

doi:10.3969/j. issn. 1007-7162. 2015. 02. 025

# 混合菌群合成聚羟基烷基酸酯(PHA)研究进展

王玉洁<sup>1</sup>, 罗灏<sup>1</sup>, 何洁鑫<sup>1</sup>, 张玉华<sup>1</sup>, 何丹<sup>2</sup>,

(1. 广东工业大学 环境科学与工程学院, 广东 广州 510006;

2. 华南理工大学 土木与交通学院, 广东 广州 510006)

**摘要:**系统地总结了混合菌群利用有机废水提供的底物合成 PHA 的相关研究进展,一般来说,混合微生物群在好氧瞬时供料和厌氧/好氧活性污泥工艺这两种模式下合成 PHA。国内研究着重于探索反应器的运行条件,包括驯化过程和积累过程,以及从混合菌群中分离可合成 PHA 的微生物等。国外研究着重于探索各种可用作碳源的有机废水,分离鉴定各种能够大量合成 PHA 的微生物,以及不同种类底物对 PHA 产量和单体组成的影响。基于一些技术性突破,PHA 合成模式可扩大规模应用于工业生产。根据现有合成方法进展,提出发展方向是分离鉴定出更多的合成 PHA 含量高的微生物,透彻分析其在 PHA 驯化积累过程中的作用;同时使废水中各类有机物比例均衡,最后进行条件优化,实现 PHA 产量最大化。

**关键词:**聚羟基烷基酸酯;混合菌;有机废水;

中图分类号: X705; Q89

文献标志码: A

文章编号: 1007-7162(2015)02-0137-07

## Research Progress of Polyhydroxyalkanoate Synthesized with Mixed Bacteria

Wang Yu-jie<sup>1</sup>, Luo Hao<sup>1</sup>, He Jie-xin<sup>1</sup>, Zhang Yu-hua<sup>1</sup>, He Dan<sup>2</sup>,

(1. School of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2. School of Civil Engineering and Transportation, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** This paper systematically summarizes the research progress of which mixed bacteria produce PHA using substrate from organic wastewater. Generally speaking, mixed bacteria can produce PHA by two ways, AN/AE technology and ADF technology. Domestic researches emphasized the operating conditions in the reactor including the domestication and accumulation. Besides, the researchers extracted the microorganism producing PHA. Foreign researches emphasized the identification of different kinds of microorganism for keeping PHA. What's more, they studied the influence that different substrates pose to PHA yield and composition and looked for more effective substrate from organic wastewater. Thanks to some technical breakthrough, PHA producing pattern can apply to industrial production. According to the current producing methods, this paper proposes that more reliable microorganism with high PHA storage should be identified and researches should go deep into the role of specific bacteria. Meanwhile, nutrition from the substrate needs to be balanced. Then it should optimize the operating conditions so as to achieve PHA production maximization.

**Key words:** polyhydroxyalkanoate(PHA); mixed bacteria; organic wastewater

白色污染是当前危害社会环境的社会性公害。这类由石油化工工业中的高分子化合物制成的塑料制品,被弃置后需要 200~400 年的时间才能完全降解。该问题推动了降解塑料的开发和应用<sup>[1]</sup>。

聚羟基烷基酸酯(PHA)是一类由微生物在 N、P、微量元素等营养缺乏,碳源充足的不均衡条件下合成的细胞内能源物质<sup>[2]</sup>。PHA 是具有与聚乙烯类石油基塑料类似的力学性能,同时也具有生物可降

收稿日期: 2014-03-14

基金项目: 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目(2012LYM-0055); 人保部留学人员科技活动资助项目(12ZK0269)

作者简介: 王玉洁(1977-), 女, 讲师, 博士, 主要研究方向为 PHA 的生产和应用。

解性和生物相容性等特性的新型环保材料。但是,生产 PHA 的主要方法,即纯菌株发酵培养,成本居高不下,限制了 PHA 的普及化。

城市污水的生物处理过程产生大量活性污泥,其中存在大量能合成 PHA 的微生物。利用活性污泥中的混合菌,驯化得到 PHA 贮存能力强的菌群,再以制糖、啤酒等行业产生的有机废水中小分子有机酸等为底物,一方面大量合成 PHA,另一方面达到除磷脱氮的效果。

目前,利用活性污泥合成 PHA 的产率尚低于纯菌株,但通过选择合适工艺,探索并优化工艺条件,将提高 PHA 的产率。

本文重点讨论优化活性污泥混合菌群生产 PHA 的工艺条件;简单阐述 PHA 的生产及应用过程中存在的问题,并指出后续研究方向。

## 1 国内采用混合菌合成 PHA 的研究

### 1.1 混合菌的驯化

国内 PHA 合成实验主要采用厌氧/好氧活性污泥法和好氧瞬时供料法,让活性污泥中混合菌群能够利用废物中营养成分,储存 PHA,可以维持不均一生存条件下相对稳定的生长和生存<sup>[3]</sup>。

#### 1.1.1 厌氧-好氧活性污泥工艺

该工艺是指微生物都能够在厌氧/好氧交替条件下,在厌氧段时以 PHA 的形式在细胞内储存能源,在好氧条件下消耗内碳源。

在驯化阶段,采用限磷和限氮两种方式均有助于活性污泥中的混合菌群合成 PHA。陈志强等<sup>[4]</sup>实验在限磷条件下( $w(C):w(N):w(P) = 100:5:0.5$ ),PHA 产量可占到细胞干重的 35%。而限氮条件下( $w(C):w(N):w(P) = 100:2.5:1$ ),PHA 合成量达到最高,能达到污泥干重的 40%。Ruan 等<sup>[5]</sup>研究表明单一控制磷源含量,经 15~20 d 驯化,获得富含 PHA 约 20% 细胞干重(CDN)比例的活性污泥。在限氮和限磷的情况下,还控制 pH 值。初始 pH 值高不利于聚糖菌(GAOs)的生长但有利于 PHA 量的贮存<sup>[6]</sup>。

聚糖菌(GAOs)是已驯化得到的一种 PHA 合成主要微生物。其脱氢酶活性、生长速率及对有机酸的利用能力与底物浓度和驯化时间有关。研究表明,长期高丙酸/乙酸驯化对 GAOs 有抑制作用<sup>[6-8]</sup>。混合菌经过驯化,污泥中 PHA 含量有明显增幅。王玉洁等<sup>[9]</sup>将取回的多种活性污泥经 3000 r/min 离心 20 min 后,以 85~120 g/L 湿重加入 SBR 中进行驯化,从而进行高密度培养。经驯化培养后,所有污泥中的 PHA 含量均大幅提高,其中珠江啤酒厂活性污泥中的 PHA 含量达 10.5%,增加了 105 倍,镜检发现驯

化后的污泥中丝状菌的数量和胞内 PHA 的产量均有增加,经鉴定为球衣菌,编号为 W99136。

陈志强等<sup>[10]</sup>从活性污泥中分离到 1 株能够利用丁酸合成 PHA 的细菌 WD-3,当  $w(C)/w(N)$  为 35, pH 为 7.0 时,WD-3 的 PHA 合成能力最高。在最佳培养条件下,细胞生长达到稳定期时,该菌 PHA 产量高达 3.01 g/L,占细胞干重的 45.4%,且 PHV 所占比例达到 1/3。经 16S rRNA 基因测序分析,初步确定该菌属于  $\gamma$ -变形菌亚纲中的肠杆菌。

李晓雁等<sup>[11]</sup>采用的驯化活性污泥方式为好氧/微好氧/沉淀,确定最佳碳源为乙酸钠,所得 PHA 的量从占污泥 MLVSS 的 2.36% 提高到 21.19%。研究中利用 DNA 指纹图谱分析与探针标记和杂交技术结合,从驯化后污泥样品中筛选出适应特定工艺条件,并能够在此工艺下长期存在的 PHA 合成优势菌 CAMP11(芽孢杆菌属)。把 CAMP11 加入活性污泥并进行驯化,主要产物为羟基丁酸与羟基戊酸组成的共聚物(PHBV),其 PHA 总量高达污泥 MLVSS 的 32.08%。

#### 1.1.2 好氧瞬时供料工艺

该工艺是通过控制反应器中的底物浓度,使微生物处于底物丰富时而匮乏的状态,以抑制微生物的生长,驯化出具有强大 PHA 贮存能力的菌群。

该工艺在好氧/缺氧时间比为 1:3 时最有利于培养系统维持稳定并存储 PHA。陈红等<sup>[12]</sup>在该时间比下驯化活性污泥,获得最高 PHA 含量(48.6%),以及最高合成速率  $5 \times 10^{-8}$  g/s。

张琦等<sup>[13]</sup>使用双阶段驯化模式,得出乙酸利用率为 27.3 mg/(L·min),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,各项指标相比单阶段驯化模式均有提高。但是双阶段驯化模式耗时过长。

许振岚<sup>[14]</sup>认为驯化是个长期的过程,长时间的氨氮、磷浓度受限,使微生物的生长长期受到限制,将导致 MLSS 减小,会使底物的消耗速率和 PHA 的合成受到较大的影响。通过优化实验得到最佳驯化条件为:SRT 为 15 d,  $w(C)/w(N)$  为 50,  $w(C)/w(P)$  为 530, COD<sub>0</sub> 为 1.050 kg/m<sup>3</sup>,至驯化结束最大得率为 0.73,驯化时间为 25 d。

大量实验均采用乙酸、丙酸等纯物质作为原料,吴海云等<sup>[6]</sup>利用食品废弃物和剩余污泥混合发酵产有机性挥发酸(VFAs)作为活性污泥合成 PHA 的廉价碳源。培养 20 d 后驯化体系达到稳定,稳定后发酵所得 VFAs 浓度为  $4.0 \pm 0.15$  kg/m<sup>3</sup>,VFAs 中丁酸含量最高,其次为戊酸,丙酸和乙酸含量相对较少。随后的优化实验中,最高 VFAs 浓度实验值

29.099 kg/m<sup>3</sup> 相应控制条件:食品废弃物含量 88.03%, pH 为 6.99, 系统反应时间 8.92 d, 有机负荷  $9.62 \times 10^{-8}$  kg/s。最高 VFAs/SCOD 比实验值 89.91%, 相应控制条件:食品废弃物含量 92.12%, pH 为 7.18, 系统反应时间 6.26 d, 有机负荷  $4.93 \times 10^{-8}$  kg/s。这可为后续 PHA 合成的工业化提供大量廉价碳源, 值得对其他污泥进行更多研究。

## 1.2 PHA 积累

许多研究通过驯化得到高效的 PHA 合成菌群, 并在 PHA 积累过程进行条件优化选择, 以提高 PHA 的贮存量。影响因素包括底物浓度, 碳源类型, 溶解氧浓度, 氧化还原电位, pH, 温度等。

### 1.2.1 COD 浓度

活性污泥合成 PHA 的最大产率与进水 COD 浓度在一定范围内呈正相关。陈玮等<sup>[15]</sup>实验发现, 当进水 COD 为 300~800 mg/L 时, PHA 产率随进水 COD 浓度的升高而增大, PHA 含量最高可达 21%。而当进水 COD 继续提升至 1000 mg/L 时, PHA 产率的提升不明显。陈红等<sup>[12]</sup>在有机负荷为 5.42 kg/m<sup>3</sup> 时, PHA 含量可达 48.6%, 当有机负荷为 0.72 kg/m<sup>3</sup> 时, PHA 的合成速率最高达到  $5 \times 10^{-8}$  g/s。针对 COD 浓度过高对微生物合成 PHA 反应产生抑制作用的问题, 有研究发现, 分批次加入底物可消除这种抑制作用<sup>[5]</sup>。分批次加入底物不仅提高了 PHA 的质量分数, 还使得 PHA 的生产时间大大缩短。

### 1.2.2 碳磷比和碳氮比

保证碳氮比不变, 探究磷元素的影响。陈玮等<sup>[15]</sup>发现, 在  $w(C):w(P)$  为 250:1 时 PHA 最大积累量达到 27%,  $w(C):w(P)$  为 750:1 时 PHA 最大积累量达到 37%。而陈志强等<sup>[4]</sup>得出利用活性污泥合成 PHA 在限氮条件下更有利, 当  $w(C):w(N)$  为 125:1 时, 获得了 PHA 的积累的最大值占到细胞干重的 59%。但是, 污泥状态持续 3 d 左右, 丝状菌大量繁殖, 导致系统崩溃。限氮过量和限磷过量分别会引起丝状菌膨胀和黏性水膨胀。PHA 高产的同时控制污泥不膨胀是目前利用活性污泥中混合菌群合成 PHA 需要解决的重要问题。

### 1.2.3 不同类型碳源

在活性污泥中提供不同碳源, 会合成不同表现型的 PHA。黄惠珺等<sup>[16]</sup>实验结果表明, 进水  $n(\text{乙酸}):n(\text{丙酸}) = 1:2$  条件下系统内 PHA 和 PHB 含量最多, 分别为 6.0 和 4.25 mol/m<sup>3</sup>。同时, 系统也可以利用甲醇、乙醇、淀粉及生活污水作为碳源物质进行底物贮存, 贮存物以 PHB 为主, PHB 分别占 PHA 总量 92%、88%、85%、70%, 但贮存量较乙酸及丙酸低。李金娟等<sup>[17]</sup>研究表明, 淀粉废水酸化产物为丁酸、乙酸、丙酸、乙醇、戊酸。以此酸化产物为

碳源经活性污泥合成 PHA, PHA 含量为 34.7%。核磁共振图谱结果分析, 此 PHA 样品含有 HB 和 3HV, 3HV 的含量占 8.9%。

目前, 已经商品化的 PHA 产品有 PHB、PHBV 和 PHBHHx。上述研究中碳源均为纯物质, 所以学者还需对利用剩余污泥发酵得到的碳源所合成的 PHA 类型进行研究, 使更多类型的 PHA 产品实现工业化、商品化。

### 1.2.4 不同磁场强度的响应分析

适当强度的磁场对 PHA 合成酶有促进作用。陈红等<sup>[12]</sup>实验发现, 在磁场强度从 0 mT 逐步增加到 30 mT 的过程中, 活性污泥中 HB, HV 的含量开始随着磁场强度的增加而增加, 到达某个点后又会随着磁场强度的增加而降低。活性污泥中 HB 含量在磁场强度为 7 mT 时达到最高(33%); 活性污泥中 HV 含量在磁场强度为 21 mT 时达到最高(12%); 当磁场强度为 11 mT 时, 活性污泥中 PHA 含量最高(40%)。吴海云<sup>[6]</sup>实验表明, 不加磁场条件下最终得到的转化率为 20.5%; 7 mT 磁场条件下得到的转化率为 23.2%, 与 21 mT 磁场条件下接近。同时有研究<sup>[14]</sup>建议控制 pH 值在较高水平(8.5~9.5 之间), 并且当磁场强度为 21 mT, SRT 为 5 d, 活性污泥合成 PHA 的能力均较大。

### 1.2.5 溶解氧(DO)

活性污泥中合成 PHA 的菌群有厌氧菌群和好氧菌群。有研究表明:以乙酸钠为碳源培养的活性污泥低 DO 浓度和高 DO 浓度均会较大程度影响 PHA 的降解速率<sup>[18]</sup>。以葡萄糖为碳源培养的活性污泥 PHA 受 DO 影响不大。蔡萌萌等<sup>[19]</sup>研究表示, 采取微氧/好氧工艺能有效解决厌氧/好氧工艺中 PHA 产量低的问题。原因是 PAOs/GAOs 菌群会在厌氧条件下并非全部碳源转化为 PHA, 而是把部分碳源转化成肝糖元。代谢途径复杂化会降低 PHA 的合成功率。而微氧时菌群摄取外界碳源, 产生较少量 PHAs。好氧时菌群快速降解外界碳源, 同时合成大量 PHA, 比相同情况下厌氧/好氧工艺的 PHA 产量多 40%。

## 2 国外采用混合菌合成 PHA 的研究

### 2.1 微生物驯化

驯化得到 PHA 贮存能力强的微生物是混合菌条件下一个重要的挑战。如果选择得到的微生物群 PHA 贮存能力不均一, 会对出水有不良影响。贮存能力低的微生物也增加 PHA 提取的成本。值得注意的是, 优化驯化过程需要得到具有 PHA 合成能力高且稳定的均一微生物群, 而不是使 PHA 含量最大化。后者应该是在积累过程完成。

### 2.1.1 AN/AE 工艺

大量研究是针对已驯化得到的两种主要微生物,即聚磷菌(PAOs)和聚糖菌(GAOs). 研究表示, GAOs 比 PAOs 表现出更强能力, 通过吸收简单底物更容易合成共聚物 P(3HB-co-3HV)且能达到更高的 PHA 含量<sup>[20]</sup>.

近几年, 研究得到 GAOs 丰富的微生物群, 其表现出较强的 PHA 合成能力.

Dai 等<sup>[20]</sup>利用乙酸驯化得到了含 75% GAOs 的微生物群, 该微生物群合成的 PHA 含 70% 3HB 和 30% 3HV, 这种产物具有与商用 PHA 类似的性能. 根据 FISH 的分析, 驯化得到的生物群落主要包括变形菌门和变形杆菌门的细菌. 但其 PHA 含量很低, 只占细胞干重的 14%.

Bengtsson 等<sup>[21]</sup>采用厌氧/好氧 SBR 工艺, 使用预发酵造纸废水驯化培养 GAOs 丰富的微生物群. 反应系统表现出稳定的 PHA 合成量, 产物组成为  $m(3HB):m(3HV):m(3H2MV)=35:60:5$ . 菌群在厌氧条件下贮存 PHA 量达到细胞干重的 30%, 在好氧条件下达到 25%. 糖蜜废液含有大量的糖类和氨基酸等营养物质供微生物生长<sup>[22]</sup>.

Pisco<sup>[23]</sup>使用富含挥发性脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸和戊酸)的发酵蜜糖废水, 驯化得到具有较强的 PHA 贮存能力的 GAO 菌群. 这个菌群的 PHA 贮存量达到细胞干重 37%. 产物主要由 3HB, 3HV, 3HHx 和少量 3H2MB 和 3H2MV 组成.

### 2.1.2 ADF 工艺

学者们在 ADF 条件下使用了较复杂的废物驯化微生物, 例如: 发酵蔗糖蜜<sup>[24]</sup>, 发酵棕榈油厂废水(POME)<sup>[25]</sup>, 含有甲酸、甲醇和乙二醇的工业废水<sup>[25]</sup>, 番茄罐头工厂废物<sup>[26]</sup>, 发酵造纸厂废水<sup>[27]</sup>和发酵啤酒厂废水<sup>[28]</sup>.

大量驯化过程运行条件得到试验. Albuquerque<sup>[24]</sup>在研究发酵蔗糖蜜中, 采用 SBR 工艺, pH 不受控的条件下, 运行周期为 12 h, SRT 为 10 d, 1.4 和  $2.5 \text{ mol/m}^3$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 两个有机负荷  $1.39 \times 10^{-6}$  和  $6.94 \times 10^{-7} \text{ mol/s}$ . 学者证明饥饿/丰盛的有机负荷比例是富集培养过程的重要因素.(在相似的周期长度和营养条件下, 过高 OLR 会使 PHA 合成能力丧失). 同时证明了氨存在于整个周期对 PHA 合成菌的富集有积极作用. 当氨的浓度较低(只出现在营养丰盛阶段), 饥饿阶段, 微生物对除 VFA 以外有机物的消耗速度较慢, 因此需要延长饥饿时段. 当有机负荷较低( $6.94 \times 10^{-7} \text{ mol/s}$ ), 氨浓度较高( $2.5 \text{ mol/m}^3$ )时, PHA 合成菌培养过程较稳定. 该系统保持一个较低但持续的 PHA 含量占细胞干重 10%.

Din 等<sup>[25]</sup>描述了一个以发酵 POME 为底物的系统, 其运行周期为 6 h, HRT 为 1 d, pH 控制在 7.0, 温度固定在  $30^\circ\text{C}$ . 对微生物群 PHA 合成所需 C/N, C/P 进行实验. 当  $180 \text{ gSCOD/gP}$  和  $260 \text{ gSCOD/gN}$  时, 最高 PHA 贮存量达到 44.5%.

Bengtsson 等<sup>[28]</sup>使用发酵造纸厂废水进行连续实验, 系统运行 pH 为 7.3, 污泥停留时间为 7d, 水力停留时间在丰盛和饥饿状态分别为 0.2 d 和 2.2 d. 富集得到的生物群主要包括丝状菌和两种形态的菌胶团菌, 在苏丹黑或耐尔蓝染色后检测到均能产生 PHA, PHA 含量平均为细胞干重的 11%. ADF 过程中以复杂废物作为底物培养的微生物群还未报道出其种类. 已确定的合成底物显示出细菌的多样性, 由变性梯度凝胶电泳鉴定得到, 陶厄氏菌属(Thauera) 主要存在于乙酸、丙酸和乳酸混合物浓度不一的反应器中. 由 RT-PCR 和定量 FISH 分析得到, 该属和固氮弓菌属一起在投放醋酸盐的系统中被发现, 阿玛瑞球菌则主要存在于投放丙酸盐的系统中. 陶厄氏菌属、固氮弓菌属和阿玛瑞球菌贮存 PHA 的能力得到耐尔蓝染色的确认<sup>[29]</sup>.

Gilda 等使用发酵蜜糖废水作为底物驯化混合菌, 实验得到以 Thauera 和 Azoarcus 为主的菌群. 学者认为微生物群落主要受有机负荷影响. 当有机负荷为  $120 \text{ mmol/(L \cdot d)}$ , 以 Thauera 为主要菌群, 大部分碳用于微生物生长, 且影响聚合物的 HV 含量; 当有机负荷为  $90 \text{ Cmmol/(L \cdot d)}$ , 以 Azoarcus 为主要菌群, 底物吸收率达到最大. 结果显示, 最佳的 PHA 合成菌群需要由大量 Azoarcus 和少量 Thauera 组成, 以达到更强的 PHA 合成能力和更佳的聚合物机械性能<sup>[30]</sup>.

然而, 已被鉴别出来的物种的相对贮存能力尚未报道. 因此, 很难评价是否所有物种都具有同等的贮存能力, 或者是否有一个物种是贮存 PHA 的主体. PHA 贮存能力和微生物种类的联系使得反应器运行条件的优化设计有利于重要的 PHA 合成微生物的生长.

### 2.2 PHA 积累

许多研究中采用相似的驯化培养, 最高的 PHA 贮存能力仍是基于纯底物. 近年, 复杂废物才开始用于驯化培养微生物以测试 PHA 贮存能力. PHA 积累效果一方面反映了驯化微生物的 PHA 贮存能力, 另一方面反映了积累过程最优化. Venkata 实验设计采用田口方法论, 优化研究表明, 试验过程微氧环境担当十分重要的角色, 随后依次是 pH, 葡萄糖, 磷, 氮, 铁, VFA 组成和 VFA 含量<sup>[31]</sup>.

在 AN/AE 过程, 通过向反应器提供额外的底物来实现 PHA 积累. 有研究发现, 在厌氧条件下, 当细

胞内糖原达到一定量,PHA 开始贮存,而这个过程与外部底物的量无关<sup>[32]</sup>. Dai 等发现在厌氧条件下, PHA 最高含量达到 28%,在好氧条件下,达到 41%. 在好氧过程中,当 VFAs 消耗完,一部分糖原会被消耗. Bengtsson 等也对厌氧/好氧条件下驯化得到的微生物施加好氧条件. 但是,微生物群同时合成糖原和 PHA. Bengtsson 等对此进行思考,并引入了随后的厌氧步骤,因此好氧段由 VFAs 合成的糖原会被消耗,VFAs 量在新的厌氧条件下达到下一个高峰.

在 ADF 条件下驯化培养得到的微生物,尽管使用复杂底物进行研究,ADF 驯化培养常常产生 3HB 和 3HV 的共聚物<sup>[26]</sup>. AN/AE 驯化培养则得到第三种单体 3HHx 或 3H2MV. 3HB 的形成是 VFAs 和原料以及糖原多样性的直接结果,除此外的单体是由复杂废物培养得到的产物. 一般来说,三元共聚物,特别是包含 MCL 单体表现出更好的力学性能. 聚合物组分的稳定性是混合菌利用复杂废物合成 PHA 的重要方面. 由于废水具有周期敏感性和其工艺的变化,这是 PHA 实现产业化的重要方面. 这个问题可通过人为改变发酵运行参数来解决<sup>[24]</sup>. 但是,当原料已经发酵好直接投入系统中,有机酸成分剧烈改变,最终对聚合物组成的控制可能出现问题.

ADF 条件下得到的单位 COD 的混合菌 PHA 产量,多数情况下,在 0.53 至 0.84 之间. 更高的实验结果(1.00)由 Dionisi 得到. 同时, Gurieff 证明了得到的高产量(0.83 和 0.84)是其他碳源的功劳而不是 VFAs. 最低值(0.075 和 0.14)是使用工业废水<sup>[33]</sup>和西红柿罐头废水<sup>[26]</sup>培养得到的. 产量的不同可能与原料的组成有关. 准确来说,是与上述研究中使用不同 VFA 组成和浓度有关. 贮存量,除了 Dionisi 的结果,都比 Serafim 使用醋酸盐(0.87)或用该种底物的 PHA 理论值(0.84)<sup>[34]</sup>要低. 这种差异是可预料到的,因为发酵的底物含有除了乙酸以外其他可在 PHA 合成时被脱碳的长链 VFA 碳源,最终导致单位碳合成较少的 PHA.

Moita 实验采用的纯生物油里含有丰富的醋酸盐,可用作培养底物来合成短链 PHAs. 纯生物油和纯醋酸盐作为底物的 PHA 最大产量占细胞干重比例分别是 9.79% 和 32.47%. 虽然纯生物油培养的混合菌表现出较低的 PHA 合成能力, PHA 细胞含量以及 PHA 总产量都较少. 但通过对生物油进行蒸馏或发酵,得到了喜人的成果,分别是 16.76% 和 16.83%. 这比其他使用混合菌和复杂底物所得到的 PHA 产量都要高. 此外, Moita 预计合理限氮条件, PHA 产量能达到更高<sup>[35]</sup>.

AN/AE 条件下得到的单位 COD 的混合菌 PHA 产量,根据原料和条件,在 0.29 到 0.94 之间浮动.

除了 Coats 研究结果以外, PHA 产量均低于 Dai 使用醋酸盐的实验值(0.85). 并且,当糖原用作一种内源物质合成 PHA 时,可以认为 AN/AE 条件下混合菌的 PHA 产量比 ADF 条件下的要高,但是还没有具体结果.

除了 Bengtsson 以外的学者,在 AN/AE 条件下,按单位 COD 计算,混合菌使用实际底物合成 PHA 量(0.014 – 0.28),和 Dai 使用醋酸盐的实验值范围相似. 但是 ADF 条件下得到的混合菌使用真实复杂底物时无法达到特定产值(0.0082 – 0.42),这是使用醋酸盐培养得到的结果(0.72)<sup>[36]</sup>. 这个差异可能与底物组成有关. 尽管混合菌可达到较高 PHA 产量,但是仍低于纯菌株的结果,这是因为生物质浓度较低. 事实上,有报道提到 ADF 运行系统中最高细胞浓度为 6.1 g/L<sup>[37]</sup>,这比纯菌株的生物量低很多,纯菌株生物量通常高于 80 g/L. Dias 等基于用醋酸盐合成 PHA 的模型,总结出 ADF 系统中生物质浓度高于 10 g/L 就足够与纯菌株相比较了. 如果驯化的微生物有很强的生长能力和 PHA 贮存能力,那么提高生物质浓度是有可能的. 除了生产力, PHA 细胞含量也是一个很重要的参数,用来评价该工艺的效率和可行性. PHA 含量直接影响到生产成本: PHA 值越低,聚合物提取的成本越高. 因此, PHA 含量最优化条件由几位学者通过改反应器运行参数得到,如下: 底物投放方案,碳氮比,碳磷比,有机负荷, pH,或者温度. 合成底物采用分批投放和低浓度氮可得到最高的 PHA 含量,占细胞干重 65%. Dionisi 等<sup>[37]</sup>测试了一系列有机物负荷从  $9.84 \times 10^{-8}$  到  $3.62 \times 10^{-7}$  kg/s,得到最大 PHA 含量为  $2.31 \times 10^{-7}$  kg/s (45.8%). 另外,投放原料组成(类型和 VFA 的量)和多聚物单体组成也在 PHA 含量中扮演重要角色. 由于每个研究中原料组成和总碳源的量都不一样,试图去比较投放不同复杂底物的污泥条件下的 PHA 含量会有偏差. 除了 Dionisi 使用的工业废水外,所有其他原料都有适用于 PHA 合成.

### 3 结论

本文对于生物塑料 PHA 的论述主要包括了厌氧–好氧活性污泥工艺和好氧瞬时供料工艺两大工艺的微生物驯化和 PHA 积累过程. 目前,对于 PHA 的研究成果主要体现在使用发酵废水提供碳源,用剩余污泥驯化得到具有 PHA 合成能力的微生物群,优化运行条件(包括 COD 浓度,碳氮磷比例,碳源类型,磁场强度以及溶解氧),混合菌在积累过程中可得到较高的 PHA 含量. 而难点主要包括: 驯化得到的微生物 PHA 合成能力不均匀,生物量不足;已被鉴定的菌种其 PHA 贮存能力无法评价;复杂底物类

别和浓度等难以控制；即使通过优化变量，PHA 含量仍无法达到使用纯菌种积累的量。

对于 PHA 的后续研究，应该致力于分离鉴定出更多的合成 PHA 含量高的微生物，透彻分析不同微生物在 PHA 驯化积累过程中的作用，达到微生物种类之间的平衡；探索废水中的各种碳源最佳比例，使之得到充分利用；获取可靠微生物和有效碳源以后，再进行条件优化，可最大限度提高微生物 PHA 含量，减少细胞 PHA 提取成本，以实现利用混合菌合成 PHA 的产业化，提高它作为一种环保材料的应用价值。

## 参考文献：

- [1] 尚贵才,周彦豪,胡丽萍,等. 降解塑料的现状、问题与发展趋势[J]. 广东工业大学学报,2002,19(1):85-89.  
Shang G C, Zhou Y H, Hu L P, et al. Current situation, problems and developing trends of degradable plastics[J]. Journal of Guangdong University of Technology, 2002, 19 (1):85-89.
- [2] Wang Y J, Hua F L, Tsang Y F, et al. Synthesis of PHAs from waster under various C: N ratios [J]. Bioresource Technology, 2007,98(8): 1690-1693.
- [3] Hu W F, Wang Y J, Hua F L, et al. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from activated sludge under various oxidation-reduction potentials [J]. Annals of Microbiology, 2006,56(3), 257-260.
- [4] 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.  
Chen Z Q, Tian T, Wen Q X, et al. Impact of nitrogen limitation and phosphorus limitation on PHA synthesis by activated sludge[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2010,4(4):771-775.
- [5] Ruan L, Wang Y J, Lam W, et al. Microcalorimetric research on recombinant *Escherichia Coli* with high production of polyhydroxyalkanoates(PHAs) [J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2007, 89(3), 953-956.
- [6] 吴海云. 食品废弃物和剩余污泥联合发酵产酸耦合活性污泥合成聚羟基烷酸酯的研究[D]. 杭州:浙江大学环境与资源学院,2010
- [7] 张超,陈银广,刘燕. 不同丙酸/乙酸长期驯化的活性污泥对 EBPR 的影响[J]. 环境科学,2008,29(9):2548-2552.  
Zhang C, Chen Y G, Liu Y. Effect of different ratios of propionic to acetic acids on long-term cultured active sludge for enhanced biological phosphorus removal[J]. Environmental Science, 2008,29(9):2548-2552.
- [8] 马民. 丙酸/乙酸比例及 pH 对聚糖菌富集系统的影响[D]. 上海:同济大学环境学院,2006.
- [9] Wang Y J, Ruan L F, Lo W H, et al. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* for production of polyhydroxyalcanoates [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006,132 (1-3):1015-1022.
- [10] 陈志强,李云蓓,温沁雪. 利用丁酸合成 PHA 高效菌株的筛选及摇瓶发酵特性研究[J]. 环境科学,2010, 31(3):828-832  
Chen Z Q, Li Y B, Wen Q X. Isolation of a PHA producing strain with Butyric acid as the carbon source and its shaking-flask fermentation character [J]. Environmental Science, 2010,31(3):828-832.
- [11] 李晓雁,黄海东,卢显芝,等. 活性污泥中 PHA 合成优势菌的筛选及产物结构分析[J]. 环境科学与技术, 2009,32(9):124-128  
Li X Y, Huang H D, Lu X Z, et al. Screening of dominant bacteria for PHA accumulation in activated sludge and structure analysis of its product [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(9): 124-128.
- [12] 陈红,黄皓,李小玲,等. 活性污泥合成 PHA 及其对磁场的响应研究[J]. 浙江大学学报:自然科学报,2009, 36(2):199-203.  
Chen H, Huang H, Li X L, et al. Investigation on PHA synthesis by activated sludge and the synthesis response to magnetic field[J]. Journal of Zhejiang University:Nature Science Edition,2009, 36(2):199-203.
- [13] 张琦,高大文,陶彧. 用于合成 PHA 活性污泥的驯化培养[J]. 哈尔滨工业大学学报,2012,44(4):58-62.  
Zhang Q, Gao D W, Tao Y. Enhanced acclimating strategies for polyhydroxyalkanoate-production conventional activated sludge[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2012,44(4):58-62.
- [14] 许振岗. 稳恒磁场对活性污泥合成聚羟基烷酸酯的影响研究[D]. 杭州:浙江大学环境与资源学院,2010.
- [15] 陈玮,陈志强,温沁雪,等. COD 浓度对活性污泥合成聚羟基烷酸酯的影响[J]. 中国给水排水,2010, 26 (21):148-151.  
Chen W, Chen Z Q, Wen Q X, et al. Effect of COD concentration on synthesis of polyhydroxyalkanoates by activated sludge [J]. China Water & Wastewater, 2010, 26 (21):148-151.
- [16] 黄惠珺,王淑莹,王中玮,等. 不同碳源类型对活性污泥 PHA 贮存及转化的影响[J]. 化工学报,2010,61 (6):1510-1515.  
Huang H J, Wang S Y, Wang Z W, et al. Effect of various types of carbon source on biochemical storage and substrate transformat ion of activated sludge[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2010,61 (6):1510-1515.
- [17] 李金娟,赵林,谭欣,等. 利用淀粉酸化废水驯化活性污泥合成聚-β-羟基脂肪酸酯及其表征[J]. 化工进展, 2011,30(7):1618-1622.  
Li J J, Zhao L, Tan X, et al. Synthesis and characterization of PHA produced by acclimated activated sludge from a-

- cidified starchy wastewater [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2011, 30(7): 1618-1622.
- [18] 方芳, 鲍晓静, 操家顺. 溶解氧对活性污泥胞内贮存物和除磷性能的影响[J]. 环境工程, 2012, 30(6): 8-11.  
Fang F, Bao X J, Cao J S. Influence of dissolved oxygen on storage formation and phosphorus removal in activated sludge[J]. Environmental Engineering, 2012, 30(6): 8-11.
- [19] 蔡萌萌, 蔡宏, 单界, 等. 活性污泥合成聚羟基烷酸酯中单体组分的调控[J]. 化工学报, 2007, 58(10): 2427-2431.  
Cai M M, Cai H, Shan Y, et al. Process regulation for monomer composition of polyhydroxyalkanoates produced by activated sludge[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 58(10): 2427-2431.
- [20] Dai Y, Yuan Z, Jack K. Production of targeted poly (3-hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 129: 489-497
- [21] Bengtsson S, Pisco A R, Werker A. Polyhydroxyalkanoates production from molasses by glycogen accumulating organisms[C]// Proceedings of 4th IWA Specialised Conference on Sequencing Batch Reactor Technology (SBR4), Rome, Italy:[ s. n. ], 2008.
- [22] 刘立凡, 梅胜, 郭晶, 等. 利用糖蜜废液培养微生物絮凝剂[J]. 广东工业大学学报, 2008, 25(2): 13-16.  
Liu L F, Mei S, Guo J, et al. On the production of a bio-flocculant using molasses[J]. Journal of Guangdong University of Technology, 2008, 25(2): 13-16.
- [23] Pisco A R, Bengtsson S, Werker A, et al. Use of industrial by-products for polyhydroxyalkanoates production by glycogen-accumulating organisms[C]// Proceedings of the 5th IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Technologies. [ S. l. ], 2008, 1-4.
- [24] Albuquerque M G E, Eiroa M, Torres C, et al. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 130: 411-421.
- [25] Din M F, Ujang Z, van Loosdrecht M C. Optimization of nitrogen and phosphorus limitation for better biodegradable plastic production and organic removal using single fed-batch mixed cultures and renewable resources[J]. Water Science and Technology, 2006, 53(6): 15-20.
- [26] Liu H Y, Hall P V, Darby J L, et al. Production of polyhydroxyalkanoate during treatment of tomato cannery wastewater[J]. Water Environment Research, 2008, 80(4): 367-372.
- [27] Bengtsson S, Werker A, Christensson M, et al. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(3): 519-526.
- [28] Mato T, Ben M, Kennes C, PHA production using brewery wastewater[C]// Proceedings of 4th IWA Specialised Conference on Sequencing Batch Reactor Technology (SBR4). Rome, Italy:[ s. n. ], 2008.
- [29] Lemos P C, Levantesi C, Serafim L S. Microbial characterisation of polyhydroxyalkanoates storing populations selected under different operating conditions using a cell-sorting RT-PCR approach[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008(2), 78: 351-360.
- [30] Carvalho G, Oehmen A, Albuquerque G. E. et al. The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses [J]. New Biotechnol, 2015, 31(4): 257-263.
- [31] Venkata S, Reddy M V. Optimization of critical factors to enhance polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by mixed culture using Taguchi design of experimental methodology [J]. Bioresource Technology, 2013, 128: 409-416.
- [32] Bengtsson S, Werker A, Welander T. Production of polyhydroxyalkanoates by glycogen accumulating organisms treating a paper mill wastewater[C]// Proceedings of 4th IWA Specialised Conference on Sequencing Batch Reactor Technology (SBR4). Rome, Italy:[ s. n. ], 2008.
- [33] Dionisi D, Majone M, Levantesi C, Effect of feed length on settleability, substrate uptake and storage in a sequencing batch reactor treating an industrial wastewater [J]. Environmental Technology, 2006, 27(8): 901-908.
- [34] Dias J M L, Serafim L S, Lemos P C, Mathematical modelling of a mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 92(2): 209-222.
- [35] Moita R, Ortigueira J, Freches A, et al. Bio-oil upgrading strategies to improve PHA production from selected aerobic mixed cultures[J]. New Biotechnol, 2014, 31(4): 297-367.
- [36] Serafim L S, Lemos P C, Oliveira R F, Optimisation of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 87(2): 145-160.
- [37] Dionisi D, Majone M, Vallini G. Effect of applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 93(1): 76-88.