

MBR 运行初期对基因工程菌的截留特性研究

刘春* 杨景亮 李再兴 郭建博

(河北科技大学环境科学与工程学院 石家庄 050018)

摘要: 在膜-生物反应器(MBR)中实施基因工程菌生物强化时, 运行初期基因工程菌流失是生态风险评价的重要内容。在一体式微滤膜-生物反应器中, 考察了运行初期不同运行条件对基因工程菌流失密度和截留效率的影响, 并对截留特性进行了探讨。结果表明, 膜-生物反应器运行初期, 不同运行条件对基因工程菌的截留效率影响不同: 污泥浓度增加, 截留效率提高; 提高膜通量和曝气量, 截留效率降低。基因工程菌接种密度为 1.0×10^{10} CFU/mL 时, 不同运行条件下的流失密度为 1.0×10^2 CFU/mL ~ 2.5×10^2 CFU/mL, 最大截留效率大于 8 lg。膜-生物反应器运行初期, 膜组件截留、污泥吸附以及对悬浮细胞迁移阻碍是影响截留效率的主要因素, 一定条件下其截留效率贡献率分别为 82.3%、14.9% 和 2.8%。膜-生物反应器稳定运行过程中形成凝胶层, 可以提高截留效率。一定条件下, 膜组件、污泥和凝胶层对基因工程菌的截留贡献率分别为 75.3%、10.7% 和 14.0%。
关键词: 膜-生物反应器, 基因工程菌, 截留特性

Interception Characteristics of MBR for Genetically Engineered Microorganism (GEM) at the Beginning of Operation

LIU Chun* YANG Jing-Liang LI Zai-Xing GUO Jian-Bo

(School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

Abstract: The leakage of genetically engineered microorganism (GEM) at the beginning of operation was the important content for ecological risk assessment when GEM was inoculated in a membrane bioreactor (MBR) for bioaugmentation. The effects of different operating conditions on leaking density and intercepting efficiency of GEM were investigated in a submerged microfiltration MBR at the beginning of operation. The interception characteristics were also discussed. The results showed that different operating conditions had different influences on intercepting efficiency: higher sludge concentration was profit for interception, while higher aeration intensity and flux had opposite effects on interception. When the inoculated density of GEM was 1.0×10^{10} CFU/mL, the leaking densities varied from 1.0×10^2 CFU/mL to 2.5×10^2 CFU/mL under different operating conditions at the beginning of operation and the maximum intercepting efficiency could be higher than 8 lg. The main factors determining intercepting efficiency at the beginning of operation were membrane module interception, sludge adsorption as well as suspended GEM transfer inhibition and their contribution shares under certain conditions were 82.3%, 14.9% and 2.8%, respectively. Gel layer formation during MBR stable operation was helpful to increase intercepting efficiency. The contribution shares for GEM interception of membrane module, sludge and gel layer were 75.3%, 10.7% and 14.0%, respectively,

under certain conditions.

Keywords: Membrane bioreactor, Genetically engineered microorganism (GEM), Interception characteristics

具有生物陌生性和生物毒性的人工合成化学品往往具有生物难降解性,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,需要采取生物强化处理措施提高去除效果^[1]。基因工程菌生物强化是提高难降解污染物生物去除效率的有效途径,但也存在效果不稳定^[2,3]和具有一定生态风险的问题^[4]。针对这些问题,研究者不断尝试一些新技术和新方法来改进生物强化效果的稳定性^[5,6];并对基因工程菌在土壤生物修复中的生态影响^[7,8]及控制措施^[9,10]进行了研究。在废水生物处理中,基因工程菌生物强化效果及其稳定性的研究较多,而基因工程菌流失的生态风险,特别是生态风险的控制措施研究还很缺乏。

膜-生物反应器(Membrane bioreactor, MBR)是实施基因工程菌生物强化废水处理的理想工艺,其工艺优势有助于提高强化效果和控制生态风险。已有研究表明,与传统活性污泥法相比,基因工程菌生物强化作用在膜-生物反应器中具有更强的稳定性^[11-13];而且,膜-生物反应器对细菌细胞具有很高的截留效率^[14,15],有助于控制基因工程菌流失,但是,膜-生物反应器对基因工程菌的截留特性研究报道很少。特别是运行初期(或膜组件清洗之后),凝胶层尚未形成,基因工程菌截留主要依靠膜组件,截留作用较弱;如果同时接种基因工程菌,反应器内基因工程菌密度最大,则此时基因工程菌流失最为严重。这种状态在生态风险研究和评价中应予以重点关注。

本研究采用 1 株阿特拉津降解基因工程菌,考察了一体式微滤膜-生物反应器在运行初期(同时是基因工程菌接种初期)对基因工程菌的截留效率,分析了膜-生物反应器运行条件对截留效率的影响,确定了截留效率的主要影响因素,初步探讨了各因素的截留效率贡献率,为膜-生物反应器应用于基因工程菌废水生物强化处理的生态风险评估积累了基础数据。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素),在 37 $^{\circ}\text{C}$, 120 r/min~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。

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 。

仅考察膜-生物反应器运行初期的截留特性。每次运行前,膜组件经过彻底清洗(清水和 0.5%次氯酸钠溶液擦洗膜面),基本恢复其清水通量。由于运行时间较短,跨膜压差(TMP)的变化不大。曝气强度为 60 $\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ (接近经济曝气量^[16])。

1.3 膜-生物反应器对基因工程菌的截留特性实验

在一定的运行条件下,开始运行后向膜-生物反应器中接种一定密度的基因工程菌,同时检测膜-生物反应器出水中基因工程菌的流失密度,计算该运行条件下的截留效率。由于流失密度与接种密度存在数量级上的差异,因此将截留效率定义为: $-\lg(\text{流失密度}/\text{接种密度})$ 。由于接种基因工程菌后,即迅速测定出水中基因工程菌流失密度,所以可以忽略土著生态系统对反应器内基因工程菌密度变化的影响,此时可获得反应器内基因工程菌密度最大(即接种密度)时的流失密度。

改变污泥浓度(接种石家庄桥西污水处理厂二沉池回流污泥)、膜通量、曝气量等运行条件,测定膜-生物反应器的截留效率,考察不同运行条件下的截留效率变化。

1.4 基因工程菌密度检测

出水中基因工程菌密度利用抗生素抗性(含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素)LB 培养基平板,采用稀释平板法测定。每个运行条件下,取运行初期 10 min 出水的混合样品。每个样品取 3 个稀释度,每个稀释度取 2 个平行样,菌落数目取平均值。未接种基因工程菌时,出水中抗生素抗性菌落的背景值基本为 0(多数

样品未检出, 个别样品极少菌落检出), 不会对检测产生影响。

2 结果与讨论

2.1 不同操作运行条件下的截留特性

2.1.1 污泥浓度: 膜-生物反应器中的污泥浓度为 0 g/L、2.5 g/L、5.0 g/L 和 10.0 g/L, 膜通量为 10 L/(m²·h)。在反应器运行初期, 接种基因工程菌悬液, 使反应器中基因工程菌的终密度为 1.0×10^{10} CFU/mL。测定出水中基因工程菌的流失密度, 并计算截留效率(图 1)。

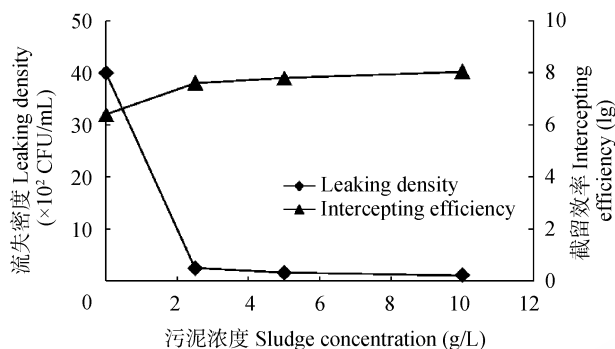


图 1 MBR 初始运行阶段污泥浓度对流失密度和截留效率的影响

Fig. 1 Influence of sludge concentration on leaking density and intercepting efficiency at the beginning of MBR operation

可以看到, 膜组件单独作用即对基因工程菌具有很高的截留效率, 可以达到 6.4 lg。污泥的存在强化了膜-生物反应器的截留作用, 污泥浓度为 2.5 g/L 时, 截留效率提高到 7.6 lg; 随着污泥浓度的增加, 截留效率进一步提高, 污泥浓度为 10 g/L 时, 截留效率可以达到 8.0 lg, 流失密度降低到 1.1×10^2 CFU/mL。污泥浓度的影响主要体现在两个方面。首先, 污泥对基因工程菌的吸附作用降低了上清液中悬浮细胞的密度, 使上清液中悬浮细胞的密度降低 1 个数量级左右, 而且污泥浓度越高, 降低幅度越大(图 2)。污泥吸附的基因工程菌不会穿过膜孔流失, 上清液悬浮细胞是流失主体, 悬浮细胞密度降低造成出水流失密度降低, 从而提高截留效率。同时, 污泥的存在也会影响悬浮细胞向膜面的迁移, 从而使膜面附近悬浮细胞密度降低, 对出水中流失密度的降低也有贡献。

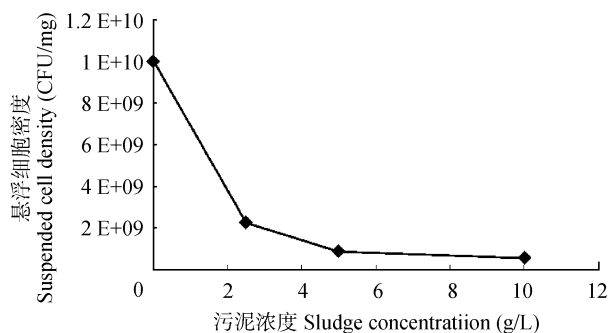


图 2 不同污泥浓度下 MBR 中上清液悬浮细胞密度
Fig. 2 Suspended GEM densities in the supernatant of MBR under different sludge concentration conditions

2.1.2 膜通量: 膜通量是膜-生物反应器的重要运行参数。在 2 个污泥浓度(0 g/L 和 5.0 g/L)下, 接种基因工程的终密度为 1.0×10^{10} CFU/mL, 膜通量为 10.0 L/(m²·h)、15.0 L/(m²·h)、20.0 L/(m²·h) 和 25.0 L/(m²·h) 时, 测定膜-生物反应器运行初期基因工程菌的流失密度, 并计算截留效率(图 3)。

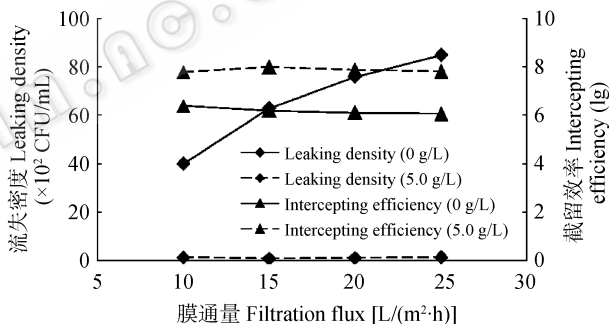


图 3 不同污泥浓度下膜通量对流失密度和截留效率的影响

Fig. 3 Influence of the flux on leaking density and intercepting efficiency with different sludge concentration

可以看到, 随着膜通量的增加, 流失密度增大, 截留效率降低。其原因在于膜通量增加, 悬浮细胞向膜面的迁移加快, 同时, 膜孔的过水流速增大, 对截留效果造成不利影响。膜组件单独作用时, 这种不利影响尤为显著; 污泥存在时, 可以阻碍悬浮细胞向膜面的迁移, 从而降低由于膜通量增大带来的不利影响。

2.1.3 曝气强度: 曝气强度是决定膜-生物反应器内水动力学条件的主要运行参数, 改变曝气强度可能影响截留效果。在污泥浓度为 5.0 g/L, 接种基因工程的终密度为 1.0×10^{10} CFU/mL, 膜通量为 10.0 L/(m²·h) 的条件下, 比较了正常曝气(曝气量

60 m³/(m²·h))和曝气量为 0(轻微搅拌以防止污泥沉降)的条件下,基因工程菌的流失密度和截留效率(图 4)。

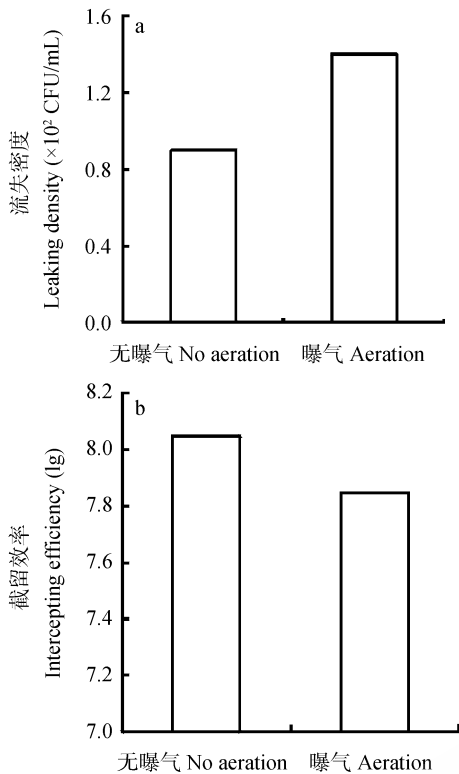


图 4 曝气和无曝气条件下流失密度和截留效率
Fig. 4 The leaking density (a) and intercepting efficiency (b) with and without aeration

可以看到,曝气量的变化对流失密度和截留效率具有一定的影响,在极端的无曝气条件下,截留效率有所提高,但变化并不显著。曝气能够增加水流的湍动程度,有利于基因工程菌细胞的迁移和扩散,因此和无曝气相比,膜面附近的悬浮细胞密度较高,因此造成出水流失密度增加。

2.2 膜组件及污泥对截留作用的贡献率

2.2.1 运行初期膜组件截留、污泥吸附和悬浮细胞迁移阻碍的贡献率:膜-生物反应器运行初期,膜面不会形成泥饼层和凝胶层,截留效率的贡献因素主要是膜组件截留、污泥吸附以及对悬浮细胞向膜面迁移的阻碍,此时,膜-生物反应器处于截留效率最低的运行状态,当接种基因工程菌终密度为 1.0×10^{10} CFU/mL 时,最大流失密度为 1.0×10^2 CFU/mL~ 2.5×10^2 CFU/mL (不同运行条件下)。

在污泥浓度为 5.0 g/L,膜通量为 10.0 L/(m²·h),曝气强度为 60 m³/(m²·h)条件下,接种基因工程的终

密度为 1.0×10^{10} CFU/mL,膜组件、污泥吸附和迁移阻碍同时作用时,流失密度为 1.42×10^2 CFU/mL,截留效率为 7.84 lg;沉降去除污泥后,排除迁移阻碍的影响,膜组件和污泥吸附作用时,流失密度为 2.4×10^2 CFU/mL,截留效率降为 7.61 lg;膜组件单独作用时流失密度为 35×10^2 CFU/mL,截留效率降为 6.45 lg。可以看到,膜组件、污泥吸附和迁移阻碍对截留效率的贡献率分别为 82.3%、14.9%和 2.8%,膜组件和污泥吸附是截留效率的主要贡献因素。

2.2.2 运行一定时间后膜组件、污泥和凝胶层的贡献率:膜-生物反应器在稳定运行中,膜面会逐渐形成凝胶层(膜污染加剧时,还会形成泥饼层,但破坏稳定运行),强化膜组件的截留作用,从而提高截留效率。在污泥浓度为 5 g/L,膜通量为 10.0 L/(m²·h),曝气强度为 60 m³/(m²·h)条件下,稳定运行 1 周,使膜面形成一定的凝胶层。在此条件下,接种基因工程的终密度为 1.0×10^{10} CFU/mL,膜组件、凝胶层和污泥同时作用时,流失密度为 0.21×10^2 CFU/mL,截留效率为 8.68 lg;取出膜组件,凝胶层和膜组件同时作用时(在清水中),流失密度为 1.79×10^2 CFU/mL,截留效率为 7.75 lg;膜组件单独作用时,流失密度为 29×10^2 CFU/mL,截留效率为 6.54 lg。

可以看到,和运行初期相比,MBR形成一定的凝胶层之后,截留效率得到进一步强化,流失密度降低到 0.21×10^2 CFU/mL,截留效率提高到 8.68 lg。膜组件、凝胶层和污泥的截留效率贡献率分别为 75.3%、14.0%和 10.7%。可以预计,如果运行时间延长,形成更为稳定的凝胶层,截留效率还会进一步提高。以上结果说明,膜组件的筛分作用是基因工程菌截留的主要作用,而污泥和凝胶层的存在强化了截留效果,进一步提高了截留效率。

尽管膜组件的筛分作用是主要作用,但是污泥和凝胶层对截留效率的提高也具有重要意义。膜组件单独作用时,流失密度达到 10^3 CFU/mL~ 10^4 CFU/mL,如果为了提高生物强化效果进一步提高接种量,流失密度还可能随之增加,在这个流失密度下,仍然存在一定的生态风险。有研究结果表明,基因工程菌接种量为 10^3 CFU/mL 时,则基因工程菌群在天然环境的土著微生态系统中基本不会产生影响^[17]。污泥和凝胶层的截留作用可以将流失密度降低到 10^1 CFU/mL~ 10^2 CFU/mL 的水平,潜在生态风险更低。

3 结论

(1) 膜-生物反应器运行初期, 不同运行条件对基因工程菌的效率截留影响不同: 污泥浓度增加, 截留效率提高; 提高膜通量和曝气量, 截留效率降低。

(2) 膜-生物反应器运行初期, 基因工程菌接种终密度为 1.0×10^{10} CFU/mL 时, 不同运行条件下的流失密度为 1.0×10^2 CFU/mL~ 2.5×10^2 CFU/mL, 最大截留效率大于 8 lg。

(3) 膜-生物反应器运行初期, 膜组件截留、污泥吸附以及对悬浮细胞的迁移阻碍是影响截留效率的主要因素, 一定条件下其截留效率贡献率分别为 82.3%、14.9%和 2.8%。

(4) 膜-生物反应器稳定运行过程中形成凝胶层, 可以提高截留效率。一定条件下, 膜组件、污泥和凝胶层对基因工程菌的截留效率贡献率分别为 75.3%、10.7%和 14.0%。

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 EM, Verstraete W. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, **50**: 16–23.
- [2] 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 Fermentation and Bioengineering*, 1998, **86**(1): 90–96.
- [3] Bryers JD, Sharp RR. Retention and expression of recombinant plasmids in suspended and biofilm bound bacteria degrading trichloroethene (TCE). *Water Science and Technology*, 1997, **36**(10): 1–8.
- [4] Drobnik J. Genetically modified organisms (GMO) in bioremediation and legislation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1999, **44**: 3–6.
- [5] Gentry TJ, Rensing C, Pepper IL. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2004, **34**: 447–494.
- [6] Thompson IP, Van der Gast CJ, Ciric L, et al. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(7): 909–915.
- [7] Bej AK, Perlin MH, Atlas RM. Effect of introducing genetically engineered microorganisms on soil microbial community diversity. *FEMS Microbiology Ecology*, 1991, **86**(2): 169–176.
- [8] Doyle JD, Shout KA, Stotzky G, et al. Ecologically significant effects of *Pseudomonas putida* PPO301(pRO103), genetically engineered to degrade 2,4-dichlorophenoxyacetate, on microbial-population and processes in soil. *Canadian Journal of microbiology*, 1991, **37**(9): 682–691.
- [9] Ronchel MC, Ramos JL. Dual system to reinforce biological containment of recombinant bacteria designed for rhizoremediation. *Applied and environmental microbiology*, 2001, **67**: 2649–2656.
- [10] Donegan K, Seidler R, Matyac C. Physical and chemical control of released microorganisms at field sites. *Canadian Journal of Microbiology*, 1991, **37**: 708–712.
- [11] 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. *Environmental Microbiology*, 2002, **4**(2): 70–80.
- [12] Ghyoot W, Springael D, Dong Q. Bioaugmentation with the *clc*-element carrying *Pseudomonas putida* BN210 in a membrane separation bioreactor. *Water Science and Technology*, 2000, **41**(10): 279–286.
- [13] 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. *环境科学*, 2007, **28**(2): 417–421.
- [14] Côté P, Buisson H. Immersed membrane activated sludge for the reuse of municipal wastewater. *Desalination*, 1997, **113**(2-3): 189–196.
- [15] Bailey AD, Hansford BS, Dold PL. The use of cross-flow microfiltration to enhance the performance of an activated sludge reactor. *Water Research*, 1994, **28**(1): 297–301.
- [16] 张传义, 王 勇, 黄 霞, 等. 一体式膜-生物反应器经济曝气量的试验研究. *膜科学与技术*, 2004, **24**(5): 11–15.
- [17] Min M, Kawabata Z, Ishii N, et al. Fate of a PCBs degrading recombinant *Pseudomonas putida* AC30 (pMFB2) and its effect on the densities of microbes in marine microcosms contaminated with PCBs. *International Journal of Environmental Studies*, 1998, **55**: 271–285.