

## 噬藻体裂解蓝藻应用初探——以噬藻体 A-4(L) 侵染鱼腥藻 PCC 7120 为例\*

程 婷<sup>1,2</sup>, 杨毅玲<sup>1</sup>, 李 琪<sup>1</sup>, 甘南琴<sup>1\*\*</sup>

(1: 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)

(2: 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘 要:** 噬藻体在蓝藻水华发生后快速增殖被认为是蓝藻水华消亡的重要途径, 但有关噬藻体的应用却鲜有报道。本研究以噬藻体 A-4(L) 侵染鱼腥藻 PCC 7120 为例, 开展光照、温度和感染复数影响噬藻体裂解藻细胞的探究, 推定噬藻体在裂解蓝藻应用中的最佳投放时间及投放剂量。结果显示, 光照是影响噬藻体裂解藻细胞最关键的因子, A-4(L) 在全光照条件下且感染复数为 0.01 时, 8 h 即可快速裂解鱼腥藻 PCC 7120, 但在全黑暗条件下无裂解; 光照时长越长, A-4(L) 对藻细胞的裂解越快。进一步研究发现, A-4(L) 在藻细胞表面的吸附不依赖光照, 但在黑暗条件下 A-4(L) 在藻细胞内的复制受到抑制, 推测 A-4(L) 的复制可能与宿主的光合作用有关。在 15~25℃ 范围内, 提高温度会加快 A-4(L) 裂解藻细胞的速度, 且胞外 A-4(L) 效价随着温度升高而增加。在  $10^{-6}$ ~1 范围内, 感染复数每提高两个数量级, A-4(L) 裂解藻细胞则提前 4 h。综合上述结果, 在 7:00 向湖水样品中投加感染复数为 0.01 的噬藻体可使 PCC 7120 藻细胞生物量在 24 h 内大幅度降低 76%。本研究为蓝藻水华发生时投加噬藻体控制蓝藻种群密度提供一定基础。

**关键词:** 噬藻体 A-4(L); 蓝藻; 鱼腥藻 7120; 裂解

## Appling cyanophage to lyse cyanobacterium—Taking the infection of *Anabaena* sp. PCC 7120 by cyanophage A-4 (L) as an example\*

Cheng Ting<sup>1,2</sup>, Yang Yiling<sup>1</sup>, Li Qi<sup>1</sup> & Gan Nanqin<sup>1\*\*</sup>

(1: State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P.R.China)

(2: University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P.R.China)

**Abstract:** Cyanophage can proliferate rapidly in the late stages of cyanobacterial blooms. Cyanophage lysis of cyanobacteria has been considered an important pathway that can induce cyanobacterial apoptosis. However, few reports have focused on the use of cyanophages. In this study, the infection of *Anabaena* sp. PCC 7120 by cyanophage A-4(L) was used as an example to investigate the influence of illumination, temperature and multiplicity of infection on cyanophage lysis, which can help us to determine the best timing and concentration of cyanophage addition. Our results showed that illumination was a key factor affecting cell lysis. A-4(L) lysed *Anabaena* sp. PCC 7120 after 8 hours at a MOI of 0.01 during continuous illumination, whereas no lysis occurred during dark incubation. In addition, prolonged illumination resulted in more rapid infection. Further studies showed that adsorption was not dependent on illumination. However, intracellular replication of cyanophage DNA was inhibited under dark conditions. It is speculated that the replication of A-4(L) DNA may be related to the photosynthesis of the host. Within the range of 15–25℃, higher temperature improved the lysis rate. The extracellular A-4(L) titer also increased with higher temperature. In the range of  $10^{-6}$ –1, A-4(L) lysed cells 4 h earlier when the MOI increased by two orders of magnitude. Taken together, we proposed the addition of cyanophage at a MOI of 0.01 between 7:00 and 12:00 for the purpose of bloom treatment. Further field experiments showed that the addition of cyanophage at a MOI of 0.01 at 7:00 am did indeed significantly reduce the biomass of PCC7120 algal cells by 76%

\* 2022-12-03 收稿; 2023-02-03 收修改稿。

国家重点研发计划项目 (2018YFA0903100) 资助。

\*\* 通信作者; E-mail: gannq@ihb.ac.cn。

within 24 hours. This study provides a basis for using cyanophages to control the abundance of cyanobacteria during cyanobacterial blooms.

**Keywords:** Cyanophage A-4(L); Cyanobacteria; *Anabaena* sp. PCC 7120; lysis

病毒在海洋和淡水系统中的含量超过每毫升  $10^7$  个<sup>[1]</sup>, 作为特异性感染蓝藻的病毒, 噬藻体数量丰富且种类繁多, 是水生微生物群落的重要组成部分。研究发现, 噬藻体主要通过裂解来调控宿主蓝藻的密度及种群结构<sup>[2-4]</sup>。据统计海洋中每天约有 1.5%~6% 的聚球藻被噬藻体裂解<sup>[5]</sup>。同样淡水水体中噬藻体也能大量裂解藻细胞, Yoshida 等<sup>[6]</sup> 在聚球藻藻华爆发期间对日本 Mikata 湖的研究发现, 每天有 0.0055%~2.1% 的宿主种群被噬藻体裂解。Coulombe 等<sup>[7]</sup> 在 1981 年发现束丝藻 (*Aphanizomenon flos-aquae*) 水华消退时藻细胞中存在病毒样颗粒, 因此推测噬藻体可能参与了该水华的消亡。Weinbauer 等<sup>[8]</sup> 在 1997 年 3 月到 1998 年 1 月监测一个超富营养化池塘发现, 噬藻体浓度较高时, 铜绿微囊藻密度急剧下降, 且产毒微囊藻在所有微囊藻生物量中由 47.1% 下降到 0.5%, 表明噬藻体还会影响产毒和不产毒蓝藻种群结构变化。

上述发现使噬藻体控藻的应用潜力得到关注, Desjardins 等<sup>[9]</sup> 于 1983 年在发生 *Leptolyngbya boryanum* 藻华的池塘中添加噬藻体 LPP-1, 发现其可以影响藻细胞的丰度和分布。1988 年, Martin 等<sup>[10]</sup> 在 80 L 微宇宙实验中发现, 加入噬藻体 SM-2 使蓝藻生物量显著下降。随着越来越多的噬藻体从水体中被分离, 人们逐渐发现噬藻体控制蓝藻水华的潜力。2006 年, Yoshida 等<sup>[11]</sup> 在日本分离得到一株可以裂解铜绿微囊藻的噬藻体, 实验结果表明它可以有效控制铜绿微囊藻水华。此外, 2020 年, Lin 等<sup>[12]</sup> 以华美微囊藻 (*Microcystis elabens*) 为宿主分离出一株广谱噬藻体 Me-ZS1, 该噬藻体将蓝藻的相对丰度从 33.25% 下降到 20.63%, 而对对照组中蓝藻的相对丰度为 52.77%。张珊珊<sup>[13]</sup> 2022 年以铜绿微囊藻 FACHB-905 藻株为宿主分离出了一株新型广谱烈性噬藻体 Min S1, 该噬藻体可以感染几种不同目的藻类, 包括色球藻目、念珠藻目、颤藻目、段殖藻目和聚球藻目, 表明该噬藻体宿主范围广泛, 在蓝藻水华治理中具有较大的应用潜力。

噬藻体在适宜的条件下可快速裂解蓝藻细胞, 其中光照、温度和 MOI (感染复数, Multiplicity of Infection, 噬藻体效价与藻细胞数量比值) 是影响噬藻体裂解蓝藻最重要的条件。廖湘勇等<sup>[14]</sup> 发现在光照周期 L:D=14 h:10 h 条件下, 噬藻体 A-4(L) 在平板上感染 PCC 7120 藻苔出现同心圆噬藻斑, 而持续光照条件下未出现, 进一步推测周期光照影响了 A-4(L) 对藻细胞的吸附或子代 A-4(L) 的释放, 使 A-4(L) 感染过程变缓或感染力变弱。温度是影响噬藻体感染的另一个重要因素, 有研究发现温度升高会提高噬藻体 PP 的吸附率<sup>[15]</sup>。MOI 也会对噬藻体侵染造成影响, 程凯等<sup>[16]</sup> 发现随着 MOI 的增大, 鲍氏织线藻被噬藻体 PP 侵染后藻丝开始断裂的时间明显提前, 当 MOI 为 1:2 时, 藻丝从 3 h 开始断裂, 而当 MOI 为 10:1 时, 藻丝则从 2 h 开始断裂。

1976—1977 年间, Koz'yakov 等<sup>[17]</sup> 在苏联列宁格勒通过筛选约 2000 份样品, 分离出包括 A-4(L) 在内的共 9 个鱼腥藻病毒亚型。在负染电镜下观察, A-4(L) 具有一个长度约为 10 nm 的尾部<sup>[14]</sup>, 因此被划分为短尾病毒。A-4(L) 侵染宿主细胞潜伏期很短, 在 28~30℃ 条件下只需 0.5~2 h<sup>[18]</sup>。本文以 A-4(L) 裂解丝状蓝藻鱼腥藻 PCC 7120 为例, 探究光照、温度和 MOI 对 A-4(L) 裂解宿主细胞的影响, 探索 A-4(L) 裂解藻细胞的最佳投加时间和投加剂量, 并利用室内探究的条件开展室外噬藻体裂解藻细胞验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 噬藻体与蓝藻

噬藻体 A-4(L) 和鱼腥藻 PCC 7120 均由中国科学院水生生物研究所徐旭东研究员惠赠。鱼腥藻 PCC 7120 是一种丝状蓝藻, 能够被 A-4(L) 裂解。使用 BG11 液体培养基, 在 30℃、50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  连续光照条件下振荡培养 PCC 7120。

### 1.2 新鲜噬藻体裂解液的制备

培养至对数生长期的 PCC 7120 ( $\text{OD}_{750}$  为 0.5 左右) 经 5000 转/min (离心机 Eppendorf Centrifuge 5810 R, 转头型号 F34-6-38) 离心 5 min 后用 BG11 培养基洗涤一次, 重悬在等体积的新鲜 BG11 培养基中。在 200 mL 藻液中加入 1 mL 效价约为  $10^7$  PFU/mL (PFU, Plaque Forming Unit) 的 A-4(L), 将其置于 30℃、50  $\mu\text{mol}/$

( $\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ) 连续光照条件下培养 2~3 d, 至藻细胞裂解液澄清透明。将裂解液经 5000 转/min 离心 5 min, 取其上清液。为了尽量去除藻细胞碎片, 再使用 10 mL 一次性塑料无菌注射器安装孔径 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜 (Millipore Express PES Membrane Filter Unit) 过滤, 过滤后得到的裂解液置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。每次实验开始前制备新鲜的裂解液, 并用噬藻斑法测其效价约为  $10^7$  PFU/mL。

### 1.3 噬藻体效价的测定

本实验中用噬藻斑法测定 A-4(L) 的效价, 将 A-4(L) 用 BG11 培养基按  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ... $10^{-10}$  (900  $\mu\text{L}$  BG11+100  $\mu\text{L}$  A-4(L)) 梯度稀释。再从每个梯度中取 100  $\mu\text{L}$  混液与 1 mL 离心浓缩之后的藻液 ( $\text{OD}_{750}$  为 0.5 的藻液浓缩 10 倍) 混合, 30 $^{\circ}\text{C}$  下静置 30 min 使噬藻体更好地吸附到藻细胞后, 与等体积的 1.5% 琼脂 BG11 培养基混匀, 迅速平铺在底层琼脂 BG11 平板上, 每个梯度设置 3 个平行。待平板凝固后, 将其放在 30 $^{\circ}\text{C}$ , 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  连续光照条件下静置培养 2 d, 记录各个稀释梯度的噬藻斑个数。噬藻体效价的计算为, 计数平板上清晰可数的噬藻斑个数, 乘稀释倍数, 再乘 10 即为噬藻体的效价 PFU/mL。

### 1.4 噬藻体侵染藻株的 $\text{OD}_{750}$ 曲线

将 PCC 7120 培养到对数生长期, 再经 5000 转/min 离心 5 min 收集藻细胞用 BG11 培养基洗涤一次, 重悬在等体积的新鲜 BG11 培养基中。根据每次实验要求实验组加入合适体积的 A-4(L), 对照组加入等体积的 BG11, 每隔一定时间取样测  $\text{OD}_{750}$ 。以侵染时间为横坐标,  $\text{OD}_{750}$  为纵坐标, 绘制 PCC 7120 的  $\text{OD}_{750}$  曲线。

### 1.5 PCC 7120 光照适应

Arhel-Goren 等<sup>[19]</sup> 研究发现, PCC 7120 具有生物钟特征; 12 h 的光暗循环培养两天后置于连续的光照条件下, PCC 7120 仍能保持在光暗循环下的昼夜节律。为了探究 PCC 7120 的昼夜节律是否影响 A-4(L) 对其裂解, 本研究将 PCC 7120 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ , 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  周期光照 (L:D=12 h:12 h) 下培养。按照给光时间将 PCC 7120 分为两组, 甲组 7:00—19:00 给光, 乙组则 19:00—7:00 给光, 培养 14 d, 使两组藻分别适应各自光暗周期的变化。14 d 后早上 7:00 (为第 0 h) 甲、乙实验组开始添加 A-4(L) 侵染 (MOI 为 0.01) 时, 甲组藻株处于光周期的状态, 乙组藻株处于暗周期的状态, 侵染时都给予连续光照。

### 1.6 不同光强下噬藻体吸附率测定

为了探究光照强度对于噬藻体吸附的影响, 本研究在 30 $^{\circ}\text{C}$  条件下, 设置光强分别为 200, 80, 0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 藻细胞密度为  $1.5 \times 10^7$  cells/mL, 藻细胞  $\text{OD}_{750}$  为 0.5 左右, MOI 为 0.01, 测定 A-4(L) 吸附率。取 A-4(L) 侵染藻细胞的样品 1 mL, 10000 转/min 离心 5 min, 采用最大可能数法 (Most Probable Number, MPN) 测定上清液中未被吸附的 A-4(L) 效价, 从而间接地测定已被吸附的 A-4(L), 计算 A-4(L) 吸附率。将上清中待测 A-4(L) 按 10 倍梯度稀释, 然后将处于对数生长期且经过新鲜 BG11 培养基重悬后的藻细胞接入无菌 96 孔板, 每孔加 150  $\mu\text{L}$ 。再加入不同的 A-4(L) 稀释液 50  $\mu\text{L}$ , 每个稀释梯度接 4 个孔, 空白组加入等量 BG11 培养基。将 96 孔板置于 30 $^{\circ}\text{C}$ , 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  连续光照条件下培养 2 d, 记录各稀释度下的藻细胞侵染孔数。将出现侵染的稀释梯度和平行样品数作为数量指标, 在最大或然数表上查出近似值, 再乘数量指标第一位数的稀释倍数, 即为原始样品中的噬藻体效价<sup>[20]</sup>: 吸附率 (%) = (1 - 上清中的 A-4(L) 效价  $\div$  A-4(L) 的初始效价)  $\times 100\%$ 。

### 1.7 qPCR 测定 A-4(L) DNA *pol* 基因拷贝数

Lindell 等<sup>[21]</sup> 通过 qPCR 绝对定量的方法测定在原绿球藻 MED4 胞内和胞外噬藻体 P-SSP7 DNA *pol* 基因的拷贝数, 且 qPCR 绝对定量的方法与传统的 MPN 法和电镜法定量噬藻体有很强的正线性相关关系, 可以准确定量噬藻体。本研究以 A-4(L) DNA *pol* 为目的基因, 将其导入 pET28H 质粒, 构建载体, 绘制 qPCR 绝对定量的标准曲线, 通过实时定量 PCR SYBR Green 法来检测 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数。PCC 7120 胞内和胞外的 A-4(L) DNA *pol* 基因拷贝数, 分别表征 A-4(L) 在胞内的复制以及胞外的释放。qPCR 反应总体积为 10  $\mu\text{L}$ , 各体系体积为: SYBR Green Realtime PCR Master Mix 5  $\mu\text{L}$ , 正向、反向引物各 0.25  $\mu\text{L}$ , A-4(L) DNA 2  $\mu\text{L}$ , 最后用无菌水补齐至 10  $\mu\text{L}$ 。qPCR 上机程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 随后进行 40 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 60 $^{\circ}\text{C}$  下退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s。该实验中, 初始  $\text{OD}_{750}$  为 0.5 左右的藻细胞中加入 A-4(L) 使 MOI 为 0.01 左右, 整个侵染过程在 30 $^{\circ}\text{C}$ , 光强为 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的全光照下进行。采集的藻样样品立即进行如下前处理: 先经 8000 转/min 离心 5 min 后, 获得上清待用于胞外 A-4(L) DNA 的提取, 沉淀藻细胞先加入少量

BG11 培养基经过 8000 转/min, 5 min 离心弃上清。前处理完的样品立即置于 4℃ 冰箱, 待样品采集完沉淀藻细胞进行以下处理: 先经过 95℃ 加热 15 min, 裂解藻细胞, 再提取胞内 A-4(L) DNA。A-4(L) DNA 提取使用 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0 试剂盒, 具体操作详见试剂盒说明书。该实验所用引物序列如表 1 所示, 表中所示引物除了用于线性化 pET28H 和单克隆的引物来自张承才老师实验室, 其余引物均为本人针对 A-4(L) 所设计, qPCR 扩增产物预期长度为 200 bp。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
pET28H_2	CATCATCACCACCACCATTAAGATCCGGCTGCTAACAAAG	线性化
PV_3	CATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTT	pET28H
pET28_DNA_pol_F	aggagatataccatgATGGTTAGGTTGCTCGCGCTAGACATA	扩增
pET28_DNA_pol_R	tgggtggtgatgatgTCAACTTCCTTTAGCCTCGTCCAAT	DNA pol
T7	tacgactcaatagggaatt	单克隆
T7 ter	AAGGGTTATGCTAGTTATTGCTC	
qPCR_DNA_pol_F	TGGTAAAGTGTGCTACAACCAATGCAAGA	qPCR
qPCR_DNA_pol_R	CAGCTTCAGGTAGAATGCTAACACTCGTA	

### 1.8 不同光照时长的侵染

探究不同光照时长对于噬藻体 A-4(L) 裂解 PCC 7120 藻细胞的影响: 在 30℃, 光强 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  条件下, 将培养箱光照设置为 7:00—19:00 给光(L:D=12 h:12 h), 分别在一天中的早上 7:00、中午 12:00、下午 15:00 和晚上 19:00 4 组不同时间添加 A-4(L), MOI 为 0.01 左右, 每隔一定时间测藻细胞 OD<sub>750</sub>。

### 1.9 不同温度的侵染

探究不同温度对于噬藻体 A-4(L) 裂解 PCC 7120 藻细胞的影响: 分别在 15、20、25 及 30℃ 下添加 A-4(L) 侵染 PCC 7120, MOI 为 0.01 左右, 4 组温度下给予全光照, 光强均为 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 每隔一定时间测藻细胞 OD<sub>750</sub> 以及用噬藻斑法测定侵染第 24 h 胞外 A-4(L) 效价。

### 1.10 不同 MOI 的侵染

为了探究不同 MOI 对 A-4(L) 裂解藻细胞的影响, 在 30℃ 且光强为 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的全光照条件下, 分别在 PCC 7120 中添加不同浓度的 A-4(L) 使 MOI 为 1.13、 $1.13 \times 10^{-2}$ 、 $1.13 \times 10^{-4}$  和  $1.13 \times 10^{-6}$ , 实验藻细胞密度为  $1.8 \times 10^7$  cells/mL 左右, 不同 MOI 下 200 mL 实验体系中 A-4(L) 浓度分别为  $10^7$ 、 $10^5$ 、 $10^3$ 、 $10$  PFU/mL 左右, 每隔一定时间测藻细胞 OD<sub>750</sub>。对于 MOI=1.13 中的 A-4(L) 采用超滤离心法对其浓缩, 选择截留分子量为 100 KD、Amicon Ultra-15 离心超滤管, 每个超滤管中加入 15 mL 新鲜 A-4(L) 裂解液, 在 4℃+3000 转/min+10 min 的条件下进行离心。离心后收集截留在滤膜内约 500  $\mu\text{L}$  浓缩 A-4(L) 裂解液, 再用噬藻斑法检验其效价, 约为  $10^8 \sim 10^9$  PFU/mL。

### 1.11 室外侵染

室外侵染实验于 2022 年 5 月 7—8 日在日光光照条件下进行, 室外温度为 19~28℃, 晴天。本研究从武汉东湖采集湖水, 为了减少湖水中微生物、悬浮颗粒和浮游动物对藻细胞的影响, 将湖水经过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜抽滤。BG11 培养至对数期的 PCC 7120 经 5000 转/min 离心 5 min 后重悬到抽滤的湖水中用于室外侵染实验。1 L 大烧杯中加 500 mL 藻液, 设置三组平行。早上 7:00 添加 A-4(L) 使 MOI 为 0.01 左右, 空白组添加等量 BG11, 每隔一定时间取样测定 OD<sub>750</sub>。由于正午光照过强达到 1500  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 故 12:00—14:00 短暂转移至阴凉处, 使正午光强约为 500  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

### 1.12 数据分析

数据绘图采用 Origin 2018, 数据分析采用 IBM SPSS Statistics 25 One-way ANOVA(LSD) 进行方差分析和多重比较,  $P < 0.05$  差异显著。

## 2 结果

### 2.1 光照对 A-4(L) 侵染的影响

全光照条件下且 MOI=0.01 时, A-4(L) 在 8 h 后裂解藻细胞(图 1A), 但是黑暗条件下 PCC 7120 的 OD<sub>750</sub> 曲线与未加 A-4(L) 的对照曲线(图 1B) 类似, 说明几乎没有裂解发生。实验结果表明 A-4(L) 裂解藻细胞依赖光照, 黑暗条件下 A-4(L) 无法裂解藻细胞。

两组颠倒光照时间培养 14 d 的 PCC 7120 在连续光照下被 A-4(L) 侵染(图 1B), 第 0 h 开始添加 A-4(L) 侵染时, 甲组藻株处于光周期的状态, 乙组藻株处于暗周期的状态。若 A-4(L) 对 PCC 7120 的裂解与 PCC 7120 的昼夜节律有关, 则甲组藻株 OD<sub>750</sub> 在早上 7:00 光照 8 h 后下降, 而乙组藻株应该在晚上 19:00 光照 8 h 后下降, 但是两组 OD<sub>750</sub> 均在给光 8 h 后开始下降, 说明 A-4(L) 对 PCC 7120 的裂解不依赖 PCC 7120 的昼夜节律, 而依赖光照。有文献也指出, 噬藻体 AS-1 对细长聚球藻 *Synechococcus elongatus* 的侵染不受宿主昼夜节律的影响, 而光照对 AS-1 侵染影响更大<sup>[22]</sup>。

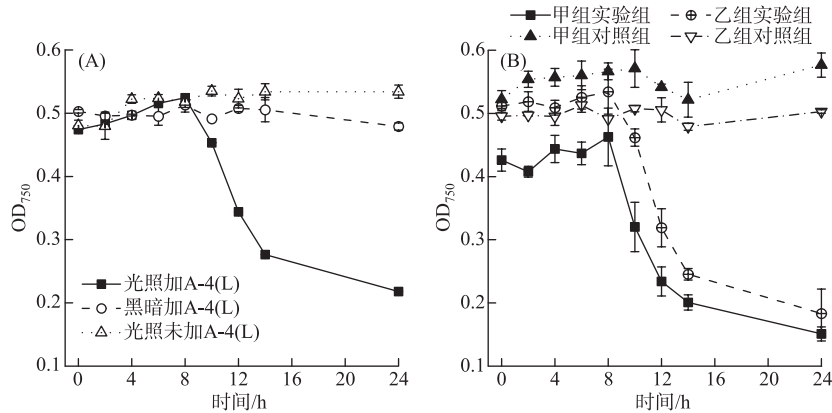


图 1 不同光照条件下 A-4(L) 侵染 PCC 7120 的 OD<sub>750</sub> 曲线  
(A. 光照和黑暗下侵染藻株; B. 侵染不同昼夜节律下藻株)

Fig.1 OD<sub>750</sub> curves of PCC 7120 infected by A-4(L) under different light conditions  
(A. PCC 7120 infected in the light and dark; B. PCC 7120 with different circadian rhythms)

2.1.1 光照强度对 A-4(L) 吸附的影响 本实验结果表明, 5 min 之后 A-4(L) 在光照条件下对 PCC 7120 的吸附率显著高于黑暗下 ( $P < 0.05$ ) (图 2), 80  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  和 200  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  光强下吸附率无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。无论光照还是黑暗条件下, 噬藻体的吸附过程十分迅速。即使在黑暗条件下仍有超过 50% 的 A-4(L) 吸附到藻细胞上, 表明 A-4(L) 对宿主细胞的吸附不依赖光照。

2.1.2 光照有无对 A-4(L) DNA 的复制和子代 A-4(L) 释放的影响 光照条件下 A-4(L) 在胞内大量复制并释放到胞外, 而黑暗下只有极少量的复制(图 3A)。胞内 A-4(L) 复制在光照 8 h 达到最大, DNA *pol* 拷贝数为  $1.1 \times 10^7$  copies/mL, 8 h 后胞内复制随着大量的藻细胞被裂解而逐渐减少。A-4(L) 侵染 PCC 7120 (MOI=0.01) OD<sub>750</sub> 在 8 h 后显著下降, 可知 A-4(L) 在大量复制完成之后便

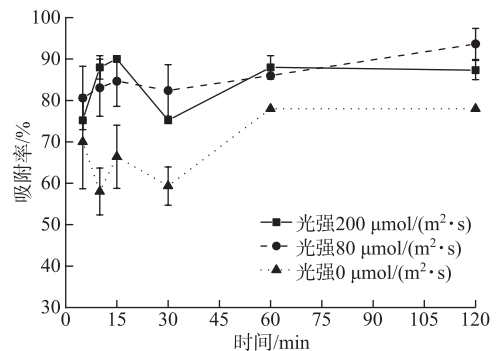


图 2 不同光强下 A-4(L) 对 PCC 7120 的吸附率  
Fig.2 Adsorption ratios of A-4(L) to PCC 7120 under various intensities of light

开始裂解藻细胞。对比胞内和胞外 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数,可以发现胞内 DNA *pol* 拷贝数高于胞外。胞外 A-4(L) 释放在光照 12 h 最大(图 3B), DNA *pol* 拷贝数为  $2.6 \times 10^6$  copies/mL, 而第 12 h 黑暗下胞外 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数为  $2.1 \times 10^5$  copies/mL, 说明光照下的胞外 A-4(L) 释放量远远高于黑暗下。胞外 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数在 0~2 h 内由于 A-4(L) 吸附到藻细胞上而减少, 在 2 h 后大幅度增加, 可知 A-4(L) 的潜伏期为 2 h 左右, 经过潜伏期之后, A-4(L) 开始释放到胞外。在 2~12 h 内, 胞外 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数大幅度增加, 表明此时 A-4(L) 的裂解期为 10 h 左右。但是 A-4(L) 侵染 PCC 7120 的  $OD_{750}$  在 8 h 后才下降(图 1A), 说明在大幅度裂解藻细胞之前, A-4(L) 已经进行胞外释放了。因此 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数比藻细胞  $OD_{750}$  能更准确地了解侵染过程, 估算 A-4(L) DNA 复制时间, 潜伏期以及释放量。

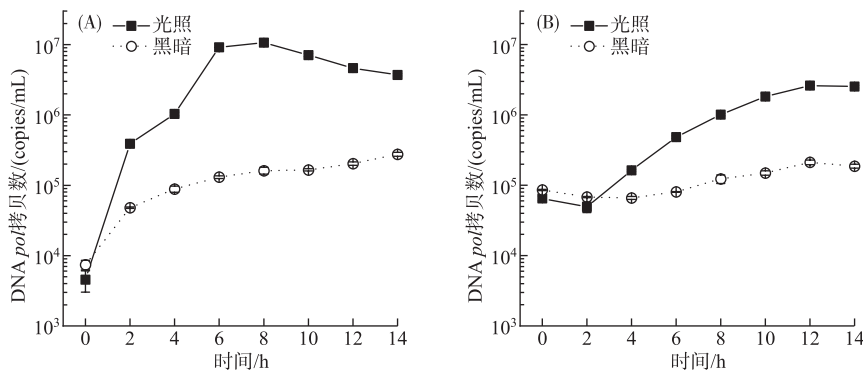


图 3 胞内(A)和胞外(B)A-4(L) DNA *pol* 基因拷贝数

Fig.3 Intracellular (A) and extracellular (B) A-4(L) DNA *pol* gene copies

**2.1.3 光照时长对 A-4(L) 裂解的影响** A-4(L) 在连续光照下 8 h 后就可裂解藻细胞 (MOI 为 0.01), 7:00 (图 4A) 和 12:00 (图 4B) 添加 A-4(L) 的两组均在 8 h 后藻细胞大量裂解。15:00 (图 4C) 一组由于只有 4 h 的光照时长, 8 h 时  $OD_{750}$  没有大幅度下降, 而第二天白天给光后  $OD_{750}$  才快速下降。19:00 (图 4D) 一组在黑暗下 12 h 藻细胞均未裂解, 第二天白天给光后  $OD_{750}$  才快速下降。由图 4C 和 4D 结果对比可知, A-4(L) 只经过光照 4 h 无法正常裂解藻细胞, 只有经过 6 h 及以上的光照, A-4(L) 才能裂解藻细胞。A-4(L) 成功裂解 PCC 7120 所需光照时长可能与侵染中某一关键进程有关, 这一关键进程是强烈依赖光照的, 在光照下完成了这一过程后, 则裂解宿主的剩余进程可以在黑暗下发生(图 4B)。

## 2.2 温度对 A-4(L) 侵染的影响

15°C 时, 藻细胞 28 h 内未见裂解; 20°C 时, 14 h 后藻细胞裂解; 在 25°C 和 30°C 时, 8 h 后藻细胞即可被 A-4(L) 快速裂解(图 5A); 表明温度升高, A-4(L) 裂解藻细胞时间明显提前。在 15~25°C 温度范围内, 随着温度的升高, A-4(L) 裂解越快且胞外 A-4(L) 效价明显提高(图 5B), 且 15°C 和 20°C 下的胞外 A-4(L) 显著低于 25°C 下的胞外 A-4(L) ( $P < 0.05$ )。而 25°C 和 30°C 条件下的侵染, 藻细胞  $OD_{750}$  变化以及第 24 h 胞外 A-4(L) 效价没有明显区别。

## 2.3 MOI 对 A-4(L) 侵染的影响

当 MOI=1.13 时, A-4(L) 侵染 4 h 后藻细胞开始被裂解; 当 MOI=1.13×10<sup>-2</sup> 时, 藻细胞被大量裂解的启动时间被延后至第 8 h; 当 MOI=1.13×10<sup>-4</sup> 时, 延后至第 12 h 后; 当 MOI=1.13×10<sup>-6</sup> 时, 持续延后至第 16 h 后。MOI 提高两个数量级, 藻细胞裂解则提前 4 h。以 A-4(L) 侵染宿主 24 h 为限, 当 MOI 为 1.13、1.13×10<sup>-2</sup>、1.13×10<sup>-4</sup> 和 1.13×10<sup>-6</sup> 时, 宿主细胞的  $OD_{750}$  分别下降了 76%、59%、58% 和 41% (图 6)。表明 MOI 越大, 噬藻体裂解宿主细胞越快。

## 2.4 室外侵染验证

室外侵染验证结果如图 7 所示, 投加 A-4(L) 的实验组藻细胞密度在 8 h 后开始迅速下降, 细胞裂解, 侵染 28 h  $OD_{750}$  下降至 0.1。对照组中藻细胞密度在 8 h 后略有下降, 后期保持稳定 ( $OD_{750}$  约为 0.45)。证明

A-4(L) 在日光照射的湖水样品中仍然可以高效裂解藻细胞。

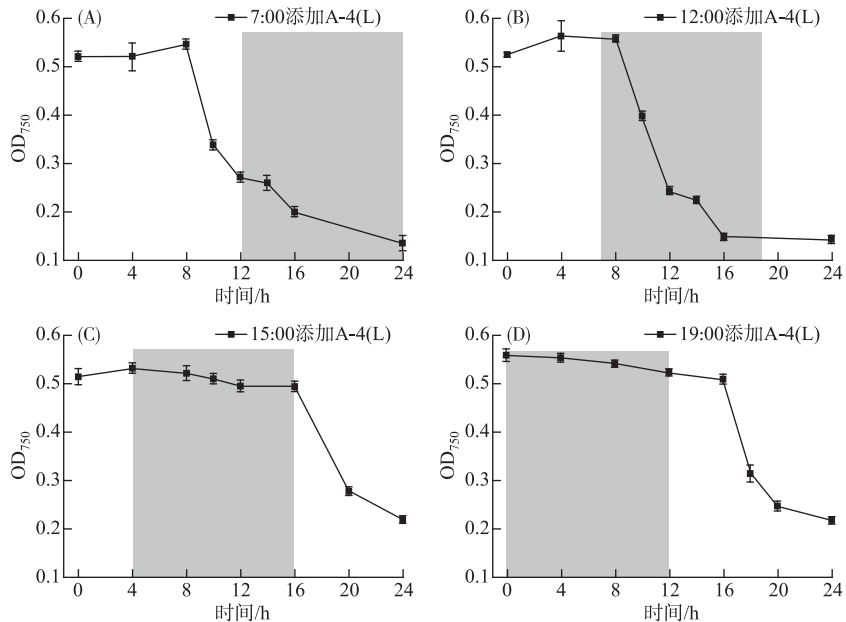


图4 不同光照时长下 A-4(L) 侵染 PCC 7120  $OD_{750}$  曲线

(A. 7:00 添加; B. 12:00 添加; C. 15:00 添加; D. 19:00 添加; 阴影部分表示无光照)

Fig.4  $OD_{750}$  curves of PCC 7120 infected by A-4(L) during different light periods

( Adding A-4(L) at 7:00(A) , 12:00(B) ; 15:00(C) and 19:00(D) ; Shadows indicate dark)

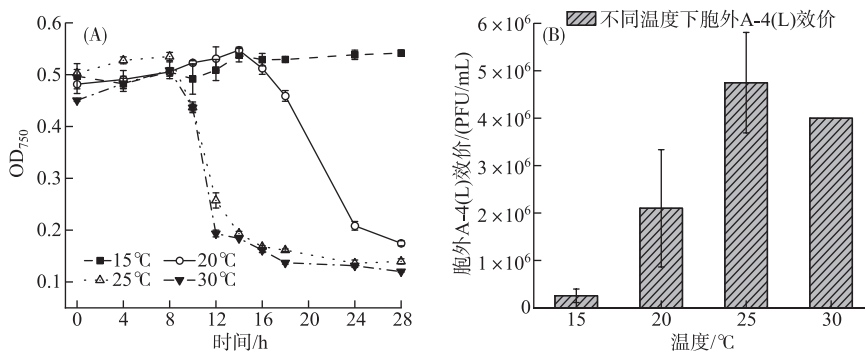


图5 温度对 A-4(L) 侵染 PCC 7120 的影响

(A: 不同温度下 A-4(L) 侵染 PCC 7120  $OD_{750}$  曲线; B: 不同温度下胞外 A-4(L) 效价)

Fig.5 Effect of temperature on infection of PCC 7120 by A-4(L)

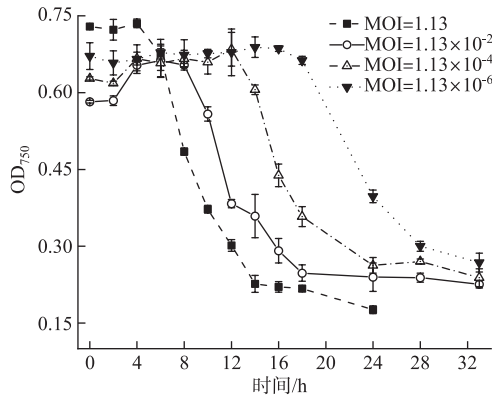
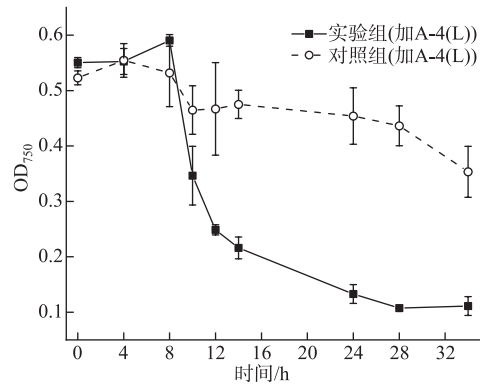
(A:  $OD_{750}$  curves of PCC 7120 infected by A-4(L) at different temperature;

B: Extracellular A-4(L) titer at different temperature)

### 3 讨论

#### 3.1 光照对侵染的影响

3.1.1 光照有无 根据全光照 30°C 条件下胞外 A-4(L) DNA *pol* 基因的拷贝数在 0~2 h 内下降, 可知 A-4(L)

图6 不同 MOI 下 A-4(L) 侵染 PCC 7120 OD<sub>750</sub> 曲线Fig.6 OD<sub>750</sub> curves for PCC 7120 infected by A-4(L) at different MOI图7 抽滤的湖水中 A-4(L) 侵染 PCC 7120 OD<sub>750</sub> 曲线Fig.7 OD<sub>750</sub> curve for PCC 7120 infected by A-4(L) in the filtered lake water

的潜伏期为 2 h 左右,而牛晓莹<sup>[15]</sup>发现噬藻体 PP 在 29°C 条件下的潜伏期为 200 min 左右,表明 A-4(L) 的潜伏期较短,可快速裂解藻细胞。根据图 3B 以及 OD<sub>750</sub> 曲线结果,A-4(L) 在大幅度裂解藻细胞之前已经进行胞外释放了。因为 MOI 为 0.01 左右,起始 A-4(L) 只能裂解约 1% 的极少量藻细胞并释放子代 A-4(L),同时未侵染的藻细胞可分裂产生新的细胞,所以此时藻细胞未被大量裂解,而随着 A-4(L) 在胞内复制的进行达到顶峰后,这时藻细胞才能被大量的 A-4(L) 大幅度裂解。在连续光照且 MOI=0.01 条件下,A-4(L) 在 8 h 后即可快速裂解 PCC 7120 藻细胞,而在黑暗条件下无法裂解。类似地,噬藻体 Pav-LD 在光照条件下感染阿氏浮丝藻 2 天后便开始裂解,而在黑暗条件下一周也未裂解<sup>[23]</sup>。噬藻体在黑暗下无法裂解藻细胞,是侵染的哪一过程依赖光照呢? 本研究表明,A-4(L) 的吸附不依赖光照,因为在黑暗下仍然有超过 50% 吸附率。姜红<sup>[24]</sup>在探究噬藻体 PP 感染野生宿主的增殖动力学中,发现光照不是噬藻体吸附到宿主上的必要条件,这与本研究结论一致。而胞内和胞外 A-4(L) DNA *pol* 基因的拷贝数结果表明,黑暗抑制了胞内 A-4(L) 复制,且在黑暗下胞外噬藻体释放量远低于光照条件下,说明胞内 A-4(L) 复制和胞外释放高度依赖光照。所以本研究表明黑暗条件下 A-4(L) 的复制以及子代 A-4(L) 的释放受到抑制,导致其无法裂解藻细胞。Borbély 等<sup>[25]</sup>发现在黑暗条件下丝状蓝藻的噬藻体复制增殖会完全停止,因为噬藻体复制需要宿主细胞的 ATP<sup>[26]</sup>,而 ATP 主要由宿主光合作用产生。通过比较胞内和胞外 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数,可以发现光照组的胞内 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数高于胞外 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数,主要原因在于,当 A-4(L) 释放到胞外后,会被吸附到未裂解的藻细胞上,导致胞外测定的 A-4(L) DNA *pol* 拷贝数低于胞内。

3.1.2 光照强度 Puxty 等<sup>[27]</sup>发现聚球藻噬藻体 S-PM2d 在高光照条件(210  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )下的潜伏期比低光照条件(15  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )下缩短了 5 h。光照强度不仅会影响噬藻体的潜伏周期,还会影响噬藻体吸附率和子代噬藻体释放量。Kao 等<sup>[22]</sup>在不同光强下测定了噬藻体 AS-1 子代释放量,发现光照强度的增加导致子代 AS-1 释放量的相应增加;他还发现在光强为 45  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,侵染样品上清中未被吸附的噬藻体效价比光强为 3  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  要低 4~6 倍,说明光强越高,噬藻体吸附率也越高。本研究中光强 200  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  和 80  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时的噬藻体吸附率均显著高于光强 0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,但是光强 200  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的吸附率并未比光强 80  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  高,可能是 80  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的光强太高,该光强条件下,噬藻体的吸附率已经达到最大。此外,本研究中吸附率是利用 MPN 法测定上清中未吸附的 A-4(L) 效价,其中 MPN 法采用了 4 管平行,平行数较少,可能是导致图 2 中有些误差线较大的原因之一。

3.1.3 光照时长 A-4(L) 在黑暗下连续 24 h 都无法裂解藻细胞,而在有光时连续光照 7 h (MOI 为 0.01 时) 便可在黑暗下裂解藻细胞(图 4B),说明充足的光照对于噬藻体裂解藻细胞是必需的。噬藻体侵染需要充足的光照,我们推测是因为侵染的前期某一过程需要光照的参与。A-4(L) 吸附不需要光照,但是 DNA 复制

高度依赖光照。且光照条件下 A-4(L) DNA 复制在 8 h 达到顶峰, A-4(L) 在给光 7 h 后可在黑暗下裂解藻细胞, 表明依赖光照的大量复制完成后, A-4(L) 可以在黑暗下裂解藻细胞。噬藻体 AS-1 侵染物光照培养 0.5~1 h 后移到黑暗下时, AS-1 无法产生正常的子代噬藻体, 而在光照下培养 3 h 后移到黑暗下时, AS-1 能够释放大量的子代噬藻体<sup>[22]</sup>, AS-1 成功感染所需的光照时长可能与感染时的具体过程有关<sup>[28-29]</sup>。这些结果均表明噬藻体需要充足的光照来助其完成某一侵染过程, 一旦完成之后, 剩余的裂解进程就可以在黑暗下发生。少量 A-4(L) DNA 复制可在黑暗下进行, 可能是因为 A-4(L) 可以借助藻细胞氧化磷酸化获得的能量进行复制<sup>[30]</sup>。然而相比于黑暗条件下的胞内 A-4(L) DNA 复制, 胞外 A-4(L) 释放量极少, 即少量复制完成的 A-4(L) 几乎无法进行胞外释放, 可能是 A-4(L) 在黑暗条件下无法完成衣壳蛋白合成或衣壳蛋白与基因组包装的过程。

### 3.2 温度对侵染的影响

本研究表明, 在 15~25℃ 区间内, 随着温度升高, A-4(L) 的裂解时间提前, 而 25℃ 和 30℃ 时 A-4(L) 裂解藻细胞的时间一致。牛晓莹等<sup>[15]</sup>在探究 CO<sub>2</sub> 浓度和温度升高对噬藻体 PP 增殖的联合作用时, 发现温度升高大幅度提高了 PP 的裂解周期和子代 PP 释放量。因为噬藻体依靠宿主细胞增殖, 所以感染成功与否很大程度上取决于宿主细胞的生理状态<sup>[31]</sup>, 即有利于宿主生长的条件能促进噬藻体的感染。本研究中, PCC 7120 在 25~30℃ 这个温度区间生理状态好, 导致 A-4(L) 对其裂解速度快。但是牛晓莹等<sup>[15]</sup>指出温度升高对宿主的生长没有影响, 但是仍能促进 PP 的感染。可能的原因是, 牛晓莹设置的温度为 25℃ 和 29℃, 此时宿主已经达到最佳的生理状态, 所以从 25℃ 升到 29℃, 宿主的生理状态并不会改变。但是由于噬藻体的核衣壳由结构蛋白质组成<sup>[32]</sup>, 温度升高能够增强宿主细胞内某些酶的活性, 提高病毒大分子合成与核衣壳装配的效率<sup>[33]</sup>, 从而提高子代噬藻体释放量。

### 3.3 MOI 对侵染的影响

Tucker 等<sup>[34]</sup>发现在 Baroon 湖泊中的噬藻体 Ma-LBP 的效价与铜绿微囊藻细胞去除率呈正相关, 添加的 Ma-LBP 效价越高, 藻细胞生物量下降的越多。本研究中以 A-4(L) 侵染后 24 h 为限, 当 MOI 为 1.13、1.13×10<sup>-2</sup>、1.13×10<sup>-4</sup> 和 1.13×10<sup>-6</sup> 时, 藻细胞的 OD<sub>750</sub> 分别下降了 76%、59%、58% 和 41%。即 MOI 越大, 噬藻体裂解宿主细胞效果越好, 且裂解时间提前。此外, Fuhrman 等<sup>[35]</sup>估计每毫升宿主和噬藻体数量的乘积为 10<sup>12</sup> 时, 噬藻体才裂解藻细胞。本研究中, 当 MOI 为 10<sup>-6</sup> 时, 每毫升藻细胞和 A-4(L) 数量乘积在 10<sup>10</sup> 左右, 但是 A-4(L) 仍可裂解藻细胞。同样, Tucker 等<sup>[34]</sup>在实验室探究噬藻体和铜绿微囊藻裂解感染时, 两者数量乘积在 10<sup>10</sup>~10<sup>14</sup> 之间, 藻细胞仍然可以裂解, 推测是因为在实验室的藻细胞培养条件和噬藻体侵染条件适宜。

### 3.4 室外实验

光照对 A-4(L) 侵染影响的结果表明, 噬藻体裂解藻细胞依赖光照且需要 6 h 及以上的光照时长, 基于此, 建议上午 7:00—12:00 投加噬藻体。温度对 A-4(L) 侵染的影响研究中发现, 20℃ 时噬藻体光照 14 h 后才能大量裂解藻细胞, 而 25℃ 和 30℃ 时噬藻体光照 8 h (MOI 为 0.01) 后便可大量裂解藻细胞, 可知在环境温度 25~30℃ 时, 噬藻体可以利用白天光照裂解藻细胞。针对噬藻体投放剂量问题, 综合考虑成本以及充分利用白天光照完成裂解, 建议投放剂量 MOI 为 0.01。从室外验证实验可以看出, A-4(L) 在日光照射的湖水样品中可以高效裂解藻细胞。当然, 此室外验证使用的蓝藻是室内纯培养模式株, 针对野外不同种类蓝藻的控制还难以实现。姜红等<sup>[36]</sup>以武汉东湖水体中存在的丝状蓝藻作为噬藻体 PP 的野生宿主时, 发现 PP 感染效率远低于其对室内纯培养鲍氏织线藻的效率。野外环境复杂, 蓝藻种类繁多, 分离更多的噬藻体将使其更好地应用于蓝藻水华的控制中。

## 4 结论

本研究探究光照、温度和 MOI 对于 A-4(L) 侵染 PCC 7120 的影响, 从而推定了应用噬藻体裂解藻细胞的最佳投加时间和投加剂量。即在环境温度为 25~30℃ 时, 上午 7:00—12:00 投加噬藻体使 MOI 约为 0.01, 可在 24 h 内将藻细胞裂解, 且室外日光照射下的实验证明上述条件适用于在抽滤的湖水中高效裂解藻细胞, 为噬藻体应用于蓝藻水华的控制提供一定的基础。但是噬藻体应用存在特异性较强、野生藻株与实验室驯化的藻株有很大差异、以及感染后出现抗性藻株等问题, 在将来的天然水体实际应用中还需要进一步

的研究。

## 5 参考文献

- [ 1 ] DeBruyn JM, Leigh-Bell JA, McKay ML *et al.* Microbial distributions and the impact of phosphorus on bacterial activity in Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research*, 2004, **30**: 166-183. DOI: 10.1016/S0380-1330(04)70338-X.
- [ 2 ] Sullivan MB, Waterbury JB, Chisholm SW. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature*, 2003, **424**: 1047-1051. DOI: 10.1038/nature02147.
- [ 3 ] Garza DR, Suttle CA. The effect of cyanophages on the mortality of *Synechococcus* spp. and selection for UV resistant viral communities. *Microbial Ecology*, 1998, **36**: 281-292. DOI: 10.1007/s002489900115.
- [ 4 ] Hewson I, O'Neil JM, Dennison WC. Virus-like particles associated with *Lyngbya majuscula* (Cyanophyta; Oscillatoracea) bloom decline in 5 Moreton Bay, Australia. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, **25**: 207-213. DOI: 10.3354/ame025207.
- [ 5 ] Suttle CA. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbial Ecology*, 1994, **28**: 237-243. DOI: 10.1007/BF00166813.
- [ 6 ] Yoshida M, Yoshida T, Kashima A *et al.* Ecological dynamics of the toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and its cyanophage in freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**(10): 3269-3273. DOI: 10.1128/AEM.02240-07.
- [ 7 ] Coulombe AM, Robinson GGC. Collapsing *Aphanizomenon flos-aquae* blooms: Possible contributions of photo-oxidation, O<sub>2</sub> toxicity and cyanophages. *Canadian Journal of Botany*, 1981, **59**(7): 1277-1284. DOI: 10.1139/b81-171.
- [ 8 ] Weinbauer MG, Fuka D, Puskaric S *et al.* Diel, seasonal, and depth related variability of viruses and dissolved DNA in the Northern Adriatic Sea. *Microbial Ecology*, 1995, **30**(1): 25-41. DOI: 10.1007/BF00184511.
- [ 9 ] Desjardins PR, Olson GB. Viral control of nuisance cyanobacteria (blue-green algae).II. Cyanophage strains, stability studies of phages and hosts, and effects of environmental factors on phage-host interactions. *California Water Resources Center*, 1983, 185.
- [ 10 ] Martin EL, Benson R. Phages of cyanobacteria. In: Calendar R (ed). *The Bacteriophages*. Plenum Publishing Corporation, 1988, **2**: 607-645.
- [ 11 ] Yoshida T, Takashima Y, Tomaru Y *et al.* Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(2): 1239-1247. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1239-1247.2006.
- [ 12 ] Lin W, Li DF, Sun ZT *et al.* A novel freshwater cyanophage vB\_MeLS-Me-ZS1 infecting bloom-forming cyanobacterium *Microcystis elabens*. *Molecular Biology Reports*, 2020, **47**(10): 7979-7989. DOI: 10.1007/s11033-020-05876-8.
- [ 13 ] 张珊珊. 噬藻体 MinS1 和 YongM 基因组分析及定量蛋白质组学分析[学位论文]. 河北: 河北师范大学, 2022.
- [ 14 ] Liao XY, Ou T, Gao H *et al.* Main reason for concentric rings plaque formation of virus infecting cyanobacteria A-4(L) in lawns of *Anabaena variabilis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, **54**(2): 191-199. [廖湘勇, 欧铜, 高宏等. 蓝细菌病毒 A-4(L) 在鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 藻苔中形成同心圆噬斑的成因. 微生物学报, 2014, **54**(2): 191-199.]
- [ 15 ] Niu XY, Cheng K, Rong QQ *et al.* The combined effects of elevated CO<sub>2</sub> and elevated temperature on proliferation of cyanophage PP. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, **32**(22): 6917-6924. [牛晓莹, 程凯, 荣茜茜等. CO<sub>2</sub>浓度和温度升高对噬藻体 PP 增殖的联合作用. 生态学报, 2012, **32**(22): 6917-6924.]
- [ 16 ] Cheng K, Wang CY, Guo YX *et al.* Measurement of lysing cycle and burst size of cyanophage infecting filamentous cyanobacteria (blue-green algae). *Virologica Sinica*, 2002, **17**(4): 374-376. [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.]
- [ 17 ] Koz'yakov S. Cyanophages of the series A(L) specific for the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *Exp Algol Biol Sci Res*, 1977, **25**: 151-175.
- [ 18 ] Hu NT, Thiel T, Giddings Jr TH *et al.* New *Anabaena* and *Nostoc* cyanophages from sewage settling ponds. *Virology*, 1981, **114**(1): 236-246. DOI: 10.1016/0042-6822(81)90269-5.
- [ 19 ] Rinat AG, Valentina B, Francesca DP *et al.* Robust, coherent, and synchronized circadian clock-controlled oscillations along *Anabaena* filaments. *eLife*, 2021, **10**: e64348. DOI: 10.7554/eLife.64348.
- [ 20 ] 熊珍珠. 噬藻体 A-1(L) 和 A-4(L) 侵染鱼腥藻 PCC 7120 的识别机理[学位论文]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2017.
- [ 21 ] Lindell D, Jaffe JD, Coleman ML *et al.* Genome-wide expression dynamics of a marine virus and host reveal features of co-evolution. *Nature*, 2007, **449**(7158): 83-86. DOI: 10.1038/nature06130.
- [ 22 ] Kao CC, Green S, Stein B *et al.* Diel infection of a cyanobacterium by a contractile bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(8): 4276-4279. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4276-4279.2005.
- [ 23 ] Gao EB, Li SH, Lv B *et al.* Analysis of the cyanophage (PaV-LD) infection in host cyanobacteria under different culture conditions. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(3): 420-425. [高恶斌, 李三华, 吕波等. 水华蓝藻噬藻体对不同条件培养的宿主细胞感染性分析. 水生生物学报, 2012, **36**(3): 420-425.]

- [24] 姜红. 噬藻体 PP 感染野生宿主的增殖动力学研究[学位论文]. 武汉: 华中师范大学, 2007.
- [25] Borbély G, Kari C, Gulyás A *et al.* Bacteriophage infection interferes with guanosine 3'-diphosphate-5'-diphosphate accumulation induced by energy and nitrogen starvation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 1980, **144**(3): 859-864. DOI: 10.1128/jb.144.3.859-864.1980.
- [26] Padan E, Ginzburg D, Shilo M. The reproductive cycle of cyanophage LPPI-G in *Plectonema boryanum* and its dependence on photosynthetic and respiratory systems. *Virology*, 1970, **40**: 514-521. DOI: 10.1016/0042-6822(70)90194-7.
- [27] Puxty RJ, Evans DJ, Millard AD *et al.* Energy limitation of cyanophage development: Implications for marine carbon cycling. *The ISME Journal*, 2018, **12**: 1273-1286. DOI: 10.1038/s41396-017-0043-3.
- [28] Sherman LA, Connelly M, Sherman DM. Infection of *Synechococcus cedrorum* by the cyanophage AS-1M. I. Ultrastructure of infection and phage assembly. *Virology*, 1976, **71**: 1-16. DOI: 10.1016/0042-6822(76)90089-1.
- [29] Sherman LA, Pauw P. Infection of *Synechococcus cedrorum* by the cyanophage AS-1M. II. Protein and DNA synthesis. *Virology*, 1976, **71**: 17-27. DOI: 10.1016/0042-6822(76)90090-8.
- [30] Cheng K, Frenken T, Brussaard CPD *et al.* Cyanophage propagation in the freshwater cyanobacterium phormidium is constrained by phosphorus limitation and enhanced by elevated pCO<sub>2</sub>. *Frontiers in Microbiology*, 2019, **10**: 617. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00617.
- [31] Mojica, Kristina DA, Brussaard *et al.* Factors affecting virus dynamics and microbial host-virus interactions in marine environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, **89**: 495-515. DOI: 10.1111/1574-6941.12343.
- [32] 邓凤霞. 噬藻体 PP 的时空分布研究[学位论文]. 武汉: 华中师范大学, 2006.
- [33] Zhang YY, Huang LL, Wang XY *et al.* Regulation of cyanobacteria population density by cyanophage and its effect on material circulation in water. *J Lake Sci*, 2022, **34**(2): 376-390. DOI: 10.18307/2022.0202. [张奕妍, 黄兰兰, 王夕予等. 噬藻体对蓝藻种群密度的调控及其对水体中物质循环的影响. 湖泊科学, 2022, **34**(2): 376-390.]
- [34] Tucker S, Pollard P. Identification of cyanophage Ma-LBP and infection of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from an Australian subtropical lake by the virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(2): 629-635. DOI: 10.1128/AEM.71.2.629-635.2005.
- [35] Fuhrman JA, Suttle CA. Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography*, 1993, **6**: 50-62.
- [36] Jiang H, Cheng K, Xiao CQ *et al.* The relationship between cyanophage PP and its wild host (filamentous cyanobacteria): Adsorption rate, latent period and burst size. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, (7): 2911-2915. [姜红, 程凯, 肖慈琼等. 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. 生态学报, 2007, (7): 2911-2915.]