

# 淡化浓海水日晒盐田原核微生物多样性分析

秦乐宁, 黄鑫洁, 朱大玲, 侍亚敏, 唐娜, 王学魁

(天津市卤水化工与资源生态化利用重点实验室 化工与材料学院 天津科技大学, 天津 300457)

**摘要:** 海滨日晒盐田具有稳定且独特的生态系统。淡化浓海水排入盐田制盐, 对盐田生态系统的稳定及盐田的可持续发展具有一定的影响。本研究分析天津汉沽淡化浓海水日晒盐田不同季节不同盐度盐池原核微生物多样性现状及群落结构变化, 以期评估淡化浓海水对盐田原核微生物群落影响提供理论依据。采用温度梯度凝胶电泳和序列测定等方法, 分析不同月份不同盐度盐池中细菌和古菌的多样性与群落结构变化。分别采用香农-威纳指数、加权丰富度指数和均匀度指数分析盐田微生物群落多样性、丰富度和均匀度。结果表明, 淡化浓海水和溴后水中均未检测出细菌和古菌。不同月份不同盐度盐池样本中细菌多样性变化不大, 优势菌主要为  $\gamma$ -变形菌门( $\gamma$ -Proteobacteria)中的 *Spiribacter salinus* 和 *Pseudoalteromonas* sp.; 古菌仅出现在盐度最高的VII号盐池中, 优势古菌为广古菌门(Euryarchaeota)的 *Halogeometricum* sp.。天津汉沽淡化浓海水日晒盐田中细菌的多样性和丰富度较低, 春夏两季细菌群落结构较为稳定, 秋冬季节细菌群落结构变化明显。盐度不同的盐池中细菌群落结构变化较大, 随着盐度逐渐升高, *Spiribacter salinus* 逐渐取代 *Pseudoalteromonas* sp.成为占主要地位的优势菌种。

**关键词:** 淡化浓海水; 日晒盐田; 原核微生物多样性; PCR-TGGE

中图分类号: Q-9

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2019)05-0027-09

DOI: 10.11759/hyxx20190115003

日晒盐田由一系列盐度不同的盐池组成, 海水逐渐蒸发, 使得卤水浓度逐渐提高, 特殊的盐度条件使得日晒盐田存在着独特的生态系统。日晒盐田生态系统中主要的生物群落包括浮游植物、浮游动物和原核微生物等。其中, 藻类等浮游植物和一些光合细菌作为生产者, 卤虫等浮游动物作为消费者, 而嗜盐微生物则作为分解者<sup>[1]</sup>。良好且稳定的生态系统, 对原盐品质及盐田的可持续发展具有深远的影响。

在低盐度(<7%)盐池中, 浮游植物群落的种类最为丰富, 数量也最多。浮游植物为卤虫等浮游动物提供饵料。当盐池中的氮、磷等营养盐质充足时, 藻类会在池底形成垫状结构, 有效防止盐池渗漏。中盐度(<15%)盐池中, 卤虫及卤蝇幼虫等嗜盐动物数量增加。卤虫既可以净化卤水, 又可为高盐区的嗜盐微生物提供营养物质。低、中盐度盐池卤水中的微生物可以分解卤水中的有机质, 且有助于碳酸钙和硫酸钙的析出, 可提高原盐中氯化钠产量和质量<sup>[2-3]</sup>。高盐度(>20%)盐池中, 几乎仅有嗜盐微生物生存下来。含有类胡萝卜素的红色嗜盐微生物对卤水着色, 有效提高卤水对光的吸收率, 增加卤水蒸发量提高蒸发效率, 可提高原盐的产量达 9.14%<sup>[1]</sup>。此外, 结晶池底层的结晶盐使得反光率增加, 卤水蒸气压处于最低值, 如

果没有红色嗜盐菌的着色, 蒸发过程很难进行<sup>[4-6]</sup>。

近年来, 海水淡化与制盐相结合技术迅速发展<sup>[7-9]</sup>。天津汉沽日晒盐田为淡化浓海水盐田, 其海水淡化工艺为低温多效法(Multi-Effect Distillation, MED)<sup>[10]</sup>。淡化浓海水的理化性质较正常海水有所不同, 其盐度约为正常海水的两倍<sup>[11]</sup>。低温多效法产生的淡化浓海水温度比海水高 5~15℃, 这会对卤水的溶氧造成影响。此外, 由于海水淡化过程要经过脱氧、加氯、添加阻垢剂、还原剂等预处理过程, 使得淡化浓海水 pH 值降低到 6.5 左右, 且铜、镍、锌、铬、钼、铁

收稿日期: 2019-01-15; 修回日期: 2019-03-10

基金项目: 天津市科技支撑计划项目(15ZXCXSF00040); 天津市自然科学基金项目(17JCBJC22900); 青岛海洋科学与技术国家实验室开放基金项目(0F2015N015); 天津科技大学青年教师创新基金项目(2015LG10); 国家大学生创新训练计划项目(201810057043)

[Foundation: Key Technologies R & D Program of Tianjin, No. 15ZXCXSF00040; Tianjin Nature Science Foundation, No.17JCYBJC22900; Open Fund of Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, No. 0F2015N015; Youth Innovation Foundation of Tianjin University of Science and Technology, No. 2015LG10; National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship, No. 201810057043]

作者简介: 秦乐宁(1994-), 女, 山东淄博人, 硕士生, 主要从事嗜盐微生物研究, Email: qinlening@126.com; 朱大玲, 通信作者, 副研究员, 电话: 022-60601305, Email: zhudaling@tust.edu.cn

等金属离子含量高于天然海水平均值。经海水淡化预处理和淡化过程,海水中原有的浮游动植物及原核微生物等都难以存活下来。因此,利用海水淡化浓海水直接排入日晒盐田制盐对原有盐田生态系统造成较大冲击,其较难自动恢复到正常平衡状态。

日晒盐田生态系统中原核微生物作为主要的生物群落,发挥着重要的作用。随着盐度的逐渐变化,各盐池中的生物群落组成也在逐渐演变<sup>[12-15]</sup>。在盐湖、日晒盐场、南极湖泊等高盐环境中,都有原核微生物存在<sup>[16]</sup>。高盐环境中原核微生物可分为轻度嗜盐微生物、中度嗜盐微生物、极端嗜盐微生物和耐盐微生物<sup>[17]</sup>,其中,极端嗜盐微生物包括极端嗜盐细菌和极端嗜盐古菌两大类。虽然如今是焦磷酸测序技术的时代,但 PCR-指纹图谱技术因所需样品量少等特点仍被广泛应用于环境微生物多样性的研究中,常被用来分析不同空间和时间中微生物群落的变化<sup>[18-22]</sup>。因此,本文采用温度梯度凝胶电泳(TGGE)技术,对天津汉沽淡化浓海水日晒盐田原核微生物多样性进行研究,分析不同盐度盐池在不同月份中的细菌和古菌多样性,对不同季节和不同盐度盐池中原核微生物群落结构变化进行分析,以期评估淡化浓海水对盐田原核微生物群落影响提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品采集

2016年10月至11月和2017年4月至9月期间,每月1次,从天津汉沽日晒盐场(118°3'11"E, 39°15'43"N)采集淡化水、溴后水及七个不同盐度的盐池卤水。因盐场每天走水,各盐池盐度几乎不变,各盐池盐度如表1所示。盐池水面下10 cm处取卤水200 mL,经孔径为200目的滤网滤除浮游动物和浮游植物后,装入无菌的聚乙烯瓶,快速运回实验室进行后续试验。

表1 不同盐池盐度

Tab. 1 Salinity of different ponds

盐池编号	盐度/°Bé
I	6
II	9
III	12
IV	15
V	18
VI	21
VII	24

### 1.2 DNA提取

将200 mL水样经0.22 μm孔径的醋酸纤维膜过滤,收集水样中的原核微生物。DNA提取采用酚氯仿抽提法<sup>[23]</sup>,具体步骤如下:将收集的菌体溶于200 μL TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0),加入3 μL溶菌酶(50 mg/mL),65°C水浴15 min。水浴结束后加入5 μL蛋白酶K(20 mg/mL),以及25 μL 10% SDS溶液,37-56°C水浴30 min。之后加入2 μL RNase,37°C水浴30 min。加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(V:V:V=25:24:1),上下颠倒数次后,10000 r/min离心10 min。吸取上层水相,再加入等体积氯仿:异戊醇(V:V=24:1),上下颠倒数次,10000 r/min离心10 min,吸取上层水相。加入1/40体积的乙酸钠(3 mol/L, pH 5.2)及2.5倍体积预冷的无水乙醇,轻轻混匀,-20°C放置过夜。10000 r/min离心15 min,弃上清。经70%乙醇洗涤,乙醇蒸干后,溶于30 μL TE buffer,-20°C保存备用。

### 1.3 PCR扩增

利用PCR技术分别对细菌和古菌16S rDNA进行扩增。本实验采用的细菌通用引物为GC-357F(5'-CG-clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。上游引物的5'端连接专为TGGE设计的CG-clamp(CGCCCCCGCGCCCGCGCCCCGGCCCCGCCCCCGCCCC)<sup>[24]</sup>。反应体系25 μL:上游引物(10 μmol/L) 1 μL,下游引物(10 μmol/L) 1 μL, Premix Taq<sup>TM</sup> 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10 μL, DNA模板1 μL。扩增条件为:94°C预变性5 min;94°C变性45 s,57°C退火45 s,72°C延伸1 min,循环35次;72°C延伸10 min。古菌通用引物采用Arc-GC-344F(5'-ACGGGGYGCASAGKCGVGA-3')和Arc958R(5'-YCCGGCGTTGAVTCCAATT-3')。上游引物的5'端连接专为TGGE设计的CG-clamp(CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGCGGGGGGCACGGGGG)<sup>[25]</sup>。反应体系25 μL:上游引物(10 μmol/L) 1 μL,下游引物(10 μmol/L) 1 μL, Premix Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa Taq<sup>TM</sup> Version 2.0 plus dye) 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10 μL, DNA模板1 μL。扩增条件为:94°C预变性5 min;94°C变性45 s,52°C退火45 s,72°C延伸1 min,循环35次;72°C延伸10 min。

PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统检测,条带单一且与预期片段大小相近的PCR产物用于下一步TGGE分析。

### 1.4 TGGE分析及测序分析

PCR扩增产物进行TGGE分析。采用Bio-Rad

TGGE 分析系统, 实验条件如下: 细菌 PCR 扩增产物采用 10%(w/v)聚丙烯酰胺(30:1)变性胶, 古菌 PCR 产物采用 6%(W/V)的聚丙烯酰胺(30:1)变性胶, 变性温度范围为 54~66°C, 变温速率 3°C/h, 1×TAE 电泳缓冲液(Tris Acetate-EDTA Buffer)中进行电泳, 电压 130 V, 电泳时间 4 h, 具体操作按照仪器使用手册说明进行。进样量: 10 μL PCR 产物+1 μL 10× DNA Loading Buffer。电泳结束后, TGGE 凝胶经 0.5 μg/mL 溴化乙锭(EB)染色 10 min, 经 TAE 缓冲液漂洗后, 凝胶成像系统拍照记录进行分析。

对有代表性优势菌的条带进行切取, 采用聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒进行回收, 0.5 μL 的回收产物作为模板进行 PCR 扩增。使用无 CG-clamp 细菌(357F, 518R)和古菌(Arc-344F, Arc-958R)通用引物, PCR 扩增条件如上文所示。扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 送专业测序公司(北京奥科鼎盛生物科技有限公司)进行测序。测序结果通过 NCBI 数据库 Blast 比对分析, 使用 MEGA 7.0.14 软件, 采用 NJ 法构建系统进化树, Bootstrap 置信值估算重复次数 1 000 次<sup>[26]</sup>。

## 1.5 多样性指数分析

使用 Quantity one 4.6.2 软件对凝胶成像系统获得的照片进行数字化分析, 可得各泳道的条带数以及各条带的相对光密度、相对迁移率, 用于多样性指数计算及不同样本中原核微生物群落结构的比较。

利用香农-威纳指数(Shannon-Weiner index,  $H$ )、加权丰富度指数(Range-weighted richness index,  $R_r$ )和均匀度指数(Pielou evenness index,  $E$ )分析微生物群落多样性、丰富度和均匀度。香农-威纳指数( $H$ )、丰富度指数( $R_r$ )和均匀度系数( $E$ )计算公式<sup>[27-28]</sup>如下:

$$H = -\sum (ni/N) \log(ni/N),$$

$$R_r = (S^2 \times Tg),$$

$$E = H / \log S,$$

其中,  $ni$  指各条带的相对光密度,  $S$  为样本中的条带总数,  $N$  为样本中所有条带相对光密度之和。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 PCR-TGGE 图谱分析

本研究在 2016—2017 年间近一年的时间里连续监测了天津汉沽日晒盐场不同盐度盐池卤水中的原核微生物变化。其中, 12 月—3 月处于严冬季节, 气温低导致蒸发量非常低, 部分盐池结冰且每年这个时期盐池不走水, 所以这四个月的样品没有采集。本

研究共 8 批次, 每批次 9 个样品进行了细菌和古菌 16S rRNA 基因的 PCR-TGGE 分析。

据已有报道, 海岸带水体中细菌的数量为  $1.0 \times 10^{26}$ , 平均丰度可达  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>3</sup><sup>[29]</sup>。而在用低温多效法进行海水淡化之前, 需对海水进行加氯除菌、过滤等预处理<sup>[30]</sup>。这就导致原本可随海水进入日晒盐田的微生物在海水淡化过程中难以存活。采用细菌和古菌的通用引物分别对淡化水及溴后水样品进行 PCR 扩增, 结果未出现任何扩增条带, 表明在经过海水淡化前预处理和淡化过程、吹溴过程之后, 淡化浓海水中的原核微生物数量非常少, 难以被检测到。该结果与理论相符, 淡化浓海水经引水渠引入日晒盐场后, 微生物需适应淡化浓海水的性质在卤水中逐渐繁殖。

不同盐度的 7 个盐池卤水中的细菌 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增产物经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测, 均获得了片段大小约 200 bp 的阳性结果。对 7 个盐池各样品中古菌 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增结果发现盐度最高的 VII 号池 PCR 扩增呈阳性结果, 获得约 600 bp 的片段, 其他盐池 PCR 扩增呈阴性结果, 表明仅高盐度 VII 号池卤水中有古菌存在。

不同盐池在 4—11 月卤水样品的细菌 16S rDNA V3 区 PCR-TGGE 结果如图 1a 所示。从图上可看出每条泳道分别有 1~8 个条带不等, 其中, 较为优势的条带有 3 条, 分别为 1 号、2 号和 8 号, 在盐田微生物群落演替中占据主要地位。4 月的 7 个盐池样品中均有 1 号和 2 号条带; 5 月的 1~7 号盐池样品中 1 号条带和 2 号条带均有存在, 其中 I 号盐池中 2 号条带是优势条带, 8 号条带出现在 II、IV~VI 号等 4 个盐池样品中; 6—7 月的 7 个盐池中, 1 号和 2 号条带均有出现, 8 号条带出现在 I~III 号盐池样品中, 3 号和 4 号条带出现在 7 月的 I 号盐池样品中; 8 月各盐池样品的条带数较其他月份有了较为明显的变化, 1 号条带出现在除 III 号盐池外的其他盐池样品中, 2 号条带仅出现在 I、VI、VII 号盐池样品中, 8 号条带出现在 II、III 号盐池样品中, 9~13 号条带出现在 VI 号盐池样品中; 9—11 月各盐池样品中 1 号条带均有出现, 除 9 月的 IV、VI、VII 号盐池样品和 10 月的 I、II 号盐池样品, 2 号条带在其他盐池样品中均有出现。14 号和 15 号条带, 是为了验证出现在相同位置的条带即代表同一个菌种, 经切胶测序, 14 号和 15 号条带序列分别与 1 号、2 号序列相同。TGGE 图谱中, 每一个

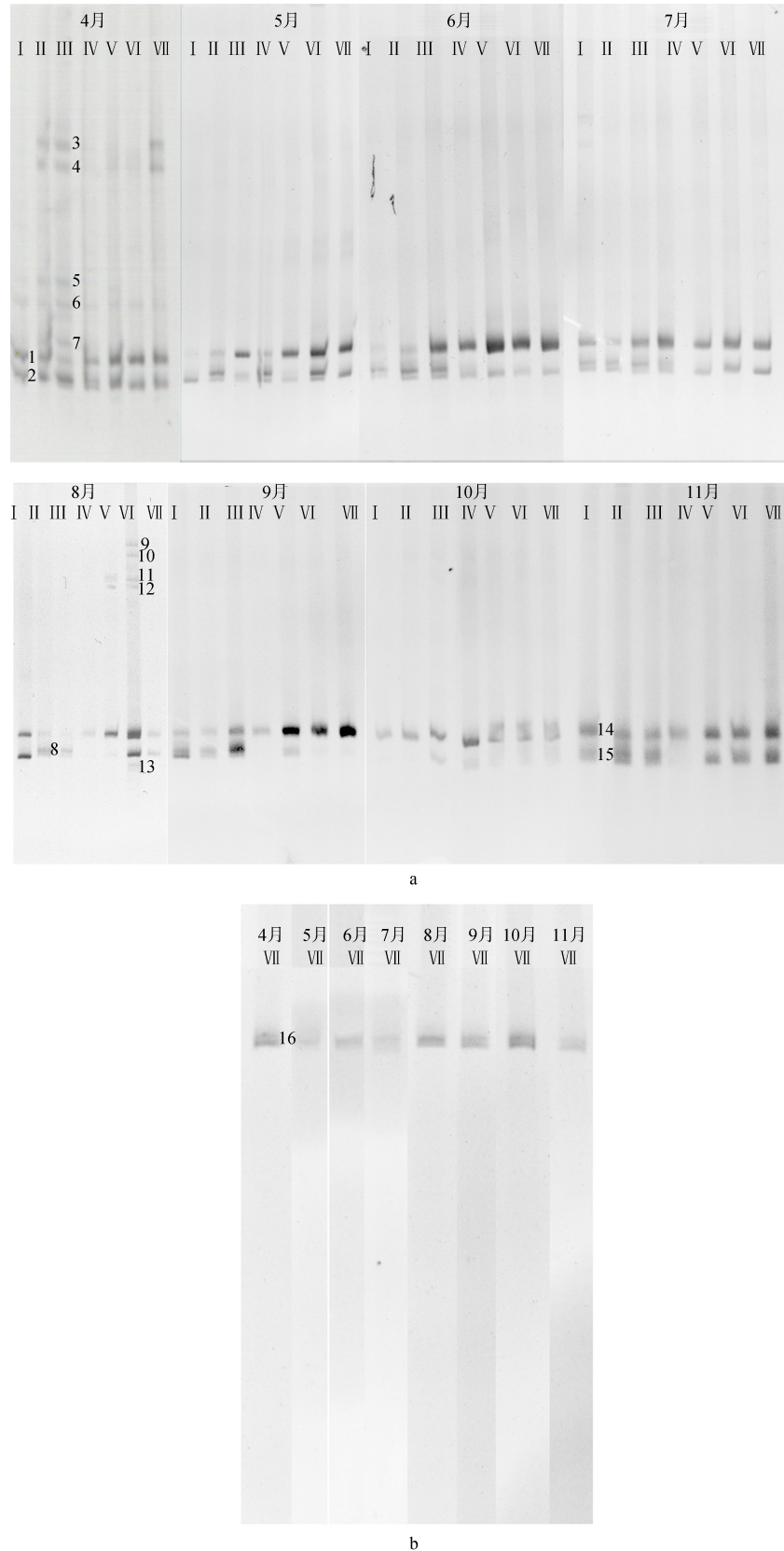


图1 天津汉沽日晒盐场不同盐池细菌(a)和古菌(b)16S rDNA 的 TGGE 图谱  
 Fig. 1 TGGE profile of bacteria (a) and Archaea (b) based on 16S rDNA genes of different ponds in the solar saltern  
 注: 不同盐池编号标示在凝胶上方, 不同条带在相应位置进行标示并编号

条带即代表一个优势菌种或一个操作单元(Operational taxonomic unit, OTU), 一个泳道中的条带数目越多, 则说明这个样本中生物多样性越丰富, 条带信号越亮, 则说明该种属的丰度越高<sup>[30-31]</sup>。根据所得到的 TGGE 图谱中各条带的相对亮度, 可直观地看出不同月份各盐池中的优势菌种的相对多寡。

使用 Quantity One 4.6.2 对 TGGE 图谱中条带的相对亮度进行定量分析。针对在相同月份中不同盐度样品的分析发现, 1 号条带在低盐度盐池中亮度较低, 随着盐度升高亮度增大。2 号条带在较低盐度盐池样本中亮度较大, 随盐度升高, 亮度逐渐降低。8 号条带几乎仅出现在中低盐度(<15°Be)的盐池中。此外, 比较 TGGE 图谱发现, 4 月各盐池中的条带数相对较多, 但相对亮度较其他月份较低; 8 月的 VI 号盐池(盐度 21°Be), 条带数明显高于其他样品, 其中 11、12 号条带仅出现在该样本中。VI 号盐池在 4—11 月卤水样品的古菌 16S rDNA V3 区 PCR-TGGE 结果如图 1b 所示, 古菌 TGGE 图谱中仅有一个条带, 表明在高盐度条件下菌群中古菌的多样性低。

## 2.2 TGGE 图谱中条带的鉴定

TGGE 图谱中 16 个条带(15 个细菌条带和 1 个古菌条带)进行了切胶、纯化、PCR 扩增及测序, 结果 12 个条带测序成功。本研究中所得的序列均已提交

至 GenBank 数据库, 登录号为 MK182943-MK182954。获得的序列分别在 GeneBank 数据库中进行 BLAST 同源性比对, 比对结果见表 2。结果表明所有的条带序列与 GeneBank 中已公布的菌种序列的相似性为 90%~100%, 相似性的菌株都来源于海水、含盐废水、海滩、盐湖等高盐环境。细菌主要为  $\gamma$ -Proteobacteria、 $\alpha$ -Proteobacteria 和 Actinobacteria 三大类, 其中优势菌为  $\gamma$ -Proteobacteria, 1 号和 14 号条带的优势菌皆为 *Spiribacter salinus*, 2 号和 15 号条带的优势菌皆为 *Pseudoalteromonas* sp., 16 号条带的优势古菌为 *Halogeometricum* sp., 相似性高达 99%。采用 NJ 法构建条带序列的系统进化树如图 2 所示, 表明多数条带序列属于变形菌门, 主要包括  $\alpha$ -Proteobacteria(5 个条带)和  $\gamma$ -Proteobacteria(4 个条带), 少数条带序列属于放线菌门 Actinomycetales(1 个条带)。1 个古菌条带鉴定为广古菌门(Euryarchaeota)几何菌属(*Halogeometricum* sp.)菌株。

## 2.3 多样性指数分析

本研究采用 Quantity one 4.6.2 软件将 TGGE 图谱中的条带信息数字化, 分别从香农-威纳指数( $H'$ )、加权丰富度指数( $R_r$ )和均匀度系数( $E$ )三个多样性指标对天津汉沽淡化浓海水盐田原核微生物的多样性、丰富度和均匀度进行分析, 结果如图 3 所示。

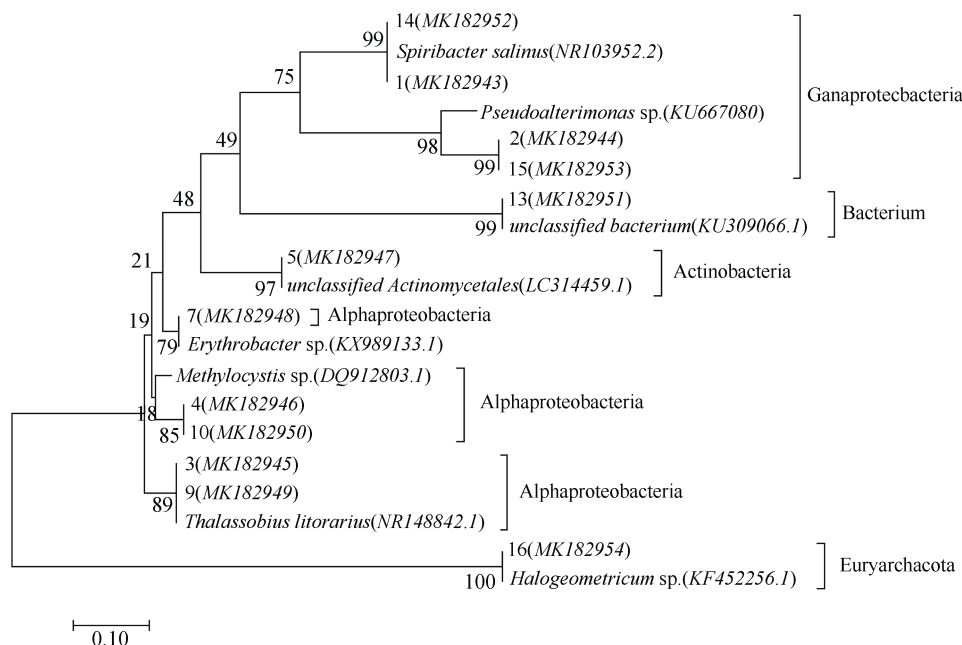


图 2 NJ 法构建的条带基因序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method based on the 16S rDNA gene sequence of bands



表 2 TGGE 凝胶切胶回收条带序列与 GeneBank 中最相近菌种的序列 BLAST 比对结果

Tab. 2 BLAST results of the sequence of the respective bands cut from TGGE gels to the closest relatives in the GeneBank database

条带编号	GenBank 登录号	聚类组	相似序列	同源性	相似序列来源
1	MK182943	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Spiribacter salinus</i> (NR103952.2)	96%	Aquatic hypersaline environment
2	MK182944	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (KU667080.1)	97%	Coastal water
3	MK182945	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Thalassobius Titorarius</i> (NR148842.1)	100%	Sea-tidal flat sediment
4	MK182946	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Methylocystis</i> sp. (DQ912803.1)	90%	salinity wastewater
5	MK182947	Actinobacteria	unclassified Actinomycetales (LC314459.1)	97%	Coastal fish-farming area
7	MK182948	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Erythrobacter</i> sp. (KX989133.1)	97%	Shallow hyperthermal system
9	MK182949	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Thalassobius Titorarius</i> (NR148842.1)	99%	Sea-tidal flat sediment
10	MK182950	$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Methylocystis</i> sp. (DQ912803.1)	90%	salinity wastewater
13	MK182951	Bacterium	Unclassified bacterium (KU309066.1)	99%	Saline microbial mat
14	MK182952	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Spiribacter salinus</i> (NR103952.2)	96%	Aquatic hypersaline environment
15	MK182953	$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (KU667080)	97%	Coastal water
16	MK182954	Euryarchaeota	<i>Halogeometricum</i> sp. (KF452256.1)	99%	Hypersaline lake

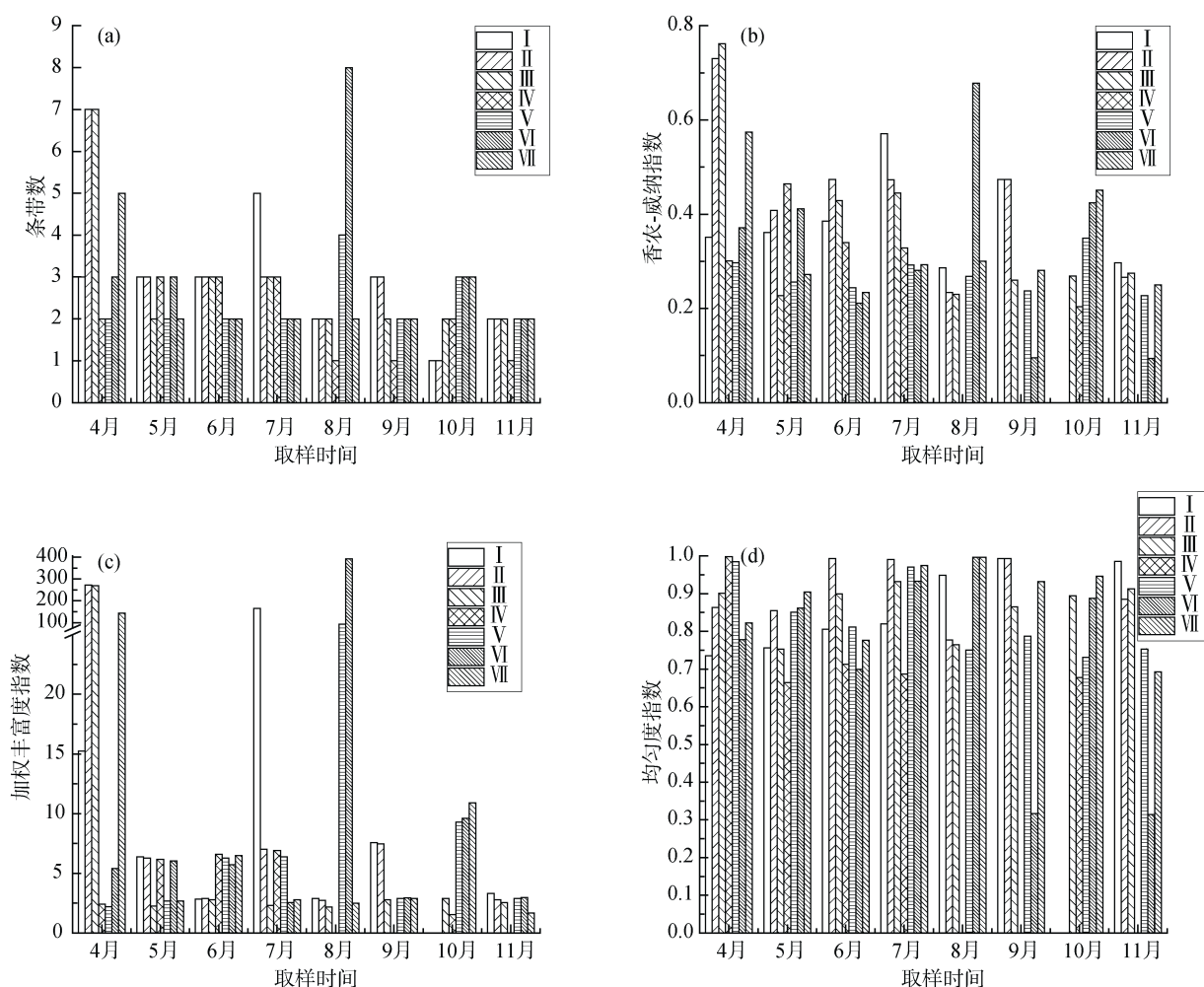


图 3 基于 TGGE 图谱不同样品细菌多样性的相关指标

Fig. 3 Correlative indexes of bacterial diversity for different samples based on TGGE patterns

注: a: 条带数; b: 香农-威纳指数; c: 加权丰富度指数; d: 均匀度指数

本研究采用香农-威纳指数表示原核微生物的多样性, 香农-威纳指数越高, 则说明该样本生物多样性越高。针对同一盐度的样本比较, 4月的香农-威纳指数( $H$ )明显高于其他月份, 推测原因可能为水温较为适中, 约为 15~22℃, 适宜在较低温度环境中生存的菌种得以繁殖, 因此菌种多样性较高。在中盐度盐池(Ⅱ~Ⅳ号盐池)中, 5—7月的香农-威纳指数( $H$ )要高于 8-11月, 这说明在春季到初夏, 水温适合中盐度盐池中细菌的生长繁殖。盐度较高的盐池, 在夏季香农-威纳指数( $H$ )较低, 而在温度相对较低的春季和秋季升高。推测原因为夏季由于气温高, 光照时间长, 日间高盐度盐池中卤水温度最高可达到 50℃, 高温不利于细菌的生长与繁殖。

加权丰富度指数( $R_r$ )小于 10, 则说明该环境不适宜微生物生存; 丰富度指数大于 30, 则说明该环境非常适宜微生物生存<sup>[27]</sup>。本实验中 4月的Ⅱ、Ⅲ、Ⅶ号样本, 7月的Ⅰ号样本, 八月的Ⅴ、Ⅵ号样本的丰富度指数较高外, 大多数样本的丰富度指数( $R_r$ )都低于 10, 这说明盐田环境不适宜微生物的生存繁殖, 只有耐受性强的极端嗜盐和耐盐微生物的生物量较高。马灌楠<sup>[32]</sup>等 2012年采用 DGGE 法对普通日晒盐田的微生物群落进行了分析, 所有样本的加权丰富度指数在 12.15~20.08 之间。与普通日晒盐田相比, 淡化浓海水盐田的微生物的丰富度指数较低, 且普通日晒盐田中的优势种群与本文中的优势种群不同, 这都表明淡化浓海水引入盐田对盐池中原有的微生物群落造成了一定的影响。

针对同一月份内均匀度系数( $E$ )分析发现, 4—8月间各样本的均匀度系数相差不大, 说明在这几个月中, 同一盐度盐池中细菌群落结构比较稳定, 变化不显著。且同一个月份不同盐度盐池中的细菌群落结构也比较稳定, 变化不显著。9—11月间各样本的均匀度系数变化较大, 说明在温度逐渐降低的秋冬季节, 盐田中各盐池的细菌群落结构发生了变化。盐度不同的盐池中细菌群落结构变化较大, 随着盐度逐渐升高随着盐度逐渐升高, *Spiribacter salinus* 逐渐取代 *Pseudoalteromonas* sp. 成为占主要地位的优势菌种。

### 3 结论

本研究采用 PCR-TGGE 和测序方法, 分析了天津汉沽淡化浓海水盐田原核微生物多样性现状, 了解了一年不同盐度盐池的原核微生物群落结构变化。结果表明淡化浓海水和溴后水中, 原核微生物量

非常少, 经 PCR 扩增未被检测到。淡化浓海水排入日晒盐田后, 微生物逐渐在卤水中繁殖。

在天津汉沽淡化浓海水日晒盐田中, 优势细菌主要为  $\gamma$  变形菌门( $\gamma$ -Proteobacteria)中的 *Spiribacter salinus* 和 *Pseudoalteromonas* sp.。优势古菌主要为广古菌门(Euryarchaeota)中的 *Halogeometricum* sp. 仅出现在盐度最高的Ⅶ号盐池中。

香农-威纳指数分析结果表明中盐度盐池中原核微生物的多样性春季高于夏季。丰富度指数较低表明盐田环境不利于微生物的生长和繁殖。均匀度系数分析结果表明春夏季节各盐池中细菌群落结构较稳定, 秋冬季节盐度不同的盐池中细菌群落结构变化较大, 随着盐度逐渐升高, *Spiribacter salinus* 逐渐取代 *Pseudoalteromonas* sp. 成为占主要地位的优势菌种。

#### 参考文献:

- [1] 李爱民, 王威, 张志香, 等. 盐田良性生态系统中嗜盐菌的研究[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 1994(4): 68-72.  
Li Aimin, Wang Wei, Zhang Zhixiang, et al. Studies on halophilic bacteria in a balanced salt pan ecosystem[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 1994(4): 68-72.
- [2] Moral A D, Roldan E, Navarro J, et al. Formation of calcium carbonate crystals by moderately halophilic bacteria[J]. Geomicrobiology Journal, 1987, 5(1): 79-87.
- [3] Rivadeneyra M A, Delgado R, Párraga J, et al. Precipitation of minerals by 22 species of moderately halophilic bacteria in artificial marine salts media: influence of salt concentration[J]. Folia Microbiologica, 2006, 51(5): 445-453.
- [4] 李岍然, 白洁. 盐田生态系统结构分析[J]. 海洋科学, 1998, 22(5): 36-39.  
Li Kuiran, Bai Jie. Analysis of structure on salt field ecosystem[J]. Marine Sciences, 1998, 22(5): 36-39.
- [5] 李娜. 浓海水理化生态特性及对盐业生产影响的研究[D]. 天津: 河北工业大学, 2006.  
Li Na. Study on physico-chemical zoology characteristic of desalinated seawater and effect in salt technics[D]. Tianjin: Hebei University of Technology, 2006.
- [6] Dieter G, Jacob S, Luise G, et al. Microbial mats and physicochemistry in a saltern in the Bretagne (France) and in a laboratory scale saltern model[J]. Fems Microbiology Letters, 1989, 62(3): 151-161.
- [7] 朱梁, 柴子华. 海水淡化与制盐相关性研究初探[J]. 中国盐业, 2016(24): 30-34.  
Zhu Liang, Chai Zihua. Preliminary study on correla-

- tion between seawater desalination and salt making [J]. China Salt Industry, 2016(24): 30-34.
- [8] 邢立谦, 陈延辉. “发电—海水淡化—制盐及盐化工”技术发展展望[J]. 盐业与化工, 2012, 41(3): 1-3.  
Xing Liqian, Chen Yanhui. Forecast of technology development for electricity generation-sea water desalination-salt and salt chemical engineering[J]. Journal of Salt & Chemical Industry, 2012, 41(3): 1-3.
- [9] 欧阳琼梅. 海水淡化及制盐循环经济项目分析[J]. 中国井矿盐, 2014(4): 40-43.  
Ouyang Qiongmei. Desalination of sea water and analysis on the recycling economy project of salt production[J]. China Well & Rock Salt, 2014(4): 40-43.
- [10] 于海淼. 天津北疆发电厂循环经济项目可行性研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.  
Yu Haimiao. Research on recycling economy project feasibility in Tianjin Beijing power plant[D]. Tianjin: Tianjin University, 2012.
- [11] 王涛, 王亮, 张亚南, 等. 淡化副产浓海水对滩晒制盐影响研究[J]. 盐业与化工, 2014, 43(11): 20-24.  
Wang Tao, Wang Liang, Zhang Yanan, et al. Study on the influence of concentrated seawater after desalination on saltern production[J]. Journal of Salt and Chemical Industry, 2014, 43(11): 20-24.
- [12] Pedrós-Alió C, Calderón-Paz J, Maclean MH et al. The microbial food web along salinity gradients[J]. Fems Microbiology Ecology, 2000, 32(2): 143-155.
- [13] Benlloch S. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(6): 349-360.
- [14] Ruth AS, Eby FS, Gunnar B. Virioplankton community structure along a salinity gradient in a solar saltern[J]. Extremophiles, 2003, 7(5): 347-351.
- [15] Jesse D, Mark C, Abraham G, et al. Patterns of microbial diversity along a salinity gradient in the Guerrero Negro solar saltern, Baja CA Sur, Mexico[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4(399): 399.
- [16] Oren A. Halophilic microbial communities and their environments[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 33: 119-124.
- [17] Kushner DJ. The Halobacteriaceae[A]. Sokatch J R, Ornston L N, Ed. The Bacteria, a Treatise on Structure and Function, Vol VIII[M]. San Diego: Academic Press, 1985: 171-206.
- [18] Kabilan M, Sivaraman C, Bhakti BS, et al. Comparison of bacterial diversity from solar salterns and a simulated laboratory study[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(2): 995-1005.
- [19] Manel BA, Fatma K, Najla M, et al. Prokaryotic diversity in a Tunisian hypersaline lake, Chott El Jerid[J]. Extremophiles Life Under Extreme Conditions, 2016, 20(2): 1-14.
- [20] Meglio LD, Santos F, Gomariz M, et al. Seasonal dynamics of extremely halophilic microbial communities in three Argentinian salterns[J]. Fems Microbiology Ecology, 2016, 92(12)
- [21] Zhang JJ, Ma GN, Deng YG, et al. Bacterial Diversity in Bohai Bay Solar Saltworks, China[J]. Current Microbiology, 2016, 72(1): 1-9.
- [22] Emilio C, Ramon M, Susana B, et al. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(6): 338-348.
- [23] 朱大玲, 唐啸龙, 张宝玉, 等. 一株海藻多糖降解菌的分离鉴定及产酶条件优化[J]. 海洋科学, 2017, 41(8): 99-107.  
Zhu Daling, Tang Xiaolong, Zhang Baoyu, et al. Isolation identification and enzyme-producing conditions analysis of a seawater polysaccharides-degrading bacteria[J]. Marine Sciences, 2017, 41(8): 99-107.
- [24] Zhang D, Li W, Zhang S, et al. Evaluation of the impact of DNA extraction methods on BAC bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(1): 44-49.
- [25] Pires A, Cleary D, Almeida A, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis and barcoded pyrosequencing reveal unprecedented archaeal diversity in mangrove sediment and rhizosphere samples[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5520.
- [26] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology & Evolution, 2011, 28(10): 2731.
- [27] Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, et al. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology[J]. Environmental Microbiology, 2010, 10(6): 1571-1581.
- [28] Kabilan M, Sivaraman C, Bhakti S, et al. Comparison of bacterial diversity from solar salterns and a simulated laboratory study[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(2): 995-1005.
- [29] 王彩霞. 渤海海域微生物群落结构的时空变化及其对环境压力的响应[D]. 山东烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2018.  
Wang Caixia. Spatial and temporal variation of microbial community structure in the Bohai sea and its response to environmental pressure[D]. Yantai, Shandong Province: Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, 2018.



- [30] Gerard M, Kornelia S. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127-141.
- [31] 冯佩英, 陆春, 朱国兴. DGGE/TGGE 技术在微生物基因分类鉴定中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2005, 26(2): 95-97.  
Feng Peiying, Lu Chun, Zhu Guoxing. Application of DGGE/TGGE technology in the identification of microbial genes[J]. *Foreign Medical Sciences*, 2005, 26(2): 95-97.
- [32] 马灌楠. 高盐环境下微生物群落结构与多样性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2015.  
Ma Guannan. Study on microbial community structure and diversity in hypersaline conditions[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2015.

## Diversity analysis of prokaryotic microorganisms in the solar saltern of concentrated seawater from desalination

QIN Le-ning, HUANG Xin-jie, ZHU Da-ling, SHI Ya-min, TANG Na, WANG Xue-kui  
(Tianjin Key Laboratory of Brine Chemical Engineering and Resource Eco-utilizaion, College of Chemistry Engineering and Material Science, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Received: Jan.15, 2019

**Key words:** concentrated seawater by desalination; solar saltern; prokaryotic microbial diversity; PCR-TGGE

**Abstract:** Coastal solar saltern has a stable and unique ecosystem. Concentrated seawater discharged into a solar saltern for salt production would exert a certain influence on the ecosystem stability and the sustainable development of the solar saltern. To provide a theoretical basis for evaluating the effect of concentrated seawater from desalination on prokaryotic microorganisms in the solar saltern, the prokaryotic microbial diversity and the community structure changes in the salt ponds at different salinities and seasons were analyzed in the solar saltern of concentrated seawater from desalination in Hangu, Tianjin. Temperature gradient gel electrophoresis and sequencing methods were used to analyze the bacterial and archaeal diversity and community structure in the concentrated seawater solar saltern of Hangu every month in a year. The Shannon–Wiener index ( $H$ ), range-weighted richness index (Rr), and Pielou evenness index ( $E$ ) were evaluated to analyze the diversity, richness, and evenness of the microbial community, respectively. Results indicated that bacteria and archaea were not detected in the concentrated seawater after the processes of seawater desalination and bromine production, respectively. The bacterial diversity demonstrated little changes in the samples at different months and salt ponds, and the dominant bacterial species were primarily *Spiribacter salinus* and *Pseudoalteromonas* sp. in the phylum of  $\gamma$ -Proteobacteria. Archaea was found only in pond of No. VII with the highest salinity, and the dominant archaeal species was primarily *Halogeometricum* sp. in the phylum of Euryarchaeota. Analysis of the diversity indexes revealed that both the diversity and richness of bacteria were lower in the concentrated seawater solar saltern of Hangu. The bacterial community structure was relatively stable in spring and summer and changed obviously in autumn and winter. The bacterial community structure changed significantly in salt ponds with different salinities, and *S. salinus* gradually replaced *Pseudoalteromonas* sp. with the gradual increase in salinity and became the dominant bacterial species.

(本文编辑: 赵卫红)