

废水生物强化处理技术研究进展*

李久安^{1,2} 周后珍¹ 刘庆华¹ 谭周亮^{1**} 李旭东¹

(¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

(²中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 生物强化技术具有高效去除目标污染物、加速系统启动、提高系统抗水力及有机负荷能力以及优化系统菌群结构和增强功能稳定性等功能,在废水生物处理实际应用中潜力巨大。总结了国内外废水生物强化处理技术研究进展,在功能微生物选育方面,通过传统选育手段与基因工程手段并举来实现;在功能菌应用与生物强化处理工艺方面,主要通过所投加的功能菌直接作用或是利用基因水平转移(HGT)来实现生物强化;在分子检测技术方面,随着分子生物学的发展,一些技术如变性梯度凝胶电泳(DGGE)、核糖体间隔基因分析方法(RISA)及荧光原位杂交(FISH)等在与微生物生态学研究得到了广泛应用。分析认为,应用分子生物学等先进技术手段,探讨废水生物强化处理工程应用过程中的微生物生态学机制,并以此为指导研发高性能菌剂,将是本领域的研究重点与方向之一。图2表1参56

关键词 废水生物处理;生物强化技术;水平基因转移;基因工程菌;群落结构
CLC X703.1

Progress in Bioaugmentation Technology Research for Biological Treatment of Wastewaters*

LI Jiuan^{1,2}, ZHOU Houzhen¹, LIU Qinghua¹, TAN Zhouliang^{1**} & LI Xudong¹

(¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Bioaugmentation has a huge potential application in biological treatment of wastewaters. The recent studies show that bioaugmentation could enhance the removal efficiency of target pollutants, accelerate the start-up of system, improve the capacity of the system resistant to hydraulic and organic shock loading, and upgrade the stability of microbial community structure and function of system. This paper summarizes the studies on the bioaugmentation technology for biological treatment of different wastewaters. About the screening of special function microorganisms, both of the traditional and genetic engineering methods are simultaneously used; about the application of special function strains and the processing technology of bioaugmentation, mainly action of the dosing special strains or the horizontal gene transfer (HGT) are directly utilized to implement bioaugmentation; besides, with the development of molecular biology, the related molecular techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) are widely used in the research of microbial ecology. This paper argues the using of molecular biology and other advanced techniques to explore the microbial ecology mechanism through the process of wastewater bioaugmentation treatment engineering application and to guide development of high performance microorganism agents as an important research direction in the future. Fig 2, Tab 1, Ref 56

Keywords biological treatment of wastewater; bioaugmentation, horizontal gene transfer; genetically engineered microorganisms; communities structure

CLC X703.1

废水生物处理是通过微生物的新陈代谢作用,将污染物分解、吸收或者吸附来实现水质的净化。生物处理法与物理、化学法相比,成本低,效率高,且在处理过程中所产生的二次污染极小,在城市和工业污水处理中得到了广泛的

应用,是目前的主流废水处理方法。为满足处理不同来源及不同性质废水的需要,科研及工程技术人员已研制开发出厌氧—好氧活性污泥工艺(A/O、AA/O)、氧化沟法、序批式活性污泥工艺(SBR)、改良型SBR法、两段法(AB法)、生物接触氧化法、曝气生物滤池(BAF)、上流式厌氧污泥床(UASB)以及膨胀颗粒污泥床(GESB)等多种类型的生物处理工艺及反应器。但是,近年来由于社会经济的迅速发展,废水量日益增多,成分日益复杂,同时各国政府与民众对出水水质要求也日益提高,一些工艺的处理能力已难以满足实际需求;尤其当废水中含暂时性有毒难处理的物质时,由于能去除该类物质的微生物在处理系统中的种类、数量较

收稿日期: 2010-06-27 接受日期: 2010-07-12

*中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-YW-G-055)、国家“十一五”科技支撑计划项目(No.2006BAC02A09)和四川省科技厅项目(No. 07SG 005-001)资助 Supported by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-G-055), the National “11th Five-year Plan” Science & Technology Project of China (No. 2006BAC02A09), and the Scientific and Technological Program of Sichuan, China (No. 07SG 005-001)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: tanzhl@cib.ac.cn)

少,同时它们在种间竞争中常处于劣势,传统的处理工艺更是难以达到理想的出水水质,并且也会给原有系统的平衡和稳定带来很大的风险.在这样的背景下就产生了生物强化技术.

生物强化技术(Bioaugmentation)是指为提高系统去除污染物的能力,向废水处理系统或者污染地投加特定功能微生物的一种工艺^[1].有学者认为它产生于20世纪70年代中期^[2],到90年代国外已有较多的文献报道.与之相比国内的研究起步较晚,直到90年代后期才有中文文献对国外的研究进行总结^[3].近十几年来,该技术在环境治理及废水生物处理系统中以其较快较明显的处理效果受到研究者越来越多的关注,这种关注程度从CNKI和ISI Web of Knowledge两

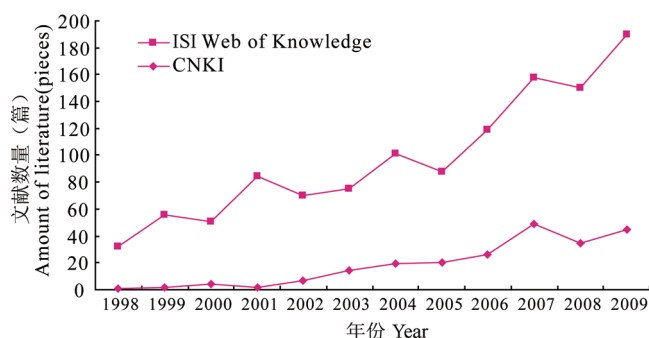


图1 有关生物强化技术科技文献的统计
Fig. 1 Statistics of the literature on bioaugmentation

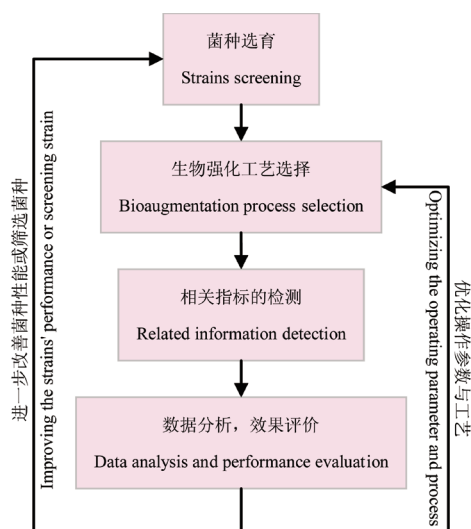


图2 废水生物强化处理技术主要流程
Fig. 2 Main processes of bioaugmentation technology for biological treatment of wastewaters

图2中主要流程构成了一个循环.所筛选到的菌种可直接发挥作用,也可通过水平基因转移间接实现生物强化.在试验过程中利用传统方法和现代分子检测技术监测到的数据进行分析 and 效果评价.如上次试验没有达到理想的结果,在进行下一轮实验时,就应该有针对性地进一步优化操作参数和工艺或者是重新选育更高性能的菌种

The main processes constitute a circulation in Fig. 2. And, the strains obtained through screening can be divided into directly display their function and indirectly actualize bioaugmentation through the horizontal gene transfer. The conventional and modern molecular detection techniques are utilized in the experiment to analyze the data, and evaluate the performance. If the previous experiment has not achieved the ideal result, we should optimize the operating parameters and process, or improve the strains' performance and re-screen strains in the next experiment

个数据库中相关文献数量变化可以看出(图1).本文只对其在废水处理系统中的研究情况进行总结,总体来说该技术可起到高效去除目标污染物^[4-5],加速系统启动^[6-7],提高系统抗水力及有机负荷的能力^[8-9],增强系统菌群结构和功能的稳定性^[10-12]等作用.目前,生物强化技术在医药^[13]、焦炭^[14]、造纸^[15]、石化^[16]、印染^[17]、橄榄油^[18]等行业的废水生物处理中均有研究,并且有些研究已进入全规模试验阶段^[19-20].其在废水处理系统中的主要流程如图2.本文试从特定功能微生物选育及其发挥作用的方式,以及生物强化工艺与相应的分子检测技术等几个环节介绍国内外的研究进展.

1 特定功能微生物选育

特定功能微生物的获得是生物强化技术应用的前提.目前,我们可以从自然界筛选菌种,也可通过人为手段构建用于废水处理的特定功能微生物.部分特定功能微生物如表1.

1.1 从自然界中筛选

从自然环境或者污染地直接筛选是获得特定功能微生物的一个重要途径,其优点是菌种来源广,方法简单.为使所筛选的微生物投加到生物处理系统后有稳定的性能和能维持有效的生物量,以及较快较高降解目标污染物的能力,在制定筛选策略时应至少考虑以下3个方面:1)当实际废水中目标物浓度很低或有其他有机物影响时,该菌是否还能发挥作用;2)废水中的其他组分是否对该菌株有抑制或毒害作用;3)该菌能否与废水处理系统内原有的微生物(以下简称土著微生物)兼容或者竞争生存.

一般为减小由于菌种来源环境与应用环境之间差异的影响,在制定筛选策略时应模拟实际废水组分及操作条件或从相似环境中进行筛选.如Song等从制革废水处理厂的活性污泥中以萘二磺酸为唯一碳源分离到*Arthrobacter* sp. 2AC和*Comamonas* sp. 4BC两株菌,将二者分别用于皮革废水处理系统生物强化实验后,发现这两种菌均能与本土微生物竞争,并且在有其他碳源存在时也能很好地降解萘二磺酸^[15].

1.2 功能菌构建

功能菌构建是指通过人为手段有目的地改变微生物的特性,以获得所需要的菌种.目前在废水处理中应用的基因工程菌多是通过质粒介导的基因转移或者原生质体融合来获得.

1.2.1 质粒介导的基因转移 质粒是染色体外一类能自主复制的核酸分子,有些本身具有降解特性,有些可通过基因重组使其获得降解某种物质的功能.重要的是,质粒可在细胞间自发或人为的发生转移,且有些质粒之间还存在相容性.质粒介导的基因转移就是利用质粒的这些特性,将具有某种功能的质粒导入受体菌使其获得此功能的一种基因工程技术.

目前,不仅可以将单一质粒导入受体菌中,也可将多种降解质粒导入同一受体菌种,使其获得降解多种物质的能力,如Friello等通过质粒转导将不同功能的质粒转移到同一株细菌中构建出了能同时降解芳烃、萜烃、多环芳烃和脂肪烃等石油组分的菌株^[34];也可通过这种方式来增强降解基因的表达,如Liu Z等把含有甲基对硫磷水解酶编码基因*mpd*和假单胞菌*P. putida* DLL21的同源调节基因的DNA片断

表1 部分具有特定功能的微生物
Table 1 Some microorganisms with specific functions

污染物 Contaminants	菌种 Strains	参考文献 References	污染物 Contaminants	菌种 Strains	参考文献 References
3-氯苯胺 3-chloroaniline	<i>Comamonas testosteroni</i> I2	[21]	壬基苯酚 Nonylphenol	<i>Sphingomonas</i> sp. TTNP3	[22]
酚类化合物 Phenolic compound	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	[18]	萘二磺酸 Naphthalene-2-sulfonic acid	<i>Arthrobactersp</i> 2AC	[15]
	<i>Trametes versicolor</i>	[18]		<i>Comamonas</i> sp. 4BC	[15]
五氯酚 Pentachlorophenol	<i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	[23]	溴氨酸 Bromaminic acid	<i>Sphingomonas xenophaga</i> QYY	[24]
邻硝基苯甲醛 2-nitrobenzaldehyde	<i>Pseudomonas putida</i> ONBA-17	[25]		<i>Pseudomonas testosteroni</i> CPW301	[26]
氰化物 Cyanide	<i>Cryptococcus humicolus</i> MCN2	[20]	苯酚 Phenol	<i>Pseudomonas putida</i> TCC 11172	[27]
硝酸盐 Nitrate	<i>Alcaligenes defragrans</i> B21	[28]	丙腈 Propionitrile	<i>Klebsiella oxytoca</i>	[29]
精对苯二甲酸 Pure terephthalic acid	Fhhh (基因工程菌Genetically engineered strains)	[30]	阿特拉津 (一种除草剂) Atrazine	<i>Escherichia coli</i> DH5α (基因工程菌 Genetically engineered strains)	[31]
	混合菌剂I (Mixed strains): <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P.</i> <i>aureofaciens</i> 和 <i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i>	[32]		<i>Pseudomonas</i> sp. BC001	[33]
邻苯二甲酸二甲酯酯 Dimethyl phthalate ester	混合菌剂II (Mixed strains): <i>Xanthomonas maltophilia</i> 和 <i>S.</i> <i>paucimobilis</i>	[32]	喹啉 Quinoline	<i>Burkholderia pickettii</i>	[14]

表中所列举的单一菌种或者是混合菌剂均能较好地降解目标污染物。其中, *Alcaligenes defragrans* B21是硫依赖型的自养脱氮菌株, 即该菌株在氧化硫单质及还原性的硫化物的同时, 以硝酸盐为电子受体并将其转化成氮气^[28]

The single or mixed strains listed in this table are able to decompose the target contaminants. Among them, *Alcaligenes defragrans* B21 is a sulfur-based autotrophic denitrification strain, that is, it can oxidize elemental sulfur or reduced-sulfur compounds to sulfate, while using nitrate as an electron acceptor and converting it into nitrogen gas^[28]

克隆到广泛宿主pBBR1MCS22质粒上, 将得到的重组质粒pBBR2mpd导入吡喃丹降解CDS21, 构建出基因工程菌CDS2 pBBR 2mpd, 该菌种对甲基对硫磷的降解能力比*P. putida* DLL21提高了6.75倍^[35]; 此外, 由于部分难降解有机污染物特别是人工合成化合物需要不同降解菌之间的协同代谢或共代谢等复杂机制才能最终得以降解^[36]。去除此类物质常规方法是通过混合菌剂来完成, 但是由于混合菌在降解过程中存在时间和空间上不统一的矛盾^[37], 势必会降低目标物的去除效果及效率。为此可以通过基因操作将受体菌所缺少的基因整合到质粒载体上, 然后导入受体微生物, 使其完成一种污染物降解过程中的多个环节。如Liu等将*Pseudomonas* sp. ADP菌株的阿特拉津 (Atrazine) 脱氯基因克隆到pACYC184质粒上, 然后将该质粒导入*Escherichia coli* DH5α后, 该菌就获得了降解Atrazine的能力, 并且在废水强化实验中去除率达到90%以上^[31]。

1.2.2 原生质体融合 原生质体融合是将双亲株细胞在酶的作用下脱去细胞壁, 形成原生质体, 在高渗和助融条件下通过细胞质融合、核融合、使基因组得到重组, 随后再生出细胞壁来获得重组子, 之后通过筛选获得目标菌种的一种方法。此项技术具有遗传物质传递完整、育种效率高、定向性好和致育性限制小等优点^[36]。

许燕滨等采用原生质体融合技术, 将两株具有含氯有机化合物降解特性的菌假单胞T21和诺卡氏菌RB21融合构建成一株高效降解含氯有机化合物工程菌, 应用于造纸漂白废水后显示融合菌去除COD_C和总氯的能力比混合菌分别提高72.05%和190%^[38]; 陈俊等利用此技术构建了基因工程菌Fhhh, 实现廉价工业化生产Fhhh菌剂, 在10 m³/d精对苯二甲

酸废水处理实验装置中, 容积负荷率达到3.0 kg L⁻¹ d⁻¹以上, 每天生物负荷率达1.42时, 出水水质也达到国家一类标准, 与国内外同类装置相比生物负荷率处于先进水平^[30]。卢显妍等采用原生质体电融合技术构建了一株高效的重金属去除菌R32, 用其处理含铬废水实验, 结果表明, R32不论是在处理低浓度还是高浓度的铬液时, 其去除率和还原率都明显高于2株亲本菌, 处理低浓度含铬废水时, 去除率和还原率可达100%; 处理高浓度含铬废水 (200 mg L⁻¹) 时, 还原率仍可达50%以上; 并且经过多次传代后, R32的除铬能力保持稳定^[39]。

由此可见, 用人为构建的功能菌进行的生物强化能较明显地提高原有系统的处理能力。但是, 由于人们对基因工程菌释放到环境后, 对生态环境所带来的影响尚缺乏充分的认识, 使其在废水处理中的应用受到了极大的限制。

2 功能菌发挥作用方式

在生物强化中, 功能菌可通过直接作用实现强化, 也可通过HGT间接实现强化。

2.1 直接作用

直接作用是指特定功能微生物加入生物处理系统后, 通过自身的增值和代谢去除目标污染物以改善系统处理能力。这种方式最普遍, 研究较多, 就目前研究成果来看也最具应用价值。按功能菌投加到处理系统后存在的形式, 可简单分为简单投加、与载体联合及细胞包埋固定3种工艺。**2.1.1 简单投加法** 简单投加是指在以活性污泥为功能单位的工艺及反应器中投加功能菌种, 投加后这些菌种以游离或悬浮状态存在。这种工艺简单、易于操作, 在进行操作时

即可用单一微生物进行投加,也可用混合菌投加。

用单一菌进行生物强化,具有菌种培养简单、成本相对较低等优点,并且在效果评价及工艺改进也较方便,受到了一些研究者的青睐。Boon等将从活性污泥中分离的 *Comamonas testosteroni* I2在实验室规模的半连续活性污泥处理工艺中进行生物强化实验,发现强化工艺获得了降解3-氯苯胺(3-CA)的能力,并维持了2 wk的完全降解,而对照组则没有观察到3-CA减少^[21];Wang等将降解喹啉的菌株 *Burkholderia pickettii*投加处理焦化废水的厌氧—缺氧—好氧工艺中,三段的COD去除率分别达25%、16%、59%,显示出生物强化技术应用于焦化废水处理非常有效^[14];Dhouib等用 *Phanerochaete chrysosporium*、*Trametes versicolor*分别对橄榄油工业废水预处理时进行生物强化,发现与原有仅用活性污泥处理相比有高的有机物去除率、较低COD/BOD₅比值、较高脱毒效果,并且其后续厌氧工艺产甲烷效率也有很大提高^[18]。

但当废水中含有较多种类难降解污染物时,混合菌或微生物制剂可能更有优势。这是由于混合菌不仅可以通过协同作用降解单一菌种不能完全降解的污染物,并且在混合菌中相同功能的微生物之间,在一方失去作用时,另一种可继续维持对目标物的降解,这都预示着混合菌有更强的降解能力和对环境的适应能力。用混合菌进行强化是生物强化研究的重点。谭周亮等通过向处理炼油废水的两级好氧中试工艺中投加微生物菌剂以构建生物强化处理系统,结果显示与活性污泥处理系统相比较,生物强化处理系统在COD与NH₄⁺-N的平均容积负荷分别提高了94.44%与40.70%的情况下,去除率分别提高了35.47%与59.28%,并且强化系统还具有良好的耐冲击负荷性的能力^[8];Quan等用混合菌来强化传统活性污泥处理系统以城除去城市废水中间歇性存在的2,4-二氯酚,在以5%和15%的比例分别接种后,1 mo内所做的3次负荷冲击冲击与对照对组相比均表现出了不错的效果^[4];代莹等通过在地下渗滤系统添加自行研制的微生物菌剂来改善土壤性状和增强地下渗滤系统中微生物活性,并研究在不同水力负荷(4 cm/d、6 cm/d、8 cm/d和10 cm/d)下系统处理效能;通过不同水力负荷对比试验,表明通过生物强化促进系统硝化和反硝化作用,使90%以上NH₄⁺-N转化为NO₃⁻-N,且在不投加反硝化碳源的情况下,TN去除率提高了13.9%以上^[9]。

简单投加方式可明显提高系统对目标物去除能力^[4,21]和增强系统耐负荷冲击能力^[4,8],并且在提升系统整体处理能力方面也有很好的表现^[9,14,18],能满足一些现有处理厂升级及应急的需要。同时它也有自身的不足,如投加菌种流失密度高^[40];与土著微生物竞争时处于劣势或被其他微生物,如原生动物吞噬^[10]等。这都会影响强化菌在处理系统中的稳定存在,致使强化效果不能稳定保持^[21,41],常需要周期性补加强化菌种。

2.1.2 与载体联合实现强化 与载体联合是指强化菌引入处理系统后附着在载体上,结合载体所形成阻滞及剪切作用共同提高系统的整体处理能力。该工艺功能有:1)载体不仅可为微生物附着和生存提供支持物,且形成生物膜后由于膜的附着和截流作用,还能极大减少微生物的流失密度^[40],使系统能维持较高的生物量,缩短系统启动时间^[6-7]和使其获得稳定的处理能力^[24,31];2)形成膜后功能菌附着于载体上,出水中强化菌的流失密度极大减少,降低了生态风险^[40],为基因工程菌在废水处理中的应用提供了支持和途径;3)载体所形成的剪切作用可使气泡、溶解性物质及胶体悬浮物充分地分散,使微生物与营养和污染物更好地接触,提高系统处理效率^[6]。此工艺的关键点是载体上强化菌的数量。为了增加载体上强化菌的数量,研究者多是通过在废水生物处理系统安装或者投加载体后,在尽量除去其他微生物的前提下再配以合适的营养及环境条件让功能菌在载体上挂膜^[7,20],之后再应用到废水处理中。

Ma等将一个全规模活性污泥系统(S2)升级为接触氧化系统(S1)后,当石化废水中COD和NH₄⁺-N浓度分别为320~530 mg/L、8~25 mg/L时,S1仅需要20 d就能使二者分别降至80 mg/L、10 mg/L以下,而S2系统要达到相似的效果则需要30 d,并且当有机负荷率(OLR)由0.6增加到0.9,最终达到1.10 kg COD m⁻³ d⁻¹时,S1仅用3 d就使系统恢复功能显示了较强的抗负荷能力,而S2则需要7 d^[7];Satoh等用硝化菌对转盘生物膜反应器进行强化试验,发现强化后形成的生物膜中硝化菌群密度极大提高,从而使系统启动速度加快和原位硝化活性提高^[6]。接种的微生物能在生物膜中扩增或繁殖,硝化菌的加入提高了生物膜表面硝化菌的有效浓度,从而导致硝化速率加快;宋国军等在序批式膜生物反应器(SMBR)中投加溴氨酸(萘醌染料中间体简称为BAA)高效降解菌鞘氨醇单胞菌QYY,对BAA模拟废水进行了生物强化降解研究,结果表明,经过30 d的驯化SMBR系统运行达到稳定,并且连续稳定运行90 d以上;进水BAA浓度为550 mg/L,降解11 h后,脱色率为98%左右,且COD去除率50%左右^[24]。

2.1.3 包埋固定实现强化 包埋固定通常是利用高聚物在形成凝胶时将细胞包埋于其内部形成,该法操作简单,对细胞活性影响较小,制作的固定化细胞球的强度较高,是目前研究最广泛的固定化方法^[42]。此技术的应用不仅能提高系统处理能力^[12,43],也能增强系统对环境条件^[29,44]变化的适应性。原因可能有:1)固定剂形成的微球囊结构并不影响营养物质和小分子污染物的进出,但可阻止强化菌流出和土著微生物进出,从而减少强化菌的流失和被原生动物的吞噬作用能维持较高的生物量;2)微球囊结构对水质、环境条件的变化还能起到一定的缓冲作用。可以想象包埋固定技术相当于是由几乎不相互作用的两部分菌群共同在发挥作用,即微球囊中的功能菌和原废水处理系统中土著微生物。

具体研究案例有:Mohan等用海藻酸钠包埋固定硫酸盐还原菌来强化处理硫酸厂废水的厌氧序批式生物膜反应器,结果显示反应器整体性能显著提高,COD去除率由35%提高到78%,硫酸盐还原效率由27%提高到80%,并且沼气产率也有增加,挥发性脂肪酸浓度也得到减小^[12];Wu等以PVA-

H₃BO₃为材料包埋固定假单胞菌, 用其在流化床反应器中连续降解苯酚, 固定化细胞在三项流化床中连续运行2 wk, 进水酚浓度从250 mg/L逐渐提高至300 mg/L时, 测得出水酚浓度均接近于0 mg/L^[43]; Chen所在的研究组将丙腈降解菌*Klebsiella oxytoca*分别用海藻酸钠和醋酸纤维素固定后与游离细胞进行对比试验, 发现在序批式反应器中当丙腈的浓度从100 mmol/L升至150 mmol/L时, 3组试验都能将其完全降解, 但当温度在20~40 ℃, pH在6~8变动时, 两组固定化细胞系统有更高的去除效率^[29]。

2.2 利用HGT间接实现生物强化

HGT是指不同的生物个体之间或单个细胞内部细胞器之间所进行的遗传物质的交流^[45]。能够发生HGT, 且能够在受体细胞中稳定地表达传代的遗传物质称为可移动遗传因子(Mobile genetic elements), 一般分为质粒和线状DNA两大类, 包括有噬菌体类DNA、质粒、转座DNA和基因岛等^[46]。Top等指出降解天然和异型(Xenobiotic)有机化合物的基因常存在于质粒, 转座子或其他可移动/整合元件^[47]; 同时指出随着研究者持续不断对降解菌的分离和性能研究, 报道的MGEs的数量也持续增加, 也有越来越多的证据表明细菌之间的降解基因的交换对微生物群体代谢途径的进化起着很大的作用。而用其进行生物强化是指将含有降解基因的微生物加入生物处理体系后, 利用微生物之间的HGT作用使土著微生物获得所投加菌的降解特性, 从而实现生物强化。由于土著微生物对处理系统环境及水质条件有很好的适应性, 可克服直接强化时强化菌流失及对新环境的不适应性等缺点, 因而, HGT被认为是一个在原位改进微生物特性、提升原废水处理系统性能的有效方式。

HGT已成为近年来研究的热点^[48], 由于质粒容易提取及操作分析等特性, 质粒成为了研究较多的可移动的遗传因子。由于受引起HGT条件的制约, 对HGT的研究主要集中在土壤体系^[49-50]和生物膜废水处理系统^[51-52]。这是因为细胞间的紧密接触和接触时间是影响HGT的关键因素, 如: Ehlers和Bouwzer用两种带有质粒RP4和不具有该质粒的假单胞菌, 在液体、琼脂及生物膜反应器中进行结合的数量级速率对比研究, 发现生物膜反应器内接合的频率比液体要高得多; 剪切力是影响生物膜上水平基因转移最重要的环境参数, 当转鼓转速为6.5 r/min和15 r/min时生物膜上的接合频率与平板上没有显著差异, 转速达50 r/min时生物膜上的接合频率为0, 即没有接合发生^[53]。然而, 由于操作条件的复杂性和人们对环境中基因转移的速率、环境因子对基因转移的影响了解不深入^[54], 目前, 即使是在有利于HGT的生物膜处理系统上的研究进展也很缓慢。多数研究处于实验室阶段, 在中试规模的实验中成功的例子很少, 如Mohan等将含有TOL质粒的基因工程菌应用到实验室和中试规模的序批式生物膜反应器中, 在实验室规模的反应器中强化菌的存活率高并且结合子得率也较高, 持续时间长, 该系统对目标污染物苯甲醇降解作用也有很大提高^[55]。但是在中试实验中接种48 h后, 反应器中就已经检测不到工程菌存在, 在实验的整个过程都没有检测到结合子, 并且与强化前相比, 系统对苯甲醇的降解效率和有机碳的去除率也没有提高。

3 分子检测技术的应用

废水处理系统功能的发挥与该系统中菌群的种类和数量有直接的关系。在对废水生物强化研究中, 在用COD、BOD以及目标物质的去除效果来评价强化系统的同时, 更应该要对强化菌剂在系统中的生存状态、持续时间以及对原有处理系统中微生物群落结构变化等方面进行研究分析。这些数据将为强化菌剂性能的改进、操作条件的优化、强化位置的选择以及反应器、工艺的改进都能提供理论依据。最终会极大地推进生物强化技术在废水治理中的研究, 推动其在实际废水处理中的应用。

一些传统的方法, 如活菌培养计数法(CFU法), 最大或然值计数法(MPN法)等, 虽然也能发挥作用, 如: Mohan等在厌氧条件下用选择性培养基培养来分析加入固定化的硫酸盐还原菌后, 厌氧序批式生物膜反应器中菌群的变化^[12]。但是这些传统方法不但繁琐耗时, 而且受目前分离和培养技术的限制, 很难对培养条件要求苛刻的微生物进行研究, 对不可培养的微生物的研究更是困难, 因此得出的数据也不全面。

近年来分子生物学技术迅速发展为人们获得及时、全面的数据提供了很好的工具。一些基于PCR及核酸杂交技术已经在生物强化的许多研究中得到应用, 如: Boon等用DGGE-16SrRNA技术研究生物强化后活性污泥菌群变化^[21]; Boon所在的另一个团队用DGGE、real-time PCR以及FISH技术研究处理系统受3-CA冲击后氨氧化微生物群落特征和数量的变化, 并观察到原生动物对强化菌的吞噬作用^[10]; Quan等用RISA跟踪强化菌剂和分析生物强化后对微生物群落结构产生的影响^[4]; Domde等用随机扩增多态性DNA标记(Random amplified polymorphic DNA)技术分析微生物种群的变化, 用PCR监测生物量的代谢活性以及用Southern杂交技术分析位点代谢表现^[56]; Selvaratnam采用PCR和RT/PCR技术, 准确评价了*Pseudomonas putida* ATCC11172菌在已有微生物系统对脱酚效果的影响, 并观察了该菌的降解性基因在系统中表达的情况^[27]。

4 结论与展望

生物强化技术在废水生物处理中有明显的处理效果, 然而由于废水处理系统是一个半开放有些甚至完全开放的复杂的生态系统, 水质水量、环境条件的波动, 强化菌与各种土著微生物相互作用以及操作条件的变化等都会给强化系统的处理效果带来不可预测的影响。在实际全规模试验或者实际工厂应用中有很多常常得不到满意的效果, 如Park等为了提高生物去除总氰化物效率, 将生物强化技术应用到一个全规模的处理焦炭废水的流化床反应器(1 280 m³), 然而连续运行时并没有达到预期的效果, 作者认为这是由强化菌较差的沉降性能, 较低的铁氰化物降解速率以及有机碳源的缺乏所造成^[20]。

因此, 弄清影响生物强化的关键因素以及微生物生态学机制, 通过放大试验研究, 实现生物强化的规模化应用, 是目前及今后生物强化技术的研究重点和方向, 主要集中在:

1) 特定功能菌是生物强化的基础资源, 也是强化效果

的关键. 目前已有一些微生物菌剂获得了专利, 然而有些功能菌剂在使用中还常常遇到菌剂质量不过关, 包括菌剂的生产、扩大培养和保存等, 造成该市场较混乱, 参差不齐, 影响其推广应用. 更高性能的菌剂将仍是今后研究的重点.

2) 利用HGT间接实现强化, 虽一个很有潜力的方向, 但目前开展的研究很少且多数初始阶段, 促进或者是影响HGT的因素将是今后研究的重点.

3) 特定功能菌性能的发挥和维持有效的生物量是生物强化成功的关键. 因此, 强化菌的增长速度必须高于其由于流失和被吞噬而损失的速度. 简单投加难以达到这一要求, 尽管周期性补加能解决这一问题, 但这也将增加工厂运行成本. 与载体联合和包埋固定化工艺是一个很好的发展方向, 其高性能材料的开发及成本的降低将是今后研究的重点.

4) 虽然目前有很多研究已经应用现代分子检测技术来评价生物强化效果, 但对数据的应用水平较低. 如何应用现代分子检测技术的数据改进及放大工艺流程、优化操作条件等是今后研究的重点.

References

- Fantroussi ES, Agathos SN. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol*, 2005, **8** (3): 268~275
- Xiang QC (全向春), Liu ZC (刘佐才), Fan GY (范广裕), Han LP (韩力平). Bioaugmentation and its application in wastewater treatment. *Res Environ Sci* (环境科学研究), 1999, **12** (3): 22~27
- Han LP (韩力平), Wang JL (王建龙), Shi HC (施汉昌), Qian Y (钱易). Bioaugmentation for removal of recalcitrant organics. *Environ Sci* (环境科学), 1999, **20** (6): 100~102
- Quan XC, Shi HC, Liu H, Lü PP, Qian Y. Enhancement of 2,4-dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture. *Water Res*, 2004, **38** (1): 245~253
- Zhao MY (赵美云), Lei ZF (雷中方). Study on bio-augmentation process of polyester wastewater treatment using dominant bacteria immobilized in calcium alginate gel bead. *Ind Water Treat* (工业水处理), 2006, **26** (3): 20~24
- Satoh H, Okabe S, Yamaguchi Y, Watanabe Y. Evaluation of the impact of bioaugmentation and biostimulation by in situ hybridization and microelectrode. *Water Res*, 2003, **37** (9): 2206~2216
- Ma F, Guo JB, Zhao LJ, Chang CC, Cui D. Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresour Technol*, 2009, **100** (2): 597~602
- Tan ZL (谭周亮), Yang JX (杨俊仕), Li XD (李旭东). Pilot-scale research on oil refinery wastewater treatment by microorganism agent. *Technol Water Treat* (水处理技术), 2007 (2): 67~70
- Dai Y (代莹), Li QY (李全艳), Sun TX (孙铁珩). Effect of hydraulic load on efficiency of enhanced biological nitrogen removal in subsurface infiltration system. *J Heilongjiang Inst Technol* (黑龙江工程学院学报), 2009 (2): 71~74
- Boon N, Top EM, Verstraete W, Siciliano SD. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Appl & Environ Microbiol*, 2003, **69** (3): 1511~1520
- Hajji KT, Lepine F, Bisaillon JG, Beaudet R, Hawari J, Guiot SR. Effects of bioaugmentation strategies in UASB reactors with a methanogenic consortium for removal of phenolic compounds. *Biotechnol & Bioengin*, 2000, **67** (4): 417~423
- Mohan SV, Rao NC, Prasad KK, Sarma PN. Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater. *Proc Biochem*, 2005, **40** (8): 2849~2857
- Saravanane R, Murthy DVS, Krishnaiah K. Treatment of anti-osmotic drug based pharmaceutical effluent in an upflow anaerobic fluidized bed system. *Waste Manage*, 2001, **21** (6): 563~568
- Wang JL, Quan XC, Wu LB, Qian Y, Hegemann W. Bioaugmentation as a tool to enhance the removal of refractory compound in coke plant wastewater. *Proc Biochem*, 2002, **38** (5): 777~781
- Song Z, Edwards SR, Burns RG. Biodegradation of naphthalene-2-sulfonic acid present in tannery wastewater by bacterial isolates *Arthrobacter* sp. 2AC and *Comamonas* sp 4BC. *Biodegradation*, 2005, **16** (3): 237~252
- Zhao LJ, Ma F, Guo JB, Zhao QL. Petrochemical wastewater treatment with a pilot-scale bioaugmented biological treatment system. *J Zhejiang Univ Sci A*, 2007, **8**: 1831~1838
- Zeng LX (曾丽璇), Luo GW (罗国维). The decoloration study of the active dye using a group of predominant bacteria. *Tech & Equip Environ Poll Contrl* (环境污染治理技术与设备), 2000, **1** (5): 36~39
- Dhouib A, Ellouz M, Aloui F, Sayadi S. Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Lett Appl Microbiol*, 2006, **42** (4): 405~411
- Zhao LJ, Guo JB, Yang JX, Wang L, Ma F. Bioaugmentation as a tool to accelerate the start-up of anoxic-oxic process in a full-scale municipal wastewater treatment plant at low temperature. *Intern J Environ & Poll*, 2009, **37** (2~3): 205~215
- Park D, Lee DS, Kim YM, Park JM. Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresour Technol*, 2008, **99** (6): 2092~2096
- Boon N, Goris J, De Vos P, Verstraete W, Top EM. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Appl & Environ Microbiol*, 2000, **66** (7): 2906~2913
- Cirja M, Hommes G, Ivashechkin P, Prell J, Schaffer A, Corvini PFX, Lenz M. Impact of bio-augmentation with *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 in membrane bioreactors degrading nonylphenol. *Appl Microbiol & Biotechnol*, 2009, **84** (1): 183~189
- Tartakovsky B, Levesque MJ, Dumortier R, Beaudet R, Guiot SR. Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfotobacterium frappieri* PCP-1. *Appl & Environ Microbiol*, 1999, **65** (10): 4357~4362
- Song GJ (宋国军), Wang J (王竞), Zhou JT (周集体), Lü H (吕红). Treatment of bromoamine acid wastewater in bioaugmented sequencing batch membrane bioreactor. *China Environ Sci* (中国环境科学), 2008, **28** (03): 229~232
- Yu FB, Ali SW, Guan LB, Li SP, Zhou S. Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *J Hazard Mat*, 2010, **176** (1~3): 20~26

- 26 Kim JH, Oh KK, Lee ST, Kim SW, Hong SI. Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. *Proc Biochem*, 2002, **37** (12): 1367~1373
- 27 Selvaratnam S, Schoedel BA, McFarland BL, Kulpa CF. Application of the polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcriptase PCR for determining the fate of phenol-degrading *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in a bioaugmented sequencing batch reactor. *Appl Microbiol & Biotechnol*, 1997, **47** (3): 236~240
- 28 Flores A, Nisola GM, Cho E, Gwon EM, Kim H, Lee C, Park S, Chung WJ. Bioaugmented sulfur-oxidizing denitrification system with *Alcaligenes defragrans* B21 for high nitrate containing wastewater treatment. *Bioproc & Biosyst Engin*, 2007, **30** (3): 197~205
- 29 Chen CY, Chen SC, Fingas M, Kao CM. Biodegradation of propionitrile by *Klebsiella oxytoca* immobilized in alginate and cellulose triacetate gel. *J Hazard Mat*, 2010, **177** (1~3): 856~863
- 30 Chen J (陈俊), Cheng SP (程树培), Wang HL (王洪丽), Lu JH (陆建华), Zhang XC (张晓春). Application of genetically engineered bacteria in treatment of pure terephthalic acid wastewater. *Ind Water & Wastewater* (工业用水与废水), 2006, **37** (1): 32~35
- 31 Liu C, Huang X, Wang H. Start-up of a membrane bioreactor bioaugmented with genetically engineered microorganism for enhanced treatment of atrazine containing wastewater. *Desalination*, 2008, **231** (1~3): 12~19
- 32 Wang YY, Fan YZ, Gu JD. Dimethyl phthalate ester degradation by two planktonic and immobilized bacterial consortia. *Intern Biodeter & Biodegr*, 2004, **53** (2): 93~101
- 33 Bai YH, Sun QH, Zhao C, Wen DH, Tang XY. Quinoline biodegradation and its nitrogen transformation pathway by a *Pseudomonas* sp. strain. *Biodegradation*, 2010, **21** (3): 335~344
- 34 Friello DA, Mylroie JR, Chakrabarty AM. Use of genetically engineered multi-plasmid microorganisms for rapid degradation of fuel hydrocarbons (Reprinted). *Intern Biodeter & Biodegr*, 2001, **48** (1~4): 233~242
- 35 Liu Z, Hong Q, Xu HH, Jun W, Li SP. Construction of a genetically engineered microorganism for degrading organophosphate and carbamate pesticides. *Intern Biodeter & Biodegr*, 2006, **58** (2): 65~69
- 36 Guo Y (郭杨), Wang SH (王世和). Application of genetically engineered strains to heavy metal and refractory wastewater treatment. *Saf & Environ Engin* (安全与环境工程), 2007, **14** (4): 57~61
- 37 Liang W (梁威), Hu HY (胡洪营). Research advances in biological enhancing treatment techniques for dyeing wastewater. *Tech & Equip Environ Poll Contr* (环境污染治理技术与设备), 2004, **5** (1): 8~11
- 38 Xu YB (许燕滨), Jiang X (江霞). Study on the construction of engineering bacteria degrading organic chloride. *Chongqing Environ Sci* (重庆环境科学), 2001, **23** (2): 46~48
- 39 Lu XY (卢显妍), Yin H (尹华), Peng H (彭辉), Ye JS (叶锦韶), Zhang N (张娜). Construction of high efficiency heavy metal removal strains by protoplast electricity induced fusion. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (1): 78~81
- 40 Liu C (刘春), Huang X (黄霞), Yang JL (杨景亮). Leakage and survival of genetically engineered microorganism in the environment applied for wastewater bioaugmentation treatment. *Environ Sci* (环境科学), 2008, **29** (9): 2571~2575
- 41 Quan XC, Shi HC, Liu H, Wang JL, and Qian Y. Removal of 2,4-dichlorophenol in a conventional activated sludge system through bioaugmentation. *Proc Biochem*, 2004, **39** (11): 1701~1707
- 42 Huang X (黄霞), Yu YX (俞毓馨), Wang L (王蕾). Application of immobilized cell in wastewater treatment. *Environ Sci* (环境科学), 1992, **14** (1): 41~49
- 43 Wu KYA, Wisecarver KD. Cell immobilization using PVA cross-linker with boric acid. *Biotechnol & Bioengin*, 1992, **39** (4): 447~449
- 44 Yan ZY (闫志英), Liao YZ (廖银章), Li XD (李旭东). Removal of nitrate from wastewater by immobilization cells. *Water Resour Prot* (水资源保护), 2006, **22** (3): 54~59
- 45 Liu JJ (刘江江), Chen LJ (陈吕军), Wen DH (温东辉), Wang J (王军). Research progress of horizontal gene transfer applied in pollution treatment. *Acta Sci Nat Univ Pekinensis* (北京大学学报), 2006, **42** (4): 555~560
- 46 van Elsas JD, Bailey MJ. The ecology of transfer of mobile genetic elements. *Fems Microbiol Ecol*, 2002, **42** (2): 187~197
- 47 Top EM, Springael D, Boon N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *Fems Microbiol Ecol*, 2002, **42** (2): 199~208
- 48 Bo YH (柏耀辉), Wen DH (温东辉), Tang XY (唐孝炎). Horizontal gene transfer and its application in pollution remediation. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (5): 741~747
- 49 Stuart-Keil KG, Hohnstock AM, Drees KP, Herrick JB, Madsen EL. Plasmids responsible for horizontal transfer of naphthalene catabolism genes between bacteria at a coal tar contaminated site are homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *Appl & Environ Microbiol*, 1998, **64** (10): 3633~3640
- 50 Newby DT, Josephson KL, Pepper IL. Detection and characterization of plasmid pJP4 transfer to indigenous soil bacteria. *Appl & Environ Microbiol*, 2000, **66** (1): 290~296
- 51 Springael D, Peys K, Ryngaert A, Van Roy S, Hooyberghs L, Ravatn R, Heyndrickx M, van der Meer JR, Vandecasteele C, Mergeay M, Diels L. 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. *Environ Microbiol*, 2002, **4** (2): 70~80
- 52 Quan XC, Tang H, Xiong WC, Yang ZF. Bioaugmentation of aerobic sludge granules with a plasmid donor strain for enhanced degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J Hazard Mater*, 2010, **179** (1~3): 1136~42
- 53 Ehlers LJ, Bouwer EJ. RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Sci & Technol*, 1999, **39** (7): 163~171
- 54 Li MY (李蒙英), Shen B (沈标), L SP (李顺鹏). Horizontal gene transfer in biofilms and its induced bioenhancement. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2006, **12** (3): 441~444
- 55 Mohan SV, Falkentoft C, Nancharaiyah YV, Sturm BSM, Wattiau P, Wilderer PA, Wuertz S, Hausner M. Bioaugmentation of microbial communities in laboratory and pilot scale sequencing batch biofilm reactors using the TOL plasmid. *Bioresour Technol*, 2009, **100** (5): 1746~1753
- 56 Domde P, Kapley A, Purohit HJ. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. *Environ Sci & Poll Res*, 2007, **14** (1): 7~11