

崔玉栋, 刘鸿环, 陈锦雪. 一株可降解磷酸酯东海原甲藻共生细菌的分离及其促藻效应[J]. 海洋学报, 2024, 46(9): 38–51, doi:10.12284/hyxb2024090

Cui Yudong, Liu Honghuan, Chen Jinxue. Isolation of a phosphonate-degrading symbiotic bacterium from *Prorocentrum donghaiense* and its promoting effect on algal growth[J]. Haiyang Xuebao, 2024, 46(9): 38–51, doi:10.12284/hyxb2024090

一株可降解磷酸酯东海原甲藻共生细菌的分离及其促藻效应

崔玉栋¹, 刘鸿环¹, 陈锦雪¹

(1. 泉州师范学院海洋与食品学院 福建省海洋藻类活性物质制备与功能开发重点实验室, 福建 泉州 362000)

摘要: 海洋中的磷酸酯 (C-P 键有机磷) 是可供浮游植物利用的一种潜在磷源。甲藻自身无法直接利用磷酸酯, 但是其共生细菌可将磷酸酯降解为磷酸盐, 从而促进藻细胞的生长。然而, 目前尚未有针对特定菌株的相关研究。本研究在 2-氨基乙基膦酸 (2-AEP) 作为唯一磷源条件下对东海原甲藻进行培养, 对其中的共生细菌进行分离纯化, 初步得到 5 种细菌。基因组测序结果表明, 其中一株尹氏菌属细菌 *Yoonia* sp. PD-AEP-1 中存在两种 C-P 裂解酶途径。通过藻菌共培养实验对菌株功能进行验证, 结果显示, 将藻细胞处理至磷饥饿状态之后, 同时加入 2-AEP 与 PD-AEP-1 悬液, 与只加 2-AEP 或只加细菌悬液的条件相比, 藻细胞生长速率和体系内磷酸盐浓度显著升高, 同时碱性磷酸酶活性及非光化学淬灭值则明显降低, 表明 PD-AEP-1 具备将 2-AEP 降解为磷酸盐的能力, 进而缓解了东海原甲藻细胞的磷限制状态, 有效促进了藻细胞的生长。该研究表明, 东海原甲藻共生细菌在降解磷酸酯从而为藻细胞提供磷源方面扮演着一定角色, 这一过程很可能有助于东海原甲藻赤潮的暴发, 凸显了海洋生态系统中藻-菌相互作用的重要性。

关键词: 磷酸酯; 东海原甲藻; 共生细菌; 促藻效应; 赤潮

中图分类号: P76

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2024)09-0038-14

1 引言

磷被视为海洋生态系统中初级生产力的限制性营养元素^[1]。磷酸盐是可被浮游植物直接利用的磷源形式, 然而其在海洋表层海水中常处于一种匮乏状态, 成为限制海洋浮游植物生物量的重要因素^[2]。浮游植物衍生出很多机制来应对磷酸盐限制, 其中最重要的途径之一即是通过利用海水中的溶解有机磷 (DOP) 来获取磷酸盐^[3]。磷酸酯类化合物和磷酸酯 (C-P 键有机磷) 是海洋中两种主要的 DOP 形式, 分别组成了海洋中高分子量 DOP 总量的 75% 和 25% 左右^[4]。大部

分真核浮游植物类群可直接通过碱性磷酸酶对磷酸酯类化合物进行水解以获取磷酸盐^[5-7]。然而, 对于磷酸酯的利用则主要分布在细菌及蓝藻中^[6-8], 研究表明, 大部分真核浮游植物类群并不具备直接降解磷酸酯的能力^[9-11]。

磷酸酯是一类化学结构中含有性质非常稳定的 C-P 化学键的有机磷化合物, 具有广泛的生物来源, 包括多种海洋无脊椎动物、蓝藻等^[12-14]。2-氨基乙基膦酸 (2-AEP) 及其衍生物是在海洋无脊椎动物中发现的主要的磷酸酯形式, 也是海洋中非常重要和普遍的磷酸酯来源。另外, 很多人工合成来源的磷酸酯在

收稿日期: 2024-04-02; 修订日期: 2024-04-19。

基金项目: 国家自然科学基金 (42306167); 福建省自然科学基金资助项目 (2023J01896); 泉州师范学院引进人才科研项目 (H17012)。

作者简介: 崔玉栋 (1988—), 男, 山东省聊城市人, 博士, 主要从事海洋真核浮游植物及其共生细菌的生理和分子生态学研究。E-mail: cyd2017@qztc.edu.cn

人类生产生活中得到广泛应用,比如在农业中被大量使用的除草剂草甘膦^[15],因此,大量人工合成磷酸酯随径流被排入到近海海域中。细菌和蓝藻可通过C-P裂解酶途径以及多种C-P水解酶途径对磷酸酯进行降解^[16-17]。C-P裂解酶途径的底物范围非常广泛,包括各类烷基和芳香基磷酸酯^[6]。C-P水解酶途径种类多样,其中最常见的一种被称作磷酸脂酶途径(PhnW-PhnX途径),该途径特异性的作用于2-AEP。

甲藻中存在部分编码磷酸酯代谢途径的基因,但由于磷酸酯转运蛋白的缺失,甲藻自身并不具备胞外环境中磷酸酯的能力^[11]。然而,研究表明,甲藻共生细菌可有效降解水体中的2-AEP并释放出磷酸盐,以供给甲藻对磷元素的需求^[11,18]。因此,共生细菌对磷酸酯的降解是甲藻间接获取磷酸盐的重要途径,在甲藻适应磷酸盐限制乃至引发赤潮的过程中扮演着重要角色。东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)是威胁我国海洋生态环境及海洋经济的赤潮甲藻物种之一,其在磷限制环境下所具有的种间竞争优势是诱发和维持赤潮的重要因素^[9]。研究表明,东海原甲藻共生细菌可降解2-AEP和草甘膦并释放出磷酸盐,进而显著促进东海原甲藻的生长^[11,15]。然而,目前相关研究大多停留在整体的群落层面,具体哪些特定的细菌物种在发挥作用,仍然缺少针对性的研究。

本研究对2-AEP作为唯一磷源条件下东海原甲藻培养体系中的细菌进行分离纯化,以获得纯菌株,并选择其中代表性菌株进行系统研究。通过基因组的测序和磷酸酯代谢相关基因的鉴定,探讨其是否具备降解磷酸酯的分子基础,同时通过藻菌共培养实验验证其是否实际具备降解磷酸酯的功能。实验结果将进一步拓展对甲藻共生细菌的认识,并为探讨其在甲藻适应磷酸盐限制环境乃至暴发赤潮过程中扮演的角色提供依据。

2 材料与方法

2.1 海洋细菌培养基

本研究采用2216E海洋肉汤培养基(MB)进行甲藻共生细菌的分离及培养^[20]。MB液体培养基按产品设定比例进行配制,在121℃条件下灭菌20 min,冷却分装后使用。液体培养基中加入15 g/L的琼脂粉,121℃条件下灭菌20 min后倒平板,制成MB固体培养基。

2.2 藻细胞培养及藻细胞密度测定

实验所用的东海原甲藻采用f/2培养基在光照培养箱中培养,培养温度为20℃,光照条件(以photons

计)为 $(100 \pm 10) \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗周期为12 h:12 h。将天然海水经滤径为3 μm和0.22 μm的滤膜进行两次过滤,之后盐度稀释至28,经高温高压(121℃,20 min)灭菌,冷却至常温后用于配置培养基。藻细胞计数采用Sedgwick-Rafter计数板,将藻细胞根据情况适当稀释,加入鲁哥氏碘液固定,之后在显微镜下进行人工计数。

2.3 磷酸盐浓度及碱性磷酸酶活性测定

藻类培养体系中磷酸盐浓度的测量通过磷钼蓝法进行。收取藻液,采用滤径为3 μm的滤膜进行过滤,将滤液定容至10 mL并且加入1 mL的磷钼蓝反应试剂,混合后静置15 min,之后通过分光光度计测定吸光值,并根据标准曲线计算磷酸盐浓度。

藻细胞碱性磷酸酶活性(alkaline phosphatase activity, APA)的测定采用对硝基苯磷酸二钠(pNPP)法测定。取2 mL藻液,加入100 μL pNPP(20 mmol/L),于20℃暗处理2 h,之后将样品在10 000 r/min条件下离心2 min,置于冰上以终止酶反应。采用可见分光光度计测定405 nm波长下上清液的吸光值,根据对硝基苯酚(pNP)标准曲线得出的公式换算出pNP的生成量,最终计算出APA,其单位为fmol pNP/(cell·h)。

2.4 藻细胞荧光参数测定

藻细胞光合系统II最大光合效率(F_v/F_m)及非光化学猝灭(NPQ)值的测定通过水样荧光仪(Water-PAM)进行。 F_v/F_m 的计算为 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ^[21]。其中 F_0 是在藻细胞经暗处理后在测量光下获得的最小荧光值; F_m 是暗处理后藻细胞经过一个短暂而强烈的强光曝光之后获得的最大荧光值; F_v 为 F_m 与 F_0 的差值。取藻细胞样品稀释至密度 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ cells/mL,20℃条件下暗处理20 min,之后使用水样荧光仪(Water-PAM)进行荧光值的测定。

NPQ的计算为 $\text{NPQ} = (F_m - F'_m)/F'_m$ ^[22]。其中 F'_m 为荧光仪中光化光开启之后在饱和脉冲开启之后测得的最大荧光值。NPQ的测量同样采用水样荧光仪,将藻细胞稀释至适宜细胞浓度后,进行20 min的暗处理,然后测量 F_m ,之后开启光化光,在诱导曲线模式下完成 F'_m 的测量,测量时间间隔设置为50 s。

2.5 3种磷源条件下东海原甲藻的培养

将活性和生长状态良好的东海原甲藻细胞接种至磷酸盐(f/2培养基,磷酸盐浓度为36 μmol/L)、2-AEP(f/2-P培养基基础上,添加36 μmol/L 2-AEP的培养基,其中2-AEP购自Sigma-Aldrich, USA)、无磷(f/2-P培养基,未添加任何磷源)等3种培养条件中,每个条件设置3个平行,之后每2 d测定一次藻细胞

密度及体系内磷酸盐浓度。

2.6 东海原甲藻共生细菌的分离及初步种属鉴定

在 2-AEP 条件藻细胞密度明显高于无磷条件之后,取 2-AEP 条件下藻液进行后续共生细菌的分离。2-AEP 条件每个平行中取 500 μL 藻液进行混合,之后采用无菌海水稀释至不同梯度,稀释比例为 $10\sim 10^4$,分别涂布至 MB 平板,待细菌菌落长出后,挑选不同大小、形状、颜色的菌落,在新的平板上进行 3 区划线,菌落长出后,挑取单个菌落接种至 MB 液体培养基进行摇床培养,培养条件为 30°C , 200 r/min, 培养时间 48 h。

收取菌液进行 DNA 提取,并以细菌基因组 DNA 为模板,通过 PCR 对细菌的 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 扩增条件参数: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s; 58°C 退火 30 s; 72°C 延伸 30~60 s, 按此条件进行 35 个循环; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保存。采用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 结果进行检测,将扩增成功的样品送至测序公司测序。

将获得的 16S rRNA 基因序列进行筛选,去除测序质量差和包含双峰的结果,将其余序列在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 分析,记录与其 16S rRNA 基因序列相似性最高的物种,下载其 16S rRNA 基因序列,与本实验所获得序列一起采用 MGEA6 软件^[23] 构建 Neighbour-Joining 系统发育树进行分析。

2.7 细菌的基因组测序及注释分析

菌株鉴定结果中, PD-AEP-1 等 15 株细菌为同属,为本实验分离出的主要类别,且其相近物种参考基因组中含有编码磷酸酯的基因,表明其具有降解磷酸酯的潜力。本研究以 PD-AEP-1 为代表,对该种细菌展开进一步研究。提取 PD-AEP-1 的基因组 DNA,并送至测序公司(美吉)采用 Illumina 高通量测序技术进行测序,测序结果首先用 Sickle(<https://github.com/najoshi/sickle>) 进行碱基质量控制,然后用 SPAdes 软件拼接成 contig 序列,再取 1 000 bp 以上的序列作为该菌基因组。使用在线软件 ANI Calculator(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) 和 Genome-Genome Distance Calculator(<https://ggdc.dsmz.de>) 分别计算菌株和其相近物种基因组的平均核苷酸相似度(Average Nucleotide Identity, ANI)值和 DNA-DNA 杂交值(DNA-DNA hybridization, DDH)值。使用 RAST(Rapid Annotation using Subsystem Technology)注释系统(<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) 对将所得到的的细菌基因组序列以及其他参考基因组序列进行注释^[24]。在注释结

果中检索与 C-P 键有机磷利用相关的基因(C-P 基因),并进一步使用 NCBI 数据库进行 BLAST 分析验证。根据注释结果中 C-P 键有机磷代谢相关基因的分布情况,分析 C-P 键有机磷代谢途径的类型及基因簇的排布。

2.8 藻菌共培养实验

将细菌进行活化培养,收集菌液在 8 000 r/min 下离心 5 min,去除上清液,加入等体积无菌海水,重悬之后再次离心,如此重复两次,以彻底去除细菌培养基成分,制成细菌悬液。

将东海原甲藻细胞培养至指数期,加入终浓度分别为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素、卡那霉素和链霉素进行抑菌处理,研究表明该抗生素组合可有效杀灭藻液中的细菌^[11]。之后接种至磷酸盐起始浓度为 6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 f/2 培养基中,并定期测定培养体系内的藻细胞密度及磷酸盐浓度,待磷酸盐浓度降为 0 且此后藻细胞浓度停止增长后,即认为藻细胞达到磷饥饿状态。将该状态下藻细胞接种至藻+菌(藻细胞培养体系中加入 1% 体积细菌悬液)、藻+2-AEP(藻细胞培养体系中加入终浓度为 36 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 2-AEP)以及藻+菌+2-AEP(藻细胞培养体系中同时加入 1% 体积细菌悬液和 36 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 2-AEP)等 3 个条件下,每个条件设置 3 个平行。每 2 d 进行藻细胞密度、DIP 浓度、APA、Fv/Fm 的测量,并在实验的第 2、6、10、14 d 时测量该藻种的 NPQ。

2.9 数据统计分析

使用 PASW Statistics18 软件进行单因素方差分析(Analysis of variance, ANOVA),以此来评估不同实验条件下统计学差异的显著性。图中呈现的数据为 3 个平行处理组的平均值,误差线为计算得出的标准方差。

3 结果

3.1 3 种磷源条件下东海原甲藻的生长曲线及磷酸盐浓度变化

将东海原甲藻转接至磷酸盐、2-AEP、无磷 3 种培养条件中进行培养,藻细胞的生长曲线和培养体系内磷酸盐浓度变化如图 1 所示,磷酸盐条件由于磷酸盐较为充足,藻细胞密度在 0~14 d 内保持了较高的生长速度。磷酸盐浓度测定结果显示,磷酸盐条件下磷酸盐浓度在前 2 d 内快速降低,表明磷饥饿状态下细胞在短期内吸收了大量磷酸盐,但因为藻细胞的生长需要持续的消耗磷酸盐,此后磷酸盐浓度保持在持续降低状态。无磷条件由于没有磷源添加,磷酸盐浓度持续保持在趋近于 0 的状态,因此尽管藻细胞密度

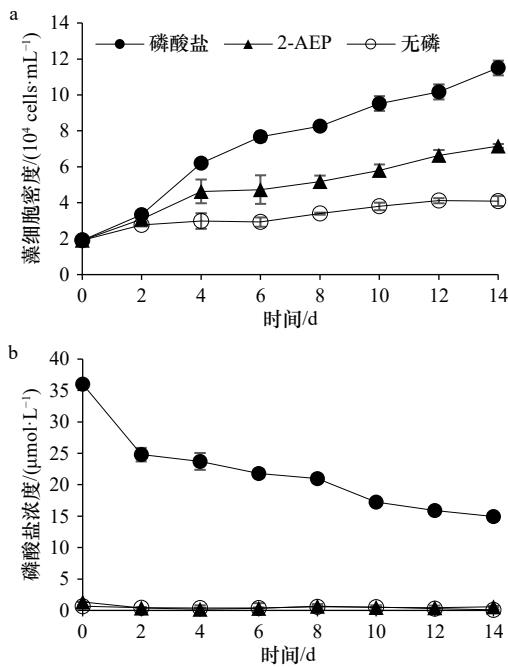


图1 3种磷源条件下东海原甲藻细胞的生长曲线(a)及培养体系内磷酸盐浓度(b)

Fig. 1 Growth curve of *Prorocentrum donghaiense* (a) and phosphate concentration in the culture (b) under three P conditions

磷酸盐: f/2 培养基, 磷酸盐浓度为 36 $\mu\text{mol/L}$; 2-AEP: f/2-P 培养基基础上添加 36 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-AEP; 无磷: f/2-P 培养基, 未添加任何磷源
 Phosphate: f/2 medium, phosphate concentration was 36 $\mu\text{mol/L}$; 2-AEP: f/2-P medium, while 36 $\mu\text{mol/L}$ 2-AEP was added; No phosphorus: f/2-P medium, no P source was added

在 0~12 d 内有缓慢升高,但由于磷酸盐的缺乏,最终停止增长。2-AEP 条件藻细胞的生长状况则介于上述两个条件之间,在 4~14 d 期间,2-AEP 条件下的藻细胞密度显著低于磷酸盐条件($p < 0.05$),同时显著高于无磷条件($p < 0.05$),表明 2-AEP 被降解,为藻细胞生长提供了额外的磷酸盐。但同时,与无磷条件类似,2-AEP 条件下磷酸盐浓度同样保持在趋近于 0 的状态,据此推测,虽然 2-AEP 可被降解生成磷酸盐,但其降解速度比较缓慢,磷酸盐释放之后即很快被藻细胞全部吸收,以供给藻细胞生长的需要。

3.2 东海原甲藻共生细菌分离及初步鉴定

于第 10 d 采集样品,对 2-AEP 条件培养体系内细菌进行了分离纯化,共分离出 23 株细菌,编号 PD-AEP-1 至 PD-AEP-23,后续通过 16S rRNA 基因序列的扩增、测序、筛选,其中 20 个序列的 BLAST 分析显示,20 个菌株与其最相近菌株的 16S rRNA 基因序列均大于 99%。基于所分离菌株及其相近菌株的 16S rRNA 基因序列制作进化树,结果如图 2 所示,所有菌株聚簇

在 5 个进化分支上,其中 PD-AEP-1、5~8、10~16、18~20 等 15 株细菌与 *Yoonia vestfoldensis* 聚簇在同一分支,PD-AEP-4、9 与 *Limnobacter thiooxidans* 聚簇在同一分支,PD-AEP-21、22、23 分别与 *Roseivirga spongicola*、*Ponticoccus alexandrii*、*Marinobacter salsuginis* 聚簇在同一分支,与 16S rRNA 基因序列 BLAST 结果保持一致,表明这 20 株细菌主要分布在假单胞菌门(Pseudomonadota)、拟杆菌门(Bacteroidota)等两个门, α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)以及鞘脂杆菌纲(Cytophagia)等 4 个纲,归属于 *Yoonia*、*Limnobacter*、*Roseivirga*、*Ponticoccus*、*Marinobacter* 等 5 个属。

3.3 共生细菌 PD-AEP-1 基因组测序及注释结果分析

BLAST 结果显示,PD-AEP-1 与 *Y. vestfoldensis* 的 16S rRNA 基因相似度为 99.65%。其基因组经测序、拼接之后,获得的基因组大小为 3.83 MB,GC 含量为 60.8%。该菌株基因组与其相近物种参考基因组(*Y. vestfoldensis* DSM 16 212, GenBank ID: GCA_000382265.1)的 ANI 值为 85.95%,DDH 值为 44%。根据细菌物种鉴定标准,虽然两个菌株 16S rRNA 基因序列相似度大于 98.65%,但当两个菌株 ANI 值小于 95%,DDH 值小于 70% 时,认为其属于不同物种^[25-26]。因此 PD-AEP-1 与 *Y. vestfoldensis* 为不同物种,将其命名为 *Yoonia* sp. PD-AEP-1,隶属于假单胞菌门、 α -变形菌纲、红杆菌目(Rhodobacterales)、红杆菌科(Rhodobacteraceae)、尹氏菌属(*Yoonia*)。PD-AEP-1 基因组中包含 3 970 个编码序列,经 RAST 系统注释后,28% 的编码序列归属于 RAST 中的子系统(Subsystem),这些基因功能特征的分布如图 3 所示。具体注释结果显示,该细菌基因组中含有编码细菌光吸收蛋白(Bacterial light-harvesting proteins)及植物生长素前体物质色氨酸的基因(Tryptophan synthase)。编码维生素 B₁、B₆、B₁₂ 及叶酸等多种 B 族维生素以及生物素等合成途径的基因也在该基因组中被发现。磷代谢(Phosphorus metabolism)子系统的结果显示,该细菌基因组中含有多种与磷酸盐代谢、多聚磷酸盐代谢以及有机磷代谢相关的基因,包括 PhoR、PhoB、聚磷酸盐激酶(Polyphosphate kinase)、外切聚磷酸酶(Exopolyphosphatase)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase)等的编码基因(表 1)。

3.4 共生细菌 PD-AEP-1 基因组中 C-P 键有机磷代谢相关基因的鉴定

在 RAST 对 PD-AEP-1 基因组进行注释的非子系

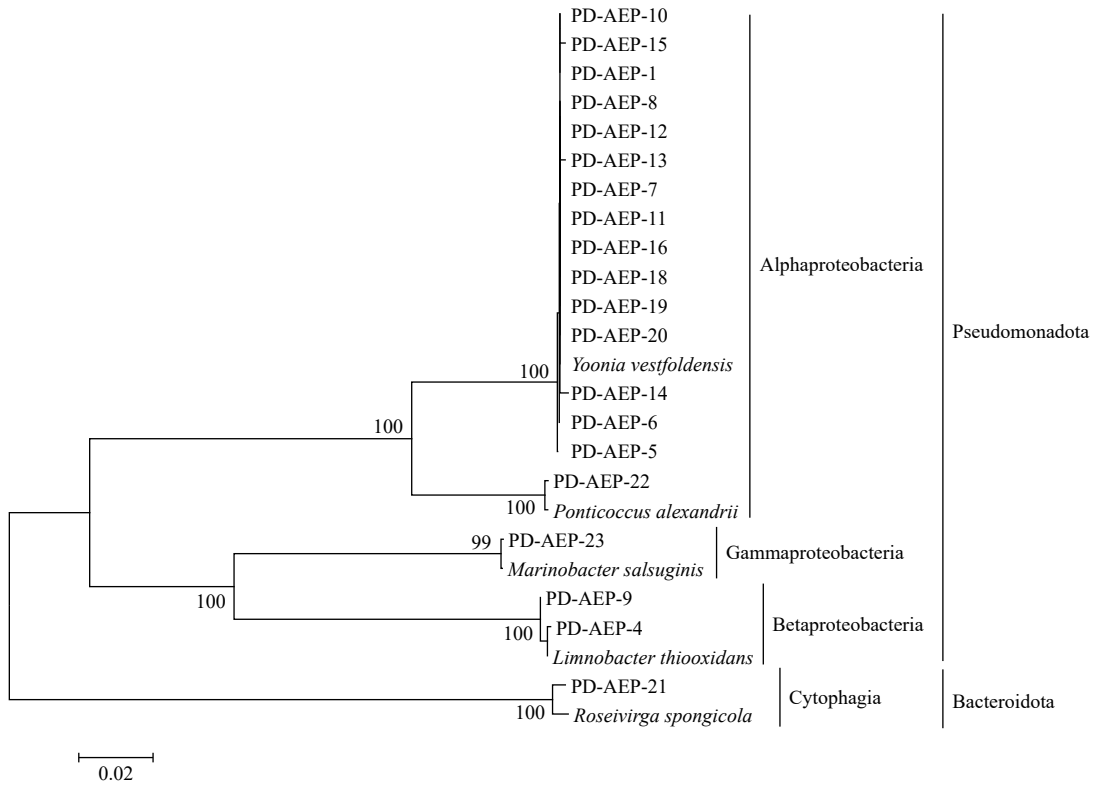


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的东海原甲藻共生细菌及其相近菌株 Neighbour-Joining 树

Fig. 2 Neighbour-Joining tree of *Prorocentrum donghaiense* symbiotic bacteria and their close strains constructed in the basis of the 16S rRNA gene sequences

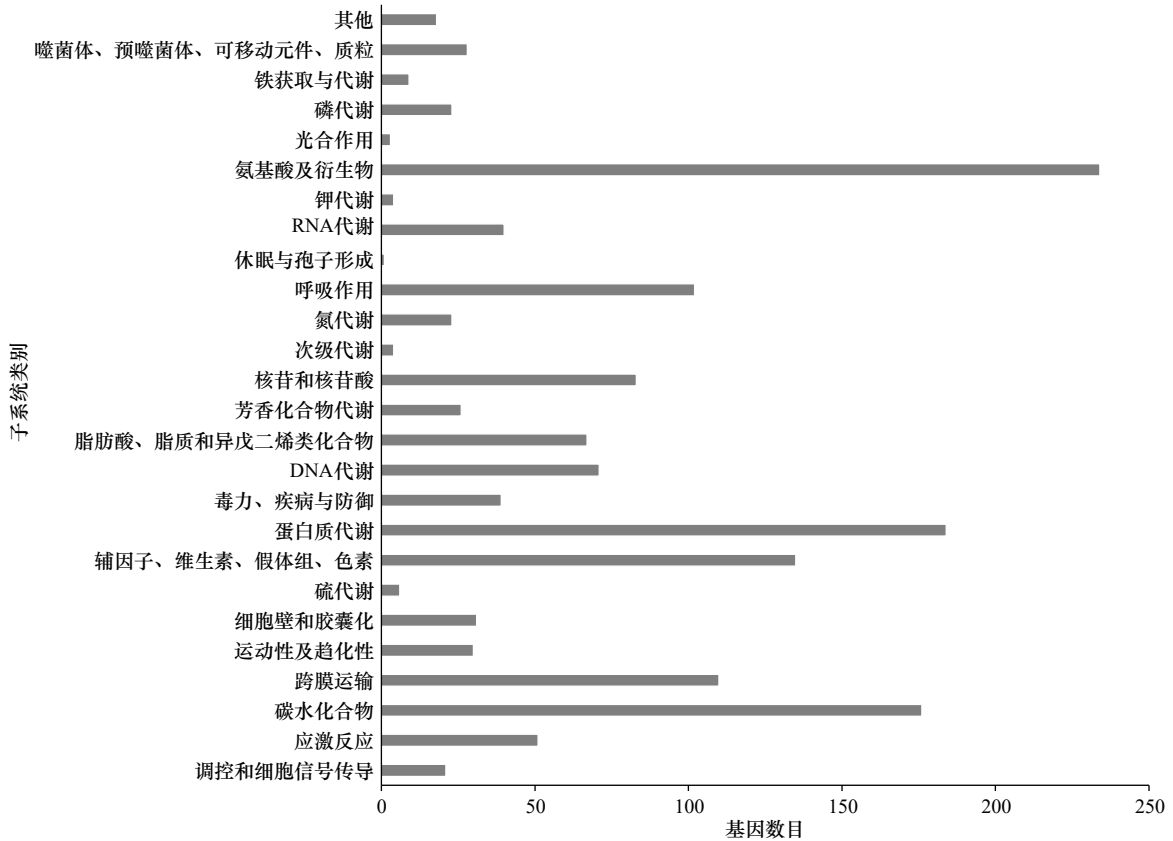


图 3 PD-AEP-1 基因组中归属于 RAST 不同子系统类别基因的分布情况

Fig. 3 Distribution of the genes from the genome of PD-AEP-1 which belong to the “Subsystem Category” of RAST

表 1 PD-AEP-1 基因组中与磷代谢相关的基因及其特征
Table 1 Genes and their characteristics related to P metabolism in the genome of PD-AEP-1

子系统	基因编号	功能
高亲和磷酸盐转运蛋白和 Pho 调节子调控	peg.1464	磷酸盐转运系统调节蛋白PhoU
	peg.1463	磷酸盐调节子转录调节蛋白PhoB (SphR)
	peg.1832	磷酸盐调节子传感蛋白PhoR (SphS) (EC 2.7.13.3)
多聚磷酸盐	peg.2944	聚磷酸盐激酶 (EC 2.7.4.1)
	peg.2027	外切聚磷酸酶 (EC 3.6.1.11)
磷酸盐代谢	peg.1508	NAD(P) 转氢酶 β 亚基 (EC 1.6.1.2)
	peg.3897	碱性磷酸酶 (EC 3.1.3.1)
	peg.3045	磷酸盐饥饿诱导蛋白PhoH
	peg.1039	锰依赖型无机焦磷酸酶 (EC 3.6.1.1)

统 (Not in Subsystem) 结果中, 经检索共获得 31 个与 C-P 键有机磷代谢相关的基因, 大多都是组成 C-P 裂解酶途径的酶及蛋白的编码基因, 如表 2 所示。根据这些基因在基因组中的排布情况, 发现这些基因组成了两个 C-P 裂解酶途径的基因簇, 其分布情况如图 4 所示。其中 C-P 裂解酶基因簇 I 由 *phnC*、*phnD*、*phnE₁*、*phnE₂*、*phnF*、*phnG*、*phnH*、*phnI*、*phnJ*、*phnK*、*phnL*、*phnM₁*、*phnM₂*、*phnN* 以及一个乙酰转移酶基因 (*atf*)、一个未知功能蛋白 Atu0170 组成; C-P 裂解酶基因簇 II 由 *phnC**、*phnD**、*phnE₁**、*phnE₂**、*phnH**、*phnI**、*phnJ**、*phnK**、*phnL**、*phnM** 以及 *atf* 等组成。这两个基因簇分布在两个不同的 contig 中。在另外一个 contig 中, 另外 4 个基因也组成了一个 *phnHIJK* 基因簇, 然而由于组成 C-P 裂解酶途径的其他主要基因的缺失, 其很可能无法单独执行裂解 C-P 键有机磷的功能。

3.5 藻菌共培养不同条件下藻细胞密度及生理参数测定结果

为探究 PD-AEP-1 是否具备降解 2-AEP 的能力, 设置了藻菌共培养实验进行验证, 结果如图 5 所示。由图 5a 可知, 将前期经过除菌处理及磷饥饿处理的东海原甲藻细胞与 PD-AEP-1 混合培养时, 在 22 d 的培养周期内, 藻细胞密度在 0~8 d 略有增长, 之后便基本持平, 甚至在后期略有下降, 表明 PD-AEP-1 细菌本身并不能为藻细胞提供磷源。将 2-AEP 加入前期经过同样处理后的东海原甲藻培养体系中, 藻细胞密度的变化趋势在前期与“藻 + 菌”条件基本类似, 在第 8 d 之后藻细胞密度基本持平, 表明藻细胞本身并不能降解 2-AEP 作为磷源使用, 同时经前期抗生素抑菌处理之后, 培养体系内并不存在可将 2-AEP 降解为

磷酸盐的细菌。“藻 + 2-AEP”条件与“藻 + 菌”条件下的藻细胞密度在前期均有小幅上升, 且“藻 + 2-AEP”条件藻细胞密度在 14~22 d 显著高于“藻 + 菌” ($p < 0.05$), 但是均并未获得持续的增长。然而, 在“藻 + 菌 + 2-AEP”条件下, 藻细胞密度保持了持续上升的趋势, 并且从第 4 d 开始就远高于另外两个条件 ($p < 0.01$), 表明在该条件下, 藻细胞获得了额外的磷源。

磷酸盐测定的结果如图 5b 所示, 其中“藻 + 2-AEP”条件与“藻 + 菌”条件下磷酸盐浓度持续处于低于 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 的水平, 且没有显著差异 ($p > 0.05$)。而从第 6 d 开始, “藻 + 菌 + 2-AEP”条件的磷酸盐浓度就显著高于前两者 ($p < 0.05$), 但持续处于低于 $1 \mu\text{mol/L}$ 的水平。由图 5c 可知, 由于藻细胞前期经过了磷饥饿处理, 在培养初始 3 种条件下藻细胞的 APA 均处于很高水平。培养开始后, “藻 + 菌”条件下, APA 在 0~8 d 略有下降, 在之后的 8~22 d 内则处于缓慢上升的趋势, 表明该条件下藻细胞持续处于磷酸盐限制状态。“藻 + 2-AEP”条件的 APA 变化趋势与“藻 + 菌”条件类似, 但在 8~22 d 略低于后者 ($p < 0.01$), 表明其同样持续处于磷酸盐限制状态。“藻 + 菌 + 2-AEP”条件下, APA 从第 2 d 起就显著低于其他两个条件 ($p < 0.01$), 且呈现持续降低的趋势。

NPQ 的测定结果如图 5d 所示, 由图可知, “藻 + 2-AEP”条件与“藻 + 菌”条件的 NPQ 均处于较高水平, 而“藻 + 菌 + 2-AEP”条件的 NPQ 则显著低于以上两个条件 ($p < 0.01$)。以往研究表明, NPQ 的升高是甲藻细胞应对磷酸盐限制时的一种重要适应机制, 而磷酸盐充足相对磷酸盐限制条件下 NPQ 处于较低水平^[27]。因此, “藻 + 菌 + 2-AEP”条件下的藻细胞的磷酸盐限制状态已经得到了显著缓解。

表 2 PD-AEP-1 基因组中与磷酸酯利用相关的基因及其特征
Table 2 Genes related to phosphonate utilization in the genome of PD-AEP-1 and their characteristics

重叠群	基因编号	长度/bp	编码的酶/蛋白*	
NODE_9_length_69264_cov_65.868739	peg.3912	1146	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate diphosphatase PhnM2 (EC 3.6.1.63)	
	peg.3913	675	Uncharacterized protein Atu0170, clustered with phosphonate utilization	
	peg.3914	543	Ribose 1,5-bisphosphate phosphokinase PhnN (EC 2.7.4.23)	
	peg.3915	684	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnL (EC 2.7.8.37)	
	peg.3916	771	Phosphonates utilization ATP-binding protein PhnK	
	peg.3917	831	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-phosphate C-P lyase PhnJ (EC 4.7.1.1)	
	peg.3918	1083	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnI (EC 2.7.8.37)	
	peg.3919	561	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnH (EC 2.7.8.37)	
	peg.3920	456	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnG (EC 2.7.8.37)	
	peg.3921	723	Transcriptional regulator PhnF	
	peg.3922	1188	Metal-dependent hydrolase involved in phosphonate metabolism PhnM1	
	peg.3923	615	Phosphonate utilization associated acetyltransferase (ATF)	
	peg.3924	1329	Phosphonate ABC transporter permease protein PhnE1 (TC 3.A.1.9.1)	
	peg.3925	873	Phosphonate ABC transporter permease protein PhnE2 (TC 3.A.1.9.1)	
	peg.3926	903	Phosphonate ABC transporter substrate-binding protein PhnD (TC 3.A.1.9.1)	
	peg.3927	819	Phosphonate ABC transporter ATP-binding protein PhnC (TC 3.A.1.9.1)	
	NODE_1_length_861959_cov_71.815100	peg.775	537	PhnH protein
		peg.776	1056	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnI (EC 2.7.8.37)
		peg.777	915	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-phosphate C-P lyase PhnJ (EC 4.7.1.1)
peg.778		798	Phosphonates utilization ATP-binding protein PhnK	
peg.779		720	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnL (EC 2.7.8.37)	
peg.780		1194	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate diphosphatase PhnM (EC 3.6.1.63)	
peg.781		816	Phosphonate ABC transporter ATP-binding protein PhnC (TC 3.A.1.9.1)	
peg.782		915	Phosphonate ABC transporter substrate-binding protein PhnD (TC 3.A.1.9.1)	
peg.783		933	ABC transporter, permease protein PhnE1	
peg.784		858	Phosphonate ABC transporter permease protein PhnE2(TC 3.A.1.9.1)	
peg.785		630	Phosphonate utilization associated acetyltransferase	
NODE_24_length_14478_cov_37.311755		peg.1318	576	PhnH protein
		peg.1319	1014	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnI (EC 2.7.8.37)
	peg.1320	846	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-phosphate C-P lyase PhnJ (EC 4.7.1.1)	
	peg.1321	768	Phosphonates utilization ATP-binding protein PhnK	

注: 因该列酶和蛋白的名称仍然未有公认的中文译名, 因此采用英文名称。

4 讨论

4.1 本实验所分离甲藻共生细菌的分类鉴定

本研究中东海原甲藻在 2-AEP 作为唯一磷源培养条件下相比于无任何磷源添加条件依然保持了持

续的增长, 表明其培养体系中的 2-AEP 可被降解生成磷酸盐。以往报道显示, 东海原甲藻自身并不具备降解 C-P 键有机磷的能力^[11], 因此推测是藻液中的共生细菌对 2-AEP 进行了降解。但由于东海原甲藻共生细菌种类丰富^[15], 具体哪些特定菌株在执行功能, 需

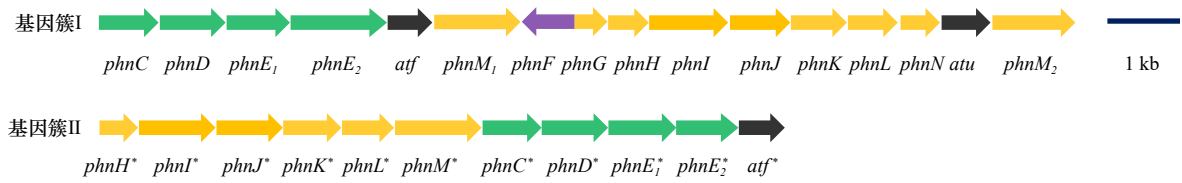


图4 PD-AEP-1基因组中两个C-P裂解酶途径基因簇的排布

Fig. 4 The organization of two gene clusters of C-P lyase pathways in the genome of the PD-AEP-1

“*”表示基因簇II中的基因;不同颜色分别代表编码磷酸酯转运蛋白(绿色)、调控蛋白(紫色)及C-P裂解酶亚基蛋白的基因,黑色为未知功能蛋白;atf:磷酸酯利用相关乙酰转移酶基因,atu:未知功能蛋白Atu0170编码基因

“**” indicates the genes of the second cluster. Genes encoding phosphonate transport (green) and regulation (purple), the C-P lyase subunits (yellow) and other proteins of unknown function (black) are shown in different colors. atf: phosphonate utilization associated acetyltransferase, atu: uncharacterized protein Atu0170

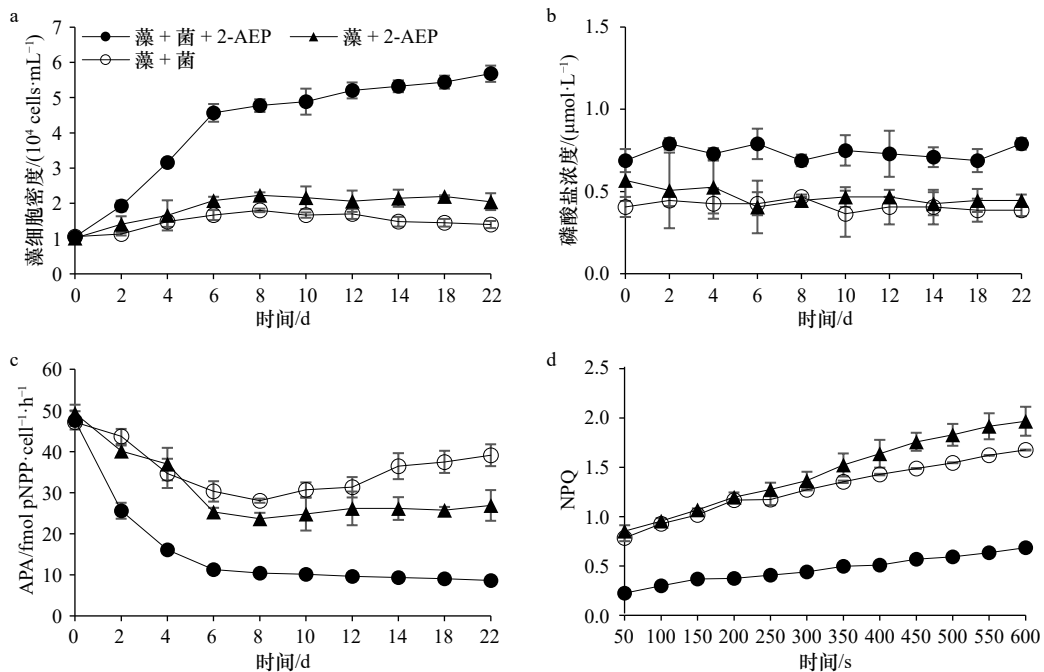


图5 3种培养条件下东海原甲藻细胞的生长曲线(a)、磷酸盐浓度(b)、碱性磷酸酶活性(c)及第12d的NPQ诱导曲线(d)

Fig. 5 Growth curve and of *Prorocentrum donghaiense*, phosphate concentration measurement, alkaline phosphatase activity (APA) measurement and induction curve of NPQ in the 12th day under three culture conditions

藻+菌:藻细胞培养体系中加入1%体积细菌悬液;藻+2-AEP:藻细胞培养体系中加入36 μmol/L 2-AEP;藻+菌+2-AEP:

藻细胞培养体系中同时加入1%体积细菌悬液和36 μmol/L 2-AEP

Algae + bacteria: algal culture systems added with 1% volume of bacteria suspension; Algae + 2-AEP: algal culture systems added with 36 μmol/L 2-AEP;

Algae + bacteria + 2-AEP: algal culture systems added with 1% volume of bacteria suspension and 36 μmol/L 2-AEP

要对纯种菌株进行分离后进一步确认。本研究在东海原甲藻培养体系中所分离出的共生细菌分布在 *Yoonia*、*Limnobacter*、*Roseivirga*、*Ponticoccus*、*Marinobacter* 等5个属,隶属于假单胞菌门(属于原变形菌门)^[28]、拟杆菌门等两个门,α-变形菌纲、β-变形菌纲、γ-变形菌纲以及鞘脂杆菌纲等4个纲。由于自然界中可在实验室分离培养的菌株只占细菌群落很小的一部分,因此本实验所分离的细菌并不能代表细菌群落的整体情况。在本实验所分离细菌分布的5个

属中, *Limnobacter*、*Marinobacter*、*Ponticoccus* 曾在链状亚历山大藻共生菌群中被分离鉴定过^[29], *Marinobacter* 和 *Ponticoccus* 也曾分别在利玛原甲藻和米氏凯伦藻的藻液中被分离出来^[30-31], *Yoonia* 属(原 *Loktanella* 属部分物种重新划分)^[32] 的纯种菌株也曾经分离自三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) 和玛氏骨条藻 (*Skeletonema marinoi*) 的培养体系^[33-34], 表明这些属都是微藻共生细菌的常见类型。Wang 等^[15] 通过 16S rRNA 基因高通量测序技术测定了东海原甲藻共生细

菌的群落结构,表明变形菌门和拟杆菌门是其中的优势菌门,优势菌纲包括 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲、鞘脂杆菌纲以及 *Sphingobacteria* 等,本实验所分离细菌分布的类群与其基本一致。Buchan 等的研究表明,与赤潮藻类相关细菌主要分布在黄杆菌纲(*Flavobacteriia*)、 α -变形菌纲以及 γ -变形菌纲^[35]。对塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)、链状亚历山大藻(*A. catenella*)共生细菌研究的结果表明,变形菌门和拟杆菌门为两种藻类共生细菌的优势类群^[29, 36-37],而米氏凯伦藻共培养细菌群落的优势菌主要分布在 Alphaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria 两个纲^[38]。因此,目前研究中所发现的甲藻共生细菌分布最多的两个门均为变形菌门和拟杆菌门。

4.2 *Yoonia* sp. PD-AEP-1 的基因组特征及其与环境适应的关联

Yoonia 属为本实验分离菌株分布最多的属,该菌属不仅存在于微藻生境,也曾在刚毛藻(*Cladophora*)、墨角藻、海葵和贻贝中被鉴定出来^[39-42],其发现地点包括东海、三峡水库、青藏高原卓乃湖、南极威德尔海等^[43-45],表明其是一种能适应咸水、半咸水及淡水等广盐性环境,并且在全世界范围内都广泛分布的菌属。

Yoonia sp. PD-AEP-1 基因组的测定结果表明,该菌株的诸多特征与功能与其对生活环境的适应以及与东海原甲藻的共生关系都是密切相关的。比如,该细菌中含有与光合作用相关的基因,表明其很可能为光合细菌,在与藻细胞同处于光照条件下时,具有进行光合作用的潜力,藻细胞并不是其获得有机物质的唯一途径;根据植物生长素合成前体色氨酸的编码基因的存在推测,该细菌在与藻细胞共生时可能以合成植物生长素的方式来促进藻细胞的生长;以往研究表明,藻类自身并不具备合成 VB₁ 和 VB₁₂ 的能力,共生细菌很可能是其获取这些 B 族维生素的重要途径^[46]。而 VB₁、VB₁₂ 等 B 族维生素的合成途径同样存在于 PD-AEP-1 中,表明其很可能具有合成这些维生素的能力,是东海原甲藻细胞生长所需 B 族维生素的重要来源之一。

PD-AEP-1 基因组中具有多种 P 代谢相关基因,其中 PhoR 和 PhoB 是 Pho 调节子(Pho regulon)的重要调控蛋白,Pho 调节子在微生物中很多关键磷代谢蛋白的基因表达与合成中扮演着重要作用,在磷酸盐匮乏的情况下被诱导表达^[2]。聚磷酸盐激酶和外切聚磷酸酶在聚磷酸盐代谢中发挥着重要作用,而聚磷酸盐是细菌细胞内部重要的储备磷源,是磷酸盐限制条件下细胞可利用的潜在磷源^[47]。碱性磷酸酶是水解

磷酸酯化化合物的重要酶类,在磷酸盐限制的条件下被表达^[48]。因此推测,PD-AEP-1 具有多种机制和途径来应对磷酸盐限制,对于磷酸盐缺乏的环境具有良好的适应能力。

4.3 *Yoonia* sp. PD-AEP-1 中 C-P 键有机磷代谢途径的分析

以往研究表明,C-P 裂解酶途径是 C-P 键有机磷的重要代谢途径,可降解大多数种类的磷酸酯化合物^[6]。在 PD-AEP-1 基因组中,鉴定出了多个 C-P 键有机磷代谢相关基因,主要集中在 3 个基因簇中,其中两个基因簇各自分别组成了相对完整的 C-P 裂解酶途径,表明其很可能具有降解 C-P 键有机磷的能力。C-P 裂解酶途径是微生物降解 C-P 键有机磷的最主要途径之一,最初在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中被发现,因其由 *phnC-phnP* 等 14 个基因依次排布组成,因此被命名为“C-P”裂解酶途径^[49]。该途径中的 14 个酶分工合作,共同完成 C-P 键有机磷从运输到降解为磷酸盐的整个过程,其中 *phnF* 负责编码 *phn* 操纵子的阻遏蛋白,*phnCDE* 所编码蛋白负责 C-P 键有机磷的运输,*phnGHIJKL* 与 C-P 键裂解酶的活性直接相关,*phnNOP* 编码的蛋白则被认为是辅助蛋白^[50]。

PD-AEP-1 基因组中存在两个不同的 C-P 裂解酶途径,这种情况在施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)中也曾被报道^[51]。不同细菌中组成 C-P 裂解酶途径的基因个数及排列顺序可能会有所不同,比如 *P. stutzeri* 中两个 C-P 裂解酶途径中都不包含 *phnO*,其中一个同时没有 *phnP*。*Thiobacillus denitrificans* 中 *phnF* 并没有在 *phnE* 之后,而是分布于 *phnC* 上游,*Trichodesmium erythraeum* IMS101 的 C-P 裂解酶途径里不包含有 *phnF*、*phnN*、*phnO*、*phnP*,且其和 *T. denitrificans* 类似,有两个 *phnE*^[8]。

PD-AEP-1 中 C-P 裂解酶基因簇同样呈现了较为独特的特征,其中基因簇 I 含有两个 *phnE* 和两个 *phnM*,两个 *phnM* 并未连续排列,与 *T. erythraeum* IMS101 类似,其中并不包括 *phnO*、*phnP*。与这些基因排布在一起的,还包括一个编码未知功能蛋白 Atu0170 的基因,以及一个乙酰转移酶基因 *atf*。因为 *phnO* 就是一种乙酰转移酶^[52],推测 *atf* 扮演着与 *phnO* 类似的功能。基因簇 II 由 11 个基因组成,其中不含 *phnF*、*phnG*、*phnN*、*phnO*、*phnP*,但与 C-P 键有机磷的运输和裂解的主要基因以及 *atf* 都存在。在 *P. stutzeri* 中的两个 C-P 裂解酶途径都可降解甲基膦酸酯,且其中的“*phn* operon”还可降解氨基膦酸酯,然而两者均无法降解草甘膦及苯基膦酸酯(phenylphosphonate)^[51],而 PD-

AEP-1 中两种 C-P 裂解酶途径的底物范围如何,作用底物有何差别,仍有待于进一步探究。

4.4 *Yoonia* sp. PD-AEP-1 的促藻效应及其生态意义探究

在海洋生态系统中,浮游植物与海洋细菌存在协同共生、抑制、竞争等多种相互作用,这些相互作用在浮游植物的生存和增殖中起着重要作用^[53]。在藻类赤潮暴发和消亡过程中,藻类共生细菌被认为碳、氮、硫等元素的循环中都扮演着重要角色^[54]。在一些甲藻赤潮爆发过程中,藻细胞会增加具有黏附性的多糖的合成增强其与周围细菌群落的联系,以潜在促进维生素和营养盐的吸收^[55]。某些特定的细菌类群与一些赤潮的突然消亡密切相关,目前已有多种具有溶藻活性的细菌被分离和研究。从深圳沿海赤潮暴发海域表层海水中分离的一株 *Muricauda* 属细菌,可通过直接溶藻的方式有效抑制海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)的生长^[56]。Shi 等在东海原甲藻赤潮水样中分离出一株 *Alteromonas* 属的细菌,可降解东海原甲藻细胞壁中的多糖,具有明显的溶藻活性^[20]。然而,对于赤潮暴发过程中对赤潮藻生长具有促进作用的细菌,尤其是特定物种,相关的研究依然很少。

Johansson 等的研究发现, *Y. vestfoldensis* 可促进玛氏骨条藻的生长,尤其是在铁元素含量较低的环境中^[34]。但在本研究中,在磷酸盐限制条件下,细菌和 2-AEP 单独存在时都不能有效促进藻细胞的生长,表明两者单独存在时都不能为藻细胞提供磷源。“藻 + 2-AEP”条件与“藻 + 菌”条件下的藻细胞密度在前期均有小幅上升,其可能原因为,藻细胞在前期培养过程中,磷元素以外其他的营养成分,如氮、微量元素以及维生素等也处于较低水平,但在其加入新的培养体系后,这些营养成分获得了充足的补充,因此促进了藻细胞的小幅增长,但是由于磷元素的缺乏,因此两个条件下藻细胞密度都未获得持续的增长。“藻 + 2-AEP”条件藻细胞密度在后期显著高于“藻 + 菌”,其原因可能为尽管实验所用 2-AEP(Sigma-Aldrich, 纯度 99%)为市场上可获得最高纯度化合物,但并非 100% 纯化合物,其中含有少量的溶解活性磷污染。

然而在“藻 + 菌 + 2-AEP”条件下,藻细胞密度具有明显且持续上升的趋势,表明其获得了额外的磷元素,促进了藻细胞的生长。由于藻细胞培养体系中并没有 2-AEP 以外的磷源输入,因此推测,“藻 + 菌 + 2-AEP”条件中的 2-AEP 已被 PD-AEP-1 降解为磷酸盐,从而间接为藻细胞的生长提供了磷源。该条件下藻细胞的 APA 相对另外两个条件也显著降低。由于 AP 的

表达受到高磷酸盐浓度的抑制,APA 的上升是磷限制的重要指标^[5],其连续的下降表明,该条件下藻细胞已经脱离磷限制状态。与之对应的,磷酸盐浓度也略高于其他两个条件,但依然保持在较低水平。究其原因,尽管 2-AEP 被降解释放出了磷酸盐,但由于藻细胞的生长需要消耗大量磷酸盐,因此,磷酸盐释放出来之后很快即被藻细胞吸收,因此并没有持续升高。NPQ 在藻细胞处于磷限制状态时会显著升高,而在磷元素供应充足的情况下则相对较低^[26],而“藻 + 菌 + 2-AEP”条件的 NPQ 相对其他两个条件明显降低,也表明该条件藻细胞获得了额外的磷源供应。综上所述,PD-AEP-1 具有降解 2-AEP 的能力,其可将 2-AEP 降解为磷酸盐,并提供给藻细胞使用,使其解除了磷酸盐限制状态,并获得了明显的增长。Janßen 等通过宏基因组技术研究发现,在一个恒化培养系统中,当加入草甘膦之后, *Y. vestfoldensis* 的 *phnJ* 基因显著上升,表明与草甘膦的降解存在一定关联性^[57]。本研究的培养实验则直接证明,与其同属的 PD-AEP-1 具备降解 C-P 键有机磷的能力。

因此推测,在海洋环境中,通过具备可降解磷酸酯功能的共生细菌的分解作用,磷酸酯可作为东海原甲藻所需磷元素的重要来源之一。研究表明,2-AEP 不仅可作为磷源被细菌利用,也可为细菌提供碳源或氮源^[58],由于细菌对碳、氮的需求更多,当 2-AEP 被降解释放出相应比例的不同元素时,P 对于细菌会处于相对冗余状态,由于 C-P 裂解酶途径通常处于 Pho 调节子的调控之下,而 Pho 调节子通常会受到较高浓度磷酸盐的抑制,因此磷酸盐会对 2-AEP 的降解产生抑制作用。而当磷酸盐被与细菌共生的藻细胞快速吸收时,C-P 裂解酶途径的抑制会被解除,有助于细菌对 C-P 键有机磷的持续降解。

由于磷元素的矿化作用十分缓慢,加之浮游植物快速的吸收利用,在海洋表层海水中,磷酸盐浓度处于极低水平,与之相比,真光层中的溶解有机磷浓度相对更高^[2]。以大西洋北部及南部海域为例,DOP 在表层海水中的浓度范围为 40~300 nmol/L,在溶解总磷中占比高达 90%~99%^[59]。在最易暴发赤潮的两个真核浮游植物类群中,硅藻偏爱高营养盐的环境,甲藻则在低磷或高 N:P 比的环境中更为盛行^[60],表明其具有更为有效适应磷酸盐限制的策略。东海原甲藻在磷酸盐限制环境下所具有的种间竞争优势是其诱发和维持赤潮的重要因素^[61]。在赤潮暴发过程中,磷酸盐持续处于极低水平^[62],由于赤潮暴发过程中需要消耗大量的磷,DOP 可能是磷元素的主要来源。甲

藻可降解磷酸酯类化合物,却无法降解 C-P 键有机磷^[9,11],因此 C-P 键有机磷通过共生细菌间接被甲藻细胞作为磷源利用,可在磷酸盐和磷酸酯类化合物等常规磷源以外为赤潮物种提供额外的磷元素供应。综上所述,东海原甲藻共生细菌降解磷酸酯进而为其提供磷元素这一机制,在磷酸盐匮乏环境中东海原甲藻细胞的生长乃至赤潮爆发过程中,可能扮演着一定角色。

5 结论

本研究从东海原甲藻培养体系中共分离获得的细菌分布在 *Yoonia*、*Limnobacter*、*Roseivirga*、*Ponticoccus*、

Marinobacter 等 5 个属,以及 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲、鞘脂杆菌纲等 4 个纲。*Yoonia* sp. PD-AEP-1 具有多种与东海原甲藻共生相适应的特征,有合成 B 族维生素的潜在能力,并且存在两个较为独特但功能全备的 C-P 裂解酶途径。另外,该菌株可降解海洋中典型的磷酸酯化合物 2-AEP 并释放出磷酸盐,从而使得 2-AEP 间接被东海原甲藻细胞作为磷源使用,带来明显的促藻效应。研究结果拓展了对于甲藻共生细菌以及藻-菌相互作用的认识,并为将来进一步研究该机制在东海原甲藻适应磷酸盐限制环境乃至爆发赤潮的过程中扮演的角色奠定基础。

参考文献:

- [1] Tyrrell T. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production[J]. *Nature*, 1999, 400(6744): 525–531.
- [2] Karl D M. Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: new views of an old cycle[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2014, 6: 279–337.
- [3] Lin Senjie, Litaker R W, Sunda W G. Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton[J]. *Journal of Phycology*, 2016, 52(1): 10–36.
- [4] Kolowitz L C, Ingall E D, Benner R. Composition and cycling of marine organic phosphorus[J]. *Limnology and Oceanography*, 2001, 46(2): 309–320.
- [5] Lin Xin, Wang Lu, Shi Xinguo, et al. Rapidly diverging evolution of an atypical alkaline phosphatase (PhoA(aty)) in marine phytoplankton: insights from dinoflagellate alkaline phosphatases[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 868.
- [6] McGrath J W, Chin J P, Quinn J P. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(6): 412–419.
- [7] Gomez-Garcia M R, Davison M, Blain-Hartnung M, et al. Alternative pathways for phosphonate metabolism in thermophilic cyanobacteria from microbial mats[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(1): 141–149.
- [8] Dyhrman S T, Chappell P D, Haley S T, et al. Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*[J]. *Nature*, 2006, 439(7072): 68–71.
- [9] Whitney L P, Lomas M W. Phosphonate utilization by eukaryotic phytoplankton[J]. *Limnology and Oceanography Letters*, 2019, 4(1): 18–24.
- [10] Wang Cong, Lin Xin, Li Ling, et al. Differential growth responses of marine phytoplankton to herbicide glyphosate[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151633.
- [11] Cui Yudong, Lin Xin, Zhang Huan, et al. PhnW-PhnX pathway in dinoflagellates not functional to utilize extracellular phosphonates[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2016, 2: 120.
- [12] Yu Xiaomin, Doroghazi J R, Janga S C, et al. Diversity and abundance of phosphonate biosynthetic genes in nature[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(51): 20759–20764.
- [13] Dyhrman S T, Benitez-Nelson C R, Orchard E D, et al. A microbial source of phosphonates in oligotrophic marine systems[J]. *Nature Geoscience*, 2009, 2(10): 696–699.
- [14] Quin L D, Quin G S. Screening for carbon-bound phosphorus in marine animals by high-resolution 31P-NMR spectroscopy: coastal and hydrothermal vent invertebrates[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 128(1): 173–185.
- [15] Wang Cong, Lin Xin, Li Ling, et al. Glyphosate shapes a dinoflagellate-associated bacterial community while supporting algal growth as sole phosphorus source[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2530.
- [16] Quinn J P, Kulakova A N, Cooley N A, et al. New ways to break an old bond: the bacterial carbon-phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(10): 2392–2400.
- [17] Villarreal-Chiu JF, Quinn JP, McGrath JW. The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 19.
- [18] Richardson B, Corcoran A A. Use of dissolved inorganic and organic phosphorus by axenic and nonaxenic clones of *Karenia brevis* and *Karenia mikimotoi*[J]. *Harmful Algae*, 2015, 48: 30–36.
- [19] Shi Xinguo, Lin Xin, Li Ling, et al. Transcriptomic and microRNAomic profiling reveals multi-faceted mechanisms to cope with phosphate stress in a dinoflagellate[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(10): 2209–2218.
- [20] Shi Xinguo, Liu Lenian, Li Yue, et al. Isolation of an algicidal bacterium and its effects against the harmful-algal- bloom dinoflagellate

- Prorocentrum donghaiense* (Dinophyceae)[J]. *Harmful Algae*, 2018, 80: 72–79.
- [21] Parkhill J P, Maillat G, Cullen J J. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress[J]. *Journal of Phycology*, 2001, 37(4): 517–529.
- [22] Baker N R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 89–113.
- [23] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [24] Overbeek R, Olson R, Pusch G D, et al. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST)[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D206–D214.
- [25] Chun J, Oren A, Ventosa A, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 461–466.
- [26] Kim M, Oh H S, Park S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346–351.
- [27] Cui Yudong, Zhang Huan, Lin Senjie. Enhancement of non-photochemical quenching as an adaptive strategy under phosphorus deprivation in the dinoflagellate *Karlodinium veneficum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 404.
- [28] Oren A, Garrity G M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2021, 71(10): 005056.
- [29] 唐莹莹, 乔玉宝, 蒋志伟, 等. 东海产麻痹性贝毒链状亚历山大藻共附生菌群多样性研究 [J]. *海洋渔业*, 2018, 40(6): 720–727.
Tang Yingying, Qiao Yubao, Jiang Zhiwei, et al. Biodiversity study of the bacterial community associated with toxic marine dinoflagellate *Alexandrium catenella* LZ1706[J]. *Marine Fisheries*, 2018, 40(6): 720–727.
- [30] 龚诗雁, 屠燕萍, 谢志浩. 4株米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 藻际异养细菌的分离鉴定 [J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(5): 1099–1104.
Gong Shiyuan, Tu Yanping, Xie Zhihao. Molecular identification of four strains of heterotrophic bacteria isolated from *Karenia mikimotoi*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(5): 1099–1104.
- [31] 李月月, 田晓清, 韩清华, 等. 利玛原甲藻 PL11 共附生菌多样性研究 [J]. *海洋渔业*, 2020, 42(1): 73–81.
Li Yueyue, Tian Xiaoqing, Han Qinghua, et al. Biodiversity of symbiotic and epiphytic bacteria of *Prorocentrum lima* PL11[J]. *Marine Fisheries*, 2020, 42(1): 73–81.
- [32] Wirth J S, Whitman W B. Phylogenomic analyses of a clade within the roseobacter group suggest taxonomic reassignments of species of the genera *Aestuariivita*, *Citricella*, *Loktanella*, *Nautella*, *Pelagibaca*, *Ruegeria*, *Thalassobius*, *Thiobacimonas* and *Tropicibacter*, and the proposal of six novel genera[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(7): 2393–2411.
- [33] 曹延群, 李赞, 潘克厚, 等. 三角褐指藻藻液细菌的分离鉴定及其对藻细胞生长的影响 [J]. *海洋湖沼通报*, 2019(1): 107–112.
Cao Yanqun, Li Yun, Pan Kehou, et al. Isolation and identification of the bacteria from *Phaeodactylum tricorutum* and their effects on the growth of algal cells[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2019(1): 107–112.
- [34] Johansson O N, Pinder M I M, Ohlsson F, et al. Friends with benefits: exploring the phycosphere of the marine diatom *Skeletonema marinoi*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1828.
- [35] Buchan A, LeClerc G R, Gulvik C A, et al. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(10): 686–698.
- [36] 刘兵, 李宇, 叶倩, 等. 链状亚历山大藻共附生细菌多样性 [J]. *生态学杂志*, 2009, 28(5): 889–894.
Liu Bing, Li Yu, Ye Qian, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with dinoflagellate *Alexandrium catenella*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(5): 889–894.
- [37] 杨小茹, 苏建强, 郑小伟, 等. 基于分子技术的 1 株产毒藻藻际细菌多样性分析 [J]. *环境科学*, 2009, 30(1): 271–279.
Yang Xiaoru, Su Jianqiang, Zheng Xiaowei, et al. 16S rDNA clone library analysis of microbial diversity associated with the PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(1): 271–279.
- [38] 王鹏斌, 戴鑫烽, 陆斗定. 米氏凯伦藻 (Km02) 共培养细菌群落的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(3): 644–651.
Wang Pengbin, Dai Xinfeng, Lu Douding. Co-cultured bacterial community of *Karenia mikimotoi* (Km02)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(3): 644–651.
- [39] Wang Yuming, Zhou Panpan, Zhou Weicheng, et al. Network analysis indicates microbial assemblage differences in life stages of *Cladophora*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(3): e0211222.
- [40] Oppong-Danquah E, Blümel M, Tasdemir D. Metabolomics and microbiomics insights into differential surface fouling of three macroalgal species of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) that co-exist in the German Baltic Sea[J]. *Mar Drugs*, 2023, 21(11): 595.
- [41] 李斯远, 何治江, 吕泓玥, 等. 厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 养殖海域与天然生长海域的微生物群落比较研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2021, 52(1): 196–205.
Li Siyuan, He Zhijiang, Lv Hongyue, et al. Comparative study on microbial community in mussel *Mytilus coruscus* body and seawater of its natural and cultured sea area in Zhoushan, Zhejiang[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(1): 196–205.
- [42] Du Zongjun, Zhang Wanyi, Xia Hongjie, et al. Isolation and diversity analysis of heterotrophic bacteria associated with sea anemones[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010, 29(2): 62–69.

- [43] Huo Lixin, Ma Anran, Liu Hong, et al. Diversity and ecological assembly process of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a low irradiation area, three gorges reservoir[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2024, 143: 116–125.
- [44] Feng Xiaoyuan, Xing Peng. Genomics of *Yoonia* sp. isolates (family Roseobacteraceae) from Lake Zhangnai on the Tibetan Plateau[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(11): 2817.
- [45] Piontek J, Meeske C, Hassenrück C, et al. Organic matter availability drives the spatial variation in the community composition and activity of Antarctic marine bacterioplankton[J]. *Environmental Microbiology*, 2022, 24(9): 4030–4048.
- [46] Cruz-López R, Maske H. The vitamin B1 and B12 required by the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* can be provided by its associated bacterial community in culture[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 560.
- [47] Orchard E D, Benitez-Nelson C R, Pellechia P J, et al. Polyphosphate in *Trichodesmium* from the low - phosphorus Sargasso Sea[J]. *Limnology and Oceanography*, 2010, 55(5): 2161–2169.
- [48] Dyhrman S T, Ammerman J W, Van Mooy B A S. Microbes and the marine phosphorus cycle[J]. *Oceanography*, 2007, 20(2): 110–116.
- [49] Metcalf W W, Wanner B L. Evidence for a fourteen-gene, *phnC* to *phnP* locus for phosphonate metabolism in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1993, 129(1): 27–32.
- [50] Hove-Jensen B, Rosenkrantz T J, Zechel D L, et al. Accumulation of intermediates of the carbon-phosphorus lyase pathway for phosphonate degradation in *phn* mutants of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(1): 370–374.
- [51] White A K, Metcalf W W. Two C-P lyase operons in *Pseudomonas stutzeri* and their roles in the oxidation of phosphonates, phosphite, and hypophosphite[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(14): 4730–4739.
- [52] Errey J C, Blanchard J S. Functional annotation and kinetic characterization of *PhnO* from *Salmonella enterica*[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(9): 3033–3039.
- [53] Amin S A, Hmelo L R, Van Tol H M, et al. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria[J]. *Nature*, 2015, 522(7554): 98–101.
- [54] González J M, Simó R, Massana R, et al. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4237–4246.
- [55] Gong Weida, Browne J, Hall N, et al. Molecular insights into a dinoflagellate bloom[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(2): 439–452.
- [56] 史荣君, 黄洪辉, 齐占会, 等. 一株溶藻细菌对海洋原甲藻的溶藻效应 [J]. *生态学报*, 2012, 32(16): 4993–5001.
Shi Rongjun, Huang Honghui, Qi Zhanhui, et al. Algicidal activity against *Prorocentrum micans* by a marine bacterium isolated from a HABs area, South China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(16): 4993–5001.
- [57] Janßen R, Skeff W, Werner J, et al. A glyphosate pulse to brackish long-term microcosms has a greater impact on the microbial diversity and abundance of planktonic than of biofilm assemblages[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 758.
- [58] Kononova S V, Nesmeyanova M A. Phosphonates and their degradation by microorganisms[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2002, 67(2): 184–195.
- [59] Lomas M W, Burke A L, Lomas D A, et al. Sargasso Sea phosphorus biogeochemistry: an important role for dissolved organic phosphorus (DOP)[J]. *Biogeosciences*, 2010, 7(2): 695–710.
- [60] Xiao Wupeng, Liu Xin, Irwin A J, et al. Warming and eutrophication combine to restructure diatoms and dinoflagellates[J]. *Water Research*, 2018, 128: 206–216.
- [61] 王金辉, 黄秀清. 具齿原甲藻的生态特征及赤潮成因浅析 [J]. *应用生态学报*, 2003, 14(7): 1065–1069.
Wang Jinhui, Huang Xiuqing. Ecological characteristics of *Prorocentrum dentatum* and the cause of harmful algal bloom formation in China Sea[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(7): 1065–1069.
- [62] Zhou Jin, Richlen M L, Sehein T R, et al. Microbial community structure and associations during a marine dinoflagellate bloom[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1201.

Isolation of a phosphonate-degrading symbiotic bacterium from *Prorocentrum donghaiense* and its promoting effect on algal growth

Cui Yudong¹, Liu Honghuan¹, Chen Jinxue¹

(1. Fujian Province Key Laboratory for the Development of Bioactive Material from Marine Algae, College of Oceanology and Food Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362131, China)

Abstract: Phosphonates in the ocean are a kind of potential phosphorus (P) source which could be utilized by phytoplankton. Although dinoflagellates cannot directly utilize phosphonates themselves, their symbiotic bacteria

have the capability to degrade phosphonates into phosphate, thereby promoting the growth of algal cells. However, no studies focusing on a specific bacteria strain have been conducted thus far. In this study, *Prorocentrum donghaiense* was cultured under conditions with 2-Aminoethylphosphonic acid (2-AEP) as the sole P source. Isolation and purification of the symbiotic bacteria from the culture was conducted and five kinds of bacteria were obtained. Genome sequencing results revealed the presence of two types of C-P lyase pathways in the bacterial strain designated as *Yoonia* sp. PD-AEP-1. The function of the bacteria strain was verified through the co-culture of bacteria and algal cells. The results demonstrated that after the algal cells were treated to phosphorus-starved condition, when 2-AEP and the bacteria suspension were added together, as compared to conditions which only 2-AEP or the bacterial suspension of PD-AEP-1 was introduced, both the growth rate of algal cells and the phosphate concentration in the cultures showed a significant increase. Meanwhile, alkaline phosphatase activity and non-photochemical quenching of the algal cells decreased significantly, indicating that PD-AEP-1 has the ability to degrade 2-AEP into phosphate, thereby alleviating phosphorus limitation for *P. donghaiense* cells and effectively promoting the growth of algal cells. The study suggests that symbiotic bacteria of *P. donghaiense* might play a part in providing P sources to the algal cells through the degradation of phosphonates. This process could probably contribute to the outbreak of *P. donghaiense* bloom, highlighting the importance of algae-bacteria interactions in marine ecosystems.

Key words: phosphonates; *Prorocentrum donghaiense*; symbiotic bacteria; algal-growth-promoting effect; red tide