

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (2) :191 - 199; 4 February 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsx.2014.02.008

## 蓝细菌病毒 A-4L 在鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 藻苔中形成同心圆噬斑的成因

廖湘勇, 欧铜, 高宏, 徐旭东, 朱蓉, 张奇亚\*

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, 湖北 武汉 430072

**摘要:**【目的】分析蓝细菌病毒 A-4L 在鱼腥藻 (*Anabaena* sp.) PCC 7120 藻苔中形成同心圆噬斑的原因, 阐明 A-4L 的一个重要生物学特征, 为分离、鉴定和筛选新的水华蓝藻病毒提供借鉴。【方法】用初始滴度为  $2.8 \times 10^{10}$  PFU/mL 的 A-4L 悬液感染鱼腥藻, 在不同时间点收集裂解液绘制一步生长曲线, 获得 A-4L 对鱼腥藻的潜伏期和释放量。将适量 A-4L 悬液感染不同培养时间的藻苔, 逐日观察和记录藻苔病变情况。培养藻苔并接种适量 A-4L 悬液, 分别置于完全持续光照 (Light: Dark = 24 h: 0 h, L: D = 24 h: 0 h) 条件; 完全周期光照 (L: D = 14 h: 10 h) 条件; 或前 3 d 周期光照转后 3 d 持续光照的条件下, 比较不同光照条件对同心圆噬斑形成的影响。然后挑取单个噬斑进行扩大培养, 纯化后, 负染电镜观察 A-4L 的超微形态。【结果】A-4L 的潜伏期为 0.5 - 2 h, 释放量约为 247 IU/cell (Infectious Units)。在周期光照条件下, 藻苔接种 A-4L 3 - 4 d 后, 出现同心圆噬斑, 且同心圆数量与攻毒后的天数 (n) 有相关性, 为 “n - 1”; 同心圆间距约为 3 mm。与周期光照条件相比, 在持续光照条件下未形成同心圆噬斑。而在周期光照条件转持续光照条件下, 由先周期光照时所形成的同心圆在转持续光照后逐渐消失, 证实同心圆噬斑的形成依赖于周期光照。负染电镜观察显示 A-4L 具有一个近似球形的头部, 直径约为 50 nm 以及长度约为 10 nm 的尾部, 形态与短尾蓝细菌病毒相似。【结论】A-4L 是一株能形成同心圆噬斑的蓝细菌病毒, 并揭示其同心圆噬斑形成的关键条件是周期光照。

**关键词:** 蓝细菌病毒 A-4L, 同心圆噬斑, 周期光照, 鱼腥藻藻苔, 水华蓝藻

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2014) 02-0191-09

蓝细菌病毒是一类感染蓝细菌的噬菌体, 能调节水体中宿主藻的种群密度<sup>[1-4]</sup>。一方面, 蓝细菌病毒入侵可导致其宿主藻光合作用中心——类囊体发生改变<sup>[5]</sup>, 影响藻类光合效率; 另一方面, 蓝细菌病毒可直接裂解蓝藻细胞, 抑制蓝藻水华的同时促进生物地球化学循环<sup>[4, 6]</sup>。故此, 蓝细菌病毒的生

物学特性、分离筛选以及鉴定等方面成为了当前的研究热点。

蓝细菌病毒作为一种感染蓝藻的病毒, 其广泛分布在不同水体中, 数量在浮游病毒中占主导地位<sup>[7-11]</sup>, 但由于受到温度、光照、宿主特异性等多种因子影响, 能从水体中分离出来并进行纯培养的仅

基金项目: 中国科学院方向项目 (KSCXZ-EW-Z-3); 国家自然科学基金项目 (31270213)

\* 通信作者。Tel: +86-27-68780792; E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

作者简介: 廖湘勇 (1990 -), 男, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 现从事水生病毒及分子生物学研究。E-mail: liaoxiangyong@ihb.ac.cn

收稿日期: 2013-05-31; 修回日期: 2013-09-03

有极少数,这就限制了对蓝细菌病毒与其宿主蓝藻之间相互作用关系的研究<sup>[12-14]</sup>。噬斑作为蓝细菌病毒(噬菌体)的一种特性标志<sup>[15-18]</sup>,其形态特异性及形成原因的分析将有助于揭示蓝细菌病毒感染宿主的生物学过程。迄今,对噬斑的认识主要来源于蓝细菌病毒纯化和病毒效价测定<sup>[15-17]</sup>。虽有真核藻病毒(藻病毒)形成同心圆空斑的报道<sup>[19]</sup>,但迄今未见感染原核藻病毒(蓝细菌病毒)形成同心圆噬斑的相关文献。

本实验以一株蓝细菌病毒 A-4L 为研究材料,初步分析了 A-4L 感染鱼腥藻 PCC7120 形成同心圆噬斑的过程和原因,为进一步认识、了解蓝细菌病毒以及分离、鉴定和筛选新的水华蓝藻病毒提供参考价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品和朋友条件:** A-4L 毒株和纯化的鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC7120<sup>[20]</sup> 由中国科学院水生生物研究所徐旭东老师实验室保种。培养基为 BG11 培养基<sup>[21]</sup>,藻种活化后,在 28℃,光照强度约 25 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,光周期为 L:D = 14 h:10 h 的条件下培养。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 低熔点琼脂糖(上海生物工程技术有限公司),其他试剂均为国产分析纯。血球计数板(上海求精生物试剂仪器有限公司);培养皿(江苏康健医疗用品有限公司);S22PC 可见分光光度计(上海棱光科技有限公司);超声波破碎仪(SCIENTE-II D, 宁波新芝生物科技股份有限公司);SIGMA 高速离心机(Eppendorf, 德国);光照培养箱(PGX-450D, 宁波莱福科技有限公司);超速离心机(OPTIMA L-90K, 美国 BECKMAN);透射电镜(JEM1230, 日本)。

### 1.2 绘制 A-4L 一步生长曲线

将一定体积的蓝细菌病毒悬液接种感染对数生长的已知细胞浓度的鱼腥藻 PCC7120,置于光照培养箱中培养,分别取感染 0 h、0.5 h、2 h、3.5 h、5 h、6.5 h、8 h、11 h、14 h 和 19 h 的藻细胞培养混合液,10000 × g、10℃ 离心 10 min,测定上清液的蓝细菌病毒滴度;另取感染后 0 h、0.5 h、2 h、3.5 h、5 h、6.5 h、8 h、11 h、14 h 和 19 h 的藻细胞培养物各 5 mL,测定藻细胞密度。参照文献<sup>[22-23]</sup> 绘制蓝细

菌病毒滴度-藻细胞密度曲线。

**1.2.1 蓝细菌病毒滴度测定:** 取 4 mL 对数期的鱼腥藻 PCC7120 混合 6 mL 融化的 0.75% 低熔点琼脂,倒入 1% BG11 琼脂平板上,放入光照培养箱中培养 3 d。然后从每个样点各取 0.1 mL A-4L 悬液,用 BG11 培养基按十倍系列稀释至 10<sup>-8</sup>,从鱼腥藻 PCC7120 藻苔中心处倒入 1 mL 稀释液,轻轻摇晃,使病毒液在平板中分布均匀,在光照培养箱中培养 24 h 后倒置培养,每个样点各做 3 个重复。4 d 后计数平板的噬斑数,根据公式计算 A-4L 滴度:

$$N = \frac{M \times S}{V}$$

式中  $N$ : 蓝细菌病毒效价;  $M$ : 噬斑平均数量;  $S$ : 稀释倍数;  $V$ : 取样体积

**1.2.2 藻细胞密度测定:** 取 5 mL 鱼腥藻 PCC7120 藻液,超声波破碎 15 s,使之成为单细胞藻,用 BG11 将破碎后的藻液稀释至 10<sup>-3</sup>,用血球计数板(25 格 × 16 格)在光学显微镜下计数,至少计数 3 次,取其平均值,3 次计数的值与其平均值之差应小于 ±15%,否则应重新计数。按下列公示计算藻细胞密度。

$$C = \frac{M \times S}{80} \times 400 \times 10000$$

式中  $C$ : 藻细胞密度, cell/mL;  $M$ : 80 小格内藻细胞个数;  $S$ : 藻液稀释倍数;

### 1.3 不同稀释度 A-4L 对鱼腥藻 PCC7120 藻苔的感染

取 4 mL 对数期的鱼腥藻 PCC7120 混合 6 mL 融化的 0.75% 低熔点琼脂,倒入 1% BG11 琼脂平板上,放入光照培养箱中培养 3 d。然后用培养基将纯化的 A-4L 按十倍系列稀释成 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup> 和 10<sup>-10</sup> 共计 10 个梯度的病毒悬液。从鱼腥藻 PCC7120 藻苔中心处倒入稀释液,轻轻摇晃,使病毒液在平板中分布均匀,光照培养箱中培养 24 h 后倒置培养。每个稀释梯度设 3 个重复,每 6 h 观察一次,记录藻苔感染情况,待出现空斑后,测量空斑直径,每个平板各取 3 个空斑测定,最后取平均值分析。

**1.3.1 病毒液稀释方法:** 将 10 管含 0.9 mL BG11 液体培养基的 Eppendorf 管分别标写 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>……10<sup>-10</sup>。取 0.1 mL 纯化的 A-4L 悬液,注入 10<sup>-1</sup> 的试管中,旋摇混匀。然后从 10<sup>-1</sup> 管中吸

0.1 mL 加入  $10^{-2}$  管中, 混匀, 依此类推, 稀释至  $10^{-10}$  管。

#### 1.4 蓝细菌病毒 A-4L 对不同培养时间的鱼腥藻藻苔感染性测定

取 3 组 1% BG11 琼脂平板, 每组设 3 个重复, 分别倒入混匀的 4 mL 对数期鱼腥藻 PCC7120 与 6 mL 融化的 0.75% 低熔点琼脂液体, 凝固后放入光照培养箱中培养, 分别在培养 1 d、3 d、6 d 时间点时, 接种 1 mL  $10^{-8}$  稀释度的 A-4L 悬液, 置于相同条件下培养, 每天观察和记录感染情况。

#### 1.5 光照对同心圆噬斑的影响

取 4 组 1% BG11 琼脂平板, 每组设 3 个重复, 分别倒入混匀的 4 mL 对数期鱼腥藻 PCC7120 与 6 mL 融化的 0.75% 低熔点琼脂液体, 凝固后放入光照培养箱中培养, 使藻适应固体培养条件。3 d 后, 4 组接种 1 mL  $10^{-8}$  稀释度的 A-4L 悬液, 分别置于完全周期光照条件 (L: D = 14 h: 10 h); 完全持续光照条件 (L: D = 24 h: 0 h); 或前 3 d 周期光照转后 3 d 持续光照条件, 其它条件一致, 每天观察和记录感染情况。

#### 1.6 电镜观察

用灭菌牙签在噬斑边缘沾取一下, 放入 3 mL 鱼腥藻 PCC7120 藻液中轻微震荡, 使沾取的病毒粒子

进入藻液, 充分混合后, 置于光照培养箱培养, 待裂解后, 经  $8500 \times g$  离心 30 min 去除细胞碎片, 上清接种至 100 mL 鱼腥藻 PCC7120 藻液中, 光照培养箱中培养, 完全裂解后, 经  $10000 \times g$  离心 30 min 除去藻细胞碎片后, 上清液经  $105181 \times g$  超速离心 1.5 h, 病毒沉淀再过蔗糖密度梯度纯化, 取一定量纯化悬液用 2.5% 的戊二醛固定, 吸附到 Formvar-碳膜铜网上的蓝细菌病毒颗粒经 2% 磷钨酸染色 3 - 5 min, 自然干燥后, 在 JEM1230 型透射电镜 100 kV 下观察, CCD 图像传输系统拍照。

## 2 结果

### 2.1 A-4L 的一步生长曲线

在一步生长曲线测定实验中, 接种 A-4L 悬液 2 h 后, 鱼腥藻 PCC7120 细胞浓度开始下降, 同时 A-4L 的滴度加速上升, 这也就意味着 A-4L 的潜伏期为 0.5 h - 2 h。在感染 19 h 后, 鱼腥藻 PCC7120 细胞浓度从  $2.78 \times 10^8$  cell/mL 降至  $2.6 \times 10^7$  cell/mL, 而 A-4L 滴度却从  $2.8 \times 10^{10}$  PFU/mL 增加至  $9.03 \times 10^{10}$  PFU/mL, 因此, 每个宿主细胞平均可释放 247 感染单位的蓝细菌病毒 A-4L (图 1)。

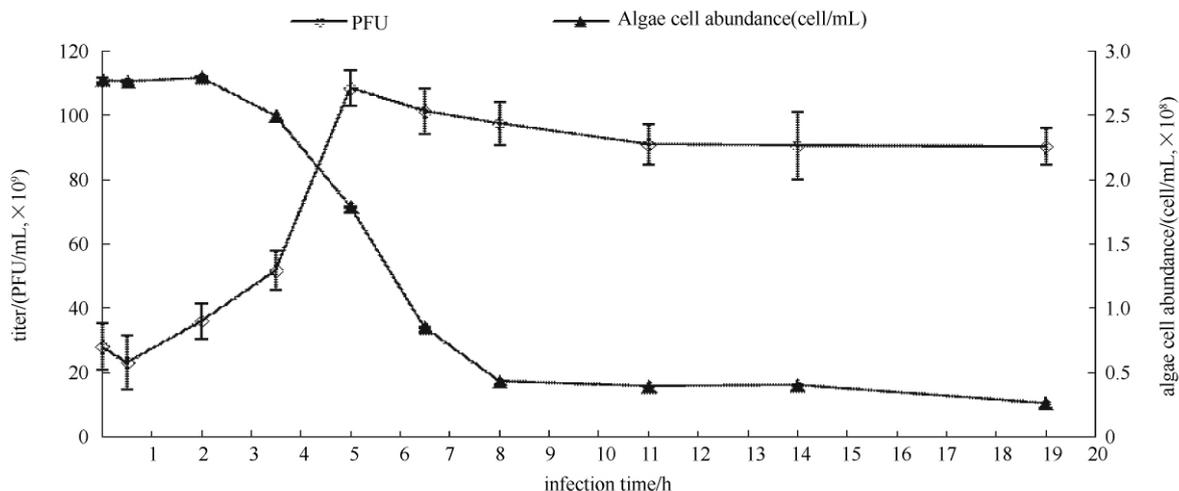


图 1. A-4L 的一步生长曲线

Figure 1. One-step growth curves of A-4L.

### 2.2 同心圆噬斑的形成及其形态变化的观察

A-4L 感染鱼腥藻 PCC7120 的 1 d 后, 平板中形成噬斑。继续感染到 2 d 时, 噬斑内部出现一个同心圆, 且随着感染天数的不断增加, 同心圆数量也随

之增加 (图 2)。持续观察发现, 同心圆的数量和鱼腥藻攻毒后的天数 (n) 具有相关性, 为 “n - 1”, 且噬斑内同心圆间距约为 3 mm。同时, 同心圆内部颜色随时间的延长由浅黄色逐渐变成乳白色。

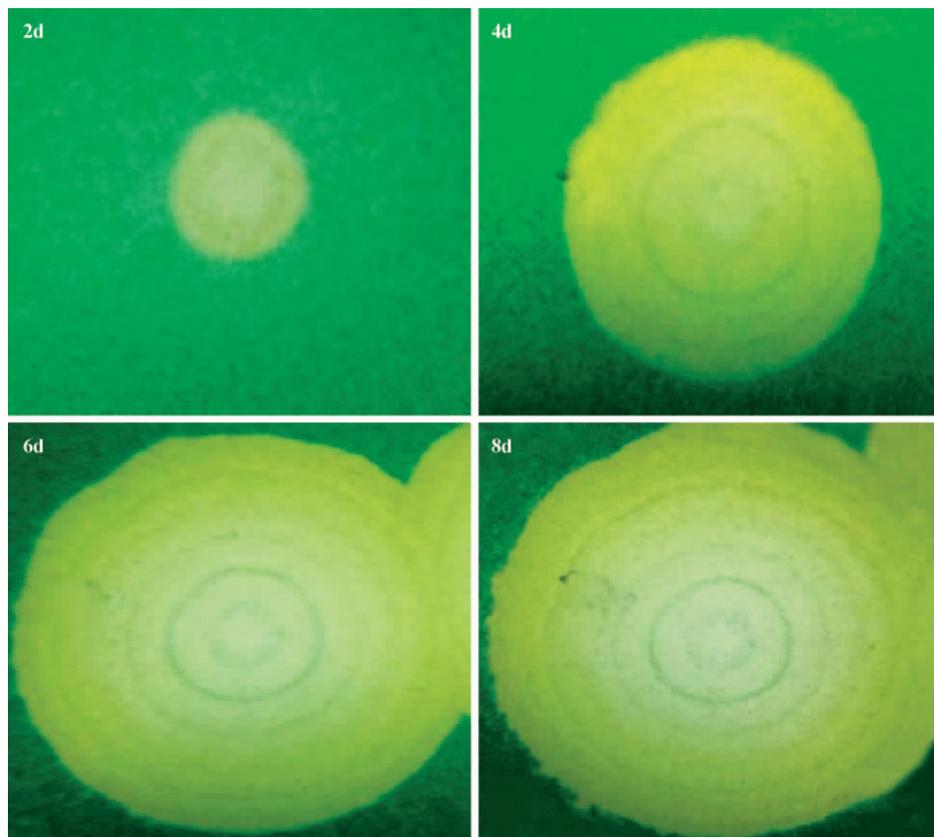


图 2. A-4L 感染鱼腥藻 PCC7120 藻苔后形成的噬藻斑

Figure 2. The plaques of lawns of *Anabaena* sp. PCC7120 infected by A-4L.

### 2.3 不同稀释度 A-4L 对同心圆噬斑的影响

十倍系列稀释 ( $10^{-1}$  -  $10^{-10}$ ) 的 A-4L 悬液感染鱼腥藻 PCC7120 藻苔 32h 后, 除  $10^{-10}$  梯度未见噬斑形成, 其它稀释梯度均出现直径约为 3.5 mm - 4 mm 的噬斑, 其中  $10^{-1}$  至  $10^{-6}$  稀释度 A-4L 感染形成的噬斑相互融合, 而  $10^{-7}$  至  $10^{-9}$  稀释度的 A-4L 感染条件下能清楚观察到噬斑。继续培养到 54 h, 差别更加明显,  $10^{-1}$  至  $10^{-6}$  稀释度感染的藻苔几乎全部裂解, 但和  $10^{-7}$  至  $10^{-9}$  稀释度一样, 噬斑内部能观察到一个同心圆。然而随着时间延长,  $10^{-1}$  至  $10^{-6}$  稀释度藻苔全部裂解, 不再形成同心圆, 而  $10^{-7}$  至  $10^{-9}$  稀释度平板同心圆数量随时间增加。从图 3 可看出,  $10^{-9}$  稀释度噬斑数量太少, 对于同心圆噬斑的分析无代表性;  $10^{-7}$  稀释度噬斑相互融合的数量相对  $10^{-8}$  稀释度多, 所以  $10^{-8}$  稀释度最适合同心圆噬斑分析和形成过程的观察。

蓝细菌病毒滴度测定, A-4L 悬液的初始滴度为  $2.8 \times 10^{10}$  PFU/mL, 吸取 0.1 mL A-4L 悬液稀释后,

$10^{-8}$  稀释液滴度为 28 PFU/mL。

### 2.4 鱼腥藻藻苔的不同培养时间对同心圆噬斑的影响

1 mL  $10^{-8}$  稀释度的 A-4L 悬液分别感染三组不同培养时间的藻苔 2 d 后, 平板上都出现同心圆噬斑, 但噬斑形态不同 (图 4)。培养 1 d 的平板中噬斑最大, 藻苔颜色比较淡, 虽能观察到同心圆噬斑, 但同心圆不清晰, 不能准确观察和分析同心圆的形成; 培养 3 d 的平板中噬斑直径稍小, 能很好的观察同心圆噬斑; 培养 6 d 的平板中噬斑直径最小, 且噬斑边缘模糊化, 呈弥散性, 每个噬斑的直径增长趋势不一致, 不适合同心圆噬斑的分析。感染 4 d 后, 三组平板的同心圆噬斑差异性更加明显。

这一结果表明, 不同培养时间的藻苔对蓝细菌病毒的敏感性存在差异性, 藻苔培养期太短或太长, 都对蓝细菌病毒噬斑的形态存在一定的影响, 平板中培养 3 d 的藻苔接种 A-4L 悬液最适合观察及分析同心圆噬斑的形成。

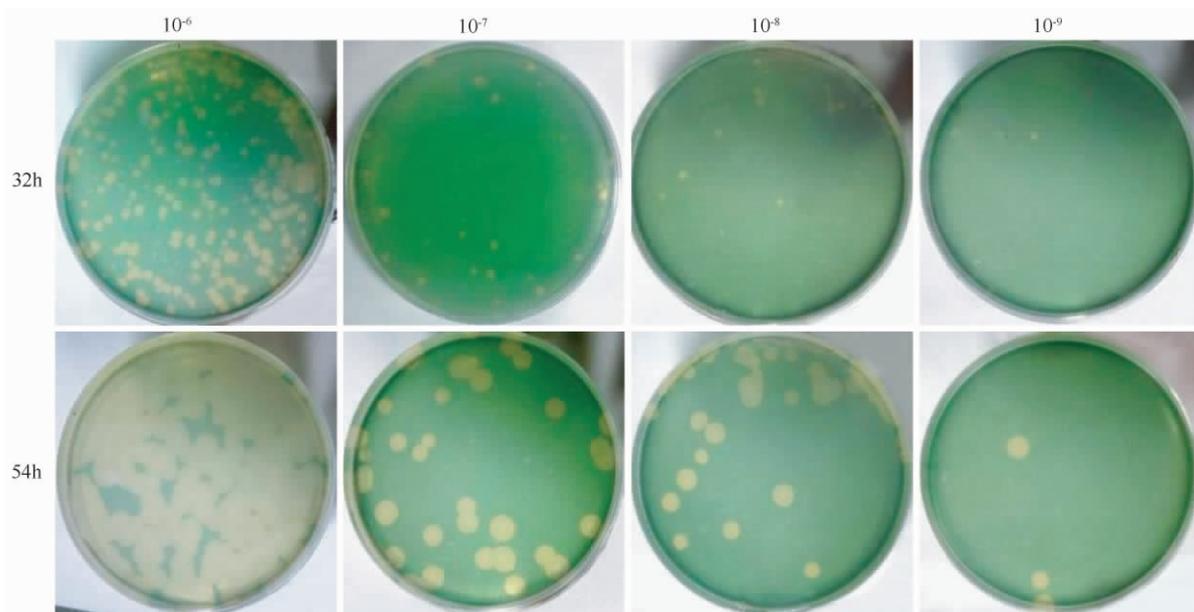


图 3. 不同时间不同稀释度 A-4L 感染鱼腥藻 PCC7120 藻苔形成的空斑

Figure 3. The plaques of lawns of *Anabaena* sp. PCC7120 infected by A-4L with different dilution at different time. The picture showed four representative dilutions.

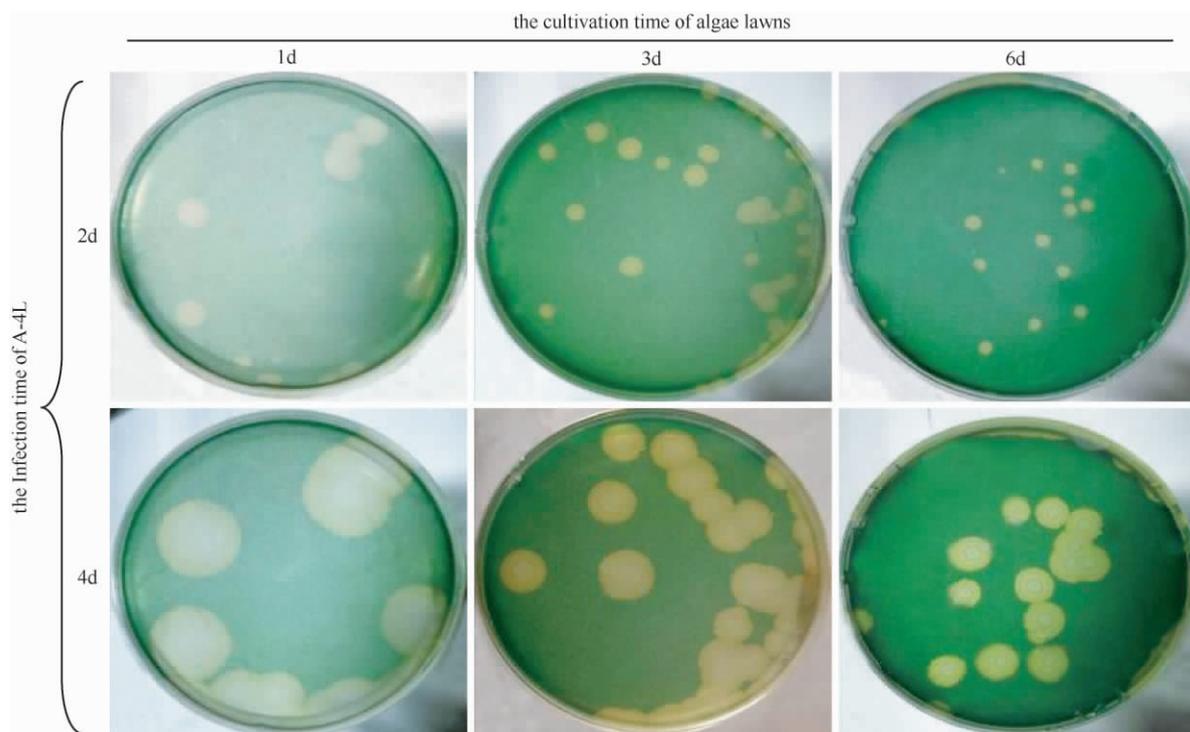


图 4. A-4L 感染不同培养时间的鱼腥藻 PCC7120 藻苔形成的噬斑

Figure 4. The plaques of lawns of *Anabaena* sp. PCC7120 infected by A-4L at different cultivation time.

## 2.5 不同光照条件对同心圆噬斑的影响

在不同光照条件下, A-4L 感染鱼腥藻 PCC7120 形成的噬斑具有一定的差异。如与周期光照条件相

比(图 5. II), 持续光照条件下, A-4L 感染鱼腥藻 PCC7120 藻苔没有形成同心圆噬斑(图 5. I); 而另一条件下, 前 3 d 周期光照条件过程中, 藻苔形成同

心圆噬斑, 转为持续光照条件后, 第 4 天时继续形成同心圆, 但同心圆边缘变浅, 4 d 后不再形成同心圆 (图 5. III), 可见同心圆的形成依赖周期光照。

此外, 持续光照条件下, 噬斑内部颜色由浅黄色逐渐变成乳白色, 比周期光照条件下颜色更浅, 可见

与周期光照条件相比, 持续光照条件蓝细菌病毒裂解得更充分。同时, 在持续观察感染过程发现, 持续光照条件下, 噬斑直径在一定时间范围内比周期光照条件下增长的也要快。

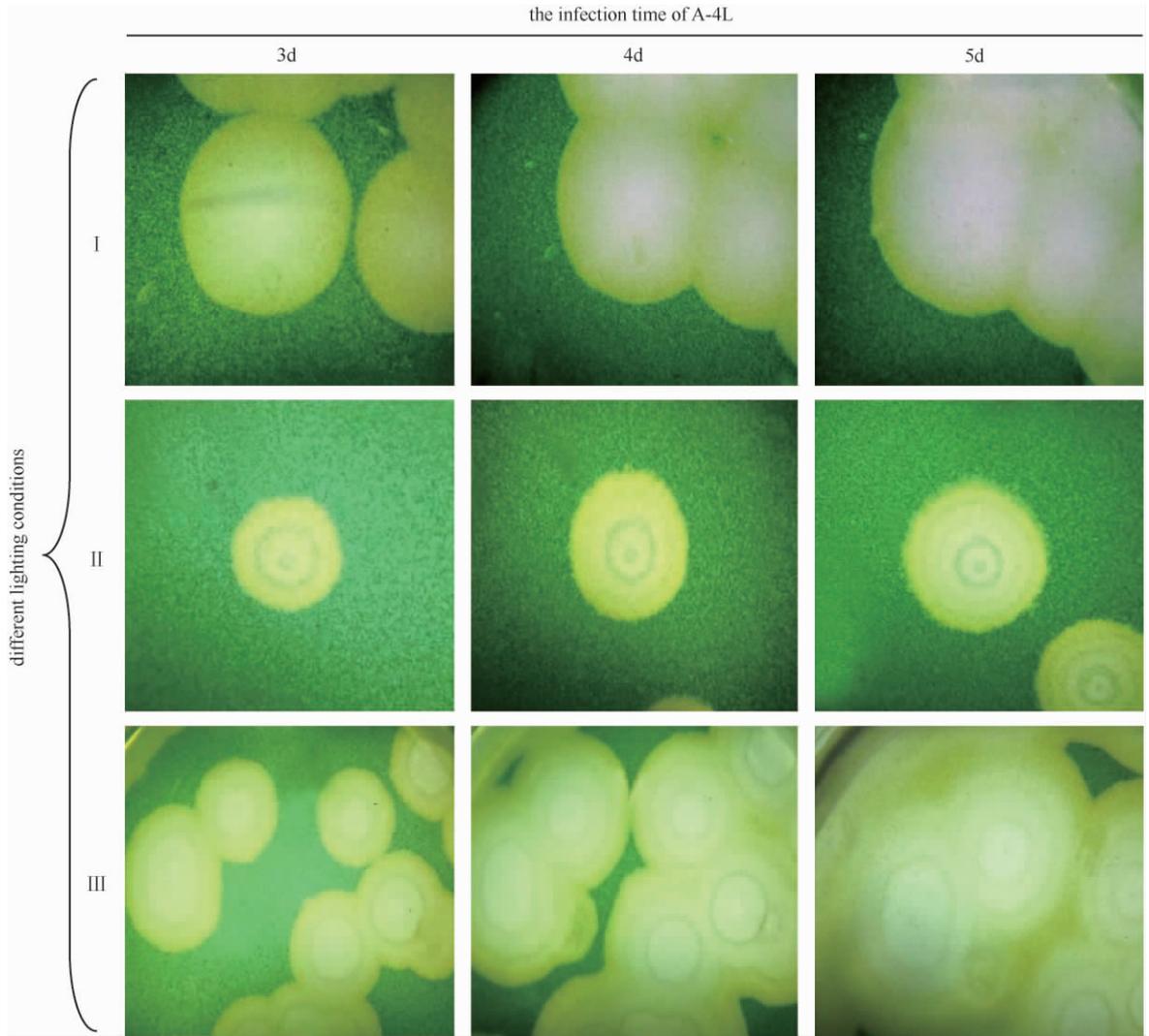


图 5. 不同光照条件不同时间 A-4L 感染鱼腥藻 PCC7120 藻苔形成的噬斑

Figure 5. The plaques of lawns of *Anabaena* sp. PCC7120 infected by A-4L at different time and different lighting conditions; (I) Continues lighting (24 L:0D); (II) Periodic lighting (14 L:10 D); (III) Periodic lighting (14 L:10 D) during the first three days, then turned to the continues lighting (24 L:0D).

## 2.6 A-4L 的电镜观察

挑取单个噬斑扩大培养, 纯化后负染电镜观察。从图 6 可见, A-4L 头部近似球形, 直径约为 50 nm, 具有一个长约 10 nm 的尾部, 有短尾蓝细菌病毒的形态特征。

## 3 讨论

A-4L 的一步生长曲线 (图 1) 显示: 蓝细菌病毒的效价在 0.5 h 或之前是低于 0 h 的, 而 0.5 - 2 h, 蓝细菌病毒效价逐渐上升, 这表明此期间是 A-

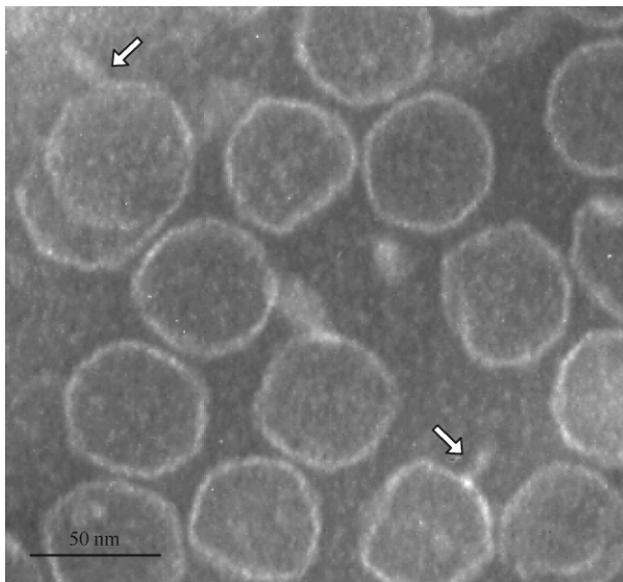


图 6. A-4L 的负染电镜观察 (80000 ×)

Figure 6. Negative staining electron micrographs image of A-4L (80000 ×). The arrows indicate the tail of A-4L.

4L 由侵染到释放的过程, 因此测得 A-4L 的潜伏期为 0.5 - 2 h。如果能采集更多实时测定数据, 无疑其结果将更精确。但由于测试样本需在光照条件下培养才有效, 当采样间隔时间更短就会改变培养条件, 影响结果的可靠性。结果还表明, A-4L 潜伏期比较短, 但其释放量相对比较大, 可能是由于蓝细菌病毒感染的宿主差异性导致的, 如宿主的生理特性或体积大小<sup>[24-25]</sup>。除此, A-4L 感染 5 h 后效价有一个下降的时间段, 从理论上分析, 藻细胞下降, 蓝细菌病毒滴度应随之上升, 这有可能是因为在该时间段部分蓝细菌病毒失活引起的。

蓝细菌病毒作为一类特异性感染蓝藻的病毒, 其生物学的一些部分特性也和其宿主一样容易会受到一些生态因子影响<sup>[25]</sup>。周期光照条件下, A-4L 在平板上感染鱼腥藻 PCC7120 藻苔出现同心圆噬斑, 持续光照条件下培养未出现此现象, 说明光照能直接影响 A-4L 噬斑的形态及蓝细菌病毒的感染情况。同心圆噬斑的形成依赖于周期光照, 可能原因是由于光照影响了蓝细菌病毒对藻的吸附或子代蓝细菌病毒的释放, 使感染过程变缓或蓝细菌病毒感染力变弱, 从而导致了白天有光照与夜晚无光照时蓝细菌病毒感染力差异的形成, 最终以同心圆噬斑的形式直观地呈现。Jia 等<sup>[26-27]</sup>的研究曾报道蓝细菌病毒对宿主藻的吸附以及子代蓝细菌病毒的复

制是一个依赖于光照的过程。Suttle 等<sup>[28]</sup>也曾提出蓝细菌病毒在应对各种生态因子影响的过程中, 可能会采取一些昼夜节律感染和复制的策略的假设, 其具体机制还有待研究。从鱼腥藻方面考虑, 对于光照是否会影响鱼腥藻的节律性, 从而导致蓝细菌病毒感染鱼腥藻不同, 这方面还有待于进一步研究。

此外, 虽然形成藻苔的鱼腥藻初始浓度相同, 都是对数期生长的藻, 但藻苔在平板上的不同培养时间对蓝细菌病毒 A-4L 敏感性不同, 可能因为在不同培养时间点, 藻细胞对固体培养基的适应性和藻细胞结构都存在一定差异性。培养期过短, 藻细胞还处在适应期, 对蓝细菌病毒的敏感度降低; 培养期过长, 藻细胞进入稳定期, 细胞结构发育完整, 增强了对蓝细菌病毒的抵抗力。对数期或衰老期的藻细胞壁都还不够稳定, 防御能力很弱, 故感染性强。而稳定期的细胞各部分结构都发育完善, 对病毒的抵御能力都增强<sup>[14,29]</sup>。

对蓝细菌病毒的研究目前虽然取得了一些进展, 但是还未能真正运用到自然水体中, 可能原因是由于对蓝细菌病毒形态、生理等特性研究未全面掌握, 所以迫切需要探索蓝细菌病毒的分离培养的方法, 更进一步了解和认识蓝细菌病毒。本实验仅以一株蓝细菌病毒 A-4L 作为研究材料, 比较了不同实验条件下 A-4L 的感染特性, 同时对其同心圆噬斑的形成原因做了初步分析。自然水体中还存在着不同类型的蓝细菌病毒, 那么这些不同类型的蓝细菌病毒之间感染宿主是否都能形成类似 A-4L 的噬斑? 影响噬斑形成及形态特征的因素是否一致? 所形成的噬斑又具有哪些差异性以及多重同心圆噬斑形成的具体机制是什么? 这些问题都还有待下一步深入研究。

## 参考文献

- [1] Sullivan MB, Waterbury JB, Chisholm SW. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature*, 2003, 424 (6952): 1047-1051.
- [2] Mühling M, Fuller NJ, Millard A, Somerfield PJ, Marie D, Wilson WH, Scanlan DJ, Post AF, Joint I, Mann NH. Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage communities: evidence for viral control of phytoplankton. *Environmental Microbiology*, 2005, 7 (4): 499-508.
- [3] Zhang Q, Gui J. A kind of strategic bio-resource not to be neglected—freshwater and marine viruses and their roles in the global ecosystem. *Bulletin of the Chinese Academy of*

- Sciences*, 2009, 24 (4) : 414-420. (in Chinese)  
张奇亚, 桂建芳. 一类不可忽视的战略生物资源—淡水与海水中的病毒及其在生态系统中的作用. 中国科学院院刊, 2009, 24 (4) : 414-420.
- [4] Breitbart M. Marine Viruses: Truth or Dare. *Annual Review of Marine Science*, 2012, 4 : 425-448.
- [5] Gao EB, Gui JF, Zhang QY. A novel cyanophage with a cyanobacterial nonbleaching protein a gene in the genome. *Journal of Virology*, 2012, 86 (1) : 236-245.
- [6] Suttle CA. Viruses in the sea. *Nature*, 2005, 437 : 356-361.
- [7] Zhang Q. Virioplankton. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26 (6) : 691-696. (in Chinese)  
张奇亚. 浮游病毒. 水生生物学报, 2002, 26 (6) : 691-696.
- [8] Liu Y, Zhang Q, Yuan X. Studies on abundance and morphological diversity of virioplankton in the Donghu Lake, Wuhan. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29 (1) : 1-6. (in Chinese)  
刘艳鸣, 张奇亚, 袁秀平. 武汉东湖浮游病毒的丰度及多样性. 水生生物学报, 2005, 29 (1) : 1-6.
- [9] Liu Y, Zhang Q. Detection of the genome size of virioplankton from Donghu Lake by pulsed field gel electrophoresis. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 2005, 51 (S2) : 238-240. (in Chinese)  
刘艳鸣, 张奇亚. 利用脉冲场凝胶电泳测定东湖浮游病毒基因组的大小. 武汉大学学报 (理学版), 2005, 51 (S2) : 238-240.
- [10] 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.
- [11] Liu YM, Yuan XP, Zhang QY. Spatial distribution and morphologic diversity of virioplankton in Lake Donghu, China. *Acta Oecologica*, 2006, 29 (3) : 328-334.
- [12] Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 2005, 43 (No. S) : 93-100.
- [13] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34 (4) : 415-425.
- [14] Gao E, Li S, Lv B, Zhang Q. Analysis of the cyanophage (Pav-LD) infection in host cyanobacteria under different culture conditions. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36 (3) : 420-424. (in Chinese)  
高恶斌, 李三华, 吕波, 张奇亚. 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) : 420-424.
- [15] Lee HL, Doris L, Patricia JP. Induction of temperate cyanophage AS-1 by heavy metalcopper. *BMC Microbiology*, 2006, 6 (2) : 17
- [16] Raytcheva DA, Cameron Haase-Pettingell, Piret JM, King JA. Intracellular assembly of cyanophage Syn5 proceeds through a scaffold-containing procapsid. *Journal of Virology*, 2011, 85 (5) : 2406-2415.
- [17] Liu L, Guo Z, Huang P, Wang H, Xu L. Isolation and identification a cyanophage in Lake TaiHu. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 2 (36) : 340-342. (in Chinese)  
刘露, 郭宗楼, 黄朴, 王昊 徐立红. 一株太湖水域蓝藻噬藻体的分离与鉴定. 水生生物学报, 2012, 2 (36) : 340-342.
- [18] Li M, Ji X, Wang B, Zhang Q, Lin L, Zhang B, Wei Y. Isolation and characterization of a lytic bacteriophage from Mingyong glacier melt water. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (2) : 236-242. (in Chinese)  
李明源, 季秀玲, 王宝强, 张琦, 林连兵, 张兵, 魏云林. 明永冰川融水中一株裂解性低温噬菌体的分离及特征. 微生物学报, 2012, 52 (2) : 236-242.
- [19] Claus B, Hartmut F. Large-scale production and plaque titration of European *Chlorella* viruses. *Journal of Virological Methods*, 1997, 67 (2) : 119-125.
- [20] Jiang HB, Kong RQ, Xu XD. The N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase gene promotes growth and cell differentiation of cyanobacteria under light-limiting conditions. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (8) : 2239-2245.
- [21] Kima DG, Laa HJ, Ahna ChY, Parkb YH, Oha HM. Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (3) : 3163-3168.
- [22] Yoshida T, Takashima Y, Tomaru Y, Shirai Y, Takao Y, Hiroishi S, Nagasaki K. Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (2) : 1239-1247.
- [23] Wang K, Chen F. Prevalence of highly host-specific cyanophages in the estuarine environment. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (2) : 300-312.
- [24] Gao EB, Yuan XP, Li RH, Zhang QY. Isolation of a novel cyanophage infectious to the filamentous cyanobacterium *Planktothrix agardhii* (cyanophyceae) from Lake Donghu, China. *Aquatic Microbial Ecology*, 2009, 54 (2) : 163-170.
- [25] 张奇亚, 桂建芳. 水生病毒学. 北京: 高等教育出版社, 2008 : 358-361.
- [26] Jia Y, Shan JY, Millard A, Clokie MR, Mann NH. Light-dependent adsorption of photosynthetic cyanophages

to *Synechococcus* sp. WH7803. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 310 (2): 120-126.

[27] Jia Y. An investigation into the adsorption of cyanophages to their cyanobacterial hosts. The PhD dissertation of Warwick University, 2009.

[28] Suttle CA. Ecological, evolutionary, and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae // Hurst CJ. *Viral Ecology*. London: Academic Press, 2000: 247-296.

[29] Wang C, Guo Y, Chen K, Zhao Y, Shi Z. The correlation of host's growth stage with enlargement of plaque and adsorption rate of cyanophage. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27 (6): 660-663. (in Chinese)

王春艳, 郭亚新, 程凯, 赵以军, 石正丽. 噬藻斑扩大及噬藻体吸附率与宿主生长期的关系. *水生生物学报*, 2003, 27 (6): 660-663.

## Main reason for concentric rings plaque formation of virus infecting cyanobacteria (A-4L) in lawns of *Anabaena variabilis*

Xiangyong Liao, Tong Ou, Hong Gao, Xudong Xu, Rong Zhu, Qiya Zhang\*

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei Province, China

**Abstract:** [Objective] To clarify an important biological characteristic of virus infecting cyanobacteria (A-4L) and to isolate, identify new bloom-forming cyanobacteria viruses, we studied A-4L concentric rings plaque formation in *Anabaena* sp. PCC7120. [Methods] One step growth curve was designed to estimate the latent period and burst size of A-4L. The initial titer of A-4L was about  $2.8 \times 10^{10}$  PFU/mL. The appropriate titer suspension of A-4L was inoculated onto the lawns of *Anabaena* sp. PCC 7120 which have been cultivated at different time. Pathological change of lawns was observed and recorded daily. To investigate the effect of lighting on the concentric rings plaque formation, plates were cultivated and infected under continuous lighting (L: D = 24 h: 0 h), periodic lighting (L: D = 14 h: 10 h) or 3 days continuous lighting after periodic lighting for 3 days. The ultra-morphology of purified A-4L was observed by negative staining electron microscopy. [Results] The latent period of A-4 (L) was 0.5 h - 2 h and the burst size was about 247 infectious units per cell. Under periodic lighting, concentric rings plaques were observed in the plate after infection 3 days to 4 days and the distance between two rings was about 3 mm. Statistic analysis showed that there was a correlation between the number of concentric rings in plaques and infection days, which was "n - 1". Compared with the periodic lighting, the plaques without concentric rings were observed under continuous lighting. However, the concentric rings formed under periodic lighting disappeared gradually after turning to continuous lighting, which demonstrated that the formation of concentric rings plaques depended on the periodic lighting. Negative staining electron microscopy showed that the A-4L particle had a spheroidal head with diameter about 50 nm and a tail with length about 10 nm which was similar to the characteristic morphology of cyanobacterial podoviruses. [Conclusion] A-4L is a virus infecting cyanobacteria which can form concentric rings plaque. And periodic lighting is the key conditions for the concentric rings plaque formation of A-4L.

**Keywords:** virus infecting cyanobacteria (A-4L), concentric rings plaque, periodic lighting, lawns of *Anabaena variabilis*, bloom-forming cyanobacteria

(本文责编:王晋芳)