

废水生物强化中基因工程菌的流失和环境生存状况研究

刘春^{1,2}, 黄霞^{2*}, 杨景亮¹

(1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 石家庄 050018; 2. 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:在废水生物强化处理中, 基因工程菌从生物反应器向环境的流失会造成潜在生态风险. 在传统活性污泥法反应器 (CAS) 和膜-生物反应器 (MBR) 中, 考察了 1 株降解阿特拉津基因工程菌的流失和流失后在模拟自然环境中的生存状况. 结果表明, 基因工程菌在接种初期从反应器中流失的密度最大. 在接种密度为 10^{10} CFU/mL 时, CAS 的最大流失密度接近接种密度, MBR 的最大流失密度仅有 10^2 CFU/mL. 在模拟自然环境中, 流失密度是决定基因工程菌生存状况的主要因素. 在 CAS 出水 10^{10} CFU/mL 流失密度下, 高种群密度基因工程菌在水体和土壤中生存时间较长 (30 d 以上), 潜在生态风险较高; 在 MBR 出水 10^2 CFU/mL 流失密度下, 基因工程菌在水体和土壤中很快衰亡, 潜在生态风险较小. 环境条件对基因工程菌生存状况具有影响, 提高土壤的含水率、有机质含量以及环境选择压力的存在有利于基因工程菌生存.

关键词:基因工程菌; 流失密度; 生存状况; 生态风险; 废水处理

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)09-2571-05

Leakage and Survival of Genetically Engineered Microorganism in the Environment Applied for Wastewater Bioaugmentation Treatment

LIU Chun^{1,2}, HUANG Xia², YANG Jing-liang¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Genetically engineered microorganism (GEM) leaking from bioreactors to natural environment will lead to potential ecological risk when applied for wastewater bioaugmentation treatment. An atrazine-degrading GEM was used in a conventional activated sludge bioreactor (CAS) and a membrane bioreactor (MBR) to investigate leaking density of GEM in the effluent. Survival of GEM in the simulated natural environments after leakage was also explored. The results showed that the maximum leakage happened at the initial time of GEM inoculation. When inoculating density was 10^{10} CFU/mL, the maximum leaking density from CAS was close to inoculating density as well as the maximum leaking density from MBR was only 10^2 CFU/mL. Leaking density was the key factor influencing GEM survival in the simulated environments. When leaking density from CAS reached to 10^{10} CFU/mL, GEM with high density would survive in the simulated water and soil environments for a long time (more than 30 d), which would lead to high potential ecological risk. On the contrary, when leaking density from MBR was 10^2 CFU/mL, GEM would disappear quickly in the simulated environments, which meant low potential ecological risk. Environmental conditions also affected GEM survival. Increasing water content and organic compounds content of soil as well as creating environmental selective pressure (adding atrazine) were profitable for GEM survival.

Key words: genetically engineered microorganism (GEM); leaking density; survival; ecological risk; wastewater treatment

生物强化是提高难降解污染物生物去除效率的可行途径^[1], 高效降解基因工程菌为生物强化提供了新的微生物资源, 有利于提高污染物降解速率^[2, 3], 特别是对提高处理系统的抗冲击负荷能力具有显著效果^[4~7]. 但是, 在生物反应器中具有强化降解能力的基因工程菌, 流失到环境中却可能产生危害, 带来生态风险.

在土壤生物修复中, 由于基因工程菌直接释放到环境中, 因此其生态风险问题受到重视^[8, 9]. 而且研究表明, 基因工程菌的释放对土壤微生物群落的多样性、活性等具有一定的影响. 比如 Bej 等^[10]将

2, 4, 5-T 降解基因工程菌接种到土壤中, 发现土壤微生物群落生物多样性有提高, 特别是基因工程菌和 2, 4, 5-T 同时存在时, 这种影响更为明显; Doyle 等^[11]发现 2, 4-D 降解基因工程菌 *Pseudomonas putida* PPO301 (pRO103) 对土壤微生物群落的碳氧化能力、真菌和细菌数量以及脱氢酶活性都有一定影响. 同时, 对基因工程菌生态风险控制 and 评价研究也主要

收稿日期: 2007-09-21; 修订日期: 2007-11-12

作者简介: 刘春 (1976~), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为废水生物处理技术, E-mail: liuchun07@tsinghua.org.cn

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

集中在土壤生物修复中^[12~17]。

目前,在基因工程菌生物强化废水处理中还缺乏生态风险控制和评价的研究。事实上,废水处理过程是开放系统,基因工程菌随处理出水进入天然水体和土壤环境后,也会带来潜在的生态风险,因而对生态风险进行必要的评价和控制是非常必要的。基因工程菌的流失和流失后在自然环境中的生存研究,是进行生态风险评价和控制的重要内容。本研究比较了在膜-生物反应器(MBR)和传统活性污泥法(CAS)处理工艺中实施生物强化时,1株阿特拉津降解基因工程菌的流失密度差异,并考察了基因工程菌流失后在模拟天然水体和土壤环境中的生存状况,以期对生态风险评价和控制提供参考依据。

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 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素),在37 $^{\circ}\text{C}$,120~140 r/min摇床中培养过夜,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-生物反应器和活性污泥反应器

采用一体式膜-生物反应器和活性污泥反应器同时开展并行实验。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。

2个反应器的运行条件基本一致:接种某污水处理厂的二沉池回流污泥,污泥浓度约为3~4 g/L,基因工程菌接种密度为 10^{10} CFU/mL,力停留时间24 h,进水为校园生活污水加阿特拉津20 mg/L。

1.3 基因工程菌在模拟天然水体和土壤中的生存

基因工程菌的生态风险研究均采用模拟自然环境微系统。本研究模拟天然水体的表层水环境和土壤的表层土环境,并接种与反应器流失密度相同的基因工程菌,以考察基因工程菌从反应器流失后在自然环境中的生存状况。

(1)模拟土壤环境 土壤类型很多,组成、物理化学性质以及生态系统都很复杂,这些条件对基因工程菌生存都会造成影响。本研究选择华北地区典型的砂壤土,有机物含量为6.8%,pH值中性,用2 mm筛网筛过,取一定量(含水,约为40 g)的土壤置于培养皿中,土壤在培养皿中的厚度约为0.5 cm,最

终含水率约为10%~12%。充分翻动土壤使其充氧,接种基因工程菌后,将培养皿密封,保持土壤性质基本不变,置于自然环境中(非太阳直射处,温度为华北地区5~6月的温度),每周1次测定土壤中基因工程菌密度,并翻动土壤充氧。模拟土壤环境条件有利于基因工程菌生存(避免太阳直射,温度20~30 $^{\circ}\text{C}$,好氧,较高的有机物含量和含水率),可以反映基因工程菌在适宜条件下的生存状况。同时,改变土壤的含水率、有机物含量和阿特拉津含量,考察土壤性质对基因工程菌生存的影响。

(2)模拟水体环境 水体环境比土壤环境简单,由于有机物含量低,生物量少,溶氧较低,在水体表层,太阳直射强烈,因此总体来说,水体环境更不利于基因工程菌生存。本研究中,取某池塘中的池水,水中COD含量为39.4 mg/L,氨氮含量为0.4 mg/L。将0.5 L池水放置于广口瓶中,接种基因工程菌,置于室外自然环境中,测定工程菌密度随时间的变化,考察基因工程菌在天然水体中的生存状况。

1.4 基因工程菌密度检测

基因工程菌密度利用抗生素抗性(含25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 氯霉素)LB培养基平板,采用平板菌落计数法(CFU)测定。反应器出水和模拟水体直接稀释后测定。土壤样品取0.5 g土壤(湿重),置于无菌水中,加入玻璃珠,充分振荡,使土壤充分分散,然后将土壤分散液稀释至合适的浓度后测定。每个样品取3个稀释度,每个稀释度取2个平行样,涂布于选择性培养基培养皿上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24~48 h后计数,菌落数目取平均值(基因工程菌株菌落和环境抗性菌株菌落具有明显差异,可以将其区分)。

2 结果与讨论

2.1 MBR和CAS反应器基因工程菌的流失密度

传统CAS反应器是完全开放的处理系统,可以代表目前大部分废水生物处理工艺的特点,细菌细胞随出水的流失不会受到任何限制;MBR反应器是一种新型的生物处理工艺,膜组件对基因工程菌具有高效截留作用,因此细菌细胞随出水的流失会得到有效控制。在1.2所示的反应器运行条件下,2个反应器中基因工程菌的流失情况如图1所示。

可以看到,在2个反应器运行的过程中,出水中基因工程菌的流失密度存在很大的差异。CAS反应器中,基因工程菌的流失密度与反应器上清液基因工程菌密度基本一致。在运行的初始阶段,CAS出水中基因工程菌的流失密度最大,接近接种密度 10^{10}

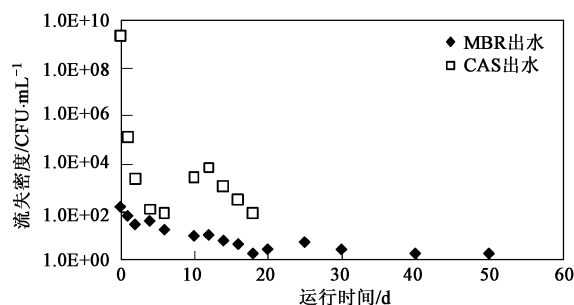


图1 基因工程菌从CAS和MBR中流失的密度

Fig. 1 Leaking densities of GEM from CAS and MBR

CFU/mL;随后,由于生态因素的影响,反应器上清液中基因工程菌密度迅速下降^[18],因此出水中流失密度也迅速降低;在运行过程中,由于阿特拉津的影响,CAS反应器容易发生污泥膨胀^[19],污泥随出水大量流失,出水中流失的主要是附着于污泥絮体的基因工程菌,此时流失密度可以达到 $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL。

MBR反应器中,同样是在运行初始阶段,接种基因工程菌之后,出水中基因工程菌流失密度最大,但远远小于CAS反应器,仅在 10^2 CFU/mL以下。随后,由于反应器中基因工程菌密度的衰减,以及膜污染对截留作用的贡献,出水中流失密度始终很低,基本在 10 CFU/mL以下,或者检测不到。事实上,运行初始阶段,反应器中基因工程菌密度最大,膜的截留作用最弱(未形成凝胶层和泥饼层),此时可以看作是MBR的最大可能流失密度。当MBR稳定运行之后,基因工程菌的流失可基本忽略。

可见,CAS反应器最大流失密度可以达到接种密度,运行不正常时,污泥的流失也会造成出水中流失密度的增加。而MBR反应器出水流失密度很小,且不受运行状况的影响。所以,和CAS相比,MBR可以大大降低由于基因工程菌流失造成的生态风险。

2.2 基因工程菌流失后在模拟环境中的生存

基因工程菌流失后在自然环境中的生存状况也是决定生态风险的重要方面,基因工程菌在自然环境中维持密度越高,生存时间越长,造成的生态风险就越大。接种密度为 10^{10} CFU/mL时,CAS的最大流失密度接近接种密度,运行异常时,流失密度可以达到 $10^3 \sim 10^5$ CFU/mL,MBR的最大流失密度为 10^2 CFU/mL,因此,本研究考察了这3个流失密度条件下,基因工程菌在模拟环境中的生存状况。

3个流失密度下基因工程菌在模拟水体环境中的生存状况如图2所示。

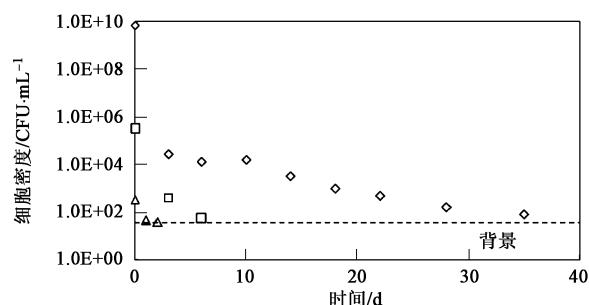


图2 流失后基因工程菌在模拟水体环境中的生存

Fig. 2 GEM survival in the simulated water environment after leaking

可以看到,基因工程菌流失密度为 10^2 CFU/mL时,在天然水体中生存状况很差,1 d之内即降到背景值水平;流失密度为 10^5 CFU/mL水平时,基因工程菌在天然水体中生存状况也较差,6 d之后密度降至背景值;而初始密度为 10^{10} CFU/mL水平时,基因工程菌生存状况明显优于前2个流失密度,基因工程菌密度在 $10^2 \sim 10^4$ CFU/mL水平上可以维持相当长的时间,直到35 d之后才逐渐降到背景值水平。

3个细胞密度(10^{10} 、 10^5 、 10^2 CFU/g)下基因工程菌在模拟土壤环境中的生存状况如图3所示。

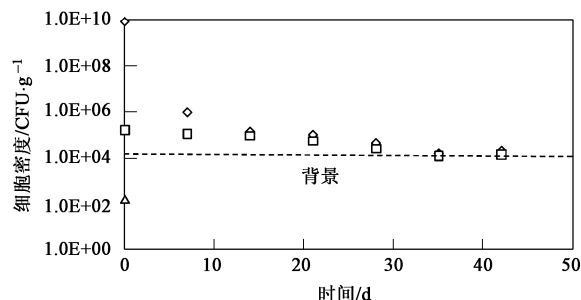


图3 流失后基因工程菌在模拟土壤环境中的生存

Fig. 3 GEM survival in the simulated soil environment after leaking

可以看到,土壤中抗生素抗性细菌种群背景值高达 10^4 CFU/g,所以流失 10^2 CFU/g基因工程菌不会对土壤中抗性细菌种群产生影响。 10^5 CFU/g和 10^{10} CFU/g流失密度水平的基因工程菌在土壤中生存时间相差不多,都是在28 d时降至背景值水平。基因工程菌在土壤中的衰减速率明显比水体中慢,保持较高种群密度时间更长,流失密度为 10^{10} CFU/g时,在第1周内,密度可以保持在 10^6 CFU/g以上,在第3周时,还可以保持在 10^5 CFU/g左右。

可见,流失密度是决定基因工程菌在环境中生存的主要因素。控制流失密度可以有效降低生态风险。和传统生物处理工艺相比,MBR反应器在控制

基因工程菌流失,减少流失密度方面具有明显优势.

2.3 土壤性质对基因工程菌生存的影响

和水体环境相比,土壤环境更为复杂,对基因工程菌生存产生影响的因素更多.本研究改变原始土壤含水率(提高至 15%~17%)和有机质含量(添加蛋白胨,提高至 15%),并添加阿特拉津(浓度为 2 mg/g),考察细胞密度为 10^5 CFU/g 时,土壤含水率、有机质含量和阿特拉津残留对基因工程菌生存的影响,结果如图 4 所示.

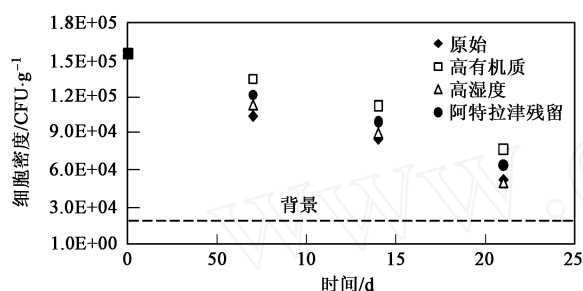


图 4 基因工程菌在不同土壤环境中的生存

Fig. 4 GEM survival in the different simulated soil environments after leaking

可以看到,提高有机质含量和增加阿特拉津对基因工程菌生存的影响较为显著.提高有机质含量,可以改善土壤的营养条件,存在阿特拉津,可以形成一定的环境选择压力,有利于基因工程菌生存.提高土壤含水率,也有利于基因工程菌的生存,但效果并不显著.可见,一些土壤性质适宜基因工程菌生存时,会增加基因工程菌的潜在生态风险.

因此,对基因工程菌流失水体和土壤环境条件的评估,也应该是生态风险评价的重要内容.

3 结论

(1) 废水生物强化处理中,基因工程菌在接种初期从反应器中流失的密度最大.

(2) 在接种密度为 10^{10} CFU/mL 时,CAS 反应器的最大流失密度接近接种密度,MBR 反应器的最大流失密度仅有 10^2 CFU/mL.

(3) 在模拟自然环境中,流失密度是决定基因工程菌生存状况的主要因素.在 CAS 出水 10^{10} CFU/mL 流失密度下,高种群密度基因工程菌在水体和土壤中生存时间较长(30 d 以上),潜在生态风险较高;在 MBR 出水 10^2 CFU/mL 流失密度下,基因工程菌在水体和土壤中很快衰亡,潜在生态风险较小.

(4) 环境条件对基因工程菌生存状况具有影响.

提高土壤的含水率、有机质含量以及环境选择压力的存在有利于基因工程菌生存.

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] Fujita M, Ike M, Hashimoto S. Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered microorganisms [J]. Water Research, 1991, 25(8): 979-984.
- [3] Watanabe K, Teramoto M, Harayama S. Stable augmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harboured by an indigenous dominant bacterium [J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(10): 577-583.
- [4] Erb R W, Eichner C A, Wagner-Dobler I, et al. Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed *Pseudomonas* [J]. Nature Biotechnology, 1997, 15(4): 378-382.
- [5] Nublein K, Maris D, Timmis K N, et al. Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* sp. introduced into activated sludge microcosms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58: 3380-3386.
- [6] Eichner C A, Erb R W, Timmis K N, et al. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(1): 102-109.
- [7] 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.
- [8] Schwieger F, Willke B, Munch J C, et al. Ecological pre-release risk assessment of two genetically engineered, bioluminescent *Rhizobium meliloti* strains in soil column model systems [J]. Biological Fertilizer and Soils, 1997, 25: 340-348.
- [9] Goux S, Shapir N, Fantroussi S E, et al. Long-term maintain of rapid atrazine degradation in soils inoculated with atrazine degraders [J]. Water, Air, and Soil Pollution: Focus, 2003, 3: 131-142.
- [10] Bej A K, Perlman M H, Atlas R M. Effect of introducing genetically engineered microorganisms on soil microbial community diversity [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1991, 86(2): 169-176.
- [11] Doyle J D, Shout K A, 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 [J]. Canadian Journal of microbiology, 1991, 37(9): 682-691.
- [12] Ronchel M C, Ramos J L. Dual system to reinforce biological containment of recombinant bacteria designed for rhizoremediation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 2649-2656.
- [13] Torres B, Jaenecke S, Timmis K N, et al. A gene containment strategy based on a restriction-modification system [J].

- Environmental Microbiology, 2000, 2(5): 555-559.
- [14] Donegan K, Seidler R, Matyac C. Physical and chemical control of released microorganisms at field sites [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1991, 37: 708-712.
- [15] Angel J S, Levin M A, Gagliardi J V, et al. Validation of microcosms for examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (lacZY) in soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(8): 2835-2839.
- [16] Van der Hoeven N, Van Elsas J D, Heijnen C E. A model based on soil structural aspects describing the fate of genetically modified bacteria in soil [J]. Ecological Modeling, 1996, 89: 161-173.
- [17] Edge T A, Wyndham R C. Predicting survival of a genetically engineered microorganism, *Pseudomonas chlororaphis* 3732RN-L11, in soil and wheat rhizosphere across Canada with linear multiple regression models [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48: 417-427.
- [18] 刘春,黄霞,王慧. 基因工程菌在活性污泥中的衰减及其影响因素[J]. 应用生态学报, 2007, 18(3): 646-652.
- [19] 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.

第五届国际水协膜技术大会暨展览会通知

第五届国际水协膜技术大会暨膜技术与设备展览会(IWA Membrane Technology Conference & Exhibition)是2009年度全世界最有影响力的膜产业界的盛事之一,本次大会由清华大学与国际水协联合主办,将于2009年9月1~3日在北京召开。

大会将邀请来自国际水协、联合国教科文组织、耶鲁大学、牛津大学、新南威尔士大学、清华大学、中国科学院、北京大学、天津大学、浙江大学、哈尔滨工业大学、上海交通大学等国内外著名大学和研究机构的专家学者参会,与您分享当前膜领域最新研究动态和成果。

届时,也会有来自各国的膜企业参加展览会,为业内人士提供与国内外顶尖学者和业界著名企业家交流沟通的平台和机会,让您了解到当前最新的膜技术应用案例与成果。

热忱希望您充分利用此次机会踊跃投稿!具体要求请见大会官方网站。期待我们在北京相聚!

会议主要围绕以下几个内容展开:

- (1) 新型膜材料和装置;
- (2) 不同的膜和复合膜的工艺;
- (3) 膜污染机理和控制;
- (4) 饮用水处理;
- (5) 生活污水处理和回用;
- (6) 工业废水处理和回用;
- (7) 脱盐工艺;
- (8) 工程案例研究。

会议网站: <http://www.IWA-MTC2009.org>

联系电话: 010-62796518; 010-62780050

联系人: 张硕洁 张凯琴

传真: 010-62771472; 010-62795275

E-mail: iwamtc2009@tsinghua.edu.cn; iwamtc2009@gmail.com