科学通报 2011 年 第 56 卷 第 14 期：1071 ~ 1079
评 述 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

海洋微生物与噬菌体间的相互关系

张永雨[①②], 黄春晓[②③], 杨军[①*], 焦念志[②*]

① 中国科学院城市环境研究所城市生态健康与安全重点实验室, 厦门 361021;
② 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005;
③ 福建省厦门第一中学, 厦门 361003
* 联系人, E-mail: jyang@iue.ac.cn; jiao@xmu.edu.cn

2010-12-23 收稿, 2011-03-30 接受
国家自然科学基金(41006087, 91028001, 41076063)、近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学)青年访问学者基金(MELRS0932)和福建省科技计划重点项目(2009Y0044)资助

摘要 病毒是海洋中丰度最高的生物体, 其中绝大多数又为能够侵染细菌和古菌的噬菌体. 它们在控制微生物死亡率、调节微生物群落结构与多样性、影响微食物网过程以及参与碳、氮等元素的生物地球化学循环等方面扮演着重要的生态角色. 本文对近年来关于海洋细菌与其病毒间相互关系的研究进行了概述, 并结合作者的工作对未来的研究进行展望.

关键词
海洋噬菌体
噬菌体感染
水平基因转移
噬菌体抗性

海洋病毒学是当今海洋生态学研究的前沿热点之一[1], 而病毒与细菌间的相互关系是其中一个很重要的研究方面. 病毒在海洋生态系统中是数量最多、遗传多样性最高的生物体, 而且其中绝大多数为噬菌体. 它们是引起微生物死亡的最主要因素之一. 通过噬菌体感染、水平基因转移以及诱导宿主微生物产生抗性突变等方式, 在调节微生物种群大小、结构与多样性以及影响微食物网过程, 参与碳、氮等元素的生物地球化学循环等方面起着重要作用.

本文将综述海洋噬菌体与细菌间相互关系研究的进展, 进一步阐明噬菌体在海洋生态系统中的重要生态地位与功能.

1 海洋噬菌体的发现及其丰度大小

噬菌体是一种以原核生物(包括细菌和古菌等)为宿主的病毒类群, 它最早发现于 1915 年. 之后, d'Herelle 在 1917 年又再次发现了这种能够裂解细菌的生物类群, 并将其命名为"bacteriophage" [2]. 噬菌体的发现以及后来围绕噬菌体所开展的大量研究, 对生命科学的发展具有极其重要的意义. 例如, 通过噬菌体侵染细菌的实验证明了 DNA 是生命的遗传物质, 并进而推动了一门全新学科即分子生物学的问世[2]. 然而关于海洋噬菌体的研究却起步较晚. 直到 20 世纪 90 年代, 人们通过电子显微镜观察才发现海水中含有大量的病毒粒子, 且其中主要为噬菌体[3]. 使得噬菌体在海洋生态系统中的潜在生态功能开始引起人们的广泛关注.

研究表明, 噬菌体在海洋中的数量极其丰富, 总量约 10^{30} 个. 著名的海洋病毒学专家 Suttle[4]曾就这个庞大数量打了一个形象的比喻: "如果将海洋中的病毒头尾相连排成一列, 那么这个队列的长度将比地球附近的 60 个星系相互间的距离总和还要长". 噬菌体在海洋中无处不在, 可以说哪里有微生物出现, 哪里就会伴有噬菌体的存在. 在表层海水中噬菌体的丰度约为 10^7 个/mL, 是细菌丰度的 5~25 倍[3]. 虽然, 随着海水深度的增加, 病毒的数量有逐渐减少的趋势. 但在海底沉积物中, 由于营养物质丰富, 使得细菌具有非常高的丰度, 与其相对应, 病毒的数量也达到了一个极高的水平, 约为 10^8~10^9 个/cm^3[5]. 可以说, 噬菌体是海洋中丰度最高的生物有机体.

英文版见: Zhang Y Y, Huang C X, Yang J, et al. Interactions between marine microorganisms and their phages. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4503-2

2 海洋噬菌体的基本特征及其分类

在海洋中噬菌体具有极高的多样性, 然而如果从形态上对其分类, 并不是很多. 图 1 概括了目前已经分离的海洋噬菌体的几种主要类型. 大多数海洋噬菌体具有头和尾结构的复合形态, 核酸为线型双链 DNA(dsDNA). 根据其尾部形态特征的不同, 可以分为以下 3 科, 分别是长尾病毒科(*Siphoviridae*)、短尾病毒科(*Podoviridae*)和肌病毒科(*Myoviridae*)[5]. 如图 1(a)所示, 肌病毒科噬菌体通常具有一个粗壮且可以伸缩的尾部. 这类病毒往往具有较强的裂解能力, 即大多数为烈性病毒. 另外, 它们的宿主范围较广, 因而也是最容易从海水中分离出来的一类噬菌体. 短尾病毒科噬菌体(图 1(b))往往具有一个短且不可伸缩的尾部, 它们也具有较强的裂解能力, 但宿主范围非常小, 它们侵染宿主时, 具有严格的宿主专一性, 因此这类噬菌体较少能从海水中分离出来. 长尾病毒科的噬菌体(图 1(c)), 顾名思义, 它们通常具有一个长长的尾部, 但与肌病毒科噬菌体不同的是, 它们的尾部往往不能伸缩. 另外, 这类病毒对宿主菌的裂解能力较弱, 常为温和性噬菌体, 它们在感染宿主菌时, 并不马上引起宿主菌的裂解, 而是将其自身的基因组整合到宿主菌的基因组中, 并随着宿主菌的繁殖而完成它们自身的增殖. 它们的宿主范围介于肌病毒科与短尾病毒科噬菌体之间, 是一类较常能从海水中分离出来的噬菌体类群[5].

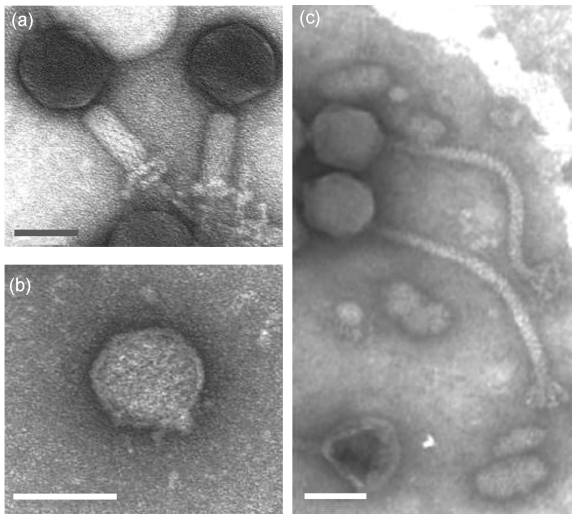


图 1 海洋噬菌体的 3 种主要形态类型

(a) 肌病毒科; (b) 短尾病毒科; (c) 长尾病毒科. 标尺长度为 50 nm[5]

3 噬菌体在微食物环以及海洋物质循环中的作用

越来越多的研究表明, 噬菌体是引起海洋细菌死亡的主导因素之一. 在表层海水中, 由噬菌体引起的细菌死亡率约达 10%~50%[6~10], 与浮游动物引起的细菌死亡率几乎相当. 而在一些不利于原生动物生存的环境中(如深海及沉积物中), 噬菌体介导的细菌死亡率, 甚至高达 50%~100%. 例如, 最近 Danovaro 等人[11]在对大西洋、南太平洋、地中海以及黑海等处的海底沉积物及其上覆水中的病毒致死作用进行研究后, 发现由噬菌体介导的细菌死亡率平均高达 80%左右.

自 1983 年 Azam 等人[12]提出微生物食物环的概念以来, 细菌作为水生生物网的中心组分的认识得到了人们的普遍接受. 在微生物食物环中, 异养细菌吸收利用藻类光合作用释放的溶解有机碳(DOC), 使得一部分以 DOC 形式存在的光合作用产物转化为颗粒有机碳(POC), 再被小型纤毛虫和异养鞭毛虫所摄食, 重新回到主食物链中[13]. 噬菌体的介入使得微生物食物环中的物质和能量流向变得复杂化, 它不同于捕食所造成的细菌生产力和生物量向海洋食物网上层传递, 细菌被噬菌体裂解后, 除产生一部分细胞碎片和子代病毒颗粒外, 会向周围环境释放出大量胞内的可溶性有机物(DOM), 其中包括大量碳、氮、磷等含量丰富的核酸与蛋白质等, 这些物质可以被其他细菌重新利用, 从而使得细菌生产力和营养物质又重新回到或保持在细菌水平, 在“微食物环”中形成一个“病毒回路(viral shunt)”, 影响微食物网过程, 促进碳、氮等元素在微生物间的循环[4]. 据报道, 海洋中约有 1/4 的碳是通过微生物食物环的病毒回路进行流通的[14].

现代海洋生态学认为海洋细菌是海洋生态系统物质和能量循环的驱动者, 因此, 作为可以造成大量细菌死亡和可以改变营养物质循环方向的病毒, 无疑对整个海洋生态系统有着巨大的影响[5,11]. 研究表明, 光合作用所固定的碳的 6%~26% 经过“病毒回路”的作用回流到海洋 DOM 库, 海洋 DOM 库中的碳量与大气的碳量相当, 可见海洋病毒对全球碳循环的影响[4].

除此之外, 病毒还影响着海洋系统中颗粒物分布和沉降、以及通过促进二甲基硫生成, 参与全球气

候的调控等[3,5].

浮游病毒的裂解作用可产生溶解有机物, 如单体、寡聚体和多聚体、胶体物质和细胞碎片等, 避免死亡的微生物以颗粒形式直接沉降到海底, 这有利于保存真光层中一些限制性营养盐(如 N, P, Fe), 对于真核生物来说尤为重要. 尤其是微量营养元素如铁, 在海洋生态系统中起着非常重要的作用. 浮游病毒通过裂解宿主细胞, 使得大量营养物质包括一些络合态的铁等微量营养元素以溶解态的形式保存在真光层内, 提高了这些营养物质的可利用性, 维持了真光层内的初级生产[1].

许多海洋藻类具有合成与积累二甲基硫丙酸(DMSP)的能力, 而病毒通过裂解作用可以促进藻类对 DMSP 的释放, 在周围环境各种因子的作用下, DMSP 较容易通过降解转变为挥发性硫化物二甲基硫(DMS). DMS 不仅与酸雨、酸雾的形成有关, 而且可形成云凝结核, 增加对太阳的反射, 因此对气候的调节起重要作用[13].

4 噬菌体调节微生物群落结构

噬菌体对微生物的致死作用, 不仅显著影响微生物的丰度, 而且还可以不同的方式使微生物种群结构发生改变. 其作用方式主要有 4 种: 噬菌体感染、消灭优胜者(kill the winner)、水平基因转移以及微生物对噬菌体的抗性突变[1]. 其中噬菌体对微生物群落“kill the winner”的作用方式对微生物种群结构的影响较大[15].

由于噬菌体发生感染时对宿主细菌具有一定的选择性, 通过感染可引起某些细菌种群的大量死亡, 从而调节微生物群落中不同细菌类群之间的丰度大小和比例. 目前关于噬菌体在调节微生物群落结构的机制方面存在多种假说, 其中最具影响力的一个即“kill the winner” 假说. 该假说认为噬菌体吸附并感染宿主细胞, 是一个随机碰撞发生的过程, 感染频率的高低与宿主密度有着很大的关系, 当宿主细菌在环境中数量很少的时候, 由于它们与噬菌体的接触频率较低, 因而较少被噬菌体感染, 而微生物群落中的优势种群, 由于其在数量上占有明显优势, 从而大大增加了同噬菌体的接触频率, 因而更容易受到感染[16]. 通过这种方式, 噬菌体能够控制单一特异物种的过度繁殖, 从而调节着微生物群落的多样性组成. 微生物群落中的优势种群(胜利者)由于数量众多导致其特异性病毒感染的机会大增, 其病毒大量繁殖, 引起其种群的消亡, 从而为其他弱势类群细菌提供了必需的生存空间和营养物质, 进而维持细菌类群的多样性和生态系统的稳定性. Zhang 等人[17]利用稀释培养和变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法, 研究了噬菌体对中国香港近海环境中的细菌种群的丰度与结构的影响, 发现与未添加噬菌体的对照组相比, 虽然细菌种群的丰度在噬菌体感染下有所减少, 但其多样性却得到明显提高, 暗示了噬菌体对保持细菌种群多样性的重要作用.

在病毒与宿主之间长期的相互作用下, 它们之间亦建立了一套互惠的基因进化机制-水平基因转移[1,13]. 一方面, 病毒裂解宿主时, 由于错误剪切使病毒携带有部分宿主基因, 病毒基因组由于获得了宿主基因而得到很大的修正, 这些携带有宿主基因的病毒再去感染其他宿主时, 就产生了转导现象; 另一方面, 裂解过程中释放大量的宿主基因, 这些自由的基因片段游离于水体中, 通过转化进入另一宿主并改变其遗传物质的组成. 在长期的进化过程中, 通过水平基因转移, 细菌和病毒同时不断朝着更加多样化的方向发展, 增加微生物群落结构与功能的多样性.

此外, 在病毒与细菌长期的“斗争”中, 宿主自身也会利用某种机制改变自身基因, 以抵抗病毒的侵染[18]. 但由于细菌在获得这种突变的同时, 往往在一定程度上会降低其自身的新陈代谢能力(竞争力), 即两者间存在一种“Trade-off”, 使得突变株和野生型菌株往往可以同时共存, 因而也不断增加微生物群落结构与功能的多样性[19]. 例如, Middelboe 等人[20]将一株海洋细菌 *Cellulophaga baltica* MM#3 与两株能够感染该菌的噬菌体 ΦS_M 和 ΦS_T 混在一起, 利用连续培养装置培养 3 周, 即微生物群落几乎达到稳定状态时, 发现其中的细菌组成发生了显著改变, 培养液中的微生物群落变为以噬菌体 ΦS_T 抗性菌和即能抵抗 ΦS_M 又能同时抵抗 ΦS_T 的抗性菌为主, 同时仅伴有一小部分对噬菌体敏感的宿主菌存在. 研究还发现这些突变菌株对多种碳源的代谢能力也发生了显著变化, 充分揭示了噬菌体在促进微生物向更加多样性发展过程中所起的重要作用.

5 噬菌体感染机制及其不同生存对策

海洋噬菌体与宿主细菌的相互关系首先表现为海洋噬菌体具有多样化的生存对策. 噬菌体缺乏独

立完整的代谢酶系统, 必须依赖宿主细菌的酶体系来获得生命活动所需的物质和能量[10], 为了最大化持续性的利用宿主细菌这一“生物加工厂”, 噬菌体进化出多种生存方式.

最典型的生存方式是裂解性感染. 以此种方式生存的噬菌体即烈性噬菌体, 它们在侵入宿主细菌胞内后, 能够在短时间内快速利用宿主的酶体系, 进行大量增殖并导致宿主细胞裂解释放子代噬菌体. 海洋中烈性噬菌体大量存在, Moebus 等人[21]对大西洋海域中的病毒进行研究, 发现在所分离到的病毒中, 烈性噬菌体所占比例高达 65%. 裂解性的生存方式是对富营养环境的适应[2], 在富营养条件下, 细菌的新陈代谢和裂殖速率加快, 为噬菌体快速繁殖大量后代提供了基础条件, 同时也保证了细菌自身在大量被裂解后避免绝种的威胁, 实现了海洋细菌和噬菌体共同的世代延续.

溶源性感染是溶源性噬菌体(也称为温和噬菌体)将其基因组嵌入到宿主染色体中(此时称为前噬菌体), 随宿主基因的复制而复制, 并随宿主菌的分裂传递到子代细菌的基因组中, 可以长期潜伏于宿主胞内. 而细胞中含有以前噬菌体状态存在的噬菌体基因组的细菌又称为溶源性细菌. 前噬菌体可自发地或在理化因素(如 PH、温度、盐度、营养条件等)的诱导下脱离宿主细菌基因组进入溶菌周期, 产生并释放子代噬菌体, 导致细菌裂解. 溶源性噬菌体在贫营养的海洋环境中更具生存优势, 这是由于营养物质缺乏致使细菌丰度降低, 从而不能满足烈性噬菌体快速大量感染的要求[15,22,23]. 另外, 在较易对游离态噬菌体粒子造成威胁的海域, 溶源性的生存方式占主导地位[24]. 在分布上, 溶源性细菌呈现出远海较近岸多的特点[25~28], 根本原因是远海海域受人为的影响小, 水体透明度大, 紫外线的穿透深度随之加深, 因此造成大量游离态噬菌体粒子的死亡, 于是幸存的噬菌体粒子选择以溶源性方式暂时“寄生”于宿主体内免受不良环境的威胁[29]. Weinbauer 等人[30]指出, 深海中的异养微型生物群落主要由溶源性细菌组成.

假溶源性的存在状态在海洋生态系统中广泛分布, 其特点是噬菌体核酸以类似质粒的状态独立存在于宿主细菌胞质中. 目前有关此类生存对策的研究还没有形成统一观点. Ripp 和 Miller[31,32]指出, 假溶源性是在宿主细菌处于高度饥饿的状态下, 噬菌体缺少足够的能量用于启动基因表达以进入溶源性或烈性状态, 因而和宿主共存的一个特殊的不稳定的阶段. Moebus[33]则认为假溶源性是一个短暂的宿主细菌表现免疫性状态的阶段, 在这个阶段中细菌和噬菌体共存, 直至诱导因子(可能是一种多糖解聚酶)的出现, 子代噬菌体再行释放. 另外, 也有部分学者认为这种生存对策能够使海洋噬菌体在所处微环境发生变化时迅速的采取相应措施, 同时也为海洋噬菌体如何长期存活于不利环境中提供了一种可能的解释[15].

慢性感染的特点在于噬菌体不会造成宿主细菌裂解, 子代噬菌体通过分泌或出芽的方式进行释放[10]. 目前有关此种生存方式的生态学意义以及海洋噬菌体在何种环境条件下会启动此方式目前尚不够清楚.

海洋噬菌体通过控制在宿主细菌胞内潜伏期的长短, 实现最大化增殖, 其中宿主细菌的丰度和生理状态是实现这一精确调控的间接决定因素[34,35]. 子代噬菌体的数量将随着潜伏期的延长而不断增多, 当外界环境条件适于宿主细菌快速生长时再进行释放, 并随即展开新一轮的感染[10]. 在宿主细菌数量多、活性高的情况下, 噬菌体大多采取缩短潜伏期的对策——裂解性方式, 以此快速释放子代噬菌体, 缩短世代周期、增大世代循环数[30]; 相反, 宿主细菌数量极少时, 噬菌体采取延长潜伏期的对策——溶源性方式, 以求在度过不良环境的同时, 保证子代噬菌体的最大释放量[34]. 目前, 裂解量是用于研究噬菌体生存能力的一个非常有效的参数.

从生态对策的角度出发, 大多数海洋噬菌体完全采用 r-对策, 即具有复制率高、子代释放率高、世代周期短等的特点, 在几小时甚至几分钟内即可完成子代噬菌体的复制并将宿主致死, 常见于烈性噬菌体. 另一种生存对策即完全选择 K-对策的海洋噬菌体, 通常它们的基因组较小, 组装后代的数量也相对较少, 并能够将其 DNA 整合到宿主基因组中或者以类似质粒的状态独立存在, 与其宿主形成稳定的依存关系, 如溶源性及假溶源性噬菌体. 第三种是过渡类型, 介于以上两种类型的生存对策之间, 例如专一性感染 SAR11 细菌类群的噬菌体, SAR11 细菌在分类上属于 α-变形菌纲, 这类细菌分布广、丰度大, 是地球上最丰富的有机体之一, 在表层和深水中的海洋微型生物群落中占据主导地位. 通常, 倾向于

K-对策的海洋噬菌体往往感染丰度高、生长缓慢的微生物种群, 而倾向于r-对策的海洋噬菌体大都具有较强的攻击力, 感染目标多是微生物群落中呈瞬间爆发式生长的优势种. 相对于海洋中的其他生物类群, 海洋噬菌体所独具的高生长速率和对外界环境改变的迅速响应等特点, 决定了它们在r, K选择连续体中更多的分布于r-对策区[4].

6 水平基因转移-噬菌体与微生物的共进化机制

海洋噬菌体是海洋细菌之间进行遗传物质传递的重要媒介[36]. 子代噬菌体在供体细菌胞内进行装配时, 错误的将宿主细菌的基因(随机的部分DNA片段或前噬菌体整合位点附近的基因)组装到衣壳中, 随着新一轮感染的发生, 这部分遗传物质将转移到同种或异种受体细菌胞内, 实现水平基因转移. 发生转移的基因与受体细胞中的原有基因进行整合, 从而产生新的基因, 为海洋细菌适应不同的海洋环境和面对新的自然选择压力提供了可能[37,38]. 部分前噬菌体进入溶菌周期后, 能够在启动基因表达的同时, 改变宿主的表型[36]. 另外, 在水平基因转移的过程中, 细菌DNA获得噬菌体衣壳的保护, 免遭环境中核酸酶的降解, 能够长时间保持其生物学活性, 因而海洋噬菌体充当了外源基因储库的作用[39,40].

海洋生态系统中噬菌体所介导的水平基因转移频率难以直接测定, 研究者通过构建模型或应用分子学方法进行预测. 分子学方法主要包括向原位海洋环境中添加已知基因并检测自然菌群对该基因的获得率、或添加受体细菌并进而对环境基因的转移速率进行测定、或对从海洋环境中分离的细菌进行基因组分析. Jiang 和 Paul[41]通过数学模型推算出美国坦帕湾河口平均每年的水平基因转移频率高达 1.3×10^{14} 次.

海洋噬菌体介导的水平基因转移受多种因素的影响. 首先, 当供体细菌处于非溶源性状态而受体菌为溶源性状态时, 水平基因转移发生的频率较高. 其次是与海洋噬菌体的宿主特异性有关, 宿主范围较广的海洋噬菌体对环境中的水平基因转移具有更加重要的作用. 再次, 温度对水平基因转移也具有限制作用, 如嗜温菌与嗜热菌之间无法进行水平基因转移, 原因是嗜温蛋白在高温下失活, 而嗜热蛋白在温度降低时无法完成其正常的酶催化作用[42]. 另外, 其他因素如MOI(multiplicity of infection, 多重感染率)、细菌基因组大小和G/C含量等也将影响水平基因转移频率[40,41].

海洋噬菌体在裂解宿主的过程中释放出细菌DNA、细胞壁、细胞质等结构物质, 进入环境中的细菌DNA一部分被核酸酶降解, 另一部分则被噬菌体用于合成自身DNA[10], 但目前还没有对噬菌体裂解作用所导致的细菌DNA释放量及其对海洋微生物食物环能流的影响进行更加深入的研究.

海洋细菌基因组具有高度动态和镶嵌性的特点, 大量的遗传信息伴随着水平基因转移过程不断地进行插入或去除[10]. 供体细菌的遗传物质通过噬菌体在受体细菌种群中广泛传播, 这些遗传物质必须获取能够在受体中长期存在的形式, 在自然选择的压力下, 对受体细菌有利的基因得以保存[43]. 这一过程将同时对供体及受体细菌产生影响, 最终促使细菌新种的产生, 增加细菌种群的遗传多样性[37,44]. 与此同时, 海洋噬菌体基因型由于不断获取宿主基因而实现多样化发展, 据估测每100 L海水中海洋噬菌体的种类高达5000种[45]. 海洋噬菌体与宿主细菌在相互作用的过程中互惠互利、共同进化[46]. Lindell 等人[47,48]研究发现, 感染海洋蓝细菌 *Synechococcus* 和 *Prochlorococcus* 的噬菌体通常携带一个能够编码光合蛋白的基因(*psbA*), 在感染宿主的过程中, 表达该光合基因及其他与光合作用有关的基因, 从而利用光合蛋白保持宿主细胞的活性, 使宿主不断为其提供所需的能量. 而细菌在长期的进化中也可获取噬菌体的某些有利基因, 从而确保自身的生存优势. 例如, 在假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 中包含两段噬菌体的尾部基因簇, 可编码细胞产物-细菌素, 有效杀菌或抑制其他细菌的生长, 提高自身的生存竞争力[49].

7 海洋细菌抵抗噬菌体感染的机制

在每秒高达 10^{23} 的感染压力下[4], 为了避免由于噬菌体感染所造成的细菌大量死亡, 宿主细菌进化出一系列有效的可遗传的抗噬菌体感染机制. 目前共研究发现五大抗感染机制——吸附抑制、噬菌体DNA注入阻挠、限制/修饰系统、流产性感染、规律成簇的间隔短回文重复防御(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPRs)体系[10,50,51], 其中的部分机制则是分别针对噬菌体完成

一次世代循环所必不可少的 5 个关键步骤(吸附、注入、生物合成、组装、释放)进行阻断(图 2). 在海洋细菌抵抗噬菌体感染的同时, 有效地控制海洋噬菌体的种群数量[52].

吸附抑制是阻碍噬菌体感染的第一道防线. 吸附的实现需要借助细胞表面受体, 即噬菌体的吸附蛋白只有在特异性识别细菌的细胞表面受体后, 才能将其尾部或衣壳附着在细菌表面. 细菌的细胞表面受体大多数是位于细胞壁上的磷壁酸分子、脂多糖分子和糖蛋白复合物, 也有的位于菌毛、鞭毛或荚膜上. 细菌通过调控受体基因表达、改变受体蛋白空间构型、或对受体进行修饰[10], 使噬菌体无法找到吸附位点, 从而阻止吸附. 最近, 本文作者亦对一株海洋好氧不产氧光合异养细菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 的抗噬菌体感染机制进行了研究, 发现细菌表面几种膜蛋白的表达量下调, 可能赋予了宿主对病毒吸附自身表面的抑制作用[52]. 我们推测这几种膜蛋白很可能充当了噬菌体感染时的吸附靶位(识别受体), 它们表达量的下调或消失严重干扰了噬菌体对细菌正常的吸附, 从而阻止了其进一步感染.

噬菌体 DNA 注入阻挠, 是指噬菌体吸附到细菌表面之后, 宿主细菌通过改变其细胞表面的通透性, 使得噬菌体无法将其 DNA 注入到宿主体内, 从而无法实现对宿主的进一步侵染. 目前关于噬菌体 DNA 注入阻挠的详细机制还不甚明确[10,18,54].

当噬菌体 DNA 进入宿主胞内后, 细菌可启动限制/修饰防御系统, 阻断噬菌体 DNA 整合到自身染色体中. 限制/修饰系统由细菌胞内的限制性核酸内切酶和甲基化酶共同组成, 具有限制外源 DNA、保护自身 DNA 的作用[55]. 噬菌体 DNA 进入宿主胞内后, 首先由限制性核酸内切酶识别噬菌体 DNA 的特异序列, 并在识别位点或其周围进行切割, 随后由其他的内切酶将切下的片段降解. 而细菌 DNA 则已在甲基化酶的作用下发生甲基化, 能够避免被自身的限制性核酸内切酶识别. 然而也有极少数的噬菌体 DNA 未能被宿主限制性核酸内切酶及时识别, 这部分外源 DNA 将被细菌当作自身的 DNA 进行修饰——甲基化, 反而受到宿主的保护. 因此限制/修饰系统被认为是功能最强大但同时也是最脆弱的防御系统[55]. 另外, 部分噬菌体则演化出对抗限制性核酸内切酶的策略, 如去除 DNA 中的限制性内切酶位点、获得甲基化酶基因、修饰识别碱基(甲基化或糖基化)、以及合成能够抵抗宿主核酸内切酶的蛋白等[10,15].

流产感染是一种“自我牺牲”式的细菌用来抵抗噬菌体侵染的方式. 它发生于噬菌体 DNA 注入到宿主胞内后, 通过宿主细胞自身的死亡, 使得噬菌体无法继续借助宿主的合成代谢系统来进行其自身的繁殖[10]. 这种“自我牺牲”式的抗噬菌体感染方式能有效的保护其他同种细菌免遭或少遭该种噬菌体的感染, 从进化的角度上也解释了自杀性基因存在的合理性[32,55].

CRISPRs 防御体系是人们最近新发现的一种原

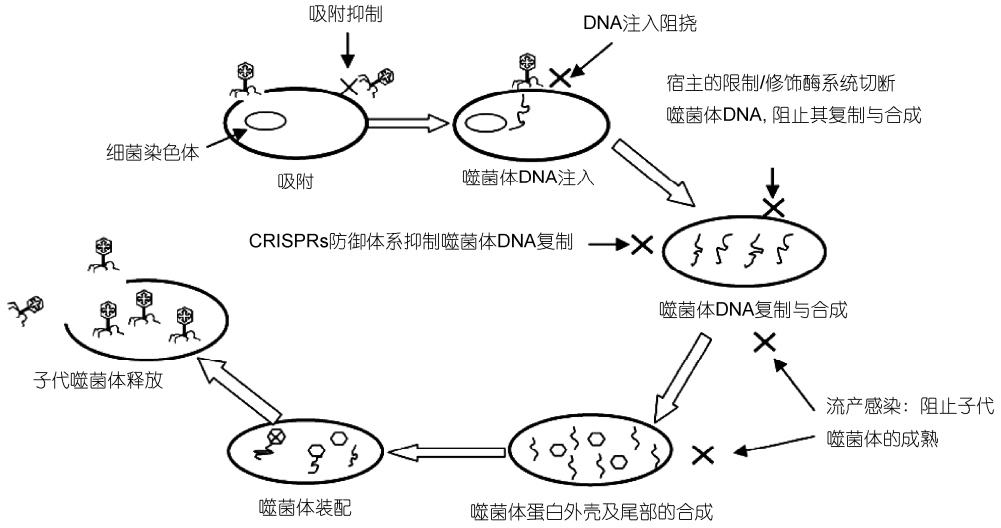


图 2 噬菌体感染细菌的全过程以及宿主在不同阶段的抗感染方式

核生物用于抵抗噬菌体感染的方式. CRISPRs 在海洋细菌与古菌中广泛分布, 其结构主要包括不连续的同向重复序列和间隔其中的大小与之相近的非重复间区序列两部分, 同向重复序列高度保守, 间区序列则具有极高的多态性[50,51]. 间区序列与噬菌体、质粒等外源基因组序列具有同源性[56~58]. 这一抗性的特异性取决于插入到 CRISPRs 位点中的外源基因组序列. 当间隔序列与某种噬菌体的 DNA 序列较为相似时, 该宿主菌既可表现出对该种噬菌体的抗性. 其抵抗机制与真核生物中的 RNA 干扰较为相似[50,59].

除了上述 5 种典型的抗感染机制之外, 最近有关抗噬菌体感染的研究又有新成果. 本文作者及其合作者首次利用蛋白质组学技术对海洋玫瑰杆菌 DSS-3 及其抗噬菌体突变株 M1 进行细胞全蛋白差异分析, 发现突变株胞内有 4 个蛋白发生某种碱性化修饰, 以此赋予了突变株 M1 对抗噬菌体感染的特性[60]. 尽管我们最终未能对这些种蛋白质及其特殊的修饰方式得到成功鉴定, 但却表明细胞内部某些关键蛋白的碱性化修饰可能亦是宿主细胞抵抗病毒感染的一种未知途径和策略, 同时随着蛋白质组学研究技术的不断发展以及人们对蛋白质及其修饰鉴定方法的不断改进, 在将来的噬菌体抗性研究中更多的未知机制和过程有望被逐步揭示和了解.

8 展望

海洋病毒学发展至今, 研究者们已经认识到海洋中噬菌体与细菌之间的相互作用复杂多样, 并在调节微生物群落、促进微生物进化、以及促进海洋微生物食物环的动态变化中扮演着重要的生态角色, 但目前对它们之间的作用过程与机制还缺乏深入的了解. 因此笔者认为以下几个方面的工作还有待于进一步深入研究: (1) 在更大尺度上(包括河口、不同海区的近海、外海及不同水深范围)开展生态调查, 同时结合现场(或围格)培养实验, 研究细菌与噬菌体在不同环境条件(如温度、盐度、光照、水压等)下其各自丰度、群落组成及其生物活性的变化, 更全面了解噬菌体在对控制微生物生长率(或死亡率)、以及调节微生物群落结构与多样性中的重要作用; (2) 对海洋噬菌体裂解宿主细菌所释放的结构物质进行量化研究, 用以重新评估海洋噬菌体的裂解作用对海洋微生物食物环能流的影响; (3) 结合环境基因组学和环境蛋白质组学技术对原位海洋环境中的噬菌体进行研究, 准确评析海洋噬菌体的结构与功能多样性特征. (4) 利用先进的分子生物学技术以及基因组和蛋白质组学等手段, 在基因和蛋白水平上进一步揭示海洋噬菌体与细菌之间的协同进化关系.

参考文献

1 焦念志. 海洋微型生物生态学. 北京: 科学出版社, 2006. 272–303
2 Duckworth D H. History and basic properties of bacterial viruses. In: Goyal S M, Gerba C P, Bitton G, eds. Phage Ecology. New York: John Wiley & Sons, 1987. 1–44
3 Fuhrman J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature, 1999, 399: 541–548
4 Suttle C A. Marine viruses—Major players in the global ecosystem. Nat Rev Microbiol, 2007, 5: 801–812
5 Suttle C A. Viruses in the sea. Nature, 2005, 437: 356–361
6 Fuhrman J A, Suttle C A. Viruses in marine planktonic systems. Oceanography, 1993, 6: 51–63
7 Steward G F, Smith D C, Azam F. Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi Seas. Mar Ecol-Prog Ser, 1996, 131: 287–300
8 Weinbauer M G, Hofle M G. Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 431–438
9 Suttle C A. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. Microb Ecol, 1994, 28: 237–243
10 Weinbauer M G. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol Rev, 2004, 28: 127–181
11 Danovaro R, Dell A, Corinaldesi C, et al. Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems. Nature, 2008, 454: 1084–1087
12 Azam F, Fenchel T, Field J G, et al. The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar Ecol Prog Ser, 1983, 10: 257–263
13 王斐, 郑天凌, 洪华生. 海洋病毒在微生物食物环中的重要作用. 海洋科学, 1998, 4: 41–43
14 Wilhelm S W, Suttle C A. Viruses and nutrient cycles in the sea. Bioscience, 1999, 49: 781–788
15 Wommack K E, Colwell R R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64: 69–114

16 Thingstad T F, Lignell R. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. Aquat Microb Ecol, 1997, 13: 19–27
17 Zhang R, Weinbauer M G, Qian P Y. Viruses and flagellates sustain apparent richness and reduce biomass accumulation of bacterioplankton in coastal marine waters. Environ Microbiol, 2007, 9: 3008–3018
18 Allison G E, Klaenhammer T R. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. Inter Dairy J, 1998, 8: 207–226
19 Bohannan B J M, Kerr B, Jessup C M, et al. Trade-offs and coexistence in microbial microcosms. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 81: 107–115
20 Middelboe M, Holmfeldt K, Riemann L, et al. Bacteriophages drive strain diversification in a marine *Flavobacterium*: Implications for phage resistance and physiological properties. Environ Microbiol, 2009, 11: 1971–1982
21 Moebus K, Nattkemper H. Bacteriophage sensitivity patterns among bacteria isolated from marine waters. Helgoland Mar Res, 1981, 34: 375–385
22 Echols H. Developmental pathways for the temperate phage: Lysis vs lysogeny. Ann Rev Genet, 1976, 6: 157–190
23 Hewson I, O'Neil J M, Fuhrman J A, et al. Virus-like particle distribution and abundance in sediments and overlying waters along eutrophication gradients in two subtropical estuaries. Limnol Oceanogr, 2001, 46: 1734–1746
24 Lenski R E. Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage. Adv Microb Ecol, 1988, 10: 1–44
25 Weinbauer M G, Suttle C A. Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities. Aquat Microb Ecol, 1999, 18: 217–225
26 Jiang S C, Paul J H. Occurrence of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction. Mar Ecol Prog Ser, 1996, 142: 27–38
27 Jiang S C, Paul J H. Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. Mar Ecol Prog Ser, 1994, 104: 163–172
28 Jiang S C, Paul J H. Significance of lysogeny in the marine environments: Studies with isolates and a model of lysogenic phage production. Microb Ecol, 1998, 35: 235–243
29 Wilhelm S W, Weinbauer M G, Suttle C A, et al. The role of sunlight in the removal and repair of viruses in the sea. Limnol Oceanogr, 1998, 43: 586–592
30 Weinbauer M G, Brettar I, Höfle M. Lysogeny and virus-induced mortality of bacterioplankton in surface, deep, and anoxic waters. Limnol Oceanogr, 2003, 48: 1457–1465
31 Ripp S, Miller R V. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. Microbiology, 1997, 143: 2065–2070
32 Ripp S, Miller R. Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, 1998, 144: 2225–2232
33 Moebus K. Marine bacteriophage reproduction under nutrient-limited growth of host bacteria. 2. Investigations with phage-host tem [H3:H3/1]. Mar Ecol Prog Ser, 1996, 144: 13–22
34 Abedon S T. Selection for bacteriophage latent period length by bacterial density: A theoretical examination. Microb Ecol, 1989, 18: 79–88
35 Abedon S T, Herschler T D, Stopar D. Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 4233–4241
36 Rohwer F, Prangishvili D, Lindell D. Roles of viruses in the environment. Environ Microbiol, 2009, 11: 2771–2774
37 Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid, 1999, 42: 73–91
38 Dutta C, Pan A. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. J Bios, 2002, 27: 27–33
39 Stotzky G. Gene transfer among bacteria in soil. In: Levy S B, Miller R V, eds. Gene Transfer in the Environment. New York: McGraw-Hill, 1989. 165–222
40 Schicklmaier P, Schmieger H. Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the Salmonella typhimurium complex. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 1637–1640
41 Jiang S C, Paul J H. Gene transfer by transduction in the marine environment. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 2780–2787
42 Jain R, Rivera M C, Moore J E, et al. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. Mol Biol Evol, 2003, 20: 1598–1602
43 Lawrence J G. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. Curr Opin Microbiol, 1999, 2: 519–523
44 Gogarten J P, Townsend J P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. Nat Rev Microbiol, 2005, 3: 679–687
45 Rohwer F, Thurber R V. Viruses manipulate the marine environment. Nature, 2009, 459: 207–212
46 Lindell D, Jaffe J D, Coleman M L, et al. Genome-wide expression dynamics of a marine virus and host reveal features of co-evolution. Nature, 2007, 449: 83–86

47 Lindell D, Sullivan M B, Johnson Z I, et al. Transfer of photosynthesis genes to and from Prochlorococcus viruses. Proc Nat Acad Sci USA, 2000, 101: 11013–11018
48 Lindell D, Jaffe J D, Johnson Z I, et al. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. Nature, 2005, 438: 86–89
49 Nakayama K, Takashima K, Ishihara H, et al. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. Mol Microbiol, 2000, 38: 213–231
50 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 2007, 315: 1709–1712
51 崔玉军, 李艳君, 颜焱锋, 等. 规律成簇的间隔短回文重复: 结构、功能与应用. 微生物学报, 2008, 48: 1549–1555
52 Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M L, et al. Phage-host interaction: An ecological perspective. Bacteriol, 2004, 186: 3677–3686
53 Huang C X, Zhang Y Y, Jiao N Z. Phage Resistance of a Marine Bacterium, *Roseobacter denitrificans* OCh114, as Revealed by Comparative Proteomics. Curr Microbiol, 2010, 61: 141–147
54 Hill C. Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev, 1993, 12: 87–108
55 Forde A, Fitzgerald G F. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76: 89–113
56 Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extra-chromosomal origin. Microbiology, 2005, 151: 2551–2561
57 Mojica F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol, 2005, 60: 174–182
58 Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. Microbiology, 2005, 151: 653–663
59 Deveau H, Barrangou R, Garneau J E, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol, 2008, 190: 1390–1400
60 Zhang Y Y, Jiao N Z, Colquhoun D R, et al. Protein modifications related to phage resistance in a marine roseobacter. Aquat Microb Ecol, 2009, 55: 203–207