

水环境中甲基磷酸含量变化及其对“藻-磷”关系响应的探究*

李清^{1,2,3}, 袁翰卿^{1,2,3}, 李哲^{2,3}, 肖艳^{2,3**}, 高德萌², 鄢小静²

(1: 重庆交通大学, 重庆 400074)

(2: 中国科学院重庆绿色智能技术研究院, 重庆 400714)

(3: 中国科学院大学重庆学院, 重庆 400714)

摘要: 甲基磷酸 (Methylphosphonate, MPn) 作为具有 C-P 键特征的典型有机磷酸盐, 其生物合成与降解过程深刻影响着水生生态系统的磷循环和甲烷 (CH₄) 产生机制。然而, 目前关于水体 MPn 变化及藻类 MPn 蓄积能力却鲜见报道。本研究采用液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱 (LC-MS/MS) 技术, 对 21 个水体样本及 15 株水华藻种进行 MPn 定量分析, 并结合野外连续监测、室内藻类培养及原水培养实验 (添加 MPn/Pi、BES 处理、过滤除藻、避光处理), 揭示 MPn 动态变化与 CH₄ 生成的关联。结果显示, 52.4% (11/21) 的水体样本检出 MPn ($1.50 \pm 0.24 \sim 6.99 \pm 0.59$ $\mu\text{g/L}$), 93.3% (14/15) 的藻株胞内蓄积 MPn ($1.87 \pm 0.57 \sim 22.24 \pm 5.81$ $\mu\text{g/L}$), 其中微囊藻 FACHB-3602 胞内 MPn 在 7 天培养中呈现动态积累 (峰值 8.63 ± 0.85 $\mu\text{g/L}$), 表明藻类是水生态系统 MPn 的重要生物源。在水样和藻类中, MPn-P 对溶解性有机磷 (DOP) 的贡献率 (0.70%~37.85%、0.21%~0.90%) 均显著高于 MPn-C 对溶解性有机碳 (DOC) 的贡献 (0.00%~0.05%、0.00%~0.01%), 凸显 MPn 生态化学计量特征以磷循环为主导。原水培养实验显示, 添加 MPn 使 CH₄ 产量较对照组提升 157.43%, 同时添加无机磷 (Pi) 则抑制 CH₄ 生成; 过滤除藻使水体产 CH₄ 平均含量降低 23.96%, 避光处理则促进 CH₄ 积累, 推测藻菌互作影响水体 MPn 周转与有氧 CH₄ 生成, 且该过程受无机磷调控。本研究可为进一步探索 MPn 在水体磷循环中的作用、以及有氧产 CH₄ 机制提供重要的理论支撑。

关键词: 甲基磷酸; 藻类; 有氧产甲烷; 磷循环

Exploration of methylphosphonate content variations in aquatic environments and their response to the algae-phosphorus relationship

Li Qing^{1,2,3}, Yuan Hanqing^{1,2,3}, Li Zhe^{2,3}, Xiao Yan^{2,3**}, Gao Yimeng², Wu Xiaojing²

(1: Chongqing Jiaotong University, Chongqing 400074, P.R.China)

(2: Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing 400714, P.R.China)

(3: Chongqing School, University of Chinese Academy of Sciences, Chongqing 400714, P.R.China)

Abstract: Methylphosphonate (MPn), a typical organophosphonate characterized by a C-P bond, profoundly influences phosphorus cycling and methane (CH₄) production mechanisms in aquatic ecosystems through its biosynthesis and degradation processes. However, there is limited research on the dynamics of MPn in water bodies and the MPn accumulation capacity of algae. In this study, liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-MS/MS) was employed to quantify MPn in 21 water samples and 15 algal species. Combined with field monitoring, algal laboratory cultivation, and raw water incubation experiments (including MPn/Pi addition, BES treatment, algal filtration, and dark treatment), the relationship between MPn dynamics and CH₄ generation was investigated. The results revealed that MPn was

* 2025-01-19 收稿; 2025-03-25 收修稿稿。

国家自然科学基金项目 (52470202, U2340222) 资助。

**通信作者; E-mail: yxiao@cigit.ac.cn.

detected in 52.4% (11/21) of water samples ($1.50 \pm 0.24 \sim 6.99 \pm 0.59$ $\mu\text{g/L}$), and 93.3% (14/15) of algal strains accumulated intracellular MPn ($1.87 \pm 0.57 \sim 22.24 \pm 5.81$ $\mu\text{g/L}$). Notably, *Microcystis* sp. FACHB-3602 exhibited dynamic MPn accumulation during 7 days cultivation (peak value: 8.63 ± 0.85 $\mu\text{g/L}$), indicating that algae are a significant biological source of MPn in aquatic ecosystems. In both water samples and algae, the contribution of MPn-P to dissolved organic phosphorus (DOP) (0.70%~37.85%、0.21%~0.90%) was significantly higher than that of MPn-C to dissolved organic carbon (DOC) (0.00%~0.05%、0.00%~0.01%), highlighting the dominant role of MPn in phosphorus cycling from an ecological stoichiometric perspective. Raw water incubation experiments demonstrated that MPn addition increased CH_4 production by 157.43% compared to the control, while simultaneous addition of inorganic phosphorus (Pi) suppressed CH_4 generation. Algal filtration reduced CH_4 production by 23.96%, whereas dark treatment promoted CH_4 accumulation. These findings suggest that algal-bacterial interactions regulate MPn turnover and aerobic CH_4 production, modulated by inorganic phosphorus availability. This study provides critical theoretical insights for further exploration of MPn's role in aquatic phosphorus cycling and aerobic CH_4 production mechanisms.

Keywords: Methylphosphonate; Algae; Aerobic methane production; Phosphorus cycling

甲基膦酸 (Methylphosphonate, MPn) 作为结构简单的有机膦酸盐 (分子式 $\text{CH}_5\text{O}_3\text{P}$), 其独特的 C-P 键特性使其成为碳磷循环的关键化合物^[1-3]。传统观点认为 MPn 属于生物不可利用磷, 但近年来研究发现, 在无机磷 (Pi) 限制条件下, 多种微生物可通过裂解 MPn 的 C-P 键获取磷源以维持生长, 揭示了该化合物在生物磷循环中的重要作用^[4]。同时, MPn 降解过程中甲基基团 ($-\text{CH}_3$) 的断裂会与氢离子结合生成甲烷 (CH_4), 这一过程已被证实是表层有氧水体 CH_4 产生的重要机制^[5]。

在气候变化背景下, 藻类作为水生生态系统中的初级生产者, 与 MPn 生物合成的关联性日益受到关注^[6-8]。Dyhrman 团队^[9]发现两株束毛藻 *Trichodesmium erythraeum* IMS101 与 *Trichodesmium erythraeum* ST6-5 合成的膦酸酯占细胞总颗粒磷的 8%-17%, 揭示其可能是海洋贫营养区膦酸脂的主要生物来源; Acker 等^[10]通过基因分析证实 MPn 生物合成基因在原绿球藻 *Prochlorococcus* SB 与海洋浮游细菌主要类群 SAR11 中广泛分布。尽管目前已从海洋、淡水系统与蓝藻中成功鉴定出 *mpnS*、*ppd*、*pdh* 等编码 MPn 合成的关键基因^[10-14], 但针对水体和生物源 MPn 含量变化的研究却寥寥无几, 这在一定程度上制约了对 MPn 生物地球化学循环的深入解析。

近年来, 富营养化湖泊中观测到的有氧产 CH_4 现象与藻类活动呈现出显著相关性^[15]。Willis 等^[16]证实尖头藻 *Raphidiopsis raciborskii* CS-506 在 Pi 缺乏时可通过矿化难降解有机膦酸盐维持竞争优势, 这一发现为解析水华暴发的磷代谢机制提供了新视角。随着组学技术的发展, MPn 降解途径及其功能基因的研究取得重要进展^[17-19]。研究显示, 束毛藻 *Trichodesmium erythraeum* IMS101、聚球藻 *Synechococcus* JA-2-3Ba (2-13) 和鱼腥藻 *Anabaena cylindrica* PCC7122 等蓝藻均携带完整的 MPn 降解 *phn* 基因簇, 可在膦酸盐为唯一磷源的培养基中生长^[7, 20, 21]。更有实验证据表明, 海洋与淡水系统中的微生物可通过好氧代谢 MPn 释放 CH_4 ^[2, 22, 23]。因此, 研究水体和藻类中 MPn 含量变化对预测 CH_4 排放趋势有重要意义。

基于上述背景, 本研究采用液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱 (LC-MS/MS) 技术, 系统检测了水体及藻类样本中 MPn 含量, 结合野外监测与室内受控培养实验, 旨在阐明水体有氧 CH_4 产生的潜在生物源。研究成果将为解析 MPn 在水体碳磷循环中的作用机制, 以及评估藻类对水体 CH_4 排放的贡献提供重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 水样采集及藻种培养

本研究实验选用的 15 株藻种 (微囊藻 *Microcystis* sp. 8 株、束丝藻 *Aphanizomenon* sp. 2 株、长孢藻 *Dolichospermum* sp. 2 株、斜生四链藻 *Tetrademus obliquus* 1 株、小球藻 *Chlorella* sp. 1 株、聚球藻 *Synechococcus* sp. 1 株), 购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库 (FACHB-Collection)。对 15 株藻种进行 MPn 含量检测, 随后选取 MPn 单位含量最高的藻种进行 7 天实验培养。

选取三峡库区澎溪河流域高阳平湖和赤水河-盐津河小流域的 6 个点位水体进行 MPn 含量检测。并对高阳平湖点位 MPn、溶解性有机磷 (Dissolved Organic Phosphorus, DOP)、溶解性有机碳 (Dissolved Organic Carbon, DOC) 进行连续 15 天的跟踪监测, 每天上午 9 点采集高阳平湖表层有氧水体, 用灭菌离心管将水样分装成 3 份, 当天送到-20℃冷冻库保存, 返回实验室一周内完成 MPn 含量检测。此外, 进一步采集高阳平湖水华期间的水样, 用于实验室原水培养实验。

1.2 实验设置

1.2.1 培养实验一 选取 MPn 单位含量最高的藻种微囊藻 *Microcystis* sp. FACHB-3602 进行 7 天实验培养, 第 0 h、12 h、24 h、36 h、2 d、3 d、5 d、7 d 取样检测 MPn、DOP 和 DOC 含量。所有藻种均保持光强 2000 lux、光暗比 12 h:12 h, 温度 25℃条件培养, 且在培养过程中每天将藻液手动摇动 3 次。在 25℃下培养至对数期后, 离心收集对数期藻细胞, 用于正式实验。

1.2.2 培养实验二 将采集的高阳平湖原水水样剧烈摇晃以除去多余的 CH₄, 构建 6 组原水培养体系。对照组为未处理原水, 其余 5 组分别进行黑暗处理 (双层铝箔避光)、GF/F 滤膜过滤 (Whatman, 47 mm) 处理、产甲烷古菌抑制剂 2-溴乙烷磺酸钠 (BES, 500 μmol/L) 添加、MPn (10 μmol/L) 添加、及 MPn+Pi (各 10 μmol/L) 复合处理。所有样本分装于灭菌血清瓶 (满容密封), 置于恒温培养箱中培养 3 天, 培养条件为光强 2000 lux、光暗比 12 h:12 h, 温度 25℃。第 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 取样检测 CH₄ 含量。

1.3 指标测定与分析

1.3.1 MPn 定量分析 (1) 仪器参数设备的参数优化: 本研究用于 MPn 分析的仪器为 Agilent 1290-6530 Q-TOF MS 四极杆-飞行时间液质联用仪 (美国安捷伦科技公司), 仪器配备可检测低含量的喷射流电喷雾离子源 (ESI) 飞行时间质谱仪。分析样本前根据目标化合物 MPn 的特性选择“负离子模式”的电离检测方式, 仪器设备参数参考 Baygildiev 团队^[24]的 MPn 检测方法进行优化。

(2) 负模式的色谱参数如下: 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm, 美国), 等度洗脱, 柱温 40℃。流动相 A 为甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 体积比为 95:5。流速为 0.275 mL/min, 每次分析时间为 2.5 min;

(3) 负模式的质谱参数如下: 在手动进样模式下, 通过改变毛细管电压、破碎电压与锥孔电压优化了 MPn 检测条件, 模式为电喷雾负离子模式。干燥气温度设定为 350℃, 流速为 10 L/min。毛细管电压设为 2800 V, 破碎电压设为 90 V, 锥孔电压设为 60 V。扫描模式 TargetedMS/MS, 扫描速率 2 spectra/s, 碰撞能 20 eV, 母离子为 95 m/z, 子离子为 78.957±0.005 m/z。随后进行仪器控制和数据可视化, 质谱数据分析使用专用软件包 Agilent Mass Hunter Workstation (美国安捷伦科技公司) 进行。

(4) 水样和藻类样本预处理:①水体样本: 采集的水样解冻后经 0.22 μm 聚醚砜微孔滤膜过滤后上机进行检测;②藻类胞内: 取 5 mL 藻液培养物, 经 0.45 μm 醋酸纤维微孔滤膜, 将滤膜移入 10 mL 离心管中, 再加入 5 mL 去离子水 (制备条件同上), 进行反复摇晃, 等滤膜上的藻细胞重新融入去离子水 (制备条件同上) 后将滤膜用酒精灭菌过的镊子夹出, 将离心管拧紧, 用 PE 聚乙烯保鲜膜将样本包裹, 放入-80℃的超低温冰箱冷冻 8 h; 然后取出并置于室温下溶解, 重复冻融操作 3 次, 再经超声波细胞破碎仪在冰浴中进行超声破碎 (功率: 40 W; 周期设置: 工作 3 s/间隙 3 s; 时长设置: 10 min), 最后经 0.22 μm 聚醚砜微孔滤膜过滤, 滤液直接用于测量藻类胞内 MPn;③藻类胞外: 上述 5 mL 藻液培养物经 0.22 μm 聚醚砜微孔滤膜过滤后, 滤液上机进行检测。

(5) 水样和藻类样本 MPn 分析测试: 所有样本经 0.22 μm 聚醚砜微孔滤膜过滤后, 待用超声波脱气后将 20 μL 样本等量注入色谱仪。若样本含有杂质较多或样本较为浑浊, 需对样本进行离心, 于 4℃以 12000 r/min 离心 5 min 后准备测定。

(6) 质控方法: 开始分析样本前, 首先进行仪器状态检查和质量校正, 样本溶液的进样体积指定为 20 μL。随后根据 1.2 节仪器设备参数优化后的条件, MPn 有效分离, 得到离子流谱图, 每个样品需要重复检测 4-5 次, 以确保数据更准确。

1.3.2 水体和藻类 DOC 和 DOP 含量的检测 在测定含量前, 需要使用 0.45 μm 滤膜对水样和藻类样本进

行过滤。溶解性总磷（Dissolved Total Phosphorus, DTP）减去溶解性无机磷（Dissolved Inorganic Phosphorous, DIP）的值即为 DOP 含量。DTP 与 DIP 的测定方法参照《水和废水监测分析方法（第四版）》^[25]中钼锑抗分光光度法测定。DOC 的测定方法使用 Shimadzu®TOC-V 分析仪进行测试分析。

1.3.3 CH₄含量测定 采用顶空平衡法^[26]提取溶解在水样中的 CH₄：用 300 mL 聚丙烯注射器筒收集 200 mL 水样，确保收集水样后的注射器筒密封且无气泡，然后在该注射器筒内采集 100 mL 高纯度氮气（>99.99%），以形成顶部空间环境，震荡摇晃 2 分钟达到平衡。收集顶空平衡后的 100 mL 气体样品至事前抽真空的铝箔气袋中，通过配备火焰离子化检测器（FID）的气相色谱仪（Agilent 8860 GC, 美国）系统分析 CH₄的含量。气相色谱条件如下：色谱柱为 AgilentG3591-81004 与 AgilentG3591-81121，载气为高纯氮气，流速为 21 mL/min，柱箱温度为 60℃，FID 温度保持在 275℃，进样量为 1 mL，运行时间为 12 min。

1.4 数据统计和分析

所有实验重复 3 次。数据处理与统计分析采用 Excel 和 Origin2021 软件进行处理和作图，并使用单因素方差分析（ANOVA）和克鲁斯卡尔-瓦利斯单程方差分析（Kruskal-Wallis test）对实验数据进行差异显著性分析，显著性水平设为 $P < 0.05$ ，数据结果以平均值±标准差（Mean±SD）表示。

2 结果与分析

2.1 水环境样本中 MPn 的含量

21 个水体样本检测结果显示，MPn 的检出率为 52.40%（11/21），11 个水体样本 MPn 浓度介于 $1.50 \pm 0.24 \sim 6.99 \pm 0.59 \mu\text{g/L}$ 之间。藻类样本分析表明，93.3%（14/15）的藻株胞内存在 MPn 蓄积，其浓度范围为 $1.87 \pm 0.57 \sim 22.24 \pm 5.81 \mu\text{g/L}$ 。此外，所有藻株中除微囊藻 FACHB-3602 外，其余藻株胞外均未检测到 MPn。而长孢藻 FACHB-1250 在胞内外均未检出 MPn（图 1）。

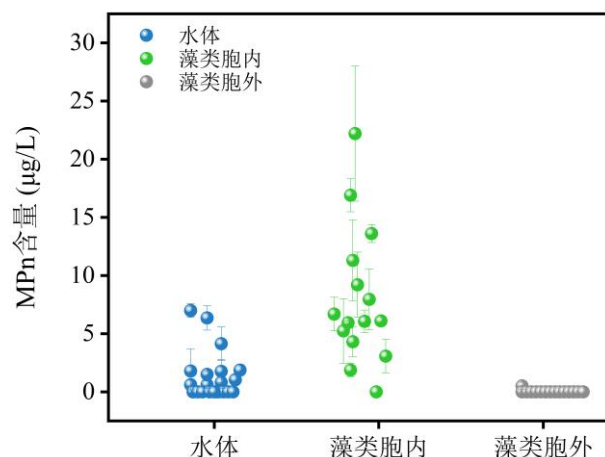


图 1 水体样本与藻类样本 MPn 含量

Fig.1 MPn content in water samples and algal samples

2.2 高阳平湖连续监测中 MPn、DOP 和 DOC 含量变化

连续 15 天监测显示，表层水体 MPn 含量整体呈现先下降后上升再继续下降的波动性趋势，其平均浓度为 $1.39 \pm 2.18 \mu\text{g/L}$ 。其中，第 13 天出现峰值 $6.99 \pm 0.59 \mu\text{g/L}$ ，第 14 天仍维持 $6.35 \pm 1.05 \mu\text{g/L}$ 的高浓度。水体中 DOP 含量在实验初期快速积累，在第 2 天达到峰值 $0.046 \pm 0.01 \text{ mg/L}$ ，随后呈波动性变化，与 MPn 含量的变化趋势较为一致。相比之下，DOC 含量的变化在整体上较为平稳，平均浓度为 3.04 ± 1.09

mg/L, 前 3 天保持稳定, 第 4 天出现短暂波动下降至 1.34 ± 0.17 mg/L 后又上升, 随后保持幅度较小的波动 (图 2a)。在监测时间内, MPn-P 对 DOP 的贡献率 (MPn-P/DOP, 0.70%~37.85%) 显著高于 MPn-对 DOC 的贡献 (MPn-C/DOC, 0.00%~0.05%) ($P < 0.05$) (图 2b)。

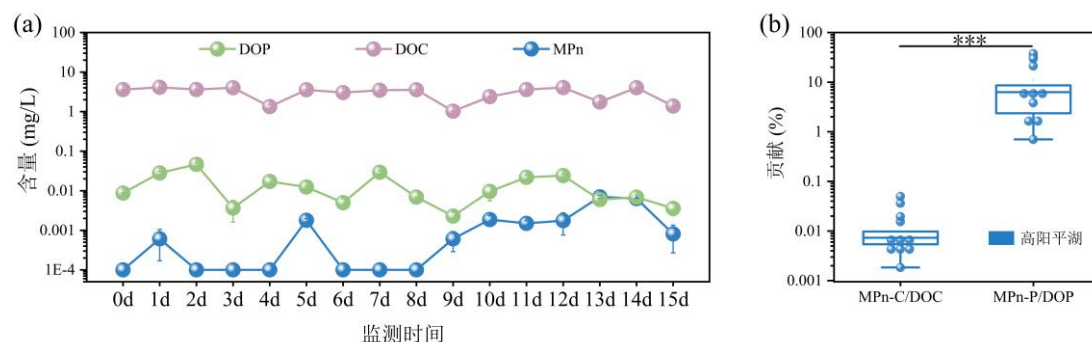


图 2 高阳平湖 15 天连续监测水样中 MPn、DOP、DOC 含量的变化 (a), 以及 MPn 中 P 和 C 对 DOP 和 DOC 的贡献 (b)

Fig.2 Variations in the contents of MPn, DOP, and DOC (a) and the contributions of P and C in MPn to DOP and DOC (b) in water samples from Gaoyang Lake during a 15-day in continuous monitoring

2.3 微囊藻培养实验中 MPn、DOP 和 DOC 含量变化

微囊藻的 7 天培养实验显示, 胞内 MPn 含量变化在初期呈蓄积状态, 并在第 2 天达到峰值 8.63 ± 0.85 $\mu\text{g/L}$, 随后经过 3 天的培养后呈平稳下降趋势。胞外 DOP 含量在实验前期持续上升, 并在第 5 天达到最大值 1.13 ± 0.51 mg/L, 随后在实验末期下降至 0.32 ± 0.04 mg/L。而胞外 DOC 含量在实验周期维持相对稳定状态, 在第 2 天出现短暂波动, 其含量上升至峰值 21.71 ± 0.25 mg/L, 第 3 天后 DOC 含量趋于平缓 (图 3a)。微囊藻中 MPn-P 对 DOP 的贡献率 (0.21%~0.90%) 显著高于 MPn-C 对 DOC 的贡献 (0.00%~0.01%) ($P < 0.05$) (图 3b)。

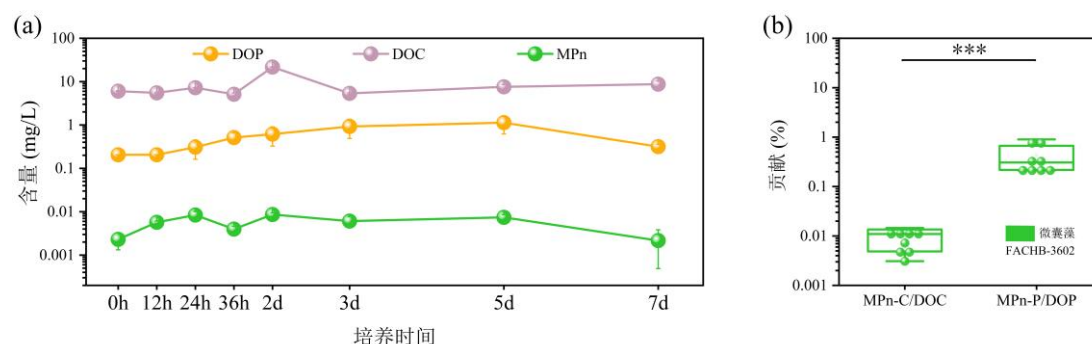


图 3 微囊藻 FACHB-3602 7 天培养实验中 MPn、DOP、DOC 含量的变化 (a), 以及 MPn 中 P 和 C 对 DOP 和 DOC 的贡献 (b)

Fig. 3 Variations in the contents of MPn, DOP, and DOC (a) and the contributions of P and C in MPn to DOP and DOC (b) in a 7-day cultivation experiment of *Microcystis* sp. FACHB-3602

2.4 原水培养实验添加 MPn 和 Pi 对 CH₄ 含量的影响

原水培养实验显示, MPn+Pi 组的 CH₄ 含量变化的幅度大于对照组与 MPn 组的 CH₄ 含量变化幅度。添加 MPn 显著促进 CH₄ 生成, MPn 添加组在 48 h CH₄ 含量达到峰值 6.64 ± 0.71 ng/ μL , 随后开始逐渐下降; 实验后期 MPn 组 72 h 的 CH₄ 含量与对照组 CH₄ 含量相比仍提升了 157.43%。当同时添加 MPn 与 Pi (MPn+Pi 组) 时, CH₄ 生成则受到抑制, 其 CH₄ 含量在 36 h 时含量降至 3.99 ± 1.24 ng/ μL ; 在实验结束时, 其 CH₄ 含量较 MPn 添加组降低 41.15%。培养后期, 三个实验组产生的 CH₄ 含量呈平缓下降趋势,

且 MPn+Pi 组的 CH₄ 含量趋近于对照组水平（图 4）。

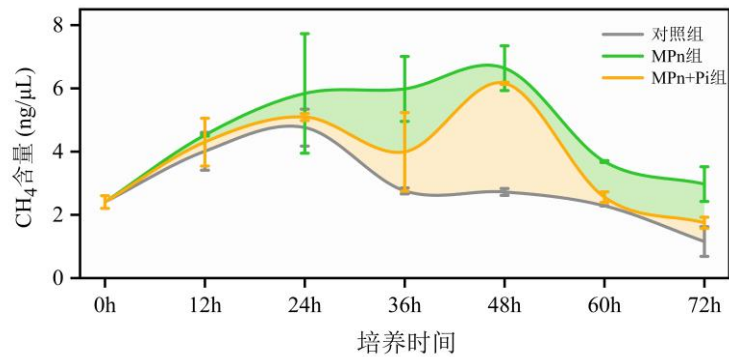


图 4 原水培养实验中添加 MPn 组、同时添加 MPn+Pi 组与原水对照组的 CH₄ 含量变化

Fig.4 Changes in CH₄ content among the MPn-treated group, MPn+Pi-treated group, and control group in the raw water incubation experiment

2.5 原水培养实验不同处理组 CH₄ 含量变化

原水产甲烷抑制实验表明，各处理组的大多数值集中在均值附近，数据整体上呈现出良好的正态分布特性，表明实验重复性良好且随机误差可控。添加产甲烷古菌抑制剂 BES 处理组的产 CH₄ 平均含量为 2.60 ± 0.70 ng/μL，与对照组相比 (2.87 ± 1.18 ng/μL)，BES 使 CH₄ 平均浓度降低 9.60%。过滤去除藻类组，CH₄ 平均含量下降至 2.18 ± 0.43 ng/μL，较对照组中 CH₄ 含量降低 23.96%，为所有处理组中最低。而避光处理(黑暗组)CH₄ 的平均含量为各处理组中最高，达到 3.03 ± 0.74 ng/μL，较对照组中 CH₄ 含量升高 5.58%。（图 5）

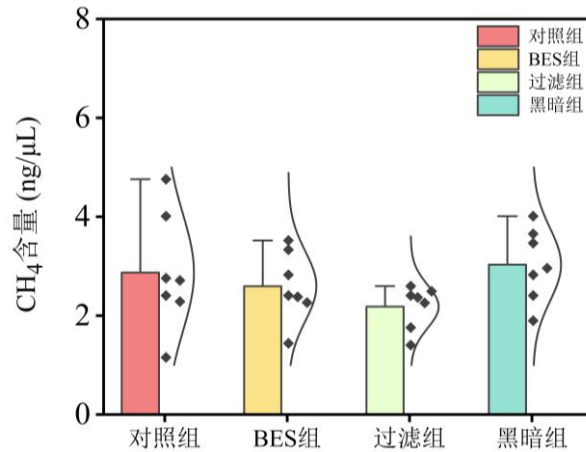


图 5 原水培养实验中 BES 处理组、过滤组、黑暗组与原水对照组的 CH₄ 含量变化

Fig. 5 Changes in CH₄ content among the BES-treated group, filtered group, dark group, and control group in the raw water incubation experiments

3 讨论

本研究通过对高阳平湖与赤水河水样的连续监测，揭示了 MPn 在水体中的普遍存在特征。环境样品中 MPn 的来源具有双重性：一方面源于天然生物合成过程，另一方面与人工合成污染物相关^[27]。采样点位附近存在农田、生活污水、化工厂等潜在污染源时，该点位水样的 MPn 含量可能会有所升高^[28, 29]。

在天然生物来源方面, 蓝藻等水生生物已被证实具备 MPn 生物合成能力^[9, 19]。

高阳平湖 15 天的连续监测数据显示, 表层水体 MPn 浓度呈现显著波动特征。这种动态变化揭示了水体中 MPn 的快速周转特性, 如藻类生物合成持续输入 MPn, 而微生物降解过程则不断消耗该化合物^[23]。MPn 合成降解过程不仅调控 DOP、DOC 的浓度变化, 同时受二者浓度梯度的反向调控^[30]。值得注意的是, 第 13-14 天出现的浓度峰值可能与水华藻类衰亡过程相关, 此时藻类胞内储存的 MPn 大量释放至水体, 为其他微生物提供了充足的产 CH₄ 底物来源。

对 15 株水华藻种的检测发现, 14 株藻细胞胞内均含有 MPn, 证实藻类是 MPn 的重要生物源。已有研究对蓝藻基因组中检测到的 *mpnS* 与 *pepM* 等关键合成基因亦为此提供了分子生物学证据^[10, 11]。微囊藻 FACHB-3602 在 7 天培养期间胞内 MPn 呈现波动积累模式, 这可能与磷储存策略相关。随着藻类的生长阶段和环境 Pi 浓度波动, 藻类通过调节 MPn 合成/分解代谢维持胞内磷稳态^[9]。除微囊藻 FACHB-3602 外, 藻类胞外均未检测出 MPn, 可能源于两方面: (1) MPn 释放至藻细胞外部属于一种微量精密调控, 其释放量低于现有检测方法检出限; (2) MPn 作为细胞壁多糖和膜磷脂的结构组分, 主要参与细胞机械保护等生理功能^[31]。

进一步分析显示, 水体 15 天连续监测和微囊藻 7 天培养实验中, MPn-P 对 DOP 的贡献率均显著高于 MPn-C 对 DOC 的贡献。这一差异源于水体营养元素的生物有效性。碳元素相对磷元素而言, 其分布来源广泛且含量较高, 这使碳的生物利用率相对较低。而 MPn 被生物降解时, 其 C-P 键断裂甲基转化为 CH₄ 释放, 导致 MPn 的部分碳含量消耗^[31]。作为关键限制性营养元素, 磷的生物需求强度显著高于碳, 含 C-P 键的化合物主要作为磷源而非碳源被利用。如对念珠藻 *Nostoc* sp. FACHB-892 利用 MPn 的过程进行的转录组分析表明, 磷胁迫显著激活了高亲和力磷转运系统基因簇 (*pstSCAB*) 以及碱性磷酸酶基因 (*phoA*、*phoD*) 的表达, 从而使磷的获取与利用效率显著提高。相比之下, 碳代谢相关基因未表现出类似的变化趋势。因此, 在生物源 MPn 中, 磷元素的生物利用率高于碳元素。这种差异可能反映了生态系统中的一种反馈机制, 藻类为了适应磷的有限供应, 可能进化出了更高效的有机磷利用策略^[11]。

本研究原水培养实验中, 添加 MPn 组的水样 CH₄ 含量显著提升, 表明水体中存在高效的 C-P 键裂解系统。值得注意的是, 当同时添加 MPn 与 Pi 时, CH₄ 含量较单一 MPn 处理组下降 41.15%, 这与 Khatun 等^[32]的湖泊水样培养实验结果一致, 表明 MPn 分解代谢过程中, 微生物对磷酸酯生物利用相关基因表达是由磷限制诱导的, 如磷限制条件可诱导 *phnJ* 基因表达上调, 而 Pi 的补充通过负反馈机制抑制该基因表达^[22]。类似调控模式也存在于藻类磷代谢过程: Pi 充足时, 藻类优先吸收无机磷; 当 Pi 匮乏, 藻类通过 Pho 调控系统启动 MPn 等替代磷源利用途径^[11, 17, 19, 33]。

原水产甲烷抑制实验进一步验证了藻源型 MPn 的环境效应。添加产甲烷古菌抑制剂 BES 后, 水体 CH₄ 产量仅降低 9.60%, 表明该系统中 CH₄ 生成主要由好氧微生物代谢途径主导。这一结果支持了当前的研究观点——藻类水华衰退期观测到的 CH₄ 暴发现象与经典产甲烷古菌途径无显著关联^[34]。此外, 与对照组相比, 过滤除藻处理组 CH₄ 平均产量下降 23.96%, 进一步证明藻类是水环境中 MPn 贡献者。黑暗处理组 CH₄ 产量较对照组升高, 可能与藻细胞缺乏光照, 其光合活性逐渐降低随后衰亡释放胞内 MPn 供其他微生物利用有关^[35, 36]。这些发现与 Zhao 等^[17]提出的“微囊藻可依赖藻际细菌对 MPn 降解实现磷补给”的假说相契合, 即在磷限制条件下, 微囊藻通过招募可吸收利用 MPn 的藻际细菌形成共生体系, 细菌降解 MPn 产生的 Pi 反哺藻类生长, 形成物质循环的闭环系统。这种藻-菌互作机制不仅影响水体 MPn 含量的变化, 更是藻类适应低磷环境的重要生存策略^[17, 37]。

综上, 本研究系统揭示了藻类在水体 MPn 生物地球化学循环中的核心地位, 显著改变水体有机磷库组成。未来研究需重点关注藻菌互作对 MPn 周转的调控机制, 以及该过程对 CH₄ 排放的潜在影响。

4 结论

- 1) 水体样本中 MPn 含量为 1.50±0.24~6.99±0.59 μg/L, 不同藻种胞内 MPn 含量为 1.87±0.57~22.24±5.81 μg/L, 藻类是水体 MPn 的重要生物来源。
- 2) 在水样和藻类中, MPn-P 对 DOP 的贡献均显著高于 MPn-C 对 DOC 的贡献, MPn 中磷元素的生物

利用率大于碳元素。

- 3) 藻菌互作影响水体 MPn 周转与有氧 CH₄ 生成, 且该过程受无机磷调控。

5 参考文献

- [1] Chin J P, McGrath J W, Quinn J P. Microbial transformations in phosphonate biosynthesis and catabolism, and their importance in nutrient cycling [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 31: 50-57.DOI:10.1016/j.cbpa.2016.01.010.
- [2] Karl D M, Beversdorf L, Björkman K M, et al. Aerobic production of methane in the sea [J]. *Nature Geoscience*, 2008, 1(7): 473-478.DOI:10.1038/ngeo234.
- [3] von Arx J N, Kidane A T, Philippi M, et al. Methylphosphonate-driven methane formation and its link to primary production in the oligotrophic North Atlantic [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 6529.DOI:10.1038/s41467-023-42304-4.
- [4] Ulrich E C, Kamat S S, Hove-Jensen B, et al. Methylphosphonic Acid Biosynthesis and Catabolism in Pelagic Archaea and Bacteria [M] *Marine Enzymes and Specialized Metabolism*, Pt B. 2018: 351-426 DOI:10.1016/bs.mie.2018.01.039.
- [5] Teikari J E, Fewer D P, Shrestha R, et al. Strains of the toxic and bloom-forming *Nodularia spumigena* (cyanobacteria) can degrade methylphosphonate and release methane [J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(6):1619-1630.DOI:10.1038/s41396-018-0056-6.
- [6] Keppler F, Hamilton J T G, Braß M, et al. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions [J]. *Nature*, 2006, 439(7073): 187-191.DOI:10.1038/nature04420.
- [7] Dyhrman S, Chappell P, Haley S, et al. Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium* [J]. *Nature*, 2006, 439(7072): 68-71.DOI: 10.1038/nature04203.
- [8] Grossart H P, Frindt K, Dziallas C, et al. Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(49): 19657-19661.DOI:10.1073/pnas.1110716108.
- [9] 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, 696-699.DOI:10.1038/ngeo639.
- [10] Acker M, Hogle S L, Berube P M, et al. Phosphonate production by marine microbes: Exploring new sources and potential function [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(11). DOI:10.1073/pnas.2113386119.
- [11] Zhao L, Lin L Z, Chen M Y, et al. The widespread capability of methylphosphonate utilization in filamentous cyanobacteria and its ecological significance [J]. *Water Research*, 2022, 217.DOI:10.1016/j.watres.2022.118385.
- [12] Metcalf W W, Griffin B M, Cicchillo R M, et al. Synthesis of Methylphosphonic Acid by Marine Microbes: A Source for Methane in the Aerobic Ocean [J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1104-1107.DOI:10.1126/science.1219875.
- [13] Perez-Coronel E, Michael Beman J. Multiple sources of aerobic methane production in aquatic ecosystems include bacterial photosynthesis [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6454.DOI:10.1038/s41467-022-34105-y.
- [14] Born D A, Ulrich E C, Ju K S, et al. Structural basis for methylphosphonate biosynthesis [J]. *Science*, 2017, 358(6368): 1336-1339.DOI:10.1126/science.aao3435.
- [15] Bii M, Klintzsch T, Ionescu D, et al. Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane [J]. *Science Advances*, 2020, 6(3): eaax5343. DOI: 10.1126/sciadv.aax5343.
- [16] Willis A, Chuang A W, Dyhrman S, et al. Differential expression of phosphorus acquisition genes in response to phosphorus stress in two *Raphidiopsis raciborskii* strains [J]. *Harmful Algae*, 2019, 82: 19-25.DOI:10.1016/j.hal.2018.12.003.
- [17] Zhao L, Lin L-Z, Zeng Y, et al. The facilitating role of phycospheric heterotrophic bacteria in cyanobacterial phosphonate availability and *Microcystis* bloom maintenance [J]. *Microbiome*, 2023, 11(1): 142.DOI:10.1186/s40168-023-01582-2.
- [18] Yu X, 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*, 2013, 110(51): 20759-20764.DOI:10.1073/pnas.1315107110.
- [19] Peng SH, Hang SM, Zeng Y et al. Advances on cyanobacteria phosphonate metabolism and its ecological significance. *J Lake Sci*, 2023, 35(01): 43-56. DOI: 10.18307/2023.0102. [彭思慧, 黄淑敏, 曾莹, et al. 蓝藻膦酸酯代谢及其生态意义研究进展. 湖

泊科学, 2023, 35(01): 43-56.]

- [20] Adams Melissa M, Gómez-García María R, Grossman Arthur R, et al. Phosphorus Deprivation Responses and Phosphonate Utilization in a Thermophilic *Synechococcus* sp. from Microbial Mats [J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(24): 8171-84.DOI:10.1128/jb.01011-08.
- [21] Forlani G, Pavan M, Gramek M, et al. Biochemical Bases for a Widespread Tolerance of Cyanobacteria to the Phosphonate Herbicide Glyphosate [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(3): 443-56.DOI:10.1093/pcp/pcn021.
- [22] Yao M, Henny C, Maresca J A. Freshwater Bacteria Release Methane as a By-Product of Phosphorus Acquisition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(23): 6994-7003.DOI:10.1128/AEM.02399-16.
- [23] Wang Q, Dore J E, McDermott T R. Methylphosphonate metabolism by *Pseudomonas* sp. populations contributes to the methane oversaturation paradox in an oxic freshwater lake [J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(6): 2366-2378. DOI: 10.1111/1462-2920.13747.
- [24] Baygildiev T M, Rodin I A, Stavrianidi A N, et al. Time-Efficient LC/MS/MS Determination of Low Concentrations of Methylphosphonic Acid [J]. *Inorganic Materials*, 2017, 53(14): 1382-5.DOI:10.1134/S0020168517140023.
- [25] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 (第四版) [M]. 中国环境科学出版社, 2002,243-257.
- [26] Li Z, Lu L, Lv P, et al. Imbalanced Stoichiometric Reservoir Sedimentation Regulates Methane Accumulation in China's Three Gorges Reservoir [J]. *Water Resources Research*, 2020, 56(9): e2019WR026447.DOI:10.1029/2019WR026447.
- [27] Kononova S V, Nesmeyanova M A. Phosphonates and Their Degradation by Microorganisms [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2002, 67(2): 184-95.DOI:10.1023/A:1014409929875.
- [28] Duke S O, Powles S B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide [J]. *Pest Management Science*, 2008, 64(4): 319-25. DOI:10.1002/ps.1518.
- [29] Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K. Glyphosate in northern ecosystems [J]. *Trends Plant Science*, 2012, 17(10): 569-74. DOI: 10.1016/j.tplants.2012.05.008.
- [30] Repeta D J, Ferrón S, Sosa O A, et al. Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter [J]. *Nature Geoscience*, 2016, 9(12): 884-887.DOI:10.1038/ngeo2837.
- [31] 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): 412-9.DOI:10.1038/nrmicro3011.
- [32] Khatun S, Iwata T, Kojima H, et al. Aerobic methane production by planktonic microbes in lakes [J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 696: 133916.DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.133916.
- [33] Cox D D, Parsons R J, Van Mooy B A S, et al. Methylphosphonate Is Utilized by Commensal Microbiota of Macroalgae in the Oligotrophic Sargasso Sea [J]. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 2023, 128(12): e2023JC020315.DOI:10.1029/2023JC020315.
- [34] Lenhart K, Klintzsch T, Langer G, et al. Evidence for methane production by the marine algae *Emiliania huxleyi* [J]. *Biogeosciences*, 2016, 13(10): 3163-74.DOI:10.5194/bg-13-3163-2016.
- [35] 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]. *Environ Microbiol*, 2007, 9(10): 2392-400. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01397.x.
- [36] Liang X, Zhang X, Sun Q, et al. The role of filamentous algae *Spirogyra* spp. in methane production and emissions in streams [J]. *Aquatic Sciences*, 2016, 78(2): 227-39.DOI:10.1007/s00027-015-0419-2.
- [37] Seymour J R, Amin S A, Raina J-B, et al. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(7): 17065.DOI:10.1038/nmicrobiol.2017.65.