

土壤学报
Acta Pedologica Sinica
ISSN 0564-3929, CN 32-1119/P

《土壤学报》网络首发论文

题目： 微观水分和养分条件对铜绿假单胞菌噬菌体裂解宿主过程的影响
作者： 王燕，阮楚晋，谢文琳，朱堃，陈国炜，刘莹，王钢
收稿日期： 2022-01-07
网络首发日期： 2022-07-01
引用格式： 王燕，阮楚晋，谢文琳，朱堃，陈国炜，刘莹，王钢. 微观水分和养分条件对铜绿假单胞菌噬菌体裂解宿主过程的影响[J/OL]. 土壤学报.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1119.P.20220630.2221.002.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI: 10.11766/trxb202201070528

王燕, 阮楚晋, 谢文琳, 朱堃, 陈国炜, 刘莹, 王钢. 微观水分和养分条件对铜绿假单胞菌噬菌体裂解宿主过程的影响[J]. 土壤学报, 2022

WANG Yan, RUAN Chujin, XIE Wenlin, ZHU Kun, CHEN Guowei, LIU Ying, WANG Gang. Effects of Microscopic Water and Nutrient Conditions on the Host Lysis Process of *Pseudomonas aeruginosa* Phage[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022

微观水分和养分条件对铜绿假单胞菌噬菌体裂解宿主过程的影响*

王燕¹, 阮楚晋^{1,2}, 谢文琳¹, 朱堃¹, 陈国炜³, 刘莹¹,
王钢^{1†}

(1. 中国农业大学土地科学与技术学院, 北京 100083; 2. 瑞士联邦水科学与技术研究所, 杜本多夫 8600; 3. 合肥工业大学土木与水利工程学院, 合肥 230009)

摘要: 为研究不同水分和养分条件下细菌和噬菌体的生长和运移规律、细菌和噬菌体种群互作过程以及其对群落结构的影响和调控机制, 通过控制微生物运动平板表面相对水膜厚度研究铜绿假单胞菌 PAO1 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) 和铜绿假单胞菌噬菌体 PA-27-1 (*Pseudomonas aeruginosa* phage PA-27-1) 的互作过程。结果表明, 细菌和噬菌体的互作主要受噬菌体裂解细菌、细菌的运动和噬菌体扩散三个因素控制。水分通过调控多孔表面水膜的厚度和连通性来改变细菌在微孔尺度的运动, 进而影响微生物在粗糙界面的增殖和生物膜的形成过程以及菌落的形态特征, 同时通过影响噬菌体的扩散传播来调节细菌和噬菌体之间的互作机制。细菌与噬菌体自身运动性及个体大小上的不同也导致二者在微观孔隙中增殖(扩散)特征的差异。相对低水膜网络促进了细菌和噬菌体之间的空间隔离, 降低了噬菌体有效侵染细菌的概率, 从而有利于细菌的增殖。丰富的养分条件有利于细菌生物量的快速繁殖, 进而促进噬菌体的增殖。本研究揭示了环境生物膜等微生境中噬菌体和宿主细菌的生长和运移规律, 有助于为深入理解土壤噬菌体的时空分布特征与演变规律以及其与土壤细菌之间的互作模式提供理论基础和数据支撑。

关键词: 相对水膜厚度; 铜绿假单胞菌; 噬菌体; 空间自组织

中图分类号: S154.38⁺¹ 文献标志码: A

Effects of Microscopic Water and Nutrient Conditions on the Host Lysis Process of *Pseudomonas aeruginosa* Phage

WANG Yan¹, RUAN Chujin^{1,2}, XIE Wenlin¹, ZHU Kun¹, CHEN Guowei³, LIU Ying¹, WANG Gang^{1†}

(1. *Collage of Land Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100083, China*; 2. *Swiss Federal Institute for*

* 国家自然科学基金项目(41877412)、国家高层次青年人才项目(2016)和中国农业大学“2115”人才培育发展支持计划(1191-00109012)共同资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.41877412), the National Thousand (Youth) Talents Program of China 2016 and the Talents Training and Development Program “2115” of China Agricultural University (No.1191-00109012)

† 通讯作者 Corresponding author, Tel: 010-62734558; E-mail: gangwang@cau.edu.cn

作者简介: 王燕(1989—), 女, 陕西周至人, 博士后, 主要从事土壤微观水文物理条件对微生物生命过程的研究。E-mail: wangyan68@cau.edu.cn

收稿日期: 2022-01-07; 收到修改稿日期: 2022-04-07-

Abstract: 【Objective】 This study was designed to investigate the growth and migration of bacteria and phages under different water and nutrient conditions, as well as the process and mechanism of the interactions between bacteria and phages. 【Method】 Using the agar plate, the interaction of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Pseudomonas aeruginosa* phage PA-27-1 were performed. 【Result】 The coexistence of bacteria and phages is mainly affected by phase-induced lysis of bacteria, motility of bacteria and the diffusion of phages. Moisture regulated the relative water film thickness and connectivity on the porous surface of plates. It also affected the movement and proliferation of bacteria, the formation process of biofilms, and morphological characteristics of colonies on the porous interface. Additionally, it regulated the interaction mechanism between bacteria and phages by affecting the spread of phages. Different motility patterns and individual sizes between bacteria and phages also led to differences in their proliferation (diffusion) characteristics in micro-pores. Lower water film thickness and patchy distribution promoted the spatial isolation between bacteria and phages and reduced the probability of phage-reduced lysis, which was important for the proliferation of bacteria. 【Conclusion】 This study reveals the migration of phages and bacteria in micro-habitats like biofilm and provides a theoretical basis and data support for the temporal and spatial distribution of soil phages, as well as the interaction pattern between soil phages and soil bacteria.

Key words: Relative water film thickness; *Pseudomonas aeruginosa*; Phage; Spatial organization

病毒存在于地球上发现生命的任何地方，并在生物地球化学的元素循环和能量传递过程中发挥重要作用^[1]。土壤具有丰富的空间结构（比表面积达 $1 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ），与土壤各要素（水分、养分、空气和温度等）共同形成了土壤特有的复杂异质体，为土壤病毒和其他微生物的生命活动创造了多重生态位^[2]。土壤孔隙结构的不均一性和水分的动态变化时刻影响着养分以及病毒的时空分布与扩散运移，同时也影响着微生物的活动^[3]以及微生物与病毒之间的互作过程^[4]。噬菌体作为土壤病毒群落的主要组成，能够快速对特定宿主细菌物种的丰度变化作出响应，然后通过侵染和破坏宿主细胞释放出养分物质，从而影响养分循环^[5]。同时，噬菌体能够诱导宿主细胞间水平基因转移来驱动宿主微生物的进化^[6]；并通过病毒与宿主之间从个体到群落水平的错综复杂的相互作用关系来影响微生物的多样性和群落结构^[7-8]。因此，从微孔和个体细胞尺度剖析土壤微生物运移以及种群之间的互作过程，是深入理解土壤微生物生命形态与生态过程的关键。然而，土壤孔隙的时空异质性和复杂性对土壤微生物和噬菌体的研究尤其是原位观测构成巨大的挑战^[9]。

Wang 与 Or^[4]和 Dechesne 等^[10]通过室内实验结合模型模拟表明，细菌个体在微孔尺度的运动受与其自身半径相关的水膜厚度制约，其作用力主要包括自身推力、黏滞阻力和表面张力，且水膜厚度又可通过控制水分基质势调节。Dechesne 等^[11]利用多孔陶土构建了土壤粗糙界面微观模型，在模拟土壤微观物理结构的基础上通过控制粗糙界面的水基质势来调控其微观水分分布状态，实现了土壤微生物活动及种群互作过程的微观原位观测。Celik 等^[12]和 Crozed 等^[13]利用不同浓度琼脂平板控制相对水膜厚度来研究微观水分条件对单细胞运动及菌落拓殖过程的影响，发现相对水膜厚度影响细菌的趋化运动进而影响菌落分布形成带状形貌。因此，在病毒-宿主互作过程的研究中，可以引入不同浓度琼脂平板控制相对水膜厚度，并进行病毒-细菌互作的原位观测。

本研究以铜绿假单胞菌噬菌体和宿主细菌铜绿假单胞菌作为研究对象，利用微生物运动平板控制相对水膜厚度，研究不同水分和养分条件下细菌和噬菌体的生长与运移规律以及其对细菌-噬菌体互作过程的作用机制，为土壤噬菌体的时空分布特征与演变规律以及其与土壤细菌之间的互作模式提供理论基础和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验所用宿主细菌为铜绿假单胞菌 PAO1 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1), 并转入标记红色荧光蛋白 (RFP) 基因质粒, 使其在 561 nm 激发波长下能发出红色荧光。使用 Luria-Bertani (LB) 培养基^[14]培养和转接铜绿假单胞菌 PAO1, 于 28 °C 条件下培养 5 h 至对数生长期后置于 4 °C 短期储存备用。铜绿假单胞菌噬菌体为专一裂解性噬菌体 PA-27-1 (*Pseudomonas aeruginosa* phage PA-27-1)^[15]。该噬菌体分离自医院污水, 无囊膜, 属有尾病毒目, 直径约为 55 nm, 尾长约 30 nm, 尾宽约 7 nm, 其电镜图像见图 1。PA-27-1 潜伏期约 20 min, 培养 4 min 后有 98% 的噬菌体 PA-27-1 吸附于宿主细胞。以最佳感染复数 (MOI 为 0.000 1) 试验时, 裂解量为 164^[15]。噬菌体的扩繁方法为接种噬菌体 PA-27-1 至对数期的铜绿假单胞菌 PAO1 菌液中, 于 28 °C 条件下摇床 (180 r·min⁻¹, THZ-92B, Boxun) 培养 8 h。将培养液转移至离心机 (Centrifuge 5415D, Eppendorf) 中, 置于 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 分离宿主细菌, 上清液再通过 0.22 μm 微孔过滤器过滤, 获得新鲜的噬菌体 PA-27-1 悬液备用。

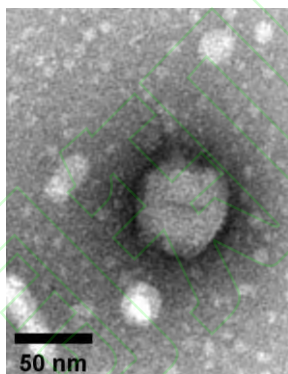


图 1 噬菌体 PA-27-1 的电镜图像

Fig. 1 The electron microscope observation of phage PA-27-1

1.2 琼脂表面相对水膜厚度测定

实验在可控温度和湿度的气候控制室 (长 6 m×宽 3 m×高 2.2 m, 中国农业大学资源与环境学院定制气候控制室) 中进行, 考虑到实验所用细菌和噬菌体在密闭琼脂表面生长扩散, 分别对 70% RH (Relative Humidity) 和 95% RH 下琼脂表面的相对水膜厚度进行记录。测定原理参考基恩士公司 (KEYENCE CORPORATION) 的工业激光共聚焦显微镜 (vk-x200k, KEYENCE, Japan) 的产品说明和前人实例^[16], 即共聚焦显微镜的共轭原理, 首先对焦平面的信息进行 Z 轴扫描, 然后将每层焦平面上的光强度数据转换为相应的高度值, 再将每层的高度值纪录和计算。实验以均一的玻璃纤维为参照物 (直径为 10 μm), 并将其轻轻平行于琼脂表面方向放置在三种琼脂浓度的平板表面, 平衡 30 min 后用共聚焦显微镜的轮廓模式记录 50X/0.95NA 物镜下玻璃纤维所在处的表面形貌, 分别记录至少 3 次。实验及计算原理如图 2。玻璃纤维直径减去水膜以上玻璃纤维高度即为相对水膜厚度。

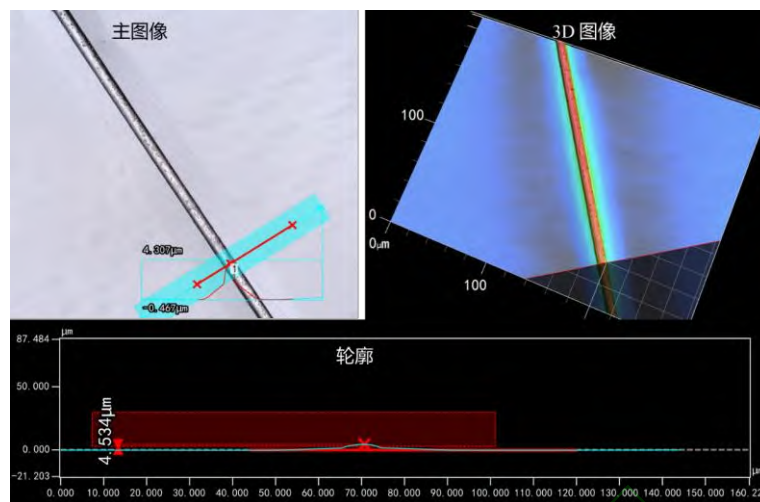


图 2 微观原位观琼脂表面相对水膜厚度及计算原理

Fig. 2 The theory and calculation of relative water film thickness on the agar surface

1.3 琼脂实验培养、观察及取样

菌株及培养基制备: 挑取新鲜活化的铜绿假单胞菌单菌接种于 LB 液体培养基中, 于 37 °C 条件下摇床 (180 r·min⁻¹, THZ-92B, Boxun) 培养 8 h。分别配制琼脂浓度 (重量比) 为 0.1%、0.2% 和 0.3% (即 100 mL 液体 LB 培养基中分别加入 0.1、0.2 和 0.3 g 琼脂粉)、养分浓度为 10% 和 100% 的 LB 培养基。10% LB 培养基的定义为胰蛋白胨和酵母粉的浓度为常规浓度的 10% (胰蛋白胨 1 g·L⁻¹, 酵母提取物 0.5 g·L⁻¹, 氯化钠 10 g·L⁻¹, pH 7.0)。其中, 琼脂浓度的设定参照文献中琼脂浓度的设定范围^[12]; 同时, 预实验结果表明, 在 0.1%~0.3% 琼脂浓度条件下, 铜绿假单胞菌最快可以在 48 h 培养时间内拓殖到整个培养皿, 因此实验培养时间统一设定为 48 h。初始养分浓度会影响宿主细菌的生长速率, 进而调节噬菌体和细菌之间的互作过程。通过设置初始养分浓度为 10% 和 100% 的 LB 培养基来观测初始养分浓度对宿主菌株的生长速率以及噬菌体对宿主细菌的侵染效率的影响。

细菌与噬菌体的接种: 如图 3 所示, 吸取上述培养 8 h 进入对数期的铜绿假单胞菌 PAO1 菌悬液 1 μL, 滴加至平板中央处, 每个水平设 3 组重复。另取同样数量的培养皿, 重复上述接种步骤, 待菌液接种完毕后, 吸取 1 μL PFU·mL⁻¹ (plaque-forming unit·mL⁻¹, 噬菌斑形成单位) 为 10⁹ 的 PA-27-1 溶液, 在与菌液接种点间隔 1 cm 处进行接种。接种后的试验样品置于 28 °C 培养箱中培养至 48 h。每间隔 8 h 取出观测、拍照和计算。

1.4 数据处理

近年来, IOD (Integrated optical density) 表征生物信息的方法被广泛应用于生物医学领域^[17]。本研究采用 Image Pro Plus 图像分析软件对显微镜观测的图片进行处理分析, 计算累积光密度值 IOD, 以表征不同处理下铜绿假单胞菌 PAO1 的生物量^[18-19]:

$$IOD_{(s)} = \sum OD(p, q) = am_{(s)}$$

式中, S 为某一选定部位所在的区域; OD 为光密度值; p、q 分别为 S 区域内各像素的横坐标和纵坐标, m 为该部位上阳性物质的总量; a 为系数。

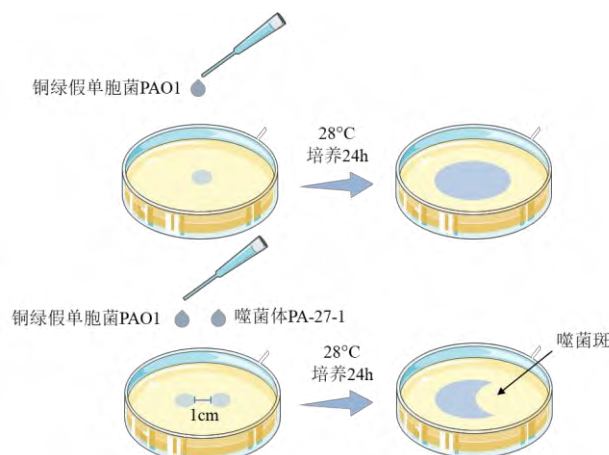


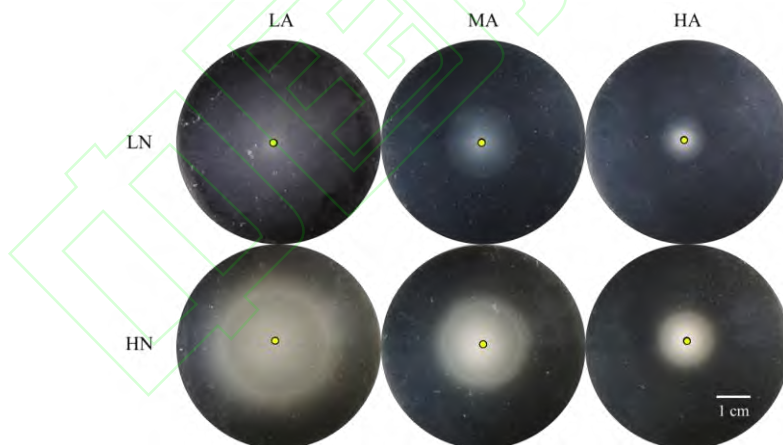
图 3 琼脂实验示意图

Fig. 3 Schematic diagram of agar experiment

2 结果

2.1 水分和养分对铜绿假单胞菌 PAO1 扩增速率和生物量的影响

在不同琼脂浓度和养分浓度下铜绿假单胞菌 PAO1 的生长和拓殖实验结果表明, 菌落半径随着培养时间呈现稳步上升趋势, 且不同条件下菌落半径的差异逐渐增大 (图 4)。培养 32 h 后, 铜绿假单胞菌 PAO1 在低琼脂浓度 (LA) 和高养分浓度 (HN) 条件下拓殖面积最大, 达 35.36 cm^2 , 扩散速率 $0.10 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ 。而在高琼脂浓度 (HA) 和低养分浓度 (LN) 条件下, 拓殖面积最小, 为 2.47 cm^2 , 扩散速率 $0.03 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ 。



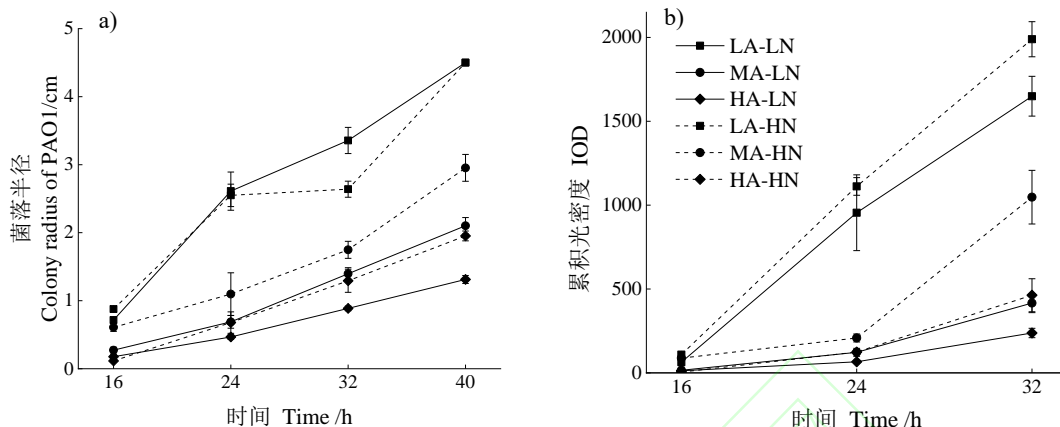
注: 黄圈为细菌接种点, LA 为 0.1% 琼脂浓度, MA 为 0.2% 琼脂浓度, HA 为 0.3% 琼脂浓度, LN 为低养分 (10% 的 LB 培养基), HN 为高养分 (100% 的 LB 培养基), 下同。Note: The yellow circle indicates the bacterial inoculation point. Different letters represent 0.1% agar concentration (LA), 0.2% agar concentration (MA), 0.3% agar concentration (HA), low nutrient (LN) and high nutrient (HN). The same below.

图 4 培养 32 h 后不同琼脂和养分浓度下铜绿假单胞菌 PAO1 生长情况

Fig. 4 The growth of PAO1 under different agar and nutrient concentrations after 32 hours of incubation

对在不同琼脂浓度和养分浓度下铜绿假单胞菌 PAO1 累积光密度值 IOD 进行计算 (计算方法为选定菌落区域内单个像素光密度值的累加), 以表征不同处理下铜绿假单胞菌 PAO1 的生物量 (图 5)。菌落累积光密度值随着培养时间呈现稳步上升趋势, 且不同条件下菌落

半径的差异逐渐增大。培养 32 h 后，铜绿假单胞菌 PAO1 在低琼脂浓度（LA）和高养分浓度（HN）条件下，累积光密度值 IOD 最大，达到 1 989.52。而在高琼脂浓度（HA）和低养分浓度（LN）条件下，累积光密度值 IOD 最小，为 238.10。

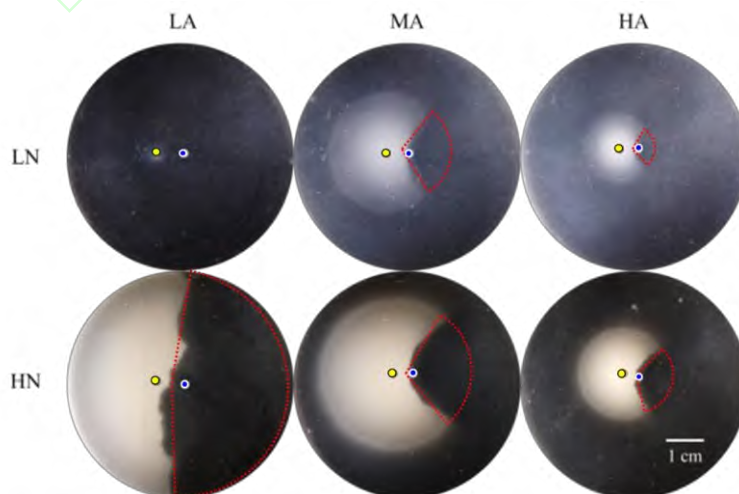


注：IOD 是菌落的累积光密度值，用于表征生物量。当细菌培养至 40 h 时，菌落的边缘已经到达培养皿的边缘，培养后期的菌落生长和 IOD 值无法观测，因此我们记录菌落半径为培养皿的半径，即 4.5 cm。Note: The calculation of IOD is the accumulation of the optical density value of the selected colony area, which was used to represent biomass. When the culture time was 40 h, the edge of the colony touched the inner wall of the petri dish, and the further increase and total IOD of the colony could not be observed, so the colony radius at this time was all recorded as 4.5 cm.

图 5 不同琼脂浓度和养分浓度下铜绿假单胞菌 PAO1 菌落半径 (a) 和累积光密度值 (b) 随时间变化情况
Fig. 5 Changes of colony radius (a) and IOD (b) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 with time under different agar and nutrient concentrations

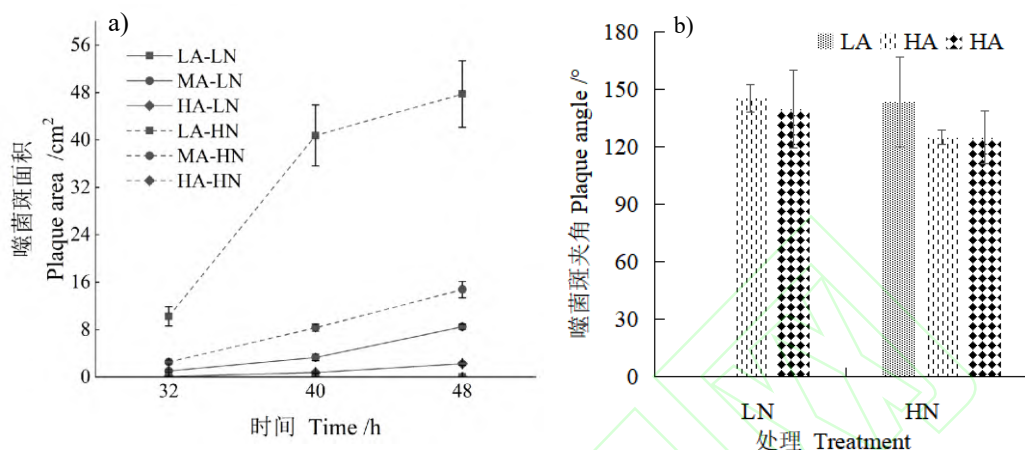
2.2 水分和养分对铜绿假单胞菌噬菌体 PA-27-1 噬菌斑形态特征的影响

在不同琼脂浓度和养分浓度下铜绿假单胞菌噬菌体 PA-27-1 的侵染实验表明，噬菌斑呈扇形，其面积随着培养时间呈现稳步上升趋势，且不同条件下噬菌斑面积的差异逐渐增大(图 6、图 7)。细菌拓殖至噬菌体接种点后发生侵染，培养 16 h 时观察到噬菌斑。培养 32 h 时，铜绿假单胞菌噬菌体 PA-27-1 在低琼脂浓度（LA）和高养分浓度（HN）条件下，噬菌斑面积最大，达到 10.22 cm²，占菌落面积的 29%。而在高琼脂浓度（HA）和低养分浓度（LN）条件下，拓殖面积最小，为 0.11 cm²，占菌落面积的 23%。而 PA-27-1 在低琼脂浓度（LA）和低养分浓度（LN）条件下未观测到噬菌斑。



注: 黄圈为细菌接种点, 蓝圈为噬菌体接种点, 红色虚线区域为噬菌斑。Note: The yellow circle indicates the bacterial inoculation point, the blue circle indicates the phage inoculation point, and the red dashed-line area represents the PA-27-1 plaque area.

图 6 培养 32 h 后不同琼脂和养分浓度下铜绿假单胞菌 PAO1 和铜绿假单胞菌噬菌体 PA-27-1 生长情况
Fig. 6 The growth of PAO1 and PA-27-1 under different agar and nutrient concentrations after 32 hours of incubation



注: 噬菌斑的面积通过菌落应占据的面积(菌落半径的平方和 π 的乘积)减去实际菌落面积得到。Note: The calculation method of plaque area is the area that should be occupied by the colony (the product of the square of the colony radius and π) minus the actual area of the colony.

图 7 不同琼脂浓度和养分浓度下 PA-27-1 噬菌斑面积随时间变化情况 (a) 和培养 32 h 时噬菌斑裂解夹角情况 (b)

Fig. 7 Changes in the diameter of PA-27-1 plaque area (a) and lysis angle of plaque when the incubation time is 32 h (b) under different agar and nutrient concentrations

2.3 不同琼脂浓度表面相对水膜厚度

不同琼脂浓度表面相对水膜厚度不同(图 8、表 1)。相同琼脂浓度下, 随着相对湿度的降低, 琼脂表面相对水膜厚度降低。相同相对湿度下, 琼脂表面相对水膜厚度随着琼脂浓度的增加而降低。相对湿度 95% 时, 0.1%~0.3% 的琼脂表面相对水膜厚度为 9.25~6.87 μm , 而相对湿度 70% 时, 0.1%~0.3% 的琼脂表面相对水膜厚度为 8.01~5.60 μm 。对相同湿度下不同浓度琼脂表面的相对水膜厚度进行单因素方差分析发现, 相对湿度 95% 时, 0.1% 和 0.2% 的琼脂表面相对水膜厚度差异不显著, 但与 0.3% 的琼脂表面相对水膜厚度差异显著 ($P<0.05$)。相对湿度 70% 时, 0.1% 与 0.2% 和 0.3% 的琼脂表面相对水膜厚度差异显著 ($P<0.05$), 但 0.2% 和 0.3% 的琼脂表面相对水膜厚度差异不显著。基于实验中细菌和噬菌体培养均在无菌且密闭的培养皿中进行, 以下培养实验的水分影响因素分析皆用相对湿度约 95% 相对水膜厚度, 实验条件皆为相对湿度约 95% 无菌密闭的培养皿。

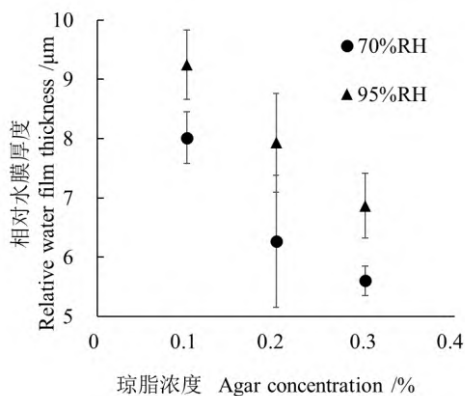


图 8 两种相对湿度下不同琼脂浓度表面相对水膜厚度变化

Fig. 8 Relative water film thickness of agar medium with different concentration under different humidity condition

表 1 不同琼脂表面相对水膜厚度及统计检验

Table 1 Relative water film thickness of agar medium measured by microscopy

琼脂浓度 Agar concentration	相对水膜厚度 Relative water film thickness (Mean±SD)	
	70%RH	95%RH
0.1%	8.01±0.43a	9.25±0.59a
0.2%	6.27±1.11b	7.93±0.83ab
0.3%	5.60±0.25b	6.87±0.54b

2.4 相对水膜厚度和养分对细菌和噬菌体运动及增殖的影响

对不同相对水膜厚度和养分下的菌落半径进行双因素方差分析(表 2), 其中菌落半径为因变量, 相对水膜厚度和养分为固定因子, 培养时间为协变量。发现相对水膜厚度的主效应显著 ($P=0.001$), 相对水膜厚度和养分的交互作用以及养分的主效应不显著(分别为 $P=0.335$ 和 $P=0.405$)。三个相对水膜厚度梯度的组内成对比较均具有显著差异。

表 2 PAO1 菌落半径双因素方差分析检验结果

Table 2 Dual-factor analysis results of PAO1 colony radius

差异来源 Source of variations	平方和 III Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F	P 值 P
模型 Calibration model	694.10	6	115.68	67.81	0.001
截距 Intercept	26.36	1	26.36	16.62	0.001
时间 Time	330.07	1	330.07	193.48	0.001
水分 Water condition	332.97	2	16.49	97.59	0.001
养分 Nutrient	1.59	1	1.59	0.93	0.335
交互 Water condition×Nutrient	3.10	2	1.55	0.91	0.405
误差 Error	305.37	179	1.71		
总计 Total	1 790.52	186			
矫正总计 Corrected total	999.46	185			

对不同相对水膜厚度和养分下的菌落累积光密度进行双因素方差分析(表 3), 其中累积光密度为因变量, 相对水膜厚度和养分为固定因子, 培养时间为协变量。发现相对水膜厚

度和养分各自的主效应均显著 ($P = 0.001$ 和 $P = 0.012$)，相对水膜厚度和养分的交互作用不显著 ($P = 0.617$)。对三个相对水膜厚度梯度进行组内成对比较，发现 0.1%琼脂浓度和 0.2%琼脂浓度具有显著差异 ($P = 0.001$)，0.1%和 0.3%琼脂浓度具有显著差异 ($P = 0.001$)，0.2%和 0.3%琼脂浓度不具有显著差异 ($P = 0.060$)。

表 3 PAO1 菌落累积光密度双因素方差分析检验结果

Table 3 Dual-factor analysis results of PAO1 colony accumulated optical density

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source of variations	III Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F	P
模型 Calibration model	19 968 756.50	6	3 328 126.09	40.12	0.001
截距 Intercept	1 378 457.37	1	1 378 457.37	16.62	0.001
时间 Time	8 677 077.34	1	8 677 077.34	104.61	0.001
水分 Water condition	9 652 825.40	2	4 826 412.70	58.19	0.001
养分 Nutrient	558 921.57	1	558 921.57	6.74	0.012
交互 Water condition×Nutrient	80 680.80	2	40 340.40	0.49	0.617
误差 Error	5 142 602.20	62	82 945.20		
总计 Total	42 337 200.46	69			
矫正总计 Corrected total	25 111 358.71	68			

对不同相对水膜厚度和养分下的噬菌斑面积进行双因素方差分析 (表 4)，其中噬菌斑面积为因变量，相对水膜厚度和养分为固定因子，培养时间为协变量。发现相对水膜厚度的主效应显著 ($P = 0.001$)，相对水膜厚度和养分的交互作用以及养分的主效应不显著 (分别为 $P = 0.477$ 和 $P = 0.166$)。上述分析表明，琼脂浓度能够控制噬菌体的扩散速度，导致不同相对水膜厚度条件下噬菌体侵染细菌能力的差异。

噬菌体与细菌的接触区域均呈现较为稳定的扇形，且不随着培养时间的增长而产生明显变化趋势。各处理下噬菌斑扇形裂解区域度数均在 $120^\circ \sim 160^\circ$ 范围内。对培养时间为 32 h 时不同相对水膜厚度和养分下的扇形裂解夹角进行双因素方差分析 (表 5)，其中扇形裂解夹角为因变量，相对水膜厚度和养分为固定因子，培养时间为协变量。发现养分的主效应和相对水膜厚度和养分的交互作用均显著 (分别为 $P = 0.001$ 和 $P = 0.050$)，相对水膜厚度的主效应不显著 ($P = 0.139$)。

表 4 PA-27-1 噬菌斑面积双因素方差分析检验结果

Table 4 Dual-factor analysis results of PA-27-1 plaque area

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source of variations	III Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F	P
模型 Calibration model	11 872.25	5	2 374.45	48.92	0.001
截距 Intercept	662.51	1	662.51	13.65	0.001
时间 Time	1 980.50	1	1 980.50	40.80	0.001
水分 Water condition	7 208.98	2	3 604.49	74.26	0.001
养分 Nutrient	95.66	1	95.66	1.97	0.166
交互 Water condition×Nutrient	24.86	1	24.86	0.51	0.477
误差 Error	2 766.86	57	48.54		

总计 Total	22 169.38	63
矫正总计 Corrected total	14 639.11	62

表 5 PA-27-1 噬菌斑裂解夹角双因素方差分析检验结果

Table 5 Bifactor analysis results of PA-27-1 plaque angle

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source of variations	III Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F	P
模型 Calibration model	3 813.79	5	762.76	5.02	0.001
截距 Intercept	39 019.68	1	39 019.68	257.01	0.001
时间 Time	854.10	1	854.10	5.63	0.021
水分 Water condition	620.65	2	310.33	2.04	0.139
养分 Nutrient	2 286.88	1	2 286.88	15.06	0.001
交互 Water condition*Nutrient	610.93	1	610.93	4.02	0.050
误差 Error	8 653.82	57	151.82		
总计 Total	1 271 593.65	63			
矫正总计 Corrected total	12 467.61	62			

3 讨论

本研究中, 选用红色荧光蛋白 (RFP) 标记的铜绿假单胞菌野生型 PAO1 和其专一性裂解噬菌体 PA-27-1, 利用不同相对水膜厚度的琼脂平板, 原位微观观测水分和养分条件对细菌及噬菌体的生长、运动及相互作用的影响, 探究噬菌体侵染细菌的过程及细菌-噬菌体共存影响因子。

在 0.1% ~ 0.3% 琼脂浓度下, 随着琼脂浓度的增加, 琼脂表面相对水膜厚度越薄。受琼脂分子链状结构的影响, 琼脂表面相对水膜并非界限分明的自由水, 而是符合吉布斯吸附曲线的存在浓度由培养皿底端向空气界面逐渐降为 0 的区域^[20]。实验测定的相对水膜厚度是可供细菌扩散的“等效水膜厚度”的最大可能, 实际宿主细胞和噬菌体生长和扩散的位点低于相对水膜的厚度。结果表明, 琼脂浓度主要通过控制其表面的相对水膜厚度进而控制细菌群落的拓殖速率。以相对水膜厚度为主导的水分能够改变细菌在孔隙尺度微小水膜表面运动时的受力 (自身推力、黏滞阻力和表面张力等) 从而影响细菌的拓殖^[4]。相对水膜越薄, 细菌种群的增殖面积和生物量越低。在相同的养分条件下, 细菌种群的增殖面积和生物量与相对水膜厚度成显著负相关。而在相同的琼脂浓度条件下, 养分浓度越高群落拓殖面积和噬菌斑面积越大, 这可能是由于噬菌体的生长依赖于宿主细胞, 当养分浓度较低时, 噬菌体复制所需要能量供给不足, 噬菌体的复制受到抑制, 从而影响噬菌体的生长和扩散。这一结果证实养分浓度通过控制细菌增殖进而影响噬菌体复制。

本研究还发现菌落边缘到达噬菌体接种点后, 噬菌体在接种点附近产生了扇形裂解区域, 其成因包括噬菌体裂解细菌、细菌的运动和噬菌体扩散三个因素。水分通过相对水膜厚度影响细菌的运动速率, 进而影响细菌的扩增面积和生物量, 而细菌的扩增面积和生物量是噬菌体的扩散及复制能力的基础。尽管培养平板中养分相对均匀, 但在细胞尺度, 细菌在生长过程中消耗周围养分, 细菌拓殖区与其附近细菌未拓殖到的区域形成养分梯度, 这促进了细菌在平行于平板方向上的定向运动, 该结论在前人报导中已有证实^[21-22]。而噬菌体无法自行移

动,当噬菌体侵染细菌后,被感染的细菌依然沿着菌落半径方向朝菌落外的高营养区域进行运动,这在一定程度上促进了噬菌体的空间传播与裂解。这种独特的裂解形状在先前的文献中也已有报道^[23]。此外,也有许多试验证明了空间因素和细菌与噬菌体自身运动性及个体大小上的不同也对微生物群落中具有相互作用的物种的共存具有重要作用^[23-25]。裂解过程中产生的平滑边界很有可能是细菌和噬菌体共存和共同繁殖的明显标志。

此外,本文引入水基质势来控制相对水膜厚度,通过原位观测病毒-细菌互作来揭示土壤基质中噬菌体与细菌的时空分布特征与演变规律。然而琼脂表面相对土壤寡营养界面养分充足,琼脂表面生物量相比土壤界面高,但在相对水膜厚度较低的微米尺度下噬菌体的分布、扩散随其宿主的影响这一结论在土壤中依然适用,尤其有助于揭示微米尺度环境生物膜(如土壤,水)生境中噬菌体及宿主的迁移规律。后期仍需大量工作来准确揭示土壤微环境中噬菌体与细菌的真实时空分布特征与演变规律。

4 结论

细菌与噬菌体自身运动性以及噬菌体对宿主细菌的依赖性导致二者在微观孔隙中运动(扩散)特征的差异。丰富的养分条件有利于细菌生物量的快速繁殖,进而促进噬菌体的增殖。此外,噬菌斑呈现扇形裂解区域,且其形状与养分浓度相关性不大。扇形裂解区域的形成可能与边界处噬菌体和细菌的内在生物学特性(细菌的增殖速率、噬菌体的侵染速率、细菌运动性和细菌趋化性)之间维持平衡有关。本研究还发现细菌和噬菌体的共存主要受到水分条件的影响。水分能够调控微孔尺度的相对水膜厚度,进而影响微生物在多孔界面的运动、增殖、生物膜的形成以及菌落的形态特征,同时通过影响噬菌体的扩散传播来调节细菌和噬菌体之间的互作过程及共存状态。相对低水膜条件下孤立的水膜网络促进了细菌和噬菌体之间的空间隔离,降低了噬菌体有效侵染细菌的概率,从而有利于细菌的增殖。这一结果为环境生态系统中微生物群落多样性的存在提供了理论支撑。

参考文献 (References)

- [1] Trubl G, Jang H B, Roux S, et al. Soil viruses are underexplored players in ecosystem carbon processing[J]. *mSystems*, 2018, 3(5): e00076-18
- [2] Wilpiszeski R L, Aufrecht J A, Retterer S T, et al. Soil aggregate microbial communities: Towards understanding microbiome interactions at biologically relevant scales[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(14): e00324-19.
- [3] Han M, Ruan C J, Han Z, et al. Spatial organization patterns: rules of “game” for microbial community assembly[J]. *Microbiology China*, 2022, DOI: 10.13344/j.microbiol.china.220149. [韩苗, 阮楚晋, 韩峥, 等. 空间组织模式: 微生物群落组装的“游戏”规则[J]. *微生物学通报*, 2022, DOI: 10.13344/j.microbiol.china.220149.]
- [4] Wang G, Or D. Aqueous films limit bacterial cell motility and colony expansion on partially saturated rough surfaces[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1363-1373.
- [5] Kuzakov Y, Blagodatskaya E. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 83: 184-199.
- [6] Jin M, Guo X, Zhang R, et al. Diversities and potential biogeochemical impacts of mangrove soil viruses[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 58.
- [7] Lourenur M, de Sordi L, Debarbieux L. The diversity of bacterial lifestyles hampers bacteriophage tenacity[J]. *Viruses*, 2018, 10(6): 327.
- [8] Wu H Q, Ruan C J, Wan W, et al. Progress of functional genes related to soil nitrogen cycling based on knowledge mapping[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, DOI: 10.11766/trxb202110270580. [吴汉卿, 阮楚晋, 万炜, 等. 基于知识图谱分析的土壤氮循环功能

基因研究进展[J]. 土壤学报, 2022, DOI: 10.11766/trxb202110270580.]

- [9] Mitarai N, Brown S, Sneppen K. Population dynamics of phage and bacteria in spatially structured habitats using phage λ and *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(12): 1783-1793.
- [10] Dechesne A, Wang G, GA, W G, et al. Hydration-controlled bacterial motility and dispersal on surfaces[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(32): 14369-14372.
- [11] Dechesne A, Or D, Gülez G, et al. The porous surface model, a novel experimental system for online quantitative observation of microbial processes under unsaturated conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5195-5200.
- [12] Celik Ozgen V, Kong W T, Blanchard A E, et al. Spatial interference scale as a determinant of microbial range expansion[J]. Science Advances, 2018, 4(11): eaau0695.
- [13] Croze O A, Ferguson G P, Cates M E, et al. Migration of chemotactic bacteria in soft agar: Role of gel concentration[J]. Biophysical Journal, 2011, 101(3): 525-534.
- [14] Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1951, 62(3): 293-300.
- [15] Wu L, Luo J, Yang Z L, et al. Isolation and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PA-27-1[J]. Journal of Third Military Medical University, 2019, 41(4): 315-322. [吴柳, 罗娟, 杨竹兰, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体PA-27-1的分离及其生物学特性[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(4): 315-322.]
- [16] Lazouskaya V, Sun T Z, Liu L, et al. Effect of surface properties on colloid retention on natural and surrogate produce surfaces[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(12): E2956-E2965.
- [17] Loncoñanco E, Navarrete F, Cuevas N, et al. Integrated optical density analysis of the immunohistochemical expression of the progesterone receptor in the uterine endometrium of prepubertal araucana sheep[J]. International Journal of Morphology, 2021, 39(5): 1278-1282.
- [18] Tang Y F. The origin and physical meaning of the optical density[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 1997, 14(3): 179-181, 170. [汤耀法. 光密度的由来及其物理意义[J]. 中国医学物理学杂志, 1997, 14(3): 179-181, 170.]
- [19] Myers J A, Curtis B S, Curtis W R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density[J]. BMC Biophysics, 2013, 6(1): 4.
- [20] Sun L, Peng C J, Liu H L, et al. Monte Carlo simulation of adsorption of random copolymers at solid-liquid interface[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering: China, 2006, 57(5): 1048-1054. [孙蕾, 彭昌军, 刘洪来, 等. Monte Carlo模拟随机共聚高分子在固/液界面的吸附行为[J]. 化工学报, 2006, 57(5): 1048-1054.]
- [21] Anwar M N, Li Z F, Gong Y, et al. Omics studies revealed the factors involved in the formation of colony boundary in *Myxococcus xanthus*[J]. Cells, 2019, 8(6): 530.
- [22] Koster D A, Mayo A, Bren A, et al. Surface growth of a motile bacterial population resembles growth in a chemostat[J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 424(3/4): 180-191.
- [23] Li X C, Gonzalez F, Esteves N, et al. Formation of phage lysis patterns and implications on co-propagation of phages and motile host bacteria[J]. PLoS Computational Biology, 2020, 16(3): e1007236.
- [24] Blanchard A E, Celik V, Lu T. Extinction, coexistence, and localized patterns of a bacterial population with contact-dependent inhibition[J]. BMC Systems Biology, 2014, 8: 23.
- [25] Wang G, Or D. Trophic interactions induce spatial self-organization of microbial consortia on rough surfaces[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 6757.

(责任编辑: 卢萍)