

四类海洋超微型浮游生物同步监测*

焦念志 杨燕辉

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 以1997年2—3月采自东海的自然海水为样品,采用SYBRGreen I染色剂对微生物细胞DNA染色后进行流式细胞仪分析,研究了SYBRGreen I区分真核微型浮游植物、蓝细菌、原绿球藻以及异养细菌的效果。结果表明,该方法可较好地分离四类微型生物,同时对于一般性细胞分类和计数,可省去以前作者采用的DNA染色前处理步骤,大大提高分析速度。与传统方法相比,采用流式细胞仪对四类超微型生物进行同步监测,可避免以往不同类群生物不同方法观测所造成的系统误差,并可快速批量处理样品。

关键词 SYBRGreen I 流式细胞仪 超微型生物 同步监测

学科分类号 Q-331

越来越多的研究表明,超微型浮游生物($< 2\mu\text{m}$)不仅在大洋水域是生物量和生产力的主要贡献者(Bienfang *et al*, 1984; Blanchot *et al*, 1992; Campbell *et al*, 1994),而且在近海也占有极为重要的生态学地位。例如在胶州湾, $< 2\mu\text{m}$ 的超微型浮游植物占浮游植物生物量的29%、总有机碳的35%、总初级生产力的34%(Jiao *et al*, 1994)。而海洋微型生物生态过程作为生命系统和无机环境之间相互联系的基础环节,是海洋生态系统中最基本,也是最重要的生态过程。这方面的研究将使人们对海洋生态系统的结构和功能有更深刻的认识,从而为评价海洋生物资源以及海洋生态系统在全球环境和气候变化中的作用提供更全面、准确的参数。

然而,深入了解微型生物生态过程有赖于准确测定超微型浮游生物群落中各类群细胞数量和生物量。在以往的研究中,分级生物量(特别是分粒级测定叶绿素)是反映微型生物重要性的主要信息。然而这种方法却无法给出超微型浮游生物群落内部更精细的信息。而且研究表明,通常用于收集叶绿素的GF/F玻璃纤维滤膜可允许大约15%的原绿球藻通过,造成200m内POC积分数据的误差在20%左右(Campbell *et al*, 1994)。电镜观察可分析种类组成,但却无法精确定量研究。表面荧光显微镜常常被用于计数异养细菌和蓝细菌,但却无法分辨原绿球藻,而把它误计为异养细菌。另外,取样不均匀、样本数量小,以及自养、异养生物分开观察等,均可造成常规方法分析的严重误差。在东海外海和南海,表面荧光显微镜对异养细菌计数的误差为5%—31%(焦念志等)¹⁾。此外,传统的方

* 国家杰出青年基金资助项目,39625008号;国家自然科学基金重点资助项目,39630060号;国家自然科学基金资助项目,39570143号。焦念志,男,出生于1962年12月,博士,研究员, E-mail: jiao@ms.qdio.ac.cn

1) 焦念志,杨燕辉,1999. 表面荧光显微镜观测对东海和南海异养细菌的过高估计. 海洋与湖沼,待刊

收稿日期:1998-12-25, 收修改稿日期:1999-03-24

法均相当费时,无法开展大规模生态学调查。

到目前为止,在对超微型生物的研究中,流式细胞仪(Flow cytometer, FCM)已成为必不可少的分析仪器。本文探讨了采用流式细胞分析结合 SYBRGreen I DNA 染色对四类海洋自养和异养超微型生物同步监测的效果,以期找到一种同时观测不同类型海洋超微型生物的有效方法。

1 材料与方法

1.1 采样

自然海水样品由 Niskin 采水器采自 1997 年 2—3 月东海 JGOFS 航次。将经 100 μ m 筛绢过滤后的 1ml 水样移至 1.2ml Nalgene 冻存瓶中,加入戊二醛至终浓度为 0.1%,黑暗固定 10min 后置低温冰箱或液氮中保存至分析。

1.2 流式细胞仪(FCM)分析

供 FCM 分析的样品在 37 $^{\circ}$ C 解冻。用于原绿球藻、聚球藻和超微型真核类分析的样品不经任何处理直接上机分析,用于上述 3 类自养生物加上异养细菌共 4 类微型生物同步分析的样品需经 DNA 染色处理。

对 DNA 染色样品,为简化以往复杂的前处理步骤,本文比较两种不同处理方法。将同一染色样品分为 2 份。一份按 Marie 等(1997)的方法处理。样品加入 RNaseA 和 B 的混合物 30mg(Sigma R-4875 和 R-5750, W/W = 1/1),然后再加入 0.3mol/L 柠檬酸钾储备液 45 μ l,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。进样前加入 SYBRGreen I 储备液(1% 商品溶液, Molecular Probes Inc.)至终浓度为 1×10^{-4} 。另一份样品直接加入 SYBRGreen I 储备液至终浓度为 1×10^{-4} ,混匀后室温条件下黑暗静置 10—15min 以使 DNA 着色。

样品由 FASCalibur (Bekton Dickinson)流式细胞仪分析。对仪器进行光路、光电转换电容优化处理,使之适合于超微型细胞的分析。由 Harvard Apparatus SI 100 定量进样泵进样,流速为 15 μ l/min。由采样系统计数 10 000 个细胞所用的时间来确定所分析样品的体积。用 0.47 μ m 标准荧光小球(美国 Polyscience 公司)进行内参定位。

采集每细胞的前向散射光(FSC)、侧向散射光(SSC)、红色荧光(Red-FL)、橙色荧光(Orange-FL)和绿色荧光(Green-FL)信号进行细胞特性分析。其中 FSC 和 SSC 分别是反

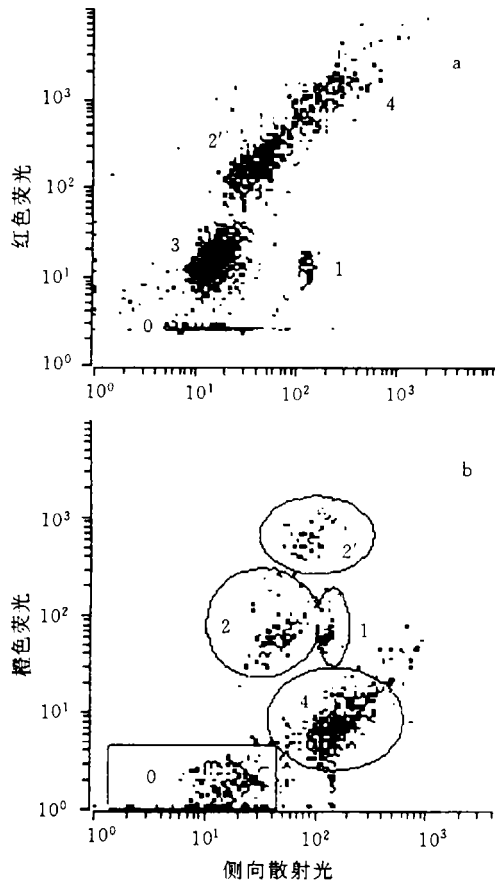


图 1 东海两个典型站位自养超微型生物流式细胞分析图

Fig.1 FCM plots of unstained samples from two typical stations in the East China Sea, showing the discrimination of the 3 groups of the autotrophic picoplankton

0. 噪声, 1. 荧光小球, 2. 低藻红素聚球藻品系, 2'. 高藻红素聚球藻品系, 3. 原绿球藻, 4. 超微型真核自养生物

映细胞大小和性状的参数,而 Red-FL和 Orange-FL分别是叶绿素和藻红素的荧光, Green-FL是 DNA 着色荧光。根据这些参数两两对应的 FCM 图谱比较确定的 4 类微型生物在图中的位置将彼此区分开来。

2 结果

2.1 未经 DNA 染色的样品显示了 3 个类群(图 1)。其中,图 1a 是东海外海 418 站红色荧光信号对侧向散射光信号的 FCM 图,图 1b 是近岸 406 站橙色荧光信号对侧向散射光信号的 FCM 图。在图 1a 中处于右上方的是颗粒最大、单细胞叶绿素含量最高的超微型真核浮游植物,处于左下方的是细胞最小、单细胞叶绿素信号最弱的原绿球藻,处于中间的是聚球藻。在图 1b 中,聚球藻(2 和 2')由于其较强的藻红素荧光信号而使其与原绿球藻和超微型真核浮游植物分开。两图比较可发现,流式细胞分析不仅能区分不同的微生物类群,还能区分每一类超微型生物中的不同品系。在东海外海,同时存在着 2 个品系的聚球藻,一类是高藻红素含量的(图 1b, 2'),另一类是低藻红素含量的(图 1b, 2)。而到了外海,低藻红素品系消失而只剩高藻红素品系(图 1a)。实际上,高藻红素品系聚球藻与原绿球藻的分布有明显的相关性(数据未显示)。FCM 分析不仅能精确定量每类群超微型生物,而且还能提供以往分析方法所无法给出的品系水平上的群落结构差异以及每个细胞的生

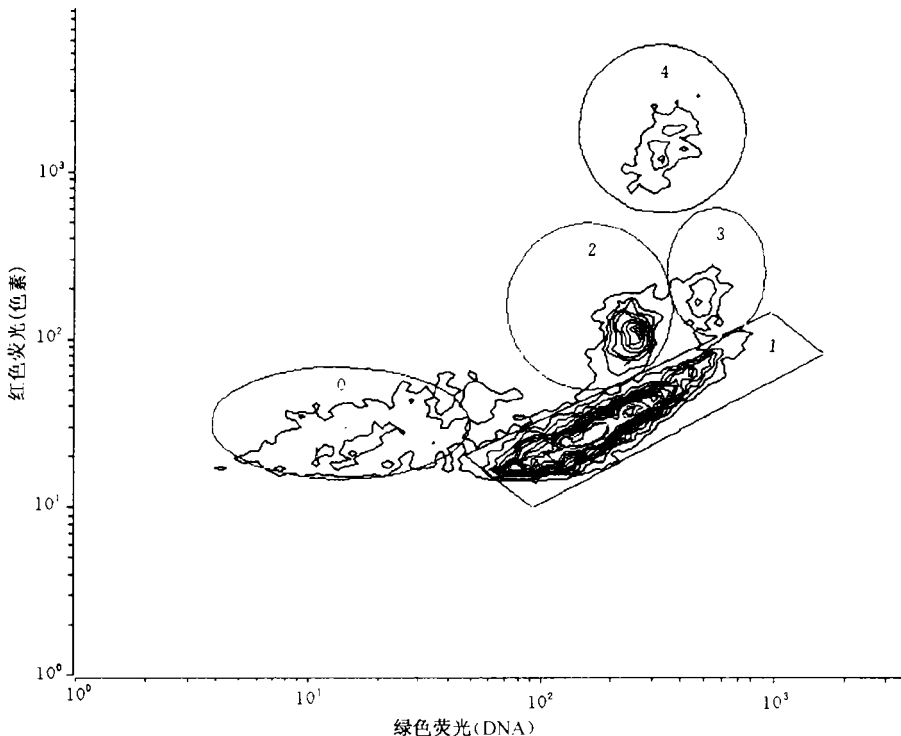


图2 SYBRGreen I直接染色的4类超微型浮游生物流式细胞图

Fig.2 FCM plots of picoplankton assemblages stained with SYBRGreen I, showing the discrimination of 3 groups of the autotrophic picoplankton and heterotrophic bacteria

0. 噪声, 1. 异养细菌, 2. 原绿球藻, 3. 聚球藻, 4. 超微型真核自养生物

理生态特性等的重要信息。

2.2 直接经 SYBRGreen I 染色样品的 FCM 图中增加了一个位于右下方的数量大、颗粒小、具有较强的绿色荧光信号的类群,即为异养细菌(图 2)。与图 1 相比,3 类自养生物的位置有所变化,但仍可被明显区分开来。由图 2 可知,SYBRGreen I 可以很好地分离原绿球藻、聚球藻、超微型真核浮游植物和异养细菌这四类超微型浮游生物。与经过染色前处理样品的 FCM 图谱(未列出)相比,未经前处理的样品的分离效果并无明显影响。

2.3 作者采用 SYBRGreen I 直接染色法分析了东海冬季 4 类超微型浮游生物的数量分布。图 3 显示了东海一个典型站点 4 类超微型生物的深度剖面分布。为清楚地

比较 4 类超微型生物的垂直分布特征,图 3 中将细菌数量除以 10 以使之同其它几类自养生物处于可比的量级。由图 3 可知,细菌和原绿球藻是微型浮游生物数量上的优势种。聚球藻和超微型真核类在垂直分布上无明显的最大层。原绿球藻在 30m 水深处有一个最大分布,向下逐渐减少。东海各类微型生物在表层和近表层分布的特点与地中海和北大西洋冬季超微型生物垂直分布的特点相似(Vaulot *et al*, 1990; Olson *et al*, 1990)。而异养细菌的垂直剖面分布趋势与自养生物不同,在真光层底部的数量大于上层。

3 讨论

流式细胞仪能以每秒处理数百个细胞的速度分析单个细胞的光学特征,不仅能够快速、精确地进行超微型生物的分类、计数,而且还能反映细胞的生理生态特性,进行细胞周期分析(Vaulot *et al*, 1995),同时还能根据需要将不同类群进行分离(Goericke *et al*, 1994)。流式细胞仪的这些特点使之尤其适合于微型生物生态学研究。

本文简化了 Marie 等(1997)介绍的方法,即省略了酶解及有关的孵育过程,直接使用 SYBRGreen I 染色,分析了东海冬季 4 类超微型浮游生物的数量分布。东海具有广阔的陆架,与大洋海区相比,无机颗粒和有机物碎屑等杂质干扰严重。因此,近海超微型浮游生物的 FCM 分析相对来说对仪器和分析技术的要求较高。本文的结果表明,SYBRGreen I 直接染色法能对 4 类海洋超微型浮游生物进行很好的分离,达到了与经酶解等前处理同样的效果,说明简化方法在实际操作中是可行的,尤其在大量现场样品分析和高频度采样处理分析过程中,可大量节省时间和分析费用。

最后有必要指出,如期望得到较高的 DNA 含量分辨率(如进行细胞周期研究时),样品的酶解处理可能会有助于得到更满意的结果。此外,4 类微型生物在同一个样品中同时检测,由于 DNA 着色后自养细胞的色素荧光效果被削弱,FCM 对自养细胞特征的分辨率会有所下降,因而当同时把色素指标作为研究对象时,应单独将未经染色的样品用

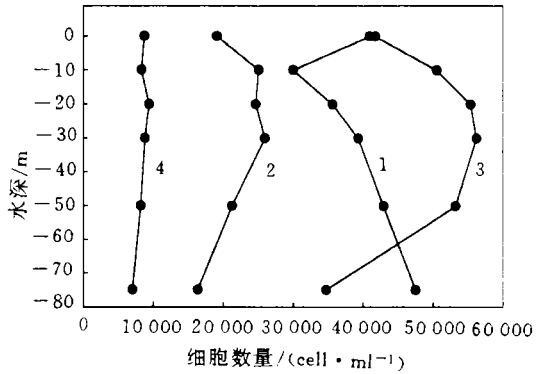


图 3 东海 418 站异养细菌(1, 1/10 丰度)、聚球藻(2)、原绿球藻(3)、超微型真核浮游植物(4)垂直分布图

Fig. 3 Depth profiles of heterotrophic bacteria (1, 1/10 abundance), *Synechococcus* (2), *Prochlorococcus* (3), and picoeukaryotes (4) at St. 418 in the East China Sea

于分析。

参 考 文 献

- Bienfang P K, Szyper J P, Okamoto M Y *et al*, 1984. Temporal and spatial variability of phytoplankton in a subtropical ecosystem. *Limnol Oceanogr*, 29:527—539
- Blanchot J, Rodier M, Bouteller A Le, 1992. Effect of El Niño Southern Oscillation events on the distribution and abundance of phytoplankton in the western Pacific Tropical Ocean along 156°E. *J Plankton Res*, 14:137—156
- Campbell L, Vault D, 1994. The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnol Oceanogr*, 39(4):954—961
- Goericke R, Welschmeyer N A, 1994. The prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Res*, 40(11/12):2 283—2 294
- Jiao N Z, Wang R, 1994. Size structures of microplankton biomass and production in Jiaozhou Bay, China. *J Plankton Res*, 16(12):1 609—1 625
- Marie D, Partensky F, Jacquet S *et al*, 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol*, 63(1):186—193
- Olson R J, Chisholm S W, Zettler E R *et al*, 1990. Spatial and temporal distribution of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res*, 37(6):1 033—1 051
- Vault D, Marie D, Olson R J *et al*, 1995. Growth of a photosynthetic prokaryote in the equatorial Pacific Ocean. *Science*, 268:1 480—1 482
- Vault D, Neveux J, Mantoura R F C, 1990. Winter presence of prochlorophytes in surface waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnol Oceanogr*, 35(5):1 156—1 164

SIMULTANEOUS MONITORING OF AUTOTROPHIC PICOPANKTON AND HETEROTROPHIC BACTERIA

JIAO Nian-zhi, YANG Yan-hui

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract Picoplankton is a major contributor to the total biomass and production not only in the oligotrophic oceans but also in most of the coastal waters. As different kinds of picoplankton may have different energy flow pathways and play different ecological roles in ecosystems, detailed information on picoplankton community structure is desired for a better understanding of the function of the marine ecosystem. However, most of the data on picoplankton community structure in the China Seas were from microscopy by which an abundant tiny autotrophic picoplankton, *Prochlorococcus* could not be detected but miscounted as heterotrophic bacteria, leading to a significant error in biomass trophic pool budgets. Feasible analysis methods are needed for the determination of picoplankton structure in these areas. Flow cytometry (FCM) is a necessity for studying microbial ecology. The autotrophs can be easily discriminated by FCM due to their

different pigment composition and cell size, while the heterotrophic bacteria can only be determined when their DNA were stained with fluorescence material. We applied flow cytometry to the simultaneous monitoring of the four principal picoplankton populations, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, picoeukaryotes and heterotrophic bacteria in the East China Sea. We simplified the method of previous authors who used RNase, potassium citrate and EDTA modifiers in pretreatment before dying and running the samples. DNA stain SYBRGreen I was added directly to a concentration of 10^{-4} of commercial solution 10—15 minutes before running the samples. Forward scatter, side scatter, orange fluorescence, red fluorescence and green fluorescence were used for the discrimination of these four populations. Results of the field samples by the simplified were similar to those by the previous classical method. The simple stain procedures without any pretreatment promised a feasible approach of rapid batch analysis of field picoplankton samples.

Key words SYBRGreen I Flow cytometry (FCM) Picoplankton Simultaneous monitoring

Subject classification number Q-331

《海洋与湖沼》学报历年获奖目录

1988 年	山东省科协优秀科技期刊	一等奖
1990 年	中国科学院优秀自然科学期刊	二等奖
1991 年	山东省科委、山东省新闻出版局、山东省科协 优秀科技期刊(总分第一名)	一等奖
1992 年	中国科学院优秀科技期刊	二等奖
1992 年	中国科协优秀科技期刊	一等奖
1992 年	国家科委、中宣部、国家新闻出版署优秀科技 期刊	二等奖
1994 年	华东区优秀科技期刊	一等奖
1996 年	山东省科委、山东省新闻出版局、山东省科协 科技期刊质量评估	优秀级
1996 年	山东科技期刊编辑学会	先进集体奖
1997 年	中国科协优秀科技期刊	二等奖
1997 年	国家科委、中宣部、国家新闻出版署优秀科技 期刊	三等奖