

分子世界里的海洋微生物生态学——未来的发展趋势

李秋芬 译 唐启升 校

(农业部海洋生物资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

原著 David A. Caron

(Department of Biological Sciences, University of Southern California, 3616
Trousdale Parkway, AHF 301 Los Angeles, CA 90089-0371, USA)

摘要 过去几十年中,遗传学和免疫学方法的进步改变了医学和生物制药学的研究。人类和几种模式生物的基因组已全部完成测序,这一遗传学信息财富的初步开发已经开始引起对这几种生物的研究及由此产生的应用的革命。得益于生物医学领域的技术进步带来的巨大便利,对微生物(包括海洋微生物)生态学的理解也紧随其后。通过这些新方法、新技术的应用,海洋微生物生态学已经从20世纪50、60年代海洋生物学和生物海洋学的小脚注变成了我们对海洋的兴趣焦点。在过去的半个世纪中,我们学到了大量关于海洋中微生物的丰度、分布和活性的知识。由于认识到海洋微生物异常丰富的多样性、它们在全球生物地球化学过程中所起的主导作用以及天然和工程微生物产品给人类带来益处的潜力,它们已成为科研和公众关注的中心,而且人们对这些海洋中微小生物的迷恋也不会迅速消退。最新的研究表明,我们对海洋生态系中微生物多样性广度的了解相当有限,而且,自然界中许多、或者说大多数海洋微生物的优势种还没有被引入实验室培养。因此,我们对这些物种的生化、生理和行为能力的认识还是懵懂的,并且,在可预见的未来,海洋微生物研究还将是海洋科学研究的主要焦点。随着很多领域的研究者转向这项工作,我们可以期待海洋微生物群落组成和功能方面将会有更多的新发现和范例出现。

关键词 微生物生态学 细菌 原生物 生态基因组学 分子分类学

中图分类号 Q178.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2007)06-0083-14

Morine microbial ecology in a molecular world: what does the future hold?

LI Qiu-fen (Translation) TANG Qi-sheng (Proofreading)

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

David A. Caron (Author)

(Department of Biological Sciences, University of Southern California,
3616 Trousdale Parkway, AHF 301 Los Angeles, CA 90089-0371, USA)

ABSTRACT Advances in genetic and immunological approaches during the last few decades

山东省博士后科研项目专项经费资助

收稿日期:2007-02-09;接受日期:2007-04-02

作者简介:李秋芬(1969-)女,副研究员,在站博士后。主要从事海洋微生物生态学及环境微生物研究。E-mail:liqf@ysfri.ac.cn,

Tel: (0532)85836341

have transformed medicine and biomedical research. The human genome and the genomes of numerous model organisms are now fully sequenced. Initial exploitation of this wealth of genetic information has begun to revolutionize research on these species, and the applications derived from it. Progress in understanding the ecology of microorganisms (including marine taxa) has followed closely on the heels of these advances, owing to the tremendous benefit afforded by major technological advances in biomedicine. Through the application of these novel approaches and new technologies, marine microbial ecology has moved from a minor footnote within marine biology and biological oceanography during the 1950s and '60s to the focus of much of our present interest in the ocean. During the intervening half-century, we have learned a great deal regarding the overall abundances, distributions and activities of microorganisms in the sea. Recognition of the extraordinary diversity of marine microbes, the predominant role that they play in global biogeochemical processes, and the potential for natural or engineered microbial products to benefit humankind, has placed marine microbes in the spotlight of both scientific and popular attention. Our fascination with these minute denizens of the ocean is not likely to wane anytime soon. Recent studies have indicated that we still know relatively little about the breadth of microbial diversity in marine ecosystems. In addition, many (most) of the predominant marine microbial forms in nature have not yet been brought into laboratory culture. Thus, our knowledge is still rudimentary with respect to the spectra of biochemical, physiological and behavioral abilities of these species, and the study of marine microbes will remain a major focus of investigations in marine science well into the foreseeable future. As a large cadre of researchers moves headlong into this work, we can expect many new discoveries and more paradigm shifts regarding tile composition and marine microbial communities.

KEY WORDS Microbial ecology Bacteria Protists Ecogenomics
Molecular taxonomy

1 引言

1.1 一个现代典范的进化历程(The evolution of a modern paradigm)

海洋微生物学研究正在经历一个暴发式增长和快速变革的时代,这是由这些生物在能量流动和物质循环过程中所起的中心作用所决定的,也是一个过去 1/4 世纪中随着我们在海洋中的微生物群体的丰度、分布、活性方面知识的增加而逐渐得出的结论。直到 20 世纪 70 年代,海洋微生物研究还是基础性的,如建立海水中高丰度细菌的重要性、微型浮游植物在初级生产者中的主导地位、以及异养单细胞真核生物(异养原生动物)作为微食物环的连接者、分解者和营养盐再矿化者的重要作用。那时,典型的海洋生态系统数学模型还没有将微生物作为食物链的主要因子之一。但是,这种状况在接下来的几年里发生了戏剧性的变化,这开始于 Pomeroy 1974 年写的一篇关于海洋微生物生态学的会议综述文章,它修正了人们那时对微生物在海洋生态系统中的生态作用的认知。

20 世纪 70~90 年代,显微术的进步和新的可视技术的应用,为拓展 Pomeroy 提出的范例提供了宝贵的信息,如流式细胞术的应用、放射性物质作为示踪物检测海洋食物网内部物质和能量的流动途径和速率以及对已培养的细菌和原生生物(微藻和原生动物)的广泛生理学研究。在这些后续研究中,人们建立了部分关于微生物在微食物环中生长、消费和物质循环方面的一些基本模式和界定,在后面几十年中,人们证实了微生物在微

食物环中的许多功能,并对微生物分类单元的生态群或功能群的活力有了更清晰的理解。这个盒子模型法对把微生物种群和其他海洋分类单元归放在一起很有用。其中的各种概念也随着新发现和认识而不断精确。

随着新技术和新方法的开发和应用,微生物生态学的新发现和突破不断呈现。这是因为这个领域有强烈的技术依赖性,如落射式荧光显微镜应用于天然水样的检测,帮助建立了细菌在海水中具有高而稳定的丰度的观点,后来的图像分析技术在个体大小和生物量方面提供了更多的信息。另外,在发现球形蓝细菌,如聚球蓝细菌,是世界海洋中普遍存在种群的过程中,落射式荧光显微术起了关键作用,它还延伸到 $2\sim 20\ \mu\text{m}$ 大小的原生动物和小于 $0.2\ \mu\text{m}$ 的病毒的研究。天然或替代的荧光标记的被捕食者在检测吞食性原生动物的摄食活性中的应用,为建立微生物消费者中的主要营养关系起了建设性的作用,在许多原生物种群中鉴定混合光合营养/吞蚀营养方面也是如此。这些发现中的每一项都有助于提高我们对天然水体中特定种类微生物的多样性、活生物量及动力学的理解,并迫使我们改变浮游生物群落内碳和能量流动的已存在模式。

1.2 原核生物方面的最新进展

从20世纪80年代中期到90年代初,分子生物学领域的手段和方法开始被用于浮游微生物天然群体多样性的调查,这些早期的研究主要集中于自由生活的细菌。这之前,这些细菌群落的组成只能通过从天然海水样品中分离和培养的菌株获知。遗传学手段第一次使天然微生物群落的分析摆脱了实验室富集和培养可能引起的潜在选择。伴随或跟随着这些细菌群落组成基本特征的描述和单细胞探针技术的应用,天然海水样品中单个细菌细胞的系统分类第一次得以实现。

这些早期研究立即改变了传统的对原核生物多样性广度的界定和海洋中大多数具有重要生态学意义的类群的定义。出乎意料的是,证明了天然细菌类群是由目前未被培养的一些海洋细菌类群(16S rDNA序列)组成的。这一发现向当时的传统观点,即保藏的菌种代表了天然细菌群体的真实多样性提出了挑战,并引起人们对根据已保藏菌株的生理学信息来预测海洋中细菌过程发生的作用产生了怀疑。不出所料,这些发现孕育了一个培养手段的新时代,即培养“不可培养”海洋细菌的时代。

对原核生物的遗传学分析还带来了其他令人惊奇的发现,20世纪90年代初的基因序列系统发育分析表明那些以往仅仅与细菌有关的微生物类群具有广泛发生性,并且支持所有生物的“三域说”。后面的研究出人意料地证明了世界海洋中古菌具有很高丰度。更近几年,如蛋白视紫红质(Proteo-rhodopsin)这样非常特殊的化合物的普遍存在,以及如好氧性不产氧光合作用这样原核生物类群中生理多样性广泛发生的可能性,已经激发了人们对海洋中许多微生物基本营养模式进行重新评价的热情。

1.3 真核生物方面的最新进展

DNA序列信息同样也在真核微生物学(原生物)方面做出了卓越的贡献。历史上,都是在细胞形态特征的基础上描述原生物的种(一般大小和形状、鞭毛/纤毛、色素、矿化结构等)。直到现在,形态学在种类鉴定上还保持着“金标准”的地位。但是,它的确有缺点,例如微小的原生物通常只有很少的典型形态特征可用来进行种的鉴定(如很多种都小于 $10\ \mu\text{m}$),而有些类群有可变的或不固定的大小和形状,还有许多类群具有不同形态的多个生命阶段。正是这些局限性和复杂性证明了遗传学分析是分类的有用补充工具,它也有助于在原生物中建立进化关系,尤其是在缺乏足够的形态学特征,或面对易误导的和模棱两可的形态特征引起矛盾之时。

虽然第一次应用分子生物学手段研究天然原生物群体,较研究细菌和古菌群体的特征要晚,但前者的研究增长很迅速,并且在我们对原生物群落结构的理解上,同样带来了显著的变化。除了上面提到的种类鉴定上的困难,遗传学分析还为克服传统分类学的困难提供了一种可能的途径,因为为显现那些诊断用的分类特征,复杂的采样、固定和染色程序阻碍了生态学家试图描述天然原生物群体的组成。

最近,运用核糖体小亚基RNA基因(18S rDNA序列)的真核微生物多样性调查报道了以前没有记载的巨大的多样性。许多从环境样品中获得的序列都是目前收集的培养物中所没有的新类群,有些类型可能还代表门或界水平上的新多样性。而且,真核微生物群落结构是很复杂的,有很多与环境条件有关的特殊类型。这些

发现激发了人们进一步研究这些类群的特征,并希望把它们引入实验室进行培养,一种类似于用新方法培养“不可培养的”细菌的努力。

分子生物学手段用于原生生物生态学,除了进行多样性分析,一个主要聚焦点是获取感兴趣物种的准确和定量信息。尽管对天然原核生物群体的分子生物学分析主要集中在群落水平,但是原生生物的个体生态学研究也受到了和群落多样性同等的关注。鉴定具有生态学、经济学或人类健康意义的物种的遗传学方法开始出现了,包括研究有毒赤潮藻、潜在人类病原、尚未培养的微型真核生物和那些自然界中有重要生态学作用物种的方法。

综合起来讲,20 世纪末和 21 世纪初期间这些应用分子生物学方法尝试研究海洋微生物群落结构的最新发现,已经带来了这个领域的完整循环,回到了一个多世纪前海洋学经历的“发现阶段”。19 世纪末,海洋学早期的探索大部分是描述性的,描述新渔网和浮游生物网拖到的样本中发现的新物种和对海洋生态结构的新认识。尽管远超过它的“婴儿期”,但是,微生物生态学今天仍在重复那种模式,利用现代分子生物学工具探测微生物多样性的深度,对这些多样性的意义建立功能上的理解,并把这一信息放入更大的海洋生物学和生物地球化学的框架中。在这做这些的过程中,微生物生态学从海洋研究前沿的影子中清晰地走了出来。

2 海洋微生物生态学的光明前景

预测一个高度活跃的科学领域的未来,是极愉快又冒险的做法。因为它的进程通常是非线性的,研究方向也会经常迅速改变。据说,在宽广的海洋微生物生态学领域中,一些通用性的轨迹(或者说突破)已在此时显现。正如人类基因组的测序为生物医学一些明显的研究方向确定了发展进程,同样,遗传学手段在海洋微生物研究中的应用也为我们对这些生物如何发挥功能、如何与海洋中其他微生物相互作用的上的突破确定了发展进程(图 1)。

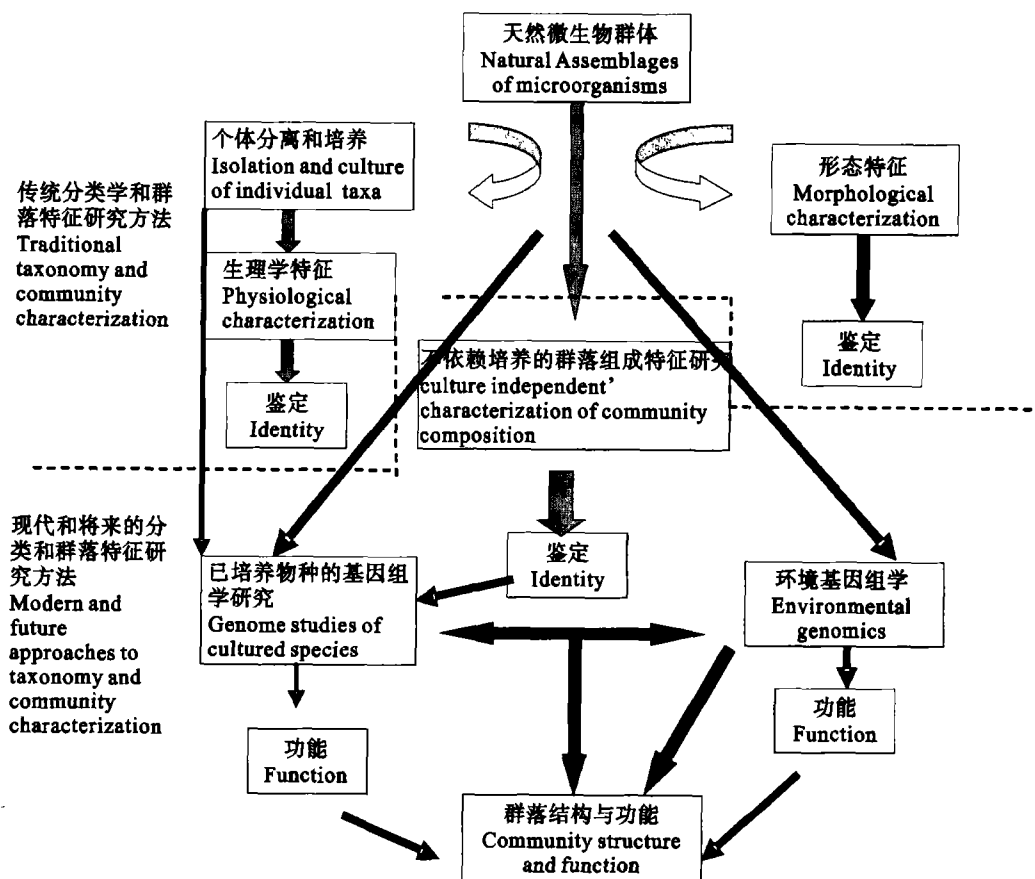


图 1 分子世界里的海洋微生物群落分析流程

Fig. 1 Marine microbial community analysis in a molecular world

2.1 “-omics”革命(The ‘-omics’ revolution)

最近几年,高通量的DNA测序能力正在以令人眼花缭乱的步伐发展。当获得任何已知生物的序列信息变得很容易时,序列数据库就会迅速膨胀。现在,测定一个个体生物的基因组完整序列所要求的时间已经缩减到了几天。另外,宏基因组数据库(Metagenome (environmental) data)已开始收集各种各样的海洋生态系统中的基因组信息。基因组潜力的下游表达,也会被进一步加入到关于微生物的能力和活性的数据中,也使解释微生物基因组遗传学潜力的过程变得更复杂。这些无限大量的信息既诱人又具有淹没性。我们已经到了收集数据的能力超过正确解释它的能力的地步。因此,在最近的将来,获得发现的一个途径就是找到分析无法计量的信息的有效手段,以及设计方法来应用那些信息获取关于微生物群落如何构建和如何发挥功能的知识。

2.2 针对分类单元的基因组学(Taxon-directed genomics)

在过去10年间,对已培养微生物的测序工作在以呈指数增长的态势进行。目前,有几百个基因组已完成或正在进行测序。最近完成测序的物种中,有许多是原核和真核的海洋微生物类群。按这个进度,好几百个已培养微生物的基因组测序将在下一个10年完成,并且这些信息可从科学机构获取。由于对这些物种的研究尚处于初始阶段,我们只能把推测某一范例转变的可能性来作为这些从基因组中挖掘出来的信息的结果。然而,从这些数据库中还是采集到了一些“具有一定可信度的结果(Low-lying fruit)”。例如,这些研究揭示了细菌和真核浮游植物中存在没预料到的代谢能力、海洋蓝细菌对不同光合营养类型的独特适应能力以及绿球蓝细菌*Prochlorococcus*的基因组大小在进化和生态学上的可能影响等。由此看来,这个领域的研究是没有止境的,我们对超过1/4的已测序基因的功能还是一无所知的。但这种状况将来必会有所改变。

个体分类单元的基因组学有希望使我们真正理解周围环境对微生物活力的影响。一个天然微生物基因组中所包含的遗传学潜力没必要等同于已经认识到的活性或功能,但它是源头,认识到这一点很重要。结合基因芯片(Macro/microarrays)这样利用基因组学信息的手段,可以审视天然或人工条件下的细胞或群落。这些手段将把实验带入生态学或生理学研究,这是理解微生物与其物理、化学和生物环境相互作用的一个重要工具。把微生物放入不同环境条件下的操纵性研究,能让我们理解特定微生物所用的生化路径或生理反应。这个刚刚展露头角的方法学将很快让这些审视发生在活的单细胞上。这种“活在载玻片上(Live-on-a-chip)”的手段在细胞对刺激反应方面,将会提供前所未有的信息。“整个群落”操纵将允许质疑一个天然群落中特定过程的状态和反应。基因组学研究也为设计工程微生物作为生物探头,或指导生物化学过程,如对污染环境的修复铺平了道路。

尽管全基因组测序切实可行和最终令人向往,但它仍然超出大多数实验室的能力。政府和个人对这一任务的支持仍是必要的,许多基因组计划还要等一段时间。完全基因组测序的替代方法正被用来解决这件事,并提供新的高度灵敏的方法来质疑在细胞内部操作的分子过程。已表达序列标志(Expressed sequence tags ESTs)和大块平行标记序列测定(Massively parallel signature sequencing MSPP)和其他刚出现的手段的应用,提供了探索微生物基因功能的可能性。这些手段尤其适用于那些带有很大的基因组还需要很多测序工作的微生物物种。

2.3 针对群落的基因组学(Community-directed genomics)

群落水平的基因组学研究无疑将花费大部分时间来完全解决,但也会获得目前还无法完全预测的好处。一些间接发现目前还是适当和必要的,因为毕竟我们对天然微生物群落的整个组成还知之甚少。当前正处于起步阶段的宏基因组计划(Metagenomic programs)(也称之为生态基因组学‘ecogenomics’或环境基因组学‘environmental genomics’)以评价一个生态系统中微生物遗传学多样性为突出目标概括了这一方法。大多数微生物的宏基因组学研究看起来还缺乏明确的重点和方向。那意味着现在正处于观察阶段而不是评价阶段,这其中部分原因是,我们还没有针对多数生态系中微生物多样性的范围或者这个多样性对整个群落功能重要性的正确评价的事实。由于许多海洋微生物目前还没被培养,因此也没有必要进行基因组测序。欲完全了解

海洋中微生物的遗传多样性的尝试性工作,揭示了令人惊讶的微生物基因阵列(Array),其中有许多基因目前还不知道它们的功能。我们还需要一定的时间才能整合及完全解释这些信息的价值,但是象 Venter 等(2004)这样的基准研究让我们初步看到了一个天然海洋生态系中存在的遗传学能力,并显示出有趣的特色和更明确研究的可能策略。

宏基因组学研究正开始为“整个群落代谢(Whole community metabolism)”展现一个画卷(Picture)。最近有人列出了可能实现的巨大潜力和全面探索基因组学信息必须克服的一些障碍,包括数据管理、提取信息的计算机工具问题,以及如何把基因组学和生态学信息耦合起来的重要问题。而且,值得注意的是,一个群落内部进化发生是在“种”的水平上,而不是“群落”水平上。在宏基因组学研究中有一种倾向,即把一个群落中的总基因组信息当作一个巨大的实体,从中可以任意选择基因和过程。但是,群落水平的手段不能脱离一个事实,即“种”是功能上的生态学单位。

除了这些宏基因组学上的艰难努力,评价天然微生物群落的结构以及它们如何对环境压力做出反应的更多较容易的尝试现在正被充分利用。在这些研究中,主要用了两种方法来研究群落结构的特征,单基因测序(通常是 16S 或 18S)和扩增 DNA 的片断分析。两种方法的 DNA 都是直接从环境样品中提取的。这些不依赖培养的方法至少可以提供 3 个功能,首先它们为分析一个生态系系统发育多样性的谱型(一个还知之甚少的特征)提供了一个切实可行的方法(考虑到实际测序的费用)。其次,通过提供特定时间和地点的群落组成,使微生物群落的比较实验研究得以进行,进而提供了一个方法来调查群落组成对生物或非生物因子变化的反应。第三,假设一个特定的方法能提供微生物中存在的分类学信息,那么这些方法为分类学/系统发育学提供了框架,基于此就可以把天然群落宏基因组学研究产生的遗传学信息串联起来。

rRNA 基因的克隆和测序已经成了评价海洋细菌、古菌和原生动物的天然群体多样性的一个相当普遍的方法。因此,这一方法已在原核生物(16S)中得到广泛应用。但是,它在真核生物(18S)中的应用显示,关于整个微生物类群还有很多有待我们学习。由于测序费用高、劳动密集,克隆/测序技术在微生物群体的比较试验研究中较少用到。但是它在微小真核生物天然群体研究中的应用已经表明,经过短期培养和对浮游食物链扰动作出反应期间,群体组成会发生戏剧性的变化。

核酸片段扩增和扩增产物混和物的片断分析已经成为微生物群落比较研究更流行的方法。包括末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)自动化核糖体基因间隙分析(ARISA)和扩增核糖体 DNA 限制性分析(ARDRA)等在内的各种各样的方法,已被用于各种生态系的原核和真核微生物群体。这些方法的优势在于研究者获得一个微生物全体群落水平信息的速度,它可使研究微生物群落结构随环境因子变化而变化时,不同群落或处理之间能进行比较。尽管片段分析方法通常缺乏序列信息提供的答案,但是,相对低廉的成本和评价更大量样品的能力使它们成了将来海洋微生物生态学研究的一个有用工具。

2.4 微生物多样性和分子分类学(Microbial diversity and molecular taxonomy)

来自海洋微生物的大量序列信息的出现,不但使群落结构和功能的研究能够进行,而且使分类学描述也得以进行。微生物类群中存在的保守基因序列,为分子分类学提供了潜在的“签名”,那将比培养(细菌)和形态学(原核生物)的传统分类方案具有不寻常的更大的可行性。DNA 序列已经很快被科学委员会采纳,作为描述细菌和古菌种的代表,因为这些类群现在还不能培养,因此也不能进行生理学检验。这项工作的黄金标准已经并将继续是核糖体 DNA(通常是 16S)。因为真核生物分类学长期基于形态学,分子分类学在真核生物群落的分类中的应用相对较少。但是,rRNA 基因序列现在正在被常规地应用,作为系统发育学分析中一个附加的分类学特征,也作为一个公认的分类学特征来设计天然群体中真核生物种快速鉴定和定量技术(如荧光原位杂交,实时定量 PCR)。

我们有许多理由来发展微生物种的分子分类学。如上面提到的,许多古菌和细菌还没有得到培养,提供的有用的形态学细节也很少。应用序列信息对这些类群进行组织和分类是一个符合逻辑的手段。对原核生物来说,以形态学为基础的分类学专门技术正在逐渐衰落。因此,DNA 分类学有望保留这些重要种类的重要分类学信息。DNA 序列也能够鉴定原核生物种形态不同的生命阶段,如已经建议的一种腰鞭毛虫 *Pfiesteria piscicida*。

cicida, 和区分一些含义模糊的物种, 如已经提到的一些浮游有孔虫类。这样, 分子分类学将会包括那些依赖生物分类学信息研究群落而并不是分类学专家的研究者, 如生态学家、生理学家。最后, 种类鉴定的遗传学手段比传统分类方案最终将更容易实现自动化。这样可大大提高评价天然样品中微生物群落结构的速度。这一方法有望跟“生物条形码联盟(Consortium for the Barcode of Life)”这样的计划相媲美, 后一计划是为了建立以细胞色素氧化酶 1 为选择基因, 为地球上的后生动物分门别类的分子分类学而产生的。

根据单个基因进行分类或系统发育分析的缺点是众所周知的。例如, 水平基因转移会混淆分类单元内的关系。这点虽然不能否定定义分子分类学的基本前提, 但是包括更多的基因来建立分类学(甚至一些全基因组的评价)会最终提供一个更满意的方案。综合来自许多保守基因的信息应该能增加分子分类学的力量(可信度)。

海洋微生物分子分类学的可获得性使相当多的研究重点得以向前发展。DNA 序列的巨大数据库大大推动了基于序列来设计方法鉴定和定量天然微生物群体中的靶生物。分子分类学也使基因芯片得到发展。利用它, 微生物群落中的大量组成部分可以同时被测定。这种“系统发育片(Phylochips)”, 对微生物生态学研究 and 快速判定感兴趣的物种存在与否, 具有建设意义。

值得注意的是, 根据序列信息对微生物分类单元重新定义, 并不能解决单细胞生物种的概念上的难题。大多数微生物学家看起来喜欢生态学上的物种概念, 但是, 关于多数微生物的生态位特征, 我们知道得还很少, 这使得这种定义目前还是不可行的分类学。然而, 基于 DNA 的分类学, 将使生物学家可以结合序列定义和传统分类特征来设计方案, 使某一特定目的或问题的解决达到理想的水平。

2.5 菌种保藏的扩充和开发(Expansion and exploitation of culture collection)

可以预期, 在未来几年间, 海洋微生物的菌种保藏将因科学和应用的原因得到前所未有的发展。建立培养的现实原因是, 培养是基因测序的先决条件。一个更基本的原因是, 培养保持着微生物物种生理学和生物地球化学活性研究的基本机理。从自然界不容易获得机理性的数据, 而高度控制的实验室环境允许仔细、系统地检测环境变化对生长和行为的影响。

通过不依赖培养的方法对天然群落进行调查, 我们认识到还有好多海洋微生物没有被培养, 这激发了人们努力将更多微生物带入培养。通过流式细胞仪的细胞分类、其他高通量技术以及高倍稀释培养基(比过去用的高营养培养基更接近自然环境)等新手段, 将大大增加分离和培养新微生物的成功率。另一个对将来试图培养的有利之处是, 大量为各种各样海洋生态系收集的宏基因组学数据。这些努力将会帮助确定那些真正代表天然生态系优势种的微生物的生理学能力和局限性。宏基因组学无疑将提供线索来帮助培养那些“不可培养”的种类。

反过来, 新海洋微生物的培养物, 将被基因组学手段用来理解它们的生理学和生态学, 至于理解的复杂水平, 目前还只能想象。到目前为止, 生理学研究还是应用简单的实验方法来理解生长的基本参数(如元素组成、营养、生长效率等)。这些研究试图构建微生物种群内部或之间的食物网结构、能量流动和物质循环的大体原理。基因组学信息的应用将能够在全新的水平理解驱动微生物个体生理的能力、限制和力量, 芯片将允许在不同的条件下考察微生物。这样不但可以观察到这些种的外部反应, 而且也能搞清这些反应的内在遗传学和生化原理。

科学上早已认识到菌种保藏的价值, 但是很显然, 政府基金机构现在才理解了资助菌种保藏的价值, 目前可以获得充实的资金来支持和扩展海洋菌种保藏。在科学委员会内部有一个强烈的愿望, 就是将证明材料(包括活的和冷冻的)存入公共菌种保藏中。令人高兴的是, 这也刺激了那些现在还没有在过程中存活下来的种的冷冻保存方面的工作。很明显, 私人企业现在也认识到了自然界中存在的尚未使用的微生物多样性中蕴含的潜在价值, 而成了培养新微生物的积极参与者。

2.6 微生物群落的剖析(和构建)(Dissecting (and constructing) microbial communities)

过去几十年中, 微生物学在技术和计算机化方面的进步是令人震惊的, 而且在以后几十年内也会同样显

著。我们进入了一个可以开始提出和回答最基本和持久的问题的时代,从300多年前微生物被Antonie van Leeuwenhoek观察到开始,微生物学家就在思考的问题,即这个巨大的看不到的群落真正的多样性是什么样的?是什么维持着它的多样性?自然界微生物的进化关系如何?微生物是全球分布的还是存在地方性分布特点?微生物间的进化关系是如何形成的以及它们如何维持?一个微生物群落功能的稳定性和/或弹性是否与群落的多样性有关?面对环境改变时,微生物群落功能的局限性是什么?群落如何适应这种变化等。

随着新的分子生物学手段和技术逐渐展现在我们面前,回答这些和其他的基础问题终于变得可行。例如,大型和微型生物之间的共生关系虽然已经被记载好多年了,但直到最近,我们才开始通过基因组学、蛋白组学、生物工程和生化来理解微生物共生体和它们宿主间关系的分子基础。实验手段已发展到开始应用系统模型理论化和测试影响微生物进化的过程。而且,由于实验数据受益于计算机化生物学进步,模型驱动的生物发现正在迅速成为分子生物学的主体,它产生的数学模型可以预测复杂生物学过程的结果并为后续研究提供可供验证的理论。这种还原学手段集中于剖析物种之间复杂的相互作用和环境条件对物种进化的影响。

另一方面,试验性地检测群落生物多样性和它的生物地球化学功能、稳定性及弹性之间关系的尝试,主要集中于理解复杂物种群体的应急机制。这个领域现存的许多理论来源于理论生态学,支持证据来自经验主义观察和大型生物群落实验操作得来的理论。然而,微生物是此类研究的非常好的实验载体,因为个体的微生物种和整个群落都容易被囊括和操作。可以想象,在不久的将来,我们就可看到一个由许多营养类型和多种营养层次构成的微生物“人工群落”。这些群落可以用来实验性地测试关于群落多样性和对环境压力的稳定性和弹性特征的理论。组成这种群落的类群的基因组学信息将会有助于深刻洞察影响这些关系的因子。

2.7 在自然界中的应用:监测微生物世界(Applications in nature: Monitoring the microbial world)

水生微生物生态学研究的一个长期目标就是实时、实地测试这些物种的丰度、分布和活性。这种能力对监测那些具有生态功能和公众健康意义的菌种(如人类致病菌、有毒赤潮藻)是必需的,对试图阐明刺激或促进这些物种生长的因子的实验研究得以进行也是必要的。尽管这种情况对海洋中的物理和化学特征已成为现实,但是进行微生物现场快速测定的生物探头的发展还明显滞后。

定置浮标(Moored buoys)、遥控潜水器(Remotely operated vehicles)和自动潜水器(Autonomous vehicles)是现代海洋科学的必备和常用工具。对生态恒久因子,如温度、压力、光、盐度、溶解氧及各种营养盐离子的高精度测定已经开始提供自然界中这些变化的大体情况。卫星成像也在大尺度描写海洋表面特征(有些具有生物学意义)能力方面大大加快了步伐。相反,仅有屈指可数的设备可以对微生物进行有意义的现场和接近实时的测定。

开发这些设备的障碍并不是微不足道的。大多数生物学测定要求多个前处理步骤来测定微生物的种类和丰度。这些测定要求仪器精确并需要能源(如,他们要求小心保存样品和控制温度,如果涉及到PCR扩增DNA,甚至还需要温度循环)。要测定低丰度的某些目标生物,还需要通过过滤或其他方法进行样品的上游浓缩,这就需要额外增加能源。下一代的生物探头需要工程师和分子生物学家密切配合,来使期望变成现实。

然而,我们还是可以期待在不久的将来生物学仪器的开发会有显著的进展,并不仅限于生物探头开发领域,还有配置探头的领域及应用它获得信息的领域。目前海洋仪器的着眼点在于生产和配置少量很复杂的仪器,从它进行外推来表现整个生态系统的生物学。尽管这个方法比较适合某些水平的问题(如,大尺度的环境变化及他们对于一个生态系统生物学的一般影响),但是,大多数生物学过程所受驱动的因子和力量,比现在配置的多数仪器所能测定的空间和时间尺度要小。为了更有效地监测微生物类群和从生态学角度理解决定他们存在与否的因子,有必要在更小的尺度上研究它们。

这样,可以预想,将来会有很多相对便宜、自动化、可联网工作的仪器或车辆,它们可以单独测量、在网络中实时或接近实时地集合生物学、化学和物理学数据,得出人类对更复杂、更昂贵的仪器的反应和行为。这些仪器和探头正在变为现实。按这个进程,接下来应该是合并多种设计的生态基因组学探头。这些方法无疑将包括用微型/大型芯片(系统发育芯片)来检测普通微生物类群存在与否及其丰度,还包括建立某些特定功能基因的存在、多样性和活性。

这个新生代的现场测量仪器,对我们理解微生物的分布、作用过程和控制它们的因子是有深远意义的,其实际应用也是切实可行的。饮用水供应的实时监测、潜在致病微生物对游泳海滩污染的监视、对养殖和休闲/商业渔业病原菌和产毒素藻类暴发的仔细审查,在联邦和州政府的日程上是高度优先的。遗传学信息的现场应用是非常急需的。随着这些设备被设计、开发和精制,这一领域将会继续得到迅速发展和进步。

3 结论

海洋微生物生态学已经迅速从20世纪50、60年代海洋学的一个很不重要的“小注脚”位置变成了海洋科学的一个关键领域及尖端生物学和环境研究的焦点。在不断认识到微生物在海洋生物学和生物地球化学中的中心作用及微生物学和分子生物学方面重大突破等的推动下,我们正站在这一领域快速增长期的起点。而且,这些物种物理和遗传操作上的便利性,使它们成了基础生物学多方面研究的理想候选者。最大的困难是,每一个研究人员都必须跟上这一领域多学科交叉的现实及知识和技术不断更新的步伐。无疑,这将是一个激动人心和有益的挑战,也是下个10年和以后将见证突出进步的领域。

参 考 文 献

- Almann, R. I., Krümholz, L., and Stahl, D. A. 1990b. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172:762~770
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Micro-biol. Rev.* 59:143~169
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, S. W., Devereux, R., and Stahl, D. A. 1990a. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919~1925
- Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C. A., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S. G., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Oodstein, D., Hadi, M. Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B. D., Jurka, J., Kapitanov, V. V., Kroger, N., Lau, W. W. Y., Lane, T. W., Larimer, F. W., Lippmeier, J. C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, P., Parker, M. S., Palenik, B., Pazour, G. J., Richardson, P. M., Ryneanson, T. A., Saito, M. A., Schwartz, D. C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F. P., and Rokhsar, D. S. 2004. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*; Ecology, evolution and metabolism. *Science*, 306:79~86
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Kteyer-Reil, L. A., and Thingstad, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257~263
- Beja, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P., Jovanovich, S. B., Gates, C. M., Feldman, R. A., Spudich, J. L., Spudich, E. N., and DeLong, E. F. 2000. Bacterial rhodopsin; Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 289:1902~1906
- Beja, O., Spudich, E. N., Spudich, J. L., Leclerc, M., and DeLong, E. F. 2001. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, 411:786~789
- Beja, O., Suzuki, M. T., Heidelberg, J. F., Nelson, W. C., Preston, C. M., Hamada, T., Eisen, J. A., Fraser, C. M., and DeLong, E. F. 2002. Unsuspected diversity among Marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature*, 415:630~633
- Bjgrnsen, P. K. 1986. Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1199~1204
- Blackwood, C. B., Marsh T., Kim, S. H., and Paul, E. A. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:926~932
- Blaxter, M. L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Phil. Trans. Royal. Soc. Lond. B.* 359:669~679
- Bowers, H. A., Tengs, T., Glasgow, H. B., Jr. Burkholder, J. M., Rublee, P. A., and Oldach, D. W. 2000. Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related Dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4641~4648
- Brenner, S., Johnson, M., Bridgman, J., Golda, G., Loyd, D. H., Johnson, D., Luo, S., McCurdy, S., Foy, M., Ewan, M., Roth, R., George, D., Eletr, S., Albrecht, G., Vermaas, E., Williams, S. R., Moon, K., Burcham, T., Pallas, M., DuBridge, R. B., Kirchner, J., Fearon, K., Mao, J., and Corcoran, K. 2000. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature Biotechnol.* 18:630~634
- Burkholder, J. M., Glasgow, H. B., Jr. and Steidinger, K. A. 1995. Stage transformations in the complex life cycle of an ichthyotoxic “ambush-predator” dinoflagellate. In: Lassus, P., Arzul, G., Denn, E., Erard-Le, Gentien, P., and Baut, C. Marcaillou-Le (eds.). Harmful marine al-

- gal blooms. Lavoisier Publishing. Paris, 567~572
- Caron, D. A. 2000a. Protistan herbivory and bacterivory. In: Paul J. H. (eds.), *Marine Microbiology*, 289~315. Academic Press. London
- Caron, D. A. 2000b. Symbiosis and mixotrophy among pelagic microorganisms. In: Kirchman, D. L. (eds.), *Microbial Ecology of the Oceans*, Wiley-Liss. Inc., New York, 495~523
- Caron, D. A., and Finlay, B. J. 1994. Protozoan links in food webs. In: Hausmann, K., and Hiilsmann, N. (eds.), *Progress in Protozoology, Proceedings of the IX International Congress of Protozoology*. Berlin 1993, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 125~130
- Cary, S. C., and Chisholm, S. W. 2001. *Ecological genomics: The application of genomic sciences to understanding the structure and function of marine ecosystems*. University Press, 1~20
- Casper, E. T., Paul, J. H., Smith, M. C., and Gray, M. 2004. The detection and quantification of the red tide Dinoflagellate *Karenia brevis* by real-time NABSA. *Applied & Environmental Microbiology*, 70:4 727~4 732
- Chisholm, S. W., Olson, R. J., Zettler, E. R., Goericke, R., Waterbury, J. B., and Welschmeyer, N. A. 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334:340~343
- Cifuentes, A., Anton, J., Wit, R. de, and Rodriguez-Valera, F. 2003. Diversity of *Bacteria and Archaea* in sulphate-reducing enrichment cultures inoculated from serial dilution of Zostera noltii rhizosphere samples. *Environ. Microbiol.* 5:754~764
- Clark, M. S., Clarke, A., Cockell, C. S., Convey, P., Detrich, H. W., Fraser, K. P. P., Johnston, I. A., Methe, B. A., Murray, A. E., P. Romisch, L. S., K., and Rogers, A. D. 2004. Antarctic genomics. *Comp. Funct. Genom.* 5:230~238
- Cohan, F. M. 2002. What are bacterial species? *Ann. Rev. Microbiol.* 56:457~487
- Coleman, A. W. 2002. Microbial eukaryote species, *Science*, 297:337
- Connon, S. A., and Giovannoni, S. J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3 878~3 885
- Countway, P. D., Cast, R. J., Savai, P., and Caron, D. A. 2005. Protistan diversity estimates based on 18S rDNA from seawater incubations in the western N. Atlantic. *J. Eukaryot. Microbiol.* In press
- Coyne, K. J., Hutchins, D. A., Hare, C. E., and Cary, S. C. 2001. Assessing temporal and spatial variability in *Pfiesteria piscicida* distributions using molecular probing techniques. *Aquat. Microb. Ecol.* 24:275~285
- Dawson, S. C., and Pace, N. R. 2002. Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:8 324~8 329
- de Vargas, C., Norris, R., Zaninetti, L., Gibb, S. W., and Pawlowski, J. 1999. Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifera and their relation to oceanic provinces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:2 864~2 868
- DeLong, E. F. 1991. *Molecular systematics, microbial ecology and single cell analysis*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 237~257
- DeLong, E. F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 5 685~5 689
- DeLong, E. F. 2002. Microbial population genomics and ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:520~524
- DeLong, E. F. 2004a. Microbial population genomics and ecology: a new frontier. In: Fraser, C. M., Nelson K. E., and Read T. D. (eds.), *Microbial Genomics*. Human Press, Microbial Genomics, 419~442
- DeLong, E. F. 2004b. Microbial population genomics and ecology: The road ahead. *Environ. Microbiol.* 6:875~878
- DeLong, E. F., Wickham, F. S., and Pace, N. R. 1989. Phylogenetic stains; Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 243:1 360~1 363
- Derelle, E., Ferraz, C., Lagoda, P., Eychenie, S., Cooke, R., Regad, F., Sabau, X., Courties, C., Delseny, M., Demaille, J., Picard, A., and Moreau, H. 2002. DNA libraries for sequencing the genome of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae): The smallest free-living eukaryotic cell. *J. Phycol.* 38:1 150~1 156
- Diez, B., Pedrós-Alid, C., Marsh, T. L., and Massana, R. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied & Environmental Microbiology*, 67:2 942~2 951
- Downie, J. A., and Young, J. P. W. 2001. The ABC of symbiosis. *Nature*, 412:597~598
- Dtez, B., Pedrós-Alid, C., and Massana, R. 2001. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2 932~2 941
- Ducklow, H. W. 1991. The passage of carbon through microbial foodwebs: Results from now network models. *Mar. Microb. Food. Webs*. 5:129~144
- Ducklow, H. W. 1994. Modeling the microbial food web. *Microb. Ecol.* 28:303~319
- Edgcomb, V. P., Kysela, D. T., Teske, A., Gomez, A. de Vera, and Sogin, M. L. 2002a. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:7 658~7 662
- Edgcomb, V. P., Simpson, A., Amaral, G. B., Zettler, L. A., Nerad, T. A., Patterson, D. J., Holder, M. E., and Sogin, M. L. 2002b. Pelobionts

- are degenerate protist; insights from molecules and morphology. *Mol. Biol. Evol.* 19:978~982
- EI Fantroussi, S., Urakawa, H., Bernhard, A. E., Kelly, J. J., Noble, P. A., Smidt, H., Yershov, G. M., and Stahl, D. A. 2003. Direct profiling of environmental microbial populations by thermal dissociation analysis of native rRNAs hybridized to oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2 377~2 382
- Elena, S. F., and Lenski, R. E. 2003. Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Rev. Genet.* 4:457~469
- Estrin, D., Culler, D., Pister, K., and Sukhatme, G. 2002. Connecting the physical world with pervasive networks. *IEEE Pervasive Networks. IEEE Pervasive Computing Archive*, 1:59~59
- Fasham, M. J. R., Ducklow, H. W., and hlcKelvie, S. M. 1990. A nitrogen-based model of plankton dynamics in the oceanic mixed layer. *J. Mar. Rev.* 48:591~639
- Fenchel, T. 1969. The ecology of marine microbenthos. IV. Structure and function of the benthic ecosystem. its chemical and physical factors and the microfauna communities with special reference to the ciliated protozoa. *Ophelia*, 6:1~182
- Fenchel, T. 1970. Studies on the decomposition of organic detritus derived from the Turtle Grass *Thalassia testudinum*. *Limnol. Oceanogr.* 15:14~20
- Fenchel, T. 1988. Marine plankton food chains. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 19:19~38
- Finkel, S. E., and Kolter, R. 1999. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4 023~4 027
- Fisher, M. M., and Triplett, E. W. 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4 630~4 636
- Flaten, G. A. F., Castberg, T., Tanaka, T., and Thingstad, T. F. 2003. Interpretation of nutrient-enrichment bioassays by looking at sub-populations in a marine bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:11~18
- Francisco, D. E., Mah, R. A., and Rabin, A. C. 1973. Acridine orange epi fluorescence technique for counting bacteria. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 92:416~421
- Fuhrman, J. A., and Suttle, C. A. 1993. Viruses in marine planktonic systems. *Oceanogr.* 6:51~63
- Fuhrman, J. A., McCallum, K., and Davis, A. A. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature*, 356:148~149
- Fuhrman, J. A., McCallum, K., and Davis, A. A. 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1 294~1 302
- Gast, R. J., and Byers, T. J. 1995. Genus- and subgenus-specific oligonucleotide probes for *Acanthamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71:255~260
- Gast, R. J., Dennett, M. R., and Caron, D. A. 2004. Characterization of protistan assemblages in the Ross Sea, Antarctica. By denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2 028~2 037
- Giovannoni, S. J., and Rappe, M. 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Kirchman, D. L. (eds.), *Microbial Ecology of the Oceans*, Wiley, New York, 47~84
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Pivtoyer, C. L., and Field, K. G. 1990a. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345:60~63
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., and Pace, N. R. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide Probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170:720~726
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Schmidt, T. M., and Pace, N. R. 1990b. Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2 572~2 575
- Guillard, R. R. 1973. Methods for micrallagellates and nannoplankton. In: J. R. Stein (eds.), *Handbook of phycological methods-culture methods and growth measurements*, Cambridge University Press, 70~83
- Guillou, L., Chretiennot-Dinet, M. -J., Boulben, S., Moon-van der. Staay, S. Y., and Vaulot, D. 1999a. *Symbiomonas scintillans* gen. et sp. nov. and *Picophagus flagellatus* gen. et sp. nov. (Heterokonta): Two new heterotrophic flagellates of picoplanktonic size. *Protist.* 150:383~398
- Guillou, L., Chretiennot-Dinet, M. J., Medlin, L. K., Claustre, H., Goer, L. d., and Vaulot, D. 1999b. *Bolidomonas*: A new genus with two species belonging to a new algal class. The Bolidophyceae (Heterokonta). *J. Phycol.* 35:368~381
- Habuca, A., Pawlowski, J., Hanes, S. D., and Bowser, S. S. 2004. Unexpected foraminiferal diversity revealed by small-subunit rDNA analysis of Antarctic sediment. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51:173~179
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., and deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. London B.* 270:313~322
- Hobbie, J. E., Daley, R. J., and Jaspar, S. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1 225~1 228

- Hobbie, J. E., Holm-Hansen, O., Packard, T. T., Pomeroy, L. R., Sheldon, R. W., Thomas, J. P., and Wiebe, W. J. 1972. A study of the distribution and activity of microorganisms in ocean water. *Limnol. Oceanogr.* 17:544~555
- Jannasch, H. W. 1966. Growth of marine bacteria at limiting concentrations of organic carbon in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 12:264~271
- Jannasch, H. W., and Jones, G. E. 1959. Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.* 4:128~139
- Jenkins, B. D., Steward, G. F., Short, S. M., Ward, B. B., Jonathan, J. P., and Zehr, P. 2004. Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA microarray. *Applied & Environmental Microbiology*, 70:1767~1776
- Johannes, R. E. 1965. Influence of marine protozoa on nutrient regeneration. *Limnol. Oceanogr.* 10:434~442
- Johnson, P. W., and Sieburth, J. M. 1979. Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Oceanogr.* 24:928~935
- Karl, D. M. 2002. Hidden in a sea of microbes. *Nature*, 415:591~592
- Karner, M., DeLong, E. F., and Karl, D. M. 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 409:507~510
- Kolber, Z. S., Van Dover, C. L., Niederman, R. A., and Falkowski, P. G. 2000. Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature*, 407:177~179
- Koropatnick, T. A., Engle, J. T., Apicella, M. A., Stabb, E. V., Goldman, W. E., and McFall-Ngai, M. J. 2004. Microbial factor mediated development in a host-bacterial mutualism. *Science*, 306:186~188
- Li, W. K. W., Subba Rao, D. V., Harrison, W. G., Smith, J. C., Cullen, J. J., Irwin, B., and Platt, T. 1983. Autotrophic picoplankton in the tropical ocean. *Science*, 219:292~295
- Li, K. W., Dickie, P. M., Irwin, B. D., and Wood, A. M. 1992. Biomass of bacteria, Cyanobacteria, prochlorophytes and photosynthetic eukaryotes in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Res.* 39:501~519
- Lidstrom, M. E., and Meldrum, D. R. 2003. Life-on-a-chip. *Nature Reviews Microbiology*, 1:158~164
- Lim, E. L., Caron, D. A., and Dennett, M. R. 1999. The ecology of *Paraphysomonas imperforata* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment culture. *Limnol. Oceanogr.* 44:37~51
- Lim, E. L., Dennett, M. R., and Caron, D. A. 2001. Molecular identification of heterotrophic nanoflagellates by restriction fragment length polymorphism analysis of small subunit ribosomal DNA. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:247~257
- Lipscomb, D. L. 1989. Relationships among the eukaryotes. In: Fernholm, B., Bremer, K., and Jornwall, H. (eds.), *The hierarchy of life*, Elsevier Science Publishers, 161~178
- Lopez-Garcia, P., Rodriguez-Vajera, F., Pedrós-Alid, C., and Moreira, D. 2001. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, 409:603~607
- Lupp, C., Urbanowski, M., Greenberg, E. P., and Ruby, E. G. 2003. The *Vibrio fischeri* quorum-sensing systems *ain* and *lux* sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. *Mol. Microbiol.* 50:319~331
- Malone, T. C. 1971. The relative importance of nanoplankton and netplankton as primary producers in tropical oceanic and neritic phytoplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* 16:633~639
- Massana, R., Guillou, L., Diféz, B., and Pedros-Alid, C. 2002. Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4554~4558
- McGrady-Steed, J., Harris, P. M., and Morin, P. J. 1997. Biodiversity regulates ecosystem predictability. *Nature*, 390:162~165
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Pivuyzer, C., Winter, C., and Herndl, G. J. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3518~3525
- Moon-van der Staay, S. Y., De Wachter, R., and Vaulot, D. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 409:607~610
- Morhn, A., Buchan, A., Gonzalez, J. M., Heidelberg, J. F., Whitman, W. B., Kiene, R. P., Henriksen, J. R., King, G. M., Belas, R., Fuqua, C., Brinkac, L., Lewis, M., Johri, S., Weaver, B., Pai, G., Eisin, J. A., Rahe, E., Sheldon, W. M., Ye, W., Miller, T. R., Carlton, J., Rasako, D. A., Paulsen, I. T., Ren, Q., Daugherty, S. C., Deboy, R. T., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Madupu, R., Nelson, W. C., Sullivan, S. A., Rosovitz, M. J., Haft, D. H., Selengut, J., and Ward, N. 2004. Genome sequence of *Silicibacteria, pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature*, 432:910~913
- Muvlaert, K., Van der Gucht, K., Vloemans, N., De Meester, L., Gillis, M., and Vyverman, W. 2002. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4740~4750
- Naeem, S., and Li, S. 1997. Biodiversity enhances ecosystem stability. *Nature*, 390:507~509
- Nelson, K. E. 2003. The future of microbial genomics. *Environ. Microbiol.* 5:1223~1225
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, J., and Pace, N. R. 1986. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA Approach. *Ann. Rev. Mi-*

- crobiol. 40:337~365
- Olson, R. J., Chisholm, S. W., Zettler, E. R., Altabet, M. AL., and Dusenberrv, J. A. 1990. Spatial and temporal distributions of I prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.* 37:1 033~1 051
- Olson, R. J., Shalapyonok, A., and Sosik, H. M. 2003. An automated submersible flow cytometer for analyzing pico-and nanonhytonlankton: FlowCytobot. *Deep-Sea Res.* 50:301~315
- Oz, A., Behi, D. G., Koblize, E. M., Massana, R., and Beja, O. 2005. Roseobacter-like bacteria in red and mediterranean sea aerobic anoxygenic photosynthetic populations. *Applied & Environmental Microbiology*, 71 :344~353
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Olsen, G. J., and Lane, D. J. 1985. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *Amer. Soc. Microbiol. News*, 51:4~12
- Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, R., Allen, R. E., hlcCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E., and Waterbury, J. 2003. The genome of a motile marine Synechococcus. *Nature*, 424:1 037~1 042
- Parsons, H., Baden-Tillson, C., Pfannkoch, Y. H. Rogers, and Smith, H. O. 2004. Environmntal genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304:66~74
- Pomeroy, L. R. 1974. The ocean's food web. a changing paradigm. *Bioscience*, 24:499~504
- Popels, L. C., Cary, S. C., Hutchins, D. A., Forbes, R., Pustizzi, F., Gobler, C. J., and Coyne, K. J. 2003. The use of quantitative polymerase chain reaction for the detection and enumeration of the harmful alga *Aureococcus anophagefferens* in environmental samples along the United States East Coast. *Limnology and OceanographyL: Methods*, 1:92~102
- Proctor, L. M., and Fuhrman, J. A. 1991. Roles of viral infection in organic particule flux. *Mar. Ecol Prog. Ser.* 69:133~142
- Rappe, M., and Giovannoni, S. J. 2003. The uncultured microbial majority, *Ann. Rev. Microbiol.* 57:369~394
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., and Handelsman, J. 2004. metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Ann. Rev. Genet.* 38:525~552
- Rocap, G., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N. A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W. R., Johnson, Z. L., Land, M., Lindell, D., Post, A. F., Regala, W., Shah, M., Shaw, S. L., Steglich, C., Sullivan, M. B., Ting, C. S., Tolonen, A., Web, E. A., Zinser, E. R., and Chisholm, W. 2003. Genome detergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424:1 042~1 047
- Rolfe, B. G., Mathesius, U., Djordjevic M., Weinman, J., Hocan, C., Weiller, G., and Bauer, W. D. 2003. Proteomic analysis of legumemicrobe interactions. *Comp. Funct. Genom.* 4:225~228
- Rondon, N. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Ioiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J., and Goodman, R. M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied & Environmental Microbiology*, 66:2 541~2 547
- Rublee, P. A., and Gallegos, C. L. 1989. Use of fluorescently labelled algae (FLA) to estimate milcrozooplankton grazing. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51:221~227
- Ruby, E. G., Urbanowski, M., Campbell, J., Dunn, A., Faini, M., Gunsalus, R., Lostroh, P., Lupp, C., McCann, J., Millikan, D., Schaefer, A., Stabb, E., Stevens, A., Visick, K., Whistler, C., and Greenberg, E. P. 2005. Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:3 004~3 009
- Sanders, R. W. 1991. Mixotrophic protists in marine and freshwater ecosystems. *J. Protozool.* 38:76~81
- Scala, S., Carels, N., Falciatore, A., Chiusano, M. L., and Bowler, C. 2002. Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* 129:1~10
- Schafer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R., Stackebrandt, E., Troussellier, M., Guindulain, T., Vives-Rego, J., and Muyzer, G. 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: Changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34:243~253
- Schlegel, M. 1994. Molecular phylogeny of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* 9:330~335
- Schloss, P. D., and Handelsman, J. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14:303~310
- Scholin, C. A. *et al.* 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, 403:80~84
- Scholin, C. A., Buck, K. R., Britschgi, T., Cangelosi, G., and Chavez, F. P. 1996. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycologia*, 35:190~197
- Sherr, B. F., Sherr, E. B., and FEtllon, R. D. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate ill situ protozoan bacterteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:958~965
- Sherr, B. F., Sherr, E. B., and Hopkinson, C. S. 1988. Trophic interactions within pelagic microbial communities: Indications of feedback_regulation of carbon flow. *Hydrobiologia*, 1 59:19~26

- Sherr, E. B., and Sherr, B. F. 1988. Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. *Limnol. Oceanogr.* 33:1 225~1 227
- Sherr, E. B., and Sherr, B. F. 1994. Bacterivory and herbivory: Key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *Microb. Ecol.* 28:223~235
- Sherr, E. B., Caron, D. A., and Sherr, B. F. 1993. Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy. In: P. Kemp, B. Sherr, E. Sherr and J. Cole (eds.) *Handbook of Methods in aquatic Microbial ecology*. Lewis Publishers. Boca Raton, 213~227
- Sieburth, J. M., Smetacek, V., and Lenz, J. 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23:1 256~1 263
- Sieracki, M. E., Johnson, P. W., and Sieburth, J. M. 1985. Detection enumeration and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:799~810
- Simpson, M. L., Sayler, G. S., Reming, J. T., and Applegate, B. 2001. Whole-cell biocomputing. *Trends Biotechnol.* 19:317~323
- Sims, G. P., Aitken, R., and Rogerson, A. 2002. Identification and phylogenetic analysis of morphologically similar naked amoebae using small subunit ribosomal RNA. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49:478~484
- Sogin, M. L., Elwood, H. J., and Gunderson, J. H. 1986. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Science*, 83:1 383~1 387
- Sogin, M. L. 1989. Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Am. Zool.* 29:487~499
- Sogin, M. L. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1:457~463
- Steele, J. H. 1974. *The structure of marine ecosystems*. Harvard University Press. Cambridge
- Stein, J. L., Manh, T. L., Wu, K. Y., Shizuya, H., and DeLong, E. F. 1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.* 178:591~599
- Sterner, R. W., and Elser, J. J. 2002. *Ecological stoichiometry: The biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press. Princeton. NJ, 584
- Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M., and Breznak, J. A. 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Applied & Environmental Microbiology*. 70:4 748~4 755
- Steward, G. F., Jenkins, B. D., Ward, B. B., and Zehr, J. P. 2004. Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (*nifH*) gene diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1 455~1 465
- Stoeck, T., Taylor, G. T., and Epstein, S. 2003. Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea). *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5 656~5 663
- Stoecker, D. K. 1998. Conceptual models of mixotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implications. *Europ. J. Protistol.* 34:281~290
- Thompson, J. R., Pacocha, S., Pharino, C., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D. E., Benoit, J., Sarma-Rupavtarm, R., Distel, D. L., and Polz, M. F. 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science*, 307:1 311~1 313
- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., and Banfield, J. F. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*. 428:37~43
- Urakawa, H., El FanRoussi, S., Smidt, H., Smoot, J. C., Tribou, E. H., Kelly, J. J., Noble, P. A., and Stahl, D. A. 2003. Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2 848~2 856
- Vall, M., and de Lorenzo, V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:327~338
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D. Y., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, R
- Waterbmy, J. B., Watson, S. W., Guillard, R. R. L., and Brand, L. E. 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine planktonic cyanobacterium. *Nature*, 277:293~294
- Watts, J. E. M., Schreier, S. B., Wu, Q., May, H. D., and Sowers, K. R. 2000. A comparison of DGGE, tRFLP and ARDRA to examine microbial diversity in anaerobic polychlorinated biphenyl (PCB) dechlorinating enrichment cultures. *Abstract of the General Meeting of the American Society for Microbiology*, 100:573
- Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4 576~4 579
- Worm, B., and Duffy, J. E. 2003. Biodiversity, productivity and stability in real food webs. *Trends Ecol. Evol.* 18:628~632
- Zobell, C. E., and Feltham, C. B. 1938. Bacteria as food for certain marine invertebrates. *J. Mar. Res.* 1:312~327