

DOI: 10.12119/j.yhj.202101011

孔石莼净化高盐废水海藻叶表微生态分析

卢文娟¹ 吕 剑^{1,2} 武 君³ 张宇轩² 崔德杰¹

(1. 青岛农业大学资源与环境学院, 山东 青岛 266109; 2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 山东 烟台 264003; 3. 中国科学院青海盐湖研究所, 中国科学院盐湖资源综合高效利用重点实验室, 青海 西宁 810008)

摘 要: 孔石莼是一种大型潮间带绿藻, 在去除氮磷营养盐方面已发挥显著作用, 但目前尚不清楚其在净化高盐废水时的叶表微生态情况。利用孔石莼处理高盐废水, 通过高通量测序技术分析了孔石莼表面和废水中的微生物群落分布特征。研究表明: 孔石莼表面的微生物多样性和微生物丰度均高于废水。孔石莼叶表优势菌属包括芽孢杆菌属 *Bacillus*、微小杆菌属 *Exiguobacterium*、虚构芽孢杆菌属 *Fictibacillus* 和短芽孢杆菌属 *Brevibacillus*, 其中芽孢杆菌属 *Bacillus* 最为丰富, 占比超过整体的 70%。废水中微生物以芽孢杆菌属 *Bacillus* 与微小杆菌属 *Exiguobacterium* 为主, 二者占比总和超过整体的 99%。相较于水体的流动性, 孔石莼表面更利于微生物的生长与分布。

关键词: 孔石莼; 高盐废水; 微生态

中图分类号: X714; X703

文献标识码: A

文章编号: 1008-858X(2021)01-0099-06

孔石莼是一种分布广泛的大型潮间带绿藻, 同时也是一类重要的海洋蔬菜和饲料, 在环境条件适合的情况下能维持快速的生长, 也是潮间带生产力的重要组成部分^[1-3]。已有研究表明大型藻包括孔石莼对去除水体营养盐具有较好的效果^[4-8]。植物与微生物组合型浮床对于富营养化的高盐水体有较好的净化效果, 对于水体中的总氮、总磷等有较好的去除效果^[9]。微生物在养殖水体净化营养盐方面具有重要作用。固化微生物^[10-13]和复合微生物菌剂^[14]联合植物或藻类在废水处理中也有应用。目前关于大型藻净化高盐废水的研究较少, 关于叶表微生态分析也尚未有详细报道, 因此研究孔石莼处理高盐废水时叶表微生态, 对于进一步了解废水中营养盐的净化机制与途径具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

孔石莼采自山东省烟台市海韵广场与烟台渔人码头之间的潮间带岩石上, 样品采回之后, 使用陈化一个月的海水洗净砂砾以及小型动物, 将其置于人工智能光照培养箱中稳定培养 3 d。将孔石莼用于高盐废水的净化, 待水体营养盐的净化率大于 60%, 废水采用 0.22 μm 的玻璃纤维滤膜进行抽滤。将滤膜装入灭菌的离心管中冷冻保存。

1.2 DNA 提取与高通量测序分析

由于孔石莼藻体较大且表面积较大, 采用无菌棉签沾取无菌水擦拭物体表面取样, 然后棉签置于无菌冻存管中保存于 -80 °C 冰箱。将收集

收稿日期: 2020-02-14; 修回日期: 2020-03-02

基金项目: 烟台市“双百计划”项目(Y739011021)

作者简介: 卢文娟(1996-)女, 硕士研究生, 主要研究方向养殖水处理。Email: wenjuanlu_1996@163.com。

通信作者: 武 君(1980-)女, 研究员, 博士生导师, 主要从事环境地球化学研究。Email: wujunlisa@163.com。

到的存于棉签上的微生物以及过滤养殖废水的滤膜上的微生物使用 E. Z. N. A. [®] soil 试剂盒进行总 DNA 的提取。使用 NanoDrop2000 检测 DNA 的浓度和纯度, DNA 的提取质量使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。合格后进行 PCR 扩增, 本研究 16S · rRNA 基因 PCR 扩增区域为 V4 ~ V5 可变区, 515F (5' - GTGCCAGCMGCCGCGG - 3') 和 907R (5' - CC. GTCAATTCMTTTRAGTTT - 3')。使用 MiSeq PE300 对纯化后的 PCR 产物进行测序。将测序结果去接头序列后使用 UCH - IME 去除嵌合体。在 97% 相似度下获得物种分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTU), 比对 Silva - a 数据库 (SSU123), 设置比对阈值为 70%。分析其丰度、Alpha 多样性、微生物群落多样性等分析, 以得到样品内物种丰富度和多样性等信息。

1.3 数据处理

微生物多样性指数采用 mothur 计算。采用 Flash 软件对 pair - end 双端序列进行拼接, 使用 Qiime 进行序列去重过滤、序列分类注释、beta 多样性距离计算, 使用 Uparse 进行 OTU 聚类分析, 使用 U - search 进行 OTU 统计。

2 结果与讨论

2.1 潮间带绿藻孔石莼表面及养殖废水微生物多样性

由测序结果, 对样品的 alpha 多样性进行分析。结果得到的各项指数如图 1 所示。Coverage 指数 (图 1 A) 是指各个样本文库的覆盖率, 数值越高, 则样本中序列被检测出来的概率越高, 该数值可反映本次测序结果是否代表样本的真实情况。数值越接近于 100%, 代表本次测序结果越符合样本中微生物的实际情况。

孔石莼叶表面及养殖水的 Coverage 指数均大于 99.9%, 说明此次测序结果可以代表样本的真实情况, 符合微生物的实际情况。

菌群丰富度指数可以用 Ace 指数、Sobs 指数以及 Chao 指数代表, 这三者的指数越高, 菌群的丰富度越高^[15-16]。孔石莼叶表面的 Ace 指数 (图 1 B) 最大值为 74.2, 最小值为 43.2, 均值为 54.0。养殖废水的 Ace 指数最大值为 30.4, 最小值为 17.6, 均值为 24.6。孔石莼叶表面的 Ace 指数

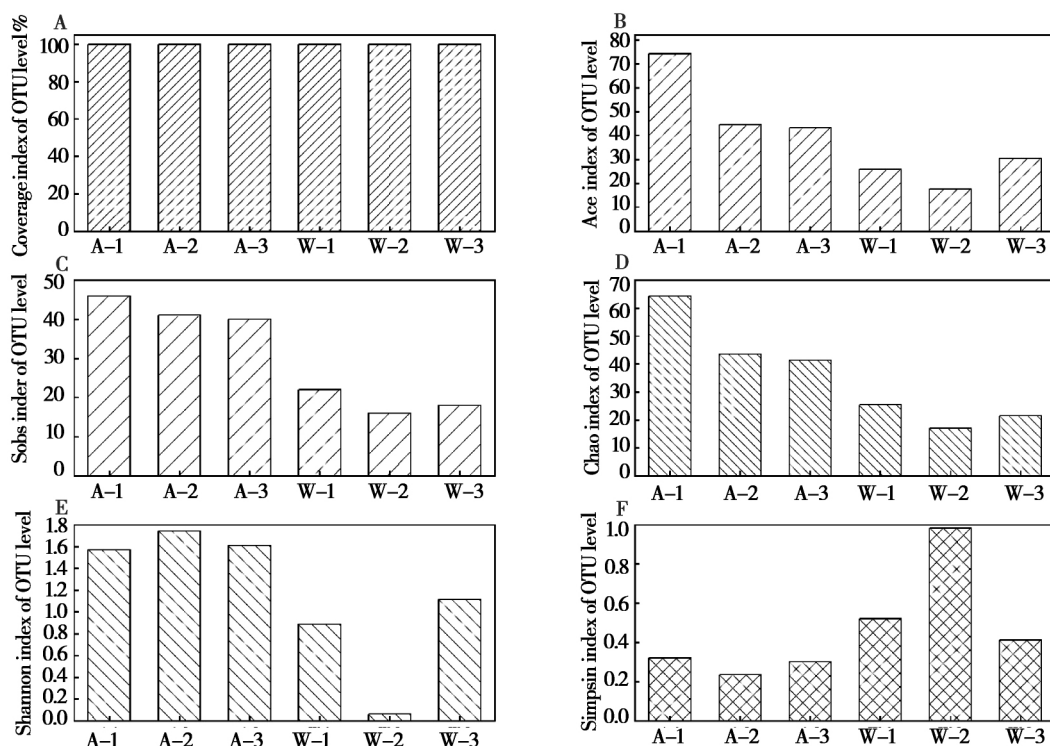


图 1 孔石莼叶表面和高盐废水的 alpha 多样性指数

Fig. 1 Alpha diversity index of *Ulva lactuca* surface and high - salt wastewater

均值为养殖废水的 2.2 倍。孔石莼表面的 Sobs 指数(图 1 C) 最大值为 46 ,最小值为 40 ,均值为 42.3 。养殖废水的 Sobs 指数最大值为 22 ,最小值为 16 ,均值为 18.7 。孔石莼叶表面的 Sobs 指数均值为废水的 2.3 倍。孔石莼叶表面的 Chao 指数(图 1 D) 最大值为 64.2 ,最小值为 41.4 ,均值为 49.7 。废水的 Chao 指数最大值为 25.3 ,最小值为 17.0 ,均值为 21.2 。孔石莼叶表面的 Chao 指数均值为高盐废水的 2.3 倍。从图 1 可以看出 ,三种指数均为孔石莼叶表面的丰富度指数大于高盐废水 ,说明孔石莼叶表面的菌群丰富度较高。

Shannon 指数与 Simpson 指数均代表群落多样性 ,Shannon 指数越大代表群落多样性越高^[17] ,而 Simpson 指数则相反^[18] 。孔石莼叶表面的 Shannon 指数(图 1 E) 最大值为 1.7 ,最小值为 1.6 ,均值为 1.6 。高盐废水的 Shannon 指数最大值为 1.1 ,最小值为 0.1 ,均值为 0.7 。孔石莼叶表面的 Shannon 指数均值为废水的 2.4 倍。

孔石莼叶表面的 Simpson 指数(图 1 F) 最大值为 0.3 ,最小值为 0.2 ,均值为 0.3 ; 废水的 Simpson 指数最大值为 1.0 ,最小值为 0.4 ,均值为 0.6 。废水的 Simpson 指数均值是孔石莼叶表面的 2.2 倍。从图 1 可以看出 ,两种指数均反映藻

表面的群落多样性更大。这可能是由于相对于水体的流动性 ,孔石莼叶表面为微生物提供了一个相对比较稳定的生存环境。

在 97% 的相似度水平下 ,对孔石莼叶表面和高盐废水进行分析。孔石莼叶表面特有的 OTU 占孔石莼整体的 51.0% ,为两者整体的 32.9% 。高盐废水特有的 OTU 占养殖废水整体的 11.1% ,为两者整体的 3.9% 。孔石莼叶表面和废水共有的 OTU 占两者整体的 31.6% 。孔石莼叶表面的 OTU 为废水的 1.8 倍。孔石莼叶表面的微生物菌群更加丰富 ,说明孔石莼叶表面更利于微生物生长。

2.2 微生物群落属水平结构组成

图 2 显示了在 31 个属水平上 ,孔石莼叶表面与养殖废水的群落结构组成情况。可以看出所提取的共有优势菌群有芽孢杆菌属 *Bacillus*、微小杆菌属 *Exiguobacterium*。虚构芽孢杆菌属 *Fictibacillus* 和短芽孢杆菌属 *Brevibacillus* 相对占有一定比例。其中 ,以芽孢杆菌属 *Bacillus* 最为丰富。

孔石莼叶表面的芽孢杆菌属 *Bacillus* 最大占比为 76.3% ,最小为 67.6% ,均值为 73.0% 。养殖废水的芽孢杆菌属 *Bacillus* 最大占比为 99.5% ,最小为 42.0% ,均值为 80.3% 。芽孢杆

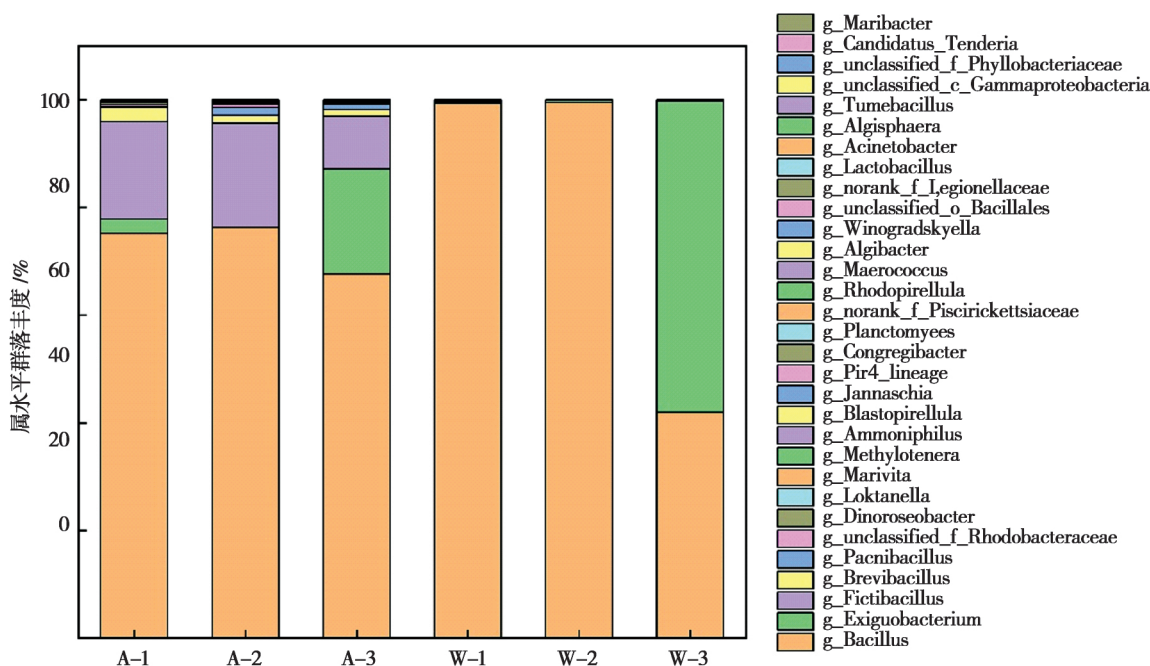


图 2 孔石莼叶表面和废水基于属水平的微生物群落丰度分析

Fig. 2 Analysis of microbial community abundance based on genus level on *Ulva lactuca* surface and in wastewater

菌属 *Bacillus* 具有降解水中污染物的能力,其中包含具有反硝化能力的菌属,已被正式描述为硝化细菌^[19-20]。这为孔石莼净化养殖废水及富营养化水体提供了保障。

孔石莼叶表面的微小杆菌属 *Exiguobacterium* 最大占比为 19.5% ,最小为 0.0% 均值为 7.4% 。废水的微小杆菌属 *Exiguobacterium* 最大占比为 57.8% ,最小为 0.2% 均值为 19.5% 。微小杆菌属 *Exiguobacterium* 是一种革兰氏阳兼性厌氧菌,其中的一些菌群除了在分解偶氮染料、农用化学品和石油中的有机污染物具有一定的作用外,还在修复重金属污染和促进根部生长方面发挥着作用,且对于高碱性废水的处理也有一定贡献^[21]。

孔石莼叶表面的虚构芽孢杆菌属 *Fictibacillus* 最大占比为 19.3% ,最小为 9.8% ,均值为 15.8% 。废水的虚构芽孢杆菌属 *Fictibacillus* 最大占比为 0.2% ,最小为 0.0% ,均值为 0.1% 。孔石莼叶表面的短芽孢杆菌属 *Brevibacillus* 最大占比为 2.7% ,最小为 1.2% ,均值为 1.8% 。废水的短芽孢杆菌属 *Brevibacillus* 最大占比为 0.2% ,最小为 0.0% ,均值为 0.1% 。孔石莼叶表面的其它菌属占比均值为 2.0% ,最大值为 2.9% ,最小值为 1.3% 。废水的其它菌属占比均值为 0.1% 。各样本的优势菌属基本是一致的,所以无论所有样本的加和还是单独其中一个样本其优势属的趋势皆基本一致。

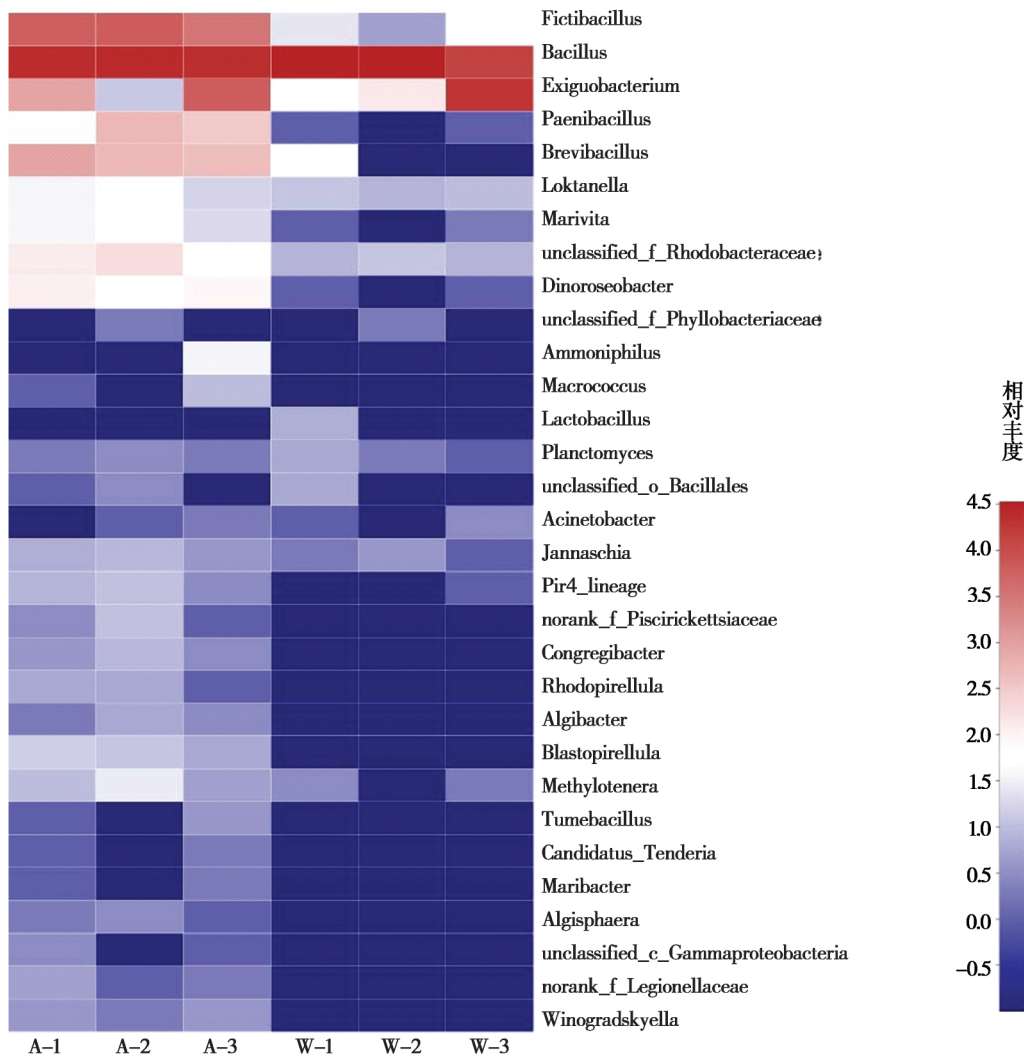


图 3 孔石莼叶表面和废水微生物群落基于属水平 heatmap 图

Fig. 3 Heatmap of microbial community on *Ulva lactuca* surface and in wastewater based on genus level

图 3 显示,孔石莼叶表面分为 A-1、A-2、A-3 三个平行,养殖废水分为 W-1、W-2、W-3 三个平行。右侧颜色从下到上的颜色变化表示相对丰度由低到高。从图 3 可以看出芽孢杆菌属 *Bacillus* 在所有样本中的相对丰度最高,其次为微小杆菌属 *Exiguobacterium*、虚构芽孢杆菌属 *Fictibacillus*,其它菌属占比较小。从图 3 可以明显看出,藻类表面还有其它菌属占有比例,而水体中占比较少。孔石莼表面特有的菌属为 *Ammoniphilus*、*Algibacter*、*Algisphaera*、*Blastopirellula*、*Congregibacter*、*Macrocooccus*、*Winogradskyella*、*Tumebacillus*、*Maribacter*、*Rhodopirellula*、*Pir4_lineage*、*norank_f_Piscirickettsiaceae* 共 12 个菌属,均以深浅不同的浅蓝、浅红表示;与此相对应的养殖废水的则以深蓝、浅蓝表示。孔石莼叶表面表示相对丰度较高的红色区域较多,说明具有较大的种群多样性和丰度。因此,从 heatmap 的颜色分布可以了解两组之间菌属的差异以及相对丰度相似情况。

2.3 微生物种群差异分析

主坐标分析作为一种非约束性的数据降维方法,与 PCA 相比在于不受限于距离算法,改变了

坐标系统,在样品聚类时考虑了物种的丰度。从图 4 可以看出,孔石莼叶表面和养殖废水之间在 PC1 方面的贡献不同。图 4 中,第一主坐标 PC1 和第二主坐标 PC2 分别占总变异来源的 70.21% 和 26.02%。主坐标分析结果表明孔石莼叶表面与养殖废水微生物群落之间同一类群的丰度存在显著差异。

可以通过物种差异分析揭示孔石莼叶表面和养殖废水在属水平上具有显著差异的微生物类群。

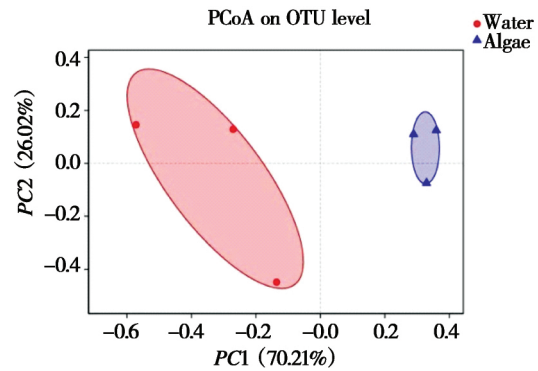


图 4 基于 OTU 水平的孔石莼叶表面和废水微生物群落主坐标分析

Fig. 4 Principal coordinate analysis on microbial community of *Ulva lactuca* surface and wastewater based on OTU levels

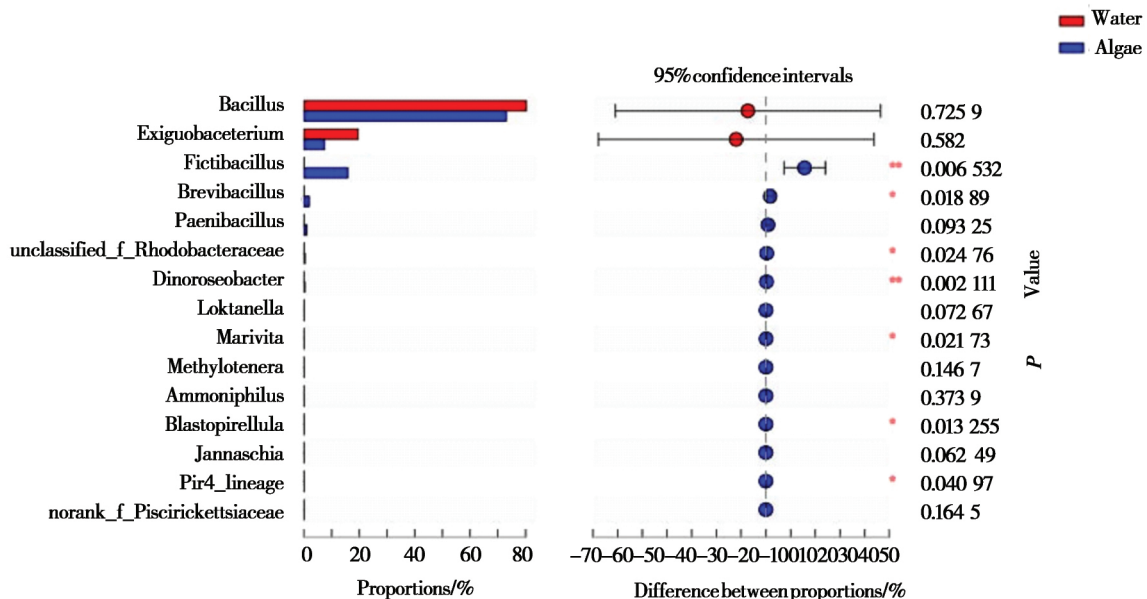


图 5 孔石莼叶表面和废水微生物群落基于属水平的 T 检验差异性显著分析

Fig. 5 Significant analysis of difference between T-test on microbial community of *Ulva lactuca* surface and wastewater based on genus level

从图 5 中可以看出,在 student's *T* 检验分析下,前 15 个属水平下两组之间的差异。芽孢杆菌属 *Bacillus* 和微小杆菌属 *Exiguobacterium* 在两组样本中没有显著差异。虚构芽孢杆菌 *Fictibacillus* 因为其在水体中的含量较低,所以孔石莼叶表面与养殖废水具有极显著差异,此外 *Dinoroseobacter* 两组之间也存在极显著差异。两组之间存在显著差异的菌属为短芽孢杆菌属 *Brevibacillus*、*unclassified_f_Rhodobacteraceae*、*Marivita*、*Blastopirellula*、*Pir4_lineage* 共 5 个菌属。

3 结 论

高通量测序结果分析表明孔石莼表面微生物多样性高于高盐废水。高盐废水核心菌属为芽孢杆菌属 *Bacillus*、微小杆菌属 *Exiguobacterium*、虚构芽孢杆菌属 *Fictibacillus* 和短芽孢杆菌属 *Brevibacillus*。其中高盐废水中芽孢杆菌属 *Bacillus* 与微小杆菌属 *Exiguobacterium* 丰度均值大于孔石莼叶表面,孔石莼叶表面虚构芽孢杆菌属 *Fictibacillus* 和短芽孢杆菌属 *Brevibacillus* 丰度均值大于高盐废水。其余占比较少的菌属中,孔石莼叶表面的丰度均值也高于废水。这表明,芽孢杆菌属 *Bacillus* 与微小杆菌属 *Exiguobacterium* 更易于向水中迁移生存,在水环境中更利于其繁殖扩散。孔石莼叶表面的微生物群落多样性为其在处理高盐废水中提供了更多的可能。

参考文献:

- [1] 蔡恒江,唐学玺.孔石莼和赤潮异湾藻相互作用的初步研究[J].大连海洋大学学报,2012,27(3):255-259.
- [2] 王珊,刘瑀,张松.石油烃对孔石莼生长及光合作用的影响[J].大连海洋大学学报,2010,26(5):432-436.
- [3] 夏建荣,邹定辉.利用 OJIP 叶绿素 a 荧光评估干出对孔石莼(*Ulva lactuca*)光系统 II 的影响[J].海洋通报,2007,26(4):50-55.
- [4] 毛玉泽,杨红生,王如才.大型藻类在综合海水养殖系统中的生物修复作用[J].中国水产科学,2005,12(2):225-231.
- [5] 孙琼花.大型海藻对养殖废水营养盐吸收及海区的生物修复[D].福州:福建师范大学,2013.
- [6] 郑辉.3 种典型大型海藻对富营养化水体氮磷净化效果的分析[J].科技通报,2013,32(3):222-225.
- [7] 田继远,贾鸿冰,于娟,等.4 种大型海藻单养和两两混养条件下生长以及营养盐的吸收利用[J].海洋湖沼通报,2017,(2):123-130.
- [8] 王翔宇,詹冬梅,李美真,等.大型海藻吸收氮磷营养盐能力的初步研究[J].渔业科学进展,2011,32(4):67-71.
- [9] 陈友媛,吴亚东,孙萍,等.微生物强化组合浮床净化微盐碱水体的效果[J].环境科学,2017,38(7):2850-2858.
- [10] 刘娥.藻菌固定及其净化水产养殖废水的效果研究[D].上海:上海海洋大学,2017.
- [11] 伍华雯.固定化微生物联合粉绿狐尾藻(*Myriophyllum aquaticum*)净化养殖废水的研究[D].宁波:宁波大学,2013.
- [12] 伍华雯,陆开宏,钱伟,等.固定化微生物联合大型水生植物净化养殖废水的实验研究[J].中国水产科学,2013,20(2):316-326.
- [13] 邹万生,张景来,刘良国,等.有效微生物菌与水生植物联合净化珍珠蚌养殖废水[J].环境工程学报,2012,6(6):1773-1779.
- [14] 任华峰,姜天翔,邱金泉,等.复合微生物菌剂在海水养殖废水净化中的试验研究[J].环境污染与防治,2015,37(7):111.
- [15] Chao A, M A M C, Yang M. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates[J]. Biometrika, 1993, 80(1):193-201.
- [16] Chao A. Nonparametric - estimation of the number of classes in a population[J]. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, 11(4):265-270.
- [17] Shannon C E. A mathematical theory of communication[J]. Bell System Technical Journal, 1948, 27(4):623-656.
- [18] Simpson E H. Measurement of diversity[J]. Nature, 1949, 163(4148):688.
- [19] 孟婷,杨宏.高效反硝化细菌的快速培养及群落结构多样性分析[J].环境科学,2017,38(9):3816-3822.
- [20] 王思宇,李军,王秀杰,等.添加芽孢杆菌污泥反硝化特性及菌群结构分析[J].中国环境科学,2017,37(12):4649-4656.
- [21] 张莹,石萍,马炯.微小杆菌 *Exiguobacterium* spp 及其环境应用研究进展[J].应用与环境生物学报,2013,19(5):898-904.

(下转第 110 页)

Salt-tolerance and Bioinformatics Analysis on the Serine Protease EYHS Secreted by *Salinivibrio* sp. YH4

WU Cui-ling ,SONG Ying-da ,GAO Hui-fang ,ZHANG Lian-yun ,REN Chen-xia
(Changzhi Medical College ,Changzhi 046000 ,China)

Abstract: To investigate the structural properties and salt tolerance of serine protease EYHS secreted by *Salinivibrio* sp. YH4 , the gelatin immersing zymography was employed to analyze salt tolerance of EYHS. Bioinformatics tools were used to analyze structural properties of EYHS and six S8 family salt-tolerant serine proteases. The results showed that EYHS had high proteolytic activity at 4 mol/L NaCl. The proportion of irregular curls was high on the surface of EYHS and six kinds of S8 serine proteases ,while α -helix and β -sheet were mainly located inside the enzyme. Furthermore ,the content of acidic amino acids was high on the surface of serine protease and it has a weak hydrophobic core. Multiple sequence alignment showed that there were highly conserved motifs ,polar amino acids and aromatic amino acids on both sides of the catalytic triad ,in addition to high contents of Gly and Ala. Homologous modeling and surface charge distribution showed that α -helix and β -sheet formed the catalytic cavity of protease ,the EYHS active center contained a catalytic triad composed of Asp32 ,His65 and Ser215 ,with the surface electrostatic potential being negative in the catalytic center area. The above structural characteristics of salt-tolerant serine protease may help maintain its stability and moderate flexibility in high salt environment ,which was helpful for its catalytic function. This study provided a theoretical basis for studying the adaptability of salt tolerant serine protease to high salt environment.

Key words: *Salinivibrio* sp. YH4; Serine protease; Salt-tolerant protease; Bioinformatics

(上接第 104 页)

Microecological Analysis on Seaweed Leaf Surface for High-salt Wastewater Treatment by Using *Ulva lactuca*

LU Wen-juan¹ ,LV Jian^{1,2} ,WU Jun³ ,ZHANG Yu-xuan² ,CUI De-jie¹

(1. Resources and Environment College of Qingdao Agricultural University ,Qingdao 266109 ,China;

2. Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation ,Yantai Institute of Coastal Zone Research ,Chinese Academy of Sciences ,Yantai 264003 ,China;

3. Key Laboratory of Comprehensive and Highly Efficient Utilization of Salt Lake resources , Qinghai Institute of Salt Lakes ,Chinese Academy of Sciences ,Xining 810008 ,China)

Abstract: *Ulva lactuca* ,a large intertidal green alga ,has played a significant role in removing nitrogen and phosphorus nutrients in waters. However ,no detailed information is available on microecology of leaf surface for high-salt wastewater treatment by using *Ulva lactuca*. Therefore ,this study investigated the microbial community feature of seaweed surface and wastewater through high-throughput sequencing technology for high-salt wastewater treatment by using *Ulva lactuca*. The results showed that the microbial diversity and abundance of algal surface were higher than those of wastewater. The dominant bacteria on algal surface included *Bacillus* , *Exiguobacterium* , *Fictibacillus* and *Brevibacterium*. *Bacillus* accounted for more than 70% of the total microorganisms on algal surface ,serving as the main dominant bacterium. *Bacillus* genus and *Exiguobacterium* genus were the main species in the wastewater ,accounting for over 99% of the total microorganisms. The algal surface was more conducive to the growth and distribution of microorganisms than the water with the fluidity.

Key words: *Ulva lactuca*; High-salt wastewater; Microecology