

用于合成 PHA 活性污泥的驯化培养

张琦, 高大文, 陶 彧

(哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨)

摘 要: 活性污泥用于可降解塑料聚羟基烷酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA) 生产前需进行驯化培养, 以增强其合成能力. 为提高 PHA 产量, 对比考察了单阶段驯化和双阶段驯化两种模式对底物利用、活性污泥性质以及合成 PHA 的影响. 结果表明: 单阶段模式下乙酸利用速率为 $8.8 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{min})$, 活性污泥质量浓度为 $2\,000 \text{ mg/L}$ 左右, PHA 单位乙酸合成效率为 0.19 g/g , PHA 含量在进水后 90 min 时达到最大值; 双阶段模式下各项指标均有提高, 利用率为 $27.3 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{min})$, 活性污泥质量浓度为 $4\,500 \text{ mg/L}$ 左右, PHA 单位乙酸合成效率提高到 0.24 g/g , PHA 含量在进水后 30 min 时达到最大值. 因此, 双阶段模式比单阶段模式更适于培养具有高 PHA 合成能力的活性污泥.

关键词: 活性污泥; 驯化; 聚羟基烷酸酯; 乙酸

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2012)04-0058-05

Enhanced acclimating strategies for polyhydroxyalkanoate-production conventional activated sludge

ZHANG Qi, GAO Da-wen, TAO Yu

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China)

Abstract: The polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation ability of raw Conventional activated sludge (CAS) can be improved with proper acclimating method, which is necessary for high PHA yield. This study compared two acclimating strategies: one-step acclimation and two-step acclimation. The comparison was based on the PHA production activity, substrate utilization rate and sludge characteristics. The one-step acclimation performed a PHA yield of 0.19 g/g acetate acid and an acetate acid utilization rate of $8.8 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{min})$. The PHA maximum content was obtained 90 min later after substrate feeding accomplished. The final biomass concentration (MLVSS) was around $2\,000 \text{ mg/L}$. The data of these three criteria for the two-step acclimation were 0.24 g/g acetate acid, $27.3 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{min})$, 30 min and $4\,500 \text{ mg/L}$, respectively, which were all increased. Our study indicated that the two-step acclimating strategy was more suitable to cultivate PHA-production CAS.

Key words: activated sludge; acclimate; polyhydroxyalkanoate (PHA); acetate acid

目前, 聚羟基烷酸酯 (PHA) 的微生物合成已实现产业化, 且基本采用纯菌发酵方式完成. 但纯菌发酵方式的生产成本高昂, 产品在可生物降解的包装材料、组织工程材料、缓释材料等方面有广

阔的应用前景, 只有进一步降低成本才可能被更广泛应用^[1]. 活性污泥法是目前最有效的污水生物处理法之一, 有研究证明在污水处理过程中存在 PHA 合成现象^[2]. 目前已有采用市政废水^[3]、糖蜜废水^[4-5]和制橄榄油废水^[6]等经厌氧酸化处理后作为活性污泥的底物来合成 PHA 的报道, 在废水处理过程中合成 PHA 既能实现污水和污泥的资源化, 还能降低 PHA 的生产成本. 利用废水培养活性污泥生产 PHA 的过程一般包括废水厌

收稿日期: 2011-04-12.

基金项目: 黑龙江省杰出青年基金资助项目 (JC200909).

作者简介: 张琦 (1985—), 女, 硕士研究生;

高大文 (1967—), 男, 教授, 博士生导师.

通讯作者: 高大文, gaodw@hit.edu.cn.

氧处理、活性污泥驯化以及 PHA 合成 3 个阶段^[7-8],如图 1 所示. 合成 PHA 活性污泥驯化培养的研究结果证明,外部营养物质的供给在充足和缺乏状态间动态变化,有利于活性污泥中合成 PHA 的微生物富集,还能够促进合成能力的提高,这种培养方式被称为丰盛-饥饿模式(或称好氧动态补料工艺,ADF)^[9]. 多数研究中活性污泥的驯化培养和 PHA 的合成培养都采用 ADF 工艺,取得的最高 PHA 产量可达细胞干质量的 89%. 目前的研究重点为 PHA 合成阶段培养条件的优化(DO、pH 值、碳氮比、碳磷比等)^[10-12]. 研究表明,底物中氮和磷的质量浓度过高或过低都不利于 PHA 合成,且其中氮源质量浓度对其影响更为明显^[12]. 在各研究中驯化阶段所采用的底物组成和培养方式等一般与合成期保持一致,但未有结果表明与 PHA 合成阶段相似的培养方式对活性污泥的驯化也最有效,而且关于驯化条件的优化研究也鲜见报道.

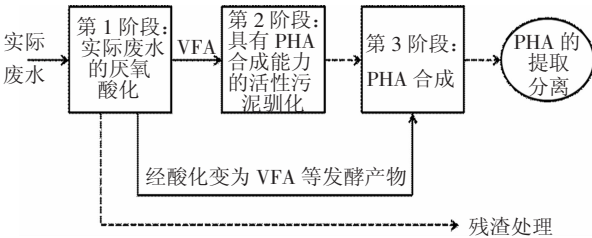


图1 PHA 3 阶段合成工艺流程

为了提高活性污泥的驯化效果,增加 PHA 的产量,对比研究了单阶段模式和双阶段模式下所驯化活性污泥的底物利用速率、污泥性质和 PHA 产量,证明了双阶段模式更适于培养合成 PHA 的活性污泥.

1 试 验

1.1 活性污泥及培养设备

用于接种的活性污泥取自哈尔滨市某污水处理厂 A/O 工艺二沉池. 污泥接种后,反应器内污泥质量浓度为 800 mg/L 左右,SVI 为 70 mL/g.

利用好氧序批式反应器(SBR)对活性污泥进行驯化培养,反应器的有效容积为 1 L,每周期进水体积为 0.5 L. 采用 ADF 工艺进行培养,曝气量为 1 L/min,培养温度为室温(18~20℃).

1.2 人工废水组成

本试验中所利用的废水全部为人工配水,其中模拟酸化废水为驯化活性污泥的主要底物,由营养液和少量微量元素液组成,每升配水中加入 2 mL 的微量元素液,进水 pH 为 6.6~6.7;模拟生活污水应用在双阶段驯化模式的过渡驯化期,

COD 为 600 mg/L 左右,BOD₅ 为 280 mg/L 左右. 两种配水组成及质量浓度如表 1、2 所示.

表 1 模拟酸化废水的组成 mg·L⁻¹

营养液	ρ	微量元素液	ρ
CH ₃ COONa·3H ₂ O	4 000	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1 000
NH ₄ Cl	170(单阶段)	H ₃ BO ₃	150
	300(双阶段)	CoCl ₂ ·6H ₂ O	150
K ₂ HPO ₄	92	MnCl ₂ ·4H ₂ O	120
KH ₂ PO ₄	45	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	120
MgSO ₄	600	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	60
EDTA	100	CuSO ₄ ·5H ₂ O	30
CaCl ₂ ·2H ₂ O	70	KI	30

表 2 模拟生活污水组成 mg·L⁻¹

成分	ρ	成分	ρ
牛肉膏	68	(NH ₄) ₂ SO ₄	112
蛋白胨	132	KH ₂ PO ₃	48.8
淀粉	268	MgSO ₄	66
葡萄糖	200		

1.3 试验方法

单阶段驯化模式:将取自污水处理厂二沉池的活性污泥混合液接种到 SBR 反应器中,利用模拟酸化废水进行驯化培养,SBR 周期为 12 h(包括曝气 660 min,静沉 40 min,进水、排水各 10 min),每日排出 100 mL 污泥混合液,污泥龄(SRT)为 10 d(见表 3).

双阶段驯化模式:培养过程分为过渡驯化和继续驯化两个时期. 过渡驯化期:SBR 周期为 8 h(包括曝气 420 min,静沉 40 min,进水、排水各 10 min),每天运行 3 个周期,不排泥. 活性污泥接种后先利用模拟生活污水进行培养,运行 1 d 后,进水中模拟生活污水量每日减半,不足部分用模拟酸化废水补充. 运行到第 3 天时进水中的模拟生活污水仅占 1/8,到第 4 天开始完全用模拟酸化废水进行培养,再继续运行 2 d,完成过渡驯化. 继续驯化期:延长 SBR 周期到 12 h(包括曝气 660 min,静沉40 min,进水、排水各 10 min),每昼夜运行两个周期,每日排出 100 mL 污泥混合液,控制污泥龄为 10 d,继续驯化至污泥质量浓度以及活性污泥对各物质的代谢(碳源、PHA)都达到稳定状态(见表 3).

表 3 运行参数对比

模式	配水	周期/h	SRT/d
单阶段	模拟酸化废水	12	10
双阶段	模拟酸化废水 + 模拟生活污水	8	0
	模拟生活污水	12	10

1.4 检测方法

从反应器中取 4 mL 样品,离心后使固液分离,上层清液用于乙酸质量浓度检测,下层固体为活性污泥,用于 PHA 含量检测。

PHA 质量分数检测^[12]:将样品至于 -20 ℃ 冰箱中,完全冷冻后放置于真空冷冻干燥机中冻干;冻干后的样品经称重后加入 2 mL 氯仿和 2 mL 苯甲酸、甲醇和硫酸混合溶液中,105 ℃ 消解;再加入超纯水,经充分振荡后低温静置使液体分层,吸取下层有机相,利用气相色谱和 FID 检测器测定含量。

乙酸质量浓度检测:先将样品透过 0.45 μm 的滤膜,去除样品中的微生物等杂质;再加入甲酸酸化,以环己酮和乙酸丁酯为内标物,利用气象色谱和 FID 检测器检测质量浓度。

试验中测定的其他指标主要有 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、溶解性正磷酸盐(SOP)、MLSS、MLVSS,检测方法采用国家环保总局颁布的标准方法^[13]。

2 结果与分析

2.1 底物代谢

利用单阶段驯化模式进行培养的反应器内乙酸、氨氮和正磷酸盐的质量浓度都在进水后 90 min 内显著降低,其中乙酸和氨氮被完全利用;磷酸盐相对过量,90 min 后质量浓度保持在 30 mg/L 左右。在底物快速消耗阶段,其利用速率分别为乙酸 8.8 mg/(L · min),氨氮 0.3 mg/(L · min),正磷酸盐 0.3 mg/(L · min)。底物中各物质质量浓度随时间变化见图 2 所示。

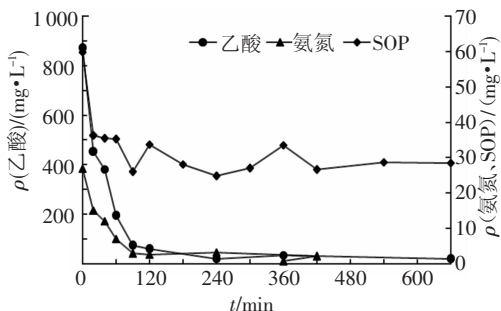


图2 单阶段培养体系中营养物质质量浓度变化

以双阶段驯化模式运行的反应器内活性污泥对底物的利用情况有所不同。乙酸在进水的前 30 min 内被快速利用,之后其质量浓度保持在较低水平,利用速率为 27.3 mg/(L · min);进水氨氮质量浓度为 46 mg/L,前 120 min 内氨氮质量浓度快速下降,之后降速变缓,到周期结束时出水氨氮质量浓度为 14.2 mg/L,快速消耗期的吸收速率为 0.2 mg/(L · min);磷酸盐在进水后 120 min 内被全部利用,吸收速率为 0.3 mg/(L · min)。底

物中各物质质量浓度随时间变化如图 3 所示。

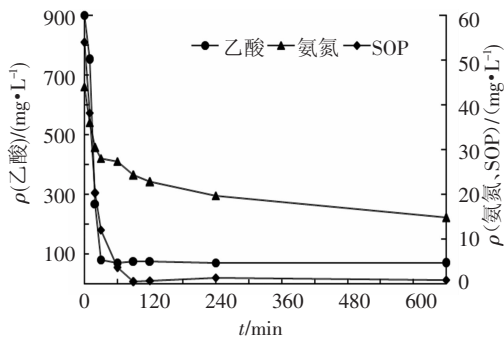


图3 双阶段培养体系中营养物质质量浓度变化

纯菌种合成 PHA 是通过脂肪酸 β -氧化及从头合成等途径完成的^[1],需多种 PHA 合成酶和辅酶等蛋白质类物质参与^[14]。目前尚没有能够直接解释混合菌种吸收底物合成 PHA 机理的研究,但混合菌种吸收底物合成 PHA 的过程和纯菌种有一定的相似性,即活性污泥中微生物需从底物中吸收氮源用于合成相关酶等功能物质。Taka-batake 等^[15]在研究含氮化合物对于活性污泥合成 PHA 的影响时发现:底物中加入含氮化合物能够促进微生物细胞中蛋白质和碳水化合物含量提高,且加入含氮化合物的体系内碳源利用速率也较不加氮源的体系有明显提高。本研究中,双阶段驯化模式下进水氨氮质量浓度高于单阶段驯化模式,氨氮质量浓度相对过量,能够充足供给微生物合成功能性物质所需的氮元素,使微生物细胞中相关酶和辅酶量增加,增强微生物利用底物合成 PHA 能力,因此底物中碳源能够在短时间内被快速利用,乙酸的利用速率从 8.8 mg/(L · min) 加快到 27.3 mg/(L · min),提高了 210%。双阶段模式中过渡期的培养过程也能够一定程度上增强活性污泥中微生物的活性,但活性污泥对底物的利用效果考查主要是在驯化培养达到稳定后(培养第 15 天后)进行的,所以相对而言,过渡期培养的影响相对较小。

2.2 污泥性质

单阶段驯化模式培养试验中,从污泥接种到运行第 10 天期间未对反应器排泥。第 10 天 MLVSS 为 3 000 mg/L,之后每周期排出 50 mL 泥水混合物,保持 SRT 为 10 d,MLVSS 开始下降,5 d 后稳定在 2 000 mg/L 左右,SVI 在 80 mg/L 左右。运行到第 20 天,活性污泥沉降性能快速恶化,SVI 上升至 300 ~ 600 mL/g,MLVSS 快速下降到 1 200 mg/L。结合以往研究结果^[16],分析其原因可能是在氮源相对不足的状态下,丝状菌较大的比表面积可以最大限度地吸收营养元素,与其他微生物竞争时能很快占据优势地位,导致污泥的

SVI 急剧升高,系统崩溃.

双阶段驯化模式培养的活性污泥在增殖速率和 MLVSS 等方面有显著改善. 过渡驯化期一般在 5~6 d 内基本结束, 由于在此期间反应器不排泥, 活性污泥质量浓度快速增加, 过渡驯化完成时活性污泥质量浓度为 3 000 mg/L. 之后开始继续驯化阶段, 每周期排出 50 mL 污泥, 保持 SRT 为 10 d, MLVSS 仍继续增加, 反应器运行到第 15 天 MLVSS 可达 4 500 mg/L 左右, 比单阶段模式增加了 125%. 驯化培养到第 35 天, 活性污泥沉降性能仍然较好, SVI 为 80 mL/g 左右.

前人研究表明, 混合菌种中微生物吸收底物主要用于合成储藏性物质和细胞增殖, 与活性污泥中其他微生物相比, 合成 PHA 的微生物将吸收的底物更多地用于 PHA 合成而非细胞增殖^[9], 因此, 活性污泥中合成 PHA 的微生物的增殖性能相对较弱. 双阶段驯化模式在驯化初期不排泥有利于提高污泥质量浓度, 即有利于富集合成 PHA 的微生物. 试验采用的活性污泥取自于污水处理厂, 在过渡驯化期进水从类似于生活污水的模拟生活污水逐渐转变为模拟酸化废水, 有助于微生物适应驯化环境, 保持较高的增殖量和较高的 PHA 合成活性. 反应器运行到第 5 天时, 单阶段驯化模式下 MLVSS 为 1 700 mg/L, 而双阶段驯化模式下 MLVSS 提高了 1.8 倍, 达 3 000 mg/L. 活性污泥在短时间内达到较高质量浓度, 有利于缩短驯化时间, 提高驯化效率. 由于双阶段驯化模式下充分供给氨氮, 微生物增殖不受氨氮质量浓度限制, 因此, 微生物的增殖能力比单阶段模式有所增强, 反应器开始定期排泥后 MLVSS 仍不断增加, 提高了驯化产出的活性污泥量, 从而最终提高 PHA 的产量. 有研究表明活性污泥的沉降性能不影响 PHA 在细胞中的含量^[17], 但是污泥膨胀导致污泥质量浓度迅速降低, 引起 PHA 产量降低, 甚至体系崩溃, 同时, 污泥的沉降性能下降也会引起污水处理过程中的出水水质降低, 因此, 双阶段驯化模式在维持活性污泥良好性能方面也更有优势.

2.3 PHA 合成能力

与单阶段模式相比, 双阶段模式培养的活性污泥合成 PHA 的能力更强 (见图 4). 在单阶段模式下, 活性污泥中 PHA 的质量分数在 90 min 时达到最高, 占污泥干质量的 7.8%, 单位乙酸合成量为 0.19 g/g. 双阶段驯化模式下, PHA 质量分数提前 60 min 达到最大值, 合成速率明显加快, 且质量分数可达污泥干质量的 8.5%, 单位乙酸 PHA 合成量为 0.24 g/g, 比单阶段模式下的合成

量有所提高, 因此认为双阶段模式驯化的活性污泥合成 PHA 的速率更快, PHA 合成能力更强. 原因是双阶段模式中的过渡驯化期促进了活性污泥中合成 PHA 微生物的富集, 逐渐变化的进水策略也使微生物逐渐适应驯化环境, 避免了环境突然改变引起的激性反应, 使微生物保持较高生命活性, PHA 合成能力也相应地得到提高. 李伟等^[18]在考察碳源质量浓度对聚羟基丁酸 (PHB) 产量的影响研究中发现: 当反应器中乙酸质量浓度为 1 479 mg/L 时, 单位乙酸合成量仅为 0.2 g/g; 而在乙酸质量浓度为 2 925 mg/L 时, 单位乙酸 PHB 的合成量为 0.4 g/g, PHB 最高质量分数占细胞干质量的 56.3%, 且在乙酸质量浓度小于 2 925 mg/L 时, PHB 合成量随乙酸质量浓度增加而增加. 本研究的双阶段模式驯化结果表明: 在碳源质量浓度比文献报道低的情况下, 活性污泥吸收碳源用于合成 PHA 的量更高, 这说明双阶段模式驯化的活性污泥合成 PHA 的能力更强. 若在合成期配合采取适当的手段 (如提高碳源质量浓度、改变碳源投加方式等) 促进微生物细胞中 PHA 的积累, 污泥中的 PHA 质量分数可能达到更高水平, 但是其效果有待进一步研究.

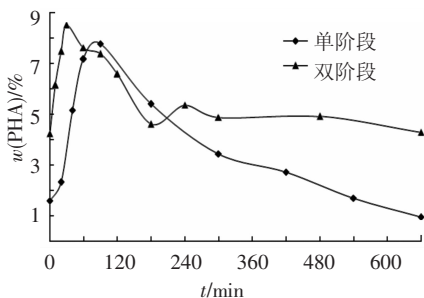


图 4 不同驯化模式培养下 PHA 质量分数的变化

以往多数研究表明, 在氮、磷质量浓度较低等生长受限环境下, 微生物会将吸收的大部分底物用于合成 PHA, 即氮、磷质量浓度较低的底物能促进微生物合成 PHA 能力的提高^[19], 因此, 在实际废水进行 PHA 生产过程之前需对废水进行脱氮除磷处理. 但也有研究发现, 培养底物中是否加入含氮化合物对活性污泥中 PHA 的质量分数影响不大^[15]. 本试验中, 体系中氨氮质量浓度从 30 mg/L 提高到 46 mg/L 后, PHA 占污泥干质量的量略有提高 (从 7.8% 提高到 8.5%), 且其合成量没有受到抑制, 反而有所增加 (提高 4 倍), 因此, 在驯化培养过程中供给相对充足的氮源对于提高活性污泥合成 PHA 的能力具有重要作用. 说明在驯化合成 PHA 的活性污泥时, 可以利用不经脱氮除磷处理的实际废水, 从而更大程

度降低 PHA 生产成本.

3 结 论

1) 双阶段驯化模式下乙酸利用速率比单阶段驯化模式下提高 210%; PHA 含量比单阶段提前 60 min 达到最大值, 且 PHA 合成量比单阶段驯化模式更高. 双阶段驯化模式培养的活性污泥吸收碳源合成 PHA 的能力更强.

2) 双阶段模式培养下活性污泥中微生物增殖更快, 体系内污泥质量浓度比单阶段模式培养的体系内增加 125%. 双阶段驯化模式中增加的过渡驯化期有利于活性污泥中微生物对驯化环境的逐步适应, 及合成 PHA 微生物的富集.

3) 驯化阶段氮源的充足供给有利于促进微生物增殖、碳源吸收以及 PHA 合成能力的提高, 因此, 含氮、磷的废水无需脱氮除磷处理可直接用于 PHA 的驯化培养, 从而降低生产成本.

参考文献:

- [1] 陈国强, 张广, 赵锴, 等. 聚羟基脂肪酸酯的微生物合成、性质和应用[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(2): 197-208.
- [2] TAKABATAKE H, SATOH H, MINO T, *et al.* PHA (polyhydroxyalkanoate) production potential of activated sludge treating waste water [J]. Water Science and Technology, 2002, 45(12): 119-126.
- [3] COATS E R, VANDEVOORT K E. Toward polyhydroxyalkanoate production concurrent with municipal wastewater treatment in sequencing batch reactor system [J]. Journal of Environmental Engineering, 2011, 137: 46-54.
- [4] BENGTSSON S, PISCO A R. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 145: 253-263.
- [5] ALBUQUERQUE M G E, MARTINO V. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties [J]. Journal of Biotechnology, 2011, 151: 66-76.
- [6] BECCARI M, BERTIN L, DIONISI D, *et al.* Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2009, 84: 901-908.
- [7] CHAKRAVARTY P, MHAISALKAR V, CHAKRABARTI T. Study on poly-hydroxyalkanoate (PHA) production in

pilot scale continuous mode wastewater treatment system [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 2896-2899.

- [8] BECCARI M, BERTIN L, DIONISI D, *et al.* Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process [J]. Chem Technol Biotechnol, 2009, 84: 901-908.
- [9] SALEHIZADEH H, LOOSDRECHT van M C M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance [J]. Biotechnology Advances, 2004, 22: 261-279.
- [10] SATOH H, IWAMOTO I, MINO T, *et al.* Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic [J]. Water Science Technology, 1998, 38: 103-109.
- [11] CHUA A S M, TAKABATAKE H, SATOH H. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent [J]. Water Research, 2003, 37: 3602-3611.
- [12] 陈志强, 田婷, 温沁雪, 等. 限氮和限磷对活性污泥合成聚羟基烷酸的影响 [J]. 环境工程学报, 2010, 4(4): 771-775.
- [13] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2003: 210-284.
- [14] DIAS J M L, LEMOS P C. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product [J]. Macromol Biosci, 2006, 6: 885-906.
- [15] TAKABATAKE H, SATOH H, MINO T, *et al.* Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process [J]. Water Science and Technology, 2000, 42: 351-356.
- [16] WEN Qinxue, CHEN Zhiqiang. Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge [J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(10): 1602-1607.
- [17] DIONISI D, BECCARI M, GREGORIO S D I, *et al.* Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2005, 80: 1306-1318.
- [18] 李伟, 陈银广. 活性污泥微生物以乙酸为碳源合成聚羟基烷酸酯的研究 [J]. 环境科学, 2009, 30(8): 2366-2370.
- [19] JOHNSON K, JIANG Y, KLEEREBEZEM R, *et al.* Enrichment of mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity [J]. Biomacromolecules, 2009, 10: 670-676.

(编辑 刘 彤)