

中文摘要

近年来,噬藻体对蓝藻高度专一的致死性使得它在治理蓝藻水华中的潜在作用引起了高度重视。本论文的研究目的主要是研究南太湖水域浮游植物种群年度变化特点,进而提取能特异性感染优势种群的噬藻体并加以证实。

研究主要通过对南太湖近岸水域连续 12 个月水样的采集和鉴定,分析浮游植物的种群组成、年度变化以及优势种群丰度变化情况,并从水样以及藻细胞中提取噬藻体对蓝藻进行感染,通过藻液的颜色变化证实感染现象的存在,通过生长抑制实验定量检测噬藻体对铜绿微囊藻 912 的感染情况,用 PCR 技术检测噬藻体目的基因,用光镜以及电镜来观察藻细胞感染前后的细胞形态、超微结构改变。

主要结果:

- 1、从 2008 年 11 月到 2009 年 10 月,采集的浮游植物属于蓝藻门、硅藻门、绿藻门、甲藻门、金藻门共 5 门 11 个属,其中微囊藻是该水域的第一大优势种群,鱼腥藻是第二大优势种群。
- 2、7 月份、8 月份水样依次过 0.45 μm 、0.22 μm 滤膜后加入到对数期生长的藻液中,两周后,与对照组相比,铜绿微囊藻 912、鱼害微囊藻 1005、水华微囊藻 1028 的实验组颜色均无明显变化;而浓缩后的 6 月份、7 月份、8 月份水样对铜绿微囊藻 912 藻液均有不同程度的感染现象。
- 3、6 月份、7 月份、8 月份、9 月份水样依次过 0.45 μm 、0.22 μm 滤膜后经梯度稀释加入到对数期生长的铜绿微囊藻 912 藻液中,6 天后,未经稀释的水样对藻细胞生长存在明显的抑制作用。
- 4、6 月份、7 月份的藻细胞噬藻体提取液对对数期生长的铜绿微囊藻 912、鱼害微囊藻 1005 均有不同程度的感染现象,而对水华微囊藻 1028 则无感染现象。
- 5、噬藻体的 PCR 检测显示,浓缩的 6 月份水样的实验组出现了目的条带,大小约为 400bp,其他各组均未出现目的条带。
- 6、铜绿微囊藻 912 被病毒感染之后,细胞变得较为圆滑,不再呈现群体状态,而变得较为分散,细胞膜与细胞器开始分离,细胞膜渐渐溶解,细胞器严重损伤,藻细胞最终裂解死亡。

主要结论:

1. 从 2008 年 11 月到 2009 年 10 月南太湖水域浮游植物共 5 门 11 个属, 呈现多样性特点, 全年蓝藻占优势, 其中微囊藻是全年的优势种群, 鱼腥藻是第二大优势种群。
2. 通过对藻细胞感染前后的显微形态以及超微结构变化, 并通过 PCR 技术对目的基因的定性检测, 证实了南太湖水域中存在能特异性感染铜绿微囊藻 912 的噬藻体。

关键词: 南太湖; 浮游植物; 蓝藻; 微囊藻; 铜绿微囊藻 912; 噬藻体

ABSTRACT

Recently, it has attracted great attention that cyanophage plays a potential role in controlling the algal blooms for high host-specificity. This paper aimed to investigate the annual changes of phytoplankton population, then extract cyanophage that could specifically infect the dominant species and identify it.

In the present study, nearshore water samples of Southern Taihu Lake were collected continuously for 12 months. Then, the composition, annual changes of phytoplankton population and abundance of dominant species were analyzed. Furthermore, cyanobacteria was infected by cyanophage extracted from water samples and algae. Viral infection was confirmed through color changes and cyanophage infection of *microcystis aeruginosa* 912 was detected quantitatively through growth inhibition of cyanobacteria. Meanwhile, the purpose gene of cyanophage was estimated by PCR and morphological changes and ultrastructural changes were detected by optical microscopes and TEM.

Main results:

1. From November 2008 to October 2009, phytoplankton species, belonging to 11 genera of 5 phyla including *Cyanophyta*, *Bacillariophyta*, *Chlorophyta*, *Pyrrophyta*, *Chrysophyta*, were collected. *Microcystis* was the first dominant species and *Anabaena* was the second dominant species.
2. The July's water sample and the August's water sample were successively filtered through 0.45- μm and 0.22- μm membranes and then inoculated into exponentially growing cultures of *Microcystis aeruginosa* 912, *Microcystis ichthyoblabe* 1005 and *Microcystis-flos-aquae* 1028. The cultures were incubated for two weeks. Compared to the control group, no significant color changes were observed in test groups. However, varying degrees of infection could be observed when the June's water sample, the July's water sample and the August's water sample were concentrated.
3. The June's water sample, the July's water sample, the August's water sample and the September's water sample were successively filtered through 0.45- μm and 0.22- μm membranes. Then these water samples by gradient dilution were inoculated into exponentially growing cultures of *Microcystis aeruginosa* 912. Six days later, the growth

of cyanobacteria was significantly inhibited by the water sample without dilution.

4. Varying degrees of infection were observed when the cyanophage extracted from the June's algae and the July's algae was separately incubated into the exponentially growing cultures of *Microcystis aeruginosa* 912 and *Microcystis ichthyoblabe* 1005, but the infection was not observed for *Microcystis-flos-aquae* 1028.

5. The PCR results of the cyanophage showed that purpose gene band of 400bp was only observed in the concentrated June's water sample, but was not observed in others.

6. The cells of *Microcystis aeruginosa* 912 infected by the cyanophage became roundish in shape and dispersed, not in colony. Meanwhile cell membranes and organelles began to separate, cell membranes were dissolved gradually, organelles were damaged severely and cells were finally lysed.

Main conclusion:

1. The phytoplankton population in the Southern Taihu Lake from November 2008 to October 2009 belonged to 11 genera of 5 phyla. In the whole year, *Microcystis* was the first dominant species and *Anabaena* was the second dominant species.

2. It was confirmed that cyanophage that could specifically infect *Microcystis aeruginosa* 912 existed in the Southern Taihu Lake through morphological changes, ultrastructural changes of cyanobacteria before and after infection and qualitative analysis for purpose gene by PCR.

Key Words: Southern Taihu Lake; Phytoplankton population; *Microcystis*; *Microcystis aeruginosa* 912; Cyanophage

插图清单

编号	名称	页码
图 2.1	太湖采样点位置	5
图 2.2	浮游植物种群显微图片	7
图 2.3	浮游植物种群年度变化	8
图 3.1	7 月份水样对蓝藻的感染	18
图 3.2	8 月份水样对蓝藻的感染	19
图 3.3	浓缩的 6 月份水样对蓝藻的感染	20
图 3.4	浓缩的 7 月份水样对蓝藻的感染	21
图 3.5	浓缩的 8 月份水样对蓝藻的感染	22
图 3.6	6 月份水样对蓝藻的生长抑制	23
图 3.7	7 月份水样对蓝藻的生长抑制	24
图 3.8	8 月份水样对蓝藻的生长抑制	25
图 3.9	9 月份水样对蓝藻的生长抑制	26
图 3.10	从 6 月藻细胞提取的噬藻体对蓝藻的感染	27
图 3.11	从 7 月藻细胞提取的噬藻体对蓝藻的感染	28
图 3.12	噬藻体目的基因的 PCR 检测	29
图 3.13	噬藻体感染藻细胞的形态改变	31
图 3.14	噬藻体感染藻细胞的超微结构改变	32

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名: 梁兴飞 签字日期: 2010 年 2 月 28 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

学位论文作者签名: 梁兴飞

导师签名: 邵宇清

签字日期: 2010 年 2 月 28 日

签字日期: 2010 年 2 月 28 日

致 谢

研究生生涯即将结束，离校日期也渐渐迫近，回首两年半的求学经历，有因为实验失败长久的沮丧，也有实验成功瞬间的喜悦；有穿梭于校区间忙碌，也有驻足于太湖边的惬意。一路走来，庆幸有许多师长，亲人，朋友，同学的帮助和鼓励，希望在此之际表达我深深的感恩之情。

首先要感谢我的导师郭宗楼教授，在课题选择和实验研究的整个过程中得到了郭老师的悉心指导和热情帮助，在我攻读硕士研究生期间，也深深受益于郭老师的关心、爱护和谆谆教导。作为老师，循循善诱，点拨迷津，让人如沐春风；作为长辈，关怀备至，身体力行，让人感念至深。郭老师不但使我树立了严谨的科研观念，还使我明白了许多为人处世的道理，在此谨向郭老师表示我最诚挚的敬意和感谢。

其次要特别感谢我的课题指导老师徐立红教授，从实验设计到论文写作，倾注了徐老师大量的心血，两年来，徐老师渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作作风对我产生了深远的影响，时刻激励着我要严格要求自己，不断努力学习，善于发现问题，不要惧怕任何困难，徐老师的教导自己将受益终生。

本论文的顺利完成，离不开各位老师和同学的关心和帮助，在此要感谢分析测试中心黎军英老师在本文电镜实验中给予的支持，感谢梁婧和郑群同学在本文 PCR 实验中提供的帮助，感谢徐进、邢鸣鸾、季林丹、谢蕾、孙瑜、孟冠敏、张亚莉、李覃、王昊、程玉生、吕朝阳、莫涵、胡荣祥、陈亚男等同学和黄朴老师在日常工作和生活中给予的支持和帮助，感谢室友高树晓、蔡红辉、裴明黎、康海权、吴从元、孙铮、胡晟、吴明生、王陪炯、丁晓、胡帅、程伟光在生活上的照顾，伴我度过了难忘的读书生涯。

最后，感谢所有关心和帮助过我的朋友、同学和亲友，感谢我的家人给予我巨大的支持和信心，无论身处何处，都能感受到家人的牵挂和祝福，特别感谢挚友张红芳一直以来的陪伴和支持，一路走来，风雨同舟，在未来的日子，自己一定努力学习和工作，不辜负他们的期望！

梁兴飞

2010 年 2 月

南太湖浮游植物种群季节变化及噬藻体的初步研究

第一章 绪论

蓝藻（或蓝细菌 *cyanobacteria*）是地球上最早出现的光合自养生物，它们利用水作为电子供体，利用太阳能将 CO_2 还原成有机碳化合物，并释放出自由氧。蓝藻是地球上生命系统演化的产物，同时也强烈地影响着地球生命系统的演化，在地球生物圈形成和发展过程中起到了关键性作用（谢平，2007），它极大地改变了岩石圈、大气圈和水圈的物理化学性质。蓝藻的释氧光合作用使大气圈中自由氧缓慢积累，大气圈开始氧化，自由氧分压逐渐增加，为真核生物的起源创造了条件。随着真核生物的到来，大气氧浓度出现了剧烈的增加，建造了一个坚实的臭氧层，并揭开了陆地生命的新纪元。蓝藻作为重要的初级生产者，具有较高的营养价值。固氮蓝藻在维持全球土壤和水体肥力方面起着十分重要的作用(Rai, 1990)。蓝藻在未来食物生产和太阳能转化方面具有潜在的应用价值(Paerl et al., 2001)，尽管如此，蓝藻对人类的危害却依然明显，特别是蓝藻的大量繁殖造成蓝藻水华的爆发，给人们的生活和生产带来了巨大的危害。

近年来，人口的快速增长以及社会经济迅猛发展导致化肥的使用量急剧增加，再加上含磷洗衣粉的大量使用，未经处理的富含 N、P 的生活污水和农业上未被利用的 N、P 等大量排入内陆水体，使全球范围内的水体富营养化现象日趋严重（饶钦止等，1980；朱广伟等，2005），而形成水华的藻类（主要是蓝藻）的大量繁殖正是水体富营养化的重要表征之一。

太湖是中国的第三大淡水湖，地处长江下游、沪宁杭三角中心。以太湖为中心的太湖流域，包括江苏南部、浙江北部和上海市以及安徽省的一小部分，总面积 36500km^2 。流域内有 37 个大中城市以及县级市，其中包括上海、苏州、无锡、常州、嘉兴、湖州等大城市，总人口 4000 万人。近年来，随着经济和社会的发展，大量的污染物被排入太湖水中，引起了大量的污染（黄涟平等，2001；李恒鹏等，2007；苏嫚丽等，2009）。据水质监测数据表明，从 20 世纪 80 年代初期到 1995 年，太湖水域水质呈明显下降趋势，全湖平均总氮、总磷等主要指标较 10 年前增加一倍以上，原来以 2 类水质为主的水体现在已变为 3 类水为主，2 类水水域面积由 69.0% 缩小到

15.0%，3类水由30.0%扩大到70.0%(杨坚波等，2004)。从总体上看，太湖水体表现出明显的富营养化特征，且呈迅速发展的趋势。目前太湖地面水普遍达到3~4类，局部地区已达到5类，富营养化程度则上升了一个半到两个等级。由于富营养化程度的加剧，导致浮游植物大量繁殖，藻类经常爆发，且爆发时间延长，已经由原来的夏季扩展到现在的春、夏、秋3季(王兴民等，2006)，藻类爆发的区域也不断扩大，已由原来的梅梁湖等局部发展到了湖心以及南太湖水域(周小宁等，2007；周立国等，2008)。

太湖蓝藻的演变也经历了漫长的发展历程，20世纪50年代初，太湖的浮游植物以隐藻和硅藻占优势，夏季虽然蓝藻数量最多，但主要由小型种群组成，形成水华的微囊藻数量不多(饶钦止，1961)。1960年，科学家对太湖177个采样点收集的浮游植物分析得出，从个体数来看，西太湖蓝藻占绝对优势，占藻类总量的96.6%，而东太湖以硅藻占绝对优势，占藻类总量的71.8%，蓝藻占9.9%。蓝藻的分布几乎遍及全湖，在西北部比较集中，在蓝藻中以微囊藻和鱼腥藻的数量最多，分布最广(陈洪达等，1965)。20世纪80年代，对太湖的浮游植物种群季节分布显示，太湖夏秋季藻类生物量中蓝藻、硅藻和隐藻平分秋色(孙顺才等，1993)，而20世纪90年代，通过对太湖梅梁湾藻类研究得出，太湖梅梁湾藻类生物量夏季蓝藻(偶尔有绿藻)占据绝对优势(陈宇炜等，1998)，进入21世纪后，蓝藻在太湖全年中占绝对优势(许秋瑾等，2005；Song,et al., 2007；liu,et al., 2008)。

蓝藻的大面积爆发形成了大量的水华，造成了鱼虾的大量死亡。据不完全统计，太湖流域每年因水污染造成的经济损失约为50亿人民币，大规模蓝藻水华的暴发降低了水资源的利用效能，引起了严重的生态问题，许多蓝藻特别是微囊藻属(*Microcystis*)是产毒的，毒素释放到水体中后，败坏了水质，危害了人类及其它生物的健康(Chen et al., 2005；xie et al., 2005)，因此，抑制产毒蓝藻繁衍、防止水华的暴发已经成为关注的焦点。目前，治理蓝藻污染有很多方法，如通过引水、换水稀释水中的污染物质，以此来降低藻类的浓度(华荣生，2001)，但是补水量太小起不到净化作用，而提高补水量又造成资源的大量浪费；另外采用过滤、吸附、机械清除的办法(李秉柏，2007)，虽然从一定程度上起到了治理的效果，但是治标不治本，而且成本较高。而采用一些化学的方法虽然能够及时有效的控制蓝藻的生长，但往往会造成二次污染(和丽萍，2000；尹海川等，2005)。

噬藻体(cyanophage)是一种侵染原核藻类的病毒,是浮游病毒的重要组成部分。噬藻体对宿主蓝藻高度专一的致死性使得它在治理蓝藻水华中的潜在作用引起了研究者的高度重视(Fuhrman, 1999; Tomaru et al., 2004),人们发现在自然发生的蓝藻水华中加入过量的噬藻体能够导致蓝藻的大量减少 (Sherman et al., 1978)。目前,尽管对蓝藻水华的产生机制已经研究了很多,但是最近研究发现,除了光照、温度等物理因子以及 N、P 等化学物质的影响外,大量噬藻体对蓝藻的裂解可能是非常重要的控制蓝藻水华的影响因子(Yukari et al., 2007; Stoddard et al., 2007)。一般来说,蓝藻水华总是保持季节性周期出现,集中出现在早春和晚秋,但是蓝藻水华并不会经常发生,其中一个很重要的因素就是噬藻体在水体微生物群落的更替中扮演了非常重要的角色,潜在地控制了蓝藻的生长。近年来,蓝藻水华频繁暴发,淡水水域中噬藻体的生态作用也越来越受到重视 (Zhao et al., 2002; Stephen et al., 2005; Takashi et al., 2006)。

虽然对噬藻体的生态作用以及分子生物学研究已获得了不少成就,但主要集中于海洋当中,淡水噬藻体的研究很少,尤其是能够裂解引起水华微囊藻的噬藻体并没有太多的报道,因此,研究淡水水域中噬藻体的生态作用对防治蓝藻繁殖有着重要的意义,而提取能裂解微囊藻的噬藻体则是关键的一步。本课题研究的目的是分析南太湖水域浮游植物的种群组成、年度变化特点以及优势种群丰度变化规律,在此基础上,从太湖水体中提取能特异性感染优势种群的噬藻体,研究噬藻体对蓝藻的感染情况,通过对感染前后藻细胞的显微形态、超微结构变化以及 PCR 定性检测来证实噬藻体的存在,为进一步分离和扩培噬藻体提供基础,也为进一步探讨淡水噬藻体的生态作用提供参考。

第二章 南太湖浮游植物种群季节变化

本研究通过对南太湖近岸水域从 2008 年 11 月到 2009 年 10 月连续 12 个月水样的采集、固定以及鉴定,分析该水域浮游植物的种群组成、年度变化特点以及优势种群丰度变化情况,为研究南太湖优势种群变化特点提供参考,也为进一步分离特异性感染优势种群的噬藻体提供实验依据。

2.1 材料

2.1.1 主要试剂

鲁哥氏染液 (Lugol's): 将 6g 碘化钾溶于 20ml 水中,待其完全溶解后,加 4g 碘充分摇动,全溶后加入 80ml 水即可。

2.1.2 主要实验材料和仪器

载玻片,盖玻片,浮游生物网,浮游植物计数框,电子显微镜。

2.2 方法

2.2.1 采样地点

从 2008 年 11 月到 2009 年 10 月共 12 个月,每月采样一次,采样点位于湖州市太湖大坝近岸水域(纬度 $30^{\circ}94' \sim 30^{\circ}97'$, 经度 $120^{\circ}1' \sim 120^{\circ}128'$),如图 2.1 所示。

2.2.2 水样采集及固定

取表层水样 ($<0.5\text{m}$), 4°C 保存并于 24h 内运回实验室,将采集的水样 30ml,充分摇匀后加入 1.5% 鲁哥氏染液固定, 4°C 保存。

2.2.3 浮游植物鉴定

浮游植物鉴定由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库完成。

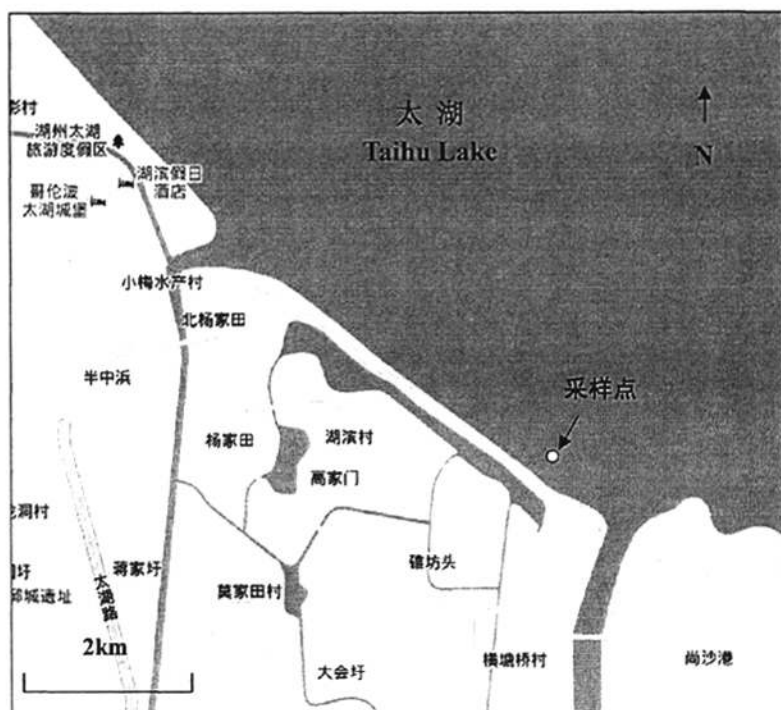


图 2.1 太湖采样点位置

Fig2.1 Sampling site in Taihu Lake

2.3 结果

2.3.1 浮游植物种群组成

表 2.1 为南太湖水域采样点浮游植物种群组成。由表可知,从 2008 年 11 月到 2009 年 10 月共 12 个月中,采集的浮游植物属于蓝藻门、硅藻门、绿藻门、甲藻门、金藻门共 5 门 11 个属,其中硅藻门种类最多,共 5 个种属,分别为直链藻属、小环藻属、桥弯藻属、脆杆藻属、针杆藻属;蓝藻门含有 2 个种属,分别为微囊藻属和鱼腥藻属;绿藻门含有两个种属,分别为纤维藻和衣藻;另外甲藻门和金藻门各含有一类种属,分别为隐藻属和舟形藻属,各个月份浮游植物的显微图片如图 2.2 所示。

表 2.1 浮游植物种群组成

Table2.1 Composition of phytoplankton population

采样时间	浮游植物种群
2008 年 11 月	几乎未见藻细胞
2008 年 12 月	微囊藻、鱼腥藻、直链藻、桥弯藻
2009 年 1 月	微囊藻、鱼腥藻、直链藻、脆杆藻
2009 年 2 月	微囊藻、舟形藻、针形藻
2009 年 3 月	微囊藻、直链藻、脆杆藻、桥弯藻、蓝纤维藻
2009 年 4 月	微囊藻、鱼腥藻、纤维藻、衣藻
2009 年 5 月	微囊藻、鱼腥藻
2009 年 6 月	微囊藻
2009 年 7 月	微囊藻
2009 年 8 月	微囊藻
2009 年 9 月	微囊藻、鱼腥藻、小环藻、隐藻
2009 年 10 月	微囊藻、鱼腥藻

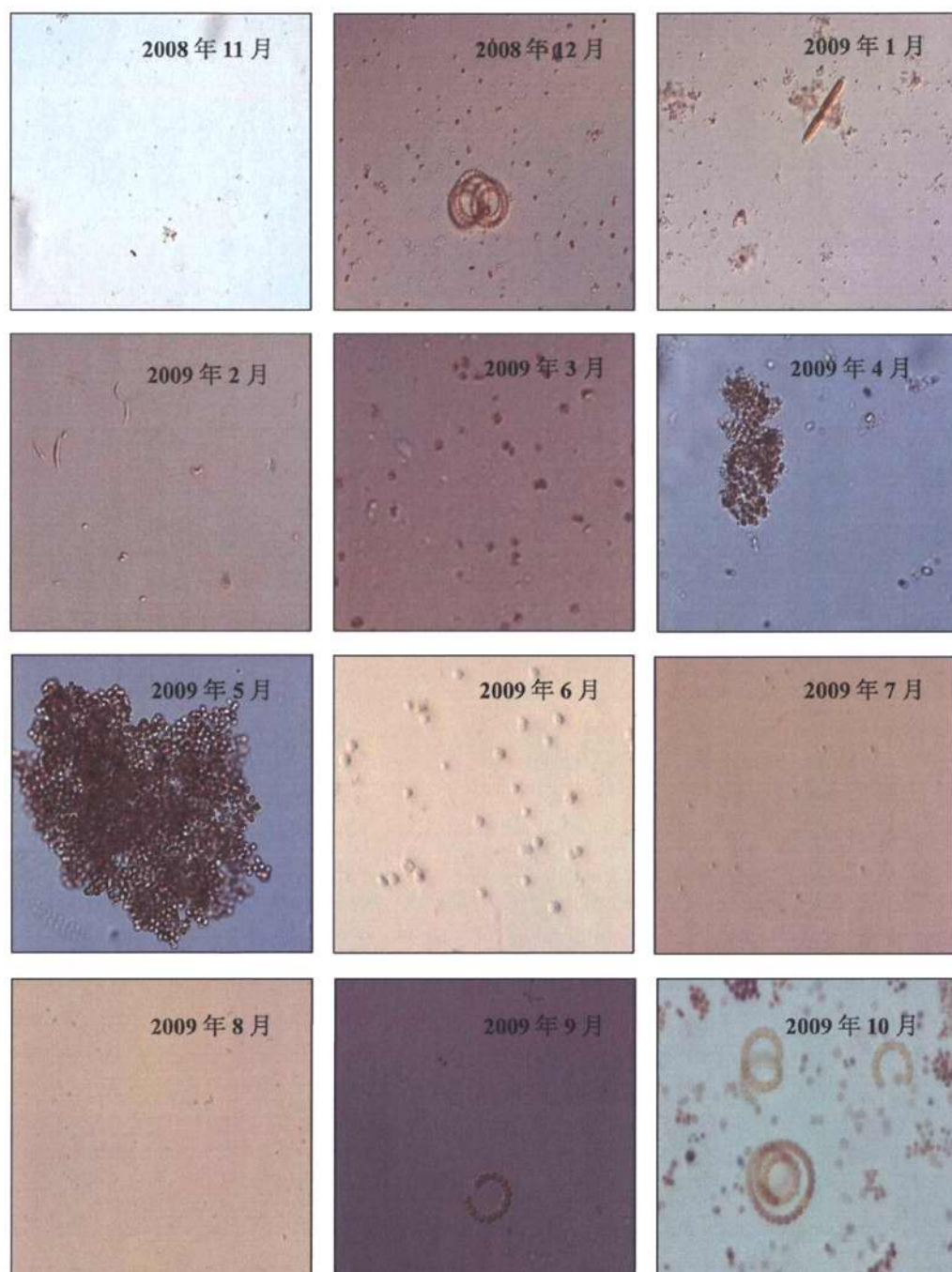


图 2.2 浮游植物种群显微图片

Fig2.2 Micrographs of phytoplankton population

2.3.2 浮游植物种群年度变化

图 2.3 为从 2008 年 11 月到 2009 年 10 月采样点浮游植物种群年度变化情况，以该种群在浮游植物中所占的百分比来反映种群数量随时间变化的规律。其中，2008 年 11 月份，样品中未见任何藻细胞，2008 年 12 月份，微囊藻所占的百分比为 80%；2009 年 1 月和 2 月，浮游植物种群比较少，各个种群的数量也比较少；从 2009 年 3 月份开始到 5 月份，微囊藻数量开始增多，微囊藻种群所占的百分比开始上升，分别为 50%、56%、94%；6 月以后一直到 8 月份，微囊藻占统治优势，所占百分比几乎为 100%；9 月和 10 月微囊藻所占百分比下降，为 90%。

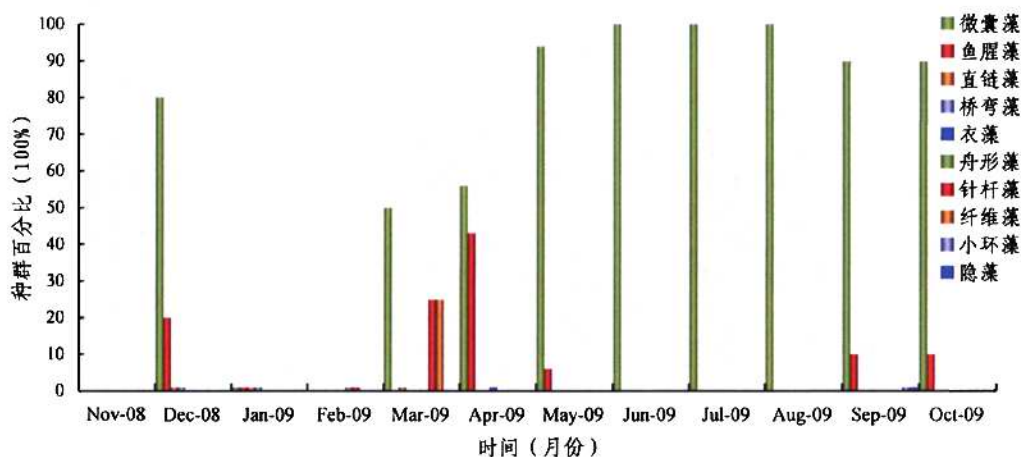


图 2.3 浮游植物种群年度变化

Fig2.3 Annual changes of phytoplankton population

2.3.3 微囊藻种群丰度变化

表 2.2 为从 2009 年 3 月到 2009 年 8 月期间，微囊藻种群的丰度变化情况，数量计数采用浮游植物计数框，将样品摇匀后，取 0.1ml 于计数框中进行计数。由表可知从 3 月开始一直到 6 月份，采样点的微囊藻种群数量逐渐增加，到 6 月份达到最大值，之后微囊藻种群数量逐渐下降。

表 2.2 微囊藻种群丰度

Table2.2 Abundance of *Microcystis* population

时间	微囊藻数量（万个/L）
2009 年 3 月	3870.30
2009 年 4 月	22176.99
2009 年 5 月	97833.42
2009 年 6 月	449069.80
2009 年 7 月	105688.44
2009 年 8 月	3183.89

2.4 讨论

目前关于太湖水域浮游植物群落组成和优势种群演化的研究比较广泛，但主要集中于五里湖和梅梁湾（宋晓兰等，2007；钱奎梅等，2008；陈家长等，2009），对南太湖水域浮游植物群落组成的研究则相对较少。目前已知的南太湖水域浮游植物种群共有 243 属种 7 个门，其中蓝藻门 98 属，绿藻门 64 属，硅藻门 39 属，裸藻门 21 属，隐藻门 13 属，甲藻门 6 属，金藻门 2 属（原居林等，2009；赵汉取等，2009）。本次研究发现南太湖水域浮游植物种群呈现多样性特点，对采样点浮游植物种群的逐月分析鉴定显示，浮游植物种群分别属于蓝藻门、硅藻门、绿藻门、甲藻门、金藻门共 5 门 11 个属，其中蓝藻门含有 2 个属，分别为微囊藻属和鱼腥藻属，而对微囊藻属鉴定结果显示，微囊藻种类很多，包含有惠氏微囊藻、鱼害微囊藻、铜绿微囊藻、水华微囊藻、挪氏微囊藻、卷曲微囊藻等，说明微囊藻种群也呈现多样性特点。

太湖浮游植物种群演化经历了比较大的变化，20 世纪 50 年代初，以夏季蓝藻数量最多，隐藻、硅藻和绿藻次之，其他季节隐藻和硅藻在数量上占绝对优势；60 年代，西部湖区夏季蓝藻数量占绝对优势；80 年代，夏秋季藻类生物量中蓝藻、硅藻和隐藻平分秋色；90 年代，蓝藻（偶尔有绿藻）占据绝对优势；21 世纪夏季蓝藻一统天下。本次研究发现，从 2008 年 11 月到 2009 年 10 月采样点浮游植物优势种群一直是蓝藻，特别是微囊藻，而其他门类的藻类则不占优势。除去 2008 年 11 月份由于气温突然变冷，浮游植物几乎全部死亡，没有监测到浮游植物外，从 2008 年 12 月到 2009 年 10 月这 11 个月中，微囊藻在每个月份均能检测到，其中微囊藻占绝对优势

的月份共有 9 个月，特别是从 3 月份开始，天气逐渐变暖，湖水温度上升后，加上光照和富营养化的影响，微囊藻快速繁殖，湖水中微囊藻丰度迅速上升，数量逐渐增加，从 6 月份开始一直到 8 月份，微囊藻几乎占据了浮游植物的 100%，很少见到其它浮游植物。

除微囊藻外，鱼腥藻在浮游植物中比重也比较大，仅次于微囊藻，研究发现，从 2008 年 11 月到 2009 年 10 月这 12 个月中，鱼腥藻在 6 个月份出现过，开始出现的时间为 4 月份，晚于微囊藻，所占比重为全年最高的 43%，之后，随着微囊藻的大量繁殖，鱼腥藻所占比重开始下降，到 5 月份，鱼腥藻所占的百分比为 6%，而当微囊藻在 6 月份到 8 月份占统治优势后，鱼腥藻没有出现。到 9 月份之后，微囊藻比重下降，鱼腥藻又开始出现，所占比重为 10%左右。

近年来，太湖富营养化程度加剧，蓝藻水华频频暴发，而引起水华的蓝藻主要包括微囊藻和鱼腥藻两种，这两种蓝藻所产生的藻毒素除了直接对鱼类、人畜产生毒害，也是引发肝癌的重要诱因之一（Dawson, 1998; Sekijima et al., 1999; Kohoutek et al., 2007），防治产毒蓝藻的过度繁殖迫在眉睫，噬藻体的生态作用使得它在治理蓝藻水华中的潜在作用引起了研究者的高度重视，尤其是研究能够裂解引起“水华”微囊藻的噬藻体对了解淡水噬藻体的生态作用以及进一步防治蓝藻有着非常重要的意义。

第三章 从南太湖水样及藻样中提取噬藻体

本研究通过采集 2009 年 6 月到 2009 年 9 月南太湖水域的水样以及藻样,进一步从水样和藻细胞中提取噬藻体,并对对数期的藻液进行特异性感染,通过藻液的颜色变化证实噬藻体的感染,通过生长抑制实验定量检测噬藻体对铜绿微囊藻 912 的感染情况,用 PCR 技术检测噬藻体目的基因,用光镜以及电镜来观察藻细胞感染前后细胞形态、超微结构改变,通过以上方法证实南太湖水域中存在能特异性感染铜绿微囊藻 912 的噬藻体。

3.1 材料

3.1.1 主要试剂

聚乙二醇 6000 (PEG 6000), 氯化钠, 氯仿, 其余试剂为国产分析纯。

3.1.2 藻种与培养基

藻种:

铜绿微囊藻 912 (*Microcystis aeruginosa* 912), 鱼害微囊藻 1005 (*Microcystis ichthyoblabe* Kutz 1005), 水华微囊藻 1028 (*Microcystis-flos-aquae* 1028), 水华鱼腥藻 245 (*Anabaena flos-aquae* 245) 均购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库, 培养条件为采用 BG11 培养基, 光照强度为 2000lux, 温度为 30℃, 光暗周期为 12h:12h。

BG11 培养基:

Working solution	g/L
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.04
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA (dinatrim-salt)	0.006
Na ₂ CO ₃	0.006

A5 + Co solution	1 mL
Add to 1000 ml of distilled water	
Composition of the A ₅ + Co solution	
H ₃ BO ₃	2.86g
MnCl ₂ . H ₂ O	1.81g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.22g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0.08g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.039g
Co (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.05g

3.1.3 水样处理用液

鲁哥氏染液:

将 6g 碘化钾溶于 20ml 水中，待其完全溶解后，加 4g 碘充分摇动，全溶后加入 80ml 水即可。

TM buffer :

1mol/L Tris.cl (pH 7.5)	50ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	2g
加水至 1L	

3.1.4 电镜实验相关试剂

0.2M 磷酸缓冲液 (PBS) 的配制:

0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液 (A 液)	610ml
0.2mol/L 磷酸二氢钠溶液 (B 液)	390ml

将 A 液与 B 液体混合后配成 0.2M 母液

2.5%戊二醛溶液:

0.2M PBS/ml	50ml
25%戊二醛水溶液/ml	10ml
双蒸水加至/ml	100ml

Spurr 包埋剂配方:

VCD 树脂	10g
DER736	8g

NSA	26g
DMAE	0.4g

3.1.5 PCR 实验试剂

TEM :	
10mmol/L	Tris-HCl, pH8.0
10mmol/L	EDTA
0.5%	SDS
150μg/ml	蛋白酶 K

3.1.6 主要仪器

- 电子天平(Sartorius 公司, 德国)
- AP-9925 溶剂过滤器 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司, 中国)
- Microfuge®低温高速离心机(Beckman公司, 美国)
- 智能人工气候箱 (宁波海曙, 中国)
- 泰仕照度计 (杭州正东电子有限公司, 中国)
- 血球计数板 (上海医用光学仪器厂, 中国)
- 超净台 (苏净集团安泰公司, 中国)
- 超声波清洗仪 (Branson 公司, 美国)
- 电子显微镜(OLYMPUS 公司, 日本)
- 超速离心机(Beckman 公司, 美国)
- 超低温冰箱(SO-LOW 公司, 美国)
- 透射电镜 (JEOL-JEM-1230 TEM, 日本)
- 超薄切片机 (Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, 奥地利)
- 临界点干燥仪 (Hitachi HCP-2 Critical point dryer, 日本)
- 真空喷镀仪 (Eiko IB5 ion coater, 日本)
- 包埋剂 (SPI-CHEM Spurr resin, USA)
- PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国)

3.2 方法

3.2.1 水样采集

采样时间为 2009 年 6 月到 9 月份, 逐月采集, 采样点为湖州市太湖大坝近岸水

域(见图 2.1), 取表层水样和藻样(<0.5m), 4°C 保存并于 24h 内运回实验室, 进行下一步实验。

3.2.2 水样中噬藻体的提取与浓缩

水样中噬藻体的提取: 将 2009 年 7 月份以及 8 月份采集的水样, 分别依次过 0.45 μ m、0.22 μ m 滤膜后, 用 2%氯仿抽提, 收集水相, 超声除气 20min 以除去残留的氯仿, 4°C 避光保存。

水样中噬藻体的浓缩: 取 2009 年 6 月份采集的太湖水样 1L, 依次过 0.45 μ m、0.22 μ m 孔径的滤膜后, 加入固体氯化钠 58.44g 至终浓度为 1mol/L, 搅拌使其溶解, 按照 10%w/v 加入 PEG6000, 充分溶解后放入 4°C 冰箱过夜, 使病毒颗粒沉淀, 于 4°C 以 11,000g 离心 10min 回收沉淀的病毒颗粒, 弃上清液, 沉淀溶于 TM 缓冲液, 得到水样浓缩液 12ml。同理将 2009 年 7 月份采集的太湖水样 1250ml, 按照上述方法浓缩, 得到浓缩液 35ml; 将 2009 年 8 月份采集的太湖水样 1300ml, 按照上述方法浓缩, 得到浓缩液 30ml。

3.2.3 藻细胞中噬藻体的提取

将 2009 年 6 月份以及 7 月份采集的太湖藻样, 分别放入-20°C 冰箱反复冻融三次, 取冻融后的藻细胞裂解液 500ml 加入固体氯化钠至终浓度为 1mol/L, 搅拌使其溶解, 于 4°C, 4000rpm 离心 30min 去除沉淀, 上清液按照 10%w/v 加入 PEG6000, 充分溶解后放入 4°C 冰箱过夜, 使病毒颗粒形成沉淀, 于 4°C 以 11,000g 离心 10min 回收沉淀的病毒颗粒, 弃上清液, 沉淀溶于 TM 缓冲液, 加入等体积氯仿抽提, 收集水相, 20000rpm 离心 1h, 弃上清, 加入 2mLTM 缓冲液悬浮底部沉淀, 4°C 避光保存。

3.2.4 用生长抑制实验检测噬藻体感染

将 2009 年 6~9 月份太湖水样分别过 0.45 μ m、0.22 μ m 混合纤维素滤膜后, 用 BG11 培养基进行 10 倍梯度稀释, 分别取上述 10 倍稀释水样、100 倍稀释水样、1000 倍稀释水样、10000 倍稀释水样以及未经稀释的水样按照 1: 9 比例加入到对数期的铜绿微囊藻 912 藻液中, 对照为未加任何水样的对数期的藻液, 每个系列做 6 个平行, 6 天后用血球计数板进行显微计数。

3.2.5 用颜色变化证实噬藻体感染

将 3.2.2 中的水样 100 μ l 加入到 900 μ l 对数期的铜绿微囊藻 912、鱼害微囊藻 1005、

水华微囊藻 1028 藻液中，作平行样。对照组中加入经氯仿处理的 BG11 培养基，每日定时观察记录。

将 3.2.2 中浓缩后的水样病毒提取液 100 μ l 加入到 900 μ l 对数期的铜绿微囊藻 912 藻液中，做平行，对照组中加入经高温灭菌的水样病毒浓缩液，每日定时拍照观察记录。

将 3.2.3 中藻细胞病毒提取液 100 μ l 加入入到 900 μ l 对数期的铜绿微囊藻 912、鱼害微囊藻 1005、水华微囊藻 1028 藻液中，做平行，对照组中加入经氯仿处理过的 BG11 培养基，每日定时拍照观察记录。

3.2.6 用 PCR 检测噬藻体目的基因

基因组 DNA 提取：分别取 2009 年 6、7、8 月份浓缩后的水样病毒提取液按照 1:9 比例加入到对数期的铜绿微囊藻 912 藻液中，做对照，将已经发生感染的实验组和对照组的藻液 109,000g 超离 30min，将收集的藻细胞沉淀作为样品进行 DNA 提取，具体实验步骤如下：

- ① 每份样品中加入 100 μ l TES，混匀，55℃ 3 小时；
- ② 加入等体积酚-氯仿-异戊醇，混匀，12000 r/min 离心 10 分钟，将上清吸入新的离心管；
- ③ 加入等体积氯仿，混匀，12000 r/min 离心 10 分钟，将上清吸入新的离心管；
- ④ 重复 3；
- ⑤ 在 4 所得上清中加入 1/10 体积的 2 mol/L 乙酸钠和 2 倍体积的无水乙醇，-20℃ 过夜；
- ⑥ 12000 r/min 离心 10 分钟，弃上清；
- ⑦ 沉淀 DNA 用 70%乙醇洗 1 次，12000 r/min 离心 10 分钟，弃上清，晾干，加 20 μ l TE 缓冲液溶解沉淀。

PCR 反应体系：

10 \times PCR Buffer	2 μ l
4dNTP (10 mM)	0.4 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1.6 μ l

reducAF (10 μM)	0.5μl
reducAR (10 μM)	0.5μl
DNA	5μl
Taq DNA 聚合酶 (5 u/μl)	0.5μl
无菌水	9.5μl
总体系	20μl

反应条件:

95 °C	预变性 2 分钟	
94 °C	30 秒	} 35 个循环
50 °C	45 秒	
72 °C	30 秒	
72 °C	10 分钟	
4 °C	保温	

引物设计:

表 3.1 PCR 引物设计
Table 3.1 Primer design for PCR

目标基因	引物	序列 (5'to3')
ribonucleoside-diphosphate	reducAF	GTGGAGTGAATCTATGCGTTG
reductase	reducAR	GCCCTTACTCCACTCACTA

3.2.7 用光镜及电镜观察噬藻体对藻细胞感染

感染前后细胞的光镜观察：取 2009 年 7 月份浓缩的藻细胞病毒浓缩液 100μl 加入到 900μl 对数期的铜绿微囊藻 912、鱼害微囊藻 1005 藻液中，作对照。一周后取感染组和对照组的藻液 1~2 滴经过涂片、干燥、固定后，用 1.5%的鲁格式染液固定细胞形态，等涂片干燥后进行镜检。

感染前后细胞的电镜观察：将 3.2.6 中收集到的藻细胞样品在 2.5%的戊二醛溶液中固定，加入 2%的琼脂来固定藻细胞沉淀后，加入 2.5%的戊二醛固定，然后按下列步骤处理样品：

- ① 倒掉固定液，用 0.1M, pH7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品三次，每次 15min;
- ② 用 1%的锇酸溶液固定样品 1-2h;
- ③ 倒掉固定液，用 0.1M, pH7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品三次，每次 15min;
- ④ 用梯度浓度（包括 50%，70%，80%，90%和 95%五种浓度）的乙醇溶液对样品进行脱水处理，每种浓度处理 15min，再用 100%的乙醇处理一次，每次 20min; 最后过度到纯丙酮处理 20min;
- ⑤ 用包埋剂与丙酮的混合液（V/V=1/1）处理样品 1h;
- ⑥ 用包埋剂与丙酮的混合液（V/V=3/1）处理样品 3h;
- ⑦ 纯包埋剂处理样品过夜;
- ⑧ 将经过渗透处理的样品包埋起来，70℃加热过夜，即得到包埋好的样品;
- ⑨ 样品在 Reichert 超薄切片机中切片，获得 70~90nm 的切片，该切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50%乙醇饱和溶液各染色 15min，在日本 JEOL 公司的 JEM-1230 型透射电镜中观察拍照。

3.3 结果

3.3.1 用颜色变化判断水样对蓝藻的感染

图 3.1 为 7 月份水样加入对数期藻液中的感染情况。由图可知，经过两周时间，与对照组相比，铜绿微囊藻 912 的实验组颜色上无明显变化，而鱼害微囊藻 1005 的实验组与对照组相比，颜色上也无明显变化。

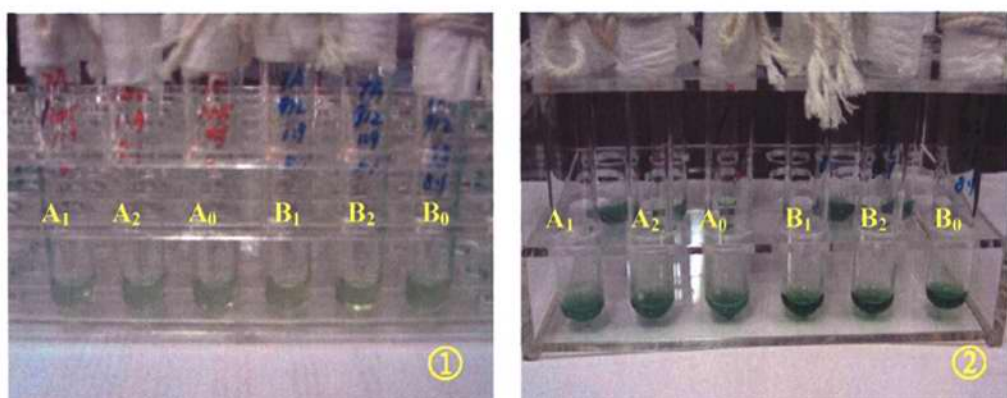


图 3.1 7 月份水样对蓝藻的感染

(图①为感染第一天; 图②为感染第十四天)

(A₁、A₂ 为鱼害微囊藻 1005 实验组; A₀ 为鱼害微囊藻 1005 对照组)

(B₁、B₂ 为铜绿微囊藻 912 实验组; B₀ 为铜绿微囊藻 912 对照组)

Fig3.1 Infection of cyanobacteria by the July's water sample

(Fig ① are infection on the first day; Fig ② are infection on the 14th day)

(A₁ and A₂ are test groups of *Microcystis ichthyoblabe* 1005;

A₀ is control group of *Microcystis ichthyoblabe* 1005;

B₁ and B₂ are test groups of *Microcystis aeruginosa* 912;

B₀ is control group of *Microcystis aeruginosa* 912)

图 3.2 为 8 月份水样加入对数期藻液中的感染情况。由图可知，经过两周时间，三种藻的实验组与对照组相比，颜色上均无明显变化。

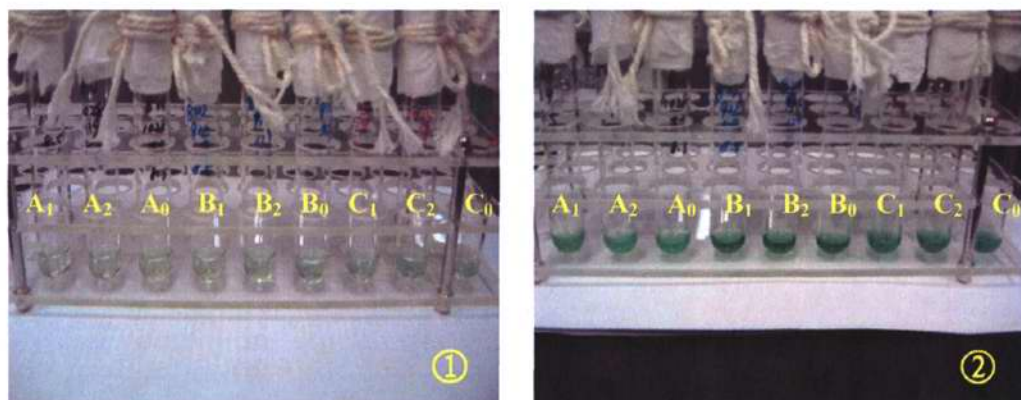


图 3.2 8 月份水样对蓝藻的感染

(图①为感染第一天; 图②为感染第十四天)

(A₁、A₂ 为水华微囊藻 1028 实验组; A₀ 为水华微囊藻 1028 对照组)

(B₁、B₂ 为铜绿微囊藻 912 实验组; B₀ 为铜绿微囊藻 912 对照组)

(C₁、C₂ 为鱼害微囊藻 1005 实验组; C₀ 为鱼害微囊藻 1005 对照组)

Fig 3.2 Infection of cyanobacteria by the August's water sample

(Fig ① are infection on the first day; Fig ② are infection on the 14th day)

(A₁ and A₂ are test groups of *Microcystis-flos-aquae* 1028;

A₀ is control group of *Microcystis-flos-aquae* 1028;

B₁ and B₂ are test groups of *Microcystis aeruginosa* 912;

B₀ is control group of *Microcystis aeruginosa* 912;

C₁ and C₂ are test groups of *Microcystis ichthyoblabe* 1005;

C₀ is control group of *Microcystis ichthyoblabe* 1005)

圖 3.3 為經濃縮約 80 倍的 6 月份水樣加入對數期的銅綠微囊藻 912 藻液中的感染變化情況。由圖可知，經過兩周時間，實驗組與對照組相比，顏色較淺，為黃綠色，而對照組為墨綠色，即濃縮的 6 月份水樣對銅綠微囊藻 912 發生了感染。

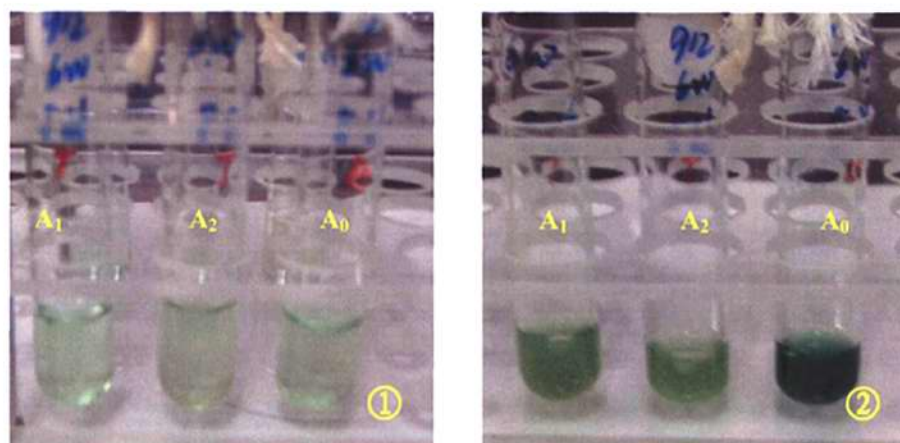


圖 3.3 濃縮的 6 月份水樣對藍藻的感染

(圖①為感染第一天；圖②為感染第十四天)

(A₁、A₂為銅綠微囊藻 912 實驗組；A₀為銅綠微囊藻 912 對照組)

Fig 3.3 Infection of cyanobacteria by the concentrated June's water sample

(Fig ① are infection on the first day; Fig ② are infection on the 14th day)

(A₁ and A₂ are test groups of *Microcystis aeruginosa* 912;

A₀ is control group of *Microcystis aeruginosa* 912)

图 3.4 为经浓缩约 35 倍的 7 月份水样加入对数期的铜绿微囊藻 912 藻液中的感染变化情况。由图可知, 经过 4 天时间, 实验组发生了明显变化, 颜色变浅, 为淡绿色, 对照组为亮绿色, 即浓缩的 7 月份水样对铜绿微囊藻 912 产生了感染。

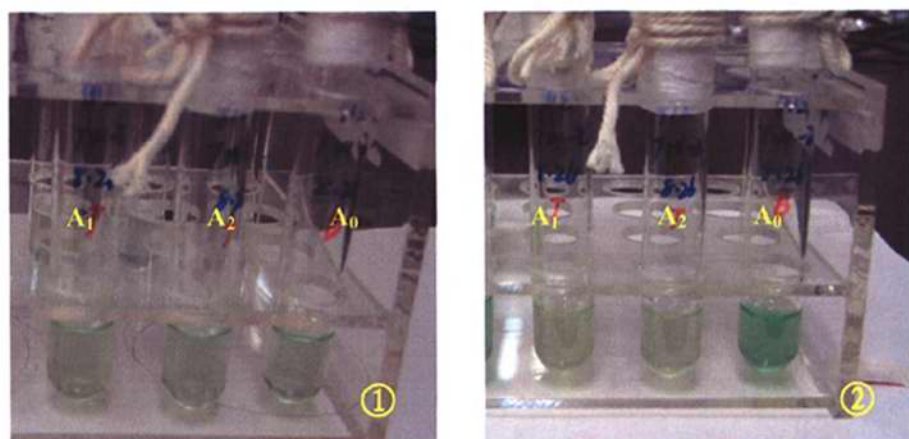


图 3.4 浓缩的 7 月份水样对蓝藻的感染

(图①为感染第一天; 图②为感染第四天)

(A₁、A₂为铜绿微囊藻 912 实验组; A₀为铜绿微囊藻 912 对照组)

Fig 3.4 Infection of cyanobacteria by the concentrated July's water sample

(Fig ① are infection on the first day; Fig ② are infection on the fourth day)

(A₁ and A₂ are test groups of *Microcystis aeruginosa* 912;

A₀ is control group of *Microcystis aeruginosa* 912)

图 3.5 为经浓缩约 30 倍的 8 月份水样加入对数期的铜绿微囊藻 912 藻液中的感染变化情况。由图可知, 经过 2 天时间, 实验组与对照组相比, 颜色明显变淡, 几乎为无色, 对照组为淡绿色, 即浓缩的 8 月份水样对铜绿微囊藻产生了感染, 且感染效果明显。

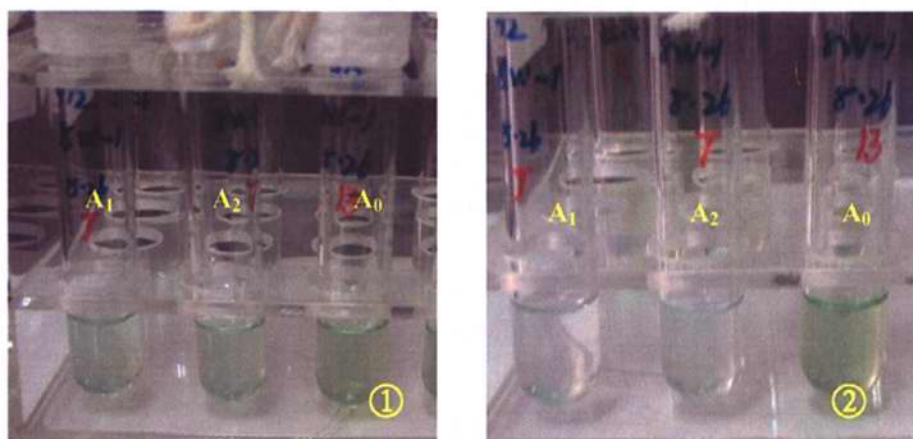


图 3.5 浓缩的 8 月份水样对蓝藻的感染

(图①为感染第一天; 图②为感染第二天)

(A₁、A₂为铜绿微囊藻 912 实验组; A₀为铜绿微囊藻 912 对照组)

Fig3.5 Infection of cyanobacteria by the concentrated August's water sample

(Fig ① are infection on the first day; Fig ② are infection on the second day)

(A₁ and A₂ are test groups of *Microcystis aeruginosa* 912;

A₀ is control group of *Microcystis aeruginosa* 912)

3.3.2 用生长抑制判断水样对蓝藻的感染

图 3.6 为 6 月水样经梯度稀释后加入对数期的铜绿微囊藻 912 藻液后的生长抑制情况。由图可知，6 天后对照组藻细胞数目由 3.6×10^5 个/ml 增长到 22×10^6 个/ml，而其他各实验组中藻细胞数目均比对照组少，其中未经稀释水样对藻细胞生长抑制最明显，6 天后藻细胞数仅为 18.4×10^6 个/ml。

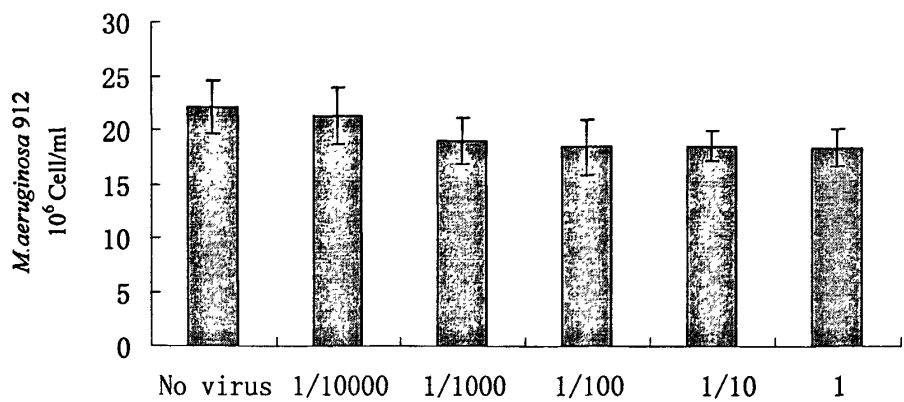


图 3.6 6 月份水样对蓝藻的生长抑制

Fig3.6 Growth inhibition of cyanobacteria by the June's water sample

图 3.7 为 7 月水样经梯度稀释后加入对数期的铜绿微囊藻藻液后的生长抑制情况。由图可知，6 天后对照组藻细胞数目由 3.0×10^5 个/ml 增长到 19.7×10^6 个/ml，而未经稀释水样对藻细胞生长抑制最明显，6 天后藻细胞数仅为 10.3×10^6 个/ml，其他各实验组变化不明显。

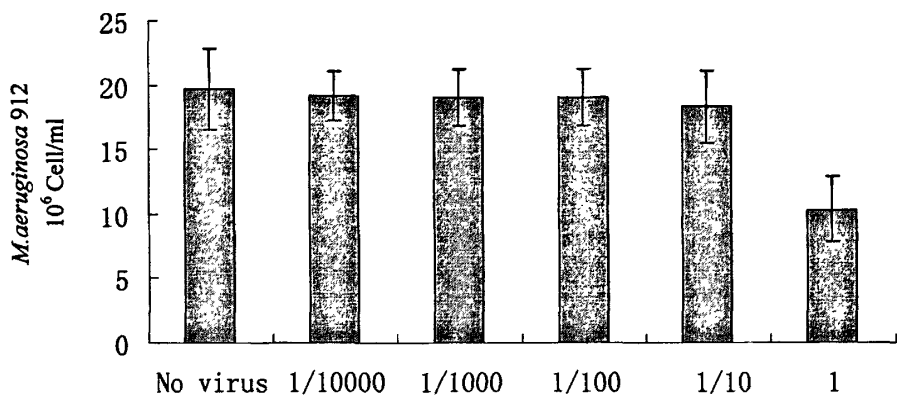


图 3.7 7 月份水样对蓝藻的生长抑制

Fig3.7 Growth inhibition of cyanobacteria by the July's water sample

图 3.8 为 8 月水样经梯度稀释后加入铜绿微囊藻 912 对数期藻液后的生长抑制情况。由图可知，6 天后对照组藻细胞的数目由 5.4×10^5 个/ml 增长到 37.3×10^6 个/ml，而加入未经稀释水样以及稀释 10 倍水样的实验组中藻细胞数目明显比对照组少，其中未经稀释水样对藻细胞生长抑制最明显，6 天后藻细胞数仅为 16×10^6 个/ml，即比对照组藻细胞数目少很多；而稀释 100 倍、1000 倍、10000 倍的实验组和对照组相比，藻细胞数目相对较少，但不太明显。

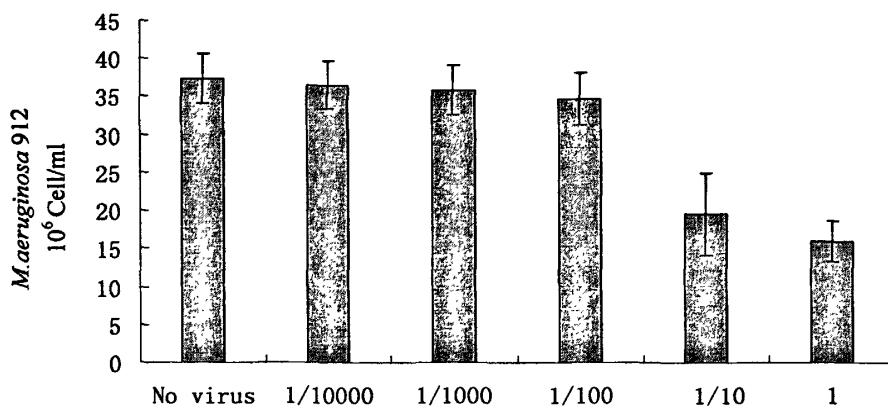


图 3.8 8 月份水样对蓝藻的生长抑制

Fig3.8 Growth inhibition of cyanobacteria by the August's water sample

图 3.9 为 9 月水样经梯度稀释后加入对数期铜绿微囊藻 912 藻液后的生长抑制情况。由图可知, 经过六天后, 对照组藻细胞数目由 $4.8 \times 10^5/\text{ml}$ 增长到 15.6×10^6 个/ ml , 而各个稀释度的实验组藻细胞数目均比对照组少, 其中未经稀释水样对藻细胞生长抑制最明显, 6 天后实验组藻细胞数仅为 9.1×10^6 个/ ml , 明显小于对照。

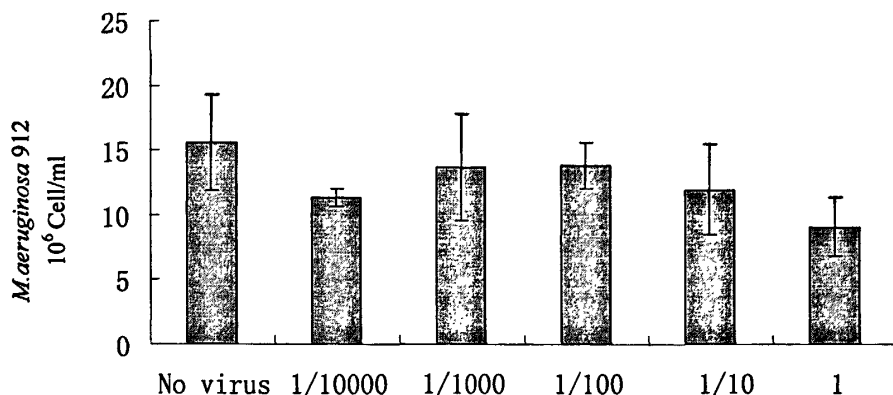


图 3.9 9 月份水样对蓝藻的生长抑制

Fig3.9 Growth inhibition of cyanobacteria by the September's water sample

3.3.3 藻细胞提取噬藻体对蓝藻的感染

图 3.10 为从 6 月藻细胞中提取噬藻体加入对数期藻液中的感染变化情况。由图可知, 经过 7 天时间, 铜绿微囊藻 912 的实验组与对照组相比, 颜色明显发生变化, 几乎为透明色, 而对照组为深绿色; 鱼害微囊藻 1005 的实验组与对照组相比, 颜色也发生了变化, 实验组为淡绿色, 对照组为亮绿色; 而对于鱼腥藻 245 来说, 则无明显变化, 即从 6 月份藻细胞中提取的噬藻体能特异性感染铜绿微囊藻 912 和鱼害微囊藻 1005, 而对鱼腥藻 245 则无感染。

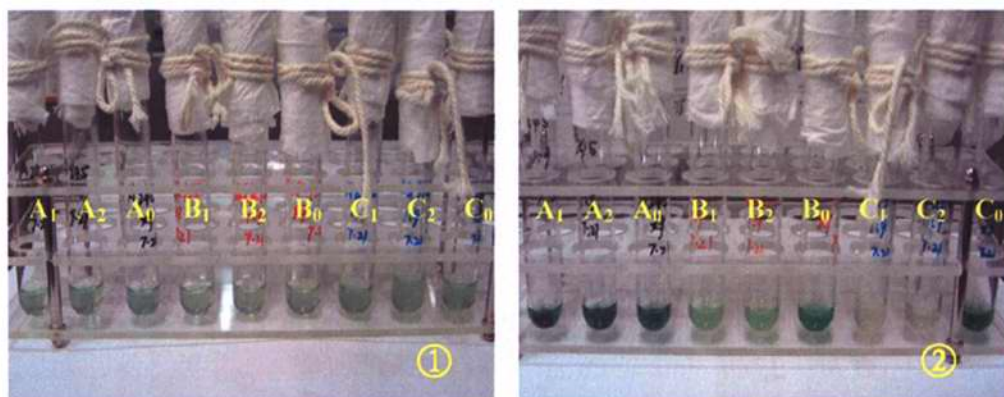


图 3.10 从 6 月藻细胞提取的噬藻体对蓝藻的感染

(图①为感染第一天; 图②为感染第十四天)

(A₁、A₂ 为鱼腥藻 245 实验组; A₀ 为鱼腥藻 245 对照组)

(B₁、B₂ 为鱼害微囊藻 1005 实验组; B₀ 为鱼害微囊藻 1005 对照组)

(C₁、C₂ 为铜绿微囊藻 912 实验组; C₀ 为铜绿微囊藻 912 对照组)

Fig 3.10 Infection of cyanobacteria by cyanophage extracted from the June's algae

(Fig ① are infection on the first day; Fig ② are infection on the 14th day)

(A₁ and A₂ are test groups of *Anabaena flos-aquae* 245;

A₀ is control group of *Anabaena flos-aquae* 245;

B₁ and B₂ are test groups of *Microcystis ichthyoblabe* 1005;

B₀ is control group of *Microcystis ichthyoblabe* 1005;

C₁ and C₂ are test groups of *Microcystis aeruginosa* 912;

C₀ is control group of *Microcystis aeruginosa* 912)

图 3.11 为从 7 月藻细胞中提取噬藻体加入对数期藻液中的感染变化情况。由图可知, 经过 12 天时间, 铜绿微囊藻 912 的实验组与对照组相比, 颜色明显发生变化, 变为黄色, 而对照组藻液为深绿色; 鱼害微囊藻 1005 的实验组与对照组相比, 颜色稍变淡, 实验组为绿色, 对照组为深绿色, 说明从 6 月份藻细胞中提取的噬藻体能特异性感染铜绿微囊藻 912 和鱼害微囊藻 1005。

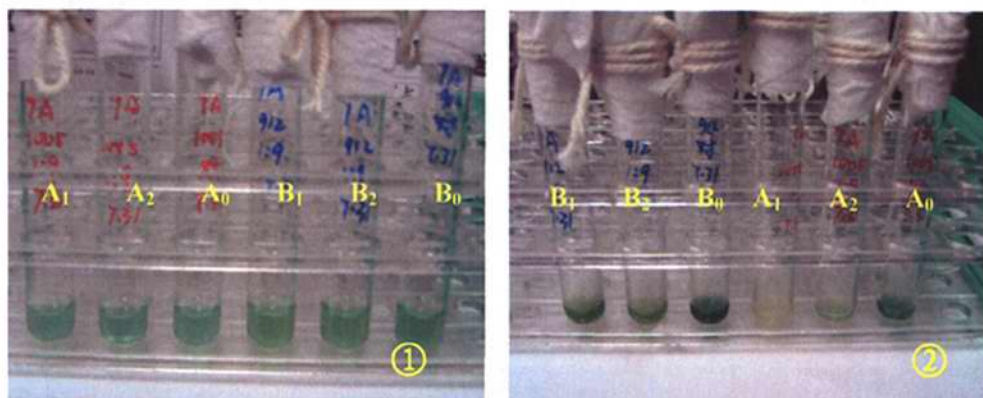


图 3.11 从 7 月藻细胞提取的噬藻体对蓝藻的感染

(图①为感染第一天; 图②为感染第十四天)

(A₁、A₂ 为鱼害微囊藻 1005 实验组; A₀ 为鱼害微囊藻 1005 对照组)

(B₁、B₂ 为铜绿微囊藻 912 实验组; B₀ 为铜绿微囊藻 912 对照组)

Fig 3.11 Infection of cyanobacteria by cyanophage extracted from the July's algae

(Fig ① are infection on the first day; Fig ② are infection on the 14th day)

(A₁ and A₂ are test groups of *Microcystis ichthyoblabe* 1005;

A₀ is control group of *Microcystis ichthyoblabe* 1005;

(B₁ and B₂ are test groups of *Microcystis aeruginosa* 912;

B₀ is control group of *Microcystis aeruginosa* 912)

3.3.4 用 PCR 检测噬藻体的目的基因

图 3.12 为浓缩的 6 月、7 月、8 月水样对铜绿微囊藻 912 进行感染后噬藻体目的基因的 PCR 检测结果。由图可知，对照组无目的条带，而浓缩的 6 月份水样的感染组出现了目的条带，大小约为 400bp，浓缩的 7 月份、8 月份实验组没有出现目的条带。

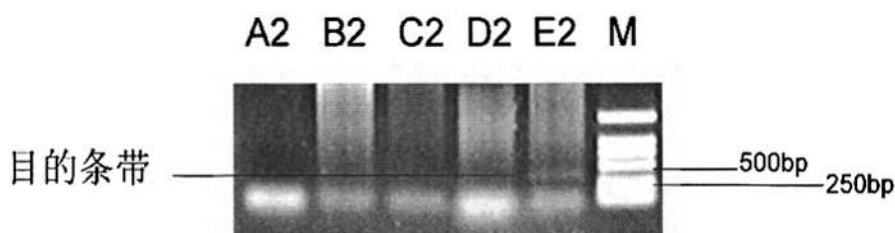


图 3.12 噬藻体目的基因的 PCR 检测

(A2 为 8 月浓缩水样的对照组、B2 为 8 月浓缩水样的实验组、C2 为 7 月浓缩水样的实验组、D2 为 6 月浓缩水样的对照组、E2 为 6 月浓缩水样的实验组、M 为 DNA 分子 Marker)

Fig3.12 Analysis of the cyanophage purpose gene by PCR

(A2 is test group of the concentrated August's water sample;
B2 is control group of the concentrated August's water sample;
C2 is test group of the concentrated July's water sample;
D2 is control group of the concentrated June's water sample;
E2 is test group of the concentrated June's water sample;
M is marker for DNA molecules)

3.3.5 感染前后藻细胞的显微观察

图 3.13 为铜绿微囊藻 912 和鱼害微囊藻 1005 被噬藻体感染前后的细胞显微形态改变。由图可知，鱼害微囊藻 1005 被病毒感染之后，细胞形态发生了明显变化，变得圆滑，部分细胞正处于破裂状态；铜绿微囊藻 912 被病毒感染之后，细胞也变得圆滑，细胞不再呈现群体状态，变得较为分散。

图 3.14 为铜绿微囊藻 912 被病毒感染前后细胞超微结构的改变。由图可知，感染前藻细胞轮廓清晰可见，细胞膜与细胞器紧密相连，细胞器结构完整，能见到完整的类囊体、羧化体等细胞器。而感染后藻细胞的超微结构发生了改变，开始裂解的藻细胞变得圆滑，细胞膜与细胞器开始分离，细胞膜逐渐溶解，类囊体、羧化体等细胞器严重损伤，细胞内部形成很多“空洞”，藻细胞被大量裂解。

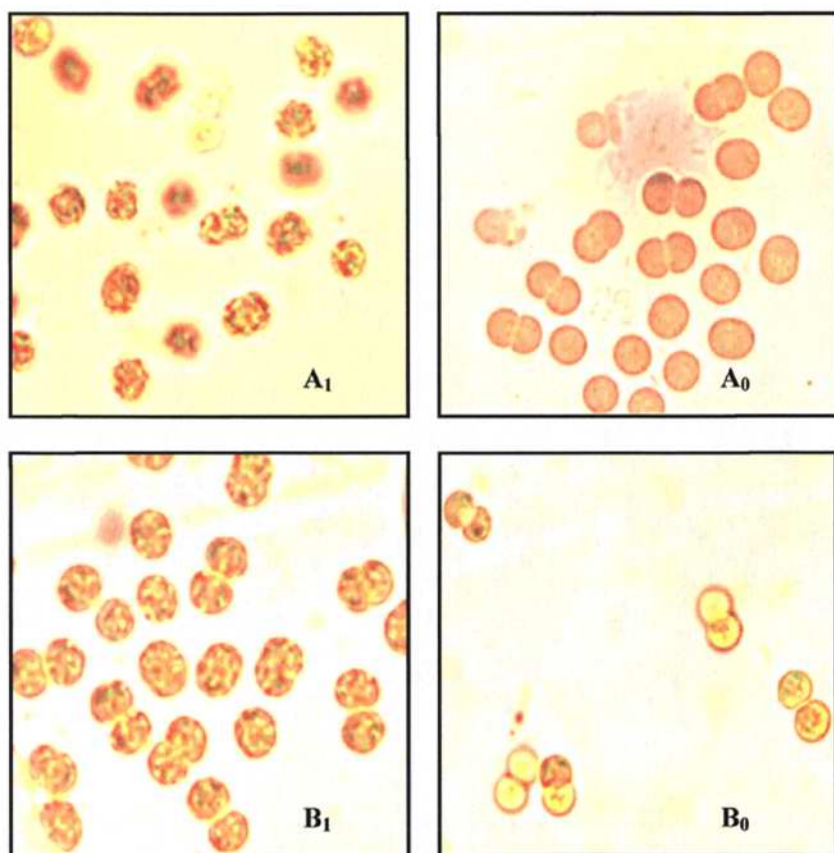


图 3.13 噬藻体感染藻细胞的形态改变

(其中 A₁:感染前的鱼害微囊藻 1005, A₀:感染后的鱼害微囊藻 1005

B₁:感染前的铜绿微囊藻 912, B₀:感染后的铜绿微囊藻 912)

(放大倍数, 1000 ×)

Fig3.13 Morphological changes of the cyanobacteria infected by cyanophage

(A₁ is *Microcystis ichthyoblabe* 1005 before infection; A₀ is *Microcystis ichthyoblabe* 1005 after infection)

(B₁ is *Microcystis aeruginosa* 912 before infection; B₀ is *Microcystis aeruginosa* 912 after infection)

(Magnification, 1000 ×)

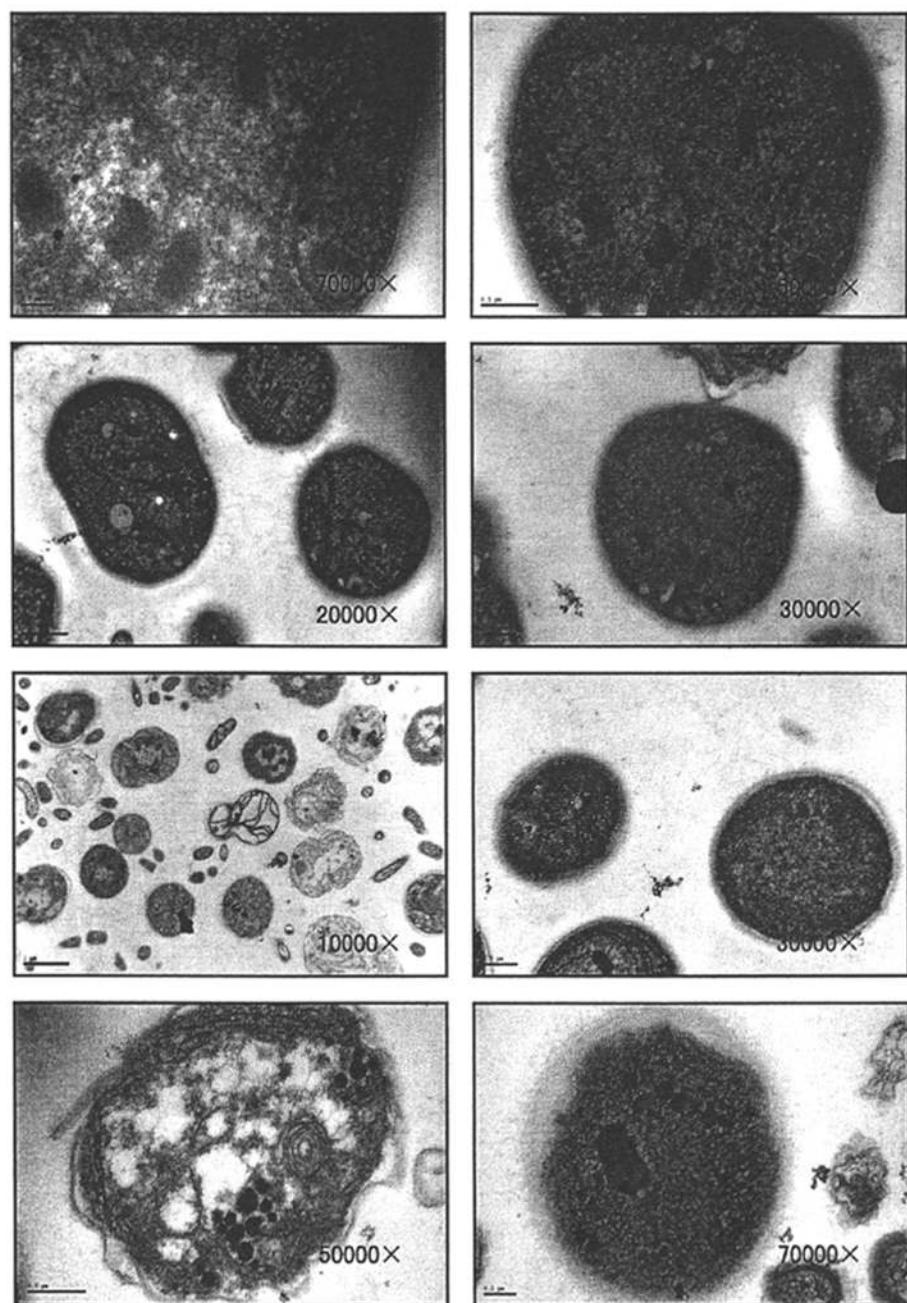


图 3.14 噬藻体感染藻细胞的超微结构改变

(放大倍数, 10000 \times , 20000 \times , 30000 \times , 50000 \times , 70000 \times)

Fig3.14 Ultrastructural observation of the cyanobacteria infected by cyanophage

(Magnification, 10000 \times , 20000 \times , 30000 \times , 50000 \times , 70000 \times)

3.4 讨论

形态观察是在光学显微镜下观察宿主细胞在感染前后的群体形态以及单个细胞的形态结构变化,而超微结构观察则是应用透射电子显微镜技术(TEM)观察感染前后宿主的细胞膜、线粒体、内质网等细胞器的亚显微结构变化,通过TEM观察能够提供关于病毒感染后宿主超微结构的大量信息。PCR技术是一种体外扩增DNA的技术,其基本原理是在特定引物的引导下,依靠DNA聚合酶的催化,经过高温变性、低温退火以及适温延伸三个步骤组成一个周期,循环进行,使得目的基因的DNA片段迅速扩增。PCR技术作为一项成熟的技术,已成功应用于各类病毒的检测以及诊断。目前,人们已经将PCR技术用于分析天然水样中的噬藻体种类及分布,并根据基因序列建立了以PCR为核心的定性检测方法(Frederickson et al., 2003; Dorigo et al., 2004; Muhling et al., 2005)。

噬藻体对藻细胞进行感染的过程中,噬藻体的尾部吸附在藻细胞的细胞壁上,然后进行侵入,将头部的DNA注入细胞内,在细胞体内完成DNA的复制以及蛋白质合成,并形成完整的噬藻体颗粒,在噬藻体成熟后,溶菌酶逐渐增加,促使藻细胞裂解,从而释放出子代噬藻体,在噬藻体侵染藻细胞的DNA合成会停止,酶的合成也受到阻抑,噬藻体逐渐控制了藻细胞的代谢,在整个侵染过程中宿主的形态结构也会发生改变(Keizo Nagasaki et al., 1997)。在本实验中,高倍显微镜下观察到感染后藻细胞的形态结构明显发生了变化,对于鱼害微囊藻1005来说,感染后的藻细胞变得更加圆滑,此时病毒已经侵入了宿主细胞,引起了宿主细胞形态结构的变化。而对于铜绿微囊藻912来说,不但感染后细胞变得更加圆滑,而且细胞开始分散,不再呈现群体状态,说明病毒的侵染使得宿主的形态以及群体结构都发生了改变,而通过电镜观察藻细胞的超微结构改变更加明显,感染之后,细胞膜开始溶解,类囊体、羧化体等细胞器遭到损伤,内部结构遭到大量破坏,此时宿主已经完全丧失活性,开始裂解死亡。电镜观察可以很明显地看到病毒侵染造成了铜绿微囊藻912的细胞超微结构的改变,说明从水样中提取的噬藻体能够特异性感染铜绿微囊藻912。

本实验用PCR技术对噬藻体目的基因进行检测,根据噬藻体Ma-LMM01编码ribonucleoside-diphosphate reductase的基因序列设计引物。Ma-LMM01是目前淡水水域噬藻体中研究的比较多的一种噬藻体,是近年来研究的热点,噬藻体Ma-LMM01的基因组全长为162129bp,呈线性环状排列,包含184个蛋白编码基因和两个tRNA

基因(Takashi et al., 2006; Takashi et al., 2008). ribonucleoside-diphosphate reductase 是广泛存在于各种生物体内的一种还原酶, 是 DNA 合成的关键控制酶, 它可以催化核糖核苷二磷酸还原为脱氧核糖核苷酸, 且具有高度的保守性, 因此可以根据 MA-LMM01 的序列来设计引物检测噬藻体的存在。对噬藻体目的基因进行 PCR 检测过程中, 水样中病毒浓度的高低直接影响到能否检测出病毒, 如果病毒浓度很低, 很可能影响到病毒的检测, 因此水样的浓缩是很重要的一步, 采用超离的方法将感染后的样品进行浓缩, 无疑大大增加了病毒被检测出的几率。实验中只有 6 月份浓缩水样的感染组有目的条带, 7 月、8 月浓缩水样的感染组并无目的条带, 很可能是由于 7 月和 8 月实验组中病毒丰度太低, 提取的 DNA 量太少, 不能有效检测出病毒的存在。6 月份浓缩水样的实验组检测出的目的基因的 DNA 片段大小约为 400bp, 与预计的大小 391bp 接近。

噬藻体在自然界中大量存在, 尤其存在于富营养化的水体中 (Suttle, 2000; 郭亚新等, 2003), 环境监测结果显示噬藻体的数量与藻类的数量总是保持着季节性的平行关系, 噬藻体的浓度总是在夏秋季节水温最高时达到最高, 此时藻细胞的数量也最丰富, 两者呈现一种动态平衡过程 (Suttle, 1994)。目前, 噬藻体的分离感染主要采用将自然水体中的水样过 0.45 μm 、0.22 μm 滤膜, 然后按照一定比例加入对数期的蓝藻藻液中检测有无感染现象的发生。一般认为, 两周时间内能使得藻液发生感染, 则认为该病毒能特异性的感染蓝藻 (Adoloh et al., 1971; Sherman et al., 1976)。实验中采用的四个藻种均为目前从太湖自然水体中分离得到, 因此从太湖水体中提取病毒并对蓝藻进行特异性感染有利于噬藻体的分离提取。

噬藻体是否对蓝藻发生感染可以从颜色变化上来判断, 但是灵敏度低, 因此并不能完全说明不存在能特异性感染的病毒, 很有可能是由于噬藻体浓度较低, 加上噬藻体失活和降解, 无法造成很明显感染现象, 而对感染后的藻细胞进行显微计数则能更准确证实水样中提取的噬藻体在一定程度上抑制铜绿微囊藻 912 的生长。研究表明, 病毒颗粒的浓度对侵染宿主影响很大, 病毒颗粒浓度越高, 越容易发生侵染, 引起宿主的裂解 (Gromov, 1983; Wang, et al., 2003)。经过浓缩的 6、7、8 月份水样对铜绿微囊藻 912 的生长都能发生很明显的抑制作用。

噬藻体在自然界中一方面以游离的形式存在于水体中, 另一方面存在于藻细胞内。藻液经过反复冻融后, 细胞壁破裂, 细胞内的病毒颗粒被释放, 经过聚乙二醇和

氯化钠的富集后，感染液中病毒颗粒浓度大大增加，使得接触感染的几率增大，从而更容易发生特异性感染。本实验从藻细胞提取噬藻体并对宿主蓝藻的感染中，很可能存在两种噬藻体，一种能特异性感染铜绿微囊藻 912，另外一种能特异性感染水华微囊藻 1005。实验中，6 月藻样感染对数期的藻液，经过一定时间，均能使得铜绿微囊藻 912 以及水华微囊藻 1005 发生感染，其中铜绿微囊藻 912 感染现象更加明显，而鱼腥藻 245 无感染现象，这也从另一方面说明了，南太湖水域中存在能特异性感染铜绿微囊藻 912 的噬藻体。

通过显微形态和超微结构观察以及 PCR 技术进行定性检测，可以证实南太湖水域中存在能特异性感染铜绿微囊藻 912 的噬藻体，而铜绿微囊藻 912 是目前从太湖水域中分离得到的一株产毒微囊藻，这为研究宿主蓝藻和噬藻体的生态关系提供了研究基础，也为抑制太湖蓝藻水华实现生物控藻提供一种全新的思路和方法，对今后防治蓝藻水华将起到非常重大的作用。

第四章 结论

1. 从 2008 年 11 月到 2009 年 10 月南太湖水域浮游植物共 5 门 11 个属, 呈现多样性特点, 全年蓝藻占优势, 其中微囊藻是全年的优势种群, 鱼腥藻是第二大优势种群。
2. 通过对藻细胞感染前后的显微形态以及超微结构变化, 并通过 PCR 技术对目的基因的定性检测, 证实了南太湖水域中存在能特异性感染铜绿微囊藻 912 的噬藻体。

参考文献:

- Adoloh K W and Haselkorn R (1971). Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *Virology* **46**: 200-208.
- Chen J and Xie P (2005). Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon* **45**(5):615-625.
- Chen J and Xie P (2007). Microcystin accumulation in freshwater bivalves from Lake Taihu, China, and the potential risk to human consumption. *Environ Toxicol Chem* **26**(5):1066-1073.
- Dawson, R. M (1998). The toxicology of microcystins. *Toxicon* **36** (7): 953-962.
- Dorigo U, Jacquet S, Humbert J F. (2004). Cyanophage diversity, inferred from g20 gene analyses, in the largest natural lake in France, Lake Bourget. *Appl Environ Microbiol* **70**:1017-1022.
- Frederickson C M, Short S M, Suttle C A. (2003). The Physical environment affects cyanophage communities in British Columbia inlets. *Microb Ecol* **46**:348-357.
- Fuhrman J (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**: 541-548.
- Keizo N, Mineo Y. (1997). Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquat Microb Ecol* **13**:135-140.
- Kohoutek, J. and P. Babica, et al. (2007). A novel approach for monitoring of cyanobacterial toxins: development and evaluation of the passive sampler for microcystins. *Anal Bioanal Chem*.
- Liu Y Q and Xie P, et al. (2008). Seasonal dynamics of microcystins with associated biotic and abiotic parameters in two bays of lake Taihu, the third largest freshwater lake in China. *Bull Environ Contam Toxicol* **80**(1):24-29
- Muhling M, Fuller N J, Millard A, et al. (2005) Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage communities; evidence for viral control of phytoplankton. *Environ Microbiol* **7**:499-508.
- Paerl H W and Fulton R S III, et al. (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Sci World J* **1**:76-113.
- Rai A N (1990). *CRC Handbook of Symbiotic Cyanobacteria*. CRC Press, Boca Raton, 253.
- Sekijima, M. and T. Tsutsumi, et al. (1999). Enhancement of glutathione S-transferase placental-form

- positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats. *Carcinogenesis* **20** (1): 161-165.
- Sherman L A and Brown R M (1978). Cyanophage and virus of eukaryotic algae, In: H. Fraenkel-Conrat et al. eds. *Comprehensive Virology*. New York: Plenum Press 145-243.
- Sherman L A and Cornelly M (1976). Isolation and characterization of a cyanophage infecting unicellular blue-green algae. *A. nidulans* and *S. cedrerum*. *Virology* **72**: 540-544.
- Stephen T and Peter P (2005). Identification of Cyanophage Ma-LBP and infection of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from an Australian subtropical lake by the virus. *Appl Environ Microbiol* **71**(2): 629-635.
- Stoddard L I, Martiny J B H, Marston M F. (2007). Selection and Characterization of Cyanophage Resistance in Marine *Synechococcus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(17):5516-5522.
- Suttle C. (2000). Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria. *The ecology of the cyanobacteria*: Kluwwer Academic publishers 563-589.
- Suttle C A, Chan A M. (1994). Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3167-3172.
- Takashi Y and Yukai T, et al. (2006). Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl and Environ Microbiol* **72**(2): 1239-1247.
- Yoshida T, Nagasaki K, Takashima Y, et al. (2008). Ma-LMM01 infecting toxic *Microcystis aeruginosa* illuminates diverse cyanophage genome strategies. *J Bacteriol* **190**(5): 1762-1772.
- Yukari T, Takashi Y, Aki K, et al. (2007). Cryopreservation of a Myovirus Infecting the Toxin-Producing Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbes Environ* **22**(3):297-299.
- Tomaru Y and Tarutani K, et al. (2004). Quantitative and qualitative impacts of viral infection on a *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay. *Aquatic Microb Ecol* **34**: 227-238.
- Wang C Y, Guo Y X, Chen K, et al. (2003). The correlation of host's growth with enlargement of plaque and adsorption rate of cyanophage. *Acta Hydrobiologica Sinica* **27**:660-663.
- Gromov B V (1983). Cyanophage. *Ann Microbiol* **134**:43.
- Xie L and Xie P, et al. (2005). Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater

- fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ Toxicol* 20(3):293-300.
- Zegura, B. and I. Zajc, et al. (2007). Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis. *Toxicon*.
- Zhao Y J and Chen Kai, et al. (2002). Isolation and identification of the first strain Cyanophage (Cyanobacteria virus) in our country *Progress in Natural. Science* 12(9): 923-927.
- 陈家长, 孟顺龙, 尤洋, 等 (2009). 太湖五里湖浮游植物群落结构特征分析. *生态科学学报* 18 (4):1358-1367.
- 陈洪达, 方榕乐, 王耕南, 等 (1965). 太湖综合调查初步报告. 北京: 科学出版社.
- 陈宇炜, 高锡芸, Dokuli M (1998). 太湖梅梁湾浮游植物动态及其初级生长力周年变化的研究. 太湖环境生态研究 (一). 北京: 气象出版社. 98-108.
- 郭亚新, 程凯, 赵以军, 等 (2003). 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*. 23(2):167-170.
- 华荣生 (2001). 太湖蓝藻治理方法初探. *水产养殖* 1:31-34
- 和丽萍 (2000). 利用化学杀藻剂控制滇池蓝藻水华研究. *云南环境科学* 20(2):43-44.
- 黄涟平, 范成新, 濮培民, 等 (2001). 太湖水环境以其污染控制. 北京: 科学出版社.
- 李秉柏, 施德堂, 王志明. (2007). 太湖蓝藻暴发的原因及对策建议. *江苏农业科学* 6:336-339.
- 李恒鹏, 杨桂山, 黄文钰, 等 (2007). 太湖上游地区面源污染氮素入湖量模拟研究. *土壤学报* 44 (6):1063-1069.
- 钱奎梅, 陈宇炜, 宋晓兰, 等 (2008). 太湖浮游植物优势种长期演化与富营养化进程的关系. *生态科学*. 27(2): 65-70.
- 饶钦止 (1961). 五里湖 1951 年湖泊学调查. *水生生物学集刊* 1:74-92.
- 饶钦止, 章宗涉 (1980). 武汉东湖浮游植物的演变 (1956-1975 年) 和富营养化的问题. *水生生物学报* 7: 1-17.
- 苏嫚丽, 赵言文, 胡正义等. (2009). 太湖流域农村污水特征研究. *江西农业学报* 21(7): 176-179
- 宋晓兰, 刘正义, 潘宏凯等. (2007). 太湖梅梁湾与五里湖浮游植物群落比较. *湖泊科学* 19 (6):643-651.
- 孙顺才, 黄涟平 (1993). 太湖. 北京: 科学出版社.
- 谢平 (2007). 论蓝藻水华的发生机制. 北京: 科学出版社.

- 许秋瑾, 高光, 陈伟民(2005). 太湖微囊藻毒素年变化及其与浮游生物的关系. 中国环境科学 25: 28-31.
- 王兴民, 陈书琴, 金相灿, 等(2006). 贡湖、梅梁湾沿岸浅水区观测场水生植物周年动态及影响因素研究. 环境科学研究 19:29-33.
- 杨坚波, 林玉娣(2004). 无锡太湖水域蓝藻污染与治理经济效益分析. 中国初级卫生保健 18: 1.
- 原居林, 尹文林, 沈锦玉, 等(2009). 南太湖浮游植物特征及其富营养化评价. 生态学杂志 28(11): 2197-2201.
- 尹海川, 柳清菊, 林强(2005). 纳米 TiO_2 掺杂贵金属 Pt 抑制蓝藻的生长. 功能材料 12(36):1934-1937.
- 周立国, 冯学智, 王春红(2008). 太湖蓝藻水华的 MODIS 卫星监测. 湖泊科学 20:203-207
- 周小宁, 蒋霞, 金相灿(2007). 太湖梅梁湾沉积物的垂直分布及环保疏浚深度的推算. 中国环境科学 27:445-449.
- 朱广伟, 秦伯强, 张路, 等(2005). 长江中下游湖泊沉积物中磷的形态及藻类可利用量. 中国科学 D 辑 35(增刊 II):24-32.
- 赵汉取, 韦肖杭, 姚伟忠, 等(2009). 蓝藻爆发后南太湖水域浮游生物及富营养化. 浙江海洋学院学报 28(1):21-24.

作者简历及在学期间所取得的科研成果

作者简历:

梁兴飞, 男, 2007 年 7 月毕业于南京农业大学生物工程专业, 2007 年 9 月至 2010 年 3 月就读于浙江大学生工食品学院农业水土工程专业攻读硕士学位。

在读期间完成的论文:

梁兴飞, 郭宗楼. 超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素 a 的方法优化[J].

水生生物学报 (出版中)

在读期间参与的科研项目:

水体污染控制与治理国家科技重大专项子课题: 高藻湖泊型原水取水口藻类拦截与生物控制关键技术研究 (2008ZX07421-001)

综述

淡水水域中噬藻体的研究进展

梁兴飞, 郭宗楼

关键词: 蓝藻; 病毒; 噬藻体; 铜绿微囊藻

Key word: cyanobacteria; virus; cyanophage; *microcystis aeruginosa*

水体富营养化是目前世界各国面临的一个重大环境问题,而形成水华的藻类(主要是蓝藻)的大量繁殖正是水体富营养化的重要表征之一。大规模蓝藻水华的暴发降低了水资源的利用效能,引起了严重的生态问题,许多蓝藻特别是微囊藻属(*Microcystis*)是产毒的,毒素释放到水体中后,败坏了水质,危害了人类及其它生物的健康。因此抑制产毒蓝藻繁衍,防止水华的暴发已经成为人们关注的热点。

目前,尽管对蓝藻水华的产生机制已经研究了很多,但是最近研究发现,除了光照、温度等物理因子以及N、P等化学物质的影响外,大量噬藻体(Cyanophage)对蓝藻的裂解可能是非常重要的控制蓝藻水华的影响因子(Tomaru et al., 2004)。一般来说,蓝藻水华总是保持季节性周期出现,集中出现在早春和晚秋,但是蓝藻水华并不会经常发生(Elser et al., 1999),其中一个很重要的因素就是噬藻体在水体中微生物群落的更替中扮演了非常重要的角色,潜在地控制了蓝藻的生长(Fuhrman, 1999)。近年来,蓝藻水华频繁暴发,淡水水域中噬藻体的生态作用也越来越受到重视(Suttle et al., 2000; Stephen et al., 2005; Takashi et al., 2006),各国的研究者对噬藻体的生态学和分子生物学进行了大量的研究。

1 噬藻体的概述

蓝藻(Cyanobacteria)是一类原核生物,也是地球上最早出现的光合自养生物,具有细菌的一切特征,因此又常称为蓝细菌。相应地,把特异性感染蓝细菌的病毒成为噬藻体(Sherman et al., 1978),它们是浮游病毒的重要组成部分。

噬藻体最早是在1963年Safferman和Morris在一个废水稳定塘(A waste-stabilization pond)中分离得到的一类病毒,它们同时侵染鞘丝藻(Lynbya)、席藻(Phormidium)及织线藻(Plectonema),这类最早发现的病毒被命名为“LPP-1”病毒(Safferman, 1963),以后陆续又发现了其它的噬藻体。

噬藻体的命名是根据宿主的名称即取宿主的拉丁文的第一个字母,如分离的宿主为鱼腥藻(*Anabaena*)的病毒,简称“A”病毒(Rippka et al., 1979),感染念珠藻(*Nostoc*)

的“N”病毒(Adoloh et al., 1971)等; 有的病毒能同时侵染“共专一宿主”(Cospecific host), 如同时侵染组囊藻(Anacystis)和聚球藻(Synechococcus)的病毒被命名为“AS”病毒等(Sherman et al., 1976); 有的发现不同的血清学亚型, 字母后加上阿拉伯数字来表示, 如“SM-1”病毒、“SM-2”病毒及“LPP-3”病毒等(Safferman et al., 1969; Mendzhul et al., 1996)。

2 淡水噬藻体的分布

继第一株淡水噬藻体 LPP-1 从淡水中分离后, 1972 年, Safferman 等人从废水稳定塘中又分离出了另一株噬藻体 AS-1(Sherman et al., 1976), 该噬藻体为多面体形, 头部直径为 900nm, 带有一个可收缩的尾部。对宿主蓝藻的感染实验中发现病毒的潜伏期为 8.5h, 释放周期为 7.5h, 平均释放量为 50PFU (Plaque forming unit)/细胞。2002 年, 赵以军等人分离得到了我国第一株淡水噬藻体 (Mendzhul et al., 1996), 该噬藻体能够特异性感染织线藻(Plectonema)和席藻(Phormidium), 被命名为噬藻体 PP, 电镜下观察噬藻体头部直径为 52nm, 尾部很短, 基因组大小为 36kb, 推测为短尾病毒。27℃下裂解织线藻的周期为 4h, 其中潜伏期为 3h, 最后的 1h 为裂解期, 病毒释放量为 200PFU/细胞, 感染过程中, 织线藻的放氧速率急剧下降。

噬藻体虽然最早在淡水中发现, 但是关于它的研究远没有海洋中的多, 尤其是能够裂解引起“水华”微囊藻的噬藻体并没有太多的报道, 1976 年, Fox 等从淡水湖中分离得到了噬藻体 SM-2 (Fox et al., 1976), 研究发现它能够感染铜绿微囊藻 NPC-1 (Microcystis aeruginosa)。Benson 等人研究了光合作用抑制剂以及光的强弱变化对噬藻体 SM-2 的影响, 发现感染过程中, 宿主的光合作用持续增强, 病毒高度依赖宿主的光合作用来保持活性 (Benson et al., 1981)。1999 年, Manage 等研究了季节变化对噬藻体丰度的影响, 在 6 月到 9 月间, 铜绿微囊藻的数量随着噬藻体的丰度的增加而减少, 而且当宿主的数量处于较低的水平时候, 几乎检测不出病毒的存在 (Manage et al., 1999)。结果显示病毒的丰度和宿主之间有着非常重要的关系 ($r=0.81, n=69, p<0.01$), 研究表明噬藻体对铜绿微囊藻种群的演变有着重要的影响 (Manage et al., 2001)。2005 年, 在澳大利亚的 Baroon 湖中, Stephen 等人分离出多株能够裂解铜绿微囊藻水华的噬藻体, 命名为噬藻体 Ma-LBP, 该病毒属于短尾病毒科, 对 Ma-LBP 的研究表明, 噬藻体的丰度与铜绿微囊藻被裂解的速率是相关的 ($R^2=0.95$), 病毒的复制时间是 11.2h, 裂解量是 28PFU/细胞。实验的结果还显示, 在 Baroon 淡水湖中, 这类噬藻体可能是

控制铜绿微囊藻的最主要的自然因子。2006年,日本学者 Yoshida 等人又分离到了一株可以裂解淡水中铜绿微囊藻的噬藻体,命名为噬藻体 Ma-LMM01,该病毒属于肌病毒科新的家族中的成员,基因组大小为 162109bp,呈线性环状排列(Yoshida et al., 2008)Ma-LMM01 感染宿主时,该病毒的潜伏期为 6~12h,释放量为 50~120PFU/细胞。实验的结果也显示了这类噬藻体可以有效地控制铜绿微囊藻水华。

3 噬藻体对宿主的致死作用

噬藻体对宿主蓝藻高度专一的致死性使得它在治理蓝藻“水华”中的潜在作用引起了研究者的高度重视,人们发现在自然发生的蓝藻水华中加入了过量的噬藻体能够导致蓝藻的大量减少。传统概念认为,浮游动物的捕食是造成浮游藻类和菌类死亡的最主要的因素,研究也发现噬藻体不会与敏感宿主同时出现,这些都表明了噬藻体能够控制蓝藻的种群数量变化。将两者比较发现,捕食和裂解造成藻类的致死效力是相当的,但当具体到环境中,宿主的个体大小和浓度、水深、盐度、溶解氧等情况可能影响二者所占的比重(Gromov, 1983),结果也证明了噬藻体在控制宿主种群的繁殖上发挥了重要的作用。

4 影响噬藻体分布和动态变化的因素

噬藻体的分布和动态变化主要是由其增殖和失活决定的,影响其增殖的因素主要是由接触、吸附、增殖和释放量决定的;而影响它失活的因素包括很多方面,其中最主要的造成病毒失活的物质包括天然细菌、热敏性物质、酶、胶体、有机颗粒物、重金属以及日光辐射的致死作用等(Wilhelm et al., 1998),其中日光辐射的致死作用是最主要的因素,它能在几个小时内使得整个病毒种群失去活力(Weinbauer et al., 1997)。

4.1 影响噬藻体接触和吸附的因素

噬藻体对宿主的接触和成功吸附是感染的前提,主要是由噬藻体和宿主的浓度、宿主细胞大小和噬藻体的颗粒大小决定的。

4.1.1 宿主浓度的影响

宿主浓度是影响噬藻体吸附能力的重要因素。当宿主细胞的浓度降至某一阈值时,病毒失活和降解的速率超过病毒增殖的速度,必然导致有感染力的病毒数量的减少。对裂解聚球藻的噬藻体的研究表明野外环境中噬藻体的增殖需要宿主细胞达到一定的浓度,只有当聚球藻浓度大于 $10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,噬藻体才能够增殖。而且随着浓

度的增加,吸附速率不断提高,达到饱和吸附的时间也不断延长(王春艳等,2003)。所以宿主浓度对噬藻体的增殖有着很大的影响,而且影响浓度存在一个阈值。

4.1.2 病毒浓度的影响

病毒自身的浓度也是影响病毒成功吸附的重要因素。Wilcox 和 Fuhrman 等发现,如果微宇宙系统中的病毒 VDC (Viral direct counts) 浓度要达到野外水平的话,病毒的初始浓度就必需大于 $10^6 \text{PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$,他们还推测只有当这宿主浓度和病毒浓度的乘积大于 10^{12} 时病毒才能增殖(Wilcox et al., 1994)。宿主细胞大小和病毒颗粒大小对成功吸附的影响可能是因为表面积越大,提供更多的受体位点与病毒发生特异性吸附的缘故,这样能够发生碰撞的机会就越大 (Hadas et al.,1997)。

4.1.3 物理因子对吸附的影响

通常来说,人们认为噬藻体的吸附需要二价阳离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+})的参与,也有研究发现不同浓度的磷酸盐浓度对吸附有显著影响 (Safferman et al., 1964)。虽然对离子对病毒吸附的影响机制还没有具体的研究,但是研究发现高浓度的阳离子是某些噬藻体吸附所必需的,因此,可以认为噬藻体的吸附是受到阳离子的影响的。

光照对噬藻体吸附速率的影响十分明显,主要是通过光化学反应或者光诱导来改变细胞表面的离子构成从而使细胞表面发生电荷中和,增加吸附速率,而在有光照吸附的条件下吸附率明显高于无光照条件的。在观察噬藻体 AS-1 的吸附实验中,发现光吸附比暗吸附约快 2 倍,而且都发生在前 10min,而在 90min 后发现有很大的比例的噬藻体没有吸附到宿主细胞上。而对噬藻体 PP 的吸附率研究表明,光吸附在 7min 时达到饱和,而暗吸附则延长至 15min 才能达到饱和。

4.2 影响噬藻体稳定性的环境因子

噬藻体在环境中受众多因子的制约,其中影响活性的主要是光照、温度、盐度、营养水平、pH 值、颗粒性物质等。光照在噬藻体的生态系统扮演着非常重要的角色 (Clokic et al., 2006),是众多环境因子当中对噬藻体活性影响最大的。日光对病毒起作用的主要是短波段的紫外线 (Ultraviolet Radiation,UV)。实验表明,当自然水体中的病毒处于完全日光照射下,病毒的失活率为 $10\sim 40\% \text{h}^{-1}$,并随深度增加而急剧降低,其中主要是由于 UV-B 的降低(Wilhelm et al., 1998)。赵以军等对噬藻体 PP 进行研究发现,光照是噬藻体繁殖的必要条件。人们也发现失活的病毒经过日光辐射能够恢复活性。程凯等对噬藻体 PP 在光损伤后进行 UV-B 光修复实验(Kai et al., 2007),研究

发现病毒的感染力从 28.9%提高到了 92.1%，并且在很短的时间内达到最大值，研究结果表明，噬藻体 PP 在 UV-B 下快速进行光修复从而恢复感染力。应用免疫化学探测技术(Immunohistochemical detection technology)研究 DNA 损伤和病毒的失活之间的关系上发现，宿主的介导的光修复机制在病毒 DNA 的修复中起了重要作用。而且也发现病毒活性的恢复和水体的环境因素有关，光修复率在远洋的贫营养海水样品中只能达到 25%，在近岸的富营养化的水体中则达到 50%以上(Weinbauer et al., 1993)。

温度是影响噬藻体感染力的又一个重要因素。噬藻体的释放量随温度的升高有大幅度的增加，而且在低温条件下其裂解周期也有明显的延长。一般认为 4℃下噬藻体能够稳定的保存，但是随着时间的延长，病毒的活性降低。研究发现噬藻体 Ma-LMM01 在 4℃储存 100 天，病毒的感染活性减低了 90%，而在液氮中储存的噬藻体活性基本没有什么变化(Yukari et al., 2007)。但是高温对病毒的活性影响很大，40℃下噬藻体分离株只能稳定一至几小时，到 50℃以上时噬藻体就很快失活(Maranger et al., 2005)。温度对噬藻体增殖的影响很可能是通过对细胞内某些酶活性的调节来实现的。

无机盐离子特别是阳离子可以影响病毒的稳定性。如噬藻体 LPP-1 和 SM-2 在有 Mg^{2+} 存在时比悬浮在去离子水中更稳定，AS-1 也是在有阳离子存在时更稳定，此外，其他的阳离子如 Mn^{2+} 或 Na^{+} 等也能稳定某些噬藻体。对噬藻体 LPP-1 的研究认为 LPP-1 需要一定浓度的 Mg^{2+} 来保持其衣壳的完整性，当 Mg^{2+} 浓度为 1mM 及以上浓度时 LPP-1 具有感染性，而当浓度为 0.1mM 时感染性丧失(Maranger, 1981)。但病毒对阳离子的需求也并不是绝对的，其原因很有可能是由于不同的病毒种类在不同离子环境中下具有不同的吸附能力。

N、P 水平也会影响噬藻体的增殖。有研究发现，富营养化水体中病毒释放量要高于中等营养水体中的。说明，N、P 浓度会促进病毒的增殖的，这可能是因为 N、P 对于病毒胞膜蛋白及 DNA 的合成是必需的。

pH 值对噬藻体稳定性的影响不大。研究发现，淡水噬藻体在更广的 pH 范围内具有感染性，如 LPP-1、AS、SM-1 能在 pH 为 5~11 时保持稳定(Safferman et al., 1972)。由于噬藻体具有如此广泛的 pH 耐受范围，因此可说明环境中 pH 值的改变不大可能影响噬藻体在自然界中的分布。

重金属离子对噬藻体的稳定性也有一定影响，部分重金属离子可以诱导噬藻体发

生裂解。Lee 等研究了温性噬藻体 AS-1 在重金属诱导下发生裂解的过程(Lee et al., 2006), 发现 Cu^{2+} 是一种诱导病毒发生裂解的诱发因子, 当 Cu^{2+} 在 $3.1 \times 10^{-6} \sim 3.1 \times 10^{-4} \text{M}$ 时, 噬藻体 AS-1 能够感染宿主。研究也发现金属离子诱导噬藻体发生裂解可能与宿主受体位点的变化有关(Stoddard et al., 2007)

除了上述因素外, 天然细菌、热敏感性物质、胶体、酶、有机颗粒物等都会造成噬藻体的失活, 但这些因素相对来说不是很重要, 研究表明只占整个噬藻体种群失活率很小的一部分, 早期研究了解到理化因子、生物因素、细菌群落及可溶性有机物等都会对病毒的活性有影响, 但是近期的研究表明, 光照是病毒增殖最重要的环境因子, 约有 2/3 的浮游病毒能被 <320nm 的 UV-B 所杀灭(Suttle, 1992)。

5 噬藻体的分子生物学研究

噬藻体的分子生物学研究是一个新兴的研究领域, 涉及到从宏观生态学到分子生物学的诸多门类, 而且有待解决的问题也很多, 迄今为止, 人们已经建立了以 PCR 为核心的定性检测方法, 并且已经将 PCR 技术用于分析天然水样中的噬藻体种类及分布, 并根据基因序列建立了以 PCR 为核心的定性检测方法。应用信号介导扩增核酸技术 (SMART) 构建噬藻体的基因文库以及对噬藻体的基因组全序列测定也取得了一定的进展。

5.1 PCR 为核心的定性检测

近年, 以 PCR 为核心的定性检测方法检测水体中噬藻体的多样性和丰度取得了很大成果。Takashima 等在对噬藻体 Ma-LMM01 的衣壳鞘蛋白进行研究时候发现, 当蓝藻水华发生的时候, 利用实时荧光定量 PCR 技术 (A real-time quantitative PCR) 可以检测到噬藻体的存在。Baker 等成功利用寡核苷酸序列 (Oligonucleotide sequence) 为引物检测到了噬藻体 AN-15 衣壳蛋白的存在 (Andrea et al., 2006), 并以此作为一种诊断探针监测了淡水水域中噬藻体的丰度变化, 为研究淡水水域中噬藻体种群的多样性提供了有用的工具。Fullerd 等利用竞争性聚合酶链反应 (cPCR) 技术对水体中感染聚球藻的噬藻体进行了定性检测和定量分析, 他们还利用该技术研究自然水体中病毒的基因多样性(Nicholas et al., 1998)。随着分子生物学技术手段的发展, 利用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 和 PCR 相结合的技术手段来研究噬藻体的分子生物学的相关问题也有一定进展, 如利用噬藻体高度保守的 g20 结构基因, 研究噬藻体的空间分布特征, 影响空间分布的物理因子, 噬藻体种群多样性和种群组成, 病毒和宿主的关系。

系,与噬菌体(Phage)之间的亲缘关系,不同噬藻体之间的遗传性等(Frederickson et al., 2003; Dorigo et al., 2004; Muhling et al., 2005)。

5.2 SMART 技术的基因检测

SMART 技术是一种依赖于多拷贝的信使 RNA,利用酶联寡聚吸附技术来扩增的新技术。近年来应用 SMART 技术来分析噬藻体的基因核苷酸序列,构建噬藻体的 cDNA 基因文库取得了一定突破。2002 年, Hall 等利用与 g20 基因互补的 DNA 为探针(Hall et al., 2002),采用 SMART 技术能高效特异的检测出海洋中的蓝藻病毒 DNA。2007 年, Wharam 等人利用 SMART 技术进行噬藻体的分子生物学研究(Susan et al., 2007),他们将 g20 标记来检测噬藻体感染宿主后的表达情况。SMART 技术为研究噬藻体感染以及基因表达提供了又一种重要的分子生物学手段。

5.3 基因组全序列测定

噬藻体的基因组全序列测定对于了解其生物学特性以及与蓝藻之间系统进化的关系具有深刻的含义。2002 年, Chen 等人发表了第一株烈性噬藻体“P60”的基因组序列的全文(Chen et al., 2002),研究显示,该基因组的几个读码框的编码蛋白与聚球藻的蛋白酶的序列惊人的相似,而且基因组包含大约 80bp 的潜在开放读码框(Potential Open Reading Frames),这与 T7, phi-YeO3-12, SIO1 很相似,所有的这些都反映了 P60 的系统进化关系。通过对已经分离了的多株聚球藻病毒发现,短尾病毒科噬藻体绝大多数是裂解性的,肌病毒科和长尾病毒科的噬藻体有更大的遗传差异性和宿主抗性。2007 年,刘新尧等人报道能够感染淡水蓝藻宿主的噬藻体 Pf-WMP4 的全部基因序列(Liu et al., 2007),其中的 45 个潜在开放读码框中,有 9 个的基因序列和 T7 噬菌体的非常相似,体外转录实验发现,7 个位于基因序列末尾左端的启动子能够被宿主 RNA 聚合酶所确认。2008 年, Yoshida 等首次对能够感染铜绿微囊藻的噬藻体 Ma-LMM01 进行了基因测序,发现 Ma-LMM01 含有三种编码移位酶的基因,而这同样也在宿主中的基因中也检测到,结果暗示在宿主和病毒间发生了基因的转移。实验中也发现 Ma-LMM01 含有 NblA 的同源基因,这对藻胆蛋白的降解和降低宿主对光能的吸收非常重要。

由于目前对噬藻体遗传进化的研究不是很多,加上噬藻体本身的高度差异性,缺乏有效的标记基因来进行研究,限制了对噬藻体和宿主蓝藻的遗传和进化的研究,但是随着噬藻体形态学、宿主系统的关系、特别是基因组学的研究为它们提供了进化

和分类的重要线索。人们发现短尾噬藻体的 DNA 聚合酶基因和肌病毒噬藻体的结构蛋白基因 g20 具有相当强的保守性,因此可以利用它们作为研究噬藻体的分子进化的标记基因,从而建立噬藻体的系统进化图谱。

6 研究展望

目前,噬藻体作为一种重要的控制蓝藻水华暴发的生物控制因子已经引起了人们的关注。在我国淡水水域中,蓝藻特别是铜绿微囊藻水华的暴发已经严重威胁到人们日常生活甚至人类健康。从我国自然水体中分离并筛选出特异高效的噬藻体,重点研究噬藻体和宿主蓝藻之间的关系、噬藻体的空间分布和种群组成,研究宿主蓝藻和噬藻体的进化关系等都将为抑制蓝藻水华实现“生物控藻”提供一种全新的思路和方法,对今后防治蓝藻水华将起到非常重大的作用。

我国对噬藻体的研究仅仅停留在生态研究,分子生物学相关研究几乎是空白。目前应用 PCR 为核心的定性检测方法已经日益成熟,今后可以利用这种技术分析淡水水样中的噬藻体种类及分布,应用和发展诊断分子探针 (Diagnostic molecular probe) 来对蓝藻水华的暴发做出预警。利用 DGGE 和 PCR 相结合的技术手段来研究噬藻体种群多样性和种群组成、同海洋中噬藻体进化关系以及不同噬藻体间的遗传性等,而用 SMART 技术来构建噬藻体基因文库必定在淡水水域中噬藻体的研究上发挥更大作用。

References:

- Adoloh K W, Haselkorn R.(1971). Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *Virology* **46**: 200-208.
- Amla D V.(1981). Chelating agent shock of cyanophage AS-1 infecting unicellular blue-green. *Indian. J Exp Biol* **19**:209-211.
- Andrea C.Baker, Victoria J. (2006).Goddard,Identification of a Diagnostic Marker To Detect Freshwater Cyanophages of filamentous Cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* **9**: 5713-5719.
- Benson, R., and E. Martin.(1981). Effects of photosynthetic inhibitors and light-dark regimes on the replication of cyanophage SM-2. *Archives of Microbiology* **129**:165-167.
- Chen F, Lu J. (2002) Genomic sequence and evolution of marine cyanophage P60: a new insight on lytic and lysogenic phages. *Appl Environ Microbiol* **68**:2589-2594.
- Clokier M R J, Mann N H.(2006). Marine cyanophages and light. *Environmental Microbiology* **8**(12):2074-2082.
- Dorigo U, Jacquet S. (2004). Humbert J F. Cyanophage diversity,inferred from g20 gene analyses,in the

- largest natural lake in France, Lake Bourget. *Appl Environ Microbiol* **70**:1017-1022.
- Elser J. (1999). The pathway to noxious cyanobacterial blooms in lake: the food web as the final turn. *Freshwater. Biology* **42**: 537-543.
- Frederickson C M, Short S M, Suttle C A. (2003). The Physical environment affects cyanophage communities in British Columbia inlets. *Microb Ecol* **46**:348-357.
- Fox J A, Booth S J, Martin E L. (1976). Cyanophage SM-2: A new blue-green algal virus. *Virology* **73**:557-560.
- Fuhrman J. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**: 541-548.
- Hadas H, Einav M, Fishov I, et al. (1997). Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiol* **143**:179-185.
- Gromov B V. (1983). Cyanophage. *Ann Microbiol* **134**:43.
- Hall M J, Wharam S D, Cardy D L, et al. (2002). Use of Signal-Mediated Amplification of RNA Technology (SMART) to Detect Marine Cyanophage DNA. *BioTechniques* **32**(3), 604-611.
- Kai Cheng, Yijun Zhao, Xiuli Du, et al. (2007) Solar radiation-driven decay of cyanophage infectivity, and photoreaction of the cyanophage by host cyanobacteria. *Aquat Microb Ecol.* **48**, 13-18.
- Lee H L, Doris L, Patricia J P, et al. (2006). Induction of temperate cyanophage AS-1 by heavy metal-copper. *BMC Microbiology.* **2**(24):6-17.
- 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.
- Manage P M, Kawabata Z, Nakano S. (1999). Seasonal changes in densities of cyanophage infectious to *Microcystis aeruginosa* in a hypereutrophic pond. *Hydrobiologia* **411**:211-216.
- Manage P M, Kawabata Z, Nakano S. (2001). Dynamics of cyanophage-like particles and algicidal bacteria causing *Microcystis aeruginosa* mortality. *2*:73-78.
- Mendzhul M I, Koltukova N V, Lyysenko T G, et al. (1996). Effect of reproduction of cyanophage LPP-3 on activity of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in the cells of cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Ukrain Biokhim Zhur* **67**: 33-38.
- Nicholas J. Fuller, William H, et al. (1998). Occurrence of a Sequence in Marine Cyanophages Similar to That of T4 g20 and Its Application to PCR-Based Detection and Quantification Techniques. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2051-2060.
- Rippka R, Derwent J, Waterbury J B, et al. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Gen Microbiol* **111**: 1-61.
- Safferman R S, Diener T O. (1972). Desjardins PR and Morris ME Isolation and characterization of AS-1, phycovirus infecting the blue-green alga, *Anacystis nidulans* and *Synechococcus cedrorum*. *Virology* **47**:105-113.
- Safferman R S, Morris M E. (1964). Growth characteristics of the blue-green algal virus LPP-1. *J Bacteriol* **88**: 771-775.
- Safferman R S, Schnerder J R, Steere R L, et al. (1969). Phycovirus SM-1, a virus infecting unicellular

- blue-green algae. *Virology* 37: 3860-3895.
- Safferman R S, Morris M E. (1963). Algal viruses: isolation. *Science* 140: 679-680.
- Sherman L A, Brown R M. (1978). Cyanophage and virus of eukaryotic algae, In: H. Fraenkel-Conrat et al. eds. *Comprehensive Virology*. New York: Plenum Press 145-243.
- Sherman L A, Cornelly M. (1976). Isolation and characterization of a cyanophage infecting unicellular blue-green algae. *A. nidulans* and *S. cedrerum*. *Virology* 72: 540-544.
- Stephen T, Peter P. (2005). Identification of Cyanophage Ma-LBP and infection of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from an Australian subtropical lake by the virus. *Appl Environ Microbiol* 71(2): 629-635.
- Stoddard L I, Martiny J B H. (2007). Marston M F. Selection and Characterization of Cyanophage Resistance in Marine *Synechococcus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 73(17):5516-5522.
- Susan D W, Matthew J H, William H W, et al. (2007). Detection of virus mRNA within infected host cells using an isothermal nucleic acid amplification assay: marine cyanophage gene expression within *Synechococcus* sp. *Virology Journal* 4(52):1-8.
- Suttle C. (2000). Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria. *The ecology of the cyanobacteria*: Kluwver Academic publishers 563-589.
- Suttle C A, Chen F. (1992). Mechanisms and rate of inactivity of marineviruse in seawater. *Appl Environ microbial* 8:3721-3729.
- Takashi Y, Yukai T, Yuji T, et al. (2006). Isolation and charcterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruinsa*. *Appl and Environ Microbiol* 72(2): 1239-1247.
- Tomaru Y, Tarutani K, Yamaguchi K, et al. (2004). Quantitative and qualitative impacts of viral infection on a *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay. *Aquatic Microb Ecol* 34: 227-238.
- Wang C Y, Guo Y X, Chen K, et al. (2003) The correlation of host's growth with enlargement of plaque and adsorption rate of cyanophage *Acta Hydrobiologica Sinica* 27:660-663.
- Weinbauer M G, Wilhelms S M, Suttle CA, et al. (1997) Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine virus communities. *Appl Environ Microbiol* 63:2200-2205
- Weinbauer M G, Fuks D, Peuzzi P. (1993). Distribution of viruses and dissolved DNA along a coastal trophic gradient in the northern Adriatic Sea. *Appl Environ Microbiol* 59:4074-4082.
- Wilcox B M, Fuhrman J A. (1994). Bacterial viruses in coastal seawater: lytic rather than lysogenic production 114:35-45.
- Wilhelm S M, Weinbauer M G, Suttle C A, et al. (1998) Measurements of DNA damage and photoreactivation imply that most viruses in marine surface waters are infective. *Aquat Microb Ecol* 14:215-222.
- Wilhelm S W, Weinbauer M G, Suttle C A, et al. (1998). Measurements of DNA damage and photoreactivation imply that most viruses in marine surface waters are infective. *Aquat Microb Ecol* 14:215-222.

- Wilson W H, Carr N G, Mann N H. (1996). The effect of phosphate status on the kinetics of cyanophage in the oceanic cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7803. *J Phycol* 32:506-516.
- Xinyao Liu, Miao Shi, Shuanglei Kong, et al. (2007). Cyanophage Pf-WMP4, a T7-like phage infecting the freshwater cyanobacterium *Phormidium foveolarum*: Complete genome sequence and DNA translocation. *Virology* 36:28-39.
- Yoshida T, Nagasaki K, Takashima Y, et al. (2008). Ma-LMM01 infecting toxic *Microcystis aeruginosa* illuminates diverse cyanophage genome strategies. *J Bacteriol* 190(5): 1762-1772.
- Yukari T, Takashi Y, Aki K, et al. (2007). Cryopreservation of a Myovirus Infecting the Toxin-Producing Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbes Environ* 22(3):297-299.
- Zhao Y J, Chen Kai, Shi Z L, et al. (2002). Isolation and identification of the first strain Cyanophage (Cyanobacteria virus) in our country. *Progress in Natural. Science* 12(9): 923-927.
- 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, 27:660-663.