

Doi: 10.11840/j.issn.1001-6392.2020.01.002

流式细胞术检测海洋浮游异养细菌 异质性的研究进展

赵苑^{1,2,3}, 董逸^{1,2,3}, 李海波^{1,2,3}, 赵丽^{1,2,3}, 张武昌^{1,2,3}, 肖天^{1,2,3}

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 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 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘 要: 海洋浮游异养细菌 (以下称浮游细菌) 存在个体间的异质性, 对浮游细菌异质性的研究是理解细菌生产、代谢及其在生物地球化学循环中重要作用的基础。流式细胞术具有快速分析大量细菌个体的能力, 除了用来分析样品中细菌的丰度外, 流式细胞术和细胞染色技术结合, 被用来研究自然海水中浮游细菌在细胞膜完整性、CTC (5-氨基-2, 3-二 (4-甲基苯基) 四唑氯化物) 呼吸功能和核酸含量三个方面的异质性。尽管国外已经有较多研究, 但我国在这方面的研究尚比较缺乏, 本文综述了自然海区浮游细菌这三项异质性的研究现状, 介绍了不同海区 (主要是近岸) 浮游细菌的异质性及其随环境的变化, 以期推动我国在此领域的研究工作。目前对其异质性的变化机制尚没有很好的理论解释, 在全球变化的大背景下, 针对大洋深海和极区, 有关长期变化、全球变暖以及酸化等对浮游细菌异质性的影响研究需要加强。

关键词: 海洋浮游异养细菌; 流式细胞术; 细胞膜完整性; CTC 活性; 异质性

中图分类号: P735; Q93

文献标识码: A

文章编号: 1001-6932(2020)01-0012-12

Composition heterogeneity of marine heterotrophic bacterioplankton analyzed by flow cytometry

ZHAO Yuan^{1,2,3}, DONG Yi^{1,2,3}, LI Hai-bo^{1,2,3}, ZHAO Li^{1,2,3}, ZHANG Wu-chang^{1,2,3}, XIAO Tian^{1,2,3}

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: There is heterogeneity in several aspects among the individuals of the marine heterotrophic bacterioplankton (bacteria hereafter). Knowledge of bacteria heterogeneity and its influencing factors is the basis for understanding the critical role of bacterial production and metabolism in biogeochemical cycle. Combined with staining techniques, flow cytometry was used widely in analyzing bacteria heterogeneity in addition to the efficient counting of large amounts of bacteria. Bacteria heterogeneities of three aspects were analyzed by flow cytometry: membrane integrity, CTC test, and DNA content. Although a lot of bacteria heterogeneity studies were carried out in the world oceans, this research was scarce in China. This review introduces the research status of the three bacteria heterogeneity studies in the world oceans in order to promote similar study in China. Most of the bacteria heterogeneity study were carried out in coastal and shallow waters. While some spatial and temporal variations of these heterogeneity index were found, no mechanism was proposed to explain the phenomenon successfully. More studies should be carried out in deep waters and long-term changes. Influence of global warming and ocean acidification on bacteria heterogeneity need to be studied in response to climate change.

Keywords: marine heterotrophic bacterioplankton; flow cytometry; membrane integrity; CTC test; heterogeneity

收稿日期: 2019-04-09; 修订日期: 2018-08-01

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFA0603204); 国家自然科学基金 (41806178; 91751202; 41576164; 41711530149)。

作者简介: 赵苑 (1983-), 副研究员, 主要从事海洋微食物网生态学研究。电子邮箱: yuanzhao@qdio.ac.cn。

通讯作者: 张武昌, 博士, 研究员。电子邮箱: wuchangzhang@qdio.ac.cn。

<http://hytb.nmdis.org.cn>

细菌群落中的单个细菌在生理状态、代谢活性、化学组成、基因转录翻译、行为等多个方面存在差异,即细菌个体间的异质性,区分细菌群落中不同个体特征的研究被称为单细胞微生物学(Brehm-Stecher et al, 2004; Ishii et al, 2010)。海洋浮游异养细菌(以下简称浮游细菌)在海洋有机物降解和溶解有机碳转化中起着重要作用,同时也是影响海洋净生产力的重要生物因素(张异凡等 2019)。它们种类繁多,胞内含几千种化合物,代谢反应(途径)极其多样,所以自然海水中各个细菌除了种类的差别之外,也存在生理代谢和化学组成的异质性,对浮游细菌异质性及其影响因素的研究是理解细菌生产、代谢及其在生物地球化学循环中的重要作用的基础。

浮游细菌生理代谢和化学组成的异质性可以依据不同的指标进行研究(Del Giorgio et al, 2008; Grégori et al, 2001; Hammes et al, 2011)。浮游细菌的生理代谢包括细菌的存活状态和代谢活性。存活状态是 100 年以前使用的概念,它依赖于培养方法(Hammes et al, 2011),将细菌涂布在琼脂平板上能生长形成菌落的即为活的,不能生长的为死的,这曾经是判断细菌存活的金标准(Buysschaert et al, 2016)。但很多细菌在环境中处于“具有活性但无法培养”的状态(Rozsak et al, 1984),这些细菌无法在平板上生长,但仍保持一定代谢能力,在适宜环境条件下可以复活并繁殖。使用落射荧光显微镜来计数海水中浮游细菌丰度的方法是浮游细菌研究的重要突破(Hobbie et al, 1977),相当一段时间内人们认为这个方法得出的是存活的细菌丰度,然而 Zweifel 等(1995)使用表面荧光显微镜技术发现使用 DNA 荧光染料 DAPI (4', 6-二脒基-2-苯基吲哚, 4', 6-diamidino-2-phenylindole) 染色的波罗的海水样中,仅有少数(2%~32%)细菌可以观察到拟核(nucleoid),而大多数细菌不含拟核,可能是无活性(inactive)的,称为幽灵细菌(ghost)。几乎与此同时,Heissenberger 等(1996)用电镜法观察到浮游细菌仅约 34%具有完整的细胞结构,多数细菌细胞的内部结构受损(42%)或缺乏内部结构(24%),意味着这些细菌是无活性或者死亡的。目前学者可以通过检验细胞结构的完整性来判断细菌的存活状态,主要指标有:1) 是否具有拟核;2) 细胞膜

是否完整;3) 细胞膜是否具有极性和膜电位。

代谢活性是通过检验细菌对某种物质(底物)的吸收和转化能力来进行判断,需要培养并检测细菌体内物质的积累情况,所以对于底物的选择主要考虑可吸收和可检测两个指标。许多物质由于分子量或极性等原因是不能被细菌所吸收的,因此并不是所有物质都能作为底物。根据可检测的要求,底物主要有两类:1) 放射性标记底物,即使用有放射性标记的有机底物培养细菌并过滤到滤膜上,将滤膜和底片叠加放到玻片上,用荧光显微镜观察细胞周围是否有放射线造成的阴影,这项技术被称为显微放射自显影术,这种有放射性标记的有机底物除了被吸收进细菌细胞内以外,还可能部分吸附在细菌细胞外,也能出现所谓“放射线阴影”,造成假阳性的误差,因此在过滤后对滤膜的清洗很重要;2) 可产生荧光物质的酶底物,例如,加入呼吸作用电子传递链中某种酶的底物,具有呼吸作用的细菌胞内会积累可以产生荧光的物质,通过检测胞内有没有荧光判定是否有呼吸作用。目前测定细菌的化学组成异质性即胞内化学成分的含量,经常检测的三个主要指标包括:核酸含量、核糖体含量和胞内 pH。

对于单个细菌,基本上进行其中的一种或两种测试后,细菌就会被测定过程杀死,无法进行其他指标的测定。因为不能确定一个细菌的所有指标,所以很难确定各个指标之间的联系。代谢活性和存活状态相关联,但不完全代表存活状态,根据代谢活性仅能得出活跃的细菌肯定是活的,而不活跃细菌可能是死的,也可能是活的(可能由于活跃程度低于该种方法的检测限的细胞)(Falcioni et al, 2008)。因此,不能通过测定其中的一个指标而推知其他指标。

每个细菌在上述每个指标都存在一个状态,这些指标给出的结果基本都是二分法,即阳性或阴性,对于阳性指标,不能进一步分出强弱的等级。例如,对于细胞膜不完整的结果,无法测定这个细菌的细胞膜损坏 1/4 还是 1/8。除了阳性(或阴性)细菌的具体数目外,阳性(或阴性)细菌所占的比例(一般以 % 表示)也是重要的表达方式。浮游细菌群落根据这些指标得出的阳性和阴性数目的比值被统称为这个细菌群落的生理状态(Howard-Jones et al, 2001; Del Giorgio et al, 2008; Falcioni

et al, 2008; Hammes et al, 2011) 或代谢活性 (Martin et al, 2008)。因为每个指标都是细菌生理状态的一个方面, 所以学者们建议同时测定几个不同的指标来描述细菌群落的生理状态 (Smith et al, 2003; Hammes et al, 2011)。

以上细菌生理指标的测定方法都有各自的问题, 因此它们在浮游细菌中的应用受到多方面的制约, 有的方法技术复杂 (如放射自显影技术), 有的依靠人眼观察, 人眼的敏感度和个体差异会对结果造成影响, 所以这些方法在浮游细菌研究中的应用普及程度不一样。由于荧光染料与流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 的结合, 流式细胞术方便快捷的单细胞分析优势使得三个指标的检测技术在浮游细菌生理状态研究中得到较为广泛的应用, 包括细菌存活状态异质性的细胞膜完整性检测、代谢活性异质性的 CTC (5-氰基-2, 3-二 (4-甲基苯基) 四唑氯化物, 5-Cyano-2, 3-di- (p-tolyl) tetrazolium chloride) 活性检测和细菌细胞内化学组成异质性的核酸含量检测 (Gasol et al, 2000; Joux et al, 2000; Sherr et al, 2001; Czechowska et al, 2008)。早期的研究大多只测定其中一个或两个指标, 随着认识的深入和技术装备的更新, 近年来越来越多的研究同时测定这三个指标 (Gasol et al, 2009; Morún et al, 2009; 2011; Franco-Vidal et al, 2011; Lefort et al, 2014; Huete-Stauffer et al, 2015; Baltar et al, 2016; Luis et al, 2019)。虽然国外学者已经进行了大量的研究, 我国在这方面的研究却非常少, 本文综述了采用流式细胞术进行细胞膜完整性、CTC 活性和核酸含量检测三项细菌异质性研究的成果, 为我国的相关研究提供参考。

2 浮游细菌的细胞膜完整性检测

细胞膜完整性检测采用 NADS (核酸双染色, nucleic acid double-staining) 方法 (Grégori et al, 2001), 基于荧光染料对细胞膜的穿透性不同进行检测, 原理是使用两种荧光染料对细菌的核酸进行染色, 绿色荧光染料 SYTO 9 或 SYBRGreenI 可以透过完整和不完整的细胞膜, 使细菌呈现绿色荧光; 红色荧光染料 PI (碘化丙啶, propidium iodide) 由于分子较大, 仅能穿过不完整的细胞膜, 而且 PI 与核酸的结合能力强于 SYTO 9 或

SYBRGreenI, 削弱细菌的绿色荧光, 使具有不完整细胞膜的细菌呈红色荧光。计数具有不同颜色荧光的细菌即可分别得到样品中具完整细胞膜和不完整细胞膜的细菌数目, 细胞膜完整的细菌不绝对是活的, 但是细胞膜不完整的细菌肯定是死的或受伤的。这个方法由 Boulos 等 (1999) 最先与落射荧光显微镜结合使用, 随后 Barbesti 等 (2000) 结合双染色与流式细胞术对纯培养菌株进行检测, Grégori 等 (2001) 将流式细胞术用于自然海水和淡水细菌的研究中, 并将这种方法命名为 NADS。Falcioni 等 (2008) 证明了 NADS 方法可以探测自然环境中细菌的死亡, 并探索了 NADS 方法用于浮游细菌的技术细节, Nescerecka 等 (2016) 对不同作者的技术细节的效果进行了比较, 并提出了完整的实验流程, 标志着这一技术已经比较成熟, NADS 的结果常用活细胞百分比例来表示。

海洋中使用 NADS 方法进行的细菌存活状态调查大多局限于几个近岸浅海区, 包括地中海西北部近岸海区 (Grégori et al, 2001; Alonso-Sáez et al, 2006; Falcioni et al, 2008; Lekunberri et al, 2012; Ruiz-Gonzalez et al, 2012; Lefort et al, 2014; Gomes et al, 2015), 大西洋比斯开湾 (Morún et al, 2009; Huete-Stauffer et al, 2015)、美国马萨诸塞州的 Waquoit 湾河口 (Morún et al, 2011), 南大洋的南极半岛海域 (Ortega-Retuerta et al, 2008), 北冰洋的卡拉海 (Mosharova et al, 2016; 2017)。深海大洋海域的研究仅有地中海 (Lasternas et al, 2010) 和大西洋的加纳利群岛附近 (Gasol et al, 2009; Baltar et al, 2010; Lasternas et al, 2014), 其中 Gasol 等 (2009) 和 Baltar 等 (2010) 进行了深海采样 (>1 000 m), 其他研究仅采集 200 m 以浅水样。此外, 学者们还在比斯开湾进行了昼夜变化 (Lefort et al, 2014) 以及周年和季节变化研究 (Morún et al, 2009; Huete-Stauffer et al, 2015)。

根据这些调查, 在表层海水中, 活的细菌在总细菌丰度中占优势, 其比例介于 50%~90% 之间, 大洋和近岸海区没有差异。活细菌的丰度比例随水深增加而下降, Gasol 等 (2009) 发现大西洋加纳利群岛附近海域活细菌的丰度比例从 200 m 的 40%~70% 降低为 1 000 m 的 10%~40%, Baltar 等 (2010) 在同一海区的研究发现活细菌的丰度比例

从表层的 70%~79% 降低为 2 000 m 的 25%~60%。在地中海西部到东部的一个断面, Lasternas 等 (2010) 发现在一定温度范围 (5 °C~25 °C) 内, 活细菌的丰度比例与温度呈负相关, 随温度升高而降低。对比斯开湾的季节变化研究表明, 夏季活细菌有较高的比例和生长率 (Morán et al, 2009; Huete-Stauffner et al, 2015), 而从昼夜变化上看活细菌丰度比例没有明显的变化 (Lefort et al, 2014)。

水文现象和生物过程对活细菌比例有一定影响, 如: 中尺度涡区域的活细菌比例高于涡的外部 (Baltar et al, 2010); 在北冰洋卡拉海的一个河口, 活细菌比例随盐度 (4.4~28.5) 增加而增加 (Mo-sharova et al, 2016); 在加纳利群岛海域的调查表明, 当浮游植物死亡时, 浮游植物向细胞外释放的有机物增加, 活细菌比例从 60% 上升到 95% (Lasternas et al, 2014)。学者们通过围隔实验研究影响活细菌比例的因素, 添加营养盐诱发水华会导致活细菌比例增加 (Lasternas et al, 2014; Baltar et al, 2016), 其主要原因为细菌的存活需要 DOM (溶解有机物), 而浮游植物发生水华时会向水体释放大量 DOM; 此外培养实验表明光照对活细菌比例的影响有季节性, 夏季活细菌比例会降低, 其他季节则影响不大 (Alonso-Sáez et al, 2006; Ruiz-Gonzalez et al, 2012)。

3 浮游细菌的 CTC 活性检测

细菌的呼吸需要 ETS (电子传递系统), CTC 是一种可以渗透细胞膜的荧光染料, 在海水中加入 CTC 后, 有活跃 ETS 的细菌会还原 CTC, 在细菌细胞内形成并积累具有红色荧光的 CTF (甲脒, CTC-formazan) 结晶 (Rodriguez et al, 1992; Schaule et al, 1993), 这些细菌被称为 CTC+ (CTC 阳性, 即活跃呼吸) 的细菌 (Rodriguez et al, 1992)。

20 世纪 90 年代中期, Gasol 等 (1995) 和 Lovejoy 等 (1996) 首先用表面荧光显微镜检测 CTC 活性, 随后 Kaprelyants 等 (1993) 用流式细胞术来分辨实验室培养细菌的 CTC 活性, Del Giorgio 等 (1997) 和 Sieracki 等 (1999) 则将这种方法应用于自然湖水和海水中的浮游细菌研究。

CTC 活性检测方法是將 CTC 加入含细菌的自然海水中进行培养, 使得细菌吸收 CTC 生成 CTF,

因此 CTC 的浓度和培养时间是该方法的关键, 不同的研究者使用了不同的培养浓度、时间。目前对于浓度已经有了比较一致的看法, 即加入海水中的 CTC 的最佳终浓度为 5 mmol/L, 低于这个浓度得出的 CTC+ 比例会偏低, 例如 Lovejoy 等 (1996) 用的浓度为 0.75 mmol/L, CTC+ 细菌的比例为 1%~2%, 这个比例被认为过低。CTC 培养所需水样体积很小, 只用 0.5~1.5 mL 室温培养即可, 红色荧光在加入 CTC 后立刻产生 (Gasol et al, 2007), 10 min 后就可以进行检测, 随着这个结晶的体积增大, 荧光强度也相应增强, 1 h 后, 红色结晶的数目不再增长 (Gasol et al, 2007), 50 min 的培养即可得出较准确的 CTC+ 细菌比例, 此后, 虽然 CTC+ 细菌的数目不再增加, 但是红色荧光的强度还会一直增强, 甚至能持续 10 h (Gasol et al, 2007)。

CTC+ 检测方法也有一定的局限性, 并非所有细菌都能够利用 CTC, 虽然 Sherr 等 (1999) 在海洋中分离的菌株都能降解 CTC, 但是其他生境, 例如人体内 (Smith et al, 1997)、厌氧环境 (Bhupathiraju et al, 1999)、地下水 (Hatzinger et al, 2003)、河流 (Yamaguchi et al, 1997) 的证据表明有些细菌不降解 CTC, 所以海洋中也很可能存在不降解 CTC 的细菌。CTC+ 细菌与其他细菌状态的指标也有对比实验, 例如 Karner 等 (1997) 发现 CTC+ 细菌的数目低于显微放射自显影技术得出的活跃细菌数目。

CTF 晶体在细菌细胞内累积可能会导致细菌破裂, 使得 CTF 释放到水体中。Gasol 等 (1995) 在用表面荧光显微镜观察时, 注意到细菌细胞外也有 CTF 颗粒, Gasol 等 (2007) 用 SYTO13 对 CTC 培养的细菌染色, 用流式细胞术分别计数红色和绿色 (SYTO 13+) 荧光颗粒, 发现细菌破裂后释放到海水里的 CTF 结晶用流式细胞仪仍能检测到, 会被认为是一个细菌。

多项研究表明 CTC 或 CTF 对细菌具有毒性, 例如: CTC 染色后细菌放射性标记的生长率和呼吸率分别降低了 1%~14% 和 4%~44% (Ullrich et al, 1996), 用荧光细菌进行的毒性测试表明浓度为 0.1~5 μmol/L 的 CTC 在 15 min 后荧光减少 50%~100% (Ullrich et al, 1996); 加入 5 mmol/L 的 CTC 培养 30 min 后, 细菌的丰度平均减少 22%

(Gasol et al, 2007); 加入 CTC 后, 细菌的运动停止 (Grossart et al, 2001)。Gasol 等 (2007) 认为 CTC 作为外来物质对细菌肯定产生影响, 但其毒性可能很低, 因为加入 CTC 数小时后, CTC+细菌的数目不再增加, 但是单个细菌中的 CTF 荧光强度还在增加, 说明仍有细菌降解 CTC (Del Giorgio et al, 1997), 细菌并没有被立即杀死。由于毒性要在细菌吸收和降解 CTC 后才能发生, 所以 CTC 的毒性对 CTC+阳性的检测数据没有影响, CTC+测试是有效的。

对于 CTC+细菌对细菌代谢的贡献有两种截然不同的观点: 第一种观点认为 CTC+细菌是细菌代谢的主要贡献者, 例如 Smith (1998) 发现虽然切萨皮克湾 CTC+细菌比例平均只有 14%, 但是 CTC+细菌丰度和占总细菌数的比例都与细菌群落呼吸有很好的相关性; Sherr 等 (1999) 发现 CTC+细菌是放射性标记物的主要吸收者。第二种观点认为 CTC+细菌的贡献并不那么大, Servais 等 (2001) 用放射性底物培养来自法国地中海沿岸海水的细菌, 然后进行 CTC 染色并用流式细胞仪分选出 CTC+细菌, 测定其放射性标记的量, 结果发现与总细菌的放射性标记相比, CTC+细菌贡献占总细菌生产的比例 < 60%; Longnecker 等 (2005) 使用同样的方法得出在美国俄勒冈外海 CTC+细菌贡献了总细菌生产的 7%~14%。然而, Gasol 等 (2007) 研究认为第二种观点把释放在水体中的 CTF 颗粒也作为细菌进行了分选, 导致 CTC+细菌的放射性结果偏低。

CTC+细菌比例的测定最初于 1995 年应用于浮游细菌研究中 (Gasol et al, 1995), 目前有 CTC+调查资料的海区包括地中海的布拉内斯湾 (Blanes Bay) (Gasol et al, 1995; Baltar et al, 2016)、比斯开湾 (Morán et al, 2009; Franco-Vidal et al, 2011; Huete-Stauffer et al, 2015)、亚得里亚海 (Paoli et al, 2006)、法国近岸海域 (Bernard et al, 2000)、大西洋的切萨皮克湾 (Smith, 1998)、北卡罗来纳州外海陆架区 (Sherr et al, 2002)、马萨诸塞州的 Waquoit 湾河口 (Morán et al, 2011)、加拿大的圣劳伦斯湾 (Lovejoy et al, 1996; 2000)、新斯科舍 (Nova Scotia) 近海 (Lovejoy et al, 2000)、波罗的海 (Schumann et al, 2003)、葡萄牙的阿威罗 (Ria de Aveiro) 海湾 (Almeida et al, 2001)、

加纳利群岛附近海域 (Gasol et al, 2009)、塞内加尔近岸海域 (Gasol et al, 2009)、太平洋的俄勒冈州外海 (Choi et al, 1996; Sherr et al, 1999; Longnecker et al, 2005)、加利福尼亚州圣莫尼卡湾 (Santa Monica Bay) (Karner et al, 1997), 其他海区还包括澳大利亚塔斯马尼亚外海 (Davidson et al, 2004)、北冰洋的卡拉海 (Mosharova et al, 2016; 2017) 和南大洋海冰 (Martin et al, 2008) 等。

以上现场调查表明 CTC+细菌比例一般低于 10%, 内陆架海区比外陆架海区高 (Sherr et al, 2002), 极地 CTC+细菌比例较高, 平均为 32%~38% (Martin et al, 2008; Mosharova et al, 2017)。在北冰洋卡拉海河口, CTC+细菌比例随盐度 (4.4~28.5) 增加而增加 (Mosharova et al, 2016), 但在西非塞内加尔的河口, CTC+细菌比例在一定范围内随盐度升高 (0~20) 而降低, 当盐度继续升高时, CTC+细菌比例增加 (Bettarel et al, 2011)。CTC+细菌比例垂直分布基本为表层高、深层低, 在加纳利群岛附近海域表层 CTC+细菌比例为 5%~10%, 底层 1 000 m 比例 < 5% (Gasol et al, 2009), 在比斯开湾夏季表层 CTC+细菌比例高, 冬季上下混合均匀 (Franco-Vidal et al, 2011), 在北卡罗来纳州外海陆架区 (Sherr et al, 2002) 和俄勒冈州外海 (Longnecker et al, 2005), 200 m 以浅水柱内 CTC+细菌比例的垂直分布没有明显规律。对于 CTC+细菌比例的季节和周年变化的研究很少, 在比斯开湾 CTC+细菌占总细菌比例周年平均为 3.6%, 最高值出现在 4 月, 达 12% (Morán et al, 2009), 而在比斯开湾另一个海区, 最高值 (12%) 出现在夏季 (Franco-Vidal et al, 2011)。

CTC+细菌比例可能受其摄食者鞭毛虫丰度的影响, CTC+细菌比例与异养鞭毛虫在鞭毛虫总丰度的比例相关, 异养鞭毛虫在鞭毛虫总丰度中的比例高时, CTC+细菌比例降低, 说明异养鞭毛虫选择摄食活跃的细菌 (Lovejoy et al, 1996; 2000), Del Giorgio 等 (1996) 的培养实验也支持这一观点。

4 浮游细菌的核酸含量检测

根据核酸染色后的荧光强度可估算浮游细菌的核酸含量。早期研究中, 荧光的强弱在高分辨率荧

光显微镜下即可分辨 (Sieracki et al, 1992), Li 等 (1995) 最先使用流式细胞术, 发现根据散射信号 (SSC, side scatter, 与细胞的密度相关) 和绿色荧光的相对强度 (与细胞的核酸含量有关), 将浮游细菌在流式图上分为核酸含量不同的群, 这种分群现象在淡水和海水、寡营养和富营养水体都有, 因此是浮游细菌群落的普遍特征 (Bouvier et al, 2007)。

对这些不同核酸含量的细菌分群的用词不同, Li 等 (1995) 称它们为组 (group), Gasol 等 (1999) 称它们为亚群 (subpopulations), 此外也有研究称它们为亚组 (subgroup) (Gasol et al, 2000)。在自然海水样品中, 浮游细菌经核酸染色大多被分为两群, 通常称为 HNA (高核酸含量群, high nucleic acid) 和 LNA (低核酸含量群, low nucleic acid) (Lebaron et al, 2001), 有的研究在 HNA 和 LNA 之外还有 VHNA (极高核酸含量群, very high nucleic acid) (Nishimura et al, 2005; Girault et al, 2015; Dhib et al, 2017)。

用流式细胞仪分选 HNA 和 LNA 细胞进行分子生物学测序, 不同的学者得出了相互冲突的结论: 有的认为 HNA 和 LNA 在系统发生上类群组成没有区别 (Bernard et al, 2000; Servais et al, 2003; Longnecker et al, 2005), 而有的研究认为 HNA 和 LNA 在系统发生上的类群组成是不同的或有的分类类群在一个核酸类群中占主导, 例如 LNA 主要与 SAR11 类群和 SAR86 类群有关, HNA 则主要与 γ -变形菌、红细菌目、SAR116 类群和拟杆菌门有关 (Eilers et al, 2000; Fuchs et al, 2000; Zubkov et al, 2001; 2002; Fuchs et al, 2005; Mary et al, 2006; Schattenhofer et al, 2011; Vila-Costa et al, 2012)。

有浮游细菌分群研究资料的海区包括地中海西北部近岸 (Gasol et al, 1999; Joux et al, 2005; Gomes et al, 2015)、直布罗陀到塞浦路斯的断面 (Van Wambeke et al, 2011)、亚得里亚海 (Šantić et al, 2014)、突尼斯海岸潟湖 (Dhib et al, 2017)、大西洋的加拿大近岸海区 (Jellett et al, 1996)、美国的马里兰近岸 (Bouvier et al, 2007)、拉布拉多海 (Li et al, 1995)、墨西哥湾 (Jochem, 2001; Jochem et al, 2004)、西班牙比斯开湾 (Calvo-Díaz et al, 2006; Morán et al, 2009; García et al,

2014)、加纳利群岛附近海域 (Gasol et al, 2009)、波罗的海河口区 (Kaartokallio et al, 2016)、太平洋的俄勒冈外海 (Bouvier et al, 2007)、北加州外海 (Sherr et al, 2006)、在北太平洋 12°N-34°N 经向断面 (Girault et al, 2015)、台湾浅滩 (Jiang et al, 2017)、南大洋德雷克海峡 (Corzo et al, 2005)、普利兹湾 (Ortega-Retuerta et al, 2008)、澳大利亚南部阿德莱德近岸站位 (Schapira et al, 2009)、澳大利亚南部大陆架上升流区 (Paterson et al, 2012)、北极海区加拿大富兰克林湾 (Belzile et al, 2008) 等海区。

自然海区浮游细菌中, HNA 的 DNA 含量大大高于 LNA, 约为后者的 4~6 倍 (Li et al, 1995; Jellett et al, 1996; Sherr et al, 2006; Bouvier et al, 2007), HNA 和 LNA 两群荧光的平均值成正比, 即当 LNA 的荧光值增加时, HNA 的荧光值也增加 (Bouvier et al, 2007)。自然海区中 HNA % (HNA 丰度占总细菌丰度的百分比) 大多介于 30%~90% 之间, 表层的比例随营养程度的升高而升高, 例如滨海湿地高于海洋 (Bouvier et al, 2007), 近岸区高于陆坡和大洋区 (Sherr et al, 2006), 澳大利亚南部大陆架上升流区 HNA % (84%~93%) 高于其他区域 (36%~43%) (Paterson et al, 2012), 在南海台湾浅滩赤潮区域 HNA % 介于 63%~78%, 高于非赤潮区域 (38%~57%) (Jiang et al, 2017)。Li 等 (1995) 发现不同的海洋生境中 HNA % 与叶绿素 *a* 浓度成正相关, 说明 HNA % 随着有机物供给的增多而上升。HNA % 与叶绿素 *a* 有关, 因此海水的生产力也可能与此有关, 但是叶绿素 *a* 浓度很高和很低的海区也会出现相近的 HNA %, 说明除生产力之外还有其他影响因素 (Bouvier et al, 2007)。

在近岸海区 (200 m 以浅) 的垂直分布调查中, 多数研究发现营养程度高的表层 HNA % 低于营养程度低的底层 (Jochem, 2001; Calvo-Díaz et al, 2006; Belzile et al, 2008), 这与 Li 等 (1995) 的观点不同 (Jochem et al, 2004), 原因尚不清楚。在大洋中, HNA % 在水深 200 m 以浅的垂直分布中稍有增加但没有明显规律 (Gasol et al, 2009; Van Wambeke et al, 2011; Girault et al, 2015), 在地中海自 200 m 以深 HNA % 随深度增加而升高, 从 0~250 m 的 30%~50% 升高至 3 300 m 的 50%~

70% (Van Wambeke et al, 2011), 在加纳利群岛附近, 从 0~1 000 m 没有变化 (Gasol et al, 2009)。在红海中部, 在 200 m 以浅是 LNA 占主导, 在 200 m 以深是 HNA 占主导 (Calleja et al, 2018)。在东北大西洋深水中, 从 70°N-30°N, HNA % 降低, 再到 10°S, HNA % 稍微升高 (Reinthal et al, 2013)。近岸海区 HNA % 随盐度变化的研究较少, 在法国地中海沿岸罗纳河口, 盐度变化范围在 15~36 之间, HNA % 在 40%~80% 之间, 随盐度变化在不同的调查没有明显的规律 (Joux et al, 2005)。

表层 HNA % 的季节变化一般为春季和冬季比例大, 夏季比例小, 如西班牙比斯开湾 (Calvo-Díaz et al, 2006) 和亚得里亚海 (Šantić et al, 2014), 在北极贝福特陆架的富兰克林湾 HNA % 春季比冬季更高 (Belzile et al, 2008), 而深水 HNA % 没有明显的季节变化 (Belzile et al, 2008; Calvo-Díaz et al, 2006)。对影响 HNA % 的因素目前所知甚少, 实验操作中升温培养可以使细菌核酸含量降低 (Huete-Stauffer et al, 2015), 此外不同浮游植物释放的 DOC 会影响 HNA % (Tada et al, 2016), HNA 对浮游植物水华的反应比 LNA 明显 (Gomes et al, 2015)。

流式细胞术发现可根据核酸含量把水体细菌分为两群后, 这两群细菌在活性上的差异立即引起关注, Li 等 (1995) 发现 HNA 的分布和 DNA 含量与水体叶绿素 *a* 浓度具有相关性, 所以推测 HNA 是活跃细菌, 而 LNA 是不活跃细菌。Jellett 等 (1996) 提出了 ACI (活跃细胞指数, active cell index) 概念, 即 HNA 占总细菌丰度的比例, 与 HNA % 概念相同, 他们发现 ACI 与细菌生产力的变化趋势一致, 认为 ACI 可以表征细菌群落的活跃程度。

但是 HNA 和 LNA 是否活性不同仍需要直接的证据。第一项证据来自生长率培养实验, Gasol 等 (1999) 发现稀释培养实验中 HNA 有较高的生长率, 而 LNA 生长率较低, 所以认为 HNA 是活跃细菌, LNA 是不活跃或死细菌, Vaqué 等 (2001) 同样支持这个观点, 但是也有培养实验发现 LNA 有较高的生长率, 并非是不活跃的细菌 (Jochem et al, 2004; Zubkov et al, 2004; Sherr et al, 2006)。另外的直接证据来自两类细菌对放射性标记底物的吸收能力的比较, 有研究发现 HNA 能够活跃吸收底

物 (Lebaron et al, 2001; 2002; Servais et al, 2003), 所以是 HNA 是活跃细菌; 但是也有一些研究发现 LNA 的活性和 HNA 相当, 在单位细菌体积比较时甚至超过 HNA (Zubkov et al, 2001; Longnecker et al, 2005; Mary et al, 2006; Scharek et al, 2007; Wang et al, 2009; Longnecker et al, 2010; Talarmin et al, 2011; Huete-Stauffer et al, 2012), HNA 类群中的细菌的活性也不尽相同 (Moran et al, 2007)。由于生长率和对底物的吸收能力的实验都得出了矛盾的结果, 目前普遍认为 LNA 和 HNA 的划分不能作为细菌是否活跃的指示, HNA 比 LNA 活跃一些, 但是 LNA 中也有一些细菌是活跃的, 能吸收有机底物并表现出一定的生长。

5 浮游细菌异质性研究指标间的关系

目前已有相当多的研究分别使用不同的指标报道了浮游细菌的异质性, 主要包括 NADS 法研究细菌存活状态异质性、CTC 法研究细菌的代谢状态异质性, 以及 HNA/LNA 法研究细菌的化学组成异质性, 但对不同指标之间的关系研究相对较少。采用 NADS 法检测时观测到活细菌比例通常大于 HNA 比例, 这意味着 LNA 不全是死细菌, 例如在南极半岛海区, 61% 的细菌是活的, 这其中约 45% 的细菌属于 HNA, 也就是说有 16% 的活细菌属于 LNA (Ortega-Retuerta et al, 2008)。空间分布方面, 在加纳利群岛附近海域三者的垂直分布变化趋势并不一致 (Gasol et al, 2009)。在同一海区的周年变化中, 这些指标的变化也不同步, 例如在地中海西北部海区, HNA % 在 3 月最高, 但是活细菌比例在 9 月最高 (Gomes et al, 2015); 在比斯开湾, HNA % 和 CTC+细菌比例周年变化较为一致, 但是活细菌比例则与这两项指标不一致 (Morán et al, 2009); 在地中海西北部, CTC+细菌比例与 HNA % 的日变化趋势一致 (Lefort et al, 2014); 在围隔实验中, NADS 和 HNA % 的变化趋势相似, 而 CTC+细菌比例变化与前两者不一致 (Baltar et al, 2016)。

6 小结与展望

浮游细菌能够有效吸收和转化海洋生态系统中

的 DOM, 快速响应物理化学梯度等环境因素的变化, 对其生理状态研究的重要性显而易见。我国在相关方面的研究较为缺乏, 主要包括好氧不产氧光合异养细菌的膜电位研究 (Jiao et al, 2004)、台湾浅滩和珠江口的 HNA % 研究 (Xu et al. 2013; Jiang et al, 2017; 李祥付等 2018) 等, 在淡水中也有浮游细菌生理状态的报道 (Liu et al, 2016)。

目前的研究集中在近岸海域, 大洋深海和极区的资料较少, 长期变化、全球变暖、酸化等其他影响因素影响下浮游细菌生理状态的变化研究亟须加强:

(1) 目前对浮游细菌生理状态的调查主要集中在近岸海域, 在大洋和深海的资料很少, 2 000 m 水深以下几乎没有资料, 在如此广阔的水域中浮游细菌生理状态如何, 从近岸海区至大洋是如何过渡的, 在深海全水深调查中细菌的生理代谢活性是如何垂直变化的, 这些问题亟须得到解释。

(2) 光强也可能对细菌的生理状态有影响, 目前仅在中纬度 (41°N) 的地中海 Blanes 海湾进行过研究 (Alonso-Sáez et al, 2006; Ruiz-Gonzalez et al, 2012; Lefort et al, 2014)。低纬度海区的光强是否会降低细菌的生理状态, 夏季能影响到多深, 影响的时间有多长, 是否存在昼夜变化, 也需要继续研究。

(3) 浮游细菌生理状态周年变化仅在比斯开湾 (Morán et al, 2009; Huete-Stauffer et al, 2015)、亚德里亚海 (Šantić et al, 2014) 和北极的贝福特陆架的富兰克林湾 (Belzile et al, 2008) 有研究报告, 数据还十分缺乏, 难以总结其变化规律, 应选择代表性海域进行深入的周年变化调查。

(4) 海洋酸化和全球变暖已严重威胁到海洋生态系统的稳定性及生物多样性。在这一背景下, 可以通过调节升温梯度和 pH, 研究全球变暖和酸化对浮游细菌生理状态的影响。

参 考 文 献

- Almeida M, Cunha M, Alcántara F, 2001. Physiological responses of marine and brackish water bacterial assemblages in a tidal estuary (Ria de Aveiro, Portugal). *Aquatic Microbial Ecology*, 25: 113–125.
- Alonso-Sáez L, Gasol J M, Lefort T, et al, 2006. Effect of natural sunlight on bacterial activity and differential sensitivity of natural bacterioplankton groups in northwestern Mediterranean coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5806–5813.
- Baltar F, Arístegui J, Gasol J M, et al, 2010. Mesoscale eddies: hotspots of prokaryotic activity and differential community structure in the ocean. *The ISME Journal*, 4: 975.
- Baltar F, Palovaara J, Unrein F, et al, 2016. Marine bacterial community structure resilience to changes in protist predation under phytoplankton bloom conditions. *The ISME Journal*, 10: 568–581.
- Barbesti S, Citterio S, Labra M, et al, 2000. Two and three - color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria. *Cytometry*, 40: 214–218.
- Belzile C, Brugel S, Nozais C, et al, 2008. Variations of the abundance and nucleic acid content of heterotrophic bacteria in Beaufort Shelf waters during winter and spring. *Journal of Marine Systems*, 74: 946–956.
- Bernard L, Courties C, Servais P, et al, 2000. Relationships between bacterial cell size, productivity and genetic diversity in aquatic environments using cell sorting and flow cytometry. *Microbial Ecology*, 40: 148–158.
- Bettarel Y, Bouvier T, Bouvier C, et al, 2011. Ecological traits of planktonic viruses and prokaryotes along a full-salinity gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, 76: 360–372.
- Bhupathiraju V K, Hernandez M, Landfear D, et al, 1999. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 231–243.
- Boulos L, Prevost M, Barbeau B, et al, 1999. LIVE/DEAD? BacLight?: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 77–86.
- Bouvier T, Del Giorgio P A, Gasol J M, 2007. A comparative study of the cytometric characteristics of high and low nucleic - acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, 9: 2050–2066.
- Brehm-Stecher B F, Johnson E A, 2004. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 538–559.
- Buyschaert B, Byloos B, Leys N, et al, 2016. Reevaluating multicolor flow cytometry to assess microbial viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 9037–9051.
- Calvo-Díaz A, Morán X A G, 2006. Seasonal dynamics of picoplankton in shelf waters of the southern Bay of Biscay. *Aquatic Microbial Ecology*, 42: 159–174.
- Calleja ML, Ansari MI, Rostad A et al. 2018. The mesopelagic scattering layer: a hotspot for heterotrophic prokaryotes in the Red Sea twilight zone. *Frontiers in Marine Science* 5: UNSP 259.
- Choi J W, Sherr E B, Sherr B F, 1996. Relation between presence - absence of a visible nucleoid and metabolic activity in bacterioplankton cells. *Limnology and Oceanography*, 41: 1161–1168.
- Corzo A, Rodríguez-Gálvez S, Lubian L, et al, 2005. Antarctic marine bacterioplankton subpopulations discriminated by their apparent content of nucleic acids differ in their response to ecological factors. *Polar Biology*, 29: 27–39.

- Czechowska K, Johnson D R, van der Meer J R, 2008. Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 205–212.
- Davidson A, Thomson P, Westwood K, et al, 2004. Estimation of bacterioplankton activity in Tasmanian coastal waters and between Tasmania and Antarctica using stains. *Aquatic Microbial Ecology*, 37: 33–45.
- Del Giorgio P A, Gasol J M, 2008. Physiological structure and single-cell activity in marine bacterioplankton. In: Kirchman D L (ed.), *Microbial Ecology of the Oceans*, 2nd edn. John Wiley & Sons, Ltd; UK: 243–285.
- Del Giorgio P A, Gasol J M, Vaqué D, et al, 1996. Bacterioplankton community structure: protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnology and Oceanography*, 41: 1169–1179.
- Del Giorgio P A, Prairie Y, Bird D, 1997. Coupling between rates of bacterial production and the number of metabolically active cells in lake bacterioplankton, measured using CTC reduction and flow cytometry. *Microbial Ecology*, 34: 144–154.
- Dhib A, Denis M, Ziadi B, et al, 2017. Assessing ultraphytoplankton and heterotrophic prokaryote composition by flow cytometry in a Mediterranean lagoon. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 13710–13721.
- Eilers H, Pernthaler J, Amann R, 2000. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4634–4640.
- Falcioni T, Papa S, Gasol J M, 2008. Evaluating the flow-cytometric nucleic acid double-staining protocol in realistic situations of planktonic bacterial death. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1767–1779.
- Franco-Vidal L, Morán X A G, 2011. Relationships between coastal bacterioplankton growth rates and biomass production: comparison of leucine and thymidine uptake with single-cell physiological characteristics. *Microbial Ecology*, 61: 328–341.
- Fuchs B M, Woebken D, Zubkov M V, et al, 2005. Molecular identification of picoplankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 39: 145–157.
- Fuchs B M, Zubkov M V, Sahn K, et al, 2000. Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environmental Microbiology*, 2: 191–201.
- García F C, López-Urrutia Á, Morán X A G, 2014. Automated clustering of heterotrophic bacterioplankton in flow cytometry data. *Aquatic Microbial Ecology*, 72: 175–185.
- Gasol J M, Alonso-Sáez L, Vaqué D, et al, 2009. Mesopelagic prokaryotic bulk and single-cell heterotrophic activity and community composition in the NW Africa – Canary Islands coastal-transition zone. *Progress in Oceanography*, 83: 189–196.
- Gasol J M, Arístegui J, 2007. Cytometric evidence reconciling the toxicity and usefulness of CTC as a marker of bacterial activity. *Aquatic Microbial Ecology*, 46: 71–83.
- Gasol J M, Del Giorgio P A, 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 64: 197–224.
- Gasol J M, Pa D G, Massana R, et al, 1995. Active versus inactive bacteria: size – dependence in a coastal marine plankton community. *Marine Ecology Progress Series*, 128: 91–97.
- Gasol J M, Zweifel U L, Peters F, et al, 1999. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4475–4483.
- Girault M, Arakawa H, Barani A, et al, 2015. Heterotrophic prokaryote distribution along a 2300 km transect in the North Pacific subtropical gyre during a strong La Niña conditions: relationship between distribution and hydrological conditions. *Biogeosciences*, 12: 3607–3621.
- Gomes A, Gasol J M, Estrada M, et al, 2015. Heterotrophic bacterial responses to the winter-spring phytoplankton bloom in open waters of the NW Mediterranean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 96: 59–68.
- Grégori G, Citterio S, Ghiani A, et al, 2001. Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4662–4670.
- Grossart H-P, Riemann L, Azam F, 2001. Bacterial motility in the sea and its ecological implications. *Aquatic Microbial Ecology*, 25(3): 247–258.
- Hammes F, Berney M, Egli T, 2011. Cultivation-independent assessment of bacterial viability. In: Müller S, Bley T (eds.), *High Resolution Microbial Single Cell Analytics*. Springer Berlin Heidelberg; Berlin, Heidelberg: 123–150.
- Hatzinger P B, Palmer P, Smith R L, et al, 2003. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 47–58.
- Heissenberger A, Leppard G G, Herndl G J, 1996. Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4521–4528.
- Hobbie J E, Daley R J, Jasper S, 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 1225–1228.
- Howard-Jones M H, Frischer M E, Verity P G, 2001. Determining the physiological status of individual bacterial cells. *Methods in Microbiology*, 30: 175–206.
- Huete-Stauffer T M, Arandia-Gorostidi N, Díaz-Pérez L, et al, 2015. Temperature dependences of growth rates and carrying capacities of marine bacteria depart from metabolic theoretical predictions. *FEMS Microbiology Ecology*, 91: fiv111.
- Huete-Stauffer T M, Morán X A G, 2012. Dynamics of heterotrophic

- bacteria in temperate coastal waters: similar net growth but different controls in low and high nucleic acid cells. *Aquatic Microbial Ecology*, 67: 211–223.
- Ishii S, Tago K, Senoo K, 2010. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1281–1292.
- Jellett J F, Li W K W, Dickie P M, et al, 1996. Metabolic activity of bacterioplankton communities assessed by flow cytometry and single carbon substrate utilization. *Marine Ecology Progress Series*, 136: 213–225.
- Jiang X, Li J, Ke Z, et al, 2017. Characteristics of picoplankton abundances during a *Thalassiosira diporocyclus* bloom in the Taiwan Bank in late winter. *Marine Pollution Bulletin*, 117: 66–74.
- Jiao N, Yang Y, Luo T, 2004. Membrane potential based characterization by flow cytometry of physiological states in an aerobic anoxygenic phototrophic bacterium. *Aquatic Microbial Ecology*, 37: 149–158.
- Jochem F, 2001. Morphology and DNA content of bacterioplankton in the northern Gulf of Mexico: analysis by epifluorescence microscopy and flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, 25: 179–194.
- Jochem F, Lavrentyev P, First M, 2004. Growth and grazing rates of bacteria groups with different apparent DNA content in the Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 145: 1213–1225.
- Joux F, Lebaron P, 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, 2: 1523–1535.
- Joux F, Servais P, Naudin J J, et al, 2005. Distribution of picophytoplankton and bacterioplankton along a river plume gradient in the Mediterranean Sea. *Vie Et Milieu—Life and Environment*, 55: 197–208.
- Kaartokallio H, Asmala E, Autio R, et al, 2016. Bacterial production, abundance and cell properties in boreal estuaries: relation to dissolved organic matter quantity and quality. *Aquatic Sciences*, 78: 525–540.
- Kaprelyants A S, Kell D B, 1993. The use of 5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride and flow cytometry for the visualisation of respiratory activity in individual cells of *Micrococcus luteus*. *Journal of Microbiological Methods*, 17: 115–122.
- Karner M, Fuhrman J A, 1997. Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1208–1213.
- Lasternas S, Agustí S, 2014. The percentage of living bacterial cells related to organic carbon release from senescent oceanic phytoplankton. *Biogeosciences*, 11: 6377–6387.
- Lasternas S, Agustí S, Duarte C M, 2010. Phyto- and bacterioplankton abundance and viability and their relationship with phosphorus across the Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 60: 175–191.
- Lebaron P, Servais P, Agogué H, et al, 2001. Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1775–1782.
- Lebaron P, Servais P, Baudoux A C, et al, 2002. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, 28: 131–140.
- Lefort T, Gasol J M, 2014. Short-time scale coupling of picoplankton community structure and single-cell heterotrophic activity in winter in coastal NW Mediterranean Sea waters. *Journal of Plankton Research*, 36: 243–258.
- Lekunberri I, Lefort T, Romera-Castillo C, et al, 2012. Relationship between induced phytoplankton blooms and the structure and dynamics of the free-living heterotrophic bacterial community. *Marine Ecology Progress Series*, 448: 23–37.
- Li W K W, Jellett J F, Dickie P M, 1995. DNA distributions in planktonic bacteria stained with TOTO or TO-PRO. *Limnology and Oceanography*, 40: 1485–1495.
- Liu J, Hao Z, Ma L, et al, 2016. Spatio-temporal variations of high and low nucleic acid content bacteria in an exorheic river. *PLoS ONE*, 11: e0153678.
- Longnecker K, Sherr B F, Sherr E B, 2005. Activity and phylogenetic diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content and electron transport system activity in an upwelling ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7737–7749.
- Longnecker K, Wilson M J, Sherr E B, et al, 2010. Effect of top-down control on cell-specific activity and diversity of active marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 58: 153–165.
- Lovejoy C, Legendre L, Klein B, et al, 1996. Bacterial activity during early winter mixing (Gulf of St. Lawrence, Canada). *Aquatic Microbial Ecology*, 10: 1–13.
- Lovejoy C, Legendre L, Therriault J C, et al, 2000. Growth and distribution of marine bacteria in relation to nanoplankton community structure. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 47: 461–487.
- Luis S, Calleja M L, Huete-Stauffer T M, et al, 2019. Low abundances but high growth rates of coastal heterotrophic bacteria in the Red Sea. *Frontiers in Microbiology* 9: 3244.
- Martin A, Hall J A, Toole R, et al, 2008. High single-cell metabolic activity in Antarctic sea ice bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 52: 25–31.
- Mary I, Heywood J L, Fuchs B M, et al, 2006. SAR11 dominance among metabolically active low nucleic acid bacterioplankton in surface waters along an Atlantic meridional transect. *Aquatic Microbial Ecology*, 45: 107–113.
- Moran X A G, Bode A, Suárez L Á, et al, 2007. Assessing the relevance of nucleic acid content as an indicator of marine bacterial activity. *Aquatic Microbial Ecology*, 46: 141–152.
- Morán X A G, Calvo-Díaz A, 2009. Single-cell vs. bulk activity properties of coastal bacterioplankton over an annual cycle in a temperate ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 67: 43–56.
- Morán X A G, Ducklow H W, Erickson M, 2011. Single-cell physiologi-

- cal structure and growth rates of heterotrophic bacteria in a temperate estuary (Waquoit Bay, Massachusetts). *Limnology and Oceanography*, 56: 37–48.
- Mosharova I V, Il'inskii V V, Mosharov S A, 2016. State of heterotrophic bacterioplankton of Yenisei estuary and the zone of Ob–Yenisei discharge in autumn in relation with environmental factors. *Water Resources*, 43: 341–352.
- Mosharova I V, Mosharov S A, Ilinskiy V V, 2017. Distribution of bacterioplankton with active metabolism in waters of the St. Anna Trough, Kara Sea, in autumn 2011. *Oceanology*, 57: 114–121.
- Nescerecka A, Hammes F, Juhna T, 2016. A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. *Journal of Microbiological Methods*, 131: 172–180.
- Nishimura Y, Kim C, Nagata T, 2005. Vertical and seasonal variations of bacterioplankton subgroups with different nucleic acid contents: possible regulation by phosphorus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 5828–5836.
- Ortega–Retuerta E, Reche I, Pulido–Villena E, et al, 2008. Exploring the relationship between active bacterioplankton and phytoplankton in the Southern Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 52: 99–106.
- Paoli A, Karuza A, de Vittor C, et al, 2006. Daily variations of highly active bacteria in the Northern Adriatic Sea. *Journal of Plankton Research*, 28: 325–335.
- Paterson J S, Nayar S, Mitchell J G, et al, 2012. A local upwelling controls viral and microbial community structure in South Australian continental shelf waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 96: 197–208.
- Reinthalter T, Álvarez Salgado X A, Álvarez M, et al, 2013. Impact of water mass mixing on the biogeochemistry and microbiology of the Northeast Atlantic Deep Water. *Global Biogeochemical Cycles*, 27: 1151–1162.
- Rodríguez G G, Phipps D, Ishiguro K, et al, 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1801–1808.
- Rozsak D, Grimes D, Colwell R, 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 334–338.
- Ruiz–Gonzalez C, Lefort T, Galí M, et al, 2012. Seasonal patterns in the sunlight sensitivity of bacterioplankton from Mediterranean surface coastal waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 79: 661–674.
- Šantić D, Šestanović S, Šolč M, et al, 2014. Dynamics of picoplankton community from coastal waters to the open sea in the Central Adriatic. *Mediterranean Marine Science*, 15: 179–188.
- Schapiro M, Pollet T, Mitchell J G, et al, 2009. Respiration rates in marine heterotrophic bacteria relate to the cytometric characteristics of bacterioplankton communities. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89: 1161–1169.
- Scharek R, Latasa M, 2007. Growth, grazing and carbon flux of high and low nucleic acid bacteria differ in surface and deep chlorophyll maximum layers in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 46: 153–161.
- Schattenhofer M, Wulf J, Kostadinov I, et al, 2011. Phylogenetic characterisation of picoplanktonic populations with high and low nucleic acid content in the North Atlantic Ocean. *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 470–475.
- Schaule G, Flemming H, Ridgway H, 1993. Use of 5–cyano–2, 3–ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3850–3857.
- Schumann R, Schiewer U, Karsten U, et al, 2003. Viability of bacteria from different aquatic habitats. II. Cellular fluorescent markers for membrane integrity and metabolic activity. *Aquatic Microbial Ecology*, 32: 137–150.
- Servais P, Agogué H, Courties C, et al, 2001. Are the actively respiring cells (CTC+) those responsible for bacterial production in aquatic environments? *FEMS Microbiology Ecology*, 35: 171–179.
- Servais P, Casamayor E O, Courties C, et al, 2003. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquatic Microbial Ecology*, 33: 41–51.
- Sherr B, Sherr E, del Giorgio P, 2001. Enumeration of total and highly active bacteria. In: Paul H (ed.), *Methods in Microbiology*. Elsevier; St Petersburg, Florida: 129–159.
- Sherr B F, del Giorgio P, Sherr E B, 1999. Estimating abundance and single–cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC. *Aquatic Microbial Ecology*, 18: 117–131.
- Sherr E B, Sherr B F, Longnecker K, 2006. Distribution of bacterial abundance and cell–specific nucleic acid content in the Northeast Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 53: 713–725.
- Sherr E B, Sherr B F, Verity P G, 2002. Distribution and relation of total bacteria, active bacteria, bacterivory, and volume of organic detritus in Atlantic continental shelf waters off Cape Hatteras NC, USA. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49: 4571–4585.
- Sieracki M E, Cucci T L, Nicinski J, 1999. Flow cytometric analysis of 5–cyano–2, 3–ditolyl tetrazolium chloride activity of marine bacterioplankton in dilution cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2409–2417.
- Sieracki M E, Viles C L, 1992. Distributions and fluorochrome–staining properties of submicrometer particles and bacteria in the North Atlantic. *Deep Sea Research Part A: Oceanographic Research Papers*, 39: 1919–1929.
- Smith E M, 1998. Coherence of microbial respiration rate and cell–specific bacterial activity in a coastal planktonic community. *Aquatic Microbial Ecology*, 16: 27–35.
- Smith E M, del Giorgio P A, 2003. Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities? *Aquatic Microbial Ecology*, 31: 203–208.
- Smith J J, McFeters G A, 1997. Mechanisms of INT (2–(4–iodophenyl)–

- 3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiological Methods*, 29: 161-175.
- Tada Y, Suzuki K, 2016. Changes in the community structure of free-living heterotrophic bacteria in the open tropical Pacific Ocean in response to microalgal lysate-derived dissolved organic matter. *FEMS Microbiology Ecology*, 92: fiw099.
- Talarmin A, Van Wambeke F, Catala P, et al, 2011. Flow cytometric assessment of specific leucine incorporation in the open Mediterranean. *Biogeosciences*, 8: 253-265.
- Ullrich S, Karrasch B, Hoppe H, et al, 1996. Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4587-4593.
- Van Wambeke F, Catala P, Pujo-Pay M, et al, 2011. Vertical and longitudinal gradients in HNA-LNA cell abundances and cytometric characteristics in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, 8: 1853-1863.
- Vaqué D, Casamayor E O, Gasol J M, 2001. Dynamics of whole community bacterial production and grazing losses in seawater incubations as related to the changes in the proportions of bacteria with different DNA content. *Aquatic Microbial Ecology*, 25: 163-177.
- Vila-Costa M, Gasol J M, Sharma S, et al, 2012. Community analysis of high- and low-nucleic acid-containing bacteria in NW Mediterranean coastal waters using 16S rDNA pyrosequencing. *Environmental Microbiology*, 14: 1390-1402.
- Wang Y, Hammes F, Boon N, et al, 2009. Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria. *The ISME Journal*, 3: 889-902.
- Xu J, Jing H, Sun M, et al, 2013. Regulation of bacterial metabolic activity by dissolved organic carbon and virus. *Journal of Geophysical Research Biogeosciences* 118: 1573-1583.
- Yamaguchi N, Nasu M, 1997. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 43-52.
- Zubkov M V, Allen J I, Fuchs B M, 2004. Coexistence of dominant groups in marine bacterioplankton community—a combination of experimental and modelling approaches. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 84: 519-529.
- Zubkov M V, Fuchs B M, Burkill P H, et al, 2001. Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5210-5218.
- Zubkov M V, Fuchs B M, Tarran G A, et al, 2002. Mesoscale distribution of dominant bacterioplankton groups in the northern North Sea in early summer. *Aquatic Microbial Ecology*, 29: 135-144.
- Zweifel U L, Hagstrom A, 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2180-2185.
- 李祥付, 徐杰, 施震, 等, 2018. 珠江口异养细菌时空分布特征及其调控机制. *热带海洋学报*, 37: 27-36.
- 张异凡, 王奎, 王振波, 2019. 海洋生态系统净生产力研究进展. *海洋通报*, 38: 1-7.

(本文编辑: 袁泽轶)