## SPG 膜曝气-基因工程菌生物膜反应器处理阿特拉津废水研究

## 刘春🏧, 龚鹏飞, 肖太民, 张明, 年永嘉, 杨景亮, 张晶

**摘要:** 膜曝气-生物膜反应器(MABR) 是一种新型的膜-生物废水处理工艺,在MABR中采用基因工程菌生物膜可以强化难降解污染物的生物去除.本研究在 SPG 膜表面形成基因工程菌生物膜,运行 SPG 膜曝气-生物膜反应器(SPG-MABR)处理阿特拉津废水,考察了气压、 挂膜生物量和液体流速对 SPG-MABR 运行性能的影响,以及基因工程菌生物膜的变化.结果表明,提高气压可以增大透氧系数,从而提高阿特拉津和 COD 的去除速率以及复氧速率.提高挂膜生物量能够加快阿特拉津和 COD 的生物去除,但生物膜厚度增加使得氧传质阻力增大,复氧速率降低. 层流状态下减小 SPG-MABR 中的液体流速,有利于污染物向生物膜扩散传质,从而提高污染物去除速率. 气压为 300 kPa、 生物量为 25 g·m<sup>-2</sup>、 液体流速为 0.05 m·s<sup>-1</sup>时, SPG-MABR 反应器对阿特拉津 5 d 的去除率可以达到 98.6%.在 SPG-MABR 运行过程中,基因工程菌生物膜呈现微生物多态化趋势.生物膜表面逐渐被其他微生物细胞覆盖,基因工程菌分布减少,生物膜内部仍以基因工程菌细胞为主.

关键词: 膜曝气-生物膜反应器 基因工程菌 SPG 膜 阿特拉津 透氧系数

## Atrazine Wastewater Treatment in a SPG Membrane-Aerated Genetically Engineered Microorganism Biofilm Reactor

LIU Chun<sup>™</sup>, GONG Peng-fei, XIAO Tai-min, ZHANG Ming, NIAN Yong-jia, YANG Jing-liang, ZHANG Jing

Abstract: Membrane-aerated biofilm reactor (MABR) represent a novel membrane-biological wastewater treatment technology. In addition, bioaugmented treatment using genetically engineered microorganism (GEM) biofilm in MABR is proposed to improve refractory pollutant removal. In the present study, a SPG membrane aerated-biofilm reactor (SPG-MABR) with GEM biofilm formed on the SPG membrane surface was applied to treat atrazine wastewater. The influences of air pressure, biofilm biomass and liquid velocity on the performance of the SPG-MABR were investigated. The variation of GEM biofilm during the SPG-MABR operation was observed. The results indicated that the increased air pressure could promote atrazine and COD removal as well as re-oxygenation by increasing oxygen permeability coefficient. A higher biofilm biomass could also enhance atrazine and COD removal, but simultaneously reduce the re-oxygenation rate because biofilm thickness and oxygen transfer resistance increased. When liquid velocity in the SPG-MABR was decreased under laminar flow condition, atrazine and COD removal was improved due to the facilitated contaminant diffusion from wastewater to biofilm. The atrazine removal efficiency reached to 98.6% in the SPG-MABR after 5d treatment at air pressure of 300 kPa, biofilm biomass of 25 g·m<sup>-2</sup> and liquid velocity of 0.05 m·s<sup>-1</sup>. The microbial polymorphism of GEM biofilm was observed during the SPG-MABR operation. The surface of GEM biofilm was gradually covered by other microbial cells and the distribution of GEM cells reduced, but inside the GEM biofilm, the GEM cells were still dominant.

## **Key words**: membrane-aerated biofilm reactor genetically engineered microorganism SPG membrane atrazine oxygen permeability coefficient

膜曝气-生物膜反应器(membrane aerated biofilm reactor, MABR)将膜技术与生物膜技术相结合<sup>[1, 2, 3]</sup>,逐渐成为水处理工艺研究的热点之一. MABR 反应器中膜外表面附着生长生物膜,膜内腔为压缩氧气或空气,气相中的氧通过膜孔扩散进入生物膜,在生物膜内完成污染物的去除. MABR 反应器采用无泡曝气<sup>[4, 5]</sup>,氧直接以分子状态扩散进入生物膜,传质液膜阻力可以忽略,传质效率高,因而 MABR 反应器可以获得接近 100%的极高氧利用效率<sup>[6]</sup>.同时,MABR 反应器中生物膜异向传质,底物和氧的浓度梯度方向相反,有助于实现处理功能活性层化,从而具有去除有机污染物和同步硝化反硝化脱氮功能<sup>[7, 8]</sup>.

目前,MABR 中用于曝气的膜材料主要有 3 类:微孔膜、 致密膜和复合膜<sup>[2]</sup>,此外还有采用可透气性织物 或陶瓷膜进行无泡曝气的报道<sup>[9]</sup>. SPG(shirasu porous glass)膜是一种具有均匀微小孔径的无机玻璃微孔膜<sup>[10]</sup>,在 产生微气泡过程中得到应用<sup>[11, 12, 13]</sup>,也可以作为一种可能的膜材料应用于 MABR 反应器,但目前未有相关的研 究报道.

基因工程菌应用于生物强化可以有效去除难降解污染物,加速处理启动过程,提高系统抗冲击能力,增强 微生物群落结构及功能的稳定性<sup>[14, 15, 16]</sup>. 生物膜中细胞接触频率高,降解基因在生物膜中的迁移频率远远高于液 相环境<sup>[17, 18]</sup>. 运行膜曝气-基因工程菌生物膜反应器有利于降解基因在生物膜内的水平迁移,从而改善生物强化效 果及其稳定性.

阿特拉津是世界上用量最大的除草剂,环境残留严重,生态风险较高,且废水排放不当会污染水源并危害 农业生产<sup>[19, 20]</sup>.传统生物处理过程对阿特拉津的处理效果较差<sup>[21, 22]</sup>,而采用基因工程菌生物强化可以有效提高阿 特拉津生物去除效率<sup>[23, 24]</sup>.本研究在 SPG 膜表面形成基因工程菌生物膜,运行 SPG 膜曝气-生物膜(基因工程菌) 反应器(SPG-MABR)处理阿特拉津废水,考察了不同运行条件下 SPG-MABR 中基因工程菌生物膜对阿特拉津的 生物强化去除效果,并探讨了 SPG-MABR 的氧传质能力以及生物膜传质阻力和生物活性对氧传质能力的影响, 以期为难降解废水提供一种新的生物强化处理技术.

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 E. coli DH5α,质粒载体为 pUC18,携带阿特拉津脱氯水解酶基因 (atzA)、绿色荧光蛋白基因(gfp)及氨苄青霉素抗性基因<sup>[25]</sup>.

挑取单菌落于 LB 培养基中(含 60 µg·mL<sup>-1</sup>氨苄青霉素),在 37℃,120~140 r·min<sup>-1</sup>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,一定量蒸馏水重悬,制成菌悬液备用.

1.2 SPG-MABR 反应器

SPG-MABR 反应器装置如图 1 所示. SPG 膜为管式亲水膜,膜管径为 1.0 cm,膜管长为 50 cm,膜孔径 为 0.6 µm,膜面积为 1.57×10<sup>-2</sup> m<sup>2</sup>.在 SPG 膜外侧形成基因工程菌生物膜,置于不锈钢柱形反应器中,反应器 有效容积为 0.12 L,密封进水槽有效容积为 5L(即为处理水量).采用液体循环泵实现废水在反应器内的循环处理,通过调节循环流量控制反应器内液体流速.具有一定压力的空气(低于泡点压力)从 SPG 膜内侧进行无泡曝气.单纯 SPG 膜泡点压力>100 kPa,形成生物膜后泡点压力显著升高(>300 kPa).



图 1 SPG 膜曝气-基因工程菌生物膜反应器示意 Fig. 1 Schematic diagram of SPG membrane-aerated GEM biofilm reactor

1.3 SPG-MABR 反应器运行

挂膜:采用抽滤方法强化挂膜过程,以 SPG 膜为过滤介质,对 SPG 膜外侧一定量的基因工程菌悬液进行抽滤,将基因工程菌细胞截留至 SPG 膜外侧,在 SPG 膜外侧形成均匀致密的基因工程菌生物膜.

运行: 挂膜完成后,在不同的运行条件(气压、 挂膜生物量、 液体流速)下进行间歇运行实验,运行周期为 7 d,处理阿特拉津浓度为 15~20 mg·L<sup>-1</sup>的人工配水<sup>[26]</sup>,处理水量为 5 L. 测定反应器内溶解氧(DO)浓度和污染 物浓度(COD 和阿特拉津)随时间的变化,考察反应器的运行性能及运行条件的影响,并在此过程中对基因工程菌 生物膜变化进行观察.

1.4 SPG-MABR 反应器透氧系数测定

无生物膜时,测定 SPG 膜在清水中的透氧系数.加入 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>和 CoCl<sub>2</sub>去除清水中原有 DO,控制一定的 气压和流速,进行无泡曝气,测定 DO 浓度随时间变化曲线.通过式(1)线性回归得到斜率,即为单纯 SPG 膜无 泡曝气透氧系数.

$$c \times V = f \times S \times t \times p \tag{1}$$

式中,f 为透氧系数; c 为 t 时刻的 DO 浓度; V 为处理水量; S 为 SPG 膜表面积; p 为气压.

存在生物膜时,在 SPG-MABR 反应器处理废水运行过程中,测定反应器内 DO 浓度和 COD 浓度随时间的 变化曲线.在 COD 去除阶段(12~36 h),通过式(2)线性回归得到斜率,估算透氧系数.在随后的复氧阶段(72 h 后) 通过式(1)估算透氧系数.

$$\Delta c \times V = f \times S \times \Delta t \times p \tag{2}$$

式中,f 为透氧系数; Δc 为Δt 时间内 COD 的去除量; V 为处理水量; S 为 SPG 膜表面积; p 为气压. 1.5 基因工程菌生物膜观察

在 SPG-MABR 反应器运行初期和末期,从 SPG 膜上获取生物膜样品进行观察分析.通过扫描电子显微镜 (SEM)(HITACHI, S-4800-I, 日本)观察生物膜微生物相的变化.采用荧光显微镜(Motic, BA200, 中国)对生物膜 基因工程菌细胞的绿色荧光性进行观察<sup>[27]</sup>.采用荧光原位杂交(FISH)技术检测生物膜样品中 *atzA* 基因分布.所用 *atzA* 特异性荧光探针序列为: 5'-ACG GGC GTC AAT TCT ATG AC, 5'荧光物质为 FITC.杂交后的生物膜样品 置于荧光显微镜下进行观察<sup>[28]</sup>.

1.6 分析方法

DO浓度采用溶解氧测定仪(WTW cellOx 325,德国)测定. COD采用国标法测定.

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:流动相配比为甲醇 :水=70 :30,检测波长为 223 nm. 2 结果与讨论 2.1 气压对 SPG-MABR 反应器运行性能的影响

在液体流速为 0.05m ·s<sup>-1</sup>、生物量为 25 g ·m<sup>-2</sup>的条件下,比较了气压为 200 kPa 和 300 kPa 时,SPG-MABR 反应器的运行性能.废水处理过程中阿特拉津浓度变化如图 2 所示.可以看到,基因工程菌生物膜对阿特拉津具 有良好的去除效果,提高气压可以明显加快阿特拉津去除速率.气压为 300 kPa 时,基因工程菌对阿特拉津 5 d 的去除率可以达到 98.6%.



图 2 同气压下 SPG-MABR 中阿特拉津去除 Fig. 2 Atrazine removal in the SPG-MABR at different air pressures

运行过程中, DO 浓度以及 COD 浓度变化如图 3 和图 4 所示.可以看到,在初始处理阶段(0~2 d), DO 浓度迅速降低并维持在极低水平(<0.5 mg·L<sup>-1</sup>);随后在复氧过程中,DO 浓度逐渐升高并趋于稳定.同时,废水中的 COD 也是在初始处理阶段(0~3 d)去除最快,去除率接近 80%;随后 COD 几乎不再去除.这个过程反映了废水中 的有机物在好氧代谢过程中对 DO 的利用消耗过程.同时,气压较大时可以获得更快的 COD 去除速率和复氧速率.







图 4 不同气压下 SPG-MABR 运行时 COD 浓度变化 Fig. 4 COD concentrations during SPG-MABR operation at different air pressures

通常认为,氧扩散传质是 MABR 反应器运行的限制过程<sup>[2, 29]</sup>,而气压是影响氧扩散传质的重要因素,因而 气压对 MABR 运行性能具有显著影响.初始处理(COD 去除)阶段,由于 COD 的快速好氧降解,DO 在生物膜内 基本被消耗,因此液相主体中的 DO 浓度极低,可基于此阶段 COD 的去除速率估算透氧系数.此时,在 200 kPa 和 300 kPa 气压条件下,基于 COD 去除估算的透氧系数分别为2.51 g·(m<sup>2</sup>·d·bar)<sup>-1</sup>和 2.82 g·(m<sup>2</sup>·d·bar)<sup>-1</sup>. COD 去除完成后为复氧阶段,DO 开始从生物膜内扩散到液相主体,因此液相主体的 DO 浓度逐渐升高,在 200 kPa 和 300 kPa 气压条件下,通过 72 h 后的复氧曲线计算的透氧系数分别为 0.15 g·(m<sup>2</sup>·d·bar)<sup>-1</sup>和 0.29 g·(m<sup>2</sup>·d·bar)<sup>-1</sup>.可见,300 kPa 气压下的透氧系数较高,因而 SPG-MABR 反应器运行性能较好,但反应器运行 能耗也会随之增加.

此外,100 kPa 气压下单纯 SPG 膜透氧系数为 3.31 g · (m<sup>2</sup> · d · bar)<sup>-1</sup>, 与聚丙烯致密膜的透氧系数基本相当 <sup>[30]</sup>. 和单纯 SPG 膜透氧系数相比,300 kPa 气压下(气压提高 3 倍), SPG-MABR 复氧阶段的透氧系数大幅下降, 可见生物膜传质阻力显著降低了氧扩散传质的能力;同时,在 COD 去除阶段,SPG-MABR 的透氧系数大大高于 复氧阶段,接近单纯 SPG 膜透氧系数,表明生物膜内好氧降解过程对 DO 的消耗可以强化氧扩散传质<sup>[29]</sup>.

2.2 挂膜生物量对 SPG-MABR 反应器运行性能的影响

在液体流速为 0.05m ·s<sup>-1</sup>、 气压为 200 kPa 的条件下,比较了挂膜生物量为 25 g ·m<sup>-2</sup>和 50 g ·m<sup>-2</sup>时, SPG-MABR 反应器的运行性能. 废水处理过程中阿特拉津浓度变化、 DO 浓度变化和 COD 浓度变化如图 5~7

所示.可以看到,挂膜生物量较大时,污染物(阿特拉津和 COD)的去除速率有所提高,但 COD 去除后的复氧速率有所降低.



图 5 不同挂膜生物量下 SPG-MABR 中阿特拉津去除 Fig. 5 Atrazine removal in the SPG-MABR at different biofilm biomasses

当挂膜生物量从 25 g·m<sup>-2</sup>提高至 50 g·m<sup>-2</sup>时,由于 COD 去除能力提高,COD 去除阶段的透氧系数从 2.51 g·(m<sup>2</sup>·d·bar)<sup>-1</sup>提高至 3.50 g·(m<sup>2</sup>·d·bar)<sup>-1</sup>;同时由于生物膜厚度增加,增大了生物膜传质阻力,因此复氧阶段 的透氧系数从 0.15 g·(m<sup>2</sup>·d·bar)<sup>-1</sup>降低至 0.068 g·(m<sup>2</sup>·d·bar)<sup>-1</sup>.此结果进一步表明,生物膜本身具有很强的氧 传质阻力,但生物膜的代谢活性可以通过对 DO 的消耗促进氧扩散传质.



图 6 不同挂膜生物量下 SPG-MABR 运行中 DO 浓度变化 Fig. 6 DO concentrations during SPG-MABR operation at different biofilm biomasses



图 7 不同挂膜生物量下 SPG-MABR 运行时 COD 浓度变化 Fig. 7 COD concentrations during SPG-MABR operation at different biofilm biomasses

2.3 液体流速对 SPG-MABR 反应器运行性能的影响

液体中的污染物向生物膜的扩散传质是影响 SPG-MABR 运行性能的另一主要因素,而液体流速对污染物的 扩散传质具有重要影响.反应器中液体流速<0.15 m·s<sup>-1</sup>时为层流状态,此时,污染物主要以分子扩散的方式从废 水进入生物膜.

在气压为 200 kPa、 生物量为 25 g·m<sup>2</sup>的条件下,比较了液体流速为 0.025、 0.05 和 0.10 m·s<sup>-1</sup>时, SPG-MABR 反应器的运行性能. 废水处理过程中阿特拉津浓度变化如图 8 所示. 可以看到,在较小的液体流速 下,阿特拉津的去除速率较快. 同时, COD 的去除速率在较小的液体流速下也有所提高(数据未给出). 可见,在 层流状态下,降低液体流速可以增加废水与生物膜的接触时间,有利于污染物向生物膜扩散传质,从而提高污染 物去除速率.



图 8 不同液体流速下 SPG-MABR 中阿特拉津去除 Fig. 8 Atrazine removal in the SPG-MABR at different liquid velocities

需要指出的是,SPG-MABR 在不同条件下运行过程中,阿特拉津去除负荷范围为 90~260 mg ·(L ·d)<sup>-1</sup>,显 著高于基因工程菌生物强化 MBR 反应器对阿特拉津的去除负荷[70 mg ·(L ·d)<sup>-1</sup>]<sup>[23]</sup>,表现出 SPG-MABR 的工艺优势.

2.4 基因工程菌生物膜变化

对挂膜后运行初期的 SPG 膜表面基因工程菌生物膜进行观察,结果如图 9 所示. 由图 9A 可以看到,采用 抽滤方法强化挂膜,可以快速形成均匀致密的生物膜. 采用 SEM 对生物膜进行观察,可以看到生物膜细胞形态均 为杆状基因工程菌细胞[图 9B]. 基因工程菌细胞具有 *gfp* 基因标记,因此采用荧光显微镜直接观察生物膜,可以 看到生物膜中基因工程菌具有明显绿色荧光现象[图 9C]. 采用 FISH 技术对生物膜中基因工程菌进行 *atzA* 基因分布[图 9D]. 以上观察结果表明, SPG 膜表面形成了具有生物活性的基因工程菌生物膜.



图 9 运行初期 SPG 膜表面基因工程菌生物膜观察 Fig. 9 Observation of genetically engineered microorganism biofilm on the SPG membrane surface at the initial operation phase

A.SPG 膜表面生物膜; B.生物膜细胞形态; C.生物膜基因工程菌绿色荧光 观察; D.生物膜 *atzA* 基因 FISH 检测

对 SPG-MABR 反应器运行结束后的基因工程菌生物膜进行观察,结果如图 10 所示.可以看到,生物膜表面的绿色荧光现象明显减弱(图 10A1),而且生物膜表面的 atzA 基因丰度也显著降低(图 10 A2),而生物膜表面 SEM 观察表明杆状基因工程菌细胞减少,其它形态的微生物细胞大量出现(图 10 A3).可见,在 SPG-MABR 运行过程中,基因工程菌生物膜呈现微生物多态化趋势,特别是生物膜表面逐渐被其他微生物细胞覆盖,基因工程菌的分布减少.然而,在生物膜内部绿色荧光现象仍较为显著(图 10B1), atzA 基因丰度也明显高于生物膜表面(图 10B2),且细胞形态仍然以杆状基因工程菌细胞为主(图 10B3),可见生物膜内部基因工程菌保持较好,因而 MABR 反应器在运行过程中,对阿特拉津的去除性能未受到明显影响.



图 10 运行末期 SPG 膜表面基因工程菌生物膜观察 Fig. 10 Observation of genetically engineered microorganism biofilm on the SPG membrane surface at the final operation phase

A1.生物膜表面绿色荧光观察; A2.生物膜表面 atzA 基因 FISH 检测; A3.生物膜表面细胞形态; B1.生物膜内部绿色荧光观察; B2.生物膜内部 atzA 基因 FISH 检测; B3.生物膜内部细胞形态

3 结论

(1) 在 SPG-MABR 反应器运行中,提高气压可以增大透氧系数,从而提高阿特拉津和 COD 的去除速率以 及复氧速率.增加挂膜生物量能够提高阿特拉津和 COD 的去除速率;但随着生物膜厚度增加,氧传质阻力增大, 复氧速率降低. 层流状态下减小反应器中的液体流速,有利于污染物向生物膜扩散传质,从而提高污染物去除速 率.

(2) 气压为 300 kPa、 生物量为 25 g·m<sup>-2</sup>、 液体流速为 0.05 m·s<sup>-1</sup>时, SPG-MABR 反应器中基因工程菌 生物膜对阿特拉津 5 d 的去除率可以达到 98.6%.

(3) 采用抽滤方式可以在 SPG 膜表面快速形成均匀致密的基因工程菌生物膜. 在 SPG-MABR 运行过程中, 生物膜呈现微生物多态化趋势. 生物膜表面逐渐被其他微生物细胞覆盖,基因工程菌分布减少,生物膜内部仍然 以基因工程菌细胞为主.