

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 群体生长与解散过程中的细菌群落变化*

刘佳音¹, 方道艳¹, 张玉晴², 王艺饶², 蔡元锋³, 施丽梅^{2**}, 李朋富^{1**}, 吴庆龙²

(1: 南京大学生命科学院, 南京 210093)

(2: 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 湖泊与流域水安全全国重点实验室, 南京 211135)

(3: 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展全国重点实验室, 南京 211135)

摘要: 微囊藻藻际中生长着大量的细菌, 它们影响微囊藻的生长以及藻群体的维持, 在水华的生消过程中发挥着重要作用。微囊藻的生长伴随着微囊藻群体的形成与解散, 但在此过程中附生细菌群落的变化规律仍然未知。本文针对一株从太湖中分离的群体铜绿微囊藻, 在不同的培养温度下监测其生长和解散过程, 揭示与微囊藻群体密切相关的细菌类群。结果表明: 在 15~30 °C, 该群体微囊藻展示出差异化的生长周期, 温度越高群体解散越快, 微囊藻群体数目达到峰值的时间越短。随着 D2 群体的生长, >20 μm 的微囊藻群体附生细菌群落从以 *Pseudomonadales* 为主转变为以 *Sphingomonadales* 为主; 3~20 μm 的单细胞一小群体微囊藻附生细菌群落及游离细菌群落中的优势菌群均从 *Pseudomonadales* 转变为 *Cytophagales*。 *Limnobacter* 只在游离细菌群落中相对丰度较高; *Roseococcus* 只在 >20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中有较高的相对丰度; *Porphyrobacter* 在游离细菌群落及 3~20 μm 的单细胞一小群体微囊藻附生细菌群落中相对丰度较高; *Mesorhizobium* 在 3~20 μm 的单细胞一小群体微囊藻附生细菌群落及 >20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中有较高的相对丰度。对不同粒径及不同温度下的细菌群落进行 Venn 图及特异性-占有率 (SPEC-OCCU) 图分析发现, 部分独有种及特化种只在 15 °C 下出现, OTU669 (*Methylobacteriaceae*)、OTU722 (*Brevundimonas* sp.) 和 OTU682 (*Pseudoxanthobacter* sp.) 在所有温度下均为 >20 μm 的 D2 群体附生细菌群落的特化种。网络分析结果表明, >20 μm 的微囊藻群体的附生细菌网络中关键节点最多。本研究揭示了微囊藻群体生长过程中藻际细菌群落组成的变化, 有助于深入了解附生细菌在微囊藻群体维持及水华中的作用。

关键词: 蓝藻水华; 铜绿微囊藻群体; 细菌群落结构; 附着细菌; 游离细菌

Changes in bacterial communities during growth and disaggregation of colonial *Microcystis aeruginosa**

Liu Jiayin¹, Fang Daoyan¹, Zhang Yuqing², Wang Yirao², Cai Yuanfeng³, Shi Limei^{2**}, Li Pengfu^{1**} & Wu Qinglong²

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

(2: State Key Laboratory of Lake and Watershed Science for Water Security, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 211135, P.R.China)

(3: State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 211135, P.R.China)

Abstract: A large number of bacteria inhabit in *Microcystis* phycosphere. They affect the growth and colony maintenance of *Microcystis*, and play important roles in the development and elimination of *Microcystis* blooms. Bacteria accompany the formation and disaggregation of *Microcystis aeruginosa* colonies during their growth, but changes in bacterial communities during the process were still unclear. In this study, *Microcystis* colony development and bacterial community variation in colonial *Microcystis* strains isolated

* 2024-04-07 收稿; 2024-09-26 收修改稿。

国家自然科学基金项目 (32371606, 31971449) 资助。

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

from Lake Taihu were monitored during cultivation at different temperatures. The experimental results showed that the growth pattern of this colonial *Microcystis* strain to varying temperatures from 15 °C to 30 °C was different, the higher the temperature the faster the colonies disaggregate, and the shorter the time for *Microcystis aeruginosa* colonies to reach the peak. During the growth process of D2 colonies, the dominant bacterial communities associated with *Microcystis* colonies of >20 μm shifted from *Pseudomonadales* to *Sphingomonadales*; The dominant bacterial communities associated with unicellular-small *Microcystis* colonies of 3–20 μm changed from *Pseudomonadales* to *Cytophagales*, which were similar to those in the free-living bacterial community. On genus level, *Limnobacter* were dominated only in the free-living bacterial community; *Roseococcus* were dominated only in *Microcystis* colonies of >20 μm; *Porphyrobacter* were dominated in free-living bacterial community and unicellular-small *Microcystis* colonies of 3–20 μm; and *Mesorhizobium* were dominated in unicellular-small *Microcystis* colonies of 3–20 μm and *Microcystis* colonies of >20 μm. Venn diagrams and specificity-occupancy (SPEC-OCU) plots of bacterial communities at different particle sizes and temperatures revealed that some exclusive and specialized species only appeared at 15 °C, OTU669 (*Methylobacteriaceae*), OTU722 (*Brevundimonas* sp.) and OTU682 (*Pseudoxanthobacter* sp.) were specialized species of the *Microcystis* colonies of >20 μm at all temperatures. Network analyses revealed that bacterial communities in *Microcystis* colonies of >20 μm had the most critical nodes. These results revealed variation patterns in bacterial community composition of different particle sizes during the growth process of colonial *Microcystis aeruginosa*. This study would contribute to a better understanding of the role of bacterial communities in *Microcystis* blooms.

Keywords: Cyanobacterial bloom; *Microcystis aeruginosa* colony; bacterial community; attached bacteria; free-living bacteria

在全球气候变化与人为干扰持续加剧的双重压力下,蓝藻水华在全球淡水生态系统中频繁暴发,其中微囊藻(*Microcystis* spp.)是水华蓝藻的主要优势种。微囊藻水华是淡水水体面临的重要环境问题:部分水华微囊藻会产生蓝藻毒素,具有肝毒性,对人类和动物的健康产生危害^[1]。此外微囊藻水华还会导致底层缺氧,从而影响水生动植物生长,产生一系列生态问题^[2]。微囊藻通常以群体的形式出现,群体形态有助于其适应不同的光照,减少被浮游动物捕食的概率,在营养匮乏等不利条件下,藻际生长的微生物可为其提供所需的营养物质,这使得群体微囊藻具有更高的竞争优势,也是微囊藻水华发生的关键机制之一^[3-4]。

微囊藻的生长繁殖不仅会受到水体富营养化程度、光照、水体流动和水温等的影响^[2,5-6],还会受到生活在微囊藻群体藻际中各种细菌生命活动的影响^[3]。藻类及其周围胞外产物包括营养物质、化学引诱剂或抗菌物质等形成的微环境称为藻际,在藻际内的细菌接触到的藻类分泌物很大程度上导致了细菌的定殖,且可能对定殖细菌具有选择作用,因此特定藻类的附生细菌往往具有特异性^[4,7-9]。已有多项研究发现微囊藻附生细菌可以诱导单细胞微囊藻形成微囊藻群体并影响微囊藻群体的大小和生长速度^[4,9-12];Dai等发现微囊藻群体的大小与附着细菌密度呈正相关,表明附着细菌有利于微囊藻群体的形成^[9];Shen等将从微囊藻中分离出的细菌与单细胞微囊藻共培养后发现其可以形成群体^[10];Wu等发现 *Chryseobacterium* sp.和 *Pseudomonas chengduensis* 明显增加了铜绿微囊藻群体的大小,而 *Exiguobacterium indicum*、*Delftia* sp.、*Bacillus cereus* 和 *Stenotrophomonas maltophilia* 使群体明显变小,但对微囊藻生长速度没有影响,*Aeromonas caviae* 和 *Sphingopyxis* sp.对群体大小没有影响,但 *Aeromonas caviae* 会促进微囊藻的生长^[12]。湖泊浮游细菌群落组成的变化伴随着蓝藻的组成变化^[13-14]。微囊藻水华强度变化会改变水体生态系统及水环境的物理化学特征,进而影响水体中细菌群落结构组成^[7]。微囊藻群体附生细菌群落的变化也受到环境因素差异的驱动^[15-16],各个细菌菌株的最适生长温度不同,温度变化会改变微囊藻群体附生细菌的群落结构,如 *Enterobacter*、*Brevundimonas* 和 *Sphingomonas* 等在 32 °C 下相对丰度更高^[15],而附生细菌群落的变化又会影响微囊藻群体的生长。因此,微囊藻与细菌之间存在相互影响,附着在微囊藻群体上的异养细菌对藻群体的形成具有非常重要的作用。

然而,微囊藻群体在实验室内培养过程中大都解散为单细胞,因此在微囊藻群体生长过程中细菌群落的变化规律仍然不清楚。Shi等对夏季及冬季太湖4个位点的微囊藻相关细菌、颗粒附着细菌和游离细菌群落进行了UPGMA分析,发现同一取样时间、同一生境中的大多数细菌群落都聚集在一起,而同一位点的细菌群落在夏季和冬季相差较大,因此在同一体系中,对于相同的细菌种群,时间差异的影响比空间差异大^[17]。探讨附生细菌在特定微囊藻生长周期内的组成变化,对于深入了解藻菌关系及微囊藻水华的形成与

消退具有非常重要的作用。本研究通过一株从太湖中分离并长期在实验室培养的群体微囊藻,该群体微囊藻在培养过程中部分藻群体解散为单细胞,部分仍然可以维持群体状态,探讨在不同温度及不同粒径下细菌群落组成的变化规律,试图解析与微囊藻群体生长和解散密切相关的细菌类群,从而有助于对附生细菌在微囊藻水华生消中作用的理解。

1 材料与方法

1.1 实验材料

藻种培养和样品采集的方法与方道艳等的相同^[18]。本研究所使用的铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 群体 D2, 是 2011 年从太湖分离纯化得到的。取对数生长期的 D2 群体接种于含 250 mL BG-11 培养基的 500 mL 灭菌锥形瓶中, 初始浓度为 5×10^4 cells/mL, 每组设置 3 个平行, 置于 15、20、25 和 30 °C 的光照培养箱 (GZX-300BS-III, 上海新苗医疗器械制造有限公司) 中培养。光照强度为 $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光暗周期为 12 h:12 h。

实验初期, 每 5 d 取一次样, 实验后期调整至每 10 d 或 15 d 取一次样, 共培养 80 d。所有操作均在超净工作台 (SW-CJ-1FD, 苏州安泰) 进行。每次取样前将藻液摇匀, 每瓶取 10 mL 藻液, 将 3 个平行的样品混合后用 20、3 及 $0.2 \mu\text{m}$ 的滤膜 (47 mm 直径, Millipore, Germany) 进行梯度过滤, 以收集 $>20 \mu\text{m}$ 的 D2 群体及其附生细菌、 $3 \sim 20 \mu\text{m}$ 的单细胞一小群体微囊藻及其附生细菌以及 $0.2 \sim 3 \mu\text{m}$ 的游离细菌, 将滤膜于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.2 实验方法

1.2.1 叶绿素 *a* 及比增长速率 每次取 3 mL 藻液, 使用浮游植物荧光仪 Phyto-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) 测定叶绿素 *a* 浓度 (Chl.*a*)。为了比较 D2 群体在不同温度下达到生物量峰值前的生长速率, 根据藻的生长曲线, 统一利用取样中期第 40 天的 Chl.*a* 浓度数据, 按照如下公式, 计算前 40 d 比增长速率 (μ):

$$\mu = (\ln N_{40} - \ln N_0) / t \quad (1)$$

其中, N_{40} 为第 40 天藻液的 Chl.*a* 浓度; N_0 为第 0 天的 Chl.*a* 浓度; t 为培养时间 (40 d)。

1.2.2 群体数目及形态 取 1 mL 藻液, 用倒置显微镜对 D2 群体进行计数, 重复 3 个平行。同时用光学显微镜 (Imager, A2x, ZEISS, Germany) 观察, 并用 ZEN 3 (blue dition) 拍照软件记录 D2 群体的形态变化。

1.2.3 DNA 提取、PCR 扩增和 Illumina Miseq 测序 此部分内容与方道艳等的实验方法相同^[18]。DNA 提取采用乙基黄原酸钾 (XS) 法^[19], 引物采用 338F 和 806R 对 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增, PCR 产物经纯化、检测定量后, 构建 PE 300 的文库。由上海美吉生物医药科技有限公司利用 Illumina 公司的 Miseq PE 300 平台进行测序。原始数据上传至 NCBI 数据库中, BioProject 序列号为 PRJNA700808^[18]。

1.3 数据处理

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件 (version 0.30) 质控, 使用 FLASH 软件进行拼接。使用 UPARSE 软件 (version 7.1. <http://drive5.com/uparse/>) 根据 97% 的相似度对序列进行分类操作单元 (Operational Taxonomic Unit, 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, 比对 Silva 数据库 (SSU123), 设置比对阈值为 70%^[18]。对测序数据进行均一化处理, 均一化序列数为 32544。初步数据通过 Excel 2016 进行整理。利用 GraphPad Prism 9 和 R 4.3.2 语言平台进行统计分析、单因素方差分析、群落组成分析、Venn 图分析、物种的生境特异性分析及微生物网络分析及绘图。

物种的生境特异性分析: 分别计算每个 OTU 的特异性和占有率, 然后将其投影到特异性-占有率图 (SPEC-OCCU 图) 上, 筛选出特异性和占有率 ≥ 0.7 的 OTU, 即它们具有生境特异性, 将其定义为特化种^[20]。节点的拓扑特征可由模块内连通性 (Z_i) 和模块间连通性 (P_i) 定义, 节点属性可根据其拓扑特征分为 4 类: 模块中心点 (module hubs, 在模块内部具有高连通度, $Z_i > 2.5$ 且 $P_i \leq 0.62$)、连接节点 (connectors, 在两个模块间具有高连通度, $Z_i \leq 2.5$ 且 $P_i > 0.62$)、网路中心点 (network hubs, 在整个网络中具有高连通度, $Z_i > 2.5$ 且 $P_i > 0.62$) 及外围节点 (peripherals, 在模块内部和模块之间均不具有高连通性, $Z_i \leq 2.5$ 且 $P_i \leq 0.62$)。除外围节点外的其余 3 类节点为关键节点, 这些节点代表了在维持微生物群落结构稳定性上可能起重要作用的关键物种^[21]。

2 结果分析

2.1 在不同温度下铜绿微囊藻群体 D2 的生长及形态变化

D2 群体的生长和解散表现出因温度而异的特点。在 15 °C 下 D2 群体数在第 20 天后开始缓慢增加,到第 40 天增加速度加快,到第 65 天时达到最大值,为 6387 个/mL(图 1)。20 °C 下,D2 群体数在第 0~25 天增加,第 25~55 天藻群体数目较为稳定,第 55 天后 D2 群体数减少。25、30 °C 下,D2 群体数分别在第 20、15 天达到峰值后迅速降低。温度越高,D2 群体达到峰值的时间越短:在 15、20、25 和 30 °C 下 D2 群体数目达到峰值的时间分别为第 65、25、20 和 15 天(图 1)。由图 2 可知,当温度为 15 °C 时,D2 群体的比增长速率最低,为 0.066 d⁻¹;当>15 °C 时,比增长速率升高,到 25 °C 达到最大值(0.205 d⁻¹)。在 20 和 30 °C 时,D2 群体的比增长速率比在 25 °C 时略有降低,分别为 0.188 和 0.197 d⁻¹,表明 25 °C 更适宜 D2 群体的生长。

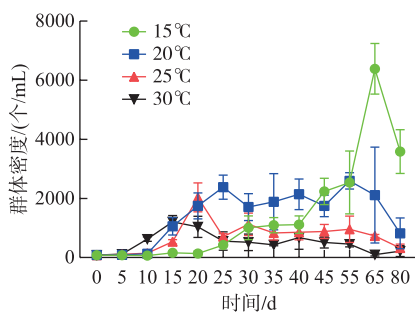


图 1 不同温度对 D2 群体培养体系中微囊藻群体数目的影响

Fig.1 Effects of different temperatures on the number of *Microcystis* colonies in colonial D2 culture system

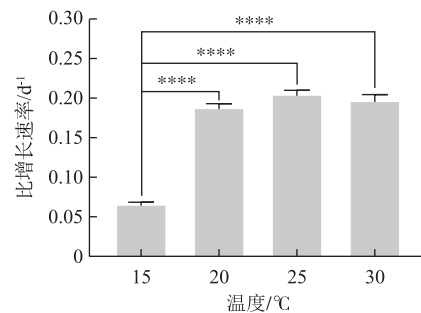


图 2 不同温度下 D2 群体的比增长速率 (one-way ANOVA, **** 表示 $P<0.0001$)

Fig.2 Growth rate of colonial D2 under different temperatures

在光学显微镜下发现,随着生长时间的增加,D2 群体会逐渐解散,成为单细胞,且其解散程度与温度有关。在 15 °C 下,第 65 天时 D2 群体基本没有解散。在 20、25 °C 下,随着培养时间延长,到第 45 天时,D2 群体中小群体的占比增加,群体变得松散,体系中逐渐出现单细胞微囊藻。在 30 °C 下,D2 群体在第 15 天时开始解散,在第 65 天时体系中出现大量单细胞(图 3)。

2.2 铜绿微囊藻 D2 群体各粒径附生细菌群落不同温度下随生长周期的组成变化

综合各温度下的分析发现,在不同粒径的优势细菌类群中,*Sphingomonadales* 在游离细菌和附生在 3~20 μm 的微囊藻单细胞一小群体的细菌群落中相对丰度相似,分别为 12.2% 和 12.4%,但在>20 μm 的微囊藻群体的附生细菌群落中占比较高(23.07%);*Caulobacteriales*、*Rhizobiales* 和 *Rhodospirillales* 的相对丰度随 D2 群体粒径的增大而增加,在>20 μm 的 D2 群体的附生细菌群落中相对丰度最高(16.9%、10.7% 和 4.6%);*Sphingobacteriales* 和 *Burkholderiales* 在不同粒径下相对丰度相似;*Pseudomonadales* 和 *Rhodobacteriales* 在 3~20 μm 的微囊藻单细胞一小群体的附生细菌群落中占比最高,分别为 21.6% 和 8.5%;*Chlorobiales* 和 *Cytophagales* 在游离细菌群落中相对丰度最高(15.4% 和 33.5%)。

随着藻群体的生长,培养体系中优势菌目也会发生变化(图 4)。在所有温度及粒径的 D2 群体附生细菌群落中,*Pseudomonadales* 的相对丰度均呈现下降趋势。在>20 μm 的微囊藻群体附生细菌群落中,*Burkholderiales* 的相对丰度在所有温度下均呈下降趋势,*Rhizobiales* 与之相反,总体呈现升高趋势;*Sphingomonadales* 的相对丰度在所有温度下均呈现先升高后降低的趋势;在 20、25 和 30 °C 时,*Caulobacteriales* 的相对丰度在第 0~15 天较高,在 15 °C 下则为第 35~65 天较高;*Chlorobiales* 的相对丰度在 15 °C 较高,可以达到 27.45%,在其余 3 个温度下则在 0.39%~8.33% 的范围内波动。在 3~20 μm 的单细胞一小群体微囊藻的附生细菌群落中,在所有温度下,*Caulobacteriales*、*Rhizobiales* 和 *Rhodobacteriales* 的相对丰度均呈现先升高后下降的趋势;在 20、25 和 30 °C 下,*Rhodospirillales* 的相对丰度在 0.38%~5.05% 的范围内波动,但其相对丰度

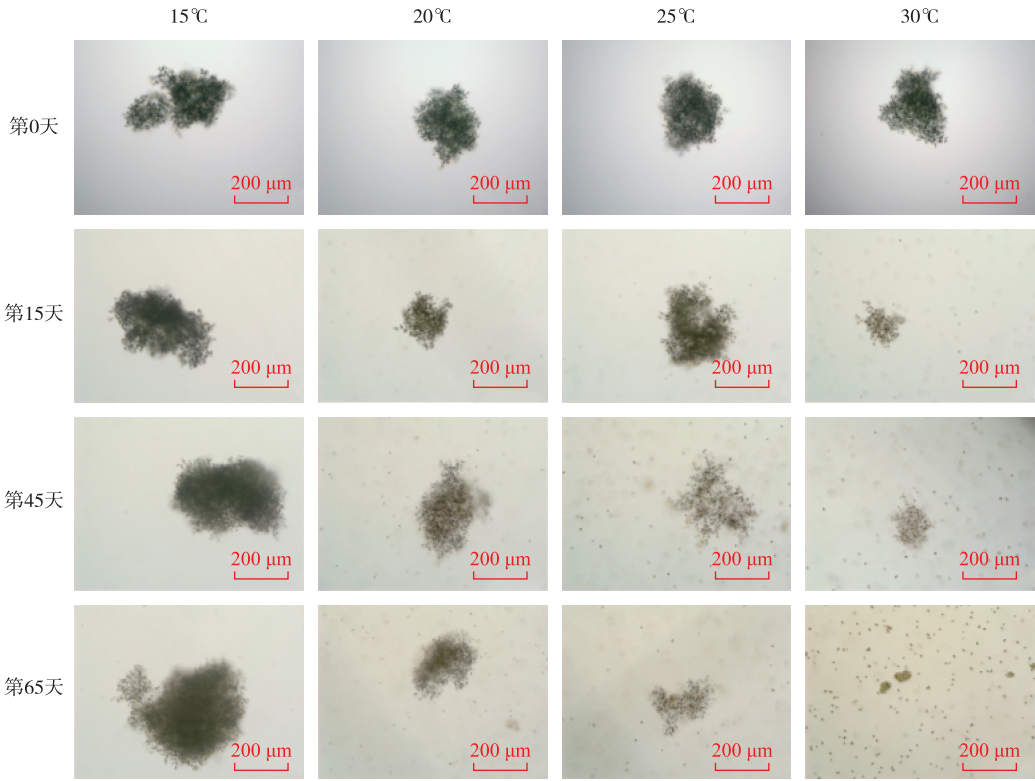


图 3 通过光学显微镜观察(10 倍物镜)的不同温度下 D2 群体的生长变化

Fig.3 Growth changes of colonial D2 under different temperatures as observed by optical microscopy (10×magnification)

在 15℃ 下可达到 27.57%, *Cytophagales* 与其相反,在 15℃ 下相对丰度最高,为 2.35%,但在 20、25 及 30℃ 下峰值分别可达到 48.73%、59.28% 和 53.32%; *Sphingomonadales* 的相对丰度在 15℃ 下呈升高趋势,在其他 3 个温度下均先升高后降低。在游离细菌群落中, *Rhodobacterales* 和 *Sphingomonadales* 的相对丰度在所有温度下均呈先升高后减少的趋势; *Caulobacterales* 的相对丰度在所有温度下均在 0.24% ~ 3.79% 的范围内波动, *Rhodospirillales* 的相对丰度均在 0.08% ~ 1.65% 的范围内波动;在 15℃ 下, *Cytophagales* 的相对丰度在 4.12% ~ 6.83% 的范围内波动,但在其余 3 个温度下其相对丰度最高达 75.53%。

在属水平下,部分细菌只在特定温度下出现: *Blastomonas* 和 *Limnobacter* 只在 15℃ 下相对丰度较高; *Roseococcus* 在 20 和 25℃ 下相对丰度较高; *Mesorhizobium* 在 20 和 30℃ 下相对丰度较高; *unclassified_f_Hyphomonadaceae* 只在 25℃ 下相对丰度较高, *Phreatobacter* 只在 30℃ 下相对丰度较高。综合各温度下的分析后,发现不同粒径下相对丰度较高的细菌类群有所区别: *Limnobacter* 只在游离细菌群落中相对丰度较高,其相对丰度先升后降,峰值出现在第 45 天(2.64%)。 *Roseococcus* 只在 >20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中有较高的相对丰度,其相对丰度在第 0 ~ 15 天升高,在第 15 ~ 45 天降低,然后升高至最大值 6.61%; *Porphyrobacter* 在游离细菌群落及 3 ~ 20 μm 的单细胞一小群体微囊藻附生细菌群落中相对丰度较高,且相对丰度均先升高后降低,峰值均出现在第 45 天,其在游离细菌群落中的相对丰度稍高。 *Mesorhizobium* 在 3 ~ 20 μm 单细胞一小群体微囊藻附生细菌群落及 >20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中有较高的相对丰度,在 >20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中,其相对丰度随培养时间的增加而升高;而在 3 ~ 20 μm 的单细胞一小群体微囊藻附生细菌群落中,其相对丰度先升高后降低,且相对丰度稍低(图 5)。

3 个粒径下存在的细菌类别也有所不同: *Lactobacillus* 和 *Acinetobacter* 只在 3 ~ 20 μm 的单细胞一小群体

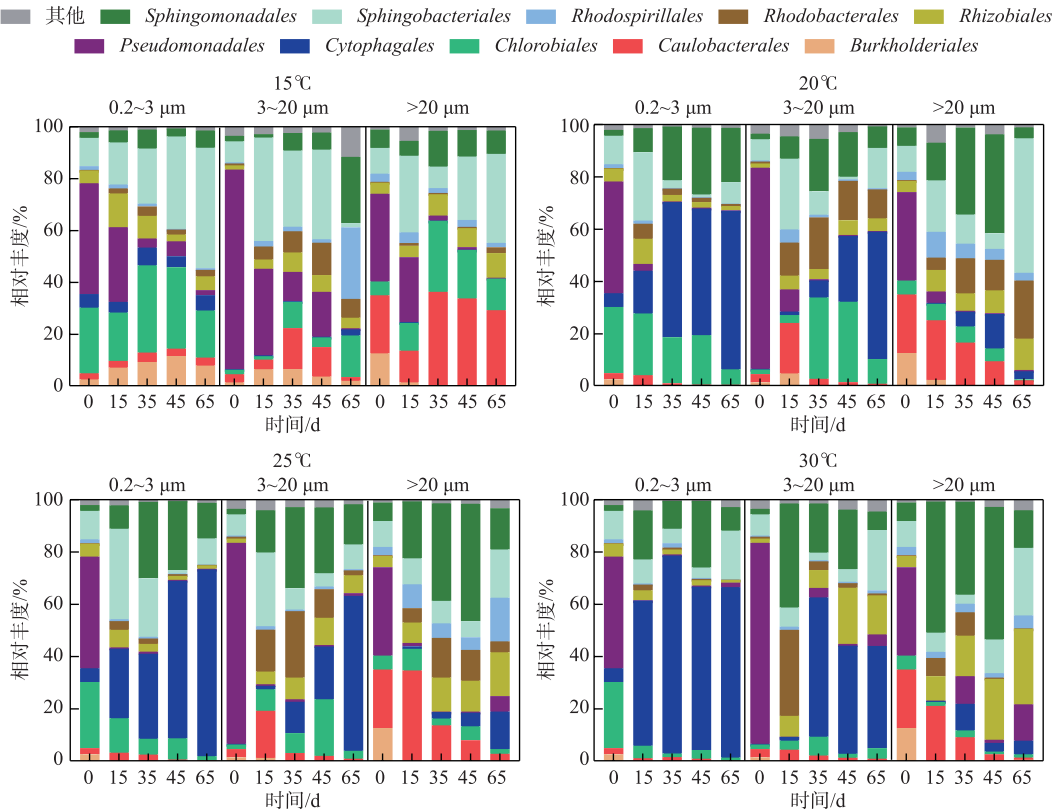


图4 在不同温度、不同生长时期 D2 群体培养体系中不同粒径下细菌群落的相对丰度
(目水平, 去除蓝藻序列)

Fig.4 Relative abundance of bacteria communities in different particle sizes in colonial D2 culture system at different temperatures and growth phases (at order level, removing cyanobacteria sequences)

微囊藻附生细菌群落中存在;*Nocardioides* 和 *Limnobacter* 在游离细菌群落及 3~20 μm 的单细胞—小群体微囊藻附生细菌群落中存在; *unclassified_o__Rhizobiales* 在 3~20 μm 的单细胞—小群体微囊藻附生细菌群落及 >20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中存在; *unclassified_f__Microbacteriaceae*、*unclassified_c__Alphaproteobacteria* 和 *Propionibacterium* 只在 >20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中存在; *norank_f__FukuN57* 则存在于游离细菌群落及 >20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中。

2.3 不同温度下铜绿微囊藻 D2 群体培养体系中群体微囊藻附生细菌群落中的独有种

在 OTU 水平下, 对各温度下不同粒径的附生菌群进行 Venn 分析, 并对只附生于 >20 μm 的微囊藻群体的细菌相对丰度变化进行分析, 结果表明 (图 6): 在 15 $^{\circ}\text{C}$ 下, OTU759 (*Gemmatimonas* sp.)、OTU751 (*Erythrobacteraceae*)、OTU604 (*Rikenellaceae_RC9_gut_group* sp.)、OTU706 (*Erythrobacteraceae*)、OTU734 (*Ruminococcaceae_UCG-014* sp.)、OTU439 (*Lysinibacillus* sp.)、OTU460 (*Anaerotruncus* sp.)、OTU507 (norank)、OTU701 (*Alphaproteobacteria*)、OTU667 (*Alphaproteobacteria*)、OTU673 (*Roseococcus* sp.)、OTU666 (*Bacteroidales_S24-7_group*) 和 OTU558 (*Bacteroidales_S24-7_group*) 只存在于 >20 μm 的微囊藻群体的附生细菌群落中; OTU745 (*Rhizobiales*)、OTU744 (*Sphingomonas* sp.)、OTU714 (*Arthrobacter* sp.)、OTU666 (*Bacteroidales_S24-7_group*)、OTU585 (*Corynebacterium_1* sp.)、OTU563 (*Bacteroidales_S24-7_group*) 和 OTU501 (*Aeromonas* sp.) 为在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下 >20 μm 的微囊藻群体附生细菌群落的独有种; OTU734 (*Ruminococcaceae_UCG-014* sp.)、OTU692 (*Bacteroidales_S24-7_group*)、OTU659 (*Alphaproteobacteria*)、OTU566 (*Mitochondria*)、OTU525 (norank)、OTU494 (*Rhi-*

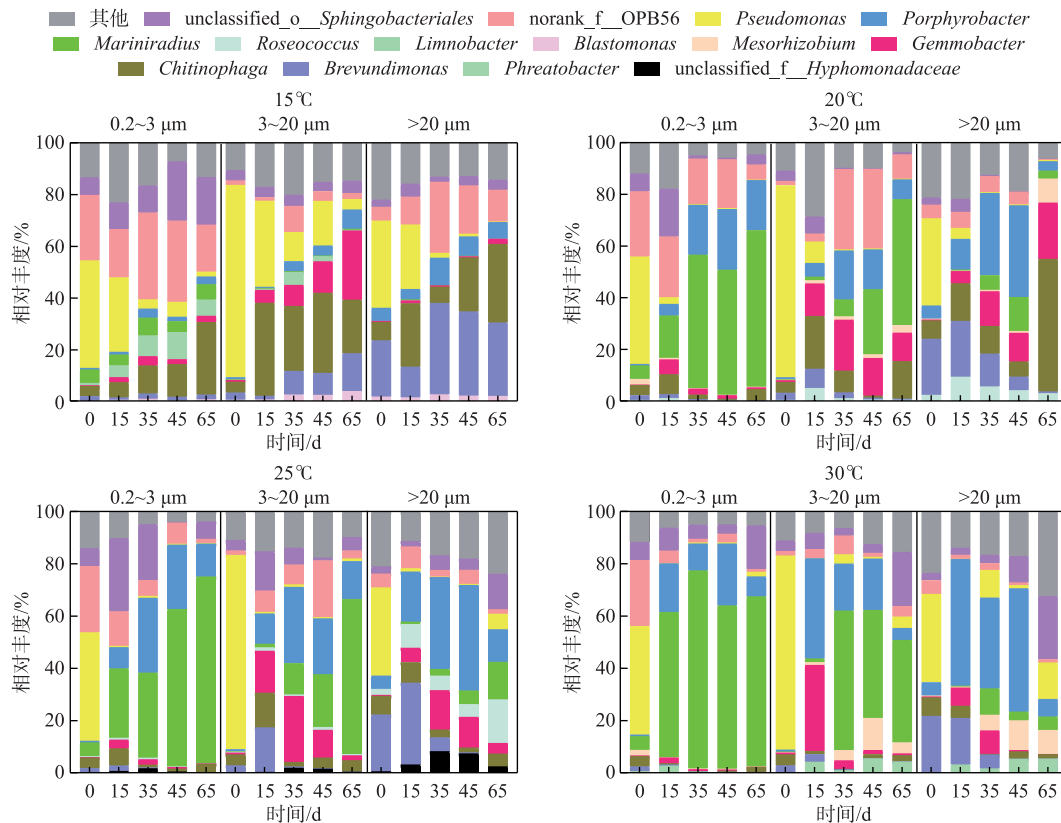


图5 在不同温度、不同生长时期 D2 群体培养体系中不同粒径下细菌群落的相对丰度
(属水平, 去除蓝藻序列)

Fig.5 Relative abundance of bacteria communities in different particle sizes in colonial D2 culture system at different temperatures and growth phases (at genus level, removing cyanobacteria sequences)

zobium sp.)、OTU439(*Lysinibacillus* sp.)、OTU410(*Enterobacteriaceae*) 和 OTU134(*Ralstonia* sp.) 为在 25 °C 下只附生于 > 20 μm 微囊藻群体的细菌; 在 30 °C 下只附生于 > 20 μm 微囊藻群体的细菌有: OTU714(*Arthrobacter* sp.)、OTU659(*Alphaproteobacteria*)、OTU439(*Lysinibacillus* sp.) 和 OTU410(*Enterobacteriaceae*)。

部分细菌在多个温度下都只附生于 > 20 μm 的微囊藻群体: OTU734(*Ruminococcaceae*_UCG-014 sp.) 在 15 和 25 °C 下均存在; OTU439(*Lysinibacillus* sp.) 在 15、25 和 30 °C 下均存在; OTU714(*Arthrobacter* sp.) 在 20 和 30 °C 下均存在; OTU659(*Alphaproteobacteria*)、OTU410(*Enterobacteriaceae*) 在 25 和 30 °C 下出现于 > 20 μm 的 D2 群体附生菌群中。

2.4 铜绿微囊藻 D2 群体培养体系中不同粒径下附生细菌群落の特化种

对不同粒径下的细菌群落进行了生境特异性分析, 并对特化种的相对丰度变化进行了分析, 得到图 7。在游离细菌群落中, OTU569(*FukuN57*)、OTU571(*Ancylobacter* sp.)、OTU603(*Mesorhizobium* sp.)、OTU676(*Mariniradius* sp.)、OTU655(*Limnobacter* sp.)、OTU259(*Hydrogenophaga* sp.)、OTU450(*Sphingopyxis* sp.) 和 OTU676(*Mariniradius* sp.) 为 15 °C 下的特化种; 20 °C 下的特化种有 9 株, 为 OTU740(*Porphyrobacter* sp.)、OTU730(*Sphingopyxis* sp.)、OTU695(*Mariniradius* sp.)、OTU758(*Sphingomonadales*)、OTU685(*Mariniradius* sp.)、OTU767(*Gemmatimonas* sp.)、OTU259(*Hydrogenophaga* sp.)、OTU450(*Sphingopyxis* sp.) 和 OTU655(*Limnobacter* sp.); 25 °C 和 30 °C 下均只有一株特化种, 为 OTU655(*Limnobacter* sp.)。

在 3~20 μm 的单细胞一小群体微囊藻附生菌群中, OTU708(*Gemmobacter* sp.)、OTU454(*Variibacter* sp.)、

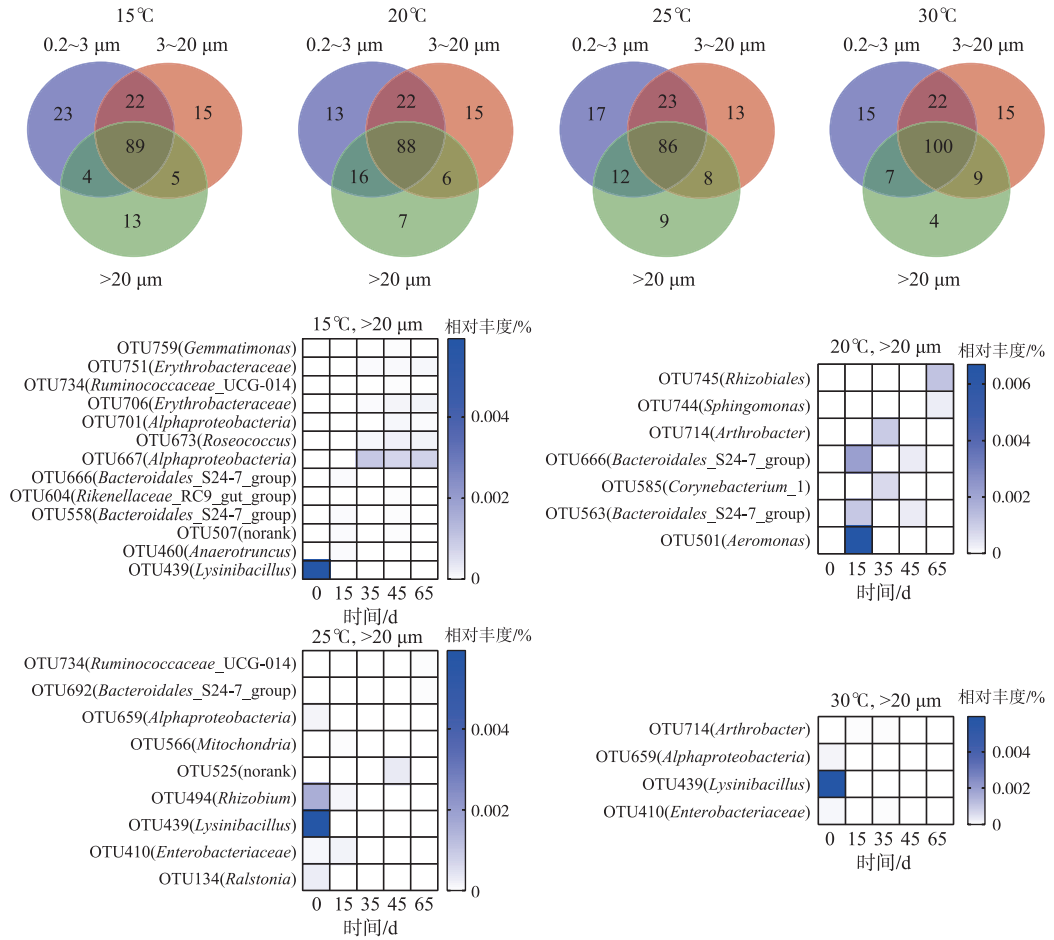


图 6 D2 群体培养体系中不同粒径的附生菌群的 Venn 分析及只存在于>20 μm 的 D2 群体附生细菌群落的细菌相对丰度变化

Fig.6 Venn analysis of bacterial communities in different particle sizes in colonial D2 culture system and changes in the relative abundance of bacteria present only in bacterial communities associated with the D2 colonies (>20 μm)

OTU661(*Hydrogenophaga* sp.)、OTU755(*Chryseobacterium* sp.)、OTU390(*Propionibacterium* sp.)、OTU694(*Nocardioideis* sp.)和 OTU447(*Phenylobacterium* sp.)为 15 °C 下的特化种;OTU540(*Hyphomonas* sp.)和 OTU447(*Phenylobacterium* sp.)在 20 °C 下为特化种;25 °C 下不存在特化种;30 °C 下,OTU689(*Alphaproteobacteria*)、OTU674(*Alphaproteobacteria*)、OTU668(*Phreatobacter* sp.)、OTU535(OPB56)和 OTU710(*Alphaproteobacteria*)为特化种。

在>20 μm 的 D2 群体附生菌群中,15 °C 下的特化种有:OTU659(*Alphaproteobacteria*)、OTU711(*Alphaproteobacteria*)、OTU535(OPB56)、OTU669(*Methylobacteriaceae*)、OTU687(*Hyphomonadaceae*)、OTU722(*Brevundimonas* sp.)和 OTU682(*Pseudoxanthobacter* sp.); OTU511(*Roseococcus* sp.)、OTU669(*Methylobacteriaceae*)、OTU722(*Brevundimonas* sp.)、OTU682(*Pseudoxanthobacter* sp.)和 OTU687(*Hyphomonadaceae*)为 20 °C 下的特化种;25 °C 下的特化种包括:OTU511(*Roseococcus* sp.)、OTU669(*Methylobacteriaceae*)、OTU722(*Brevundimonas* sp.)、OTU682(*Pseudoxanthobacter* sp.)、OTU687(*Hyphomonadaceae*)、OTU455(*Devosia* sp.)和 OTU582(*Hyphomicrobium* sp.);30 °C 培养体系中的特化种包括:OTU669(*Methylobacteriaceae*)、OTU722(*Brevundimonas* sp.)、OTU682(*Pseudoxanthobacter* sp.)、OTU455(*Devosia* sp.)和 OTU582(*Hyphomicrobium* sp.)。

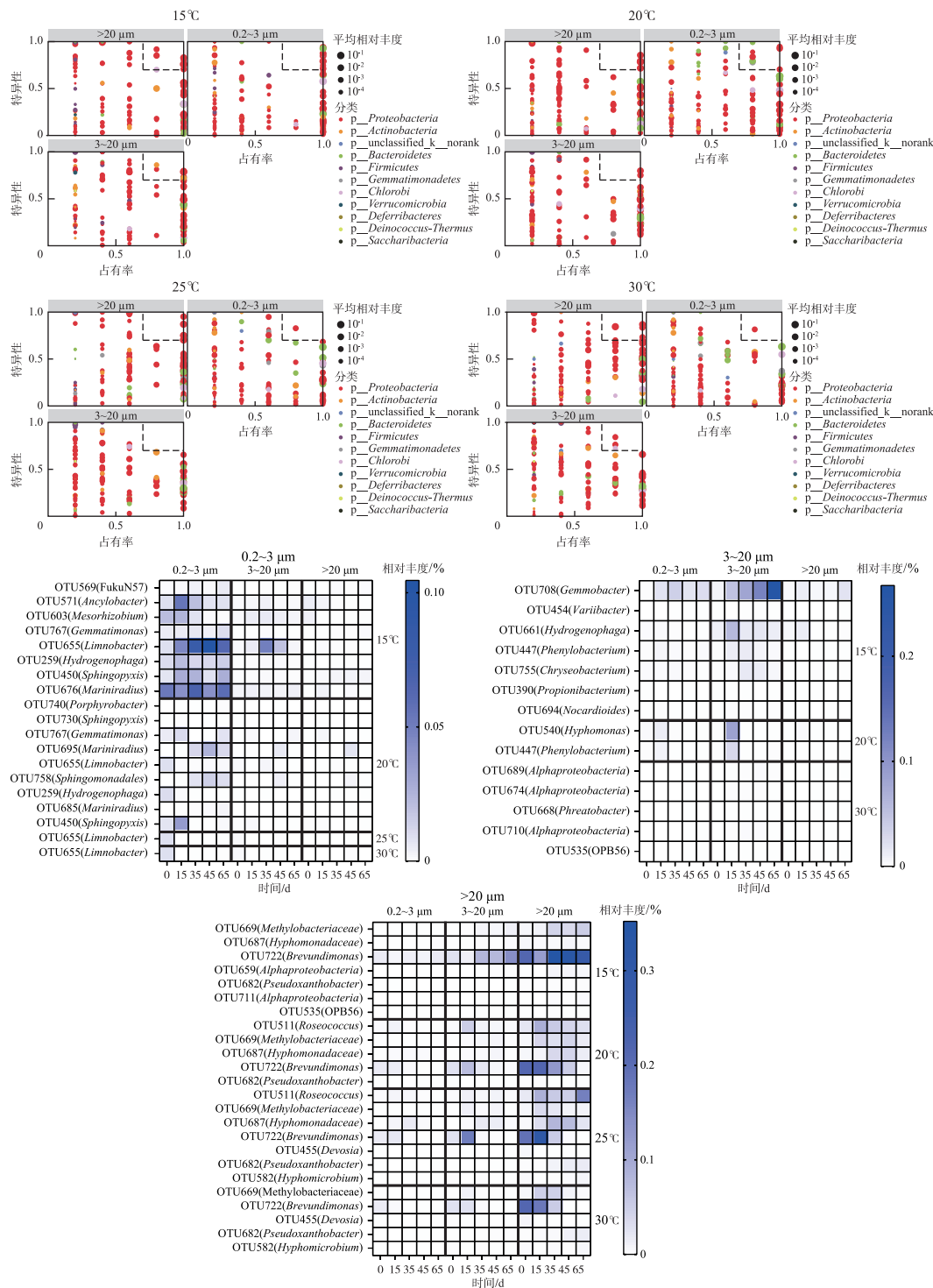


图7 各温度下不同粒径细菌群落 OTUs 的 SPEC-OCCU 图及特化种的相对丰度分析
Fig.7 SPEC-OCCU plots of OTUs and relative abundance of specialized species in bacterial communities in different particle sizes under various temperatures

各粒径附生细菌群落的特化种分析结果表明:在游离细菌群落中,OTU655(*Limnobacter* sp.)为不依赖于温度的特化种,OTU767(*Gemmatimonas* sp.)、OTU259(*Hydrogenophaga* sp.)和OTU450(*Sphingopyxis* sp.)为15和20℃下共有的特化种。在3~20 μm的单细胞一小群体微囊藻附生菌群中,OTU447(*Phenylobacterium* sp.)为15和20℃下共有的特化种。在>20 μm的群体附生菌群中,OTU669(*Methylobacteriaceae*)、OTU722(*Brevundimonas* sp.)和OTU682(*Pseudoxanthobacter* sp.)不依赖温度,在所有温度下均为特化种;OTU687(*Hyphomonadaceae*)为15、20和25℃培养体系的共有特化种;OTU511(*Roseococcus* sp.)在20和25℃下均为特化种;OTU455(*Devosia* sp.)和OTU582(*Hyphomicrobium* sp.)在25和30℃下均为特化种。

这些特化种存在于所有粒径的附生细菌群落中,在相应的细菌群落中拥有较高的相对丰度:游离细菌群落中的特化种在游离细菌群落中的相对丰度基本在0.21%~6.06%的范围内变化,但3~20 μm的单细胞一小群体微囊藻附生菌群及>20 μm的群体附生菌群的相对丰度大多<0.4%;3~20 μm的单细胞一小群体附生菌群的特化种的相对丰度在0.03%~10.53%之间变化,在其他粒径下的相对丰度基本<0.4%;>20 μm的微囊藻群体附生菌群的相对丰度在>20 μm的微囊藻群体附生菌群中的相对丰度在0.09%~12.56%的范围内变化,在其他粒径下基本<1%;低温下游离细菌群落及3~20 μm的单细胞一小群体微囊藻附生菌群特化种的相对丰度较高。

2.5 铜绿微囊藻 D2 群体培养体系中不同粒径下的网络关键节点分析

综合各种温度处理,分析不同粒径中细菌群落的网络关系。在游离细菌群落、3~20 μm的单细胞一小群体微囊藻附生菌群和>20 μm的D2群体附生菌群相关网络的关键节点均为连接节点,分别有3、6和25个关键节点(图8)。游离细菌群落的网络关键节点为OTU561(*Microcystis aeruginosa*)、OTU679(*Sphingomonas* sp.)和OTU708(*Gemmobacter* sp.);3~20 μm的单细胞一小群体微囊藻附生菌群的网络关键节点包括OTU511(*Roseococcus* sp.)、OTU561(*Microcystis aeruginosa*)、OTU567(*Sphingobacteriales*)、OTU669(*Methylobacteriaceae*)、OTU708(*Gemmobacter* sp.)和OTU767(*Gemmatimonas* sp.);>20 μm的D2群体附生菌群相关网络的关键节点包括OTU447(*Phenylobacterium* sp.)、OTU450(*Sphingopyxis* sp.)、OTU511(*Roseococcus* sp.)、OTU512(*Devosia* sp.)、OTU544(*Phyllobacteriaceae*)、OTU556(*Pseudomonas* sp.)、OTU561(*Microcystis aeruginosa*)、OTU569(FukuN57)、OTU603(*Mesorhizobium* sp.)、OTU665(*Alphaproteobacteria*)、OTU669(*Methylobacteriaceae*)、OTU672(*Alphaproteobacteria*)、OTU676(*Mariniradius* sp.)、OTU679(*Sphingomonas* sp.)、OTU690(*Phreatobacter* sp.)、OTU695(*Mariniradius* sp.)、OTU711(*Alphaproteobacteria*)、OTU722(*Brevundimonas* sp.)、OTU729(*Blastomonas* sp.)、OTU737(*Alphaproteobacteria*)、OTU743(*Devosia* sp.)、OTU744(*Sphingomonas* sp.)、OTU754(*Sphingomonas* sp.)、OTU758(*Sphingomonadales*)和OTU771(*Alphaproteobacteria*)。

图8为OTU水平下不同粒径的微生物群落中藻菌及细菌之间的相互作用网络,从门水平上对节点进行分类。3个粒径下的节点数相差不大,游离细菌群落间的连线数最多,有160条,其中正相关的有112条,负相关的有48条;3~20 μm单细胞一小群体微囊藻和>20 μm的D2群体的微生物群落连线数相似,但3~20 μm单细胞一小群体微囊藻的微生物群落中正相关连线数较多(表1)。结果表明游离细菌群落中各物种之间的相互作用关系更加复杂。

3 讨论

3.1 不同温度对铜绿微囊藻 D2 群体生长的影响

富营养化湖泊中的蓝藻通常在25~30℃具有较高的生长优势^[22-23]。而不同种属的蓝藻对温度的响应不同,从而决定其发生水华的时间不同^[24]。有研究表明,微囊藻的最适生长温度在25℃左右^[24-25],本研究也发现铜绿微囊藻D2群体在25℃下的平均比生长速率最大。Zhu等^[5]基于野外和室内实验数据,发现在温度超过20℃时,随着培养时间延长,微囊藻群体明显减小,而在15℃时没有明显变化。Duan等^[26]则发现惠氏微囊藻群体和鱼害微囊藻群体在15~25℃明显增大,但当温度从25℃增加到30℃时,鱼害微囊藻群体明显减小,而惠氏微囊藻群体增大,可见温度影响微囊藻群体的形成而且具有种间差异。蓝藻水华生消过程伴随着藻群体大小变化以及藻群体生物量的改变。结合Zhu等^[5]得到的高温可使微囊藻群体明显减小的研究结果,得出结论:较高的温度会促进D2群体的生长,但可能不利于群体的维持,表现为D2群体

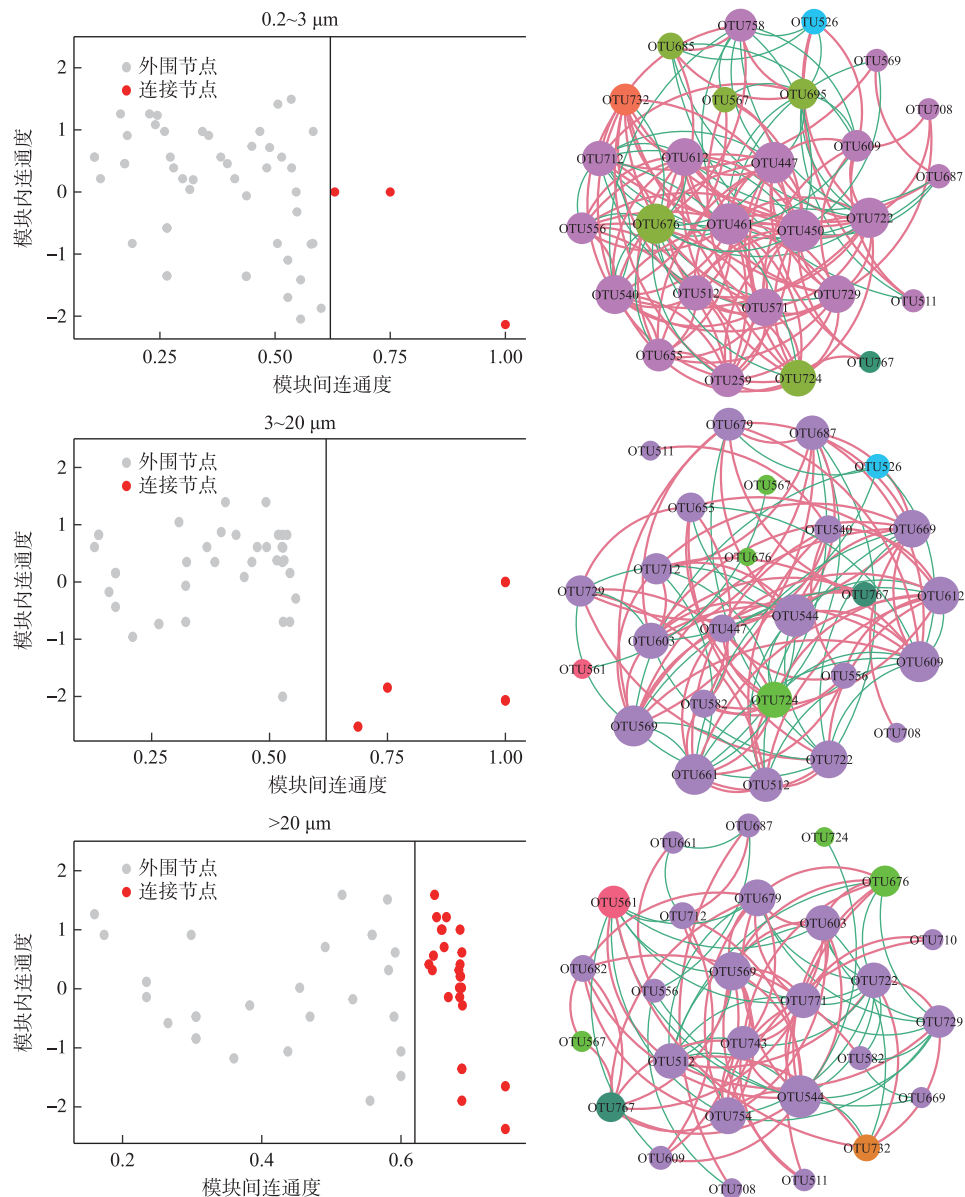


图 8 D2 群体培养体系中细菌群落在不同粒径下的物种相关性网络分析(红色线条代表正相关,绿色线条代表负相关,物种之间的关系密切程度与连线数呈正相关)

Fig.8 Species correlation network analysis of bacterial community in different particle sizes in colonial D2 culture system

大小和数目减少,群体解散较快。

3.2 温度对铜绿微囊藻 D2 群体各粒径附生细菌群落组成随生长周期变化的影响

Zhu 等的研究表明,即使是 11 年前分离得到的蓝藻菌株,其附生细菌群落结构和野外蓝藻的细菌群落结构也无显著差异^[27]。Li 等、Xie 等对从野外分离并短期培养的微囊藻群体进行宏基因组分析发现,其附生细菌群落中存在 *Rhizobiales*、*Sphingomonadales*、*Rhodobacterales*、*Gemmatimonadales*、*Caulobacterales*、*Pseudomonadales*、*Burkholderiales*、*Rhodospirillales* 和 *Flavobacteriales* 等常见于野外微囊藻附生细菌群落的细菌类

表 1 D2 群体培养体系中细菌群落在不同粒径下的物种相关性网络特征参数(含蓝藻序列)
Tab.1 Characteristic parameters of species correlation network of bacterial community in colonial
D2 culture systems in different particle sizes (including cyanobacteria sequences)

粒径	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
0.2~3 μm	28	160	112	48	2.33
3~20 μm	27	102	67	35	1.91
>20 μm	29	101	60	41	1.46

群^[28-29]。这些细菌类群在本实验所使用的 D2 群体的附生细菌群落中也存在,因此该实验中 D2 群体的附生细菌群落变化及与群体状态有关的关键细菌对野外微囊藻群体与细菌关系的研究具有一定的参考意义。

Pseudomonadales 可与铜绿微囊藻进行磷交换^[30],随着培养时间的增加,培养基中的营养物质浓度会逐渐减少,以此来看 *Pseudomonadales* 的相对丰度应该随生长时间的增加而升高,但实验结果却与之相反:在所有温度与粒径下,*Pseudomonadales* 的相对丰度均急剧降低,说明 *Pseudomonadales* 在微囊藻群体形成与维持中还有未被发现的作用,且其功能受温度影响不大。*Caulobacteriales* 可以产生一种极性粘附素用于表面黏附和细胞之间的粘附^[31],属于 *Rhodobacterales* 的 *Rhodobacteraceae* 在生物膜形成之初发挥了重要作用,可能会促进富氮环境中的反硝化作用,从而促进形成生物膜以及增加群落多样性^[32],在 3~20 μm 的单细胞一小群体微囊藻的附生细菌群落中,其相对丰度在所有温度下均呈现先升高后降低的趋势,且相对丰度增加的时间与 D2 群体数目增长的时期基本相符,因此 *Caulobacteriales* 和 *Rhodobacterales* 可能与微囊藻群体的形成有关。

Cytophagales 可以降解微囊藻毒素及微囊藻细胞^[33],其相对丰度随生长周期的变化趋势在不同温度下不同,但其在游离细菌群落及 3~20 μm 的单细胞一小群体微囊藻的附生细菌群落中的相对丰度在实验后期均较高,说明随着生长时间的增加,该菌在裂解死亡的藻细胞中发挥重要作用,有利于培养体系中的营养循环。此外>20 μm 的微囊藻群体附生细菌群落中的相对丰度较其他粒径低可能是由于更大的群体抵御外界不良环境的能力更强。

Sphingomonadales 是一类重要且常见的附生细菌^[12],对 *Suaeda glauca* 以及 *Phragmites australis* 根际细菌的研究过程中发现 *Sphingomonadales* 可以大量地产生用于细菌间细胞通讯的酰化高丝氨酸内酯(Acyl-homoserine lactones,AHLs)^[34],这可能有利于相关细菌在微囊藻藻际聚集,因此 *Sphingomonadales* 可能与微囊藻附生细菌群落的形成有关。其产生的鞘磷脂(glycosphingolipids,GSLs)也可能在群体维持中发挥作用^[18],在所有温度下,*Sphingomonadales* 在>20 μm 微囊藻群体及 3~20 μm 的单细胞一小群体微囊藻附生细菌群落中的相对丰度在第 15~45 天较高可能与此有关。在 15、20 和 25 ℃ 下各粒径的附生细菌群落中,*Sphingobacteriales* 的相对丰度均在第 0~15 天增加,而 30 ℃ 时,其相对丰度在第 0~35 天降低,表明 *Sphingobacteriales* 和微囊藻的相互作用可能会受到高温的影响。

3.3 铜绿微囊藻 D2 群体培养体系中独有种、特有种、关键物种作用分析

许多研究表明附生细菌在微囊藻群体的形成过程中发挥了重要作用。Wang 等发现微囊藻群体中的 2 株属于 γ -*Proteobacteria* 的细菌和 1 株属于 *Bacteroidetes* 的细菌在群体完全解散为单细胞后消失,之后又将从微囊藻群体中分离的附生细菌加入单细胞微囊藻中,以此了解附生细菌与微囊藻群体的关系,发现了 5 种可以促进微囊藻形成群体的细菌,且与细菌共培养的培养体系中紧密结合的胞外聚合物(tightly bound extracellular polymeric substances,TB-EPS)含量增加,而 TB-EPS 在微囊藻群体的形成中发挥重要作用^[11,35]。温度可以影响微囊藻群体上附生细菌的群落结构,从而改变微囊藻与细菌之间的相互作用,进而影响水华的形成。本实验通过观察微囊藻群体的形态变化以及不同各粒径下附生细菌群落结构的改变,揭示了在不同温度下,在微囊藻群体形成与解散过程中的关键细菌,这有助于深入了解附生细菌与微囊藻群体的关系。

藻类对附生细菌具有选择作用,不同细菌对定殖的环境也有偏好,各粒径下附生细菌群落的特化种可能是藻类和细菌双向选择的结果,有研究发现群体附生细菌可能比游离细菌对微囊藻的形成产生更大的影响^[36]。只在>20 μm 的微囊藻群体的附生细菌群落中存在的细菌及>20 μm 的微囊藻群体附生细菌群落的

特化种与微囊藻群体的状态更为密切,且关键物种的缺失可能导致模块和网络的崩解,因此>20 μm 的微囊藻群体附生细菌群落的独有种、特化种及关键种对微囊藻群体的形态变化有重要的作用。

表 2 与微囊藻群体形成与解散有关的细菌
Tab.2 Bacteria associated with *Microcystis* colonies formation and disaggregation

细菌种类	作用	参考文献
<i>Porphyrobacter</i> sp.	与微囊藻群体维持有关	Shen 等 ^[10]
<i>Flavobacteriaceae</i> sp.		
<i>Aeromonas veronii</i>	诱导单细胞微囊藻形成群体	Wang 等 ^[11]
<i>Enterobacter aerogenes</i>		
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	减小微囊藻群体大小	Wu 等 ^[12]
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Shewanella putrefaciens</i>		
<i>Exiguobacterium</i> sp.		
<i>Delftia</i> sp.		
<i>Bacillus</i> sp.	增加微囊藻群体大小	
<i>Stenotrophomonas</i> sp.		
<i>Chryseobacterium</i> sp.		
<i>Sphingomonas</i> sp.	与微囊藻群体维持有关	Wang 等 ^[35]
<i>Pseudomonas chengduensis</i>		
<i>Pseudomonas</i> sp. CM-1		
<i>Sphingomonas</i> sp. CM-2		

枯竭或浓度较低的环境中, *Gemmatimonas* 能促进磷向微囊藻细胞转移,而使水华维持更长的时间^[42], *Aeromonas* sp. 可诱导单细胞微囊藻形成微囊藻群体^[11]。

部分细菌与胞外多糖或生物膜形成有关: *Caulobacteriales* 产生的粘附素^[31]可能有利于微囊藻细胞通过细胞黏附形成群体;大多数 *Hyphomonadaceae* 细菌都可以降解复杂的化合物,且可以附着或者形成生物膜^[43]。而 EPS 是微囊藻群体形成所必需的,因此它们可能与微囊藻群体的形成或解散有关。

Gan 等发现微囊藻毒素能明显增加微囊藻群体的大小^[44],因此微囊藻毒素降解菌可能会改变微囊藻群体状态,而 *Rhizobiales*、*Hydrogenophaga*、*Alphaproteobacteria*、*Burkholderiales*、*Enterobacteriales*、*Bacillales* 与微囊藻毒素降解有关^[45-49],因此它们可能与微囊藻群体的形态变化有关。 *Brevundimonas* 和 *Rhizobium* 是群体附生细菌群落网络的关键节点,且常见于铜绿微囊藻水华中^[50-51]。研究发现 *Bacteroidales* 与微囊藻水华相关^[14]。

温度会影响微囊藻的生长速度及微囊藻群体的大小、数目和解散速度:研究发现高温会促进有毒微囊藻菌株的生长并影响微囊藻群体的大小^[5,26,52],低温可以诱导微囊藻群体的形成^[53-54]。温度也会影响附生细菌群落的结构,而图 6 和图 7 都显示在低温条件下与微囊藻群体密切相关的细菌相对丰度更高,因此说明温度可能是通过影响相关细菌的相对丰度进而改变微囊藻群体形态。

3.3 铜绿微囊藻 D2 群体培养体系中主要的细菌类群在自然水体中的分布

Kim 等从韩国发生蓝藻水华的 8 个地点采集了蓝藻样本,测序后发现 *Brevundimonas* 普遍存在于样本中^[51], *Sphingomonadales* 常见于微囊藻群体中,且可能为微囊藻藻华提供不可缺少的元素^[12,14], *Rhodobacteriales* 也是微囊藻附生细菌中常见的一类,且是水华期间维生素 B-12 的主要提供者^[55], *Sphingobacteriales* 在游离细菌群落中的相对丰度比群体附生细菌群落中的高^[56], Yang 等发现在滇池铜绿微囊藻水华期间属于 *Chlorobiales* 的某一种 OPB56 细菌在游离细菌中占据优势^[50],且在蓝藻水华期间 OPB56 的相对丰度显著高于非蓝藻水华期间^[57-58]。 Shi 等发现 *Caulobacteriales* 在>120 μm 的微囊藻群体中丰度较高^[59],

研究发现部分细菌可以直接或间接影响微囊藻群体的形态(表 2): *Chryseobacterium* sp.、*Sphingomonas* sp. 和 *Pseudomonas* sp. 菌株可显著增加铜绿微囊藻的群体大小; *Porphyrobacter* sp.、*Pseudomonas* sp. CM-1 和 *Sphingomonas* sp. CM-2 与微囊藻群体的维持有关^[10,12,35]; *Pseudomonas*、*FukuN57*、*Gemmobacter*、*Phreatobacter*、*Roseococcus* 及 *Mariniradius* 导致了微囊藻群体附生细菌群落与单细胞微囊藻附生细菌群落的差异^[37];有研究发现,在高温条件下微囊藻群体更易分解为单细胞,而 *Mariniradius* 可能与此过程有关^[18]; Bi 等发现在微囊藻群体体系中加入可以抑制蓝藻群体生长的枯草芽孢杆菌后 *Methylobacteriaceae* 的相对丰度低于对照组^[38],因此猜测 *Methylobacteriaceae* 与微囊藻群体生长有关。 *Sphingomonadales* 可能影响微囊藻水华形成^[15],且属于该目的 *Porphyrobacter* 可以刺激胞外聚合物的释放,而释放的 EPS 可以将藻类和细菌细胞聚集形成群体,促进蓝藻水华的形成,并多次被报道可能与微囊藻群体有关^[10,35,39-40]。 *Actinobacteria* 的部分代谢产物可以抑制蓝藻水华的形成^[41]。在营养物质

Cytophagales 在微囊藻群体中相对丰度较高^[56]。

4 结论

1) 温度影响微囊藻群体维持和解散过程:15 ℃下微囊藻群体可以维持很久的群体状态,直到第 65 天都没有解散,25 和 20 ℃下微囊藻群体维持时间相近,30 ℃下微囊藻群体解散最快,且温度越高微囊藻群体数目达到峰值的时间越短。

2) 在属水平上的分析发现,部分细菌只在部分粒径下相对丰度较高:*Limnobacter* 只在游离细菌群落中相对丰度较高;*Roseococcus* 只在>20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中相对丰度较高;*Porphyrobacter* 在游离细菌群落及 3~20 μm 的单细胞—小群体微囊藻附生细菌群落中相对丰度较高;*Mesorhizobium* 在 3~20 μm 的单细胞—小群体微囊藻附生细菌群落及>20 μm 的 D2 群体附生细菌群落中相对丰度较高。

3) 不同温度培养体系中微囊藻群体状态的异同可能与培养体系中关键细菌有关:部分独有种及特化种只在 15 ℃下出现,这可能与 15 ℃下培养体系中群体维持时间较长有关;OTU669 (*Methylobacteriaceae*)、OTU722 (*Brevundimonas* sp.) 和 OTU682 (*Pseudoxanthobacter* sp.) 在所有温度下均为>20 μm 的 D2 群体附生细菌群落的特化种,这表明它们与>20 μm 的微囊藻群体密切相关,可能与微囊藻群体的形态变化有关。>20 μm 的微囊藻群体附生细菌群落的网络关键节点较多,表明群体附生细菌群落具有较高的稳定性。

5 参考文献

- [1] Cheng R, Zhu H, Wang JF *et al.* Removal of microcystin (MC-LR) in constructed wetlands integrated with microbial fuel cells: Efficiency, bioelectricity generation and microbial response. *Journal of Environmental Management*, 2022, **309**: 114669. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.114669.
- [2] Dervaux J, Mejean A, Brunet P. Irreversible collective migration of cyanobacteria in eutrophic conditions. *PLoS One*, 2015, **10**(3): e0120906. DOI: 10.1371/journal.pone.0120906.
- [3] Fan Q, Xiao HJ, Wu Q *et al.* Characterization of epiphytic bacteria associated with colonial *Microcystis*. *J Lake Sci*, 2017, **29**(3): 617-624. DOI: 10.18307/2017.0310. [范琦, 肖惠杰, 吴强等. 群体微囊藻附生细菌特性. 湖泊科学, 2017, **29**(3): 617-624.]
- [4] Le VV, Srivastava A, Ko SR *et al.* *Microcystis* colony formation: Extracellular polymeric substance, associated microorganisms, and its application. *Bioresource Technology*, 2022, **360**: 127610. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127610.
- [5] 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.
- [6] Ma JR, Brookes JD, Qin BQ *et al.* Environmental factors controlling colony formation in blooms of the cyanobacteria *Microcystis* spp. in Lake Taihu, China. *Harmful Algae*, 2014, **31**: 136-142. DOI: 10.1016/j.hal.2013.10.016.
- [7] Wang SR, Zhao DY, Zeng J *et al.* Variations of bacterial community during the decomposition of *Microcystis* under different temperatures and biomass. *BMC Microbiology*, 2019, **19**(1): 207. DOI: 10.1186/s12866-019-1585-5.
- [8] Brunberg AK. Contribution of bacteria in the mucilage of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) to benthic and pelagic bacterial production in a hypereutrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **29**(1): 13-22. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00594.x.
- [9] Dai W, Ruan WL, Bi XD *et al.* The role of attached bacteria in the formation of *Microcystis* colony in Chentaizi River. *Water Science and Technology*, 2022, **86**(5): 968-978. DOI: 10.2166/wst.2022.277.
- [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] Wang WJ, Shen H, Shi PL *et al.* Experimental evidence for the role of heterotrophic bacteria in the formation of *Microcystis* colonies. *Journal of Applied Phycology*, 2016, **28**(2): 1111-1123. DOI: 10.1007/s10811-015-0659-5.
- [12] Wu Q, Zhang XH, Jia SJ *et al.* Effects of the cultivable bacteria attached to *Microcystis* colonies on the colony size and growth of *Microcystis*. *Journal of Freshwater Ecology*, 2019, **34**(1): 663-673. DOI: 10.1080/02705060.2019.1665115.
- [13] Woodhouse JN, Kinsela AS, Collins RN *et al.* Microbial communities reflect temporal changes in cyanobacterial composition in a shallow ephemeral freshwater lake. *The ISME Journal*, 2016, **10**(6): 1337-1351. DOI: 10.1038/ismej.2015.218.
- [14] Lu JR, Zhu B, Struewing I *et al.* Nitrogen-phosphorus-associated metabolic activities during the development of a cyanobacterial bloom revealed by metatranscriptomics. *Scientific Reports*, 2019, **9**: 2480. DOI: 10.1038/s41598-019-38481-2.
- [15] 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.
- [16] Dziallas C, Grossart HP. Microbial interactions with the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their dependence on temperature. *Marine*

- Biology, 2012, **159**(11): 2389-2398. DOI: 10.1007/s00227-012-1927-4.
- [17] Shi LM, Cai YF, Kong FX *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.
- [18] Fang DY, Shi LM, Li PF *et al.* Effects of temperature on composition and stability of bacterial community in colonial *Microcystis aeruginosa* culture systems. *J Lake Sci*, 2021, **33**(6): 1660-1674. DOI: 10.18307/2021.0605. [方道艳, 施丽梅, 李朋富等. 温度对铜绿微囊藻群体系培养体系中细菌群落组成及稳定性的影响. 湖泊科学, 2021, **33**(6): 1660-1674.]
- [19] 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.
- [20] Gweon HS, Bowes MJ, Moorhouse HL *et al.* Contrasting community assembly processes structure lotic bacteria metacommunities along the river continuum. *Environmental Microbiology*, 2021, **23**(1): 484-498. DOI: 10.1111/1462-2920.15337.
- [21] Deng Y, Jiang YH, Yang YF *et al.* Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinformatics*, 2012, **13**: 113. DOI: 10.1186/1471-2105-13-113.
- [22] Lüring M, Eshetu F, Faassen EJ *et al.* Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*, 2013, **58**(3): 552-559. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2012.02866.x.
- [23] Lei LM, Dai JJ, Lin QQ *et al.* Competitive dominance of *Microcystis aeruginosa* against *Raphidiopsis raciborskii* is strain- and temperature-dependent. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, 2020, **421**: 36. DOI: 10.1051/kmae/2020023.
- [24] Guan Y, Zhang M, Zhao XQ. The trade-offs of functional traits in *Microcystis* (FACHB-905) and *Anabaena* (FACHB-82) responding to temperature. *J Lake Sci*, 2020, **32**(1): 134-143. DOI: 10.18307/2020.0113. [管乐, 张民, 赵兴青等. 微囊藻 (FACHB-905) 和鱼腥藻 (FACHB-82) 响应温度变化的功能特性权衡. 湖泊科学, 2020, **32**(1): 134-143.]
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Zhu L, Zancarini A, Louati I *et al.* Bacterial communities associated with four cyanobacterial genera display structural and functional differences: Evidence from an experimental approach. *Frontiers in Microbiology*, 2016, **7**: 1662. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01662.
- [28] 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.
- [29] Xie ML, Ren ML, Yang C *et al.* Metagenomic analysis reveals symbiotic relationship among bacteria in *Microcystis*-dominated community. *Frontiers in Microbiology*, 2016, **7**: 56. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00056.
- [30] Jiang LJ, Yang LY, Xiao L *et al.* Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas* sp.). *Hydrobiologia*, 2007, **581**(1): 161-165. DOI: 10.1007/s10750-006-0518-0.
- [31] Chepkwony NK, Berne C, Brun YV. Comparative analysis of ionic strength tolerance between freshwater and marine caulobacterales adhesins. *Journal of Bacteriology*, 2019, **201**(18): 10.1128/jb.00061-19. DOI: 10.1128/jb.00061-19.
- [32] Liu BH, Hu ZX, Li CL *et al.* Effects of nitrogen on the bacterial microbiome community of *Oocystis borgei*, an alga widely used in marine aquaculture. *Diversity*, 2024, **16**(2): 100. DOI: 10.3390/d16020100.
- [33] Maruyama T, Kato K, Yokoyama A *et al.* Dynamics of microcystin-degrading bacteria in mucilage of *Microcystis*. *Microbial Ecology*, 2003, **46**(2): 279-288. DOI: 10.1007/s00248-002-3007-7.
- [34] He CF, Zheng L, Gao W *et al.* Diversity and functions of quorum sensing bacteria in the root environment of the *Suaeda glauca* and *Phragmites australis* coastal wetlands. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022, **29**(36): 54619-54631. DOI: 10.1007/s11356-022-19564-6.
- [35] 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.
- [36] Le VV, Kang M, Ko SR *et al.* Response of particle-attached and free-living bacterial communities to *Microcystis* blooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, **108**(1): 42. DOI: 10.1007/s00253-023-12828-2.
- [37] Shi LM, Cai YF, Gao SL *et al.* Gene expression in the microbial consortia of colonial *Microcystis aeruginosa*—A potential buoyant particulate biofilm. *Environmental Microbiology*, 2022, **24**(10): 4931-4945. DOI: 10.1111/1462-2920.16133.
- [38] Bi XD *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on the growth, colony maintenance, and attached bacterial community composition of colonial cyanobacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, **26**(15): 14977-14987. DOI: 10.1007/s11356-019-04902-y.
- [39] Pineda-Mendoza RM, Briones-Roblero CI, Gonzalez-Escobedo R *et al.* Seasonal changes in the bacterial community structure of three eutrophic urban lakes in Mexico city, with emphasis on *Microcystis* spp. *Toxicon*, 2020, **179**: 8-20. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.02.019.
- [40] Ren HY, Zhu JN, Kong FY *et al.* Ultrasonic enhanced simultaneous algal lipid production and nutrients removal from non-sterile domestic

- wastewater. *Energy Conversion and Management*, 2019, **180**: 680-688. DOI: 10.1016/j.enconman.2018.11.028.
- [41] Luo JF, Wang Y, Tang SS *et al.* Isolation and identification of algicidal compound from *Streptomyces* and algicidal mechanism to *Microcystis aeruginosa*. *PLoS One*, 2013, **8**(10): e76444. DOI: 10.1371/journal.pone.0076444.
- [42] Mankiewicz-Boczek J, Font-Nájera A. Temporal and functional interrelationships between bacterioplankton communities and the development of a toxigenic *Microcystis* bloom in a lowland European reservoir. *Scientific Reports*, 2022, **12**(1): 19332. DOI: 10.1038/s41598-022-23671-2.
- [43] Zhang ZH, Nair S, Tang LL *et al.* Long-term survival of *Synechococcus* and heterotrophic bacteria without external nutrient supply after changes in their relationship from antagonism to mutualism. *mBio*, 2021, **12**(4): e0161421. DOI: 10.1128/mBio.01614-21.
- [44] Gan N, Xiao Y, Lin Z *et al.* The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environmental Microbiology*, 2012, **14**(3): 730-742. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02624.x.
- [45] Takenaka S, Watanabe MF. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 1997, **34**(4): 749-757. DOI: 10.1016/s0045-6535(97)00002-7.
- [46] Qian YL, Okano K, Kodato M *et al.* Dynamics of the prokaryotic and eukaryotic microbial community during a cyanobacterial bloom. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2021, **86**(1): 78-91. DOI: 10.1093/bbb/zbab179.
- [47] Morón-López J, Nieto-Reyes L, Molina S *et al.* Exploring microcystin-degrading bacteria thriving on recycled membranes during a cyanobacterial bloom. *Science of the Total Environment*, 2020, **736**: 139672. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139672.
- [48] Manage PM, Edwards C, Singh BK *et al.* Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(21): 6924-6928. DOI: 10.1128/AEM.01928-09.
- [49] Santos AA, Keim CN, Magalhães VF *et al.* Microcystin drives the composition of small-sized bacterioplankton communities from a coastal lagoon. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022, **29**(22): 33411-33426. DOI: 10.1007/s11356-022-18613-4.
- [50] Yang CY, Wang Q, Simon PN *et al.* Distinct network interactions in particle-associated and free-living bacterial communities during a *Microcystis aeruginosa* bloom in a plateau lake. *Frontiers in Microbiology*, 2017, **8**: 1202. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01202.
- [51] Kim M, Shin B, Lee J *et al.* Culture-independent and culture-dependent analyses of the bacterial community in the phycosphere of cyanobloom-forming *Microcystis aeruginosa*. *Scientific Reports*, 2019, **9**: 20416. DOI: 10.1038/s41598-019-56882-1.
- [52] Davis TW, Berry DL, Boyer GL *et al.* The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, 2009, **8**(5): 715-725. DOI: 10.1016/j.hal.2009.02.004.
- [53] 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.
- [54] Li M, Zhu W, Gao L *et al.* Changes in extracellular polysaccharide content and morphology of *Microcystis aeruginosa* at different specific growth rates. *Journal of Applied Phycology*, 2013, **25**(4): 1023-1030. DOI: 10.1007/s10811-012-9937-7.
- [55] Isaac A, Francis B, Amann RL. Tight adherence (TAD) pilus genes indicate putative niche differentiation in phytoplankton bloom associated rhodobacterales. *Frontiers in Microbiology*, 2021, **10**: 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.718297.
- [56] Jankowiak JG, Gobler CJ. The composition and function of microbiomes within *Microcystis* colonies are significantly different than native bacterial assemblages in two north American lakes. *Frontiers in Microbiology*, 2020, **28**: 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01016.
- [57] Chun SJ, Cui YS, Lee JJ *et al.* Network analysis reveals succession of *Microcystis* genotypes accompanying distinctive microbial modules with recurrent patterns. *Water Research*, 2020, **170**: 115326. DOI: 10.1016/j.watres.2019.115326.
- [58] Chun SJ, Cui YS, Lee CS *et al.* Characterization of distinct CyanoHABs-related modules in microbial recurrent association network. *Frontiers in Microbiology*, 2019, **10**: 1637. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01637.
- [59] Shi LM, Huang YX, Zhang M *et al.* Large buoyant particles dominated by cyanobacterial colonies harbor distinct bacterial communities from small suspended particles and free-living bacteria in the water column. *MicrobiologyOpen*, 2018, **7**(6): e00608. DOI: 10.1002/mbo3.608.