

噬藻体 PP 对野生宿主——丝状蓝藻的吸附率、裂解周期及释放量的影响

姜 红 程 凯 肖慈琼 张艳慧 赵以军* 赵 进

(华中师范大学 城市水环境生态学湖北省重点实验室 武汉 430079)

摘要 研究在日光光照条件下,以自然水体中存在的丝状蓝藻作为噬藻体 PP 的野生宿主,用离心法测定了噬藻体 PP 对野生宿主藻的吸附率,用一步生长曲线法获得了噬藻体 PP 对野生宿主藻的裂解周期及释放量。结果表明:噬藻体 PP 对野生宿主藻在 60min 时能够达到的吸附率为 1.79‰,吸附系数为 8.09%,噬藻体 PP 感染野生宿主藻的潜伏期介于 45 ~ 75min 之间,平均释放量为 34.32PFU·Cell⁻¹。上述结果一方面说明,噬藻体 PP 感染野生宿主藻的吸附系数、潜伏期及释放量均远小于以实验室培养的鲍氏织线藻作为宿主所得到的数据;另一方面也说明,噬藻体 PP 具有较强的吸附和裂解野生宿主的能力,这将有助于解释噬藻体 PP 在淡水富营养化水体中具有广泛分布的现象。

关键词 噬藻体 丝状蓝藻 吸附 潜伏期

文章编号:1000-0933 (2007)07-2911-05 中图分类号:Q938 文献标识码:A

The relationship between cyanophage PP and its wild host (filamentous cyanobacteria) : adsorption rate , latent period and burst size

JIANG Hong , CHENG Kai , XIAO Ci-Qiong , ZHANG Yan-Hui , ZHAO Yi-Jun* , ZHAO Jin

Central China Normal University , Hubei Key Lab of Urban Water Environmental Ecology , Wuhan 430079 , China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (7) 2911 ~ 2915.

Abstract : Using wild filamentous cyanobacteria as host , the adsorption rate of cyanophage PP was studied by centrifugation method , the burst size and the latent period were studied by measuring the One-step growth curve of cyanophage PP. The adsorption rate was 1.79‰ in 60min , and the successful contact ratio was 8.09% correspondingly. The latent period was about 45 — 75min , and the average burst size was 34.32 PFU·Cell⁻¹. All the results mentioned above were obviously lower than the results previously published for the laboratory host (*Plectonema boryanum* IU594). Besides , the high adsorption rate and short latent period , in the infection of the wild host , might contribute to the wide distribution of cyanophage PP in eutrophicated freshwater.

Key Words : cyanophage ; filamentous cyanobacteria ; adsorption ; latent period

研究人员发现,浮游病毒在海水表层的浓度可达 10¹⁰ VLPs·L⁻¹ (VLPs , virus-like particles),为细菌数量的 10 倍以上,可以造成海洋细菌与蓝藻宿主的高致死率,从而导致水体中初级生产力的下降^[1]。海洋中噬藻体

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30370062 ,30470344)

收稿日期 2007-01-21 ;修订日期 2007-05-28

作者简介 姜红 (1981 ~) ,女,山东青岛人,硕士生,主要从事微生物生态学研究. E-mail :sdjh1981@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail :zhaoyj@mail.ccnu.edu.cn

Foundation item :The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30370062 ,30470344)

Received date 2007-01-21 ; **Accepted date** 2007-05-28

Biography JIANG Hong , Master , mainly engaged in microbiological ecology. E-mail :sdjh1981@163.com

广泛存在、含量丰富,并具有重要的生态学功能^[2-4]。2005 年在澳大利亚的 Lake Baroon 发现了多株能够裂解产毒铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的噬藻体,实验结果显示这类噬藻体可以控制铜绿微囊藻的生物量,并且在类似 Lake Baroon 的淡水中,这类噬藻体可能是控制铜绿微囊藻的最主要的自然因子^[5]。2006 年有报道在日本分离得到一株可以裂解铜绿微囊藻的噬藻体,实验结果同样显示这类噬藻体可以有效控制铜绿微囊藻水华^[6]。

本实验室于 2002 年报道了我国首株在淡水中分离的噬藻体 PP,因其可特异性感染鲍氏织线藻 (*Plectonema boryanum* IU594) 和坑形席藻 (*Phormidium foveolarum* IU427) 而命名为噬藻体“PP”^[7]。目前本实验室已经对其生物学、生态学分布等方面开展了较全面的研究,结果表明:噬藻体 PP 广泛存在于富营养水体的湖泊中,且含量丰富,并具有重要的生态学意义。在检测的 6 个代表极富营养、重富营养、中富营养水平湖泊中,都有噬藻体 PP 存在,且其效价在 9 月份可达 $10^3 \sim 10^4$ PFU·L⁻¹ (PFU, plaque-forming units)^①。以往本实验室对噬藻体 PP 增殖的研究都是在实验室中完成的,所用的宿主是实验室培养的鲍氏织线藻,实验室培养的鲍氏织线藻与噬藻体 PP 的野生宿主存在很大的差异,以噬藻体 PP 的野生宿主作为研究对象,在类似野外的自然环境条件下研究噬藻体 PP 的增殖,将更接近噬藻体 PP 的真实情况。

1 材料与方法

1.1 材料

鲍氏织线藻 (*Plectonema boryanum* IU594) 来自中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心,在 28℃、2000lx 的条件下使用 AA 培养基进行持续光照培养^[8]。噬藻体“PP”,为本实验室分离得到的一株淡水噬藻体^[7],保存在 4℃ 冰箱中。野生宿主为一种丝状蓝藻,不能在实验室条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 水样采集

2006 年 9 月 24 日、25 日,分别从武汉东湖的庙湖 (30°31.60N, 114°22.15E) 采集水样 4000ml,分别用来测定野生宿主藻细胞的密度、噬藻体 PP 对野生宿主藻的吸附率、潜伏期及释放量。

1.2.2 野生宿主藻细胞密度的测定

取已知效价的噬藻体 PP 悬液 (10^9 PFU·ml⁻¹) 10 ml 感染 100 ml 采集的水样,对照组为加入 10ml 灭活噬藻体 PP 悬液的 100ml 水样。将实验组和对照组均置于 28℃、2000lx 的光照培养箱中培养,并分别在培养 0、6h 时,用清洁注射器取 10 ml 水样,用 0.45μm ($D = 25$ mm) 的醋酸纤维膜过滤,使藻细胞截留在该滤膜上,然后用荧光显微计数法 (Olympus SH-2, 选用 610nm 的滤光片) 观察计数,每张膜片取 5 个视野,计丝状藻的数量和长度,并求其平均数,所有实验均设 3 个平行。按照如下公式计算宿主藻细胞密度:

$$\text{宿主藻细胞密度} = (\text{实验组第 0 小时时的藻细胞密度} - \text{实验组第 6 小时时的藻细胞密度}) - (\text{对照组第 0 小时时的藻细胞密度} - \text{对照组第 6 小时时的藻细胞密度})$$

1.2.3 噬藻体 PP 对野生宿主藻吸附率的测定

2006 年 9 月 24 日,将 3000ml 采自武汉东湖的天然水样 (宿主藻细胞密度为 1.01×10^5 cell·ml⁻¹),黑暗剧烈震荡培养 6h,加入已知效价的噬藻体 PP 至终浓度为 1.34×10^3 PFU·ml⁻¹ (此浓度即为噬藻体 PP 吸附的初始效价 P_0),然后将其分装到 3 个 1000ml 烧杯中后,水浴控温 28℃,在日光下培养,实验样品上方覆盖一层防紫外线的 3M 膜 (型号为 3535,其对紫外光的透过率小于 1%,对可见光的透过率大于 60%),以排除紫外光对噬藻体 PP 的失活作用,分别于 15、30、60min 时取样 30ml,12000g,10min 离心,洗涤两次,弃上清,以除去游离的噬藻体 PP,成功吸附到宿主藻细胞上的噬藻体 PP 离心后则留在沉淀藻细胞中。用 PFU 法^[9]测噬藻体 PP 效价时,为了清楚地在平板上观察计数噬藻斑,需要将沉淀的藻细胞用 0.5ml 灭菌的天然水样重新悬浮后,加入到 0.5ml 细胞密度为 10^7 cell·ml⁻¹ 的鲍氏织线藻液中后倒上层平板,24h 后纪录噬藻斑的个数 P_1 。按

① 邓凤霞. 噬藻体 PP 的时空分布研究. 华中师范大学. 硕士学位论文. 2005

照以下公式计算噬藻体 PP 的吸附率 $A = P_1/P_0$,其中 A 为吸附率 ,以百分数的形式表示 ; P_1 为沉淀藻细胞中噬藻体 PP 的效价 ; P_0 为噬藻体 PP 的初始效价。

1.2.4 噬藻体 PP 裂解野生宿主藻的潜伏期及释放量的测定

2006 年 9 月 25 日 将采自武汉东湖的 3000ml 天然水样 ,10000g ,10min 离心浓缩 ,使宿主藻的浓度为 $1.01 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$,加入已知效价的噬藻体 PP ,使其终浓度达到 $1.98 \times 10^4 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$,静置感染 15min 后 ,10000 g ,10 min ,离心洗涤两次 ,定容至 300ml ,取其中 5 ml 用于测噬藻体 PP 的效价 ,将它作为 (计算)噬藻体 PP 释放量的初始效价 ;取其中 285 ml 平均放入 3 个 100ml 小烧杯中 ,水浴控温 28℃ ,在日光下培养 ,实验样品上方覆盖防紫外光的 3M 膜 ,同时用磁力搅拌器搅拌水样 ,以防止噬藻体 PP 发生二次吸附。分别于 0 ,30 ,60 ,90 ,120 ,160 ,180min 时取样 5ml , (静置感染的 15min 计算在潜伏期内) ,用 PFU 法测噬藻体 PP 的效价。

根据各时间点得到的噬藻体效价绘出噬藻体 PP 感染野生宿主藻的一步生长曲线 ,根据曲线得到噬藻体 PP 裂解野生宿主的潜伏期和释放量。

2 结果与分析

2.1 室外实验光强度变化的测定结果。

2.2 噬藻体 PP 对野生宿主的吸附结果

从图 2 可以看出 ,噬藻体 PP 的初始效价为 $1.34 \times 10^3 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$,第 15 分时测得的噬藻体对野生宿主的吸附率为 0.29‰ ,第 30 分时测得的噬藻体 PP 的吸附率为 1.13‰ ,第 60 分时测得的噬藻体 PP 的吸附率为 1.79‰。实验中噬藻体 PP 对野生藻的吸附率持续上升 ,并且 ,从本实验中得不到噬藻体 PP 的饱和吸附率。

2.3 噬藻体 PP 感染野生宿主藻的释放量结果

从噬藻体 PP 感染野生藻的一步生长曲线 (图 3)上得出 ,噬藻体感染的潜伏期小于 75min ,大于或等于 45min。实验中测得噬藻体 PP 的初始效价为 $5.44 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$,105min 时游离在水中的噬藻体的效价达到 $185.33 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$,由此可得出噬藻体 PP 的平均释放量为 $34.32 \text{ PFU} \cdot \text{Cell}^{-1}$ 。

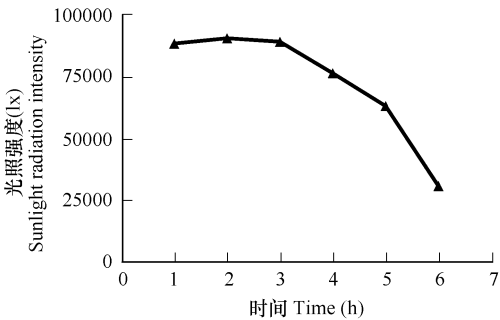


图 1 室外实验光强变化图

Fig.1 The change of sunlight radiation intensity in this experiment

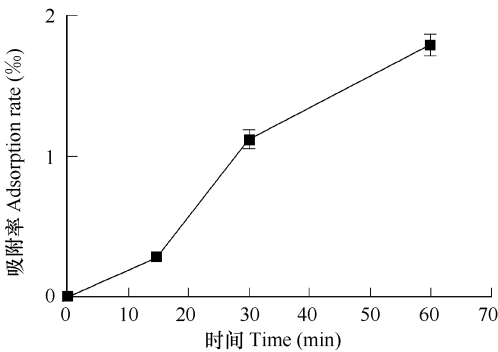


图 2 噬藻体对野生宿主的吸附曲线

Fig.2 Adsorption curve of cyanophage to host cell

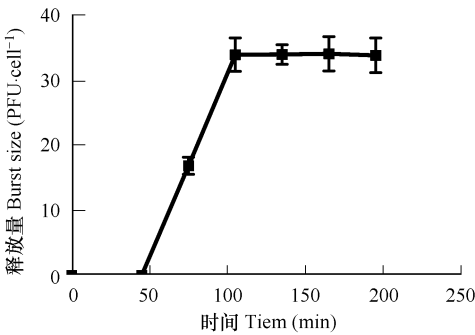


图 3 噬藻体感染野生宿主的一步生长曲线

Fig.3 One-step growth curves of cyanophage

3 讨论

过去 10 余年中 ,人们发现噬藻体在水中 ,尤其是海水中分布广泛、含量丰富 ,并通过控制聚球藻的生物量和水华消长而具有生物地球化学循环的重要生态学意义^[2]。对我国淡水噬藻体的分布和调查显示 ,噬藻体 PP 的分布较为广泛 ,而且含量丰富 ,裂解性强^[10]。推测噬藻体 PP 应具有重要的生态学意义。

病毒成功吸附到宿主上,是病毒进行增殖的第一步,噬藻体接触宿主并发生吸附的频率受很多因子的影响,其中,噬藻体和宿主的浓度被认为是最重要的因素之一,当噬藻体的浓度低于某一阈值时,噬藻体的失活速率就会超过其与宿主的接触速率,从而导致病毒数量的下降。有试验表明,只有当宿主细胞浓度达到 $10^4 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,噬菌体才会增殖,但也有人认为,在宿主细胞浓度低于 $10^2 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,噬菌体仍可以成功的吸附增殖。对海水聚球藻病毒的研究表明,只有当总聚球藻浓度大于 $10^3 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,聚球藻病毒的数量才会增加。Alexander^[11]等则提出病毒和宿主细胞的浓度乘积大于 10^{12} ml^{-1} 时,才可以发生明显的吸附。本次吸附实验中用的野生宿主藻的浓度为 $1.01 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$,加入的噬藻体 PP 的初始浓度为 $1.34 \times 10^3 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$,结果显示,噬藻体 PP 发生了明显的吸附。

比较几种不同病毒的吸附力大小时,通过比较吸附率是其中的一个方面,在不同的病毒、宿主浓度感染的条件下,比较其吸附系数更能够准确地反映某种病毒的吸附能力。病毒对宿主细胞的吸附系数可以通过下面的公式得到:

$$A_s = AR^{[12]}$$

$$R = (Sh2\pi dD_v)VP^{[11]}$$

式中, A_s 为吸附率 ($\text{VLPs} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$); A 为吸附系数:吸附率占最大接触率的百分数; R 为最大接触率 ($\text{VLPs} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$); Sh 为 Sherwood 常数 1.53; d 为宿主细胞的直径 (cm); D_v 为病毒的扩散率 ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) 5×10^{-8} ^[11]; V 为病毒浓度 ($\text{VLPs} \cdot \text{ml}^{-1}$); P 为宿主细胞浓度 ($\text{Cell} \cdot \text{ml}^{-1}$)。

本实验中测得的噬藻体对野生藻的 30min 时的吸附率为 1.13%,测得野生藻的平均直径为 $1.6 \mu\text{m}$,根据上述公式计算得其吸附系数为 8.09%,王春艳等^[13]以鲍氏织线藻作为噬藻体 PP 的宿主,采用相同的实验方法,设置鲍氏织线藻的浓度为 $10^7 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$,噬藻体浓度为 $5 \times 10^4 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$,测得其 30min 的吸附率为 28.0%,鲍氏织线藻的平均直径为 $2.5 \mu\text{m}$,计算得其吸附系数为 12.95%。通过比较二者的吸附系数得出,与野生宿主相比,噬藻体 PP 更容易吸附到鲍氏织线藻上,产生这种结果的原因可能是由野生藻与鲍氏织线藻不同的形态大小及不同的生长状态引起的。镜检发现野生藻与鲍氏织线藻大小有明显的差距。王春艳^[15]等的研究表明,噬藻体对不同生长状态下的鲍氏织线藻的吸附率不同,随织线藻生长的持续,噬藻体的吸附率不断上升,至稳定期时达到最大。在自然环境中,浮游微生物种群的延续总是由短暂的快速生长和期间长时间的停滞组成^[14]。另外也有资料证明,病毒的吸附系数在不同营养背景的水体中取值不同,如在远海的贫营养环境中,吸附系数约为 18%~34%,在近海营养程度较丰富的水体中,吸附系数接近 1.0%^[15]。本实验的采样点为重度富营养化水体,实验中得到的吸附系数比近海营养程度较丰富的水体中得到的吸附系数要大得多,这可以说明与其它种类的病毒相比较,噬藻体 PP 更容易吸附到宿主上,实现其快速增殖的目的。

本实验室以前对噬藻体 PP 裂解鲍氏织线藻 (IU 594) 的裂解周期及释放量的研究结果^[16]与本试验得出的结果有较大差异。噬藻体 PP 裂解鲍氏织线藻 (IU 594) 的释放量为 $206 \text{ PFU} \cdot \text{Cell}^{-1}$,潜伏期为 3h,裂解期为 1h,而本次试验的结果显示噬藻体 PP 裂解野生宿主的释放量为 $34.32 \text{ PFU} \cdot \text{Cell}^{-1}$,感染的潜伏期小于 75min,大于或等于 45min,裂解期为 1h。推测造成这一差异的主要原因是由宿主的种类和其生长状态的差异造成的。通过显微镜观察,发现野生宿主藻的景观长度明显小于实验室条件下培养的鲍氏织线藻,而 Weinbauer^[17]等人则发现,宿主细胞体积和病毒的释放量之间存在着显著的正相关性,宿主体积越大,其病毒的释放量就越大,而且病毒粒子越小 (30~60nm) 情况就越吻合。而噬藻体 PP 头部直径仅为 52 nm ^[7],恰好处于小颗粒病毒范围。此外,也有证据表明当宿主有着充分的营养供给或处于旺盛的生长状态时 (如在实验室的培养条件下),其被病毒感染后的释放量也较高,相反,如果宿主是处于半饥饿或生长停滞的状态下 (如在野外自然条件下),其被病毒感染后的释放量就较低,甚至难于被成功感染。Børshheim^[18]曾利用一步生长曲线测得 26 种噬菌体的平均释放量为 $185 \text{ PFU} \cdot \text{Cell}^{-1}$,结果明显高于环境中估算的释放量。通过对其他种类的丝状蓝藻病毒的研究发现,其一般都是在 3~5h 内完成感染并释放出大量的病毒粒子^[19]。

综上所述,本次实验在日光照射下 (排除紫外光导致的噬藻体 PP 的失活),通过人工控温,获得了噬藻体

PP 对野生宿主藻的吸附率及一步生长曲线。实验结果显示 :与其它种类的噬藻体野外实验的结果相比 ,噬藻体 PP 对野生宿主藻的吸附系数高、裂解周期短 ,有助于噬藻体 PP 种群的维持 ,解释了水体中 ,尤其是富营养化水体中噬藻体 PP 大量存在的原因。然而本次实验的结果与实验室条件下的结果有明显的差异 ,说明基于自然条件和野生宿主的试验对研究包括噬藻体在内的浮游病毒的生态学是不可替代的。

References :

[1] Fuhrman J A , Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature ,1999 ,399 :541 — 548.

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

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

[4] Berch O K , Borseim K Y , Bratbak G , *et al.* High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature ,1989 ,340 :467 — 468.

[5] Stepen T , Peter P. Identification of Cyanophage Ma-LBP and infection of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from an Australian subtropical lake by the virus. Appl Environ Microbiol ,2005 ,71 :629 — 635.

[6] Takashi Yoshida , Yukari Takashima , Yuji Tomaru , *et al.* Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Appl and Environ Microbiol ,2006 ,72 :1239 — 1247.

[7] Zhao Y J , Cheng K , Shi Z L , *et al.* The first Cyanophage strain separation and identification in China. Natural Science Progress ,2002 ,12 (9) : 923 — 927.

[8] Carr N G , Xu L , Cheng K , *et al.* Notes on isolation and laboratory culture In :The biology of Blue-Green Algae. Berkeley :Blackwell Scientific Publications ,1973 ,525 — 531.

[9] Paul J H , Rose J B , Jiang S C , *et al.* Coliphage and indigenous phage in Mamala Bay , Oahu , Hawii. Appl Environ Microbiol ,1997 (1) ,63 :133 — 138.

[10] Guo Y X , Cheng K , Zhao Y J , *et al.* The distribution and infectivity of cyanophage and other algae-lysin factors in fresh water. China Environmental Science ,2003 ,23 (2) :167 — 170.

[11] Alexander G M , George A J. Viral dynamics :a model of the effects size ,shape ,motion and abundance of single-celled planktonic organisms and other particles. Mar Ecol Prog Ser ,1992 ,89 :103 — 116.

[12] Steward G F , Smith D C , Azam F. Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi seas. Mar Ecol Prog Ser ,1996 , 131 :287 — 300.

[13] Wang C Y , Guo Y X , Cheng K , *et al.* The correlation of host’s growth stage with enlargement of plaque and adsorption rate of cyanophage. Acta Hydrobiologica Sinica ,2003 ,27 (6) :660 — 663.

[14] Wommack K E , Rita R C. Virioplankton :Viruses in Aquatic Ecosystems. Microbiology and Molecular Biology Reviews ,2000 ,64 (1) :1092 — 2172.

[15] Steven W. Wilhelm , Markus G , Weinbauer Curtis A , *et al.* The role of sunlight in the removal and repair of viruses in the sea. Limnol. Oceanogr. ,43 (4) ,1998 .586 — 592.

[16] Cheng K , Wang C Y , Guo Y X , *et al.* Measurement of lysing cycle and burst size of cyanophage infecting filamentous cyanobacteria (blue-green algae). Virologica Sinica ,2002 ,17 (4) :374 — 376.

[17] Weinbauer M G , Hofle M G. Size-specific mortality of lake bacterioplankton by natural virus communities. Aquat Microb Ecol ,1998 ,15 (2) :103 — 113.

[18] B rsheim K Y. Native marine bacteriophages. Fems Microbiol Ecol ,1993 ,102 :141 — 159.

[19] Adolph K W , Haselkon R. Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga of the genus *synechococcus*. Virology ,1973 ,54 : 230 — 236.

参考文献 :

[7] 赵以军 程凯 石正丽 等. 我国首株噬藻体 (蓝藻噬藻体)的分离与鉴定. 自然科学进展 2002 ,12 (9) 923 ~ 927.

[10] 郭亚新 程凯 赵以军 等. 淡水噬藻体及其他溶藻因子的分布与感染力. 中国环境科学 2003 23 (2) :167 ~ 170.

[13] 王春艳 郭亚新 程凯 等. 噬藻斑扩大及噬藻体吸附率与宿主生长期的关系. 水生生物学报 2003 27 (6) 660 ~ 663.

[16] 程凯 王春艳 郭亚新 等. 感染丝状蓝藻的噬藻体的裂解周期和释放量的测定. 中国病毒学 2002 17 (4) 374 ~ 376.