

营养条件与间歇曝气方式对活性污泥累积聚-3-羟基丁酸酯的影响

王婧, 李清彪, 何宁, 王远鹏, 孙道华, 邵文尧, 陈翠雪, 钱惠静

(厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 考察了营养条件与间歇曝气方式对好氧培养的活性污泥累积聚-3-羟基丁酸酯(PHB)的影响。结果表明,在营养平衡的条件下PHB的最大累积量占活性污泥(MLSS)质量分数的12.5%;而在只添加碳源条件下,PHB的最大累积量可提高到MLSS质量分数的19.2%;高碳源浓度有利于活性污泥累积PHB,以4.5 g/L的乙酸钠为碳源,PHB的最大累积量达MLSS质量分数的41.7%,PHB的生成速率为265 mg/(L·h)。以曝气30 min 停曝30 min 为循环的间歇曝气方式能有效提高活性污泥中PHB的累积量。与连续曝气相比,该间歇曝气方式使污泥最大累积PHB量占MLSS的质量分数提高了9%。

关键词: 聚-3-羟基丁酸酯(PHB); 活性污泥; 营养条件; 间歇曝气

中图分类号: X705

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2007)05-0045-04

Effects of nutritional conditions and intermittent aeration on accumulation of PHB in activated sludge

WANG Jing, LI Qing-biao, HE Ning, WANG Yuan-peng, SUN Dao-hua, SHAO Wen-yao, CHEN Cui-xue, QIAN Hui-jing

(Fujian Provincial Key Laboratory for Chemical Biology, Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The effects of nutritional conditions and intermittent aeration of operation cycles on poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by activated sludge were studied. The results showed that, activated sludge from aerobic reactors accumulated PHB was around 12.5% of Mixed Liquor Suspended Solid (MLSS) under eutrophy conditions while it was up to 19.2% of MLSS under only carbon source provided conditions. High carbon source concentration was helpful to PHB accumulation. The maximum PHB content of MLSS reached 41.7% of MLSS when 4.5 g/L of sodium acetate was used as the unique carbon source, with PHB production rate being 265 mg/(L·h). The optimum intermittent aeration of operational cycle was: 30 minutes' aeration followed by 30 minutes' intermission. Compared with continuous aeration process, the PHB content of MLSS increased by 9% with the optimized intermittent aeration of operational cycle.

Key words: poly-3-hydroxybutyrate (PHB); activated sludge; nutritional condition; intermittent aeration

聚-3-羟基丁酸酯(PHB)是许多原核微生物合成的胞内能量和碳源储藏性聚合物,它的力学性能与某些热塑性材料如聚乙烯、聚丙烯类似,可以完全降解进入生态循环,被认为是一种可生物降解塑料^[1-2]。PHB还具有良好的生物相容性和压电性,在医学上具有广阔应用前景(可吸收性缝线、带药控释制剂、复合骨代材料等^[3-8])。目前发酵法仍是获得聚酯生物可降解塑料的主要手段,各发达国家积极研制和开发PHB生产技术,但这些生产工艺大都是采用纯种微生物,以葡萄糖、丙酸等价格昂贵的有机物作为底物,而且工艺运行操作要求苛刻,因此成

本比较高。选择廉价底物并开发新的工艺,降低PHB的生产价格,已成为新的研究热点之一。近几年来各国对利用混合菌种和多种底物合成PHB的活性污泥法进行了大量的实验研究^[9-14],笔者以活性污泥为原料,考察了营养条件及间歇曝气方式对PHB积累的影响。

1 实验方法

1.1 实验装置和污泥驯化

实验所用反应器总体积约6 L,有效容积5 L。接种活性污泥取自福建省厦门市某污水处理厂曝气

收稿日期: 2007-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20076037)

作者简介: 王婧(1982-),女,硕士生;李清彪(1963-),男,博士,教授,博士生导师,主要从事环境工程、生物化工、工业催化方面的研究,通讯联系人,0592-2183751, kelqb@xmu.edu.cn.

池,采用好氧培养,周期为 24 h,曝气量为 2 L/min。每个周期运行方式为:瞬时进水+好氧曝气+沉淀+瞬时出水。进水采用自配水,主要成分质量浓度(mg/L)为:乙酸钠 1 092, KCl 234, K₂HPO₄·3H₂O 150, NH₄Cl 194, MgSO₄·7H₂O 306, CaCl₂ 54, FeCl₃·3H₂O 9.8, 蛋白胨 334, 酵母膏 124。

每周沉淀 30 min 后排出 3 L 上清液。培养驯化 10 天后,污泥性状稳定,外观由黑色逐渐转变为浅褐色,沉降性能良好,污泥体积指数(SVI)值为 105 mL/g 左右, COD 去除率为 90% 左右,可以认为该系统活性污泥基本培养驯化成熟,初步达到稳定运行的要求。驯化成熟后的活性污泥每周期的菌体生长量趋于稳定,污泥质量浓度由 2.0 g/L 上升至 2.4 g/L 左右,每周期在好氧结束后排出 1 L 左右的活性污泥混合液,以控制反应器内污泥质量浓度为 2.0 g/L,维持污泥龄为 5d。取每周期好氧结束后排出的剩余污泥进行下一步的烧杯实验。

1.2 分析测试方法

污泥浓度(MLSS):采用细胞干重法。取反应器内混合液 8 mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 水洗, 收集菌体在 105 °C 下烘干至恒重, 称重。

PHB 的含量:采用紫外分光光度法^[15]。取一定量的污泥,加入 3 mL 次氯酸钠溶液破坏细胞结构,再加入 10 mL 氯仿抽提细胞内含物。混合液在 60 °C 水浴摇床中, 150 r/min 萃取 90 min。萃取后分层,分离出含有 PHB 的氯仿层。测定时吸取一定量的氯仿(PHB 的含量为 5~50 μg), 加热除去氯仿,加入 10 mL 浓硫酸, 100 °C 水浴加热 10 min, 冷至室温并混匀,在 235 nm 处测定吸光度,再根据工作曲线确定 PHB 的含量。

COD 浓度:重铬酸钾法^[16]。

溶解氧(DO)浓度:采用上海雷磁仪器厂的

SJG-203A 数字溶氧分析仪进行溶解氧的测定。

PHB 的提取:将累积了 PHB 的活性污泥, 4 000 r/min 离心, 收集菌体, 加入次氯酸钠-氯仿溶液^[17], 在 60 °C 水浴摇床中, 150 r/min 萃取 90 min。萃取后分层, 分离出含有 PHB 的氯仿层。减压浓缩, 回收大部分的氯仿。浓缩液用 5 倍冷乙醇析出沉淀, 离心, 丙酮洗, 水洗, 60 °C 真空干燥 12 h, 即得 PHB 产品。

PHB 结构分析:采用德国 Bruker 公司 DRX-400 型核磁共振仪进行结构表征, 以氘代氯仿为溶剂, 四甲基硅烷(TMS)为内标, 测得标准品(Sigma 公司产品)和所提取的样品 PHB 的核磁共振的氢谱(¹H-NMR)及碳谱(¹³C-NMR)谱图。测得产物的¹H-NMR谱图, 与标准品¹H-NMR谱图的峰型和出峰位置一致, 也与林东恩等^[12]的报道基本一致; 而¹³C-NMR谱图与标准品¹³C-NMR谱图和许旭萍等^[18]所报道的的峰型和出峰位置一致。

1.3 PHB 的累积实验

1.3.1 考察好氧情况下不同营养条件的影响

取好氧结束后的活性污泥混合液 1 L 于烧杯中, 分别考察在营养平衡、缺氮、缺磷及缺氮缺磷条件下 COD 的去除和 PHB 的累积情况, 同时设置空白对照实验。连续曝气并保持曝气量为 2 L/min, 定时取样测量 MLSS、COD、PHB 浓度或含量。培养系统中不同营养成分及其含量如表 1 所示。

表 1 营养成分 mg/L

系统	空白	C	CN	CP	CNP
乙酸钠	0	1500	1500	1500	1500
NH ₄ Cl	0	0	153	0	153
K ₂ HPO ₄	0	0	0	59	59

注: CNP 为营养平衡, CN 为缺磷, CP 为缺氮, C 为缺氮缺磷; 其中各种营养物的组成按 C、N、P 质量比 100:5:1 来添加。

(上接第 44 页)

[5] Jones S F, 许爱英, 李凤龙. 一种新型的治疗非小细胞性肺癌的抗肿瘤药长春瑞宾[J]. 国外医学: 药学分册, 1997, 24(2): 82-84.

[6] 吕洁丽, 杨中汉, 袁珂. 新型凝胶树脂及大孔吸附树脂在中草药成分分离纯化中的应用[J]. 中草药, 2005, 28(3): 239-242.

[7] Potier P. Synthesis of the antitumor dimeric indole alkaloids from *Catharanthus* species[J]. *Journal of Natural Products*, 1980, 43(1): 72-87.

[8] 王慧春, 张成总. 干柱色谱法分离大黄酚和大黄素甲醚[J]. 青岛大学学报, 2006, 24(1): 60-61.

[9] 秦箐. 快速低压干柱色谱技术的改进及其在刺苋分离提纯中的应用[J]. 蛇志, 2000, 12(2): 76-77.

[10] 袁珂, 吕洁丽, 殷明文. 海南含羞草中黄酮碳苷类化学成分的研究[J]. *药学报*, 2006, 41(5): 435-438.

[11] 罗猛, 付玉杰, 祖元刚, 等. 反相高效液相色谱法快速测定长春花中 4 种生物碱[J]. *分析化学*, 2005, 33(1): 87-89.

[12] 朱丽, 徐为公, 赵广荣. 注射用重酒石酸长春瑞滨稳定性研究[J]. *中国药业*, 2006, 15(10): 9-10.

[13] Van Heugen J C, De Graeve J, Zorza G, et al. New sensitive liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometric detection for the clinical analysis of vinorelbine and its metabolites in blood, plasma, urine and faeces[J]. *Journal of Chromatography*, 2001, 926(A): 11-20.

[14] 中国科学院大连化学物理研究所. 一种组合式色谱干柱: 中国, 1552500[P]. 2004-12-08. ■

1.3.2 考察碳源浓度的影响

采用乙酸钠为唯一碳源, 考察连续曝气条件下不同碳源质量浓度(1.5、2.0、2.5、3.5、4.5 g/L)对污泥累积 PHB 的影响。实验方法同上。

1.3.3 考察不同曝气方式的影响

以 2.5 g/L 乙酸钠为碳源, 考察以曝气 15 min 停曝 15 min 为循环(方式 a)、以曝气 30 min 停曝 30 min 为循环(方式 b)、以曝气 60 min 停曝 60 min 为循环(方式 c)的间歇曝气方式下 PHB 的累积情况。并与连续曝气(方式 d)的情况做对比。曝气时保持曝气量为 2 L/min, 停曝时段开启磁力搅拌器使污泥混合均匀处于缺氧状态。定时取样测量 DO、PHB、COD、MLSS 浓度或含量。

2 结果与讨论

2.1 营养条件的影响

连续曝气时, 不同营养条件下 PHB 累积的结果如图 1、图 2 所示。从图 1 和图 2 可看出, 在不同的营养条件下, 前 2.5 h 内 COD 都已被较快地去除并累积为 PHB, 在接下来的几个小时中, COD 基本不再变化, 表明反应器内开始缺乏污泥所需的有机营养物质, 此时 PHB 作为胞内碳源储藏性物质开始逐渐被微生物所消耗。与空白样做对比, 结果表明营养条件对污泥累积 PHB 有一定影响, 其中碳源的影响程度最大, 这与 H. CHUA 等^[9]的结果一致。另外磷源对累积 PHB 的影响也比氮源大, 表明菌体在氮源限制的情况下, 其胞内的代谢途径发生一定的变化, 细胞物质的生物合成过程受到一定程度的抑制, 代谢的中间产物乙酰 CoA 由原来主要流向 TCA 循环以形成合成菌体所需的物质转为流向 PHB 的合成途径而形成 PHB^[19]。详细的影响机制还需要进一步的研究。可见活性污泥在营养不平衡特别是只添加碳源的时候可提高 PHB 的累积量。

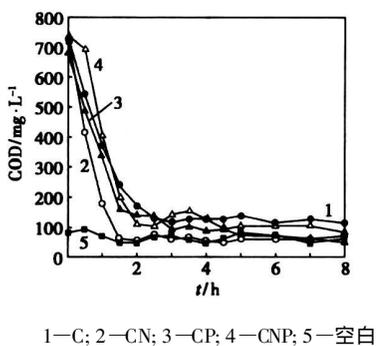


图 1 不同营养条件下 COD 随时间变化图

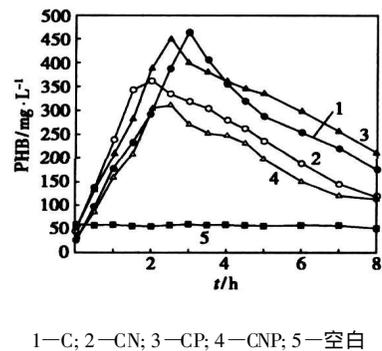
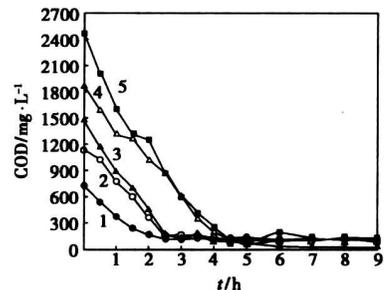


图 2 不同营养条件下 PHB 浓度随时间变化图

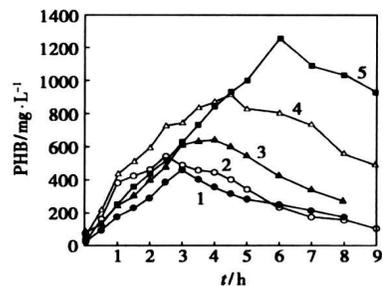
2.2 碳源浓度的影响

连续曝气时不同碳源浓度下 COD 的去除和 PHB 的累积情况如图 3、图 4 所示。



碳源质量浓度, g/L: 1—1.5; 2—2.0; 3—2.5; 4—3.5; 5—4.5

图 3 不同碳源质量浓度下 COD 随时间变化图



碳源质量浓度, g/L: 1—1.5; 2—2.0; 3—2.5; 4—3.5; 5—4.5

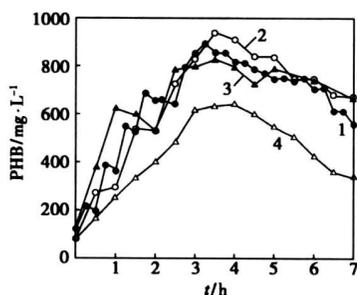
图 4 不同碳源质量浓度下 PHB 浓度随时间变化图

从图 3 可看出, 碳源浓度的增大, 延长了 COD 的去除时间, 但并不影响 COD 的最终去除效果, 活性污泥对不同的进水 COD 适应性良好。从图 4 可看出, PHB 的累积时间和累积量都随着碳源浓度的增大而增大, 当碳源质量浓度为 4.5 g/L 时 PHB 的累积量最高。与林东恩等^[11]和 Hiroyasu Satoh 等^[13]的研究结果类似, 该实验所驯化的活性污泥在不同的碳源浓度下累积 PHB 占 MLSS 的质量分数由 18.8% 提高至 41.7%。好氧条件下碳源浓度对污泥累积 PHB 有很大影响, 当碳源质量浓度分别为 1.5、

2.0、2.5、3.5、4.5 g/L 时, PHB 的生成速率为 145、207、225、241 mg/(L·h) 和 265 mg/(L·h)。由此可见高碳源浓度能提高 PHB 的生成速率。

2.3 曝气方式的影响

实验结果指出, 3 种不同曝气方式下溶解氧浓度均在曝气初期急剧升高, 15 min 内基本达到 2.6 mg/L 的稳定值。在曝气结束阶段, 溶解氧浓度都迅速降低, 5 min 内反应器基本处于缺氧状态。随着曝气-停曝循环时间的延长, 溶解氧上升到稳定值后保持的时间也相应地延长。本实验所驯化的污泥对不同间歇曝气方式适应性良好, COD 去除率都达到了 85% 以上, 好氧时段对 COD 的降解率高于缺氧时段。从图 5 可看出, 相对于好氧连续曝气而言, 间歇曝气能增加污泥中 PHB 的累积量。这是由于活性污泥中的微生物群复杂, 好氧菌在营养不平衡的情况下可累积 PHB, 兼性菌包括聚磷菌在厌氧或缺氧的条件下则能分解体内的多聚磷酸盐, 获得能量吸收环境中分子有机酸合成 PHB^[11]。间歇曝气的曝气方式能同时利用污泥中的好氧菌和兼性菌累积 PHB, 其中以曝气 30 min 停曝 30 min(方式 b) 的循环间歇曝气方式为最优的曝气循环, 与好氧连续曝气对比, 该间歇曝气方式使污泥中最大 PHB 累积量占 MLSS 的质量分数提高了 9%。



1—方式 a; 2—方式 b; 3—方式 c; 4—方式 d

图 5 不同曝气循环下 PHB 质量浓度随时间变化图

3 结语

本实验所驯化的活性污泥 PHB 主要在好氧初期得到累积, 并在碳源缺乏的好氧后期作为碳源储藏性物质被降解。营养条件对活性污泥累积 PHB 存在一定影响, 其中碳源的影响较大, 磷源次之, 而氮源的影响较小。高碳源浓度能促进活性污泥提高 PHB 的累积量以及 PHB 的生成速率。本实验条件下 PHB 最高含量可达到占 MLSS 质量的 41.7%, 相应的 PHB 的生成速率为 265 mg/(L·h); 以曝气 30 min, 停曝 30 min 为最优的间歇曝气循环方式, 与好

氧连续曝气对比, 该间歇曝气循环使污泥中 PHB 最大累积量占 MLSS 的质量分数提高了 9%。

参考文献

- [1] Nicholson J W. 聚合物化学[M]. 付中玉, 译. 2版. 北京: 中国纺织出版, 2005: 26.
- [2] 李铁骑, 齐昆. 微生物聚酯的合成和应用研究进展[J]. 现代化工, 1994, 14(9): 14- 17.
- [3] 刘春, 张小凡. PHB 在生产可降解塑料方面的应用及其微生物累积的研究进展[J]. 塑料工业, 2005, 33(8): 1- 3.
- [4] 汤苏阳, 艾玉峰, 董兆麟. 新型生物降解材料 PHB 细胞相容性研究[J]. 中国美容医学, 2000, 9(2): 86- 88.
- [5] 蔡志江, 王玲, 侯信. 聚羟基丁酸酯及其在生物医学领域中的应用[J]. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(2): 306- 309.
- [6] 清华大学. 聚羟基脂肪酸酯及其共聚物制成的血管支架及其制备方法: 中国, 1410133A[P]. 2003- 04- 16.
- [7] CHEN Guo-Qiang, WU Qiong. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials[J]. Biomaterials, 2005, 26(33): 6565- 6578.
- [8] Volova T, Shishatskaya E, Sevastianov V, et al. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 16(2): 125- 133.
- [9] Chua H, Yu P H F, Ho L Y. Coupling of waste water treatment with storage polymer production[J]. Applied biochemistry and Biotechnology, 1997, 63/ 64/ 65: 627- 635.
- [10] 林东恩, 张逸伟, 沈家瑞. 活性污泥合成生物可降解塑料的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2004, 27(2): 101- 109.
- [11] 郝晓地, 朱景义, 曹秀芹. 利用混合菌群活性污泥法实现生物可降解塑料 PHA 的合成[J]. 生态环境, 2005, 14(6): 967- 971.
- [12] 林东恩, 张逸伟, 郭世强. 活性污泥好氧/厌氧合成聚-3-羟基丁酸酯[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2002, 30(9): 100- 104.
- [13] Chuua A S M, Takabatake H, Sato 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.
- [14] Sato H, Iwamoto Y, Mino T, et al. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic[J]. Water Science and Technology, 1998, 38(2): 103- 109.
- [15] 陈玲, 李礼尧, 王武. 聚-β-羟丁酸酯紫外检测方法的改进[J]. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(2): 27- 31.
- [16] 国家环保局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国环境科学出版社, 1997: 123- 126.
- [17] Hanhn S K, Chang Y K, Kim B S, et al. Communication to the editor optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44(2): 256- 261.
- [18] 许旭萍, 陈接锋. 球衣菌内聚-β-羟基丁酸提取方法的研究[J]. 生物技术通报, 2006(3): 69- 72.
- [19] 堵国成, 陈坚, 高海军. 真养产碱杆菌累积聚-β-羟基丁酸发酵条件的研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(1): 103- 107. ■