

## 水环境中微小细菌的分布及生态作用研究进展

刘杰 李蕾 王莹莹\*

(南开大学 环境科学与工程学院 环境污染过程与基准教育部重点实验室 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室 天津 300071)

**摘要：**由于微生物本身的生理特性及现有检测方法的限制，自然界中大部分细菌不能被传统微生物工具所观察，这类微小细菌被称之为“看不见的主体(Unseen majority, USM)”，在大多数天然水环境中营养物浓度较低，微小细菌(USM)占有主导优势，具有重要的生态作用。但是，微小细菌对传统富营养培养基比较敏感，且生物体积微小(小于  $0.1 \mu\text{m}^3$ )，难以被传统培养基所检测分离，人们对其认识仍然很局限。总结关于微小细菌的一些特性概念，概括微小细菌的检测和培养方法及在水环境中的分布情况，进一步讨论其生态作用及应用，最后对微小细菌的生理及其在水质评价中的应用等方面进行展望。

**关键词：**水环境，纳米细菌，寡营养细菌，超微细菌，不可培养活细菌，低核酸细菌，检测及培养

## Distribution and ecological role of small bacteria in aquatic environments——a review

LIU Jie LI Lei WANG Ying-Ying\*

(Ministry of Education Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** Due to the fundamental physiology and current limits in detection methods, the majority of microorganisms, so-called “unseen majority (USM)”, in the natural world are not accessible using traditional microbiological tools. Small USM bacteria are dominant and have significant ecological functions in most aquatic environments, where nutrient concentrations are low. As they are sensitive to conventional high nutrient media and have small bio-volumes (less than  $0.1 \mu\text{m}^3$ ), small bacteria often escape traditional cultivation attempts and are therefore still poorly described. In this review, the concepts relating to the characterization of small cells are compared. We also review the cultivation and detection methods and the distribution of small bacteria in aquatic environments, followed by in-depth discussion of the ecological functions of small bacteria. Finally, the future prospects of USM bacteria are discussed in terms of their growth physiology and applications in water quality evaluation.

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 31270545)；天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目(No. 12JCZDJC29700)

\*通讯作者：Tel：86-22-66229721；✉：wangyy@nankai.edu.cn

收稿日期：2014-03-21；接受日期：2014-06-11；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2014-06-12

**Keywords:** Aquatic environment, Nanobacteria, Oligotrophic bacteria, Ultramicrobacteria, Viable but non-culturable bacteria, Low nucleic acid content bacteria, Detection and cultivation

自然界中大部分细菌不能通过传统微生物培养(如平板技术)观察到,尽管目前已有关于这类菌的基因信息报道,但是这部分“看不见的主体(Unseen majority, USM)”不仅尺寸太小,而且不易、甚至不能培养,同时由于检测方法的限制,对其认识极少。在自然界中大部分水环境的营养物浓度较低,如地下水、地表水和饮用水的溶解有机碳(Dissolved organic carbon, DOC)浓度通常在 0.5–5.0 mg/L 之间,它们大多数是以聚合物的形式存在,不能被微生物所利用,而微生物可同化有机碳(Assimilable organic carbon, AOC)的浓度通常只有 10–100  $\mu\text{g/L}$ ,其中单独的糖类或氨基酸的浓度甚至不超过几微克每升<sup>[1]</sup>。由于微生物只能转运单体和低聚合物(几百道尔顿)穿透细胞,只有 0.5%–5.0%的 DOC 可被微生物生长所利用,在不同的领域这部分 DOC 名称也各不相同,通常被称为“不稳定有机碳库(Labile organic carbon pool)”、“可同化有机碳(AOC)”或“直接基质(Direct substrates)”<sup>[2]</sup>。异养微生物的生长主要受碳/能源的限制,微生物在这种低营养物环境下其细胞浓度也较低,细胞浓度范围为从未污染地下水的  $10^4$  cells/mL 到地表水的  $10^6$  cells/mL<sup>[3–4]</sup>,用显微镜观察时发现,这些细菌大多数处于“死的、休眠体或饥饿状态”<sup>[1,5–6]</sup>。细胞体积作为细菌生理状态的指标之一,研究认为在低营养条件下的细胞体积要小于富营养条件下的细胞体积,细胞的大小及活性能随其所处的环境而变化,小的细胞比表面有利于营养物质的转送<sup>[7]</sup>,因此,在低营养水环境中生存的细菌通常也比较小,即占有主导地位(优势菌群)的是那些特别小的细胞<sup>[8–9]</sup>。目前,这些小细胞可以在实验室通过饥饿条件(Starvation condition)获得,同时,研究也证实了细菌在营养物匮乏的存活期内细胞的尺寸将会减小<sup>[10–11]</sup>。天然水环境中的大多数微生物都不能用传统的微生物工具(例如平板)进行培养,研究显示 90%–99%的这些菌株都没有被分离过<sup>[1,12]</sup>。在不同

的文献中,依据研究背景及所用方法,微小细菌有着不同的名称:纳米细菌、超微细菌、过滤性细菌、寡营养细菌、不可培养活细菌、低核酸细菌等。由于有限的培养和生长特性检测方法及从水环境中分离出的菌株,到目前为止,这种在水环境中广泛存在但很难用传统方法分离培养的微小细菌,其代谢活动仍存在着广泛的争议,对它们的生理特性和生态作用了解以及相关应用还很有限。

## 1 水环境中的微小细菌

纳米细菌(Nanobacteria)一词首先作为超微细菌(Ultramicrobacteria)的同义词出现于 Morita 1988 年的论文中,随后,1992 年芬兰科学家 Ciftcioglu 和 Kajander 发现一种能通过 100 nm 滤菌器的原核微生物,并将其命名为纳米细菌<sup>[13]</sup>。纳米细菌在自然界中广泛存在,并与无机沉淀物和地质层的形成有着紧密的联系<sup>[14]</sup>。然而,目前仍无法确定这类菌是否是“生命单元(Living units)”以及是否与生物矿化现象有关,关于纳米细菌的真实生存能力,研究者之间存在着很大的争论<sup>[15]</sup>。与纳米细菌相比,超微细菌则相对好定义。超微细菌被用来描述在营养物质丰富的琼脂表面上生长缓慢<sup>[16]</sup>、并无论在何种条件下生长体积都小于  $0.1 \mu\text{m}^3$  的细菌<sup>[17]</sup>。从细胞尺寸角度来讲,超微细菌和纳米细菌描述的是同一类细菌,而所用的名称主要取决于它们被发现时所处的环境和研究者的偏好,超微细菌常作为纳米细菌的同义术语使用<sup>[10,13,17–18]</sup>。在微生物学中,过滤性细菌(Filterable bacteria)是指能够通过滤膜的细菌,它被认为是细菌(特别是那些致病菌)生命周期中的一个生物阶段。在许多文献中超微细菌也被定义为能够通过  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜的菌,甚至“过滤性细菌”和“超微细菌”之间可互换<sup>[17]</sup>,但是研究认为细菌过滤能力同时取决于细胞的粒径和形状,如有些棒状细菌(其长度  $0.4\text{--}0.7 \mu\text{m}$ )也能穿过  $0.2 \mu\text{m}$  滤膜,但体积大于  $0.1 \mu\text{m}^3$ <sup>[4,11,19]</sup>,因此用超微细菌这一词描述这些微小细菌更为严谨。

自然水环境中能在琼脂培养基中长出群落形态(即可见密度或可见菌落形成)的细菌不到总菌数的1%<sup>[20]</sup>,大部分细菌虽然明显存在且具有活性,但不能被培养,它们通常被称为“不可培养活细菌[Viable but non-culturable (VBNC) bacteria]”<sup>[12]</sup>。细菌“活性(Viability)”和“可培养(Culturability)”之间的关系主要是基于以下3个方面:(1)生物圈中存在很多在实验条件下没有被培养和描述的细菌;(2)“不可培养活细菌”是指一些可以培养但在受到某些刺激后进入一个暂时不可培养状态的细菌;(3)新技术的发展使“不可培养细菌”的活性、完整性以及组成很容易被观察到<sup>[21]</sup>。因此,“不可培养”在一定意义上是基于细菌生存环境的营养物质,许多细菌只能在寡营养下生存下来。寡营养是指低营养物质通量[mg C/(L·d)]和低绝对营养物质浓度(mg C/L)<sup>[22]</sup>,自然界中大多数水生生态系统属于寡营养环境,例如,占地球总面积70%以上的海洋中DOC流量在0.35–70 mg/(L·d)之间,而湖泊约为0.10 mg/(L·d)<sup>[23]</sup>。在寡营养生态环境中生存的细菌经常被不同的微生物学家称为“休眠菌(Resting bacteria)”、“寡营养细菌(Oligotrophic bacteria)”、“饥饿细菌(Starved bacteria)”或“不可培养活细菌(VBNC bacteria)”。基于上述定义,寡营养细菌部分等同于“不可培养活细菌(VBNC bacteria)”。在寡营养环境下,细胞都采用减小体积的生存策略以增加营养物质的吸收。

大量研究表明超微细菌也不能或是很难在营养丰富培养基中生长,水环境中的超微细菌或纳米细菌都具有寡营养细菌的显著特性<sup>[8,16]</sup>,因此又可以将其称为寡营养超微细菌(Oligotrophic ultramicrobacteria)。

基于DNA荧光染色的流式细胞技术(Flow cytometry, FCM)通过不同的荧光信号可以反映出细胞的不同性质(如核酸含量和细胞尺寸)<sup>[24–25]</sup>,通过FCM自然水环境中的微生物可分为低核酸含量菌(LNA菌, Low nucleic acid content bacteria)和高核酸含量菌(HNA菌, High nucleic acid content bacteria)两大菌群<sup>[26–30]</sup>,这种依据核酸含量的分类(伴随细胞大小)是一种典型特有的流式细胞仪现象,如图1A所示。由于超微细菌的体积小,其基因含量也相对较少,每个细胞大约为1.0–2.5 fg DNA,不到*Escherichia coli*细胞DNA的50%<sup>[31]</sup>,较低的DNA含量表明超微细菌属于LNA菌。LNA菌不仅具有传统意义上的寡营养生长特性,而且还因为小的细胞体积被归为超微细菌或纳米细菌,这一性质在Wang等<sup>[24,29]</sup>的研究中得以证实。

根据以上各定义,表1总结出各类微小细菌的特征及相互之间的关系,可知微小细菌具有3个显著特性:尺寸小,寡营养难培养以及DNA含量低,在学者的研究叙述中以“超微细菌”和“LNA菌”使用为最广。

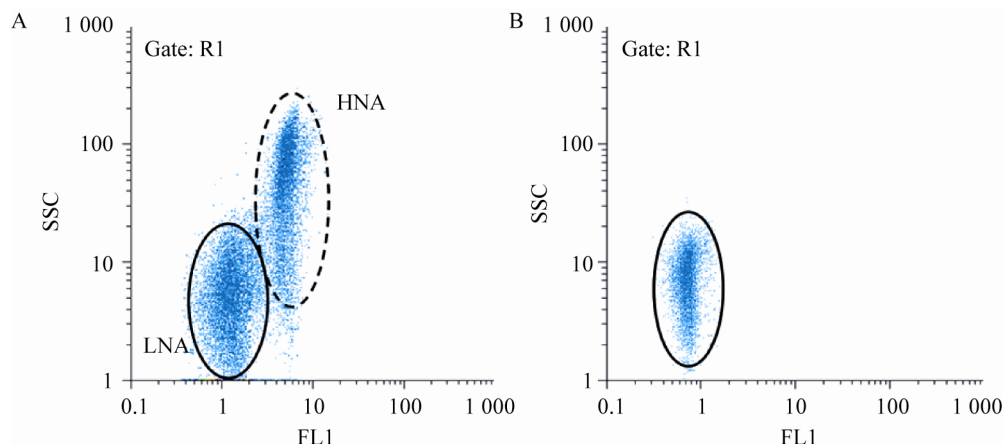


图1 淡水环境流式细胞仪检测总菌(A)和*Betaproteobacterium* strain CB菌(B)图<sup>[29]</sup>  
Figure 1 Flow cytometric dot-plot of the total bacterial community (A) and *Betaproteobacterium* strain CB (B) from freshwater environment<sup>[29]</sup>

表 1 各类微小细菌的特征及相互之间的关系					
Table 1 Characteristics and relationships of various type of small bacteria					
名称 Name	大小 Size (nm)	特征 Character	分类基准 Criteria	同义名称 Terms	参考文献 References
纳米细菌 Nanobacteria	20-500	极其微小, 在自然界广泛存在	细胞体积	超微细菌	[13-14]
超微细菌 Ultramicrobacteria	<300	在营养物质丰富的琼脂培养基表面生长缓慢, 体积小于 0.1 $\mu\text{m}^3$	细胞体积	寡营养细菌, 不可培养活细菌, 可过滤性细菌	[16-17]
过滤性细菌 Filterable bacteria	<450	能通过 0.45 $\mu\text{m}$ 孔径和更小孔径的滤膜	细胞尺寸	超微细菌、纳米细菌	[4]
不可培养活细菌 Viable but non-culturable bacteria	—	在传统富营养培养基中不能生长到可被观察到状态	细胞活性和生理特性	寡营养细菌	[20]
寡营养细菌 Oligotrophic bacteria	<450	第一次培养时能在含碳 1-15 mg/L 的培养基上生长	细胞生理特性	不可培养活细菌, 超微细菌	[22,32-33]
LNA 细菌 Low nucleic acid bacteria	—	基因含量少, 不能在富营养培养基中生存, 体积小	细胞检测方法	纳米细菌, 超微细菌, 不可培养活细菌, 寡营养细菌	[29]

2 水环境中微小细菌的检测和分离培养

2.1 流式细胞术对微小细菌的检测

早期主要采用低营养琼脂分离鉴定微小细菌<sup>[34]</sup>, 但由于微小细菌很难培养且尺寸很小, 其结果并不理想, 用普通的光学显微镜很难发现, 只有通过其它高分辨率显微镜或电子显微镜才能看到<sup>[35]</sup>。近年来随着科学技术的发展, 越来越多的新技术应用到微小细菌的研究中。其中荧光显微技术和流式细胞技术被广泛应用于水中细菌的检测, 使检测的灵敏度提高了 3 个数量级, 特别是随着 DNA 荧光染色技术的发展, 流式细胞仪已被广泛用于对水中浮游细菌的计数和细胞特性的分析<sup>[25,36]</sup>。流式细胞技术可以不依靠细菌的“培养”而进行检测分析, 克服了微生物学研究中的一个主要障碍, 即使得研究观察“不可培养”菌变的可行<sup>[25,37]</sup>, 与此同时, 通过流式细胞仪的光散射和荧光信号可以测定细菌的体积<sup>[29]</sup>和生物量<sup>[36]</sup>。流式细胞技术以其快速分析、高精确度、多参数、单细胞水平信息反馈以及易于获得相关的统计数据等优点<sup>[25,37]</sup>, 成为研究微小细菌的一个重要分析工具, 通过流式细胞仪, 单个细胞可在 10<sup>4</sup> cells/s 的速度及低至 10<sup>3</sup> cells/mL 浓度下进行检测, 这个浓度约为多数水体微生物浓度的 0.1%, 其高灵敏度

足以检测水中的任何细菌, 同时, FCM 也可对相应的细胞干重、DNA 含量和相关染色质比率等参数进行测量<sup>[25,38]</sup>。另外, FCM 结合其他方法如 ATP<sup>[39]</sup>或细胞分子分析后可以综合排序分析, 进而扩大对所获得数据的解释范围<sup>[1]</sup>。这些新技术的应用, 大大加快了水环境中微小细菌的研究步伐。

2.2 自然水环境中微小细菌的分离培养

为了分离得到单一超微菌株, 针对寡营养特性研究者们提出了各种新型的培养方法<sup>[40]</sup>, 如菌落转移法、极度稀释法、模拟环境扩散培养、单细胞封装培养、过滤-环境适应法等。目前, 在这些方法中被认为最有效的方法是基于 Button 等提出的经过改进的极度梯度稀释培养法(Extinction dilution culturing method), 该方法能最大限度的分离出水环境中的寡营养细菌<sup>[29,38]</sup>。同时, 结合过滤驯化适应培养可以分离出难培养的寡营养超微细菌<sup>[41-42]</sup>。采用寡营养的淡水/海水作为生长基质, 形成一种含有多种低浓度碳源并与细菌自然生长环境相似的介质, 在适宜的培养条件下, 超微细菌能够快速繁殖且不会改变它们原本的性状<sup>[1,29]</sup>, 这种方法已被证明是培养超微细菌的适宜基质, 其最适生长温度在 20-30 °C 之间, 略高于在自然水体生长时的温度。Wang 等<sup>[29]</sup>详细阐述了其具体步

骤：(1) 先将寡营养自然水体经巴氏灭菌(30 min，60 °C)后用 0.1 μm 孔径无菌滤膜过滤，以除去水中的颗粒物(过滤器在使用前至少用 200 mL 的无碳水清洗，以彻底除去残存的有机碳)作为下一步实验的培养基质；(2) 采用 0.45 μm 滤膜获得过滤性细菌，然后通过极度稀释法或单细胞分选进行富集培养，接种浓度分别采用 1、10、100 cells/mL 3 个梯度，每一个浓度做 24 个平行，实验所用培养玻璃瓶均不含有 AOC；(3) 在培养箱中 20 °C 培养 14 d 及以上直至进入细胞静止期，培养结束后进行 FCM 分析；(4) 重复上述步骤直至获得稳定的超微细菌，然后在最后一步极度稀释时，用 1 cells/mL 浓度接种。Wang 等<sup>[29]</sup>采用极度梯度稀释法从淡水环境中分离出 3 株 LNA 菌，图 1B 为其中一株淡水超微细菌(*Betaproteobacterium* strain CB)在流式细胞仪上的检测图。

3 微小细菌在水环境中的分布

3.1 组成分布

微小细菌被认为在形态、结构组织、生理和生态学上都具有高度的多样性，在原核生物的多个基因发育分支中都发现有微小细菌<sup>[18]</sup>。超微细菌以其微小的尺寸分布于自然界中，有研究报道指出在寡营养环境中大部分细菌的直径是 0.3–0.5 μm，在湖泊中细菌的体积在 0.01–0.20 μm<sup>3</sup> 之间(平均体积约为 0.03 μm<sup>3</sup>)，在海洋中大部分细菌的体积在 0.01–0.10 μm<sup>3</sup> 之间<sup>[43]</sup>。Hahn 等<sup>[35]</sup>用电子显微镜分

析了奥地利 Mondsee 湖、Wolfgangsee 湖和 Constance 湖、以及中国太湖 4 个淡水湖(寡营养至富营养)中细菌的尺寸分布，发现在两季混合的中度寡营养 Mondsee 湖中绝大部分微生物的体积在 0.03–0.09 μm<sup>3</sup> 之间，并分离出 9 株 Microbacteriaceae (Actinobacteria)超微细菌(体积：0.052–0.083 μm<sup>3</sup>)，其中 MWH-Ta1 的直径为 190.9±15.6 nm。

微小细菌在许多水环境中以优势菌而存在，是生态系统中的主要组成部分<sup>[17,32]</sup>。Haller 等<sup>[44]</sup>分析了法国 Calvi 海湾(西地中海) 10 m 深处超微细菌和总细菌的群落结构差异，克隆测序显示超微细菌(*α/γ-Proteobacteria* 和 *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*)是其中优势菌，通过培养获得了 *Pseudoalteromonas* 和 *Vibrionaceae* 以及 *Erythromicrobium* 过滤性细菌<sup>[19]</sup>。Schattenhofe 等<sup>[45]</sup>在调查北大西洋浮游微生物中 LNA 菌和 HNA 菌的分布及基因系统发育特性时发现，LNA 菌中的第一优势菌也为 *α-Proteobacterial* SAR11 (45%–74%)，其次为 *β-Proteobacteria* (2%–4%)。Hood 等<sup>[34]</sup>在调查美国 Perdido 海湾入河口处微生物分布情况时发现 *Vibrio* sp.是主要的超微细菌优势菌，其次是 *Listonella* sp.和 *Pseudomonas* sp.。随着技术的发展，越来越多的微小细菌被分离发现，到目前为止，所发现的微小细菌包含于古细菌、放线菌门、变形菌门和拟杆菌门等分支(表 2)。

表 2 已报道微小细菌的分类 Table 2 Classification of reported small bacteria	
分类 Classification	报道菌株 Reported strains
Euryarchaeota	<i>Methanobacteriales</i> , <i>Methanosarcinales</i> <sup>[46]</sup>
Actinobacteria	<i>Microbacteriaceae</i> <sup>[35]</sup> , <i>Rhodococcus corallinus</i> <sup>[47]</sup>
α-Proteobacteria	<i>Rhizobiales</i> <sup>[48]</sup> , <i>Sphingomonas</i> ( <i>Sphingopyxis</i> ) <i>alaskensis</i> <sup>[22,49-51]</sup> , <i>Erythromicrobium</i> <sup>[44]</sup> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <sup>[52-53]</sup>
β-Proteobacteria	<i>Polynucleobacter necessarius</i> <sup>[29,54]</sup> , <i>Herminiimonas</i> <sup>[55]</sup>
γ-Proteobacteria	( <i>Vibrio</i> , <i>Listonella</i> , <i>Pseudomonas</i> ) <sup>[34]</sup> , <i>Pseudomonas</i> <sup>[47]</sup> , ( <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Vibrionaceae</i> ) <sup>[44]</sup>
Bacteroidetes	<i>Cytophaga</i> <sup>[56]</sup>

已有许多研究指出微小细菌在不同环境下与其它菌之间有不同的相互作用。Roesel 等<sup>[57]</sup>比较了德国寡营养 Stechlin 湖中附着颗粒生长 (Particle-associated, PA) 细菌、独立生长 (Free-living, FL) 细菌和超微细菌的群落结构动态, 聚类和非度量多维测度分析表明, 超微细菌的群落动态变化要高于 FL 菌, 即超微细菌具有高的多样性, 这种现象在极端寡营养环境中更加的明显。Hood 和 MacDonell<sup>[34]</sup>在美国 Perdido 海湾入河口处的研究也显示出超微细菌的浓度与总异养细菌 (Heterotrophic plate counts, HPCs) 成负相关, 然而, Schattenhofe 等<sup>[45]</sup>研究却表明 LNA 菌的群落组成较 HNA 菌相对稳定。尽管这种相互作用的差异很明显, 但机理还不很明确, 仍需深入研究。

### 3.2 时空分布

微小细菌在地球环境中广泛存在, 包括开放的海洋<sup>[51]</sup>、河流<sup>[29]</sup>、湖泊<sup>[35]</sup>和地下水<sup>[24]</sup>, 甚至在冰冻万年的冰芯中<sup>[41]</sup>都有发现, 与其他微生物一样, 其时空分布受诸多环境因子影响, 如季节、水温、光照、水深、营养物质及无机盐浓度等。

微小细菌的分布不受地理因素的限制, 在多种环境中都有存在。目前, 关于超微细菌的认识大部分都以研究 *Sphingopyxis alaskensis* 作为典型寡营养超微细菌的代表而获得, 这种菌分别在 Resurrection 湾 (Alaska)、北海和日本海岸都有分离报道<sup>[22,50-51]</sup>。Andrade 等<sup>[58]</sup>研究了西南大西洋 (13–25° S, 28–42° W) 20 m 深处浮游细菌的分布情况, 结果显示 LNA 菌占总菌数的 30%–85% 不等, 在研究区域的南部是主要的优势菌。Van Wambeke 等<sup>[59]</sup>研究显示 LNA 菌在地中海区域海洋中占总菌数的 31%–70%。Hahn 从乌干达、中国、奥地利、法国等国家的热带、亚热带和温带 3 个气候带中分离得到 45 株 *Polynucleobacter necessarius* 超微细菌<sup>[54]</sup>。Nakai 等<sup>[48]</sup>采用 16S rDNA 系统发育树方法分析了世界范围内不同环境下 (包括北极圈、南极洲、撒哈拉沙漠、中国和日本地区的海水、淡水、土壤和砂砾) 超微细菌组成, 基因序列分析表明,

在分离的超微菌株中有 18 株是潜在的新物种 (与已知菌种的同源性小于 97%), 其中 *Rhizobiales* 微小细菌甚至可以生长在冰冻层的石灰苛刻环境中。Miteva 等<sup>[41]</sup>分析了有 12 000 年历史的格陵兰冰川 3 034 m 深处冰芯中的微生物, 通过过滤分离培养发现超微细菌在冰芯占据主导优势, 过滤后分离得到的菌株 (1 290 株) 要高于未过滤所分离的菌株 (447 株), 研究也表明过滤能增加冰川中细菌的可培养性, 使其适应人工培养并恢复到长成群落所要求的生理条件。

微小细菌的分布受季节和温度变化影响明显。Salcher 等<sup>[60-61]</sup>用荧光杂交 (MAR-FISH) 技术分析了欧洲 13 个湖泊中 *Alphaproteobacteria* LD12 (一株海洋 SAR11 超微细菌的淡水同型进化分支) 的时空分变化, 发现 LD12 随季节和水深而明显变化, 其浓度与温度呈指数函数关系, 在夏季, LD12 在湖泊表面变温水层的浓度  $[(0.3-8.0) \times 10^8 \text{ cells/mL}]$  能够接近 SAR11 在海洋中的浓度。Huete-Stauffer 等<sup>[62]</sup>在研究 Biscay 海湾沿岸菌落动态时, 也发现 LNA 菌的生长速率与温度成正比 ( $r=0.95$ ,  $P<0.01$ ,  $n=6$ ), 而与叶绿素 II 成反比 ( $r=-0.90$ ,  $P=0.01$ ,  $n=6$ )。Haller 等<sup>[44]</sup>观察到 Calvi 海湾的超微细菌分布在夏季和冬季有着明显的差异, 这可能是季节和温度引起的水质 (如盐度) 变化, 从而导致了超微细菌的分布变化<sup>[34]</sup>。

微小细菌群落受水深和水体稳定性的影响。Nishimura 等<sup>[63]</sup>在调查日本 Biwa 湖 (中度营养淡水湖) 中浮游细菌时发现, 在温度分层时期, LNA 菌含量随深度增加而减少。La Ferla 等<sup>[64]</sup>分析了地中海地区 South Adriatic 海和 South Tyrrhenian 海域 LNA 菌和 HNA 菌的垂直分布, 结果也显示 LNA/HNA 的比列随深度的增加而减少 (表层: 1.56, 中间: 0.76, 深海: 0.70)。李云<sup>[65]</sup>的研究发现, 在长江口区域, 由于水体不稳定, 微小细菌随水深变化不大。Santic 等<sup>[27]</sup>调查了 Adriatic 海域中 LNA 菌和 HNA 菌的分布情况, 发现 LNA 菌在沿海地区的百分比为 6.82%–78.52%, 公海为

34.38%–71.38%,在沿海地区,LNA菌表现出季节性分布,在远海地区,LNA菌表现为环境优势菌。

营养物质和无机盐对LNA的分布也具有重要作用。Andrade等<sup>[58]</sup>用主成分分析研究了西南大西洋浮游细菌与环境因子的相互关系,结果表明LNA菌浓度与硝酸盐浓度相关,在Van Wambeke等<sup>[59]</sup>研究地中海LNA菌和HNA菌的分布特性中,进一步发现LNA菌与可溶性磷、硝酸盐和亚硝酸盐成负相关,菌落的生理特性及分布主要受海洋深度的影响。在李云<sup>[65]</sup>研究长江口及其邻近海域中细菌的分布时,也发现了相同的规律。

此外,近来微小细菌在土壤、淤泥等其他环境中也有报道<sup>[18]</sup>,同时也具有较高的基因多样性,在Archaea、Actinobacteria、Cytophaga和Proteobacteria等主要系统发育组中都有分布<sup>[56]</sup>,但其数量占细菌总数的比重要小于水体中比重。Soina等<sup>[66]</sup>采用多重离心-过滤和电子显微镜观察的方法发现土壤中广泛分布着超微细菌,在天然土壤中超微细菌占总细菌数的5%,而在污染的城市土壤中这一比值为15%。

#### 4 水环境中微小细菌的生态作用

在微小细菌中,纳米细菌以其纳米级的微小体积吸引着各界研究人员的注意。作为早期地球寡营养环境中的主要微生物,纳米细菌通过参与早期地球环境有机化的过程,在地球初期的生物形成和进化中具有重要的作用<sup>[23,67-68]</sup>。

德国研究人员所发现的“火球纳米细菌”被认为是世界上最古老的球形生命体<sup>[69]</sup>。Sommer等<sup>[70]</sup>认为地球和火星的生命都起源于一种类似于纳米细菌且以自身合成物质为主的纳米囊泡,为了适应极端的环境压力和营养物质的匮乏,纳米囊泡形成了一种保护机制,即矿化的外壳,来保护内部的化学组成,以促进其在早期环境中的进化。Kajander认为,纳米细菌可能是地球形成早期、在原始大气条件下的一种最原始的生命形式,纳米细菌能够模仿组织液和肾小球滤液钙化产生生命所必需的磷灰石<sup>[13]</sup>,通过复制砂岩中粘土微晶使矿物和金属原子结合

到细胞膜上起催化和矿化作用,以此减少生命所需酶和蛋白质的量,这种代谢途径使得纳米细菌的生长速率比普通型细菌慢了10 000倍,这或许解释了纳米细菌在极端环境条件下的耐受性<sup>[67]</sup>。Woese等<sup>[71]</sup>通过共生同源基因系统发育树分析也认为在极端环境下生存并可利用无机营养的细菌可能是地球上最早出现的生命。在早期的地球环境中,营养物质极其贫乏,而纳米细菌却能够在此极端环境下生存和繁殖,表明纳米细菌可能对地质层的形成有重要作用,通过对纳米细菌的研究将有助于了解生命的起源和生物的进化<sup>[70]</sup>。

微小细菌以其特有的生理代谢机制及生态位,参与整个地球生物圈的生物多样性、生态系统结构组成及物质循环和能量流动。由于体积微小,超微/纳米细菌具有相对较高的比表面积,从而提高了它们从外界吸收营养物质的能力,这类细菌在营养物质的生物地球化学循环中的重要作用已被微生物生态学家所认同。作为超微细菌的另一显著特性:低核酸含量(LNA),起初在FCM上观察到它们的存在时,被认为是死的或即将衰亡的细菌<sup>[26,72]</sup>,但是后来的研究推翻了这种判断,Zubkov等<sup>[73]</sup>发现,LNA菌参与蛋氨酸的吸收代谢作用。Longnecker等<sup>[5]</sup>从基质利用和基因发育组成两方面分析,证明了在海洋代谢中LNA菌和HNA菌具有相同的作用。Salcher等<sup>[60]</sup>研究发现*Alphaproteobacteria* LD12超微细菌偏爱谷氨酰胺和谷氨酸,表现出比普通细菌对谷氨酸和甘氨酸的高吸收能力,能够利用有机碳(如葡萄糖、果糖、醋酸盐)的单体,在低营养环境下LD12能够减慢代谢使其适应寡营养环境,LD12和SAR11都能够产生一种稀有的单体使得它们能够成功穿越海水和淡水栖息环境差异所带来的屏障。*S. alaskensis*的生理特性被广大研究者作为寡营养超微细菌的模型。*S. alaskensis* RB2256具有非常低的DNA含量,约为大肠杆菌的25%,具有丰富的蛋白质和单拷贝rRNA操纵子,在饥饿条件下,RB2256会降低营养物质的吸收及其可培养性来减少生长消



耗;同时, RB2256 在 56 °C 水浴、25 mmol/L 双氧水和 20%酒精处理时仍具有较高的存活率, 这表明 RB2256 具有抗性机制能适应环境压力, 而这些都是其他菌所不具有的<sup>[49]</sup>, 此外, 其结构性蛋白质合成机制能对营养物质浓度的突变做出快速响应<sup>[74]</sup>。Williams 等<sup>[50]</sup>研究了 *S. alaskensis* RB2256 海洋超微细菌对碳和氮的代谢能力, 在营养物质竞争激烈的寡营养环境中, RB2256 通过一种简化的代谢机制来确保对稀有营养物质的最佳吸收, 形成一种生理能力来增加利用周围环境中有效的营养物质。Ramseier 等<sup>[28]</sup>在研究二氧化氯和高锰酸盐对细胞膜的损害时发现, LNA 菌的膜破坏速率要小于 HNA 菌, 表明 LNA 菌和 HNA 菌的细胞膜具有不同的化学官能团, 使得 LNA 菌较难被氧化。另外, 研究还认为超微细菌能够采用“休眠”策略以应对不利环境, 在寡营养环境中这种菌比重可达 40%<sup>[57]</sup>。上述特异的生理和分子策略都使得超微细菌能成为环境中的优势菌, 在生物地球化学循环中担当着重要角色。

同时, 微小细菌在污染生态修复等方面也有一定的应用价值。目前, 大多数报道的环境污染物微生物降解是在营养条件充足甚至过量的实验室条件下进行的, 污染物浓度多在 mg/L 甚至 g/L 的水平, 而实际环境中, 污染物种类多、性质复杂、相对浓度较低, 普通的物理化学方法难以去除微污染物<sup>[75]</sup>。由于传统的微生物不能在低浓度营养条件下正常生长, 而微小细菌仅需要很少的营养便可以生存, 因此在微污染水体的净化处理过程中微小细菌有着非常重要的应用前景。Ross 等<sup>[76]</sup>从地表水中分离超微细菌, 发现超微细菌的刺激作用能有效形成生物膜, 这种生物膜具有较高的代谢多样性可以应用于污染水体的修复。Sanin 等<sup>[47]</sup>研究了不同营养条件对 3 株超微细菌(*Pseudomonas* sp. A、*Pseudomonas* sp. D 和 *Rhodococcus corallinus* 11) 的表面特征和附着性能的影响, 结果表明超微细菌的转运吸附降解特性可应用于土壤修复技术。Harold 等<sup>[77]</sup>分析了一株来自底泥的超微细菌 DF-1,

发现其在 PCBs 的解毒和消除中具有较强的微生物脱氯作用, 这为 PCBs 持久性有机污染物污染底泥的原位治理提供了一个突破。Gozdereliler 等<sup>[78]</sup>在研究低浓度除草剂(4-氯-2-甲基苯氧基乙酸)的降解时发现, LNA 菌与除草剂的矿化活性相关, 表明 LNA 菌在微污染水环境的修复中具有一定的应用潜力。另外, 利用寡营养细菌可用来监测某些重金属物质, Tada 等<sup>[52-53]</sup>从土壤中分离出一种寡营养细菌(*Sphingomonas paucimobilis* KPS01), 通过光密度法来监测环境水源中的  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{6+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  等重金属离子, 其检测范围可达  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  mmol/L。

## 5 研究展望

微生物以其绝对的数量优势, 在地球生物化学循环中起重要的作用<sup>[68,79]</sup>。从历史的角度来看, 水环境生态学曾致力于研究食物链动力学的数量模型, 随着 1983 年“微生物圈”假说的出现<sup>[80]</sup>, 细菌就成了食物链模型的重要组成部分, 但为了建立易处理的地球化学通量模型, 一直都是将其作为“黑匣子”来处理<sup>[12]</sup>。随着新光合微生物和新异养微生物的发现, 微生物“黑匣子”经常在概念水平上发生变化, 而通过对微小细菌的进一步研究, 将逐步缩小“黑匣子”的范围<sup>[81]</sup>。随着微生物学与传统水环境生态系统的进一步结合, 未来微小细菌群的代谢模式可能成为浮游细菌群中较大的模型元素之一, 能更好的用于预测地球水体化学通量。

寡营养水环境中细胞对有效养分的吸收、生存和生长所用的基本策略是“混合基质生长”, 即能同时利用多种不同的碳/能源, “混合基质生长”为细胞提供了动力学竞争优势和灵活的代谢<sup>[1]</sup>。虽然这个理论已经确立, 但仍有许多地方需要完善, 特别是关于在更复杂条件下(包括短暂和振荡)的竞争动力学概念。同时, 因现在所使用的一些原则都是 50 年前确定的, 目前仍缺乏良好的、坚实的数据来确认或证明这种模型。“混合基质生长”的建立在一定程度上解释了微小细菌在低基质浓度下的生长机制, 但是未来的工作仍需进一步研究分析微小



细菌的生长发育和生理特性。为了更好地掌握自然环境条件下微小细菌的生长及特性,可以从两方面展开研究<sup>[1]</sup>: (1) 设计实验分析特定条件下微生物的生长动力学和生理机制; (2) 在复杂的环境下用不确定的天然微生物菌群和“天然”碳/能源基质进行实验。

随着研究的增加,微小细菌在不同的环境中都有所分离、报道,而分离出来的菌株通过基因序列分析(如 16S rDNA 鉴定)等方法得出,它们与富营养条件下获得的常见菌属具有相同的进化分支,但是微小细菌仍然保持着与常见菌属显著不同的细胞形态及特性,如微小细菌在不同温度、生长时期、营养浓度条件下,其细胞大小和低核酸含量等特性都会保持不变,因此,目前仍需要更进一步的生理和全基因组数据来精确确定它们的系统发育地位。

近年来检测饮用水及水环境中微生物质量(包括水环境中的病原微生物)的标准方法虽然一直在完善,包括培养基的改良和替代程序的推介,例如,在使用倾注平板法计细菌数时可采用膜过滤和涂布平板法加以补充<sup>[20]</sup>,但由于异养菌平板计数方法效率低,这种方法已受到越来越多的质疑。传统标准方法不仅在准确度和可信度上存在问题,而且它们作为指示公共健康安全价值标准也存在疑虑,这对生活水健康提出了很大挑战。微小细菌不能用高营养固体培养基培养,但在水样细菌总数中占有很大比例,而日常用水中,能在固体培养基上形成菌落的细胞数要远远小于实际存在的细胞数。因此,这要求对现有饮用水和水环境中微生物质量的标准检测方法进行修订,特别是对日常饮用水微生物指标进行完善,以保障水质卫生安全。

流式细胞技术以其精准和高效的特性得到了广泛的应用,最直接的应用就是饮用水中细菌总数的检测,FCM 可以用来追踪从源头处理到饮用水分配范围内的微生物问题,包括过滤和消毒效果以及分配过程中的生物稳定性和微生物再生等问题。这些方法应用已在瑞士得以实践,在饮用水安全领域迈出了坚实一步。目前,研发便携且更经济的仪

器、新的染色方法和在线监测软件用于检测水环境中特别是饮用水中的微小细菌,以降低检测成本,从而普及这个快速精确的检测方法,将是未来检测饮用水微小细菌领域的发展趋势。

## 参考文献

- [1] Egli T. How to live at very low substrate concentration[J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 4826-4837.
- [2] Egli T. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates[J]. *Advances in Microbial Ecology*, 1995, 14: 305-386.
- [3] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(12): 6578-6583.
- [4] Wang Y, Hammes F, Boon N, et al. Quantification of the filterability of freshwater bacteria through 0.45, 0.22, and 0.1  $\mu\text{m}$  pore size filters and shape-dependent enrichment of filterable bacterial communities[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(20): 7080-7086.
- [5] Longnecker K, Sherr BF, Sherr EB. Activity and phylogenetic diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content and electron transport system activity in an upwelling ecosystem[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7737-7749.
- [6] Vila-Costa M, Gasol JM, Sharma S, et al. Community analysis of high- and low-nucleic acid-containing bacteria in NW Mediterranean coastal waters using 16S rDNA pyrosequencing[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(6): 1390-1402.
- [7] Ren L, He D, Zeng J, et al. Bacterioplankton communities turn unstable and become small under increased temperature and nutrient-enriched conditions[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 84(3): 614-624.
- [8] MacDonell M, Hood MA. Isolation and characterization of ultramicrobacteria from a gulf coast estuary[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(3): 566-571.
- [9] Duda VI, Suzina NE, Esikova TZ, et al. A cytological characterization of the parasitic action of ultramicrobacteria NF1 and NF3 of the genus *Kaistia* on chemoorganotrophic and phototrophic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 69(2): 180-193.
- [10] Velimirov B. Nanobacteria, ultramicrobacteria and starvation forms: a search for the smallest metabolizing bacterium[J]. *Microbes and Environments*, 2001, 16(2): 67-77.
- [11] Wang Y, Hammes F, Duggelin M, et al. Influence of size, shape, and flexibility on bacterial passage through micropore membrane filters[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(17): 6749-6754.
- [12] Giovannoni SJ, Stingl U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 343-348.

- [13] Kajander EO, Çiftçioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(14): 8274-8279.
- [14] Hamilton A. Nanobacteria: gold mine or minefield of intellectual enquiry[J]. Microbiology Today, 2000, 27: 182-185.
- [15] Cisar JO, Xu DQ, Thompson J, et al. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(21): 11511-11515.
- [16] Torrella F, Morita RY. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41(2): 518-527.
- [17] Schut F, Prins R, Gottschal J. Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction[J]. Aquatic Microbial Ecology, 1997, 12: 177-202.
- [18] Duda VI, Suzina NE, Polivtseva VN, et al. Ultramicrobacteria: Formation of the concept and contribution of ultramicrobacteria to biology[J]. Microbiology, 2012, 81(4): 379-390.
- [19] Vybiral D, Denner EBM, Haller CM, et al. Polyphasic classification of 0.2 µm filterable bacteria from the western Mediterranean Sea[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1999, 22(4): 635-646.
- [20] Roszak D, Colwell R. Survival strategies of bacteria in the natural environment[J]. Microbiological Reviews, 1987, 51(3): 365.
- [21] Barer MR, Harwood CR. Bacterial viability and culturability[J]. Advances in Microbial Physiology, 1999, 41: 93-137.
- [22] Cavicchioli R, Ostrowski M, Fegatella F, et al. Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingomonas alaskensis*)[J]. Microbial Ecology, 2003, 45(3): 203-217.
- [23] 张崇邦, 黄立南, 栾天罡, 等. 寡营养细菌及其在环境科学中的应用[J]. 应用生态学报, 2005, 16(4): 773-777.
- [24] Wang Y, Hammes F, Egli T. The impact of industrial-scale cartridge filtration on the native microbial communities from groundwater[J]. Water Research, 2008, 42(16): 4319-4326.
- [25] Wang Y, Hammes F, De Roy K, et al. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology[J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(8): 416-424.
- [26] Lebaron P, Servais P, Agogué H, et al. Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems?[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1775-1782.
- [27] Santic D, Krstulovic N, Solic M, et al. HNA and LNA bacteria in relation to the activity of heterotrophic bacteria[J]. Acta Adriatica, 2012, 53(1): 25-40.
- [28] Ramseier MK, von Gunten U, Freihofer P, et al. Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate[J]. Water Research, 2011, 45(3): 1490-1500.
- [29] Wang YY, Hammes F, Boon N, et al. Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria[J]. The International Society for Microbial Ecology Journal, 2009, 3(8): 889-902.
- [30] Bouvier T, del Giorgio PA, Gasol JM. A comparative study of the cytometric characteristics of High and Low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(8): 2050-2066.
- [31] Savageau MA. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control[J]. American Naturalist, 1983, 122: 732-744.
- [32] 王颖群, 严共华. 寡营养细菌[J]. 微生物学通报, 1995, 22(5): 302-304.
- [33] 韩东东, 郝振宇, 高广海, 等. 寡营养细菌及其生态作用和应用的研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(4): 526-535.
- [34] Hood MA, MacDonell M. Distribution of ultramicrobacteria in a gulf coast estuary and induction of ultramicrobacteria[J]. Microbial Ecology, 1987, 14(2): 113-127.
- [35] Hahn MW, Lunsdorf H, Wu QL, et al. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1442-1451.
- [36] De Roy K, Clement L, Thas O, et al. Flow cytometry for fast microbial community fingerprinting[J]. Water Research, 2012, 46(3): 907-919.
- [37] Hammes FA, Egli T. New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum[J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39(9): 3289-3294.
- [38] Button DK, Schut F, Quang P, et al. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 881-891.
- [39] Hammes F, Goldschmidt F, Vital M, et al. Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments[J]. Water Research, 2010, 44(13): 3915-3923.
- [40] 田甜, 李冬梅, 戴世鲲, 等. 海洋环境中难培养微生物的寡营养培养[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1031-1039.
- [41] Miteva VI, Brenchley JE. Detection and isolation of ultrasmall microorganisms from a 120,000-year-old Greenland glacier ice core[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 7806-7818.
- [42] Hahn MW, Stadler P, Wu QL, et al. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria[J].

- Journal of Microbiological Methods, 2004, 57(3): 379-390.
- [43] Cole JJ, Pace ML, Caraco NF. More and larger cells in anoxic waters[J]. Limnology and Oceanography, 1993, 38(8): 1627-1632.
- [44] Haller CM, Rölleke S, Vybiral D, et al. Investigation of 0.2  $\mu\text{m}$  filterable bacteria from the Western Mediterranean Sea using a molecular approach: dominance of potential starvation forms[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 31(2): 153-161.
- [45] Schattenhofer M, Wulf J, Kostadinov I, et al. Phylogenetic characterisation of picoplanktonic populations with high and low nucleic acid content in the North Atlantic Ocean[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2011, 34(6): 470-475.
- [46] Fedotova AV, Belova SE, Kulichevskaya IS, et al. Molecular identification of filterable bacteria and archaea in the water of acidic lakes of northern Russia[J]. Microbiology, 2012, 81(3): 281-287.
- [47] Sanin SL, Sanin FD, Bryers JD. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(6): 909-914.
- [48] Nakai R, Shibuya E, Justel A, et al. Phylogeographic analysis of filterable bacteria with special reference to Rhizobiales strains that occur in cryospheric habitats[J]. Antarctic Science, 2013, 25(2): 219-228.
- [49] Schut F, Gottschal JC, Prins RA. Isolation and characterisation of the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 20(3/4): 363-369.
- [50] Williams TJ, Ertan H, Ting L, et al. Carbon and nitrogen substrate utilization in the marine bacterium *Sphingopyxis alaskensis* strain RB2256[J]. The International Society for Microbial Ecology Journal, 2009, 3(9): 1036-1052.
- [51] Ting L, Williams TJ, Cowley MJ, et al. Cold adaptation in the marine bacterium *Sphingopyxis alaskensis* assessed using quantitative proteomics[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(10): 2658-2676.
- [52] Tada Y, Kobata T, Nakaoka C. A simple and easy method for the monitoring of environmental pollutants using oligotrophic bacteria[J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 32(1): 12-15.
- [53] Tada Y, Inoue T. Use of oligotrophic bacteria for the biological monitoring of heavy metals[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(1): 154-160.
- [54] Hahn MW. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5248-5254.
- [55] Sahin N, Gonzalez JM, Iizuka T, et al. Characterization of two aerobic ultramicrobacteria isolated from urban soil and a description of *Oxalicibacterium solurbis* sp. nov.[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 307(1): 25-29.
- [56] Lysak LV, Lapygina EV, Konova IA, et al. Quantity and taxonomic composition of ultramicrobacteria in soils[J]. Microbiology, 2010, 79(3): 408-412.
- [57] Roesel S, Grossart HP. Contrasting dynamics in activity and community composition of free-living and particle-associated bacteria in spring[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2012, 66(2): 169-181.
- [58] Andrade L, Gonzalez AM, Rezende CE, et al. Distribution of HNA and LNA bacterial groups in the Southwest Atlantic Ocean[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2007, 38(2): 330-336.
- [59] Van Wambeke F, Catala P, Pujo-Pay M, et al. Vertical and longitudinal gradients in HNA-LNA cell abundances and cytometric characteristics in the Mediterranean Sea[J]. Biogeosciences, 2011, 8(7): 1853-1863.
- [60] Salcher MM, Pernthaler J, Posch T. Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria 'that rule the waves' (LD12)[J]. The International Society for Microbial Ecology Journal, 2011, 5(8): 1242-1252.
- [61] Salcher MM, Pernthaler J, Frater N, et al. Vertical and longitudinal distribution patterns of different bacterioplankton populations in a canyon-shaped, deep prealpine lake[J]. Limnology and Oceanography, 2011, 56(6): 2027-2039.
- [62] Huete-Stauffer TM, Moran XAG. Dynamics of heterotrophic bacteria in temperate coastal waters: similar net growth but different controls in low and high nucleic acid cells[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2012, 67(3): 211-223.
- [63] Nishimura Y, Kim C, Nagata T. Vertical and seasonal variations of bacterioplankton subgroups with different nucleic acid contents: possible regulation by phosphorus[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 5828-5836.
- [64] La Ferla R, Maimone G, Azzaro M, et al. Vertical distribution of the prokaryotic cell size in the Mediterranean Sea[J]. Helgoland Marine Research, 2012, 66(4): 635-650.
- [65] 李云. 长江口及其邻近海域浮游异养细菌、寡营养细菌、光合细菌的分离鉴定、分布规律及与生态环境因子关系[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2005.
- [66] Soina VS, Lysak LV, Konova IA, et al. Study of ultramicrobacteria (Nanoforms) in soils and subsoil deposits by electron microscopy[J]. Eurasian Soil Science, 2012, 45(11): 1048-1056.
- [67] Kajander EO, Bjorklund M, Ciftcioglu N. Mineralization by nanobacteria[J]. Proceedings of the SPIE, 1998, 3441: 86-94.
- [68] Konopka A. What is microbial community ecology?[J]. The International Society for Microbial Ecology Journal, 2009, 3(11): 1223-1230.
- [69] 罗明典. 超微细菌的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(10): 35-76.
- [70] Sommer AP, McKay DS, Ciftcioglu N, et al. Living nanovesicles chemical and physical survival strategies of primordial biosystems[J]. Journal of Proteome Research, 2003, 2(4): 441-443.

- [71] Woese CR. Interpreting the universal phylogenetic tree[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(15): 8392-8396.
- [72] Lebaron P, Servais P, Baudoux AC, et al. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2002, 28(2): 131-140.
- [73] Zubkov MV, Tarran GA, Burkill PH. Bacterioplankton of low and high DNA content in the suboxic waters of the Arabian Sea and the Gulf of Oman: abundance and amino acid uptake[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2006, 43(1): 23-32.
- [74] Eguchi M, Nishikawa T, Macdonald K, et al. Responses to stress and nutrient availability by the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(4): 1287-1294.
- [75] Phillips PJ, Chalmers AT, Gray JL, et al. Combined sewer overflows: an environmental source of hormones and wastewater micropollutants[J]. Environmental Science and Technology, 2012, 46(10): 5336-5343.
- [76] Ross N, Villemur R, Marcandella E, et al. Assessment of changes in biodiversity when a community of ultramicrobacteria isolated from groundwater is stimulated to form a biofilm[J]. Microbial Ecology, 2001, 42(1): 56-68.
- [77] May HD, Miller GS, Kjellerup BV, et al. Dehalorespiration with polychlorinated biphenyls by an anaerobic ultramicrobacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(7): 2089-2094.
- [78] Gozdereliler E, Boon N, Aamand J, et al. Comparing metabolic functionalities, community structures, and dynamics of herbicide-degrading communities cultivated with different substrate concentrations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(1): 367-375.
- [79] Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats[J]. Annual Reviews in Microbiology, 1985, 39(1): 321-346.
- [80] Azam L. The ecological role of water-column microbes in the sea[J]. Marine Ecology Progress Series, 1983, 10: 257-263.
- [81] Read S, Marzorati M, Guimaraes BCM, et al. Microbial Resource Management revisited: successful parameters and new concepts[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(3): 861-871.

征订启事

## 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2014年每册定价58元,全年696元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所 《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413