

基因工程菌生物强化 MBR 工艺处理阿特拉津试验研究

刘春¹, 黄霞^{1*}, 孙炜², 王慧¹

(1. 清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家联合重点实验室, 北京 100084; 2. 天津城市建设学院, 天津 300384)

摘要: 以生活污水为共基质, 考察了基因工程菌在 MBR 和活性污泥反应器中对阿特拉津的生物强化处理效果, 以及生物强化处理对污泥性状的影响. 结果表明, 基因工程菌在 MBR 中对阿特拉津具有很好的生物强化处理效果, 阿特拉津平均出水浓度为 0.84 mg/L, 平均去除率为 95%, 最大去除负荷可以达到 70 mg/(L·d). 生物强化的 MBR 对生活污水中 COD 的平均去除率为 71%, COD 平均出水浓度 65 mg/L, COD 容积负荷增加对 COD 去除效果有一定影响; 对生活污水中的氨氮具有很好的去除效果, 氨氮平均出水浓度为 1.1 mg/L, 平均去除率为 97%, 最大氨氮去除负荷为 143 mg/(L·d). 与普通 MBR 污泥相比, 生物强化 MBR 污泥的硝化活性和亚硝化活性略高, 碳氧化活性略低, 因此表现出氨氮处理效果很好, COD 处理效果略差. 阿特拉津的存在会对污泥性状产生影响, 可能是造成污泥碳氧化活性低的原因.

关键词: 生物强化; 基因工程菌; 膜生物反应器; 阿特拉津

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)02-0417-05

Bioaugmentation Treatment of Atrazine in MBR Using Genetically Engineered Microorganism (GEM)

LIU Chun¹, HUANG Xia¹, SUN Wei², WANG Hui¹

(1. ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Tianjin Institute of Urban Construction, Tianjin 300384, China)

Abstract: Bioaugmentation treatment of atrazine by genetically engineered microorganism (GEM) in membrane bioreactor (MBR) and conventional activated sludge bioreactor (CAS), was investigated using domestic wastewater as co-substrate, and effects of bioaugmentation treatment on sludge activities were also discussed. The results showed that significant removal of atrazine was obtained in MBR with bioaugmentation: average atrazine concentration in effluent was 0.84 mg/L, average removal rate was 95%, and the maximum removal loading of atrazine was as high as 70 mg/(L·d). Average COD removal in MBR was 71%, and average COD concentration in effluent was 65 mg/L. However, COD removal was affected when volumetric loading of COD increased. NH₃-N removal in MBR was also perfect: average NH₃-N concentration in effluent was 1.1 mg/L, average removal rate was 97%, and the maximum removal loading of NH₃-N was 143 mg/(L·d). Compared with sludge in common MBR, abilities of nitrification and nitroization of sludge in bioaugmented MBR were higher but ability of carbon oxidation was lower, which was responsible for performance of COD and NH₃-N removal probably. Exposure to atrazine resulted in some negative effects on activated sludge and might be the reason for lower carbon oxidation ability of bioaugmented sludge.

Key words: bioaugmentation; genetically engineered microorganism (GEM); MBR; atrazine

在过去的数十年, 大量的人工合成化学品被排放到环境中, 其中大部分是自然环境中不存在的物质, 而且具有相当的生物毒性; 同时, 环境中的土著微生物对这些物质缺乏生物降解能力, 造成这些物质在环境中的长期存在和累积. 另一方面, 传统的生物处理工艺在去除这些难降解污染物方面表现不佳, 因此, 接种具有特殊降解能力的高效菌或基因工程菌进行生物强化处理, 是解决这一问题的可行途径^[1].

生物强化的应用研究主要集中于土壤生物修复和废水生物处理. 目前, 已有一些在传统生物反应器中应用基因工程菌进行生物强化处理的研究报道,

目标物质主要是芳烃、氯代芳烃、酚等^[2~11]. 由于基因工程菌的生物强化处理有时会表现得不稳定, 因此一些研究对基因工程菌生物强化方式进行改进, 以改善其生物强化稳定性和处理效果^[12]. 另一方面, 改变反应器的形式, 采用膜生物反应器 (MBR) 取代传统生物反应器, 可以高效截留工程菌细胞, 而且污泥龄比较长, 有利于保持基因工程菌的种群密度, 改善生物强化稳定性. 已有研究表明, 携带具有水平

收稿日期: 2006-03-19; 修订日期: 2006-04-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA601170)

作者简介: 刘春 (1976~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为废水生物处理技术, E-mail: liuchun02@mails.tsinghua.edu.cn

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

迁移能力降解基因的工程菌,在 MBR 中降解稳定性优于普通活性污泥法^[13,14],但是其采用的基因工程菌有一定的特殊性,缺乏普遍意义.

本研究采用 1 株具有较好代表性的普通基因工程菌,探讨其在 MBR 中的生物强化效果.所采用的基因工程菌 pMD4 含有阿特拉津脱氯水解酶基因片段,可以将阿特拉津转化为羟基阿特拉津^[15],具有很高的转化活性^[16],这个转化可以大大降低阿特拉津的生物毒性,提高生物可降解性.由于该基因工程菌不能完全矿化阿特拉津,所以需要其它碳源作为生长和代谢基质.以生活污水作为共基质一起处理,既可以满足生物强化对碳源的需求,又可以完成生活污水的处理.为此,本研究在连续运行条件下,考察了基因工程菌在 MBR 中对阿特拉津生物强化处理的效果,以及阿特拉津负荷对处理效果的影响;探讨了该强化处理过程对 MBR 原有处理功能的影响;比较了基因工程菌在 MBR 和活性污泥反应器中对阿特拉津生物强化效果的差异.

1 材料与方法

1.1 菌株和菌悬液的制备

本研究使用的基因工程菌受体细胞为大肠杆菌 DH5 α ,质粒载体为 pACYC184,携带阿特拉津脱氯水解酶基因,对氯霉素有抗性.

挑单菌落于 LB 培养基中(含 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素),在 37 $^{\circ}\text{C}$, 120 ~ 140 r/min 摇床转速下培养过夜,离心,磷酸缓冲液(pH 7.0)洗涤,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 600 nm 波长下的光密度值的标准直线,然后在实验中,通过测定 600 nm 波长下的光密度值,计算菌悬液细胞的密度.

1.2 膜生物反应器和活性污泥反应器

采用一体式膜生物反应器(MBR)和活性污泥反应器(CAS)同时开展并行实验.一体式 MBR 容积为 6 L,内置中空纤维膜组件,膜材质为聚乙烯,膜面积为 0.03 m^2 ,孔径为 0.4 μm .CAS 反应器采用曝气池和沉淀池合建式,曝气池和沉淀池容积分别为 12 L 和 4.5 L.

1.3 反应器运行条件

MBR 和 CAS 反应器都接种北京清河污水处理厂的二沉池回流污泥,初始污泥浓度约为 4 g/L,待反应器运行稳定后,投加基因工程菌悬液,使工程菌在反应器中的终浓度约为 0.03 g/L,运行过程中没

有排泥.

反应器的运行温度在 30 $^{\circ}\text{C}$ 左右,DO 在 4 ~ 5 mg/L ,pH 值保持在中性.

反应器进水为清华大学校园生活污水,COD 平均值约为 240 mg/L ,氨氮平均值约为 36 mg/L .

反应器运行参数如表 1 所示.

表 1 反应器运行参数

Table 1 Operation parameters of bioreactors

项目	Run-1	Run-2	Run-3
HRT/h	12	8	6
阿特拉津平均进水浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	13	19	17
阿特拉津平均容积负荷/ $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$	26	57	68
COD 平均容积负荷/ $\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$	0.42	0.70	0.97
氨氮平均容积负荷/ $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$	75	87	132
运行时间/d	25	15	14

1.4 分析项目与方法

阿特拉津浓度:含有阿特拉津的水样用 0.45 μm 的滤膜过滤后,采用 HP1050 型 HPLC 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:流动相比比为甲醇:水 = 70:30,检测波长为 223 nm.

活性污泥活性:通过测定耗氧速率(OUR)来反映污泥活性^[17].在测定过程中,当 DO 降到 3 mg/L 时,加入氯酸钠抑制硝化活性,降到 2 mg/L 时,加入 ATU 抑制亚硝化活性,以此得到污泥的硝化、亚硝化和碳氧化活性.测定中所使用的基质为模拟生活污水的自配水(葡萄糖为主要碳源, NH_4^+ 为主要氮源).

COD、氨氮、MLSS 等常规指标的测定采用国家标准方法.

2 结果与讨论

2.1 MBR 和 CAS 反应器对阿特拉津的生物强化处理

在 MBR 和 CAS 反应器中,基因工程菌对阿特拉津的生物强化处理首先经历了一个启动期,约为 4 d,在启动期,阿特拉津的去除率仅有 20% ~ 40%.启动之后,如图 1、图 2 所示,MBR 对阿特拉津始终保持了良好的强化处理效果,出水阿特拉津浓度保持在 1 mg/L 以下,平均为 0.84 mg/L ,平均去除率为 95%.在 Run-1、Run-2、Run-3 这 3 个阶段,阿特拉津平均容积负荷分别为 26、57、68 $\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$,相应的平均去除负荷为 24.5、54.1 和 65.1 $\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$,最大去除负荷可以达到 70 $\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$.在启动期,阿特拉津的容积负荷较低时,阿特拉津的出水浓度也比较高,

除此之外,阿特拉津容积负荷的增加不会影响 MBR 系统对阿特拉津的处理效果,出水阿特拉津浓度始终保持在很低的水平,如图 3 所示.这个结果说明 MBR 经过生物强化后,可以处理较高负荷的阿特拉津.本研究中,由于受到膜通量的限制,没有进一步缩短水力停留时间.CAS 反应器对阿特拉津也有很好的强化处理效果,在 Run-1 阶段出水阿特拉津浓度也保持在 1 mg/L 左右,平均 0.92 mg/L,平均去除率为 93%.与活性污泥反应器相比,MBR 的强化处理效果略好一些,但是差别不大.但是运行 2 周之后(14~16 d),活性污泥反应器出现污泥膨胀,污泥开始流失,导致污泥浓度下降,阿特拉津去除率出现不稳定,开始下降,直到系统崩溃.

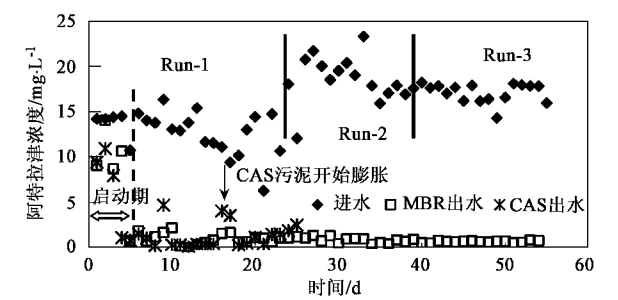


图 1 MBR 和 CAS 反应器对阿特拉津的生物强化处理
Fig.1 Bioaugmentation treatment of atrazine in MBR and CAS bioreactor

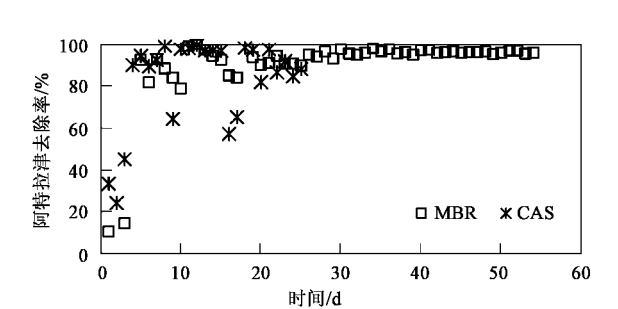


图 2 MBR 和 CAS 反应器对阿特拉津去除率
Fig.2 Removal rates of atrazine in MBR and CAS bioreactor

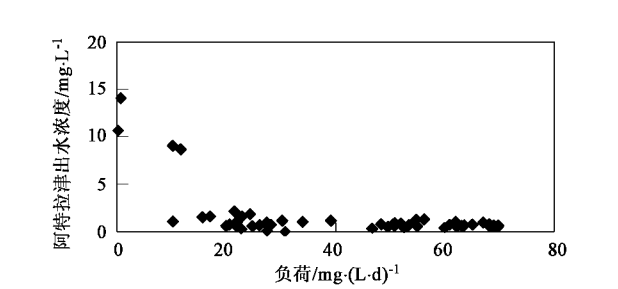


图 3 阿特拉津负荷对出水阿特拉津浓度的影响
Fig.3 Effect of increased atrazine loading on atrazine concentration in effluent

2.2 MBR 和 CAS 反应器中 COD 和氨氮的去除

将阿特拉津的生物强化处理和生活污水的处理结合在一起,既要保证阿特拉津的去除效果,也要考虑生活污水的处理效果.阿特拉津和基因工程菌都有可能对污泥原有的活性产生影响,从而影响反应器对污染物的处理能力.因此,在考察生物强化过程中阿特拉津去除效果的同时,也考察了反应器对 COD 和氨氮的处理效果.

如图 4 所示,在平均进水 COD 浓度为 240 mg/L 时,MBR 和 CAS 反应器对 COD 具有较好的去除效果.在 Run-1、Run-2、Run-3 3 个运行条件下,COD 容积负荷分别为 0.42、0.70、0.97 g/(L·d),相应的 MBR 的平均 COD 去除负荷为 0.32、0.49 和 0.63 g/(L·d),平均出水 COD 浓度为 47、71 和 85 mg/L,平均 COD 去除率为 76%、72%和 66%.可见,随着 COD 负荷的增加,COD 的去除效果有所下降.整个 MBR 运行期间平均出水 COD 浓度为 65 mg/L,平均去除率为 71%,和普通 MBR 相比,本研究中生物强化 MBR 对 COD 的去除效果稍差.这可能是由于阿特拉津负荷的增加对污泥活性产生了影响.活性污泥反应器仅维持了在 Run-1 阶段的运行,平均出水 COD 浓度为 55 mg/L,平均去除率为 75%,基本与 MBR 相同.

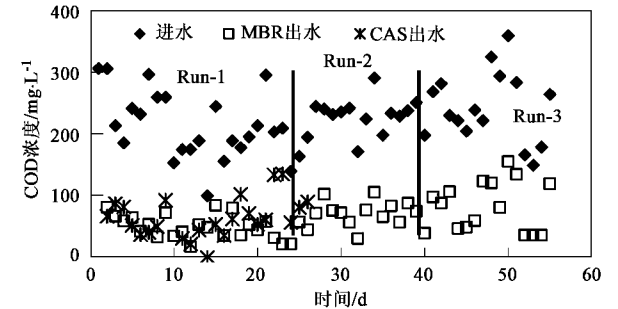


图 4 MBR 和 CAS 反应器对 COD 的去除效果
Fig.4 Removal of COD in MBR and CAS bioreactor

对于氨氮,MBR 和 CAS 反应器均具有很好的去除效果,如图 5 所示.在 Run-1、Run-2、Run-3 3 个运行条件下,氨氮的容积负荷分别为 75、87、132 mg/(L·d),相应地 MBR 对氨氮的平均去除负荷分别为 70、85 和 130 mg/(L·d),最大去除负荷可以达到 143 mg/(L·d),平均出水氨氮浓度为 1.1、0.9 和 1.2 mg/L,平均氨氮去除率均为 97%.可见,在本实验的氨氮负荷范围内,MBR 对氨氮的去除效果没有受到氨氮负荷增加的影响.整个稳定运行期间,平均出水氨氮浓度为 1.1 mg/L,平均去除率为 97%.活性污泥

反应器在稳定运行时,对氨氮也有较好的去除效果,但出现污泥膨胀之后,去除率大幅下降.

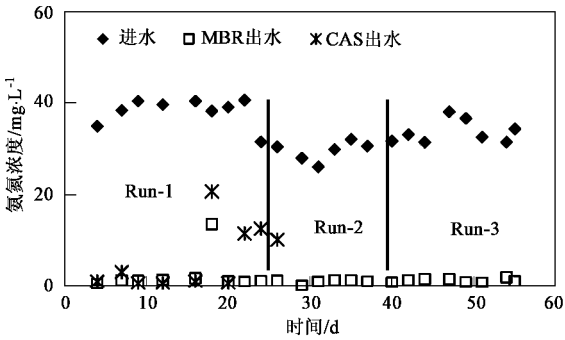


图 5 MBR 和 CAS 反应器对氨氮的去除效果
Fig.5 Removal of $\text{NH}_3\text{-N}$ in MBR and CAS bioreactor

2.3 生物强化对污泥活性的影响

MBR 和 CAS 反应器对 COD 和氨氮的处理效果反映了污泥的碳氧化活性和硝化活性,为了进一步比较生物强化处理后污泥活性的变化,对生物强化后的 MBR 中污泥和普通的 MBR 中的污泥活性进行了比较,如图 6 所示.可以看到,生物强化处理后污泥的硝化活性和亚硝化活性要高于普通污泥,而碳氧化活性要低于普通污泥,而总的耗氧速率基本相当.和前面 COD 和氨氮的去除效果的结果相比较,可以看到强化生物处理后污泥的硝化活性和亚硝化活性比较高,保证了对氨氮很好的处理效果;而碳氧化活性比较低,使得生物强化的 MBR 对 COD 的处理效果不及普通 MBR.

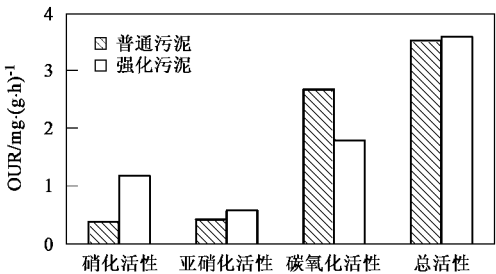


图 6 强化污泥和普通污泥活性的比较
Fig.6 Comparison of sludge activities between bioaugmented sludge and common sludge

污泥浓度在生物强化 MBR 中的变化规律,与普通 MBR 相比,也有一定的差别.如图 7 所示,污泥浓度随时间的变化明显受到 COD 负荷和阿特拉津负荷的共同影响.在 Run-1 运行条件下,污泥浓度从原有稳定浓度开始下降,然后趋于稳定.而后在 Run-2 运行条件下,COD 容积负荷从 $0.42 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 提高到

$0.70 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$,若在普通 MBR 中,污泥浓度应该提高,但是在本研究中,污泥浓度却有所下降,说明污泥的产率系数与前一个负荷相比,有大幅度下降.分析原因,可能是阿特拉津容积负荷从 $26 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 增加到 $57 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$,比 Run-1 时增加了 1 倍多,阿特拉津容积负荷的大幅度提高对活性污泥的增殖表现出明显的抑制作用.不过,当污泥对阿特拉津的高负荷有一定适应之后,再小幅增加容积负荷到 Run-3 的 $68 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 时,阿特拉津对污泥增殖的抑制作用就没有那么明显了.此时 COD 容积负荷增加到 $0.97 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$,污泥浓度随 COD 负荷的增加而增加,并达到一个相对较高的稳定浓度.该结果表明,阿特拉津的存在对活性污泥中的微生物还是存在相当的影响.但和活性污泥反应器相比,污泥浓度可以保持在一个相当高的水平.而在活性污泥反应器中,受阿特拉津负荷增加的影响,发生污泥膨胀,产生污泥流失,污泥浓度持续下降(在重复试验中得到相同的结果,对照试验未处理阿特拉津活性污泥反应器没有出现污泥膨胀).

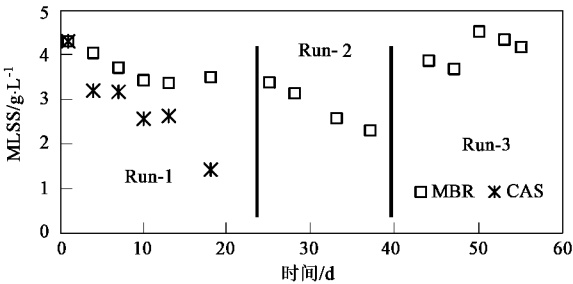


图 7 MBR 和 CAS 反应器中污泥浓度的变化
Fig.7 Change of sludge concentrations in MBR and CAS

已有研究表明,阿特拉津的存在会显著降低水环境中细菌的生物量^[18],对活性污泥中的微生物会产生一定程度的毒害作用^[19].本研究中,MBR 和 CAS 反应器在运行过程中都出现了污泥絮体解体、平均粒径降低、SVI 值下降的现象.特别是在 CAS 反应器中,大量的细小污泥絮体随出水流失,导致污泥丝状菌膨胀,系统崩溃.可见,阿特拉津的存在和容积负荷的增加对活性污泥的影响非常显著,这可能是造成污泥性状变化和碳氧化活性较低的重要因素.在 MBR 中,虽然污泥性状也发生变化,但由于膜的高效分离作用,可以保持污泥不流失,因而在运行稳定性上具有更大的优势.

3 结论

(1)以生活污水为共基质,基因工程菌在 MBR

中可以实现对阿特拉津的生物强化处理,阿特拉津平均出水浓度 0.84 mg/L,平均去除率为 95%,最大去除负荷可达 70 mg/(L·d)。

(2)生物强化的 MBR 对生活污水 COD 的平均去除率为 71%,COD 平均出水浓度 65 mg/L, COD 负荷的增加对去除效果有一定影响;对生活污水中的氨氮具有很好的去除效果,氨氮平均出水浓度 1.1 mg/L,平均去除率为 97%,最大氨氮去除负荷为 143 mg/(L·d)。

(3)生物强化的活性污泥反应器在较低容积负荷下稳定运行时,具有较好的阿特拉津、COD 和氨氮去除效果,阿特拉津平均出水浓度 1.27 mg/L,平均去除率为 93%,但运行 2 周后污泥发生膨胀,系统被破坏,MBR 的运行稳定性优于 CAS 反应器。

(4)和普通 MBR 污泥相比,强化生物处理后 MBR 污泥的硝化活性和亚硝化活性略高,碳氧化活性略低。阿特拉津的存在和负荷的增加会对污泥性状产生影响,可能是造成活性污泥碳氧化活性较低和出现污泥膨胀的重要原因。

致谢:感谢南开大学蔡宝立教授赠送菌株。

参考文献:

- [1] Van Limbergen H, Top E M, Verstraete W. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, **50**: 16 ~ 23.
- [2] McClure N C, Weightman A J, Fry J C. Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated sludge unit [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, **55**: 2627 ~ 2634.
- [3] Fujita M, Ike M, Hashimoto S. Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered microorganisms [J]. Water Research, 1991, **25**(8): 979 ~ 984.
- [4] Fujita M, Ike M, Kamiya T. Accelerated phenol removal by amplifying the gene expression with a recombinant plasmid encoding catechol-2, 3-oxygenase [J]. Water Research, 1993, **27**(1): 9 ~ 13.
- [5] Soda S, Ike M, Fujita M. Effects of inoculation of a genetically engineered bacterium on performance and indigenous bacteria of a sequencing batch activated sludge process treating phenol [J]. J. Fermentation and Bioengineering, 1998, **86**(1): 90 ~ 96.
- [6] Bryers J D, Sharp R R. Retention and expression of recombinant plasmids in suspended and biofilm bound bacteria degrading trichloroethene (TCE) [J]. Water Science and Technology, 1997, **36**(10): 1 ~ 8.
- [7] Nublein K, Maris D, Timmis K N, et al. Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* spp. introduced into activated sludge microcosms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, **58**: 3380 ~ 3386.
- [8] Fujita M, Ike M, Uesugi K. Operation parameters affecting the survival of genetically engineered microorganisms in activated sludge processes [J]. Water Research, 1994, **28**(7): 1667 ~ 1672.
- [9] Erb R W, Eichner C A, Wagner-Doebler I, et al. Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed *Pseudomonas* [J]. Nature Biotechnology, 1997, **15**(4): 378 ~ 382.
- [10] Ravatn R, Zehnder A J B, van der Meer J R. Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**(6): 2162 ~ 2132.
- [11] 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.
- [12] Gentry T J, Rensing C, Pepper I L. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2004, **34**: 447 ~ 494.
- [13] Springael D, Peys K, Ryngaert A. Community shifts in a seeded 3-chlorobenzoate degrading membrane biofilm reactor: indications for involvement of in situ horizontal transfer of the *clc*-element from inoculum to contaminant bacteria [J]. Environmental Microbiology, 2002, **4**(2): 70 ~ 80.
- [14] Ghysels W, Springael D, Dong Q. Bioaugmentation with the *clc*-element carrying *Pseudomonas putida* BN210 in a membrane separation bioreactor [J]. Water Science and Technology, 2000, **41**(10): 279 ~ 286.
- [15] 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.
- [16] Strong L C, McTavish H, Sadowsky M 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.
- [17] 刘锐. 一体式膜-生物反应器的微生物代谢特性及膜污染控制 [D]. 北京: 清华大学环境科学与工程系, 2001.
- [18] Downing H F, Delorenzo M E, Fulton M H, et al. Effects of the agricultural pesticides atrazine, chlorothalonil, and endosulfan on South Florida microbial assemblages [J]. Ecotoxicology, 2004, **13**: 245 ~ 260.
- [19] Nsabinmana E, Bohatier J, Belan A, et al. Effects of the herbicide atrazine on the activated sludge process: microbiology and functional views [J]. Chemosphere, 1996, **33**: 479 ~ 494.