

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200233011

UDC_____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

利用高选择性基因工程菌治理有机废水配
伍的含汞废水

Treatment of Mercuric Ion Wastewater Coupled with
Organic Matters by Genetically Engineered *E.coli* JM109

教育部优秀青年教师资助计划项目, 福建省自然科学基金 (NO. D0310004)

郑 杨 春

指导教师姓名: 邓 旭 教 授

专业名称: 化 学 工 程

论文提交日期: 2 0 0 5 年 5 月

论文答辩日期: 2 0 0 5 年 6 月

学位授予日期: 2 0 0 5 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2005年6月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

符号说明

C_e	吸附平衡后溶液中金属离子浓度	mg L^{-1}
C_i	溶液中起始金属离子浓度	mg L^{-1}
C_{in}	进料液中金属离子浓度	mg L^{-1}
C_R	反应器中金属离子浓度	mg L^{-1}
D	稀释率	h^{-1}
D_{cri}	临界稀释率	h^{-1}
E	金属离子去除率	
F_{in}	进料液流量	ml min^{-1}
F_{out}	出料液流量	ml min^{-1}
K	Langmuir 常数	
M	菌体质量浓度	g.dry cell L^{-1}
OD_{600}	菌体浓度吸光度	
q_{max}	单位干重菌体对金属离子的理论最大吸附量	
	Langmuir 常数	$\text{mg [g.dry cell]}^{-1}$
Q	单位干重菌体对金属离子的吸附量	$\text{mg [g.dry cell]}^{-1}$
k,n	Freundlich 常数	
R	反应器处理能力	$\text{mgHg}^{2+} \text{ h}^{-1}$
T	时间	min, h
V	反应器有效体积	ml
γ	相关系数	
μ	比生长速率	
μ_{max}	最大比生长速率	

计算公式

1 去除率 E $E = \frac{(C_i - C_e)}{C_i} \times 100\%$ 或 $E = \frac{(C_{in} - C_e)}{C_i} \times 100\%$

2 菌体质量浓度 M $M = OD_{600} \times 0.35$

3 富集能力 q $q = \frac{(C_i - C_e)}{M}$ 或 $q = \frac{(C_{in} - C_e)}{M}$

4 Langmuir 吸附等温式 $q = \frac{q_{\max} C_e}{K + C_e}$

5 Freundlich 吸附等温式 $q = kC_e^{1/n}$

6 稀释率 D $D = F_{in} / V$

7 反应器处理能力 R $R = F_{in} \times (C_{in} - C_e)$

摘 要

本文首先研究了利用分子生物学技术构建的高选择性汞富集基因工程菌 *E.coli* JM109 (表达 MerT、MerP 汞特异结合转运蛋白和金属硫蛋白 MT, 简称为 M1) 对 Hg^{2+} 的富集能力。研究表明在初始 Hg^{2+} 为 $1\sim 20\text{mg L}^{-1}$ 范围内 M1 对 Hg^{2+} 的富集过程既可以用 Langmuir 也可以用 Freundlich 吸附等温模型来描述, 其等温吸附方程分别可以表示为 $q=16.975C_e/(1.813+C_e)$ 和 $q=5.135C_e^{0.498}$, 但 Langmuir 方程的拟合效果在实验范围浓度内都比较理想, 而 Freundlich 方程在较低浓度的实验浓度中拟合效果较好。

研究了在低营养环境中基因工程菌的生长富集耦合行为。实验主要考察了汞离子浓度、离子强度、络合物、不同金属离子、pH 对其生长富集耦合的影响。研究表明 M1 的生长受抑制程度随着环境中汞离子浓度的增加而增加, 当环境中汞离子浓度达到 4mg/L 时, 菌体在生长平稳期的 OD_{600} 仅达到 0.3 左右, 汞去除率也较低; 而当环境汞离子为 1mg/L 时, 其生长基本不受抑制, 并且汞去除率达到 90% 以上, 得到较好的生长富集效果。比较了在不同的 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度下菌体的生长富集耦合行为, 结果表明 Na^+ 浓度为 0.04mol/L 时, 其生长富集效果最好; Ca^{2+} 浓度为 0.1mol/L 时其生长富集行为基本不受影响, 而随着环境中 Ca^{2+} 浓度的进一步增加, M1 的生长逐渐受到抑制; Mg^{2+} 对 M1 生长富集的影响与 Ca^{2+} 相似。络合物 EDTA 对菌体的生长富集耦合影响较大, 而柠檬酸三钠对菌体的生长富集耦合影响很小。当 EDTA 浓度为 1.4mmol/L 时, M1 的生长受到严重抑制, 而在 50mmol/L 柠檬酸三钠的环境中, 其生长富集耦合基本不受影响。在其他金属离子共存的情况下, M1 的生长受抑制, 其抑制顺序为: $\text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \geq \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$, 由于 M1 生长受共存金属离子的抑制, 因此其对汞离子的富集行为也相应受到影响, 其中 Ni^{2+} 对生长富集的影响最小, 当 Ni^{2+} 为 10mg/L , Hg^{2+} 为 1mg/L 时, M1 的生长及其对汞离子的富集基本不受影响。 Hg^{2+} 的存在导致 M1 的生长受起始 pH 的影响,

但起始 pH 的变化对 Hg^{2+} 的去除影响不明显。

为了研究利用微生物的生长富集性能实现重金属废水的连续化处理，实验设计了连续操作搅拌槽式反应器，并实现了 M1 菌在连续操作搅拌槽式反应器对有机废水配伍的含 Hg^{2+} 废水的连续化处理。考察了起始 Hg^{2+} 浓度和稀释率对反应器处理效果和処理能力的影响。研究发现在连续操作搅拌槽式生物反应器中利用 M1 菌的生长富集耦合能力对有机废水配伍的含 Hg^{2+} 废水进行连续处理时，当稀释率一定时，反应器的处理能力随起始 Hg^{2+} 浓度的增加而增大；当起始 Hg^{2+} 浓度为定值时，去除率会随稀释率的升高而降低，并且反应器的处理能力存在一个最优稀释率。

最后，针对 M1 菌在连续搅拌反应器中对 Hg^{2+} 进行的连续化处理过程，建立了一个基于 Hg^{2+} 物料平衡的过程模型，分析了连续处理工艺的 Hg^{2+} 变化情况。结果发现模型计算值与实验值基本符合，基本能够对连续处理运行过程进行模拟。但是由于耦合处理过程的复杂性、菌体本身的活力的不一致性以及测定方法上的误差，实验值与模型计算值虽然比较接近，但仍存在一定的相对偏差。

该研究为利用高选择基因工程菌 M1 处理有机废水配伍的含汞废水技术的实际应用打下基础。

关键词：基因工程菌 *E.coli*；汞离子；废水；生物富集；连续化处理

Abstract

The developments of genetic engineering have been bringing new means for metals cleanup. Through genetic engineering, microorganisms can enhance not only their specificity to specific metal but also their capacity of metal uptake. Genetically engineered *E. coli JM109*, namely M1, by expressing Hg²⁺ transport system (MerP and MerT) and GST-MT simultaneously, can improve its Hg²⁺ resistance and bioaccumulation capacity compared to the original host strain. Despite much research, few bioaccumulation processes with gene-modified microorganisms were applied into industrial use due to the difficulties in an attempt to realize continuous treatment. To make the genetically engineered cells propagate themselves without losing high affinity to the desired metal when they are accumulating metal ions is a feasible and effective way to make the treatment process continually operational, considering the fact that heavy metals usually coexist in wastewater with other kinds of contaminants such as organic pollutants, which can possibly be used by microorganism as substrates. Furthermore, using growing cells can avoid the need of a separate biomass production process such as cultivation, harvesting, etc. Therefore, it is meaningful to study M1's capability of simultaneous growth and bioaccumulation of Hg²⁺ under low nutritional circumstances, and furthermore, to study the continuous treatment of Hg²⁺ contaminated wastewater.

Firstly, bioaccumulation capacity of M1 was tested under the condition of pH6.5 and 37°C. Equilibrium isotherm of Hg²⁺ uptake by M1 was analysed by Langmuir and Freundlich adsorption model. The isotherm fitted both

Langmuir model and Freundlich model well. Langmuir model constant q_{\max} (theoretical maximum biosorptive capacity) and K (dissociation constant) were $16.679\text{mg [g dry cell]}^{-1}$ and 1.813mg L^{-1} respectively. Freundlich constant k and n were 5.135 and 2.008 respectively.

Secondly, M1 was also tested for its capability of simultaneous growth and bioaccumulation of Hg^{2+} under low nutritional circumstances. The influential factors of ambient conditions, e. g. initial concentrations of mercuric ion, ionic strength, the presence of metal chelators, other coexisting metal ions and pH were investigated. Hg^{2+} bioaccumulation behavior of M1 was proved to be well coupled with its growth. Na^+ was essential to the M1 growth. Of all tested Na^+ concentrations, 0.04mol L^{-1} was optimal. The presence of 0.1mol L^{-1} Ca^{2+} or Mg^{2+} could promote the growth of M1 and keep Hg^{2+} removal rate high, but the growth of M1 was inhibited seriously as the concentration of Ca^{2+} or Mg^{2+} reached 0.3mol L^{-1} . Chelator EDTA had a significant influence on M1 growth and Hg^{2+} bioaccumulation, while the effect of citrate was little. The presence of other coexisting metal ions inhibited the growth of M1 and then affected Hg^{2+} bioaccumulation. The influential order was as follow: $\text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \geq \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$. Furthermore, M1 was very sensitive to pH in 0.5LB containing 1mg/L Hg^{2+} and only grew well under pH 6-7, while the control (M1 in 0.5LB without Hg^{2+}) could grow well as pH reached 8. The behavior of Hg^{2+} bioaccumulation by M1 was also affected as pH exceeded 7, but the inhibition effect was much slighter than that on M1 growth.

Thirdly, a continuous treatment of Hg^{2+} contaminated wastewater by M1 was realized in a designed Continuous Stirred-Tank Bioreactor. Initial Hg^{2+} concentration in Feed and diluting rate were tested for their

influence on the efficiency of the continuous process.

Lastly, a kinetic model based on Hg^{2+} mass balance was proposed to analyse the continuous treatment process. The calculated steady-state Hg^{2+} concentrations in effluents of different 11 runs were close to the data observed in the experiments. Despite relative errors between calculated ones and experimental ones, the model could fairly simulate the continuous treatment process.

Key words: Genetically engineered *E. coli*, Mercuric ion, Wastewater, Bioaccumulation, Continuous treatment

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 重金属污染的危害、来源及处理方法	1
1.2 生物吸附	1
1.2.1 生物吸附材料 2	
1.2.2 生物吸附机理 3	
1.2.3 生物吸附的影响因素 5	
1.3 基因工程技术在生物处理重金属污染中的应用	9
1.3.1 微生物对金属毒性的抗性 10	
1.3.2 金属结合蛋白(肽) 11	
1.3.3 一些与重金属抗性相关的操纵子 12	
1.3.4 构建基因工程菌与重金属污染处理 15	
1.4 本文的研究意义、目的及内容	1
第二章 基因重组菌对 Hg^{2+} 的生物富集耦合实验	21
2.1 引言	21
2.2 实验部分	21
2.3 结果和讨论	30
2.3.1 M1 对 Hg^{2+} 生物富集的富集等温模型 30	
2.3.2 M1 在不同 Hg^{2+} 浓度环境下的生长富集耦合 34	
2.3.3 离子强度对 M1 生长富集耦合行为的影响 35	
2.3.4 络和剂对 M1 生长富集耦合行为的影响 42	
2.3.5 共存金属离子对 M1 生长富集耦合行为的影响 45	
2.3.6 起始 pH 对 M1 生长富集耦合行为的影响 48	
2.4 小结	51
第三章 M1 对含 Hg^{2+} 有机废水的连续化处理	53
3.1 引言	53
3.2 实验部分	53
3.3 结果和讨论	55
3.3.1 不同进料 Hg^{2+} 浓度对连续化处理的影响 55	

3.4 小结..... 68

第四章 连续化处理过程的数学模型及数据拟合 69

4.1 引言..... 69

4.2 模型的建立..... 69

4.3 结果和讨论..... 71

4.4 误差分析..... 82

4.5 小结..... 85

第五章 结论 86

参考文献 88

附录一 原始数据 96

附录二 求解数学模型的 matlab 程序 105

附录三 在读期间完成的论文 106

致谢 107

Contents

Chapter 1 Introduction 1

1.1 DAMAGE AND TREATMENT OF HEAVY METAL	1
1.2 BIOSORPTION	1
1.2.1 Biosorbent	2
1.2.2 Biosorptive mechanisms	3
1.2.3 Influencial factors of biosorption	5
1.3 APPLICATION OF GENETIC TECHNOLOGY IN HEAVY METAL POLLUTION TREATMENT	9
1.3.1 Heavy metal resistance of microorganisms	10
1.3.2 Metal chelating protein and peptide	11
1.3.3 Operons concerning heavy metal resistance	12
1.3.4 Genetically engineered microorganism and heavy metal pollution treatment	15
1.4 GOAL	19

Chaper 2 Simultaneous growth and bioaccumulation of mercuric ion by genetically engineered *E.coli* JM109 21

2.1 INTRODUCTION	21
2.2 EXPERIMENT	21
2.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	30
2.3.1 Bioaccumulation isotherm model of Hg ²⁺ by M1	30
2.3.2 Effect of Hg ²⁺ concentration on the SG&B	34
2.3.3 Effect of ionic strength on SG&B	35
2.3.4 Effect of chelators on SG&B	42
2.3.5 Effect of coexisting ion on SG&B	45
2.3.6 Effect of initial pH on SG&B	48
2.4 CONCLUSION	51

Chaper 3 Continuous treatment of organic heavy metal wastewater by genetiaccally engineered *E.coli* JM109 53

3.1 INTRODUCTION	53
3.2 EXPERIMENT	53
3.2.1 Experimental equipment	53
3.2.2 Experiment method	53
3.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	55
3.3.1 Effect of different Hg ²⁺ concentrations in influent on continuous treatment	55
3.3.4 Effect of dilute rate on continuous treatment	60
3.4 CONCLUSION	68
Chapter 4 Mathematical model of continuous treatment.....	69
4.1 INTRODUCTION	69
4.2 MODEL ESTABLISHMENT	69
4.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	71
4.4 ERROR AND ANALYSIS	82
4.4 CONCLUSION	85
Chapter 5 Conclusions	86
References.....	88
Appendix I	96
Appendix II.....	105
Appendix III	106
Acknowledgement.....	107

第一章 文献综述

1.1 重金属污染的危害、来源及处理方法

工业废水中所含的重金属元素主要有铬、汞、镍、镉、钼、铅、铜和锌等，重金属离子在自然界中没有自净和生物降解能力，可通过生物链不断富集，对动植物的生命活动造成危害，如震惊世界的水俣病和骨痛病就是由于汞和镉造成的。重金属废水的来源主要源于采矿业、冶金业、电镀、农药、化工、印染等行业^[1,2]。据报道，目前我国受镉、砷、铬、铅等重金属污染的耕地面积近 2000 万公顷，约占总耕地面积的 1/5，其中工业“三废”污染耕地 1000 万公顷，污水灌溉的农田面积已达 330 多万公顷。例如：某省曾对 47 个县和郊区的 259 万公顷耕地（约占全省耕地五分之二）进行过调查，结果表明，75% 的县已受不同程度的重金属污染的潜在威胁，而且污染趋势仍在加重。仅以土壤重金属污染为例，全国每年就因重金属污染而减产粮食 1000 多万吨，另外被重金属污染的粮食每年也多达 1200 万吨，合计经济损失至少 200 亿元^[3]。

传统的重金属废水处理方法有：化学沉淀法、电解法、离子交换法、膜技术分离法、氧化还原法、铁氧体法、浮上法、吸附法、反渗透法、电渗析法、蒸发浓缩法等^[2,4]。但是这些传统的方法最突出的缺点是处理低浓度重金属废水时，操作繁琐，运行费用高，能耗大，且易造成二次污染^[4,5]，因此，寻求新的处理技术是十分必要的。

1.2 生物吸附

与传统重金属废水处理方法相比，生物吸附法原材料来源丰富、品种多、成本低，不仅吸附设备简单、易操作，而且具有速度快、吸附量大、选择性好等优点，尤其在处理 1-100ppm 的重金属水溶液时特别有效。在后处理方面，

用一般的化学方法就可以解吸生物量上吸附的金属离子，且解吸后的生物量可以再次吸附重金属^[5]。因此，生物吸附法作为一种新兴的处理技术，特别是在处理低浓度的重金属废水方面有着极为广阔的前景，一些微生物对重金属离子的吸附可见表 1。

目前人们对生物吸附的定义不尽相同。从广义上说，生物吸附包括两个阶段：第一阶段重金属在细胞表面上的吸附，即胞外多聚物、细胞壁上的官能团与金属离子的结合，特点是快速、可逆，不依赖于能量代谢，因此又称为被动吸附；第二阶段是细胞表面吸附的金属离子与细胞表面的某些酶结合转移到细胞内，其特点是速度慢、不可逆，与细胞代谢有关，又称为主动运输。非活性生物量主要依靠表面吸附，活性生物量既有表面吸附又有主动运输^[5]。狭义上则将不依赖于代谢作用的非活性生物量被动的表面吸附统称为生物吸附（biosorption），而将依赖于代谢作用的活性生物量对重金属的主动运输作用称为生物富集（bioaccumulation）^[6]。生物吸附剂表面具有金属吸附能力的功能基团有：羧基、磷酸基、巯基、氨基、硫酸基、咪唑、硫醚、酚基、氨基化合物、多肽和蛋白质上的羟基、细胞壁上的多聚糖等^[7]。

1.2.1 生物吸附材料

生物吸附和富集的材料来源广泛，有微生物材料、植物材料、动物材料以及这些材料的衍生物等。细菌、酵母、真菌、放线菌^[8]、树叶^[9]、骨粉^[10]、蕨类植物^[11]、苔藓类植物^[12]、藻类^[13]、生物聚合物^[14]甚至鸡蛋壳膜^[9]都可以用来作为生物吸附材料。

表 1 一些微生物吸附剂对重金属离子的吸附

Tab.1 Heavy metals biosorption by some biomass

微生物	吸附金属离子	吸附量 (mg/g. dry biomass or cell)
<i>Actinomyces AK61</i> ^[6]	Cd^{2+}	10
<i>Azolla filiculoides</i> ^[11]	Zn^{2+}	45.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PU21 ^[15]	Hg^{2+}	400
<i>Ochrobactrum authropi</i> ^[16]	Cr^{6+}	86.2
	Cd^{2+}	37.3
	Cu^{2+}	32.6
<i>Streptomyces riomusus</i> ^[17]	Zn^{2+}	30
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ^[18]	Cd^{2+}	27.79
	Pb^{2+}	85.86
	Cu^{2+}	26.55
<i>Polyporous versicolor</i> ^[19]	Ni^{2+}	57

1.2.2 生物吸附机理

生物吸附重金属机理很复杂，有静电吸附机理、离子交换机理、表面络合机理、氧化还原、微沉淀机理等。

(1) 静电吸附机理：静电吸附，是一种物理吸附，金属离子通过静电作用而被生物吸附。Kuyucak 等在用死马尾藻吸附金的研究中发现，在有其它金属离子 (UO^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^{2+}) 存在，pH2.5 的溶液中，马尾藻能选择性地吸附金。他们认为在较低的 pH 条件下，氯亚金酸盐水解生成不同的金属阴离子基团，而在此 pH 下，马尾藻表面的功能基团，如胺基和羧基使细胞表面

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库