

3种淡水环境中低核酸含量细菌的滤过性

刘杰 宋宇昊 赵志鹏 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:【目的】增加低核酸含量(LNA)细菌与过滤性细菌之间的认识。【方法】采用流式细胞技术(FCM)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)及统计学分析研究3种典型淡水环境中细菌群落与滤过性。【结果】LNA细菌与过滤性细菌在数量上具有很好的相关性($y=0.646x+22.42$, $R^2=0.984$, $P<0.01$),细菌的滤过性不仅与细菌大小有关,还与细胞整体形状及其伸缩性有关;细菌群落组织与LNA细菌比重呈负相关性,而与HNA细菌呈正相关性。【结论】0.45 μm 膜过滤对水样微生物群落中的LNA细菌具有极强的筛选效果;细菌群落组织与其基于流式细胞技术测定的基因含量具有密切联系。

关键词: 流式细胞技术(FCM), 低核酸含量(LNA)细菌, 高核酸含量(HNA)细菌, 过滤性细菌, 变性梯度凝胶电泳(DGGE), 群落组织

Filterability of bacteria with low nucleic acid content in three freshwater environments

LIU Jie SONG Yu-Hao ZHAO Zhi-Peng WANG Ying-Ying*

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

Abstract: [Objective] We studied the correlation between low nucleic acid content (LNA) bacteria and their filterability. [Methods] Bacterial community and filterability in three freshwater environments were analyzed by flow cytometry (FCM), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and statistical analysis. [Results] The proportion of LNA bacteria and their filterability had a significant correlation ($y=0.646x+22.42$, $R^2=0.984$, $P<0.01$), and the filterability of LNA bacteria depended on not only the cell size, but also shape and flexibility. In addition, bacteria community organization positively correlated to the proportion of high nucleic acid content (HNA) bacteria and negative correlated to the proportion of LNA bacteria. [Conclusion] The results indicated that 0.45 μm pore-size-filtration can efficiently screen LNA bacteria from the autochthonous microbial

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270545)

*Corresponding author: Tel: 86-22-66229721; E-mail: wangyy@nankai.edu.cn

Received: October 08, 2015; Accepted: November 24, 2015; Published online (www.cnki.net): January 06, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270545)

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

收稿日期: 2015-10-08; 接受日期: 2015-11-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-06

community, and demonstrated that bacterial community organization was closely related to the nucleic acid content measured by flow cytometry.

Keywords: Flow cytometry (FCM), Low nucleic acid content (LNA) bacteria, High nucleic acid content (HNA) bacteria, Filterable bacteria, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Community organization

微孔过滤(0.1 μm –0.45 μm)通常被用作热敏药物和实验溶剂的一种消毒方法,并在饮用水和废水处理中被作为物理法去除细菌等微生物^[1-2]。自20世纪30年代以来,能够通过微孔过滤膜的微生物已经引起了研究者的广泛关注^[1],其中能够通过0.45 μm 膜的细菌被称之为“过滤性细菌(Filterable bacteria)”。有些研究者将其作为一类新微生物,然而一些研究者认为这是细菌生命周期中的一个生物阶段^[3],尽管这些观点都是基于致病菌的悬浮培养,但是这种有趣的现象因缺乏成熟的实验条件和合适的培养方法而被人们所忽略^[4]。0.22 μm 膜过滤已被作为一种商业化的过滤消毒法,但是近来许多报道都指出在水环境中存在许多能够通过0.22 μm 孔径膜的细菌,这又重新唤起了人们对过滤性细菌研究的热点^[5-7]。目前关于过滤性细菌的研究大多基于异养菌平板技术(HPCs),包括计数、分离过滤性细菌以及标准过滤器性能的测试等,但是这种方法在检测自然环境中微生物时存在很多缺陷,由于平板技术是基于培养的方法,但特定的培养基并不能反映真实的环境条件,在自然环境中只有不到1%的浮游细菌能够在琼脂表面上长出菌落形态,而实际环境中存在许多具有代谢活性的细菌,基于HPCs方法测得的过滤性细菌丰度远远低于真实值^[8-10]。近来,流式细胞技术(FCM)的发展极大地促进了环境中过滤性细菌的研究。

在流式细胞技术中,水环境中的细菌普遍被分为低核酸含量(LNA)细菌和高核酸含量(HNA)细菌两大类。细菌DNA含量与细胞大小具有密切的关系,作为LNA细菌的重要特性之一,其细胞大小比普通细菌要小很多,有研究者将其归类于超微细菌^[11-12]。LNA细菌在环境中普遍存在且具有重要的生态作用,然而由于分离纯菌株的有限,使得对

LNA细菌的生理生长特性认识还很有限,因此如何将LNA细菌与其他(HNA)细菌分离开来是获得LNA纯菌的首要条件,而LNA细菌的微小特性为研究提供了一个很好的切入点,即通过一定孔径的生物滤膜来分离LNA菌群。本研究选取河水、湖泊水和地下水作为代表进行水环境微生物的滤过性研究,分析0.45 μm 过滤对3种不同水源中LNA细菌的影响,为LNA细菌的分离提供依据;同时,通过DGGE技术探讨细菌DNA含量与微生物群落组织的关系。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

实验分别从地下水(湖南)、河流(海河)和湖泊(鄱阳湖)3种典型淡水环境中采集水样,采样参照《水质采样技术指导(HJ 494-2009)》^[13]。试验样品用 1×10^5 Pa灭菌30 min的1 L Schott玻璃瓶收集,所有样品在常温下采集,4 $^{\circ}\text{C}$ 保藏,24 h内立即进行实验。

1.2 主要试剂和仪器

SYBR Green I InvitrogenTM, ThermoFisher公司;0.22 μm 尼龙膜滤器,美国PALL公司;0.45 μm Millex[®]-HV生物膜滤器,Millipore公司;Dneasy Blood&Tissue Kit, Qiagen公司;电泳染料6 \times blue/orange loading dye和PCR反应试剂GoTaq Master Mix, Promega公司。

流式细胞仪CyFlow Space,德国Partec公司;DcodeTM基因突变检测系统和Molecular ImagerTM Gel Dox XR⁺紫外成相系统, Bio-Rad公司。

1.3 流式细胞术分析

取1 mL水样,加10 μL SYBR Green I进行荧光染色,染色标准工作溶液为:用0.22 μm 尼龙

膜过滤后的二甲基亚砷将 SYBR Green I 母液稀释 100 倍, 室温条件下避光孵化 15 min。同时用 0.45 μm Millex[®]-HV 生物膜过滤水样, 利用 FCM 分析过滤前后的细菌变化。

实验所用流式细胞仪 CyFlow Space 仪器参数为: 光源功率 50 mW、发射波长 488 nm、线性范围 $2 \times 10^2 - 1 \times 10^5$ cells/mL、检出限 200 cells/mL、绝对计数误差小于 5%。发射光信号收集软件为 FlowMax, 其中, 绿色荧光收集波长 520 ± 20 nm。所有信号均被收集在绿色荧光(FL1)-侧向散色光(SSC)二维散点图上。仪器增益设置为地下水: SSC=300、FL1=320; 鄱阳湖水: SSC=280、FL1=360; 海河水 SSC=280、FL1=380, 均为 lg4 对数放大倍数。用 Milli-Q 无菌水稀释样品以保证测定过程中流式细胞仪计数小于 500 cells/s, 设置“门 Gate”将目标细胞群与背景分离开, 每个样品 3 个平行。

细菌的滤过性(Filtration efficiency, *FE*)采用如下公式评估:

$$FE = \frac{C_{\text{after}}}{C_{\text{before}}} \times 100\%$$

其中, C_{before} 和 C_{after} 分别指过滤前后水样中的 FCM 细菌浓度, 膜对细菌的去除效果(Removal efficiency, *RE*)采用如下公式: $RE(\%) = 100 - FE$ 计算。

1.4 PCR-DGGE 分析

水样微生物总 DNA 使用 Dneasy Blood&Tissue Kit 提取。采用 Nested-PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因 V3 区^[14], PCR 反应体系及程序参照屠腾等^[10]方法, 其所用试剂为 GoTaq Master Mix。DGGE 分析(DcodeTM 基因突变检测系统)电泳条件: 丙烯酰胺凝胶溶液(丙烯酰胺与亚甲双丙烯酰胺的质量比为 37.5:1)浓度 8%、变性剂梯度 35%至 60% (100% 变性剂为 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺)^[15], 16 mL 凝胶溶液中加入 15.5 μL 10%的过硫酸铵(氧化剂)和 15.5 μL 四甲基乙二胺(加速剂)。取 20 μL PCR 产物样品, 加入 5 μL 6 \times blue/orange loading dye, 离心混匀上样。电泳条件为: 1 \times TAE 缓冲溶液(40 mmol/L Tris, 20 mmol/L HAc, 50 mmol/L

EDTA, pH 8.0), 恒温 60 $^{\circ}\text{C}$, 恒定电压 140 V, 电泳 4 h。电泳结束后用 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB 染色 20 min。染色完毕, 用蒸馏水漂洗干净, 在紫外成像系统(Molecular Imager TM Gel Dox XR⁺)下得到 DGGE 图谱。

1.5 数据分析与处理

细菌群落组织用 Quantity One 4.31 软件(Bio-Rad 公司)对 DGGE 图谱进行定量分析, 经过泳道识别、条带识别和配对 3 个步骤后, 群落组织(Community organization, Co)用条带分布的 Gini 系数百分比进行量化, 即标准化的 Pareto-Lorenz 曲线与理想均匀度直线(Perfect evenness curve, PEC)之间面积^[16-17]。使用 SPSS16.0 进行方差分析(One-way ANOVA)和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 水源中过滤性细菌

实验选取 3 种典型水源(河流、湖泊和地下水)结合 FCM 和 0.45 μm 膜过滤分析了水样中土著微生物及过滤性细菌的群落特征。水样过滤前后的群落特征如图 1 所示, 结果表明 0.45 μm 膜过滤对微生物群落具有显著影响; 在数量上, 过滤前地下水、海河水和鄱阳湖水中总细菌浓度分别为 1.04×10^6 、 2.61×10^6 、 1.08×10^6 cells/mL, 经 0.45 μm 生物膜过滤后, 水样中的过滤性细菌浓度(图 2)分别为 1.91×10^4 cells/mL (地下水)、 6.75×10^5 cells/mL (海河)和 7.46×10^5 cells/mL (鄱阳湖); 在群落结构上, 过滤前, 地下水只有很明显的 2 团菌落(图 1A), 其中 HNA 细菌属于绝对优势菌群, 海河水样中可以看到微弱的 3 团菌落(图 1B), 而鄱阳湖明显分为 4 团菌落(图 1C), 其中 LNA 细菌属于优势菌群, 在 0.45 μm 生物膜过滤后, 水中细菌群落结构发生了明显的变化, 地下水中的绝大部分 HNA 细菌被过滤去除(图 1D), 而海河(图 1E)和鄱阳湖(图 1F)水中的 HNA 细菌也几乎被去除。同时, 过滤后的细菌分群更加明显, 这一现象与前人研究相似。Wang 等^[2]发现, 水样微生物经过过滤培养后, 其群落分簇变得更多。

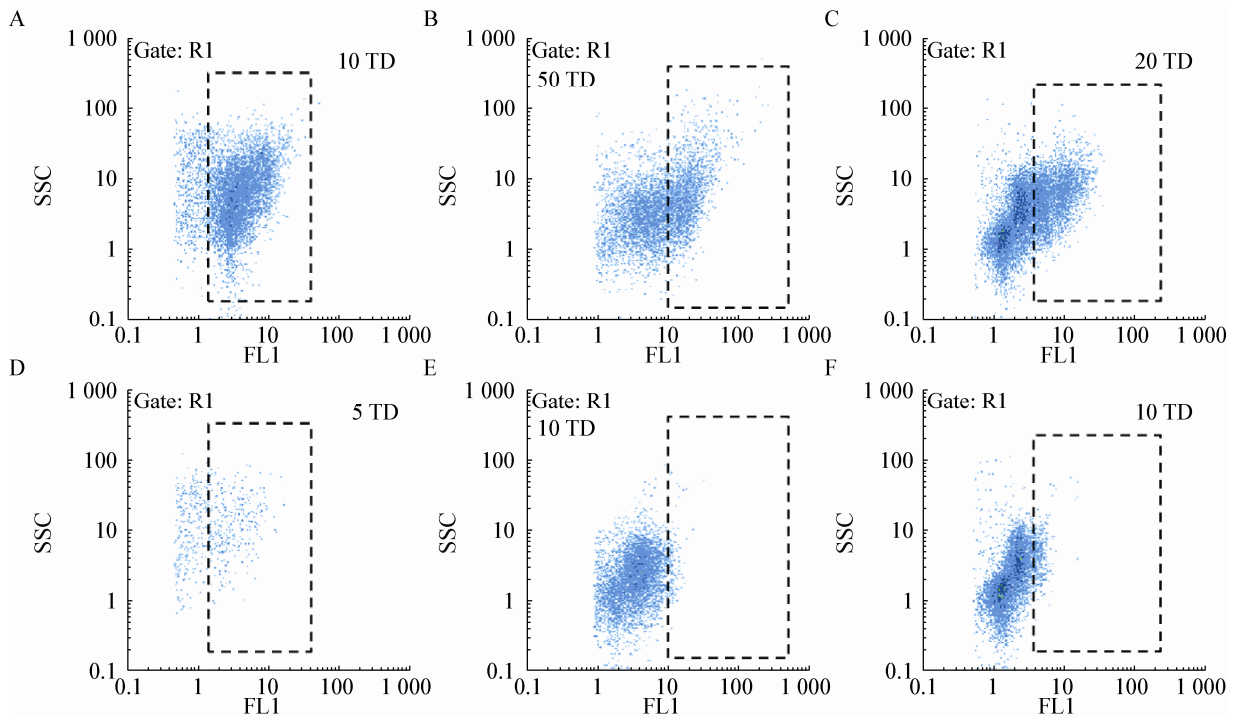


图1 0.45 μm 过滤对细菌群落影响的 FCM 分析

Figure 1 Bacterial community's FCM analysis about the effect of 0.45 μm filtration

注：A、B 和 C 分别为地下水、海河和鄱阳湖原水样；D、E 和 F 分别为 0.45 μm 过滤后的地下水、海河和鄱阳湖水样；TD 表示稀释倍数；虚线框内的细菌表示被膜过滤去除掉的(HNA 细菌)部分。

Note: Original water samples come from underground water (A), Haihe River (B) and Poyang Lake (C), and (D), (E) and (F) indicate those samples after filtration through a 0.45 μm -pore-size filter respectively. TD means the dilution ratio in FCM analysis, and bacteria in dash frame indicate the effect of filtration on HNA bacteria.

方差分析显示(图 2)：在过滤前，地下水和鄱阳湖水中总细菌浓度没有显著的差别($P>0.05$)，而海河水中细菌浓度最高($P<0.01$)，约为地下水和鄱阳湖中细菌浓度的 2 倍；在过滤后，鄱阳湖和海河水样中的过滤性细菌浓度要显著高于地下水中的过滤性细菌浓度($P<0.01$)，而此时鄱阳湖和海河水中的过滤性细菌浓度没有显著的差异($P>0.05$)。实验结果表明，鄱阳湖水样中具有最高的 0.45 μm 过滤性细菌比重(69.1%)，海河中为 25.8%，而地下水中最低(1.8%) (图 2)。与海河水相比，尽管鄱阳湖水样原土著微生物数量较低，但其过滤性细菌比重却最高。

由于热敏性溶液不能用高压蒸汽法灭菌，因此在医学、工业和科学研究中，微孔过滤被广泛用于

定性去除水中的细菌，其中 0.22 μm 孔径膜被一直作为标准的过滤消毒，而 0.1 μm 膜则被认为是绝对去除水环境细菌的界线(除了病毒)^[18]。然而，在海洋、淡水以及饮用水等环境中存在着许多过滤性细菌，研究显示许多细菌可以通过 0.22 μm 甚至 0.1 μm 孔径过滤器，而 0.45 μm 膜在提供微生物安全保障时作用很有限^[1]。Chandler 等^[19]发现 *Treponema pallidum* 能够逃脱 0.22 μm 的滤器，Rubin 等^[20]从 0.22 μm 过滤后的去离子水中分离出一株 *Leptospira biflexa*，Fedotova 等^[21]分析了 Rybinsk (俄罗斯)水库中 0.22 μm 过滤性细菌的组成，通过 16S rRNA 基因鉴定分析发现，它们大部分都属于 β -Proteobacteria；Wang 等^[1]从瑞士分离到一株能穿过 0.1 μm 滤器的 *Hylemonella gracilis*。在海水环

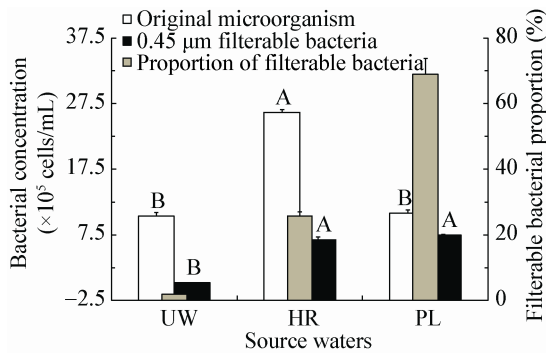


图2 3种水源中过滤性细菌

Figure 2 The abundance of filterable bacteria in three water sources

注: UW: 地下水; HR: 海河; PL: 鄱阳湖; 不同字母表示相同柱状图中具有显著性差异($P < 0.01$).

Note: UW, HR and PL indicate underground water, Haihe River and Poyang Lake respectively, and different letters in the same column mean significant difference at 0.01 level.

境中, 0.22 μm 过滤性细菌主要属于 α 和 λ-Proteobacteria 变形菌门以及 *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* 分支^[22-23], 而在淡水环境中则主要是 β-Proteobacteria 变形菌门^[1,5,21], 这些过滤性细菌具有多种形状, 如小球型、短螺旋状和棒杆状等^[3], 它们在寡营养的海洋、淡水以及饮用水中广泛存在, 过滤性细菌在这种环境中因比表面积比其他细菌大而具有较高的营养物质转运速率, 所以能成为优势菌。

2.2 过滤性细菌与 LNA 细菌的相互关系

实验结果显示, 水样中过滤性细菌与 LNA 细菌具有极显著的正相关性(图 3, $R^2=0.984$, $P < 0.01$), 这表明过滤性细菌与 LNA 细菌在 FCM 上具有很好的重合性, 过滤对水样微生物群落组成(特别是 LNA 细菌)具有极强的筛选效果, 通过膜过滤可以增加水样中 LNA 细菌的比重。尽管过滤能够增加水样中 LNA 细菌的比重, 但是对比分析发现, 原水样中过滤性细菌的比重与 LNA 细菌的比重仍有一定的差异, 即过滤性细菌与 LNA 细菌的比重并非相等, 这说明过滤虽然在一定程度上能够将 HNA 细菌和 LNA 细菌分开, LNA 这类微小细菌也具有可滤过性, 但是在过滤过程中细胞的大小并不是决定细菌可滤过性(过滤细菌占总菌浓度的比重)的唯一因素。

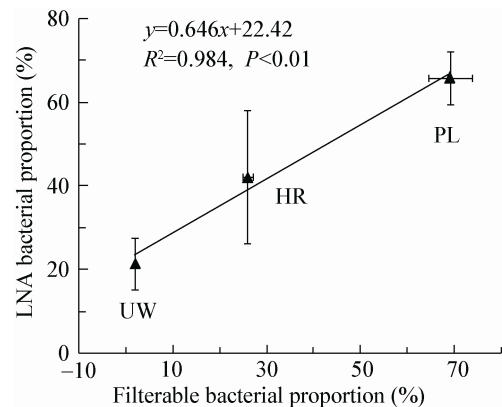


图3 过滤性细菌比重和 LNA 细菌比重的相互关系

Figure 3 Correlation of filterable and LNA bacterial proportion in three water sources

注: UW: 地下水; HR: 海河; PL: 鄱阳湖.

Note: UW, HR and PL indicate underground water, Haihe River and Poyang Lake respectively.

研究表明细菌的大小(生物体积)及形状(细胞的最小宽度和整体形状)共同决定了其可滤过性, Wang 等^[3]研究显示, 具有较大体积的 *Hylemonella gracilis* (体积 0.12 μm³, 0.45 μm 滤过性 46.51%) 其滤过性反而要高于相对小体积的 *Brevundimonas diminuta* (体积 0.08 μm³, 0.45 μm 滤过性 1.47%), 这是因为 *Hylemonella gracilis* 属于螺旋状具有较小的最小细胞宽度, 而 *Brevundimonas diminuta* 是短棒状, 其最小细胞宽度要大于 *H. gracilis* 的最小细胞宽度, 进而导致了滤过性的差异。当细菌在具有相似形状时, 细胞的最小宽度越小越容易穿过膜; 而当细胞的最小宽度与膜孔径相当时, 细胞的整体形状则决定了其滤过性。此外, 细菌的伸缩性对其滤过性也很重要, 研究发现, 在具有张力的甘油溶胶中, *Spirillum* 属能够被拉伸至其原长度的 3 倍而不断裂; 在外力消失时, 细胞能够恢复到它们的原始大小和形状^[24], 因而在过滤过程中, 细菌可能会由于外压或自身原因进行伸缩从而穿过滤膜。在本研究中, 鄱阳湖水样可能含有一些细长或具有伸缩的 HNA 细菌, 在过滤时也能通过滤膜, 因而使得其过滤性细菌比重略高于 LNA 细菌比重。另一方面, 细菌在膜孔中的堵塞也会在一定程度上影响细菌的滤过性, 会导致细菌的滤过性降低, 因而初始

浓度不同时也可能导致滤过性的差异,正是如此可能导致了在本研究中海河水和地下水中的过滤性细菌比重低于 LNA 细菌比重。另外,微生物的培养条件也会影响细菌的滤过性,细菌的大小会随所处的环境而改变,Anderson 和 Heffernan^[25]研究发现一些分离的过滤性细菌在实验室条件培养后不再具有滤过性。

2.3 群落组织与 LNA 和 HNA 细菌的关系

通过 Quantity one 软件对 DGGE 图谱进行定量计算得到水样中细菌群落的分布情况,通过绘制 DGGE 图谱 Parelo-Lorenz 曲线(图 4A),反映出物种的分布,即微生物群落组织功能。在地下水中具有最高的群落组织,这可能是在地下水中微生物的生存环境压力大导致了一些优势菌的形成^[16]。同时,相关分析表明,水样细菌的群落组织与 HNA 细菌比重具有显著的正相关(图 4B, $R^2=0.843$, $P<0.05$),而与 LNA 细菌比重呈负相关。

HNA 细菌与微生物群落组织的正相关说明细菌基因含量与群落组织具有密切的联系。流式细胞技术中 HNA 和 LNA 细菌的分类主要是基于荧光信号 FL1 双峰模型,细菌 DNA 核酸染色后的荧光激发主要与其胞内核酸含量有关,微生物物种的基因大小和基因拷贝数共同影响细菌的荧光信号 FL1^[26]。由于 HNA 细菌中含有较高的核酸含量,即具有较大基因组,在 HNA 细菌比重高的水样中

具有较高微生物群落组织。研究发现,在碳源等养分受限制时,LNA 细菌会采取简化的代谢方式来适应这种环境,通过加强有限范围生物可利用基质的吸收机制来确保能够完成所有的代谢,这样就可以排除一些额外冗余基因(这些基因控制碳氮代谢)需要^[27]。这种基因的简化,反映了细菌在应对环境变化时(如营养基质提高)改变代谢策略的能力,基因调控是高效开发竞争基质策略中不可缺少的部分,控制网络的最小化(基因最优化 Streamlined genomes)是消极寡营养细菌的标志之一^[28],这也解释了在寡营养环境中存在许多 LNA 细菌的原因。

3 结论

(1) LNA 细菌与过滤性细菌在 FCM 上具有很好的相关性($R^2=0.984$, $P<0.01$),膜过滤对水样微生物群落中 LNA 细菌具有极强的筛选效果,通过 0.45 μm 膜过滤可以增加水样中 LNA 细菌的比重。

(2) LNA 细菌比重与过滤性细菌比重之间的差异可能是因为:细菌的大小、整体形状及其可伸缩性导致过滤性细菌比重大于 LNA 细菌比重;而细菌自身的膜孔堵塞及培养条件的变化会导致过滤性细菌比重小于 LNA 细菌比重。

(3) 细菌的群落组织与其基因含量具有密切联系,具体地,群落组织与 HNA 细菌比重呈正相关性,而与 LNA 细菌呈负相关性。

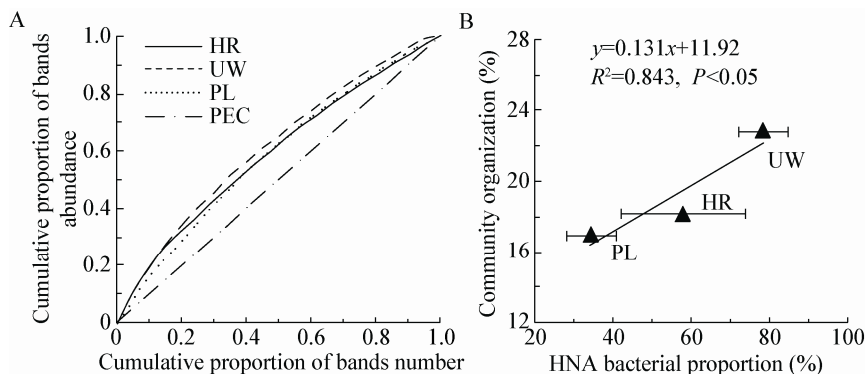


图 4 细菌群落 Parelo-Lorenz 曲线(A)和群落组织与 HNA 细菌相关性(B)

Figure 4 Parelo-Lorenz curve of bacterial community (A) and Correlation of community organization and HNA bacteria (B)

注: UW: 地下水; HR: 海河; PL: 鄱阳湖; PEC: 理想均匀曲线。

Note: UW, HR, PL and PEC indicate underground water, Haihe River, Poyang Lake and perfect evenness curve respectively.

参 考 文 献

- [1] Wang YY, Hammes F, Boon N, et al. Quantification of the filterability of freshwater bacteria through 0.45, 0.22, and 0.1 μm pore size filters and shape-dependent enrichment of filterable bacterial communities[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(20): 7080-7086
- [2] Wang YY, 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
- [3] Wang YY, Hammes F, Düggelein M, et al. Influence of size, shape, and flexibility on bacterial passage through micropore membrane filters[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(17): 6749-6754
- [4] Liu J, Li L, Wang YY. Distribution and ecological role of small bacteria in aquatic environments—a review[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(10): 2100-2111 (in Chinese)
刘杰, 李蕾, 王莹莹. 水环境中微小细菌的分布及生态作用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(10): 2100-2111
- [5] Hahn MW. Broad diversity of viable bacteria in 'sterile' (0.2 μm) filtered water[J]. *Research in Microbiology*, 2004, 155(8): 688-691
- [6] 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
- [7] Young KD. The selective value of bacterial shape[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(3): 660-703
- [8] Wang YY, 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
- [9] Yu H, Ma LL, Mao GN, et al. Fast and safety detection of drinking water in respect of microbial quality[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(8): 1171-1178 (in Chinese)
余辉, 马丽丽, 毛冠男, 等. 饮用水微生物的安全快速检测[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(8): 1171-1178
- [10] Tu T, Li L, Mao GN, et al. Analysis of bacterial diversity in the Songhua River based on nested PCR and DGGE[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(11): 3505-3515 (in Chinese)
屠腾, 李蕾, 毛冠男, 等. 利用细胞计数手段和 DGGE 技术分析松花江干流部分地区的细菌种群多样性[J]. *生态学报*, 2012, 32(11): 3505-3515
- [11] 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
- [12] La Ferla R, Lo Giudice A, Maimone G. Morphology and LPS content for the estimation of marine bacterioplankton biomass in the Ionian Sea[J]. *Scientia Marina*, 2004, 68(1): 23-31
- [13] Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. HJ 494-2009 Water Quality—Guidance on Sampling Techniques[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2009 (in Chinese)
中华人民共和国环境保护部. HJ 494-2009 水质采样技术指导[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2009
- [14] Lautenschlager K, Boon N, Wang YY, et al. Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition[J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 4868-4877
- [15] Liu J, Gao GH, Wang YY. Impact of different land practice on soil microbial community in Tianjin[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2014, 47(6): 45-52 (in Chinese)
刘杰, 高广海, 王莹莹. 天津地区不同土地利用方式对土壤微生物群落的影响[J]. *南开大学学报: 自然科学版*, 2014, 47(6): 45-52
- [16] 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
- [17] Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, et al. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1571-1581
- [18] American Society for Testing and Materials. F838-05 Standard test method for determining bacterial retention of membrane filters utilized for liquid filtration[S]. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2005
- [19] Chandler FW Jr, Clark JW Jr. Passage of *Treponema pallidum* through membrane filters of various pore sizes[J]. *Applied Microbiology*, 1970, 19(2): 326-328
- [20] Rubin SJ, Perlman S, Ellinghausen HC Jr. Isolation of *Leptospira biflexa* from commercially prepared deionized water labeled "sterile for tissue culture"[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1980, 12(1): 121-123
- [21] Fedotova AV, Serkebaeva YM, Sorokin VV, et al. Filterable microbial forms in the Rybinsk water reservoir[J]. *Microbiology*, 2013, 82(6): 728-734
- [22] Haller CM, Rölleke S, Vybiral D, et al. Investigation of 0.2 μm 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
- [23] 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
- [24] Isaac L, Ware GC. The flexibility of bacterial cell walls[J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1974, 37(3): 335-339
- [25] Anderson JIW, Heffernan WP. Isolation and characterization of filterable marine bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1965, 90(6): 1713-1718
- [26] Button DK, Robertson BR, Lepp PW, et al. A small, dilute-cytoplasm, high-affinity, novel bacterium isolated by extinction culture and having kinetic constants compatible with growth at ambient concentrations of dissolved nutrients in seawater[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11): 4467-4476
- [27] Williams TJ, Ertan H, Ting L, et al. Carbon and nitrogen substrate utilization in the marine bacterium *Sphingopyxis alaskensis* strain RB2256[J]. *ISME Journal*, 2009, 3(9): 1036-1052
- [28] Giovannoni SJ, Tripp HJ, Givan S, et al. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium[J]. *Science*, 2005, 309(5738): 1242-1245