

曾祥朋,杨清香.噬菌体在环境耐药基因转移中的作用综述[J].江苏农业科学,2019,47(7):14-18.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.004

噬菌体在环境耐药基因转移中的作用综述

曾祥朋¹,杨清香^{1,2}

(1.河南师范大学生命科学学院,河南新乡 453007; 2.河南省高校资源微生物与功能分子重点实验室,河南新乡 453007)

摘要:耐药细菌随着畜禽粪便排出体外后,其携带的耐药基因可以通过质粒、转座子、整合子等可移动元件传递给其他环境微生物,从而导致耐药基因的传播和扩散。目前对耐药基因转移机制的研究多集中在质粒、转座子、整合子等,对噬菌体在耐药基因传播中的贡献了解甚少。在河流、海洋、污水等自然环境中通过噬菌体转导机制进行基因转移已经被证实,噬菌体作为可移动元件在基因转移和基因重组中的作用频率比人们预想的要高。为了能正确认识噬菌体在畜禽粪便抗生素耐药基因水平传播中的作用,结合国内外相关研究,介绍环境噬菌体的特性及其生态分布、环境噬菌体携带耐药基因情况、噬菌体介导的基因转移机制以及噬菌体在抗生素耐药基因传播中的作用,以期了解环境噬菌体在耐药基因水平转移中的作用提供参考。

关键词:抗生素耐药基因;基因水平转移;噬菌体;转导;介导;基因转移机制

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)07-0014-05

近几十年来,为了提高畜禽生长速度,抗生素在畜禽养殖业中被大量应用。报道显示,我国抗生素年产量约 2 万 t, 46.1% 用于畜禽养殖业,其中近一半用于动物生长促进剂^[1]。抗生素的使用改变了养殖动物肠道微生物的耐药特性,同时也促进了肠道微生物耐药性的进化。Loof 等对生猪饲料同时添加 100 g/t 金霉素、100 g/t 磺胺甲噁唑、50 g/t 青霉素,随着时间的延长猪的肠道微生物群落结构发生变化,所施加抗生素的耐药基因丰度也有所增加^[2]。Zhu 等的研究表明,动物饲料和治疗用药使得 63 种耐药基因富集了 192 ~ 28 000 倍^[3]。长期使用抗生素而形成的选择压力,使得耐药细菌逐渐被筛选出,随着粪便排出体外^[4]。目前,畜禽粪便已经成为自然环境中耐药细菌和耐药基因的储存库^[5]。耐药基因是细菌表现耐药性的根本原因,耐药细菌随着畜禽粪便排出体外后,其携带的耐药基因可以通过质粒、转座子、整

合子等可移动元件传递给其他环境微生物,从而导致耐药基因的传播和扩散^[6]。因此,当含有耐药细菌和耐药基因的粪便进入自然环境后,在高丰度耐药基因、可移动元件及其他环境压力共存的情况下,环境中的敏感细菌可能会因此产生抗生素耐药性,若人类致病菌通过这种方式获得多重耐药性,则会对人类健康造成巨大危害^[7]。

目前,关于畜禽粪便中耐药细菌和耐药基因的污染问题已经得到广泛关注,但是对其耐药基因转移机制的研究多集中在质粒、转座子、整合子等,对噬菌体在耐药基因传播中的贡献了解甚少^[8-9]。近年来噬菌体在河流、海洋、污水等自然环境中通过转导进行基因转移已经被证实^[10],噬菌体作为可移动元件在基因转移和基因重组中的作用频率比人们预想的要高^[11-12]。

本文将总结近些年环境噬菌体研究的重要进展,介绍环境噬菌体的特性及其生态分布、环境噬菌体携带耐药基因情况、噬菌体介导的基因转移机制以及噬菌体在抗生素耐药基因传播中的研究方法,以期全面了解环境噬菌体在耐药基因水平转移中的作用提供参考。

1 环境噬菌体的特性及其生态分布

噬菌体是原核微生物病毒。噬菌体基因组由单链或双链

收稿日期:2017-11-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:21477035)。

作者简介:曾祥朋(1990—),男,河南濮阳人,硕士研究生,主要从事环境微生物研究。E-mail:yougujimo@163.com。

通信作者:杨清香,博士,教授,主要从事资源与环境微生物学研究。E-mail:yangqx@hut.edu.cn。

[26] Kim H U, Lee K R, Jung S J, et al. Senescence-inducible *LEC2* enhances triacylglycerol accumulation in leaves without negatively affecting plant growth [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13 (9): 1346-1359.

[27] 刘长斌,佟少明,张文蕾,等.拟南芥 *Leafy Cotyledon 2* 的表达提高了小球藻 *Chlorella sorokiniana* 的油脂含量[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(6): 1037-1045.

[28] Ramli U S, Baker D S, Quant P A, et al. Control analysis of lipid biosynthesis in tissue cultures from oil crops shows that flux control is shared between fatty acid synthesis and lipid assembly [J]. *Biochemical Journal*, 2002, 364(2): 393-401.

[29] Greenwell H C, Laurens L M, Shields R J, et al. Placing microalgae

on the biofuels priority list: a review of the technological challenges [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, 7(46): 703-726.

[30] 苗迎春,雷洁,牛蕾蕾,等.提高植物营养器官含油量的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(1): 1-5.

[31] Kondo H, Shiratsuchi K, Yoshimoto T, et al. Acetyl-CoA carboxylase from *Escherichia coli*: gene organization and nucleotide sequence of the biotin carboxylase subunit [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88: 9730-9733.

[32] Li S J, Cronan J E Jr. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(2): 855-863.

的 DNA 或 RNA 组成,大小从几个 kb 到 100 kb 不等。根据对宿主菌作用效果不同,将噬菌体分为两大类,即温和噬菌体和烈性噬菌体。

噬菌体是生物圈中丰度最高的生物体,据估计总体数量可达 $10^{30} \sim 10^{32}$ 个。在对海洋、淡水和土壤环境中的噬菌体生态研究表明,噬菌体是自然界微生物系统的重要组分,平均每个细菌细胞约有 10 个噬菌体^[12]。噬菌体在海洋中的数量极其丰富,丰度高达 10^{30} 个,表层海水中噬菌体丰度约为 10^7 个/mL,是细菌数量的 5 ~ 25 倍^[14]。人和动物体内也有高浓度的噬菌体,主要存在于肠道中,它们被认为是动物体内最重要的生物群落^[15]。由于噬菌体在水和陆地生态系统中具有极高的丰度和变化性,因此可以通过特异性侵染、基因水平转移、溶源转换等方式影响细菌群落,并且在有机物质释放、营养循环和水生态系统的功能等方面起着重要作用^[16]。噬菌体对微生物群落构成的强大的捕食压力意味着细菌能否好好生存不仅取决于可利用的资源,而且取决于生物环境。因此,噬菌体能够不断地调节微生物生态和活性,包括营养流食物网动力学、微生物多样性及多样化趋势^[17]。

噬菌体在污水处理系统中也普遍存在。研究表明,活性污泥中噬菌体的数量为 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL,该数量与大多数其他水生生态系统相比较高或相当。由于噬菌体对其宿主菌具有特异性的侵染和裂解作用,因此,人们利用噬菌体控制污泥产生以达到污泥减量的目的。Hao 等将活性污泥 2D 号模型进一步发展并研究了污水处理系统中原生动物的捕食和噬菌体的侵染对污泥减量的贡献,结果表明,捕食作用在污泥减量控制方面更有效,捕食和噬菌体的侵染对污泥减量最大贡献率分别达 21%、9%^[18]。

一般来说噬菌体有宿主专一性,1 株噬菌体只能侵染 1 个宿主。但是环境中也存在一些噬菌体不仅能侵染同种不同株的细菌,还能够侵染分类群完全不同的细菌,甚至能够侵染革兰氏染色完全不同的细菌类群,例如, Khan 等从活性污泥中分离出 8 株噬菌体,其中 6 株均为宽宿主噬菌体,这就使噬菌体-细菌的相互作用关系更加复杂^[19]。一方面噬菌体通过转导可以传递相关基因给宿主菌并有利于宿主菌的生存,

另一方面噬菌体侵染并裂解细菌,使宿主菌产生对噬菌体的抗性,噬菌体-细菌可以说是在对抗中共进化^[20]。环境中数量如此巨大的噬菌体到底有什么作用,在细菌群落发展和演化中起什么作用,目前并不清楚,因此,有关噬菌体和细菌群落的相互关系研究是目前微生物生态学的重要课题。而耐药细菌群落在环境中的发展和演化是噬菌体群落研究的很好对象,因此有关噬菌体在耐药转移中的作用研究逐渐成为该领域的热点。

2 噬菌体介导基因转移机制

噬菌体介导细菌间基因转移的方式为特异性转导或普遍性转导。噬菌体在宿主菌体内组装过程中可能产生 2 种类型的子代病毒颗粒,一种为只包含病毒 DNA 的颗粒,一种为误包进宿主 DNA 片段的颗粒。误包有宿主 DNA 的病毒颗粒感染新的宿主后可将所携带的 DNA 导入受体细胞,通过同源重组形成转导子,使受体菌获得新的基因。此种方式可传递供体细菌任何基因,由烈性噬菌体或温和噬菌体介导,称之为普遍性转导。噬菌体只能传递供体染色体上原噬菌体整合位置附近的基因转导称之为特异性转导,由温和噬菌体介导。

与转导相似但本质不同的另一现象为溶源性转换,当温和型噬菌体感染宿主细菌时,噬菌体 DNA 整合到宿主菌染色体上,使其成为溶源性状态并获得特有的性状,如对同源噬菌体的免疫性和可诱导性。通过溶源性转换还可使宿主菌表型发生改变,获得或丧失某一性状。在 DNA 几种转移机制中,由噬菌体引起的溶源性转变更占优势,且效率更高^[7]。虽然以上几种转移机制在自然条件下发生的频率并不高,但也为基因的转移提供了一个途径。

3 环境噬菌体携带耐药基因情况

噬菌体 DNA 上携带耐药基因已经成为一个不争的事实,目前,各类水体如城市污水处理厂、活性污泥、河流、医院废水、养殖废水、屠宰场废水等均被检测,已检测到的耐药基因种类基本涵盖各种常用抗生素,例如 β -内酰胺类、喹诺酮类、四环素类、甲氧西林、磺胺类等,具体见表 1。

表 1 不同环境样品中噬菌体携带的耐药基因

样品来源	检测手段	耐药基因种类或机制	参考文献
河流、城市污水、屠宰场废水	qPCR	<i>blaTEM</i> 、 <i>blaCTX</i> -M、 <i>qnrA</i> 、 <i>qnrS</i> 、 <i>mecA</i>	[21]
活性污泥	宏基因组	四环素、氨基青霉素、外排泵机制	[12]
河流、城市污水、养殖污水	qPCR	<i>qnrA</i> 、 <i>qnrS</i>	[22]
污水处理厂、医院	qPCR	<i>blaCTX</i> -M、 <i>blaSHV</i> 、 <i>blaTEM</i> 、 <i>qnrA</i> 、 <i>qnrB</i> 、 <i>qnrS</i>	[23]
猪、家禽、牛的排泄物废水及屠宰场	qPCR	<i>blaTEM</i> 、 <i>blaCTX</i> -M、 <i>mecA</i>	[24]
城市污水	qPCR	<i>blaTEM</i> 、 <i>blaCTX</i> -M、 <i>sulI</i>	[25]
厌氧消化后的活性污泥	qPCR	<i>blaTEM</i> 、 <i>blaCTX</i> -M、 <i>qnrA</i> 、 <i>qnrS</i> 、 <i>sulI</i>	[26]

作为噬菌体储存库的土壤环境目前也已被研究。Ross 等利用 qPCR 手段检测土壤中细菌和噬菌体 DNA 上所携带耐药基因的情况,共对 *strA*、*strB*、*sulI*、*aadA*、*blaOXA-20* 等 5 对耐药基因进行检测,结果显示所有的耐药基因均在选用的样品中检出^[27]。施用未经处理、厌氧消化处理、脱水处理肥料的土壤中细菌 DNA 中耐药基因丰度有所增加,但是施用经堆肥处理的粪便土壤中耐药基因丰度有所降低,这就表明堆肥处理显著降低了携带耐药基因细菌的数量,致使检测结果中耐药基因丰度降低。但是噬菌体 DNA 上的耐药基因丰度

在各个土壤样品中基本持平。这就说明噬菌体作为基因的载体在自然环境中相对其宿主菌来说更加稳定。

除了环境样品,人体粪便样品中的噬菌体 DNA 也被检测到耐药基因的存在。Minot 等对人类粪便样品做病毒宏基因组分析,测序结果主要为噬菌体基因组信息^[28]。Liu 等利用 ARDB 对测序结果进行耐药基因分析,在基因组中找到万古霉素类、四环素类、 β -内酰胺类等耐药基因^[29]。除了利用宏基因组对噬菌体基因组进行研究,目前对噬菌体 DNA 的耐药基因检测主要利用的手段为荧光定量 PCR (qPCR)。Quirós

等研究了 80 个人类粪便样品中噬菌体 DNA 上耐药基因携带情况,80 个研究个体在研究期间均未使用抗生素,用 qPCR 的方法检测了 *blaTEM*、*blaCTX-M-1*、*mecA*、*armA*、*qnrA*、*qnrS* 等基因的丰度,结果显示,77% 的样品中至少被检测到 1 种或多种抗生素耐药基因,其中 *blaTEM*、*qnrA*、*blaCTX-M-1* 等是丰度最高的耐药基因^[9]。

噬菌体是细菌适应不同环境的一个潜在遗传基因库,是细菌维持自身群落稳定的重要因素。Modi 等让小鼠口服环丙沙星和氨苄青霉素,研究在抗生素选择压力下噬菌体和细菌如何变化,在抗生素的作用下,噬菌体基因组上编码大环内酯类和 β -内酰胺类耐药基因增多,同时还出现了与环丙沙星和氨苄青霉素无关的其他耐药基因;从口服抗生素和对照的小鼠体内分离噬菌体与细菌群落共培养,与口服抗生素小鼠体内分离的噬菌体共培养的细菌耐药比例相比对照增加 2~3 倍;抗生素的选择压力促进了噬菌体和细菌间的基因交流,噬菌体可以通过基因交换改变宿主菌的抗药表型以适应环境保证其群落的稳定,细菌群落的稳定又保证了噬菌体的正常繁殖^[30]。

尽管在噬菌体 DNA 上检测到耐药基因的存在,在一些菌株之间噬菌体也可以成功介导耐药基因的转移,然而,目前有关噬菌体在这种传播中的证据还非常有限。传统的观点认为噬菌体基因组很少编码耐药基因。噬菌体在耐药基因传播中是否发挥作用还存在争论,还没有一个完全公认的结论。Enault 等的研究结果^[31]可以说是对目前大多数研究的一个巨大反击,他们采用生物信息学的方法评估了 1 181 株噬菌体基因组耐药基因存在情况,结果表明,大多数噬菌体基因组中的耐药基因与实际的耐药基因的同源性很低,或者检测到的耐药基因实际上是没有耐药活性的,而目前大多数报道的噬菌体耐药基因普遍被明显高估。这就是说噬菌体在耐药基因传播中的作用很可能被普遍高估。

4 噬菌体在抗生素耐药基因传播中的作用

噬菌体介导基因转移的传统研究手段是利用选择性培养基对转导子进行筛选,可以直观表征转导结果,例如,Fard 等以鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*) 和粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 为宿主菌分离了 3 株噬菌体进行转导试验,从基因型和表型对转导后的受体菌进行耐药性评估,结果显示,在噬菌体介导作用下,四环素抗性由鹌鸡肠球菌成功传递给了粪肠球菌;庆大霉素抗性由粪肠球菌成功传递给屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、海氏肠球菌 (*Enterococcus hirae*)、耐久肠球菌 (*Enterococcus durans*)、酪黄肠球菌 (*Enterococcus casseliflavus*) 等,虽然转移频率不高,但是也为耐药基因的转移提供了一个途径,证明噬菌体在肠球菌抗生素耐药转移中发挥了一定作用^[32]。但是这种方法依赖于转移基因的高频率表达,不能对细菌-噬菌体间基因流动的具体方向做定量描述,更不能在单细胞水平研究基因的交换重组情况。

Hease 等将 PCR 的高灵敏度与荧光原位杂交技术对细胞精确定位及形态学分析技术相结合,建立了原位 PCR^[33],该方法首先对细胞预处理使细胞具有适当通透性并保持完整;然后 PCR 各反应物进入细胞并在细胞内扩增目的基因片段,利用荧光分子标记的 dNTP 和引物在扩增同时或者扩增后利用 DNA 分子杂交和免疫细胞化学技术等,使扩增产物带上荧

光信号并在细胞内原位停留;最后用荧光显微镜检测目的基因。原位 PCR 技术可以在组织切片、细胞等样品中检测低拷贝的 DNA 或 RNA,并在形态学上精确定位,通过揭示细胞内低拷贝基因的分布,可对病毒感染、基因突变、基因重排、基因低水平表达等进行深入研究。原位 PCR 为噬菌体-细菌间基因流动提供一个直观的检测手段。Hease 等利用原位 PCR 成功扩增检测到真核细胞中 Visna 病毒的 DNA^[33]。Kenzaka 等利用与原位 PCR 原理相同方法即循环引物介导的原位标记-荧光原位杂交 (cycling primed in situ amplification-fluorescent in situ hybridization,简称 CPRINS-FISH) 精确研究噬菌体介导的氨苄青霉素耐药基因在大肠杆菌细胞间的转移频率,以噬菌体 P1、T4、EC10 等作为转移工具直接计数,结果显示其基因转移频率分别为 10^{-8} ~ 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-9} ~ 10^{-8} ; CPRINS-FISH 检测结果显示其转移频率均在 10^{-4} ~ 10^{-3} 之间;直接计数和 CPRINS-FISH 检测结果均表明,超过 20% 的受体菌携带供体菌的基因并发挥一定的生理功能^[34]。2010 年,Kenzaka 等用相同方法再次证明噬菌体在细菌基因交换中发挥着重要作用^[35]。噬菌体传递基因给其宿主菌以利于宿主适应不同的环境,从而促进自己的生存和增殖。这种基因交换表明噬菌体在其宿主适应不同环境压力中发挥重要作用。

由噬菌体介导的水平转移频率一般在 10^{-10} ~ 10^{-2} 之间,但转移频率与环境生化特征、受体菌及噬菌体本身特性相关。Medaniel 等对沿海地域和海洋的最新研究得出了较高的转导频率,可达 10^{-3} ~ 10^{-1} ^[36]。

噬菌体所介导的耐药基因转移可以发生在同种不同菌株之间,也可以发生在不同种细菌之间,报道最多的是大肠杆菌的不同菌株之间,以及鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 的不同菌株之间,详见表 2。Beumer 等研究发现,在宽宿主噬菌体 D3112、UT1、SN-T 中均检测到 16S rRNA 基因的存在,这就表明噬菌体和宿主菌存在活跃的基因交流^[37]。

5 噬菌体在耐药基因转移中的作用展望

在不同环境的噬菌体 DNA 上检测到不同抗生素耐药基因的事实让我们不得不思考,噬菌体在耐药基因的起源和传播中扮演着怎样的角色。噬菌体 DNA 上携带耐药基因,这就为噬菌体传播耐药基因提供了物质基础。携带有耐药基因的噬菌体随着人类或动物的粪便排放到环境中,生物体和环境之间定然有一个噬菌体循环,这些没有被人发现的噬菌体附着在食物或存在于水体中。当进入肠道中遇到合适的宿主菌,噬菌体便可通过转导实现耐药基因的转移,获得耐药基因的宿主菌在抗生素选择压力的作用下成为优势种群。噬菌体在耐药基因传播中的作用主要建立在如下推测:首先,噬菌体 DNA 上检测到不同种类的抗生素耐药基因,可能是一个潜在的耐药基因库;其次,相比宿主菌来说,不管温和噬菌体或烈性噬菌体其在水环境中存活能力更强^[46];最后,由于噬菌体的结构优势,其在环境中的活力优于游离的 DNA,如线性 DNA 片段或质粒^[47],因此,借助噬菌体的主动侵染活性,应该比转化所介导的基因转移更具有优越性。另一方面,由于目前报道的宽宿主噬菌体的存在,使它们在环境中的适应性更强,相比接合作用所介导的基因转移来说也有更多的机会在不同种属细菌之间进行基因交换。然而 Enault 等的研究

表 2 噬菌体介导的耐药基因转移

供体菌	受体菌	噬菌体	耐药基因	参考文献
鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. Typhimurium</i> DT104)	鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. Typhimurium</i> DT16)	PDT17、ES18	PDT17: <i>amp</i> 、 <i>cam</i> ; ES18: <i>amp</i> 、 <i>cam</i> 、 <i>tet</i>	[38]
大肠杆菌(<i>E. coli</i> B834/HMS174)	大肠杆菌(<i>E. coli</i> BE)	T 偶数噬菌体(RB42/RB43/RB49)	<i>amp</i> 、 <i>tet</i>	[39]
大肠杆菌(<i>E. coli</i> NBRC 12713 KEN1)	大肠杆菌(<i>E. coli</i> C600RK2/HB101/NBRC 12713/W3110)	EC10	<i>bla</i>	[40]
海德堡沙门菌(<i>S. heidelberg</i> S25)	鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. Typhimurium</i> MZ1262)	噬菌体 P24	<i>bla</i> CMY-2、 <i>tet</i> (A)/ <i>tet</i> (B)	[41]
大肠杆菌(<i>E. coli</i> CFT073 WAM3686)	大肠杆菌(<i>E. coli</i> CFT073 WAM2909)	噬菌体(8EB49/8EB47/8EB32/8EB5)	<i>kan</i>	[42]
大肠杆菌(<i>E. coli</i> O157:H7 EDL933)	大肠杆菌(<i>E. coli</i> K12 AB1157)	噬菌体(933W)	<i>tet</i>	[43]
鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. Typhimurium</i> DT104NCTC13348)	鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. Typhimurium</i> DT104 BBS 1012)	噬菌体(卡巴多司诱导)	转导: <i>tetG</i> ; 共转导: <i>floR</i> / <i>bla</i> / <i>pse</i> -1	[44]
鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. Typhimurium</i> DT120BBS 1162/BBS 1170)	鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. Typhimurium</i> BBS 243)	噬菌体(氟喹诺酮诱导)	<i>kan</i>	[45]

结果^[31]也值得关注,噬菌体基因组上很少携带耐药基因或者所携带的与目前已知的耐药基因具有相似性的片段没有活性,那么噬菌体到底如何介导基因转移呢?关于噬菌体在耐药基因所有的结论似乎都太早,须要更多的研究数据来证明。

环境噬菌体宏基因组研究结果显示,大多数噬菌体的开放阅读框(open reading frames,简称 ORF)与 GenBank 数据库中的已知基因序列无明显相似性,例如,Breitbart 等对海水和海底沉积物进行测序,结果显示,样品中出现约 65% 的新序列^[47]。Rohwer 在文章中假设,若环境中有 1 亿种噬菌体,每个噬菌体可编码 50 个 ORFs,其中有 50% 的 ORFs 是新序列,那么环境中的噬菌体可能包含了 25 亿全新的 ORFs,全球只有小于 0.000 2% 的噬菌体宏基因组已被采样研究^[48]。由此可见,我们对噬菌体基因组的了解只是冰山一角,噬菌体基因组上存在大量未知功能基因,这些片段是否与耐药基因或耐药基因转移相关还须要深入研究。

目前报道的数据显示,噬菌体很可能在抗生素耐药基因传播中发挥一定作用,但是与质粒、转座子等可移动元件相比其贡献比例尚未明确。首先,环境中可培养的细菌不到 1%,因此通过双层培养所获得的噬菌体数量将远远低于噬菌体种类的 1%;其次;目前国内外还没有噬菌体完整的基因信息数据库,想要绕过培养障碍从基因层面研究噬菌体和细菌的关系还存在困难;最后;噬菌体并不全是宽宿主,且难分离,这就导致转导试验在实验室难以大规模进行,无法积累足够的数据证明转导的直观贡献。噬菌体从发现至今已有百年历史,但其生命规律及其在生态环境中的地位还未完全了解,噬菌体的研究道路还很长。

参考文献:

[1] Hvistendahl M. China takes aim at rampant antibiotic resistance[J]. Science,2012,336(6083):795.
[2] Looft T,Johnson T A,Allen H K,et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2012,109(5):1691-1696.
[3] Zhu Y G,Johnson T A,Su J Q,et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. Proceedings of the

National Academy of Sciences,2013,110(9):3435-3440.
[4] Sarmah A K,Meyer M T,Boxall A B. A global perspective on the use,sales,exposure pathways,occurrence,fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment[J]. Chemosphere,2006,65(5):725-759.
[5] 孙刚,袁守军,计峰,等. 畜禽粪便中抗生素残留危害及其研究进展[J]. 环境与健康杂志,2009,26(3):277-279.
[6] 杨凤霞,毛大庆,罗义,等. 环境中抗生素抗性基因的水平传播扩散[J]. 应用生态学报,2013,24(10):2993-3002.
[7] 张吴,王盼亮,杨清香. 畜禽粪便中多重耐药细菌及耐药基因研究[J/OL]. 北京:中国科技论文在线(2017-04-26)[2017-09-23]. [http://www. paper. edu. cn/releasepaper/content/201704-606](http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201704-606).
[8] Marta C L,Juan J,Maite M,et al. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples[J]. PLoS One,2011,6(3):e17549.
[9] Quiros P,Colomer-Lluch M,Martinez-Castillo A,et al. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2014,58(1):606-609.
[10] Lang A S,Zhaxybayeva O,Beatty J T. Gene transfer agents:phage-like elements of genetic exchange[J]. Nature Reviews Microbiology,2012,10(7):472-482.
[11] Muniesa M,Imamovic L,Jofre J. Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments[J]. Microbial Biotechnology,2011,4(6):725-734.
[12] Parsley L C,Consuegra E J,Kakirde K S,et al. Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid,or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage[J]. Applied and Environmental Microbiology,2010,76(11):3753-3757.
[13] Breitbart M,Thompson L R,Suttle C A,et al. Exploring the vast diversity of Marine viruses[J]. Oceanography,2007,20(2):135-139.
[14] Fuhrman J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. Nature,1999,399(6736):541-548.
[15] Letarov A,Kulikov E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities[J]. Journal of Applied Microbiology,2009,107(1):1-13.
[16] Liu B,Zhou F F,Wu S J,et al. Genomic and proteomic

- characterization of a thermophilic *Geobacillus* bacteriophage GBSV1 [J]. Research in Microbiology, 2009, 160(2): 166–171.
- [17] Rodriguez – Valera F, Martin – Cuadrado A –, Pasic L, et al. OPINION explaining microbial population genomics through phage predation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(11): 828–836.
- [18] Hao X D, Wang Q L, Cao Y L, et al. Evaluating sludge minimization caused by predation and viral infection based on the extended activated sludge model No. 2d [J]. Water Research, 2011, 45(16): 5130–5140.
- [19] Khan M A, Satoh H, Katayama H, et al. Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency [J]. Water Research, 2002, 36(13): 3364–3370.
- [20] Brussow H, Chanchaya C, Hardt W D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(3): 560–602.
- [21] Colomer – Lluch M, Calero – Cáceres W, Jebri S, et al. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population [J]. Environment International, 2014, 73: 167–175.
- [22] Colomer – Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(5): 1265–1274.
- [23] Marti E, Variatza E, Balcazar J L. Bacteriophages as a reservoir of extended – spectrum β – lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2014, 20(7): 0456–0459.
- [24] Colomer – Lluch M, Imamovic L, Jofre J, et al. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(10): 4908–4911.
- [25] Calero – Cáceres W, Muniesa M. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater[J]. Water Research, 2016, 95: 11–18.
- [26] Calero – Cáceres W, Melgarejo A, Colomer – Lluch M A, et al. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions[J]. Environmental Science and Technology, 2014, 48(13): 7602–7611.
- [27] Ross J, Topp E. Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(22): 7905–7913.
- [28] Minot S, Sinha R, Chen J, et al. The human gut virome: inter – individual variation and dynamic response to diet [J]. Genome Research, 2011, 21(10): 1616–1625.
- [29] Liu B, Pop M. ARDB—Antibiotic resistance genes database[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(S1): D443–D447.
- [30] Modi S R, Lee H H, Spina C S, et al. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome[J]. Nature, 2013, 499(7457): 219.
- [31] Enault F, Briet A, Bouteille L, et al. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses [J]. ISME Journal, 2017, 11(1): 237–247.
- [32] Fard R, Barton M D, Heuzenroeder M W. Bacteriophage – mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci [J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(6): 559–564.
- [33] Haase A T, Retzel E F, Staskus K A. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, 87(13): 4971–4975.
- [34] Kenzaka T, Tani K, Sakotani A, et al. High – frequency phage – mediated gene transfer among *Escherichia coli* cells, determined at the single – cell level [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3291–3299.
- [35] Kenzaka T, Tani K, Nasu M. High – frequency phage – mediated gene transfer in freshwater environments determined at single – cell level [J]. The ISME Journal, 2010, 4(5): 648–659.
- [36] McDaniel L D, Young E, Delaney J, et al. High frequency of horizontal gene transfer in the oceans [J]. Science, 2010, 330(6000): 50.
- [37] Beumer A, Robinson J B. A broad – host – range, generalized transducing phage (SN – T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8301–8304.
- [38] Schmiegier H, Schicklmaier P. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104 [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170(1): 251–256.
- [39] Taniashin V I, Zimin A A, Shliapnikov M G, et al. Transduction of plasmid antibiotic resistance determinants with pseudo – T – even bacteriophages [J]. Genetika, 2003, 39(7): 914–926.
- [40] Kenzaka T, Tani K, Sakotani A, et al. High – frequency phage – mediated gene transfer among *Escherichia coli* cells, determined at the single – cell level [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3291–3299.
- [41] Zhang Y F, Lejeune J T. Transduction of *bla*_{CMY-2}, *tet*(A), and *tet*(B) from *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Heidelberg to *S. typhimurium* [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 129(3/4): 418–425.
- [42] Battaglioli E J, Baisa G A, Weeks A E, et al. Isolation of generalized transducing bacteriophages for uropathogenic strains of *Escherichia coli* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(18): 6630–6635.
- [43] Marinus M G, Poteete A R. High efficiency generalized transduction in *Escherichia coli* O157:H7 [J]. F1000 Research, 2013, 2(7): 1–7.
- [44] Bearson B L, Allen H K, Brunelle B W, et al. The agricultural antibiotic carbadox induces phage – mediated gene transfer in *Salmonella* [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5(52): 1–8.
- [45] Bearson B L, Brunelle B W. Fluoroquinolone induction of phage – mediated gene transfer in multidrug – resistant *Salmonella* [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2015, 46(2): 201–204.
- [46] Duran A E, Muniesa M, Mendez X, et al. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(2): 338–347.
- [47] Breitbart M, Salamon P, Andresen B, et al. Genomic analysis of uncultured marine viral communities [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(22): 14250–14255.
- [48] Rohwer F. Global phage diversity [J]. Cell, 2003, 113(2): 141.