

冬季和春季长江口及其近海水域浮游病毒丰度的分析*

白晓歌¹ 汪 岷¹ 马晶晶¹ 孙 军² 梁彦韬¹ 乔 倩¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 2. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学
重点实验室 青岛 266071)

提要 采用荧光显微技术,对 2006 年长江口及近海水域 20 个站点的表层及 10m 层或潜水体冬、春两季的浮游病毒丰度进行了检测,对浮游病毒丰度在季节(冬、春两季)、水平分布和垂直分布上的变化进行了探讨。调查区浮游病毒丰度在冬、春季节上并无明显差异,但在水平分布上存在很大差异,河口区浮游病毒直接检测量(Virus Direct Count, VDC)达到 10^7 个/ml,近海水域 VDC 为 10^6 个/ml,河口区的浮游病毒丰度都明显高于近海水域病毒丰度($P < 0.01$)。在垂直分布上,冬、春两季长江口水域水深小于 10m 的站位,表层浮游病毒丰度与底层病毒丰度无明显差别,水深大于 10m 的站位,表层水样的浮游病毒丰度都高于 10m 水层病毒丰度,说明长江口浮游病毒的垂直分布与站位总水深有关。还通过比较各站点 VDC 与叶绿素 *a* 含量的数据,分析了二者之间的相关性:冬季浮游病毒丰度与叶绿素 *a* 含量成正相关性;春季浮游病毒丰度与叶绿素 *a* 含量成负相关性,但病毒丰度受叶绿素 *a* 含量的影响仅为 10%—11%。

关键词 浮游病毒, 荧光显微计数, SYBR Green I, 长江口

中图分类号 Q958.885.3

对水体中自然状态下的病毒调查表明,在绝大部分的水体环境中浮游病毒是最丰富的浮游物种。近二十年来,其重要的生态学地位逐渐被人们所认识。大量研究表明,病毒主要由噬菌体(Contreras-Coll *et al*, 2002; Wichels *et al*, 1998)和藻类病毒(Augesti *et al*, 1998; Boehme *et al*, 1993)两大类组成,它在海洋能流、地球物理化学循环、全球气候、种间遗传物质交换以及控制赤潮方面都有着重要影响。Hara 等(1991)首次利用荧光显微计数法检测了日本大阪湾和 Otsuchi Bay 两个湾域中游离病毒的丰度,病毒直接检测量(Virus Direct Count, VDC)为 1.2×10^6 — 3.5×10^7 个/ml,随后,这种方法在国际上被普遍采用,用于水体中病毒丰度的检测。我国水体中浮游病毒的检测研究较少(刘艳鸣等, 2005; Liu *et al*, 2006),主要

集中于武汉东湖湖水。

长江口水域是一个淡水与海水混合的河口地带,蕴藏着丰富多样的生物群落。近年来,随着工农业生产的发展,河口、沿岸水域富营养化程度日趋严重,由浮游植物引发的赤潮频发,长江口及其邻近海域已成为我国赤潮多发区之一,受到国内外学者的广泛关注。在这一生态系统中,海洋浮游病毒的生态效应如何,现在并不清楚,作者利用荧光显微技术检测长江口及近海水域中浮游病毒的丰度及其在冬、春季、水平分布和垂直分布的情况,并通过比较各站点 VDC 与叶绿素 *a* 含量的数据,分析长江口水域浮游病毒丰度与浮游植物之间的关系,以期对长江口生态环境的研究及改善提供基础资料。

* 国家自然科学基金重点项目“长江口水域富营养化特性及对策研究”, 50339040 号;中国科学院知识创新工程重要方向项目“长江口水域富营养化关键过程与机制研究”, KZCX3-SW-232 号。白晓歌, E-mail: baixiao221@tom.com

通讯作者: 汪岷, 博士, 副教授, E-mail: mingwang@ouc.edu.cn, wangmin30@hotmail.com

收稿日期: 2006-06-24, 收修改稿日期: 2006-08-29

1 调查内容与采样

于 2006 年 2 月和 5 月进行冬、春两个季节的调查。在长江口河口区及其临近海域($30^{\circ}30'N$ — $32^{\circ}30'N$, $121^{\circ}00'E$ — $123^{\circ}30'E$)共布设 20 个观测站采集水样进行浮游病毒丰度分布的观测研究(图 1)。各观测站总水深在 7—60m 之间不等,各采样站点用 5L 的 Niskin 采水器采取水样,水深大于 10m 的站位取表层(0.5m)和 10m 水层的水样;水深小于 10m 的站位,则取表层(0.5m)和底层(底上 2m)水样;浅于 5m 的站点只采表层水样。2006 年 2 月份采水样 40 个,5 月份采水样 38 个。

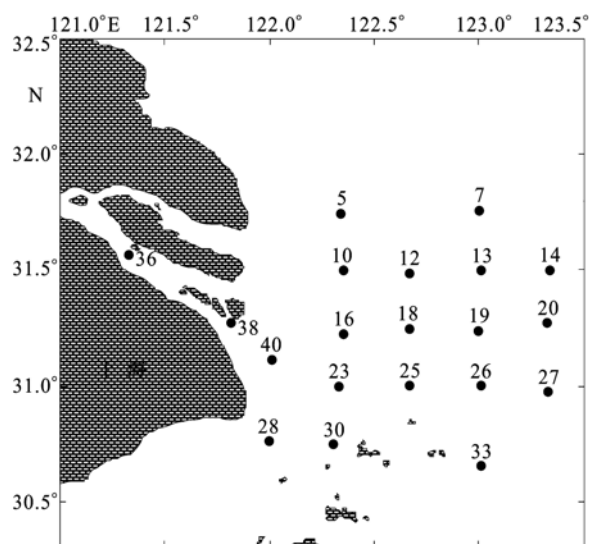


图 1 长江口及其近海水域的浮游病毒取样站点分布图
Fig. 1 The virioplankton sampling stations in the Changjiang (Yangtze) River Estuary and the adjacent Sea

2 实验方法

2.1 浮游病毒的计数

每个站点采集水样 50ml 后,立即以终浓度为 3.5%的甲醛固定,放在 4℃低温保存。浮游病毒检测参照 Noble 等(1998)的方法,并稍加改进:水样用孔径为 $0.45\mu m$ 的滤膜过滤后,取 3ml 经孔径为 $0.02\mu m$ 的氧化铝膜(Whatman)过滤,将病毒滤于膜上,待干燥,用终浓度为 2.5×10^{-3} 的 SYBR Green I 染料(Molecular Probes)避光染色 15min。干燥后,制片。荧光显微镜蓝色激发光下,油镜观察。随机取 10—20 个视野计算浮游病毒数,每个样品至少计数 200 个病毒。病毒粒子呈针扎状,亮绿色。

2.2 水样中叶绿素 *a* 的测定

现场过滤各层水样 0.5L 于 Whatman GF/F 滤

膜上,并迅速保存于 4℃冰箱中,待实验室内进行测定。叶绿素 *a* 样品按 Holm-Hansen 等(1965)的萃取荧光法于唐纳荧光计上测定,并计算最终叶绿素 *a* 浓度。

3 结果

3.1 长江口水域浮游病毒的水平分布和季节变化

2006 年 2 月(冬季)航次各站点 VDC 在 4.90×10^5 — 1.92×10^7 个/ml 之间,平均值为 4.65×10^6 个/ml,最低值(4.90×10^5 个/ml)出现在 30 号站 10m 水层;长江口河口区 3 个站位(36 号、38 号和 40 号站)VDC 最多为 1.20 — 1.92×10^7 个/ml,近海域 17 个站点 VDC 处于 1.10 — 6.94×10^6 个/ml 之间。2006 年 5 月(春季)航次各站点 VDC 在 8.21×10^5 — 2.19×10^7 个/ml 之间,平均值为 5.40×10^6 个/ml,最低值(8.21×10^5 个/ml)出现在 10 号站 10m 水层,长江口河口区 3 个站点 VDC 最多为 $(1.16$ — $2.19) \times 10^7$ 个/ml,近海域 17 个站点 VDC 处于 $(1.19$ — $9.88) \times 10^6$ 个/ml 之间。从水平分布上来说,长江口河口区病毒丰度达到 10^7 个/ml,近海水域绝大部分站位病毒丰度为 10^6 个/ml,河口区浮游病毒丰度在冬、春两季均明显高于近海水域浮游病毒丰度($P < 0.01$)。从季节上来说,总体病毒丰度在冬季和春季无明显差别($P > 0.05$)。

长江口河口区冬、春两季表层和深层水体都出现明显的浮游病毒密集区(图 2),病毒数量均达到 10^7 个/ml,但河口区病毒丰度在冬、春两季并无明显变化,在水平分布上也无明显变化($P > 0.05$)。近海水域浮游病毒丰度则在季节、水平分布上都处于动态变化的过程中。冬季表层出现两个病毒丰度较高水区(丰度高于 5.0×10^6 个/ml)位于 10 号、12 号站以及 25 号、26 号站,春季表层这两个病毒丰度较高水区范围扩大(图 2a 和图 2c)。冬季深层水体在 5 号、12 号和 19 号站范围内以及 28 号和 30 号站范围内出现了病毒丰度较低水区,其它水域病毒丰度较为均一(图 2b),但前者浮游病毒较低水域春季向西移,后者并未改变(图 2d);春季深层水体出现了两个明显的病毒丰度较高水区,分别在 13 号和 19 号站范围以及 33 号和 27 号站范围内。

3.2 冬、春两个季节浮游病毒垂直分布趋势

在冬季和春季 20 个调查站中,14 个站位(水深大于 10m)采集的为表层及 10m 水层的水样,

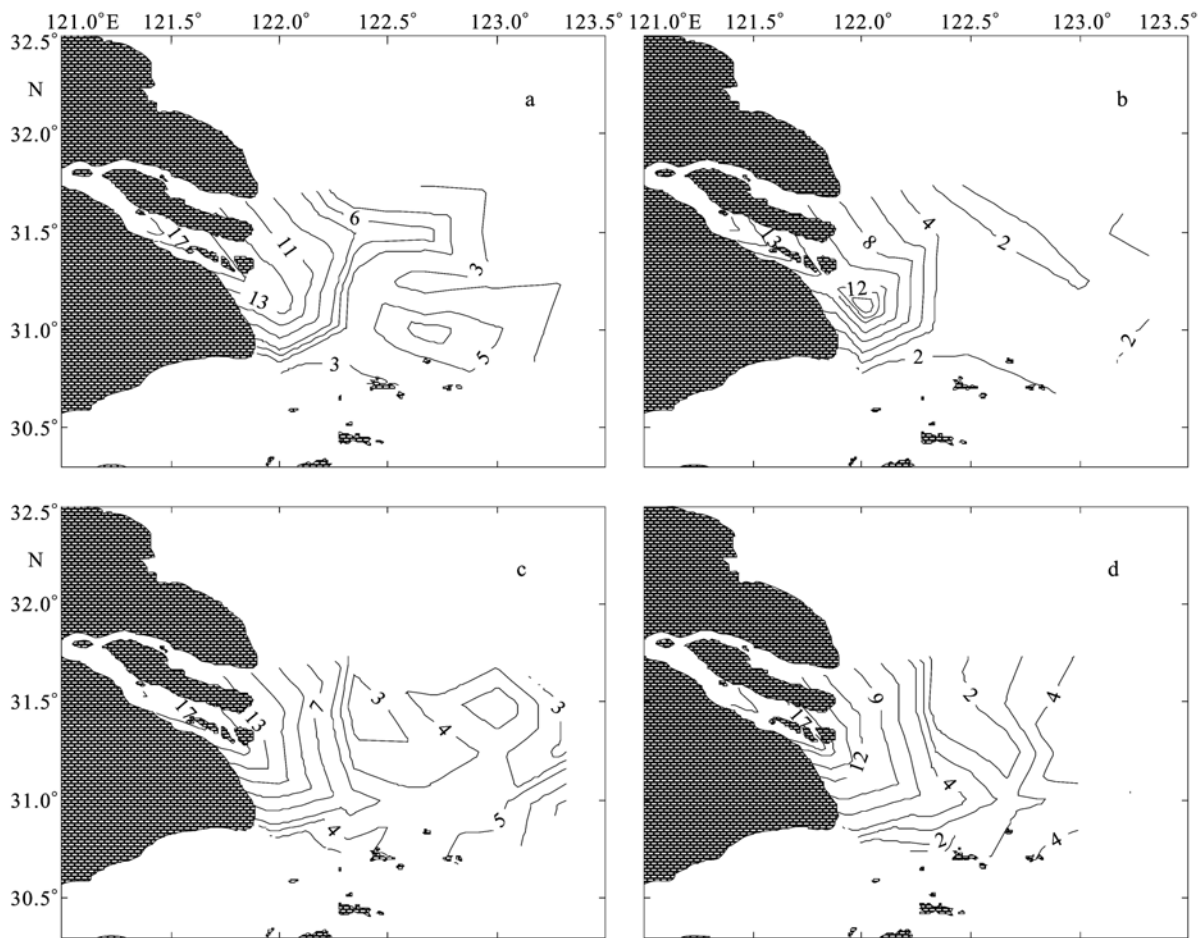


图2 冬、春两季长江口及近海水域表层水体和深层水体浮游病毒丰度的平面分布图(单位: 10^6 个/ml)

Fig. 2 Virioplankton abundance in surface and subsurface water layers in winter and spring in the Changjiang (Yangtze) River estuary and the adjacent Sea (unit: 10^6 viruses/ml)

a. 冬季表层水体; b. 冬季深层水体; c. 春季表层水体; d. 春季深层水体

都位于长江口近海水域;其它6个站点(水深小于10m,包括河口区的3个站位)采集的为表层及底层的水样。比较表层和10m水深水样VDC,冬季除7号,13号和18号站外,春季除7号和19号站外,其它站点冬、春两季表层水体的VDC都比10m水层的高。尽管个别站位表层VDC低于10m水层VDC,但总的来说,冬季和春季表层水样的浮游病毒丰度高于10m水层病毒丰度($P < 0.05$)。利用两个样本的配对 t 检验得出水深浅于10m的6个站位的表层水体浮游病毒丰度与底层病毒丰度并无明显差别($P > 0.05$),进一步对长江口河口区3个站位的病毒丰度进行统计分析,显示冬、春两季表层与底层浮游病毒丰度无明显差别($P > 0.05$)。总结得出:长江口浮游病毒丰度的垂直分布与总水深有一定关系。长江口近海水域总水深大于10m的站位,表层病毒丰度高于深层病毒丰度;总水深小于10m的站位,病毒垂直分布无明显差别。河口区域(水深浅于10m)病毒垂直分布

也无明显差别。

3.3 水样中叶绿素 a 数据

冬季各站位的叶绿素 a 含量在0.269—1.589 $\mu\text{g/ml}$ 之间,平均值为0.779 $\mu\text{g/ml}$,最低值出现在20号站10m水深;最高值出现在36号站表层。春季各站位的叶绿素 a 含量在0.289—26.215 $\mu\text{g/ml}$ 之间,平均值为5.738 $\mu\text{g/ml}$ 。各站位间叶绿素 a 含量差别很大,最低值出现在28号站表层水体(0.289 $\mu\text{g/ml}$);最高值出现在18号站10m水层(26.215 $\mu\text{g/ml}$)。春季表层河口区36号和38号站叶绿素 a 含量与冬季表层相比,无明显差别,河口区40号站和近海域叶绿素 a 含量明显增加(图3)。深层水体河口区与冬季深层水体叶绿素 a 含量相比无明显变化,近海域17个站位中除28号,23号和30号站外,叶绿素 a 含量都有明显增加。春季河口区40号站和近海域叶绿素 a 含量明显增加,且在采样过程中水体颜色明显变化,说明在采样过程中长江口近海水域有大面积的赤潮发生。

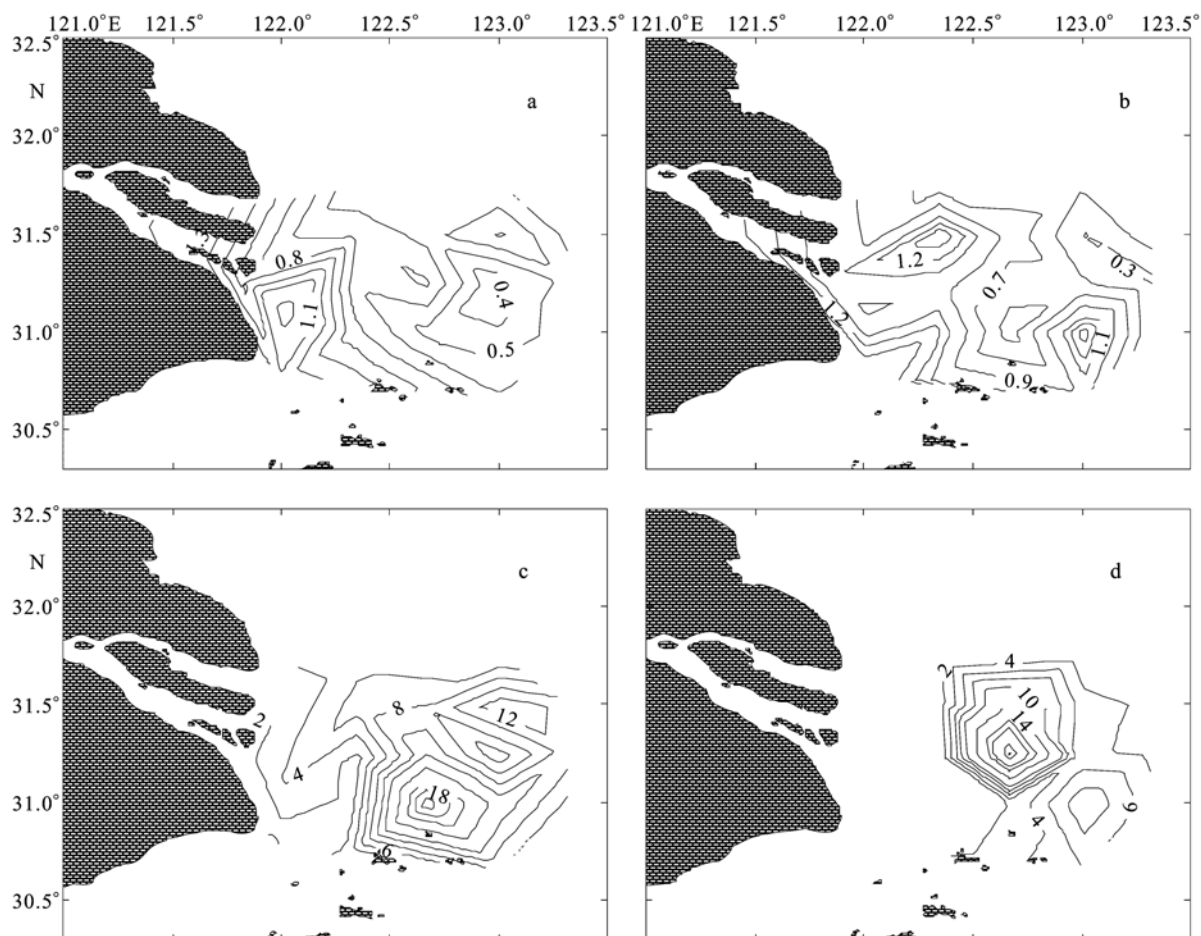


图3 长江口及其近海水域冬、春两季各水样叶绿素 *a* 含量

Fig.3 Chlorophyll *a* concentration in water samples from the Changjiang (Yangtze) River estuary and the adjacent sea in winter and spring

a. 冬季表层; b. 冬季深层; c. 春季表层; d. 春季深层

3.4 长江口冬、春季 VDC 和叶绿素 *a* 含量的关系

利用 SPSS 软件对长江口冬季和春季浮游病毒丰度和相应叶绿素 *a* 含量之间的关系, 进行一元线性相关分析: 冬季长江口浮游病毒丰度与叶绿素 *a* 含量有显著的正相关性($P < 0.05$, $r = 0.344$, $n = 40$), 其确定系数(coefficient of determination, R^2)为 0.118; 春季长江口浮游病毒丰度与叶绿素 *a* 含量有显著的负相关性($P < 0.05$, $r = -0.327$, $n = 38$), R^2 为 0.107。 R^2 值处于 0—1 之间, 在浮游病毒丰度和叶绿素 *a* 含量有相关性的前提下, 其值越接近 1, 浮游病毒丰度的变化受叶绿素 *a* 含量变化这个决定因素影响越大, $R^2 = 1$, 说明浮游病毒丰度的变化可以完全由叶绿素 *a* 含量的变化来解释; 其值越接近 0, 浮游病毒丰度的变化受叶绿素 *a* 含量的变化影响越小。

4 讨论

本文中检测到冬、春两季长江口河口区 VDC 为 10^7 个/ml, 长江口近海水域 VDC 为 10^5 — 10^6 个/ml, 绝大部分站位为 10^6 个/ml。长江口河口区浮游病毒丰度明显高于长江口近海水域病毒丰度, 可能是与河口区域严重的富营养化有关。有文献报道, 许多水域(包括河口区和近海水域)浮游病毒丰度有明显的季节变化(Bergh *et al*, 1989; Cochran *et al*, 1998; Jiang *et al*, 1994; Weinbauer *et al*, 1995; Wommack *et al*, 1992), 但也有例外, 在夏威夷岛的马马拉海湾(Mamala Bay)浮游病毒分布并没有明显的季节规律(Paul *et al*, 1997)。本文研究结果显示, 长江口河口区及近海水域冬季和春季的浮游病毒丰度也无明显差别($P > 0.05$), 其原因可能与长江口河口区的生态环境和春季长江口近海水域发生大面积的赤潮有关。长江口河口

区终年都处于严重富营养化状态(邬建勇等, 2006), 营养盐供给可能成为影响病毒宿主生物量以及代谢率的主要因素, 而季节和温度对其影响则不明显; 春季长江口近海水域发生大面积赤潮(石晓勇等, 2005), 赤潮藻类正处于生长旺盛的时期, 死亡率低, 此期间的藻类病毒可能正处于潜伏期, 因藻类细胞裂解而进入水体中的浮游病毒量就少, 从而导致了长江口近海水域冬、春两季浮游病毒丰度无明显变化。

据文献报道(Weinbauer *et al*, 1995; Drake *et al*, 1998), 只有在一些生产力旺盛的水体中才发现 VDC 与水体深度有关。长江口的调查发现浮游病毒丰度的垂直分布与总水深有一定关系。总水深小于 10m 的站位, 病毒垂直分布无明显差别; 总水深大于 10m 的站位, 表层病毒丰度高于深层病毒丰度。长江口水深小于 10m 的站位(6—8m), 都位于河口区和近河口区, 表层(0.5m)和底层(底以上 2m)采样水深相差不大(3.5—5.5m), 且在此区域海上运输频繁, 水体扰动剧烈, 其病毒垂直分布可能不明显。总水深大于 10m 的站位都位于长江口近海水域。在近海水域水体中, 表层水体中含氧量大于深层水体; 表层水体光线较好, 光合自养的藻类生长旺盛, 以及以藻类为食的微生物也随之生长, 寄生的病毒也随之大量复制并释放, 表层浮游病毒丰度相应就高。

Maranger 等(1995)检测发现加拿大魁北克省的 22 个湖体浮游病毒丰度与相应的叶绿素 *a* 含量成明显的正相关性。本文结果发现冬季浮游病毒丰度与叶绿素 *a* 含量也成正相关性, 原因可能与冬季气温低, 浮游细菌的丰度降低, 藻类生物量较细菌量成为影响病毒丰度的主导作用有关; 春季浮游病毒丰度与叶绿素 *a* 含量成负相关性, 原因可为赤潮发生前期, 藻类细胞裂解量少有关。但冬、春季浮游病毒丰度与叶绿素 *a* 含量的 R^2 值(0.118 和 0.107)都较小, 说明冬、春两季浮游病毒丰度受叶绿素 *a* 含量的影响小, 仅为 10%—11%。叶绿素 *a* 含量反映水体中浮游植物生物量, 可以说, 冬、春两季浮游病毒丰度与浮游植物生物量都有一定的关系, 同时也说明长江口浮游病毒丰度变化除受到浮游植物生物量变化的影响外, 还受其它许多相关因素的影响, 需要进一步的相关数据分析, 才能深入了解长江口及近海水域冬、春两季浮游病毒的影响因素。本文是对长

江口水域浮游病毒丰度和时空分布的初次调查, 可为河口水域生态环境的保护提供有价值的参考资料, 以期更全面的研究河口水域的生态环境。

致谢 本实验及论文写作过程中, 得到了中国海洋大学栾青杉和宋书群的帮助, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 刘艳鸣, 张奇亚, 2005. 利用脉冲场凝胶电泳测定东湖浮游病毒基因组的大小. 武汉大学学报(理学版), 51(s2): 238—240
- 石晓勇, 王修林, 陆 茸等, 2005. 东海赤潮高发区春季溶解氧和 pH 分布特征及影响因素探讨. 海洋与湖沼, 36(5): 404—412
- 邬建勇, 王金辉, 秦玉涛等, 2006. 长江口表层水体的生态遗传毒性初步研究. 海洋与湖沼, 37(1): 20—27
- Augusti S, Satta M P, Mria M P *et al*, 1998. Dissolved esterase activity as a tracer of phytoplankton lysis: evidence of high phytoplankton lysis rates in the north-western Mediterranean. *Limnol Oceanogr*, 43(8): 1836—1849
- Bergh O, Borsheim K Y, Bratbak G *et al*, 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340: 467—468
- Boehme J, Frischer M E, Jiang S C *et al*, 1993. Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the southeastern Gulf of Mexico: distribution and contribution to oceanic DNA pools. *Mar Ecol Prog Ser*, 97: 1—10
- Cochran P K, Paul J H, 1998. Seasonal abundance of lysogenic bacteria in a subtropical estuary. *Appl Environ Microbiol*, 64: 2308—2312
- Contreras-Coll N, Lucena F, Mooijman K *et al*, 2002. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Res*, 36(20): 4963—4974
- Drake L A, Choi K H, Haskell A G E *et al*, 1998. Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay, USA. *Aquat Microb Ecol*, 16: 17—25
- Jiang S C, Paul J H, 1994. Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Mar Ecol Prog Ser*, 104: 163—172
- Hara S, Terauchi K, Koike I, 1991. Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 57(9): 2731—2734
- Holm-Hansen O, Lorenzen C J, Holmes R W *et al*, 1965.

- Fluorometric determination of chlorophyll. *J Cons Perm Int Explor Mer*, 30: 3—15
- Liu Y M, Yuan X P, Zhang Q Y, 2006. Spatial distribution and morphologic diversity of virioplankton in Lake Donghu, China. *Acta Oecologica*, 29(3): 328—334
- Maranger R, Bird D F, 1995. Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Mar Ecol Prog Ser*, 121: 1—3
- Noble R T, Fuhrman J A, 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat Microb Ecol*, 14(2): 113—118
- Paul J H, Rose J B, Jiang S C *et al*, 1997. Coliphage and indigenous phage in Mamala Bay, Oahu, Hawaii. *Appl Environ Microbiol*, 63(1): 133—138
- Weinbauer M G, Fuks D, Puskaric S *et al*, 1995. Diel, seasonal, and depth-related variability of viruses and dissolved DNA in the Northern Adriatic sea. *Microb Ecol*, 30(1): 25—41
- Wichels A, Biel S S, Gelderblom H R *et al*, 1998. Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl Environ Microbiol*, 64(11): 4128—4133
- Wommack K E, Hill R T, Kessel M *et al*, 1992. Distribution of viruses in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol*, 58(9): 2965—2970

VIRIOPLANKTON ABUNDANCE IN WINTER AND SPRING IN CHANGJIANG RIVER ESTUARY BY FLUORESCENCE MICROSCOPE COUNTING

BAI Xiao-Ge¹, WANG Min¹, MA Jing-Jing¹, SUN Jun², LIANG Yan-Tao¹, QIAO Qian¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, 266003; 2. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract In most aquatic environments, virioplankton is the most abundant plankton class. Virioplankton promotes the release of dissolved organic material and the regeneration of inorganic nutrients. It plays an important part in influencing the size structure of community and the pathways of material and energy transport in marine ecosystem. To study the distribution and seasonal variation of virioplankton in Changjiang (Yangtze) River estuary, virioplankton abundance in February (winter) and May 2006 (spring) was studied in the estuary. In this study, virioplankton was quantified by using fluorescent microscope. The samples were collected using Rossette into 50ml sterilized vials, fixed by formaldehyde (3.5%, final concentration) and then stored at 4 °C for counting virioplankton. The data was analyzed with the statistic method of independent *t*-test and the unitary linear regression analysis. Result show that the range of virus abundance was 0.490—19.2 and 0.821—21.9 ($\times 10^6$ viruses/ml) in the winter and spring respectively. No significant seasonal but geographical variation in virioplankton abundance was found. Using virus direct count by fluorescent microscope to represent the abundance, we found that the virus count in the estuary was 10^7 /ml significantly higher than that of in the offshore area at 10^6 /ml ($P < 0.01$), due probably to that nutrient concentrations in the estuary were much higher than that in the offshore area. In vertical direction, the distribution of the viral abundance varied with the site depth. In shallow water (<10-m depth) areas, no significant change in virus concentration was found, whereas in deeper regions (>10-m depth), the virus concentration decrease with depth. In season, virioplankton abundance was positively in winter but negatively in spring correlated with chlorophyll *a* concentration significantly ($P < 0.05$).

Key words Virioplankton, Fluorescent microscope counting, SYBR Green I, The Changjiang (Yangtze) River estuary