

研究简报

## 噬藻斑扩大及噬藻体吸附率与宿主生长期的关系

王春艳<sup>1</sup> 郭亚新<sup>1</sup> 程 凯<sup>1</sup> 赵以军<sup>1</sup> 石正丽<sup>2</sup>

(1 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079; 2 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

### THE CORRELATION OF HOST'S GROWTH STAGE WITH ENLARGEMENT OF PLAQUE AND ADSORPTION RATE OF CYANOPHAGE

WANG Chunyan<sup>1</sup>, GUO Yaxin<sup>1</sup>, CHENG Kai<sup>1</sup>, ZHAO Yijun<sup>1</sup>, SHI Zhengli<sup>2</sup>

(1 College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079;

2 Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

关键词: 噬藻体; 噬藻斑; 吸附; 鲍氏织线藻; 生长期

Key words: Cyanophage; Plaque; Adsorption; *Plectonema boryanum*; Growth stage

中图分类号: Q949.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)06-0660-04

蓝藻是地球上最重要的初级生产者之一, 它们在北极水域等极端环境下均可生存, 固氮贡献巨大<sup>[1]</sup>, 而噬藻体是重要的具物种特异性的蓝藻致死者, 在控制蓝藻种群的结构中无疑起着重要作用: 噬藻体不但在海水中大量存在<sup>[2]</sup>, 而且在控制水体初级生产力方面起关键作用, 它们可降低海洋 78% 的初级生产力<sup>[3]</sup>, 控制海洋中有机碳的循环<sup>[4]</sup>。

尽管海洋噬藻体的生态学已经成为近年来的研究热点, 但相比之下, 人们对淡水噬藻体的生态地位的认识却还很缺乏。淡水中研究最多的是裂解织线藻的 IPP 噬藻体<sup>[5]</sup>, 它不仅具有较强的裂解效力, 而且在全球的淡水水体中广泛分布<sup>[6]</sup>, 无疑这类噬藻体在水体中能够维持较大的种群数量一定存在某种独特的机制, 而这个维持的机制很可能是与宿主藻的生长状态有关<sup>[7]</sup>。长期以来, 在实验室内研究噬藻体感染和增殖的报道几乎都是以快速生长的细胞为对象, 但在自然环境中, 宿主蓝藻在其生活的大部分时间都是处于缓慢生长或饥饿状态的, 这种状态通常都被认为和标准细菌生长曲线的稳定期差不多<sup>[7]</sup>, 那么宿主藻和噬藻体的种群数量如何实现平衡的? 为了回答这个问题, 作者以裂解织线藻的噬藻体为材料, 分别研究了液体和固体培养条件下噬藻体对不同生长期的宿主的吸附与裂解。

#### 1 材料和方法

**1.1 材料** 噬藻体是 2001 年从武汉市的富营养化池塘中分离得到的, 可特异性感染鲍氏织线藻 (*Plectonema boryanum*

IU594) 和坑形席藻 (*Phormidium foveolarum* IU427), 它不仅分布很广, 而且裂解力也很强<sup>[8]</sup>。本次试验中所使用的鲍氏织线藻 IU594 来自于中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心, 使用 AA 培养基培养宿主蓝藻<sup>[9]</sup>。

**1.2 噬藻斑与织线藻生长的相关性** 取鲍氏织线藻 (藻细胞浓度为  $10^7$  cell/mL) 制成琼脂浓度为 1.5% 固体 AA 平板, 在光照培养箱中培养 (光照强度为  $2.5 \times 10^{-2} \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 光暗比为 16:8, 培养温度为 28℃) 1d 后, 用毛细吸管将  $1 \times 10^2$  PFU/mL 的噬藻体悬液点样于上述固体平板的中心, 继续倒置培养。每 24h 将平皿图像扫描进计算机, 用 photoshop 5.0 的绿色通道取平皿上多处位置的绿色分量强度值, 用其平均值指示藻的生长, 同时测量噬藻斑的直径。以上试验均设 3 个重复。

**1.3 鲍氏织线藻生长曲线的测定** 用 AA 培养基在 1.2 所述的条件下进行液体静置培养 (500mL), 每天取 5mL 藻液, 经针头过滤器过滤后, 用 95% 乙醇提取叶绿素 a, 使用岛津 UV2401PC 紫外分光光度计测定提取液在 665nm, 645nm, 630nm 处的吸收值, 参照 Eley 的公式<sup>[10]</sup> 计算叶绿素 a 含量, 持续 40d, 重复 2 次。结果显示鲍氏织线藻的生长可分为 3 个时期: 1—7d 为延迟期, 7—11d 为对数期, 11d 后为稳定期。在吸附试验中选择了第 4, 第 7, 第 10, 第 12, 第 26, 第 40d 的藻分别代表延迟期、对数期早期、对数期中期、稳定期早期、稳定期中期和稳定期晚期的宿主。

**1.4 噬藻体吸附率的测定** 将藻液适当浓缩使其浓度为  $10^7$  cell/mL, 然后与一定体积的噬藻体悬液 ( $5 \times 10^7$  PFU/mL) 混

收稿日期: 2002-07-22; 修订日期: 2003-02-20

基金项目: 中国科学院院长基金项目、武汉市科技攻关项目; 国家自然科学基金 (39600004) 资助项目

作者简介: 王春艳 (1982—), 女, 四川达县人, 现为中国科学院水生生物研究所硕士生

通讯作者: 赵以军, Email: pyjzhao@263.net; 石正丽, Email: zlshi@pentium.whioiv.ac.cn

合,使噬藻体效价与藻细胞数量的比值(MOI,Multiplicity of Infection)为1:10<sup>3</sup>(PFU:Cell),于28℃下避光静置,于5min、10min、15min、30min、60min、120min时取样,分别用氯仿处理法和离心法测量未吸附的噬藻体效价并进行比较。氯仿处理法的过程为:向上述样品中加入1/10体积的氯仿,剧烈振荡5min,静置分层后,取上清用PFU法<sup>[11]</sup>测量其噬藻体效价。离心处理法的过程为:将样品10000g/min离心5min沉降藻细胞,用PFU法测量上清中的噬藻体效价。测得的噬藻体效价可通过以下公式换算成噬藻体的吸附率:吸附率%=(1-上清中的噬藻体效价/噬藻体的初始效价)×100%。结果为用氯仿处理法测得30min和120min时的吸附率分别为61.4%和66%,离心法的结果则分别为28.0%和57.4%。可见氯仿处理法比离心法得到的吸附率要高,而造成这一现象的原因,很可能是由于10000g/min 5min的离心条件不足以使全部的藻细胞完全沉淀,因此在以后的试验中选用氯仿处理法来测量噬藻体的吸附率。

1.5 噬藻体对不同生长时期藻细胞吸附曲线的测量 取不同生长期的藻液,经浓缩或稀释后将细胞浓度调整为10<sup>7</sup>cell/mL,用1.4中所述的氯仿处理法测定噬藻体在5—120min的吸附率。所得的结果用SPSS10.0的Onaway ANOVA(LSD)过程进行方差分析和多重比较。

1.6 光吸附与暗吸附的比较 取对数期织线藻,将细胞浓度调整为10<sup>7</sup>cell/mL后,分别在遮光和给光(光强为25μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)条件下用1.4中所述的氯仿处理法测量5—120min的吸附率。

2 结果

2.1 织线藻生长与噬藻斑扩大的相关性

由图1可明显看出织线藻生长和噬藻斑扩大的曲线趋势是一致的。相关分析也表明两者呈极显著相关(P=0),也就是说噬藻斑的扩大与藻的生长之间有明显的同步性。从

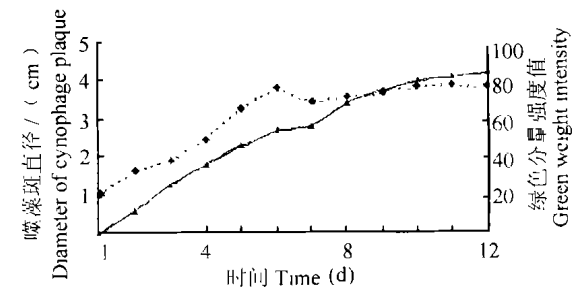


图1 织线藻生长(◆·····)与噬藻斑扩大(→)的曲线  
Fig.1 Growth curve of plectonema and cyanophage plaque

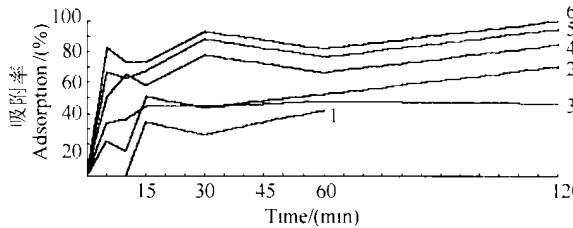


图2 噬藻体对不同生长时期织线藻的吸附曲线  
Fig.2 Adsorption curve of cyanophage to host cells at different growth stage  
1 延迟期 2 对数期早期 3 对数期中期 4. 稳定期早期  
5 稳定期中期 6. 稳定期晚期

第1d至6d,藻的生长较快(平均生长速度为9.3绿色分量强度值/d)相应噬藻斑的扩大也较快(平均扩大速度为4.3mm/d);当藻培养至第6d,藻的生长停止,噬藻斑也暂时停止扩大,到第7d时,藻又有小幅的生长,当天的噬藻斑也扩大了。从第8d到第12d,藻的生长较慢(平均生长速度为0.8绿色分量强度值/d),相应噬藻斑的扩大也较慢(平均扩大速度为1.3mm/d)。长至12d时,藻已发黄,此时噬藻斑也停止扩大了。试验中,还发现:在培养6d的固体平板上分别用毛细吸管点上浓度为10<sup>2</sup>PFU/mL和10<sup>7</sup>PFU/mL的噬藻体悬液,前者不形成噬藻斑(但在仅培养1d的织线藻平板上10<sup>2</sup>PFU/mL的噬藻体悬液是可以成斑的),而后者形成噬藻斑。

表1 噬藻体对不同生长期织线藻吸附率差异  
Tab.1 Difference of the adsorption rate of cyanophage to host cells at different growth stage

显著水平 Significant level	稳定期晚期 Latter stationary stage	稳定期中期 Middle stationary stage	稳定期早期 Early stationary stage	对数期中期 Middle exponential stage	对数期早期 Early exponential stage
延迟期	0.000**	0.000**	0.000*	0.012*	0.011*
对数期早期	0.000**	0.000**	0.005*	0.980	
对数期中期	0.000**	0.000**	0.004*		
稳定期早期	0.072	0.315			
稳定期中期	0.406				

\* P<0.05; \*\* P<0.01.

2.2 噬藻体对不同生长时期的宿主细胞的吸附率的比较

图 2 可见, 不同生长期的织线藻对噬藻体的吸附曲线是明显不同的, 方差分析的结果(表 1) 也表明噬藻体对延迟期、对数期和稳定期宿主的吸附率存在显著差异, 也就是说不同生长期的宿主的吸附动力学过程是不同的: 随着织线藻培养的持续, 噬藻体对宿主藻的吸附速度不断提高, 饱和吸

附率不断上升, 达到饱和吸附的时间也不断延长(表 2)。

2.3 光吸附与暗吸附的比较

由表 3 可见, 光照条件下的吸附率明显高于暗吸附, 且光吸附在 7min 时即达到饱和, 而暗吸附则延长至 15min 才达到饱和, *t* 检验的结果也显示两组数据之间存在极显著差异 ( $P=0.02$ )。

表 2 噬藻体对不同时期宿主吸附特征的比较			
Tab. 2 The comparison of the cyanophage's adsorption characters to host cells at different growth stage			
	开始 15min 的平均吸附速率 <sup>a</sup> Average adsorption speed at the beginning 15 min	1h 吸附率 <sup>b</sup> Adsorption rate at 1h	吸附达饱和的时间 Time required for stable adsorption
延迟期 Delay stage	2.3%/min	42.0%	15min
对数期 Exponential stage	3.0—3.4%/min	47.4%—52.0%	15min
稳定期 Stationary stage	3.8—4.8%/min	66.0%—80.6%	30min

a 用 15min 时的吸附率除以 15min。Calculated by divided adsorption rate at 15 min by 15min.

b 代表噬藻体达到饱和吸附的水平。Stand for the stable adsorption rate.

表 3 光吸附与暗吸附试验结果比较						
Tab. 3 Comparison of adsorption rate with and without light						
吸附率 Adsorption rate	7min	10min	15min	30min	60min	120min
暗吸附 Dark adsorption	35.0%	36.6%	44.6%	44.6%	47.4%	46.0%
光吸附 Light adsorption	83.4%	80.8%	78.0%	78.0%	86.0%	85.4%

3 讨论

有证据表明, 噬菌体对不同生长期的宿主的感染能力是不同的, 通常, 当宿主处于饥饿状态或进入生长的稳定期后, 由于宿主抵抗力的增强, 噬菌体的感染能力就会下降(如潜伏期的延长和释放量的减少)<sup>[12]</sup>, 只有对快速生长的细胞和衰老细胞都具有感染力的噬菌体才能够形成不断扩大的噬菌斑<sup>[13]</sup>。(图 1) 显示噬藻斑的扩大到某一时期就停止了, 说明噬藻体对不同生长期的宿主的感染力是有差别的: 对数期的宿主较易被感染, 而稳定期和衰亡期的细胞则难于被裂解。由于在自然环境中, 即使是在生产力最高的水体中, 浮游微生物也总是处在饥饿-饱相间的状态之中, 也就是说浮游微生物种群的延续总是由短暂的快速生长和其间的长时间的停滞组成的<sup>[7]</sup>。而病毒对饥饿宿主的延迟的裂解效应, 甚至是直到细胞分裂才发生的增殖, 使得子代病毒能够选择只在宿主的快速生长期才释放, 从而既能够使病毒自身的种群

得以延续, 又能够对宿主数量进行控制。

吸附是噬藻体感染的第一步, 以前主要侧重于研究不同浓度的宿主与噬藻体发生接触的机率及光照、温度和  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等二价阳离子对吸附的影响, 而噬藻体对不同生长期的宿主的吸附的研究则较为缺乏。Hilla 等人研究了 T4 噬菌体对不同状态的大肠杆菌的吸附情况, 发现宿主细胞的生长速度越快, 则噬菌体的吸附就越容易发生<sup>[14]</sup>, 他们推测造成这一现象的原因是快速生长的细胞具有更大的表面积, 可以提供更多的受体位点与噬菌体发生特异性吸附。噬藻体对不同生长期的织线藻的吸附是不同的(图 2、表 1), 随着织线藻生长的持续, 噬藻体的吸附率不断上升, 最终达到的吸附水平也不断提高, 至稳定期时达到最大, 且此时吸附达到稳定所需的时间也最长(图 2、表 2), 这很可能与织线藻细胞表面的病毒受体位点的数量变化有关。

将固体培养基上噬藻斑的扩大和液体培养中噬藻体对不同生长期的宿主的吸附二者的结果结合起来分析, 可以看

出噬藻体对衰老宿主的感染力下降显然不是由于无法正常吸附到细胞表面,而应该是在噬藻体的大分子合成和装配等感染步骤上出现了异常,如发生溶源化或假溶源化等<sup>[7]</sup>。

Cseke 等人研究了光照对 AS-1 噬藻体吸附力的影响,发现暗吸附的效率显著低于光吸附,可见光照对吸附是十分重要的。而造成这一现象的原因是很可能由于光照会造成细胞表面发生电中和<sup>[15]</sup>。

由于噬藻体(特别是淡水噬藻体)的生态研究在国内外开展得很不充分,对噬藻体生态地位的认识也有待更进一步,所以这方面研究的持续深入是极有必要的。下一步,将就噬藻体对饥饿细胞的感染力(包括吸附、潜伏期、释放量等诸多指标)进行全面的研究。

参考文献:

[ 1 ] Zhang X K, Dai L F, Dai HP. N<sub>2</sub> fixing of cyanobacteria and its biological effects [ M ]. Chian Algology Research. Wuhan: Wuhan publisher, 2001, 212—222[ 张宪孔, 戴玲芬, 戴和平. 蓝藻的固氮及其生物学意义. 中国藻类学研究. 武汉: 武汉出版社, 2001, 212—222]

[ 2 ] Bergh O. High abundance of viruses found in aquatic environments [ J ]. *Nature*, 1989, **340**: 467—468

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

[ 4 ] Fuhrman, J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects [ J ]. *Nature*, 1999, **399**( 6736 ): 541—548

[ 5 ] Zhao Y J, Shi Z L, Huang G J, et al. Blue green algal viruses (Cyanophage) [ J ]. *Virologica Sinica*, 1999, **14**( 2 ): 100—105[ 赵以军, 石正丽, 黄国锦等. 蓝藻病毒(噬藻体)的研究进展. 中国病毒学, 1999, **14**( 2 ): 100—105]

[ 6 ] Singh S. Cyanophages, A Unique group of cyanobacterial viruses: present status and future prospects [ M ]. *Algal Ecology: An Overview*. Dehra dun: International Book Distributors, 1995, 381—400

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

[ 8 ] Zhao Y J, Cheng K, Shi Z L, et al. First report of isolation and identification of cyanophage (Blue green algal virus) in China [ J ]. *Progress in Natural Science*, 2002, **12**( 9 ): 923—927[ 赵以军, 程凯, 石正丽等. 我国首株噬藻体(蓝藻病毒)的分离与鉴定. 自然科学进展, 2002, **12**( 9 ): 923—927]

[ 9 ] Richard W C. Culturing methods for cyanobacteria [ M ]. San Diego, California: Academic Press, 1988, 68—92

[ 10 ] Eley J H. Effect of carbon dioxide concentration on pigmentation in the blue green alga *Anacystis nidulans* [ J ]. *Plant & Cell Physiol*, 1971, **12**: 311—316

[ 11 ] Suttle C A. Aquatic Microbial Ecology [ M ]. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993, 121—134

[ 12 ] Probst Ricciuti, C. Host virus interactions in *Escherichia coli*: effect of stationary phase on viral release from MS2 infected bacteria [ J ]. *J Virol*, 1972, **10**: 162—165

[ 13 ] Robb F T, Hill R T. Bacterial viruses and hosts: influence of culturable state [ C ]. *Nonculturable microorganisms in the environment*. Washington: ASM Press in press

[ 14 ] Hilla H. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli* [ J ]. *Microbiology*, 1997, **143**: 179—185

[ 15 ] Cseke C S, Farkas G L. Effect of light on the attachment of cyanophage AS-1 to *Anacystis nidulans* [ J ]. *J Bacteriol*, 1979, **137**( 1 ): 667—669