微生物学报 Acta Microbiologica Sinica 2019, 59(6): 1156–1163 http://journals.im.ac.cn/actamicrocn DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20180306



Geomicrobiological Applications 地质微生物应

镉离子污染条件下微生物群落中细菌与藻类的相互作用

石遵计,曹政,胡科鑫,彭鑫碧,朱一帆,谢波*

华中师范大学生命科学学院,湖北 武汉 430079

摘要:【背景】水体微生物有着丰富的多样性,不同种类的微生物之间的相互作用对水体生态系统的组成结构与功能具有重要影响。水体内的藻类与某些微生物可以发生多种相互作用,然而人们对逆境条件下的菌藻有益相互作用尚缺乏深入研究。【目的】为了研究镉对水体微生物群落的影响以及镉胁迫下菌藻之间可能的相互作用。【方法】本研究运用了基于 16S rRNA 基因的高通量测序技术,分析在不同 Cd²⁺条件下微生物群落结构的变化,利用微生物相互作用网络分析菌藻之间可能发生的相互作用。【结果】 通过分离培养筛选出了与集胞藻 PCC6803 互作抗 Cd²⁺的关键细菌 Y9 菌株。【结论】研究结果表明 Y9 菌株属于 Phyllobacteriaceae 科,与微生物群落组成和微生物互作网络的分析结果相符。本研究为探索 水体环境中微生物种间相互作用、菌藻互作抗 Cd²⁺的生态效应提供参考依据。

关键词: 菌藻互作, 镉离子, 高通量测序, 微生物互作网络

在自然界中,无论是水体环境还是土壤环境, 细菌与藻类之间都广泛存在着直接或间接的相互 作用。菌藻相互作用主要包括以下几个方面:(1) 藻类附生细菌具有一定的宿主专一性,例如,黄 杆菌门和鞘脂杆菌门的细菌是圆海链藻和中肋骨 条藻的主要附生细菌^[1]。(2) 藻类和细菌之间有着 抑制和促进等关系,例如,藻类可分泌抗菌物质 抑制特定细菌的生长^[2];细菌合成的一些植物激素 对藻类的生长有一定的调控作用^[3];某些细菌还具 有溶藻、诱导藻类形态发育或藻体聚集等能力^[4-5]。 (3) 藻类与细菌之间可以识别和感应彼此的信号物质,例如,藻类可能会依赖 NO 或核黄素衍生物来调控细菌的行为^[6]。

细菌对藻类提供的有利方面主要集中在营养 改善、激素调节和协同保护^[7-8]。对必需物质提供 方面,细菌不仅可以为其他生物提供氮源,还可 以对其他生物要素进行加工,例如,某些细菌的 5'-核苷酶含量较高,因此可以通过酶促还原作用快 速地对 ATP 类 5'-核苷酸进行水解,产生大量藻类 可以使用的无机磷^[9]。在为藻类提供激素等方面,

基金项目:国家自然科学基金(31570098);中国博士后科学基金(2015M582247);湖北省自然科学基金(2017CFB164);中央高校 基本科研业务费(CCNU18ZDPY03, CCNU16GD014)

^{*}通信作者。Tel: +86-27-67867827; E-mail: xiebo@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期: 2018-07-10; 修回日期: 2018-08-02; 网络出版日期: 2018-08-19

有研究表明浒苔共生菌具有将色氨酸转变为植物 激素吲哚乙酸(IAA)的能力^[10]。细菌能够对重金 属、化学污染物等毒物进行吸附、分解和转化从而 发挥协同保护的作用,降低毒物的侵害^[11-12]。菌藻 互作抗逆还包括抗热、耐盐等,如细菌产生的维 生素 **B**₁₂ 可满足藻类生长需要从而显著增强衣藻 耐热能力^[13],某些细菌可帮助藻类耐盐^[14]。

尽管上述研究提供了一些例证,但人们对不 同环境条件、时间尺度下藻类与细菌互作的形式、 机理和变化趋势等重要问题的了解并不深入,其 原因主要在于传统的研究方法难以评价环境中微 生物的复杂相互作用关系、难培养微生物的大量 存在等。另外,我国部分水体中的重金属 Cd²⁺污 染日益严重,现实环境中菌藻互作抵抗重金属 Cd²⁺的相关研究甚少,相关种群还不清楚。有关 在研究藻类与细菌相互作用时选择高通量测序方 法的报道目前还很少。因此,选择高通量测序等 技术研究镉离子胁迫下藻类与细菌相互作用是比 较适合的方法。微生物种间相互作用研究中,目 前的常用技术是利用各物种或OTU的同现性或相 关性对相互作用进行评估^[15]。在基于 SPARCC 相 关性等算法获得物种共现性后,可在一定的阈值 上筛选并构建出微生物种间互作的网络。我们认 为不仅要注重利用高通量测序数据构建种间互作 的网络,同时也要结合传统生物学实验予以验证 和补充, 使菌藻互作形式与机理研究更深入。

1 材料和方法

1.1 样品采集及富集方法

采集武汉南湖水样,以环境水样不加 Cd²⁺ (CdCl₂·2.5H₂O)为对照,在 Cd²⁺ (25 μmol/L)胁迫条 件下,在无碳源 BG11 培养基中富集处理培养 5 d 后,取出1/2水样,用循环水式多用真空泵于0.22μm 孔径的聚碳酸酯滤膜上过滤,用于 DNA 提取及细 菌群落结构分析。每个处理分3个实验组,培养 5d为一轮富集,如此富集5轮并收集样品,处理 分组见表1。

1.2 群体水平高通量测序与数据分析

提取各处理组样品总 DNA,按照 Illumina 公司 16S rRNA 基因测序建库方法,采用通用引物扩增 16S rRNA 基因序列 V3-V4 区,并利用标签化引物二次扩增构建 16S rRNA 基因高通量测序文库,最后在 Illumina Miseq 平台进行测序。随后分析细菌群落多样性,首先利用 QIIME 进行初步的质量筛选(去除接头污染的序列,同时去除引物序列与 Barcode 序列)。基于 QIIME 等,分选序列,以 97%的序列相似性拣出 OTU,去除嵌合体,进行 Alpha diversity、Beta diversity、Taxonomic analysis 等分析细菌群落结构。利用 origin 2017、office 2017 和 SPSS Statistics 17.0 软件进行统计分析。

1.3 菌藻互作中物种互作网络及菌藻互作抗 Cd²⁺有益菌 Y9 菌株的分离鉴定

利用高通量测序 OTU 丰度结果, 以 SPARCC 等算法实现的共现相关性为关键依据,构建微生

表 1. 实验样品处理表

Table 1. Experimental	groups and treatments
-----------------------	-----------------------

Enrichment cycles	Water samples	Water samples/Cd ²⁺ treatment
Control	Water (1,2,3)	
First round	Water (1,2,3)	Cd ²⁺ +Water (1,2,3)
Second round	Water (1,2,3)	Cd ²⁺ +Water (1,2,3)
Third round	Water (1,2,3)	Cd ²⁺ +Water (1,2,3)
Fourth round	Water (1,2,3)	Cd ²⁺ +Water (1,2,3)
Fifth round	Water (1,2,3)	Cd ²⁺ +Water (1,2,3)

1, 2, 3 in Table 1 mean number of replication.

物物种相互作用网络,并通过 Cytoscape-3.3 构建 网络图形。以高通量测序所获得与菌藻互作抗 Cd²⁺过程中细菌种类的有关信息为基础,挖掘互 作网络中的有关信息如抗 Cd²⁺微生物的种类等; 同时以集胞藻 PCC6803 为材料,在48 孔板中共 接种藻类和分离的细菌,建立高通量菌藻互作研 究平台,考察共培养物中藻类活细胞数量等指标, 以增强藻类抵抗环境因子 Cd²⁺的能力为标准,实 际分离筛选保护藻类抵抗重金属 Cd²⁺的菌株。

本实验所用到的藻种是集胞藻 PCC6803 (Synechocystis sp. PCC6803),来源于中国科学院水 生生物研究所徐旭东研究员实验室。首先,用24孔 板测定集胞藻 PCC6803 的抗 Cd²⁺最小抑制浓度 (MIC)。Cd²⁺浓度梯度为0、5、10、25、50、100、 150、200 µmol/L。空白对照和每个浓度梯度都设 3个重复,在温度为 25°C、光照强度为 2000 lux 的养藻间静置培养5d,期间定时观察藻的生长状 况。其次,取富集第5轮的水样1mL,将其稀释 到 10⁻¹、10⁻² 和 10⁻³。然后取 100 µL 稀释液在含 100 µmol/L Cd²⁺的 R2A 和 LB 固体平板培养基上 稀释涂布,置于恒温培养箱进行28°C培养。48h 后,挑取各单克隆于平板培养基上划线培养,获 得纯的单菌落。通过对分离的 Cd²⁺抗性菌进行 16S rRNA 基因的扩增与测序,鉴定细菌的种属。然后 在24孔板中进行菌藻共培养实验,筛选到了能增 强 PCC6803 抗 Cd²⁺的细菌 Aminobacter sp. Y9。

1.4 Y9 菌株与集胞藻 PCC6803 互作抗 Cd²⁺过程 中藻数的测定

实验于 100 mL 锥形瓶中, 在无碳源 BG11 培 养基中, 按照(1) PCC6803、(2) PCC6803+Cd²⁺、 (3) PCC6803+Cd²⁺+Y9、(4) PCC6803+Y9 进行分 组实验, 其中 PCC 6803 与 Y9 菌株按照不同的比 例进行共培养,比例分别是 1:0.1、1:1、1:10、1:100, 每组设 3 个重复, 放置在温度为 25 °C、光照强 度为 2000 lux 的养藻间静置培养, 每天摇动 2 次。 其中 Cd²⁺浓度为集胞藻 PCC6803 抗 Cd²⁺ MIC (25 μmol/L)。在培养过程中, 每隔 24 h, 利用显 微镜直接计数法, 取 30 μL 的培养液放在血球计 数板中, 于显微镜下直接计数, 然后推算出总的 藻数, 再以时间为横轴, 藻数为纵轴, 制作集胞 藻 PCC6803 的生长曲线。显微计数公式如下: 每 毫升原液所含藻数=每小格平均藻数×400×1000× 稀释倍数。

2 结果和分析

2.1 水样富集过程中细菌多样性测序深度及 α 和β 多样性指数分析

处理后的样品经利用 Illumina Miseq 测序平 台测序。序列经质控、双端拼接后,在25个样品 中(含1个技术重复)共获得206192条序列。OTU 以序列相似性≥97%为标准。经技术重复数据可 靠性检测,我们将各样品OTU的要求定为3个重 复至少均检测出2次(3×2),并以此进行数据过滤、 去除嵌合体。过滤后的数据以样品最低序列数进 行稀薄化 Rarefaction 处理,得到有效OTU 1162 个,该OTU 表用于后续多个分析。

各样品的 rarefaction (稀释度曲线)见图 1-A, 在测序序列达到 7500 条带之后,每个样品的 OTUs 含量趋于稳定,说明其可以满足样品的测序深度 分析要求。如图显示,在 5 轮富集过程中,水样 组及水样加 Cd²⁺组的 Simpson 多样性指数变化不 大并且无明显差异(图 1-B)。图 1-C 显示,同一处 理组聚集在一起,说明相同处理之间的群落多样 性具有相似性。对照组、水样组和水样加 Cd²⁺组 的点离得都较远,表明 Cd²⁺处理的细菌群落结构 变化明显。





Figure 1. Rarefaction curves, bacteria alpha diversity (Simpson) and β -diversity analysis of the sequencing data. A: Rarefaction curve of the observed OTUs. B: Simpson index analysis. C: PCoA results based on Bray-Curtis distance. Bars in Figure 1-A represent the mean±SD of the biological replicates. 0, 1, 3, 5 in Figure 1-B mean the enrichment cycle.

2.2 细菌群落结构的组成和变化

如图 2-A 所示,对水样在 Cd²⁺富集过程中细 菌群落结构的组成和变化分析得出(丰度在前 50 的科),其中占优势的科有 Pseudomonadaceae、 Moraxellaceae、Sphingomonadaceae、Strepttococcaceae、 Bacillaceae 等,可以看出,Rhodoccyclaceae、 Chitinophagaceae、Phyllobacteriaceae 等科的细菌 丰度随 Cd²⁺的富集逐渐增多。从图 2-B 和图 2-C 中得到 Chitinophagaceae 和 Phyllobacteriaceae 2个 科在富集前的细菌丰度接近为 0,富集过程中 2 个 科的菌都有明显增多,推测这 2 个科中的细菌可 能具有抗 Cd²⁺能力。

2.3 水样富集过程中物种互作网络及菌藻互作 抗 Cd²⁺有益菌的分离鉴定

进一步基于共现性构建出微生物种间相互作 用网络,首先根据 OTU 的相关性,将科水平的细 菌物种建立了共现性网络(图 3-A)。SPARCC 相关 性 r 阈值为 0.60 或-0.60, P≤0.01 以保证网络中 仅保 留 相关性大于阈值的物种。微囊藻科 (Microcystaceae)和束球藻科(Gomphosphaeriaceae) 是本实验水样中检测到的主要蓝藻,由图 3-A 所示,与微囊藻科(Microcystaceae)主要正相 关菌有 Comamonadaceae、Leuconostocaceae、 Hyphomonadaceae、Bradyrhizobiaceae 等 11 个类 群,与束球藻科(Gomphosphaeriaceae)主要正相关 菌 有 Comamonadaceae 、Hyphomonadaceae 、 Bacillaceae、Phyllobacteriaceae 等 10 个类群,这 些细菌类群有可能在菌藻互作抗 Cd²⁺中发挥着重 要作用。

为验证高通量测序所获得的菌藻互作抗 Cd²⁺ 过程中微生物群落组成等信息,挖掘微生物互作 网络中与蓝藻密切相关的细菌种类,获得与菌藻



图 2. 水样在 Cd²⁺富集过程中的细菌群落变化

Figure 2. The microbial communities of water sample during multi-cycle Cd^{2+} stress. A: The abundance change of Top 50 Families. B: The abundance change of Chitinophagaceae. C: The abundance change of Phyllobacteriaceae. Bars in Figure 2-B and Figure 2-C represent the mean±SD of three biological replicates.

互作抗 Cd²⁺过程密切相关的关键细菌,我们以集 胞藻 PCC6803 为材料,在 24 孔板中共接种藻类 和分离的细菌,筛选出能与集胞藻互作抗 Cd²⁺的 关键细菌。通过实验,藻 PCC6803 的抗 Cd²⁺最小 抑制浓度 MIC 为 25 μmol/L。我们分离到了能与集 胞藻 PCC6803 互作抗 Cd²⁺的细菌 *Aminobacter* sp. Y9,Y9 菌株抗 Cd²⁺最小抑制浓度 MIC 为 200 μmol/L。 在无碳源 BG11 培养基中,通过测定不同藻菌比 例(1:0.1, 1:1, 1:10, 1:100)的集胞藻 PCC6803 与 Y9 菌株在 25 μmol/L Cd²⁺胁迫后的藻数,结果显 示藻 PCC6803 的生长被 Cd²⁺抑制,通过与不同比 例的 Y9 菌株共培养后,即使在 Cd²⁺胁迫下,藻 PCC6803 的生长逐渐恢复(图 3-B), Y9 菌株本身 在无碳源 BG11 培养基中不能生长,但与藻 PCC6803 共培养后,Y9 菌株具有了一定的生长 趋势(结果未显示),结果表明该菌确实可以与集 胞藻 PCC6803 互作抗 Cd²⁺。更为重要的是,该菌 属于 Phyllobacteriaceae 科(图 3-A 红色字体),这 与我们微生物互作网络中 Phyllobacteriaceae 科与 Gomphosphaeriaceae (蓝藻)具有正相关结果相符。



图 3. 微生物种间相互作用网络及实验验证

Figure 3. Microbial species interaction network and experimental verification. A: Microbial species interaction network based on their co-occurrences at the family level. B: The growth curves of *Synechocystis* sp. PCC6803 with different ratios of strain Y9 under Cd^{2+} stress. In figure A, the blue and green circles in the figure represent cyanobacteria, and the bacteria that can positively interact with cyanobacteria, respectively. In figure B, Cd^{2+} indicates that the concentration of Cd^{2+} is 25 µmol/L, and 6803/0.1 Y9 indicates that the ratio of PCC6803 and bacteria is 1:0.1, 6803/Cd²⁺/0.1 Y9 indicates that the ratio of PCC6803 and bacteria is 1:0.1 under 25 µmol/L Cd^{2+} stress, and so on.

3 讨论

本实验中,我们通过高通量测序分析了水 样在 Cd²⁺胁迫下富集过程中细菌群落结构的 组成和变化。构建出微生物种间相互作用网 络,发现了在菌藻互作抗 Cd²⁺中与蓝藻正相关 的细菌物种。并分离到了能与集胞藻 PCC6803 互作抗 Cd²⁺的关键细菌 *Aminobacter* sp. Y9, 该分离菌株属 Phyllobacteriaceae 科,这与微生 物群落组成和微生物互作网络的信息与结果 相符。

本研究运用了基于 16S rRNA 基因的高通量 测序技术,然而 16S rRNA 基因并不能用来完全表 征某一微生物的种属,在高通量测序的数据中, 某些微生物虽然可以精确到种的水平,但是我们 也难以百分之百预测出具体微生物的信息。另外, 由于共现性计算的局限性、实验室培养的难度和 某些功能微生物并不依赖于数量的变化来发挥功 能,也将造成组学数据和试验结果之间的差异。 尽管 Y9 菌株能与集胞藻相互作用抵抗 Cd²⁺胁迫, 而在组学数据中并没有观察到明显的一致性。在 探究 Y9 菌株与集胞藻 PCC6803 互作抗 Cd²⁺机制 过程中,我们推测菌藻互作过程 Y9 菌株分泌某种 代谢物与镉离子相结合或胞外糖的包裹减轻了镉 离子对藻 PCC6803 的抑制,或 Y9 菌株的存在给 藻 PCC6803 创造了某种适宜的微环境。在以后的 研究中,需要结合代谢组学深入研究菌藻互作抗 Cd²⁺机制。

参考文献

- Grossart HP, Levold F, Allgaier M, Simon M, Brinkhoff T. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(6): 860–873.
- [2] Desbois AP, Mearns-Spragg A, Smith VJ. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology*, 2009, 11(1): 45–52.
- [3] De-Bashan LE, Antoun H, Bashan Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*, 2008, 44(4): 938–947.
- [4] Gärdes A, Iversen MH, Grossart HP, Passow U, Ullrich MS. Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*. *The ISME Journal*, 2011, 5(3): 436–445.
- [5] Shen H, Niu Y, Xie P, Tao M, Yang X. Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshwater Biology*, 2011, 56(6): 1065–1080.
- [6] Amin SA, Green DH, Gärdes A, Romano A, Trimble L, Carrano CJ. Siderophore-mediated iron uptake in two clades of *Marinobacter* spp. associated with phytoplankton: the role of light. *BioMetals*, 2012, 25(1): 181–192.
- [7] Egan S, James S, Holmström C, Kjelleberg S. Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata. FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35(1): 67–73.
- [8] Michel G, Nyval-Collen P, Barbeyron T, Czjzek M, Helbert W. Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Applied Microbiology and*

Biotechnology, 2006, 71(1): 23-33.

- [9] Liu HL, Zhou YY, Xiao WJ, Ji L, Cao XY, Song CL. Shifting nutrient-mediated interactions between algae and bacteria in a microcosm: evidence from alkaline phosphatase assay. *Microbiological Research*, 2012, 167(5): 292–298.
- [10] Gupta V, Kumar M, Brahmbhatt H, Reddy CRK, Seth A, Jha B. Simultaneous determination of different endogenetic plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(11): 1259–1263.
- [11] Medina M, Neis U. Symbiotic algal bacterial wastewater treatment: effect of food to microorganism ratio and hydraulic retention time on the process performance. *Water Science and Technology*, 2007, 55(11): 165–171.
- [12] Sansone U, Belli M, Riccardi M, Alonzi A, Jeran Z, Radojko J, Smodis B, Montanari M, Cavolo F. Adhesion of water-borne particulates on freshwater biota. *The Science of Total Environment*, 1998, 219(1): 21–28.
- [13] Xie B, Bishop S, Stessman D, Wright D, Spalding MH, Halverson LJ. *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B₁₂-producing bacteria. *The ISME Journal*. 2013, 7(8): 1544–1555.
- [14] Dittami SM, Duboscq-Bidot L, Perennou M, Gobet A, Corre E. Host-microbe interactions as a drive of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures. *The ISME Journal*, 2016, 10(1): 51–63.
- [15] Jiang XP, Hu XH. Studies in microbiome big data. Mathematical Modeling and Its Applications, 2015, 4(3): 6-18. (in Chinese) 蒋兴鹏, 胡小华. 微生物组学的大数据研究. 数学建模及 其应用, 2015, 4(3): 6-18.

Interactions between bacteria and phytoplankton in microbial communities under cadmium contamination conditions

Zunji Shi, Zheng Cao, Kexin Hu, Xinbi Peng, Yifan Zhu, Bo Xie^{*}

School of life sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Abstract: [Background] Microorganisms in water are rich in diversity, and various interspecific relationships occur among different microorganisms, which have an important influence on the composition structure and function of water ecosystem. Phytoplankton (microalgae and cyanobacteria) and some microbes in aquatic environment can interact with each other in various formats. However, the beneficial interactions between bacteria and phytoplankton under stress conditions remain unclear. [Objective] Studying the effects of Cd^{2+} on the microbial community of water samples and possible interactions between bacteria and phytoplankton. [Methods] Based on the high throughput sequencing of 16S rRNA gene, we analyzed the changes of microbial community structure under Cd^{2+} stress. We used the microbial interaction network to analyze the possible interaction between bacteria and phytoplankton. [Results] By isolation and culture, we found that the strain Y9 could interact with *Synechocystis* sp. PCC6803 and help the algae to resist the toxicity of Cd^{2+} . [Conclusion] The results showed that strain Y9 belonged to Phyllobacteriaceae family, which was consistent with the results of microbial community composition and microbial interaction network. This study will provide a new scientific basis for exploring the interactions between microorganisms in aquatic environment and the ecological effects of interactions between bacteria and phytoplankton for cadmium resistance.

Keywords: bacteria and phytoplankton interaction, Cd²⁺, microbial community, microbial interaction network

(本文责编:张晓丽)

谢波,1996-2006 于华中农业大学获得学士和微生物学博士学位,2006-2013 分别在美国 爱达荷大学和爱荷华州立大学进行博士后研究,现任华中师范大学生命科学学院教授。 团队主要方向为结合生物学、生物信息学、生态学等多学科领域中的技术与理论开展微 生物种间相互作用的基础与应用研究。相关论文发表在 ISME J、Plant J、Plant Biotechnol J、Chem Eng J 等杂志,部分文章获得 F1000 Faculty 的推荐。



http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570098), by the China Post-doctoral Science Foundation (2015M582247), by the Hubei Natural Science Foundation (2017CFB164) and by the Self-determined Research Funds of CCNU from the College's Basic Research and Operation of MOE (CCNU18ZDPY03, CCNU16GD014)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-27-67867827; E-mail: xiebo@mail.ccnu.edu.cn

Received: 10 July 2018; Revised: 2 August 2018; Published online: 19 August 2018