

对虾养殖池环境修复作用菌固定化的研究

邹玉霞^{1,2,3}, 辛福言¹, 李秋芬¹, 曲克明¹, 袁有宪¹

(1. 中国水产科学院黄海水产研究所海洋食品安全与环境控制重点开放实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 为了将对虾养殖池环境修复作用菌 Lt 7 511 投放到虾池底部降解有机污染物, 并且不造成二次污染, 以沸石作为固定化载体, 研究了影响固定化的因素、固定化菌降解有机物的性质及保藏方法。结果表明, 沸石在 500 ℃ 灼烧 2 h 可除去绝大部分吸附水分, 增大表面积; 固定化过程中沸石粒度、菌液的浓度及体积对沸石吸附作用菌的能力都有影响, 每 kg 60 目沸石可吸附 0.46 g 菌体 (干质量); 沸石固定化菌对饵料浸出液的降解效果明显高于非固定化菌; 真空保藏的固定化菌的存活情况明显优于保藏在空气中的固定化菌。

关键词: 对虾养殖池环境; 生物修复; 沸石; 固定化

中图分类号: S968.22

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2004)08-0005-05

对虾养殖是我国水产业的支柱产业之一。受养殖方式所限, 对虾的残饵、粪便沉积在池底, 形成有机污染, 深度可达 30~40 cm, 并随池龄而增加^[1], 从而造成养殖环境恶化, 病害蔓延, 生产力水平低下。因此寻求一种行之有效的可操作的虾池环境修复技术迫在眉睫。

生物修复是利用微生物消除环境中的有机污染物, 具有操作简单, 效果显著等优点, 已得到广泛的应用^[2], 但目前仅仅停留在游离细胞阶段。直接使用微生物游离细胞的弊端很多, 如细胞易被水流冲走、利用率低下、由于培养基的带入而引起二次污染等^[3]。并且在养殖池塘中, 有机污染物绝大部分沉积在底部, 因此需要利用合适的固定化载体, 使作用菌穿过对虾养殖池的水体到达池底并生长繁殖, 达到降解池底有机污染物的目的。

天然沸石是一种多孔粘土矿物, 它可以将细菌吸附在表面或内部孔隙中^[4], 而且能迅速吸收 H₂S、NH₃、CO₂ 等有害气体及水中的有机腐化物, 净化水质^[5], 并且价格低廉, 已经在水产养殖业中广泛使用。作者首次将沸石作为固定化载体应用于对虾养殖池的生物修复, 并优化了固定化工艺, 为大规模的生产应用提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

Lt 7 511, 本实验室筛选^[6]。

1.2 培养基

2216 E 培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 磷酸铁 0.01 g, 海水补至 1 L, pH 7.6, 固体培养基加入 2% 琼脂, 121 ℃ 高压灭菌 20 min。

1.3 饵料浸泡液

取 40 g 海马牌配合饵料, 加入 1 L 海水, 浸泡 24 h 后滤纸过滤, 将滤液 115℃ 灭菌 30 min, 在无菌室用无菌滤纸过滤后待用。

1.4 菌液制备

将作用菌接种于液体 2216 E 培养基, 28℃ 200 r/min 振荡过夜。取 200 μL 涂布于 2 216 E 平板, 28℃ 倒置培养 20 h 后, 每个平板加 3 mL 无菌海水, 将培养好的菌体用无菌刮刀刮下, 4℃ 4 000 r/min 离心 10 min,

收稿日期: 2003-04-08; 修回日期: 2003-08-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (819-02-07); 国家自然科学基金 (39670581); 国家九五攻关项目子专题 (96-922-02-02-02)。

作者简介: 邹玉霞 (1973-), 女, 博士研究生, 主要从事海洋微生物学的研究, E-mail: zouyuxia@ms.qdio.ac.cn

弃上清,取一部分沉淀 100℃ 烘干至恒质量,计算菌体含水量;剩余菌体用无菌海水悬浮并稀释,菌体干质量/海水的最终浓度为 0.6 g/L。

1.5 沸石的活化

取沸石 50 g(山东潍坊产,20~80 目),用马弗炉在 500℃ 下灼烧 2 h,冷却后称质量,放在干燥器中待用,并计算沸石失重百分比。实验设置 3 个平行样。

1.6 作用菌的沸石固定化

将 1.4 制备的菌液取出少许放入无菌三角瓶中作为对照,剩下的加入等质量的活化好的沸石,28℃ 150 r/min 振荡 0.5 h,静置 2 h 后取出沸石,在无菌风下吹干。实验设置 3 个平行样。

1.7 沸石吸附作用菌数目的计算

分别将对照和 1.6 中取出沸石后剩余的菌液系列稀释,涂布 2 216 E 平板,28℃ 倒置培养后计数,计算对照和剩余菌液中作用菌的浓度。沸石吸附的菌数 = (对照菌体浓度 × 最初菌液体积) - (剩余菌液菌体浓度 × 剩余菌液体积)。

1.8 固定化后降解性能的测定

将固定化菌和未固定化菌(菌量与固定化的相当)分别接种于灭菌的饵料浸泡液中,28℃ 200 r/min 振荡培养,每隔 24 h 取样,12 000 r/min 离心 2 min 后测定上清的 COD 含量。COD 去除率 = (起始 COD 值 - 作用菌作用后的 COD 值) / 起始 COD 值。测试 COD 时设置 3 个平行样。

1.9 固定化沸石的保存与活性检测

将未失水的固定化沸石(简称湿沸石),无菌风下失水 50% 的固定化沸石(简称半干沸石),无菌风下失水 100% 的固定化沸石(简称干沸石),分别抽真空包装,室温保藏。每隔半个月取出,洒在 2 216 E 平板上,28℃ 培养,通过比较菌落个数比较不同保藏方法的优劣。

1.10 COD 测定方法

按照国家海洋局规定的碱性高锰酸钾氧化法^[7]测定。

1.11 固定化工艺

首先筛取 60 目的沸石,水洗去粉尘,在 500℃ 灼烧 2 h,冷却后用作固定化载体;培养修复作用菌 Lt 7 511 并收集菌体,用无菌海水重悬浮,稀释至 0.6 g/L;向菌悬液中加入等质量的处理后的沸石,28℃

150 r/min 振荡 0.5 h 后静置 2 h,倒入有孔隙的编织袋中,然后将编织袋悬挂在一大容器上,室温过夜,使水分渗漏出来;将制备好的湿沸石固定化菌放入塑料袋中,抽真空,封口,室温保存。

2 实验结果

2.1 沸石活化温度的选择

用马弗炉分别在 100~600℃ 灼烧沸石 2 h,冷却后称质量,计算沸石失重百分比。用 SPSS 软件(10.0 版本)单因素方差分析结果表明,500℃ 和 600℃ 沸石的失重差异不显著($P > 0.05$)。因此选用 500℃ 灼烧沸石,使其失去绝大部分水分,增加其多孔结构的表面积,提高对菌的吸附作用。

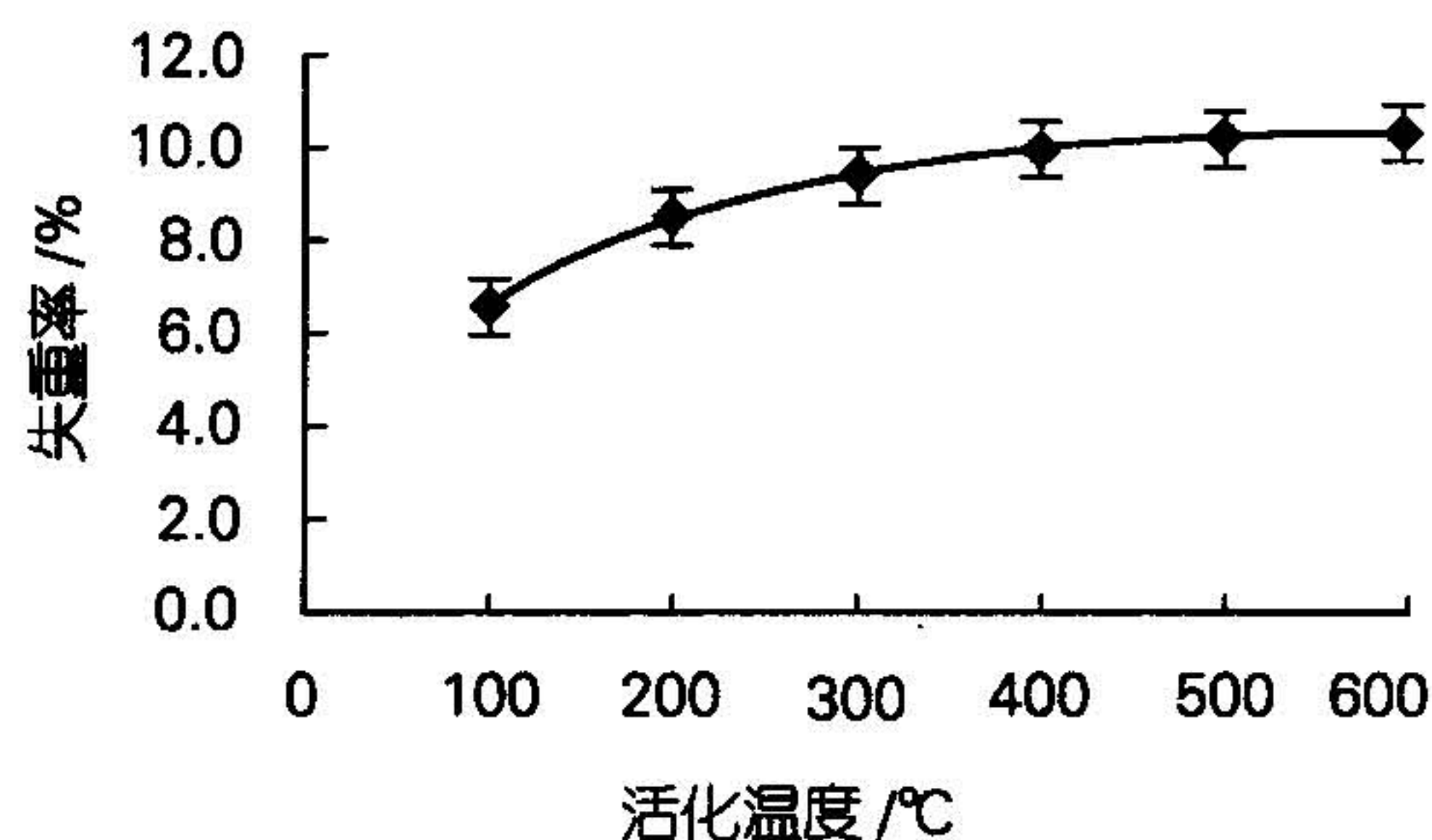


图 1 沸石活化温度对失重率的影响

Fig. 1 Effect of activating temperature of zeolite on weight lessness rates

2.2 沸石粒径对沸石吸附能力的影响

将不同直径、相同质量(30 g)的沸石放入相同体积(30 mL)、相同浓度的菌液中进行吸附,结果如图 2 所示,随着沸石粒径的减小,表面积增大,吸附率也随之增加。用 SPSS 软件(10.0 版本)单因素方差分析结果表明,随着粒径的减少,吸附的菌数显著增加($P < 0.05$)。但沸石粒径越小,球磨及筛洗的时候越费时费力,因此在实际应用中选择 60 目的沸石作为固定化载体。

2.3 菌液体积对沸石吸附能力的影响

将相同质量的沸石(30 g)加入到不同体积的菌液(菌浓度相同)中,菌体吸附率随着菌液体积的减少而增加,但体积太小时,沸石不能均匀摇动起来,从而使菌无法充分均匀地吸附到沸石的多孔结构中。实验结果(图 3)表明,菌液的体积为 30 mL 时即菌液的

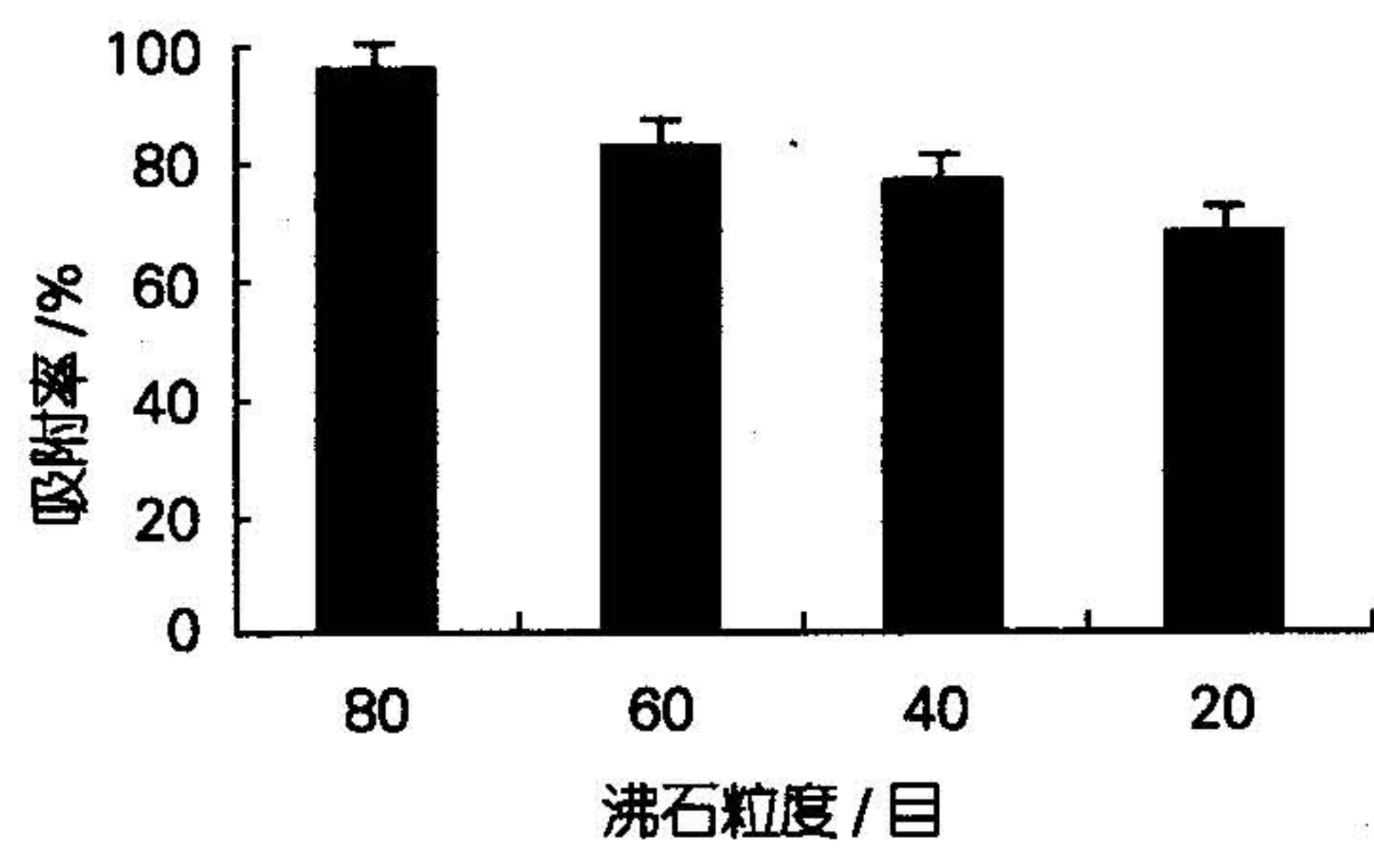


图2 沸石粒径对沸石吸附能力的影响

Fig. 2 The effect of zeolite granule size on adsorption capacity

体积和沸石的重量比为 1:1 时吸附率最高, 达 90%。

2.4 菌液浓度对沸石吸附能力的影响

从表 1 可以看出, 相同质量的沸石在相同体积的菌液中, 起始浓度越高, 沸石吸附的菌数越多, 用 SPSS 软件 (10.0 版本) 单因素方差分析结果表明, 不同起始浓度吸附菌数差异非常显著 ($P<0.01$)。因此, 要想增加单位质量沸石吸附的菌量, 可以提高菌液的起始浓度。

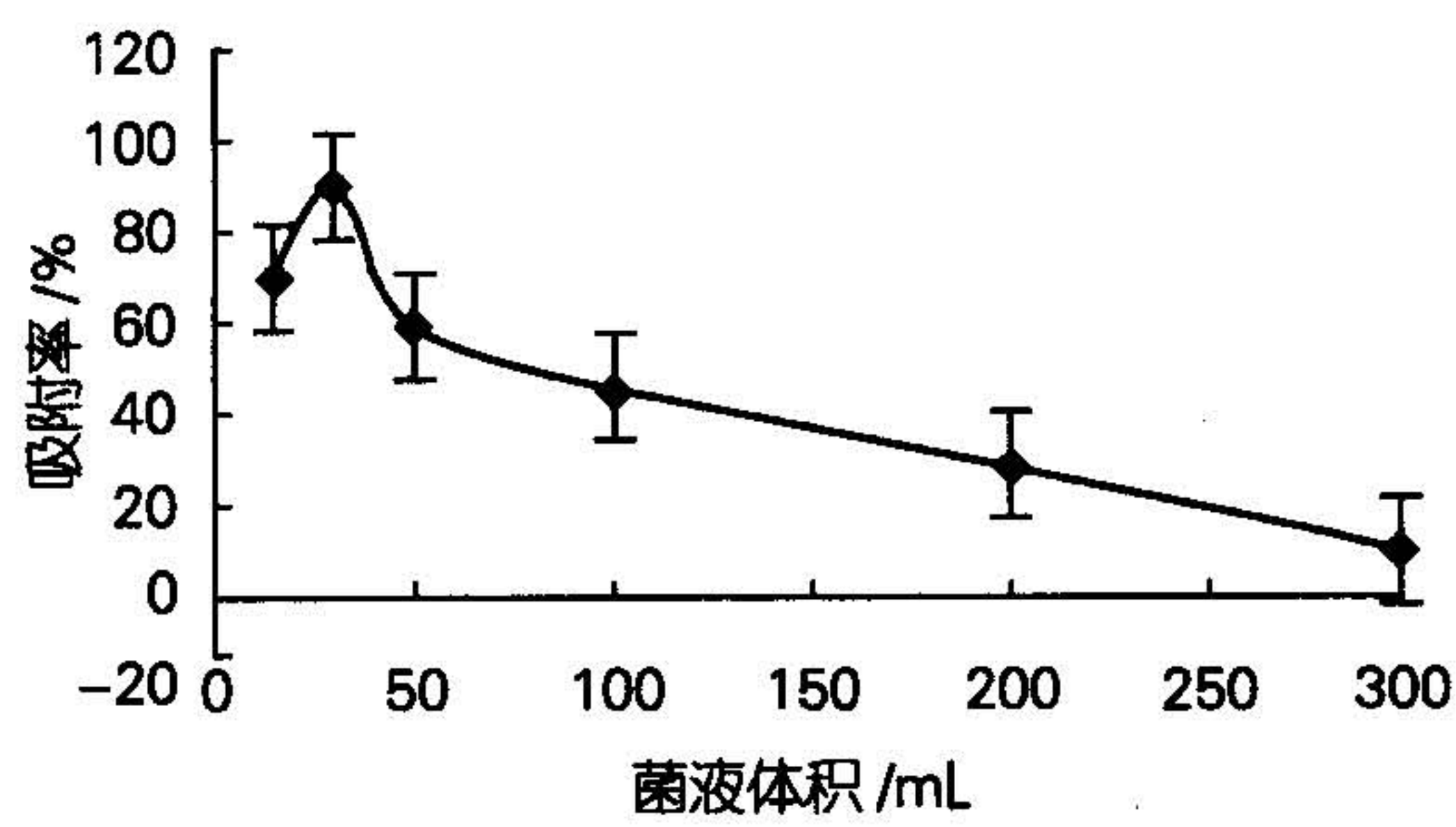


图3 菌液体积对沸石吸附能力的影响

Fig. 3 The effect of volume of bacteria suspension on adsorption capacity

表1 菌液浓度对沸石吸附能力的影响

Tab.1 The effect of concentration of bacteria suspension on adsorption capacity

起始浓度 ($\times 10^7/\text{mL}$)	起始总菌数 ($\times 10^8$)	吸附菌数 ($\times 10^8$)
1.04	3.12	2.35
3.51	10.53	8.36
14.77	44.31	33.73
87.67	263.01	184.35
415.00	1245.00	944.70

2.5 沸石固定化作用菌的降解性能

从图 4 可明显看出固定化菌的降解性能要好于非固定化菌 ($P<0.01$), 其原因可能是沸石对 NH_3 、 H_2S 等有害气体有吸附作用, 减少了培养基中有害气体的浓度, 另外由于沸石有增氧的作用, 也有利于菌体的生长及对有机物的利用和分解。同时, 从图 4 中也可以看出, 在接种后第 1 天, COD 去除率达到较高的水平, 然后有所下降, 第 3 天后 COD 去除率又开始上升。分析可能是降解菌先是很快速将培养基中的可溶性有机物降解, 然后逐渐分解不可溶的有机物小颗粒, 使培养基中的可溶性有机物增多, 且其溶解的速率大于分解的速率, 导致 COD 去除率下降, 当不可溶有机物颗粒分解完毕后, 菌体的继续生长繁殖使可溶性有机物不断减少, 因此 COD 去除率不断增加。

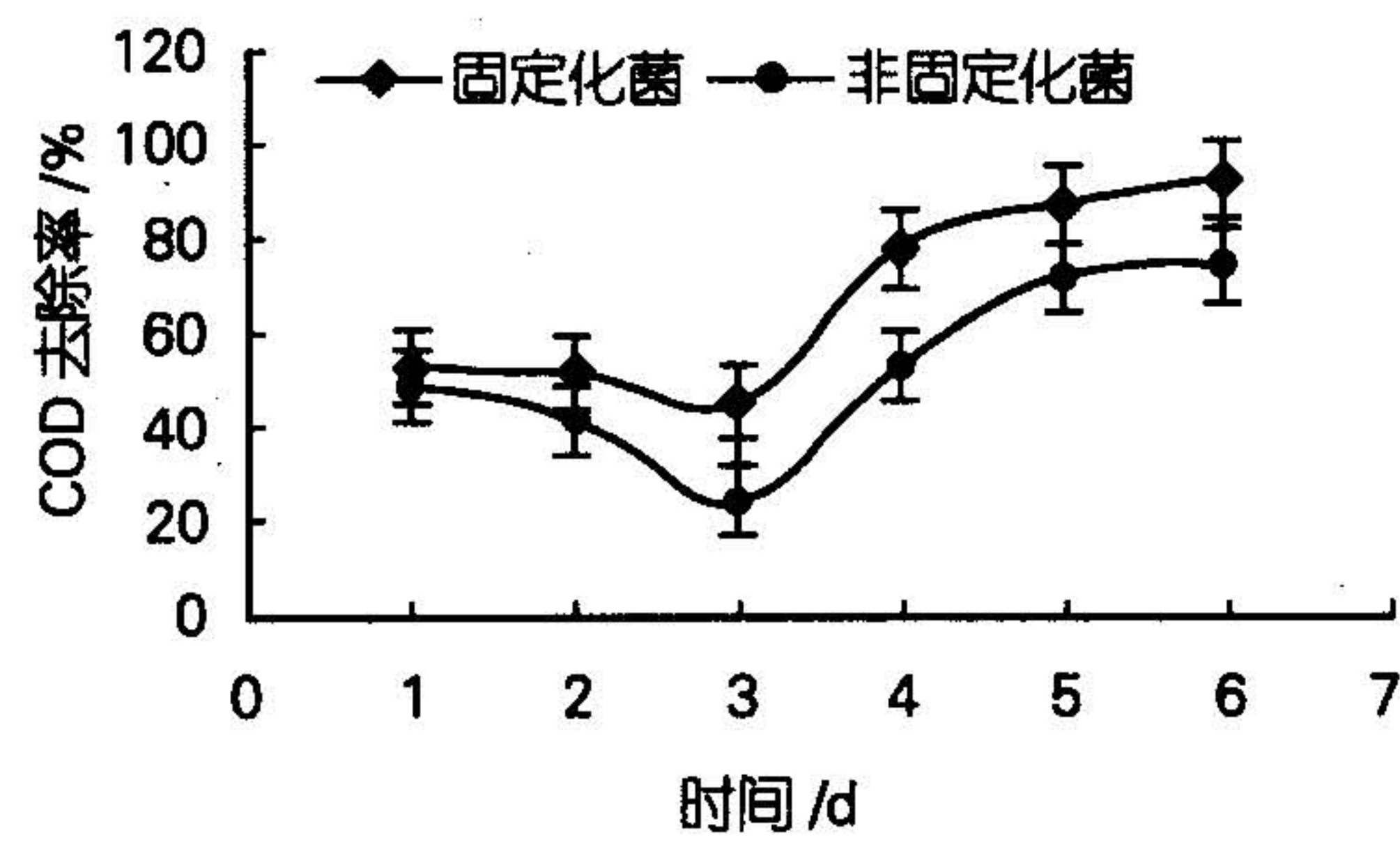


图4 固定化菌的降解性能

Fig. 4 The degradation ability of immobilized bacteria

2.6 保藏方法对固定化菌的存活情况的影响

表 2 是真空保藏固定化菌与放置于空气中的固定化菌在不同时间的存活情况。结果表明, 无论是湿沸石, 半干沸石, 还是干沸石, 在真空中保藏均比在空气中保藏菌的存活率高。湿沸石的保藏效果优于半干沸石和干沸石, 而半干沸石和干沸石之间的差别不大。因此真空保藏固定化菌是一种行之有效的方法。

3 讨论

作者曾尝试过利用扇贝壳粉和牡蛎壳粉作为固定化载体, 但菌体的吸附率和 COD 的去除率均不如沸石的效果好 (数据未在本文列出), 而且大量的扇贝壳粉和牡蛎壳粉也不如沸石容易获得。沸石价格低廉, 易于获得, 现在已经被越来越多地用于固定化工艺中。吴国庆等^[8]用沸石固定紫色非硫光合细菌,

朱俊晨^[9]用沸石来固定黑曲霉,王怡平^[10]等在固定光合细菌时加入沸石增加沉降性,龚加顺等^[11]利用沸石固定单宁酶,都取得了很好的效果。沸石是一类含水的架状结构铝酸盐矿物,其化学成分是由SiO₂、Al₂O₃、H₂O和碱或碱土金属离子四部分构成。H₂O是沸石的主要成分之一,含量一般在10%左右,但水不参加沸石的骨架组成,仅吸附在沸石空洞和孔道的表面,沸石受热后其中的水就释放出来,使其空洞和孔道增大,从而增大其表面积,以利于菌的吸附。用沸石吸附微生物细胞,投入到虾池中,沸石会很快沉到虾池底

部,防止微生物因分散到整个水域中而导致菌体浓度下降。由于微生物只是附着在沸石上,因此很容易离开沸石而扩散到周围底质中,并生长繁殖成为优势菌株,从而有效地降解整个虾池底部的有机污染物,为对虾提供良好的栖息环境,达到提高对虾成活率及产量的目的。应用与推广^[12]结果表明,利用本工艺固定化的细菌修复虾池沉积环境效果显著。目前,中国有1.3×10⁹ m² 虾池,大部分池底的有机污染相当严重,因此本工艺具有广阔的推广应用前景,具有很大的市场开发潜力。

表2 保藏方法对固定化菌的存活情况的影响

Tab.2 The effect of different storage methods for immobilized bacteria on survival rate

时间 (d)	湿沸石		半干沸石		干沸石	
	真空	空气	真空	空气	真空	空气
15	+++++	++++	+++++	+++	+++++	+++
30	+++++	+++	+++++	++	+++++	++
45	+++++	++	++++	-	++++	+
60	+++++	+	++++	-	++++	-
75	+++++	-	++++	-	++++	-
90	+++++	-	++++	-	++++	-
120	+++++	-	++++	-	++++	-
180	+++++	-	+++	-	+++	-
360	++++	-	++	-	++	-

注:“++++”、“+++”、“++”、“+”代表存活菌数越来越少,“-”代表无存活菌。

参考文献:

[1] 袁有宪,幸福言,孙耀. 对虾养殖池沉积环境中TOC、TP、TN和pH及质量评价模型[J]. 水产学报,2000, 24(3): 247-253.

[2] 李秋芬,袁有宪. 海水养殖环境生物修复技术研究展望[J]. 中国水产科学,2000, 7(3): 90-92.

[3] 程书培. 环境生物技术[M]. 南京:南京大学出版社,1994. 111-135.

[4] Milan Z, de Las Pozas C, Cruz M, et al. The removal of bacteria by modified natural zeolites[J]. J Environ Sci Health Part A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2001, 36(6): 1073-1087.

[5] 尹振鳌,陈胜林. 虾池水质改良八法[J]. 科学养鱼. 2003(4): 21-22.

[6] 李秋芬,曲克明,幸福言. 虾池环境生物修复作用的分离与筛选 [J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(3): 281-285.

[7] 国家海洋局. 海洋环境监测规范[M]. 北京:海洋出版社,1998. 142-143.

[8] 吴国庆,张琳,牛志卿. 固定化PSB细胞技术研究及应用[J],环境科学研究,1994, 7(6): 51-55.

[9] 朱俊晨. 产糖化酶黑曲霉固定化方法比较的研究[J],工业微生物,2001, 30(6): 38-41.

[10] 王怡平,荚荣,梅贤君. 固定化光合细菌在中华绒螯蟹人工育苗中的应用[J]. 水产学报,1999, 23(2): 156-161.

[11] 龚加顺,刘勤晋,肖琳,等. 沸石固定化单宁酶及其在茶饮料澄清中的应用 [J]. 中国食品工业. 1999(12): 40-41.

[12] 幸福言,李秋芬,邹玉霞. 虾池环境修复作用菌的模拟应用[J]. 应用与环境生物学报,2002, 8(1): 75-77.

(下转第75页)

(上接第 8 页)

Study of immobilization of functional bacteria for bioremediation of shrimp culture environment

ZOU Yu-xia^{1,2,3}, XIN Fu-yan¹, LI Qiu-fen¹, QU Ke-ming¹, YUAN You-xian¹

(1. Key Lab of Marine Food Safety and Pollution Control, Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Qingdao 266071, China; 2. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. The Graduate School Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Apr., 8, 2003

Key words: Shrimp culture environment; bioremediation; zeolite; immobilization

Abstract: In order to degrade the organic pollution in the bottom of shrimp pond by functional bacteria Lt7511 without polluting the pond again, zeolite was used to immobilize the bacteria. In this paper, the factors influencing the immobilization, the absorption characteristics and the storage method of immobilized bacteria were studied. The results showed that most water contained in the zeolite was removed by heating at 500°C for two hours and that the size of zeolite, the concentration and the volume of the bacteria suspension influenced the effect of immobilization. As a result of optimization of immobilization procedure, 0.46 g bacteria (dry weight) were absorbed on 1kg zeolite (granule size: 60). The immobilized bacteria had a much higher degradation ability than free bacteria, and the survival rate of immobilized bacteria conserved in vacuum is much higher than in air.

(本文编辑:张培新)