

· 工业生物技术 ·

变废为宝：利用活性污泥生产生物可降解塑料聚-3-羟基丁酸酯

陈佳妮

清华大学附属中学，北京 100084

陈佳妮. 变废为宝：利用活性污泥生产生物可降解塑料聚-3-羟基丁酸酯. 生物工程学报, 2017, 33(12): 1934–1944

Chen JN. From waste to treasure: turning activated sludge into bioplastic poly-3-hydroxybutyrate. Chin J Biotech, 2017, 33(12): 1934–1944

摘要：活性污泥（简称污泥）是废水处理产生的副产物，量大而且难以处理。本研究通过对污泥的高温热裂解处理，获得可用于培养微生物的营养物质。实验发现污泥热裂解液可以取代培养嗜盐单胞菌 *Halomonas* CJN 的氮磷源、酵母膏和微量元素，来生产生物可降解塑料聚-3-羟基丁酸酯（PHB）。进一步发现厌氧发酵污泥热裂解液产生的乙酸可以取代葡萄糖来作为碳源支持微生物的生长。这样，可以实现利用污泥热裂解液来生产生物塑料 PHB。通过进一步在 *Halomonas* CJN 中构建附加 PHB 合成路径，可以实现完全用污泥热裂解液来高效生产 PHB，粗略估计使 PHB 的制造成本从 30 000 元/t 下降到 20 000 元/t，实现污泥变废为宝的目标。

关键词：活性污泥，聚羟基脂肪酸酯，聚-3-羟基丁酸，嗜盐单胞菌，无灭菌发酵，生物塑料

From waste to treasure: turning activated sludge into bioplastic poly-3-hydroxybutyrate

Jia'ni Chen

Tsinghua University High School, Beijing 100084, China

Abstract: Large quantity of activated sludge is generated from wastewater treatment but without yet an appropriate deposition. High temperature can lyse the activate sludge so that nitrogen and phosphorus containing nutrients are released. *Halomonas* CJN was found to grow on the heat lysed activated sludge and glucose for production of bioplastic

Received: October 9, 2017; **Accepted:** October 27, 2017

Corresponding author: Jia'ni Chen. Tel: +86-10-62771389; E-mail: chenjn0718@163.com

网络出版时间：2017-11-03

网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20171103.1336.001.html

poly-3-hydroxybutyrate (PHB) in the absence of yeast extract, nitrogen and phosphorus sources as well as trace elements. This reduces the PHB production cost significantly. Furthermore, acetic acid formed from anaerobic fermentation of heat lysed activated sludge can be used to replace glucose for cell growth but not much for PHB production. After construction of an additional PHB synthesis pathway in *Halomonas* CJN, we can produce PHB entirely from heat lysed activated sludge, reducing production cost of PHB roughly from ¥ 30 000 Yuan/ton to ¥ 20 000 Yuan/ton, thus turning waste activated sludge to valuable raw material resource.

Keywords: activated sludge, polyhydroxyalkanoates, PHB, *Halomonas*, unsterile fermentations, bioplastics

水资源已经变得越来越稀有，而人类大量地使用水资源又产生了大量的废水。比如 2013 年某市废水排放量为 15.5 317 亿 m^3 ，日废水排放量为 426 万 $\text{t}^{[1]}$ ，每天需要对大量的废水进行处理。

污泥是污水处理的产物。我国污水处理厂在逐年增加，相应的污泥产量也越来越多。一般来说，如果一座污水处理厂日污水处理量为 10 万 t ，则会产生 100 t 的湿污泥^[1]。北京市日废水排放量为 426 万 $\text{t}^{[1]}$ ，则日产生污泥 4 260 t 。国外研究经验显示，活性污泥处理常占污水处理总成本的一半以上，目前国内外主要通过焚烧、填埋、厌氧消化处理，在需高投入处理的同时还不可避免地对环境产生危害。如何把污泥变废为宝是保护环境和可持续发展的重要课题。

污泥主要由微生物组成，可以通过高温加热裂解微生物细胞释放出许多营养物质，包括氨基酸、核苷酸、单糖和维生素等以及它们的聚合物，比如蛋白质、DNA、RNA 及其多糖等。这些营养物质可以被微生物（细菌）再利用用于生长。微生物如果能用这些污泥热裂解营养物来发酵生长，实现微生物制造，将为日益增加的污泥提供一个资源化的解决方案^[2-3]。

目前，已有的处理污泥的研究主要是利用这些污泥热裂解营养物来发酵生产沼气^[4]。但是由

于经济性不好，并没有得到很好的普及。是否还有其他的微生物发酵产品可以利用这些污泥热裂解的营养物来制造？

很早以前，微生物就被发现能够产生一些类似塑料、结构多样的细胞内物质，称为“聚羟基脂肪酸酯” (Polyhydroxyalkanoates, 简称 PHA) (图 1)^[5]。PHA 又被称为生物塑料，它来源于生物，可以被无处不在的微生物作为食物吃掉而消

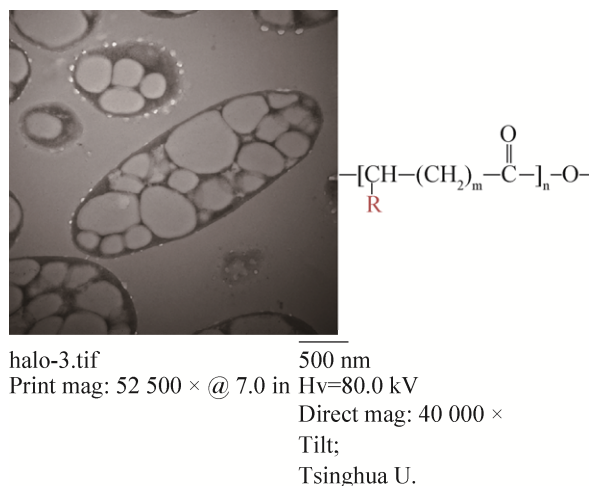


图 1 细菌大量积累 PHA 生物塑料成为细胞内含体 (左图)，其分子结构 (右图)^[5]

Fig.1 Bacterial cells accumulated a large number of PHA particles as inclusion body (left) and its molecular structure (right)^[5]. The PHA structure is diverse due to the change of R group. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) is the most representative PHA.

失(称为生物可降解性)。人们一直在努力尝试用环境友好的生物塑料 PHA 来取代不可降解的石油基塑料,如聚乙烯 PE 和聚丙烯 PP 等,以减少白色污染。但是,由于 PHA 的生产需要细菌生长在昂贵的培养基(如淀粉、氨基酸和维生素等营养源)中,导致 PHA 生产成本很高,至今尚未能大规模地生产和应用,无法完成替代石油塑料的使命,也无法实现环保的理想^[6]。

是否能够在廉价的活性污泥与昂贵的 PHA 之间建立起桥梁,变废为宝呢?污泥热裂解营养物可能含有微生物生长所需要的营养元素。如果能作为营养源来培养微生物使之生产 PHA,则在很大程度上解决了利用昂贵的培养基来制造生物塑料的问题,有可能降低 PHA 的制造成本,从而提高其经济性。

首先,要研究如何将活性污泥转化成微生物容易利用的成分,排水公司常用的办法之一是污泥热裂解技术。但是,污泥热裂解营养物成分复杂,可能含有不利于微生物生长的有毒物质。实际中,还需要不同的微生物协同作用,才能实现活性污泥营养成分的充分消化。早期的研究工作发现,厌氧条件下混合微生物菌群在活性污泥中会积累占细胞干重 20%左右的 PHB,而在微氧/好氧工艺条件下 PHB 含量可以达到 62%^[7],但这结果远低于使用单一组分培养单一菌种的 80%以上的 PHB 含量^[4],而且混合菌群细胞密度(细胞干重 CDW)都远远低于单一菌株,所以利用活性污泥进行生物塑料 PHB 的生产研究停滞不前^[8]。

为了实现单一菌株的高效转化,就需要寻找生命力强大的单一菌株“微生物工厂”。在自然界中,极端环境下生长的微生物有可能肩负起这个重任,消化这些复杂的污泥热裂解营养物^[9]。于

是,我们利用从具有极端环境的新疆艾丁湖的盐湖(日夜温差 50 °C,盐浓度 200 g/L, pH>9)采集的土样,分离得到能生产 PHA 的一些细菌。通过进一步的培养和筛选,找到了嗜盐单胞菌 CJN (*Halomonas* CJN),希望这个“微生物工厂”能够实现利用污泥热裂解营养物制造生物可降解塑料 PHA 的使命。

本研究致力于寻找可以利用活性污泥进行发酵生产的“微生物工厂”(菌株),通过筛选找到了嗜盐单胞菌,将其命名为 *Halomonas* CJN。进一步探究其利用污泥热裂解营养物生产生物可降解塑料 PHA 的模式材料——PHB (Poly-3-hydroxybutyrate) 的可能性(图 2),为解决污泥处理成本高的问题开创出一条可行有利的新出路,也为生产生物可降解塑料寻找到更经济实用的原料。这将为今后生物塑料大规模地替代不可降解的石油塑料提供一个环境友好的方案,也为污泥的资源化利用提供新的出路。

1 材料与方法

1.1 菌株筛选

称取 1 g 从新疆艾丁湖采回来的土样,悬浮于 20 mL 含有 9%的 NaCl 生理盐水中。然后激烈振荡试管中的悬浮液 6 min。取 1 mL 上清液,均匀涂布于固体培养基(污泥热裂解液离心上清 + 20 g/L 葡萄糖 + 15 g/L 琼脂)中。37 °C 培养过夜,观察和挑取最大的白色不透明菌落。

本实验分离得到了一株嗜盐嗜碱的盐单胞菌,命名为 *Halomonas* CJN,该菌株可以在 30–45 °C 的温度下,在污泥热裂解液添加葡萄糖,或者廉价的化肥和淀粉水解物葡萄糖中快速生长,最适温度为 37 °C, pH 耐受范围为 5.0–11.0,最适 pH 为 9.0,可耐受的 NaCl 浓度

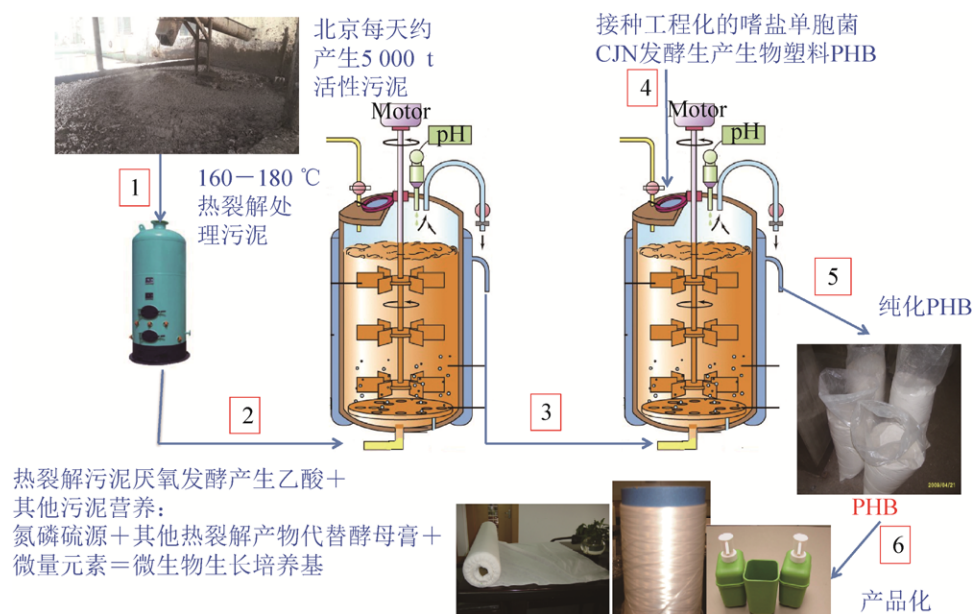


图2 利用活性污泥生产生物塑料的过程

Fig. 2 The PHB production process using activated sludge.

为 10–250 g/L，最适为 60 g/L。当把生长条件固定在 37 °C、pH 8.6–9.0、NaCl 浓度为 40–60 g/L 时，*Halomonas* CJN 可以在上述低成本培养基中进行无灭菌连续发酵，节省了高温高压的蒸汽制造成本，减少了无菌操作的复杂过程，从而降低了 PHA（本研究用 PHA 的模式材料 PHB 作为对象来研究）的生产成本。

1.2 让活性污泥能够被“微生物工厂”利用——污泥热裂解

污泥取自北京排水集团（简称北排）污水处理池，污泥中含有丰富的有机营养成分，体现为很高的 Biological oxygen demand (BOD) 和 Chemical oxygen demand (COD)，极有可能成为优质的碳、氮、磷元素的来源。但由于大分子的有机物不能为“微生物工厂”直接利用，所以首先要想办法变成小分子。由于热裂解技术比较成熟而且简单易行，所以首选这种成熟工

艺来处理活性污泥。采用热裂解技术 (Thermal hydrolysis pre-treatment, THP) 在 155–170 °C 高温的高压蒸汽下对污泥进行数分钟的热裂解，使污泥中的微生物细胞溶解，胞外产物释放，细胞聚合物（包括蛋白质、多糖、DNA、RNA 和脂肪等）分解为氨基酸、单糖、核苷酸和脂肪酸酯等，这样产生污染的污泥变成了营养丰富的小分子混合物。同时，高温处理也去除了污泥中其他的微生物，使污泥成为适合培养微生物的营养源。

1.3 培养基及培养方法

配置不同浓度的污泥热裂解液，通过对照实验来摸索最合适的实验条件。本实验用于活化菌种 *Halomonas* CJN 及其种子液的培养基为 60LB 培养基（含 60 g/L NaCl，5 g/L 酵母提取物，10 g/L 胰蛋白胍）。摇瓶发酵培养基为添加 60 g/L NaCl 的矿物盐培养基（简称 60MM），主要由 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.02% MgSO_4 、1.0% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、

0.15% KH_2PO_4 、60 g/L NaCl 和 30 g/L 葡萄糖组成。将过夜活化培养的种子液以 5% 接种量接种于 50 mL 矿物盐培养基中 (500 mL 摇瓶) 37 °C、200 r/min 培养 48 h。然后摇床 200 r/min 培养微生物,分析细胞的生长状况 (细胞干重, Cell Dry Weight, 简称 CDW) 和生物塑料 PHB 的细胞含量。实验组利用污泥热裂解液上清, 设置 100%、50%、10% 和 1% 浓度梯度, 不加酵母膏提取物, 其余条件与对照组相同。

1.4 通过细胞干重和 PHB 含量分析确定实验效果

为了验证“微生物工厂”*Halomonas* CJN 将活性污泥转化成 PHB 的能力, 选取细胞干重和 PHB 含量这两个重要指标进行分析, 从而确定实验效果。

细胞干重分析: 培养结束后, 将菌液以 10 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。随后, 用去离子水洗涤 1 次, 并再次离心收集细胞沉淀。将得到的细胞沉淀置于 -80 °C 冰箱预冷 1 h 后, 置于真空冷冻干燥机内 12 h 完全去除水分。利用精密天平测定细胞干重 (Cell dry weight, CDW)^[10]。

PHB 含量分析: PHB 酯化液的配制: 色谱纯甲醇中, 含 3% (V/V) 浓硫酸和 0.5 g/L 的苯甲酸, 总体积为 500 mL。称取 30-40 mg 冷冻干燥后的菌体约 10 mg 已知 PHB 标样于耐高温的酯化管中, 加入 2 mL 三氯甲烷与 2 mL 酯化液, 加

盖密封后于 100 °C 条件下反应 4 h。反应结束后, 待冷却至室温, 加入 1 mL 去离子水, 充分振荡, 静置, 直至有机相与水相完全分层。取下层有机相用于气相色谱分析。用岛津公司 (日本) 的 GC-2014 型气相色谱仪进行分析。使用 HP-5 型号的色谱毛细管柱, 其规格为: 长 30 m, 内径 320 μm 、内含 250 nm 厚的 5% 苯基-9% 二甲基聚硅氧烷作为固定相。检测器为氢火焰离子化检测器 (Flame ionization detector, FID), 进样口为 SPL 分流进样口。载气为高纯氮气, 燃气与助燃气分别为氢气和空气。用注射器抽取酯化管内的有机相于样品瓶内, 置于样品池, 使用 AOC-20S 型自动进样器进样。以丙酮为洗涤试剂, 在每次进样前洗涤 3 次, 再用待测样品润洗^[11]。

2 结果与分析

2.1 污泥热裂解后氮磷元素及有机酸含量大幅提高

对北排提供的污泥进行热裂解前后的上清液主要营养元素分析 (感谢北排常菁博士提供的数据), 发现热裂解后的污泥上清液中氮磷元素以及挥发性有机酸 (Volatile fatty acids, VFA) 的含量都大幅度地增加 (表 1)。显然热裂解污泥的上清液对微生物的生长至少可以提供碳源 (来自 VFAs)、氮源和磷源, 这对微生物生长是有利的, 它至少可以作为微生物生长的添加剂。

表 1 北京排水集团污水厂污泥热裂解前后污泥上清液成分的比较

Table 1 Comparison of the sludge supernatant after thermal treatments

Processing status	Parameters (mg/L)			
	COD	VFAs	Nitrogen	Phosphorus
Before thermal treatments	13 094	350	974	92.4
After thermal treatments	28 490	943	2 259	149.0

COD: chemical oxygen demand; VFA: volatile fatty acids.

2.2 污泥热裂解的上清液可以作为微生物培养基添加成分

2.2.1 污泥热裂解液浓度对嗜盐单胞菌 *Halomonas* CJN 生长的影响

因为污水处理得到剩余污泥随批次不同成分可能会有波动,因此取两批不同时间段的污泥热裂解液 a 与 b 离心获得上清液,进行 *Halomonas* CJN 的摇瓶发酵生长实验。

设计两组对照试验,对照组一为正常没有加污泥热裂解液的矿物培养基(60MM)组,对照组二为添加了 1 g/L 酵母膏提取物(Yeast extract)(以提供氨基酸和维生素等生长因子,称为 60MM1gY)。实验组利用污泥热裂解液上清,设置 100%、50%、10%和 1%浓度梯度,不加酵母膏提取物,其余条件与对照组相同。

结果表明两批污泥热裂解液得到的细胞干重有差距,都对嗜盐单胞菌生长和 PHB 有影响(图 3)。对照组一 60MM 使细胞生长到约 7 g/L 细胞干重并生产了占细胞干重 65%的 PHB,对照组二 60MM1gY 使细胞长到 11 g/L 并生产了占细胞干重 72%的 PHB。污泥热裂解液实验组(Sludge waste, 缩写为 SW)方面,可以看出 50%的两种污泥热裂解液 SWa-50%和 SWb-50%均使细胞长到约 13 g/L,含有占细胞干重 40%–60%的 PHB,PHB 的生产还有很大提高空间。100%的两种污泥热裂解液 SWa-100%和 SWb-100%使细胞分别长到约 13 和 14 g/L,分别生产了 20%和 40%的 PHB,PHB 的生产具有更大提高空间。10%的两种污泥热裂解液仍然对细胞生长有影响,SWa-10%与对照组相比无论生长还是 PHB 含量都处于劣势,SWb-10%结果与对照组 MM1gY 相比结果相似,说明 SWb-10%可以作为酵母膏使用。而 1%的两种污泥热裂解液对细胞生长和 PHB 合成没有影响(图 3)。

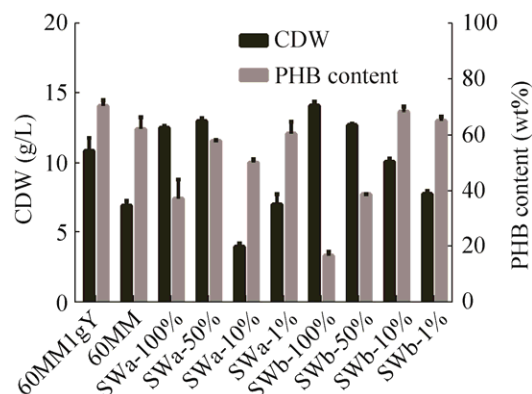


图 3 不同浓度的两种污泥热裂解液对 *Halomonas* CJN 细胞生长和 PHB 生产的影响

Fig. 3 Effects of two thermally treated activated sludge on the cell growth and PHB production by *Halomonas* CJN grown on different concentrations. 5% (V/V) overnight cultures were inoculated in 50 mL 60MM in 500 mL flasks. 37 °C 200 r/min for 48 h. The thermally treated activated sludges SWa or SWb were added to 60MM medium at different concentrations. Error bars are s ($n=3$).

2.2.2 污泥热裂解液作为酵母膏和氮磷矿物元素取代物培养 *Halomonas* CJN

实验结果显示, *Halomonas* CJN 在 60MM 培养基培养时能长到 7 g/L 干重,而加入污泥热裂解液的 60MM 培养基在相同条件下细胞生长达到 13 g/L,几乎提高了 1 倍(图 3)。因此我们设计单一变量摇瓶发酵实验,验证利用污泥热裂解液培养 *Halomonas* CJN 是否可以替代 60MM 培养基中氮、磷、矿物元素和葡萄糖。

在 60MM 培养基添加 30 g/L 葡萄糖条件下,细胞干重达到 8.5 g/L。当在上述 60MM 添加 30 g/L 葡萄糖的培养基中加入不同浓度污泥热裂解液时, *Halomonas* CJN 细胞干重可以达到 12、13、14 g/L(图 4 左边浅灰色柱状图),说明污泥热裂解液可以完全取代昂贵的酵母膏。

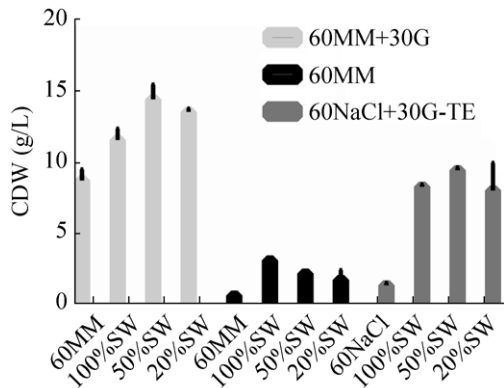


图 4 污泥热裂解液取代酵母膏、糖、或氮磷和微量元素对细胞生长的影响

Fig. 4 Detection of the cell growth when the thermally treated activated sludge replaced some medium components, including yeast extract, glucose, nitrogen, phosphorus and trace elements. 5% (V/V) overnight cultures were inoculated in 50 mL 60MM in 500 mL flasks. 37 °C 200 r/min for 48 h. The thermally treated activated sludge SW was added to 60MM medium at different concentrations. Error bars are s ($n=3$). 60MM (Black pillars): glucose was removed from the mineral medium. 30G: 30 g/L glucose. 60NaCl+30G-TE: 60 g/L NaCl+30 g/L glucose without trace elements.

在不添加葡萄糖的条件下, 60MM 培养基添加污泥热裂解液只能使细胞干重达到 1–3 g/L, 说明污泥热裂解液提供的碳源不够支持细胞生长 (图 4 中间黑色柱状图)。当以去除氮、磷及矿物元素的 MM 培养基污泥热裂解液作为培养基时, 可以达到与 60MM 培养基相同的细胞干重, 即 8.5–10 g/L (图 4 右边灰色柱状图)。这说明若在此基础上培养细胞生产 PHB, 可以用污泥热裂解液完全取代酵母, 也还可以仅添加葡萄糖作为碳源来进行摇瓶发酵实验 (图 3)。

2.2.3 污泥热裂解液培养嗜盐单胞菌 *Halomonas* CJN 的氮磷元素消耗

由于污泥热裂解液含大量氮磷元素 (表 1),

实验结果表明一定程度上可以减少氮磷及矿物元素的添加 (图 3 和 4) 因此利用其培养 *Halomonas* CJN 也可以实现生物除氮减磷。实验将只添加葡萄糖作为碳源的污泥热裂解液培养基与 60MM 培养基作为对照, 分别测量实验前后培养基液体的氮磷元素等含量, 结果表明用污泥热裂解液作为培养基 48 h 培养 *Halomonas* CJN 消耗其中大部分氮磷元素, 总氮减少一半, 总磷只有发酵前的 1/4。降低培养基成本的同时有除磷减氮的作用 (表 2)。

2.2.4 *Halomonas* CJN 在污泥热裂解液中生产 PHB

污泥热裂解液含有丰富的氮磷源, 可以作为培养基成分, 减少发酵添加成分的成本 (表 1 和 2)。摇瓶发酵实验证明用污泥热裂解液完全取代含氮、磷、硫和微量元素以及酵母膏是成功的, 细胞干重可以长到约 7 g/L, 与 60MM 培养基几乎完全一样。然而, PHB 含量只能达到 28% 细胞干重, 低于 60MM 培养基中 PHB 含量的 70% (图 5)。表明用污泥热裂解液可以促进细胞的生长, 同时给 PHB 的积累留有很大的提升空间。进一步的 PHB 含量提高可以通过过表达 PHB 合成基因来实现。

2.3 利用污泥热裂解液厌氧发酵获得的乙酸取代葡萄糖作为碳源培养 *Halomonas* CJN 生产 PHB

污泥热裂解液中含大量碳化合物, 不能被 *Halomonas* CJN 作为碳源利用 (图 4 中间黑色柱状图), 只能成为剩余 COD 作为废水成分排出。针对这个问题, 进一步探究是否可能将这些碳化合物转化成“微生物工厂”能够利用的成分。

表 2 污泥热裂解液作为氮磷源发酵前后滤液组分变化

Table 2 Analysis of the supernatants of sludge components before and after fermentations

Supernatant (mg/L)	COD	Nitrogen	Phosphorus
Before fermentation	14 195	1 349.0	81.0
After fermentation	23 970	709.3	18.6

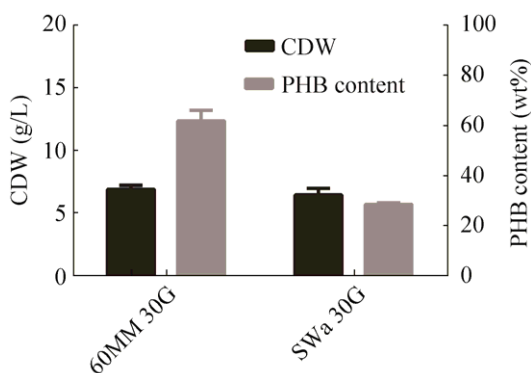


图 5 污泥热裂解液培养 *Halomonas CJN* 生产 PHB

Fig. 5 PHB production by *Halomonas CJN* cultured in media containing thermally treated activated sludge. 5% (V/V) overnight cultures were inoculated in 50 mL 60MM in 500 mL flasks. 37 °C, 200 r/min for 48 h. Error bars are s ($n=3$). 30G: 30 g/L glucose. SW: sludge waste.

北京排水集团提出厌氧发酵可能是最简单的途径,可以将大量污泥热裂解液中的碳水化合物转化为乙酸为主的有机酸,浓度最高可达 15 g/L,由此获得的乙酸比葡萄糖廉价。在前人的实验中已经证明乙酸能够较好地被微生物利用^[12],于是本研究尝试以乙酸取代葡萄糖作为碳源培养 *Halomonas CJN*。实验设置在污泥热裂解液中的乙酸浓度为 5、10、15 g/L,获得了较好的实验结果(图 6)。

实验结果表明:当用污泥热裂解液加乙酸作为碳源时, *Halomonas CJN* 细胞生长干重随着乙酸浓度的增加而增加,当乙酸浓度达到 15 g/L

时,细胞干重可以达到约 9 g/L,与 30 g/L 葡萄糖时的细胞干重 10 g/L 接近。说明乙酸可以促进 *Halomonas CJN* 生长。然而乙酸对 PHB 的生产促进作用较弱,只能达到 20%,不及葡萄糖的 65%–70% (图 6)。结果表明,乙酸可以促进细胞生长,但并没有促进 PHB 的生产,而葡萄糖对 PHB 生产更有利。

实验结果表明,葡萄糖仍然比乙酸对细胞的生长和 PHB 的生产更好。虽然乙酸与葡萄糖一起作为碳源有利于提高 PHB 生产,但是乙酸与葡萄糖共培养只能把 PHB 生产提高到 40%,远低于单独葡萄糖时达到的 70%–80% (图 7)。如果需要进一步提升 PHB 的生产率,下一步的工作将是通过在“微生物工厂”*Halomonas CJN* 里构建 PHB 合成的附加代谢路径,提高乙酸作为廉价碳源的转化率,使乙酸作为单一碳源不但能促进细胞生长,而且能提高 PHB 的积累量。

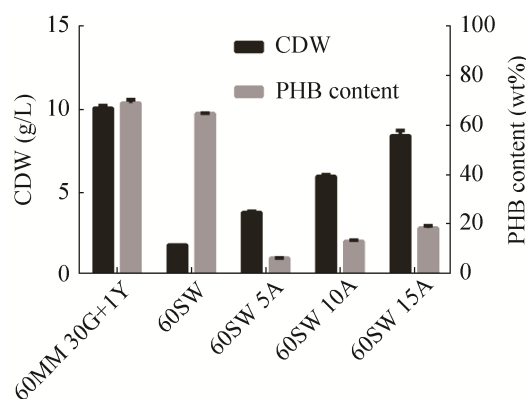


图 6 乙酸作为碳源在污泥热裂解液中对 *Halomonas CJN* 生长及 PHB 生产的影响

Fig. 6 PHB production and growth of *Halomonas CJN* inoculated on acetic acid as a carbon source. 5% (V/V) overnight cultures were inoculated in 50 mL 60MM in 500 mL flasks. 37 °C, 200 r/min for 48 h. Error bars are s ($n=3$). 30G: 30 g/L glucose. 1Y: 1 g/L yeast extract. 60SW: sludge waste was added to 60MM medium. 5A: 5 g/L acetic acid. 10A: 10 g/L acetic acid. 15A: 15 g/L acetic acid.

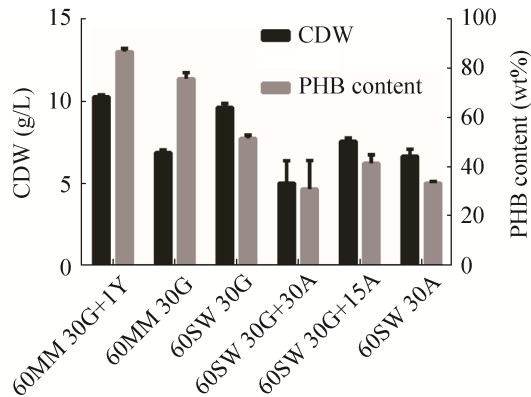


图7 乙酸与葡萄糖混合碳源对 *Halomonas CJN* 生长及 PHB 生产的影响

Fig. 7 Growth and PHB production by *Halomonas CJN* inoculated on acetic acid and glucose mixture as the carbon sources. 5% (V/V) overnight cultures were inoculated in 50 mL 60MM in 500 mL flasks. 37 °C, 200 r/min for 48 h. Error bars are s ($n=3$). 30G: 30 g/L glucose. 1Y: 1 g/L yeast extract. 60SW: sludge waste was added to 60MM medium. 30A: 30 g/L acetic acid. 15A: 15 g/L acetic acid.

3 讨论

本研究把废水处理产生的污泥通过热裂解转化为培养细胞 *Halomonas CJN* 的营养源 (表 1) 来生产生物塑料聚-3-羟基丁酸酯 PHB (图 3-7), 减少了污泥带来的污染, 实现了变废为宝的目标, 而且还降低了生物塑料 PHB 的制造成本, 做到一举三得。

本研究首先通过测量热裂解产生的水解液上清, 发现了丰富的氮磷源 (表 1)。通过菌种筛选, 找到了“微生物工厂” *Halomonas CJN*, 然后在污泥热裂解液中进行培养, 发现其中的氮磷源都被消耗大半 (表 2), 进一步证明了污泥热裂解液可以取代培养微生物所需的基本氮磷源, 可以节省这一部分的成本。同时, 为了促进微生物生长所加入的昂贵的酵母提取物 (酵母膏) 以及微

量元素也可以被污泥热裂解液所取代 (图 4), 进一步降低了 PHB 的生产成本。这一部分的成本, 最保守的估计节省了 1 500 元/t PHB (氮磷源 + 微量元素约 800 元/t PHB, 酵母膏约 700 元/t PHB) (数据来源于 PHA 生产商蓝晶公司)。

另一方面, 污泥热裂解液主要是促进了微生物的生长提升细胞干重, 对促进 PHB 积累作用不大 (图 3 和图 5)。但是, 低积累的“微生物工厂” *Halomonas CJN* 还是有进一步提高 PHB 积累的潜能。这一部分今后可以通过代谢工程和合成生物学等手段, 在微生物中构建附加的 PHB 强合成代谢通路的方法, 使 *Halomonas CJN* 在污泥热裂解液不但能很好地生长, 还能很好地生产生物塑料 PHB^[13]。

本研究试图利用污泥热裂解液本身所具有的碳源来取代葡萄糖支持微生物的生长。但发现污泥热裂解液含有的碳源不能被“微生物工厂” *Halomonas CJN* 所利用 (图 3)。于是, 委托北京排水集团通过厌氧发酵把污泥热裂解液含有的碳源转化为“微生物工厂” *Halomonas CJN* 能利用的乙酸 (图 6), 而相应减少葡萄糖的用量, 这样的替代可再降低 PHB 的生产成本。然而发现乙酸能支持细胞的生长, 却不支持 PHB 产量的提升。

为此, 通过把有利于生产 PHB 的较为昂贵的葡萄糖和有利于细胞生长的来源于污泥热裂解液的乙酸混合起来, 作为混合碳源进行实验, 发现 PHB 含量稍有提高, 但仍然不如葡萄糖好 (图 7)。因此, 需要寻找乙酸作为单一碳源的新思路。

所以, 下一步关键在于乙酸为单一碳源的污泥热裂解液中高效生产 PHB, 于是探索代谢路径将成为下一步研究的重要方向^[13]。

从经济性角度分析,这一项创新的工艺能减少葡萄糖作为原料的成本至少 8 500 元,减少上面污泥热裂解液取代酵母膏、氮磷源和微量元素的成本 1 500 元,总共可以节省约 10 000 元的 PHB 制造成本,使 PHB 从现在的 30 000 元/t 变成 20 000 元/t(数据来源于 PHA 生产商蓝晶微生物科技有限公司),这样使得生物塑料的竞争力进一步加强。

本研究为废水处理产生的大量活性污泥提供了一条新的废物资源化利用道路,对未来降低微生物发酵生产生物塑料 PHA 的成本提供了可能性。另一方面,嗜盐单胞菌在剩余污泥热裂解液中培养对氮磷元素的消耗为废水处理除磷减氮减少了成本。同时,本次研究利用单一菌种在活性污泥中发酵是一种创新,具有可操作性强的优势。前人进行的混合菌群培养生产 PHA 由于其不可控性,细胞密度很低,没有可开发性^[14]。而 *Halomonas* CJN 为 PHA 积累提供了较大的可增长空间。不得不提的是,实验培养嗜盐单胞菌所需高盐浓度在后期也需污水厂进行稀释处理,因此下一步研究方向是通过对菌体进行诱变筛选,改造降低正常生长所需的高盐浓度,同时通过构建附加 PHB 代谢通路尝试增加 PHB 积累量。

生命力强大的“微生物工厂”*Halomonas* CJN 除了可以在高盐高碱等条件下利用成分复杂的污泥热裂解营养物生产 PHA 外,还具有以下好处:1) 单一菌种培养更容易调控整个发酵过程(混合菌群难以达到高密度);2) 不需对培养基进行灭菌处理,节约能量;3) 采用简单设备减少发酵设备上的投资;4) 不需对发酵过程进行严格控制。这些特点,大幅度减少了培养微生物的复杂性^[15-17]。

本研究发现可以利用“微生物工厂”*Halomonas*

CJN 变废为宝,使活性污泥成为资源来生产生物可降解塑料 PHB。

致谢:感谢清华大学生物材料实验室的姚志昊老师提供的具体实验技术指导、吴琼老师的微生物知识指导、清华附中本部邱楠、梁姝颀和王旭老师的数理化生物知识指导以及实验空间、论文写作的指导。同时感谢北京排水集团的常菁博士提供的污泥及其热裂解液分析数据。

REFERENCES

- [1] Beijing Municipal Bureau of Statistics, Beijing Investigation Corps of National Bureau of Statistics. 2013 Beijing Statistical Yearbook. Beijing: China Statistics Press, 2013 (in Chinese).
北京市统计局,国家统计局北京调查总队. 2013 北京市统计年鉴. 北京: 中国统计出版社, 2013.
- [2] Nghiem LD, Koch K, Bolzonella D, et al. Full scale co-digestion of wastewater sludge and food waste: bottlenecks and possibilities. *Renew Sustain Energy Rev*, 2017, 72: 354–362.
- [3] Tyagi VK, Lo SL. Sludge: a waste or renewable source for energy and resources recovery? *Renew Sustain Energy Rev*, 2013, 25: 708–728.
- [4] Feng YH, Zhang YB, Chen S, et al. Enhanced production of methane from waste activated sludge by the combination of high-solid anaerobic digestion and microbial electrolysis cell with iron-graphite electrode. *Chem Eng J*, 2015, 259: 787–794.
- [5] Chen GQ. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(8): 2434–2446.
- [6] Wang Y, Yin J, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 30: 59–65.
- [7] Satoh H, Iwamoto Y, Mino T, et al. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Sci Technol*, 1998, 38(2): 103–109.

- [8] Chen GQ, Wei DX. Microbial Poly-hydroxy Fatty Acid Ester. Beijing: Chemical Industry Press, 2014 (in Chinese).
陈国强, 魏岱旭. 微生物聚羟基脂肪酸酯. 北京: 化学工业出版社, 2014.
- [9] Yin J, Chen JC, Wu Q, et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(7): 1433–1442.
- [10] Li ZJ, Shi ZY, Jian J, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2010, 12(4): 352–359.
- [11] Braunegg G, Sonnleitner B, Lafferty RM. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1978, 6(1): 29–37.
- [12] Yang M, Sun YL, Zheng XC, et al. Denitrification efficiency and techno-economic analysis of different exotic additional carbon source. *Water Wastewater Eng*, 2010, 36(11): 125–128 (in Chinese).
- 杨敏, 孙永利, 郑兴灿, 等. 不同外加碳源的反硝化效能与技术经济性分析. *城镇给排水*, 2010, 36(11): 125–128.
- [13] Zhao H, Zhang HM, Chen XB, et al. Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*. *Metab Eng*, 2017, 39: 128–140.
- [14] Lam W, Wang YJ, Chan PL, et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using sludge from different wastewater treatment processes and the potential for medical and pharmaceutical applications. *Environ Technol*, 2017, 38(13/14): 1779–1791.
- [15] Tan D, Wu Q, Chen JC, et al. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metab Eng*, 2014, 26: 34–47.
- [16] Fu XZ, Tan D, Aibaidula G, et al. Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals. *Metab Eng*, 2014, 23: 78–91.
- [17] Zheng YG, Xue YP, Jin LQ. *Biological Process and Equipment*. Beijing: Chemical Industry Press, 2004 (in Chinese).
郑裕国, 薛亚平, 金利群. *生物加工过程与设备*. 北京: 化学工业出版社, 2004.

(本文责编 陈宏宇)