

丘成桐生物奖

参赛队员姓名： 陈佳妮

中学： 清华大学附属中学

省份： 北京市

国家/地区： 中国 / 北京市

指导教师姓名： 吴琼、梁姝颀

论文题目： 变废为宝：利用活性污泥生产生物可降解塑料 PHB

创新性声明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人或本团队已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛团队签名：

吴博 姚志昊 邱 梁妹娟
陈佳妮 旭

日期：2017年9月15日

论文题目:

变废为宝: 利用活性污泥生产生物可降解塑料 PHB

作者:

陈佳妮

论文摘要:

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，获得可以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。下一步，可通过在 *Halomonas* CJN 中构建附加 PHB 合成路径，尝试完全用污泥热裂解液来高效生产 PHB。粗略估计 PHB 的制造成本从 30000 元/吨下降到 20000 元/吨，实现了污泥资源化，变废为宝。

关键词:

活性污泥；聚羟基脂肪酸酯；聚-3-羟基丁酸；PHB；降低成本；污泥资源化

Title:

From Waste to Treasure: Turning Activated Sludge into Bioplastic PHB

Author:

Chen Jiani

Abstract:

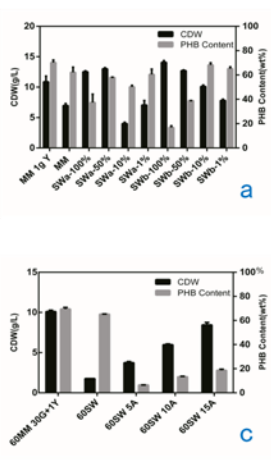
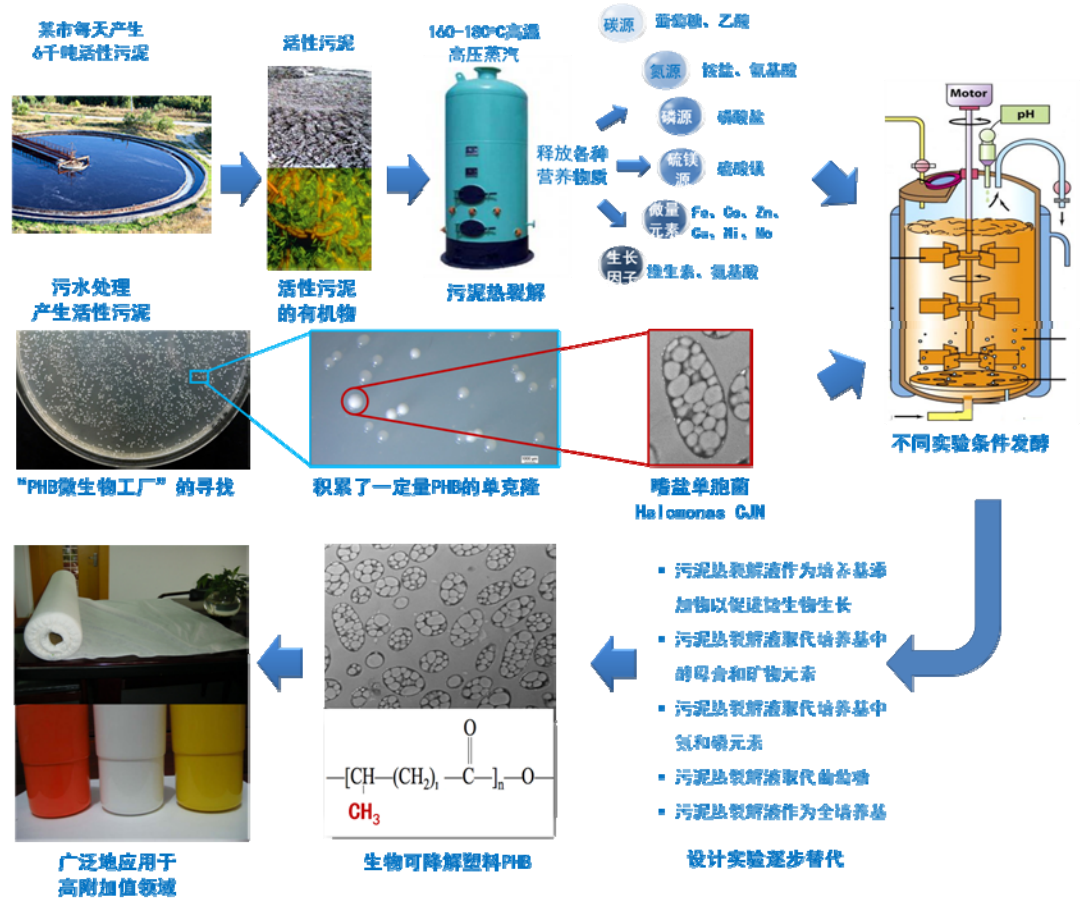
Activated sludge is generated from wastewater treatment processes in large quantity yet without an appropriate deposition way. High temperature can lyze the activate sludge so that nitrogen and phosphorus containing nutrients are released. *Halomonas* CJN was found be able to grow on the heat lyzed activated sludge and glucose for production of bioplastic 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 lyzed 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 the *Halomonas* CJN, we will be able to produce PHB entirely from heat lyzed 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 ; Poly-3-hydroxybutyrate; PHB; cost reduction; sludge resources

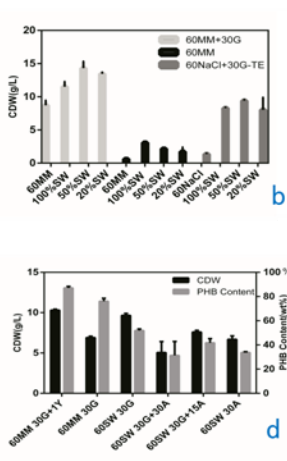
图像摘要

变废为宝：利用活性污泥生产生物塑料PHB



实验结论

- 污泥热裂解液可以作为培养基添加物进行添加
- 污泥热裂解液可以取代微生物培养基中的酵母膏、氮磷源和矿物元素
- 污泥热裂解液厌氧发酵产生的乙酸可以直接被嗜盐单胞菌用来生长, 但乙酸转化为PHB的转化率不如葡萄糖高
- 乙酸和葡萄糖混合转化为PHB的转化率不如葡萄糖单独加入转化率高



活性污泥热裂解液作为培养基培养PHB生产菌嗜盐单胞菌Halomonas C.J.N的研究

本研究发现可以利用“微生物工厂” Halomonas C.J.N变废为宝, 使活性污泥成为资源来生产生物可降解塑料PHB。该方法兼具创新性、实用性和经济性。

目录

| | |
|---|----|
| 1. 研究背景、目的和意义..... | 1 |
| 2. 科学研究方法及研究思路..... | 3 |
| 2.1 科学研究方法..... | 3 |
| 2.2 培养基及培养方法..... | 3 |
| 2.3 分析方法-通过细胞干重和 PHB 含量分析来确定实验效果..... | 4 |
| 2.4 研究的基本思路和过程..... | 5 |
| 2.5 让活性污泥能够被“微生物工厂”利用-污泥热裂解..... | 6 |
| 2.6 “微生物工厂”的寻找-菌株筛选..... | 7 |
| 3. 研究结果与分析..... | 9 |
| 3.1 污泥热裂解后, 上清液中氮磷元素及有机酸含量大幅提高..... | 9 |
| 3.2 污泥热裂解的上清液可以作为微生物培养基添加成份..... | 9 |
| 3.3 探索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 <i>Halomonas</i> CJN 生产 PHB..... | 13 |
| 4. 总结及下一步设想..... | 15 |
| 5. 参考文献..... | 17 |
| 6. 致谢..... | 18 |
| 团队成员简历..... | 18 |
| 指导老师简历..... | 19 |

论文正文:

1. 研究背景、目的和意义

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 年某市废水排放量约为 15 亿立方米, 日废水排放量为 426 万吨。2016 年该市日废水排放量增加到 600 万吨, 3 年内增加了 40% (《2013 及 2016 年某市统计年鉴》), 每天需要处理大量的废水, 而且废水量增长迅猛, 如果不能找到环境友好的处理方法, 将给社会带来沉重的负担。

污泥是污水处理的产物。伴随着污水量的逐年迅猛增长, 相应的污泥产量也快速增加。一般来说, 如果一座污水处理厂日污水处理量为 10 万吨, 则会产生 100 吨的湿污泥 (《2013 及 2016 年某市统计年鉴》)。该市 2013 年日产污泥 4260 吨, 2016 日产污泥已增加到 6000 吨。国内外研究经验显示, 活性污泥处理成本占污水处理总成本的一半以上, 目前主要通过焚烧、填埋、厌氧消化处理, 在高成本处理的同时还不可避免地对环境产生危害。如何将污泥资源化是保护环境和实现可持续发展的重要课题。

污泥主要是由微生物组成, 可以通过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, 这些营养物可以被微生物 (细菌) 再利用来生长。如果能用这些污泥裂解营养物来发酵培养微生物, 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 (Nghiem et al 2017; Tyagi and Lo 2013)。

目前, 同类的污泥处理研究, 主要是利用这些污泥裂解营养物来发酵生产沼气 (Tyagi and Lo 2013; Feng et al 2015)。由于经济性不佳的原因, 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裂解的营养物来制造?

另一方面, 许多微生物被发现能够生产一些类似塑料、结构多样的细胞内物质, 称为“聚羟基脂肪酸酯 (英文为 polyhydroxyalkanoates, 简称 PHA)” (图 1) (Chen 2009)。PHA 现在被称为生物塑料, 因为它来源于生物, 所以可以被无处不在的微生物作为食物吃掉而消耗 (称为生物可降解性)。人们一直在努力把

PHA 作为环境友好的生物塑料来取代不可降解的石油塑料，如：聚乙烯 PE 和聚丙烯 PP 等，以减少塑料污染（也称为白色污染）。同时，PHA 具有生物相容性，也可广泛地应用于医学，如：骨钉、骨棒、人工血管、心脏支架、心脏瓣膜，脊椎骨等高附加值领域。

但是，由于培养生产 PHA 的细菌需要生长在昂贵的食物，如：淀粉、氨基酸和维生素等营养源中，导致 PHA 生产成本很高，虽然生产工艺方面的技术已经得到突破，但由于制造原料成本过高的原因，至今未能被市场广泛应用，无法完成取代石油塑料的使命，更无法实现环保的理想（Wang et al 2014）。

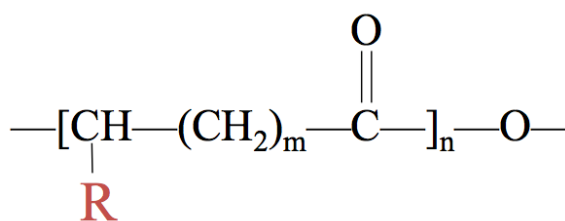
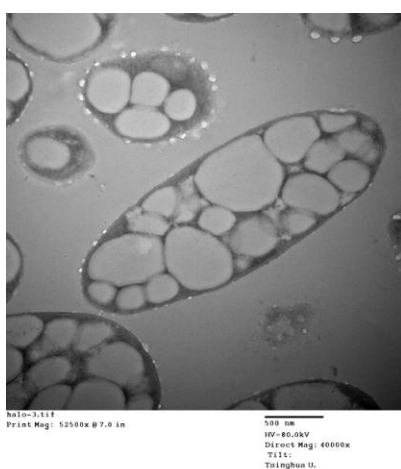


图 1. 细菌大量积累 PHA 生物塑料成为细胞内含体（左图）其分子结构如图（右图）由于 R 的变化，PHA 结构多样，其中聚-3-羟基丁酸酯（Poly-3-hydroxybutyrate, 简称 PHB, R 为甲基）是最有代表性的 PHA，是模式 PHA。本文以 PHB 作为代表研究生物塑料。

是否能够在廉价的活性污泥与昂贵的 PHB 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要素。如果能作为营养源来培养微生物（细菌）生产 PHB，则在很大程度上解决了利用昂贵的食品原料来制造生物塑料的问题，有可能降低 PHB 的制造成本，从而提高其经济性。

此前的有不少研究采用混合菌种生产 PHB，由于混合微生物菌群难以进行生长优化，造成细胞密度低，PHB 产率很低，可操作性不强（Lam et al 2017）。

本研究目的在于：寻找合格的单一“微生物工厂”（菌株），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 的可能性，并摸索其最

佳的生产条件。在保证足够细菌生长的基础上, 提高细菌含 PHB 的百分比, 实现污泥资源化及 PHB 生产效益最大化。

本研究的意义在于: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更经济实用的原料。这将从根本上减少白色污染, 为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。

另外, 污泥的资源化为将来生物技术的大规模推广提供了切实可行的思路, 用生物方法替代化工方法生产各类产品, 包括: 原材料、日用燃料和化学品等, 这将会改变整个生物产业的格局。

2. 科学研究方法及研究思路

2.1 科学研究方法

本研究采用单一菌种、逐个单一变量研究、设置对照实验、平行实验、活性污泥浓度梯度等科学方法, 通过简单的高温 (160—180°C) 处理, 来寻找活性污泥热裂解后, 破碎细胞所释放的各种成份对于微生物生长和 PHB 合成的影响。

2.2 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简称为 60LB, 含 60 g/L NaCl, 5 g/L 酵母提取物和 10 g/L 胰蛋白胨。摇瓶发酵培养基 (对照组) 为矿物盐 (化肥) 培养基 (MM), 由 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.02% MgSO₄, 1.0% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.15% KH₂PO₄, 以及 1 g/L 酵母提取物和 30 g/L 葡萄糖组成 (矿物盐培养基, 简称 MM 培养基)。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 毫升摇瓶), 37°C, 200 rpm 培养 48 h。然后摇床 200 转/分培养微生物 (图 2), 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 的细胞内含量。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。



图 2 液体培养基及摇瓶培养的摇床实验

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 毫升摇瓶），37℃，200 rpm，摇床 200 转/分培养 48 h。

2.3 分析方法-通过细胞干重和 PHB 含量分析来确定实验效果

为了验证“微生物工厂”*Halomonas* CJN 将活性污泥转化成 PHB 的能力，选取两个重要指标：细胞干重和 PHB 含量进行分析，确定实验效果。细胞干重代表细胞的生长状况，而 PHB 含量则表明细胞合成生物塑料的能力。通过这两个指标，可以判定该细胞在特定的培养条件下是否能高效生产 PHB。

细胞干重分析：培养结束后，将菌液以 10000 rpm 离心 10 min，收集菌体。随后，用去离子水洗涤一次，并再次离心收集细胞沉淀。将得到的细胞沉淀置于 -80℃ 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）（Li et al 2010）。

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℃ 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（图 3）。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 (Braunegg et al 1978)。

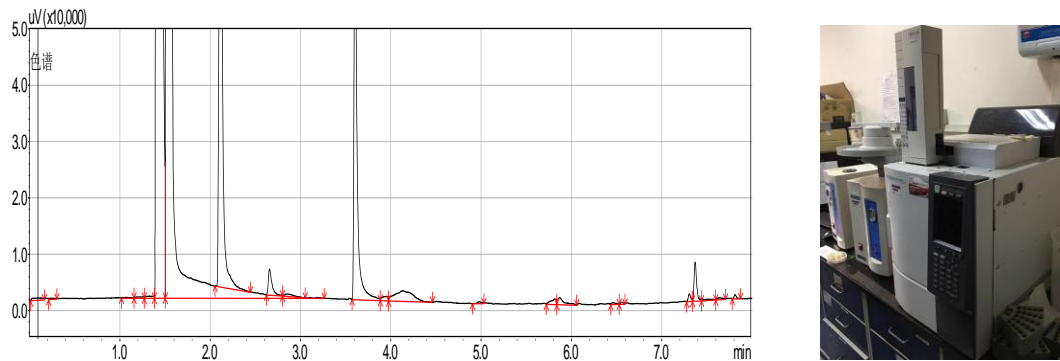


图 3 气相色谱分析生物塑料 PHB 含量和纯度

(实验完成于清华大学微生物实验室 2016. 10. 7—2016. 10. 15)

2.4 研究的基本思路和过程

本研究的基本思路是：将某市污水处理厂的活性污泥进行热裂解，对其各微生物生长所需元素做定量测量，然后尝试在不同条件下筛选和培养细菌微生物，通过细胞干重以及 PHB 含量来判定活性污泥作为微生物培养基的可能性，并根据结果逐步优化反应条件。研究具体步骤如下：

首先，研究如何将活性污泥转化成微生物容易利用的培养成份。

第二步，为了能够实现单一菌株高效的转化，寻找生命力强大的单一菌株“微生物工厂”。

第三步，循序渐进地设计几个实验，探索用污泥热裂解液逐步取代生产 PHB 的各类营养成分。分别进行以下实验：

- 污泥热裂解液作为培养基添加物（以促进微生物生长）
- 污泥热裂解液取代培养基中酵母膏和矿物元素
- 污泥热裂解液取代培养基中氮和磷元素

- 污泥热裂解液取代葡萄糖
- 污泥热裂解液作为全培养基

通过以上实验, 逐步探索利用污泥生产 PHB 最佳生长条件, 在保证足够细胞干重的基础上, 提高“微生物工厂”积累 PHB 的含量, 实现污泥资源化及 PHB 生产效益最大化。

2.5 让活性污泥能够被“微生物工厂”利用-污泥热裂解

首先, 要研究如何将活性污泥转化成微生物容易利用的成份。污泥取自某排水集团污水处理池, 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。但是完整细胞的大分子的有机物不能为“微生物工厂”直接利用, 所以首先要想办法转化成小分子。破碎细胞有许多方法, 包括: 超声处理、加压减压处理、表面活性剂处理以及高温处理等。而其中高温处理是最简单易行的方法, 160—180° 加热处理污泥实现热裂解在废水处理厂是较为成熟的工艺。

但是, 污泥热裂解营养物成份复杂, 可能含有不利于微生物生长的有毒物质。实际情况中, 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% (Sato et al 1998), 但这结果远低于使用单一组分培养单一菌种的 80%以上 (Chen 2009), 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 的生产研究可行性较低(陈国强和魏岱旭, 2014)。

本研究采用热裂解技术 (Thermal Hydrolysis Pre-Treatment, THP) 在 160-180°C 高温的高压蒸汽对污泥进行数分钟的热裂解, 使污泥中的微生物细胞破裂, 胞内产物释放, 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(这部分由北排完成), 这样产生污染的污泥变成了一个营养丰富的大小分子混合物(成份类似营养丰富的酵母膏)。

同时, 高温处理也去除了污泥中其他的微生物, 使污泥成为一个适合培养微生物的营养源。

下一步, 为了能够实现单一菌株高效的转化, 就需要寻找生命力强大的单一菌株“微生物工厂”。

2.6 “微生物工厂” 的寻找-菌株筛选

在自然界中, 严酷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 (Yin et al 2015)。于是就利用从新疆艾丁湖这个严酷的盐湖 (日夜温差 $>50^{\circ}\text{C}$, 盐浓度 200 g/L, $\text{pH}>9$) 采集的土样, 分离得到能生产 PHB 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 PHB 的使命。

把从新疆艾丁湖采回来的土样, 称取 1 克, 悬浮于 20 毫升 9% 的 NaCl 生理盐水中。然后激烈震荡试管中的悬浮液 6 分钟。取 1 毫升上清液, 均匀涂布于污泥热裂解液离心上清+20 g/L 葡萄糖+15 克/升琼脂做成的固体培养基中。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 观察并挑选最大的白色不透明菌落 (图 4)。

本实验分离得到了一株嗜盐嗜碱的单胞菌, 命名为 *Halomonas* CJN, 该菌株可以在 30~45 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下, 在污泥热裂解液加葡萄糖, 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 $^{\circ}\text{C}$, pH 耐受范围为 5.0~11.0, 最适 pH 为 9.0, 可耐受的 NaCl 浓度为 10~250 g/L, 最适为 60 g/L。当把生长条件固定在 37 $^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8.6-9.0$, 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 PHB 的生产成本。

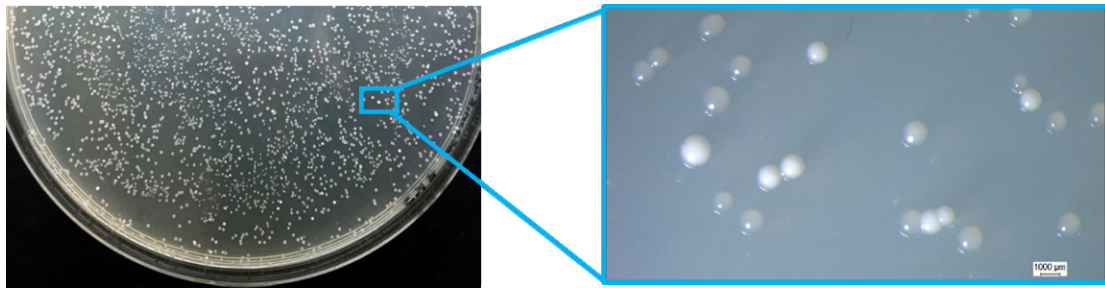


图 4. “微生物工厂” 的寻找-菌株筛选示意图

积累了一定量 PHB 的单克隆，菌落呈现乳白色及不透明性；没有积累 PHB 的单克隆，呈现淡黄色和较高的透明度。这是初步筛选 PHB 积累菌落的依据。

（实验完成于清华大学微生物实验室 2016. 9. 16—2016. 9. 18）

3. 研究结果与分析

3.1 污泥热裂解后，上清液中氮磷元素及有机酸含量大幅提高

对某排水集团提供的污泥进行热裂解前后的上清液，主要营养元素的分析（感谢常菁博士提供的数据），发现热裂解后的污泥上清液中氮和磷元素以及挥发性有机酸(Volatile Fatty Acids, VFA)的含量(COD)都大幅度的增加(表1)。因此，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. 某市排水场污泥热裂解前后污泥上清液成份的比较

| 热裂解前后各项参数比较 | 上清液中各指标数据 (mg/l) | | | |
|-------------|------------------|------|------|------|
| | COD | VFAs | 总氮 | 总磷 |
| 热裂解前 | 13094 | 350 | 974 | 92.4 |
| 热裂解后 | 28490 | 943 | 2259 | 149 |

COD: Chemical Oxygen Demand, VFA: Volatile Fatty Acids

3.2 污泥热裂解的上清液可以作为微生物培养基添加成份

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份可能会有波动，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 (MM 组)，对照组二为添加了 1 g/L 酵母膏(Yeast Extract)提取物 (以提供氨基酸和维生素等生长因子，称为 MM1gY)。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 5)。对照组一基本矿物培养基 (MM) 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 MM1gY 使细胞长到 11 g/L 并生产了占细胞干重 72%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 40—60% 的 PHB, 还有很大可以提高 PHB 生产的空间。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, 提高 PHB 生产的空间更大。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 5)。

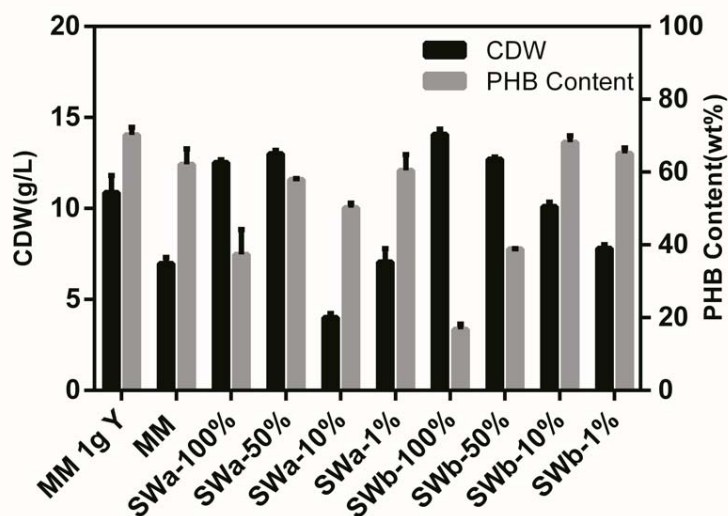


图 5. 不同浓度的两种污泥热裂解液对 *Halomonas* CJN 生长和 PHB 生产的影响
 实验条件: 将过夜活化培养的种子液以 5% 接种量接种于 50 ml 矿物盐培养基中 (500 毫升摇瓶), 37°C, 200 rpm 培养 48 h。污泥热裂解液 SWa 或 SWb 以不同浓度加入基本培养基 MM 中。三个平行实验 (实验完成于清华大学微生物实验室, 2016. 10. 7—2016. 10. 15)。

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 在正常矿物培养基 (MM) 培养时能长到 7 g/L 干重时, 而加入污泥热裂解液的矿物培养基在相同条件下细胞生长达到 13 g/L, 几乎提高了一倍 (图 5)。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 是否可以替代正常 MM 培养基中的氮、磷、矿物元素和葡萄糖。

在正常培养基 60MM+30 g/L 葡萄糖 (含 60 g/L NaCl 不含酵母膏) 条件下, 细胞长到 8.5 g/L。当在上述 60MM+30G 中加入不同浓度污泥热裂解液时,

Halomonas CJN 可以长到 12、13 到 14 g/L (图 6 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。

在不添加葡萄糖的条件下, 污泥热裂解液+60MM 矿物质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 6 中间黑色柱状图)。即当以剩余污泥热裂解液作为培养基时, 不加酵母以及氮、磷及矿物元素基本培养基 (需要加 30 g/L 葡萄糖) 时, 可以达到与正常培养基相同的细胞干重, 即 8.5—10 g/L (图 6 右边灰色柱状图)。如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 5)。

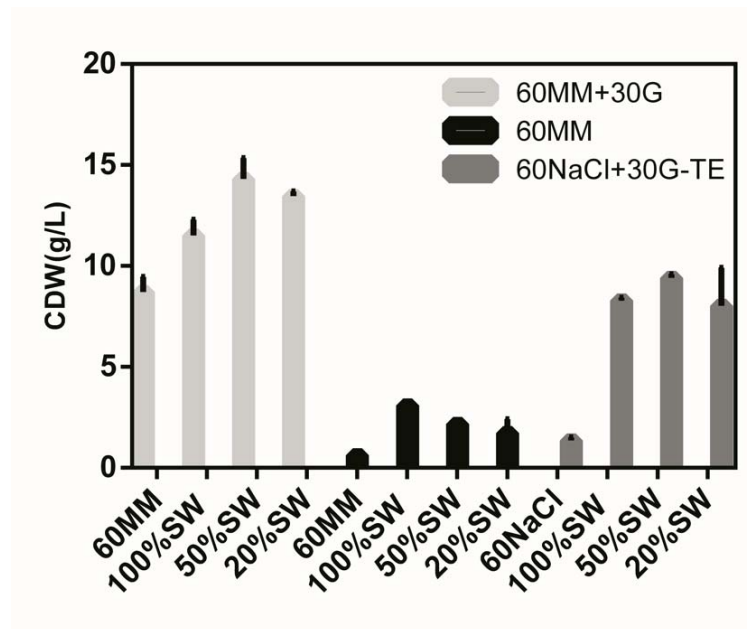


图 6. 污泥热裂解液取代酵母膏、糖、氮磷和微量元素对细胞生长的影响
 实验条件: 将过夜活化培养的种子液以 5%接种量接种于 50 ml 矿物盐培养基中 (500 毫升摇瓶), 37°C, 200 rpm 培养 48 h。污泥热裂解液 SW 以不同浓度加入基本培养基 MM 中。三个平行实验。60MM: 60 g/L NaCl+基础矿物质; 30G: 30 g/L 葡萄糖; 60NaCl+30G-TE: 60 g/L NaCl+30 g/L 葡萄糖无微量元素 (实验完成于清华大学微生物实验室, 2017. 1. 1—2017. 1. 12)。

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 5 和 6), 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正常矿物培养基做为对照，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 小时培养 *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）。

表 2. 污泥热裂解液作为氮磷源发酵前后滤液组分变化

| 培养基 (mg/L) | COD | 总氮 | 总磷 |
|------------|-------|-------|------|
| 污泥热裂解液 | 14195 | 1349 | 81 |
| 发酵后上清液 | 23970 | 709.3 | 18.6 |

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，可以作为培养基成份，减少发酵添加成份成本（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，与标准矿物培养基几乎完全一样。然而，PHB 含量只能达到 28%细胞干重，低于标准培养基的约 70%（图 7）。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。

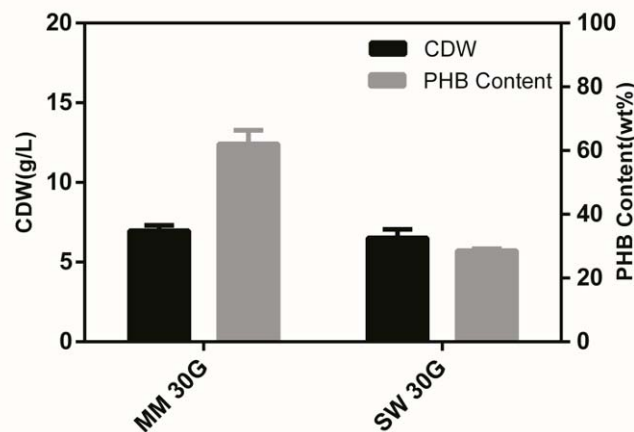


图 7. 污泥热裂解液培养 *Halomonas* CJN 生产 PHB

实验条件：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 毫升摇瓶），37℃，200 rpm 培养 48 h。三个平行实验。MM: mineral medium 含 60 g/L NaCl；30G: 30 g/L 葡萄糖；SW: Sludge waste。

（实验完成于清华大学微生物实验室，2017. 2. 9—2017. 2. 16）

3.3 探索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 3 中间黑色柱状图), 只能成为剩余 COD 作为废水成份排出。针对这个问题, 进一步探究是否能将这些碳化合物转化成“微生物工厂”能够利用的成份。

因此, 我们找到某排水集团, 探究是否可能将污泥热裂解液做进一步的处理, 某市排水集团提出厌氧发酵可能是最简单可行的途径, 可以将大量污泥热裂解液中的碳化合物转化为以乙酸为主的有机酸, 浓度最高可达 15 g/L, 由此获得的乙酸比葡萄糖廉价。乙酸在前人的实验已经被证明能够较好地被微生物利用。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 g/L, 10 g/L 和 15 g/L, 获得较好的实验结果 (图 8)。

实验结果表明: 当用污泥热裂解液加乙酸做为碳源时, *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, 说明乙酸可以被 *Halomonas* CJN 来生长。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 8)。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。

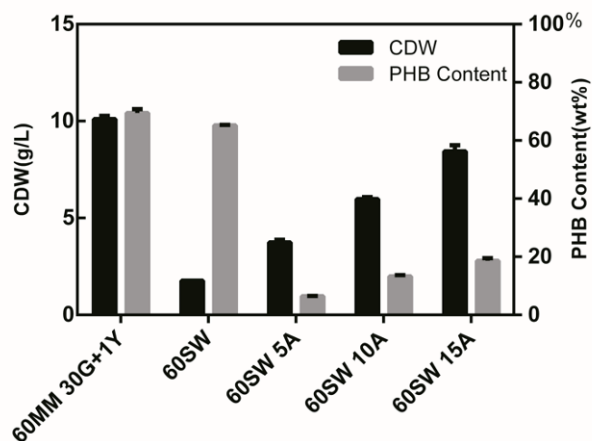


图 8 乙酸作为碳源在污泥热裂解液中对 *Halomonas* CJN 生长及 PHB 生产的影响
 实验条件: 将过夜活化培养的 *Halomonas* CJN 种子液以 5%接种量接种于 50 ml 矿物盐培养基中 (500 毫升摇瓶), 37°C, 200 rpm 培养 48 h。共做三个平行实

验。60MM: mineral medium 含 60 g/L NaCl; 30G: 30 g/L 葡萄糖; 1Y: 1 g/L yeast; 60SW: Sludge waste, 或污泥热裂解液加 60 g/L NaCl; 5A、10A、15A: 5、10、15 g/L acetic acid (乙酸) (实验完成于清华大学微生物实验室, 2017. 4. 4—2017. 4. 18)。

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+葡萄糖只能把 PHB 生产提高到 40%, 远低于单独葡萄糖时达到的 70-80% (图 9)。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。

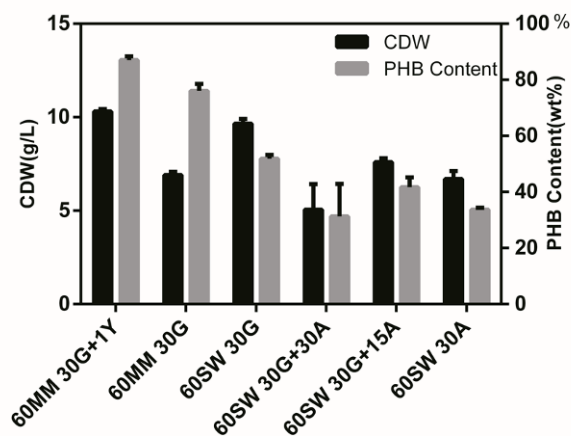


图 9. 乙酸与葡萄糖混合碳源对 *Halomonas* CJN 生长及 PHB 生产的影响
 实验条件: 将过夜活化培养的种子液以 5%接种量接种于 50 ml 矿物盐培养基中 (500 毫升摇瓶), 37°C, 200 rpm 培养 48 h。三个平行实验。60MM: mineral medium 含 60 g/L NaCl; 30G: 30 g/L 葡萄糖; 1Y: 1 g/L yeast; 60SW: Sludge waste, 或污泥热裂解液加 60 g/L NaCl; 30A、15A: 30、15 g/L acetic acid (乙酸) (实验完成于清华大学微生物实验室, 2017. 5. 30—2017. 6. 10)

4. 总结及下一步设想

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 5-9)。减少了污泥带来的污染, 实现了变废为宝的目标, 而且还降低了污泥处理的成本和生物塑料 PHB 的制造成本, 可以说一举三得。

本研究首先通过测量污泥热裂解液上清的成份, 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; 然后将其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 6), 进一步降低 PHB 的生产成本。这一部分的成本, 最保守的估计节省了 1500 元 / 吨 PHB (氮磷源加微量元素约 800 元 / 吨 PHB, 酵母膏约 700 元 / 吨 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, 提升了细胞干重, 但对促进 PHB 积累作用不大 (图 5 和 7)。因此, 低积累的“微生物工厂” *Halomonas* CJN 还有进一步提高 PHB 积累的潜能。

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 5)。于是, 委托某市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 8), 而相应减少葡萄糖的用量, 这样的替代可进一步降低 PHB 的生产成本。然而, 实验发现乙酸虽然能支持细胞的生长, 但却不支持 PHB 的产量提升。

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 9)。因此, 需要寻找乙酸作为单一碳源的新思路。

所以, 未来研究的关键在于如何在乙酸作为单一碳源的污泥热裂解液中高效生产 PHB, 探索代谢路径将成为下一步研究的重要方向 (Zhao et al 2016)。

本研究下一步的设想是：通过代谢工程及合成生物学等手段对嗜盐单胞菌进行诱变筛选，降低正常生长所需的低盐浓度，同时构建附加 PHB 代谢通路来增加 PHB 的积累量，使 *Halomonas* CJN 在污泥热裂解液不但能很好地生长，还能高效地生产生物塑料 PHB。

本研究的创新性在于：为废水处理产生的大量活性污泥提供了一条废物资源化的新道路，为未来降低微生物发酵生产生物塑料 PHB 的成本提供了新方案。同时，本次研究利用单一菌种在活性污泥中发酵也是一种创新，具有可优化及操作性强的优势。前人进行的混合菌群培养生产 PHB 由于其不可控性，细胞密度很低，没有可开发性 (Lam et al 2017)。

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份复杂的污泥热裂解营养物生产 PHB 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，同时也为今后的工业化生产降低了成本 (Tan et al 2014; Fu et al 2014)。

本研究兼具经济性及实用性：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 8500 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 1500 元，总共可以节省约 10000 元的 PHB 制造成本，使 PHB 从现在的 30000 元 / 吨变成 20000 元 / 吨 (数据来源于 PHA 生产蓝晶公司)，这样使得生物塑料的竞争力进一步加强，也使得将来的大规模应用成为可能。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，也为废水除磷减氮减少了成本。

结论：本研究发现可以利用“微生物工厂” *Halomonas* CJN 变废为宝，将污染物活性污泥用来生产生物可降解塑料 PHB，不仅降低了污泥处理的成本，还降低了 PHB 的生产成本，使得将来大规模应用 PHB 成为可能，从根本上减少白色污染。该方法兼具创新性、实用性和经济性。

5. 参考文献

- Braunegg G, Sonnleitner B and Lafferty RM. Rapid Gas-Chromatographic Method for Determination of Poly-beta-hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 6 (1978) 29-37
- Chen GQ. A Polyhydroxyalkanoates Based Bio- and Materials Industry. *Chemical Society Reviews* 38 (2009) 2434-2446
- Feng YH, Zhang YB, Chen S and Quan X. Enhanced Production of Methane from Waste Activated Sludge by the Combination of High-solid Anaerobic Digestion and Microbial Electrolysis Cell with Iron-graphite Electrode. *Chemical Engineering Journal* 259 (2015) 787-794
- Fu XZ, Tan D, Aibaidula G, Wu Q, Chen JC and Chen GQ. Development of *Halomonas* TD01 as A Host for Open Production of Chemicals. *Metabolic Engineering* 23 (2014) 78-91
- Lam W, Wang YJ, Chan PL, Chan SW, Tsang YF, Chua H, Yu PHF. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) using Sludge from Different Wastewater Treatment Processes and the Potential for Medical and Pharmaceutical Applications. *Environmental Technology* 38 (2017) 1779-1791
- Li ZJ, Shi ZY, Jian J, Guo YY, Wu Q and Chen GQ. Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from Unrelated Carbon Sources by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 12 (2010) 352-359
- Nghiem LD, Koch K, Bolzonella D and Drewes JE. Full Scale Co-digestion of Wastewater Sludge and Food Waste: Bottlenecks and Possibilities. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 72 (2017) 354-362
- Satoh H, Iwamoto Y, Mino T and Matsuo T. Activated Sludge as a Possible Source of Biodegradable Plastic. *Water Science and Technology* 38 (1998) 103-109.
- Tan D, Wu Q, Chen JC and Chen GQ. Engineering *Halomonas* TD01 for Low Cost Production of Polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering* 26 (2014) 34-47
- Tyagi VK and Lo SL. Sludge: A Waste or Renewable Source for Energy and Resources Recovery? *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 25 (2013) 708-728
- Wang Y, Yin J and Chen GQ. Microbial Polyhydroxyalkanoates, Challenges and Opportunities. *Current Opinion in Biotechnology* 30 (2014) 59-65
- Yin J, Chen JC, Wu Q and Chen GQ. *Halomonas* spp, a Rising Star for Industrial Biotechnology. *Biotechnology Advance* 33 (2015) 1433-1442
- Zhao H, Zhang HQM, Li T, Lou CB, Ouyang Q and Chen GQ. Novel T7-Like Expression Systems Used for *Halomonas*. *Metabolic Engineering* 39 (2017) 128-140
- 陈国强、魏岱旭. 《微生物聚羟基脂肪酸酯》 化工出版社 (2014)

6. 致谢

陈佳妮提出在活性污泥与生物可降解材料 PHB 之间搭建桥梁的设想, 并思考如何寻找并利用“微生物工厂”变废为宝, 逐步深入地探究了“微生物工厂”的转化能力, 提出了后续改进的方向。

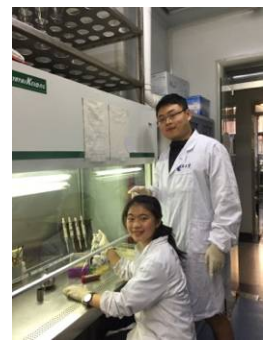
感谢清华大学生物材料实验室的姚志昊老师提供的具体实验技术指导、吴琼老师的微生物知识指导、清华附中本部邱楠、梁姝颀和王旭老师的数理化生物知识指导以及实验空间、论文写作、演讲技巧的指导。还要感谢某排水集团的常菁博士提供的污泥及其热裂解液分析数据。

团队成员简历

陈佳妮 (chenjn0718@163.com) : 2001 年 7 月 18 日出生于北京。2007—2013 年就读于清华附小, 2013—2016 年就读于清华大学附属中学初中部。陈佳妮担任班里的宣传委员, 组织过多次大型的活动包括: 话剧演出和微电影拍摄等。在各届学生节中表现突出, 通过积极营销, 创下附中单组销售纪录。被评为校级优秀学生干部。2016—今就读于清华大学附属中学高中部, 在班里学习名列前茅, 担任学习委员。2016 年参加全国创新英语大赛成功晋级复赛。2016 年被选拔进学校领导力训练营, 2017 年赴香港交流。从初中一年级 (2013 年) 开始, 一直坚持在清华大学生命科学学院观摩和参与一系列科研活动。从高中一年级 (2016 年) 开始一直在周末和假期坚持参与清华大学生命学院微生物实验室吴琼老师主持的一些科研工作。利用高一暑假 (2017 年) 时间参加清华大学神经科学夏令营进行学习, 并作为代表和托马斯杰斐逊中学进行生物方面的学术交流, 并和他们的老师进行了生物统计学的学习。长期坚持自己的爱好, 从小学 4 年级 (2012 年) 开始创作以清华附小为背景的长篇小说《十二神兽》(22 万字), 初中开始创作另一部小说《死亡游戏者》(目前达到 15 万字) 还在撰写中。

指导老师简历

姚志昊 (yaozhihao@phalab.org) : 1991年8月18日出生于山东省烟台市长岛县。2010年考入中国农业大学烟台研究院水产养殖专业,2014年7月毕业并获得农学学士学位。2015年考入清华大学生命科学学院攻读生物学硕士学位至今。



吴琼 (wuqiong@mail.tsinghua.edu.cn) : 清华大学生命科学学院长聘副教授。1973年出生,1996年在清华大学生物系获得理学学士学位,2001年在清华大学获得生化及分子生物学博士学位。



邱楠 (qiunan2009@hotmail.com) : 毕业清华大学,物理学博士毕业,毕业后在清华大学附属中学担任清华大学附中任教,并出任清华大学附属中学 STEAM 科技中心主任,主要负责学生科技活动的组织和创客、高等项目研究课程和项目(包括能源系统、计算机科学、地理信息、自动化与机器人、生命科学、化学分析)的开发。



梁姝颀 (stygen@163.com) : 本科就读于北京师范大学生命科学学院生物科学专业,2007年进入北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系,师从刘德培院士,获理学博士学位。毕业后进入环境保护部环境发展中心/中日友好环境保护中心国家环境保护二噁英污染控制重点实验室工作。2016年进入清华大学附属中学工作。担任生命科学实验室负责人。



王旭 (oushang521521@sina.com.cn) : 女,中学生物教师。曾被评为“海淀区教育系统青年先进教育工作者”和“清华附中学科带头人”。

