

温度对铜绿微囊藻群体培养体系中细菌群落组成及稳定性的影响*

方道艳¹, 施丽梅^{2**}, 李朋富^{1**}, 蔡元锋³, 张 民², 史小丽², 吴庆龙², 于 洋²

(1: 南京大学生命科学学院, 南京 210093)

(2: 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008)

(3: 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008)

摘 要: 微囊藻藻际细菌影响微囊藻的生长及其水华的消长。然而特定微囊藻群体中藻际细菌群落组成对温度变化的响应规律仍不清楚。本文把一株从太湖分离得到的群体铜绿微囊藻, 置于不同温度(15、20、25 和 30℃)下进行培养, 分析各培养体系中不同粒径附生或游离细菌群落组成的异同。结果表明: 温度显著影响微囊藻群体(>20 μm)附生、单细胞一小群体(3~20 μm)附生和游离(0.2~3 μm)细菌群落的组成(PERMANOVA, $P<0.01$), Sphingomonadales、Pseudomonadales 和 Cytophagales 分别是 3 组细菌群落中的最优势菌目, 相对丰度分别为 21.35%、19.74% 和 33.44%。在 3 组细菌群落中都存在一些核心优势细菌类群, 其丰度相对稳定, 对温度变化不敏感。其中在微囊藻群体附生细菌群落中, 优势菌属 *Brevundimonas* 和 OPB56 在 20~30℃ 之间培养时其相对丰度较为稳定; 单细胞一小群体附生细菌群落中的核心优势菌属 *Mariniradius* 相对丰度也是在 20~30℃ 之间较为稳定, 而 *Gemmobacter* 相对丰度在 4 种温度下均较为一致; 游离细菌群落中的核心优势菌属 *Porphyrobacter* 相对丰度在 20~30℃ 之间时也相对稳定。另外, 在 15℃ 时, 单细胞一小群体附生和游离细菌群落的多样性都达到最高, 总体细菌群落物种相关性网络复杂度最高, 但合作性关联最弱。该研究结果对于深入了解微囊藻群体的藻-菌关系有重要意义。

关键词: 铜绿微囊藻群体; 细菌群落; 温度; 附生细菌; 游离细菌; 太湖

Effects of temperature on composition and stability of bacterial community in colonial *Microcystis aeruginosa* culture systems*

Fang Daoyan¹, Shi Limei^{2**}, Li Pengfu^{1**}, Cai Yuanfeng³, Zhang Min², Shi Xiaoli², Wu Qinglong² & Yu Yang²

(1: School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, P.R.China)

(2: State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P.R.China)

(3: State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P.R.China)

Abstract: Bacteria in phycosphere of *Microcystis* affect growth, development and decline of *Microcystis* blooms. In specific *Microcystis* colony, however, the pattern of bacterial community composition in response to different temperatures are still unclear. In this study, a colonial *Microcystis aeruginosa* strain isolated from Lake Taihu was cultivated at different temperatures (15, 20, 25 and 30℃) to analyse the similarities and differences in the composition of different particle attached or free living bacterial communities in each culture system. Temperature significantly affected community compositions of bacteria including *Microcystis* colony (>20 μm) attached bacteria, single cell-small colony (3~20 μm) attached bacteria and free-living (0.2~3 μm) bacteria (PERMANOVA, $P<0.01$), Sphingomonadales, Pseudomonadales and Cytophagales were the most dominant order in the three groups, account-

* 2021-02-24 收稿; 2021-04-13 收修稿稿。

国家水体污染控制与治理科技重大专项(2018ZX07208-004)和国家自然科学基金项目(31971449, 31370509)联合资助。

** 通信作者; E-mail: pengfuli@nju.edu.cn; lmshi@niglas.ac.cn.

ing for 21.35%, 19.74% and 33.44% of the total relative abundance, respectively. There were some core dominant bacterial species in the three groups of bacterial communities, which were relatively stable in abundance and insensitive to temperature changes. The relative abundance of *Brevundimonas* and OPB56, the dominant genus among the core bacterial community attached with *Microcystis* colony, were relatively stable when temperature changed from 20 to 30°C. The relative abundance of *Mariniradius*, the dominant genus among the core bacteria attached with single cell-small colony, was also relatively stable when temperature changed from 20 to 30°C, and the relative abundance of *Gemmobacter*, the another dominant genus among the core bacteria attached with single cell-small colony, was relatively stable in response to temperature changes. The relative abundance of *Porphyrobacter*, the dominant genus among the core bacterial community in free-living bacteria, were also relatively stable when temperature changed from 20 to 30°C. Compared with the situations at other three higher temperatures, the complexity of species correlation network at 15°C was the highest but the cooperative correlation was the weakest. The results of this study were of great significance for understanding the algal-bacterial relationships in phycosphere of colonial *Microcystis*.

Keywords: *Microcystis aeruginosa* colony; bacterial community; temperature; attached bacteria; free-living bacteria; Lake Taihu

在夏季湖泊暴发的蓝藻水华中,微囊藻(*Microcystis* spp.)是主要优势种.当气象和水文条件适宜时,微囊藻会迅速繁殖并聚集,形成微囊藻水华^[1-2].微囊藻能产生毒素、消耗氧气及释放气味化合物等,从而带来一系列生态问题 and 健康风险^[3-4].微囊藻在自然界中普遍以群体形态存在,这也是微囊藻属能在淡水生态系统中占据独特生态位,形成优势的重要原因之一^[5-6].在富营养化湖泊中,微囊藻的生长繁殖除了受环境因素,例如温度、光照和氮磷供应水平等的影响^[7-9],还与大量定殖在藻群体上的或者游离在藻细胞周围的异养细菌关系密切^[1].研究表明细菌能够影响微囊藻的形态和群体形成^[10],并且微囊藻与其附生细菌之间具有密切的代谢偶联关系^[11].Zhang等^[12]发现,藻际细菌群落促进了不同水华蓝藻之间的演替,表明了附生细菌在微囊藻生长及其水华发生发展中起到了重要作用.

同时,微囊藻水华也会影响水体细菌群落结构组成^[13-14].藻类通过分泌胞外多糖等代谢产物影响藻周围生境中的物质组成^[15-17],从而影响周围细菌的群落结构.不同藻的胞外多糖含量和组成不同^[9],故特定藻的附生细菌相对于其他的藻具有特异性^[18-19].虽然在不同湖泊生境下同种微囊藻群体上的细菌群落组成趋于相似^[19],但细菌群落多样性会随着微囊藻水华的发展产生波动^[20].此外,微囊藻群体的附生细菌组成不同于游离细菌或其他沉降颗粒附生细菌的,具有明显的特异性^[21].细菌群落组成除了因不同水华阶段和优势蓝藻种类的不同而发生变化外,也会受到温度等环境因素的影响^[22].Wang等^[23]发现环境因素对洱海藻类附生细菌和游离细菌群落组成的影响要大于浮游植物群落组成的影响,其中温度是主要的环境影响因素之一.有研究报道,附生细菌和游离细菌由于受到温度等环境因素的影响,两者群落组成之间共享的 OTUs 占 59% (占总 reads 的 96%),部分细菌会在附生状态和游离状态之间发生转变^[24].因此,藻的附生菌中存在稳定附着和随机附着的类型,探讨环境条件变化下的稳定附着细菌群落组成是进一步深入研究藻-菌关系的重要方面.

由于在野外微囊藻水华中多种蓝藻种属经常共存,因此,细菌群落组成往往受到多种因素综合的影响,揭示其影响规律较为困难.而关于微囊藻附生菌的室内研究,大都以单细胞微囊藻作为研究对象^[22].单细胞微囊藻与群体微囊藻在形态和生理上有很大差异,比如微囊藻群体株系细胞壁表面相比单细胞株系具有更厚的表层蛋白(S-layer)^[25].对于单一微囊藻群体附生细菌群落组成对温度的响应目前仍不清楚.为了进一步探究在温度变化下,微囊藻群体上细菌群落组成及其在温度波动下的核心微生物类群,本研究以从太湖分离的一株群体铜绿微囊藻为材料,揭示了在4种温度下附生与游离细菌群落组成的相对稳定性和动态变化规律,从而有助于了解藻-菌相互关系对微囊藻水华生消的影响.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种培养和采样 本研究采用的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)群体 D2,下文简称“D2 群体”,由蔡元锋博士在 2011 年从太湖分离纯化得到.将扩大培养后的 D2 群体,接种到含 250 mL BG-11 培养基的 500 mL 灭菌玻璃三角瓶中,并放置在设定不同温度的光照培养箱中进行培养,初始接种浓度为 5×10^4 cells/

mL. 综合文献报道^[7, 26]及对太湖湖水温度的调查, 本实验将温度梯度设置为 15、20、25 和 30℃, 来模拟野外微囊藻所处的温度. 实验每组设置 3 个平行, 光暗周期为 12 h:12 h, 光照强度为 50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. 根据预实验结果, 分别在第 15、35、45 和 65 天取样. 取样前轻轻摇匀, 使 D2 群体均匀分布. 微囊藻单个细胞大小一般为 3~5 μm , 而微囊藻群体一般含 4 个以上微囊藻细胞, 因此, 取适量体积藻液 (10 mL) 后, 依次过滤在 20、3 和 0.2 μm 的滤膜 (47 mm 直径, Millipore, Germany) 上, 则分别代表微囊藻群体 (>20 μm)、单细胞一小群体 (3~20 μm) 和游离 (0.2~3 μm) 等 3 种不同粒径中的细菌群落, 滤膜保存在 -80℃, 直至分析使用.

1.1.2 主要仪器与试剂 光照培养箱和 PCR 仪 (ABI GeneAmp[®] 9700 型) 等. 乙基黄原酸钾、乙酸铵、EDTA、Tris-HCl、10% SDS、RNase A、异丙醇、70% 乙醇和无菌水等.

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 DNA 提取采用乙基黄原酸钾 (XS) 法^[27-28], 处理过程如下: 取出过滤样品得到的 3 种梯度滤膜, 用干净灭菌剪刀剪碎后, 置于 1.5 mL 的离心管中, 加入 50 μL 的 TER (10 mmol/L Tris-HCl, pH=7.4; 1 mmol/L EDTA, pH=8; 100 mg/mL RNase A) 溶液. 随后加入新制的 XS 缓冲液 (1% XS; 100 mmol/L Tris-HCl, pH=7.4; 20 mmol/L EDTA, pH=8; 1% SDS; 800 mmol/L ammonium acetate), 前后摇晃, 混合. 将混合后的细胞裂解液在 70℃ 下水浴 60 min, 期间每隔 10 min 摇晃一次. 之后, 将试管剧烈涡流 10 s, 再置于冰上 30 min. 将细胞裂解液以 14000 r/min, 在 4℃ 下离心 10 min, 去除细胞碎片. 随后将上清液小心地转移到含有 750 μL 异丙醇的离心管中, 在室温下放置 10 min. 在 12000 $\times g$, 4℃ 下离心 10 min, 使得 DNA 沉淀. 之后加入 70% 乙醇, 在 12000 $\times g$, 4℃ 下离心 10 min 洗涤沉淀, 并风干. 最后将 DNA 溶解在 50 μL 的无菌水中.

1.2.2 PCR 扩增 用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增^[29], 并添加 barcode 序列, 程序如下: 95℃ 预变性 3 min, 27 个循环 (95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s), 最后 72℃ 延伸 10 min. 采用 TransGen AP221-02; TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20 μL 扩增体系: 10 ng DNA 模板, 0.8 μL BSA, 0.4 μL FastPfu 聚合酶, 0.8 μL 的正向引物 (5 $\mu\text{mol/L}$) 和反向引物 (5 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL 2.5 mmol/L dNTPs 和 4 μL 5 \times FastPfu 缓冲液, 最后加 ddH₂O 至 20 μL .

1.2.3 Illumina MiSeq 测序 用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测. 利用 QuantiFluor[™]-ST (Promega, USA) 进行检测定量. 根据 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, San Diego, USA) 标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2 \times 300 的文库. 利用 Illumina 公司的 Miseq PE 300 平台进行测序, 由上海美吉生物医药科技有限公司完成. 原始序列提交到 NCBI 数据库, BioProject 序列号为 PRJNA700808.

1.3 数据处理

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控, 使用 FLASH 软件^[30] 进行拼接. 使用 UPARSE 软件^[31] (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>), 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类, 并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体. 利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对每条序列进行物种分类注释^[32], 比对 Silva 数据库 (SSU123), 设置比对阈值为 70%. 利用 mothur 软件 (version 1.30.1) 进行 Alpha 多样性分析 (http://www.mothur.org/wiki/Schloss_SOP#Alpha_diversity), 包括物种丰富度 Chao1 指数, Shannon-Wiener 多样性指数 (以下简称 Shannon 指数) 和谱系多样性 PD 指数 (以下简称 PD 指数)^[33], 指数组间差异采用 Wilcoxon 秩和检验 (Wilcoxon rank-sum test) 确定. 统计分析和相关绘图利用 Origin 9.1、GraphPad Prism 9 和 R 语言平台实现: R 语言 'vegan' 软件包进行 NMDS 和 PERMANOVA 分析和作图; 'stats' 软件包进行组间差异显著性检验; 并利用 R 完成群落组成分析和 Venn 图分析. 单因素相关性网络分析使用 Python 语言 'Networkx' 工具包确定, 筛选条件为: 选取属分类水平上总丰度前 50 的物种, 并计算物种之间的斯皮尔曼 (Spearman) 等级相关系数 ($|R| \geq 0.5$, $P < 0.05$). 除了单因素相关性网络分析包含蓝藻序列外, 以上其它分析均去除蓝藻序列.

2 结果分析

2.1 D2 群体培养体系中不同粒径细菌群落的多样性受温度的影响

Alpha 多样性分析显示, 在微囊藻群体附生细菌群落中, 不同温度下的细菌群落多样性指数和丰富度指

数均没有显著性差异(图 1a~c),但 15℃下,单细胞一小群体附生细菌群落的群落多样性 PD 指数要显著高于 25℃下的($P<0.05$)(图 1c),且在游离细菌群落中,15℃下细菌群落 Shannon 多样性指数显著高于 25℃和 30℃($P<0.05$)(图 1a),表明单细胞一小群体附生细菌群落和游离细菌群落在温度较低时组成更为多样。

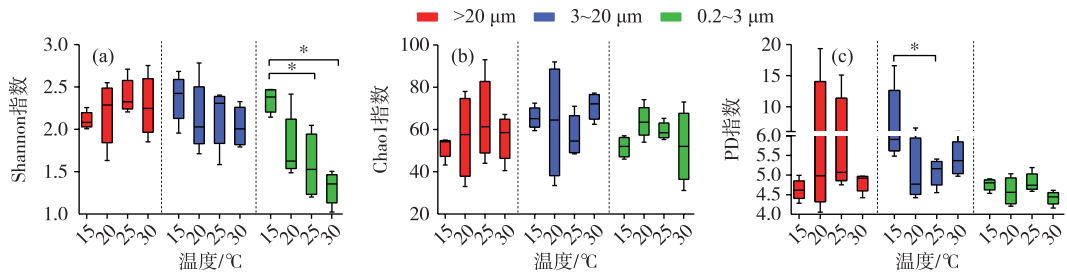


图 1 D2 群体培养体系中群体(>20 μm)附生细菌、单细胞一小群体(3~20 μm)附生细菌和游离(0.2~3 μm)细菌群落在 15、20、25 和 30℃下 Alpha 多样性比较分析 (Wilcoxon 秩和检验, * $P<0.05$, 去除蓝藻序列)

Fig.1 Comparative analysis of alpha diversity of bacteria communities in colonial D2 culture systems at 15, 20, 25 and 30℃ attached with *Microcystis* colony (>20 μm), single cell-small colony (3~20 μm) and free-living (0.2~3 μm) bacterial community, respectively (Wilcoxon rank-sum test, * $P<0.05$, after removing cyanobacteria sequences)

对于 Beta 多样性,基于 Bray-Curtis 距离的 NMDS 分析表明,温度均显著影响微囊藻群体(图 2a)、单细胞一小群体附生(图 2b)和游离细菌(图 2c)群落分布(PERMANOVA, $P<0.01$);PERMANOVA 分析揭示,温度能分别单独解释 3 组细菌群落组成总体差异的 44.38%、45.97%和 65.35%,则表明相比微囊藻群体附生细菌和单细胞一小群体附生细菌,温度变化对游离细菌群落组成影响要大($P<0.01$)。

而同一温度下,微囊藻群体、单细胞一小群体附生和游离细菌群落分布也具有差异性(图 3)。PERMANOVA 分析揭示,粒径大小能分别单独解释 15、20、25 和 30℃下样本群落组成总体差异的 60.87%、37.29%、35.74%和 48.22%。在 15℃和 30℃下,3 种粒径大小下的细菌群落具有极显著差异($P<0.01$),20 和 25℃下不同粒径细菌群落组成具有显著性差异($P<0.05$)。这些结果表明,不同粒径大小能够显著影响 D2 铜绿微囊藻群体的细菌群落组成,且在 15℃和 30℃下,细菌群落组成差异性更大($P<0.01$)。

2.2 D2 群体培养体系中不同粒径细菌群落在不同温度下的组成差异

综合 4 次时间点取样的平均值,由温度对 D2 群体细菌群落组成影响的分析结果表明,在微囊藻群体附生细菌群落中, Sphingomonadales、Caulobacteriales 和 Sphingobacteriales 是优势菌目,分别占总相对丰度的 21.35%、17.18%和 15.99%;而单细胞一小群体附生细菌群落中,有 19.74%是 Pseudomonadales,其次是 Cytophagales 和 Sphingobacteriales,分别占总相对丰度的 15.65%和 15.14%;Cytophagales、Sphingobacteriales 和 Chlorobiales 则在游离的细菌群落中相对丰富,分别占总相对丰度的 33.44%、15.48%和 15.32%(图 4)。

随着温度的变化,这些不同粒径下的优势菌目,呈现不同的变化趋势(图 4)。在微囊藻群体附生细菌群落中, Sphingomonadales 相对丰度在 15℃下最低,占 8.97%,当在 30℃时相对丰度增加至 31.45%,总体呈现上升趋势;Caulobacteriales 和 Sphingobacteriales 在 15℃时,相对丰度相近,分别是 27.04%和 21.26%,但不同的是, Caulobacteriales 相对丰度在 20℃时降至 14.42%,随后在 25℃和 30℃下波动较小;而 Sphingobacteriales 相对丰度在 20℃下占 20.17%,基本与 15℃下持平,随后在 25℃下降至 10.61%,再在 30℃下基本保持稳定。

在单细胞一小群体附生细菌群落中, Pseudomonadales 和 Sphingobacteriales 相对丰度变化趋势接近,两者都在 15℃下最高,分别占 28.63%和 27.53%,且在 20℃下均开始下降,分别降至 17.29%和 11.94%;不同的是, Pseudomonadales 相对丰度在 25℃时,有略微下降后(占 15.94%),在 30℃下又回到接近 20℃下的值,为 17.09%,而 Sphingobacteriales 在 20℃和 25℃下,相对丰度先保持稳定,在 30℃下又略微下降。Cytophagales 则在 15℃时相对丰度极低,仅占 0.31%,随后在其它 3 个温度下,依次增加,在 30℃下,增加至 26.93%。

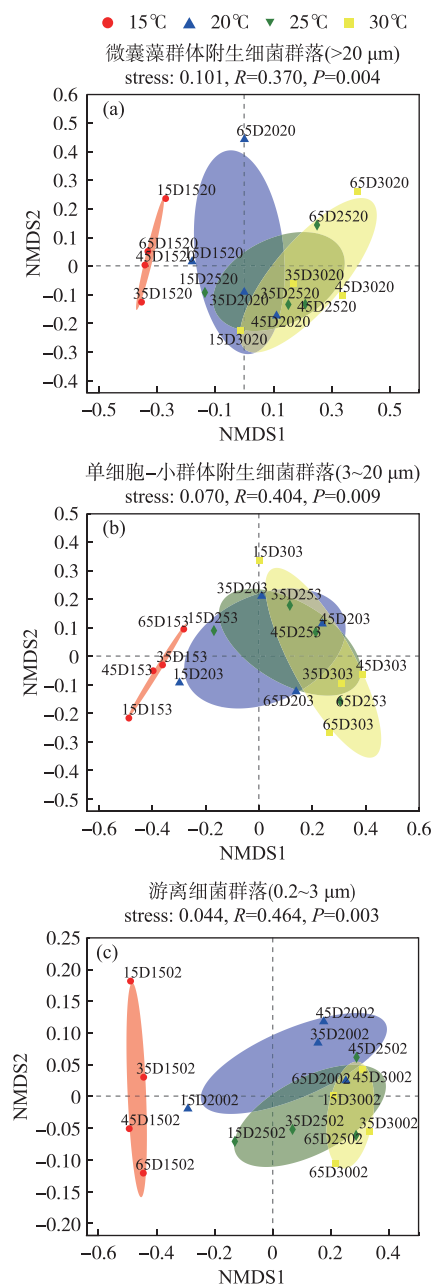


图2 D2 群体培养体系中不同粒径下的细菌群落基于 Bray-Curtis 距离的非度量多维尺度 (NMDS) 分析 (OTU 水平, 去除蓝藻序列)
(注: 以 15D1520 为例, 其表示第 15 天时, D2 群体在 15°C、>20 μm 粒径细菌群落样本)

Fig.2 Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) ordination based on Bray-Curtis distances of bacterial communities of different particles at OTU level (after removing cyanobacteria sequences)

在游离细菌群落中, Cytophagales 在 4 个温度下整体有较大的增长幅度, 在 15°C 下, 其相对丰度占 5.32%, 当在 30°C 下相对丰度占比增加至 52.90%; Sphingobacteriales 的相对丰度在 15°C 下与 Chlorobiales 的相对丰度接近, 分别为 26.22% 和 25.17%。随后, Sphingobacteriales 相对丰度下降幅度较 Chlorobiales 的大, 在 20°C 时, 两者的相对丰度分别是 9.96% 和 18.11%, 但之后 Sphingobacteriales 基本保持稳定, 而 Chlorobiales 持续下降, 到 30°C 时两者的相对丰度占比分别是 9.66% 和 7.09%。

在目水平上 (图 5), 微囊藻群体附着细菌群落中, Sphingomonadales 在 15°C 下的相对丰度要显著低于 25°C 和 30°C 下的 ($P<0.05$), Chlorobiales 相对丰度在 15°C 下要显著高于其余 3 个温度下的 ($P<0.05$), 而 Rhodobacteriales 相对丰度在 15°C 下要显著低于 20°C 和 25°C 下的 ($P<0.05$)。在单细胞-小群体附着细菌群落中, Sphingobacteriales 相对丰度在 15°C 下显著高于 20°C 和 25°C 下的 ($P<0.05$), 极显著高于 30°C 下的 ($P<0.01$), 而 Rhodospirillales 在 15°C 下的相对丰度, 分别与 25°C 和 30°C 下的相对丰度, 有极显著 ($P<0.01$) 和显著差异 ($P<0.05$); 而游离细菌群落中的 Cytophagales 相对丰度, 在 15°C 下要显著低于 20°C 和 25°C 下的 ($P<0.05$), 极显著低于 30°C 下的 ($P<0.001$), Sphingomonadales 相对丰度在 15°C 下要显著高于其在 20°C 下的 ($P<0.05$), Chlorobiales 相对丰度在 15°C 下要显著高于 25°C 和 30°C 下的值 ($P<0.05$), 且在 20°C 下的相对丰度显著高于 30°C 下的 ($P<0.05$), Burkholderiales 在 15°C 下占优势, 相对丰度极显著高于其余 3 个温度下的值 ($P<0.01$), Caulobacteriales 相对丰度在 15°C 下要极显著高于 30°C 下的 ($P<0.01$)。结果表明, 在微囊藻群体附着细菌群落中, Sphingomonadales 和 Rhodobacteriales 在 15°C 下相对丰度较低, 而 Chlorobiales 相反, 其在 15°C 下具有较高的相对丰度; 在单细胞-小群体附着细菌群落中, Sphingobacteriales 更能适应 15°C 环境; 而在游离细菌群落中, Cytophagales 在温度高的环境占据优势, Chlorobiales 和 Burkholderiales 更能适应 15°C 环境。

2.3 D2 群体培养体系中不同粒径细菌群落在 4 种温度下核心微生物组成差异

在属水平上, 微囊藻群体、单细胞-小群体附着和游离细菌群落, 在不同温度下均存在的微生物 (以下称为核心物种) 数量分别是 34、37 和 28 个 (图 6)。在微囊藻群体附着细菌群落核心物种中,

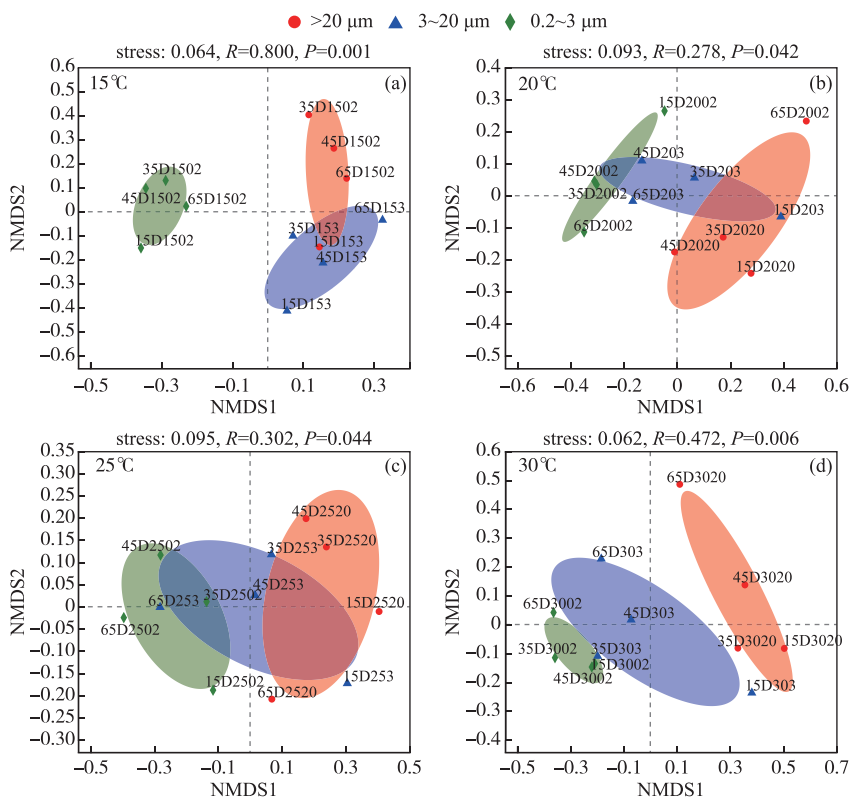


图3 不同温度下的 D2 群体培养体系中细菌群落基于布雷柯蒂斯 (Bray-Curtis) 距离的非度量多维尺度 (NMDS) 分析 (OTU 水平) (a~d 分别代表 15、20、25 和 30℃ 下细菌群落组成差异 (去除蓝藻序列))

Fig.3 Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) ordination based on Bray-Curtis distances of bacteria communities at different temperatures at OTU level (a~d represent the composition differences of bacterial communities at 15, 20, 25 and 30℃, respectively (after removing cyanobacteria sequences))

Porphyrobacter、*Brevundimonas*、*Chitinophaga* 和 OPB56 相对丰度占比较高,分别占到 22.45%、13.20%、12.20% 和 6.88%;其中,*Porphyrobacter* 相对丰度从 15℃ 的 7.04%,增加到 30℃ 的 34.23%;*Brevundimonas* 和 OPB56 相对丰度变化总体趋势则相反,在 15~30℃ 下的占比变化范围分别为 5.27%~28.01% 和 1.63%~17.01%,而 *Chitinophaga* 在 15℃ 和 20℃ 下相对丰度不变,之后随着温度升高而降低,占比变化范围是 2.44%~21.64%。在单细胞一小群体附生细菌群落核心物种中,*Mariniradius*、*Porphyrobacter*、*Gemmobacter* 和 *Chitinophaga* 是优势属,分别占物种总相对丰度的 19.75%、13.99%、12.73% 和 11.71%;从 15~30℃,*Mariniradius* 呈先增后减的趋势,在 25℃ 下相对丰度达到最高,波动范围为 0.32%~30.49%,但在 20℃ 到 30℃ 下的变化相对稳定,为 30.49%~32.70%;*Porphyrobacter* 相对丰度随着温度的升高而增加,占比变化范围是 3.38%~21.38%,而 *Chitinophaga* 则相反,相对丰度随着温度的升高而降低,在 1.52%~31.10% 范围内变化;*Gemmobacter* 相对丰度在不同温度下变化幅度相对较小,为 11.04%~11.41%。在游离细菌群落核心物种中,*Mariniradius*、*Porphyrobacter*、OPB56 和 unclassified Sphingobacteriales 相对丰度最高,分别占到 40.97%、13.43%、13.01% 和 11.26%。*Mariniradius* 丰度整体随着温度升高而增加,但在 20℃ 和 25℃ 下的相对丰度占比相近,总体占比变化范围为 5.47%~63.44%;*Porphyrobacter* 在 20℃ 温度时,相对丰度增加到最高值,随后在 25℃ 和 30℃ 下较为稳定,总体占比变化范围是 2.39%~15.45%;OPB56 在 15~30℃ 的变化下,相对丰度逐渐降低,占比在 2.83%~26.73% 范围内变化;unclassified Sphingobacteriales 在 20℃ 下丰度很低,总体呈先减后增的趋势,占比变化范围是 9.20%~17.27%。由结果可见,在微囊藻群体附生细菌群落中,*Brevundimonas* 和 OPB56 的相对丰

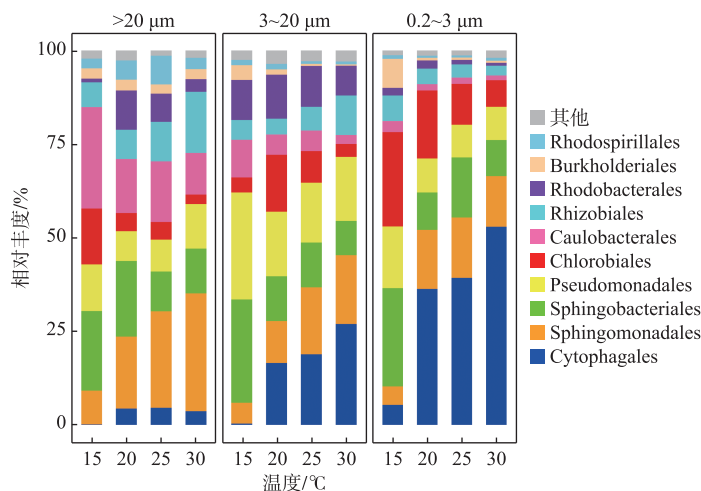


图 4 D2 群体培养体系中不同粒径包括微囊藻群体 ($>20\ \mu\text{m}$) 附生细菌、单细胞一小群体 ($3\sim 20\ \mu\text{m}$) 附生细菌和游离 ($0.2\sim 3\ \mu\text{m}$) 细菌在 15、20、25 和 30℃ 下的目水平群落组成 (去除蓝藻序列)

Fig.4 At order level, composition of bacteria communities attached with *Microcystis* colony ($>20\ \mu\text{m}$), single cell-small colony ($3\sim 20\ \mu\text{m}$) and free-living ($0.2\sim 3\ \mu\text{m}$) bacterial community in colonial D2 culture systems level at 15, 20, 25 and 30℃ (after removing cyanobacteria sequences)

度在温度 20~30℃ 之间相对稳定;在单细胞一小群体附生细菌群落中的核心优势菌属中, *Mariniradius* 相对丰度在 20~30℃ 之间较为稳定,且在 4 种温度下 *Gemmobacter* 相对丰度均较为一致;在游离细菌群落中的核心优势菌属, *Porphyrobacter* 相对丰度在温度 20~30℃ 之间保持相对稳定.

2.4 铜绿微囊藻群体 D2 细菌群落在 4 种温度下物种相关性网络复杂度分析

图 7 显示了在属水平上,不同温度下的 D2 群体培养体系中,藻-菌及菌-菌等细菌群落间的相互关系网络,并在门水平上以不同颜色对节点进行区分,绿色连线表示正相关,红色连线表示负相关,线越多,表示该物种与其他物种之间的联系越密切. 在 15℃ 下的物种相关性网络节点数虽然仅略高于 25℃ 下的 (表 1),但前者连线数最高,有 296 条连线,其中正相关 155 条,负相关 141 条,后者连线数最低,有 166 条显著相关的边,其中正相关 131 条,负相关 35 条;20℃ 和 30℃ 下物种相关性网络节点数相等,均为 49 个,但 30℃ 下网络连线数有 216 条,其中正相关 145 条,负相关 71 条,而 20℃ 下连接数有 185 条,其中正相关 122 条,负相关 63 条. 结果表明 (表 1),在 15℃ 和 30℃ 下,不同粒径细菌群落间的交流作用相对紧密,其次是 20℃ 和 25℃ 下的,且不同温度下, D2 群体物种间正负相关连线数比均大于 1,说明当温度发生变化时,物种间的合作关系仍占主要地位;此外,25℃ 下 D2 群体物种间的连线数虽然是最少的,但正负相关连线数比是最高的,为 3.74,而 15℃ 则相反,细菌不同物种间联系最为密切,但正负相关连线数比最低,为 1.10,说明温度升高促进了细菌之间的合作关系.

在物种相关性网络图中,一个物种节点 (species-node) 连接的节点数目越多,表示该节点的连通性 (degree) 越高,一个节点的连通性越高就意味着该节点的度中心性 (degree centrality) 越高,利用这种方法可找到 Hub 节点,确定关键物种 (keystone taxa) [34]. 此外,紧密中心性 (closeness centrality) 和介数中心性 (betweenness centrality) 也能作为关键物种的确定条件 [35]. 综合高度中心性、高紧密中心性和低介数中心性这 3 个指标 (图 8),本研究确定了 D2 群体细菌群落不同温度下相关网络关键物种. 结果发现,在 15、20、25 和 30℃ 下, D2 群体细菌群落相关性网络的关键物种分别是 *Hydrogenophaga*、*FukuN57*、*Alphaproteobacteria* 和 *Sphingomonas* (表 2).

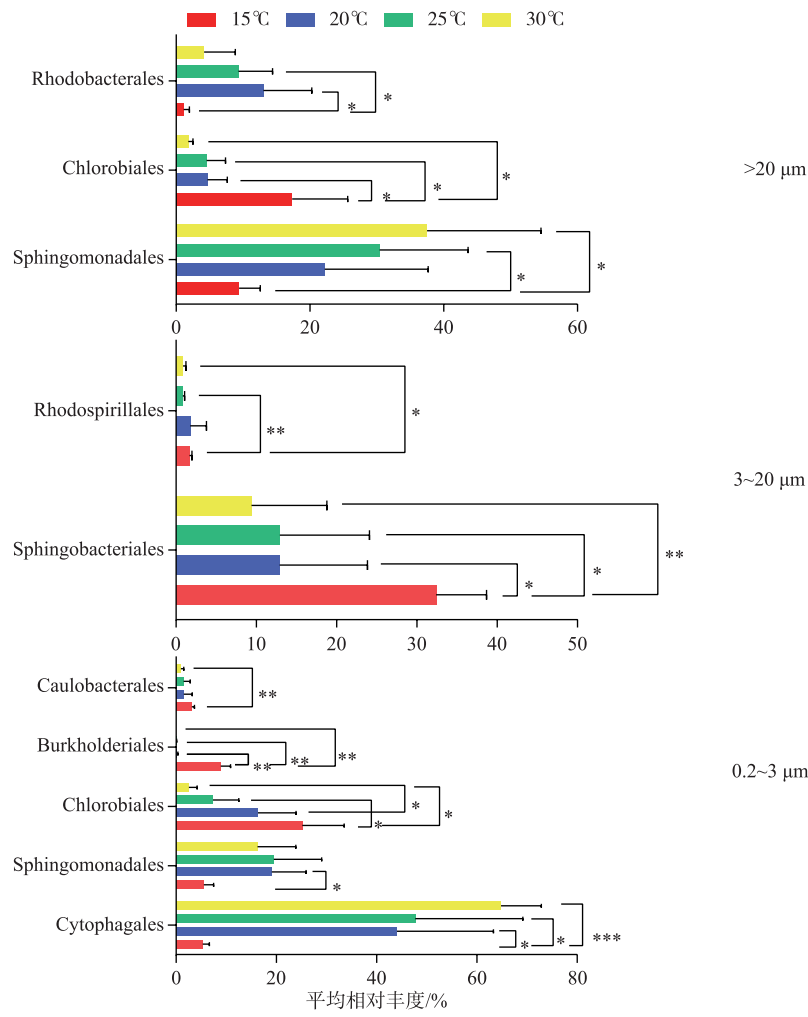


图 5 D2 群体培养体系中不同粒径包括微囊藻群体(>20 μm)附生细菌、单细胞—小群体(3~20 μm)附生细菌和游离(0.2~3 μm)细菌群落在 15、20、25 和 30℃ 下目水平的丰度差异 (去除蓝藻序列, One-way ANOVA, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Fig.5 At order level, differential abundance of bacterial communities attached with *Microcystis* colony (>20 μm), single cell-small colony (3~20 μm) and free-living (0.2~3 μm) bacterial community in colonial D2 culture systems at 15, 20, 25 and 30°C (after removing cyanobacteria sequences, One-way ANOVA, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

表 1 D2 群体培养体系中细菌群落在 15、20、25 和 30℃ 下物种相关网络特征参数(含蓝藻序列)

Tab.1 Key parameters of species-related network in bacterial community in colonial D2 culture systems at different temperatures (including cyanobacteria sequences)

温度	节点数	连线数	正相关连线数	负相关连线数	正负相关连线数比
15℃	47	296	155	141	1.10
20℃	49	185	122	63	1.94
25℃	46	166	131	35	3.74
30℃	49	216	145	71	2.04

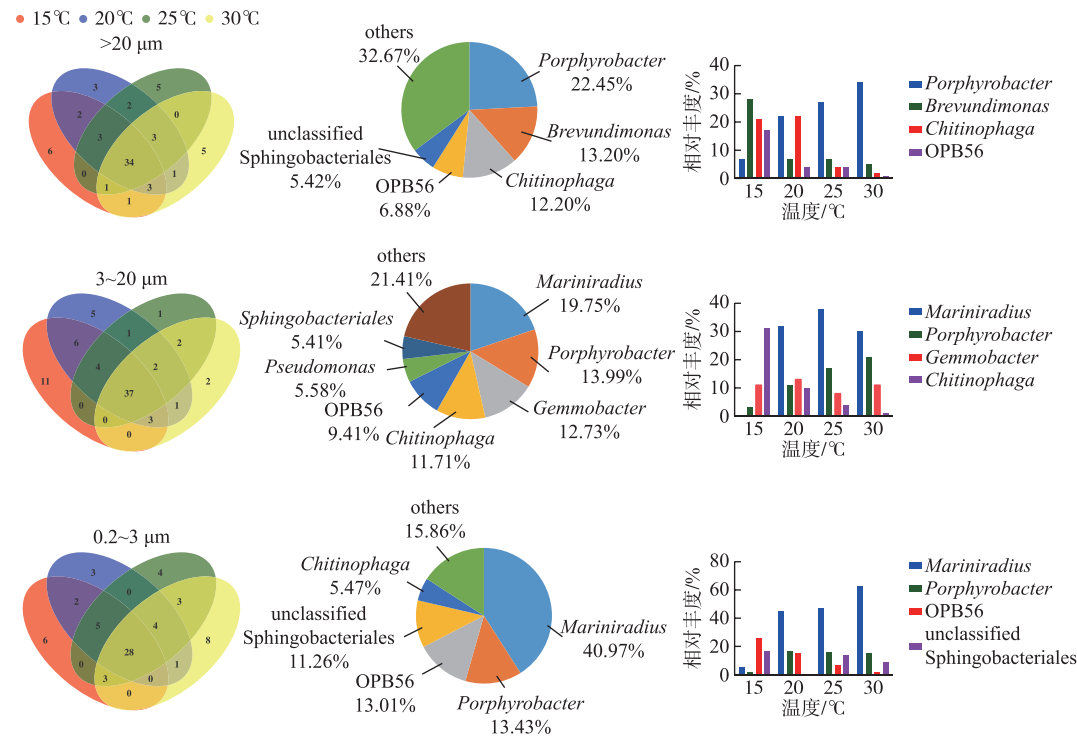


图 6 D2 群体培养体系中不同粒径包括微囊藻群体(>20 μm) 附生细菌、单细胞-小群体(3~20 μm) 附生细菌和游离(0.2~3 μm) 细菌群落在 15、20、25 和 30℃ 下属水平的核心微生物组分析(去除蓝藻序列)

Fig.6 At genus level, analysis of core microbiome in bacterial communities attached with *Microcystis* colony (>20 μm), single cell-small colony (3~20 μm) and free-living (0.2~3 μm) bacterial community in colonial D2 culture systems at 15, 20, 25 and 30℃ (after removing cyanobacteria sequences)

表 2 D2 群体培养体系中细菌群落在 15、20、25 和 30℃ 下相关网络关键物种分布情况(含蓝藻序列)
Tab.2 Key parameters of species-related network in bacterial community in colonial D2 culture systems at 15, 20, 25 and 30℃ (including cyanobacteria sequence)

	15℃	20℃	25℃	30℃
节点编号	2	32	37	24
节点名称	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>FukuN57</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>
度中心性	0.57	0.35	0.31	0.42
紧密中心性	0.65	0.51	0.51	0.59
介数中心性	0.09	0.07	0.05	0.13

3 讨论

3.1 D2 群体培养体系中不同粒径中的细菌群落多样性及组成受温度影响的差异

水体环境条件(如温度、营养盐等)是影响细菌群落结构的重要因素^[36],探讨在不同环境条件下特定藻的藻际细菌群落组成变化,对于深入认识藻菌关系及其在藻类水华中的影响具有重要的意义. 本研究中铜绿微囊藻群体 D2,从太湖分离得到后,在室内培养条件下一直保持着很好的群体形态,从生长及聚集情况上来看,和野外暴发的水华蓝藻状态很相似(部分群体颗粒粒径可超过 100 μm),可以作为野外水华蓝藻与细菌关系研究的重要补充材料. 有研究发现,相比群体微囊藻,单细胞微囊藻附生细菌多样性较低^[37],本研究

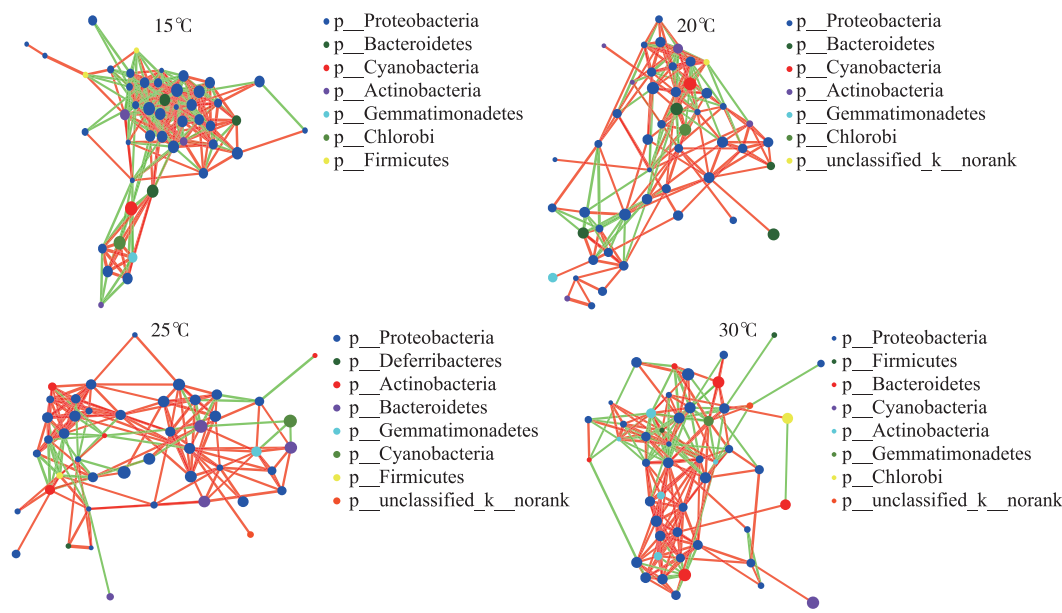


图 7 D2 群体培养体系中细菌群落在 15、20、25 和 30℃ 下物种相关性网络复杂度分析 (包含蓝藻序列)
Fig.7 Complexity analysis of species-related network of bacteria communities in colonial D2 culture systems at 15, 20, 25 and 30℃ (including cyanobacteria sequences)

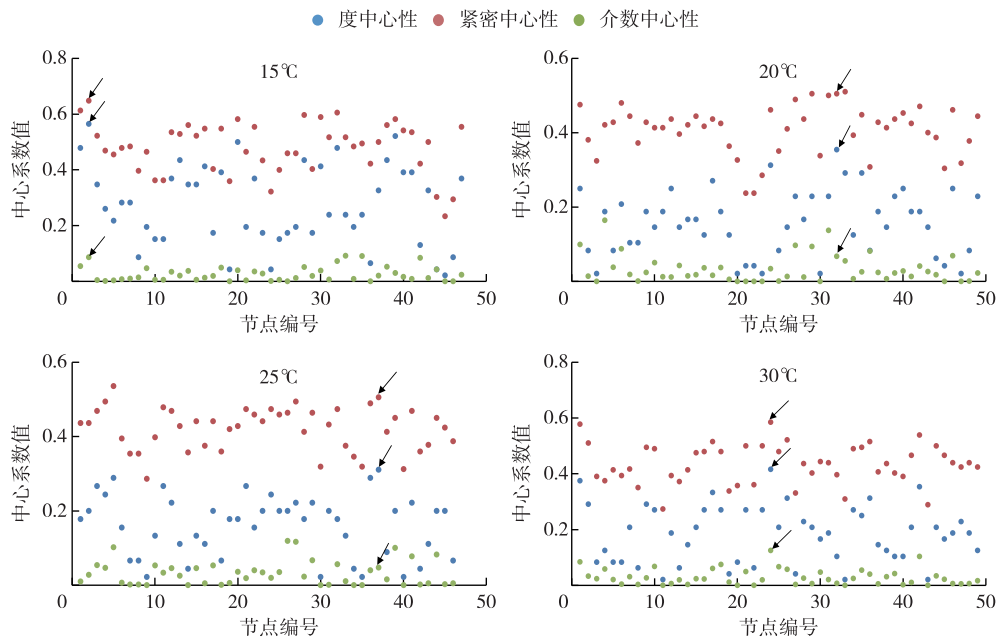


图 8 D2 群体培养体系中细菌群落在 15、20、25 和 30℃ 下物种相关性网络中心性分析 (含蓝藻序列, 箭头所示为关键物种)
Fig.8 Centrality analysis of species-related network of bacterial communities in colonial D2 culture systems at 15, 20, 25 and 30℃ (including cyanobacteria sequences, the arrows showed the keystone taxa)

则分析了 D2 群体在 15、20、25 和 30℃ 下培养时, 3 种粒径 (>20 、 $3\sim20$ 、 $0.2\sim3\ \mu\text{m}$) 中的细菌群落多样性变化. 由于过滤体积较小, 因此由滤膜堵塞造成的 3 种粒径中细菌群落的重叠基本上可以忽略, 且在使用 $20\ \mu\text{m}$ 滤膜时, 选用的负压较低 ($0.01\ \text{MPa}$), 所需的过滤时间也短 ($3\sim5\ \text{s}$), 不会打散微囊藻群体. 多样性分析结果表明, 在微囊藻群体附生细菌群落的多样性指数和丰富度指数在不同温度下均没有显著性差异, 而单细胞—小群体附生细菌群落的 PD 多样性指数和游离细菌群落的 Shannon 指数, 在 15℃ 下分别均显著高于 25℃ 和 30℃ 下的, 说明单细胞—小群体附生和游离的细菌群落在温度较低时组成更为多样.

微囊藻群体附生细菌的群落组成与游离细菌群落组成不同, 不同大小的微囊藻群体附生细菌的群落组成也具有差异性^[38]. PERMANOVA 分析表明, 温度能分别单独解释微囊藻群体附生、单细胞—小群体附生和游离细菌群落组成总体差异的 44.38%、45.97% 和 65.35%, 说明温度对细菌群落组成的影响随群体粒径的增加而减弱, 即相比附着在大群体上的细菌群落对温度变化的响应, 游离菌对温度变化的响应更为强烈. PERMANOVA 分析揭示, 粒径大小能分别单独解释 15、20、25 和 30℃ 下样本群落组成总体差异的 60.87%、37.29%、35.74% 和 48.22%, 表明同一温度下, 粒径大小对细菌群落组成的影响程度也具有差异性, 差异性从低到高依次是: $25^\circ\text{C} < 20^\circ\text{C} < 30^\circ\text{C} < 15^\circ\text{C}$. 这说明在较高温度 (30℃) 和较低温度 (15℃) 下, 不同粒径细菌群落组成差异增大, 表明温度影响了附生细菌与游离细菌群落组成之间的交流.

Shi 等^[18]发现 Sphingomonadales 是微囊藻附生细菌中常见的一类, 该目下物种的典型特征是能产出鞘磷脂 (glycosphingolipids, GSLs)^[39], 而 GSLs 是在细菌的外膜上, 具有类似于脂多糖功能的物质^[40], 在微囊藻群体附生细菌群落中, Sphingomonadales 相对丰度最高, 其分泌的鞘磷脂可能也在群体维持中发挥作用, 此外 Sphingomonadales 相对丰度在 30℃ 下最高, 说明高温下更利于该菌在微囊藻藻际中生长. 其次是 Caulobacterales, 据文献报道^[41], Caulobacterales 能够在海洋或者淡水环境下, 产生粘附素 (holdfast adhesin). 在微囊藻群体附生细菌群落中, Caulobacterales 相对丰度在 15℃ 下最高, 其它 3 个温度下总体相对稳定, 这也解释了 15℃ 下 D2 能较好地保持群体形态, 可能与产生粘附素的细菌增加有关. 研究表明 Sphingobacteriales 对 N、P 营养元素变化非常敏感^[42-43]. 另一个可能与固氮过程有关的 Pseudomonadales^[44]在单细胞—小群体附生细菌群落中相对丰度很高, 其相对丰度除在 15℃ 下较高, 在另外 3 个温度下基本保持稳定. 这意味着与该菌有关的 N、P 营养元素的利用率可能也受到温度的影响. 在单细胞—小群体附生和游离细菌群落中, Cytophagales 相对丰度分别位于第二和第一, 分别占 15.65% 和 33.44%, 而且在这 2 种粒径的细菌群落组成受不同温度影响的整体变化趋势相同: 15℃ 下相对丰度保持在较低水平, 20℃ 和 25℃ 下持续增加, 直至在 30℃ 下相对丰度最高. Cytophagales 是能够溶解蓝藻细胞的一类细菌^[45-46], 说明随着温度升高, 该菌在裂解转化部分死亡蓝藻中起到重要的作用, 从而可能加速了营养盐的循环, 更有利于蓝藻的生长. 在野外发生蓝藻水华的湖泊水柱下部 (水深 25 cm 处), Chlorobiales 这一类硫化细菌^[47-48]的相对丰度最高^[49], 本研究发现, Chlorobiales 只在游离细菌群落中相对丰度较高, 并且其丰度随温度升高而降低, 说明此类菌可能在藻释放到水体的胞外产物的转化中起到重要作用.

3.2 D2 群培养体系中不同粒径细菌群落在 4 种温度下核心微生物多样性差异

Kim 等^[50]发现, 对比初始野外微囊藻样品细菌群落组成, 在室内继代培养一年后的微囊藻培养体系细菌群落中, *Brevundimonas* 和 *Pseudomonas* 成为与铜绿微囊藻建立长期共生关系的优势菌种, 能够促进铜绿微囊藻的生长, 这与本研究结果相一致. *Porphyrobacter* 在微囊藻群体附生细菌群落中的相对丰度最高, 说明 *Porphyrobacter* 可能是具有促进微囊藻群体生长作用的一类特殊细菌^[10]. 但值得注意的是, *Porphyrobacter* 在 3 种粒径下, 相对丰度在 20~30℃ 时都比 15℃ 要高, 且 20~30℃ 时, 其相对丰度在游离细菌群落中不再有较大变化, 这表明较高温度可能更有利于 *Porphyrobacter* 的生长, Hanada 等也曾从温泉中分离出该属一个新的嗜热细菌^[51]. 在 4 种温度下, *Brevundimonas* 均只存在于微囊藻群体附生细菌群落中, 其相对丰度在 15℃ 下最高, 20~30℃ 时降低且在该温度范围内基本保持稳定, 表明该菌可能在低温下的微囊藻群体生长中起到重要作用. 而在微囊藻群体附生细菌群落中, *Porphyrobacter* 相对丰度最高, 其次是 *Brevundimonas*, 这一点与 Kim 等^[50]的报道有所不同, 可能是由于藻种不同所产生的差异. Bhumika 等^[52]在 2013 年发现 Cyclobacteriaceae 科里一个新属——*Mariniradius*. 本研究发现 *Mariniradius* 只存在于单细胞—小群体附生和游离细菌群落的核心物种中, 且在 20~30℃ 相对丰度很高并相对稳定, 同时只包含 *Saccharolyticus* AK6 一个种, 该菌可

能与高温下 D2 群体与单细胞微囊藻之间的转变过程中有关. 此外,在单细胞—小群体附生细菌的核心优势菌属中,*Gemmobacter* 相对丰度在 4 种温度下均较为平稳,作为重要的反硝化细菌^[53],Shi 等^[54]发现该属细菌与碳分解有关,当在大气 CO₂ 浓度条件下,富营养化水体中的 *Gemmobacter* 相对丰度也会升高,这类细菌对温度变化不敏感,能稳定存在单细胞—小群体附生细菌群落中,表明其作为核心优势菌属,对群落碳氮等物质循环可能发挥着重要作用.

3.3 D2 群体培养体系中细菌群落在 4 种温度下物种相关性网络复杂度分析

Zhao 等^[55]通过全年调查 6 个城市淡水湖泊并结合网络分析发现,其浮游细菌群落网络会随季节的变化存在明显的差异,而温度是影响蓝藻菌群的重要因素之一. Lin 等^[56]对太湖水体细菌群落进行了网络分析研究,发现野外不同季节细菌群落之间的相互作用存在显著差异,秋季细菌网络是最大和最复杂的,而春季细菌相关网络是最简单的. 但不同的是,Jiao 等^[57]发现浮游细菌群落网络在冬季具有较高的复杂性,形成了高度稳定的群落结构,Kara 等^[58]调查富营养化淡水湖的浮游细菌群落十年间季节动态和共生现象,发现春季条件类群丰度会减少,但总体上导致类群(特别是丰度最高的类群)间有更密切的联系. 本研究通过模拟温度变化,发现 15℃ 下的细菌群落组成最为复杂,其次是 30℃ 下的,说明低温(15℃)和高温(30℃)有利于加强细菌之间的联系. 尽管温度发生变化,但物种间的合作关系仍占主要地位,本研究发现,25℃ 下细菌之间的连线数虽然最少,但正负相关连线数比是最高的,而 15℃ 下细菌物种间联系最为密切,但正负相关连线数比是最低的,说明温度升高促进了细菌之间的合作关系,细菌之间合作关系的增加可能促进营养盐循环,从而有利于蓝藻水华的发生.

4 结论

1) 温度显著影响微囊藻群体附生细菌、单细胞—小群体附生细菌和游离细菌群落组成,单细胞—小群体附生细菌群落和游离细菌群落在温度较低时,组成更为多样.

2) 从不同粒径下的优势菌目,对温度的响应来看: *Sphingobacteriales* 在微囊藻群体附生细菌群落、单细胞—小群体附生细菌群落和游离细菌群落中均具有相对稳定性;当温度在 20~30℃ 间变化时, *Caulobacteriales* 和 *Pseudomonadales* 相对丰度分别在微囊藻群体附生细菌群落和单细胞—小群体附生细菌群落中保持稳定.

3) 微囊藻群体附生细菌的核心优势菌属 *Brevundimonas* 和 OPB56 的相对丰度在温度 20~30℃ 之间相对稳定;单细胞—小群体附生细菌群落中的核心优势菌属 *Mariniradius* 相对丰度也是在该温度范围也较为稳定,而 *Gemmobacter* 相对丰度在 4 种温度下均较为一致;游离细菌群落的核心优势菌属 *Porphyrobacter* 的相对丰度在温度 20~30℃ 之间相对稳定.

4) 温度影响微囊藻群体培养体系中细菌群落物种相关性网络的复杂度,影响细菌之间的网络关联和关键物种组成,温度升高促进了物种间的合作关系.

5 参考文献

- [1] Xiao M, Li M, Reynolds CS. Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. *Biological Reviews*, 2018, **93**(3): 1399-1420. DOI: 10.1111/brv.12401.
- [2] Kong FX, Gao G. Hypothesis on cyanobacteria bloom-forming mechanism in large shallow eutrophic lakes. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, **25**(3): 589-595. [孔繁翔, 高光. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考. 生态学报, 2005, **25**(3): 589-595.]
- [3] Pope PB, Patel BKC. Metagenomic analysis of a freshwater toxic cyanobacteria bloom. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, **64**(1): 9-27. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00448.x.
- [4] Guo L. Ecology. Doing battle with the green monster of Taihu Lake. *Science*, 2007, **317**(5842): 1166. DOI: 10.1126/science.317.5842.1166.
- [5] Yamamoto Y, Shiah FK, Chen YL. Importance of large colony formation in bloom-forming cyanobacteria to dominate in eutrophic ponds. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology*, 2011, **47**(2): 167-173. DOI: 10.1051/limn/2011013.
- [6] Walsby AE, Hayes PK, Boje R. The gas vesicles, buoyancy and vertical distribution of cyanobacteria in the Baltic Sea.

- European Journal of Phycology*, 1995, **30**(2): 87-94. DOI: 10.1080/09670269500650851.
- [7] Duan ZP, Tan X, Parajuli K *et al.* Colony formation in two *Microcystis* morphotypes: Effects of temperature and nutrient availability. *Harmful Algae*, 2018, **72**: 14-24. DOI: 10.1016/j.hal.2017.12.006.
- [8] Qu Z, Zhao MM, Duan PF *et al.* Effects of nitrogen forms and supply modes on colony formation in *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 2018, **30**(2): 831-837. DOI: 10.1007/s10811-017-1327-8.
- [9] Xu F, Zhu W, Xiao M *et al.* Interspecific variation in extracellular polysaccharide content and colony formation of *Microcystis* spp. cultured under different light intensities and temperatures. *Journal of Applied Phycology*, 2016, **28**(3): 1533-1541. DOI: 10.1007/s10811-015-0707-1.
- [10] Shen H, Niu Y, Xie P *et al.* Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshwater Biology*, 2011, **56**(6): 1065-1080. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2010.02551.x.
- [11] Li Q, Lin FB, Yang C *et al.* A large-scale comparative metagenomic study reveals the functional interactions in six bloom-forming *Microcystis*-epibiont communities. *Frontiers in Microbiology*, 2018, **9**: 746. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00746.
- [12] Zhang ZY, Fan XJ, Peijnenburg WJGM *et al.* Alteration of dominant cyanobacteria in different bloom periods caused by abiotic factors and species interactions. *Journal of Environmental Sciences*, 2021, **99**: 1-9. DOI: 10.1016/j.jes.2020.06.001.
- [13] Li HB, Xing P, Chen MJ *et al.* Short-term bacterial community composition dynamics in response to accumulation and breakdown of *Microcystis* blooms. *Water Research*, 2011, **45**(4): 1702-1710. DOI: 10.1016/j.watres.2010.11.011.
- [14] Berry MA, Davis TW, Cory RM *et al.* Cyanobacterial harmful algal blooms are a biological disturbance to Western Lake Erie bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2017, **19**(3): 1149-1162. DOI: 10.1111/1462-2920.13640.
- [15] Casamatta DA, Wickstrom CE. Sensitivity of two disjunct bacterioplankton communities to exudates from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. *Microbial Ecology*, 2000, **40**(1): 64-73. DOI: 10.1007/s002480000035.
- [16] González JM, Simó R, Massana R *et al.* Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(10): 4237-4246. DOI: 10.1128/AEM.66.10.4237-4246.2000.
- [17] Sarmento H, Gasol JM. Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton. *Environmental Microbiology*, 2012, **14**(9): 2348-2360. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02787.x.
- [18] Shi LM, Cai YF, Yang HL *et al.* Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with *Microcystis aeruginosa* and other cyanobacteria. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, **21**(11): 1581-1590. DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62459-6.
- [19] Shia LM, Cai YF, Wang XY *et al.* Community structure of bacteria associated with *Microcystis* colonies from cyanobacterial blooms. *Journal of Freshwater Ecology*, 2010, **25**(2): 193-203. DOI: 10.1080/02705060.2010.9665068.
- [20] Xing P, Kong FX, Cao HS *et al.* Variations of bacterioplankton community composition during *Microcystis* spp. blooms in a shallow eutrophic lake. *Journal of Freshwater Ecology*, 2007, **22**(1): 61-67. DOI: 10.1080/02705060.2007.9664146.
- [21] Shi L, Cai Y, Kong F *et al.* Specific association between bacteria and buoyant *Microcystis* colonies compared with other bulk bacterial communities in the eutrophic Lake Taihu, China. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, **4**(6): 669-678. DOI: 10.1111/1758-2229.12001.
- [22] Dziallas C, Grossart HP. Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp.. *Environmental Microbiology*, 2011, **13**(6): 1632-1641. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02479.x.
- [23] Wang H, Zhu R, Zhang XL *et al.* Abiotic environmental factors override phytoplankton succession in shaping both free-living and attached bacterial communities in a highland lake. *AMB Express*, 2019, **9**(1): 1-13. DOI: 10.1186/s13568-019-0889-z.
- [24] Tang XM, Chao JY, Gong Y *et al.* Spatiotemporal dynamics of bacterial community composition in large shallow eutrophic Lake Taihu: High overlap between free-living and particle-attached assemblages. *Limnology and Oceanography*, 2017, **62**(4): 1366-1382. DOI: 10.1002/lno.10502.
- [25] Zu Y, Hong SJ, Xu CX *et al.* Cell wall surface layer (S-layer) promotes colony formation in *Microcystis*: Comparison of S-layer characteristics between colonial and unicellular forms of *Microcystis* and function conformation. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, **27**(34): 42254-42263. DOI: 10.1007/s11356-020-08254-w.
- [26] Zhu W, Zhou XH, Chen HM *et al.* High nutrient concentration and temperature alleviated formation of large colonies of

- Microcystis*: Evidence from field investigations and laboratory experiments. *Water Research*, 2016, **101**: 167-175. DOI: 10.1016/j.watres.2016.05.080.
- [27] Tillett D, Neilan BA. Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 2000, **36**(1): 251-258. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2000.99079.x.
- [28] Kataoka T, Homma T, Nakano SI *et al.* PCR primers for selective detection of intra-species variations in the bloom-forming cyanobacterium, *Microcystis*. *Harmful Algae*, 2013, **23**: 46-54. DOI: 10.1016/j.hal.2012.12.003.
- [29] Duan XZ, Sun JT, Wang LT *et al.* Recent infection by *Wolbachia* alters microbial communities in wild *Laodelphax striatellus* populations. *Microbiome*, 2020, **8**(1): 1-15. DOI: 10.1186/s40168-020-00878-x.
- [30] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, **27**(21): 2957-2963. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr507.
- [31] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, **10**(10): 996-998. DOI: 10.1038/nmeth.2604.
- [32] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(7): 5069-5072. DOI: 10.1128/aem.03006-05.
- [33] Jurasinski G, Retzer V, Beierkuhnlein C. Inventory, differentiation, and proportional diversity: A consistent terminology for quantifying species diversity. *Oecologia*, 2009, **159**(1): 15-26. DOI: 10.1007/s00442-008-1190-z.
- [34] Banerjee S, Schlaeppi K, van der Heijden MGA. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, **16**(9): 567-576. DOI: 10.1038/s41579-018-0024-1.
- [35] Berry D, Widder S. Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Frontiers in Microbiology*, 2014, **5**: 219. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00219.
- [36] Schweitzer-Natan O, Ofek-Lalzar M, Sher D *et al.* Particle-associated microbial community in a subtropical lake during thermal mixing and phytoplankton succession. *Frontiers in Microbiology*, 2019, **10**: 2142. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02142.
- [37] Wang WJ, Zhang YL, Shen H *et al.* Changes in the bacterial community and extracellular compounds associated with the disaggregation of *Microcystis* colonies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, **61**: 62-66. DOI: 10.1016/j.bse.2015.04.016.
- [38] Wu Q, Zhang YP, Li YM *et al.* Comparison of community composition between *Microcystis* colony-attached and free-living bacteria, and among bacteria attached with *Microcystis* colonies of various sizes in culture. *Aquatic Ecology*, 2019, **53**(3): 465-481. DOI: 10.1007/s10452-019-09702-7.
- [39] Glaeser SP, Kämpfer P. The family Sphingomonadaceae. In: Rosenberg E, Delong EF, Lory S *et al* eds. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Berlin; Springer, 2014: 641-707.
- [40] Kawasaki S, Moriguchi R, Sekiya K *et al.* The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *Journal of Bacteriology*, 1994, **176**(2): 284-290. DOI: 10.1128/jb.176.2.284-290.1994.
- [41] Chepkwony NK, Berne C, Brun YV *et al.* Comparative analysis of Ionic strength tolerance between freshwater and marine *Caulobacteriales* adhesins. *Journal of Bacteriology*, 2019, **201**(18). DOI: 10.1128/JB.00061-19.
- [42] Dennis PG, Seymour J, Kumbun K *et al.* Diverse populations of lake water bacteria exhibit chemotaxis towards inorganic nutrients. *The ISME Journal*, 2013, **7**(8): 1661-1664. DOI: 10.1038/ismej.2013.47.
- [43] Hester ER, Harpenslager SF, van Diggelen J, *et al.* Linking nitrogen load to the structure and function of Wetland soil and rhizosphere microbial communities. *mSystems*, 2018, **3**(1). DOI: 10.1128/mSystems.00214-17.
- [44] Gupta RS. The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Critical reviews in microbiology*. 2008, **26**(2): 111-131. DOI: 10.1080/10408410091154219.
- [45] Rashidan KK, Bird DF. Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. *Microbial Ecology*, 2001, **41**(2): 97-105. DOI: 10.1007/s002480000074.
- [46] Imai I, Ishida Y, Hata Y. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Marine Biology*, 1993, **116**(4): 527-532. DOI: 10.1007/BF00355470.
- [47] Overmann J. Ecology of phototrophic sulfur bacteria. In: Hell R, Dahl C, Knapp D *et al* eds. *Dordrecht; Springer Netherlands*, 2008: 375-396.

- [48] Marnocha CL, Levy AT, Powell DH *et al.* Mechanisms of extracellular S⁰ globule production and degradation in *Chlorobaculum tepidum* via dynamic cell-globule interactions. *Microbiology*, 2016, **162** (7): 1125-1134. DOI: 10.1099/mic.0.000294.
- [49] Bhatnagar S, Cowley ES, Kopf SH *et al.* Microbial community dynamics and coexistence in a sulfide-driven phototrophic bloom. *Environmental Microbiome*, 2020, **15** (1): 1-17. DOI: 10.1186/s40793-019-0348-0.
- [50] Kim M, Lee J, Yang D *et al.* Seasonal dynamics of the bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in the Han River. *Environmental Pollution*, 2020, **266**. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115198.
- [51] Hanada S, Kawase Y, Hiraishi A *et al.* *Porphyrobacter tepidarius* sp. nov., a moderately thermophilic aerobic photosynthetic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, **47** (2): 408-413. DOI: 10.1099/00207713-47-2-408.
- [52] Bhumika V, Srinivas TNR, Ravinder K *et al.* *Mariniradius saccharolyticus* gen. nov., sp. nov., a member of the family Cylobacteriaceae isolated from marine aquaculture pond water, and emended descriptions of the genus *Aquiflexum* and *Aquiflexum balticum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, **63** (Pt_6): 2088-2094. DOI: 10.1099/ijs.0.043919-0.
- [53] Wang XJ, Wang WQ, Zhang J *et al.* Dominance of Candidatus saccharibacteria in SBRs achieving partial denitrification: Effects of sludge acclimating methods on microbial communities and nitrite accumulation. *RSC Advances*, 2019, **9** (20): 11263-11271. DOI: 10.1039/C8RA09518C.
- [54] Shi M, Li JY, Zhou Q *et al.* Interactions between elevated CO₂ levels and floating aquatic plants on the alteration of bacterial function in carbon assimilation and decomposition in eutrophic waters. *Water Research*, 2020, **171**. DOI: 10.1016/j.watres.2019.115398.
- [55] Zhao DY, Shen F, Zeng J *et al.* Network analysis reveals seasonal variation of co-occurrence correlations between Cyanobacteria and other bacterioplankton. *Science of the Total Environment*, 2016, **573**: 817-825. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.150.
- [56] Lin YQ, Zhao DY, Zeng J *et al.* Network analysis reveals seasonal patterns of bacterial community networks in Lake Taihu under aquaculture conditions. *Water*, 2019, **11** (9): 1868. DOI: 10.3390/w11091868.
- [57] Jiao C, Zhao D, Zeng J *et al.* Disentangling the seasonal co-occurrence patterns and ecological stochasticity of planktonic and benthic bacterial communities within multiple lakes. *Science of the Total Environment*, 2020, **740**. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140010.
- [58] Kara EL, Hanson PC, Hu YH *et al.* A decade of seasonal dynamics and co-occurrences within freshwater bacterioplankton communities from eutrophic Lake Mendota, WI, USA. *The ISME Journal*, 2013, **7** (3): 680-684. DOI: 10.1038/ismej.2012.118.