武汉东湖浮游病毒的丰度及多样性

刘艳鸣 张奇亚 袁秀平

(中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072;中国科学院研究生院,北京 100039)

摘要:运用透射电镜及荧光显微技术,对富营养化的武汉东湖中浮游病毒丰度及多样性进行了研究。电镜观察和计数结果显示,东湖中浮游病毒的丰度达到 10^8 个/mL。荧光显微镜计数结果约是电镜计数结果的 2.72 倍,差异极显著($P < 0.01$)。在东湖超富营养区的水样中观察到了多种与各种病毒形态类似的颗粒,其中大部分与噬菌体和噬藻体类似,具多种形态的尾部和六边形头部。还有一些线状、杆状、子弹形等形态的病毒粒子。研究结果显示东湖水环境中的浮游病毒不仅丰度极高,而且种类丰富。提示浮游病毒在东湖水环境和水生态系统中可能扮演重要角色。

关键词:东湖;浮游病毒;形态多样性

中图分类号:Q179.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-3207(2005)01-0001-06

东湖位于武汉市东北郊,为长江中下游一个具代表性的浅水型湖泊,它是集饮用、游泳、水上运动、钓鱼、养殖、农灌以及调节、净化生态环境等功能于一体的市区湖泊。但随着其周边城市工业迅猛发展和人口激增,目前沿东湖地区的污染单位已有 100 多家及 100 万以上的人口,每日排放污水和废水达 27 万 t,大部分未经处理直接入湖[1]。另外还有雨水、污水顺其自然地形径流入湖。使东湖变成了一个富营养化的湖泊。它所包含的水果湖、郭郑湖和汤林湖分别属于超富营养、富营养和中等营养状况(图 1),水体污染严重[2]。东湖在淡水生态方面是一个模式湖,在它的浮游植物、浮游动物、底栖动物、细菌等方面已开展了许多研究[3,4]。但对浮游病毒(水生态环境中数量最多的微生物[5])的群体研究未见报道。

浮游病毒,即水生态系统中的病毒,目前被普遍认为是水体微生物群落中丰富且重要的活性成分,它能调节水体中异养细菌,蓝藻和浮游植物的物种多样性和生物产量,影响生物地化循环,介导水生态系统中微生物之间的基因转换,对水环境乃至整个生态系统都具有重要影响[6—12]。尽管从 20 世纪后期,就有科研工作者对水环境病毒进行研究,但注意力集中在自然水体中的肠道病毒,大肠杆菌噬菌体等污染环境的病毒指示物[13],以及对藻病毒的分离和研究方面[14]。近些年才开展对浮游病毒,包含漂浮于水体中的噬菌体、噬藻体、真核藻类病毒、动物病毒、人类病毒等在内的多种群病毒的研究。作者用现代生物技术测定了东湖浮游病毒的丰度,观察了东湖浮游病毒的形态多样性,得到了一些有价值的资料,可为今后保护、治理和利用东湖提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 取样 取样点如图 1 所示,分别位于超富营养(Ⅰ)、富营养(Ⅱ)和中等营养(Ⅲ)3 个营养区的中心。2003 年 6 月 13 日取样,把取样器浸入水面以下取出水样,在 1—2h 以内用 2.5%戊二醛固定 30min(4 ℃),一星期以内分析。

1.2 电子显微镜观察和计数 按照 Børsheim 等的方法[15],用四氟树脂填平超速离心管底;在处理过的管中加入待测水样,将覆有福尔膜和碳膜的铜网,碳膜一边朝上放入管中,用 Beckman L-90k 的超速离心机在 SW41 型水平转头中,28500r/min 离心 2.5h(12 ℃),离心完毕,上清用枪头移走,空气干燥。铜网用 2%的乙酸双氧铀染色 1—3min。采用 JEOL1250 型透射电镜在 80kV、30000—80000 下观察病

收稿日期:2004-05-18;**修订日期**:2004-06-11

基金项目:国家自然科学基金项目(30170726);中国科学院创新工程方向性项目(KSCX2-SW-302)资助

作者简介:刘艳鸣(1972—),女,白族,湖南桑植人;博士,从事水生病毒学的研究

通讯作者:张奇亚,zhangqy@ihb.ac.cn

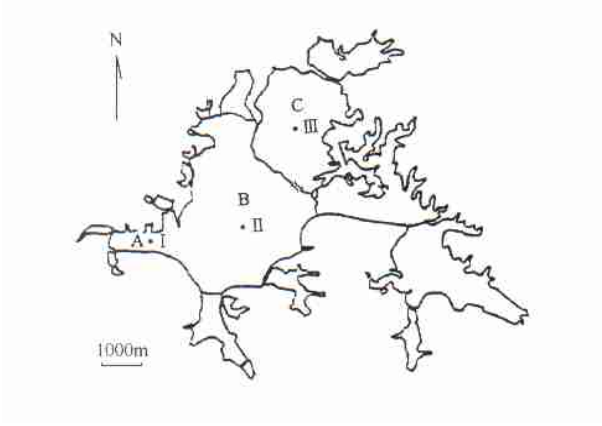


图 1 取样点

Fig. 1 Location of sampling stations

A. 水果湖; B. 郭郑湖; C. 汤林湖

毒粒子的形态和计数,每个铜网先观察一下病毒是否分布均匀,随机选择视野观察,直到病毒总数超过 300 个。

1.3 荧光显微镜计数 根据 Cheng F 等的方法[16],稍作修改,把上述已用 2.5 %戊二醛固定的水样先用 0.2μm 孔径的混合纤维素膜(上海生产)过滤掉藻类、细菌和大的杂质,用 0.02μm 孔径的氧化铝滤膜(Watman)过滤过的双蒸水 1 ∶20 稀释,过滤到 0.02μm 孔径的氧化铝滤膜上,干燥;SYBRGold 染料(一种能染双链和单链 DNA 及 RNA 的核酸染料)的母液(×10000)(Molecular Probes)用上述双蒸水稀释成 25 倍;对每一个新膜,100μL ×25 的 SYBRGold 染料滴在平底培养皿上,把上述干燥后的过滤膜,样品一边放在染料上染色 15min(暗处),置染色后的氧化铝膜于载玻片上,盖上盖玻片,荧光显微镜油镜(Leica DC)下观察、计数病毒颗粒,至少 300 个病毒被计数。

1.4 数据分析 数据用 SAS 8.1 软件包(美国 SAS 公司)中的成组法 t 测验分析东湖三个营养区浮游病毒丰度的差异性,成对法 t 测验分析透射电镜计数结果和荧光显微镜计数结果之间的差异性。

2 结果

2.1 病毒丰度的分布

透射电镜计数结果表明(表 1),东湖 3 个不同营养区的病毒丰度均达到了 10^8 个/mL。在富营养区最高,达 9.74×10^8 个/mL,中等营养区最低(7.68×10^8 个/mL)。SAS 统计软件分析表明,超富营养区和富营养区的病毒丰度显著高于中等营养区的病毒丰度($P < 0.05$)。

表 1 东湖 3 个取样点的浮游病毒丰度

Tab. 1 Virioplankton abundance of three stations in Lake Donghu

取样点 Sampling station	病毒的电镜计数(个/mL) Viral abundance by TEM	病毒的荧光显微镜计数(个/mL) Viral abundance by EM
Ⅰ	$(9.16 \pm 0.69) \times 10^8$	$(2.42 \pm 0.04) \times 10^9$
Ⅱ	$(9.74 \pm 0.63) \times 10^8$	$(2.45 \pm 0.06) \times 10^9$
Ⅲ	$(7.68 \pm 0.90) \times 10^8$	$(2.35 \pm 0.05) \times 10^9$

病毒粒子经 SYBRGold 核酸染料染色后,在荧光显微镜下发明亮的黄绿色荧光。如图 2 所示,图中分布较均匀的颗粒是病毒粒子。在三个取样点,荧光显微镜的计数结果均高于透射电镜的计数结果(表 1),平均高约 2.72 倍。

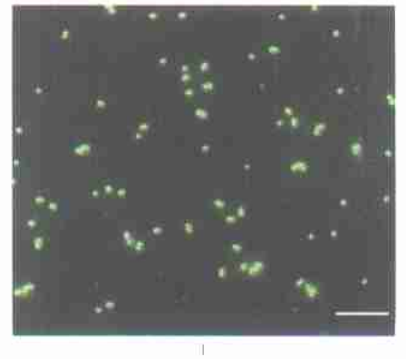


图 2 东湖超富营养区浮游病毒的荧光照片

Fig. 2 The fluorescence picture of virioplankton in hypereutrophic region of Lake Donghu

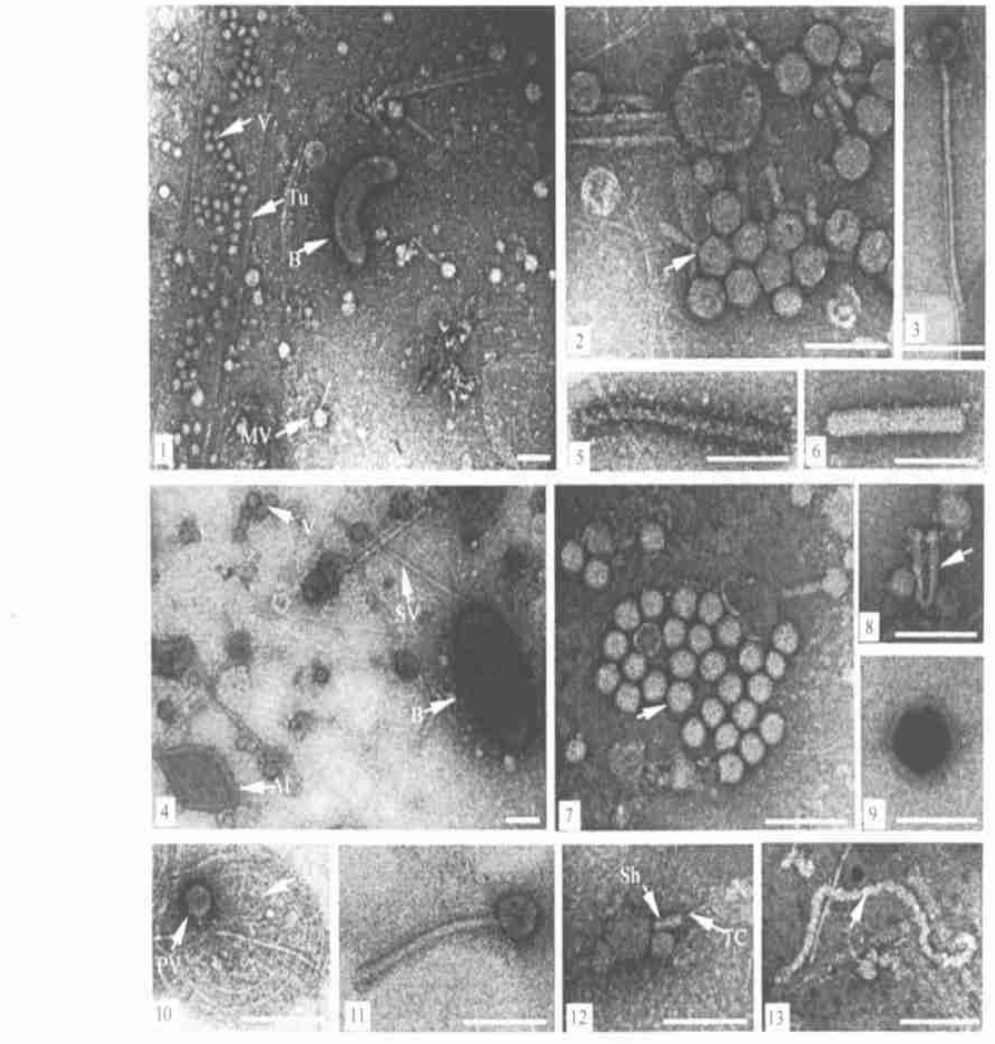
标尺:2μm

SAS 软件分析结果显示荧光显微镜的病毒计数结果与透射电镜的病毒计数结果差异极显著($P < 0.01$)。

2.2 病毒的形态多样性

取东湖 3 个湖区的水样各 2mL,分别超离到 144.128mm^2 的面积上,用透射电镜在不同放大倍数下观察,均可观察到形态丰富的与病毒形态类似的颗粒及各种藻类、细菌。下面以超富营养区水样中的微生物为例分析东湖浮游病毒形态的多样性。在电镜下可看到大量头部为六边形的颗粒(图版 Ⅰ:1,2,4),这些颗粒与噬菌体及噬藻体极为相似。依形态判断,有具收缩性尾的属粘病毒科的病毒颗粒(图版 Ⅰ:1,2,12),其中图版 Ⅰ:12 中病毒的收缩鞘和尾髓可清楚看见;有具非收缩性长尾的长尾病毒科病毒粒子(图版 Ⅰ:3,4,11);有些颗粒具很短的短尾,属短尾病毒科病毒(图版 Ⅰ:10)。有些病毒颗粒具六边形头部或圆形头部,无尾,可能属于无尾的噬菌

体或植物及动物病毒(图版 Ⅰ:1 ,4 ,7 ,9) 。另外,观察到一些杆状(图版 Ⅰ:5) 、棒状(图版 Ⅰ:6) 、线状(图版 Ⅰ:13) 及弹状(图版 Ⅰ:8) 病毒样颗粒(也不排除其中有些细胞碎片) 。在图版 Ⅰ:1 中存在一个直径约 0. 4μm、类似藻管的管状物,其中充满病毒颗粒。图版 Ⅰ:7 中间的一群病毒粒子上的衣壳粒可清楚看见,没有囊膜包裹,与腺病毒有些相似。图版 Ⅰ:5 的病毒表面有大量突起物。藻类(图版 Ⅰ:4 ,10) 和细菌(图版 Ⅰ:1 ,4) 也有被观察到。从图片可以看出,浮游病毒比浮游细菌和浮游植物多得多。



图版 Ⅰ

1、4. 超富营养区水样在不同视野下的电子显微镜照片,示水样中形态多样的病毒粒子及藻和细菌;2. 一群头部为六边形,具收缩性尾(箭头所指) 的病毒粒子;3、11. 具非收缩性长尾的病毒粒子;5. 表面有突起的杆状病毒;6. 棒状病毒;7. 一群形态相近的病毒粒子,箭头所指的一团病毒粒子上可见清晰的衣壳粒;8. 子弹形病毒(箭头所指) ;9. 无尾,具囊膜的病毒粒子;10. 一个超微藻上粘有一个短尾病毒科病毒粒子;12. 图中间的大病毒颗粒有收缩性的尾,可见收缩鞘(Sh) 和露出的尾髓(TC) ;13. 线状病毒(箭头所指) ;Al —藻,B —细菌,V —病毒,MV —粘病毒科病毒,SV —长尾病毒科病毒,PV —短尾病毒科病毒,Tu —管状物;Sh —收缩鞘,TC —尾髓;图中标尺均为:0. 2μm

1 ,4. Results observed by TEM in water samples of hypereutrophic region ,showing diverse virus-like particles ,algae and bacteria ;2. Viruses with hexagonal heads and contractile tails (arrow) ;3 、11. Viruses with long and noncontractile ;5. Baculovirus with spikes on surface ;6. Rod-shaped virus ;7. Some virus-like particles with similar shape ,viruses (arrow) with clear capsomer ;8. Bullet-shaped virus (arrow) ;9. Virus-like particles with envelope but without tail ;10. Showing a virus-like particle with short tail on an algal picoplankton ;12. Virus with contracted sheath (arrow) and exposed tail core (arrow) ;13. Filovirus (arrow) ;AL —algae ,B —bacteria ,V —virus ,MV —*Myoviridae* ,SV —*Siphoviridae* ,PV —*Podoviridae* ,Tu —tubular material ,Sh —contracted sheath ,TC —tail core ;Bar :0. 2μm

3 讨论

在本研究中,病毒的荧光显微镜计数结果显著高于电镜计数结果。可能的原因是在荧光显微镜计数时,SYBRGold 是核酸染料,除病毒的核酸被染色外,溶解在水样中的被裂解的浮游细菌、浮游植物等的核酸也能被染色,从而使计数结果偏高。另外,在荧光显微镜下,被染色的病毒颗粒发明亮的黄绿色荧光,杂质发橙红色荧光,可以区分开,杂质对计数结果的干扰可以忽略。而在电镜计数方面,水样中的杂质在铜网上会遮住一部分病毒粒子,使计数结果偏低;另外,在超离制备电镜样品时,有些病毒颗粒并没有充分沉淀到管底(而铜网在管底),这是计数结果偏低的另一个原因。

东湖的病毒丰度均在 10^9 个/mL 左右,如此高的病毒丰度只在美国加利福尼亚州单湖的研究中曾有报道[17]。比其他湖泊、河流、海洋中所测得的病毒密度要高 1—3 个数量级[5]。这可能是因为东湖位于城市市区,每天有大量工业废水和生活污水排入,带入了大量营养物质、细菌和病毒。导致浮游植物、浮游细菌和浮游病毒大量增殖。

从东湖浮游病毒的形态可以看出,大部分病毒粒子头部是六边形的,有些病毒有各种不同的尾,与噬菌体和噬藻体极为相似。这与大量实验所证明的噬菌体和噬藻体在浮游病毒中占大部分的结果一致[18—22]。浮游细菌是水生食物网中的初级生产力的主要部分,通过利用初级生产力的可溶性产物,水生菌群在初级生产力中反复循环,并与生物量相联,这一过程称为微生物环路[5]。大量研究表明 10%—50%的浮游细菌死亡率是由浮游病毒导致的。在营养丰富的水体中,浮游病毒引起的细菌死亡率会更高[7]。浮游病毒的裂解作用增强了细菌生物向可溶性有机物汇合塘流动,从而影响微生物循环[5]。目前由于湖泊富营养化,蓝藻水华严重,噬藻体对蓝藻的裂解作用可增大浮游生物固氮光合作用,使之进入可溶有机物的汇合塘[23],对减弱蓝藻水华可能也有一定的作用。另外,一些细菌,如氮循环细菌在水体自净能力中具有不可忽视的作用。有机物的矿化分解,氮素的汽化,磷盐的沉降和固定在湖底等都与细菌的作用分不开[3]。而病毒对细菌的裂解作用可调整它们的生物量和物种多样性,从而影响水体自净能力。由此可见,浮游病毒在东湖中的水环境及整个水生态系统中均扮演重要角色。

在东湖的水样中观察到的大量圆形、无尾的六边形,杆状、棒状、线状、子弹形等形态的病毒颗粒中,有一部分可能是植物病毒和动物病毒。在动物病毒中,有一部分可能是人类病毒,如腺病毒、肠道病毒等,这些病毒无疑是从外界同污水一起被排入东湖中的。目前东湖沿岸有 100 多万人口,其中约 30 万人饮用东湖的水[1]。如果这些病毒还有传染性,它们对周围人群的健康将造成严重威胁。我国近一两年,传染病流行呈上升趋势,许多病毒可通过水体媒介传播,如非典病毒、肠道病毒等。一些低毒的病毒在东湖这个污染极其严重的水体中,可能发生变异,变成高致病性的病毒。不同宿主之间的病毒也有可能进行重组而使其感染范围增大。所以东湖的污染是一个值得人们高度重视的问题。

我国是一个湖泊众多的国家,总面积为 80645km^2,约占全国国土面积的 0.8%。湖泊是重要的可多功能利用的地表水资源,但我国的湖泊 80%以上受到污染。在我国五大淡水湖中,巢湖、太湖和洪泽湖均为重富营养湖,鄱阳湖、洞庭湖氮磷的含量偏高,正处于向富营养化过渡阶段[24]。许多被污染湖泊水体的颜色、气味均有不同程度的恶化,湖泊及沿岸的生物多样性下降。位于大中城市的湖泊的污染还会导致城市景观质量下降,严重影响这些地区居民的身心健康,并影响外来投资。另外,由于水体富营养化,我国沿海赤潮爆发频繁[25]。因此,对富营养化湖泊东湖中浮游病毒的研究,不仅可为湖泊水生态环境的保护提供有价值的参考,还可为其他富营养化水体的治理提供借鉴。

参考文献:

[1] Shao L G, You Y J, Zeng M X, *et al*. The nutrients-enriched water in the East Lake of Wuhan and phosphorus-combating strategies[J]. *J. of Wuhan Yejin Uni. of Sci. & Tech*, 1999, **22**(2): 139—141[勋林广,游映玫,曾明秀,等. 武汉东湖水体富营养化现状及其控磷对策. 武汉冶金科技大学学报, 1999, **22**(2): 139—141]

[2] Gong Z J, Xie P. Impact of eutrophication on biodiversity of the macrozoobenthos community in a Chinese shallow lake[J]. *J. Freshwater Ecology*, 2001, **16**(2): 171—177

[3] Liu D S, Luo Q F. Distribution and role of dentrifying, nitrifying, nitrosetion and ammonifying bacteria in East Lake[J]. *Environmental Science*, 2002, **23**(3): 29—35[刘东山,罗启芳. 东湖氮循环细菌分布及其作用[J]. 环境科学, 2002, **23**(3): 29—35]

[4] Lei A P, Shi Z X, Wei Y X, *et al*. Diversity of the phytoplankton in Donghu Lake, Wuhan[J]. *Acta* Hydrobiologia Sinica, 2003, **27**(2): 179—184[雷安平,施之新,魏印心等. 武汉东湖浮游藻类物种多样性的研究. 水生生物学报, 2003, **27**(2): 179—184]

[5] Wommack K E, Colwell R R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems[J]. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 2000, **64**: 69—114

[6] Bergh O, Borsheim K Y, Bratbak G, *et al*. High abundance of viruses found in aquatic environments[J]. *Nature*, 1989, **340**: 467—468

[7] Fuhrman J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. *Nature*, 1999, **399**: 541—547

[8] Proctor L M, Fuhrman J A. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria[J]. *Nature*, 1990, **343**: 60—62

[9] Suttle C A, Chan A M, Cottrell M T. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity[J]. *Nature*, 1990, **347**: 467—469

[10] Thingstad T F, Heldal M, Bratbak G, *et al*. Are viruses important partners in pelagic food webs[J]. *Trends Ecol. E*, 1993, **8**: 209—212

[11] Wilhelm S W, Suttle C A. Viruses and nutrient cycles in the sea: viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs [J]. *Bioscience*, 1999, **49**: 781—788

[12] Zhang Q Y. Virioplankton[J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2002, **26** (6): 691—696[**张奇亚. 浮游病毒. 水生生物学报**, 2002, **26**(6): 691—696]

[13] Zhang C Y. The efficiency of two-step concentration method for recovery of viruses from water[J]. *China Environmental Science*, 1989, **9** (6): 463—465[**张楚瑜. 两步浓缩法回收水中病毒的有效性. 中国环境科学**, 1989, **9**(6): 463—465]

[14] Tang X C, Song L R, Sheng Y W, *et al*. Study of phycophages from *Microcystis* ·*spin* Lake Dianchi, south-west China[J]. *Journal of Microbiology*, 2003, **23**(3): 50—55[**汤显春, 宋立荣, 沈银武, 等. 滇池微囊藻病毒溶藻的研究. 微生物学杂志**, 2003, **23**(3): 50—55]

[15] Børsheim K Y, Bratbak G, Heldal M. Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 352—356

[16] Chen F, Lu J R, Binder B J, *et al*. Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 539—545

[17] Jiang S, Steward G, Jellison R, *et al*. Abundance, Distribution, and Diversity of Viruses in Alkaline, Hypersaline Mono Lake, California[J]. *Microb Ecol*, 2004, **47**(1): 9—17

[18] Cochla W P, Wikner J, Steward G F, *et al*. Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll-*a* in neritic, Oceanic and estuarine environments[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1993, **92**: 77—87

[19] Hara S, Terauchi K, Koike I. Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 2731—2734

[20] Wommack K E, Hill R T, Kessel M, *et al*. Ditribution of viruses in the Chesapeake Bay[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 2965—2970

[21] Hara S, Koike I, Terauchi K, *et al*. Abundance of viruses in deep oceanic waters[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1996, **145**: 269—277

[22] Maranger R, Bird D F, Juniper S K. Viral and bacterial dynamics in Aretic sea ice during the spring algal bloom near Resolute[J], *N. W. T., Canada*. *Mar Ecol Prog Ser*, 1994, **111**: 121—127

[23] Thingstad T F, Lignell R. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand[J]. *Aquat Microb Ecol*, 1997, **13**: 19—27

[24] Gu Z L. Bioremediation of eutrophied lakes in China[J]. *Rural Eco-Environment*, 2002, **18**(1): 42—45[**顾宗濂. 中国富营养化湖泊的生物修复. 农村生态研究**, 2002, **18**(1): 42—45]

[25] Liang S, Qian H L, Qi Y Z. Problem on the red tide in Coastal China. Sea[J]. *Ecologic Science*, 2000, **19**(4): 44—50[**梁松, 钱宏林, 齐雨藻. 中国沿海的赤潮问题**[J]. **生态科学**, 2000, **19**(4): 44—50]

STUDIES ON ABUNDANCE AND MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF VIRIOPLANKTON IN THE DONGHU LAKE, WUHAN

LIU Yan-Ming, ZHANG Qi-Ya and YUAN Xiu-Ping

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072

Graduate school of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: Virioplankton, viruses in aquatic ecosystem, are now considered to be an abundant and dynamic component in the aquatic microbial communities that can regulate the biomass production and species composition of heterophic bacteria, cyanobacteria, and phytoplankton, influence biogeochemical cycling, and mediate gene transfer between microorganisms in aquatic ecosystems. Lake Donghu located in Wuhan city was a eutrophic shallow lake, which contains three trophic regions: hypereutrophic, eutrophic and mesophic region. To assess the ecological role of virioplankton in Lake Donghu, it is necessary to determine the abundance and the morphotype diversity of virioplankton. The virioplankton abundance was measured by transmission electron microscopy (TEM) direct counts and epifluorescence microscopy (EM) direct counts using SYBR Gold stain in Lake Donghu. All data were analyzed by SAS 8.1 (SATA) software packages (SAS Institute Inc.). Water column virioplankton abundances were revealed highest numbers ($9.74 \times 10^8 mL^{-1}$) in eutrophic region and lowest numbers ($7.68 \times 10^8 mL^{-1}$) in mesotrophic region by TEM. Virioplankton direct counts of hypereutrophic and eutrophic regions were significantly higher ($P < 0.05$) than those of mesotrophic region. Virioplankton abundances counted by EM were significantly higher than those counted by TEM ($P < 0.01$), up to 2.72 times on average. The analysis of morphological diversity of virioplankton by TEM showed that most virioplankters observed were similar to bacteriophages and cyanophages which had diverse tails and hexagonal heads. According to morphotype, most of them belong to *Siphoviridae* (Tail is noncontratile, long), *Myoviridae* (Tail is contractile, long and complex, consisting of a central tube and a contratile sheath separated from the head by a neck) and *Podoviridae* (Tail is short about 20 nm and noncontratile). In addition, filovirus, baculovirus, bullet-shaped virus, rod-shaped virus, and other viruses, were also detected. Some virus-like particles observed with clear capsomer were similar to human and animal virus. In water samples, virioplankton abundance detected was much more than those of bacterioplankton, cyanobacteria and algae. The results suggest that virioplankton played vital roles in water environment and ecosystem of Lake Donghu.

Key words: Donghu Lake; Virioplankton; Morphological diversity