

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2022.11.017

UASB处理低磷啤酒废水的微生物群落特性

袁雅姝¹, 张丽伟¹, 杨佳蓉¹, 陈正洋¹, 傅金祥¹, 律泽¹,
王薇²

(1. 沈阳建筑大学 市政与环境工程学院, 辽宁 沈阳 110168; 2. 沈阳水务集团有限公司,
辽宁 沈阳 110000)

摘要: 为了探究低磷啤酒废水厌氧处理阶段的微生物种类及群落多样性,将本溪某啤酒厂的低磷特种废水处理工艺中获取的厌氧污泥接种于实验室UASB反应器中,对污泥进行培养驯化直至运行稳定,对低磷厌氧污泥中的细菌和古细菌进行高通量测序分析。UASB系统从启动到稳定历时60 d左右,对COD的去除率在70%以上;系统中污泥的细菌优势菌属为*Chlorobium*、*Longilinea*、*Methanotrix*、*Levilinea*等,古细菌优势菌属为*Methanotrix*、*Methanobacterium*。与常规厌氧污泥相比,低磷啤酒废水处理系统的厌氧污泥中硫化细菌和硫酸盐还原菌的含量较高,为优势菌属。

关键词: 低磷啤酒废水; 低磷厌氧污泥; UASB; 生物群落结构; 高通量测序

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2022)11-0098-06

Microbial Community Characteristics of UASB for Low-phosphorus Brewery Wastewater Treatment

YUAN Ya-shu¹, ZHANG Li-wei¹, YANG Jia-rong¹, CHEN Zheng-yang¹,
FU Jin-xiang¹, LÜ Ze¹, WANG Wei²

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang 110168, China; 2. Shenyang Water Group Co. Ltd., Shenyang 110000, China)

Abstract: To investigate the microbial community and diversity in anaerobic treatment of low-phosphorus brewery wastewater, the anaerobic sludge obtained from a special low-phosphorus wastewater treatment process of a brewery in Benxi was inoculated in a laboratory-scale UASB, and the bacterial and archaeal communities of the cultivated anaerobic sludge for low-phosphorus wastewater treatment were analyzed by high-throughput sequencing. It took approximately 60 days for the UASB system from start-up to stabilization, and the COD removal efficiency was above 70%. The dominant bacterial genera of the sludge in the system were *Chlorobium*, *Longilinea*, *Methanotrix*, *Levilinea*, etc., and the dominant archaea were *Methanotrix* and *Methanobacterium*. Compared with other conventional anaerobic sludge, the relative abundance of sulfur-oxidizing bacteria and sulfate-reducing bacteria in the anaerobic sludge for low-phosphorus brewery wastewater treatment was higher, which were the dominant bacteria.

Key words: low-phosphorus brewery wastewater; low-phosphorus anaerobic sludge; UASB; microbial community composition; high-throughput sequencing

利用活性污泥法处理工业废水具有处理效果好、运行管理方便等优势,通常认为厌氧污泥微生物

的正常生化处理应满足 $BOD_5:N:P=(200\sim300):5:1$,但是随着人类活动的加剧,许多工业废水(如酿造废水)都存在磷元素缺乏的问题。啤酒废水作为常见的低磷特种废水也面临处理难度大的问题。上流式厌氧污泥床反应器(UASB)是目前较为常见的厌氧生物处理技术之一,被广泛用于工业废水的处理中。

为了探究低磷啤酒废水厌氧处理阶段的微生物种类及群落多样性,笔者将本溪某啤酒厂的低磷特种废水处理工艺中获取的厌氧污泥接种于实验室UASB反应器中,培养驯化直至运行稳定,对低磷厌氧污泥中的细菌和古细菌进行高通量测序分析,以期对磷营养源缺乏的厌氧生物处理机制及其技术改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验装置

以本溪市某啤酒厂污水站厌氧罐中稳定的厌氧污泥作为接种污泥,采用模拟啤酒废水在实验室的UASB装置中进行驯化。UASB试验装置的有效容积为1.96 L,连续进水,流量为15~25 mL/min,温度控制在30~40 °C,放置在阴凉而且没有阳光直射的位置。

UASB装置进水为模拟低磷啤酒废水,其COD、 NH_4^+-N 、TP浓度分别为1 100~1 500、20~24、3~3.2 mg/L,pH为7.5~8.0,微量元素适量。

1.2 样本的采集

厌氧污泥样本取自启动后的耐低磷菌驯化UASB试验装置。取反应器上端(YJR1)和下端(YJR2)两处污泥,充氮后存于0 °C冰盒中,并快速转移至-20 °C超低温冰箱至送检。

1.3 高通量测序及数据分析

1.3.1 DNA扩增

对污泥样本中的细菌和古细菌进行高通量测序分析。针对污泥样本中目标基因组16S rDNA的V3及V4区进行扩增,PCR模板为污泥样本中提取的DNA原液,利用16S rDNA正反两种引物即341F(CCTACGGGNGGCWGCAG)和805R(GACTACH-VGGTATCTAATCC)进行扩增。根据PCR扩增图谱,扩增后出现明显清晰的条带并且位置一致,证明PCR模板达到了扩增的浓度要求。本试验委托上海生工生物公司对污泥样本进行Illumina MiSeq

高通量测序。

1.3.2 操作分类单元(OTU)分类

将所有样本序列按照序列间的距离进行聚类,然后根据序列之间的相似性分成不同的操作分类单元(OTU)。通过绘制OTU数量与聚类similarity值之间的关系图,选出最佳的similarity值进行OTU分析和分类学分析。通常取相似水平为97%的OTU进行生物信息统计分析。根据OTU列表中各样本的物种丰度情况,应用软件mothur,计算种群丰富度指数即Chao1指数和Ace指数,指数值越大,说明群落丰富度越高;同时,计算群落多样性指数即Shannon指数,Shannon指数值越大,说明群落多样性越高。

2 结果与分析

2.1 UASB启动及耐低磷厌氧菌驯化

UASB系统从启动到稳定,历时约60 d,分为3个阶段:驯化期、提高负荷期、稳定负荷期。启动阶段COD浓度的变化如图1所示。前10 d为驯化期,在这期间COD去除率较低,有细小的分散污泥被洗出。经过提高负荷期和稳定负荷期,60 d之后反应器不再有絮状污泥洗出,污泥呈颗粒状,COD去除率稳定在70%左右,基本符合啤酒废水处理厂的COD去除状态,证明UASB反应器顺利启动,驯化完成。

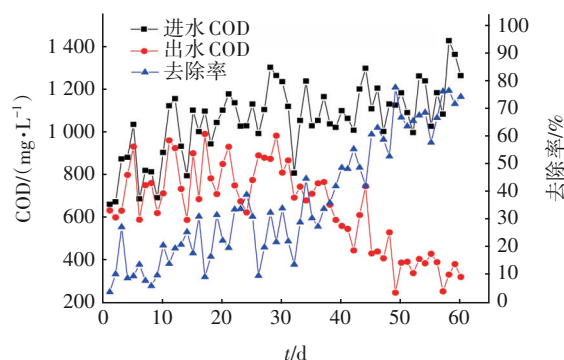


图1 UASB启动阶段COD浓度的变化情况

Fig.1 Change of COD concentration in UASB during start-up period

2.2 细菌分析

两个污泥样本的微生物丰富度和多样性指数分析结果如表1所示。可知,样本YJR2的Chao1指数和Ace指数都高于样本YJR1,这说明样本YJR2的微生物菌群丰富度更高;此外,样本YJR2的Shannon指数高于样本YJR1,说明样本YJR2的微生物

物多样性更高。

表1 污泥样本的微生物丰富度和多样性指数

Tab.1 Microbial richness and diversity index of sludge samples

项目	序列数	OTU 数	Shannon 指数	Ace 指数	Chao1 指数
YJR1	73 838	1 753	3.47	13 010.40	6 368.26
YJR2	82 308	1 956	3.48	16 256.27	8 975.30

2.2.1 门水平的优势菌群分布特征

污泥样本中细菌在门水平上的群落结构分布如图2所示。

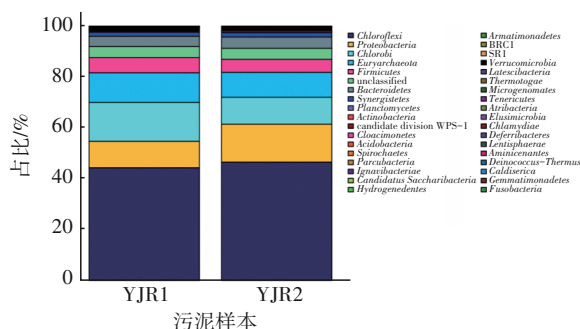


图2 污泥样本中细菌在门水平上的群落结构分布

Fig.2 Community structure distribution of bacteria in sludge samples at phylum level

由图2可知,污泥样本中细菌在门水平上具有较高的多样性,达到35个门以上,取TOP10进行分析。绿弯菌门(*Chloroflexi*)在样本YJR1和YJR2中占比最大,分别为44.36%和46.57%,具有生物除磷功能,其在中低温环境中迅速繁殖、在高温环境中迅速衰亡^[1];变形菌门(*Proteobacteria*)的占比为10.41%(YJR1)和14.95%(YJR2),具有一定的脱氮除磷能力,在地下水的微生物群落中占绝对优势^[2];绿菌门(*Chlorobi*)的占比为15.32%(YJR1)、10.54%(YJR2),其可进行不产氧光合作用^[3];广古菌门(*Euryarchaeota*)的占比为11.62%(YJR1)和9.85%(YJR2),包含了古菌中的大多数种类,其中包括产甲烷菌^[4];厚壁菌门(*Firmicutes*)的占比为5.96%(YJR1)和5.11%(YJR2),是肠道常见菌,包含好氧反硝化菌,与COD的降解去除有关;拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为肠道常见菌,可水解纤维素等多糖物质,具有硝化及反硝化除磷作用^[5],占比为4.09%(YJR1)、4.47%(YJR2);互养菌门(*Synergistetes*)的占比分别为1.52%(YJR1)和1.63%(YJR2),其可在厌氧消化反应器中降解污泥产生沼气^[6];浮霉菌门

(*Planctomycetes*)的占比为0.4%(YJR1)和0.48%(YJR2),是兼性厌氧菌,可利用糖类作为主要碳源,能够降解有机物,参与氮循环^[7];酸杆菌门(*Acidobacteria*)的占比分别为0.26%(YJR1)和0.51%(YJR2),大多为嗜酸菌,可降解纤维素等复杂有机物,是有益的肠内菌^[8];candidate division在两个样本中的占比均为0.25%,常见于活性污泥和雨林土壤中^[9]。

2.2.2 属水平的优势菌群分布特征

污泥样本中细菌在属水平上的群落结构分布见图3。污泥样本中细菌在属水平上具有较高的多样性,达到270个属以上。TOP10包括*Chlorobium*、*Longilinea*、*Methanotrix*、*Levilinea*、*Acidovorax*、*Thauera*、*Acidaminobacter*、*Desulfomicrobium*、*Chlorobaculum*、*Aminivibrio*。其中*Chlorobium*和*Chlorobaculum*属于绿菌门(*Chlorobi*);*Longilinea*、*Levilinea*属于绿弯菌门(*Chloroflexi*);*Acidovorax*、*Acidaminobacter*属于厚壁菌门(*Firmicutes*);*Thauera*、*Desulfomicrobium*属于变形菌门(*Proteobacteria*)。

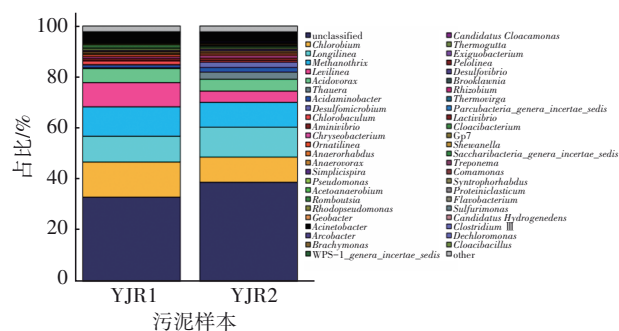


图3 污泥样本中细菌在属水平上的群落结构分布

Fig.3 Community structure distribution of bacteria in sludge samples at genus level

*Chlorobium*的占比分别为13.83%(YJR1)和9.88%(YJR2),硫细菌属于该属,具有厌氧光合产甲烷的功能特点^[10]; *Longilinea*的占比分别为10.11%(YJR1)和11.7%(YJR2),具有代谢多种碳水化合物、与产甲烷菌共培养时促进其生长的作用^[11]; *Methanotrix*属于广古菌门(*Euryarchaeota*),占比为11.52%(YJR1)和9.76%(YJR2),能够将乙酸分解为 CH_4 和 CO_2 ; *Levilinea*占比为9.51%(YJR1)和4.44%(YJR2),能代谢多种碳水化合物生成有机酸^[12]; *Acidovorax*占比为5.47%(YJR1)和4.6%(YJR2),是兼性厌氧菌属; *Thauera*占比为0.35%

(YJR1)和2.83%(YJR2),为兼性反硝化菌,具有脱氮及合成内碳源的功能;*Acidaminobacter*占比为1.05%(YJR1)和1.79%(YJR2),为专性厌氧菌,能代谢碳水化合物生成有机酸^[13];*Desulfomicrobium*占比为0.15%(YJR1)和2.11%(YJR2),严格厌氧而且活性较强的硫酸盐还原菌属于该菌属^[14];*Chlorobaculum*占比为1.48%(YJR1)和0.66%(YJR2),是厌氧菌,可以还原硫化物,利用光自养生长^[15];*Aminivibrio*属于互养菌门(*Synergistetes*),占比为0.93%(YJR1)和0.98%(YJR2),是能发酵氨基酸和有机酸的厌氧细菌属^[4]。

根据以上分析,可以归纳出污泥样本中细菌的主要功能特点:可以分解代谢多种碳水化合物生成有机酸、硫以及硫酸盐等。啤酒的主要生产原料是玉米和大麦,将玉米、大麦粉碎后加入啤酒花和鲜酵母对其进行糖化处理、发酵,在此过程中产生的废水主要有浸麦废水、糖化和发酵废液、糖化与发酵阶段的洗涤废水、冷却水等。由于啤酒加工工艺的特殊性,其产生的废水主要成分相比常规的厌氧废水含有更多的糖类和蛋白质,硫化物的含量也相对较高。

厌氧污泥在啤酒废水的长期驯化中,使得硫化细菌和硫酸盐还原菌成为优势菌种。污泥样本中的硫化细菌为第一优势菌属(在样本YJR1和YJR2中的占比分别为13.83%、9.88%),明显高于普通厌氧污泥中与硫相关含量最高的菌属(占比在1%左右)。样本中TOP10的菌属有一些与硫及硫酸盐的氧化还原反应有关,这可能是由于磷营养源缺乏不能提供能量,从而利用硫及硫酸盐的氧化还原反应产生能量,供反应器稳定运行^[10-15]。

2.2.3 物种差异比较

基于物种分类结果,计算在不同水平上各rank的丰度,比较样本或组间丰度差异,找出样本或组间丰度存在显著差异的物种分类,默认只做门和属的水平,筛选条件为 $p \leq 0.05$ 。当比较对象为样本时,采用fisher exact test,将检验得到的 p 值采用FDR做Multiple test correction得到 q 值。

在门水平上样本YJR1与YJR2物种差异比较的误差线见图4。中间所示为95%置信度区间内,物种分类丰度的差异比例,当 $p < 0.05$ 时,表示差异显著,物种分类用红色标识。由图4可知,有10种菌门的 p 值小于0.05,其中*Chloroflexi*、*Euryarchaeota*、

Proteobacteria、*Chlorobi*的丰度差异比较大,样本YJR2中*Chloroflexi*的丰度较高,可能是因为取样位置在反应器下端,厌氧条件充分,有利于代谢碳水化合物,另外,下端水浴循环温度适宜也是原因之一。*Proteobacteria*的丰度与氧含量有关。YJR1样本中*Chlorobi*丰度较高可能与顶端少量光照有关。厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)是产甲烷过程的优势菌群,两者的相互作用可提高厌氧消化过程的稳定性,降低环境因素变化对消化过程的冲击。

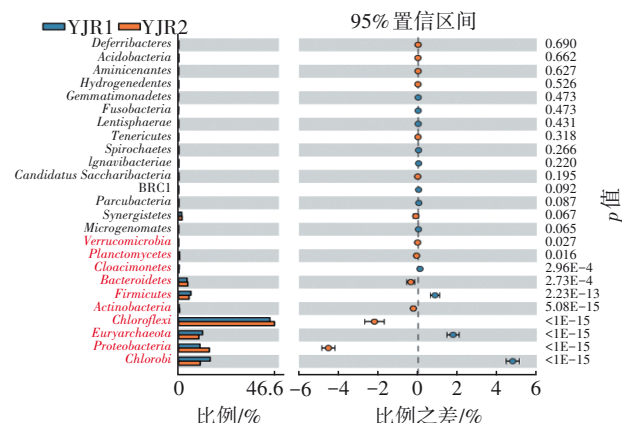


图4 在门水平上物种差异比较的误差线

Fig.4 Error bars of species difference comparison at phylum level

在属水平上样本YJR1与YJR2物种差异比较的误差线见图5。

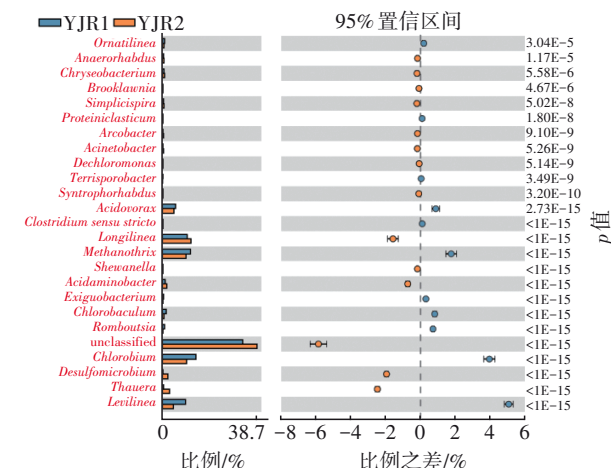


图5 在属水平上物种差异比较的误差线

Fig.5 Error bars of species difference comparison at genus level

图5中列出的24种菌属的 p 值均在0.05以下,其中*Chlorobium*、*Longilinea*、*Methanorhix*、*Levilinea*

丰度差异较大。样本 YJR1 中 *Chlorobium* 丰度较高与光照有关, *Methanothrix* 丰度较高是由于反应器下端主要完成厌氧消化中水解发酵阶段, 上端进行嗜乙酸产甲烷阶段。样本 YJR2 中 *Longilinea* 丰度较高是由于下端进污水, 受到有机物冲击较大, 所以需要更多细菌水解发酵, 促进产甲烷菌增长以更有利于降解大分子有机物。

2.2.4 功能丰度

通过分析已有测序微生物基因组的基因功能构成及 16S rDNA 测序获得的物种构成等, 推测样本中基因功能的构成。样本 YJR1 的基因功能丰度见图 6。样本 YJR1 所具有的功能主要为 [R] (仅限一般功能预测)、[E] (氨基酸运输和代谢)、[G] (碳水化合物化合物的运输和代谢)、[S] (功能不明)、[C] (能源生产和转换)、[M] (细胞壁/膜/包膜的生物生成)、[K] (转录)、[P] (无机离子运输和代谢)、[J] (翻译, 核糖体结构和生物生成)、[L] (复制、重组和修复)、[T] (信号转导机制)。其中, 微生物功能预测, 氨基酸运输和代谢, 碳水化合物化合物的运输和代谢, 能源生产和转换, 细胞壁/膜/包膜的生物生成, 微生物的转录、重组和修复, 信号转导机制等功能作用显著。

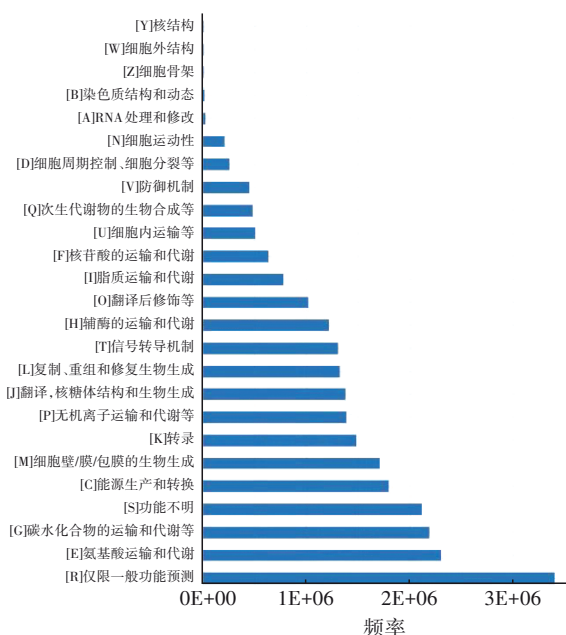


图6 样本YJR1的基因功能丰度

Fig.6 Gene functional abundance of sample YJR1

2.3 古细菌分析

2.3.1 门水平的优势菌群分布特征

样本中古细菌群落结构门水平上的多样性较

低, 共检出3个门: 广古菌门 (*Euryarchaeota*)、泉古菌门 (*Crenarchaeota*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*)。其中, 广古菌门 (*Euryarchaeota*) 占比最高, 为 99.97% (YJR1) 和 99.9% (YJR2), 产甲烷古菌属于该菌门^[4]; 泉古菌门 (*Crenarchaeota*) 占比较低, 为 0.03% (YJR1) 和 0.1% (YJR2), 具有依赖硫的特点, 可能是海洋环境中最丰富的古细菌^[16]; 浮霉菌门 (*Planctomycetes*) 在两个样本中极其微量, 占比几乎为 0, 属于兼性厌氧菌, 能利用糖类作为主要碳源、降解有机物、参与氮循环^[7]。

2.3.2 属水平的优势菌群分布特征

样本中古细菌群落结构在属水平上的多样性也较低, 共检出 14 个属, 优势菌属为 *Methanothrix*、*Methanobacterium*。*Methanothrix* 在两个样本中占比最高, 为 97.04% (YJR1) 和 97.44% (YJR2), 可将乙酸分解为 CH_4 和 CO_2 ; *Methanobacterium* 的占比为 2.26% (YJR1) 和 1.11% (YJR2), 是不活动的厌氧菌。它们普遍存在于一些炎热、低氧的环境中。

2.3.3 物种差异比较

在门水平上样本 YJR1 与 YJR2 中的古细菌物种差异并不明显, 这是由于污泥中的古细菌种类较少, 主要是产甲烷古菌。广古菌门 (*Euryarchaeota*) 中产甲烷古菌是能够以乙酸、 H_2/CO_2 、甲基化合物等为原料生成甲烷的微生物。

3 结论

① UASB 试验装置启动成功历时 60 d 左右, COD 去除率稳定在 70% 左右, 基本符合啤酒废水处理厂 COD 的去除状态。

② 经高通量测序分析, 模拟低磷啤酒废水 UASB 处理系统中细菌的优势菌属为 *Chlorobium*、*Longilinea*、*Methanothrix*、*Levilinea* 等, 它们的主要功能是分解代谢多种碳水化合物生成有机酸、硫及硫酸盐等; 古细菌的优势菌属主要为 *Methanothrix*、*Methanobacterium*, 它们的主要功能是以乙酸、 H_2/CO_2 、甲基化合物等为原料生成甲烷。

③ 污泥中细菌和古细菌的功能与啤酒废水中的污染物有明显的对应关系, 表明高通量测序有效。与其他常规厌氧污泥相比, 处理模拟低磷啤酒废水的厌氧污泥中硫化细菌和硫酸盐还原菌含量较高, 为优势菌种, 它们能够进行氧化还原反应为其他厌氧菌种提供能量, 使反应器运行稳定。

参考文献:

- [1] SUTCLIFFE I C. A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture [J]. Trends in Microbiology, 2010, 18(10): 464-470.
- [2] MADIGAN M T, MARTINKO J M, BENDER K S. Brock Biology of Microorganisms [M]. New York: Pearson Education Inc., 2011.
- [3] TANG K H, BLANKENSHIP R E. Both forward and reverse TCA cycles operate in green sulfur bacteria [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285 (46): 35848-35854.
- [4] LINCOLN S A, WAI B, EPPLEY J M, *et al.* Planktonic Euryarchaeota are a significant source of archaeal tetraether lipids in the ocean [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(27): 9858-9863.
- [5] MOR G, KWON J Y. Trophoblast-microbiome interaction: a new paradigm on immune regulation [J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2015, 213(4): S131-S137.
- [6] HUGENHOLTZ P, HOOPER S D, KYRPIDES N C. Focus: *Synergistetes* [J]. Environmental Microbiology, 2019, 11(6): 1327-1329.
- [7] LINDSAY M R, WEBB R I, STROUS M, *et al.* Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell [J]. Archives of Microbiology, 2001, 175(6): 413-429.
- [8] WHITMAN W B. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [M]. New York: John Wiley & Sons, 2015.
- [9] HUGENHOLTZ P, GOEBEL B M, PACE N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(18): 4765-4774.
- [10] WILLEY J, SHERWOOD L, WOOLVERTON C. Prescott's Microbiology [M]. New York: McGraw-Hill, 2011.
- [11] LONGILINEA Y T, IMACHI H, OHASHI A, *et al.* *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum *Chloroflexi* isolated from methanogenic propionate-degrading consortia [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(Pt 10): 2299-2306.
- [12] YAMADA T, SEKIGUCHI Y, HANADA S, *et al.* *Anaerolinea thermolimos* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae classis* nov. and *Caldilineae classis* nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56 (Pt 6): 1331-1340.
- [13] COPELAND A, SPRING S, GOKER M, *et al.* Complete genome sequence of *Desulfomicrobium baculatum* type strain [J]. Standards in Genomic Sciences, 2009, 1(1): 29-37.
- [14] HILZINGER J M, RAMANV, SHUMAN K E, *et al.* Differential RNA Sequencing implicates sulfide as master regulator of S⁰ metabolism in *Chlorobaculum tepidum* and other green sulfur bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018. DOI: 10.1128/aem.01966-17.
- [15] HONDA T, FUJITA T, TONOUCHI A. *Aminivibrio pyruvatiphilus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, amino-acid-degrading bacterium from soil of a Japanese rice field [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63 (Pt 10): 3679-3686.
- [16] MADIGAN M T, MARTINKO J M, STAHL D. Brock Biology of Microorganisms [M]. Menlo Park: Benjamin Cummings, 2010.

作者简介:袁雅姝(1964-),女,辽宁抚顺人,硕士,副教授,主要研究方向为生活饮用水水质安全保障理论与技术、水污染控制理论与技术、生物技术在水处理工程中的研究与应用等。

E-mail:yuanyashu2007@163.com

收稿日期:2021-03-11

修回日期:2021-03-31

(编辑:刘贵春)