



# 五株克雷伯氏菌噬菌体的生物学特性及比较基因组学研究

王猛<sup>1,2</sup>, 王雪<sup>2</sup>, 赵佳男<sup>2</sup>, 曾君<sup>3</sup>, 左君豪<sup>3</sup>, 郭志良<sup>3</sup>, 季芳<sup>2</sup>, 邵建立<sup>4</sup>,  
张立敏<sup>5</sup>, 王承民<sup>2\*</sup>, 秦建华<sup>1\*</sup>

- 1 河北农业大学动物医学院, 河北 保定 071000
- 2 广东省科学院动物研究所 广东省动物保护与资源利用重点实验室 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广东 广州 510260
- 3 天津农学院动物科学与动物医学学院, 天津 300384
- 4 暨南大学附属第一医院, 广东 广州 510260
- 5 联勤保障部队北戴河康复疗养中心, 河北 秦皇岛 066100

王猛, 王雪, 赵佳男, 曾君, 左君豪, 郭志良, 季芳, 邵建立, 张立敏, 王承民, 秦建华. 五株克雷伯氏菌噬菌体的生物学特性及比较基因组学研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3110-3128.

WANG Meng, WANG Xue, ZHAO Jia'nan, ZENG Jun, ZUO Junhao, GUO Zhiliang, JI Fang, SHAO Jianli, ZHANG Limin, WANG Chengmin, QIN Jianhua. Biological characteristics and comparative genomics of five *Klebsiella* phage isolates[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3110-3128.

**摘要:**【目的】耐药性克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)的细菌作为人类感染的重要病原, 是临床治疗重要的挑战。本研究对多株克雷伯氏菌裂解性噬菌体的生物学特性和基因组特征进行比较分析, 为其应用提供更多科学数据。【方法】使用双层平板法从人类和动物新鲜粪便、污水中分离纯化裂解性克雷伯氏菌噬菌体; 通过磷钨酸染色和透射电镜观察其形态; 采用双层平板噬菌斑法确定其宿主范围, 测定温度和 pH 稳定性、一步生长曲线和体外抑菌效果等生物学特性; 基于全基因组测序对分离株进行比较基因组学分析; 通过体内抑菌试验评估噬菌体对多重耐药变栖克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*) BS375-3 感染的大蜡螟(*Galleria mellonella*)幼虫的保护作用。【结果】5 株

资助项目: 广东省科学院人才专项(2016GDASRC-0205); 北京动物园圈养野生动物技术北京市重点实验室开放课题(ZDK202105); 河北省重点研发计划(20326603D); 河北省现代农业产业技术体系奶牛产业创新团队奶牛疫病防控岗位(HBCT2018120205)

This work was supported by the Leading Talents Program of Guangdong Academy of Sciences (2016GDASRC-0205), the Open Project of Beijing Key Laboratory of Captive Wildlife Technology in Beijing Zoo (ZDK202105), the Key Research and Development Program of Hebei Province (20326603D), and the Dairy Cow Disease Prevention and Control Position of Dairy Cow Industry Innovation Team of Modern Agricultural Industry Technology System of Hebei Province (HBCT2018120205).

\*Corresponding authors. E-mail: QIN Jianhua, qjhqqq@126.com; WANG Chengmin, wangchm@giz.gd.cn

Received: 2022-11-26; Accepted: 2023-03-10; Published online: 2023-03-19

噬菌体分别属于 *Schitoviridae* (pKP-BM327-1.2)、*Autographiviridae* (pKP-M186-2.1、pKP-M186-2.2 和 pKV-BS375-3.1)、*Drexelvriidae* (pKP-BS317-1.1) 家族; 噬菌体 pKV-BS375-3.1 可裂解受试菌中的 8 株, pKP-BM327-1.2 可裂解受试菌中的 3 株, pKP-M186-2.1、pKP-M186-2.2 和 pKP-BS317-1.1 则分别裂解受试菌中的 1 株; 5 株噬菌体感染 10–20 min 后即进入指数增长期, 在–20–37 °C、pH 6–10 环境下均能够保持稳定活性; 感染变栖克雷伯氏菌 BS375-3 后经噬菌体 pKV-BS375-3.1 处理 [感染复数(multiplicity of infection, MOI)=100] 的大蜡螟幼虫 96 h 内存活率达到 80% (8/10); 5 株噬菌体基因组长度在 42–77 kb 之间, 未携带抗生素抗性基因和毒力基因, 基于内容素(endolysin)的溯源分析显示该蛋白在克雷伯氏菌噬菌体中呈现多样性, 属内呈保守性。【结论】5 株克雷伯氏菌噬菌体均具有较好的体外抑菌活性, 生物学特性稳定, endolysin 在噬菌体属内呈现保守性。宿主谱宽、潜伏期短的噬菌体 pKV-BS375-3.1 在治疗 *Klebsiella pneumoniae* 和 *K. variicola* 临床感染方面具有潜在应用前景。

关键词: 克雷伯氏菌; 裂解性噬菌体; 生物学特性; 比较基因组学; 内容素

## Biological characteristics and comparative genomics of five *Klebsiella* phage isolates

WANG Meng<sup>1,2</sup>, WANG Xue<sup>2</sup>, ZHAO Jia'nan<sup>2</sup>, ZENG Jun<sup>3</sup>, ZUO Junhao<sup>3</sup>, GUO Zhiliang<sup>3</sup>, JI Fang<sup>2</sup>, SHAO Jianli<sup>4</sup>, ZHANG Limin<sup>5</sup>, WANG Chengmin<sup>2\*</sup>, QIN Jianhua<sup>1\*</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

2 Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, Guangdong, China

3 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

4 The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510260, Guangdong, China

5 Beidaihe Rehabilitation and Recuperation Center of Joint Logistics Support Force, Qinhuangdao 066100, Hebei, China

**Abstract: [Objective]** As a major pathogen of human infection, multidrug-resistant *Klebsiella* poses a great challenge in clinical treatment. To provide more scientific data for the application of phages, we analyzed and compared the biological and genomic characteristics of several strains of *Klebsiella* phages. **[Methods]** *Klebsiella* phages were isolated from human and animal fresh feces and sewage by the double plate method. The phage morphology was observed by phosphotungstic acid staining and transmission electron microscopy. The host spectrum, thermal stability, and pH stability of the phages were measured, and the one-step growth curve and *in vitro* bacteriostatic curve were established. The comparative genomics analysis was carried out for the whole genomes of the phage isolates. We further evaluated the protective effect of the phage isolates by the survival rate of *Galleria mellonella* larvae infected with the multidrug-resistant mutant *Klebsiella variicola* BS375-3 *in vivo*. **[Results]** The five phage isolates belonged to *Schitoviridae* (pKP-BM327-1.2), *Autographiviridae*

(pKP-M186-2.1, pKP-M186-2.2, and pKV-BS375-3.1), and *Drexlerviridae* (pKP-BS317-1.1). The phage isolates pKV-BS375-3.1 and pKP-BM327-1.2 could lyse eight and three bacterial hosts, respectively, while pKP-M186-2.1, pKP-M186-2.2, and pKP-BS317-1.1 could only lyse one bacterial host. The five phage isolates entered the exponential growth stage 10–20 min after inoculation and maintained stable activity at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and pH 6–10. The survival rate of *G. mellonella* larvae infected with the *K. variicola* BS375-3 treated with pKV-BS375-3.1 (MOI=100) reached 80% (8/10) after 96 h. The genomes of the five phage isolates had the length of 42–77 kb and did not carry resistance genes or virulence genes. The traceability analysis based on endolysin showed that the protein demonstrated diversity in *Klebsiella* phages and was conserved within the genus. **[Conclusion]** All the five *Klebsiella* phage isolates had good antibacterial activity *in vitro* and stable biological characteristics. The endolysins of the phage isolates were conserved within the genus. The phage pKV-BS375-3.1 with a wide host range and short latency has a potential application prospect in the clinical treatment of *Klebsiella pneumoniae* and *K. variicola* infections.

**Keywords:** *Klebsiella*; lytic phage; biological characteristics; comparative genomics; endolysin

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)和变栖克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*)广泛定植于人类、动物肠道和自然环境中<sup>[1]</sup>,是常见的重要条件致病性革兰氏阴性菌。肺炎克雷伯氏菌是临床感染和社区获得性感染的主要病原菌<sup>[2]</sup>,可导致肺炎、尿路感染、腹腔感染、血液感染、脑膜炎和化脓性肝脓肿等多种疾病<sup>[3-4]</sup>,发病率和死亡率呈逐年升高态势。而变栖克雷伯氏菌作为一种新兴致病菌,近年来不断出现人类临床感染病例<sup>[5]</sup>。Garza-Ramos等<sup>[6]</sup>在2015年首次报道了高黏性 *K. variicola* 分离株。2017年在英国报道一起来自重症监护病房的软组织 *K. variicola* 感染病例,该分离株产 IMI-2 碳青霉烯酶,对厄他培南、美罗培南和亚胺培南耐药<sup>[7]</sup>。2018年报道了一起来自中国上海某医院儿科重症监护室一名2岁女童感染病例,从患者导尿管中分离了具有高黏表型 *K. variicola* SHET-01 菌株,该菌株对碳青霉烯类抗生素美罗培南、亚胺培南和厄他培南耐药<sup>[8]</sup>。2021年从儿科患者样本中分离到一株高黏表型 *K. variicola* 株,其质粒携带

*blaNDM-1* 和 *blaIMP-4* 基因<sup>[8]</sup>。流行病学研究发现,*K. variicola* 导致的血液感染死亡率甚至超过 *K. pneumoniae* 感染<sup>[9]</sup>。因此,面对多重耐药克雷伯氏菌引发的公共卫生学潜在风险挑战,研发替代抗生素的新型疗法势在必行<sup>[10]</sup>。

噬菌体(bacteriophages)是一类特异性感染细菌、真菌、放线菌等微生物的病毒,是地球上最具生物多样性的生命体,于土壤、水体、空气或动植物体内等多种环境中广泛分布,自1915年发现噬菌体至今,针对噬菌体的研究为认识微生物互作、生态系统平衡和人类健康等方面提供了重要的科学价值<sup>[11]</sup>。噬菌体具有高度专一性的特点<sup>[12]</sup>,在介导宿主菌快速裂解死亡的同时,几乎不会影响人类或动物细胞,显示出极高的生物安全性<sup>[13]</sup>。因此,噬菌体及其衍生蛋白在临床实验性应用和相关研究中得到重视。以色列一名患者左胫骨感染广泛耐药鲍曼不动杆菌和多重耐药肺炎克雷伯氏菌,经过噬菌体和抗生素联合治疗后,组织迅速愈合且感染处细菌培养物呈阴性,患者避免截肢<sup>[14]</sup>;Yehl等<sup>[15]</sup>通过定点突变

对 T3 噬菌体尾纤维蛋白中的宿主范围决定区域进行改造, 令宿主范围扩大, 改造后的噬菌体在体外试验及小鼠模型内发挥良好作用, 有效避免了抗性菌株的出现; 源自葡萄球菌(*Staphylococcus*) 噬菌体 JD007 的细胞壁水解酶 JDlys 对不同来源和不同多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 菌株表现出强裂解活性, 研究人员发现该水解酶与细胞穿透肽组成的融合蛋白能够有效清除细胞内的 MRSA, 并抑制小鼠皮肤中 MRSA 的增殖, 从而缩短伤口愈合过程<sup>[16]</sup>。值得注意的是, 由于变栖克雷伯氏菌与肺炎克雷伯菌群 (*Klebsiella pneumoniae* complex) 其他成员具有重叠的生化 and 表型特征, 变栖克雷伯氏菌的流行被严重低估, 导致对其相关噬菌体研究的缺乏。

因此, 作为一种潜在的替代抗生素的新兴疗法, 噬菌体具有极其显著的临床应用优势。本研究针对 *K. pneumoniae* 与 *K. variicola* 临床分离株, 从多种样本中分离纯化得到 5 株裂解性噬菌体, 对其生物学特性、基因组构成和内溶素 (endolysin) 进化特征进行系统分析, 为进一步合理利用噬菌体资源提供理论依据, 奠定了噬菌体治疗方案的研发基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株来源

分离噬菌体所用宿主菌 (1 株 *K. variicola* 和 3 株 *K. pneumoniae*) 样品均采集自唐山市某医院, 均由本实验室分离并置于  $-20^{\circ}\text{C}$  甘油水冻存保藏。菌株信息 NMDCX0000171 存储在国家微生物科学数据中心 (National Data Center for Microbial Sciences, NMDC), 链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/attachment/det>

ail/NMDCX0000171。

### 1.2 噬菌体分离纯化

样本采集自唐山市某医院人类粪便、养猪场粪便和广州市西朗污水处理厂。对于粪便样品, 将 2 g 置于 15 mL 离心管, 补加无菌水至 10 mL, 充分混匀制成悬浊液, 污水样品则取 10 mL 直接进行下步操作。样品 8 000 r/min 离心 10 min, 将上清液通过  $0.22\ \mu\text{m}$  水系微孔滤膜过滤至新的离心管内。将 5 mL MH(B) 培养基、1 mL 上清滤液和 100  $\mu\text{L}$  过夜培养的细菌培养物在另一 15 mL 离心管中混匀,  $35^{\circ}\text{C}$  条件 150 r/min 连续培养 12 h。培养液再次离心, 上清液过滤后  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。取 100  $\mu\text{L}$  宿主菌液与 8 mL 预热的半固体培养基 [ $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$ , MH(B) 培养基+0.7% 琼脂] 混匀, 倾倒入底层固体 MH(A) 平板, 滴加 10  $\mu\text{L}$  滤液<sup>[17]</sup>, 待液体干燥后倒置于  $35^{\circ}\text{C}$  恒温箱中连续培养 12 h, 期间多次观察是否有透明噬菌斑出现。

使用双层平板法对噬菌体进行纯化<sup>[18]</sup>, 挑取双层平板表面出现的单个噬菌斑, 10 倍梯度连续稀释, 吸取适宜稀释度下 100  $\mu\text{L}$  噬菌体液与等体积宿主菌液混匀,  $35^{\circ}\text{C}$  条件下吸附 10 min, 加入 8 mL 预热的半固体培养基, 颠倒混匀后倒入 MH(A) 平板, 冷却凝固后  $35^{\circ}\text{C}$  条件下倒置培养 12 h。以上步骤重复 3–5 次, 至噬菌斑形态、大小均一不再变化, 即获得单一噬菌体。上述操作均在无菌条件下进行。

### 1.3 噬菌体生物学特性的测定

#### 1.3.1 噬菌体形态学观察

使用负染色法进行电镜样品染色, 将 10  $\mu\text{L}$  样品滴于石蜡封口膜, 铜网正面朝下倒扣至样品静置 1 min, 吸走多余样品液后以同样方法倒扣于磷钨酸染色液, 静置 1 min, 室温下干燥。通过透射电子显微镜 JEM-1400 flash 在 120 kV 下观察并拍摄噬菌体的形态特征。

### 1.3.2 宿主谱

参照文献[19]的研究方法,取本实验室保藏的克雷伯氏菌重新复壮[菌株信息 NMDCX0000172 存储在国家微生物科学数据中心(NMDC), <https://nmdc.cn/resource/genomics/attachment/detail/NMDCX0000172>]以获取增殖菌液,将 100  $\mu\text{L}$  菌液与预热的半固体培养基混匀,倾倒在固体平板表面,待上层培养基凝固后,取 10  $\mu\text{L}$  噬菌体富集液滴于半固体培养基表面,于恒温培养箱 35  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 12 h。利用工具 REALPHY 1.13<sup>[20]</sup>进行受试菌株全基因组进化树的绘制,使用 iTOL (<https://itol.embl.de/>)对系统发育树进行可视化和注释。

### 1.3.3 温度及酸碱稳定性

将 6 组 1 mL 噬菌体纯化液分别置于 -20、4、37、50、60、70  $^{\circ}\text{C}$  条件下处理 1 h,通过双层平板法测定效价以评估其温度稳定性。

使用 HCl 和 NaOH 溶液将 MH(B)培养基调整 pH 至 2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0,取噬菌体纯化液 100  $\mu\text{L}$  与 900  $\mu\text{L}$  上述液体混匀,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h,通过双层平板法测定效价以评估其酸碱稳定性<sup>[21]</sup>。

### 1.3.4 一步生长曲线

将噬菌体与宿主菌以 0.01 的比例混匀<sup>[21]</sup>,于 35  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min 吸附噬菌体。10 000 r/min 离心 1 min 收集细菌,弃去上清,用新鲜 MH(B)洗涤 2 次,之后重悬沉淀并添加 MH(B)至 5 mL,将离心管振荡混匀,计为 0 时刻,间隔 10 min 取样并经 10 000 r/min 离心 1 min,取上层清液通过双层平板法测定效价,绘制一步生长曲线。

### 1.3.5 体外抑菌实验

将对数生长期的菌株培养物,用 MH(B)稀释,调  $OD_{595}$  值为 0.15,将稀释后的菌株培养物分装至 4 只无菌离心管内,每管 10 mL,设置 4 个组,1 个对照和 3 个实验组(表 1)。对照组,离心管加入等体积 MH(B)培养基;实验组 1 [感

染复数(multiplicity of infection, MOI)=10], 10 mL 菌株培养物加入等体积噬菌体液(以 MOI 为 10 的比例);实验组 2 (MOI=1), 10 mL 菌株培养物加入等体积噬菌体液(以 MOI 为 1 的比例);实验组 3 (MOI=0.1), 10 mL 菌株培养物加入等体积噬菌体液(以 MOI 为 0.1 的比例)。每组充分混匀后,分别分装至 1.5 mL 离心管,37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养,每 3 h 取样并测定 595 nm 处的吸光度,连续测定 24 h,每组重复 3 次,绘制噬菌体体外抑菌曲线。

### 1.3.6 噬菌体对大蜡螟幼虫的体内抑菌效果

重新复苏多重耐药变栖克雷伯氏菌 BS375-3,进行活菌计数并调整其菌量为  $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$  CFU。将体重为 200–250 mg 的大蜡螟(*Galleria mellonella*)幼虫随机分为 3 组,每组 10 只,饥饿处理 24 h。使用 70% 的酒精对大蜡螟幼虫进行体表消毒,自尾部第一左足处注射 *K. variicola* BS375-3 菌液(20  $\mu\text{L}$ /只,  $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$  CFU),置于 37  $^{\circ}\text{C}$  黑暗培养箱,禁食处理,每隔 4 h 记录存活率,连续记录 96 h。 $2 \times 10^5$  CFU 感染的大蜡螟幼虫在 96 h 内死亡率为 70%,被用于正式试验的感染菌量。

将体重为 200–250 mg 的大蜡螟幼虫随机分为 6 组,每组 10 只,禁食处理 24 h,使用 70% 医用酒精进行体表消毒。对于空白对照组及噬菌体处理组,首先自尾部第一左足处注射 20  $\mu\text{L}$  磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS),30 min 后自对侧足部分别注射等量 PBS 和噬菌体 pKV-BS375-3.1 ( $2 \times 10^7$  PFU);对于其

表 1 体外抑菌试验分组信息  
Table 1 Group information of *in vitro* antibacterial test

Group	Culture of bacteria	Phage or MHB
Control	10 mL	10 mL, MHB
Test group 1	10 mL	10 mL, MOI=10
Test group 2	10 mL	10 mL, MOI=1
Test group 3	10 mL	10 mL, MOI=0.1

余试验组, 首先自尾部第一左足处注射 20  $\mu\text{L}$  *K. variicola* BS375-3 菌液 (2 $\times 10^5$  CFU), 30 min 后在对侧足部分别注射等量的 PBS、pKV-BS375-3.1 (2 $\times 10^7$ 、2 $\times 10^6$ 、2 $\times 10^5$  PFU, 表 2)。将幼虫置于 37  $^{\circ}\text{C}$  黑暗环境培养箱中, 禁食处理, 每隔 4 h 记录存活率, 连续记录 96 h。观察黑化情况和存活率<sup>[22]</sup>。

#### 1.4 噬菌体全基因组测序

利用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行全基因组测序(广东美格基因科技有限公司)。DNA 样品检测合格后构建文库, 采用软件 Soapnuke 对测序的数据质量进行评估以及去除低质量数据, 确保结果可信度。使用 Megahit 软件对 clean data 进行 *de novo* 组装。

#### 1.5 噬菌体基因组功能注释分析

基于 NCBI 在线工具 BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行噬菌体全基因组序列比对, 使用 MetaGeneMark (v3.38) 进行基因组基因预测, 利用 BLASTp ( $e < 10^{-3}$ ) 将所预测基因氨基酸序列与 UniProtKB 数据库的病毒序列 (ViralZone, reviewed protein, <https://viralzone.expasy.org/>) 进行比对, 同时将噬菌体序列提交至 pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 进行注释, 结合以上 2 种方法获得校正注释结果。使用软件 SnapGene software (from Insightful Science; available at [snapgene.com](http://snapgene.com)) 绘制噬菌体全基因组图谱; 基于耐药基因数据库 CARD (<https://card.mcmaster.ca/>) 对 5 株噬菌体进行分析, 预测是否

携带抗生素耐药基因 (antibiotics resistance gGenes, ARG); 下载毒力因子数据库 VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) 的 set A 核心数据库, 通过 BLAST 比对预测噬菌体是否携带毒力因子。

#### 1.6 噬菌体内溶素系统进化分析

在 GenBank 数据库中下载噬菌体 endolysin 氨基酸序列, 建立数据集。包括克雷伯氏菌噬菌体分离年份、国家、endolysin 蛋白类型等信息, 通过 MEGA-X 构建噬菌体 endolysin 系统发育树, 使用 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 对系统发育树进行可视化。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体的生物学特性

#### 2.1.1 噬菌斑及形态特征

本研究以 *K. pneumoniae* BM327-1、M186-2、BS317-1 及 *K. variicola* BS375-3 为宿主菌, 自污水、唐山市人类粪便及养猪场粪便样本中分离并命名 5 株噬菌体(表 3)。5 株噬菌体与宿主菌培养后可形成 1–2 mm 直径的噬斑, 且外侧均有半透明晕环。透射电镜下观察到噬菌体 pKP-BM327-1.2、pKP-M186-2.1、pKP-M186-2.2 和 pKV-BS375-3.1 头部直径在 52–74 nm 之间, 具有不可伸缩的短尾, 其长度在 11–27 nm 之间; 噬菌体 pKP-BS317-1.1 具有不可伸缩的长尾形态, 头部直径约为 58.15 nm, 尾长约 153.26 nm (图 1)。

表 2 噬菌体对大蜡螟幼虫的体内抑菌试验分组

Table 2 Grouping of bacteriophage protection tests against the larvae of *Galleria mellonella*

Group	The first injection <sup>a</sup>	30 minutes later <sup>b</sup>
Blank control	PBS	PBS
Phage treatment group	PBS	2 $\times 10^7$ PFU
Infection control	2 $\times 10^5$ CFU	PBS
Postinfection phage treatment group 1	2 $\times 10^5$ CFU	2 $\times 10^7$ PFU
Postinfection phage treatment group 2	2 $\times 10^5$ CFU	2 $\times 10^6$ PFU
Postinfection phage treatment group 3	2 $\times 10^5$ CFU	2 $\times 10^5$ PFU

<sup>a</sup>: Injection of PBS or *K. variicola* BS375-3, 20  $\mu\text{L}$ ; <sup>b</sup>: Injection of PBS or phage pKV-BS375-3.1, 20  $\mu\text{L}$ .

表 3 不同来源的噬菌体分离株基因组信息

Table 3 Genomic information of phage isolates from different sources

Phage	Accession No.	Isolation source	Family	Genome size (bp)	GC content (%)	Best BLAST hit (query coverage, identity)
pKP-BM327-1.2	OP413827	Human feces	<i>Schitoviridae</i>	76 991	44.16	<i>Klebsiella</i> phage vB_KpnP_P184 (87%, 94.75%)
pKP-M186-2.1	OP413828	The pig feces	<i>Autographiviridae</i> ; <i>Molineuxvirinae</i>	42 894	51.00	<i>Klebsiella</i> phage IME184 (83%, 93.45%)
pKP-M186-2.2	OP413829	Human feces	<i>Autographiviridae</i> ; <i>Slopekvirinae</i> ; <i>Drulisvirus</i>	44 728	53.83	<i>Klebsiella</i> phage KP34 (87%, 92.09%)
pKP-BS317-1.1	OP413832	Sewage	<i>Drexelviriidae</i> ; <i>Webervirus</i>	48 933	50.22	<i>Klebsiella</i> phage IME268 (92%, 94.74%)
pKV-BS375-3.1	OP413830	Sewage	<i>Autographiviridae</i> ; <i>Molineuxvirinae</i>	45 617	51.85	<i>Proteus</i> phage PmP19 (87%, 95.08%)

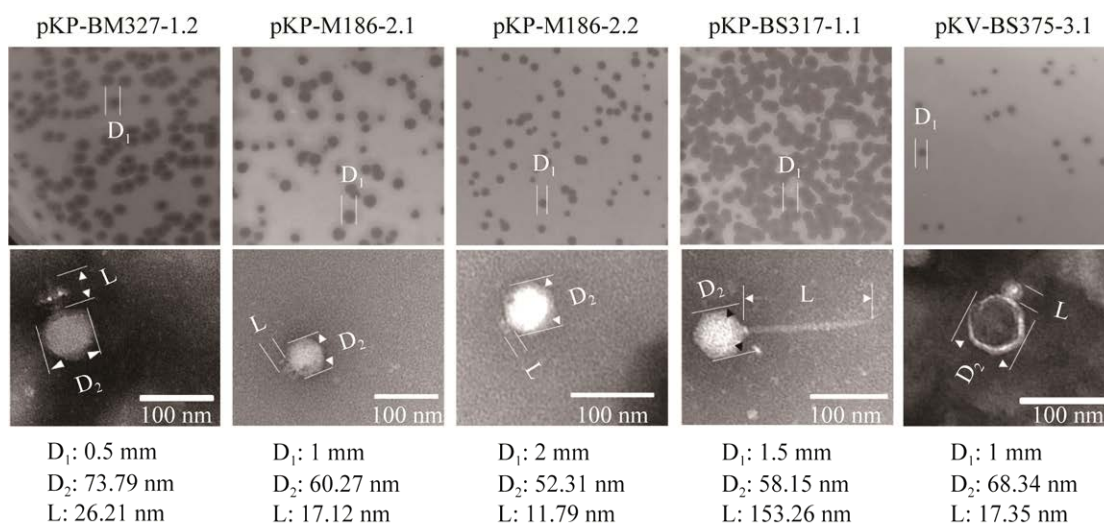


图 1 不同来源噬菌体的噬斑形态和电镜照片

Figure 1 Phage plaque morphology and electron microscopic photos of bacteriophages from different sources. D<sub>1</sub>: Plaque diameter; D<sub>2</sub>: Phage head diameter; L: Phage tail length.

### 2.1.2 宿主谱

噬菌体 pKP-M186-2.1、pKP-M186-2.2 和 pKP-BS317-1.1 仅能裂解对应宿主菌 *K. pneumoniae* M186-2 (ST111 型)、M186-2 (ST111 型) 和 BS317-1 (ST1035 型), 而噬菌体 pKP-BM327-1.2 除能裂解其宿主菌 *K. pneumoniae* BM327-1 (ST1565 型) 外, 还能裂解与 BM327-1 相同 ST 型的 *K. pneumoniae* BS329-2 和 *K. pneumoniae* BM337-1。相比之下,

*K. variicola* 噬菌体 pKV-BS375-3.1 具有较为广泛的宿主谱, 除裂解宿主菌 *K. variicola* BS375-3 (ST4115 型) 外, 还能裂解分离自医院人类粪便样品的 5 株 *K. variicola* (BS369-2、BM366-1、BS327-2-1、BS325-2、BS359-3, 均为 ST4115 型) 和 2 株 *Klebsiella quasipneumoniae* (BS419-1、BM419-3, 均为 ST2355 型), 以及马来穿山甲来源的 *K. pneumoniae* (M169-3, ST101 型) (图 2)。



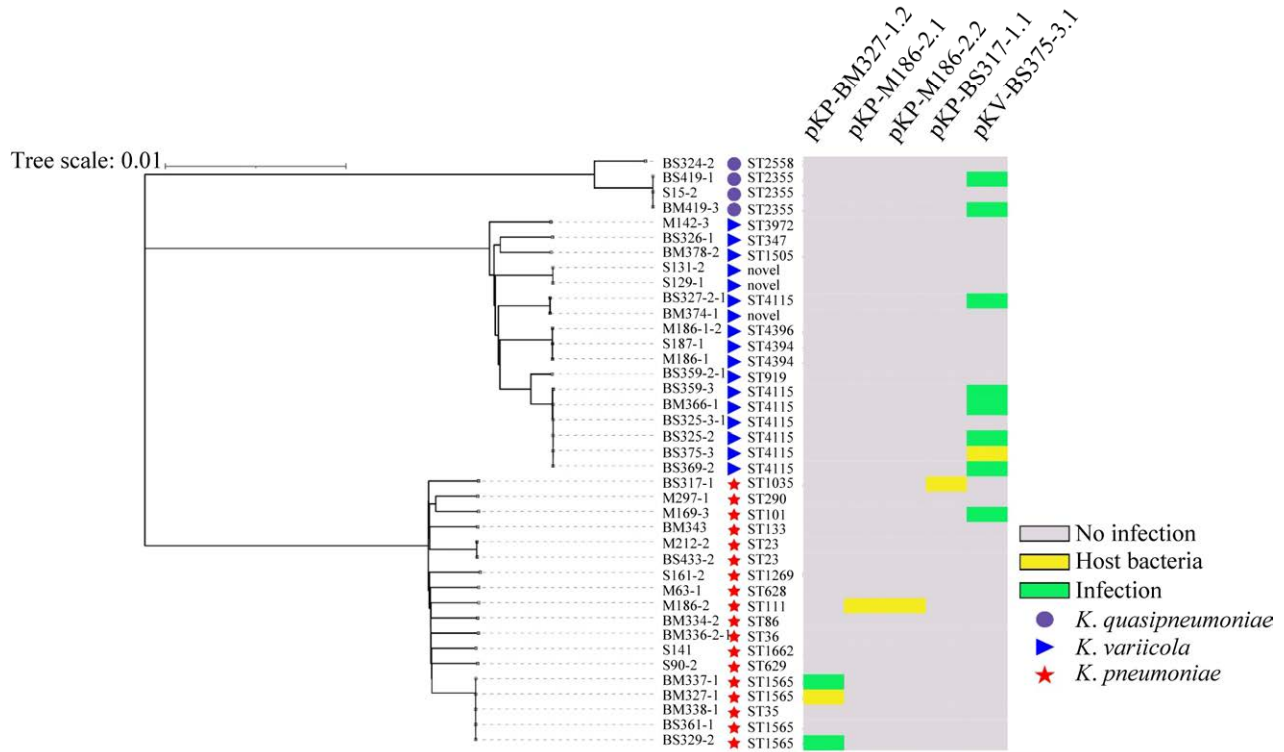


图 2 克雷伯氏菌噬菌体的宿主范围  
Figure 2 Host range of *Klebsiella* phages.

2.1.3 温度及酸碱稳定性

本研究中分离的 5 株噬菌体的效价在 -20-37 °C 保持稳定, 大于 37 °C 则温度升高时效价迅速降低, 与 37 °C 时效价相比, 在 60 °C 孵育 1 h 后的效价均极显著下降 ( $P < 0.001$ ), 其中噬菌体 pKP-BM327-1.2 和 pKV-BS375-3.1 在 60 °C 孵育 1 h 后完全失去活性(图 3A)。

5 株噬菌体在 pH 为 2 和 12 的环境下孵育 1 h 后均完全失活, 但不同来源噬菌体分离株的最适 pH 存在一定差异。噬菌体 pKP-BM327-1.2 在 pH 为 8 的弱碱环境下效价最高 [lg (PFU/mL) 为 10.22], 噬菌体 pKP-M186-2.1 与 pKP-M186-2.2 在 pH 为 7 的中性环境下效价最高 [lg (PFU/mL) 分别为 9.00 和 9.79], 而噬菌体 pKP-BS317-1.1 和 pKV-BS375-3.1 则在 pH 为 6 的弱酸环境下具有效价最高 [lg (PFU/mL) 分别为 8.88 和 8.58] (图 3B)。

2.1.4 噬菌体一步生长曲线

噬菌体一步生长曲线的测定发现, 噬菌体

pKP-BM327-1.2 和 pKP-M186-2.1 潜伏期最长 (20 min), 噬菌体 pKP-BM327-1.2 在第 70 分钟结束裂解期进入平台期, 而噬菌体 pKP-M186-2.1 裂解期持续 60 min 进入平台期。噬菌体 pKP-M186-2.2 潜伏期小于 10 min, 在第 60 分钟进入平台期。噬菌体 pKP-BS317-1.1 潜伏期为 10 min, 在 80 min 时进入平台期; 噬菌体 pKV-BS375-3.1 潜伏期小于 10 min, 该噬菌体在 50 min 时进入平台期(图 3C)。

2.1.5 噬菌体体外抑菌效果

以未加噬菌体的细菌培养物作为对照, 通过 24 h 内测定  $OD_{595}$  评估 5 株噬菌体不同 MOI (10、1、0.1) 的体外抑菌效果。*K. pneumoniae* BM327-1 培养物  $OD_{595}$  在 12 h 内持续增加, 以 MOI 为 10 的比例加入噬菌体 pKP-BM327-1.2 显示出最好的抑菌效果, 3 h 内完全抑制宿主菌株的生长(图 4A); 具有同一宿主菌 (*K. pneumoniae* M186-2)



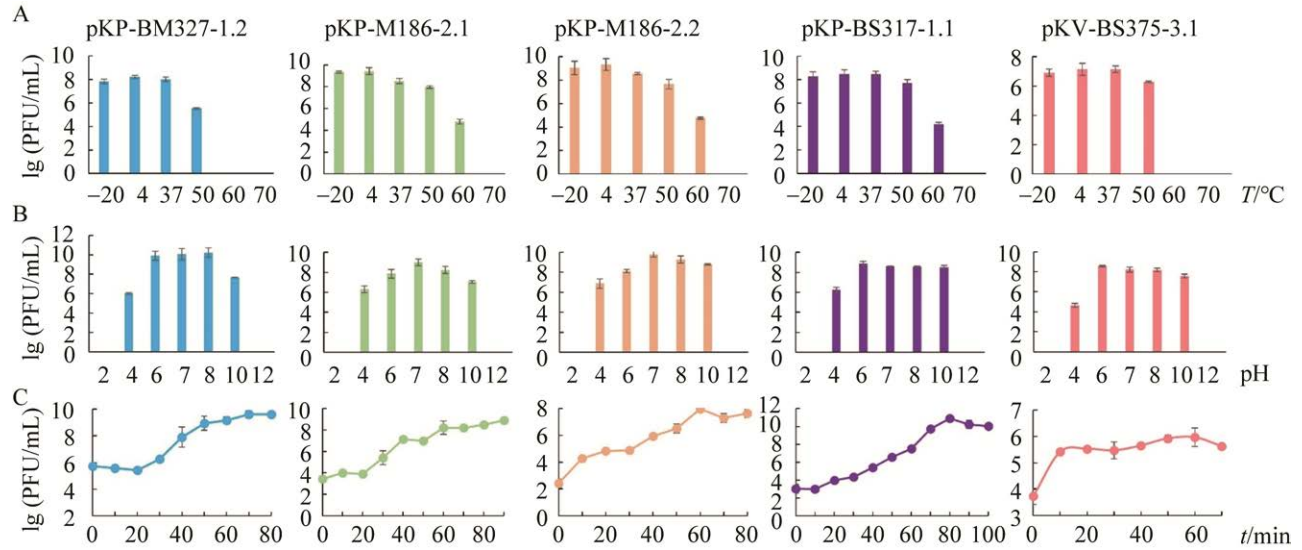


图3 噬菌体的生物学特性

Figure 3 Biological characteristics of phages. A: Temperature stability of phages. B: pH stability of phages. C: One-step growth curve of phage. Each point represents the means SD from three replicate experiments.

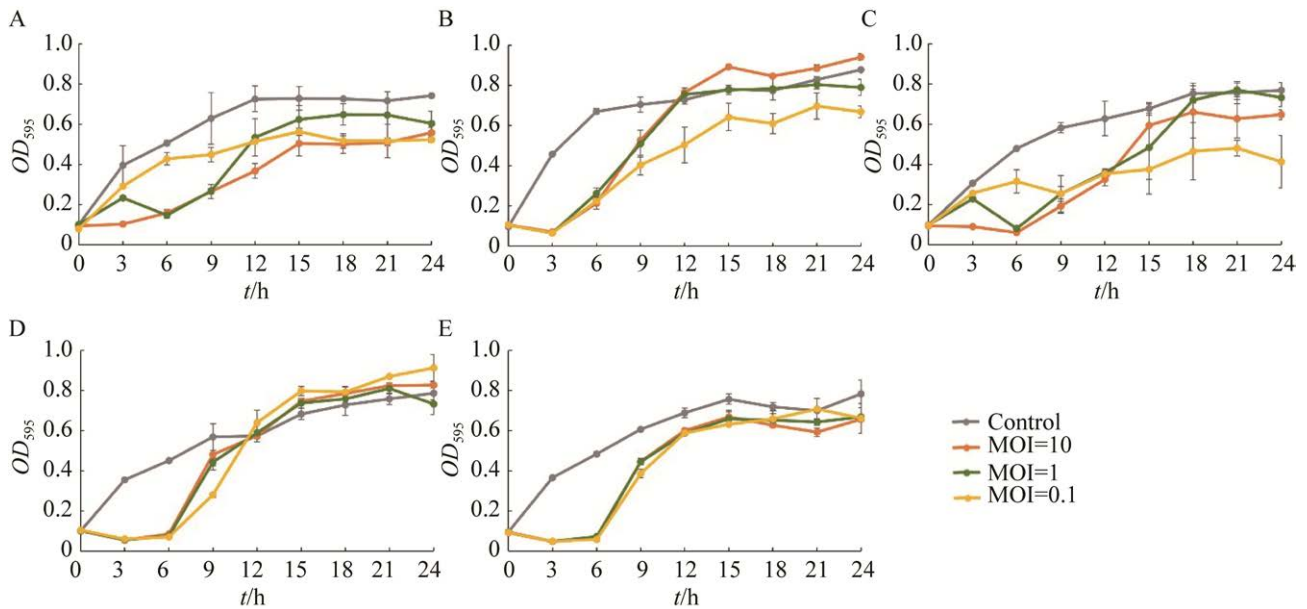


图4 噬菌体体外抑菌试验

Figure 4 Bacteriostatic curves of phage *in vitro*. A: Bacteriostatic curve of phage pKP-BM327-1.2 *in vitro*. B: Bacteriostatic curve of phage pKP-M186-2.1 *in vitro*. C: Bacteriostatic curve of phage pKP-M186-2.2 *in vitro*. D: Bacteriostatic curve of phage pKP-BS317-1.1 *in vitro*. E: Bacteriostatic curve of phage pKV-BS375-3.1 *in vitro*. Grey: Blank control (MHB medium); Orange: Phage MOI=10; Green: Phage MOI=1; Yellow: MOI=0.1. The bacterial growth status was evaluated by  $OD_{595}$  within 24 h. Each point represents the means SD from three replicate experiments.

的噬菌体 pKP-M186-2.1 和 pKP-M186-2.2 表现出不同的体外抑菌效果: 噬菌体 pKP-M186-2.1 可持续抑菌 3 h, 且与感染复数未表现出相关性(图 4B), 而以 MOI 为 10 的比例加入噬菌体 pKP-M186-2.2 后可以在 6 h 内完全抑制细菌增殖, 以 MOI 为 1 和 0.1 添加噬菌体时, 前 3 h 曲线呈上升趋势(图 4C), 表明低剂量的噬菌体 pKP-M186-2.2 抑菌效果较差; 噬菌体 pKP-BS317-1.1 和 pKV-BS375-3.1 具有相似的体外抑菌效果, 2 株噬菌体均可持续抑制细菌达 6 h (图 4D、4E)。虽然 5 株噬菌体具有多样化的体外抑菌效果, 但由于噬菌体抗性突变菌株的出现及增殖, 体外抑菌曲线均会在 3 h 或 6 h 后呈现上升趋势。

### 2.1.6 噬菌体对大蜡螟幼虫的体内抑菌效果

基于体外抑菌效果, 选择噬菌体 pKV-BS375-3.1 进行大蜡螟幼虫体内抑菌试验。空白对照和噬菌体处理组未发现大蜡螟幼虫的黑化和死亡(图 5A、5B)。大蜡螟幼虫感染组, 在感染 30 min 后分别注射 PBS 和不同 MOI 比例的噬菌体。与空白对照组相比, 感染但未经噬菌体处理组的大蜡螟幼虫在 96 h 内全部黑化, 死亡率为 90% (图 5C)。感染后经 MOI 为 100、10、1 噬菌体处理组的大蜡螟幼虫 96 h 内死亡率分别为 20%、60% 和 60% (图 5D–5F)。Kaplan-Meier 分析显示, 感染后噬菌体处理组(MOI 为 100)大蜡螟幼虫 96 h 内存活率极显著高于感染对照组(*K. variicola* BS375-3+PBS)大蜡螟幼虫( $P < 0.001$ )。感染后噬菌体处理组(MOI 为 10 和 1)的大蜡螟幼虫在 96 h 内存活率均为 40%, 但与感染对照组(*K. variicola* BS375-3+PBS)不存在显著差异( $P > 0.05$ , 图 5G)。

## 2.2 噬菌体基因组特征

5 株噬菌体基因组已提交至 GenBank, 登录号见表 3。5 株噬菌体均未携带耐药基因和毒力因子, 噬菌体 pKP-BM327-1.2 基因组全长

76 991 bp, GC 含量为 44.16%。根据国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)分类标准, 与现有的噬菌体核酸序列超过 95%即为同一种, 相似性大于 50%可归为同一属<sup>[23]</sup>。通过 BLASTn 比对, 该噬菌体为 *Schitoviridae* 科成员, 与 *Klebsiella* phage vB\_KpnP\_P184 (NC\_055919.1)的同源片段一致性最高(query cover=87%, Per. Ident=94.75%)。

噬菌体 pKP-M186-2.1 基因组全长 42 894 bp, GC 含量为 51%; pKP-M186-2.2 基因组全长 44 728 bp, GC 含量为 53.83%; 噬菌体 pKV-BS375-3.1 基因组全长 45 617 bp, GC 含量为 51.85% (表 1)。三者同属于 *Autographiviridae* 科成员, 但噬菌体 pKP-M186-2.1 与 pKV-BS375-3.1 同属于 *Molineuxvirinae* 亚科成员, 其中噬菌体 pKP-M186-2.1 与 *Klebsiella* phage IME184 (MZ398244.1)同源片段的一致性最高(query cover=83%, Per. Ident=93.45%), 噬菌体 pKV-BS375-3.1 与 *Proteus* phage PmP19 (MT680615.1)的同源片段一致性最高(query cover=87%, Per. Ident=95.08%); 而 pKP-M186-2.2 属于 *Slopekvirinae* 亚科、*Drulisvirus* 属的成员, 与 *Klebsiella* phage KP34 (NC\_013649.2)的同源片段一致性最高(query cover=87%, Per. Ident=92.09%)。

噬菌体 pKP-BS317-1.1 则属于 *Drexelviriidae* 科 *Webervirus* 属的成员, 基因组全长 48 933 bp, GC 含量为 50.22%, 与 *Klebsiella* phage IME268 (MZ398242.1)的同源片段一致性最高(query cover=92%, Per. Ident=94.74%) (表 3)。

## 2.3 噬菌体基因功能与比较基因组学分析

本研究中噬菌体基因功能注释率较低(20%–30%), 大部分编码序列(coding sequence, CDS)为未知功能蛋白, 被注释的基因整体上呈模块化结构, 包括 DNA 复制与调节模块、结构蛋白模块、裂解模块以及 DNA 包装模块, 5 株噬菌体均未携带溶源相关基因(图 6)。

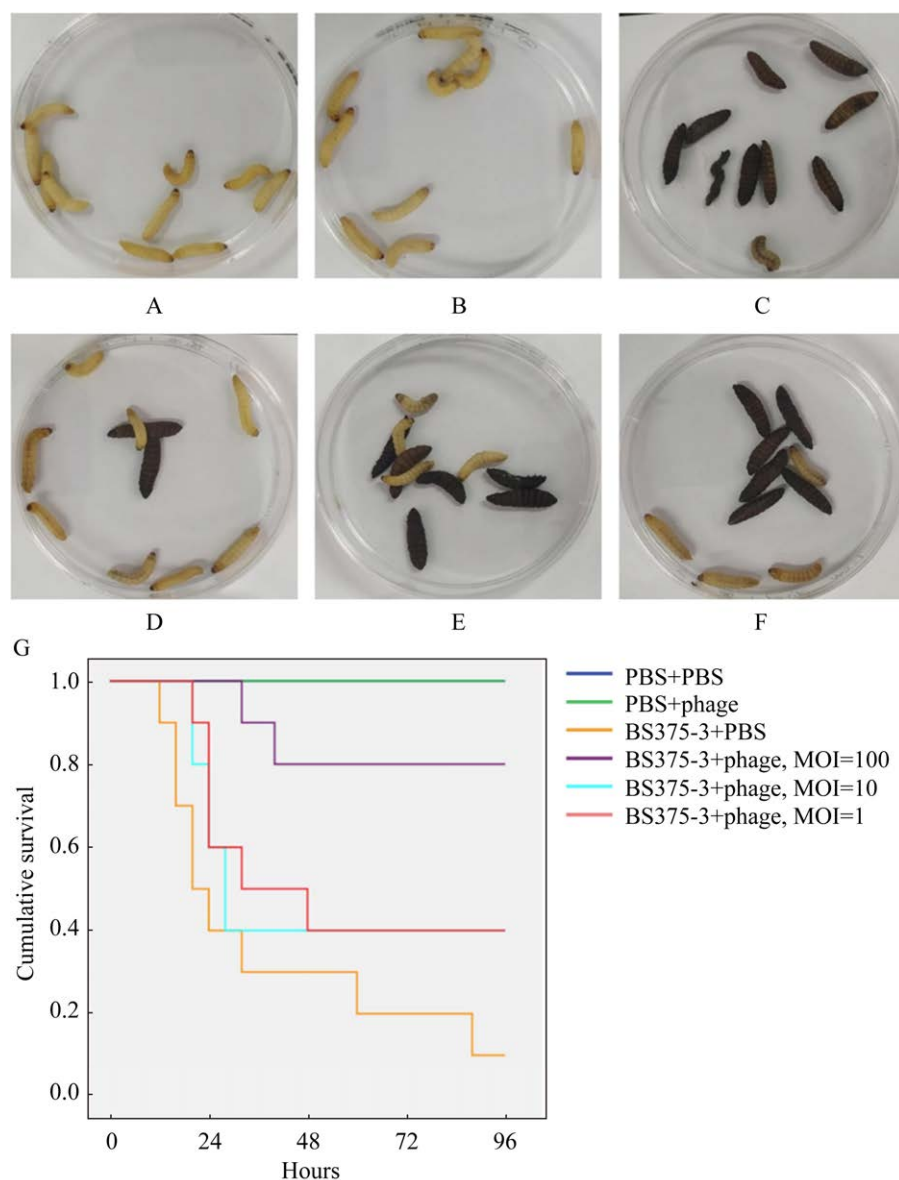


图 5 噬菌体 pKV-BS375-3.1 对感染 *Klebsiella variicola* BS375-3 大蜡螟幼虫的保护效果

Figure 5 Therapeutic effect of bacteriophage PKV-BS375-3.1 on larvae of the *Galleria mellonella* infected with *Klebsiella variicola* BS375-3. A: Blank control, injection of PBS alone. B: Injected with PBS and phage. C: The control was injected with *K. variicola* BS375-3 and PBS. D: Injected *K. variicola* BS375-3 and phage (MOI=100). E: Injected *K. variicola* BS375-3 and phage (MOI=10). F: Injected *K. variicola* BS375-3 and phage (MOI=1). G: Survival curve of the larva of the *Galleria mellonella*. If the mellonella larva wriggles or responds to physical stimuli, it is considered alive; If it does not respond to physical stimuli and turns black, it is considered dead.

噬菌体 pKP-BM327-1.2 结构蛋白包括尾丝蛋白、尾蛋白、主要的衣壳蛋白、卷尺蛋白；末端酶大亚基和门户蛋白为包装蛋白；胸苷酸

酶、核苷二磷酸还原酶、HNH 归巢内切酶、单链 DNA 结合蛋白和 RNA 聚合酶等；内肽酶和穿孔素组成了噬菌体 pKP-BM327-1.2 的裂解系统。

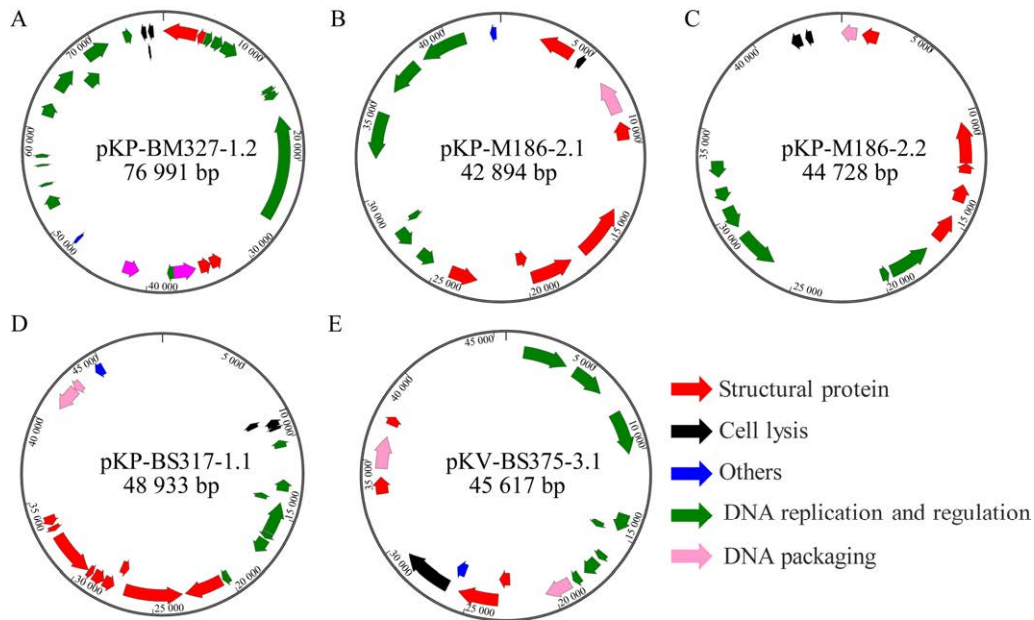


图 6 五种新分离的克雷伯氏菌噬菌体的基因组图谱

Figure 6 Genomic profiles of five newly isolated *Klebsiella* bacteriophages.

噬菌体 pKP-M186-2.1 的结构蛋白包括尾突蛋白、尾纤维蛋白、基板中心蛋白、尾管蛋白和头尾连接蛋白,这些蛋白构成了噬菌体的蛋白外壳及尾部形态;末端酶大亚基为噬菌体包装相关蛋白;DNA 复制和调节蛋白包括 DNA 聚合酶、DNA 解旋酶和 RNA 聚合酶等;裂解相关蛋白为内肽酶;此外, CDS 41 编码 Ocr 蛋白,该蛋白具有阻断 I 型 DNA 限制酶的 DNA 结合功能,因此可以阻止噬菌体 DNA 被宿主细菌限制酶切割。

噬菌体 pKP-M186-2.2 基因组的结构蛋白包括尾丝蛋白、尾管蛋白、主要的衣壳蛋白和头尾连接蛋白;包装相关蛋白为末端酶大亚基;裂解相关蛋白包括信号锚释放内容素 (signal-anchor-release endolysin, SAR-endolysin) 和膜融合蛋白(U-spanin), SAR-endolysin 在噬菌体感染周期中被合成为无酶活性的整体膜蛋白,然后从膜中释放后通过构象重构被激活,可降解宿主肽聚糖,并与 pinholin 和 spanin 蛋白一起参与导致宿主细胞程序化裂解释放成熟病毒颗粒

的一系列事件。一旦 pinholin 渗透了宿主细胞膜, SAR 内容素便被释放到周质并水解肽聚糖层。膜融合蛋白可使外膜与内膜融合,促进子代病毒粒子的释放。DNA 复制和调节蛋白包括 DNA 聚合酶、核苷酸激酶和 RNA 聚合酶。

噬菌体 pKP-BS317-1.1 具有丰富的尾部相关结构蛋白,包括尾丝蛋白、尾尖附着蛋白、尾尖组合蛋白、尾尖蛋白、卷尺蛋白、噬菌体尾部组装伴侣蛋白、尾管蛋白;包装蛋白包括末端酶小亚基和末端酶大亚基;DNA 复制和调节蛋白包括单链 DNA 结合蛋白、DNA 转录结合调控因子 Cro、腺嘌呤甲基化酶等;噬菌体的裂解系统为典型的“穿孔素-裂解酶”二元裂解系统,由穿孔素、裂解酶和 U-spanin 组成。

噬菌体 pKV-BS375-3.1 的结构蛋白包括尾管蛋白、尾丝蛋白和装饰蛋白;包装蛋白包括门户蛋白和末端酶大亚基;DNA 复制和调节蛋白包括 RNA 聚合酶、DNA 解旋酶和 DNA 聚合酶等;肽聚糖水解酶 gp36 为裂解相关蛋白。



## 2.4 噬菌体内溶素的系统发育分析

基于 GenBank 数据库筛选克雷伯氏菌噬菌体内溶素氨基酸序列,并与本研究中的克雷伯氏菌噬菌体共同构建内溶素氨基酸序列系统发育树。本研究中, *Przondovirus* 属噬菌体编码的内溶素为水解聚糖与多肽间酰胺键的 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶, pKP-M186-2.1 与 *Autographiviridae*、*Molineuxvirinae* 家族的 *Klebsiella* phage vB\_KpnP\_ZK1、*Klebsiella* phage Kp7 和 *Klebsiella* phage K1-ULIP33 处于同一分支,该分支噬菌体所编码的内溶素为内肽酶,作用于四肽侧链和五肽交联桥上的肽键,具有相同作用位点内溶素的还有 *Slopekvirus*、*Sugarlandvirus* 属噬菌体。*Taipeivirus*、*Lastavirus* 和 *Youseivirus* 属噬菌体编码的裂解酶是作用于

聚糖  $\beta$ -1,4 糖苷键的 N-乙酰基胞壁质酶。噬菌体 pKP-BS317-1.1 与 *Webervirus* 属的其他噬菌体处于同一分支,该分支噬菌体编码的裂解酶为信号锚释放内溶素 (SAR-endolysin),该裂解酶首先以无裂解活性的形式分泌,通过 N 末端 SAR 结构域锚定在膜上,以避免受感染的宿主过早裂解<sup>[24]</sup>。因此,本研究中克雷伯氏菌噬菌体内溶素显示功能多样性,且内溶素在克雷伯氏菌噬菌体属间保守(图 7,内侧二层)。N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶型内溶素噬菌体分离自中国和美国,内肽酶型内溶素噬菌体分离自中国、美国、法国和德国,N-乙酰基胞壁质酶型内溶素的噬菌体分离自美国、塞尔维亚和韩国,提示内溶素的类型与地域无明显关联(图 7,外侧一层)。

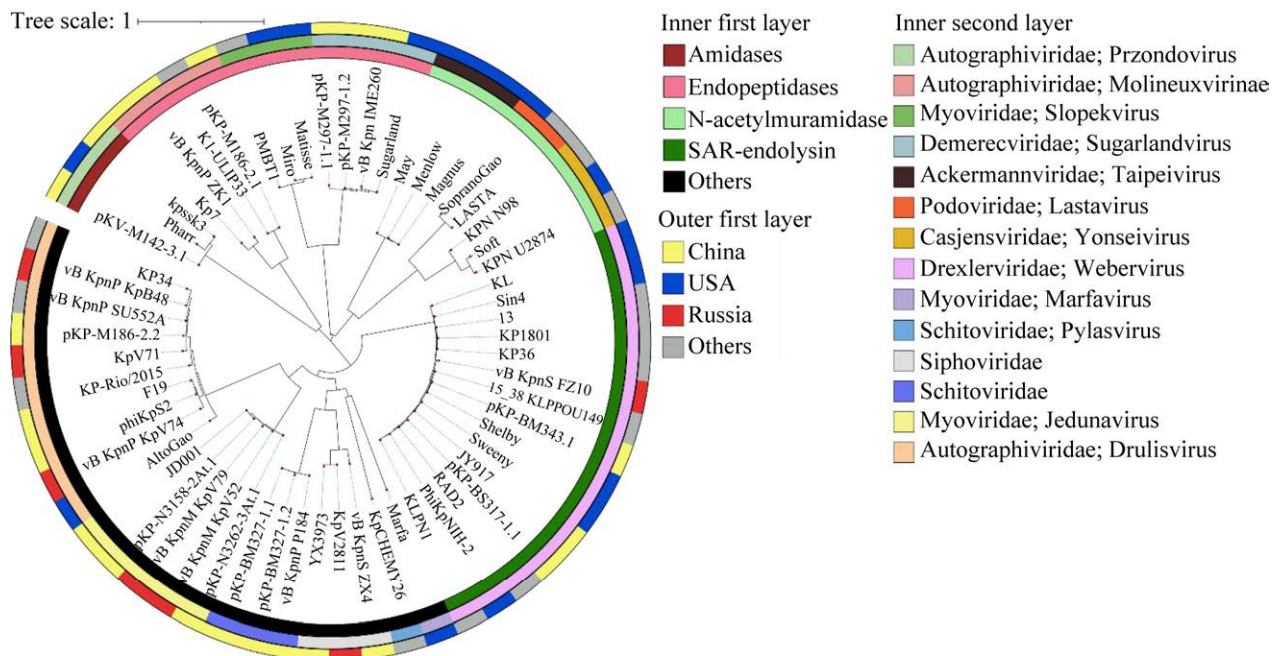


图 7 克雷伯氏菌噬菌体内溶素系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree of endolysin of *Klebsiella* phage. Inner first layer: Endolysin type; Inner second layer: Phage taxon; Outer first layer: Phage isolation countries.

### 3 讨论与结论

噬菌体是天然存在且特异性裂解细菌的病毒<sup>[25]</sup>, 在针对多重耐药菌的抢救性治疗方面显示出良好效果<sup>[12,26]</sup>, 噬菌体治疗已成为后抗生素时代细菌治疗的研究热点<sup>[27]</sup>。本研究以 3 株 *K. pneumoniae* 和 1 株 *K. variicola* 为宿主菌, 从污水、人类粪便及猪粪便中分离出 4 株 *K. pneumoniae* 噬菌体 (pKP-BM327-1.2、pKP-M186-2.1、pKP-M186-2.2 和 pKP-BS317-1.1) 与 1 株 *K. variicola* 噬菌体 (pKV-BS375-3.1)。5 株噬菌体在 -20~37 °C 保持较为稳定的活性。仅有少数报道其分离的噬菌体可在一定时间内耐受高温<sup>[19]</sup>, 在高温胁迫下, 噬菌体可通过基因突变、蛋白质改变进而发生适应性进化来保持自身的稳定性和复制能力, 从而促进其对高温环境的适应<sup>[28-31]</sup>。

噬菌体 pKP-BM327-1.2 潜伏期长达 20 min, 而 pKV-BS375-3.1 潜伏期小于 10 min, 有研究认为噬菌体的裂解时间与穿孔素 (holin) 密切相关<sup>[32]</sup>。穿孔素是由双链 DNA (dsDNA) 噬菌体编码的一类具有跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD)、多达 52 个科 (7 个超科) 的膜蛋白<sup>[33]</sup>, 被称为细菌裂解的“分子定时器”。李艳<sup>[34]</sup> 的研究发现, 穿孔素的突变发生在跨膜区前端的序列中时, 裂解时间与野生株相差不过 5 min, 而突变发生在第二跨膜区序列时, 裂解时间为 5 (M73L)–50 min (L82Q), 具有极显著差异, 表明 holin 蛋白跨膜结构域的氨基酸差异对噬菌体的裂解时间具有重要影响。

噬菌体 pKP-BM327-1.2、pKP-M186-2.1、pKP-M186-2.2 和 pKV-BS375-3.1 在电镜下形态相似, 均为短尾噬菌体 (图 1)。结合噬菌体基因组聚类分析, pKP-BM327-1.2 属于 *Schitoviridae* 科成员, 仅与 *Klebsiella* phage vB\_KpnP\_P184 (query cover=87%, Per. Ident=94.75%) 和

vB\_KpP\_FBKp27 (query cover=87%, Per. Ident=93.61%) 同源性较高, 表明 pKP-BM327-1.2 可能为一种新型噬菌体<sup>[23]</sup>。pKP-M186-2.1 和 pKV-BS375-3.1 属于 *Autographiviridae* 科、*Molineuxvirinae* 亚科成员, 但无法确定种属。pKP-M186-2.2 属于 *Autographiviridae* 科、*Slopekvirinae* 亚科、*Drulisvirus* 属的成员, 与 *Klebsiella* phage KP34 同源性最高 (query cover=87%, Per. Ident=92.09%)。而 pKP-BS317-1.1 为典型的长尾噬菌体 (尾部长度约为 153 nm), 属于 *Drexelvriidae* 科、*Webervirus* 属的成员。

噬菌体的宿主范围主要取决于噬菌体编码的受体结合蛋白 (receptor binding proteins, RBPs)<sup>[35]</sup>, 其主要成分包括尾纤维或者尾刺蛋白。RBPs 介导噬菌体与宿主细胞表面受体的初始接触, 并且对于启动感染过程至关重要<sup>[36]</sup>。本研究中, 3 株噬菌体表现出宿主特异性, pKP-M186-2.1、pKP-M186-2.2 和 pKP-BS317-1.1 仅裂解原宿主菌, 而对其余受试菌无裂解作用; 而噬菌体 pKV-BS375-3.1 具有宽宿主谱, 可裂解受试菌中的 8 株细菌, 包括 3 个菌种: 肺炎克雷伯氏菌、变栖克雷伯氏菌及准肺炎克雷伯氏菌。绝大多数克雷伯氏菌噬菌体将胞外荚膜多糖作为初始受体, 它们的 RBPs 多显示解聚酶活性<sup>[37-38]</sup>, 可以主动结合和降解荚膜多糖<sup>[39]</sup>。噬菌体 pKP-M186-2.1 基因组中, ORF2 被 pfam 注释为果胶酸裂解酶家族蛋白 (pectate lyase superfamily protein), 也被注释为刺突蛋白, 与已有研究描述中解聚酶与结构蛋白共享开放阅读框 (open reading frame, ORF), 使得噬菌体尾刺结构蛋白具有解聚酶活性相符。

内容素 (endolysin) 是噬菌体感染细菌的后期合成的一种细胞壁水解酶<sup>[40]</sup>, 参与肽聚糖的水解以释放噬菌体后代<sup>[41]</sup>。研究表明, 253 个乳

噬菌体携带 10 种不同类型的内溶素<sup>[41]</sup>。此外分枝杆菌噬菌体中也观察到此类现象,感染了耻垢分枝杆菌 mc2155 的 220 个噬菌体中找到 26 个内溶素结构<sup>[42]</sup>。本研究中克雷伯氏菌噬菌体内溶素包括 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶、内肽酶、N-乙酰胞壁质酶和 SAR-endolysin 等,与上述研究中能够感染同一属(或种)细菌的噬菌体所携带的 endolysin 呈现多样化相似。

本研究中,不同噬菌体表现出不同的体外抑菌效果。整体来说,噬菌体在前 3–6 h 抑菌效果最好,随后出现噬菌体抗性菌。先前的研究表明,肺炎克雷伯氏菌噬菌体 P24 在 1 h 内裂解杀死  $10^8$  CFU/mL 宿主菌,并持续抑制细菌生长 4 h<sup>[43]</sup>,与之相比,本研究中所分离噬菌体具有更长的抑菌时间。噬菌体抗性菌的出现是噬菌体疗法的重要挑战,但噬菌体抗性可能会导致细菌对抗生素耐药性的丧失。研究表明, *K. pneumoniae* 77 与噬菌体 KP36 作用后,约半数突变株(14/31)的质粒丢失 *bla*<sub>CTX-M</sub>、*ant*(3'')、*sul2*、*folA*、*mph(E)/mph(G)* 基因,从而恢复对抗生素的敏感性<sup>[44]</sup>。另一研究发现,对万古霉素和达托霉素耐药的粪肠球菌由于 *Epa* (胞外多糖生物合成基因)的突变而产生了噬菌体的抗性,但对细胞壁和细胞膜靶向抗生素重新敏感<sup>[45-46]</sup>。不仅如此,噬菌体抗性的出现还会导致细菌毒力的降低,例如,单核增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 被证明获得噬菌体抗性后磷壁酸糖基化基因发生突变,这导致其在小鼠体内模型中毒力减弱,以及对 Caco-2 上皮细胞和 HepG2 肝细胞细胞系的入侵缺陷<sup>[47]</sup>。因此,噬菌体鸡尾酒疗法或噬菌体与抗生素联合治疗对于预防和抑制噬菌体抗性菌的出现具有良好前景。

本研究对变栖克雷伯氏菌噬菌体 pKV-BS375-3.1 的体内抑菌效果进行评估,结果显示注射噬菌体 pKV-BS375-3.1 不会导致大蜡

螟幼虫死亡(图 5B),与噬菌体具有较高的生物安全性相符<sup>[22,48-49]</sup>。高剂量噬菌体(MOI 为 100)与其他组相比,在保护细菌感染的大蜡螟幼虫上具有显著作用,而以中剂量(MOI 为 10)和低剂量(MOI 为 1)的噬菌体与感染对照组相比,无显著性差异(图 5G),可以认为噬菌体的治疗效果与噬菌体数量呈正相关性。目前,研究人员对变栖克雷伯氏菌噬菌体的探究较少,仅发现 Ghanaim 等<sup>[50]</sup>和 Senevirathne 等<sup>[51]</sup>的相关报道。变栖克雷伯氏菌噬菌体 KPP-1 在韩国淡水样品中被分离,属于 *Vequintavirinae* 亚科、*Mydovirus* 属<sup>[51]</sup>。基于 NCBI 在线工具 Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行噬菌体全基因组序列比对,与本研究中变栖克雷伯氏菌噬菌体 pKV-BS375-3.1 基因组未发现显著相似性,提示变栖克雷伯氏菌噬菌体具有多样性。噬菌体 KPP-1 仅可裂解 32 株受试菌中的 2 株(均为变栖克雷伯氏菌),而本研究中噬菌体 pKV-BS375-3.1 具有更宽的宿主范围(图 2)。另外,噬菌体 pKV-BS375-3.1 的抑菌效果(图 4E)优于 KPP-1 (3 h 内显著抑制宿主的生长),造成这种差异的机制还需要进一步探究。因此,本研究中对于裂解多株受试菌的变栖克雷伯氏菌噬菌体生物学特性的全面表征可为后续应用及研究提供理论依据。

总之,本研究中分离并分析了 4 株肺炎克雷伯氏菌噬菌体和 1 株变栖克雷伯氏菌噬菌体生物学表型,它们被归类于 *Schitoviridae*、*Molineuxvirinae*、*Drulisvirus* 和 *Webervirus* 家族成员,均具有良好的体外抑菌活性。尤其是具有宽宿主谱、短潜伏期的变栖克雷伯氏菌噬菌体 pKV-BS375-3.1 在治疗 *Klebsiella* sp. 感染方面具有潜在应用价值。内溶素在克雷伯氏菌噬菌体中呈多样性和属内保守性,这一发现为噬菌体抗菌药物研发提供重要启示。



## 参考文献

- [1] 梅艳芳. K57 荚膜血清型肺炎克雷伯菌的微生物及临床感染特征[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2018.  
MEI YF. Microbiological characteristics and clinical features of serotype K57 *Klebsiella pneumoniae*[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2018 (in Chinese).
- [2] HOLT KE, WERTHEIM H, ZADOKS RN, BAKER S, WHITEHOUSE CA, DANCE D, JENNEY A, CONNOR TR, HSU LY, SEVERIN J, BRISSE S, CAO HW, WILKSCH J, GORRIE C, SCHULTZ MB, EDWARDS DJ, van NGUYEN K, NGUYEN TV, DAO TT, MENSINK M, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(27): E3574-E3581.
- [3] PACZOSA MK, MECSAS J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2016, 80(3): 629-661.
- [4] LI L, YU T, MA YN, YANG ZJ, WANG WJ, SONG XB, SHEN Y, GUO TT, KONG J, WANG MY, XU H. The genetic structures of an extensively drug resistant (XDR) *Klebsiella pneumoniae* and its plasmids[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, 8: 446.
- [5] RODRÍGUEZ-MEDINA N, BARRIOS-CAMACHO H, DURAN-BEDOLLA J, GARZA-RAMOS U. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans[J]. Emerging Microbes & Infections, 2019, 8(1): 973-988.
- [6] GARZA-RAMOS U, SILVA-SANCHEZ J, BARRIOS H, RODRIGUEZ-MEDINA N, MARTÍNEZ-BARNETCHE J, ANDRADE V. Draft genome sequence of the first hypermucoviscous *Klebsiella variicola* clinical isolate[J]. Genome Announcements, 2015, 3(2): e01352-e01314.
- [7] HOPKINS KL, FINDLAY J, DOUMITH M, MATHER B, MEUNIER D, D'ARCY S, PIKE R, MUSTAFA N, HOWE R, WOOTTON M, WOODFORD N. IMI-2 carbapenemase in a clinical *Klebsiella variicola* isolated in the UK[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(7): 2129-2131.
- [8] WANG BJ, PAN F, HAN DD, ZHAO WT, SHI YY, SUN Y, WANG C, ZHANG TD, ZHANG H. Genetic characteristics and microbiological profile of hypermucoviscous multidrug-resistant *Klebsiella variicola* coproducing IMP-4 and NDM-1 carbapenemases[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(1): e0158121.
- [9] MAATALLAH M, VADING M, KABIR MH, BAKHROUF A, KALIN M, NAUCLÉR P, BRISSE S, GISKE CG. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113539.
- [10] BIKARD D, EULER CW, JIANG WY, NUSSENZWEIG PM, GOLDBERG GW, DUPORTET X, FISCHETTI VA, MARRAFFINI LA. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(11): 1146-1150.
- [11] SALMOND GPC, FINERAN PC. A century of the phage: past, present and future[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(12): 777-786.
- [12] FEDERICI S, KREDO-RUSSO S, VALDÉS-MAS R, KVIATCOVSKY D, WEINSTOCK E, MATIUHIN Y, SILBERBERG Y, ATARASHI K, FURUICHI M, OKA A, LIU B, FIBELMAN M, WEINER IN, KHABRA E, CULLIN N, BEN-YISHAI N, INBAR D, BEN-DAVID H, NICENBOIM J, KOWALSMAN N, et al. Targeted suppression of human IBD-associated gut microbiota commensals by phage consortia for treatment of intestinal inflammation[J]. Cell, 2022, 185(16): 2879-2898.e24.
- [13] WU J, ZENG H, QIAN X, LI Y, XUE F, REN J, DAI J, TANG F. Pre-treatment with phages achieved greater protection of mice against infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* than post-treatment[J]. Research in Veterinary Science, 2022, 150: 72-78.
- [14] NIR-PAZ R, GELMAN D, KHOURI A, SISSON BM, FACKLER J, ALKALAY-OREN S, KHALIFA L, RIMON A, YERUSHALMY O, BADER R, AMIT S, COPPENHAGEN-GLAZER S, HENRY M, QUINONES J, MALAGON F, BISWAS B, MOSES AE, MERRIL G, SCHOOLEY RT, BROWNSTEIN MJ, et

- al. Successful treatment of antibiotic-resistant, poly-microbial bone infection with bacteriophages and antibiotics combination[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2019, 69(11): 2015-2018.
- [15] YEHL K, LEMIRE S, YANG AC, ANDO H, MIMEE M, TORRES MT, deLa FUENTE-NUNEZ C, LU TK. Engineering phage host-range and suppressing bacterial resistance through phage tail fiber mutagenesis[J]. *Cell*, 2019, 179(2): 459-469.e9.
- [16] WANG ZF, KONG LC, LIU Y, FU Q, CUI ZL, WANG J, MA JJ, WANG HG, YAN YX, SUN JH. A phage lysin fused to a cell-penetrating peptide kills intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in keratinocytes and has potential as a treatment for skin infections in mice[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(12): e00380-18.
- [17] 巩倩雯, 李一昊, 曾颜, 于沛欣, 钱新杰, 王瑜欣, 戴建君, 汤芳. 特异性识别 K1 荚膜大肠杆菌的噬菌体 PNJ1809-36 生物学特性及全基因组分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(6): 1677-1688.
- GONG QW, LI YH, ZENG H, YU PX, QIAN XJ, WANG YX, DAI JJ, TANG F. Biological characteristics and whole genome analysis of phage PNJ1809-36 target *Escherichia coli* K1[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(6): 1677-1688 (in Chinese).
- [18] LI M, LI P, CHEN L, GUO GL, XIAO YY, CHEN L, DU H, ZHANG W. Identification of a phage-derived depolymerase specific for KL64 capsule of *Klebsiella pneumoniae* and its anti-biofilm effect[J]. *Virus Genes*, 2021, 57(5): 434-442.
- [19] SOFY AR, EL-DOUGDOUG NK, REFAEY EE, DAWOUD RA, HMED AA. Characterization and full genome sequence of novel KPP-5 lytic phage against *Klebsiella pneumoniae* responsible for recalcitrant infection[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(4): 342.
- [20] BERTELS F, SILANDER OK, PACHKOV M, RAINEY PB, van NIMWEGEN E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(5): 1077-1088.
- [21] ESTRADA BONILLA B, COSTA AR, van den BERG DF, van ROSSUM T, HAGEDOORN S, WALINGA H, XIAO MF, SONG WC, HAAS PJ, NOBREGA FL, BROUNS SJJ. Genomic characterization of four novel bacteriophages infecting the clinical pathogen *Klebsiella pneumoniae*[J]. *DNA Research*, 2021, 28(4): dsab013.
- [22] PU MF, HAN PJ, ZHANG GY, LIU YC, LI YH, LI F, LI MZ, AN XP, SONG LH, CHEN YM, FAN HH, TONG YG. Characterization and comparative genomics analysis of a new bacteriophage BUCT610 against *Klebsiella pneumoniae* and efficacy assessment in *Galleria mellonella* larvae[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(14): 8040.
- [23] ADRIAENSSENS E, BRISTER JR. How to name and classify your phage: an informal guide[J]. *Viruses*, 2017, 9(4): 70.
- [24] SUN QG, KUTY GF, AROCKIASAMY A, XU M, YOUNG R, SACCHETTINI JC. Regulation of a muralytic enzyme by dynamic membrane topology[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(11): 1192-1194.
- [25] LU B, YAO XP, HAN GL, LUO ZD, ZHANG JR, YONG K, WANG Y, LUO Y, YANG ZX, REN MS, CAO SZ. Isolation of *Klebsiella pneumoniae* phage vB\_KpnS\_MK54 and pathological assessment of endolysin in the treatment of pneumonia mice model[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 854908.
- [26] ESKENAZI A, LOOD C, WUBBOLTS J, HITES M, BALARJISHVILI N, LESHKASHELI L, ASKILASHVILI L, KVACHADZE L, van NOORT V, WAGEMANS J, JAYANKURA M, CHANISHVILI N, de BOER M, NIBBERING P, KUTATELADZE M, LAVIGNE R, MERABISHVILI M, PIRNAY JP. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 302.
- [27] LUONG T, SALABARRIA AC, ROACH DR. Phage therapy in the resistance era: where do we stand and where are we going?[J]. *Clinical Therapeutics*, 2020, 42(9): 1659-1680.
- [28] 李金花, 白雨凡, 马春兰, 季秀玲, 魏云林. 噬菌体温度适应性的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(S1): 139-145.
- LI JH, BAI YF, MA CL, JI XL, WEI YL. Research progress on temperature adaptation of bacteriophage[J].

- China Biotechnology, 2022, 42(S1): 139-145 (in Chinese).
- [29] COX J, SCHUBERT AM, TRAVISANO M, PUTONTI C. Adaptive evolution and inherent tolerance to extreme thermal environments[J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10(1): 75.
- [30] KERING KK, ZHANG XX, NYARUABA R, YU JP, WEI HP. Application of adaptive evolution to improve the stability of bacteriophages during storage[J]. Viruses, 2020, 12(4): 423.
- [31] WHITTINGTON AC, ROKYTA DR. Biophysical spandrels form a hot-spot for kosmotropic mutations in bacteriophage thermal adaptation[J]. Journal of Molecular Evolution, 2019, 87(1): 27-36.
- [32] CATALÃO MJ, GIL F, MONIZ-PEREIRA J, PIMENTEL M. Functional analysis of the holin-like proteins of mycobacteriophage Ms6[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(11): 2793-2803.
- [33] REDDY BL, SAIER MH Jr. Topological and phylogenetic analyses of bacterial holin families and superfamilies[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1828(11): 2654-2671.
- [34] 李艳. 猪链球菌噬菌体穿孔素(holin)的亚细胞定位及拓扑结构[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2013.
- LI Y. Subcellular localization and topology of holin encoded by *Streptococcus suis* bacteriophage[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [35] DOWAH ASA, CLOKIE MRJ. Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria[J]. Biophysical Reviews, 2018, 10(2): 535-542.
- [36] BERTOZZI SILVA J, STORMS Z, SAUVAGEAU D. Host receptors for bacteriophage adsorption[J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(4): fnw002.
- [37] DUNSTAN RA, BAMERT RS, BELOUSOFF MJ, SHORT FL, BARLOW CK, PICKARD DJ, WILKSCH JJ, SCHITTENHELM RB, STRUGNELL RA, DOUGAN G, LITHGOW T. Mechanistic insights into the capsule-targeting depolymerase from a *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(1): e0102321.
- [38] SQUEGLIA F, MACIEJEWSKA B, ŁATKA A, RUGGIERO A, BRIERS Y, DRULIS-KAWA Z, BERISIO R. Structural and functional studies of a *Klebsiella* phage capsule depolymerase tailspike: mechanistic insights into capsular degradation[J]. Structure (London, England: 1993), 2020, 28(6): 613-624.e4.
- [39] LATKA A, LEMIRE S, GRIMON D, DAMS D, MACIEJEWSKA B, LU T, DRULIS-KAWA Z, BRIERS Y. Engineering the modular receptor-binding proteins of *Klebsiella* phages switches their capsule serotype specificity[J]. mBio, 2021, 12(3): e00455-e00421.
- [40] CAHILL J, YOUNG R. Phage lysis: multiple genes for multiple barriers[J]. Advances in Virus Research, 2019, 103: 33-70.
- [41] MARQUES AT, TANOEIRO L, DUARTE A, GONÇALVES L, VÍTOR JMB, VALE FF. Genomic analysis of prophages from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. Microorganisms, 2021, 9(11): 2252.
- [42] PAYNE KM, HATFULL GF. Mycobacteriophage endolysins: diverse and modular enzymes with multiple catalytic activities[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34052.
- [43] FANG QQ, FENG Y, McNALLY A, ZONG ZY. Characterization of phage resistance and phages capable of intestinal decolonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in mice[J]. Communications Biology, 2022, 5: 48.
- [44] MAJKOWSKA-SKROBEK G, MARKWITZ P, SOSNOWSKA E, LOOD C, LAVIGNE R, DRULIS-KAWA Z. The evolutionary trade-offs in phage-resistant *Klebsiella pneumoniae* entail cross-phage sensitization and loss of multidrug resistance[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(12): 7723-7740.
- [45] CHATTERJEE A, JOHNSON CN, LUONG P, HULLAHALLI K, McBRIDE SW, SCHUBERT AM, PALMER KL, CARLSON PE Jr, DUERKOP BA. Bacteriophage resistance alters antibiotic-mediated intestinal expansion of enterococci[J]. Infection and Immunity, 2019, 87(6): e00085-e00019.
- [46] HO K, HUO WW, PAS S, DAO R, PALMER KL. Loss-of-function mutations in *epaR* confer resistance to  $\phi$ NPV1 infection in *Enterococcus faecalis* OG1RF[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018, 62(10): e00758-18.

- [47] SUMRALL ET, SHEN Y, KELLER AP, RISMONDO J, PAVLOU M, EUGSTER MR, BOULOS S, DISSON O, THOUVENOT P, KILCHER S, WOLLSCHIED B, CABANES D, LECUIT M, GRÜNDLING A, LOESSNER MJ. Phage resistance at the cost of virulence: *Listeria monocytogenes* serovar 4b requires galactosylated teichoic acids for InlB-mediated invasion[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(10): e1008032.
- [48] JEON J, YONG D. Two novel bacteriophages improve survival in *Galleria mellonella* infection and mouse acute pneumonia models infected with extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(9): e02900-e02918.
- [49] OLSZAK T, ZARNOWIEC P, KACA W, DANIS-WLODARCZYK K, AUGUSTYNIAK D, DREVINEK P, de SOYZA A, McCLEAN S, DRULIS-KAWA Z. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of environmental bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(14): 6021-6033.
- [50] GHANAIM AM, FOAAD MA, GOMAA EZ, ABDELFATAH EL DOUGDOUG K, MOHAMED GE, ARISHA AH, KHAMIS T. Bacteriophage therapy as an alternative technique for treatment of multidrug-resistant bacteria causing diabetic foot infection[J]. *International Microbiology*, 2023. 26: 343–359.
- [51] SENEVIRATHNE A, LEE J, de ZOYSA M, NIKAPITIYA C. Genome characterization of bacteriophage KPP-1, a novel member in the subfamily *Vequintavirinae*, and use of its endolysin for the lysis of multidrug-resistant *Klebsiella variicola in vitro*[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(1): 207.