

蓝藻磷酸酯代谢及其生态意义研究进展*

彭思慧^{1**}, 黄淑敏^{1**}, 曾莹¹, 林立洲^{2,3}, 郑凌凌², 章颖⁴, 宋立荣², 束文圣¹, 李春连¹, 赵亮^{1,2***}

(1: 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州市亚热带生物多样性与环境生物检测重点实验室, 广州 510631)

(2: 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 中国科学院藻类生物学重点实验室, 武汉 430072)

(3: 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070)

(4: 浙江省越崎中学, 绍兴 312050)

摘要: 磷酸酯是新近发现的一类生物可利用磷, 其广泛存在于水生生态系统, 是水体有机磷库的重要组成部分, 构成水体磷氧化还原循环的关键环节。随着研究的深入, 越来越多的蓝藻菌株被证实参与磷酸酯的生物利用与合成, 有助于阐明其适应低磷环境的机制, 促进了对蓝藻磷策略与水体磷循环的全面理解, 具有重要的生态学意义。与此同时, 蓝藻对磷酸酯的利用性状, 使得磷酸酯作为环境污染物与蓝藻磷源的双重作用开始显现, 这会对水体浮游生物竞争格局的研究产生深远影响; 而蓝藻的甲基磷酸代谢也被认为是水体好氧甲烷发生的来源之一。本文回顾了蓝藻磷酸酯利用与合成的研究历史, 对目前蓝藻磷酸酯代谢过程生态风险与生态意义的研究进展进行了梳理, 并对这一领域未来发展趋势进行了评述。

关键词: 蓝藻; 蓝藻磷策略; 磷酸酯生物利用; 磷酸酯生物合成; 好氧甲烷发生

Advances on cyanobacteria phosphonate metabolism and its ecological significance*

Peng Sihui^{1**}, Huang Shumin^{1**}, Zeng Ying¹, Lin Lizhou^{2,3}, Zheng Lingling², Zhang Ying⁴, Song Lirong², Shu Wensheng¹, Li Chunlian¹ & Zhao Liang^{1,2***}

(1: Guangzhou Key Laboratory of Subtropical Biodiversity and Biomonitoring, Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, P.R. China)

(2: State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430072, P.R. China)

(3: Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, P.R. China)

(4: Yueqi High School, Zhejiang Province, Shaoxing 312050, P.R. China)

Abstract: As a group of newly identified bioavailable phosphorus sources, phosphonates are an important part of the aquatic organophosphorus pool and constitute a key component in the phosphorus redox cycle. In recent years, dozens of cyanobacterial strains have been demonstrated to participate in the utilization and biosynthesis of phosphonates, aiding in the understanding of how these strains are able to adapt to low concentrations of phosphate. The discovery of cyanobacteria phosphonate utilization promotes our

* 2022-04-16 收稿; 2022-05-26 收修改稿。

国家自然科学基金项目(31900090, 32270114, 3201101157)资助。

** 共同第一作者。

*** 通信作者; E-mail: zhaoliang@m.scnu.edu.cn。

knowledge of cyanobacterial phosphorus strategy and water phosphorus cycle. Intensive studies have shown the dual ecological role of phosphonates that serve both as a source of phosphorus and as a biocide for planktonics in aquatic ecosystems. They can damage the aquatic ecosystems by driving a selective decrease in phosphonate-sensitive portions with a corresponding increase in phosphonate-consuming cyanobacteria. On the other hand, cyanobacterial methylphosphonate catabolism is regarded as a promising mechanism of oxic methane production in the water. This paper reviewed the research history of cyanobacterial phosphonates utilization and biosynthesis. A summary of the research progress on the ecological risks and ecological significance of cyanobacterial phosphonates metabolism was also provided. Finally, we proposed comments on the future focus in this field.

Keywords: Cyanobacteria; cyanobacterial phosphorus strategy; phosphonate biodegradation; phosphonate biosynthesis; oxic methane production

对蓝藻水华形成与优势维持机理的解析,是高效水华防控与减灾的必要前提^[1-2]。在水生生态系统中,磷的循环是典型的沉积型循环,使磷元素成为水体最常见的生长限制因子^[3]。因此,磷的高效获取与利用,是维持水华和水体蓝藻巨大生物量的重要过程,也是学界关注的热点问题。 $+5$ 价的正磷酸盐是最易被浮游植物吸收利用的无机磷,故其亦成为水环境中最稀缺的磷形态^[4]。当无机磷耗尽时,蓝藻转而利用溶解性有机磷(dissolved organic phosphorus, DOP)^[5]。水体中的DOP主要由两类物质组成,即含磷酸酯键(C-O-P)的磷酸酯类化合物(phosphoester,图1A、B)与含有碳-磷键(C-P)的磷酸酯类化合物(phosphonate,图1C~E);其中磷酸酯类化合物可被生物高效利用供磷,而磷酸酯类化合物因其含化学结构稳定的C-P键,可抵抗各种水解、酶解与光分解等,常被归为生物不可利用磷^[5-9]。

在近些年的研究中,越来越多的微生物(包括数十株蓝藻)被证实可以分解磷酸酯,显示了磷酸酯作为生物替代性磷源的可能性,深化了对水体磷循环的认识^[7-15]。同时,磷酸酯在水环境中具有广泛来源,包括人工合成(如草甘膦、敌百虫等)与生物合成(如甲基膦酸)等,使其成为水体有机磷库的重要组成^[7-9,15-17]。随着研究的深入,磷酸酯的生态风险日益凸显,其可作为环境污染物与磷源影响水体浮游生物竞争格局^[18-24],而生物源的甲基膦酸亦可作为好氧甲烷生物发生的关键底物^[14-15,25-26]。此外,经过长期的水质管理,部分富营养化水体已呈现常态化无机磷限制,但仍可见蓝藻水华周期性暴发^[27]。作为广泛存在的生物可替代性磷源,磷酸酯在上述过程中发挥的作用值得深入探究。

本文从磷酸酯生物合成与分解机制出发,回顾了蓝藻磷酸酯代谢研究历史,对目前已有的蓝藻磷酸酯利用与合成研究进行梳理,并重点综述了蓝藻磷酸酯代谢过程生态风险与生态意义的研究进展;最后对本领域未来发展趋势进行了评述,以期对蓝藻水华形成与优势维持机理的研究探索新思路,为针对性控磷政策的制定提供理论依据。

1 磷与磷酸酯

有机磷酸酯是一类古老的分子,在原始的缺氧时期,其被认为是地球有机磷的主要形态^[28]。磷酸酯中的磷为 $+3$ 价,因此其亦构成了水体磷氧化还原循环中最主要的成分^[6,29]。

1.1 水环境中的磷酸酯

磷酸酯在水环境中广泛存在,在海洋环境中,磷酸酯可占DOP的 $10\% \sim 25\%$ ^[6,30-31];而在部分淡水水体中,DOP中磷酸酯可达 35% ^[32-33]。水体中的磷酸酯主要由生物合成产生,但也有相当一部分磷酸酯来源于人类活动。

1.1.1 人工合成的磷酸酯 1944年,Pikl合成了氨基甲基膦酸(aminomethylphosphonic),这是人类首次成功合成磷酸酯^[7]。自此,越来越多人工合成磷酸酯被应用于商业,包括制药、农业、造纸与环境等领域。例如,氨基三甲基膦酸是水处理过程中常用的絮凝剂,泰诺福韦(tenofovir)被用于I型艾滋病的治疗,三氯松(敌百虫)被用作杀虫剂,乙烯利被用作植物生长调节剂等^[7-9,34-35]。此外,人工合成磷酸酯还常作为阻燃剂与增塑剂等被广泛使用^[7-9]。

在所有人工合成的磷酸酯中,草甘膦(N-(膦酸甲基)甘氨酸,图1E)是最广泛使用的产品,占全球除草剂使用量的 25% ^[36]。美国每年至少有2万t膦以除草剂的形式被释放到环境中^[37],而我国2020年草甘膦产量已逾55万t^[38]。尽管草甘膦具有高效、低毒等特点,但其大规模使用会引发水体污染、危害人类健康,

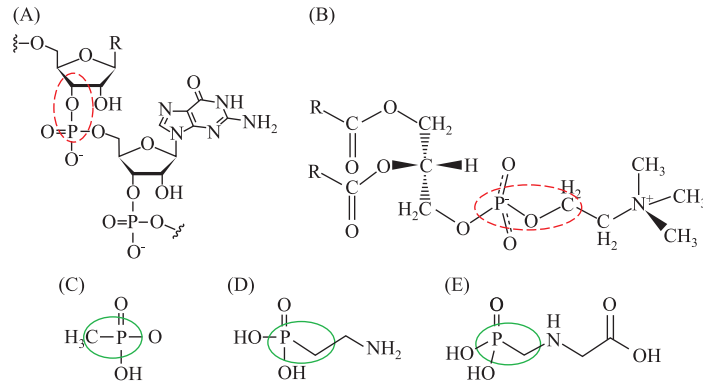


图 1 几种常见的磷酸酯(A:核酸;B:磷脂)与磷酸酯(C:甲基磷酸;D:2-氨基乙基磷酸;E:草甘膦)(图中红色虚线圈表示 C-O-P 键;绿色实线圈表示 C-P 键)

Fig.1 Formulas of several common phosphate esters (A: nucleic acid; B: phospholipids) and phosphonates (C: methyl phosphonic acid; D: 2-amino ethylphosphonic acid; E: glyphosate)
(The red dotted circle shows the C-O-P bond; the solid green coil shows the C-P bond)

已成为《生活饮用水卫生标准》(GB5749—2006)中严格控制的有机污染物,对其生态风险的研究也日趋深入。

1.1.2 生物源的磷酸酯及其生物合成 虽然科学家在 1944 年就已实现磷酸酯的人工合成,但直至 1959 年才首次鉴定到生物源的磷酸酯——2-氨基乙基磷酸(2-amino ethylphosphonic acid, 2-AEP),而 2-AEP 也被认为是野外丰度最高的生物源磷酸酯^[7]。目前人们已在不同的原始生物中鉴定出多种生物源磷酸酯,如从弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)中分离的抗生素磷霉素(fosfomycin),从产绿色链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)中分离的除草剂草胺膦(phosphinothricin)以及从海洋古菌 *Nitrosopumilus maritimus* 中分离的甲基磷酸等^[39-40]。上述磷酸酯常以胞外多糖、糖蛋白及磷脂的修饰基团或以抗生索的形式在生物中存在。磷酸酯基团的修饰,被认为可增加上述大分子的结构强度,以抵御磷酸酯酶解等^[7-9]。

虽然生物源磷酸酯结构多样,但是其生物合成途径却极其保守:其共享生物合成前体,即磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid, PEP)、磷酸丙酮酸(phosphopyruvate, PnPy)和磷酸乙醛(phosphonoacetaldehyde, PnAA)^[7-9]。在磷酸烯醇式丙酮酸变位酶(PEP mutase, PepM, EC 5.4.2.9)和磷酸丙酮酸脱羧酶(PnPy decarboxylase, Ppd, EC 4.1.1.82)的作用下,PEP 被转化为 PnAA,并形成 C-P 键^[7-9]。因此, *pepM* 也常作为磷酸酯生物合成能力筛选的标记基因;研究发现,10%的细菌编码该基因^[11]。PnAA 作为其他磷酸酯的前体,可用于广泛的产物合成。例如, PnAA 经过脱氢酶(PnAA dehydrogenase, Pdh)加氢形成羟乙基磷酸(hydroxyethylphosphonate, HEP),HEP 再经由 MPn 合成酶(MPn synthase, MpnS)转化形成甲基磷酸(图 2)^[16]。作为甲基磷酸合成的关键酶,研究发现 0.6%的海洋微生物含编码 MpnS 的基因,而这一丰度被认为可维持水体表层的高甲基磷酸浓度,以解释水体表面甲烷的超饱和现象^[16]。

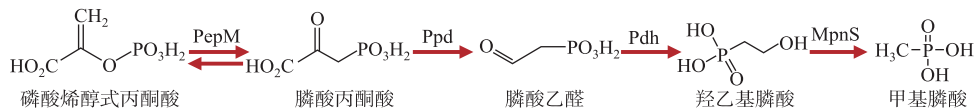


图 2 甲基磷酸生物合成通路

Fig.2 A biosynthetic pathway for methyl phosphonate synthesis

1.2 磷酸酯的生物利用

1963 年,Zeleznick 等首次发现大肠杆菌(*Escherichia coli*)可分解甲基磷酸或乙基磷酸供磷^[41],但当时并

未阐明其利用机制。La Nauze 与 Rosenberg 发现蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的细胞提取物可降解 2-AEP^[42]; 而 Lacoste 与 Neuzil 则进一步证实 2-AEP 的分解是由氨基转移与 C-P 键断裂两个步骤组成^[43]。到目前为止, 已发现三类磷酸酯生物利用途径, 包括非底物特异的 C-P 键裂解酶 (C-P lyase) 途径和与底物特异的氧化裂解与水解裂解途径。其中, 氧化裂解途径主要指特异性裂解 2-AEP 的磷酸酯加氧酶通路 (phosphonate oxygenase, PhnY⁺Z); 水解裂解途径包括磷酸丙酮酸水解酶 (PnPy hydrolase, PalA) 通路、磷酸乙酸水解酶 (PnAA hydrolase, PhnX) 通路和磷酸乙酸水解酶 (phosphonoacetate hydrolase, PhnWAY) 通路; 上述通路的具体催化过程, 在文献[7-9]中有详细描述, 此处便不再赘述。

在上述磷酸酯利用途径中, C-P lyase 途径是目前研究最为透彻的通路^[7-9], 已发现其可代谢至少 25 种磷酸酯底物^[8]。该通路主要由磷酸酯降解 (phosphonate degradation, *phn*) 基因簇完成, *phn* 基因簇由磷酸酯转运蛋白基因 (*phnC-E*)、调节子基因 (*phnF*)、C-P lyase 复合体基因 (*phnG-M*) 与辅助基因 (*phnN-P*) 等组成^[7-9]; 磷酸酯的裂解, 首先由核苷酸磷酸化酶 PhnI 执行, 在 PhnGHL 存在的情况下, PhnI 催化磷酸基取代 ATP 的腺嘌呤形成三磷酸酯; 后者经由磷酸水解酶 PhnM 作用, 水解生成无机焦磷酸盐与 5-磷酸核糖-1-磷酸酯; 该磷酸酯再作为底物被 PhnJ 作用, 经腺苷甲硫氨酸依赖过程裂解 C-P 键, 并生成相应的烷烃与 5-磷酸核糖-1,2-环状磷酸酯。

2 蓝藻磷酸酯利用与合成研究简史

作为水生生态系统中最重要原核生物类群之一, 蓝藻也被证实广泛参与磷酸酯的生物合成与分解代谢。相关研究成果深化了对蓝藻磷策略的认识, 促进了对水体磷循环的全面理解。

2.1 蓝藻磷酸酯生物利用的研究进展

1991 年, Orús 与 Marco 对蓝藻降解敌百虫过程进行追踪, 发现无菌蓝藻培养液可快速清除敌百虫; 但其后续研究中发现, 无细胞培养液和蓝藻培养液中的敌百虫降解情况无明显差异, 因此排除了蓝藻对该磷酸酯降解的贡献^[44]。Ravi 则发现在磷限制条件下多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) ACA 101 可分解草甘膦供磷, 并提出可能是胞外碱性磷酸酶参与 C-P 键的裂解^[45]。随后, Palenik 等发现聚球藻 (*Synechococcus*) WH8102 可以磷酸酯为唯一的磷源维持细胞生长, 并在其基因组中鉴定到了磷酸酯转运蛋白基因^[46]。

在 2006 年, Dyhrman 等在海洋固氮蓝藻红海束毛藻 (*Trichodesmium erythraeum*) IMS101 基因组中鉴定到 *phn* 基因簇, 这是首次明确蓝藻磷酸酯利用的遗传基础^[10]。在上述工作中, 作者比较了 9 株海洋蓝藻基因组 (包括原绿球藻 *Prochlorococcus*、聚球藻与鳄球藻 *Crocospaera* 等), 发现仅 IMS101 编码 *phn* 基因簇, 提出该性状可使束毛藻在低磷条件下获得额外竞争优势; 系统发育分析显示该基因簇极有可能通过水平基因转移获得, 并在野外水体中鉴定到束毛藻磷酸酯转运蛋白基因 (*phnD*) 与 C-P 裂解酶基因 (*phnJ*) 的较高丰度表达, 表明磷酸酯利用在束毛藻增殖过程中持续发挥积极作用; 这一成果也开启了后续一系列蓝藻磷酸酯利用的研究^[10]。表 1 总结了目前已报道的、经实验验证的可利用磷酸酯的蓝藻藻株。

2.2 蓝藻磷酸酯生物合成的研究进展

Dyhrman 等发现两株红海束毛藻藻株 (IMS101 与 ST6-5) 可合成磷酸酯, 其含量可占细胞总颗粒磷的 8%~17%, 该研究也是首次经实验确认浮游原核生物可以自主合成磷酸酯; 作者认为束毛藻可能是海洋贫营养区磷酸酯的主要来源, 并提出磷酸酯在海水中的积累会驱动浮游生物群落向磷酸酯利用细菌转变, 进一步影响海洋碳、氮、磷循环^[55]。在 2022 年, Acker 等报道了一株原绿球藻 SB 可自主合成磷酸酯, 且磷酸酯可占逾 40% 的细胞总磷; 通过单细胞基因组测序与分析, 作者确定磷酸酯合成功能在原绿球藻与海洋浮游细菌主要类群 SAR11 中广泛分布^[56]。

3 基因组学助力磷酸酯代谢蓝藻的挖掘

基因组测序技术的发展带来了蓝藻基因组数据量的井喷^[57-58], 也为磷酸酯生物代谢与生物合成蓝藻的挖掘提供了坚实的数据基础。

表 1 已发表的经实验验证可利用磷酸酯的蓝藻藻株汇总

Tab.1 Summary of experimentally confirmed cyanobacterial strains that are capable of phosphonate utilization

蓝藻物种	株系	磷酸酯利用情况 ^a						含 <i>phn</i> 基因簇	参考文献
		MP _n	EP _n	2-AEP	草甘膦	AMPA	HMP _n		
<i>Anabaena</i> sp.									
	FACHB-418/PCC 7120	-			?			是	[15,47]
<i>Anabaena variabilis</i>									
	ACA 101				+			未知	[45]
	ATCC 29413/PCC 7937						+	未知	[48]
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>									
	FACHB-1096			+	-			是	[49-51]
<i>Leptolyngbya boryana</i>									
	PCC 6306				+			否	[47]
<i>Microcystis aeruginosa</i>									
	FACHB-905				+			否	[20,22]
	PCC 7806	-			+			否	[15]
	PCC 7941				+			否	[47]
	strain 205			+	+			未知	[50]
<i>Nodularia spumigena</i>									
	UHCC 0039	+	+	-				是	[14]
	UHCC 0060	+	-	+				是	[14]
<i>Nostoc</i> sp.									
	FACHB-892	+			-			是	[15]
<i>Nostoc flagelliforme</i>									
	FACHB-838	+			+			是	[15]
<i>Nostoc punctiforme</i>									
	PCC 73102				+			否	[47]
<i>Oscillatoria tenuis</i>									
	FACHB-1052	+			-			是	[15]
<i>Planktothrix agardhii</i>									
	PCC 7811				+			未知	[18]
<i>Pseudanabaena</i> sp.									
	PCC 6802	+			-			是	[15]
<i>Prochlorococcus marinus</i>									
	MIT9301	+					+	否	[52]
<i>Synechococcus</i>									
	ARC-11			+	+	-		未知	[53]
	ARC-21			+	+	-		未知	[53]
	OS-A	+	+	+				否	[12]
	JA-2-3B' a (2-13)/OS-B' ^c	+	+	+				是	[12]
	LS0512			+	+	-		未知	[53]
	WH8102			+		-		否	[53]
<i>Trichodesmium erythraeum</i>									
	IMS101	+	+	+				是	[54]

a: 本表所统计藻株至少可利用一种磷酸酯, 未统计阴性结果; MP_n, 甲基磷酸; EP_n, 乙基磷酸; 2-AEP, 2-氨基乙基磷酸; AMPA, 氨甲基磷酸; HMP_n, 羟甲基磷酸 (hydroxymethylphosphonate); DTPMP, 二乙烯三胺五甲叉磷酸 (diethylenetriaminepenta(methylenephosphonic acid)); b: 两篇文献结果存在差异: 文献[15]显示该藻株无法利用草甘膦; 文献[47]显示该藻株可以利用草甘膦; c: 该藻株刚分离时无法利用磷酸酯; 经过短期驯化后可高效利用磷酸酯。

3.1 基于基因组比对的蓝藻门磷酸酯利用功能调查

Willis 等对 9 株水华蓝藻拟柱孢藻 (*Cylindrospermopsis raciborskii*) 进行基因组测序分析, 发现所有藻株均编码 *phn* 基因簇^[13]。同年, Teikari 等对 NCBI 数据库中 500 株蓝藻基因组进行 *phn* 基因簇搜索, 共发现 28 株蓝藻编码该基因簇, 覆盖拟柱孢藻、鱼腥藻、束毛藻与节球藻 (*Nodularia*) 等常见水华蓝藻属^[14]。笔者团队在前期完成中国科学院水生生物研究所淡水藻种库 160 株蓝藻基因组测序的基础上^[58], 于 2020 年 6 月结合 NCBI 数据库中 2408 个蓝藻基因组, 对蓝藻门 *phn* 基因簇的分布进行了全面调查^[15]。结果显示, 总共 31 属 151 株蓝藻基因组编码 *phn* 基因簇 (包括 37 株淡水藻种库蓝藻, 其基因簇结构如图 3 所示), 其中 9 个属为首次报道含该基因簇; 后续分析蓝藻表型与 C-P 裂解酶基因 *phnJ* 系统发育的相关性发现, 大部分 (141/151=93.4%) 含该基因簇的蓝藻为丝状藻, 仅 8 株为单细胞蓝藻, 且未见微囊藻或原绿球藻编码该基因簇 (图 4); 此外, 我们验证了 5 株含 *phn* 基因簇蓝藻 (表 1) 利用磷酸酯的能力, 确定 4 株蓝藻可高效分解甲基磷酸供磷, 这表明蓝藻 *phn* 基因簇的编码与确切的磷酸酯利用能力存在较强相关性^[15]。Acker 等在构建完成海洋浮游微生物单细胞基因组测序数据集基础上, 对其中蓝藻的磷酸酯生物利用途径进行调查, 确定了 2-AEP 特异性的磷酸酯加氧酶通路 (PhnY * Z) 在海洋蓝藻的广泛分布^[56]。

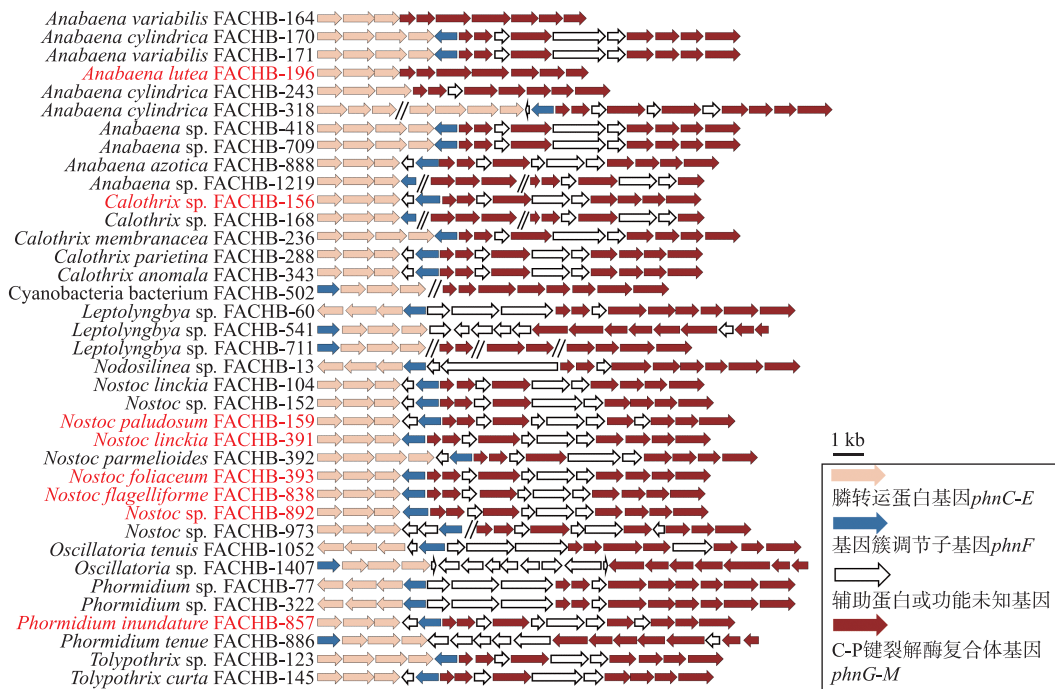


图 3 中国科学院水生生物研究所淡水藻种库 37 株蓝藻基因组中 *phn* 基因簇结构示意图

(红色字体表示该藻株同时编码参与磷酸酯生物合成的 *pepM* 与 *ppd* 基因^[15]。

箭头方向表示基因簇内各基因方向)

Fig.3 The *phn* gene cluster schematics of 37 identified cyanobacterial strains from the Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology (FACHB), Chinese Academy of Sciences (strains in red font indicate their encoding of *pepM* and *ppd* genes which are responsible for phosphonate biosynthesis^[15]). The arrows' direction represent the direction of each gene in the clusters of each strain)

3.2 基于基因组比对的蓝藻门磷酸酯合成能力调查

目前,对磷酸酯合成蓝藻挖掘的研究较为缺乏。笔者团队基于上述 2568 个蓝藻基因组数据集,通过

PepM 与 Ppd 蛋白同源比对,确定 13 属 81 株蓝藻编码上述基因,其中 7 属 11 株藻同时编码 *phn* 基因簇(图 4)。在潜在的磷酸酯合成藻株,可见念珠藻(*Nostoc*)、鱼腥藻、浮丝藻(*Planktothrix*)与眉藻(*Calothrix*)等蓝藻属;其中 79 株为丝状蓝藻,显示了丝状藻在磷酸酯代谢中的重要作用^[15]。而 Acker 等则通过 PepM 蛋白保守结构“EDK(X)5NS”比对,发现原绿球藻属、节旋藻属(*Arthrospira*)与细鞘丝藻属(*Leptolyngbya*)部分藻株也编码该基因,并通过实验确定原绿球藻 SB 藻株可自主合成磷酸酯,进一步拓宽了磷酸酯合成蓝藻的范围^[56]。

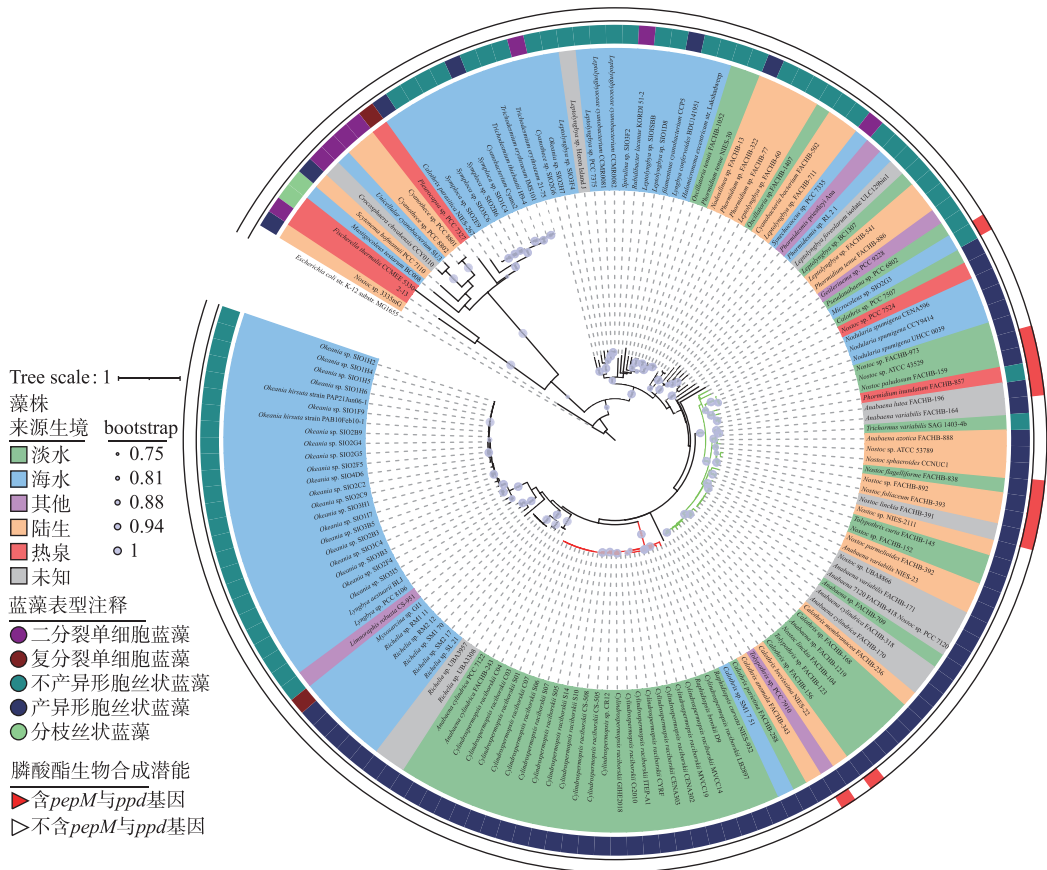


图 4 151 条蓝藻 C-P lyase 基因 *phnJ* 最大似然法系统发育树(以大肠杆菌菌株 MG1655 基因组 *phnJ* 基因为外类群。圆圈从外到内依次为:磷酸酯生物合成潜能注释、蓝藻表型注释、藻株来源生境注释^[15])

Fig.4 The maximum likelihood phylogenetic tree of *phnJ* gene sequences from 151 strains identified as carrying a *phn* gene cluster (Rings shown from outer to inner are: the presence of genes involved in phosphonate biosynthesis, annotation of cyanobacteria morphological subsections, and habitat classification^[15])

4 蓝藻磷酸酯代谢的生态意义

磷酸酯生物利用与合成蓝藻的发现,明确了磷酸酯的蓝藻可利用性,确认了蓝藻在磷氧化还原循环中的重要作用,促进了对磷生物地球化学循环的全面认识^[10]。同时,基于绝大多数蓝藻^[14-15,56]与真核藻类(目前仅记录一株绿藻与一株金藻可代谢磷酸酯)^[59]无法利用磷酸酯的事实,磷酸酯(包括生物源与人工源)在水体中的积累,改变了水生生态系统有机磷库的组成,也必然会驱动浮游生物竞争格局的改变,存在一定的生态风险。此外,草甘膦的大量使用已对水生生态系统产生深远影响,而部分蓝藻藻株可利用草甘膦的特

性是评估这一影响的关键性状。本节同时对这一领域进展进行梳理。

4.1 蓝藻磷酸酯利用的生态意义及生态风险

4.1.1 蓝藻磷酸酯利用的生态意义 研究发现,*phn* 基因簇的表达受低磷条件诱导,并受 PhoB/R 双组分系统调控^[7]。因此,蓝藻磷酸酯的利用被认为是藻株对低磷生境的适应性演化^[10]。当水体无机磷耗尽时,多数蓝藻可通过合成碱性磷酸酶水解胞外有机磷酸酯供磷,这也是最为人熟知的蓝藻磷策略之一^[4-5]。在这种情况下,利用 DOP 中剩余难转化的磷酸酯部分,将赋予这些藻株额外的竞争优势,而这一策略也被证实存在于自然水体中广泛存在^[10-15]。如 Dyhrman 等在 3 份海洋水样中的 2 份发现了束毛藻 *phnD* 与 *phnJ* 基因的高效表达^[10];Ilikchyan 等建立了基于 RT-PCR 的聚球藻与原绿球藻 *phnD* 定量方法,发现聚球藻相关基因的表达丰度与深度及水体磷浓度存在相关性,而原绿球藻 *phnD* 的表达量在所有样本中趋于恒定^[60];Ilikchyan 等同时还确定了两种藻 *phnD* 基因的表达量在马尾藻海的季节变化模式^[61];Feingersch 等则通过对全球海洋调查宏基因组数据集分析,确定原绿球藻是海洋表层磷酸酯生物利用的主要贡献者^[62];Teikari 等也观察到水华蓝藻泡沫节球藻 (*Nodularia spumigena*) 相关基因在波罗的海的广泛表达^[14]。上述结果,或许能部分解释这些蓝藻种类在相关生境的优势地位。

相比之下,淡水生境中相关研究较为缺乏。Ilikchyan 等通过相同的方法在美国伊利湖 (Erie Lake) 等数个淡水水体检测到聚球藻 *phnD* 基因的表达^[60]。笔者团队基于 151 条蓝藻 *phnJ* 基因数据集,分别设计了针对拟柱孢藻 (图 4 红色进化枝) 与部分念珠藻目 (Nostocales, 图 4 绿色进化枝) *phnJ* 基因的荧光定量 PCR 引物,确定相关基因在广东大沙河水库的拟柱孢藻水华样品中丰度较高。同时,在已公布的 25 株拟柱孢藻基因组中的 23 株编码 *phn* 基因簇,也暗示该性状在拟柱孢藻增殖过程中的保守性与重要性^[15]。

4.1.2 蓝藻磷酸酯利用的生态风险 拟柱孢藻是热带与亚热带地区最常见的淡水水华蓝藻类群。Bai 等发现,尽管铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) strain 205 与拟柱孢藻 FACHB-1096 均可高效利用 2-AEP,但在两株藻以 2-AEP 为唯一磷源共培养时,在设置的 3 种起始浓度下 (25:75, 50:50, 75:25),拟柱孢藻 FACHB-1096 均在实验结束时成为优势种^[50]。笔者团队则利用转录组测序手段,对念珠藻 (*Nostoc* sp.) FACHB-892 甲基磷酸利用过程进行追踪,发现甲基磷酸可使细胞从缺磷条件下恢复并维持细胞稳态;同时观察到了一个缺磷条件下被抑制的非核糖体多肽合成基因簇 (常与蓝藻藻毒素合成相关),在甲基磷酸添加之后正常表达。因此,作为一种广泛存在的磷源与环境污染物质,磷酸酯在驱动特定蓝藻水华暴发与藻毒素合成过程中的生态风险应当获得足够重视与深入研究^[15]。

4.1.3 蓝藻草甘膦利用的生态风险 草甘膦是一种被广泛使用的广谱除草剂,其作为甘氨酸类似物,可通过抑制 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, EPSPS),导致莽草酸途径中芳香族氨基酸的生物合成受到抑制,进一步影响必需蛋白质和次生代谢产物的合成,阻碍植物和微生物的生命能量途径^[36,47]。随着其大量使用,草甘膦通过直接喷洒、风流、地表径流与地面冲刷等方式进入水环境,目前已在多数水体检测到草甘膦及其代谢产物氨基甲基磷酸 (aminomethylphosphonic acid, AMPA) 的存在^[18-24,63]。

通常观点认为,草甘膦及其衍生物对水生生态系统存在双重影响,同时作为磷源与除草剂存在。早在 1991 年,科学家便发现蓝藻对草甘膦的普遍耐受^[64],这种抗性应与其抗草甘膦 EPSPS 酶结构及草甘膦代谢能力相关^[45,65]。研究发现大部分蓝藻具有草甘膦耐受能力;而包括绿藻与硅藻在内的真核藻类,被证实对草甘膦敏感。如 Vera 等^[19]与 Pérez 等^[21]在室外建造与自然湖泊特征形似的人工池塘,比较添加草甘膦和不添加草甘膦池塘中的淡水微生物群落结构,其实验结果表明商用草甘膦的添加会导致优势群落从对草甘膦敏感的绿藻和硅藻转变为可利用草甘膦的蓝藻 (以超微蓝藻为主)。Huntscha 等则发现 Lake Greifensee 水体中草甘膦与 AMPA 的快速消耗伴随着蓝藻数目的快速上升^[23]。在 2020 年,Berman 等为确定草甘膦的使用对自然水体浮游植物群落的影响,调查了南美大草原地区 (使用草甘膦超过 30 年) 52 个湖泊和巴塔哥尼亚地区 (几乎没有草甘膦使用历史) 24 个湖泊,结果显示,持续的草甘膦使用几乎对蓝藻没有毒性作用,反而促进了可利用草甘膦的超微蓝藻生长;草甘膦的损耗和蓝藻的增长发生在相似的时间,而这一过程也对该地区蓝藻水华的发生产生了潜在影响^[24]。

从表 1 中不难发现,蓝藻对草甘膦的可利用性与其是否编码 *phn* 基因簇关系不大。尽管目前已证实草

甘磷与 AMPA 的生物降解主要归因于 C-P lyase 途径与 phnWAY 途径,但这并不足以解释表 1 中多数藻株的草甘磷利用能力。后续对这些藻株草甘磷及 AMPA 利用机制的全面解析,是准确评估草甘磷之于水生生态系统风险的基础与前提。

4.2 蓝藻磷酸酯代谢与水体磷循环

目前对磷酸酯生物学功能的解析尚不充分,常认为其作为修饰基因维持生物大分子结构稳定性或作为抗生素等次级代谢产物存在。如 Acker 等发现磷酸酯生物合成能力在海洋原绿球藻的广泛存在,同时细胞又分配高达 40% 的磷用于磷酸酯合成,表明其参与了原绿球藻关键生物过程;进一步对磷酸酯合成蓝藻的分布特征研究发现,其相对丰度在低营养的表层水体较低并随着深度增加而上升,至营养相对丰富的深层叶绿素最大层(deep chlorophyll maximum layer)到达峰值,提出蓝藻磷酸酯的合成是在相对富营养条件下的一种生存策略;同时考虑到捕食者与病毒在该层的高丰度,作者更倾向于认为磷酸酯作为生物大分子的修饰基因,使原绿球藻抵御浮游动物捕食与病毒侵染^[56]。

同时,Acker 等也尝试通过实验否定磷酸酯合成作为蓝藻额外磷库的假设,其对无菌原绿球藻 SB(可合成磷酸酯但无磷酸酯利用通路)磷饥饿过程中的磷酸酯含量进行追踪,发现随着磷饥饿的深入原绿球藻选择合成更多的磷酸酯而非消耗原有磷酸酯;同时,作者发现尽管磷酸酯分解代谢与合成代谢功能在原绿球藻中广泛存在,但极少有藻株同时具备这两个功能,进一步佐证了其观点^[56]。上述观点更多停留在细胞生物学层面,而未从宏观的磷循环角度解释。在生物的生长过程,磷元素被用于各类有机物的合成;而当生物死亡分解时,细胞物质重新释放入环境,有机物可被生物利用进入另一轮的细胞生长,周而复始。而磷酸酯被同一类群具有分解代谢功能的部分利用,或被共生类群中具有分解代谢功能的部分利用,同样可以维持种群或共生群落的生长与增殖。比如,在我们的研究中发现,尽管同时拥有磷酸酯分解代谢与合成代谢功能的藻株数目较少(仅 7 属 11 株)^[15],但我们常可在野外水体观察到分解代谢优势类群与合成代谢优势类群的共存,如拟柱孢藻属^[66]、浮丝藻属^[66]、Okeania 与 Moorea^[67]等。总的来说,蓝藻的磷酸酯利用不仅是为其自身供磷的过程,还维持了活跃的磷氧化还原循环,对生态系统的能量流动与物质循环有重要意义。因此,蓝藻磷酸酯生物合成驱动的水体有机磷库组成与浮游生物群落变化,以及这一过程对水体磷循环的影响值得进一步探究。

5 蓝藻甲基磷酸代谢与水体好氧甲烷发生的潜在关系

在所有蓝藻磷酸酯代谢生态风险中,最受关注的则是甲基磷酸代谢对水体好氧甲烷发生的潜在贡献。水生生态系统贡献了全球近一半的甲烷排放,对其内部甲烷发生机制的全面解析是实现“双碳”目标的关键一环^[68]。通常认为,甲烷的生物发生是基于产甲烷古菌(细菌)在严格厌氧条件下完成,甲烷在水体厌氧底层产生之后向上迁移,此过程伴随着甲烷的微生物氧化,其浓度应从底层到表层逐渐降低^[69-71]。但野外观察发现,水体次表层存在甲烷过饱和现象,这一现象被称为甲烷悖论(methane paradox),暗示该水层存在好氧的甲烷发生过程^[25-26,72-78]。尽管目前该过程对全球甲烷排放的具体贡献仍存在争议^[79-81],但好氧甲烷发生又是切实发生并被频繁观察到的^[25-26,72-79]。目前已被证实的好氧甲烷发生机制包括可溶性有机物的光催化产甲烷^[81-83]、特殊底物的生物脱甲基作用产甲烷^[25-26,74]、藻类光合^[75,84]和固氮作用^[85]等。其中蓝藻的甲基磷酸利用也被认为是水体好氧甲烷发生的可能来源之一^[25-26,74]。

Karl 等发现,添加甲基磷酸的海洋原水可高效产生甲烷。通过培养实验证实束毛藻在海水代谢甲基磷酸产甲烷过程中发挥重要作用^[25]。Teikari 等对两株泡沫节球藻进行甲烷排放模式研究,发现两株蓝藻均可高效产生甲烷,并确定其积累模式为线性^[14]。笔者团队对 3 株蓝藻的甲基磷酸代谢过程进行追踪,确定在整个生长周期体系均可高效代谢甲基磷酸释放甲烷,同时正磷酸盐的添加可大幅降低甲烷排放速率。而模拟 12 h:12 h 昼夜比的 36 h 甲烷积累实验显示,产甲烷多集中于光周期,在夜晚则减弱。上述结果与已报道的多个好氧甲烷发生特性一致,暗示了蓝藻的磷酸酯利用对水体好氧甲烷发生的贡献^[15]。

表 2 总结了部分已发表的好氧甲烷发生研究中对蓝藻参与度的评述。从表中不难发现,不同文献中的主要结论可能存在矛盾,这也体现了好氧甲烷发生机制的多样性与复杂性。总的来说,水生生态系统中好氧甲烷的发生应该是多种生物参与、多机制的整合结果,这些机制随着水体类型的不同、环境因素的差异会

出现不同的组合变化。而基于蓝藻的磷酸酯利用在这一过程中持续发挥着积极的作用。对该过程甲烷排放模式与通量的具体解析将有助于水生生态系统产甲烷机制的全面认识。另一方面,全球气候变化被认为是蓝藻水华暴发频次与强度增加的驱动因子之一,而如果水华蓝藻可以通过代谢水体中广泛存在的甲基磷酸产生甲烷,那么这一过程必将正反馈于全球变暖^[1-2]。因此对这一过程的持续追踪不仅有助于解析蓝藻水华发生机理,也将推动蓝藻水华生态风险的全面评估。

表 2 部分已发表的好氧甲烷发生研究中对蓝藻参与度评述

Tab.2 Participation of cyanobacteria in published filed observations on oxic methane production

研究地点	研究方法	蓝藻相关评述与主要结论	参考文献
支持蓝藻甲基磷酸代谢对水体好氧甲烷发生贡献的研究			
德国 Stechlin 湖	原位观测 原水培养	1. 甲烷过饱和现象在氧饱和度较高的水体上层广泛存在;甲烷最大浓度与氧过饱和层重合(6 m 水深); 2. 野外观察显示,甲烷发生与蓝藻密切相关;而实验室观察则表明,除了与蓝藻相关,其他真核藻类藻际附生的产甲烷古菌也与甲烷发生相关; 3. 原水培养与原水接种藻类处理均可在好氧条件产生甲烷,且这种产生与无机磷酸盐或甲基化合物的添加相关。	[72]
德国 Stechlin 湖	原位观测 原水培养	1. 好氧甲烷发生与水体溶解性活性磷浓度呈负相关; 2. 在主要的浮游植物类群中,蓝藻与原位甲烷浓度呈正相关性且相关性最强,表明蓝藻在好氧甲烷发生过程中的关键作用; 3. 同位素标记结果显示,碳酸氢根被转化为甲烷;甲烷发生速度白天高于夜晚;甲烷的发生与光合作用存在很强相关性。	[75]
日本 14 个淡水湖泊	原位观测 原水培养	1. 原位好氧甲烷发生在大型深水寡营养湖泊广泛发生; 2. 好氧甲烷发生在热分层使其与蓝藻(尤其是聚球藻)的季节性丰度变化显著相关; 3. 原水培养结果显示,甲基磷酸的添加可高效产生甲烷;正磷酸盐的添加,会终止该体系的甲烷发生。	[26]
不支持或否定蓝藻甲基磷酸代谢对水体好氧甲烷发生贡献的研究			
加拿大 Lac Cromwell	野外围隔	1. 甲烷的生成可能由乙酰分解驱动,并与表层初级生产力相关; 2. 由于蓝藻在实验水体中的缺失(相对丰度<3.5%),排除了蓝藻产氢驱动的氢营养型甲烷发生与蓝藻去甲基甲烷发生的贡献。	[73]
美国约塞米蒂国家公园 5 个高海拔湖泊	原水培养	1. 无论是否添加甲基磷酸底物,实验水样均可高效产生甲烷; 2. 甲烷的产生与叶绿素代谢和蓝藻的光合作用有关; 3. 该产甲烷机制并不局限于蓝藻,因为大多数原叶绿素酸酯还原酶基因与叶绿素酸酯 a 还原酶基因由 β -变形菌编码; 4. 大量共存且广泛分布的细菌群落与代谢通路贡献于水生生态系统好氧甲烷发生。	[76]
中国新安江	原位观测 原水培养	1. 在 2020 年 8 月高温导致蓝藻水华时,水体甲烷浓度较高; 2. 甲烷饱和度与叶绿素浓度显著相关,且在培养过程中有明显的甲烷积累,表明藻类对好氧水体甲烷发生的潜在贡献; 3. 少淤泥的砾石底质城市好氧河流是甲烷潜在排放源;浮游植物和人类活动共同影响此类河流水体甲烷浓度。	[77]

6 研究展望

生物利用磷酸酯的生态意义不仅局限于磷循环;如 Gomez-Garcia 等^[12]发现,聚球藻代谢甲基磷酸产生的甲烷,可被藻细胞用作碳源以维持生长,从而参与碳循环;Chin 等^[86]发现了一条非磷限制依赖的 2-AEP 特异性利用通路,显示该磷酸酯可能作为氮源维持生物生长;在 2021 年,Murphy 等^[87]则发现一个非氮磷浓度依赖型 2-AEP 特异性转运蛋白复合体,提出 2-AEP 是可能水体初级生产者重要的氮源与磷源。因此,后

续研究应重点关注蓝藻磷酸酯代谢新通路的挖掘与验证,以最终确定蓝藻磷酸酯(包括人工合成源与生物源)代谢的生态意义与生态风险。

此外,藻际细菌可能在蓝藻磷酸酯代谢过程中发挥重要作用。藻际环境是藻菌关系发生的主要界面,其定义为浮游植物细胞周围富含其分泌的有机基质的区域,是水生细菌的重要微环境^[88]。研究发现蓝藻与藻际细菌间存在多方面的功能互补,藻际细菌在蓝藻生长及水华生消过程中发挥重要作用;同时蓝藻可根据自身需求,选择性招募藻际细菌^[89-91]。而磷酸酯利用细菌在野外水体广泛存在,如 Villarreal-Chiu 等基于功能基因比对,发现近 16% 细菌基因组编码 *phn* 基因簇,而 40% 细菌基因组中存在一种或多种磷酸酯生物利用途径^[11]。在 2011 年,Saxton 等对草甘膦污染水体磷酸酯代谢途径进行分析,也发现浮游细菌而非蓝藻是草甘膦降解的主要执行者;其进一步提出在自然环境中微生物以群落行使功能,而群落的集合功能(the collective ability of the community)远比个体代谢能力重要^[18]。此外,我们在实验中发现磷酸酯利用藻际细菌在微囊藻水华生物样本与实验室纯培养蓝藻藻际中广泛存在(笔者团队未发表数据)。因此,对磷酸酯利用藻际细菌在蓝藻,尤其是不编码磷酸酯代谢通路蓝藻的磷酸酯利用过程中作用的研究,将有助于全面理解蓝藻磷酸酯利用的确切机制及其对磷循环的具体贡献。

7 参考文献

- [1] Huisman J, Codd GA, Paerl HW *et al.* Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, **16**(8): 471-483. DOI: 10.1038/s41579-018-0040-1.
- [2] Huo D, Gan NQ, Geng RZ *et al.* Cyanobacterial blooms in China: Diversity, distribution, and cyanotoxins. *Harmful Algae*, 2021, **109**: 102106. DOI: 10.1016/j.hal.2021.102106.
- [3] Elser JJ, Bracken MES, Cleland EE *et al.* Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 2007, **10**(12): 1135-1142. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x.
- [4] Karl DM. Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: New views of an old cycle. *Annual Review of Marine Science*, 2014, **6**: 279-337. DOI: 10.1146/annurev-marine-010213-135046.
- [5] Nausch M. Alkaline phosphatase activities and the relationship to inorganic phosphate in the Pomeranian Bight (southern Baltic Sea). *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, **16**: 87-94. DOI: 10.3354/ame016087.
- [6] Clark LL, Ingall ED, Benner R. Marine phosphorus is selectively remineralized. *Nature*, 1998, **393**(6684): 426. DOI: 10.1038/30881.
- [7] McGrath JW, Chin JP, Quinn JP. Organophosphonates revealed: New insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, **11**(6): 412-419. DOI: 10.1038/nrmicro3011.
- [8] Horsman GP, Zechel DL. Phosphonate biochemistry. *Chemical Reviews*, 2017, **117**(8): 5704-5783. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00536.
- [9] Manav MC, Sofos N, Hove-Jensen B *et al.* The abc of phosphonate breakdown: A mechanism for bacterial survival. *BioEssays*, 2018, **40**(11): 1800091. DOI: 10.1002/bies.201800091.
- [10] Dyhman ST, Chappell PD, Haley ST *et al.* Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature*, 2006, **439**(7072): 68-71. DOI: 10.1038/nature04203.
- [11] Villarreal-Chiu JF, Quinn JP, McGrath JW. The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Frontiers in Microbiology*, 2012, **3**: 19. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00019.
- [12] Gomez-Garcia MR, Davison M, Blain-Hartung M *et al.* Alternative pathways for phosphonate metabolism in thermophilic cyanobacteria from microbial mats. *The ISME Journal*, 2011, **5**(1): 141-149. DOI: 10.1038/ismej.2010.96.
- [13] Willis A, Woodhouse JN, Ongley SE *et al.* Genome variation in nine co-occurring toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Harmful Algae*, 2018, **73**: 157-166. DOI: 10.1016/j.hal.2018.03.001.
- [14] Teikari JE, Fewer DP, Shrestha R *et al.* Strains of the toxic and bloom-forming *Nodularia spumigena* (cyanobacteria) can degrade methylphosphonate and release methane. *The ISME Journal*, 2018, **12**(6): 1619-1630. DOI: 10.1038/s41396-018-0056-6.
- [15] Zhao L, Lin LZ, Chen MY *et al.* The widespread capability of methylphosphonate utilization in filamentous cyanobacteria and its ecological significance. *Water Research*, 2022, **217**: 118385. DOI: 10.1016/j.watres.2022.118385.
- [16] Metcalf WW, Griffin BM, Cicchillo RM *et al.* Synthesis of methylphosphonic acid by marine microbes: A source for methane in the aerobic ocean. *Science*, 2012, **337**(6098): 1104-1107. DOI: 10.1126/science.1219875.
- [17] Born DA, Ulrich EC, Ju KS *et al.* Structural basis for methylphosphonate biosynthesis. *Science*, 2017, **358**(6368): 1336-1339. DOI: 10.1126/science.aao3435.
- [18] Saxton MA, Morrow EA, Bourbonniere RA *et al.* Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research*, 2011, **37**(4): 683-690. DOI: 10.1016/j.jglr.2011.07.004.

- [19] Vera MS, di Fiori E, Lagomarsino L *et al.* Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor © on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology: London, England*, 2012, **21**(7): 1805-1816. DOI: 10.1007/s10646-012-0915-2.
- [20] Qiu HM, Geng JJ, Ren HQ *et al.* Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup © formulation. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, **248/249**: 172-176. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.12.033.
- [21] Pérez GL, Torremorell A, Mugni H *et al.* Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecological Applications*, 2007, **17**(8): 2310-2322. DOI: 10.1890/07-0499.1.
- [22] Ren LX, Wang PF, Wang C *et al.* Algal growth and utilization of phosphorus studied by combined mono-culture and co-culture experiments. *Environmental Pollution*, 2017, **220**: 274-285. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.09.061.
- [23] Huntscha S, Stravs MA, Bühlmann A *et al.* Seasonal dynamics of glyphosate and AMPA in Lake Greifensee: Rapid microbial degradation in the epilimnion during summer. *Environmental Science & Technology*, 2018, **52**(8): 4641-4649. DOI: 10.1021/acs.est.8b00314.
- [24] Berman MC, Llamas ME, Minotti P *et al.* Field evidence supports former experimental claims on the stimulatory effect of glyphosate on picocyanobacteria communities. *Science of the Total Environment*, 2020, **701**: 134601. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134601.
- [25] Karl DM, Beversdorf L, Björkman KM *et al.* Aerobic production of methane in the sea. *Nature Geoscience*, 2008, **1**(7): 473-478. DOI: 10.1038/ngeo234.
- [26] Khatun S, Iwata T, Kojima H *et al.* Aerobic methane production by planktonic microbes in lakes. *Science of the Total Environment*, 2019, **696**: 133916. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.133916.
- [27] Wang MZ, Xu XW, Wu Z *et al.* Seasonal pattern of nutrient limitation in a eutrophic lake and quantitative analysis of the impacts from internal nutrient cycling. *Environmental Science & Technology*, 2019, **53**(23): 13675-13686. DOI: 10.1021/acs.est.9b04266.
- [28] Jia Y, Lu Z, Huang K *et al.* Insight into the mechanism of phosphoenolpyruvate mutase catalysis derived from site-directed mutagenesis studies of active site residues. *Biochemistry*, 1999, **38**(43): 14165-14173. DOI: 10.1021/bi990771j.
- [29] Sosa OA. Phosphorus redox reactions as pinch hitters in microbial metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, **115**(1): 7-8. DOI: 10.1073/pnas.1719600115.
- [30] Repeta DJ, Ferrón S, Sosa OA *et al.* Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter. *Nature Geoscience*, 2016, **9**(12): 884-887. DOI: 10.1038/ngeo2837.
- [31] Young CL, Ingall ED. Marine dissolved organic phosphorus composition: Insights from samples recovered using combined electrodialysis/reverse osmosis. *Aquatic Geochemistry*, 2010, **16**(4): 563-574. DOI: 10.1007/s10498-009-9087-y.
- [32] Read EK, Ivancic M, Hanson P *et al.* Phosphorus speciation in a eutrophic lake by ³¹P NMR spectroscopy. *Water Research*, 2014, **62**: 229-240. DOI: 10.1016/j.watres.2014.06.005.
- [33] Bai XL, Zhou YK, Sun JH *et al.* Classes of dissolved and particulate phosphorus compounds and their spatial distributions in the water of a eutrophic lake: A ³¹P NMR study. *Biogeochemistry*, 2015, **126**(1/2): 227-240. DOI: 10.1007/s10533-015-0155-7.
- [34] Nowack B. Environmental chemistry of phosphonates. *Water Research*, 2003, **37**(11): 2533-2546. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00079-4.
- [35] Blackburn GM. Phosphonates as analogs of biological phosphates. *Chemistry & Industry*, 1981, **7**: 134-138.
- [36] Duke SO, Powles SB. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 2008, **64**(4): 319-325. DOI: 10.1002/ps.1518.
- [37] Helander M, Salonien I, Saikkonen K. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science*, 2012, **17**(10): 569-574. DOI: 10.1016/j.tplants.2012.05.008.
- [38] 于平平. 整合趋势已定, 草甘膦行业迈向寡头格局. 营销界, 2021, (32): 51-53.
- [39] Metcalf WW, van der Donk WA. Biosynthesis of phosphonic and phosphinic acid natural products. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, **78**: 65-94. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.091707.100215.
- [40] Hendlin D, Stapley EO, Jackson M *et al.* Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science*, 1969, **166**(3901): 122-123. DOI: 10.1126/science.166.3901.122.
- [41] Zeleznick LD, Myers TC, Titchener EB. Growth of *Escherichia coli* on Methyl- and Ethylphosphonic Acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **78**: 546-547. DOI: 10.1016/0006-3002(63)90921-1.
- [42] La Nauze JM, Rosenberg H. The breakdown of aminoethylphosphonate by cell-free extracts of *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - General Subjects*, 1967, **148**(3): 811-813. DOI: 10.1016/0304-4165(67)90058-X.
- [43] Lacoste AM, Neuzil E. Transamination of 2-aminoethylphosphonic acid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience Reports*, 1969, **269**(2): 254-257.
- [44] Orús MI, Marco E. Disappearance of trichlorfon from cultures with different cyanobacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1991, **47**(3): 392-397. DOI: 10.1007/BF01702200.
- [45] Ravi V. Biodegradation of the CP bond in glyphosate by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. L. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 1998, **57**(10): 790-794.

- [46] Palenik B, Brahamsha B, Larimer FW *et al.* The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature*, 2003, **424**(6952): 1037-1042. DOI: 10.1038/nature01943.
- [47] Forlani G, Pavan M, Gramek M *et al.* Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. *Plant and Cell Physiology*, 2008, **49**(3): 443-456. DOI: 10.1093/pcp/pcn021.
- [48] Drzyzga D, Forlani G, Vermader J *et al.* Biodegradation of the aminopolyphosphonate DTPMP by the cyanobacterium *Anabaena variabilis* proceeds via a C-P lyase-independent pathway. *Environmental Microbiology*, 2017, **19**(3): 1065-1076. DOI: 10.1111/1462-2920.13616.
- [49] Bai F, Liu R, Yang YJ *et al.* Dissolved organic phosphorus use by the invasive freshwater diazotroph cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*, 2014, **39**: 112-120. DOI: 10.1016/j.hal.2014.06.015.
- [50] Bai F, Shi JQ, Yang SQ *et al.* Interspecific competition between *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* on different phosphorus substrates. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2020, **27**(34): 42264-42275. DOI: 10.1007/s11356-020-08652-0.
- [51] Shi JQ, Tian OY, Yang SQ *et al.* Transcriptomic responses to phosphorus in an invasive cyanobacterium, *Raphidiopsis raciborskii*: Implications for nutrient management. *Harmful Algae*, 2022, **111**: 102150. DOI: 10.1016/j.hal.2021.102150.
- [52] Sosa OA, Casey JR, Karl DM. Methylphosphonate oxidation in *Prochlorococcus* strain MIT9301 supports phosphate acquisition, formate excretion, and carbon assimilation into purines. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, **85**(13): e00289-e00219. DOI: 10.1128/AEM.00289-19.
- [53] Ilikchyan IN. Phosphonates utilization in marine and freshwater picocyanobacterial [Dissertation]. Ohio: Bowling Green State University, 2009.
- [54] Beversdorf LJ, White AE, Björkman KM *et al.* Phosphonate metabolism by *Trichodesmium* IMS101 and the production of greenhouse gases. *Limnology and Oceanography*, 2010, **55**(4): 1768-1778. DOI: 10.4319/lo.2010.55.4.1768.
- [55] Dyhrman ST, Benitez-Nelson CR, Orchard ED *et al.* A microbial source of phosphonates in oligotrophic marine systems. *Nature Geoscience*, 2009, **2**(10): 696-699. DOI: 10.1038/ngeo639.
- [56] Acker M, Hogle SL, Berube PM *et al.* Phosphonate production by marine microbes: Exploring new sources and potential function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, **119**(11): e2113386119. DOI: 10.1073/pnas.2113386119.
- [57] Shih PM, Wu DY, Latifi A *et al.* Improving the coverage of the cyanobacterial Phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, **110**(3): 1053-1058. DOI: 10.1073/pnas.1217107110.
- [58] Chen MY, Teng WK, Zhao L *et al.* Comparative genomics reveals insights into cyanobacterial evolution and habitat adaptation. *The ISME Journal*, 2021, **15**(1): 211-227. DOI: 10.1038/s41396-020-00775-z.
- [59] Whitney LP, Lomas MW. Phosphonate utilization by eukaryotic phytoplankton. *Limnology and Oceanography Letters*, 2019, **4**(1): 18-24. DOI: 10.1002/lo2.10100.
- [60] Ilikchyan IN, McKay RML, Zehr JP *et al.* Detection and expression of the phosphonate transporter gene *phnD* in marine and freshwater picocyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 2009, **11**(5): 1314-1324. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01869.x.
- [61] Ilikchyan IN, McKay RML, Kutovaya OA *et al.* Seasonal expression of the picocyanobacterial phosphonate transporter gene *phnD* in the Sargasso Sea. *Frontiers in Microbiology*, 2010, **1**: 135. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00135.
- [62] Feingersh R, Philosof A, Mejuch T *et al.* Potential for phosphite and phosphonate utilization by *Prochlorococcus*. *The ISME Journal*, 2012, **6**(4): 827-834. DOI: 10.1038/ismej.2011.149.
- [63] Silva V, Montanarella L, Jones A *et al.* Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of the Total Environment*, 2018, **621**: 1352-1359. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.093.
- [64] Powell HA, Kerby NW, Rowell P. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New Phytologist*, 1991, **119**(3): 421-426. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1991.tb00042.x.
- [65] Powell HA, Kerby NW, Rowell P *et al.* Purification and properties of a glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Planta*, 1992, **188**(4): 484-490. DOI: 10.1007/BF00197039.
- [66] Diaz-Torres O, de Anda J, Lugo-Melchor OY *et al.* Rapid changes in the phytoplankton community of a subtropical, shallow, hypereutrophic lake during the rainy season. *Frontiers in Microbiology*, 2021, **12**: 617151. DOI: 10.3389/fmicb.2021.617151.
- [67] Capper A, Erickson AA, Ritson-Williams R *et al.* Palatability and chemical defences of benthic cyanobacteria to a suite of herbivores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2016, **474**: 100-108. DOI: 10.1016/j.jembe.2015.09.008.
- [68] Rosentreter JA, Borges AV, Deemer BR *et al.* Half of global methane emissions come from highly variable aquatic ecosystem sources. *Nature Geoscience*, 2021, **14**(4): 225-230. DOI: 10.1038/s41561-021-00715-2.
- [69] Segers R. Methane production and methane consumption; A review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry*, 1998, **41**: 23-51. DOI: 10.1023/A%3A1005929032764.
- [70] Angel R, Claus P, Conrad R. Methanogenic Archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *The ISME Journal*, 2012, **6**(4): 847-862. DOI: 10.1038/ismej.2011.141.

- [71] Tang Q, Xue XF, Wang H *et al.* New knowledge of methanogens and methanotrophs in lake ecosystems. *J Lake Sci*, 2018, **30**(3): 597-610. DOI: 10.18307/2018.0302. [唐千, 薛校风, 王惠等. 湖泊生态系统产甲烷与甲烷氧化微生物研究进展. 湖泊科学, 2018, **30**(3): 597-610.]
- [72] Grossart HP, Frindte K, Dziallas C *et al.* Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(49): 19657-19661. DOI: 10.1073/pnas.1110716108.
- [73] Bogard MJ, del Giorgio PA, Boutet L *et al.* Oxic water column methanogenesis as a major component of aquatic CH₄ fluxes. *Nature Communications*, 2014, **5**: 5350. DOI: 10.1038/ncomms6350.
- [74] Tang KW, McGinnis DF, Ionescu D *et al.* Methane production in oxic lake waters potentially increases aquatic methane flux to air. *Environmental Science & Technology Letters*, 2016, **3**(6): 227-233. DOI: 10.1021/acs.estlett.6b00150.
- [75] Günthel M, Klawonn I, Woodhouse J *et al.* Photosynthesis-driven methane production in oxic lake water as an important contributor to methane emission. *Limnology and Oceanography*, 2020, **65**(12): 2853-2865. DOI: 10.1002/lno.11557.
- [76] Perez-Coronel E, Beman JM. Biogeochemical and omic evidence for paradoxical methane production via multiple co-occurring mechanisms in aquatic ecosystems. *BioRxiv*, 2021, DOI: 10.1101/2020.07.28.225276.
- [77] Zhao F, Zhou YQ, Xu H *et al.* Oxic urban rivers as a potential source of atmospheric methane. *Environmental Pollution*, 2022, **297**: 118769. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.118769.
- [78] Donis D, Flury S, Stöckli A *et al.* Full-scale evaluation of methane production under oxic conditions in a mesotrophic lake. *Nature Communications*, 2017, **8**: 1661. DOI: 10.1038/s41467-017-01648-4.
- [79] Günthel M, Donis D, Kirillin G *et al.* Contribution of oxic methane production to surface methane emission in lakes and its global importance. *Nature Communications*, 2019, **10**(1): 5497. DOI: 10.1038/s41467-019-13320-0.
- [80] Peeters F, Hofmann H. Oxic methanogenesis is only a minor source of lake-wide diffusive CH₄ emissions from lakes. *Nature Communications*, 2021, **12**: 1206. DOI: 10.1038/s41467-021-21215-2.
- [81] Günthel M, Donis D, Kirillin G *et al.* Reply to 'Oxic methanogenesis is only a minor source of lake-wide diffusive CH₄ emissions from lakes'. *Nature Communications*, 2021, **12**: 1205. DOI: 10.1038/s41467-021-21216-1.
- [82] Zhou YQ, Xiao QT, Yao XL *et al.* Accumulation of terrestrial dissolved organic matter potentially enhances dissolved methane levels in eutrophic Lake Taihu, China. *Environmental Science & Technology*, 2018, **52**(18): 10297-10306. DOI: 10.1021/acs.est.8b02163.
- [83] Li Y, Fichot CG, Geng L *et al.* The contribution of methane photoproduction to the oceanic methane paradox. *Geophysical Research Letters*, 2020, **47**(14): e2020GL088362. DOI: 10.1029/2020GL088362.
- [84] Bižić M, Klintzsch T, Ionescu D *et al.* Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane. *Science Advances*, 2020, **6**(3): eaax5343. DOI: 10.1126/sciadv.aax5343.
- [85] Zheng YN, Harris DF, Yu Z *et al.* A pathway for biological methane production using bacterial iron-only nitrogenase. *Nature Microbiology*, 2018, **3**(3): 281-286. DOI: 10.1038/s41564-017-0091-5.
- [86] Chin JP, Quinn JP, McGrath JW. Phosphate insensitive aminophosphonate mineralisation within oceanic nutrient cycles. *The ISME Journal*, 2018, **12**(4): 973-980. DOI: 10.1038/s41396-017-0031-7.
- [87] Murphy ARJ, Scanlan DJ, Chen Y *et al.* Transporter characterisation reveals aminoethylphosphonate mineralisation as a key step in the marine phosphorus redox cycle. *Nature Communications*, 2021, **12**: 4554. DOI: 10.1038/s41467-021-24646-z.
- [88] Seymour JR, Amin SA, Raina JB *et al.* Zooming in on the phycosphere: The ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships. *Nature Microbiology*, 2017, **2**: 17065. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.65.
- [89] Cao XY, Zhou YY, Wang ZC *et al.* The contribution of attached bacteria to *Microcystis* bloom: Evidence from field investigation and microcosm experiment. *Geomicrobiology Journal*, 2016, **33**(7): 1-11. DOI: 10.1080/01490451.2015.1074319.
- [90] Jankowiak JG, Gobler CJ. The composition and function of microbiomes within *Microcystis* colonies are significantly different than native bacterial assemblages in two North American lakes. *Frontiers in Microbiology*, 2020, **11**: 1016. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01016.
- [91] Li Q, Lin FB, Yang C *et al.* A large-scale comparative metagenomic study reveals the functional interactions in six bloom-forming *Microcystis*-epibiont communities. *Frontiers in Microbiology*, 2018, **9**: 746. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00746.