

# 利用剩余污泥驯化提取聚羟基烷酸脂的研究

陈 玮<sup>1</sup> 陈志强<sup>1,2</sup> 温沁雪<sup>1</sup> 吕炳南<sup>1</sup> 张运海<sup>1</sup> 王昌勇<sup>1</sup>

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

2 城市水资源开发利用(北方)国家工程研究中心, 哈尔滨 150090)

**摘要** 采用城镇污水处理厂剩余污泥为接种污泥, 使用乙酸钠人工配水, 先通过持续 7 天的好氧曝气恢复污泥的活性, 再保持碳源浓度不变, 逐步减少配水中磷源的含量进行厌氧 2 h—好氧 4 h 交替运行驯化, 经过 15~20 天, 获得富含聚羟基烷酸脂(PHA)约 20%的细胞干重(CDW)比例的活性污泥, 以此为原料进行 PHA 的提取。使用次氯酸钠破碎细胞壁, 氯仿为溶剂提取细胞中释放出来的 PHA, 获得含 PHA 的溶液, 再利用空气吹扫蒸发掉氯仿溶剂, 同时用 N-甲基吡咯烷酮(NMP)回收氯仿, 获得 PHA 纯度为 70%左右粗产品。

**关键词** 聚羟基烷酸脂 PHA 剩余污泥 提取

## 0 前言

随着社会和经济的发展, 塑料制品已经在生活中成为不可或缺的重要材料, 化学塑料稳定性好, 在自然条件下几十年上百年才能降解, 大量的使用破坏了土壤耕地环境, 造成了严重的白色污染问题。可降解生物塑料聚羟基烷酸脂(PHA)有望成为替代化学塑料的理想材料, 这种物质通常见于微生物细胞内聚物, 目前工业生产主要通过纯菌发酵来进行<sup>[1]</sup>, 其高成本和苛刻的培养条件限制了其进一步的扩大应用, 使用城市污水处理厂活性污泥来合成 PHA 成为近年来的研究热点<sup>[2]</sup>。通过一定的驯化手段, 活性污泥可以积累占细胞干重 20%~80%不等的 PHA 含量<sup>[3~5]</sup>, 但是如何将 PHA 从细胞中提取出来是下一步要解决的问题。对于纯菌发酵而言, PHA 含量极高(通常>90%), 杂质少, 提取技术相对容易; 对于驯化的活性污泥而言, 杂质含量高, PHA 在细胞干重中比例低(一般不足 50%), 提取起来就更容易受到干扰, 进而消耗掉较多的提取药剂的量, 造成 PHA 溶剂的浪费。

一些从微生物中提取 PHA 的方法往往经过细胞破碎、内含物释放、溶剂吸收等过程<sup>[6,7]</sup>, 部分方法还伴随着加温、低温、加压、减压等特殊条件; 通过有机溶剂溶解 PHA 时, 有的还同时使用了含有表面

活性剂、非溶剂的溶液等复杂成分, 造成有机溶剂的回收方式也较为繁琐甚至无法回收。如果能通过简单的方式在常温常压条件下进行同步回收 PHA 和其溶剂, 则具有工艺简单、节能环保的多重功效。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验装置

污泥驯化使用一只有效容积为 4 L 的 SBR 作为污泥接种培养驯化的反应器, 配有搅拌、曝气、进出水恒流泵以及在线 pH、ORP、温度的监测系统。污泥的 PHA 提取采用一套包含 3 个洗气瓶的装置。

### 1.2 检测设备及方法

试验取样选择反应器运行的一个周期内, 以半小时一次的频率采水样及泥样, 分析 SCOD、PHA 等; 其中 SCOD 采用密封消解、化学滴定法, PHA 采用 Agilent 6890N+FID 检测器的气相色谱法测定, 使用 Agilent 7683B 自动进样器自动进样以减少操作误差。

### 1.3 配水成分

以 NaAc 为碳源配水, 控制 COD<sub>Cr</sub> 在 1 000 mg/L 左右, 以 NH<sub>4</sub>Cl 为氮源, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 为磷源, 此外每升配水添加营养液 1 mL, 成分如表 1 所示。

## 2 试验结果与讨论

### 2.1 接种、驯化污泥合成 PHA

接种污泥以后首先启动 SBR 反应器, 控制反应器内污泥浓度在 3 000 mg/L 左右, 启动阶段的配水

国家自然科学基金资助项目(50708025)。

表 1 微量元素成分

| 成分  | 浓度/mg/L | 成分  | 浓度/mg/L |
|---|---------|---|---------|
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.06    | $\text{MnCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 0.094   |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                             | 0.15    | KI  | 1.18    |
| $\text{CaCl}_2$                                     | 5.0     | $\text{CuSO}_4$                           | 0.03    |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 1.5     | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.12    |

条件为  $\text{COD}_{\text{Cr}} : \text{N} : \text{P} = 100 : 5 : 1$ 。启动阶段采用完全好氧运行,每天曝气 20 h,沉淀 1 h,排水、进水 1 h,进、排水量每次 3 L,持续 7~10 d;这一阶段的目的是令投入的剩余污泥尽快恢复活性,为后续的生物合成 PHA 做准备。

经过约 7 天的启动期,污泥活性得到恢复,颜色由投入时的黑色转为棕黄色,镜检生物相丰富,污泥絮体良好。此时转入驯化阶段,采用厌氧-好氧交替的运行方式,运行周期为:进水 0.25 h,厌氧 2 h,好氧 4 h,沉淀 1.5 h,排水 0.25 h。设置厌氧过程的目的是生物选择,抑制丝状菌过快繁殖,防止污泥膨胀,提高 SBR 的运行稳定性。驯化开始时,进水  $\text{COD}_{\text{Cr}} 1000 \text{ mg/L}$ ,  $\text{COD}_{\text{Cr}} : \text{N} : \text{P} = 100 : 5 : 1$ ,取 SBR 一周期的污泥样,分析 PHA 的含量(以占细胞干重的百分比表示)。

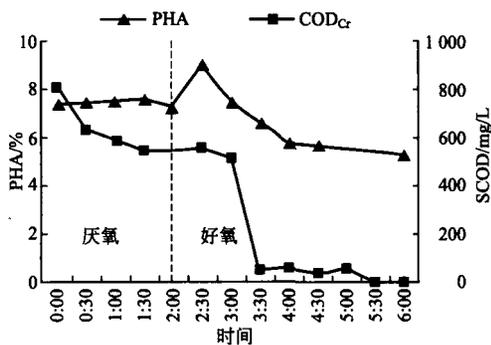


图 1 PHA 和 SCOD 在一周期内的变化规律

在一个 SBR 周期内,污泥开始 PHA 的合成和分解。在厌氧阶段 PHA 没有明显的合成,进入好氧阶段以后,PHA 含量有小幅度的提升;在 SBR 好氧反应阶段后期,随着外碳源的耗尽、SCOD 降低,PHA 作为微生物代谢过程中的内碳源开始分解提供能量,因此 PHA 含量也随后逐渐减少。

在此基础上进行营养元素的限制,在  $\text{COD}_{\text{Cr}} : \text{N} : \text{P} = 100 : 5 : 1$  的基础上,保持  $\text{COD}_{\text{Cr}} = 1000 \text{ mg/L}$  和 N 浓度不变,逐步减少 P 元素的量,每次减少 10%,再

折算成相应的  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  和 P 的比值,每改变条件后持续运行 3~4 d。在  $\text{COD}_{\text{Cr}} : \text{P} = 110, 125$  和  $\text{COD}_{\text{Cr}} : \text{P} = 165$  时取样分析,结果如图 2 所示。

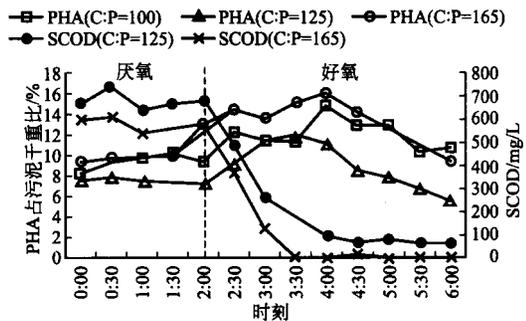


图 2 不同  $\text{COD}_{\text{Cr}} : \text{P}$  比例下的 PHA 合成和反应器内溶解性  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  规律变化

随着磷比例逐步减少,PHA 的最大合成量也有明显提高,在  $\text{COD}_{\text{Cr}} : \text{P} = 165$  时最大合成 PHA 达到 16% 左右;这和已有研究结论一致<sup>[8,9]</sup>,碳源相对过剩条件下利于 PHA 的积累,这一特点和微生物积累细胞内能源物质的机制有关。在 SBR 系统中,底物随着反应的进行不断消耗,在时间上形成浓度梯度,反应初期底物营养浓度较高,微生物充分进行代谢和增殖;在反应中后期,对于能够在细胞内积累碳源物质的细胞而言,可以通过消耗内碳源的方式维持代谢和生长,对于不能或较少积累碳源物质的细胞而言,就逐渐失去了竞争的优势;在此基础上通过人工限制营养比例,进一步强化了这种选择性,使得 SBR 不仅在时间上形成浓度梯度,在系统初期就构建了不均衡的营养环境,促进 PHA 合成细菌逐步成为优势菌。但是,在这样的不平衡体系中,丝状菌具有较大的比表面积,容易和 PHA 合成菌形成竞争造成反应器崩溃,通过 SBR 循环周期中的厌氧阶段,可有效抑制丝状菌的快速增殖,降低了污泥膨胀的风险。

经过 7 天左右的好氧启动和 10 天左右的好氧驯化,PHA 在细胞干重的最大比例可达到 20% 左右,取活性污泥混合溶液进行 PHA 的提取。

## 2.2 PHA 的提取和溶剂的同步回收

### 2.2.1 细胞破碎和 PHA 萃取

PHA 是一种脂类物质,因此具有易于溶解于有机溶液的特性,破碎细胞以后,利用有机溶剂萃取 PHA。细胞破碎采用次氯酸钠溶液,溶剂选用氯

仿。使用次氯酸钠破碎细胞时,较高的浓度虽然有利于加快反应,但是容易在破碎细胞的同时破坏 PHA 结构<sup>[6]</sup>;较低的浓度可能导致破碎不完全。

试验中选取 5% 和 20% 浓度的次氯酸钠溶液进行细胞破碎。分别取两份 200 mL 富含 PHA 的混合污泥,测得 MLSS 约为 2 800 mg/L,分别加入次氯酸钠饱和溶液,控制 NaClO 浓度分别为 5% 和 20%,然后分别加入 200 mL 氯仿,氯仿的作用除了溶液细胞破碎后释放的内含物 PHA 外,也能起到保护 PHA 尽可能地少被 NaClO 破坏<sup>[10]</sup>。将混合溶液震荡 15 min 后静置分层,上层为水溶液,中间层为残留的生物细胞,下层为包含 PHA 的氯仿溶液。取下层氯仿溶液测定其中 PHA 的浓度,结果如表 2 所示。

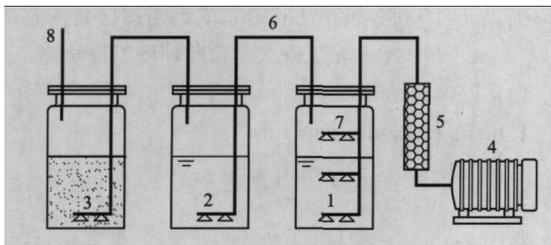
表 2 两种次氯酸钠破碎后获得的 PHA 溶液浓度

| 试验条件              | PHA 在氯仿中的浓度/mg/L |
|-------------------|------------------|
| 使用 5%NaClO 破碎萃取后  | 1 280            |
| 使用 20%NaClO 破碎萃取后 | 1 140            |

对于两种浓度下的 NaClO 而言,PHA 的浓度相差不大,细胞破碎效果基本相同,从节省成本角度来看,对于 2 800 mg/L 的污泥而言选择 5% 的 NaClO 即可满足要求。

### 2.2.2 溶剂挥发和回收

使用一组洗气瓶装置进行 PHA 固体的析出和氯仿溶剂的回收,通过气流吹扫曝气将氯仿快速挥发,氯仿蒸汽进入吸收液中,被 N-甲基吡咯烷酮(NMP)快速吸收,尾气经活性炭吸附后安全排出。NMP 是一种不易挥发、沸点与氯仿不同的有机溶剂,广泛应用于化工行业的溶剂、清洗等领域,NMP 和氯仿的混合液可在一定条件下进行分离,从而达到氯仿溶剂回收的目的。分离回收装置如图 3 所示。



1 PHA 分离罐 2 溶剂回收罐 3 尾气安全瓶 4 气泵  
5 干燥器 6 导气管 7 空气吹扫口 8 尾气排放管  
图 3 PHA 分离和氯仿回收装置

将 PHA 氯仿溶液置于分离罐 1 中,氯仿吸收

液 NMP 置于罐 2 中,活性炭置于罐 3 中,各罐密封上盖,检查气密性良好以后,开启空气泵 4,气流经过干燥剂 5 干燥后进入 1 中。由于氯仿是易挥发液体,在空气吹扫、曝气的作用下蒸发速度大大加快,溶剂蒸发速度可用马扎克公式估算:

$$G_s = (5.83 + 4.1v) \cdot PH \cdot F \cdot \sqrt{M} \quad (1)$$

式中  $G_s$ ——物质的散发量, g/h;

$v$ ——液体表面风速, m/s;

$PH$ ——饱和蒸气压力, mmHg;

$F$ ——液体敞露面积,  $m^2$ ;

$M$ ——有害物质的相对分子质量;

5.38、4.1——常数。

通过表面空气吹扫,相当于加快了液体表面风速,通过液面下的曝气,相当于提高了液体和空气的接触面积,提高了氯仿的挥发速度。经过 7 小时左右,绝大部分氯仿被 NMP 截留和吸收,罐 1 中残留的白色粉末即为 PHA 粗产品,收集后称重并测定其纯度,结果显示 PHA 的回收率(PHA 粉末重量/用于蒸发的溶液中 PHA 总质量)约为 85%,PHA 粗产品的纯度约为 70%,相对于污泥中 20% 的含量有大幅度提高,杂质主要是细胞中可溶于氯仿的其他有机成分、少量细胞壁的残留物等。PHA 粗产品如图 4 所示。

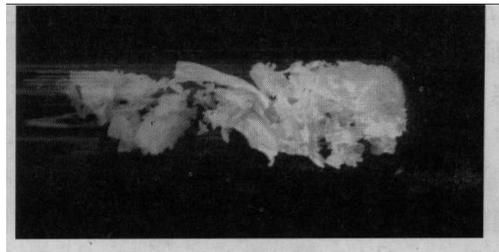


图 4 提取的 PHA 粗产品

这一分离方法和装置,要求 PHA 溶剂易溶 PHA、不亲水、易挥发,可选择的溶剂有氯仿、二氯甲烷等卤代烃,从环保角度出发,宜使用非卤代烃的烷烃、环烃、芳烃等;吸收剂的选取原则是无毒、难挥发、易溶解所选择的 PHA 溶剂,且可与所选择的 PHA 溶剂较为方便地在一定条件下分离回收,可选择的有 NMP、尼龙酸甲酯(NME)等。

### 2.3 经济性分析

试验采用的是有效容积 4 L 的 SBR,MLSS 浓度约为 2 800 mg/L,配水均为人工配水;考虑到不

同批次污泥的活性存在差别,从接种开始计,污泥的平均活性恢复期按 10 d 计算,平均培养驯化周期取 15 d;提取时使用了 400 mL 污泥混合液折合 1.12 g 污泥,污泥中的 PHA 质量浓度取 20%,破碎细胞用的次氯酸钠体积比为 5%,共计 20 mL,氯仿 400 mL,吸收剂 NMP 400 mL,根据试验结果,粗产品获得率取 85%,为便于分析,将所有的指标都按照可获得 1 kg PHA 粗产品(纯度 70%)的耗费进行折算,估算成本见表 3。

表 3 提取 1 kg PHA 粗产品的成本估算

| 项目 | 耗费药品名称                                  | 总消耗量     | 成本/元  | 备注                        |
|----|---|----------|-------|---------------------------|
| 驯化 | 乙酸钠(NaAc)                               | 111.2 kg | 278   | 因驯化过程中磷源浓度是逐步降低的,计算时取平均浓度 |
|    | 氯化铵(NH <sub>4</sub> Cl)                 | 16.6 kg  | 16.6  |                           |
|    | 磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | 2.3 kg   | 13.8  |                           |
| 提取 | 次氯酸钠                                    | 105 L    | 47.3  | 按 5% 体积比计算                |
| 总计 |   |          | 355.7 |                           |

污泥提取的药剂消耗主要和污泥混合液的数量有关,因此污泥中 PHA 含量越高,单位成本就越低,提高活性污泥中 PHA 的含量仍然是降低成本的重要因素;此外,从表 3 可以看出,驯化过程中的人工配水是成本最高的部分,如果能利用富含小分子有机酸的废水作为底物则将大大降低成本,这还有待深入研究。

### 3 结论

(1) 利用剩余污泥通过简单的驯化培养,可以获得富含 PHA 的活性污泥,用于 PHA 的生产,尽管获得的 PHA 在细胞中的含量与纯菌发酵相比偏低,但是由于剩余污泥总量很大,仍然可望获得较多的 PHA 产品。

(2) 驯化过程的长短主要受剩余污泥的状态影响,对于混有初沉池污泥的剩余污泥,因为杂质成分较多,所需的培养时间就较长。对于二沉池直接排放的剩余污泥,通常只需 15~20 天即可完成启动和

驯化全过程,即可进行 PHA 分离获得 PHA 粗产品。

(3) 使用 NMP 吸收的氯仿溶剂后,可以通过分馏等方式实现 NMP 和氯仿的重复利用。

### 参考文献

- Williams S F, Martin D P, Horowitz D M. PHA applications: addressing the price performance issue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 25(1-3): 111~121
- Chen Y G, Xu Q, Yang H Z, et al. Effect of cell fermentation time and biomass drying strategies on recovery of PHA from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactant - chelate aqueous system. *Process Biochemistry*, 2001, 36(8-9): 773~779
- Satoh H., Iwamoto Y, Mino T, et al. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Science and Technology*, 1998, 38(2): 103~109
- Rhu D H., Lee W H, Kim J Y, et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water Science and Technology*, 2003, 48(8): 221~228
- Katja J, Jiang Y, Kleerebezem R, et al. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules*, 2009, 10(4): 670~676
- 杨青, 贺青. 聚羟基烷酸(PHA)的回收方法. *工业微生物*, 1999, 29(2): 43~47
- 陈银广, 陈坚, 堵国成, 等. 聚-β-羟基丁酸酯提取方法的比较. *无锡轻工大学学报*, 1998, 17(3): 5~9
- 王琴, 陈银广. 活性污泥合成聚羟基烷酸(PHAs)的研究进展. *环境科学与技术*, 2007, (5): 111~114
- Serafim L S, Lemos P C, Oliveira R F, et al. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87(2): 145~160
- 潘贵全, 盛青, 秦杰. 次氯酸钠/氯仿混合液提取 PHA 的初步研究. *化工冶金*, 1999, (3): 286~289

✉ 通讯处: 150090 黑龙江省哈尔滨市南岗区黄河路 73 号 哈尔滨工业大学市政环境工程学院

电话: (0451)86283001

E-mail: czq0521@tom.com

收稿日期: 2010-05-04