 C/N 对 NH₄⁺-N 去除率并无显著差异，且各处理组的 NH₄⁺-N 去除率均高达 98.2 % (图 5)，故以 NO₃⁻-N 去除率的高低作为碳源优化的筛选指标。对不同碳源及 C/N 条件下的 NO₃⁻-N 去除率进行差异显著性分析后可以看出，添加碳源的处理组 NO₃⁻-N 去除率均明显地高于对照组(图 5)。当以乙醇为外加碳源时，不同的 C/N 对 NO₃⁻-N 去除率并无显著差异，且 NO₃⁻-N 去除率均高达 92.3 %；当以丙三醇为外加碳源且 C/N ≥ 5 : 1 时，不同的 C/N 对 NO₃⁻-N 去除率并无显著差异；当以葡萄糖为外加碳源时，不同的 C/N 对 NO₃⁻-N 去除率存在显著差异(P<0.05)，C/N 为 7 : 1 时，NO₃⁻-N 去除率为 93.5 %。由此可知，要实现完全脱氮，以葡萄糖为外加碳源时，所需要的 C/N 高于乙醇和丙三醇。综合考虑外加碳源的实用性和经济性等因素，选取乙醇作为复合菌群净化养殖废水的外加碳源，相应的 C/N 为 3 : 1。

3 讨论

在养殖废水处理工艺去除有机物和悬浮物的

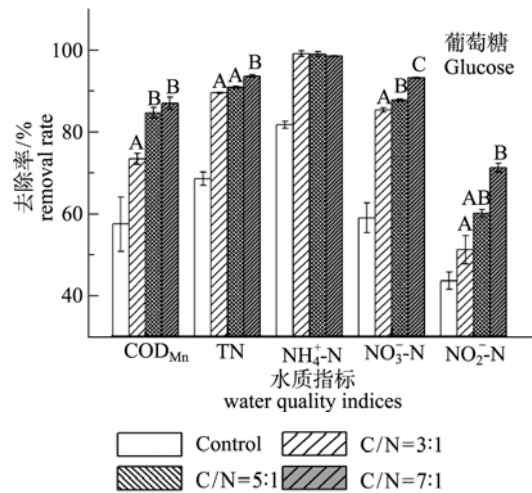
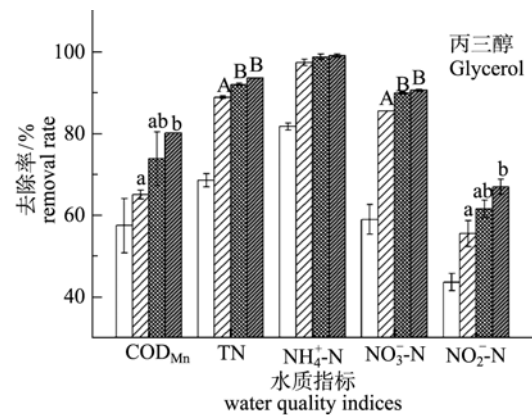
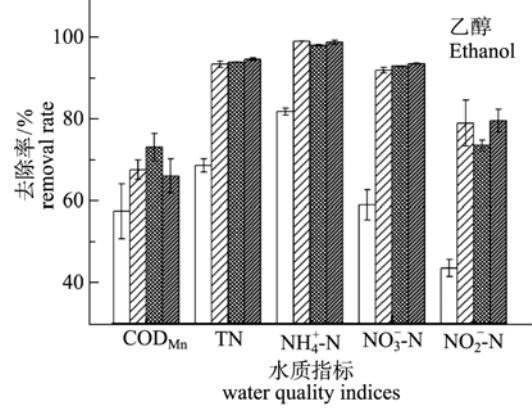


图5 碳源及 C/N 与各水质指标去除率之间的显著性差异分析

竖线表示标准差；不同小写字母表示差异显著(P<0.05)，未标字母的各组没有显著差异(P>0.05)，不同大写字母表示差异极显著(P<0.01)。

Fig.5 Analysis of significant differences between carbons and C/N within removal rate of water quality indices

Bars indicate S.D. Letters indicate the differences between groups.

Means not sharing a lower case letter are significantly different ($P < 0.05$), Non-labeled columns mean no difference at the significance level of $P > 0.05$, Means not sharing a capital letter are highly significantly different ($P < 0.01$).

基础上,且高效经济地去除营养盐成为研究者的攻关目标。反硝化脱氮工艺环节中,碳源不足是目前实际工程中的难题^[22-23]。为解决这个问题,需从机理上研究反硝化过程的限速步骤,进一步完善反硝化动力学;同时应寻找更好的改进工艺和新型外加碳源。

3.1 碳源的分类

按照碳源对反硝化速率的影响,碳源通常可以分为以下 3 种^[23]: ① 易于生物降解的有机物,如甲醇、乙醇、葡萄糖、纤维素等; ② 慢速生物降解的有机物,如蛋白质,淀粉等; ③ 细胞物质,细菌会利用细胞成分进行内源反硝化。一般来说,在反硝化过程中,易被生物降解的有机物是最好的电子供体,不仅其反硝化速率最快,且还能提高生物处理装置的处置能力和效率,提高反硝化过程的稳定性。

3.2 不同碳源对反硝化过程的影响

微生物反硝化过程中代谢碳源所经过的中间过程因碳源的种类而异,导致了代谢产生的 ATP 量不同,转化为细胞物质的量也不同^[23]。对反硝化细菌而言,如果碳源转化为自身细胞物质的百分比越大,那么被氧化提供给硝酸盐和亚硝酸盐电子的百分比也就越少,脱氮效率也就越低。因此,在反硝化过程中应该添加低生长量的碳源。

一般来说,单碳低分子化合物易被微生物利用,且微生物细胞产率比较低,所以在生物脱氮过程中使用的较为频繁。Kessru 等^[24]研究了以乙醇为碳源时,C/N 对生物反硝化反应器去除硝酸盐的影响。在 C/N 为 1.5 和 3.0 条件下, NO_3^- -N 的去除率均接近 100%,而 NO_2^- -N 浓度始终低于 1.0 mg/L,证明了此时的反硝化是非常有效的。本试验结果表明,当以乙醇为电子供体且 $\text{C/N} \geq 5:1$ 时,复合菌群对 NO_3^- -N 的去除率高达 100%,而 NO_2^- -N 的积累量最高也只有 0.1 mg/L(表 4)。

除此之外,糖类物质如葡萄糖及蔗糖,采用其作为碳源,处理效果比较理想且经济。杨新萍等^[25]研究了有机碳源对好氧反硝化细菌脱氮性能的影响,结果发现以葡萄糖作为外加碳源时, NO_3^- -N 去除率明显高于未投加碳源的实验效果,且 NO_3^- -N 去除率随着 C/N 的升高而升高。然而,糖类物质作

为碳源时也有一定的缺陷,由于糖类物质为高碳化合物,微生物生长量相对高于醇类物质,这样在反应体系中,易引起细菌的大量繁殖,影响出水水质。Gómez 等^[26]曾采用蔗糖、甲醇及乙醇作为外加碳源处理受污染的地下水,结果表明以蔗糖作碳源时, NO_2^- -N 的积累量为最显著,达到了 5.0 mg/L;而以甲醇和乙醇为碳源时, NO_3^- -N 去除率接近 100%, NO_2^- -N 的积累量几乎为零。碳源初筛试验结果表明,以醇类物质为碳源时 NO_3^- -N 去除率高于糖类物质的 NO_3^- -N 去除率;尤其是以蔗糖为碳源时, NO_2^- -N 的积累量高达 12.4 mg/L 左右。这可能与以下原因有关: ① 相对于葡萄糖等糖类物质,乙醇、丙三醇等物质的分子量较小且结构较简单,易被微生物分解利用^[27-28]; ② 由于培养基高温灭菌时,会降解部分葡萄糖,产生酸性物质和 5-羟甲基糠醛聚合物,影响菌体对葡萄糖的吸收利用^[29]。

此外,一些天然有机固体底物,如秸秆、芦苇等也逐渐引起人们的重视^[30,31]。由于这些物质主要成分为纤维素且具有较大比表面积,因此可在反硝化过程中作为菌群的生物载体和反硝化碳源。Soares 等^[32]以麦秆为填料制作了上流式厌氧反应器处理受硝酸盐污染的饮用水。在试验开始的一周内,反硝化速率达到最大值 0.1 mol/(L·d),硝酸盐去除率达到 73.5%,随后效率有所下降,新鲜麦秆的加入可以提高反硝化速率。Ovez 等^[31]利用序批式厌氧生物膜反应器,比较了江篱 (*Gracilaria verrucosa*)、萃取的甘草根和芦苇分别作为碳源的情况。结果表明,因其蛋白质含量高,比表面积大,具有最好的反硝化脱氮效果。

3.3 外加碳源对水体有机物含量的影响

从污水生物处理的脱氮工艺来看,有机物来源主要分为系统碳源和外加碳源两大类^[23]。系统碳源是指污水处理系统本身的碳源,主要以一些颗粒碳性的慢速降解有机物为主;外加碳源的 TOC 含量很高,如 0.1% 的乙醇,其 TOC 含量高达 260.8 mg/L(图 1)。所以,外加碳源带来的水体有机物含量快速升高会导致水质恶化,DO 含量下降,影响鱼类的生长繁殖。

由于经人工挂膜后的载体表面生物量巨大(图 6),可以吸附并贮存碳源,生物膜上细菌分泌出的活性酶可以将微生物体内的有机碳水解,供给

膜内部缺氧条件下的生物反硝化脱氮。而且,由于投加的是易生物降解的有机碳源,短期内引起的水体 COD_{Mn} 浓度升高,可在复合菌群的作用下被迅速降低(图 3)。从图 3 可以看出,当以葡萄糖为碳源时,2 d 内 COD_{Mn} 从 80.2 mg/L 快速降至 13.6 mg/L,显著低于对照组(20.2 mg/L)。

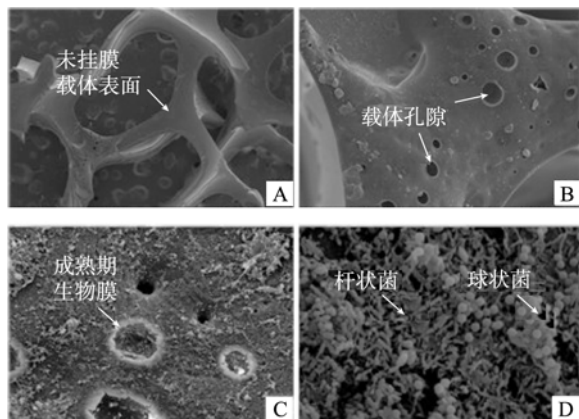
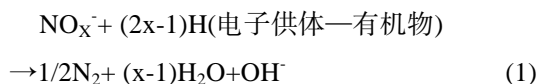


图 6 挂膜期间载体表面的生物膜扫描电镜
Fig.6 SEM photos of carrier surface in the process of training bio-film

3.4 外加碳源条件下的 pH 值变化

生物脱氮过程中,养殖废水中的 NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 在无氧或低氧条件下被微生物还原为氮气,该过程可以用下列反应式表示:



由(1)式可知,反硝化过程中会产生一定的碱度,当还原 1.0 g NO₃⁻-N 时,会产生相当于 3.6 g CaCO₃ 的碱度,可见脱氮过程中伴随着明显的 pH 值变化^[33]。试验过程中考察了以乙醇为碳源时,在不同 C/N 条件下 pH 值变化规律(图 7)。随着试验的进行,水体

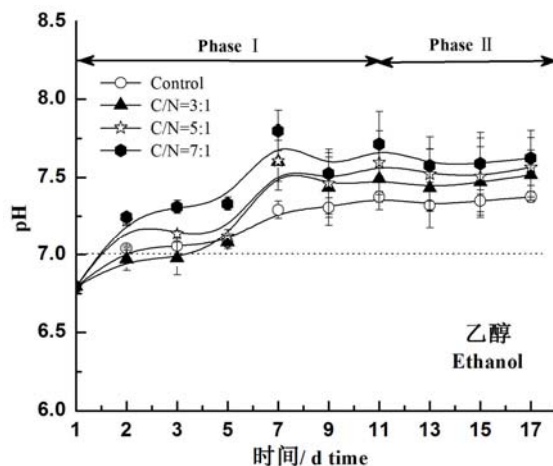


图 7 在以乙醇为碳源、不同 C/N 下 pH 值的变化
Fig.7 The variation of pH under ethanol as carbon source with different C/N ratios

的 pH 值随着 C/N 的升高而逐渐升高,试验末期, pH 值维持在 7.5 左右。可见,生物脱氮处理后的养殖废水适宜淡水鱼类的生长(适宜 pH 值 7.0~8.5)。

4 结论

本试验研究了乙醇、丙三醇、葡萄糖、蔗糖、乙酸钠和酒石酸钾钠 6 种碳源及不同 C/N 对复合菌群净化循环养殖废水效果的影响。试验结果表明,当以糖类物质为外加碳源时,试验过程中有明显的 NO₂⁻-N 积累现象;当以乙醇为外加碳源且 C/N 为 3 : 1 时,复合菌群对 TN、NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 去除率分别高达 93.3%、98.9% 和 91.8%,均显著地高于对照组(P<0.05);此外,外加碳源还能改善水体 pH 值,实验末期处理组水体 pH 值维持在 7.5 左右。可见,适宜的外加碳源及 C/N 能显著地提高整个循环养殖废水的水质处理效果。

参考文献:

- [1] 钱伟, 陆开宏, 郑忠明, 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): 104-115.
- [2] Ying F L, Shun R J, Zhen W W, et al. Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands [J]. Environmental Pollution, 2002, 119: 413-420.
- [3] Aslan S, Turkman A. Nitrate and pesticides removal from contaminated water using bionitrification reactor [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 882-886.
- [4] 泮进明, 应义斌. 营养液膜技术栽培牧草净化循环流水产养殖废水的试验[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 695-699.

- [5] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 等. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(6): 968-972.
- [6] Fernández-Nava Y, Marañón E, Soons J, *et al.* Denitrification of high nitrate concentration wastewater using alternative carbon sources [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 173:682-688.
- [7] Da H W, Gong Y W, Min N, *et al.* Effects of nitrogen source and carbon/nitrogen ratio on batch fermentation of glutathione by *Candida utilis* [J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2010, 27(2):551-559.
- [8] 陈爱玲, 李秋芬, 张立通. 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.
- [9] Hui Z Z. Influence of pH and C/N ratio on poly (vinyl alcohol) biodegradation in mixed bacterial culture [J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2009, 17:286-290.
- [10] 国家环境保护局. 中华人民共和国国家标准 GB11607-89, 渔业水质标准[S]. 2009.
- [11] 彭自然, 臧维玲, 高杨, 等. 氨和亚硝酸盐对凡纳滨对虾幼虾的毒性影响[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(3): 274-278.
- [12] 乔顺风. 水体氨氮转化形式与调控利用的研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(12): 44-47.
- [13] 郑宗林, 叶金明, 刘波. 碳源对反硝化聚磷菌磷酸盐代谢的影响[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1902-1907.
- [14] Matsumoto S, Terada A, Tsuneda S. Modeling of membrane aerated biofilm: Effects of C/N ratio, biofilm thickness and surface loading of oxygen on feasibility of simultaneous nitrification and denitrification [J]. *Biochemical Engineering*, 2007, 13: 1016-1026.
- [15] 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, 2011: 9-21.
- [16] 孟智奇. 长三角地区饮用水源污染水体的微生物修复研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010: 26-45.
- [17] Meng Z Q, Zhao Y, Lv Z M. Development of an advanced biological treatment system using bioaugmentation technology for the treatment of eutrophic drinking water resources [J]. *Clean-Soil Air Water*, 2009, 37(12): 970-981.
- [18] 张成林, 倪琦, 徐皓. 导流式移动床生物膜反应器流速选择及流态分析[J]. 水产学报, 2011, 35(2): 283-290.
- [19] 战培荣, 刘伟, 卢玲. 净化育苗循环水生物流化床特性的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(4): 328-333.
- [20] 符波, 廖潇逸, 丁丽丽, 等. 环境扫描电镜对废水生物样品形态结构的表征研究[J]. 中国环境科学, 2009, 30(1): 93-98.
- [21] 国家环境保护局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 1998.
- [22] Elefsiniotis P, Li D. The effect of temperature and carbon source on denitrification using volatile fatty acids [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 28: 148-155.
- [23] 徐亚同. 不同碳源对生物反硝化的影响[J]. 环境科学, 1994, 15(2): 29-44.
- [24] Kesseru P, Kiss I, Bihari Z, *et al.* Biological denitrification in a continuous-flow pilot bioreactor containing immobilized *Pseudomonas butanovora* cells [J]. *Biore-source Technology*, 2003, 87: 75-80.
- [25] 杨新萍, 钟磊, 周立祥. 有机碳源及 DO 对好氧反硝化细菌 AD6 脱氮性能的影响[J]. 环境科学, 2010, 31(6): 1633-1639.
- [26] Gómez M A, González-López J, Hontoria-García E. Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2000, 80:69-80.
- [27] 蔡碧婧, 谢丽, 杨殿海, 等. 反硝化脱氮工艺补充碳源选择与优化研究进展[J]. 净水技术, 2007, 26(6): 37-40.
- [28] 张燕, 陈余道, 渠光华. 乙醇对地下水中硝酸盐去除作用的研究[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(12): 72-76.
- [29] 张广斌, 张世晓. 葡萄糖注射液不同灭菌条件下 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 实用医药杂志, 2007, 24(9): 1076-1081.
- [30] 曹文平, 张永明, 李亚峰, 等. 竹丝填充床对高有机负荷及低 C/N 水质的脱氮特性[J]. 中国环境科学, 2010, 30(8): 1067-1072.
- [31] Ovez B. Batch biological denitrification using *Arundo donax*, *Glycyrrhiza glabra*, and *Gracilaria verrucosa* as carbon source [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 1289-1295.
- [32] Soares M, Aharon A. Wheat straw as substrate for water denitrification[J]. *Water Research*, 1998, 32: 3790-3794.
- [33] 马娟, 彭永臻, 王丽, 等. 温度对反硝化过程的影响以及 pH 值变化规律[J]. 中国环境科学, 2008, 28(11): 1004-1008.

Effects of carbon source and C/N ratio on treatment of aquaculture wastewater by multiple microorganisms

QIAN Wei, LU Kai-hong *, ZHENG Zhong-ming, WU Hua-wen, SHAO Lu-lu, CHEN Hui-huang

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To address the problem of insufficient carbon source in the biological denitrification of aquaculture wastewater, and improve the efficiency of biological denitrification, this study tested the effects of six carbon sources and different C/N ratios, using the removal rate of ammonium nitrogen and accumulation rate of nitrite as indicators. Preliminary screening results of carbon sources showed that when glucose and glycerol were used as the carbon sources, there was clear nitrite accumulation, which was up to 12.4 mg/L. When alcohols were used as the carbon source, the highest accumulation of nitrite was only 1.3 mg/L. Rescreening results of carbon sources showed that different carbon sources and C/N ratios did not significantly impact the removal rate of ammonium nitrogen, which was up to 98.2 % in the treatment groups, significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). When ethanol was used as the carbon source and C/N ratio was 3:1, the removal rate of total nitrogen, ammonia nitrogen and nitrate were especially high, up to 93.3 %, 98.9 % and 91.8 %, respectively, significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Considering the practicality and economy of extra carbon sources, choosing ethanol as additional carbon of purifying aquaculture wastewater by multiple microorganisms, and relative C/N ratio was 3:1. Although the extra carbon could substantially increase the concentration of COD_{Mn} , but it may be rapidly degraded by multiple microorganisms within a short time. In addition, the extra carbon could improve the stability of pH value of aquaculture wastewater to be kept between 7.2-7.8. The results of the present study suggest that the extra carbon source could significantly improve water quality and biological nitrogen removal efficiency during wastewater purification process in recirculating aquaculture systems.

Key words: aquaculture wastewater; denitrification; carbon source; C/N ratio

Corresponding author: LU Kai-hong. E-mail: lukaihong@nbu.edu.cn