



东北旱田土壤中 *Anabaena* 伴生细菌的分离与鉴定

荆瑞勇^{1,2} 王丽艳² 孙强² 刘俊杰¹ 刘居东¹ 金剑¹ 刘晓冰¹ 王光华^{*1}

1 中国科学院东北地理与农业生态研究所 黑土区农业生态重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150081

2 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 黑龙江 大庆 163319

摘要:【背景】鱼腥藻(*Anabaena*)在农田土壤中广泛分布,具有固碳和固氮功能。明确伴生细菌与蓝细菌的关系,对提高农田土壤中 *Anabaena* 的功能具有重要意义。【目的】从东北不同旱田土壤中分离 *Anabaena* sp. PCC7120 的伴生细菌,初步鉴定伴生细菌的分类归属,推测伴生细菌的功能,为明确旱田土壤蓝细菌与伴生细菌的关系提供数据支撑。【方法】采用平板分离、PCR-DGGE、克隆测序技术测定并分析不同旱田土壤中伴生细菌的 16S rRNA 基因序列,确定伴生细菌的分类地位。【结果】PCR-DGGE 图谱显示东北旱田 14 个土样中分离获得 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生细菌数量和种类不同;PCR-克隆测序获得伴生细菌的 16S rRNA 基因序列 37 条,可鉴定到种水平的菌株 36 条,主要归为鞘氨醇盒菌属(*Sphingopyxis*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和红球菌属(*Rhodococcus*)等,推测这些伴生细菌具有适应寡营养、富集微量元素、清除毒素等功效。【结论】东北旱田不同土壤中 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生细菌种类和数量各异,这些伴生细菌主要隶属于 *Sphingopyxis*、*Variovorax*、*Flavobacterium* 和 *Rhodococcus* 等属。

关键词: 旱田黑土, 蓝细菌, 伴生细菌, 分离, 鉴定

Isolation and identification of bacteria associated with *Anabaena* from upland soils in northeast China

JING Rui-Yong^{1,2} WANG Li-Yan² SUN Qiang² LIU Jun-Jie¹ LIU Ju-Dong¹
JIN Jian¹ LIU Xiao-Bing¹ WANG Guang-Hua^{*1}

1 Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150081, China

2 College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China

Abstract: [Background] *Anabaena* distribute widely in agricultural soils and have the ability of fixing-carbon and fixing-nitrogen. Clarifying the relationship between cyanobacteria and their associated bacteria is beneficial to improve the function of *Anabaena* in agricultural soils. [Objective] To isolate associated bacteria with *Anabaena* sp. PCC7120 from different upland soils in northeast China, to

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0300104); National Natural Science Foundation of China (41571246, 318407077); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (C2017045, C2018046)

*Corresponding author: E-mail: wanggh@iga.ac.cn

Received: 16-03-2019; Accepted: 12-07-2019; Published online: 09-09-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0300104); 国家自然科学基金(41571246, 318407077); 黑龙江省自然科学基金(C2017045, C2018046)

*通信作者: E-mail: wanggh@iga.ac.cn

收稿日期: 2019-03-16; 接受日期: 2019-07-12; 网络首发日期: 2019-09-09

taxonomically identify the associated bacteria, to speculate the function of associated bacteria, and to provide data support for clarifying the relationship between soil cyanobacteria and their associated bacteria. [Methods] Isolation from cultured plate, PCR-DGGE and cloning-sequencing were used to obtain and analyze 16S rRNA gene sequences of associated bacteria with *Anabaena* sp. PCC7120 from different upland soils and to determine their taxonomic position. [Results] PCR-DGGE profiles showed there are different quantity and type of associated bacteria with *Anabaena* sp. PCC7120 from 14 upland soils in northeast China. PCR cloning-sequencing result showed that 37 sequences of associated bacteria were obtained, and 36 sequences were identified at species level. The associated bacteria mainly belong to *Sphingopyxis*, *Variovorax*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, and these bacteria were suspected with the functions of adapting oligotrophic condition, enriching trace elements, removing toxins. [Conclusion] There are different quantity and type of associated bacteria with *Anabaena* sp. PCC7120 from upland soils in northeast China. These associated bacteria were mainly members of *Sphingopyxis*, *Variovorax*, *Flavobacterium* and *Rhodococcus*.

Keywords: Upland black soil, Cyanobacteria, Associated bacteria, Isolation, Identification

蓝细菌作为生态食物链中的初级生产者和被捕食者在自然环境中广泛存在^[1]。蓝细菌在自然环境中总与一些细菌伴生,这些伴生细菌与蓝细菌关系密切,引起了学术界的关注^[2-5]。目前研究发现,伴生细菌可提高或降低蓝细菌的生长^[6-7]、改变蓝细菌代谢分泌物(包括蓝细菌毒素)的质量^[2,4]、矿化蓝细菌代谢分泌物(包括毒素的降解或产生)^[3,8-9]、抵御重金属污染和被捕食^[10]、促进蓝细菌的聚集^[11]、增强蓝细菌的光合活性^[5,11]、提高蓝细菌生长所需的 CO₂ 浓度^[12]、提供蓝细菌生长所需的生长因子^[13],为蓝细菌的生存提供良好的微环境。蓝细菌对伴生细菌生长也具有重要作用,其分泌有机物为伴生细菌提供具高浓度有机营养的微环境^[14-15],促进能降解蓝细菌毒素的伴生细菌生长^[16],改变滞留在不同深度水环境中具有气囊蓝细菌的伴生细菌群落^[17]。伴生细菌对蓝细菌既有有利方面,如保护蓝细菌免受噬菌体感染^[18],也有些伴生细菌具有杀藻作用^[19],对控制具有潜在毒性的蓝细菌暴发具有重要作用^[2]。

伴生细菌数量和多样性与蓝细菌丰度也存在一定关系。在蓝细菌对数生长期,其伴生菌的生长较慢,多样性丰富;而在蓝细菌的稳定生长期时,其伴生菌的生长快,多样性降低^[5]。环境因子(如温度和营养^[2]、溶氧和 pH 值^[4])也影响着蓝细菌及其伴生菌的群落相互关系。蓝细菌伴生菌

中除了细菌外,蓝细菌的伴生菌也包括真菌和古菌^[20]。Dziallas 等^[4]采用 PCR-DGGE 方法调查了 3 株蓝细菌的伴生菌,测序结果发现游离细菌类群主要分布在 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*),而蓝细菌的伴生菌总有一些分布在 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*);游离细菌和蓝细菌的伴生细菌在拟杆菌门(*Bacterioidetes*)和 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)均有分布。芬兰 Joutikas 湖泊水华中主要蓝细菌以鱼腥藻(*Anabaena*)和束丝囊(*Aphanizomenon*)为主,最丰富的类群异养细菌群落是疣微菌门(*Verrucomicrobia*)细菌,而生物量最大细菌主要分布在 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)和噬细胞菌属-黄杆菌属-拟杆菌属类群(CFB 类群, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*)中^[21]。溶解蓝细菌细胞的伴生细菌如噬纤维细菌(*Cytophagaceae*)^[22]在水华后期广泛存在。以上研究主要针对水体中蓝细菌伴生细菌的研究。

蓝细菌分布广泛^[23],土壤中伴生细菌与蓝细菌的关系是否类似于海鞘与蓝细菌的共生关系^[24],还是类似于溶藻细菌与藻类的捕杀关系^[25],相关研究鲜有报道。为了探索同一株蓝细菌在不同旱田土壤中的伴生菌系统发育地位,本文拟以模式菌株鱼腥藻(*Anabaena* sp. PCC7120)为诱饵,在室内培养条件下置于不同土壤中混合培养 *Anabaena* sp. PCC7120,培养一段时间后再分离纯化 *Anabaena*

sp. PCC7120, 难以除去的细菌被视为鱼腥藻的伴生细菌, 通过伴生细菌的富集培养, 提取其 DNA, 经 PCR 扩增、克隆测序及 PCR-DGGE 分子生物学手段, 明确在不同旱地土壤中 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生细菌的种类, 为研究土壤中蓝细菌与其伴生细菌间相关系提供数据支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

蓝细菌菌株 *Anabaena* sp. PCC7120 模式菌株保藏在本实验室; 供试土样来自东北旱田黑土, 其基本信息见表 1。

BG-11 培养基(g/L): NaNO₃ 1.500, K₂HPO₄·3H₂O

0.040, MgSO₄·7H₂O 0.075, CaCl₂·2H₂O 0.036, 柠檬酸铁铵 0.006, EDTA 0.001, Na₂CO₃ 0.001, 微量元素溶液 1 mL。微量元素溶液(g/L): H₃BO₃ 2.860, MnCl₂·4H₂O 1.810, NaMoO₄·5H₂O 0.390, CuSO₅·5H₂O 0.079, ZnSO₄·7H₂O 0.222, CoCl₂·6H₂O 0.050。

1.2 试 验 设 计

将用 BG-11 液体培养基培养 10 d 的 *Anabaena* sp. PCC7120 悬液 5 mL 分别接种于装有 1 g 不同地点土样和 5 mL 无菌水的试管中, 充分混匀置于光照培养箱 25 °C 培养。光周期 L:D=14:10, 培养 2 周。当 *Anabaena* sp. PCC7120 菌液变为深绿色, 用接种环挑取一环菌液于选择性 BG-11 固体培养基(含

表 1 供试土壤基本信息

Table 1 Basic information of tested soils

样品 Sample	采样地点 Sampling site	经纬度 Longitude and latitude	作物 Crop	pH 值 pH value	总碳 Total carbon (g/kg)	总 N Total nitrogen (g/kg)	含水量 Water content (%)
1	双城, 黑龙江 Shuangcheng, Heilongjiang	45°23'N, 126°22'E	Corn	6.53	17.02	1.68	23
2	扶余, 吉林 Fuyu, Jilin	45°06'N, 126°11'E	Corn	5.78	19.97	2.03	18
3	德惠, 吉林 Dehui, Jilin	44°12'N, 125°33'E	Corn	4.79	17.45	1.44	22
4	公主岭, 吉林 Gongzhuling, Jilin	43°26'N, 124°43'E	Corn	5.50	14.40	1.12	23
5	昌图, 辽宁 Changtu, Liaoning	43°05'N, 124°20'E	Corn	5.46	14.58	1.02	21
6	哈尔滨, 黑龙江 Harbin, Heilongjiang	45°41'N, 126°38'E	Soybean	6.57	26.36	1.69	23
7	呼兰, 黑龙江 Hulan, Heilongjiang	46°06'N, 127°02'E	Corn	5.18	19.76	1.42	22
8	绥棱, 黑龙江 Suiling, Heilongjiang	47°13'N, 127°07'E	Corn	5.19	27.07	1.90	30
9	拜泉, 黑龙江 Baiquan, Heilongjiang	47°35'N, 126°07'E	Corn	4.98	23.41	1.95	26
10	克东, 黑龙江 Kedong, Heilongjiang	48°09'N, 126°13'E	Soybean	5.41	32.03	2.45	24
11	北安, 黑龙江 Beian, Heilongjiang	48°09'N, 126°43'E	Soybean	6.10	53.53	4.25	40
12	五大连池, 黑龙江 Wudalianchi, Heilongjiang	48°52'N, 126°08'E	Soybean	5.39	36.76	3.06	35
13	嫩江 1, 黑龙江 Nenjiang1, Heilongjiang	49°08'N, 125°37'E	Corn	5.53	31.71	2.50	28
14	嫩江 2, 黑龙江 Nenjiang 2, Heilongjiang	49°26'N, 125°26'E	Corn	5.17	37.23	2.96	33

注: 样品列的数字代表着土壤代号, 下同。

Note: The numbers below the sample column indicate different soil. The same as below.

放线菌酮 100 mg/L)平板上划线分离 *Anabaena* sp. PCC7120。固体平板置于光照培养箱培养 10 d 时,挑取单个蓝细菌菌落进一步纯化。纯化 4 次后,将平板上 *Anabaena* sp. PCC7120 及其伴生细菌用 10 mL 无菌水冲洗,收集于无菌试管混匀,取 1 mL 菌液,在无菌条件下接入装有 5 mL 已灭菌的液体牛肉膏蛋白胨培养基的试管中,同时设无菌水为对照,置于 30 °C、160 r/min 的摇床,在黑暗条件下培养 2 d,对照组试管仍为清澈,处理组变混浊。取 1 mL 浑浊的菌悬液在 15 000 r/min 离心机中离心 10 min,沉淀部分提取菌体 DNA。以菌体 DNA 为模板,采用 27F/1492R 细菌通用引物进行 PCR 扩增,PCR 产物目的条带经胶回收纯化后克隆,以阳性克隆的菌液为模板,GC-357F/517R 引物进行 PCR 扩增,其 PCR 产物经 DGGE 电泳,将不同位置条带的阳性克隆菌液送测序公司测序,系统进化分析初步确定伴生细菌的归属。

1.3 主要试剂和仪器

所有生化试剂、QIAquick 胶回收试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司。16S rRNA 基因扩增的引物和基因测序由深圳华大基因股份有限公司完成。PCR 仪、凝胶成像系统和 DGGE 电泳仪, Bio-Rad 公司;元素分析仪,艾力蒙塔公司。

1.4 菌液 DNA 的摄取

取 1 mL 蓝细菌伴生菌悬液置于 2 mL 离心管,15 000 r/min 离心 10 min,用无菌水洗涤菌沉淀 3 次,沉淀中加入 1 mL TE buffer 和终浓度为 20 µg/mL 的 RNase A,离心管涡旋混匀后置于 37 °C 温育 2 h,每 30 min 涡旋 1 次;在无菌条件下移入装有不同粒径玻璃珠(1 mm:0.5 mm:0.1 mm=1:1:1)的无菌小管中, Bead-beating 15 s;离心管中再加入 30 µL 10% SDS、30 µL 10 mg/mL 蛋白酶 K、20 µL 50 mg/mL 溶菌酶,继续在 37 °C 温育 2 h;离心管中再加入 100 µL 5 mol/L NaCl、80 µL 2% CTAB 溶液,混匀后 65 °C 温育 10 min;最后分别采用 720 µL PCI (酚:氯仿:异戊醇=25:24:1, 体积比)和 720 µL CIA

(氯仿/异戊醇=24:1, 体积比)在 15 000 r/min 离心 5 min 条件下脱蛋白;采用 440 µL 异丙醇冰浴 30 min 析出 DNA,离心收集 DNA 沉淀,用 70%乙醇涡旋洗涤 DNA,离心去除乙醇;沉淀的 DNA 用 50 µL TE buffer 溶解,4 °C 保存备用。

1.5 伴生菌 PCR 扩增

细菌的 16S rRNA 基因采用引物 27F (5'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTA CCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。50 µL 的 PCR 反应体系中包含上、下游引物(50 pmol/L)各 0.5 µL, DNA 模板 1-2 µL, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 µL, *rTaq* Buffer 5 µL, *rTaq* 酶合酶(5 U/µL) 0.5 µL, 加入无菌水至终体积。同时设无模板的阴性对照。PCR 反应条件:94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环;72 °C 10 min。

1.6 伴生细菌阳性克隆的 DGGE 检测

对蓝细菌及其伴生菌 16S rRNA 基因 PCR 产物,从 2%琼脂糖凝胶上切取约 1 500 bp 大小的 DNA 片段,将 QIAquick 胶回收试剂盒纯化后的 DNA 片段连接至 pMD18-T 载体,转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。每个处理的转化平板挑取 50 个白色单菌落,再用 RV-M/M13-47 引物进行 PCR 扩增来检测阳性克隆。PCR 条件同伴生菌 PCR 扩增,循环数降至 25。将检测获得的阳性克隆菌液采用 GC-357F (5'-CGCCCCGCCGCGCCCCGCG CCGGCCCGCCGCCCGCCCCGCCCCCTACGGGA GGCAGCAG-3')和 517R (5'-ATTACCGCGGCTGC TGG-3')引物进行 PCR 扩增。15 µL 的 PCR 反应体系包含上、下游引物(50 pmol/L)各 0.15 µL, 0.3 µL 菌液作为模板, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.5 µL, *rTaq* Buffer 1.5 µL, *rTaq* 酶(5 U/µL) 0.15 µL, 补足 ddH₂O 至终体积。设无模板的阴性对照。6 µL PCR 产物用于 DGGE 凝胶电泳检测。DGGE 变性梯度为 30%-70%。DGGE 凝胶图谱中不同位置相对应的阳性克隆菌液培养过夜后送至测序公司测序。

1.7 不同样品伴生细菌的 DGGE 检测

以不同样品中蓝细菌及其伴生细菌 16S rRNA

基因 PCR 产物为模板, GC-357F 和 517R 为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(15 μ L): 上、下游引物(50 pmol/L)各 0.15 μ L, 模板 0.3 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.5 μ L, *rTaq* Buffer 1.5 μ L, *rTaq* 酶 (5 U/ μ L) 0.15 μ L, 补 ddH₂O 至终体积。设无模板为阴性对照。6 μ L PCR 产物用于 DGGE 凝胶电泳检测。DGGE 变性梯度为 30%–70%。

1.8 伴生细菌的系统发育分析

在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对蓝细菌伴生细菌 16S rRNA 基因最近的亲缘菌进行 BLAST 比对。将其核苷酸序列用 ClustalX 1.81 进行同源性分析。采用 MEGA 4.0 软件构建 Neighbor-Joining 进化树。本文获得 *Anabaena* 伴生细菌 16S rRNA 基因 GenBank 登录号为 MK684309–MK684345。

2 结果与分析

2.1 供试土样中 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生菌 16S rRNA 基因的获得

供试土壤中 *Anabaena* sp. PCC7120 的伴生细菌是指在光照条件下培养 *Anabaena* sp. PCC7120 和土样的混合液,待 *Anabaena* sp. PCC7120 菌株生长后,通过平板连续分离纯化不能去除的细菌,采用 NA 培养基获得的细菌均被认为是伴生细菌。获得的细菌菌液通过提取其 DNA,对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增(图 1A),将每个土壤样品的 PCR 产

物约 1 500 bp 条带胶纯化回收,进行 TA 克隆,每个处理中阳性克隆检测时在 1 600 bp 位置有条带被认为是连接成功(图 1B),再将每个阳性克隆以 GC-357F/517R 进行巢式 PCR 扩增(图 1C),扩增获得 250 bp 大小的 DNA 片段,将每个阳性克隆均进行 DGGE 检测,若图 1D 中 DGGE 条带均具有一条相同条带(箭头所示),被认为是大肠杆菌感受态细胞的条带,在相同处理的 DGGE 图谱中,选取条带位置不同的阳性克隆,将其菌液送至测序公司测序。

以每个样品采用 27F/1492R 引物 PCR 扩增获得产物为模板,再以 GC-357F/517R 进行巢式 PCR,获得的 PCR 产物直接进行 DGGE 检测,从图 2 可见,土样 1–14 中 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生细菌种类较多,土样 7 中伴生细菌种类最多,呈现出 8 条带,其他处理均有 3–7 条带,表明不同土壤中 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生细菌种类存在较大的差异。

2.2 供试土样中 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生菌 16S rRNA 基因的系统进化分析

克隆测序获得 37 条 *Anabaena* 伴生细菌的 16S rRNA 基因序列,经 BLAST 比对(表 2),36 条伴生细菌与已知细菌相似性均为 98%–99%,只有克隆 11-1 与已知细菌 *Flavobacterium xinjiangense* 相似性为 94%。相似性高的 36 条序列主要分布在贪噬菌属(*Variovorax*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*),

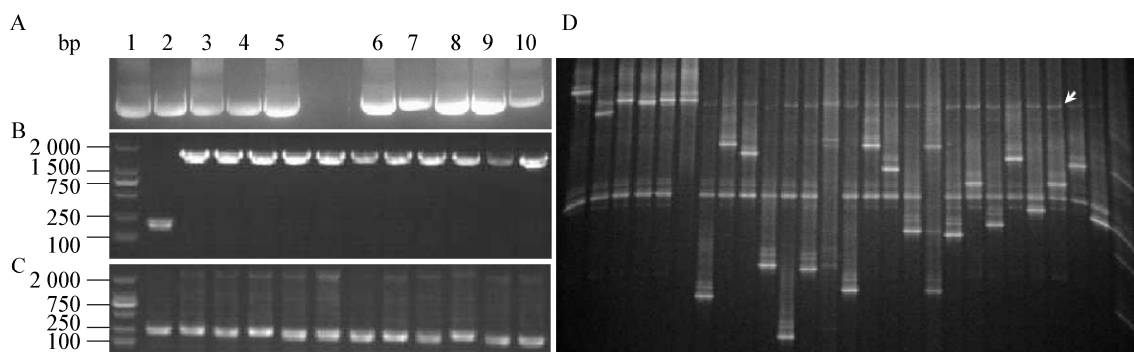


图 1 不同土样中 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生菌的分子生物学鉴定

Figure 1 Molecular identification of different associated bacteria of *Anabaena* sp. PCC7120 from different soil samples

注: A–D 分别为 PCR 扩增、阳性克隆检测、阳性克隆巢式 PCR 扩增和 DGGE 检测。图中数字 1–10 分别代表土样 1–10,下同。
Note: A–D indicate PCR amplification, positive clone detection, nest PCR amplification of positive clone and DGGE detection, respectively. The number 1 to 10 indicates the soil sample 1 to 10, respectively, the same as below.

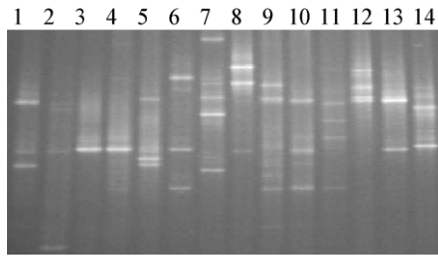


图 2 不同土壤中 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生细菌 DGGE 图谱

Figure 2 DGGE profile of *Anabaena* sp. PCC7120 associated bacteria from different soils

表 2 不同土样 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生菌的 16S rRNA 基因序列 BLAST 比对

Table 2 BLAST comparison of sequenced 16S rRNA gene sequence of *Anabaena* sp. PCC7120 associate bacteria from different soils

克隆名	最近亲缘细菌	GenBank 登录号	相似性	对齐	来源
Clones	Closest relative bacteria	GenBank accession No.	Similarity (%)	Alignment	Sources
1-1	<i>Sphingopyxis chilensis</i> S37	NR_024631	99	1 401/1 411	[26]
1-2	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	NR_074646	99	1 454/1 457	Lucas et al., 2013 unpublished
2-1	<i>Rhodococcus qingshengii</i> dj1-6	NR_043535	99	1 438/1 440	[27]
2-2	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	NR_074455	99	1 419/1 436	[28]
2-3	<i>Rhodococcus qingshengii</i> dj1-6	NR_043535	99	1 437/1 440	[27]
3-1	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	NR_074622	99	1 438/1 440	[29]
4-1	<i>Sphingopyxis chilensis</i> S37	NR_024631	99	1 398/1 411	[26]
4-2	<i>Sphingopyxis chilensis</i> S37	NR_024631	99	1 397/1 411	[26]
5-1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8	NR_074754	99	1 440/1 453	[30]
6-1	<i>Dyadobacter fermentans</i> DSM 18053	NR_074368	99	1 408/1 429	[31]
6-2	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	NR_074455	99	1 420/1 436	[28]
7-1	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	NR_074455	99	1 420/1 436	[28]
7-2	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	NR_074455	99	1 421/1 436	[28]
7-3	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	NR_074455	99	1 427/1 436	[28]
8-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NR_074828	99	1 453/1 459	[32]
8-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NR_074828	99	1 452/1 458	[32]
9-1	<i>Paenibacillus agaridevorans</i> DSM 1355	NR_025490	98	1 444/1 481	[33]
9-2	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	NR_074646	99	1 456/1 457	Lucas et al., 2013 unpulished
9-3	<i>Sphingopyxis ginsengisoli</i> Gsoil 250	NR_041366	98	1 389/1 411	[34]
9-4	<i>Sphingopyxis chilensis</i> S37	NR_024631	99	1 402/1 411	[26]
10-1	<i>Dyadobacter fermentans</i> DSM 18053	NR_074368	98	1 405/1 429	[31]
10-2	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	NR_074646	99	1 456/1 457	Lucas et al., 2013 unpulished
10-3	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	NR_074646	99	1 455/1 457	Lucas et al., 2013 unpulished
10-4	<i>Sphingopyxis chilensis</i> S37	NR_024631	99	1 405/1 411	[26]
11-1	<i>Flavobacterium xinjiangense</i> AS 1.2749	NR_025201	94	1 347/1 438	[35]
11-2	<i>Novosphingobium resinovorum</i> NCIMB 8767	NR_044045	99	1 372/1 373	[36]
11-3	<i>Xenophilusa-ovorans</i> KF46F	NR_025114	98	1 426/1 455	[37]
11-4	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> AMX 26B	NR_025105	99	1 447/1 467	[38]
11-5	<i>Xenophilusa-ovorans</i> KF46F	NR_025114	98	1 426/1 455	[37]
11-6	<i>Novosphingobium resinovorum</i> NCIMB 8767	NR_044045	99	1 372/1 373	[36]
11-7	<i>Novosphingobium resinovorum</i> NCIMB 8767	NR_044045	99	1 372/1 373	[36]
12-1	<i>Variovorax boronicumulans</i> BAM-48	NR_041588	99	1 453/1 455	[39]
12-2	<i>Variovorax paradoxus</i> EPS	NR_074646	99	1 454/1 457	Lucas et al. 2013 unpublished
12-3	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	NR_074455	99	1 421/1 436	[28]
13-1	<i>Variovorax paradoxus</i> S110	NR_074654	99	1 448/1 457	Lucas et al., 2013 unpublished
13-2	<i>Paenibacillus validus</i> JCM 9077	NR_040892	99	1 454/1 458	[40]
14-1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8	NR_074754	99	1 449/1 453	[30]

注: 表中克隆名前面的数字为土样编号, 后面的数字为克隆序号。

Note: Numbers in the front of clones indicate soil serial number, the following numbers indicate clone serial number in the table.

各占 7 条, *Sphingopyxis* 占 6 条, 红球菌属(*Rhodococcus*) 和新鞘脂菌属(*Novosphingobium*) 各 3 条, 无色菌属(*Achromobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、类芽孢菌属(*Paenibacillus*)、*Xenophilus* 和 *Dyadobacter* 各有 2 条, 假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*) 占 1 条。相似性在 97% 以下一株伴生细菌与 *Flavobacterium* 属亲缘关系最近。

将获得的伴生细菌 16S rRNA 基因序列与相近同源细菌序列构建系统树, 由图 3 可知, 这 37 株

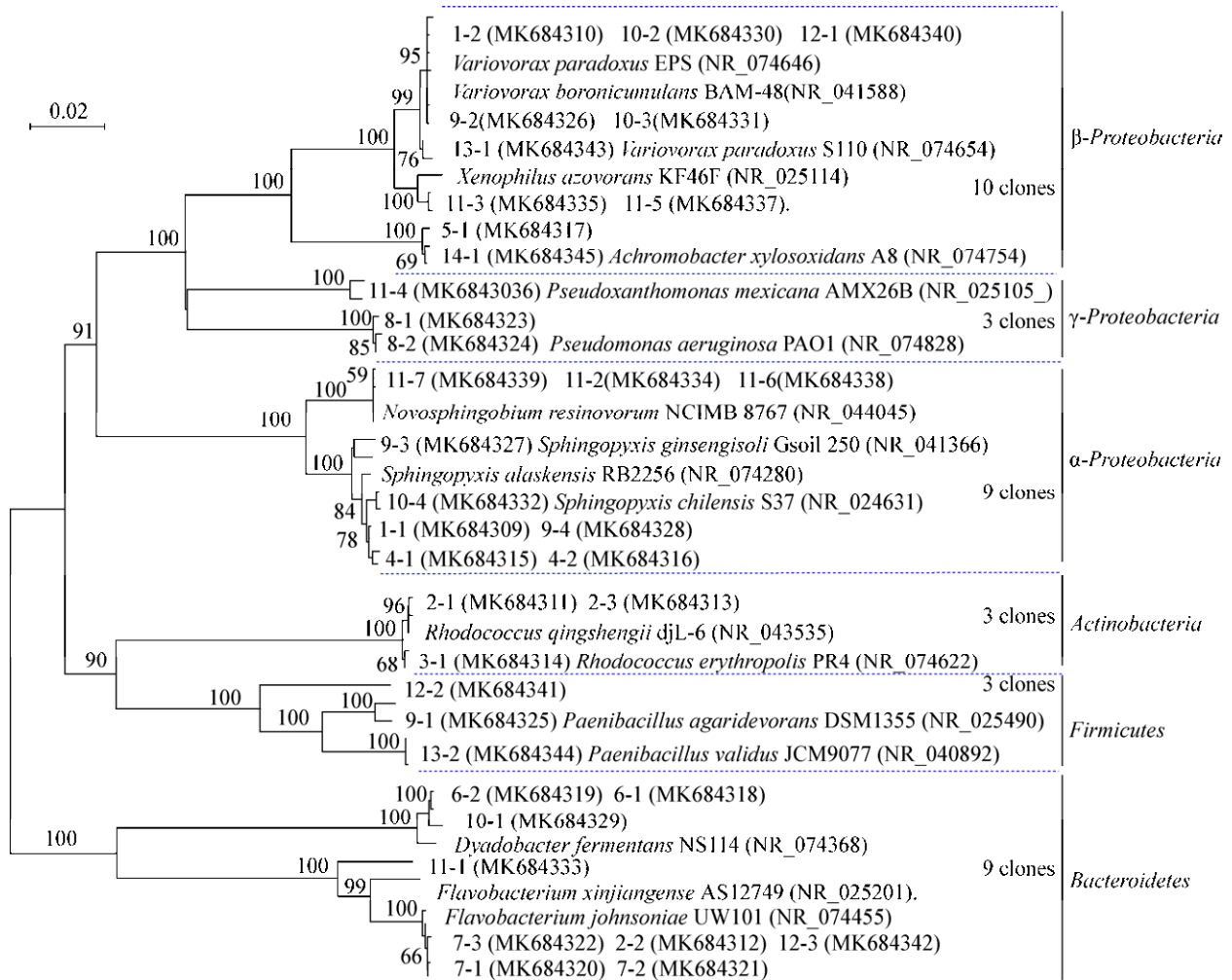


图 3 基于 16S rRNA 基因的不同土样中 *Anabaena* 伴生菌系统进化分析

Figure 3 Phylogenetic tree of *Anabaena* associated bacteria from different soils based on 16S rRNA gene

注: 进化树中分支点上数字代表 Bootstrap 值, Bootstrap 值 < 50 未显示, 括号中的序号代表相应菌株在 NCBI 上的核酸序列登录号; 标尺代表每个核苷酸替代物残基的数量。

Note: The numbers of branching points in phylogenetic tree indicate bootstrap value, bootstrap values < 50 are not shown; Serial number in bracket indicates nucleic acid sequence landing number of corresponding strain in NCBI website; The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per residue.

伴生细菌分布在 4 个门中, 变形菌门(*Proteobacteria*) (22 条) 占总数的 59.5%; 拟杆菌门(*Bacteroidetes*) (9 条) 占总数的 24.3%; 厚壁菌门(*Firmicutes*) (3 条) 和放线菌门(*Actinobacteria*) (3 条) 各占总数的 8.1%。在 *Proteobacteria* 中, *α-Proteobacteria* 占 9 条, *β-Proteobacteria* 占 10 条, *γ-Proteobacteria* 占 3 条。从进化树上可知, 相似性较低的克隆 11-1 形成独立的分支, 初步确定该克隆相对应的菌株为新的菌株, 其余 36 条伴生菌的克隆序列均与相似性最高

的菌株处于同一进化分支。

3 讨论与结论

本研究以 *Anabaena* sp. PCC7120 菌株为材料, 对不同旱田土壤的该蓝细菌伴生菌进行调查, 共得到 37 条不同的 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生细菌, 根据 16S rRNA 基因序列相似性大于 95% 的菌株可鉴定到属水平^[41], 也有研究认为 97% 以上可鉴定到属水平^[42]。核苷酸序列相似性在 98.7%–99%

的菌株间认为是种间水平^[43]。本研究获得的伴生菌中有 1 株不能明确其在属水平上的归属, 其余 36 株伴生细菌可确定至属水平甚至种间水平。从门水平来看, 获得的 *Anabaena* 伴生细菌主要分布在变形菌门(*Proteobacteria*), 其次是拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 放线菌门(*Actinobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)也有分布, 这与湖水中伴生细菌相似。Berg 等^[44]从湖水中分离获得的 460 株异养细菌中, 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化分析发现, 这些异养细菌分布在变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、厚壁菌门和异常球菌-栖热菌类群(*Deinococcus-Thermus*)中, 这些异养细菌有些是潜在的病原菌, 有些抑制或提高蓝细菌的生长, 大部分异养细菌可促进蓝细菌的生长。而本研究从旱田土壤中获得的 *Anabaena* sp. PCC7120 伴生细菌中未发现潜在的病原菌株。

在属水平上, 由构建的系统进化树可见, 不同土壤中 *Anabaena* 伴生细菌的 16S rRNA 基因序列与鞘氨醇盒菌属(*Sphingopyxis*) (6 条)、贪噬菌属(*Variovorax*) (6 条)、黄杆菌属(*Flavobacterium*) (5 条)和红球菌属(*Rhodococcus*) (3 条)的近亲缘性菌株最多。*Sphingopyxis alaskensis* RB2256 菌株在海洋寡营养环境中异养生长^[45], 该菌株也可在土壤环境中生长; *Sphingopyxis chilensis* S37 菌株能降解氯酚^[26]; *Sphingopyxis ginsengisoli* Gsoil 250 菌株分离自人参田^[34], 该菌株分布广泛且能在贫营养环境下降解芳香类化合物。*Sphingopyxis* 和 *Sphingomonas*、*Sphingobium*、*Novosphingium* 是从系统发育、化学分类及表型特征方面分化出的 4 个属。因 *Novosphingium resinovorum* 系统进化地位与 *Sphingopyxis* 相近, 于 2007 年由 *Flavobacterium resinovorum* 修订成 *Novosphingium resinovorum*^[36], 该类菌可降解异类生物物质^[46]。*Variovorax boronicumulans* 是一株分离自土壤可富集硼的细菌^[39], *Variovorax paradoxus* 属于有机营养型兼性无机化能营养型, 可分泌胞外多糖^[4], 与 *Xenophilus azovorans* 在分类学上隶属于丛毛单孢菌科

(*Comamonadaceae*)^[37]。噬细胞菌属/黄杆菌属(*Cytophaga/Flavobacterium*)和 δ 变形菌纲细菌(*δ -Proteobacteria*)与湖泊中微囊藻浓度同步变化, 该类细菌具有降解微囊藻细胞分泌的大分子, 可清除水体的毒素^[9]。红球菌属(*Rhodococcus*)可降解醇类和烷类化合物^[48], 也是贫营养环境中常被检测到的蓝细菌伴生细菌^[11]。本研究分离鉴定的蓝细菌伴生细菌还包含假黄色单胞菌(*Pseudoxanthomonas*)和可降解废水中的苯环类化合物假单胞菌(*Pseudomonas*)^[81]等。蓝细菌菌株的类群也影响着其伴生菌的类群, 同一种蓝细菌的不同菌株其伴生菌的类群更近些^[49], 而本研究调查了 *Anabaena* sp. PCC7120 在不同农田中的伴生细菌, 通过 PCR 克隆测序, 获得的伴生细菌推测其具有分布广、耐受贫营养、提供微量元素、清除蓝细菌毒素等作用, 具体机理有待进一步研究。

分离蓝细菌伴生菌的方法不同也可能造成伴生菌分离菌株的差异, 如使用不同配方的培养基。本研究用的 BG-11 培养基含有 NO_3^- 作为氮源、 Na_2CO_3 为碳源, 主要培养自养细菌, 我们推测生长在 BG-11 培养基上的蓝细菌产生的分泌物可作为伴生细菌的有机碳源, 伴生菌的生长也可提供蓝细菌生长所需的微量元素或消除蓝细菌生长产生的有毒物质。Berg 等^[44]在分离蓝细菌伴生菌时采用了 5 种培养基(Z8、R2A、CYA、TOX 及 BA), 每种培养基针对的角度不同, 可获得更多蓝细菌伴生菌的信息。比如, 培养基配方中磷含量影响到伴生细菌的种类^[11]。此外, 本文采用 PCR 克隆测序的方法获得蓝细菌伴生菌的 16S rRNA 基因全长序列, 获得的一些序列是嵌合体或由于 PCR 扩增引起错配的非细菌源序列, 这些序列已被剔除。采用 PCR-DGGE 图谱主要有两种用途: (1) 利用 GC-357F/517R 引物 PCR 扩增 16S rRNA 基因全长序列的阳性克隆子, PCR 产物经 DGGE 图谱分析, 同一样品多个阳性克隆在 DGGE 图谱中条带位置相同被认为是相同的克隆子, 反之对应的阳性克隆子被认为是不同的克隆子, 将不同的阳性克隆子对

应的菌液进行 16S rRNA 基因测序; (2) 每个土样 DNA 先采用 27F/1492R 引物 PCR 扩增, 以其 PCR 产物为模板, 再用 GC-357F/517R 引物进行巢式 PCR 扩增, 获得的 PCR 产物用于 DGGE 图谱分析, 可以直观地看到不同土样 *Anabaena* 伴生细菌对应的条带数, 同时也为阳性克隆子的测序数量提供参考。文中采用相同蓝细菌菌株在不同土壤中获得伴生细菌, 其种属分布与土壤理化性质没有直接关系, 有待下一步深入探讨。

REFERENCES

- [1] Fuks D, Radić J, Radić T, et al. Relationships between heterotrophic bacteria and cyanobacteria in the northern Adriatic in relation to the mucilage phenomenon[J]. *Science of the Total Environment*, 2005, 353(1/3): 178-188
- [2] Dziallas C, Grossart HP. Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp.[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(6): 1632-1641
- [3] Dziallas C, Grossart HP. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp.[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25569
- [4] Dziallas C, Grossart HP. Microbial interactions with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their dependence on temperature[J]. *Marine Biology*, 2012, 159(11): 2389-2398
- [5] Shen H, Niu Y, Xie P, et al. Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria[J]. *Freshwater Biology*, 2011, 56(6): 1065-1080
- [6] Paerl HW, Huisman J. Climate: blooms like it hot[J]. *Science*, 2008, 320(5872): 57-58
- [7] Salomon PS, Janson S, Granéli E. Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth[J]. *Harmful Algae*, 2003, 2(4): 261-272
- [8] Kirkwood AE, Nalewajko C, Fulthorpe RR. The effects of cyanobacterial exudates on bacterial growth and biodegradation of organic contaminants[J]. *Microbial Ecology*, 2006, 51(1): 4-12
- [9] Maruyama T, Kato K, Yokoyama A, et al. Dynamics of microcystin-degrading bacteria in mucilage of *Microcystis*[J]. *Microbial Ecology*, 2003, 46(2): 279-288
- [10] Reynolds CS. Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment[J]. *Hydrobiologia*, 2007, 578(1): 37-45
- [11] Shen H, Song LR. Comparative studies on physiological responses to phosphorus in two phenotypes of bloom-forming *Microcystis*[J]. *Hydrobiologia*, 2007, 592(1): 475-486
- [12] Kühl M, Glud NG, Ploug H, et al. Microenvironmental control of photosynthesis and photosynthesis-coupled respiration in an epilithic cyanobacterial biofilm[J]. *Journal of Phycology*, 1996, 32(5): 799-812
- [13] Paerl HW, Pinckney JL. A mini-review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling[J]. *Microbial Ecology*, 1996, 31(3): 225-247
- [14] Nicolaus B, Panico A, Lama L, et al. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria[J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(4): 639-647
- [15] Worm J, Sondergaard M. Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (cyanobacteria)[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, 14(1): 19-28
- [16] Surono IS, Collado MC, Salminen S, et al. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(2): 502-507
- [17] Casamatta DA, Wickstrom CE. Sensitivity of two disjunct bacterioplankton communities to exudates from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kützing[J]. *Microbial Ecology*, 2000, 40(1): 64-73
- [18] Armstrong E, Yan LM, Boyd KG, et al. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces[J]. *Hydrobiologia*, 2001, 461(1/3): 37-40
- [19] Middelboe M, Sondergaard M, Letarte Y, et al. Attached and free-living bacteria: production and polymer hydrolysis during a diatom bloom[J]. *Microbial Ecology*, 1995, 29(3): 231-248
- [20] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(12): 5685-5689
- [21] Kolmonen E, Sivonen K, Rapala J, et al. Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2004, 36(3): 201-211
- [22] Rashidan KK, Bird DF. Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom[J]. *Microbial Ecology*, 2001, 41(2): 97-105
- [23] Cao K, Jing RY, Wang GH, et al. Molecular biological research progress in genetic diversity of cyanobacteria[J]. *Soil and Crop*, 2015, 4(4): 183-189 (in Chinese)
曹焜, 荆瑞勇, 王光华, 等. 蓝藻遗传多样性的分子生物学研究进展[J]. *土壤与作物*, 2015, 4(4): 183-189
- [24] Qu WY, Chen L, Wang GY, et al. Symbiosis between ascidian and cyanobacteria[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(2): 458-464 (in Chinese)
曲文颖, 陈雷, 王光玉, 等. 海鞘与蓝藻的共生关系[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(2): 458-464
- [25] Wang Q, Simon P, Liu JY, et al. Identification of algicidal bacterium Sp37[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(12): 2614-2623 (in Chinese)
王琪, Simon P, 刘锦钰, 等. 滇池中溶藻细菌的分离鉴定

- 及其溶藻效应[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2614-2623
- [26] Godoy F, Vancanneyt M, Martínez M, et al. *Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(2): 473-477
- [27] Xu JL, He J, Wang ZC, et al. *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(12): 2754-2757
- [28] McBride MJ, Xie G, Martens EC, et al. Novel features of the polysaccharide-digesting gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* as revealed by genome sequence analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(21): 6864-6875
- [29] Sekine M, Tanikawa S, Omata S, et al. Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(2): 334-346
- [30] Strnad H, Ridl J, Paces J, et al. Complete genome sequence of the haloaromatic acid-degrading bacterium *Achromobacter xylosoxidans* A8[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(3): 791-792
- [31] Lang E, Lapidus A, Chertkov O, et al. Complete genome sequence of *Dyadobacter fermentans* type strain (NS114^T)[J]. Standards in Genomic Sciences, 2009, 1(2): 133-140
- [32] Winsor GL, van Rossum T, Lo R, et al. *Pseudomonas* genome database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(S1): D483-D488
- [33] Uetanabaro AP, Wahrenburg C, Hunger W, et al. *Paenibacillus agarexedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(4): 1051-1057
- [34] Lee M, Ten LN, Lee HW, et al. *Sphingopyxis ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field in South Korea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(10): 2342-2347
- [35] Zhu F, Wang S, Zhou PJ. *Flavobacterium xinjiangense* sp. nov. and *Flavobacterium omnivorum* sp. nov., novel psychrophiles from the China No. 1 glacier[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(3): 853-857
- [36] Lim YW, Moon EY, Chun J. Reclassification of *Flavobacterium resinovorum* Delaporte and Daste 1956 as *Novosphingobium resinovorum* comb. nov., with *Novosphingobium subarcticum* (Nohynek et al. 1996) Takeuchi et al. 2001 as a later heterotypic synonym[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(8): 1906-1908
- [37] Blümel S, Busse HJ, Stolz A, et al. *Xenophilus azovorans* gen. nov., sp. nov., a soil bacterium that is able to degrade azo dyes of the Orange II type[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(5): 1831-1837
- [38] Thierry S, Macarie H, Iizuka T, et al. *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(6): 2245-2255
- [39] Miwa H, Ahmed I, Yoon J, et al. *Variovorax boronicumulans* sp. nov., a boron-accumulating bacterium isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(1): 286-289
- [40] Goto K, Kato Y, Asahara M, et al. Evaluation of the hypervariable region in the 16S rDNA sequence as an index for rapid species identification in the genus *Paenibacillus*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2002, 48(5): 281-285
- [41] Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation)[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(9): 4134-4140
- [42] Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(10): 3623-3630
- [43] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards[J]. Microbiology Today, 2006, 33: 152-155
- [44] Berg KA, Lyra C, Sivonen K, et al. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms[J]. The ISME Journal, 2009, 3(3): 314-325
- [45] Vancanneyt M, Schut F, Snauwaert C, et al. *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(1): 73-79
- [46] Basta T, Buerger S, Stolz A. Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics[J]. Microbiology, 2005, 151(6): 2025-2037
- [47] Willems A, de Ley J, Gillis M. et al. *Comamonadaceae*, a new family encompassing the acidovorans rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1991, 41(3): 445-450
- [48] de Carvalho CCCR, Marques MPC, Fernandes P, et al. Degradation of hydrocarbons and alcohols by *Rhodococcus erythropolis* DCL14: a comparison in scale performance[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2007, 25(2/4): 144-150
- [49] Shi LM, Cai YF, Yang HL, et al. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with *Microcystis aeruginosa* and other cyanobacteria[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(11): 1581-1590