



氮磷营养盐添加对二甲基巯基丙酸内盐合成与降解细菌及其功能基因的影响

谭斯尹¹, 孙浩¹, 梁金昌¹, 张晓华^{1,2,3*}

¹中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003

²青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266071

³中国海洋大学深海圈层与地球系统前沿科学中心, 山东 青岛 266100

摘要:【目的】二甲基巯基丙酸内盐(dimethylsulfoniopropionate, DMSP)是海洋中主要的有机硫化物之一, 是海洋细菌硫的主要来源, 海洋细菌将其分解成“冷室气体”二甲基硫(dimethylsulfide, DMS), 对调节全球气候变化和驱动地球硫循环有重要作用。本研究通过中国东海水体的现场围隔实验模拟海水富营养化对DMSP、DMS产量以及DMSP合成基因(*dsyB*和*mntN*)和降解基因(*dddP*和*dmdA*)及相关功能细菌的影响。【方法】通过流式细胞仪计数92个围隔海水样品中微小型浮游生物的数量, 采用Illumina MiSeq测序技术对海水样品中细菌的16S rRNA基因进行高通量测序, 利用荧光定量PCR技术定量测定16S rRNA基因、DMSP合成及降解基因的丰度。【结果】研究发现, 同时添加硝酸盐(6.00 μmol/L)和磷酸盐(0.375 μmol/L)能促进叶绿素a、DMSP、DMS的浓度上升。对于DMSP合成基因, 只加磷酸盐能促进*dsyB*及*Phaeobacter*等相应物种的富集, 虽然同时添加硝酸盐和磷酸盐使*dsyB*富集, 但相对只加磷酸盐却不利于*dsyB*积累; 同时添加硝酸盐和磷酸盐也抑制*Alteromonas*的生长, 进而抑制了*mntN*的富集。对于DMSP降解基因, 同时加入硝酸盐和磷酸盐促进了*dddP*及*Thalassococcus*、*Thalassobius*、*Loktanella*和*Shimia*等物种的富集, 却抑制了SAR11、*Sulfitobacter*等的富集, 从而导致*dmdA*无法被富集。【结论】氮限制能更好地促进DMSP合成基因的表达, 从而迫使细菌增加DMSP的合成以应对氮营养条件不足的生存环境, 并进而提高DMSP脱甲基化的比例为细菌提供更多能量; 而在硝酸盐和磷酸盐充足情况下, 细菌相对减少DMSP的合成且更倾向于裂解DMSP产生DMS来降低硫同化的比例。本研究结果强调了海水富营养化对细菌合成与降解DMSP过程的影响。

关键词: 二甲基巯基丙酸内盐, 合成和降解细菌, 营养盐, 围隔实验

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFA0601303); 国家自然科学基金(91751202)

*通信作者。Tel: +86-532-82032767; E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-04-21; 修回日期: 2020-07-27; 网络出版日期: 2020-08-05

二甲基巯基丙酸内盐(dimethylsulfoniopropionate, DMSP)是一种普遍存在于海洋中的含硫有机化合物,其年产量可达 $10^9 \text{ t}^{[1]}$,占全球海洋初级生产力的 1%–10%^[2–3]。DMSP 可作为渗透压保护剂、抗氧化剂、冷冻保护剂、化学引诱剂等维持生物体细胞的基本生命活动。DMSP 的裂解降解产物二甲基硫(dimethylsulfide, DMS)是硫元素从海洋到大气扩散的最主要形式,其通量约为 13–37 Tg/年^[1]。当释放到大气后,DMS 可以被 OH^- 和 NO_3^- 自由基迅速氧化,形成二氧化硫(SO_2)、甲磺酸(methanesulfonic acid, MSA)、非海盐硫酸盐(non-sea-salt- SO_4^{2-} , nss- SO_4^{2-})等化合物^[4–5],这些含硫化合物可进一步通过光氧化或化学氧化形成硫酸盐气溶胶,可作为云凝结核促进云的形成,反射太阳辐射,降低温室效应,对调节全球气候变化有着重要的负反馈作用。

以往人们认为 DMSP 主要由藻类、盐生被子植物和珊瑚等真核生物合成。但 Curson 等于 2017 年首次发现 α -变形菌纲的海洋异养细菌——团聚拉布伦茨杆菌(*Labrenzia aggregate*) LZB033 也能够合成 DMSP,且其合成途径与真核藻类、珊瑚相似,均为利用甲硫氨酸的转氨基途径,该途径的 DMSP 合成关键基因是 *dsyB*,负责编码 MTHB 甲基转移酶^[6]。一些 α -变形菌纲的细菌如 *Oceanicola batsensis* HTCC2597、百慕大公海橄榄菌(*Pelagibaca Bermudensis*) HTCC2601 等也被发现携带有 *dsyB* 基因^[6]。此外,Williams 等从盐沼沉积物中分离得到的细菌中发现某些 α -变形菌、 γ -变形菌和放线菌能够利用甲硫氨酸通过甲基化途径合成 DMSP,并鉴定出了编码蛋氨酸甲基转

移酶的基因 *mmtN*,该基因是 DMSP 甲基化途径的标记基因^[7]。在此基础上,Curson 等于 2018 年在颗石藻、甲藻、硅藻以及珊瑚中首次发现参与编码 DMSP 转氨合成途径中关键酶 MTHB (4-methylthio-2-hydroxybutyrate)的基因 *DSYB*^[8]。Kageyama 等也从硅藻假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana* CCMP1335)中鉴定出 *DSYB* 同工酶 TpMMT 的编码基因 *TpMT2*^[9]。海洋异养细菌和浮游藻类在细胞结构和生态分布都存在较大差异,浮游藻类只存在于透光层,而异养细菌不依赖阳光生存,广泛分布于海洋各水层甚至是底层沉积物中,使得 DMSP 的产生不局限在海洋的透光层,因此异养细菌合成的 DMSP 可能对海洋环境中硫化合物的资源库作出重要贡献,研究海洋细菌合成 DMSP 在驱动全球硫循环方面具有巨大的生态和科学价值。

在海洋中,真核生物及原核生物均可以降解 DMSP。然而,细菌才是 DMSP 最主要的降解者^[10],目前已知细菌降解 DMSP 主要通过脱甲基途径、裂解途径和氧化途径。细菌通过脱甲基作用最终产生活性气体甲硫醇(methanthiol, MeSH)^[3],其关键基因 *dmdA* 广泛存在于许多海洋异养细菌中,包括玫瑰杆菌类群(*Roseobacter* Clade)、SAR11 类群和 γ -变形菌纲等^[3,11],是海水环境中最丰富的 DMSP 降解基因。另一条途径则是通过裂解酶裂解 DMSP 产生挥发性气体 DMS 和丙烯酸或 3-羟基丙酸(3-hydroxypropionate, 3HP)。参与裂解途径的酶具有高度物种和遗传多样性,目前已发现有 8 种,即 DddL、DddP、DddQ、DddW、DddY、DddK、DddD 以及真核藻类中的 Alma1^[12],

DddP、DddQ 是大洋中分布最广、丰度最高的 DMSP 裂解酶^[13-14]。虽然在海洋环境中,裂解途径仅占不到 30%,但能够产生“冷室气体”DMS 释放到环境中,影响全球气候变化。而 Thume 等于 2018 年发现 DMSP 可被氧化成二甲基亚砷丙酸盐 (dimethylsulfoxonium propionate, DMSOP), 该途径广泛存在于浮游植物和海洋细菌中,但其在 DMSP 降解中所占的比例不到 1%^[15]。

海水富营养化是海洋水体中 N、P 等营养盐含量过多而引起的水质污染现象。随着工农业和城市的发展,大量陆源污染物输入,使得近海海水富营养化严重,赤潮等生态灾害频发,对海洋生态系统造成危害,而 DMSP 和 DMS 在海域中的生物生产与营养盐有着密切的关系。Sunda 等发现氮是海洋浮游植物中 DMSP 胞内水平升高的主要影响因素^[16], Curson 等则发现高盐低氮能促进细菌中 DMSP 的合成^[6]。海洋围隔实验 (mesocosm) 始于 20 世纪 60 年代^[17], 是一种海洋学实验方法, 以往人们主要利用该方法探讨环境因子对 DMSP 和 DMS 产量的影响, 如营养盐、浮游植物、病毒感染等^[18-20]。Wilson 等通过该方法发现氮限制促使浮游植物产生更多 DMSP^[21], 但目前围隔实验多集中于研究氮限制对浮游植物 DMSP 产量的影响, 但没有现场条件下添加氮磷营养盐对 DMS/P 产量及 DMSP 相关合成与降解细菌和基因影响的研究报道。本实验采用现场海洋围隔实验方法, 将不同浓度氮磷营养盐投入围隔装置中以模拟海水富营养化, 分析海水富营养化对 DMS/P 产量、DMSP 合成基因 *dsyB* 和 *mmtN* 及降解基因 *dddP* 和 *dmdA* (C/2、D/1) 和相应物种丰度的影响, 为海水富营养化对海洋微生物

在硫的生物地球化学循环过程的作用和影响提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 海洋围隔实验

围隔实验于 2018 年 6 月搭载东海生源活性气体夏季航次在“东方红 2”综合调查船上进行。在现场设置一个有机玻璃框架, 内装 9 个聚乙烯围隔袋, 分别标记为 M1、M2 和 M3, 每组 3 个平行, 其中 M1 是对照组, M2 和 M3 是实验组。用 1% 盐酸处理聚乙烯袋 24 h, 后用采水器采集原位表层海水, 润洗聚乙烯袋后将 20 L 注入其中, 按照表 1 添加不同含量的营养盐。同时, 在外围的有机玻璃框架内始终流动着表层循环海水, 以保持围隔袋内水温与表层海水温度一致。共培养 9 d。

1.2 样品采集

在第 1、3、5、7、9 天的早上 9 点, 实验组的 3 个平行样品各取水样 300 mL, 先过滤至 3 μm 的聚碳酸酯滤膜 (Millipore, USA) 后再过滤到 0.22 μm 的聚碳酸酯滤膜上, 滤膜置于无菌冻存管中, 液氮速冻后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 到实验室后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。此外, 每个平行样品取水 2 mL, 加入 2 mL 4% 多聚甲醛暗处理 30 min 后液氮速冻, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1. 围隔实验中营养盐的添加量

Table 1. The nutrients added in the mesocosm experiment

Nutrients/ $(\mu\text{mol/L})$	M1	M2	M3
$\text{NO}_3\text{-N}$	N.D.	0.00	6.00
$\text{PO}_4\text{-P}$	N.D.	0.375	0.375

N.D. means this sample was not detected.

1.3 环境样品总 DNA 的提取

分别提取 3 μm 和 0.22 μm 滤膜上的 DNA。把滤膜放于冰上融化后,用无菌剪刀剪取 1/4 的滤膜,用 DNeasy PowerSoil Kit 试剂盒(QIAGEN, Germany)进行提取。用 Nanodrop-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)检测 DNA 的浓度(10 ng/ μL 以上)和纯度($OD_{260/280}$ 在 1.8–2.0 之间),于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 荧光定量 PCR

采用荧光定量 PCR (qPCR)技术对总细菌 16S rRNA 基因、DMSP 合成基因 *dsyB* 和 *mntN* 以及 DMSP 降解基因 *dddP* 和 *dmdA* (C/2 和 D/1) 进行定量分析。qPCR 体系如下: TB Green II (TaKaRa, Japan) 10 μL , 50 \times ROX (TaKaRa, Japan) 0.4 μL , 正反引物各 0.4 μL , 稀释 10 倍的样品 DNA 2 μL , 无菌三蒸水 6.8 μL 。扩增程序参考 Sun 等的方法^[22]。所用引物序列和退火温度见表 2。

标准曲线的制备参考 Liang 等的方法^[26]。每

个标准品和样品均设 3 个平行,以去离子水为模板作阴性对照。所有样品和标准品的 qPCR 均在 StepOne™ Real-time PCR System (Applied Biosystems)上进行,所得数据采用 StepOne (version 2.2)软件进行分析。根据定量所得的拷贝数和过滤水样体积计算样品中各基因的丰度。

1.5 其他环境参数的测定

DMSP 和 DMS 由中国海洋大学杨桂朋课题组进行测定^[27]。营养盐由中国海洋大学辛宇课题组完成^[28]。叶绿素 a 浓度由厦门大学高亚辉课题组进行测定^[29]。水体中聚球藻、微微型真核生物和异养细菌数量通过流式细胞仪(BD FACSJazz, USA)进行测定^[30]。

1.6 16S rRNA 高通量测序

将 DNA 样品送至上海美吉生物公司进行高通量测序。基于 Illumina MiSeq 测序平台 (Illumina, USA), 利用 16S rRNA 通用引物 515modF 和 806modR 进行双末端测序。

表 2. 本研究所用的 PCR 核苷酸引物序列及用途

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study and their usage

Primers	Oligonucleotide	Annealing temp/ $^{\circ}\text{C}$	Usage	References
<i>dsyBF</i>	CATGGGSTCSAAGGCSTKTT	61	qPCR	[6]
<i>dsyBR</i>	GCAGRTARTCGCCGAAATCGTA			
<i>mntNF</i>	CCGAGGTGGTCATGAAYTTYGG	54		[7]
<i>mntNR</i>	GGATCACGCACACYTCRTGRTA			
<i>dddP_874F</i>	AAYGAAATWGTTGCCCTTTGA	41		[14]
<i>dddP_971R</i>	GCATDGCRTAAATCATATC			
C/2_291F	AGATGAAAATGCTGGAATGATAAATG	50		[23]
C/2_482R	AAATCTTCAGACTTTGGACCTTG			
D/1_268F	AGATGTTATTATTGTCCAATAATTGATG	49		[23]
D/1_356R	ATCCACCATCTATCTTCAGCTA			
Eub338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	53		[24]
Eub518R	ATTACCGCGGCTGCTGG			
515modF	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	50	16S rRNA	[25]
806modR	GGACTACNVGGGTWTCTAAT		High-throughput sequencing	
M13F	GTAAAACGACGGCCAG		Detection of positive clones	[24]
M13R	GTTTTCCAGTCACGAC			

1.7 数据分析

利用美吉生物云平台对样品序列按最小序列数进行抽平化后,利用 QIIME 软件过滤低质量序列和去除嵌合体,获得有效序列^[31]。利用 Usearch61 方法对操作分类单元 (operational taxonomic units OTUs)进行聚类,聚类标准为相似度>97%的核苷酸序列^[32]。利用 RDP 数据库 (<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每个 OTU 的代表性 16S rRNA 基因序列的分类学位置进行分析,置信阈值为 70%。利用 Mothur 对包括 Shannon、Chao1 和 Good's coverage 在内 Alpha 多样性指数进行计算^[33-34]。用 Canoco (Version5.0, Microcomputer Power)进行细菌群落结构的非度量多维尺度分析 (non-metric multidimensional scaling, NMDS),并用 ANOSIM/Adonis 基于 Bray-Crutis 距离计算样品间群落组成的差异性。运用 Wilcoxon 秩和检验 (Wilcoxon rank-sum test)分析组间基因丰度、物种丰度和环境因子的差异。利用 Spearman 相关性

检验 (Spearman rank correlation test)检验环境因子与营养盐、功能基因和相关物种之间的相关性。所有统计学分析均利用 SPSS v25.0 (SPSS Inc., USA),所有检验的显著性阈值为 $P<0.05$ 。

2 结果和分析

2.1 围隔实验中环境参数变化

Chl *a* 是浮游植物光合作用所必需的光合色素,可作为估算海洋浮游植物的生物量的指标。在整个培养周期,磷酸盐添加组 M2 和对照组 M1 的 Chl *a* 浓度都保持在较低水平(图 1),平均浓度分别为 0.087 $\mu\text{g/L}$ 和 0.097 $\mu\text{g/L}$;但在培养第 5-9 天,Chl *a* 与 DMS/P 的浓度变化不一致,DMS/P 浓度逐渐升高。富氮磷组 M3 的 Chl *a* 浓度和 DMSP 浓度比对照组 M1 显著增加($P<0.05$),平均浓度分别为 1.28 $\mu\text{g/L}$ 和 85.63 nmol/L,在第 3 天两者浓度均达到最高(Chl *a*: 1.76 $\mu\text{g/L}$, DMSP: 91.64 nmol/L);培养后期 Chl *a* 浓度有所

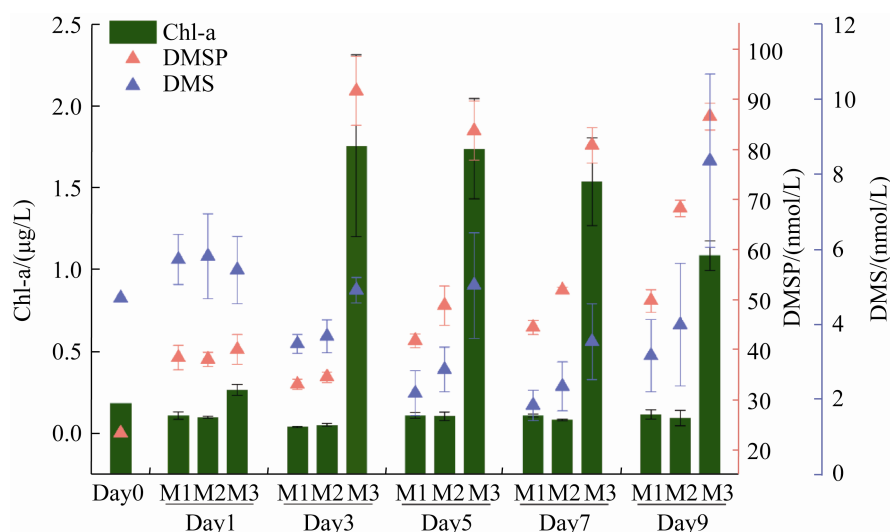


图 1. 围隔实验中氮磷添加组和对照组叶绿素 a 与 DMSP、DMS 的含量动态变化

Figure 1. The concentration of Chl *a*, DMSP and DMS of the nitrate and phosphate groups and control group in the mesocosm experiment.

下降(降至 1.09 $\mu\text{g/L}$), 但 DMSP 浓度仍然较高, 尤其是第 9 天(86.49 nmol/L)。Chl *a* 与 NO_3^- 呈显著正相关($P < 0.05$), 说明了同时添加硝酸盐和磷酸盐可以促进浮游植物生长和 DMSP 增加。Chl *a* 与 DMSP 呈显著正相关($P < 0.05$), 说明浮游植物对 DMSP 的合成有重要作用。此外, DMS 与 Chl *a* 的比值可用来估算海区浮游植物产生 DMS 的能力。与对照组 M1 相比, 磷酸盐添加组 M2 的 DMS/Chl *a* 比值 (26.36–71.71) 升高 (M1 为 16.69–87.89), 富氮磷组 M3 则下降(20.41–2.30), 表明磷酸盐能提高浮游植物产生 DMS 的能力, 而同时添加硝酸盐和磷酸盐减弱了其产生能力。

磷酸盐添加组 M2 与对照组 M1 的聚球藻 (*Synechococcus*) 数量均处于较低水平, 但富氮磷组 M3 中聚球藻数量显著增加($P < 0.05$), 且在第 3 天细胞数量达到最高(19985 cells/mL, 图 2-A), 随后逐渐下降, 反映了培养期间藻类的消亡。微型真核生物的丰度变化趋势与聚球藻相似, 富氮磷组 M3 在第 5 天达到最高(188 cells/mL, 图 2-B), 说明了同时添加硝酸盐和磷酸盐能促进聚球藻和微型真核生物的生长。值得注意的是, 虽然异养细菌的数量变化不明显, 却与聚球藻的数量变化趋势相反, 尤其在第 3 天后。此外, 在第 5–9 天, 磷酸盐添加组 M2 和对照组 M1 中 Chl *a* 浓度无显著差异, 但 DMSP 浓度逐渐升高, 推测缺乏 Chl *a* 的异养细菌可能是导致营养盐添加组中 DMSP 浓度在培养后期升高的原因(图 2-C)。

2.2 围隔实验中细菌群落结构变化

从 92 个围隔海水样品 DNA 测序中共获得 4542566 条有效序列, 平均长度为 273 bp, 3857 个 OTU。基于 OTU 的 Alpha 多样性分析可知, 所有样品的 Good's coverage 为 99.13%–99.59%, 表

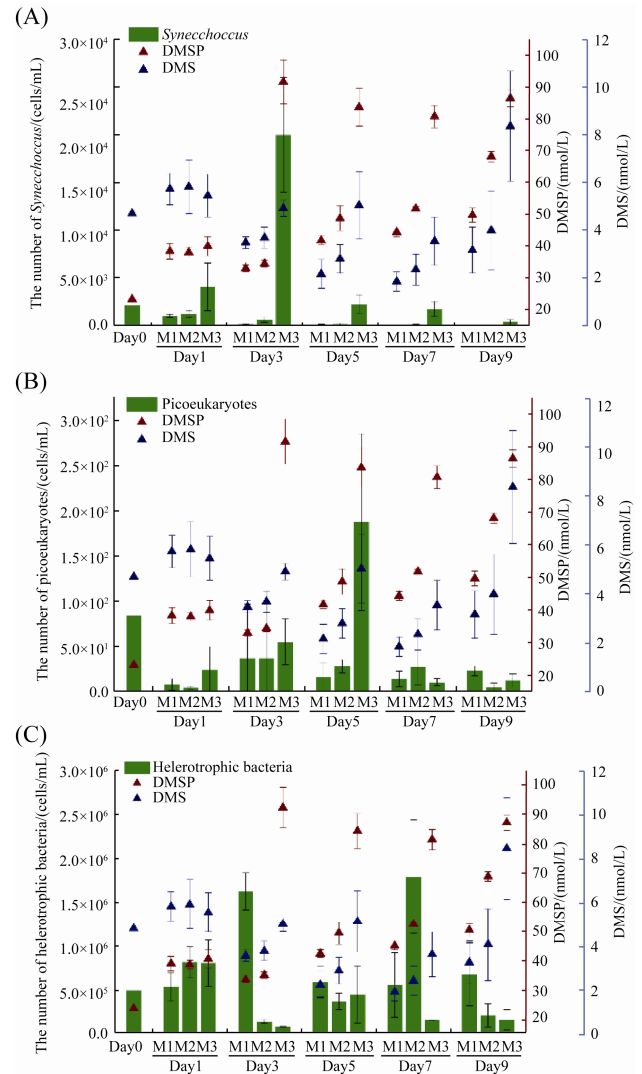


图 2. 围隔实验中氮磷添加组和对照组中聚球藻、微型真核生物和异养细菌丰度变化

Figure 2. The abundance of *Synechococcus* and picoeukaryotes of the nitrate and phosphate groups and control group in the mesocosm experiment. A: *Synechococcus*; B: picoeukaryotes; C: heterotrophic bacteria.

明这些序列可以代表研究样本的绝大部分细菌。本研究用 Shannon 指数和 Chao 1 指数来表示细菌群落的多样性和丰富度。从图 3 可知, 富氮磷组 M3 的自由生活细菌群落多样性和丰富度与对照组 M1 有显著差异($P < 0.05$), 但磷酸盐添加组 M2

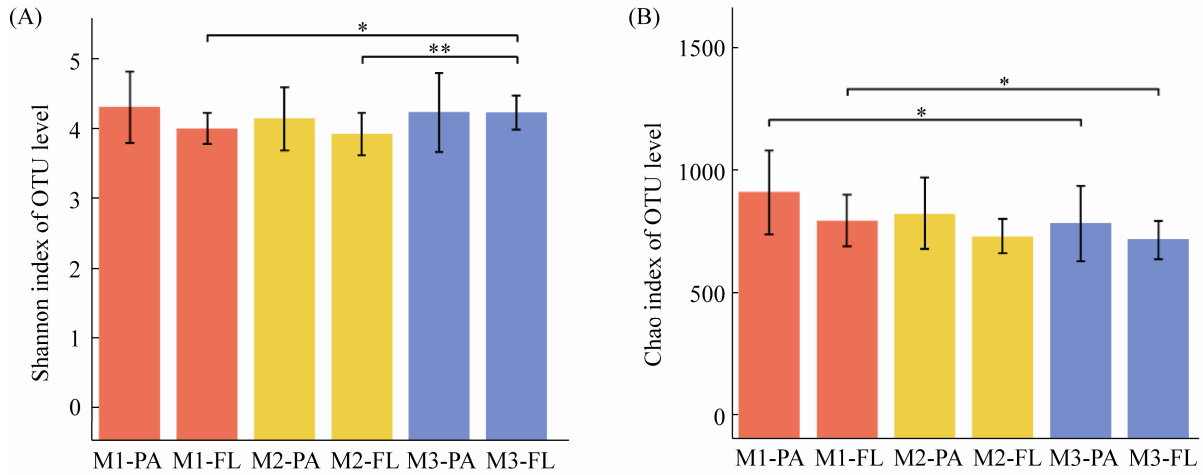


图 3. 围隔实验中细菌群落的 Shannon 指数和 Chao 指数

Figure 3. The Shannon index and Chao index of the bacterial community in the mesocosm experiment. A: Shannon index of OTU level; B: Chao index of OTU level. Particle-associated samples and free-living samples have “PA” and “FL” in their sample names, respectively.

与对照组没有显著差异, 说明了同时添加硝酸盐和磷酸盐会影响细菌群落的多样性和丰富度, 而仅添加磷酸盐影响不大。

基于 OTU 水平的 NMDS 分析可知(图 4), 从生活方式上, 自由生活细菌和附着生活细菌沿第二轴分开; 从实验处理方法上, 富氮磷组 M3 和

磷酸盐添加组 M2、对照组 M1 沿第一轴分开 ($P<0.05$), 说明了同时添加硝酸盐和磷酸盐造成了实验样品间的差异($P<0.05$)。

在纲水平上(图 5-A, 5-B), *Alphaproteobacteria* 和 *Gammaproteobacteria* 在自由生活(平均丰度分别占总细菌的 38.34%和 32.11%)和附着生活(38.27%和 28.35%)细菌群落中均为优势类群。对于自由生活细菌(图 5-A), *Alphaproteobacteria*、*Sphingobacteriia* 和 OM190 的相对丰度随着培养时间增加而逐渐升高(20.29%–55.37%、0.12%–9.65%和 0.0010%–3.32%), 而 *Gammaproteobacteria*、*Actinobacteria* 和 *Cyanobacteria* 则逐渐下降(50.17%–12.01%、10.80%–0.68%和 11.42%–2.66%)。与对照组 M1 相比, 特别在培养第 7–9 天, 两个实验组的 *Alphaproteobacteria* 相对丰度(M2 为 49.26%–50.88%, M3 为 43.23%–55.37%)均稍高于对照组 M1 (37.67%–41.60%)。同样地, 富氮磷组 M3 的 *Flavobacteriia* 相对丰度(12.41%–21.48%)显著高于对照组 M1 (1.96%–10.89%, $P<0.05$),

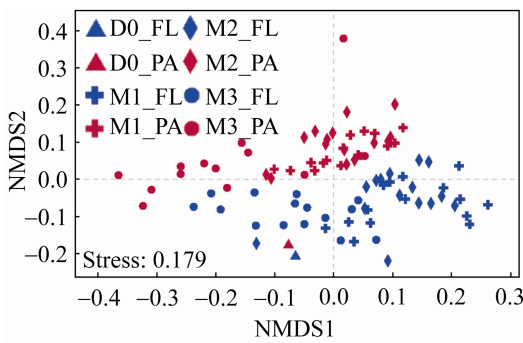


图 4. 基于 OTU 水平上细菌群落的 NMDS 分析
Figure 4. The NMDS analysis of bacterial community at OTU level. D0 represents day 0 of the mesocosm experiment. Particle-associated samples and free-living samples have “PA” and “FL” in their sample names, respectively.

且比磷酸盐添加组 M2 高 1.20–10.57 倍；*Sphingobacteriia* 的变化趋势与 *Flavobacteriia* 相似，富氮磷组 M3 (0.25%–9.65%) 显著高于对照组 M1 (0.12%–1.01%， $P < 0.05$)，比 M2 高 1.73–60.21 倍。而 *Gammaproteobacteria* 和 OM190 变化趋势则相反，对照组 M1 (28.62%–44.03% 和 0.001%–0.0016%) 和磷酸盐添加组 M2 (32.29%–50.17% 和 0.10%–3.32%) 均显著高于富氮磷组 M3 (12.01%–29.47% 和 0.0004%–0.001%， $P < 0.05$)。

对于附着生活细菌(图 5-B)，其变化趋势与自由生活细菌相似。随着培养时间的增加，*Alphaproteobacteria*、*Sphingobacteriia* 和 OM190 丰度逐渐增加(24.73%–60.14%、0.75%–15.75% 和 0.37%–6.60)，而 *Gammaproteobacteria* 和 *Actinobacteria* 则逐渐下降(52.94%–3.80% 和 7.10%–0.33%)。与对照组 M1 相比，两个实验组的 *Alphaproteobacteria* 相对丰度(M2 为 27.83%–51.99%，M3 为 34.05%–60.14%) 均显著高于对照组 0.88–1.64 倍和 0.78–1.68 倍($P < 0.05$)。富氮磷

组 M3 的 *Flavobacteriia* (8.62%–20.27%) 和 *Sphingobacteriia* (0.79%–15.75%) 的相对丰度分别显著比对照组 M1 高 1.25–3.14 倍和 1.10–7.88 倍($P < 0.05$)，且比 M2 组高 1.00–7.29 倍和 1.00–16.80 倍，而 *Gammaproteobacteria* (3.80%–42.28%) 和 OM190 (0.15%–1.10%) 比 M1 低 1.25–8.16 倍和 0.56–14.17 倍($P < 0.05$)，且比 M2 低 1.11–6.39 倍和 0.34–14.88 倍。表明同时加硝酸盐和磷酸盐可促进 *Alphaproteobacteria*、*Flavobacteriia* 和 *Sphingobacteriia* 等类群生长，而抑制 *Gammaproteobacteria*、OM190 等类群生长，从而造成了组间细菌群落差异。

2.3 氮磷营养盐对 DMSP 代谢功能基因的影响

dysB 和 *mmtN* 是细菌合成 DMSP 的标记基因，*dddP* 和 *dmdA* (C/2 和 D/1) 是细菌降解 DMSP 的代表基因，因此本实验用这 4 个基因去探究不同浓度氮磷营养盐对细菌代谢 DMSP 的影响。

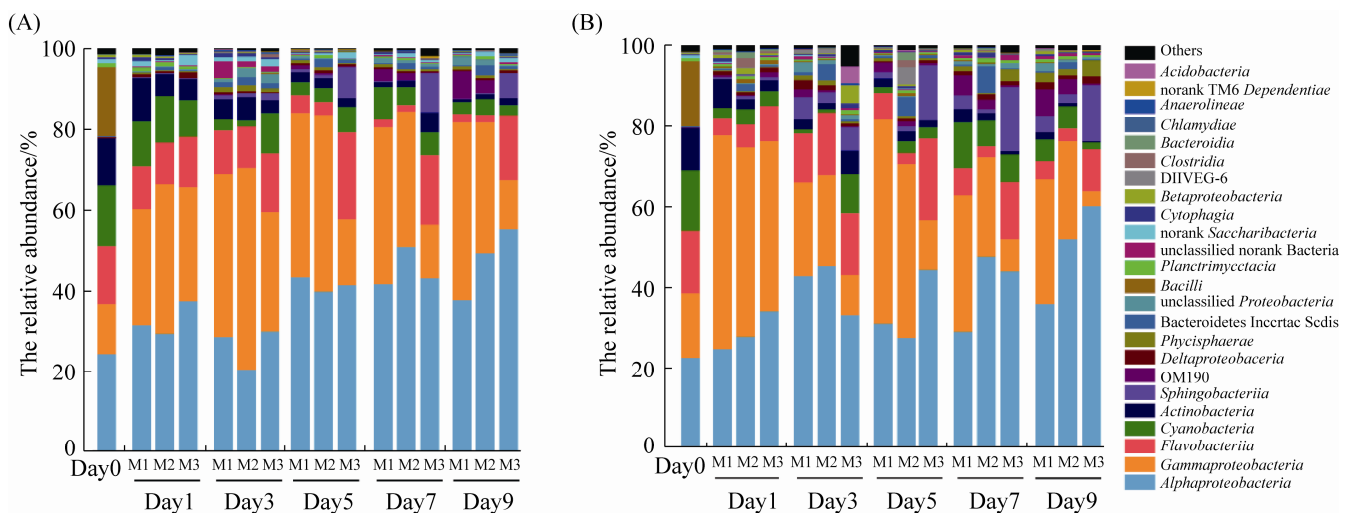


图 5. 在纲水平上细菌的群落组成

Figure 5. The bacterial community structure at class level. A: the relative abundance of free-living bacteria; B: the relative abundance of particle-associated bacteria.

2.3.1 DMSP 合成与降解基因的绝对丰度: 从图 6 可以看出, 细菌 16S rRNA 基因、DMSP 合成基因和降解基因的绝对丰度变化规律较为一致。相比于对照组 M1 (1.35×10^5 – 3.78×10^5 copies/mL, 自由生活和附着生活样品基因丰度的总和), 只添加磷酸盐 (M2) 对细菌 16S rRNA 基因丰度 (1.17×10^5 – 4.05×10^5 copies/mL) 没有明显影响 (图 6-A), 而同时添加硝酸盐和磷酸盐 (M3) 促进了细菌 16S rRNA 丰度 (2.70×10^5 – 8.43×10^5 copies/mL) 增加。

对于 DMSP 合成基因, 与对照组 M1 相比 (47.9 – 5.31×10^2 copies/mL), 营养盐的添加均促进了 *dsyB* 丰度 (M2 从 5.06×10^1 copies/mL 升至 1.19×10^3 copies/mL, M3 从 3.07×10^2 copies/mL 升至 1.79×10^3 copies/mL) 的升高 (图 6-B)。结合 16S rRNA 基因丰度变化, 说明了同时添加硝酸盐和磷酸盐促进了细菌的生长, 进而增加了 *dsyB* 的丰度; 且只添加磷酸盐也能促进 *dsyB* 丰度的增加。

mmtN 的变化规律不明显, 仅在培养前 5 天中其丰度随着时间增加而升高, 其丰度比 *dsyB* 丰度约低 66 倍 ($P < 0.05$), 且与营养盐没有显著相关性 (图 6-C)。自由生活和附着生活细菌的 16S rRNA 基因丰度、*dsyB* 丰度均与 DMSP 浓度存在显著正相关 ($P < 0.05$), *mmtN* 则没有。此外, 自由生活细菌的 *dsyB* 和 *mmtN* 丰度基本比附着生活细菌高, 分别约高 7.34 倍和 6.31 倍, 这些结果反映了培养过程中自由生活细菌是主要的 DMSP 合成菌, 主要是通过 *dsyB* 介导的转氨途径合成 DMSP。

对于 DMSP 降解基因, 磷酸盐添加组 M2 的 *dddP* 丰度变化与对照组 M1 相似 (5.83×10^3 – 1.83×10^4 copies/mL, 图 6-D), 而富氮磷组 M3 的

dddP 丰度却增加 (1.80×10^3 – 3.82×10^4 copies/mL)。*dddP* 丰度与硝酸盐浓度呈显著正相关 ($P < 0.05$), 反映了同时添加硝酸盐和磷酸盐能促进细菌的生长, 进而增加了 *dddP* 的丰度。此外, 自由生活细菌的 *dddP* 丰度与 DMS 浓度有显著正相关关系 ($P < 0.05$), 表明了自由生活细菌中的 *dddP* 介导的裂解途径对产生 DMS 有重要贡献。

随着培养时间的增加, *dmdA* 丰度逐渐上升 (图 6-E)。D/1 类群丰度均比 C/2 类群高 (自由生活和附着生活细菌分别约高 43.54 倍和 8.92 倍)。*dmdA* 丰度的变化规律不明显, 与营养盐也没有显著相关性, 但自由生活和附着生活细菌的 *dmdA* 丰度是 *dddP* 的 10.18 倍和 4.79 倍, 且自由生活细菌的 *dmdA* 丰度与 DMSP 浓度有显著的正相关关系 ($P < 0.05$), 说明了本实验中 DMSP 的降解主要是自由生活细菌通过脱甲基途径完成。值得注意的是, 在第 3 天, 细菌丰度和 DMSP 合成降解基因的绝对丰度都比较低, 可能是浮游植物的生长抑制了细菌的生长。

2.3.2 DMSP 合成与降解基因的相对丰度: 本实验以 16S rRNA 基因拷贝数来代表细菌总丰度以计算这 4 个功能基因的相对丰度, 探讨营养盐的添加是否对 DMSP 合成与降解基因起到富集作用。

在培养第 5–9 天, 磷酸盐添加组 M2 中 *dsyB* 的相对丰度比对照组 M1 高 0.78–5.73 倍 (图 7-A), 说明了只添加磷酸盐促进了 *dsyB* 的富集。富氮磷组 M3 的 *dsyB* 相对丰度比对照组 M1 高 1.51–3.13 倍, 但比磷酸盐添加组 M2 低 0.24–2.33 倍, 说明了同时添加硝酸盐和磷酸盐能使 *dsyB* 富集, 但相比只加磷酸盐, 该营养盐结构不利于 *dsyB* 的积累, 预示着硝酸盐存在抑制 *dsyB* 积累的可能。

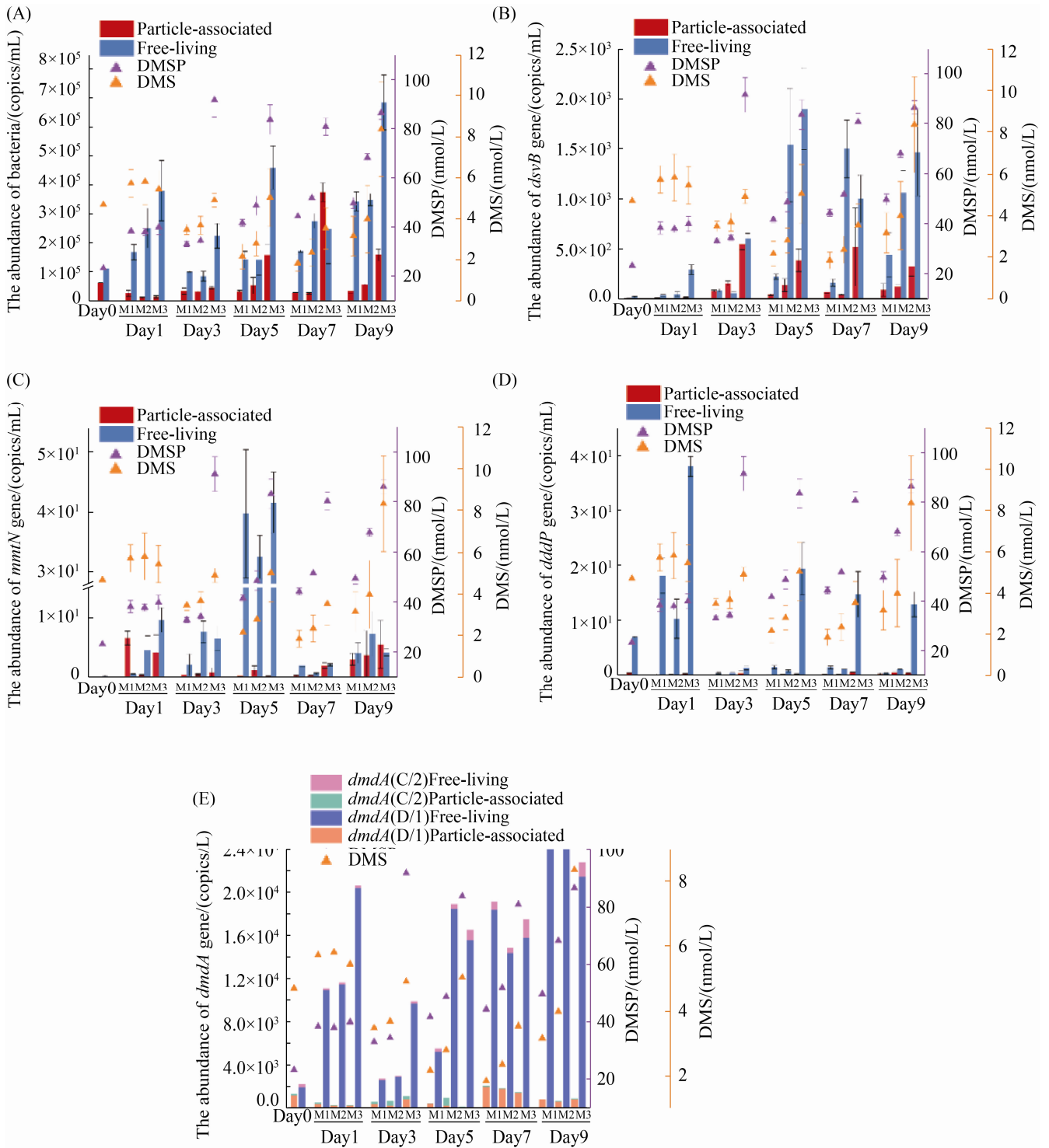


图 6. 采用 qPCR 技术检测 16S rRNA 基因和 DMSP 合成与降解基因的绝对丰度

Figure 6. The absolute abundance of 16S rRNA gene and DMSP producing and catabolising genes determined by qPCR. A: 16S rRNA; B: *dsyB*; C: *mntN*; D: *dddP*; E: *dmdA*.

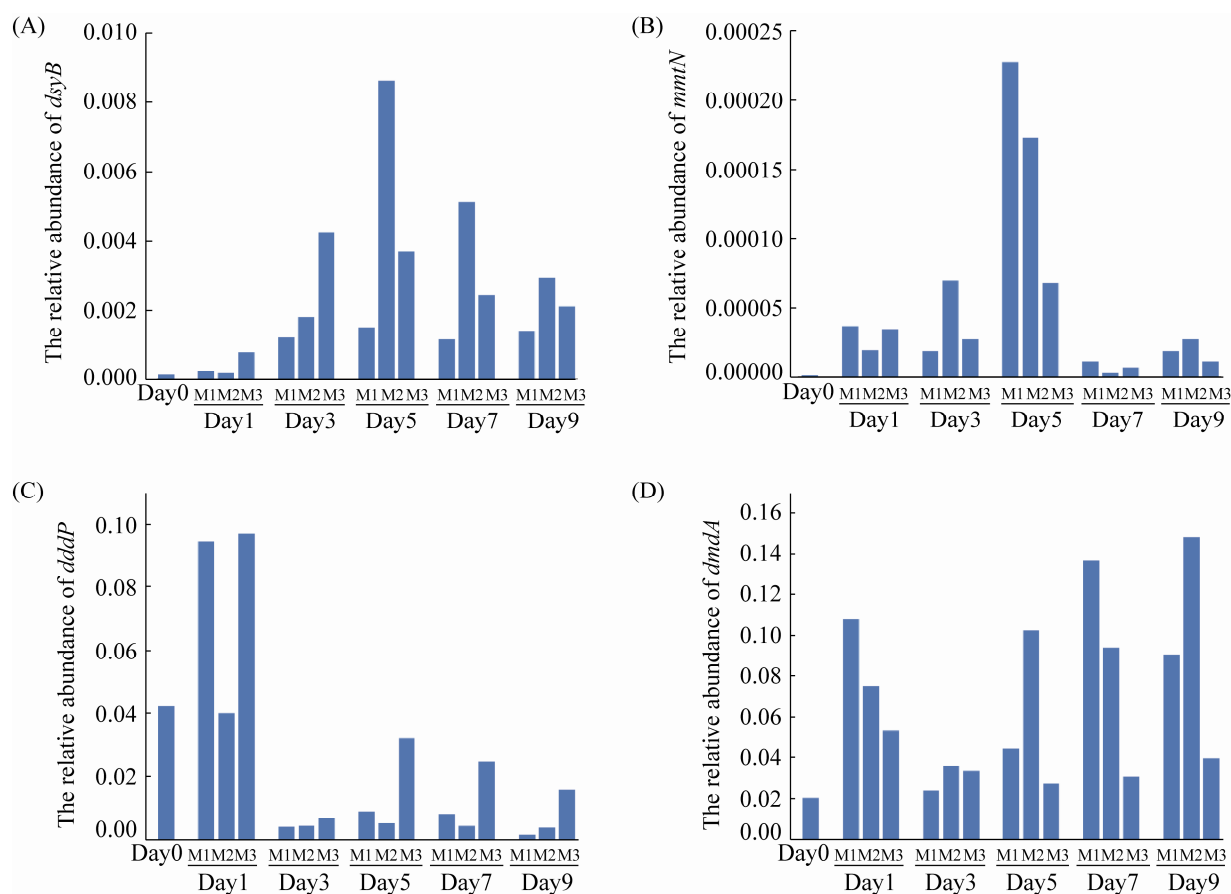


图 7. 采用 qPCR 技术检测 DMSP 合成与降解基因的相对丰度

Figure 7. The relative abundance of DMSP producing and catabolising genes. A: *dsyB*; B: *mntN*; C: *dddP*; D: *dmdA*.

三组的 *mntN* 相对丰度没有显著差异(图 7-B), 变化规律不明显, 其相对丰度平均比 *dsyB* 低 64.84 倍, 说明营养盐的添加对 *mntN* 没有明显的富集作用。

除了第 1 天, 整体上, 磷酸盐添加组 M2 的 *dddP* 相对丰度与对照组 M1 没有明显变化(图 7-C), 而富氮磷组 M3 的相对丰度分别比对照组 M1 和磷酸盐添加组 M2 高 1.03–10.26 倍和 1.52–6.33 倍, 说明同时加硝酸盐和磷酸盐能促进 *dddP* 基因的富集, 而只加磷酸盐作用不明显。但在第 3 天 *dddP* 相对丰度很低, 与其绝对丰度变化一致(图 6-D), 推测浮游植物生长阻碍了相应

细菌的富集。

对于 *dmdA* (图 7-D), 其相对丰度在磷酸盐添加组 M2 比在对照组 M1 高 0.69–2.31 倍, 且与磷酸盐浓度呈显著正相关($P < 0.05$), 说明了添加磷酸盐能促进 *dmdA* 的富集; 而富氮磷组 M3 比对照组 M1 低 0.72–4.49 倍, 且显著低于磷酸盐添加组 M2 的 1.08–3.77 倍($P < 0.05$), 说明同时添加硝酸盐和磷酸盐会抑制 *dmdA* 的富集。

2.4 氮磷营养盐对 DMSP 代谢功能细菌的影响

有许多细菌属含有 *DsyB* 和/或 *MntN*, 或通过未知机制产生 DMSP, 如 *Marinobacter*^[6–7]; 此

外, 玫瑰杆菌类群、SAR11 和 SAR116 具有降解 DMSP 的能力^[3,35]。因此, 根据 2017 年 Curson 等^[6]和 2019 年 Williams 等^[7]的研究, 在本研究的细菌群落组成中寻找具有 DMSP 合成能力和降解能力的可能物种(相对丰度), 探讨营养盐的添加是否对 DMSP 合成降解细菌起到富集作用。

2.4.1 DMSP 合成物种: 含有 *dsyB* 的 *Phaeobacter*^[6] 在磷酸盐添加组 M2 的相对丰度显著比对照组 M1 高 0.87–10.00 倍($P<0.05$), 而富氮磷组 M3 与对照组 M1 差异不大, 但比磷酸盐添加组 M2 低 0.74–5.71 倍(图 8-A)。含有 *dsyB* 的 *Thalassobius*^[6] 在富氮磷组 M3 的变化趋势则相反, 分别显著高于对照组 M1 和磷酸盐添加组 M2 的 1.95–21.77 倍和 2.86–26.50 倍($P<0.05$), 其与硝酸盐浓度呈显著正相关而与磷酸盐呈负相关($P<0.05$)。在培养 5–9 d, 与对照组 M1 相比, 磷酸盐添加组 M2 的含有 *dsyB* 和 *mmtN* 的 *Ruegeria* 的相对丰度升高(平均比 M1 高 1.91 倍), 富氮磷组 M3 则分别比对照组 M1 和磷酸盐添加组 M2 高 1.44–3.35 倍和 0.65–14.05 倍, 且 *Ruegeria* 相对丰度与硝酸盐浓度呈显著正相关($P<0.05$)。丰度较低的 *Labrenzia* 也与硝酸盐浓度呈显著正相关($P<0.05$)。表明了仅加磷酸盐能促进 *Phaeobacter* 的富集, 而同时添加硝酸盐和磷酸盐能促进 *Thalassobius*、*Ruegeria* 和 *Labrenzia* 的富集, 但抑制 *Phaeobacter* 的富集。

Alteromonas 是携带 *mmtN* 的优势菌群^[7](图 8-B), 其相对丰度在磷酸盐添加组 M2 与对照组 M1 之间没有明显差异; 但富氮磷组 M3 显著低于对照组 M1 (低 0.89–4.21 倍, $P<0.05$), 且比磷酸盐添加组 M2 低 0.54–4.62 倍。说明同时加硝酸盐和磷酸盐会抑制 *Alteromonas* 的生长, 导致

mmtN 积累受阻, 而只加磷酸盐影响不大。

2.4.2 DMSP 降解物种: 对于含有 *dddP* 物种(图 8-C), 富氮磷组 M3 中的 *Thalassococcus* 的相对丰度均显著高于对照组 M1 (1.27–2.77 倍)和磷酸盐添加组 M2 (1.41–8.53 倍, $P<0.05$), 其与磷酸盐浓度呈显著负相关($P<0.05$)。含有 *dddP* 的 *Thalassobius* 变化规律与 *Thalassococcus* 一致。此外, 磷酸盐添加组 M2 的 *Loktanella*^[36]的相对丰度比对照组 M1 高 0.42–3.11 倍, 而富氮磷组 M3 分别比对照组 M1 和磷酸盐添加组 M2 高 1.18–3.21 倍和 0.74–3.21 倍。*Shimia* 在富氮磷组 M3 中相对丰度均比对照组 M1 和磷酸盐添加组 M2 高 0.29–17.81 倍和 0.29–9.80 倍, 且与磷酸盐浓度呈显著负相关($P<0.05$)。相反, 含有 *dmdA* 和 *ddd* 的 *Sulfitobacter*^[36]的相对丰度在磷酸盐添加组 M2 中比对照组 M1 高 0.55–16.16 倍, 富氮磷组 M3 与对照组 M1 无明显差异, 但低于磷酸盐添加组 M2 的 0.44–12.90 倍。此外, 含有 *dmdA* 和 *ddd* 的 *Phaeobacter* 的变化与 *Sulfitobacter* 一致。表明了仅加磷酸盐能促进 *Sulfitobacter* 和 *Phaeobacter* 的富集, 而同时添加硝酸盐和磷酸盐能促进 *Thalassococcus*、*Thalassobius*、*Loktanella* 和 *Shimia* 等主要物种生长, 从而导致 *dddP* 被富集。

SAR11 是携带 *dmdA* 的主要物种^[37–38](图 8-D)。磷酸盐添加组 M2 的 SAR11 的相对丰度比对照组 M1 低 1.07–1.99 倍; 而富氮磷组 M3 分别比对照组 M1 低 0.74–5.48 倍和比磷酸盐添加组 M2 低 0.37–5.12 倍。说明了营养盐尤其是同时添加硝酸盐和磷酸盐会抑制 SAR11 类群、*Sulfitobacter* 等物种的生长, 阻碍了 *dmdA* 富集。

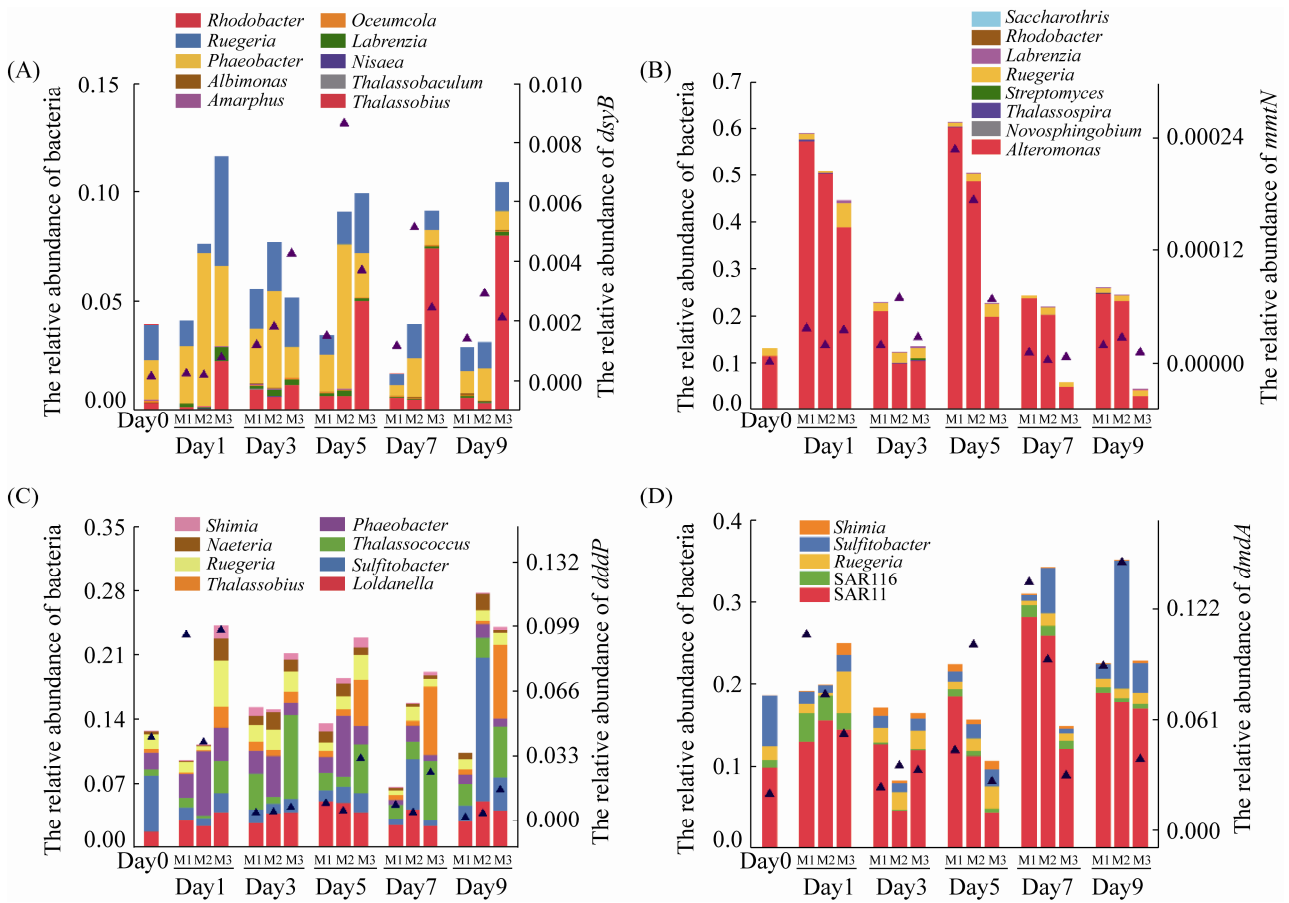


图 8. DMSP 合成与降解基因和相应物种的相对丰度

Figure 8. The relative abundance of DMSP producing and catabolising genes and their containing bacteria. A: *dsyB*; B: *mmtN*; C: *dddP*; D: *dmdA*.

3 讨论

氮、磷是细胞代谢产生核酸、氨基酸、ATP、磷脂等维持生命所需的基本元素，其在环境中的含量变化可对生物生长带来巨大的影响。本研究中，同时添加硝酸盐和磷酸盐促进了 Chl *a* 含量的增加，而只加磷酸盐没有明显作用，这与朱蓉的结论相一致^[39]。推测这可能与高磷营养盐浓度下浮游植物受氮限制，而在 Chl *a* 的合成过程中，氮元素的缺乏会造成 Chl *a* 合成受阻，进一步证明了氮元素是限制浮游植物生长的关键因素。据 Rhee 报道，当营养盐总水平能够满足海洋浮游植

物生长时，它们对氮磷的吸收比例基本遵循 Redfield 比值 16:1^[40-41]。因此，与磷酸盐添加组 M2 相比，富氮磷组 M3 的营养盐结构符合 Redfield 比值，保证了细胞同时消耗这些营养盐，促使浮游植物和细菌生长，二者合成的 DMSP 含量也随之上升，裂解得到的 DMS 也增加。值得注意的是，在第 3 天，DMSP 合成和降解基因的绝对丰度较低，可能是浮游植物的快速生长，DMSP 浓度增加，相应裂解产生的丙烯酸盐浓度升高，抑制了相应细菌的生长^[42]。而培养 5-9 d，浮游植物生物量下降，实验组的 DMSP 浓度仍较

高,尤其是磷酸盐添加组 M2,加上 *dsyB* 和相应物种丰度得到积累,且 *dsyB* 丰度与 DMSP 浓度显著相关,说明了在培养 5–9 d 细菌合成的 DMSP 占比增加,主要由 *dsyB* 介导的转氨基途径合成。

从绝对丰度上看,同时添加硝酸盐和磷酸盐促进了 *dsyB* 绝对丰度的增加(图 6-B),实际上同时添加硝酸盐和磷酸盐促进了细菌的生长而造成 *dsyB* 绝对丰度的增加(图 6-A)。从相对丰度上看(图 7-A),只加磷酸盐促进 *dsyB* 富集;虽然同时添加硝酸盐和磷酸盐能使 *dsyB* 富集,但相比于只加磷酸盐,其对 *dsyB* 的富集有一定的抑制作用,与 Curson 等发现在低氮情况下 DMSP 合成量和 *dsyB* 基因转录量增多的结果一致^[6],但只加磷酸盐富集了其优势菌——*Thalassobius*,与 *dsyB* 相对丰度变化不一致,可能是该属的部分物种没有合成 DMSP 功能。添加磷酸盐能促进 *dsyB* 和 *Phaeobacter* 的积累,暂时没有该现象的报道,而 Pomeroy 等发现添加磷酸盐能增加细菌数量^[43],可能磷酸盐促进了未被报道的含有 *dsyB* 物种的生长,其中的复杂生化相互作用需要进一步的实验来探索。对于 *mmtN*,绝对丰度和相对丰度都比 *dsyB* 低(图 6-C 和图 7-B),这与 William 的结果一致,*mmtN* 在海水中丰度极低^[7];加上 *mmtN* 丰度与 DMSP 浓度没有显著相关,进一步说明了在本围隔实验中,*mmtN* 对于 DMSP 的合成贡献较小。本实验中携带 *mmtN* 的优势类群是 *Alteromonas*,与 William 的结果一致^[7]。此外,同时添加硝酸盐和磷酸盐会抑制 *Alteromonas* 的生长,这说明硝酸盐和磷酸盐组合不利于 *Alteromonas* 的富集,从而导致 *mmtN* 丰度很低。

对于 DMSP 降解基因,同时添加硝酸盐和磷酸盐促进了 *dddP* 的富集,却抑制了 *dmdA* 的积累

(图 7-C 和图 7-D),这与相关物种的变化情况相符,如同时添加硝酸盐和磷酸盐促进了含有 *dddP* 的类群 *Thalassococcus*、*Thalassobius* 和 *Loktanella* 的生长,而抑制了含 *dmdA* 类群 SAR11、*Sulfitobacter* 等类群的生长(图 8-C 和图 8-D)。虽然同时添加硝酸盐和磷酸盐抑制了 *dmdA* 的积累,但在本研究中,*dmdA* 的绝对丰度始终高于 *dddP*,这说明在本实验的研究海域,相比于 *dmdA* 介导的 DMSP 脱甲基途径,通过 *dddP* 介导的 DMSP 裂解途径的遗传潜力要弱一些(图 6-D 和图 6-E),这与 Liu 等的发现一致^[36]。但 *dddP* 绝对丰度(自由生活细菌)与 DMS 浓度呈显著正相关关系,印证了自由生活细菌利用 *DddP* 裂解酶裂解 DMSP 的重要作用,同时揭示了 DMSP 脱甲基途径和裂解途径之间存在竞争关系。当 DMSP 可用性增加时,会出现一种解偶联现象,即 DMSP 的需求量超过了细菌对硫的需求,硫被同化的比例降低,细菌更转向 DMSP 裂解途径^[44],因此,同时添加硝酸盐和磷酸盐促进了 DMSP 浓度上升,细菌趋向 DMSP 裂解途径,使得 *dddP* 基因及 *Thalassococcus*、*Thalassobius* 等相应物种积累,DMSP 脱甲基途径比例下降,加上 SAR11 多分布在 DMSP 浓度相对较低的海域中^[45],因此 DMSP 浓度过高不利于 SAR11、*Sulfitobacter* 等携带 *dmdA* 物种的富集,而磷酸盐的作用则相反。Sunda 等发现氮限制能提高颗石藻的 DMSP 裂解酶活性,增加 DMS:Chl *a* 比值^[16],这与本实验结果一致(图 1)。

本研究发现,同时添加硝酸盐和磷酸盐能促进 DMSP 增加以及合成基因和相关物种的积累,虽然暂时无法评估硝酸盐和磷酸盐的生化相互作用,但硝酸盐起了不可忽视的作用。焦念志等

发现, 自然海区的 DMSP 与 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的关系是一种两段式的相关关系, 即 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度存在某一阈值, 当 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度低于该阈值, DMSP 与 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度呈正相关; 高于则呈负相关^[46]。因此, 本实验观察到硝酸盐所起的促进作用很可能是硝酸盐和磷酸盐的共同作用造成的, 也有可能是本实验的硝酸盐浓度低于某阈值, 这些假设对细菌合成 DMSP 的影响机制有待进一步实验验证。

综上, 从本研究可以得知, 硝酸盐的限制能更好地促进 DMSP 合成细菌表达相应功能基因 (主要是 *dsyB*) 增加 DMSP 的合成来应对营养条件不足的生存环境, 且提高 DMSP 脱甲基化的比例为细菌提供更多能量; 在硝酸盐和磷酸盐充足条件下, 细菌则相对减少 DMSP 的合成, 且更倾向于裂解 DMSP 产生 DMS 来降低硫同化比例。

致谢

感谢中国海洋大学化学化工学院杨桂朋课题组对 DMS 和 DMSP 数据提供的帮助; 感谢中国海洋大学辛宇课题组在营养盐的测定上提供帮助。感谢厦门大学高亚辉课题组在叶绿素 a 的测定上提供的帮助。

参考文献

- [1] Ksionzek KB, Lechtenfeld OJ, McCallister SL, Schmitt-Kopplin P, Geuer JK, Geibert W, Koch BP. Dissolved organic sulfur in the ocean: Biogeochemistry of a petagram inventory. *Science*, 2016, 354(6311): 456–459.
- [2] Archer SD, Widdicombe CE, Tarran GA, Rees AP, Burkill PH. Production and turnover of particulate dimethylsulphoniopropionate during a coccolithophore bloom in the northern North Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, 24(3): 225–241.
- [3] Howard EC, Henriksen JR, Buchan A, Reisch CR, Bürgmann H, Welsh R, Ye WY, González JM, Mace K, Joye SB, Kiene RP, Whitman WB, Moran MA. Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean. *Science*, 2006, 314(5799): 649–652.
- [4] Andreae MO, Ferek RJ, Bermond F, Byrd KP, Engstrom RT, Hardin S, Houmere PD, Lemarrec F, Raemdonck H, Chatfield RB. Dimethyl sulfide in the marine atmosphere. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 1985, 90(D7): 12891–12900.
- [5] Boucher O, Pham M. History of sulfate aerosol radiative forcings. *Geophysical Research Letters*, 2002, 29(9): 22-1–22-4.
- [6] Curson ARJ, Liu J, Martínez AB, Green RT, Chan Y, Carrión O, Williams BT, Zhang SH, Yang GP, Bulman Page PC, Zhang XH, Todd JD. Dimethylsulfonylpropionate biosynthesis in marine bacteria and identification of the key gene in this process. *Nature Microbiology*, 2017, 2(5): 17009.
- [7] Williams BT, Cowles K, Martínez AB, Curson ARJ, Zheng YF, Liu JL, Newton-Payne S, Hind AJ, Li CY, Rivera PPL, Carrión O, Liu J, Spurgin LG, Brearley CA, Mackenzie BW, Pinchbeck BJ, Peng M, Pratscher J, Zhang XH, Zhang YZ, Murrell JC, Todd JD. Bacteria are important dimethylsulfonylpropionate producers in coastal sediments. *Nature Microbiology*, 2019, 4(11): 1815–1825.
- [8] Curson ARJ, Williams BT, Pinchbeck BJ, Sims LP, Martínez AB, Rivera PPL, Kumaresan D, Mercadé E, Spurgin LG, Carrión O, Moxon S, Cattolico RA, Kuzhiumparambil U, Guagliardo P, Clode PL, Raina JB, Todd JD. DSYB catalyses the key step of dimethylsulfonylpropionate biosynthesis in many phytoplankton. *Nature Microbiology*, 2018, 3(4): 430–439.
- [9] Kageyama H, Tanaka Y, Shibata A, Waditee-Sirisattha R, Takabe T. Dimethylsulfonylpropionate biosynthesis in a diatom *Thalassiosira pseudonana*: Identification of a gene encoding MTHB-methyltransferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, 645: 100–106.
- [10] Curson ARJ, Todd JD, Sullivan MJ, Johnston AWB. Catabolism of dimethylsulphonylpropionate: microorganisms, enzymes and genes. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(12): 849–859.
- [11] Howard EC, Sun SL, Biers EJ, Moran MA. Abundant and

- diverse bacteria involved in DMSP degradation in marine surface waters. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(9): 2397–2410.
- [12] Alcolombri U, Ben-Dor S, Feldmesser E, Levin Y, Tawfik DS, Vardi A. Identification of the algal dimethyl sulfide-releasing enzyme: A missing link in the marine sulfur cycle. *Science*, 2015, 348(6242): 1466–1469.
- [13] Todd JD, Curson ARJ, Kirkwood M, Sullivan MJ, Green RT, Johnston AWB. DddQ, a novel, cupin-containing, dimethylsulfoniopropionate lyase in marine roseobacters and in uncultured marine bacteria. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(2): 427–438.
- [14] Todd JD, Curson ARJ, Dupont CL, Nicholson P, Johnston AWB. The *dddP* gene, encoding a novel enzyme that converts dimethylsulfoniopropionate into dimethyl sulfide, is widespread in ocean metagenomes and marine bacteria and also occurs in some Ascomycete fungi. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(6): 1376–1385.
- [15] Thume K, Gebser B, Chen L, Meyer N, Kieber DJ, Pohnert G. The metabolite dimethylsulfoxonium propionate extends the marine organosulfur cycle. *Nature*, 2018, 563(7731): 412–415.
- [16] Sunda WG, Hardison R, Kiene RP, Bucciarelli E, Harada H. The effect of nitrogen limitation on cellular DMSP and DMS release in marine phytoplankton: climate feedback implications. *Aquatic Sciences*, 2007, 69(3): 341–351.
- [17] Strickland JDH, Terhune LDB. The study of in-situ marine photosynthesis using a large plastic bag. *Limnology and Oceanography*, 1961, 6(1): 93–96.
- [18] Levasseur M, Michaud S, Egge J, Cantin G, Nejstgaard JC, Sanders R, Fernandez E, Solberg PT, Heimdal B, Gosselin M. Production of DMSP and DMS during a mesocosm study of an *Emiliana huxleyi* bloom: influence of bacteria and *Calanus finmarchicus* grazing. *Marine Biology*, 1996, 126(4): 609–618.
- [19] Kwint RLJ, Quist P, Hansen TA, Dijkhuizen L, Kramer KJM. Turnover of dimethylsulfoniopropionate and dimethylsulfide in the marine environment: A mesocosm experiment. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 145: 223–232.
- [20] Bratbak G, Levasseur M, Michaud S, Cantin G, Fernández E, Heimdal BR, Heldal M. Viral activity in relation to *Emiliana huxleyi* blooms: a mechanism of DMSP release? *Marine Ecology Progress Series*, 1995, 128: 133–142.
- [21] Wilson WH, Turner S, Mann NH. Population dynamics of phytoplankton and viruses in a phosphate-limited mesocosm and their effect on DMSP and DMS production. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1998, 46(2): 49–59.
- [22] Sun H, Zhang YH, Tan SY, Zheng YF, Zhou S, Ma QY, Yang GP, Todd JD, Zhang XH. DMSP-producing bacteria are more abundant in the surface microlayer than subsurface seawater of the East China Sea. *Microbial Ecology*, 2020, 80(2): 350–365.
- [23] Varaljay VA, Howard EC, Sun SL, Moran MA. Deep sequencing of a dimethylsulfoniopropionate-degrading gene (*dmdA*) by using PCR primer pairs designed on the basis of marine metagenomic data. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(2): 609–617.
- [24] Yin Q, Fu BB, Li BY, Shi XC, Inagaki F, Zhang XH. Spatial variations in microbial community composition in surface seawater from the ultra-oligotrophic center to rim of the South Pacific Gyre. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55148.
- [25] Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, Gilbert JA, Jansson JK, Caporaso JG, Fuhrman JA, Apprill A, Knight R. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems*, 2016, 1(1): e00009-15.
- [26] Liang JC, Liu JW, Wang XL, Lin HY, Liu JL, Zhou S, Sun H, Zhang XH. Spatiotemporal dynamics of free-living and particle-associated *vibrio* communities in the Northern Chinese Marginal Seas. *Applied Environment Microbiology*, 2019, 85(9): e00217-19.
- [27] Yang GP, Zhang HH, Zhou LM, Yang J. Temporal and spatial variations of dimethylsulfide (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the East China Sea and the Yellow Sea. *Continental Shelf Research*, 2011, 31(13): 1325–1335.
- [28] Liu JW, Fu BB, Yang HM, Zhao MX, He BY, Zhang XH. Phylogenetic shifts of bacterioplankton community composition along the Pearl Estuary: the potential impact of

- hypoxia and nutrients. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 64.
- [29] Zhang Y, Zhao ZH, Dai MH, Jiao NZ, Herndl GJ. Drivers shaping the diversity and biogeography of total and active bacterial communities in the South China Sea. *Molecular Ecology*, 2014, 23(9): 2260–2274.
- [30] Zhao L, Zhao YC, Wang CF, Zhang WC, Sun XX, Li XG, Zhao Y, Xiao T. Comparison in the distribution of microbial food web components in the Y3 and M2 seamounts in the tropical western Pacific. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(6): 1446–1455. (in Chinese)
赵丽, 赵燕楚, 王超锋, 张武昌, 孙晓霞, 李学刚, 赵苑, 肖天. 热带西太平洋 Y3 和 M2 海山微食物网主要类群生态分布与比较. *海洋与湖沼*, 2017, 48(6): 1446–1455.
- [31] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [32] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [33] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40(3/4): 237–264.
- [34] Chao A, Bunge J. Estimating the number of species in a Stochastic abundance model. *Biometrics*, 2002, 58(3): 531–539.
- [35] Choi DH, Park KT, An SM, Lee K, Cho JC, Lee JH, Kim D, Jeon D, Noh JH. Pyrosequencing revealed SAR116 clade as dominant *dddP*-containing bacteria in Oligotrophic NW Pacific Ocean. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116271.
- [36] Liu JL, Liu J, Zhang SH, Liang JC, Lin H, Song DL, Yang GP, Todd JD, Zhang XH. Novel insights into bacterial dimethylsulfoniopropionate catabolism in the East China Sea. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3206.
- [37] Sun J, Todd JD, Thrash JC, Qian YP, Qian MC, Temperton B, Guo JZ, Fowler EK, Aldrich JT, Nicora CD, Lipton MS, Smith RD, De Leenheer P, Payne SH, Johnston AWB, Davie-Martin CL, Halsey KH, Giovannoni SJ. The abundant marine bacterium *Pelagibacter* simultaneously catabolizes dimethylsulfoniopropionate to the gases dimethyl sulfide and methanethiol. *Nature Microbiology*, 2016, 1(8): 16065.
- [38] Landa M, Burns AS, Durham BP, Esson K, Nowinski B, Sharma S, Vorobev A, Nielsen T, Kiene RP, Moran MA. Sulfur metabolites that facilitate oceanic phytoplankton–bacteria carbon flux. *The ISME Journal*, 2019, 13(10): 2536–2550.
- [39] 朱蓉. 不同营养条件下四种海洋微藻生产 DMS 和 DMSP 的实验研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2013.
- [40] Redfield AC. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 1958, 46(3): 230A, 205–221.
- [41] Rhee GY. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnology and oceanography*, 1978, 23(1): 10–25.
- [42] Slezak DM, Puskaric S, Herndl GJ. Potential role of acrylic acid in bacterioplankton communities in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 1994, 105: 191–197.
- [43] Pomeroy LR, Sheldon JE, Sheldon Jr WM, Peters F. Limits to growth and respiration of bacterioplankton in the Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 1995, 117: 259–268.
- [44] Kiene RP, Linn LJ, Bruton JA. New and important roles for DMSP in marine microbial communities. *Journal of Sea Research*, 2000, 43(3/4): 209–224.
- [45] Giovannoni SJ. SAR11 bacteria: the most abundant plankton in the oceans. *Annual Review of Marine Science*, 2017, 9: 231–255.
- [46] Jiao NZ, Liu CZ, Chen NH. Distribution of Dimethylsulphoniopropionate and its controlling mechanism in the East China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(5): 525–531. (in Chinese)
焦念志, 柳承璋, 陈念红. 东海二甲基硫丙氨酸的分布及其制约因素的初步研究. *海洋与湖沼*, 1999, 30(5): 525–531.

Effects of nitrogen and phosphorus on the bacterial dimethylsulfoniopropionate production and catabolism

Siyin Tan¹, Hao Sun¹, Jinchang Liang¹, Xiaohua Zhang^{1,2,3*}

¹ College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

² Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, Shandong Province, China

³ Center for Advanced Science of Deep-Sea Spheres and Earth Systems, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) is one of the main organic sulfides in the ocean, and the main source of sulfur for marine bacteria. DMSP is catabolized by bacteria into dimethylsulfide (DMS), driving the sulfur cycle of the Earth. This study simulated the effect of seawater eutrophication on DMSP/DMS, DMSP producing genes (*dsyB* and *mntN*), catabolising genes (*dddP* and *dmdA*) and corresponding functional bacteria through the mesocosm. [Methods] We used flow cytometry to quantify the abundance of microplankton of 92 water samples. We sequenced bacterial 16S rRNA gene of seawater samples by high-throughput sequencing. Then we quantified the abundance of 16S rRNA gene, DMSP producing and catabolising genes by quantitative PCR. [Results] Adding nitrate (6.00 $\mu\text{mol/L}$) and phosphate (0.375 $\mu\text{mol/L}$) simultaneously increased the concentration of chlorophyll *a*, DMSP and DMS. For DMSP producing genes, phosphate enriched the abundance of *dsyB* and some DMSP producing genera, such as *Phaeobacter*. Adding nitrate and phosphate could enrich *dsyB* simultaneously, inhibit the growth of *Alteromonas* and the enrichment of *mntN* gene, but the effects of phosphate on *dsyB* enrichment was better than nitrate. In terms of DMSP catabolising genes, adding nitrate and phosphate simultaneously promoted the enrichment of *dddP* and the DMSP catabolising genera like *Thalassococcus*, *Thalassobius*, *Loktanella* and *Shimia*, but inhibited the enrichment of SAR11, *Sulfitobacter* and other species, resulting in the failure of enrichment of *dmdA*. Nitrogen restriction could better promote the abundance of DMSP producing gene, resulting in the increasing of bacterial DMSP production to cope with the insufficient nutritional conditions, and rising the proportion of DMSP demethylation to provide more energy for bacteria. However, in the case of nitrate and phosphate abundance, bacteria were apt to reduce the synthesis of DMSP and was more inclined to lyse DMSP to produce DMS in order to reduce the ratio of sulfur assimilation. [Conclusion] The results of this study emphasized the effect of seawater eutrophication on the bacterial DMSP production and catabolism.

Keywords: dimethylsulfoniopropionate, producing and catabolising bacteria, nutrition, mesocosm

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFA0601303) and by the National Natural Science Foundation of China (91751202)

*Corresponding authors. Tel: +86-532-82032767; E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

Received: 21 April 2020; Revised: 27 July 2020; Published online: 5 August 2020



张晓华, 中国海洋大学教授, 博士生导师, 主要从事微生物海洋学研究(包括海洋微生物的生物地球化学作用、海洋细菌的密度感应及密度感应淬灭、海洋微生物的分离鉴定及资源开发等)。主持国家自然科学基金重点项目、科技部国际合作重点项目等多项项目。以通讯作者在 *Nature Microbiol*、*ISME Journal*、*Microbiome*、*Environmental Microbiology*、*Applied and Environmental Microbiology* 等权威期刊发表多篇 SCI 论文。主编《海洋微生物学》(2007 年第 1 版, 2016 年第 2 版)。