

固定化 GEM/CAS 串联工艺强化处理阿特拉津废水

魏敏捷, 王慧*, 刘春, 宁大亮

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要:考察了固定化基因工程菌强化处理(GEM)/传统活性污泥处理(CAS)串联工艺对阿特拉津废水的处理效果,水力停留时间(HRT)对处理效果的影响,基因工程菌的生长和流失情况.结果表明,当 HRT 为 4~24 h,阿特拉津初始浓度为 20 mg/L,以实际生活污水为碳源时,串联工艺均可以实现对高浓度高负荷的阿特拉津生物强化处理.水力停留时间为 24 h 时,固定化细胞反应器(串联工艺 A 段)的处理效果最好,阿特拉津平均去除率为 96.64%,出水浓度为 0.56 mg/L.水力停留时间为 12、8 和 4 h 时,平均去除率分别为 88.59%、89.79%、88.61%.反应器在以上 4 个 HRT 时,COD 平均去除率分别为 72.76%、64.59%、66.16%和 65.84%.在整个反应过程中,没有出现大量工程菌流失的现象,同时在固定化颗粒的表面以及浅层均观察到了大量工程菌菌体,固定化颗粒的表面还出现了生物膜和菌胶团,反应结束时,颗粒形态完好,强度满足本工艺条件下长期使用的需求.

关键词:基因工程菌;阿特拉津;固定化;生物强化;活性污泥法

中图分类号:X703.1 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2008)06-1555-06

Bioaugmentation with Immobilized Genetically Engineered Microorganism (GEM)/CAS Process for Treatment of Atrazine Wastewater

WEI Min-jie, WANG Hui, LIU Chun, NING Da-liang

(Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Bioaugmentation with immobilized genetically engineered microorganism (GEM)/conventional activated sludge (CAS) process for treatment of atrazine wastewater was investigated and effects of hydraulic retention time (HRT) on treatment efficiency, activities of GEM were discussed. The results showed that when HRT was 4-24 h, significant removal of atrazine was obtained in the process with bioaugmentation. When the HRT was 24 h, the first stage of the process got best treatment effect: average atrazine removal rate was 96.64% and average atrazine concentration in effluent was 0.56 mg/L. When HRT was changed to 12 h, 8 h or 4 h, the removal rate was 88.59%, 89.79% and 88.61% respectively. The average removal of COD in 4 runs was 72.76%, 64.59%, 66.16% and 65.84% respectively. Significant loss of GEMs was not observed but strong growth activities, formation of biofilm and zoogloea on the surface of immobile particles were observed via scanning electron microscope (SEM). The mechanical stability of the particles remained unchanged after nearly two-month operation.

Key words: genetically engineered microorganism (GEM); atrazine; immobilization; bioaugmentation; activated sludge process

20 世纪 70 年代,人们将用于农业的生物强化技术引入到环境治理领域^[1],通过向反应系统中投加高效降解菌或基因工程菌来去除一些难降解物质.一些研究表明,采用基因工程菌的生物强化技术可以显著提高系统的处理效率,扩大底物利用范围,提高系统的抗冲击负荷的能力^[2],保护系统中的土著微生物^[3~5].但是基因工程菌生物强化技术存在 2 个主要问题^[6]:一是应用中降解能力的稳定性差^[7];二是菌株流失引起的生态安全性.因此需要开发更有效的方式利用基因工程菌,并在此基础上探索基因工程菌的降解极限和生物安全性.细胞固定化技术可以给外源细菌提供一个相对无毒的微环境,实现优势菌体的高密度,目前在废水处理方面已经有了一定程度的工业化应用^[8],是实现基因工程菌生物强化的可能途径.该技术用于固定基因工程菌时,可以提高基因工程菌的遗传稳定性及目的产物的表达^[9,10],但目前在发酵生产领域中应用较多^[11,12],在

废水处理领域应用不多,且以摇瓶降解试验为主.

因此,本研究选取了 1 株具有代表性的基因工程菌(pMD4)^[13~15],探讨固定化以后该菌的生物强化效果及在相关工艺中应用的生物安全性,以实现高效、安全地应用基因工程菌.基因工程菌 pMD4 含有阿特拉津脱氯水解酶的基因片断,可以将阿特拉津转化为羟基阿特拉津^[16],具有很高的降解活性.本研究采取固定化 GEM/CAS 串联工艺,利用固定化基因工程菌(串联工艺 A 段)对阿特拉津进行脱氯实现无毒化,然后利用活性污泥反应器(串联工艺 B 段)彻底矿化羟基阿特拉津,并实现 COD 的去除.在连续运行的条件下,本研究考察了不同水力停留时

收稿日期:2007-06-22;修订日期:2007-08-22

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB18);国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601170)

作者简介:魏敏捷(1980~),女,硕士研究生,主要研究方向为废水生物处理技术,E-mail: weimj04@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人,E-mail: wanghui@mail.tsinghua.edu.cn

间(HRT)下固定化基因工程菌对阿特拉津的处理效果,同时分析了工程菌的生长、流失情况.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与培养基

试验所用的基因工程菌受体细胞为大肠杆菌 DH5 α ,阿特拉津脱氯水解酶基因和 *gfp* 基因被克隆到质粒载体 pACYC184 上,载体带有氯霉素和氨苄青霉素抗性基因.菌株由南开大学蔡宝立教授赠送,清华大学环境系刘春博士改建.

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L, NaCl 5 g/L,去离子水 1.0 L.

1.1.2 试验装置

试验装置由固定化细胞反应器(串联工艺 A 段)和合建式活性污泥反应器(串联工艺 B 段)2 部分串连组成,具体如图 1 所示.试验共设计了 2 个反应器,以满足不同水力停留时间试验需要.1 号反应器的固定化细胞反应器体积为 7.2 L,活性污泥反应器中曝气池体积为 4.8 L,导流区和沉淀池共 3.2 L,2 号反应器则分别是 3.6 L、7.2 L 和 3.2 L.

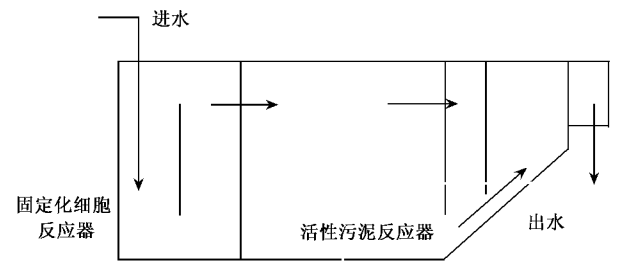


图 1 试验装置示意
Fig.1 Schematic diagram of experimental reactor

1.1.3 反应器运行条件

反应器中的活性污泥来源于北京高碑店污水处理厂的二沉池回流污泥,初始污泥浓度为 2.7 g/L.反应器启动时,先将活性污泥反应器运转一定时间(24~48 h),确保反应器出水的阿特拉津浓度与进水基本一致.然后在固定化细胞反应器中加入污水,并按 40 g/L 的浓度加入固定化颗粒.其中固定化细胞反应器采用加热装置,运行温度在 30℃ 左右,溶解氧(DO)在 5~6 mg/L, pH 值保持中性.反应器进水为清华大学校园生活污水, COD 平均值约为 227 mg/L.运行参数如表 1 所示.

1.2 方法

1.2.1 菌体的培养及收集

表 1 反应器运行参数				
Table 1 Operation parameters for the reactor				
项目	Run-1	Run-2	Run-3	Run-4
HRT(固定化细胞反应器)/h	24	12	8	4
HRT(活性污泥曝气池)/h	16	8	16	8
阿特拉津平均进水浓度/mg·L ⁻¹	17.55	15.77	17.27	16.33
阿特拉津平均容积负荷/mg·(L·d) ⁻¹	17.55	31.54	51.81	97.98
COD 平均容积负荷/g·(L·d) ⁻¹	0.34	0.68	0.30	0.68
运行时间/d	29	24	29	21

从 LB 培养平板上(含 25 μ g/mL 氯霉素, 50 μ g/mL 氨苄青霉素)挑单菌落,接种到 300 mL 液体培养基中(采用 1 L 锥形瓶),在 37℃, 120~140 r/min 转速下过夜培养,经 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,然后用灭菌的生理盐水洗涤 2 次,收获细胞,制成菌悬液备用.

菌悬液密度测定如下:首先在不同密度条件下,测得菌密度(mg/mL)与 660 nm 波长下的光密度标准直线,然后通过测定 660 nm 波长下的光密度值,计算菌悬液细胞的密度.

1.2.2 固定化方法

取适量聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)和海藻酸钠(sodium alginate, SA)溶于去离子水中,90℃ 水浴加热至完全溶解后冷却至 40℃,加入基因工程菌菌悬液.此时,混合液 PVA 最终浓度为 100 g/L, SA 为 2.5 g/L,工程菌 1.2 g/L.待混合均匀静置至没有气泡后,将混合液倒入培养皿中,厚约 3~5 mm,然后放到 -20℃ 冷冻约 12 h,取出在 4℃ 融化 12 h,再放入 -20℃ 冷冻 12 h,取出剪成 5 mm×5 mm×5 mm 左右的颗粒,用去离子水洗涤 2 次后 4℃ 储存备用.

1.2.3 检测方法

含阿特拉津的水样用 0.45 μ m 的滤膜过滤后,采用 HP1050 型 HPLC 进行检测,色谱柱为 Aichrom C18 反相柱,检测器为二极管阵列检测器,检测条件为:流动相配比为甲醇:水=70:30,检测波长为 223 nm. COD 采用重铬酸钾法.基因工程菌的计数采用含有氯霉素和氨苄青霉素抗性的 LB 培养基,用稀释平板法测定.

1.2.4 固定化细胞微生物相观察

采用 FEI QUANTA 200 扫描电子显微镜(中国科学院微生物所)观察固定化颗粒表面及内部的微生物,并拍照.

2 结果与讨论

2.1 串联工艺 A 段对阿特拉津的生物强化作用

从图 2 和图 3 中可以看出,2 个反应器的固定

化细胞反应器在启动期并没有出现降解迟滞的现象,出水的阿特拉津浓度逐渐下降,大约经过 5 d 达到出水浓度基本稳定,与该菌在 MBR 和 CAS 反应器中使用时的启动期略有不同^[17]. 运行一段时间后的固定化颗粒活性较高且比较适应反应器中的环境,此时将反应器中的水清空,灌入原水,改变水力停留时间重新运转反应器,只需要 2~3 d 反应器就能达到稳定.

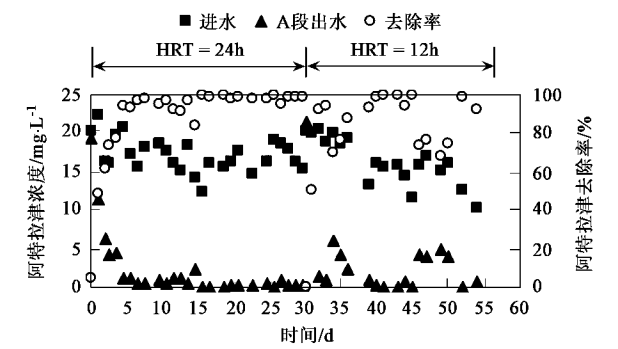


图 2 串联工艺 1-A 对阿特拉津的去除效果
Fig.2 Atrazine removal effect of the two-stage bioreactor 1 (stage A)

串连工艺对阿特拉津的去除效果的具体数据见表 2,其中去除负荷及去除率的计算是按反应器进入稳定期后的数据进行的. 比较各运行阶段的去除率及标准偏差,可以看出 Run-1 阶段固定化细胞

表 2 串联工艺在不同水力停留时间下对阿特拉津去除效果
Table 2 Atrazine removal effect of two-stage bioreactor at various HRT

周期	平均容 积负荷 /mg•(L•d) ⁻¹	A 段平均 去除负荷 /mg•(L•d) ⁻¹	A 段平均 去除率 /%	A 段去除率 变化范围 /%	A 段去除率 标准偏差 /%	A 段平均 出水浓度 /mg•L ⁻¹	B 段平均 出水浓度 /mg•L ⁻¹
Run-1	17.55	16.19	96.64	84.35~100	3.59	0.56	0.21
Run-2	31.54	27.72	88.59	69.83~100	10.89	1.91	1.05
Run-3	51.81	45.97	89.79	69.43~100	7.70	1.80	1.29
Run-4	97.98	86.67	88.61	80.89~94.18	4.89	1.88	0.87

另外,对阿特拉津进水负荷和去除负荷进行拟合,结果见图 4,可以看出随着进水负荷的增加,串联工艺 A 段对阿特拉津的去除负荷也随之增加,最大的去除负荷达到 100.70 mg/(L•d).

2.2 COD 的去除率和污泥浓度

阿特拉津和基因工程菌都有可能会对活性污泥产生影响,从而影响 COD 的去除率. 因此,为了考察固定化串连反应器对生活污水的处理效果,试验在监测阿特拉津浓度的同时,也监测了 COD 的去除效

反应器对阿特拉津平均去除率及稳定性都要优于后面 3 个阶段,平均去除率为 96.64%,而后 3 个阶段的平均去除率相差不大,均在 89%. 另外, A 段出水经过 B 段的活性污泥吸附或降解作用后,阿特拉津浓度进一步降低. 总的来说,缩短水力停留时间对固定化细胞反应器达到稳定的时间及运行过程中的稳定性有一定影响,但影响不大,在水力停留时间为 4~24 h,阿特拉津初始浓度约 20 mg/L 时(与农药厂综合污水池阿特拉津浓度相当),该反应器能够实现对高浓度、高负荷阿特拉津的生物强化去除. 河水中阿特拉津含量对水稻秧苗的安全浓度为 0.01 mg/L^[18],因此可以根据当地河水流量,调整反应器的水力停留时间,已达到阿特拉津生产废水的无毒害排放.

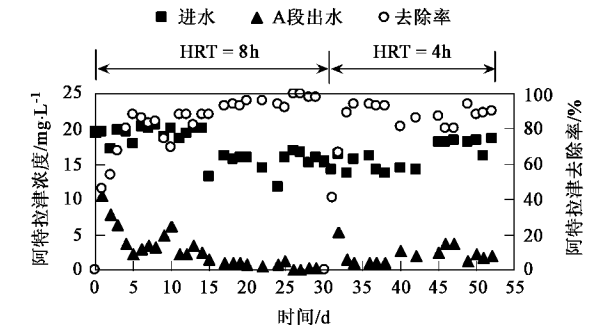


图 3 串联工艺 2-A 段对阿特拉津的去除效果
Fig.3 Atrazine removal effect of the two-stage bioreactor 2 (stage A)

果,数据见表 3.

如图 5、图 6 和表 3 所示,4 个阶段出水 COD 平均值分别是 64.79、70.76、65.96 和 79.36 mg/L,相应的 COD 平均去除率分别是 72.76%、64.59%、66.16%、65.84%,反应器实现了对 COD 的高效去除率,也就是说工程菌的投入并没有影响活性污泥反应器对 COD 的去除. 与前面的阿特拉津去除率变化规律相似,Run-1 阶段的 COD 去除率最高且最稳定,平均去除率为 72.76%,后 3 个阶段 COD 平均去除

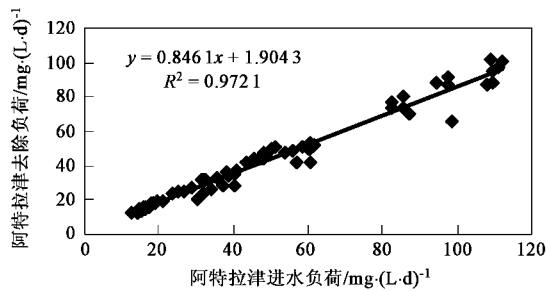


图 4 容积负荷对固定化细胞反应器出水的阿特拉津去除负荷的影响

Fig.4 Effect of increased atrazine loading on removal loading of the two-stage bioreactor (stage A)

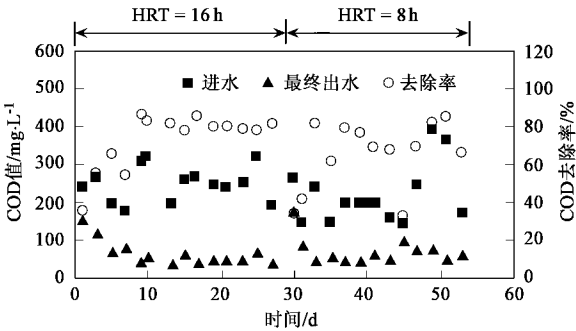


图 5 串联工艺 1 对 COD 的去除效果

Fig.5 COD removal effect of the two-stage bioreactor 1

率很接近,均在 65%左右。

根据文献[17],在 CAS 系统中直接投加基因工程菌 pMD4 进行生物强化处理阿特拉津,运行 2 周之后出现污泥性状恶化,污泥逐渐流失,丝状菌膨胀,直至系统崩溃失去阿特拉津生物强化效果的现象。与之相比,串联工艺中 CAS 在进 2 个月的运行中,一直保持高效的 COD 去除率,运行状态比较稳定。可见通过串联工艺 A 段先进行阿特拉津的生物强化处理再去除 COD,有效保护了串联工艺中的

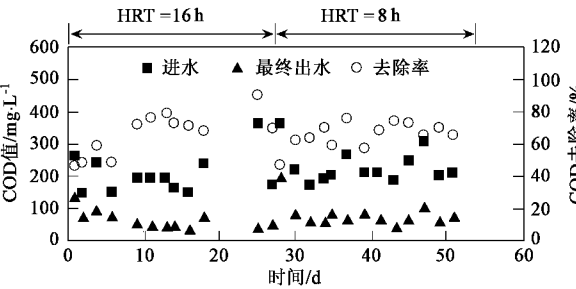


图 6 串联工艺 2 对 COD 的去除效果

Fig.6 COD removal effect of the two-stage bioreactor 2

表 3 反应器在不同阶段对 COD 去除效果

Table 3 COD removal effect of the two-stage bioreactor at various HRT

周期	平均容 积负荷 /mg·(L·d) ⁻¹	平均总去 除负荷 /mg·(L·d) ⁻¹	平均总 去除率 /%	总去除率 变化范围 /%	总去除率 标准偏差 /%	A 段平均 出水浓度 /mg·L ⁻¹	B 段平均 出水浓度 /mg·L ⁻¹
Run-1	369.34	272.16	72.76	53.33 ~ 85.93	2.80	163.94	64.79
Run-2	654.12	441.84	64.59	30.65 ~ 85.50	14.30	147.48	70.76
Run-3	305.55	221.52	66.16	69.58 ~ 78.09	6.34	185.67	65.96
Run-4	684.20	446.09	65.84	57.40 ~ 73.68	5.80	167.32	79.36

CAS,使阿特拉津对活性污泥的影响最小化。

2.3 基因工程菌的流失情况

试验过程中,采用含氨苄青霉素和氯霉素抗性的 LB 培养基监测了串联反应器 2 的进水、A 段出水、B 段活性污泥混合液以及最终出水中的基因工程菌数,数据如图 7 所示,其中 4 个取样点的细胞密度平均值分别为:818、644、12 928 和 169 CFU/mL,可以看出,出水中的菌数比进水及串联反应器 A 段的菌数都要低,且考虑出水中由对抗生素有抗性的细菌引起的背景值约为 102 CFU·mL⁻¹,因此认为反应器在整个运行的过程中没有出现严重的泄漏现象,串联工艺运行安全可靠。

从图 7 能看出 A 段出水,在第 2~3 d 时出现 1

个峰值,分析其中原因很有可能是一部分固定化颗粒表面的菌株在水流冲洗的作用下脱落进入系统。但此时工艺最终出水的工程菌数量极低。在取样的过程中,观察到此时系统刚刚启动,污泥性状良好,

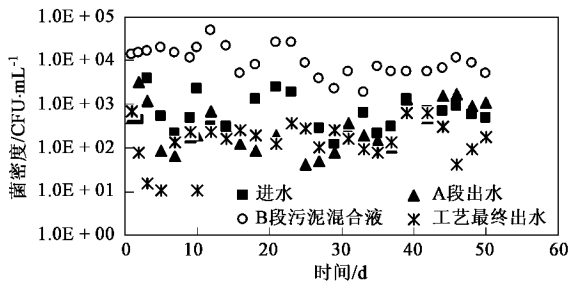


图 7 基因工程菌密度变化

Fig.7 Change of GEM density in the bioreactor

沉淀分离效果显著,出水清澈,浊度较低.因此,认为这部分流失的菌株被活性污泥系统有效截留.但从图 7 中没有观察到 B 段活性污泥混合液中工程菌数量激增的现象,工程菌数量一直维持在第 1 d(未投固定化颗粒)的监测结果 10^4 CFU/mL 这个数量级上,说明流失的菌体进入活性污泥系统后迅速衰减、死亡.

2.4 固定化颗粒的微生物相观察

试验通过电子扫描电镜(SEM)观察了反应前后固定化颗粒内外的变化情况,如图 8.比较图 8(a)和图 8(b),可以看出固定化颗粒经过 1 个多月的反应

后,表面形成明显的生物膜,在生物膜的絮体中和固定化颗粒的洞穴中均观察到杆菌,且在数量上有明显的增长.此外,生物膜中还有一些球菌,丝状菌存在.

反应器停止运行时,从反应器中取出固定化颗粒,经过近 2 个月的使用后,颗粒形态完好,与反应前相比无明显变化,机械强度满足工艺应用的要求.同时观察到颗粒表面呈淡黄色,手感光滑,有生物膜附着在表面.因此,结合去除效率,认为固定化 GEM/CAS 串联工艺能够安全可靠地实现基因工程菌的应用.

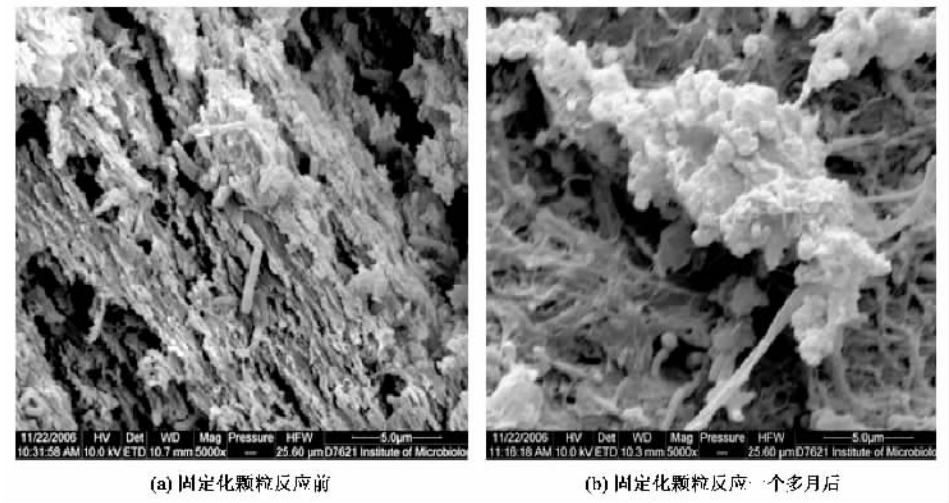


图 8 固定化颗粒扫描电镜图

Fig.8 Scanning electron micrograph of the immobilized particles

3 结论

(1)在 HRT 为 4 ~ 24 h 的范围内,采用固定化 GEM/CAS 串联工艺可以实现对高浓度高负荷阿特拉津的生物强化处理.其中水力停留时间为 24 h 时反应器运转最为稳定,串联工艺 A 段出水中阿特拉津的平均浓度为 0.56 mg/L,平均去除率为 96.64%.后 3 个阶段运转效果相差不大,平均去除率均在 89% 左右.

(2)串联工艺 A 段实现阿特拉津无毒化后,有利于保护串联在 A 段之后的活性污泥的性状,此外固定化基因工程菌的投加并没有影响活性污泥反应器对 COD 的去除,4 个阶段反应器的 COD 去除率分别为 72.76%、64.59%、66.16% 和 65.84%.

(3)在整个反应的过程中,没有出现工程菌大量流失的现象,同时在固定化颗粒的表面以及浅层的内部均观察到了大量菌体,在固定化颗粒的表面,还出现了生物膜和菌胶团.因此,结合去除效率判断包

埋固定化的方法是有利于工程菌生长和利用的.

(4)在近 2 个月的反应过程中,颗粒形态保持完好,在强度上满足工艺应用的要求,因此固定化 GEM/CAS 串联工艺是一种有应用潜力的生物强化处理方式.

参考文献:

[1] Wiyada M, Saovane D. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2002, 50(2): 101-105.

[2] Boon N, Top E M, Verstraete W, et al. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1511-1520.

[3] Erb R W, Eichner C A, Timmis K N, et al. Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad [J]. Nature Biotechnology, 1997, 15(4): 378-382.

[4] Nublein K, Maris D, Timmis K N, et al. Expression and transfer of engineered catabolic pathway harbored by prseudomonas sp. Introduced into activated sludge microcosms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58: 3380-3386.

[5] Meltem U D, Benjamin C S, Pagilla K R. Comparison of 2-chlorobenzoic acid biodegradation in a membrane bioreactor by *B. cepacia* and *B. cepacia* bearing the bacterial hemoglobin gene [J]. Water research, 2006, **40**(16): 3123-3130.

[6] Alcalde M, Ferrer M, Plou F J, *et al.* Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes [J]. Trends in biotechnology, 2006, **24**(6): 281-287.

[7] Bouchez T, Patureau D, Dabert P, *et al.* Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization [J]. Water Science and Technology, 2000, **21**(12): 61-68.

[8] Wang J L, Quan X C, Han L P, *et al.* Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of *Burkholderia pichettii* [J]. Water Research, 2002, **36**: 2288-2296.

[9] Sayadi S, Nasri M, Barbotin J N, *et al.* Increased Stability of pBR322 related plasmids in *Escherichia coli* W3101 grown in carrageenan gel beads [J]. FEMS Microbiology Letters, 1988, **56**: 307-312.

[10] Georjous G, Chalmers J J, Shuler M L, *et al.* Continuous immobilized recombinant protein production from *E. coli* capable of selective protein excretion: a feasibility study [J]. Biotech Pro, 1985, **1**: 57-65.

[11] 陈新爱, 徐志南, 沈文和, 等. 固定化基因工程菌的培养和 hEGF 表达 [J]. 化工学报, 2003, **54**(7): 1021-1024.

[12] Leng Y, Zheng P, Sun Z H. Continuous production of L-phenylalanine from phenylpyruvic acid and L-aspartic acid by immobilized recombinant *Escherichia coli* SW0209-52 [J]. Process Biochemistry, 2006, **41**: 1669-1672.

[13] De Souza M L, Wackett L P. Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61**(9): 3373-3378.

[14] Strong L C, Tavish H M, Michael J, *et al.* Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase [J]. Environmental Microbiology, 2000, **2**(1): 91-98.

[15] 刘春, 黄霞, 王慧. 绿色荧光蛋白标记阿特拉津降解基因工程菌的特性 [J]. 环境科学, 2006, **27**(7): 1439-1443.

[16] 万年升, 顾继东, 段舜山. 阿特拉津生态毒性与生物降解的研究 [J]. 环境科学学报, 2006, **26** (4): 552-560.

[17] 刘春, 黄霞, 孙炜, 等. 基因工程菌生物强化 MBR 工艺处理阿特拉津试验研究 [J]. 环境科学, 2007, **28**(2): 417-421.

[18] 叶常明, 雷志芳, 弓爱君, 等. 阿特拉津生产废水排放对水稻危害的风险分析 [J]. 环境科学, 1999, **20**(3): 82-84.