

活性污泥微生物以乙酸为碳源合成聚羟基烷酸酯的研究

李伟, 陈银广*

(同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 聚羟基烷酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA) 是一种生物可降解塑料, 利用活性污泥合成 PHA 具有操作方便的优点. 本研究对长期驯化的厌氧-好氧活性污泥工艺在厌氧条件下及好氧活性污泥工艺在好氧条件下利用乙酸合成 PHA 进行了比较分析, 发现好氧活性污泥可以合成较多的 PHA. 在此基础上, 研究了在好氧条件下乙酸加入次数、乙酸浓度及硝化抑制剂 (丙烯基硫脲, ATU) 对 PHA 合成的影响, 结果表明, 将乙酸分 3 次加入到反应器、乙酸浓度为 2 925 mg/L 及加入 6.74 mg/L ATU 时, 可以使污泥挥发性悬浮固体物中 PHA 的含量达到 56.3%.

关键词: 活性污泥; 聚羟基烷酸酯; 好氧合成; 乙酸; 丙烯基硫脲

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)08-2366-05

Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis by Activated Sludge Microbes Using Acetic Acid as Carbon Source

LI Wei, CHEN Yin-guang

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Polyhydroxyalkanoate (PHA) is a type of biodegradable plastics. The synthesis of PHA by activated sludge has the advantage of easy operation. With acetic acid as the carbon source, the anaerobic synthesis of PHA in the anaerobic-aerobic activated sludge system was compared with the aerobic one in the aerobic sludge system. It was observed that the aerobic PHA synthesis was greater than the anaerobic one. The influences of acetic acid addition frequency, acetic acid concentration and allyl thiourea (ATU) on aerobic PHA synthesis were further investigated. The results showed that the PHA content accounting for volatile suspended solids reached 56.3% under conditions of acetic acid addition with frequency of 3, acetic acid concentration of 2 925 mg/L, and ATU concentration of 6.74 mg/L.

Key words: activated sludge; polyhydroxyalkanoate; aerobic synthesis; acetic acid; allyl thiourea

生物聚羟基烷酸酯 (PHA) 是微生物在不平衡生长 (如碳源过量) 时于胞内合成并积累的一种聚合物. 它不但具有热塑性及与聚丙烯有相似的机械性能, 而且具有生物降解性、生物相容性等特性, 因此成为国内外的一个研究热点. 然而, PHA 难以大规模生产和使用的一个主要原因是生产成本较高. 如果能在无需无菌操作的条件下生物合成 PHA, 这将有助于降低 PHA 的生产成本.

活性污泥法因具有操作简便、无需无菌操作等优点, 已被广泛用于污水的生物处理. 用该法处理污水过程中会出现活性污泥中 PHA 含量增加现象^[1]. 因此, 利用活性污泥合成 PHA 已成为近年来广大研究者感兴趣的一个课题. 前人的研究表明, 活性污泥微生物既能在厌氧又能在好氧条件下积累 PHA^[2~5]. 但是, 从相关报道可以看出, 有关活性污泥合成 PHA 的研究大多在短期的批式反应器中进行. 本课题组以往的研究表明, 驯化对污水生物处理过程中的厌氧和好氧阶段 PHA 的代谢产生明显影

响^[6]. 对于活性污泥分别在长期运行 (即驯化) 的厌氧-好氧活性污泥系统的厌氧阶段及好氧活性污泥系统中好氧合成 PHA 的比较研究, 在文献中鲜见报道.

本试验首先对长期运行的厌氧-好氧活性污泥系统, 在厌氧阶段合成 PHA 的量与长期运行的好氧活性污泥系统好氧合成 PHA 的量进行了比较, 在此基础上对影响好氧活性污泥工艺合成 PHA 的关键因素进行了研究, 获得了利用好氧活性污泥合成 PHA 的合适条件.

1 材料与方法

1.1 活性污泥

接种活性污泥取自上海某污水处理厂 (A/O 工

收稿日期: 2008-08-09; 修订日期: 2008-12-09

基金项目: 霍英东基金项目 (101080)

作者简介: 李伟 (1983~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为污水生物处理与污泥资源化, E-mail: liweimiaoer@163.com

* 通讯联系人, E-mail: yinguangchen@yahoo.com

艺)的回流污泥.

1.2 废水组成

本实验采用人工配水,它主要包括碳源(乙酸)、营养液、微量元素及磷溶液,其中营养液、微量元素及磷的含量见表 1.

表 1 合成废水的组成/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Table 1 Composition of synthetic wastewater/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

营养液及磷液	质量浓度	微量元素	质量浓度
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	600	$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3
EDTA	100	H_3BO_3	0.3
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	70	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.3
NH_4Cl	74	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.24
ATU	0.67	$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.24
		$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.12
KH_2PO_4	58.7	$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.06
K_2HPO_4	44	KI	0.06

1.3 反应器运行及污泥驯化

厌氧条件下 PHA 的合成是利用厌氧-好氧序批式反应器驯化的污泥在厌氧条件下进行;好氧条件下 PHA 的合成是利用好氧序批式反应器驯化的污泥在好氧条件下进行.

1.3.1 厌氧-好氧序批式反应器的运行

将取来的活性污泥接种到厌氧-好氧序批式反应器(SBR)驯化,该反应器的有效容积为 4 L,进水体积 2 L,每昼夜运行 3 个周期,每个周期 8 h(包括厌氧 120 min,好氧 320 min,沉淀、排水、闲置和进水各 10 min),污泥泥龄控制在 13 d 左右.进水 pH 为 7.2,其中乙酸单独用计量泵加入,其在反应器中的总乙酸浓度由驯化第 1 d 的 100 mg/L 逐渐增加到第 26 d 时的 726 mg/L ,此后一直维持在此浓度.经过近 2 个月的驯化,反应器中各物理量(乙酸、PHA 等)的代谢达到稳定状态.

1.3.2 好氧序批式反应器的运行

取来的活性污泥在好氧 SBR 反应器中驯化,该反应器的有效容积 4 L,进水体积 2 L,每昼夜运行 3 个周期,每个周期 8 h(包括好氧 390 min,沉淀 60 min,排水、闲置和进水各 10 min),污泥泥龄 13 d 左右,进水 pH 为 7.2.合成废水在好氧阶段前加入反应器,乙酸单独用计量泵分 3 次加入,即在好氧的第 10、40 及 70 min 各加入 1/3;加入到反应器中的总乙酸浓度由驯化第 1 d 的 100 mg/L 逐渐增加到实验所需浓度.有关 PHA 合成的研究是在反应器中各物理量(乙酸、PHA 等)的代谢达到稳定状态,运行 6 个 SRT 后测得的.

1.4 PHA 的合成

1.4.1 厌氧与好氧条件下污泥合成 PHA 的比较

在反应器中总乙酸浓度为 726 mg/L 时,比较了厌氧与好氧条件下反应时间都为 120 min 时污泥合成 PHA 的能力,其它操作分别同厌氧-好氧序批式反应器及好氧序批式反应器的运行.

1.4.2 乙酸加入次数对好氧条件下 PHA 合成影响

该研究是在好氧 SBR 的总乙酸浓度为 2 925 mg/L 时进行的.取好氧 SBR 中的污泥 1 110 mL 等分于 3 个 1 L 的反应器中(编号分别为 1 号、2 号、3 号),向 3 个反应器中各加入废水 400 mL(组成同表 1),污泥浓度大致 3 000 mg/L ,其中 1 号反应器的乙酸(30 mL)在好氧的第 10 min 一次性加入,2 号反应器的乙酸在好氧的第 10、40 及 70 min 各加入 10 mL,3 号反应器在好氧的第 10、30、50、70 和 90 min 各加入 6 mL 乙酸.其它操作同好氧序批式反应器的运行.

1.4.3 乙酸浓度对好氧条件下 PHA 合成影响

从好氧 SBR 中取出污泥 1 850 mL,等分到 5 个 1 L 的反应器中,向每个反应器中加入 400 mL 废水(组成同表 1),污泥浓度大致 3 000 mg/L ,再分 3 次加入乙酸(总体积为 30 mL),其中 1~5 号反应器中的乙酸总浓度分别为 726、1 479、2 925、5 916 及 8 874 mg/L .其它操作同好氧序批式反应器的运行.

1.4.4 硝化抑制剂(丙烯基硫脲,ATU)对好氧条件下 PHA 合成影响

该研究是在总乙酸浓度为 2 925 mg/L 时进行的.取好氧 SBR 污泥 1 110 mL 等分于 3 个 1 L 的反应器中,向 3 个反应器中加入废水 400 mL(组成同表 1),污泥浓度大致 3 000 mg/L ,乙酸在好氧的第 10、40 和 70 min 时各加入 10 mL,其中 3 个反应器的废水中 ATU 的量分别为 0、0.67 及 6.74 mg/L .其它操作同好氧序批式反应器的运行.

1.5 分析方法

乙酸、糖原、溶解性正磷(SOP,简写为 P)、氨氮(NH_4^+-N)等指标的测定参见文献[6~10];聚 3-羟基丁酸(PHB)、聚 3-羟基戊酸(PHV)、聚 3-羟基-2-甲基-戊酸(PH2MV)的测定按文献[11]报道的方法进行,具体操作过程如下:从反应器中取出适量的泥水混合物,离心并冷冻干燥后,称取干燥后的粉末约 0.1 g 于裂解瓶中,依次加入 2 mL 氯仿、2 mL 硫酸-甲醇,0.2 mL 苯甲酸-甲醇于 98~102℃下裂解 20 h;冷却后加入 1 mL 蒸馏水离心,取下层有机相进行 PHA 气相色谱测定.测得的 PHB、PHV 及 PH2MV 的总和被认为是污泥中总 PHA 的合成量.

2 结果与讨论

2.1 厌氧与好氧条件下活性污泥合成 PHA 的比较

厌氧和好氧反应时间都为 120 min 时,厌氧合成 PHA 的量为细胞干重的 14.35%,而好氧合成的 PHA 含量为 20.97%,后者比前者高 6.62%.在其它的反应时间,好氧合成的 PHA 量也比厌氧合成的量多.因此,采用好氧工艺更有利于 PHA 的合成,在以下的研究中着重考察好氧条件下关键因素对 PHA 合成的影响.

2.2 乙酸加入次数对好氧条件下 PHA 合成影响

图 1 为好氧条件下乙酸加入次数不同时 VSS 中 PHA 合成量的对比.可以看出,对于相同的好氧反应时间,分 3 次加入乙酸时的 PHA 合成量明显高于 1 次和 5 次加入时的 PHA 合成量;在好氧时间为 390min 时的 PHA 合成量达到最大,分别为污泥 VSS 的 30.84%(乙酸 1 次加入)、43.01%(乙酸 3 次加入)和 33.29%(乙酸 5 次加入).显然,将乙酸分 3 次加入最有利于 PHA 的合成.

上述研究表明,好氧条件下微生物吸收有机物(乙酸),一方面用于生长,另一方面将吸收多余的乙酸以 PHA 的形式储存于胞内.若外界供给的乙酸量充足时,PHA 合成量不断增加.尽管本研究的 3 个反应器中加入的乙酸总量相同,但一次性加入乙酸时,过高乙酸浓度可能对微生物的生长和 PHA 的合成产生抑制作用,从而降低 PHA 的合成量;分 3 次加入乙酸比 5 次加入乙酸合成的 PHA 多,主要是因为前者每次加入的乙酸量超过微生物生长所需的量,从而使 PHA 得到大量合成.因此,本研究采用 3 次加入乙酸的方式合成 PHA.

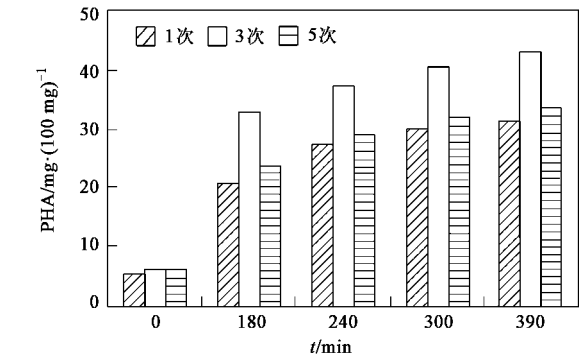


图 1 乙酸加入次数对 PHA 合成影响

Fig.1 Effect of acetic acid feeding frequency on PHA synthesis

2.3 乙酸浓度对好氧条件下 PHA 合成影响

由于 PHA 是底物过剩时细胞内积累产生的,因

此有必要研究乙酸浓度对 PHA 合成的影响.PHA 合成量随好氧时间的变化如图 2 所示.可以看出,在相同的反应时间内,乙酸浓度为 2 925、5 916 和 8 874 mg/L 时污泥合成的 PHA 量比乙酸浓度为 726 和 1 479 mg/L 时合成的 PHA 多;随着反应时间的增加,乙酸浓度为 2 925、5 916 和 8 874 mg/L 时污泥合成的 PHA 量增加,但乙酸浓度为 726 和 1 479 mg/L 时合成的 PHA 量随反应时间的增加先增加后减少.此外,图 2 的结果还表明,当乙酸浓度超过 2 925 mg/L 时,PHA 的合成量基本不随乙酸浓度的提高而增加.因此,控制反应器总乙酸浓度为 2 925 mg/L,对于 PHA 的合成较合适.

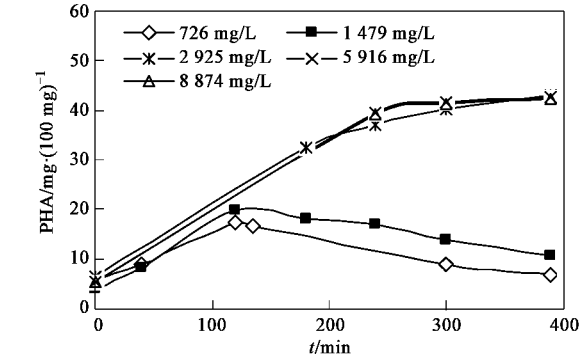


图 2 乙酸浓度对不同时间内 PHA 合成的影响

Fig.2 Effect of acetic acid concentration on PHA synthesis at different time

在研究中还发现,伴随着 PHA 的合成,污泥中的糖原及溶液中 SOP 都发生变化(图 3 和图 4).图 3 表明,当乙酸浓度超过 2 925 mg/L 时,污泥中的糖原随好氧时间的延长而降低,这与乙酸浓度对 PHA 合成影响的规律基本一致.从图 4 溶解性正磷酸盐的变化可以发现,乙酸浓度为 726 和 1 479 mg/L 时,溶液中的 SOP 先升高后降低;乙酸浓度达到 2 925 mg/L 以上时,SOP 随好氧时间的增加而增加到一定值后保持基本不变.显然,SOP 的变化规律与 PHA 的变化规律基本一致.

上述好氧条件下污泥中 PHA 和糖原及溶液中磷酸盐的变化与课题组以往研究增强生物除磷的厌氧阶段得到的规律基本一致^[1,6,7],即活性污泥微生物主要利用胞内聚磷水解产生的能量吸收溶液中的乙酸并将吸收的乙酸在胞内合成为 PHA,因而表现为溶液中磷酸盐浓度的增加及污泥 PHA 含量的提高.由于 PHA 比乙酸的还原性更强,因此在合成 PHA 时需要还原力,这主要由糖原的降解提供.因此,伴随着 PHA 合成量的增加,出现磷释放及糖原

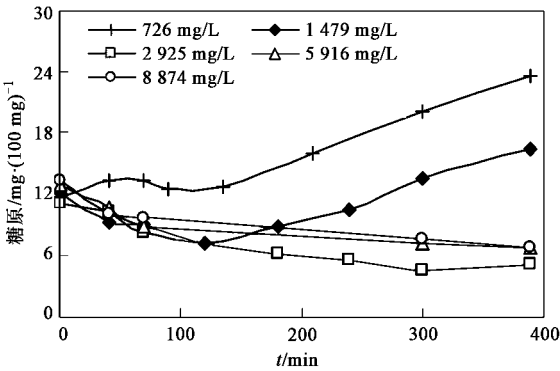


图3 不同好氧时间下污泥中的糖原随乙酸浓度的变化
Fig.3 Changes of sludge glycogen with acetic acid concentration at different aerobic time

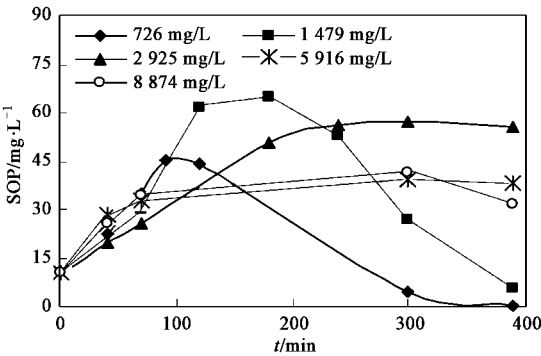


图4 不同好氧时间下溶液中正磷酸盐浓度随乙酸浓度的变化
Fig.4 Variations of soluble ortho-phosphate concentration with acetic acid concentration at different aerobic time

降解量的增加,并且 PHA 合成量的减少与磷释放及糖原降解量的减少是一致的.

表2 是不同乙酸浓度时合成的 PHA 各组分的含量.可见,乙酸作为碳源时合成的 PHA 的主要组分是 PHB,伴有较少的 PHV;不同乙酸浓度时合成的 PHB 在 PHA 中所占比例基本不变(94.9% ~ 98.0%);PHV 含量很低且较稳定(2.3% ~ 4.2%之间);在所研究的乙酸浓度范围内污泥合成的 PH2MV 可忽略不计(<1%).

在本研究中,当乙酸浓度较低时(726 和 1479 mg/L),确实好氧一段时间后出现 PHA 的降解、糖原合成及磷吸收.但是,当乙酸充足(浓度高于 2925 mg/L)时,在整个好氧时间内没有观察到 PHA 的降解、糖原合成及磷吸收.这与文献报道的好氧条件下底物充足时,活性污泥中的一些微生物(例如,聚磷菌)能够吸收有机物同时伴随磷释放、PHA 合成和糖原降解,但当底物大量消耗后又有磷吸收、PHA 降解和糖原合成的现象一致^[12].

表 2 PHA 含量最高时组成成分及含量				
Table 2 Highest PHA content and its composition				
乙酸浓度 /mg·L ⁻¹	PHB 合成量 /mg·g ⁻¹	PHV 合成量 /mg·g ⁻¹	PH2MV 合成量 /mg·g ⁻¹	PHA 合成量 /mg·g ⁻¹
726	166.22	6.12	0.09	172.44
1 479	192.33	4.69	0	196.19
2 925	412.40	11.57	6.14	430.11
5 916	407.06	17.94	3.54	428.54
8 874	403.91	16.79	2.16	422.90

通过以上分析可知,当乙酸浓度不高(726 和 1 479 mg/L)时,一部分乙酸用于微生物的生长,另一部分用于 PHA 的合成,但因为底物不够充足(见图 5),因而不能合成大量的 PHA;当乙酸浓度提高到 2 925 mg/L 时,合成的 PHA 显著增加;进一步提高乙酸浓度至 5 916 和 8 874 mg/L 时,PHA 的合成量并没有随乙酸浓度的增加而提高,与乙酸浓度 2 925 mg/L 时合成的差不多(图 2).因此,本研究认为,合成 PHA 的合适乙酸浓度是 2 925 mg/L.

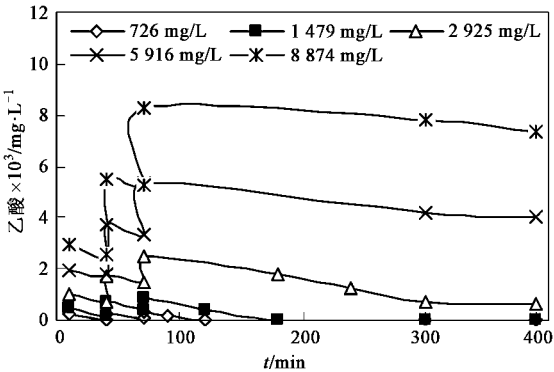


图5 不同好氧时间下乙酸浓度的变化
Fig.5 Changes of acetic acid concentration with aerobic time

2.4 ATU 对好氧条件下 PHA 合成影响

ATU 已被广泛用于生物硝化过程的抑制剂,但在本研究过程中却发现它对活性污泥合成 PHA 有一定的促进作用,特别是随着好氧反应时间的延长,这种促进作用更明显(图 6).图 6 表明,不加入 ATU 或加入较少量 ATU 合成 PHA 的含量在好氧时间超过 300min 时基本不随反应时间的变化,但是当 ATU 加入量为 6.74 mg/L 时,污泥中 PHA 量随反应时间的延长而增加.好氧时间为 480 min 时,加入 6.74 mg/L ATU 的污泥中 PHA 含量为 56.3%,比不加入 ATU 及加入 0.67 mg/L ATU 的 PHA 含量分别高 13% 和 11% 左右.有关 ATU 促进污泥好氧合成 PHA 在文献中未见报道,其机制有待进一步研究.

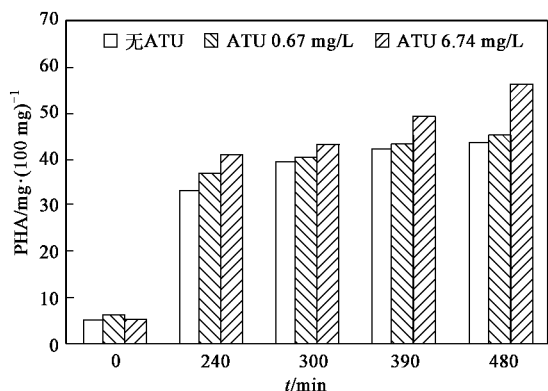


图 6 ATU 对 PHA 合成的影响

Fig.6 Effect of ATU on PHA synthesis

3 结论

(1) 好氧 SBR 在好氧阶段污泥合成的 PHA 量比厌氧好氧 SBR 中厌氧阶段合成的 PHA 量多。

(2) 好氧条件下进酸的次数对 PHA 合成有较显著的影响, 3 次进酸比 1 次和 5 次进酸更有利于污泥合成 PHA。

(3) 底物充足时有利于微生物合成更多的 PHA, 但过高的有机负荷在相同时间内并不能促进微生物合成更多的 PHA。当反应器中总乙酸浓度超过 2 925 mg/L 时, PHA 合成量基本不随乙酸浓度的增加而明显增加。

(4) 硝化抑制剂对 PHA 合成有一定的促进作用。随着时间的延长高浓度的 ATU 反应器中 PHA 合成量高于低浓度 ATU 合成 PHA 量。但由于本实验对 ATU 的影响只是初步研究, 关于其投加量大小和反应时间的控制还有待进一步研究。

(5) 在乙酸总浓度为 2 925 mg/L、分 3 次加入、ATU 量为 6.74 mg/L 及好氧反应时间为 8 h 时, 污泥中积累的 PHA 量为悬浮性固体物质的 56.3%。

参考文献:

[1] Chen Y G, Andrew A R, Terrence M C. The efficiency of enhanced

biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratio of acetic to propionic acid [J]. *Water Research*, 2004, **38**(1): 27-36.

[2] 林东恩, 张逸伟, 韦朝海, 等. 外加碳源的活性污泥合成生物降解塑料 PHAs 的试验[J]. *环境科学*, 2003, **24**(2): 97-101.

[3] Dionisi D, Majone M, Papa V, *et al.* Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **85**(6): 569-579.

[4] Dai Y, Yuan Z G, Kevin J, *et al.* Production of targeted poly(3-hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, **129**(3): 489-497.

[5] Kasemsap C, Wantawin C. Batch production of polyhydroxyalkanoate by low-polyphosphate-content activated sludge at varying pH [J]. *Bioresource Technology*, 2007, **98**(5): 1020-1027.

[6] Chen Y, Chen Y S, Xu Q, *et al.* Comparison between acclimated and nonacclimated biomass affecting anaerobic-aerobic transformations in the biological removal of phosphorus [J]. *Process Biochemistry*, 2005, **40**(2): 723-732.

[7] Tong J, Chen Y G. Enhanced biological phosphorus removal driven by short-chain fatty acids produced from waste activated sludge alkaline fermentation [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, **41**(20): 7126-7130.

[8] David J, Michael G R, Glen T D. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming [M]. Florida: Boca Raton, Lewis Publishers, 1993.

[9] APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [M]. (20th ed). Washington, D C: American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation, 1998. 4-114.

[10] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[11] Oehmen A, Keller-Lehmann B, Zeng R, *et al.* Optimization of poly-beta-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorous removal systems [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1070**(1-2): 131-136.

[12] Guisasaola A, Pijuan M, Baeza J A, *et al.* Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake in bio-P sludge: process modelling using oxygen uptake rate [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **85**(7): 722-733.