

活性污泥积累 PHB (Poly- β -hydroxybutyrate) 及其菌群多样性分析

王海飙 邢文慧 刘长莉* 周玥 刘思睿 孙明慧 刘欣 赵敏

(东北林业大学 生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 【目的】通过调整活性污泥在驯化过程中碳、氮、磷比例以及供氧模式, 以提高其积累 PHB 的能力。应用 PCR-DGGE 定期对驯化期间菌群动态进行分析。【方法】以乙酸钠为碳源, 在 SBR (Sequencing batch reactor) 内以厌氧/好氧 (A/O) 交替的驯化模式, 逐级提高碳源浓度, 限制氮源浓度, 人为创造营养不均衡条件来逐步提高活性污泥积累 PHB 的能力。【结果】当碳浓度逐步提高, COD 升高至 1 200 mg/L, COD/N/P 为 1 200/9.6/30 时, 活性污泥中 PHB 积累量达到最大, 占细胞干重的 64.2%。【结论】驯化过程中逐步提高 COD 负荷, 并增加 COD/N 的值有利于 PHB 积累, 利用苏丹黑和 Albert 法染色显示菌群内产 PHB 菌占很大比例, 透射电镜显示菌体胞内含有大量白色 PHB 颗粒。经 DGGE 菌群动态分析, 发现驯化过程中菌群种类出现较为明显的演替, 而在一个反应周期(6 h) 内菌种数量也有一定改变。驯化获得的高产 PHB 的菌群中含 *Acinetobacter*、*Bacillus*、*Bacteroidetes*、*Chryseobacteria* 及 *proteobacteria* 等 5 个属的微生物, 菌群多样性较为丰富。

关键词: 活性污泥, PHB, 菌群多样性, PCR-DGGE

基金项目: 国家自然科学基金理科基地项目(No. J1210053); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(No. DL12CA06); 哈尔滨市科技创新人才基金(No. 2011RFQXN061); 东北林业大学本科创新项目(No. 201210225023)

*通讯作者: Tel: 86-451-82192073; 信箱: liuchangli08@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-11-29; 接受日期: 2013-02-04

The community diversity of activated sludge accumulation PHB (poly- β -hydroxybutyrate)

WANG Hai-Biao XING Wen-Hui LIU Chang-Li* ZHOU Yue
LIU Si-Rui SUN Ming-Hui LIU Xin ZHAO Min

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

Abstract: [Objective] By adjusting carbon, nitrogen and phosphorus ratio and domestication model, to improve the ability of active sludge synthesis PHB. PCR-DGGE technology was used to study microbial diversity of domesticated flora. **[Methods]** In A/O alternate cycle SBR, we used sodium acetate as substrate, gradually improve carbon source concentration and limit concentration of nitrogen source, to create nutrition disequilibrium to gradually improve the content of PHB within activated sludge. **[Results]** When the COD reach 1 200 mg/L and COD/N/P=1 200/9.6/30, activated sludge synthesized PHB concentration reached the maximum of 64.2 wt% of the dry weight of cells. **[Conclusion]** In the process of domesticated sludge accumulation of PHB gradually increased, Sudan black, Albert staining and transmission electron microscopy images results showed improve carbon concentration and limit the concentration of carbon which domestication way promote the activated sludge accumulation PHB. DGGE was periodically used to identify the community diversity during the course of domestication and culture period. The population of the activated sludge was belonged to *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides* sp., *Chryseobacteria* sp. and *Proteobacteria*.

Keywords: Activated sludge, PHB, Community diversity, PCR-DGGE

随着石化能源的枯竭和环境污染的日趋严重, 开发不依赖石油, 环保的新型材料已成为世界各国研究的热点。聚羟基脂肪酸酯(PHA)是微生物合成的一类与石化塑料相似的高分子聚合物, 可生物降解, 又称“绿色塑料”。寻找廉价合成 PHA 的方法是消除“白色污染”, 缓解石化危机和实现“循环经济”的重要举措^[1-3]。对于大规模生产 PHA 来讲, 只有发酵成本足够低, 才有可能进入市场。为了降低生产成本, 世界各国在开发低廉原料上进行了大胆尝试, 以桐油^[4]、产甘油废水^[5]、工农业废物^[6]、废橄榄油^[7]合成 PHA 能达菌体干

重的 30%–77%。

驯化菌群利用剩余污泥合成 PHA 是一种崭新的废物资源化思路。废水经微生物水解和消化后, 含有非常丰富的碳源, 菌群利用的碳源种类也比较丰富, 因而活性污泥合成 PHA 单体具有丰富的多样性^[8], 除 PHB 外, 还有 PHV、3H2MV、3HHx 等^[9], 而 PHB 的产量最大研究也最为广泛。剩余污泥发酵条件易控、能耗低, 将生产成本降至最低有广泛的应用前景, 混合菌群利用废弃污泥生产 PHA 比纯菌发酵更具可操作性。

DGGE 是目前研究微生物群落多样性比较有

效的一种分子生物学技术^[10]。本研究主要利用此技术来监测菌群在不同时期的菌种多样性及其优势菌种的演替。

1 材料与方法

1.1 实验装置

实验采用 SBR 为圆柱状透明有机玻璃反应器,底部泥斗为圆锥形。总容积 15 L,有效容积 13 L,每周期初进为 10 L,周期排水比 10 L。反应器的进水、搅拌、沉淀、排水等操作程序采用全自动仪表控制,人工配水从进水箱采用蠕动泵送入反应器,进水量由液位控制器控制,进水结束后搅拌器开启进行搅拌,转速 300 r/min,此时反应器中的混合液进行厌氧反应;好氧反应以黏砂块作为微孔曝气器,开启曝气器进行好氧反应,控制 DO 为 2 mg/L, A/O 反应器的曝气由空气泵进行,好氧反应结束后沉淀,由出水泵将上清液排出反应器。驯化过程中培养基初始 pH 值在 7.0–7.3 之间,污泥龄控制在 7 d 左右。

1.2 配水和接种污泥

接种的活性污泥取自黑龙江省哈尔滨市文昌污水处理厂二沉池。接种量为 1.5 L。实验配水以乙酸钠为唯一碳源,在污泥活性恢复阶段培养基成分为(mg/L): NaAc 506.25, NH₄Cl 115.56, KH₂PO₄ 65.28, KCl 36, CaCl₂ 14.8, MgSO₄·7H₂O 91.02, 微量元素 1 mL; 微量元素组分(mg/L): EDTA 10 000, ZnSO₄·7H₂O 120, Na₂MoO₄·2H₂O 60, MnCl₂·4H₂O 120, KI 180, CuSO₄·5H₂O 30, H₃BO₃ 150, FeCl₃·6H₂O 1 500。在富集驯化阶段,进水的 COD 从 300 mg/L 开始,营养配比为 COD/N/P=100/10/5,逐渐提高 COD/N 的值进行驯化。富集驯化过程分两个阶段。第一阶段: COD 为 600 mg/L, 营养比例调为 COD/N/P=600/60/15, 20 d 后再继续降低氮含量, 营养比例调为 COD/N/P=600/30/15; 第二阶段, 将 COD 调整到 1 200 mg/L, 营养比例调节为 COD/N/P=

1 200/24/30, 驯化 20 d 后, 营养比例调为 COD/N/P=1 200/9.6/30。

1.3 实验方法

SBR 反应器采用厌氧/好氧(A/O)交替驯化模式。每周期包括 7 min 进水+110 min 厌氧+180 min 好氧+25 min 沉淀+3 min 排水+25 min 闲置。每周期 6 h, 4 周期/日。

1.4 分析检测方法

COD 采用 Lovibond PCSPECTRO COD 测定仪进行测定; 总磷、氨氮和 PHA 分别采用钼锑抗分光光度法、纳氏试剂分光光度法和次氯酸钠法测定^[11]。PHA 依照 Beun^[12]测定方法, 苏丹黑染色及异染颗粒染色^[13]。菌体细胞内成分用透射电镜^[14]观察。菌群总 DNA 用 CTAB 法提取, 采用上海生工合成的细菌 V3 区通用引物 F357GC/R517, 进行 PCR 反应。DGGE 凝胶所用系统是 BIO-RAD 475 型, 采用 Yang 等^[15]方法。电泳结束后, 将凝胶进行银染, 切胶回收的 PCR 产物送生工测序公司进行测序, 序列在 NCBI 基因库中比对, 获得优势种的信息。

2 结果与分析

2.1 活性污泥活性恢复阶段特性

SBR 反应器接种活性污泥后, 按 1.3 所述 A/O 驯化模式, 初期污泥呈黑色, 结构松散, 污泥指数 SVI 为 50 mg/L, 沉降性较好, 说明污泥内含无机物较多, 生物活性较差。驯化 20 d 后, 污泥黑色变浅, 逐渐呈浅褐色, SVI 也上升到 120 mg/L。再驯化 20 d 后, 颜色逐渐趋于黄色, 沉降性能良好, 不同周期 SBR 内污泥生长量也趋于稳定, 说明污泥状态基本稳定。将 COD 调整为 600 mg/L, 培养基营养比例不变, 继续驯化 20 d, 这两阶段的 COD、氮、磷及 PHA 的变化情况, 由图 1A 可知, 在厌氧阶段, COD 含量都有所下降, 但幅度不大, 到好氧段 COD 才有大幅度下降, 而

且第 60 天的 COD 由 589 mg/L 降至 48 mg/L, 菌群的氧化能力很强。图 1B 可知, 氮的浓度从始至终持续下降, 说明污泥稳定的生长和繁殖, 除氮能力也较强。由图 1C、D 可知, 磷及 PHA 的变化均呈单峰曲线, 在厌氧阶段都呈上升趋势, 好氧阶段呈下降趋势。由峰的高度可知上升的幅度不大, 第 60 天厌氧阶段 PHA 含量从 11.2% 上升至 13.8%。可见此时该菌好氧时期的聚磷能力并不是很强, 因此需改变驯化方案来提高菌群内产 PHA 的菌群活性。

2.2 活性污泥内 PAOs 富集阶段特性

在富集阶段, 采用逐步提高碳浓度同时限制氮浓度的方式来提高 PHA 含量。由图 2A 可知, 随着 COD 浓度的提高, 菌群 COD 去除率也不断上升, 好氧结束 COD 浓度都能够降至 0。由图 2B 可知, 氮浓度持续下降, 符合正常变化规律。由

图 2C、D 可见, 磷和 PHA 浓度都随着 COD/N 变化而有了很大变化, 当 COD/N 为 10 时, 释磷率为 26%, 当 COD/N 提高至 125 时, 释磷率达到 51%, 除磷率上升至 86%, PHA 的含量也由菌体干重的 18% 上升至 64.2%。由此说明, 逐步提高 COD/N 的值有利于 PHA 的积累, 很多研究都表明碳源与氮源的种类和浓度对 PHA 合成有重要影响, 适当提高碳氮比有利于 PHA 的积累与合成^[17]。

2.3 积累 PHA 污泥的染色和透射电镜观察

许多研究表明合成 PHA 的菌群能够积累大量多聚磷酸盐(Poly-phosphate, Poly-p)和 PHA。且 PHA 和 Poly-p 作为胞内产物在合成 PHA 过程中起着重要作用。当 COD 上升至 1 200 mg/L, 分别取厌氧末和好氧末的活性污泥, 进行类脂粒(PHA)和异染粒(Poly-p)染色, 并通过光学显微镜

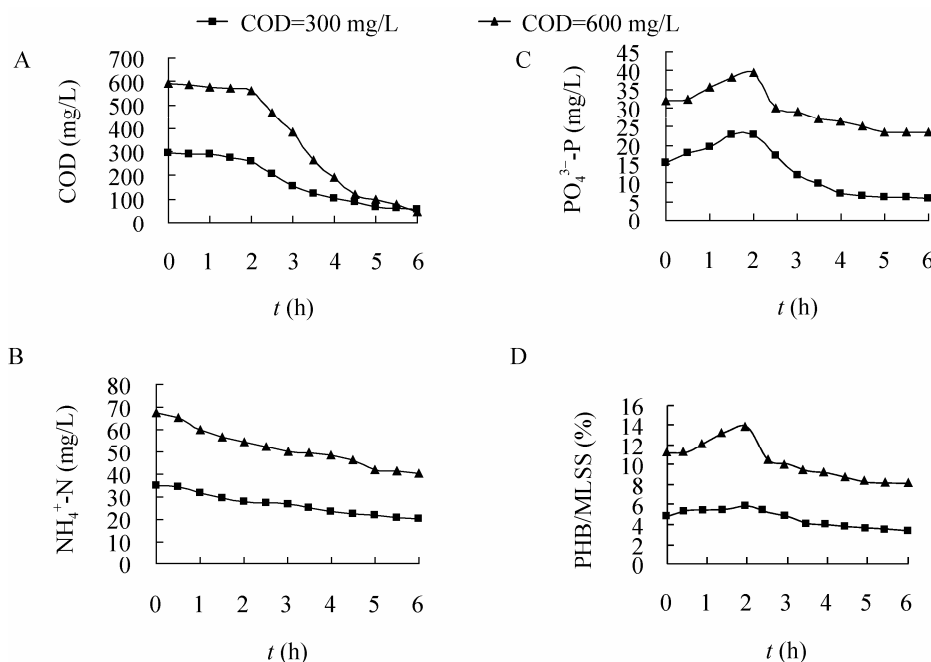


图 1 活性恢复阶段一个周期内 COD、N、P 及 PHA 的变化情况

Fig. 1 Dynamic changes of phosphorus, nitrogen and COD in period of activated sludge recover stage

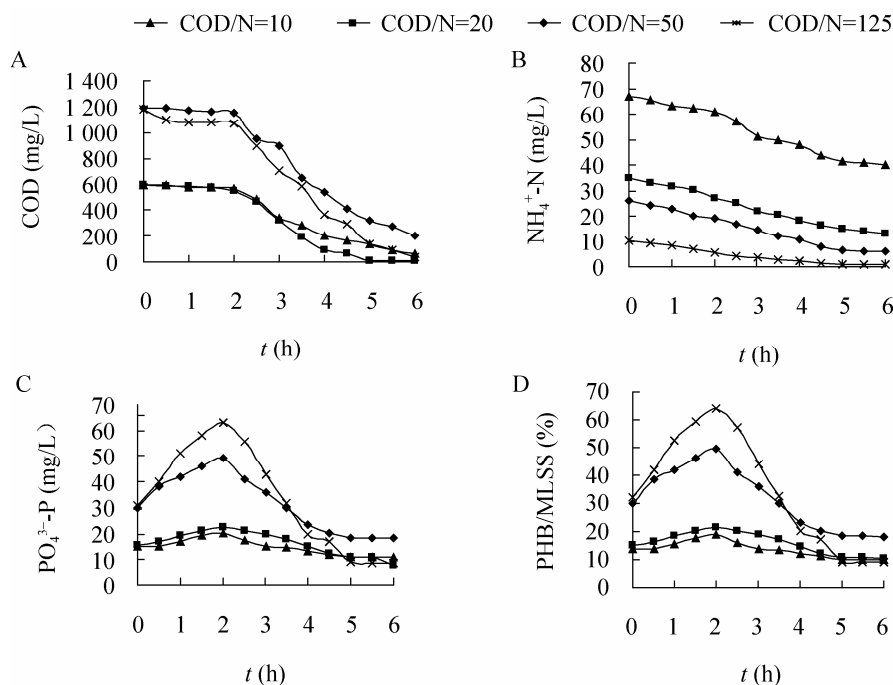


图2 不同 COD/N 条件下 COD、N、P 及 PHA 动态变化

Fig. 2 Dynamic changes of COD, phosphorus, nitrogen and PHA in different COD/N ration

(1 000×)观察。厌氧结束期 PHA 含量最高,用苏丹黑对菌体进行染色,图 3A 所示菌体内 PHA 颗粒被染成黑色导致整个菌体呈黑色,而菌体其他部分呈紫色,单从染色角度来看,菌群中含 PHA 菌在整个菌群中占较大比例;好氧末期聚磷颗粒含量最高,用 Albert 对菌体内聚磷颗粒进行染色,图 3B 中聚磷颗粒呈深蓝色,菌体其它部分呈淡蓝色。通过两种染色说明菌群内合成 PHA 菌占很大比例。图 3C 透射电镜表明,合成 PHA 的菌分为球形和杆形两种,膜内白色大小和形状不均一的颗粒状物质即为 PHA 颗粒,从整体来看,大部分菌体内都含有 PHA 颗粒,活性污泥的菌群中含 PHA 的菌占很大比例。在细胞外围,菌体的外侧也有一些白色物质,这可能是在好氧阶段 PHA 被代谢到体外的一种形式。

2.4 不同驯化阶段污泥内菌群多样性分析

在驯化过程中分别取 COD 为 0、300、600 及 1 200 mg/L 阶段的菌群(表 1),菌群对应

DGGE 图谱(图 4)中 F1、F2、F3、F4 泳道。由图 4 可见,F1 泳道内条带多且颜色浅淡,F1 是从污水处理厂取来的活性污泥样品,此时微生物尚未进行系统驯化,因而菌群内菌种组成数量多、种类繁杂;F2 与 F3 两泳道内条带数量和颜色深浅变化不大,说明菌群在 COD=300 mg/L 和 600 mg/L 时期菌种动态变化不大,分别出现 *Bacteroidetes*、*Acinetobacter baumannii*、*Beta-proteobacterium*、*Arcobacter*、*Bacillus* 等主要类群的微生物,虽然 *Bacteroidetes bacterium*、*Chryseobacterium* 也出现,但颜色较浅说明这两类菌的数量不多;当 COD 上升至 1 200 mg/L, COD/N 值由最初的 10 上升至 125 时条带发生很大变化,从图 4 中 F3 与 F4 泳道内的条带变化可知, *Arcobacter* sp. 的 1 株菌和 *Bacillus* 的 2 株菌都消失, *Bacteroidetes* 属菌株逐渐减少,却出现了 PHA-1、PHA-2、PHA-6、PHA-9 和 PHA-10 五个条带,其中有 4 株对应 *Acinetobacter* 属菌和

1 株 *Bacillus* 属的微生物。结合 COD/N/P=1 200/9.6/30 阶段活性污泥内合成 PHA 能力迅速增加, 与此阶段新增加的 4 株不动杆菌属 *Acinetobacter* 菌株说明, *Acinetobacter* 微生物对于菌群合成 PHA 起到重要作用。很多研究表明^[17-19], 不动杆菌属微生物具有高效合成 PHA

的能力。在 F4 泳道中后出现的菌中还有 1 株 *Bacillus* 属微生物, Patel 等^[20]研究表明 *Bacillus* 属纯菌株具有高效合成氢和 PHA 的能力, 通过 DGGE 测序结果说明在此菌群中含有很多合成 PHA 的菌株, 这也是驯化后期活性污泥具备高效积累 PHA 的原因。

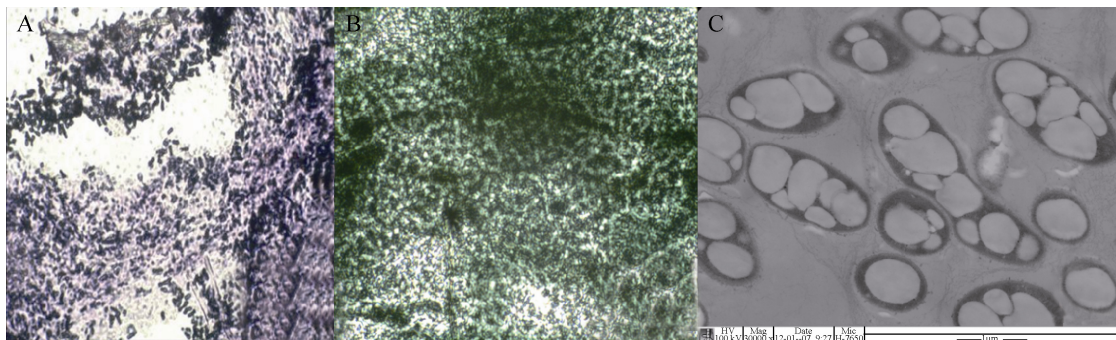


图3 菌群苏丹黑、Albert 染色及透射电镜照片

Fig. 3 Stained by Sudan black, Albert and TEM micrograph of cultivation of activated sludge

注: A: 苏丹黑染色, 黑色颗粒是含有 PHA 的菌体, 而菌体其他部分呈紫色; B: Albert 染色, Albert 对聚磷颗粒染色后呈深蓝色, 菌体其它部分呈淡蓝色; C: 透射电镜(30 000 \times).

Note: A: Stained by Sudan black used for identify the PHA, black particle was PHA granule stained by Sudan black, red indicate thallus or no PHA part; B: Stained by Albert for identify the Poly-phosphate; C: TEM micrograph (30 000 \times).

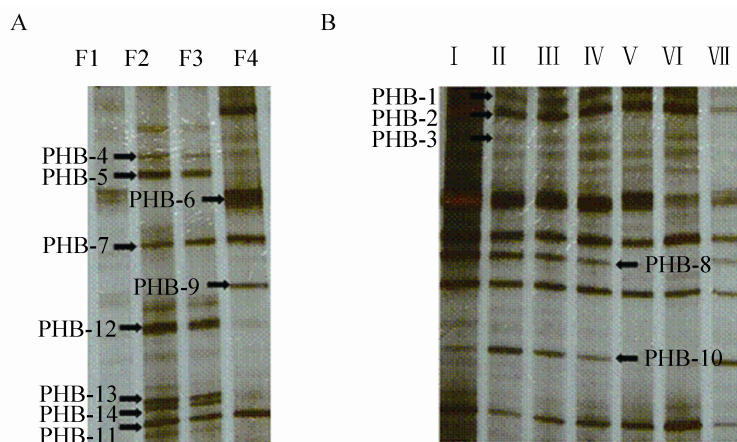


图4 活性污泥不同时期 DGGE 图谱

Fig. 4 DGGE dynamic changes of activated sludge in different stage

注: A: 驯化不同时期取活性污泥, F1、F2、F3 和 F4 分别代表活性污泥为原泥、COD 300、600、1 200 mg/L; B: 样品取自活性污泥中含有较多 PHA 的时期, 取样阶段 PHB 含量约为 64.2%。I、II、III、IV、V、VI、VII 分别代表接种 0、1、2、3、4、5、6 h 取的活性污泥; PHA-1-14 是 DGGE 泳道上较为清晰明显的条带切胶测序的序号。

Note: A: Sample came from the activated sludge of tamed period, the lane of F1, F2, F3, F4 corresponding to original activated sludge, COD 300, 600 and 1 200 mg/L; B: Sample came from activated sludge contain rich PHA synthesis bacterial which product PHB about 64.2%; The lanes of I, II, III, IV, V, VI, VII indicated of the 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 hours after inoculated. The positions of obvious bands discussed in the text are indicated by letters from PHA-1 to PHA-14.

表 1 图 4 中各种菌的基本信息
Table 1 The bacteria basic information of Fig. 4

条带编号 Bands No.	相似菌株(登录号) Similar strains (accession No.)	相似性 Identity (%)
PHB-1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain SP17 (JN409466)	98
PHB-2	<i>Acinetobacter</i> sp. 3003 (JX566580)	97
PHB-3	<i>Bacteroidetes bacterium</i> RBE2CD-54 (EF111232)	97
PHB-4	<i>Chryseobacterium</i> sp. HME7570 (JQ420023)	99
PHB-5	Uncultured <i>Bacteroidetes bacterium</i> clone B3-53 (JN371416)	99
PHB-6	<i>Acinetobacter</i> sp. Zh1-5 (HF536522)	99
PHB-7	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain A3-e (JN393311)	98
PHB-8	<i>Acinetobacter</i> sp. EK-I87 (GU935322)	84
PHB-9	<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain TAN118 (JQ973774)	99
PHB-10	<i>Bacillus</i> sp. T5-12 (GU294129)	100
PHB-11	<i>Beta-proteobacterium</i> (AJ001325)	97
PHB-12	Uncultured <i>Arcobacter</i> sp. isolate (HQ332396)	100
PHB-13	<i>Bacillus</i> sp. IWF4 (GU120651)	94
PHB-14	<i>Bacillus</i> sp. CE2 (JQ435699)	97

3 结论

(1) 在污泥的活性恢复阶段, 需要调整培养基内 COD、N、P 比例, 尤其在厌氧-好氧交替条件下逐步限制氮浓度提高碳源浓度的方式, 营造不均衡的营养条件可获得高产 PHA 的菌群。经实验证明 COD/N/P=1 200/9.6/30 更有利于 PHA 的合成, 合成 PHA 的最高含量达菌体干重的 64.2%。

(2) 用苏丹黑对类脂粒染色, Albert 法对聚磷颗粒染色的结果表明, 菌体在厌氧末期含丰富类脂颗粒, 好氧末期含较多聚磷颗粒。透射电镜观察到菌体内部积累大量的 PHA 颗粒。

(3) 经 DGGE 切胶测序比对发现, 此菌群之所以具备高效合成 PHA 能力, 很可能与 *Acinetobacter* 和 *Bacillus* 属的微生物存在有关。

参 考 文 献

[1] Liu Q, Ouyang SP, Kim J, et al. The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by

recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2007(132): 273–279.
[2] Santos AF, Polese L, Crespi MS, et al. Kinetic model of poly(3-hydroxybutyrate) thermal degradation from experimental non-isothermal data[J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2009, 96(1): 287–291.
[3] Lee SH, Kim JH, Mishra D, et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by activated sludge enriched under periodic feeding with nonanoic acid[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 6159–6166.
[4] Hafuka A, Sakaida K, Satoh H, et al. Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3551–3553.
[5] Dobroth ZT, Hu SJ, Coats ER, et al. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3352–3359.
[6] Shivakumar S. Polyhydroxybutyrate (PHB) production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077[J].

- International Journal of ChemTech Research, 2012, 4(3): 1158–1162.
- [7] Beccari M, Bertin L, Dionisi D, et al. Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2009, 84(6): 901–908.
- [8] Liu ZG, Wang YP, He Ning, et al. Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by excess activated sludge and microbial community analysis[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 185(1): 8–16.
- [9] Bengtsson S, Pisco AR, Johansson P. et al. Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 147(3/4): 172–179.
- [10] Liu YQ, Kong YH, Tay JH, et al. Enhancement of start-up of pilot-scale granular SBR fed with real wastewater[J]. Separation and Purification Technology, 2011, 82: 190–196.
- [11] 黄皓. 活性污泥合成聚羟基烷酯的条件优化[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2008.
- [12] Beun JJ, Paletta F, Van L, et al. Stoichiometry and kinetics of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2000, 67(4): 379–389.
- [13] Chen BY, Shiao TJ, Wei YH, et al. Feasibility study of polyhydroxyalkanoate production for materials recycling using naturally occurring pollutant degraders[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2012, 43(3): 455–458.
- [14] Breuer U, Terentiev Y, Kunze G, et al. Yeasts as producers of polyhydroxyalkanoates: genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Macromol Biosci, 2002, 2(8): 380–386.
- [15] Yang HY, Wu H, Wang XF, et al. Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3546–3550.
- [16] Fang F, Liu XW, Xu J, et al. Formation of aerobic granules and their PHB production at various substrate and ammonium concentrations[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(1): 59–63.
- [17] Hori K, Kobayashi A, Ikeda H, et al. *Rhodococcus aetherivorans* IAR1, a new bacterial strain synthesizing poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from toluene[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 107(2): 145–150.
- [18] Dalal J, Sarma PM, Lavana M, et al. Evaluation of bacterial strains isolated from oil-contaminated soil for production of polyhydroxyalkanoic acids (PHA)[J]. Pedobiologia, 2010, 54(1): 25–30.
- [19] Gong YH, Li MS, Xu Dong, et al. Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of Cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(4): 1235–1246.
- [20] Patel SKS, Singh M, Kumar P, et al. Exploitation of defined bacterial cultures for production of hydrogen and polyhydroxybutyrate from pea-shells[J]. Biomass and Bioenergy, 2012(36): 218–225.