

一株可增强莱茵衣藻耐盐能力细菌 MEZX29 的分离与鉴定

周璇[#], 靳元霏[#], 赵娜, 伍刚, 张征锋, 谢波^{*}

华中师范大学生命科学学院 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430079

周璇, 靳元霏, 赵娜, 伍刚, 张征锋, 谢波. 一株可增强莱茵衣藻耐盐能力细菌 MEZX29 的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4538-4548

Zhou Xuan, Jin Yuanpei, Zhao Na, Wu Gang, Zhang Zhengfeng, Xie Bo. Isolation and identification of bacterial strain MEZX29 that can enhance the salt tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4538-4548

摘要:【背景】水体中的藻类、细菌及这些微生物之间的相互作用对水体生态系统的功能有着重要作用。近年来, 一些河流、湖泊等淡水资源的盐渍化不断加重, 对水体生态系统造成严重影响。然而, 高盐胁迫条件如何影响藻类与其他细菌的相互作用, 以及是否存在能够促进藻类耐盐能力的有益细菌等问题尚未得到深入研究。【目的】分离和鉴定可以促进淡水藻类莱茵衣藻抗盐能力的细菌, 并开展相关机制分析。【方法】通过富集培养、筛选和共接种实验, 获得可以促进衣藻耐盐的细菌; 基于活细胞浓度、叶绿素含量等参数评价衣藻在不同条件下的生长能力; 对菌株进行 16S rRNA 基因序列分析和基因组分析, 预测其可能的菌藻相互作用机制。【结果】获得一株在 250–290 mmol/L NaCl 条件下可以显著增强衣藻耐盐能力的菌株 MEZX29, 16S rRNA 基因序列分析表明, 该菌可能属于 *Rhodococcus qingshengii*; 基因组分析结果表明, 该细菌含有参与糖代谢、乙烯合成、生物膜形成等途径的基因, 这些基因可能在促进衣藻抗盐过程中起到重要作用。【结论】*Rhodococcus qingshengii* MEZX29 可以增强莱茵衣藻 21gr 抵抗高盐胁迫的能力, 为研究藻类与其他微生物之间的有益相互作用提供了新的材料。

关键词: 菌-藻互作; 盐胁迫; 共培养; 红球菌; 基因组分析

基金项目: 国家自然科学基金(31970109, 31570098)

[#]对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31970109, 31570098)

[#]These authors equally contributed to this work

***Corresponding author:** E-mail: xiebo@cnu.edu.cn

Received: 2022-03-24; **Accepted:** 2022-05-31; **Published online:** 2022-07-18

Isolation and identification of bacterial strain MEZX29 that can enhance the salt tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii*

ZHOU Xuan[#], JIN Yuanpei[#], ZHAO Na, WU Gang, ZHANG Zhengfeng, XIE Bo^{*}

Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, School of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China

Abstract: [Background] Algae, bacteria and their interspecies interactions play important roles in aquatic ecosystem. In recent years, salinization of some rivers, lakes and other freshwater resources has become more serious, which greatly impacts the aquatic ecosystem. However, how salt stress influences the algae-bacteria interaction and whether certain bacteria can enhance algal salt tolerance remain unclear. [Objective] To isolate and identify the bacteria that can promote the salt tolerance of freshwater alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, and analyze the relevant mechanism. [Methods] Effective bacteria were screened through enrichment culture, isolation and co-culture experiments. The algal growth ability under different conditions was assessed based on cell concentration, chlorophyll content and other parameters. In addition, 16S rRNA gene sequence analysis and genome sequence analysis were carried out to predict the possible mechanism of algae-bacteria interaction. [Results] A bacterial strain, MEZX29, was isolated, which could significantly enhance the salt tolerance of *C. reinhardtii* under the condition of 250–290 mmol/L NaCl. The 16S rRNA gene sequence analysis indicated that MEZX29 might belong to *Rhodococcus qingshengii*. The genome sequence analysis showed that MEZX29 contained the genes involved in glucose metabolism, ethylene metabolism, and biofilm formation, which might play roles in this salt tolerance enhancement. [Conclusion] *R. qingshengii* strain MEZX29 could enhance the salt tolerance of *C. reinhardtii*, which provided a new material for studying the beneficial interaction between algae and microorganisms.

Keywords: bacteria-algae interaction; salt stress; co-culture; *Rhodococcus*; genome analysis

湖泊、河流等淡水资源是自然环境的重要组成部分,对人类生存、生态健康和环境保护具有重要的作用。然而,由于气候变化、地质活动与人类干扰等内在和外在的因素,近年来淡水系统的盐渍化在世界范围内普遍发生,对水体的生态健康造成了不容忽视的影响^[1]。水体中存在着种类繁多、数量巨大的微生物,其中,藻类在水体初级生产力、能量流动与元素生物地理化学循环方面都发挥着至关重要的作用^[2]。与海洋藻类不同,淡水藻类在高盐胁迫条件下会表现出生长迟缓甚至死亡、细胞形态

失常、细胞间聚集性增加、光合能力下降和代谢紊乱等特征;另一方面,藻类也具有合成渗透调节分子、改变细胞膜通透性等能力来适应一定的盐胁迫逆境^[3-4]。

高盐胁迫在作用于藻类自身的同时,也可能会影响藻类与其他微生物之间的种间关系。藻类可凭借光合产物在其藻际环境(phycosphere)中影响细菌种群结构和功能,而这些细菌也可以促进或抑制藻类生长^[5]。因此,藻类与细菌之间的相互作用会对双方产生重要影响,在水体生态功能中有着重要作用^[6-8]。近年来的研究

也表明,环境因子可以显著影响藻类与细菌之间的种间关系,而一些细菌在种间相互作用中可帮助藻类抵抗逆境条件的胁迫。例如,高温条件可以促进细菌 *Ruegeria* sp. R11 对赫氏颗石藻 (*Emiliania huxleyi*) 的抑制作用,而产维生素 B₁₂ 的细菌(如一些根瘤菌类细菌)却可增强莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, 简称衣藻) 的耐热能力^[9-10]。近期有报道发现,巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 可以增强索罗金小球藻 (*Chlorella sorokinian*) 的抗高盐胁迫能力,并认为细菌产生的核黄素和光色素具有一定的促进效果^[11];细菌 *Aminobacter* sp. Y9 被发现可以促进集胞藻 PCC6803 的抗重金属能力^[12]。此外,在微生物群体水平上也存在着特异的环境依赖型种间互作网络^[13],反映出微生物种间互作与环境因子之间的复杂关系^[13]。然而,目前对能够促进藻类抵抗盐胁迫的微生物资源、相互作用形式和机理的了解依然非常有限。

衣藻是一种生活在土壤、淡水等环境的单细胞真核绿藻,具有生活周期短、易于培养、遗传背景清晰等优点。作为一种模式藻类,衣藻被广泛应用于光合作用、鞭毛结构、二氧化碳固定机制和藻类生物技术等研究领域^[14],而近年来也多应用于藻类-细菌相互作用的机制研究中^[15-16]。本研究以衣藻为目标藻类,以期通过富集培养与筛选获得一株可显著增强衣藻抗盐能力的细菌,并开展鉴定与功能研究,为藻类与微生物有益相互作用提供了新的材料。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型莱茵衣藻 21gr 来源于美国衣藻资源中心 (<http://chlamycollection.org>),细菌富集培养所用的水样采集于武汉市南湖,分离的细菌保存于本实验室。

1.1.1 培养基

研究采用 2 种不同的常规培养基 R2A^[17] 或 1/2 TY^[18] 对细菌进行培养;采用 TAP^[19] 或 MM 培养基^[20] 对衣藻进行培养。在研究不同盐浓度情况下的衣藻生长能力时,分别在 MM 培养基中添加终浓度为 0、250、270、290、300 和 310 mmol/L 的 NaCl。

1.1.2 主要试剂和仪器

PCR 所用引物(27F/1492R)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。荧光酶标仪, Bio-Tek 公司;分光光度仪,北京普析通用仪器有限责任公司;PCR 仪, Bio-Rad 公司;高速连续激发式荧光仪, Hansatech 公司。

1.2 微生物的富集、分离与筛选

在含高盐浓度(250 mmol/L NaCl)的藻类基本培养基 MM 中接种莱茵衣藻 21gr,并添加 1% 的水样进行富集培养。培养室光照强度为 120 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 25 °C。经 5 轮富集培养(每轮 5-7 d)后,将样品稀释涂布于 1/2 TY 或 R2A 固体培养基上培养 5 d。再将长出的菌落通过划线法获得纯培养。纯化后的菌株与衣藻先在 MM 培养基中共接种培养 3 d(初始浓度约为 2×10^4 CFU/mL,藻菌比约为 1:1),再转接到含不同盐浓度培养基中培养,观察衣藻生长和叶绿素变化情况,筛选对衣藻抗盐能力有增强效果的菌株。

1.3 16S rRNA 基因测序分析

使用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F 和 1492R 对细菌进行菌落 PCR^[21],扩增产物纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。16S rRNA 基因序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 同源性分析,使用 ClustalX 1.83 软件和 MEGA 11 软件采取近邻接法(neighbor-joining method)分别进行序列的多重比较和系统发育树的构建。

1.4 叶绿素含量和荧光参数 F_v/F_m 测定

取 800 μL 藻类培养液于 5 mL 离心管内, 室温 12 000 r/min 离心 5 min 后去除上清, 加入 4 mL 95%乙醇并振荡摇匀, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置 3 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液测定其吸光值, 根据公式计算叶绿素含量^[22]。采用高速连续激发式荧光仪测定莱茵衣藻细胞光系统 II 的最大光化学效率 F_v/F_m 作为叶绿素荧光参数^[23]。多组别差异显著性检验采用 Duncan's 新复极差法 ($P < 0.05$)。

1.5 细菌全基因组测序与分析

细菌基因组的二代测序交由广州锐博公司执行, 主要步骤为: 提取基因组 DNA 并制备二代测序文库, 利用 Paired-End 方法进行高通量测序, 序列经质控后进行基因组组装, 序列分析采用 Prokka 软件注释并进行 KEGG 和 GO 等功能分析, 糖代谢基因(CAZyme)采用 dbCAN2 平台^[24]进行预测。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

取富集培养样品进行稀释涂布培养后, 观察长出菌落的形态、大小、色泽和生长速度等特点, 将不同的菌落通过划线法获得纯培养。然后把分离纯化的每个菌株分别与莱茵衣藻 (21gr) 在 MM 固体培养基上共接种培养, 之后转接到含高盐固体培养基, 培养后挑选出能够显著提高衣藻生存能力的细菌。通过在高盐条件下 (275 mmol/L NaCl) 衣藻叶绿素含量的比较, 筛选出 10 余株对衣藻耐盐能力有一定促进作用的菌株, 其中效果最好的菌株为 MEZX29 (图 1)。通过不同盐浓度的实验, 发现该菌株在 250–290 mmol/L NaCl 的条件下能够显著提高衣藻的生存能力 (图 2), 后期以该菌株为材料开展菌种鉴定、生物学功能等研究。

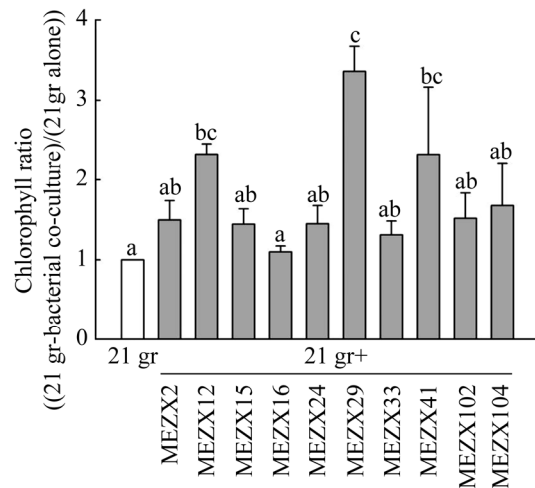


图 1 高盐条件下不同分离菌株对衣藻耐盐能力促进的效果 纵坐标表示衣藻共培养与单独培养的叶绿素含量比值。不同小写字母表示差异显著 (Duncan's 新复极差法, $P < 0.05$)

Figure 1 Salt-tolerance enhancement of *C. reinhardtii* by different isolated strains at high salt condition. The Y-axis represents the chlorophyll content ratio of *C. reinhardtii* co-culture vs *C. reinhardtii* alone. Different lowercase letters indicate significant differences according to Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

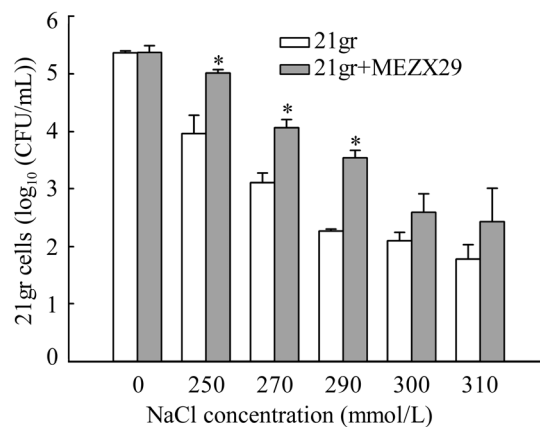


图 2 菌株 MEZX29 在不同盐浓度条件下对衣藻生长能力的影响

Figure 2 Effect of strain MEZX29 on the growth ability of *C. reinhardtii* under different salt concentrations conditions. *: $P < 0.05$.

2.2 菌株 MEZX29 对衣藻抗盐能力的促进

如图 3 所示, 在 275 mmol/L NaCl 的高盐胁迫条件下处理 3 d, 衣藻 21gr 纯培养物出现明显的叶绿素降低现象, 而 21gr 与菌株 MEZX29 的共培养物生长良好。 Fv/Fm 参数测定结果表明在高盐胁迫条件下衣藻的光合效率显著下降, 而菌株 MEZX29 的共接种能够显著提高该参数(图 4)。对培养物进行活细胞测定可以发现, 衣藻单独培养时, 活细胞浓度在 275 mmol/L

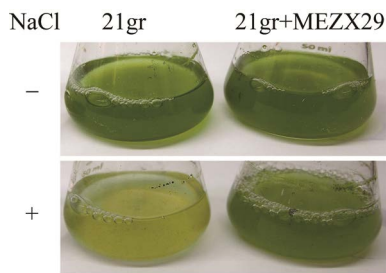


图 3 菌株 MEZX29 与衣藻 21gr 共接种结果 -: MM 培养基; +: 含高盐浓度(275 mmol/L NaCl)的 MM 培养基

Figure 3 Growth of *C. reinhardtii* with or without bacterium MEZX29. -: MM medium; +: 275 mmol/L NaCl in MM medium.

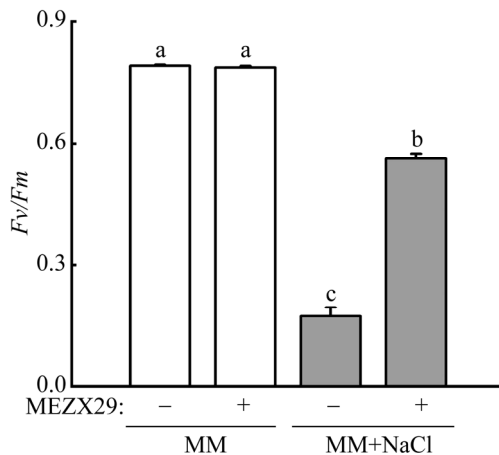


图 4 培养物的荧光参数 Fv/Fm 测定 不同小写字母表示差异显著(Duncan's 新复极差法, $P < 0.05$)

Figure 4 Fv/Fm values of the cultures. Different letters indicate significant differences according to Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

的 NaCl 条件处理 1 d 后即出现显著的下降; 而在与 MEZX29 共接种体系中, 衣藻活细胞浓度有显著提升; 在正常的 MM 培养基中, MEZX29 对衣藻的生长无显著影响(图 4 和图 5A)。此外还发现, 菌株 MEZX29 在单独、共培养体系中的活细胞浓度均不受盐浓度的显著影响, 并且共培养体系中的细菌浓度高于单独培养约 0.5 个数量级(图 5B)。这些结果意味着 MEZX29 可以与衣藻形成互惠的共生抗逆体系, 并且可以显著提高衣藻的抗盐能力。

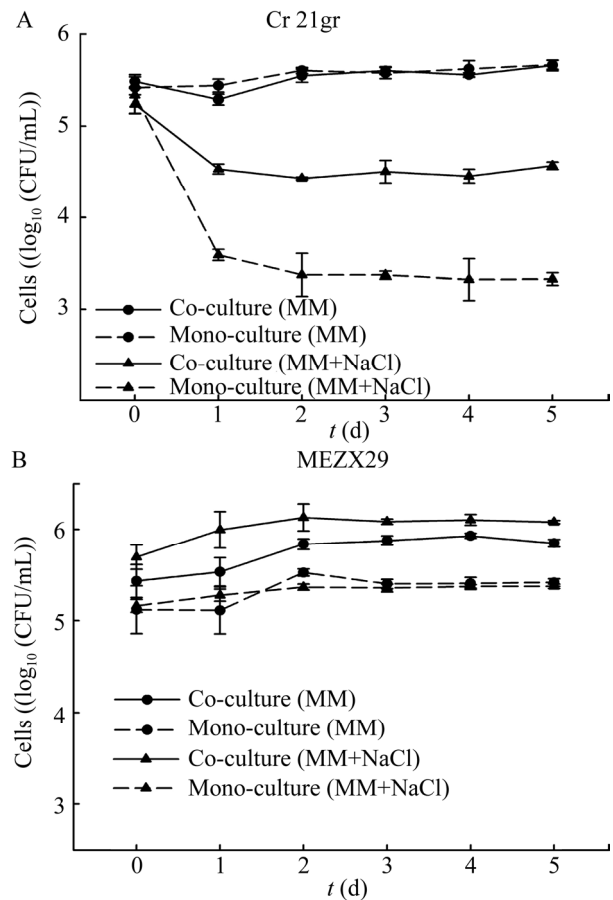


图 5 衣藻 21gr (A)与菌株 MEZX29 (B)在不同条件下的生长情况 天数为高盐条件(275 mmol/L NaCl)处理的时间

Figure 5 Growth of *C. reinhardtii* 21gr (A) and strain MEZX29 (B) under different conditions. The number of days represent the treatment time of high salt condition (275 mmol/L NaCl).

2.3 菌株 16S rRNA 基因序列的分析

将菌株 MEZX29 的 16S rRNA 基因序列 (GenBank 登录号为 ON597378) 在 NCBI 进行 BLAST 分析, 并进行系统发育树的构建。如图 6 所示, MEZX29 与 *Rhodococcus qingshengii* djl-6 和 *Rhodococcus qingshengii* djl-6-2 的种属关系最接近, 16S rRNA 基因序列的相似性均达到 99.72%。这一结果意味着 MEZX29 和上述 2 个菌株可能同样属于 *R. qingshengii*。

2.4 菌株基因组分析

为更好地理解菌株 MEZX29 如何增强衣藻耐盐能力的机制, 本研究通过二代测序方法测定了该菌株的基因组, 并对基因组序列进行了初步分析。测序结果最终获得 67 个 contigs, 基因组长度共 6 788 486 bp, 包含了 6 549 个编码序列 (GenBank 登录号为 JAKEDO000000000.1)。KEGG 分析表明, 菌株含有丰富的负责碳代谢、氨基酸代谢、维生素代谢、转运蛋白、信号转导等基因 (图 7)。

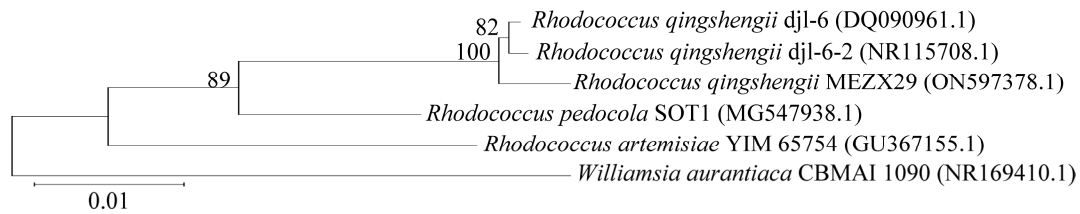


图 6 细菌 MEZX29 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 分支处数值表示 bootstrap 值 (大于 50%); 0.01 标尺为遗传差异度; GenBank 登录号显示在括号中

Figure 6 Phylogenetic tree of MEZX29 based on 16S rRNA gene sequence. Bootstrap values (>50%) are shown at branch points; Bar: 0.01 genetic variation; GenBank accession numbers are shown in parentheses.

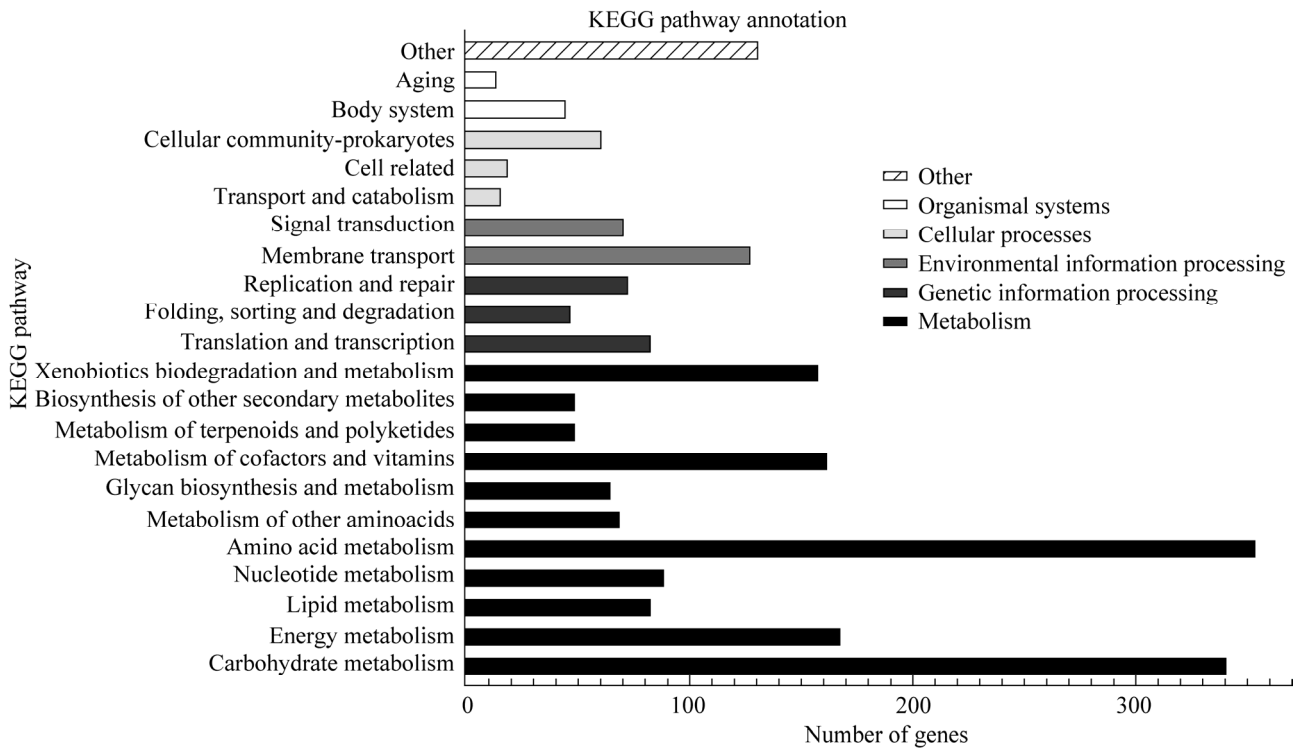


图 7 MEZX29 基因组的 KEGG 代谢通路分类预测

Figure 7 KEGG pathway classification for the MEZX29 genome.

在与藻类相互作用时,细菌的糖类代谢基因对利用藻类的碳水化合物具有重要作用^[25]。本研究将 MEZX29 的基因组在 dbCAN2 平台上进行糖代谢基因分析。结果显示,与糖代谢有关的基因共有约 89 个,包括 37 个糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)类基因、28–31 个糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)类基因、21 个碳水化合物酯酶(carbohydrate esterase, CE)类基因、3 个碳水化合物结合结构域(carbohydrate binding domain, CBM)类基因(图 8)。前人研究表明,在海洋拟杆菌与藻类多糖互作关系研究中, GH13、GH2 和 GH43 等糖苷水解酶可以帮助细菌降解藻类胞外多糖^[26],厚壁菌门的一些细菌可以利用 GH1 等酶类降解多糖^[27]。本研究发现, MEZX29 基因组中同样含有多种 GH 亚类基因(表 1),意味着它们在 MEZX29 与衣藻相互作用中可能也具有重要的作用。

结合其他微生物促进耐盐能力的研究进展^[28],进一步对 MEZX29 的基因组进行分析,结果发现有多种其他基因可能与促进衣藻耐盐有关,主要包括抑制乙烯生成、渗透压调节、生物膜的形成及调控等类别(表 2)。在这些基因中,氨基环丙烷羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氨酶基因,可以分解乙烯生成的重要前体 ACC,减少乙烯的生成^[29]; Na⁺/H⁺逆向转运蛋白可以参与调节细胞渗透压

促进 MEZX29 自身的耐盐能力;胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)、脱氧核糖核酸外切酶 III 以及信号分子环二鸟苷酸(c-di-GMP)可能参与菌-藻生物膜形成及调控,从而提高生物抗逆性^[30-31]。上述这些基因可能在 MEZX29 促进衣藻耐盐能力过程中起到有益作用。

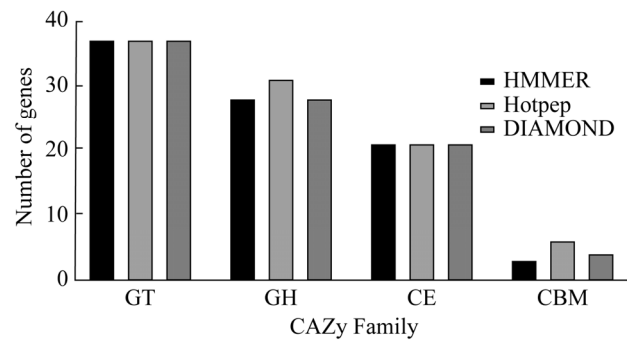


图 8 MEZX29 基因组的糖类代谢基因预测分析 GT: 糖基转移酶; GH: 糖苷水解酶; CE: 碳水化合物酯酶; CBM: 碳水化合物结合结构域蛋白。HMMER、Hotpep 和 DIAMOND 分别代表不同预测方法

Figure 8 CAZyme predictions of MEZX29 genome. GT: Glycosyltransferase; GH: Glycoside hydrolase; CE: Carbohydrate esterase; CBM: Carbohydrate binding domain. CAZyme predictions were carried out by HMMER, Hotpep and DIAMOND methods.

表 1 MEZX29 基因组 GH 类基因预测分析

Table 1 Prediction of glycoside hydrolase (GH) genes in MEZX29 genome

预测方法	GH 类基因数量	GH 类基因种类
Predictions methods	Number of glycoside hydrolase genes	Glycoside hydrolase gene types
HMMER	28	GH1, GH13, GH15, GH2, GH23, GH25, GH3, GH43, GH5, GH57, GH63, GH71, GH76
Hotpep	31	GH1, GH13, GH15, GH2, GH23, GH25, GH3, GH43, GH0, GH57, GH63, GH71, GH76, GH77
DIAMOND	28	GH1, GH13, GH15, GH2, GH23, GH25, GH3, GH43, GH0, GH57, GH63, GH71, GH76

表 2 MEZX29 促进莱茵衣藻 21gr 耐盐能力的基因预测

Table 2 Prediction of MEZX29 genes involved in salt-tolerance enhancement of *C. reinhardtii*

机制分类	基因功能	基因编号
Classification of gene mechanisms	Gene functions	Gene ID
抑制乙烯代谢	ACC 脱氨酶活性	HAILKHCD_06001
Ethylene metabolism inhibition	ACC deaminase activity	
渗透压调节	Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运	HAILKHCD_00638, HAILKHCD_05900
Osmotic pressure regulation	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	
生物膜的形成及调控	脱氧核糖核酸外切酶 III 活性	HAILKHCD_02924, HAILKHCD_05641
Formation and regulation of biofilm	Exodeoxyribonuclease III activity	
	EPS 生物合成	HAILKHCD_00890, HAILKHCD_04047, HAILKHCD_04058
	EPS biosynthetic process	
	二鸟苷酸环化酶活性	HAILKHCD_00158, HAILKHCD_00601, HAILKHCD_00802, HAILKHCD_01070, HAILKHCD_01234, HAILKHCD_01295, HAILKHCD_03498, HAILKHCD_03499, HAILKHCD_03569, HAILKHCD_04186, HAILKHCD_04297, HAILKHCD_04993, HAILKHCD_05614, HAILKHCD_05955
	Diguanosine cyclase activity	

3 讨论与结论

本研究通过菌株分离、筛选和鉴定, 获得了一株可显著增强衣藻耐盐能力的细菌 *Rhodococcus qingshengii* MEZX29, 该菌株不仅加深了对生物抵抗高盐胁迫的认识, 也进一步丰富了藻类有益微生物的资源。研究表明, 红球菌属(*Rhodococcus*)细菌在自然界广泛存在, 多个分离菌株表现出耐盐和重金属、分解和代谢环境污染物等(如原油、多氯联苯、抗菌剂等)能力^[32-36]。*R. qingshengii* 细菌普遍存在于植物根际或叶面, 有多种分离菌株已经被证明可以与植物形成有益的相互作用。例如, *R. qingshengii* S10107 可促进鹰嘴豆的生长与共生固氮能力^[37]; *R. qingshengii* BNCC203056 可以促进超富集植物对重金属离子的吸收^[38]; *R. qingshengii* RL1 菌株可以协助植物抗逆^[33]。在本研究中, MEZX29 可以显著促进衣藻的耐盐

能力, 进一步拓展了对 *R. qingshengii* 在微生物有益相互作用中的认识及其潜在的应用范围。

MEZX29 基因组的分析为研究该菌株促进衣藻耐盐能力的机制提供了丰富的信息。多种糖类代谢基因(如 GH 等类基因)已被证明参与细菌分解藻类的碳水化合物^[26-27]。有研究表明, 在高盐或重金属等不利条件的胁迫下, 藻类会分泌和渗出更多的藻类多糖, 这种分泌可能是一种主动抵抗外界胁迫的途径^[39]。然而高盐环境下共培养时, MEZX29 在基本培养基中的生长能得到一定的促进, 暗示了该细菌可能利用了 21gr 分泌的糖类物质(图 5B)。在此情况下, 有益细菌可以凭借关键的糖类代谢基因利用藻类多糖与藻建立物质交换, 并通过分泌物质或其他机制帮助藻类抵御外界胁迫^[24]。因此, MEZX29 基因组中的 GH 类等糖类代谢基因, 可能是 MEZX29 促进 21gr 耐盐胁迫的重要原因之一。

此外, 本研究发现 MEZX29 基因组中存在多种参与乙烯合成、生物膜形成等途径的基因, 可能在促进衣藻抵抗高盐胁迫中发挥重要作用。乙烯对植物生长发育和抗逆具有重要作用, 有研究表明, 可以合成乙烯前体 ACC 脱氢酶的细菌能减少植物内源性乙烯含量, 调节植物生长^[40]。因此, 推测 MEZX29 基因组中的 ACC 脱氢酶相关基因也可能通过乙烯代谢相关途径的调控来促进衣藻耐盐。此外, 多个与生物膜形成有关基因的发现, 有可能在菌藻互作的群体结构形成、缓解衣藻细胞周围的盐胁迫和提升整体抗逆能力中具有重要作用^[31,41]。上述的基因组分析为以后的具体分子机制研究提供了有价值的靶点。

藻类是水体 CO₂ 固定、初级生产力的主要贡献者, 同时也是发展生物质能源技术的重要材料, 有望在实现“双碳”目标中发挥重要作用。如何提高藻类的生产能力和抗逆能力是藻类生物技术的主要难点, 而挖掘藻类有益细菌资源、探讨菌藻关系的机理对理解微生物的生态功能、促进藻类和微生物生物技术的发展都具有重要意义。综上所述, 本研究获得的可促进衣藻抗盐能力的细菌 *R. qingshengii* MEZX29 不仅拓展了 *Rhodococcus* 属细菌的应用范围, 也为藻类与微生物有益相互作用提供了新的材料。

REFERENCES

- [1] Berger E, Frör O, Schäfer RB. Salinity impacts on river ecosystem processes: a critical mini-review[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2019, 374(1764): 20180010
- [2] Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components[J]. Science, 1998, 281(5374): 237-240
- [3] Shetty P, Gitau MM, Maróti G. Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae[J]. Cells, 2019, 8(12): 1657
- [4] Liang YJ, Zhang MY, Wang M, Zhang W, Qiao CC, Luo Q, Lu XF. Freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 adapts to an environment with salt stress via ion-induced enzymatic balance of compatible solutes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(7): e02904-19
- [5] Bell W, Mitchell R. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products[J]. The Biological Bulletin, 1972, 143(2): 265-277
- [6] Amin SA, Parker MS, Armbrust EV. Interactions between diatoms and bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2012, 76(3): 667-684
- [7] Seymour JR, Amin SA, Raina JB, Stocker R. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships[J]. Nature Microbiology, 2017, 2(7): 17065
- [8] 周进, 陈国福, 朱小山, 陈璐, 蔡中华. 赤潮过程中“藻-菌”关系研究进展[J]. 生态学报, 2014, 34(2): 269-281
Zhou J, Chen GF, Zhu XS, Chen L, Cai ZH. A review of the relationship between algae and bacteria in harmful algal blooms[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(2): 269-281 (in Chinese)
- [9] Mayers TJ, Bramucci AR, Yakimovich KM, Case RJ. A bacterial pathogen displaying temperature-enhanced virulence of the microalga *Emiliania huxleyi*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 892
- [10] 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[J]. The ISME Journal, 2013, 7(8): 1544-1555
- [11] Palacios OA, López BR, Palacios-Espinosa A, Hernández-Sandoval FE, de-Bashan LE. The immediate effect of riboflavin and lumichrome on the mitigation of saline stress in the microalga *Chlorella sorokiniana* by the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*[J]. Algal Research, 2021, 58: 102424
- [12] 石遵计, 曹政, 胡科鑫, 彭鑫碧, 朱一帆, 谢波. 镉离子污染条件下微生物群落中细菌与藻类的相互作用[J]. 微生物学报, 2019, 59(6): 1156-1163
Shi ZJ, Cao Z, Hu KX, Peng XB, Zhu YF, Xie B. Interactions between bacteria and phytoplankton in microbial communities under cadmium contamination conditions[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(6): 1156-1163 (in Chinese)

- [13] Wu G, Ge LX, Zhao N, Liu F, Shi ZJ, Zheng NN, Zhou D, Jiang XP, Halverson L, Xie B. Environment dependent microbial co-occurrences across a cyanobacterial bloom in a freshwater lake[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(1): 327-339
- [14] Salomé PA, Merchant SS. A series of fortunate events: introducing *Chlamydomonas* as a reference organism[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(8): 1682-1707
- [15] Krespach MKC, García-Altres M, Flak M, Schoeler H, Scherlach K, Netzker T, Schmalzl A, Mattern DJ, Schroeckh V, Komor A, et al. Lichen-like association of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans* protects algal cells from bacteria[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(11): 2794-2805
- [16] 周璇, 李军英, 伍刚, 周丹, 谢波. 维生素 B₁₂ 在细菌与真核藻类相互作用中的功能研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(5): 913-919
- Zhou X, Li JY, Wu G, Zhou D, Xie B. The roles of vitamin B₁₂ in the interaction between bacteria and eukaryotic algae[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(5): 913-919 (in Chinese)
- [17] Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(1): 1-7
- [18] Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1974, 84(1): 188-198
- [19] Gorman DS, Levine RP. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *PNAS*, 1965, 54(6): 1665-1669
- [20] Geraghty AM, Anderson JC, Spalding MH. A 36 kilodalton limiting-CO₂ induced polypeptide of *Chlamydomonas* is distinct from the 37 kilodalton periplasmic carbonic anhydrase[J]. *Plant Physiology*, 1990, 93(1): 116-121
- [21] Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2461-2470
- [22] Minocha R, Martinez G, Lyons B, Long S. Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species[J]. *Canadian Journal of Forest Research*, 2009, 39(4): 849-861
- [23] Butler WL, Kitajima M. Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, 376(1): 116-125
- [24] Zhang H, Yohe T, Huang L, Entwistle S, Wu PZ, Yang ZL, Busk PK, Xu Y, Yin YB. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W95-W101
- [25] Mühlenbruch M, Grossart HP, Eigemann F, Voss M. Mini-review: phytoplankton-derived polysaccharides in the marine environment and their interactions with heterotrophic bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(8): 2671-2685
- [26] Krüger K, Chafee M, Ben Francis T, Glavina del Rio T, Becher D, Schweder T, Amann RI, Teeling H. In marine Bacteroidetes the bulk of glycan degradation during algae blooms is mediated by few clades using a restricted set of genes[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(11): 2800-2816
- [27] Sichert A, Cordero OX. Polysaccharide-bacteria interactions from the lens of evolutionary ecology[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 705082
- [28] Etesami H, Beattie GA. Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 148
- [29] Liu HW, Khan MY, Carvalhais LC, Delgado-Baquerizo M, Yan LJ, Crawford M, Dennis PG, Singh B, Schenk PM. Soil amendments with ethylene precursor alleviate negative impacts of salinity on soil microbial properties and productivity[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 6892
- [30] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633
- [31] Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels[J]. *PNAS*, 2005, 102(40): 14422-14427
- [32] Bhat MA, Kumar V, Bhat MA, Wani IA, Dar FL, Farooq I, Bhatti F, Koser R, Rahman S, Jan AT. Mechanistic insights of the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with plant roots toward enhancing plant productivity by alleviating salinity stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1952
- [33] Kuhl T, Chowdhury SP, Uhl J, Rothballer M. Genome-based characterization of plant-associated *Rhodococcus qingshengii* RL1 reveals stress tolerance and plant-microbe interaction traits[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 708605
- [34] Lincoln SA, Hamilton TL, Valladares Juárez AG, Schedler M, Macalady JL, Müller R, Freeman KH. Draft

- genome sequence of the piezotolerant and crude oil-degrading bacterium *Rhodococcus qingshengii* strain TUHH-12[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(2): e00268-e00215
- [35] Pham TTM, Pino Rodriguez NJ, Hijri M, Sylvestre M. Optimizing polychlorinated biphenyl degradation by flavonoid-induced cells of the rhizobacterium *Rhodococcus erythropolis* U23A[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126033
- [36] Xu JL, He J, Wang ZC, Wang K, Li WJ, Tang SK, Li SP. *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(Pt 12): 2754-2757
- [37] JOSHI D, CHANDRA R, SUYAL DC, KUMAR S, GOEL R. Impacts of bioinoculants *Pseudomonas jessenii* MP1 and *Rhodococcus qingshengii* S10107 on chickpea (*Cicer arietinum* L.) yield and soil nitrogen status[J]. *Pedosphere*, 2019, 29(3): 388-399
- [38] Wang Y, Li ZH, Wu JJ, Liu HJ, Sun XH, Liu LJ, Du ST. Abscisic acid-catabolizing bacteria: a useful tool for enhancing phytoremediation[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 812: 151474
- [39] Maršálek B, Rojíčková R. Stress factors enhancing production of algal exudates: a potential self-protective mechanism?[J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 1996, 51(9/10): 646-650
- [40] Sapre S, Gontia-Mishra I, Tiwari S. ACC Deaminase-producing bacteria: a key player in alleviating abiotic stresses in plants[J]. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*, 2019: 267-291
- [41] Upadhyay SK, Singh JS, Singh DP. Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition[J]. *Pedosphere*, 2011, 21(2): 214-222