

◆生物工程◆

人工构建微生物组对制革废水的氨氮去除及微生物组的对比变化分析^{*}刘艺¹,林祖端¹,汤宏赤¹,施咏康²,林丽华¹,郭媛¹,王子龙¹,庞浩^{1**}

(1.广西科学院,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,非粮生物质酶解国家重点实验室,广西生物炼制重点实验室,广西南宁 530007;2.广西民族大学化学与生态工程学院,广西南宁 530007)

摘要:为探究复合人工微生物组对制革废水处理体系中微生物群落的影响,在传统的厌氧/好氧(A/O)污水处理工艺处理制革废水的基础上,投加微生物复合菌形成人工微生物组。利用复合人工微生物组强化废水处理,应用高通量测序技术测定各样品中的细菌 16S rRNA V3-V4 变异区序列,并对测序数据进行生物信息学分析、Alpha 多样性分析以及物种组成分析。结果表明,投加微生物组后,化学需氧量(COD)和氨氮的处理效果得到提升,COD 的去除率约为 82.60%,氨氮的去除率约为 99.47%。高通量测序结果表明,人工投加微生物组使得活性污泥中微生物群落丰度以及多样性提高,污染物降解功能菌占比有所提升,陶厄氏菌属(*Thauera*)成为其最主要的优势菌属。复合人工微生物组的投加对强化制革废水处理系统有一定潜力。

关键词:人工微生物组 制革废水 生物脱氮 高通量测序 微生物群落结构

中图分类号:X788 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2022)03-0254-06

DOI:10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20221019.005

制革行业是我国的重污染行业之一,在如今高标准的环保要求下,其生产废水的治理问题值得重视^[1,2]。制革废水具有高浓度、高盐量、高色度、悬浮物多以及水质波动大等特点^[3],此外,在皮革加工过程中添加的助剂、中和剂、铬鞣剂、植物鞣剂、石灰、硫化钠、铵盐、酸、碱、蛋白酶等材料,使制革废水中的还原性物质增加,直接或间接导致其中的化学需氧量(COD)含量较高^[4]。据报道,制革废水中 COD 含量

为 3 000 - 5 000 mg/L、氨氮含量为 150 - 300 mg/L^[5]。Feng 等^[6]采用电凝法处理制革废水,其 COD、氨氮的去除率分别为 68.0% 和 43.1%,氨氮的去除效果并不理想。高级氧化法处理污水虽然具有高效和迅速的优点,但是成本较高,经济性有待提高^[7]。制革废水的处理方法还有混凝沉淀法、膜分离法等,虽然也取得不错的效果,但经济成本投入较大,同时,废水处理产生的二次污染问题,也限制了这些

收稿日期:2022-05-09

修回日期:2022-08-01

^{*} 广西重大科技创新基地建设项目(2018-15Z03-1207)和桂科学者计划(CQ-D-2414)资助。

【作者简介】

刘艺(1996-),男,研究实习员,主要从事微生物与环境互动、微生物生理与生化研究。

【**通信作者】

庞浩(1975-),男,博士,研究员,主要从事分子微生物学和酶工程研究,E-mail:panghouse@126.com。

【引用本文】

刘艺,林祖端,汤宏赤,等.人工构建微生物组对制革废水的氨氮去除及微生物组的对比变化分析[J].广西科学院学报,2022,38(3):254-259.

LIU Y, LIN Z D, TANG H C, et al. Transformation of Ammonia Nitrogen in Tanning Wastewater by Artificial Microbiome and Comparative Analysis of Microbiome Change [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2022, 38(3): 254-259.

处理方法的大规模应用^[8]。制革废水中含有大量的可溶性蛋白、脂肪等有机物和甲酸等低分子添加剂, $m(\text{BOD}_5)/m(\text{COD}_{\text{cr}})$ 的值为 0.3 - 0.6, 可生化性较好, 适合进行生物处理^[9]。因此, 面对目前日渐严苛的废水排放环保标准, 生物处理方法作为一种成本低廉、不产生二次污染的废水处理方法^[10], 值得进一步探讨和优化。刘志刚等^[11]利用微生物复合菌剂解决了黑臭河道水体污染问题, 同时该微生物复合菌剂对 COD 和氨氮的去除具有一定的效果, 表明可通过添加复合人工微生物组来提高废水处理效果。本研究拟在制革废水处理过程中投加复合人工微生物组, 优化制革废水的处理效果, 并通过高通量测序的方法, 对其中的微生物群落多样性进行研究, 为复合人工微生物组在制革废水处理中的实际应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 接种污泥及实验用水

好氧污泥取自南宁市某污水处理厂, 外加一定比例的水以及糖蜜作为碳源, 尿素作为氮源, 经过一定时间的驯化后, 投入制革废水处理装置。制革废水取自台山某制革厂, 初始 COD 含量为 5 745.9 mg/L, 氨氮含量为 456.2 mg/L。

1.1.2 实验菌株

复合人工微生物组所用菌株为实验室筛选出来的、对制革废水处理具有正向作用的菌株, 包括阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.), 复配后构建人工微生物组, 命名为 GXAS1。每次均从平板上挑取单菌落, 经过液体培养基培养至一定浓度后进行菌种投加。处理前期混合配比成 100 mL 的混合液, 形成优势菌后, 逐步减少人工微生物组的投加量, 并根据每天监测的废水 COD 数值进行动态调整。

1.1.3 实验装置

实验所用 3 个反应池总体积为 15 L, 其中 2 个为好氧反应池, 总体积为 10 L, 1 个为厌氧反应池, 体积为 5 L, 实际进水总体积为 13 L。使用蠕动泵每日定时定量流加进水, 并且通过虹吸排水法进行排水, 进水量和排水量根据每天监测的 COD 和氨氮数值进行调整, 每日的进出水量约为 500 mL。好氧池中采用内置曝气头的方式进行持续曝气供氧。

1.2 方法

1.2.1 实验方法

采用相同运行参数和规模的两组厌氧/好氧(A/O)反应器进行对照实验。实验组额外添加调配好的复合人工微生物组, 对照组则添加同等体积的清水。每天定时取样测定出水氨氮及 COD 含量。

从实验组末端出水反应池中取样, 标记为样品 1; 按照同样方式从对照组中取样, 标记为样品 2。

1.2.2 分析方法

制革废水处理实验中, 氨氮使用纳氏试剂分光光度法测定, COD 使用快速消解分光光度法测定。

活性污泥的微生物群落分析实验中, DNA 使用 Nanodrop 进行定量分析, DNA 提取质量通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 利用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增后, 进行荧光定量分析, 扩增引物为 F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', R: 5'-CG-GACTACHVGGGTWTCTAAT-3', 采用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库。利用 Illumina MiSeq/NovaSeq 平台进行群落 DNA 片段双端测序分析。

DADA2 序列去噪: 利用 qiime cutadapt trim-paired 将序列的引物片段切除, 并将未能匹配的引物序列剔除; 接着利用 qiime dada2 denoise-paired 调用 DADA2 进行质控、去噪、拼接、去嵌合体等一系列操作。以上所涉及的步骤在每个文库中单独进行分析。在对各个数据库进行降噪处理后, 整合 ASVs 特征序列和 ASV 表格, 并剔除 singletons ASVs。

对测序结果开展 Alpha 多样性分析, 并在各个分类水平上进行物种组成分析。在 Alpha 多样性分析中, 丰富度用 Chao1 指数表征, 多样性用 Shannon 指数和 Simpson 指数表征^[12]。本次测序相对于整体样本的覆盖程度用菌群覆盖度 (Goods_coverage) 指数表示。

2 结果与分析

2.1 水质变化

经处理, 添加了复合人工微生物组的实验组最终出水 COD 含量基本稳定在 1 000 mg/L 左右, 氨氮测量值在 2.4 mg/L 左右, COD 降解率约为 82.60%, 氨氮去除效率约为 99.47%, 效果显著。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 序列长度分布

测序结果如图 1 所示,序列长度基本上都集中在 402-432 bp,平均长度 418 bp,能满足后续的分析需求。

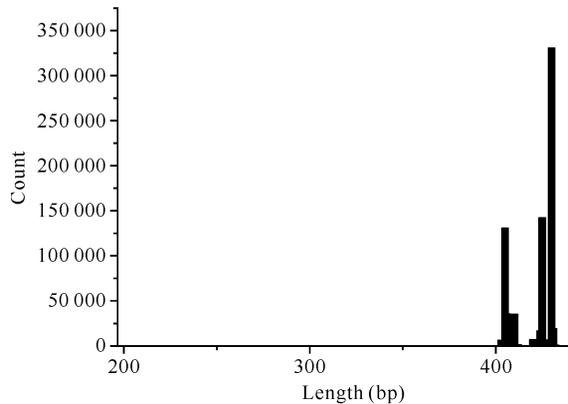


图 1 序列长度分布

Fig. 1 Length distribution of the sequence

表 1 污泥样品的高通量测序数据

Table 1 High-throughput sequencing data of sludge samples

样品编号 Sample ID	Input	Filtered	Denoised	Merged	Non-chimeric	Non-singleton
1	97 793	85 527	82 397	73 349	57 303	56 582
2	83 060	74 398	71 775	65 884	54 194	53 576

表 2 细菌群落多样性指数

Table 2 Diversity index of bacterial community

样品编号 Sample ID	Chao1	Simpson	Shannon	Goods_coverage
1	1 881.89	0.956 735	7.267 66	0.988 129
2	1 486.75	0.962 624	7.131 28	0.992 116

2.3.2 稀疏曲线

随着测序深度的增加,Chao1 指数和 Shannon 指数均呈现先上升后平稳的趋势,后期 Chao1 指数趋于平缓,Shannon 指数进入平台期,表明此测序深度有效,基本上已经完全覆盖样品中的所有微生物群落(图 2)。从图 2 也可以较为直观地看出,实验组的微生物群落较丰富。

2.4 物种组成分析

选取门水平上的物种组分进行对比,结果如图 3 所示。在 2 组样品中占比前 3 的门类从高到低依次为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)。其中 Proteobacteria 在实验组和对照组样品中占比分别为

2.2.2 DADA2 序列去噪

对经过去噪处理后的各样本的测序量进行统计学处理,结果如表 1 所示。处理结果满足后续的数据分析要求。

2.3 Alpha 多样性分析

2.3.1 Alpha 多样性指数

Alpha 多样性分析结果如表 2 所示。Goods_coverage 指数数值越高,表示覆盖程度越高^[13]。2 个样品的菌群覆盖度指数均大于 0.98,表明本次测序的覆盖度高。Chao1 指数越大,表明种群的丰富度越高^[14]。从表 2 可以看出,实验组微生物群落的丰富度高于对照组,说明添加的复合人工微生物能够在皮革废水处理系统中生长。Simpson 指数值越大,说明群落多样性越低^[15]。而 Shannon 指数相反,其值越高多样性越高。因此,综合对比实验组和对照组的 Shannon 指数和 Simpson 指数,可以反映出实验组微生物的多样性较高。

44.7%、63.22%。Proteobacteria 是城镇污水处理厂活性污泥系统和废水生物反应系统的主要种群,包含多种代谢种类,对废水中的碳、氮循环具有重要的作用,在降解有机物的同时,发挥脱氮除磷的作用^[16]。Bacteroidetes 在实验组中占比为 28.95%,在对照组中占比为 18.73%。复合人工微生物组的添加使 Bacteroidetes 比重明显高于对照组,而 Bacteroidetes 对废水中的有机物质具有很强的耐受性,可将复杂的有机物水解并降解为乳糖、乙酸、甲酸等^[17],具有水解污泥絮体的作用,同时具有去除 COD 和氨氮的作用。因此从一定程度上反映出添加复合人工微生物组有助于皮革废水的处理。综合分析,投加复合人工微生物组对于 3 种优势菌门的地位没有影响,只是比重上有波动,且对 COD 和氨氮有去除作用的菌门占比增加。

选取纲水平上的物种组分进行对比。2 组样品中比重在前 3 的纲均相同,分别为 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)、拟杆菌纲(Bacteroidia)和 α -变形杆菌纲(Alphaproteobacteria),可以认为是它们共有的优势菌(图 4)。

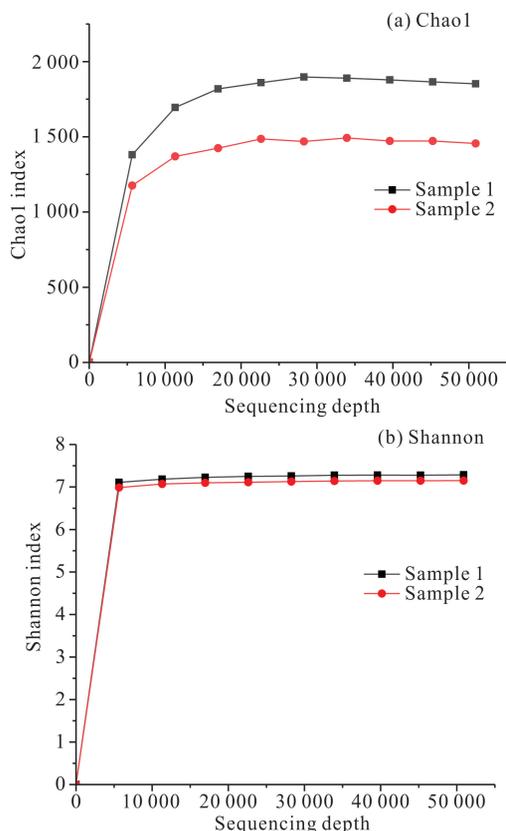


图2 细菌群落稀疏曲线

Fig. 2 Sparse curve of bacterial community

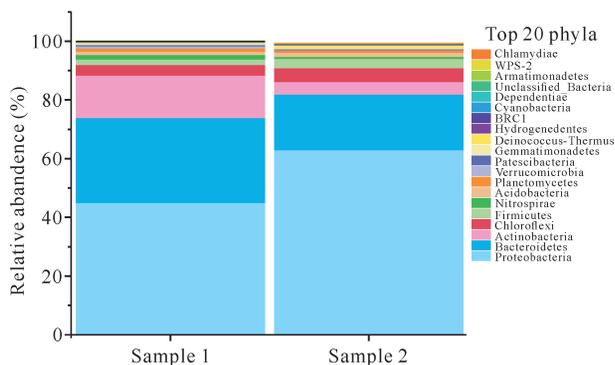


图3 细菌群落结构门水平上的组成

Fig. 3 Bacterial community composition at phylum level

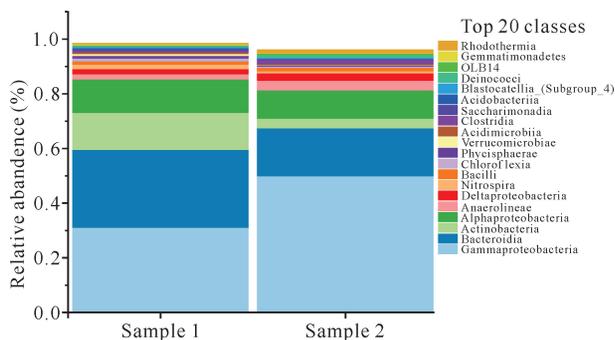


图4 细菌群落结构纲水平上的组成

Fig. 4 Bacterial community composition at class level

2组样品属水平丰度如图5所示。对照组的优势属为盐单胞菌属(*Halomonas*)和湖水盐细菌(*Planktosalinus*),占比分别为19.11%和13.80%。对照组的优势属均为耐盐类菌属,嗜盐菌是一类能在高盐环境下进行正常生长代谢的细菌^[18],其在对照组中占比高,反映出其能够适应制革废水的高盐含量环境,同时也能从侧面反映出制革废水属于高盐废水。实验组的优势属为藤黄色单胞菌属(*Luteimonas*)、陶厄氏菌属(*Thauera*)和微杆菌属(*Microbacterium*),占比分别为12.37%、7.13%和6.83%。*Microbacterium*是一类具有铬还原性的菌属,能降解毒性较高的Cr(VI),对废水中的Cr(VI)具有不错的降解能力^[19]。*Thauera*在两个组中差异较大,在对照组中所占比重较小,不到1%。然而,根据前人研究,*Thauera*被认为是一类反硝化功能菌属,其降解污染物的能力非常广泛,甚至对于通常难以被生物分解的芳香族化合物也有很强的降解作用^[20,21]。由此在一定程度上说明,额外添加的复合人工微生物组使皮革废水处理体系中的*Microbacterium*、*Thauera*占比大幅增加,对反应体系中污染物的降解起到了强化的作用。

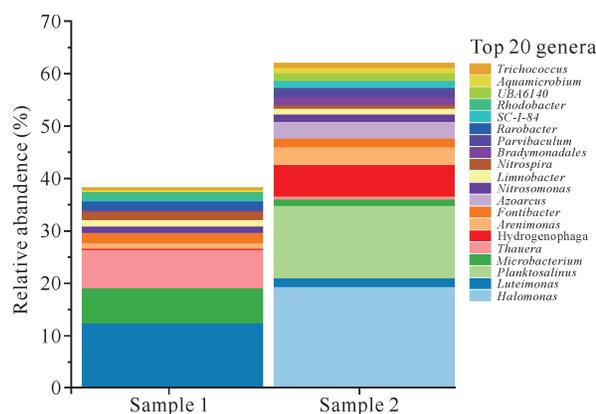


图5 细菌群落结构属水平上的组成

Fig. 5 Bacterial community composition at genus level

3 结论

(1)在制革废水的处理过程中投加复合人工微生物组,能够有效强化废水处理系统去除COD和氨氮的能力,并且对氨氮的处理效果显著,对制革废水中污染物的去除效果良好。

(2)投加复合人工微生物组后,废水处理体系中微生物群落的多样性和丰富度均提高,但体系中的优势菌门并未发生变化,变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)依

旧占据着主导地位。

(3)复合人工微生物组的投加对于属水平上的物种组成影响较大,陶厄氏菌属(*Thauera*)成为制革废水处理体系中最主要的优势菌属,对COD和氨氮的降解起到了良好的作用,对制革废水处理体系起到了一定的强化作用。

参考文献

- [1] 唐行鹏,孟宪礼,侯成林,等.某皮革厂皮革废水处理工程案例分析[J].环境工程,2016,34(2):63-68.
- [2] 胡静,张晓宁.制革废水脱氮处理技术的现状[J].西部皮革,2016,38(17):33-35.
- [3] 焦翔.制革废水处理工艺运行优化研究[D].杭州:浙江工业大学,2017.
- [4] 夏宏,杨德敏.制革废水及其处理现状综述[J].皮革与化工,2014,31(1):25-29.
- [5] 朱士彬.制革废水及其处理工艺现状分析[J].魅力中国,2020(35):355.
- [6] FENG J W, SUN Y B, ZHENG Z, et al. Treatment of tannery wastewater by electrocoagulation [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19(12): 1409-1415.
- [7] 宋怡明,徐少伟,宋昊,等.高级氧化法污水处理技术综述[J].山东化工,2019,48(24):211-213.
- [8] 吴岩,任相浩,寇莹莹,等.复合微生物菌剂处理高浓度氨氮废水的强化作用[J].科学技术与工程,2020,20(25):10544-10549.
- [9] 张丽丽,买文宁,王晓慧.制革废水处理技术的发展[J].工业用水与废水,2004(5):12-15.
- [10] 梁波,徐金球,关杰,等.生物法处理印染废水的研究进展[J].化工环保,2015,35(3):259-266.
- [11] 刘志刚,李东晓,戴志东,等.基于复合微生物菌剂的黑臭河道治理[J].科学技术与工程,2019,19(1):284-287.
- [12] LEGENDRE P, LEGENDRE L. Numerical ecology [M]. 2nd English edition. Amsterdam, the Netherlands; Elsevier Science B. V., 1998.
- [13] 贺婧,闫冰,李俊生,等.秦岭中段北坡不同海拔土壤中细菌群落的分布特征及区域差异比较[J].环境科学研究,2019,32(8):1374-1383.
- [14] CHAO A, MA M C, YANG M C K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates [J]. Biometrika, 1993, 80(1): 193-201.
- [15] 夏瑜,何绪文,文湘华.微生物群落多样性数学表征方法及其在污水处理系统研究中的应用[J].微生物学通报,2018,45(8):1778-1786.
- [16] 唐涛涛,李江,杨钊,等.污泥厌氧消化功能微生物群落结构的研究进展[J].化工进展,2020,39(1):320-328.
- [17] HILL V R, KAHLER A M, JOTHIKUMAR N, et al. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples [J]. Applied Environmental Microbiology, 2007, 73(13): 4218-4225.
- [18] 向菲,王弘宇,姜宇.嗜盐菌在高盐废水处理中的应用研究[J].山西建筑,2012,38(26):139-140.
- [19] 王春勇,张震斌,崔岩山,等. Cr(VI)还原菌 *Microbacterium* sp. QH-2 对铝氧化物吸附络影响的研究[J].农业环境科学学报,2021,40(4):801-805.
- [20] 毛跃建.废水处理系统中重要功能类群 *Thauera* 属种群结构与功能的研究[D].上海:上海交通大学,2011.
- [21] LIU B B, ZHANG F, FENG X X, et al. *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 55(2): 274-286.

Transformation of Ammonia Nitrogen in Tanning Wastewater by Artificial Microbiome and Comparative Analysis of Microbiome Change

LIU Yi¹, LIN Zudian¹, TANG Hongchi¹, SHI Yongkang², LIN Lihua¹, GUO Yuan¹,
WANG Zilong¹, PANG Hao^{1* *}

(1. State Key Laboratory of Non-Food Biomass Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Chemistry and Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi, 530007, China)

Abstract: In order to explore the impact of compound artificial microbial group on the microbial community in the tannery wastewater treatment system, based on the traditional anaerobic/aerobic (A/O) wastewater treatment process, the artificial microbial group was formed by adding microbial compound bacteria. The composite artificial microbiome was used to enhance wastewater treatment, and high-throughput sequencing technology was used to determine the sequence of bacterial 16S rRNA V3 – V4 mutation region in each sample. The sequencing data were analyzed by bioinformatics analysis, Alpha diversity analysis and species composition analysis. The results showed that after the addition of microbial group, the treatment effects of COD and ammonia nitrogen were improved. The removal rate of COD was about 82.60%, and the removal rate of ammonia nitrogen was about 99.47%. The results of high-throughput sequencing showed that the abundance and diversity of microbial communities in activated sludge were improved with the addition of microbial groups, and the proportion of pollutant degradation functional bacteria was increased. The genus *Thauera* became the most dominant one. The addition of composite artificial microbial group has certain potential for strengthening tannery wastewater treatment.

Key words: artificial microbiome; tannery wastewater; biological nitrogen removal; high-throughput sequencing; microbial community structure

责任编辑:梁 晓



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxkxyxb@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxxk.ijournal.cn/gxxkxyxb/ch>