

基因工程菌生物强化膜-生物反应器工艺启动期影响因素研究

刘春, 黄霞*, 王慧

(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)

摘要: 基因工程菌生物强化膜-生物反应器工艺经过启动期之后, 可以实现对阿特拉津的高效稳定去除, 去除率在 90% 以上. 不同条件下, 启动期最短 2 d, 最长可达 12 d. 阿特拉津初始进水负荷、运行温度和工程菌接种密度, 对启动期具有显著影响. 增加阿特拉津初始进水负荷、提高运行温度和增加基因工程菌接种密度, 可以实现快速启动. 进水水质对启动期影响不大, 在人工配水和实际污水 2 种进水条件下, 启动期基本相同, 而且稳定期 2 种进水的阿特拉津去除情况也没有差异, 说明进水水质对启动期和稳定期阿特拉津的去除影响都不大.

关键词: 生物强化; 基因工程菌; 膜-生物反应器; 阿特拉津; 启动期; 影响因素

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)05-1102-05

Influencing Factors on Start-up Period in a Bioaugmented Membrane Bioreactor Using Genetically Engineered Microorganism (GEM)

LIU Chun, HUANG Xia, WANG Hui

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: High and stable atrazine removal could be obtained after a start-up period in a membrane bioreactor (MBR) bioaugmented with genetically engineered microorganism (GEM) and the removal efficiency was above 90%. The shortest start-up period was 2 d and the longest one was 12 d under different conditions. Initial influent atrazine loading, operation temperature and initial population size of GEM affected the start-up period greatly. High initial influent atrazine loading, high operation temperature and large initial population size of GEM were favorable to shorten the start-up period. The characteristics of the influent had little effect on the start-up period. When other conditions were identical, two kinds of influents, synthetic wastewater and real domestic wastewater, had the same start-up periods. Moreover, after the start-up period, atrazine removal had also no difference with these two influents in the following stable period. Then it could be concluded that the characteristics of the influent influenced atrazine removal little not only in the start-up period but also in the stable period.

Key words: bioaugmentation; GEM; MBR; atrazine; start-up period; influencing factors

阿特拉津是世界上使用最广泛的除草剂, 已有 50 多年的应用历史, 每年施用量达到 70 000 ~ 90 000 t^[1]. 阿特拉津施用后会在田间残留, 并且迁移进入地下水和地表水, 是世界各地地下水和地表水中检出最多的除草剂. 阿特拉津废水的不当排放还会引起农作物减产和饮用水源污染^[2]. 各国对天然水体中的阿特拉津浓度制定了严格的控制标准, 美国 EPA 的标准为 3 $\mu\text{g/L}$, 欧盟的标准是 1 $\mu\text{g/L}$, 南非的标准是 2 $\mu\text{g/L}$, 此外, 欧盟的饮用水标准中, 阿特拉津浓度应该低于 0.1 $\mu\text{g/L}$. 但是, 很多地方的天然水体中的阿特拉津浓度都超出了这些标准^[3~7].

由于阿特拉津的生物降解性比较差, 采用传统的生物处理工艺对废水中的阿特拉津去除效果不甚理想^[8~10], 因此很多研究者都尝试采用物化工艺来实现对阿特拉津的高效去除, 比如零价铁还原、高级氧化技术^[11~16]、吸附剂吸附^[17~20]等.

生物强化可以改善传统生物处理工艺对难降解污染物去除效果. 本研究利用基因工程菌对阿特拉津的生物强化去除作用, 考察了在不同阿特拉津初始进水负荷、运行温度、工程菌接种密度和进水水质等操作条件下, 膜-生物反应器 (membrane bioreactor, MBR) 对阿特拉津生物强化去除的启动过程, 分析了操作条件对阿特拉津去除启动期的影响, 在 MBR 中实现生物强化去除阿特拉津的快速启动和高效去除.

1 材料与方法

1.1 菌株和菌悬液的制备

收稿日期: 2006-07-19; 修订日期: 2006-10-09

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418506)

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

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^[21].

挑单菌落于 LB 培养基中(含氯霉素 25 $\mu\text{g/mL}$),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(D)值的标准直线,然后在实验中,通过测定 600 nm 波长下的 D 值,计算菌悬液细胞的密度.

1.2 膜-生物反应器(MBR)

采用一体式膜-生物反应器开展实验.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 .

1.3 阿特拉津生物强化去除启动期实验

MBR 接种北京清河污水处理厂的二沉池回流污泥,污泥浓度为 3 ~ 4 g/L,运行 3 d,反应器运行基本稳定后,在不同的阿特拉津进水负荷、运行温度、基因工程菌接种密度以及不同的进水水质条件下,测定 MBR 完成生物强化去除阿特拉津启动的时间(从开始运行到达到稳定高效去除效果的时间),反映操作条件对启动过程的影响.反应器进水为人工配水^[22](COD 值的范围为 400 ~ 700 mg/L)和清华大学校园生活污水(COD 平均值约为 240 mg/L),进水中含有一定浓度的阿特拉津.MBR 中 DO 在 4 ~ 5 mg/L, pH 值保持在中性.启动期实验条件如表 1 所示.

表 1 启动期实验条件

Table 1 Operation parameters of MBR in start-up period				
编号	进水负荷 / $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$	运行温度 / $^{\circ}\text{C}$	工程菌密度 / $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	进水水质
1	15.0	30	0.030	人工配水
2	28.2	30	0.030	人工配水
3	48.4	30	0.030	人工配水
4	54.0	20	0.030	人工配水
5	16.9	室温(平均 < 15)	0.030	人工配水
6	29.8	30	0.045	人工配水
7	27.9	30	0.030	实际污水

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:流动相配比为甲醇:水 = 70:30,检测波长为 223 nm.

COD、污泥浓度等指标的测定均采用国家标准方法^[23].

2 结果与讨论

2.1 初始进水负荷对阿特拉津生物强化去除启动期的影响

在一般反应器的启动过程中,污染物进水负荷过高,可能会对反应器中的生物活性产生抑制作用,不利于反应器启动.但是,在生物强化的反应器中,进水负荷的增加可能会有利于接种菌株的生存和活性发挥,促进反应器启动.以 MBR 开始运行到去除率达到 90% 以上并保持稳定的时间为启动期,在运行温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、工程菌接种密度为 0.030 mg/mL 时,不同的阿特拉津初始平均进水负荷对启动期的影响如图 1 所示.可以看到,随着初始平均进水负荷的增加,启动时间不断缩短:实验 1 的初始平均进水负荷为 15.0 mg/(L $\cdot$ d),启动时间约为 6 ~ 7 d;实验 2 的初始平均进水负荷为 28.2 mg/(L $\cdot$ d),启动时间接近 5 d;实验 3 的初始平均进水负荷为 48.4 mg/(L $\cdot$ d),启动时间为 2 d.进水负荷的增加可以形成和保持较强的环境选择压力,有利于基因工程菌的生存和活性的保持,更好地发挥生物强化去除作用,因此可以缩短启动时间.

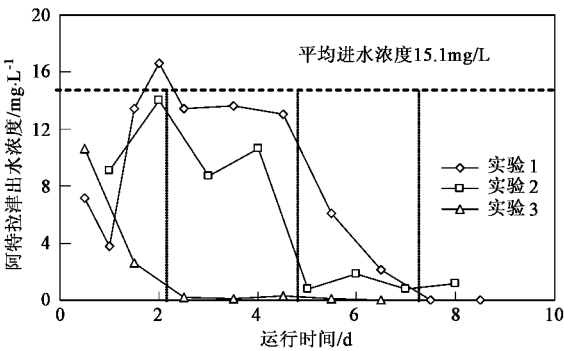


图 1 进水负荷对启动期的影响

Fig. 1 Influence of the atrazine influent loading on the start-up period

2.2 运行温度对阿特拉津生物强化去除启动期的影响

反应器运行温度是影响工程菌生存和活性的重要环境因素,因此对反应器的启动过程有重要影响.在基本相同的阿特拉津初始进水负荷和基因工程菌接种密度条件下,不同的运行温度对启动期的影响如图 2 所示.实验 3、4 的初始平均进水负荷很高,启动期比低进水负荷的实验 1、5 明显缩短,这和前面的实验结果相符.同时,在其它条件相同时,实验 4

的运行温度为 20℃,启动期为 4 d,实验 3 的运行温度为 30℃,启动期为 2 d,可见降低运行温度,启动期明显延长;在低进水负荷的实验 1、5 中,实验 5 在室温下运行(北京,10 月),运行平均温度低于 15℃,启动期接近 12 d,大大超出实验 1 在 30℃的运行温度下 6~7 d 的启动期,说明运行温度对启动的影响非常显著.基因工程菌的适宜温度为 37℃,运行温度较高,接近适宜温度时,基因工程菌的生存能力和活性也较高,可以缩短启动期,而如果运行温度过低,则对启动非常不利.

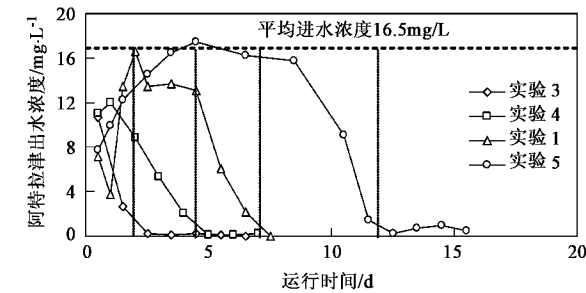


图 2 运行温度对启动期的影响

Fig.2 Influence of the operation temperature on the start-up period

2.3 接种密度对阿特拉津生物强化去除启动期的影响

生物强化反应器的启动过程中,基因工程菌种群密度是重要的影响因素,除了反应器环境因素会影响工程菌的种群密度外,初始接种密度也是启动阶段影响反应器中种群密度的重要操作条件.在基本相同的阿特拉津进水负荷和运行温度下,不同的基因工程菌接种密度对启动的影响如图 3 所示.可以看到实验 2 的工程菌接种密度为 0.030 mg/mL,启动时间为 5 d,而实验 6 的工程菌接种密度增加到 0.045 mg/mL,启动时间不足 2 d,提高工程菌密度显著缩短了启动时间.提高工程菌的接种密度有利于反应器中维持较高的工程菌种群密度,有利于工程菌生物强化作用的发挥,因此可以缩短启动时间.

2.4 进水水质对阿特拉津生物强化去除启动期的影响

本研究中所使用的基因工程菌只能实现阿特拉津向羟基阿特拉津的转化,和反应器土著生物共同作用才能实现阿特拉津完全降解,而进水阿特拉津的浓度很低,不足以提供反应器生物生长所需要的碳源,因此生物强化去除阿特拉津需要提供额外的碳源供工程菌和土著生物利用.研究中采用了 2 种不同碳源组成的水质:一是人工配水,碳源组成比较

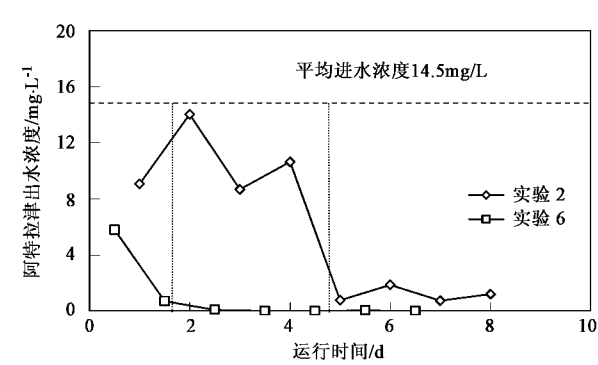


图 3 工程菌初始密度对启动期的影响

Fig.3 Influence of the initial density of GEM cells on the start-up period

单一,主要是葡萄糖,而且碳源浓度较高;二是实际生活污水,碳源组成复杂,而且碳源浓度较低,这 2 种水中含有一定浓度的阿特拉津,作为反应器进水.

在相同的初始进水阿特拉津负荷、运行温度和工程菌接种密度条件下,2 种进水 COD 负荷和去除情况如图 4 所示.可以看到,由于 2 种污水 COD 浓度的不同,COD 进水负荷存在差异,人工配水的进水负荷范围是 0.8~1.4 g/(L·d),而实际污水的进水负荷为 0.2~0.6 g/(L·d).尽管人工配水的进水 COD 负荷比实际污水的高,但 COD 负荷去除率为 0.929,显著高于实际污水的 0.748.可见 2 种进水水质条件有很大的差异,人工配水碳源在数量和可利用程度上都显著优于实际污水.

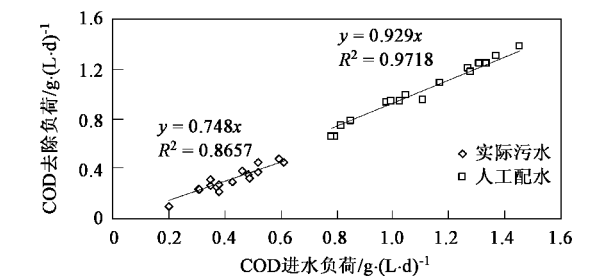


图 4 2 种进水的 COD 进水负荷和去除负荷的关系

Fig.4 Relationships between COD loading and COD removal rate with two kinds of influents

在 2 种进水水质差异显著的情况下,阿特拉津生物强化去除的启动过程如图 5 所示.可以看到,实验 2 进水为人工配水,实验 7 进水为实际污水,2 种进水水质条件下的启动时间基本相当,都是 5 d,这个结果说明尽管 2 种进水水质差异显著,但是对启动期的影响并不显著.而且反应器运行中阿特拉津随时间的去除曲线非常接近,可见,进水碳源只要能满足工程菌和土著生物生长的需要,对阿特拉津去

除的影响并不显著。

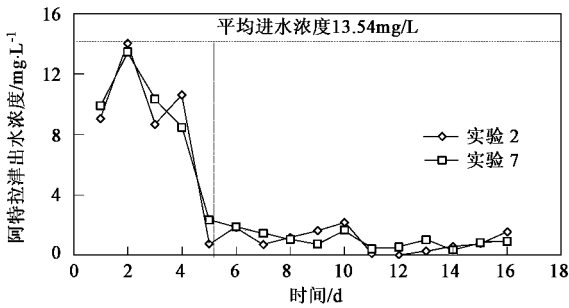


图 5 进水水质对启动期的影响

Fig.5 Influence of the influent characteristics on the start-up period

在 2 种进水条件下,经过启动期进入稳定去除期之后,阿特拉津的去除负荷如图 6 所示.可以看到,阿特拉津进水负荷范围相同时,2 种进水条件下,阿特拉津的去除负荷也基本相当.人工配水的负荷去除率为 0.929,略高于实际污水的 0.915,但是非常接近,差异远不如 COD 负荷去除率那么显著.这个结果说明,在启动期和稳定期,进水碳源的特性对阿特拉津的去除影响都不大。

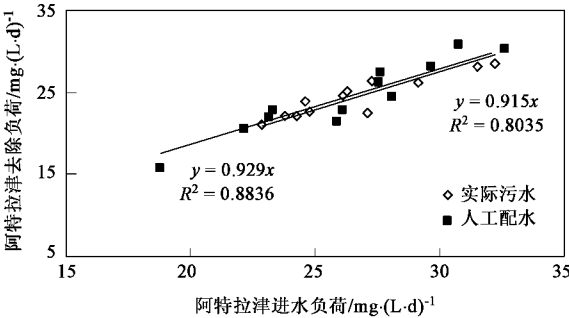


图 6 2 种进水条件下阿特拉津在稳定期的去除

Fig.6 Atrazine removal in the stable period with two kinds of influents

3 结论

- (1)启动期是 MBR 生物强化去除阿特拉津的关键步骤,不同条件下,启动期最短为 2 d,最长可达 12d.
- (2)阿特拉津初始进水负荷、运行温度、基因工程菌接种密度对启动过程影响显著;增加阿特拉津初始进水负荷,提高运行温度,增加接种密度,可以显著缩短启动时间.
- (3)进水水质对启动过程影响不大,其它条件不变时,在进水水质差异显著的人工配水和实际生活污水条件下,启动时间几乎相同;而且在稳定期,阿特拉津的去除情况也基本没有差异,说明进水水质

对阿特拉津的去除过程影响不大。

致谢:感谢南开大学蔡宝立教授赠送菌株。

参考文献:

[1] Steinberg C E W, Lorenz R, Spieser O H. Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. *Water Research*, 1995, **29**: 981 ~ 985.

[2] Ren J, Jiang K. Impact of atrazine disposal on the water resources of the Yang River in Zhangjiakou area in China [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicity*, 2002, **68**: 893 ~ 900.

[3] Van Maanen J M S, De Vaan M A J, Veldstra A W F, *et al.* Pesticides and nitrate in groundwater and rainwater in the province of Limburg in the Netherlands [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2001, **72**: 95 ~ 114.

[4] Cerejeira M J, Viana P, Batista S, *et al.* Pesticides in Portuguese surface and ground waters [J]. *Water Research*, 2003, **37**: 1055 ~ 1063.

[5] Rebich R A, Coupe R H, Thurman E M. Herbicide concentrations in the Mississippi River Basin: the importance of chloroacetanilide herbicide degradates [J]. *Science of the Total Environment*, 2004, **321**: 189 ~ 199.

[6] Sánchez-Camazano M, Lorenzo L F, Sánchez-Martín M J. Atrazine and alachlor inputs to surface and ground waters in irrigated corn cultivation areas of Castilla-Leon region, Spain [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2005, **105**: 11 ~ 24.

[7] Guzzella L, Pozzoni F, Giuliano G. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy [J]. *Environment Pollution*, 2006, **142**: 344 ~ 353.

[8] Protzman R S, Lee P H, Ong S K, *et al.* Treatment of formulated atrazine rinsate by *Agrobacterium radiobacter* strain J14a in a sequencing batch biofilm reactor [J]. *Water Research*, 1999, **33**: 1399 ~ 1404.

[9] Kontchou C Y, Gschwind N. Biodegradation of s-triazine compounds by a stable mixed bacterial community [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1999, **43**: 47 ~ 56.

[10] Ghosh P K, Philip L. Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium [J]. *Water Research*, 2004, **34**: 2277 ~ 2284.

[11] Dombek T, Dolan E, Schultz J, *et al.* Rapid reductive dechlorination of atrazine by zero-valent iron under acidic conditions [J]. *Environmental Pollution*, 2001, **111**: 21 ~ 27.

[12] Horikoshi S, Hidaka H. Non-degradable triazine substrates of atrazine and cyanuric acid hydrothermally and in supercritical water under the UV-illuminated photocatalytic cooperation [J]. *Chemosphere*, 2003, **51**: 139 ~ 142.

[13] Saltmirasa D A, Lemley A T. Atrazine degradation by anodic Fenton treatment [J]. *Water Research*, 2002, **36**: 5113 ~ 5119.

[14] Ma J, Graham N J D. Degradation of atrazine by manganese-catalysed ozonation: influence of radical scavengers [J]. *Water Research*, 2000, **34**: 3822 ~ 3828.

[15] Farré M J, Franch M I, Malato S, *et al.* Degradation of some biorecalcitrant pesticides by homogeneous and heterogeneous photocatalytic ozonation [J]. *Chemosphere*, 2005, **58**: 1127 ~ 1133.

[16]

Rodríguez E M, Álvarez P M, Rivas F J, *et al.* Wet peroxide degradation of atrazine[J]. *Chemosphere*, 2004, **54**: 71 ~ 78.

[17]

Campos C, Snoeyink V L, Mariñas B, *et al.* Atrazine removal by powdered activated carbon in floc blanket reactors [J]. *Water Research*, 2000, **34**: 4070 ~ 4080.

[18]

Brown N W, Roberts E P L, Chasiotis A, *et al.* Atrazine removal using adsorption and electrochemical regeneration [J]. *Water Research*, 2004, **38**: 3067 ~ 3074.

[19]

Ureña-Amate M D, Socías-Viciana M, González-Pradas E, *et al.* Effects of ionic strength and temperature on adsorption of atrazine by a heat treated kerolite[J]. *Chemosphere*, 2005, **59**: 69 ~ 74.

[20]

Lemić J, Kovacčević D, Tomašević-Čanović M, *et al.* Removal of atrazine, lindane and diazinone from water by organo-zeolites[J]. *Water Research*, 2006, **40**: 1079 ~ 1085.

[21]

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.

[22]

Huang X, Liu R, Qian Y. Behavior of soluble microbial products in a membrane bioreactor[J]. *Process Biochemistry*, 2000, **36**: 401 ~ 406.

[23]

国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京:中国环境科学出版社,2002.



《环境科学》征稿简则

1. 来稿报道成果要有创新性,论点明确,文字精炼,数据可靠.全文不超过 8000 字(含图、表、中英文摘要及参考文献).国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、国际合作项目或其它项目请在来稿中注明(在首页以脚注表示).作者投稿时请先登陆我刊网站(www.hjkx.ac.cn)进行注册,注册完毕后以作者身份登录,按照页面给出的提示信息投稿即可.
2. 稿件请按 GB 7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》中学术论文的规范撰写.论文各部分的排列顺序为:题目;作者姓名;作者工作单位、地址、邮政编码;中文摘要;关键词;中图分类号;英文题目;作者姓名及单位的英译名;英文摘要;关键词;正文;致谢;参考文献.
3. 论文题目应简练并准确反映论文内容,一般不超过 20 字,少用副标题.
4. 中文摘要不少于 300 字,以第三人称写.摘要内容包括研究工作的目的、方法、结果(包括主要数据)和结论,重点是结果和结论.英文摘要与中文对应,注意人称、时态和语言习惯,以便准确表达内容.
5. 前言包括国内外前人相关工作(引文即可)和本工作的目的、特点和意义等.科普知识不必赘述.
6. 文中图表应力求精简,同一内容不得用图表重复表达,要有中英文对照题目.图应大小一致,曲线粗于图框,图中所有字母、文字字号大小要统一.表用三线表.图表中术语、符号、单位等应与正文一致.
7. 计量单位使用《中华人民共和国法定计量单位》(SI).论文中物理计量单位用字母符号表示,如 mg(毫克),m(米),h(小时)等.科技名词术语用国内通用写法,作者译的新名词术语,文中第一次出现时需注明原文.
8. 文中各级标题采用 1,1.1,1.1.1 的形式,左起顶格书写,3 级以下标题可用(1),(2)……表示,后缩 2 格书写.
9. 文中外文字母、符号应标明其大小写,正斜体.生物的拉丁学名为斜体.缩略语首次出现时应给出中文全称,括号内给出英文全称和缩略语.
10. 未公开发表资料不列入参考文献,可在出现页以脚注表示.文献按文中出现的先后次序编排.常见文献书写格式为:
期刊:作者(外文也要姓列名前).论文名[J].期刊名,年,卷(期):起页~止页.
图书:作者.书名[M].出版地:出版社,年.起页~止页.
会议文集:作者.论文名[A].见(In):编者.文集名[C].出版地:出版社(单位),年.起页~止页.
学位论文:作者.论文名[D].保存地:保存单位,年份.
报告:作者.论文名[R].出版地.出版单位,出版年.
专利:专利所有者.专利题名[P].专利国别:专利号,出版日期.
11. 来稿文责自负,切勿一稿多投.编辑对来稿可作文字上和编辑技术上的修改和删节.在 3 个月内未收到本刊选用通知,可来电询问.对未刊稿件一般不退,请作者自留底稿.
12. 投稿请附作者单位详细地址,邮编,电话号码,电子邮箱等.编辑部邮政地址:北京市 2871 信箱;邮编:100085;电话:010-62941102,010-62849343;传真:010-62849343;E-mail: hjkx@rcees.ac.cn;网址:www.hjkx.ac.cn