



驯化噬菌体提高噬菌体对碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的杀菌能力

王梦竹¹, 赵梦诗¹, 马晓丹², 曾玲霜², 杨秋娥^{2*}, 邓辉^{1*}

1 中西兽医结合与动物保健福建省高等学校重点实验室, 福建 福州 350002

2 福建省土壤环境健康与调控重点实验室, 福建 福州 350002

王梦竹, 赵梦诗, 马晓丹, 曾玲霜, 杨秋娥, 邓辉. 驯化噬菌体提高噬菌体对碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的杀菌能力[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 254-267.

WANG Mengzhu, ZHAO Mengshi, MA Xiaodan, ZENG Lingshuang, YANG Qiu'e, DENG Hui. Phage training improves the bactericidal ability against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 254-267.

摘要: 【目的】本研究旨在通过驯化提高噬菌体的裂解能力并降低其宿主菌耐受性产生的速度, 从而提高对重要病原菌-碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKp)的杀菌效果。【方法】以临床 CRKp 菌株 Kp2092 为宿主菌, 利用双层琼脂平板法从污水中分离噬菌体并分析其裂解谱; 对其中的广谱强裂解性噬菌体通过透射电镜观察其形态特征并进行全基因组测序; 通过噬菌体-宿主连续培养进行噬菌体驯化, 并比较驯化前后噬菌体生物学特性的差异。【结果】分离得到的 9 株肺炎克雷伯菌噬菌体中, 噬菌体 P55anc 裂解能力强且裂解谱广, 透射电镜观察发现其为短尾噬菌体。P55anc 基因组全长 40 301 bp, 包含 51 个编码序列, 其中 27 个具有已知功能, 主要涉及核酸代谢、噬菌体结构蛋白、DNA 包装和细胞裂解等。噬菌体 P55anc 经 9 d 的驯化后, 得到 3 株驯化噬菌体。驯化后噬菌体杀菌能力增强, 主要表现为细菌生长曲线显著下降、噬菌体暴发量增多、裂解谱扩大, 且宿主菌对其产生抗性的概率显著降低。与此同时, 驯化后的噬菌体在热处理、紫外暴露以及血清等环境下保持较好的稳定性。【结论】利用噬菌体-宿主连续培养的方法可对噬菌体进行驯化和筛选, 驯化后的噬菌体杀菌效果更强, 且在不同压力处理下的稳定性良好, 而细菌产生噬菌体抗性的概率也降低。

关键词: 细菌耐药性; 噬菌体治疗; 噬菌体驯化; 共进化

资助项目: 国家自然科学基金(32100150); 福建农林大学杰出青年科研人才项目(KXJ20002); 福建省科技厅重大专项(2021NZ029008)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32100150), the Outstanding Young Research Talents Program by Fujian Agriculture and Forestry University (KXJ20002), and the Major Project of Fujian Provincial Department of Science & Technology (2021NZ029008).

*Corresponding authors. E-mail: YANG Qiu'e, qiueyang2014@163.com; DENG Hui, deng12345hui@163.com

Received: 2023-06-14; Accepted: 2023-08-21; Published online: 2023-08-29

Phage training improves the bactericidal ability against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

WANG Mengzhu¹, ZHAO Mengshi¹, MA Xiaodan², ZENG Lingshuang², YANG Qiu'e^{2*}, DENG Hui^{1*}

¹ University Key Laboratory for Integrated Chinese Traditional and Western Veterinary Medicine and Animal Healthcare in Fujian Province, Fuzhou 350002, Fujian, China

² Fujian Provincial Key Laboratory of Soil Environmental Health and Regulation, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: [Objective] This study aims to improve the bactericidal ability of phages against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, a major pathogen in clinical practice, and reduce host resistance to phages by developing a novel method of phage training. [Methods] Phages were isolated from municipal wastewater by the double-layer agar plate method with clinical carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strain Kp2092 as the host, and their host ranges were analyzed. The morphological and genetic characteristics of a phage strain with strong lysis ability and a broad host range were analyzed by transmission electron microscopy and whole-genome sequencing. Phage training was performed by phage-host co-culture for generations, and the phages before and after training were compared in terms of biological properties such as bactericidal activity, optimal multiplicity of infection, one-step growth curve, and stability under different stress conditions. [Results] A total of 9 phage strains were isolated, in which P55anc was a short-tailed phage with the strongest lysis ability and the broadest host range. The genome (40 301 bp) of P55anc included 51 coding sequences, of which 27 showed possible functions involving nucleic acid metabolism, virion morphogenesis, DNA packaging, and host lysis. Three evolved phages of P55anc were obtained after 9 days of phage training. These evolved phages showed significantly enhanced bactericidal activities, manifested by the increased burst size, broadened host range, and reduced host resistance. Moreover, the evolved phages maintained stable when being exposed to heat, ultraviolet, and serum treatments. [Conclusion] Phage training by phage-host co-culture can be employed to obtain evolved phages with enhanced bactericidal effects. Furthermore, the evolved phages reduced the host resistance and remained stable under different stress conditions.

Keywords: bacterial drug resistance; phage therapy; phage training; co-evolution

抗生素的广泛使用在抑制细菌生长的同时,还对细菌施加了选择压力,促进了耐药性的出现和传播,致使抗生素治疗失败^[1]。一旦病原菌获得抗生素耐药性(antimicrobial resistance, AMR),将会导致多重耐药菌株的出现,甚至进化出“超级细菌”。其中,治疗携带碳青霉烯酶编码基因的碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(carbapenem-

resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKp)感染已经成为了一个世界性的问题^[2]。在我国,院内 CRKp 感染又以高传播性、高致病性及高耐药性的 ST11 型为主,因此解决 ST11 型 CRKp 感染问题已迫在眉睫。

针对 ST11 型 CRKp 耐药菌感染,噬菌体(bacteriophage, phage)有望成为替代或补充传统

抗生素的候选物^[3]。噬菌体是具有多种抗菌效应的靶向细菌病毒,可以减少人体内的多重耐药菌感染^[4]。与此同时,噬菌体具有宿主特异性高的显著优点,这使得机体微生物群落不受噬菌体疗法的影响^[5]。近年来,噬菌体疗法在治疗分枝杆菌^[6]、肺炎克雷伯菌、霍乱杆菌^[7]等细菌感染等疾病方面均取得进展。

细菌和噬菌体在共同进化过程中相互施加强大的选择压力,如果这种相互作用是长期的,将可能引起快速的进化,从而导致双方抗性和传染性的增加^[8]。细菌的噬菌体抗性进化对噬菌体治疗的有效性构成了不可避免的威胁,并且针对单一噬菌体的抗性已被证明在体外很容易出现^[9]。另一方面,有文献指出,经过驯化的噬菌体在侵染宿主菌时可降低宿主菌抗性的产生^[10],从而改善治疗结果。

本研究以前期临床分离的 CRKp (Kp2092) 为宿主菌,从福州市浮村污水处理厂和福建省星源中德牧业有限公司采集的污水样品中筛选出 9 株肺炎克雷伯菌噬菌体。其中噬菌体 P55anc 侵染能力最强且裂解谱最广,故以该噬菌体及其宿主菌 Kp2092 为研究对象进行噬菌体驯化,以得到侵染和杀菌能力更强且宿主菌不易产生抗性的噬菌体进化株,为增强噬菌体杀菌能力并避免抗噬菌体细菌的出现提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株及样品

本研究所使用的宿主细菌为一株碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌 Kp2092,该细菌分离自临床病人痰液样品,并通过药敏试验测定最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)来评估其耐药情况。噬菌体分离所需污水样品于 2022 年 5 月采集自福州市浮村污水处理厂和福

建省星源中德牧业有限公司。

取保存于 -80°C 的肺炎克雷伯菌 20 μL 加入 2 mL 无菌 LB 肉汤中,振荡培养(37°C 、200 r/min,下同) 2–3 h 至指数生长期,置于 4°C 备用。

1.1.2 主要试剂和仪器

实验过程中所使用的 LB 琼脂培养基、LB 肉汤购自广东省环凯微生物科技有限公司;尿道定位显色培养基(urine orientation chromogenic medium, UTI)购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;噬菌体 DNA 提取试剂盒 DNeasy[®] Blood&Tissue Kit 购自 QIAGEN GmbH; DNase I 和 RNase-free 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;RNase A (1 000 mg/mL) 购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; Qubit Flex 购自 Thermo Fisher Scientific; Qubit 工作液 dsDNA 快速定量试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; SM 缓冲液购自上海源叶生物科技有限公司; Speactra Max[®] iD3 多功能酶标仪购自 Molecular Devices。

1.2 噬菌体的筛选和分离纯化

噬菌体的分离纯化方法参照文献[11]:将污水样品 12 000 r/min 离心 3 min,采用 0.22 μm 滤膜过滤上清液 3 遍后收集滤液备用。取滤液 1 mL 分别加至 60 株 ST11 型肺炎克雷伯菌的 1 mL 指数期菌液中,再加入 2 mL LB 肉汤, 37°C 振荡培养过夜后离心过滤,收集上清液即为噬菌体原液。

将噬菌体原液梯度稀释至 10^{-8} ,取各梯度稀释液 100 μL 至 100 μL 对应宿主菌液中混匀,静置 15 min 后加入 3.5 mL 0.6%半固体琼脂,倒入下层琼脂(1.5%琼脂培养基)中制备双层琼脂平板。 37°C 倒置过夜培养后观察有无噬菌斑。

用枪头挑取单个噬菌斑加入 500 μL 宿主菌液中,并加入 2 mL LB 肉汤后再次 37°C 培养,离心取上清过滤,滤液梯度稀释后制备双层琼脂

进行培养以纯化噬菌体, 重复上述步骤 3 次后得到纯化的噬菌体。将纯化的噬菌体滤液与 30% 甘油肉汤按 1:1 (体积比) 混合后保存于 -80°C 冰箱。

1.3 噬菌体裂解谱分析

根据已有文献报道^[11-12]修改, 本研究分析了 9 株噬菌体分离株对 60 株 ST11 型 CRKp 的裂解谱。将 60 株 CRKp 培养至指数期, 各取菌液 100 μL 加入 10 mL LB 琼脂中制备双层琼脂平板。将 9 株噬菌体与其宿主菌共培养 8-12 h 后离心过滤, 各取其噬菌体滤液 5 μL 滴于含不同 Kp 的双层琼脂平板上, 待滤液被吸收后倒置平板, 37°C 过夜培养后观察有无噬菌斑产生以及噬菌斑形态, 以附图 S1 [已提交至国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmcc.cn>), No. NMDCX0000222] 所示为标准(1 和 0.75 为透明噬菌斑, 0.5 和 0.25 为模糊噬菌斑)进行分类统计。根据噬菌体裂解谱结果, 选择裂解谱广、侵染能力强的噬菌体 P55anc 进行后续噬菌体生理特征及进化分析。

1.4 噬菌体 P55anc 形态观察

参考文献等^[13]的方法观察噬菌体形态: 取 100 μL P55anc 滤液滴于含有宿主菌 Kp2092 的双层琼脂平板上过夜培养, 取 100 μL 无菌水反复轻轻吹打噬菌斑后进行电镜拍摄。取 20 μL 噬菌体液滴到 200 目铜网上, 静置 5 min 后用滤纸吸掉多余液体, 干燥 1 min。向铜网加入 1 滴 1% 磷钨酸, 室温静置 10 min, 置于日立透射电子显微镜下观察噬菌体形态。

1.5 噬菌体基因组分析

提取噬菌体 DNA 过程中, 由于不同的噬菌体对不同的物质敏感性不同, 故本研究利用 DNeasy[®] Blood&Tissue Kit 试剂盒提取噬菌体 DNA。具体步骤参照文献[14]: 将 5 mL SM 缓冲液加入到有噬菌斑的平板中, 于 4°C 冰箱放置 12 h 后离心过滤。吸取滤液 450 μL 至 2 mL 离

管中, 加入 50 μL DNaseI 10 \times buffer, 1 μL DNaseI (1 U/ μL) 和 1 μL RNase A (1 000 mg/mL), 37°C 加热 1.5 h 后加入 20 μL 0.5 mol/L EDTA。加入 1.25 μL proteinase K (20 mg/mL), 56°C 加热 1.5 h。后续操作按照 DNeasy[®] Blood&Tissue Kit 试剂盒说明书进行。纯化后的 DNA 送至福州生工生物工程股份有限公司进行 Illumina 测序, 通过 CLC Genomics Workbench 软件去除宿主 DNA 序列, 并利用 SPAdes 从头拼接噬菌体基因组, 利用 Prokka 和 NCBI 注释该基因组, 最后利用 Snap Gene[®] 6.0.2 绘制噬菌体 P55anc 的基因图谱^[11,13,15]。将 P55anc 的基因组序列上传至 NCBI 的 GenBank 数据库, 登录号为 OR387886。

1.6 P55anc 系统发育树分析

为了说明 P55anc 与其他同源噬菌体之间的系统进化关系, 利用 P55anc 全基因组序列进行 NCBI 检索, 获得 4 株同源噬菌体序列, 并与其他 5 种不同属的噬菌体序列通过 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (version 11.0) 软件^[16]绘制系统发育树。

1.7 噬菌体 P55anc 及其宿主菌共进化

根据已有报道^[17]修改, 将 Kp2092 培养至指数期, 取 180 μL 加入 96 孔板中, 再加入 20 μL 噬菌体 P55anc 培养液, 共培养液 37°C 振荡培养 24 h 后按 1:200 接入新的 LB 肉汤后继续振荡培养, 连续传代培养 9 d, 共设置 30 个重复。在第 1、3、5、7、9 天分离每个样品中的噬菌体, 具体方法参照 1.3。将 5 μL 噬菌体滤液滴加于含宿主菌 Kp2092 的双层琼脂平板上, 37°C 培养并观察噬菌斑产生情况。如有较为透明的噬菌斑, 则表明该样品中仍有可感染 Kp2092 的噬菌体, 并计算可感染 Kp2092 的噬菌体所占 30 个重复样品的比率(%)。在共进化实验第 9 天, 仅 3 个重复的噬菌体样品可产生透明噬菌斑, 挑取单个噬菌斑培养后进行保存, 3 株噬菌体进化株分别命

名为 P55evo-1、P55evo-2、P55evo-3，并以其为研究对象进行后续实验。参照 1.5 的方法对噬菌体进化株 P55evo-1 基因组测序并进行单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析，以确定 P55evo-1 突变位点。

1.8 进化后噬菌体杀菌能力测定

挑取 Kp2092 单菌落加入 1 mL LB 肉汤，混匀后取 180 μL 加入 96 孔板中，再加入 20 μL 噬菌体滤液混匀后，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。使用 Spectra Max[®] iD3 多功能酶标仪每小时取点测定 OD_{600} ，并利用 GraphPad prism (version 8.3.0) 软件绘制 24 h 生长曲线。

进化过程中分离一株噬菌体耐受细菌，将其命名为 Kp2092evo，验证 3 株进化噬菌体对该耐受细菌的杀菌能力。实验步骤及方法同上。

1.9 进化后噬菌体裂解谱分析

参照 1.3 的方法分析进化后噬菌体裂解谱，并与 P55anc 裂解谱进行对比。

1.10 进化后噬菌体 MOI 及一步生长曲线测定

根据王九儒等^[11]的方法测定最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)及一步生长曲线^[18]。挑取 Kp2092 单菌落于 LB 肉汤培养 1.5 h，用磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS) 梯度稀释，各梯度稀释液取 10 μL 滴于 LB 平板并十字晃开，37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后计算菌液浓度(CFU/mL)。将培养好的噬菌体通过双层琼脂平板法计算噬菌体滴度(PFU/mL)。按照噬菌体/细菌浓度为 1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01 和 0.000 001 的比例混合噬菌体与菌液，使混合液体积为 200 μL ，再加至 2 mL LB 肉汤中，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 5 h，共培养液经离心后取上清过滤，滤液梯度稀释后，各稀释液利用双层琼脂平板法测定噬菌体滴度。重复 3 次，产生最高滴度的噬菌体/细菌比例即为最佳 MOI。

按最佳 MOI 混合噬菌体及其宿主菌共 400 μL ，再加至 20 mL LB 肉汤中，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 min。共培养液经离心后弃上清，加入 5 mL LB 肉汤重悬沉淀，再次离心弃上清液，重新加入 20 mL LB 肉汤 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。每 10 min 取样 1 mL，通过双层琼脂平板法测定噬菌体滴度，重复 3 次。绘制噬菌体一步生长曲线，分析噬菌体侵染宿主菌的潜伏期、裂解期和平台期并计算裂解量。裂解量=裂解末期噬菌体滴度/感染初期细菌浓度^[11]。

1.11 进化后噬菌体稳定性测定

热稳定性^[16]：取 1 mL 噬菌体滤液在 4、30、37、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 和 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 2 h 后梯度稀释，运用双层琼脂平板法计算噬菌体滴度。

紫外稳定性：取 1 mL 噬菌体滤液置于无菌培养皿中，在距离紫外灯 30 cm 处静置照射 0、5、10、15、20、25、30 min 后取样 20 μL 梯度稀释，通过双层琼脂平板法测定噬菌体滴度。

pH 敏感性：取 100 μL 噬菌体滤液加入 900 μL pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10 的无菌 LB 肉汤，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h 后梯度稀释，通过双层琼脂平板法测定噬菌体滴度。

根据报道实验方法^[11]进行改进：将血清分为 2 份，一份放 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，另一份 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min 为对照。将 PFU 为 10^6 的 500 μL 噬菌体滤液分别加入到新鲜和灭活的血清中，混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡培养，分别于第 1、2、4、6、8 小时取样，样品通过双层琼脂平板法测定噬菌体滴度。

2 结果与分析

2.1 Kp2092 MIC 测定及噬菌体分离纯化

通过测定 Kp2092 对 14 种抗生素的 MIC 值可知 Kp2092 呈现多重耐药，对美罗培南、头孢喹肟、环丙沙星等抗生素耐药(MIC 值 ≥ 64)，而

仅对替加环素、多粘菌素敏感(表 1)。细菌 Kp2092 的基因组多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)为 ST11 型, 是我国院内肺炎克雷伯菌感染较流行的 ST 亚型^[2]。以该菌株为宿主菌分离噬菌体, 将能更好地筛选出针对多重耐药菌的噬菌体。本研究以污水为样品, 共分离纯化得到 9 株可侵染 Kp2092 的噬菌体。

2.2 噬菌体裂解谱分析

将分离得到的 9 株噬菌体侵染 60 株 ST11 型 CRKp, 评估其侵染能力。结果显示不同噬菌体具有不同的裂解谱和裂解能力(图 1)。9 株噬菌体均可侵染 Kp2092, 但仅有 P55anc 可产生透明噬菌斑, 其他噬菌体产生的噬菌斑较模糊。并且 P55anc 可侵染最多宿主菌(25/60), 其中侵染 20 株菌时可产生明显噬菌斑。因此, 基于裂解能力强, 裂解谱广的噬菌体 P55anc 进行后续驯化实验。

2.3 噬菌体 P55anc 形态

噬菌体 P55anc 在其宿主菌平板上形成的噬菌斑边缘光滑、有透亮圆形的晕环(图 2A)。电

镜结果(图 2B)显示, P55anc 是头部直径约 63 nm 和尾部直径约 11 nm 的短尾噬菌体。

表 1 Kp2092 对临床重要抗生素的敏感性
Table 1 Antibiotic sensitivity of Kp2092

Antibiotics	MIC (μg/mL)	Sensitivity
Mero	≥64	R
IMP	≥64	R
AMP	≥32	R
AMC	≥32	R
TZP	≥128	R
CZ	≥64	R
CTX	≥64	R
CRO	≥64	R
FEP	≥64	R
ATM	≥64	R
CIP	≥64	R
LEV	≥8	R
TGC	2	S
CS	2	S

S: Sensitive; R: Resistant; Mero: Meropenem; IMP: Imipenem; AMP: Ampicillin; AMC: Amoxicillin/Potassium clavulanate; TZP: Tazobactam/Piperacillin; CZ: Cefazolin; CTX: Cefquinome; CRO: Ceftriaxone; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; CIP: Ciprofloxacinhydrochloride; LEV: Levofloxacin tablets; TIG: Tigecycline; CS: Colistinsulfate.

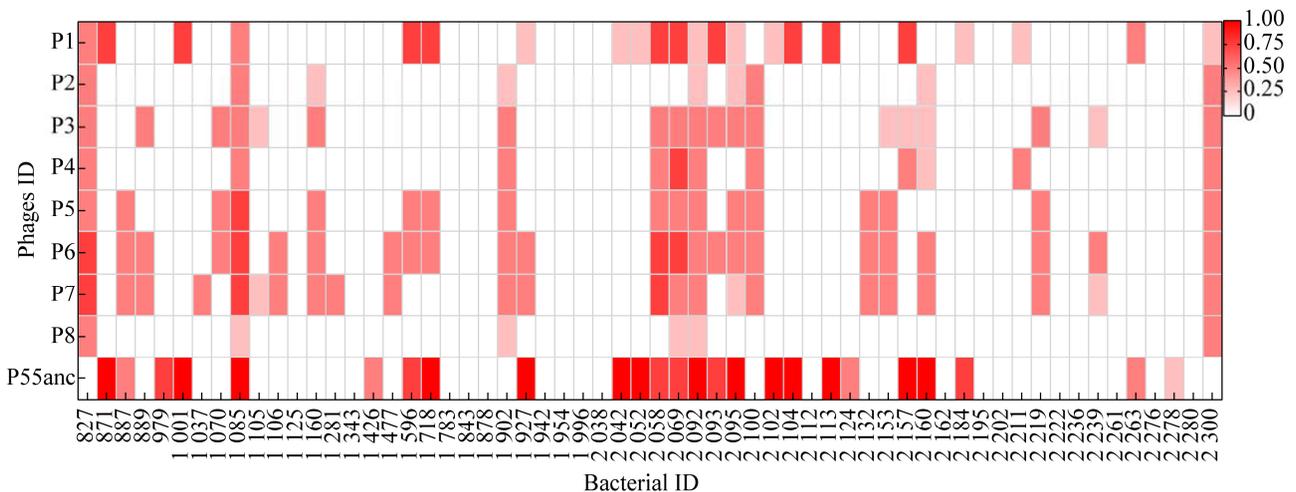


图 1 肺炎克雷伯菌噬菌体裂解谱

Figure 1 Lytic spectrum of phage to *Klebsiella pneumoniae*. The ordinate and abscissa are the name of phage (phage ID) and bacteria (bacteria ID), respectively; The deeper color represents the stronger infection ability.

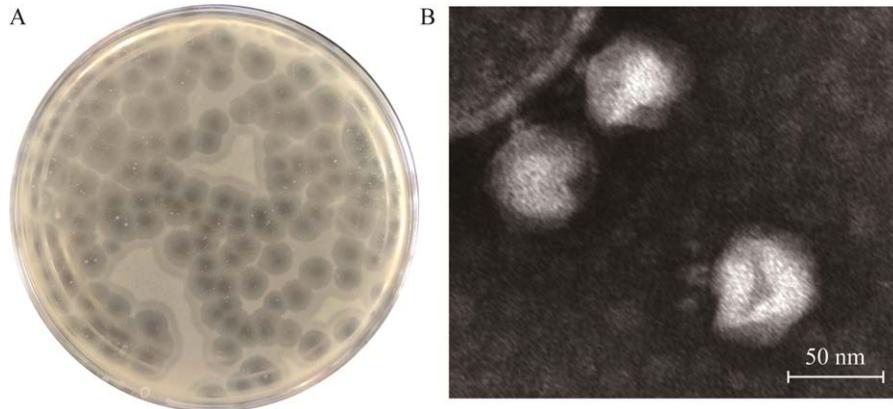


图 2 噬菌体 P55anc 平板和电镜形态

Figure 2 Plaque and morphology of phage P55anc. A: Phage plaque of P55anc on agar plate. B: Microscopic graph of P55anc.

2.4 噬菌体基因组分析

噬菌体基因组分析能够提高对噬菌体基因组的理解,并提高噬菌体应用于临床治疗的可靠性、安全性。基因组分析发现噬菌体 P55anc 基

因组全长 40 301 bp, 包含 51 个编码序列(coding sequences, CDSs), 其中 27 个编码已知功能的蛋白, 其余为假设蛋白, 未发现与耐药或毒力相关的基因(图 3)。

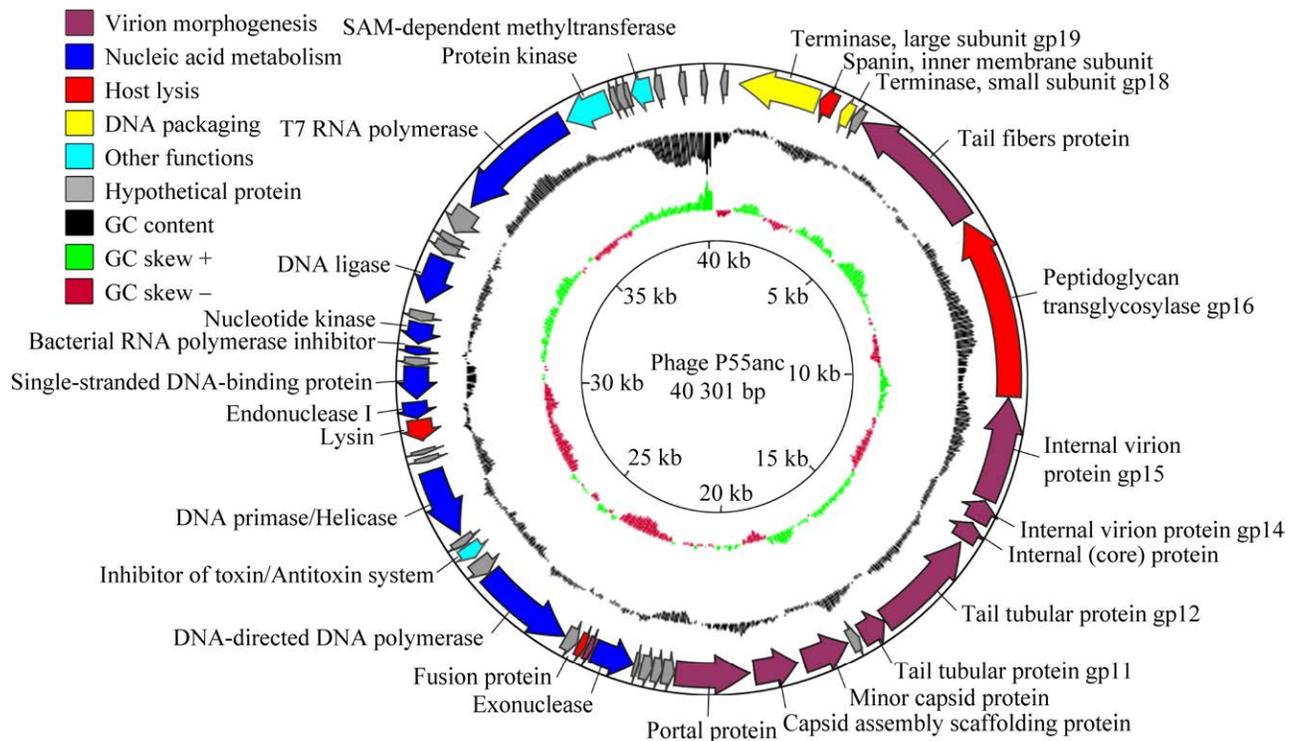


图 3 噬菌体 P55anc 全基因组图

Figure 3 Genomic map of phage P55anc.

依据功能进行分类, 27 个编码已知功能蛋白的 CDSs 中, 9 个编码噬菌体结构蛋白: 尾纤维蛋白(ORF 6)、内部病毒体蛋白(ORF 8、9、10)、尾管蛋白(ORF 11、12)、次要衣壳蛋白(ORF 14)、衣壳装配支架蛋白(ORF 15)和门户蛋白(ORF 16); 9 个 CDSs 涉及核酸代谢: 外切核酸酶(ORF 21)、DNA 聚合酶(ORF 25)、DNA 引物酶/解旋酶(ORF 29)、核酸内切酶 I (ORF 33)、单链 DNA 结合蛋白(ORF 34)、细菌 RNA 聚合酶抑制剂(ORF 36)、核苷酸激酶(ORF 37)、DNA 连接酶(ORF 39)和 T7 RNA 聚合酶(ORF 43); 4 个 CDSs 参与细胞裂解: 膜融合蛋白(ORF 3)、葡聚糖转糖基酶(ORF 7)、融合蛋白(ORF 23)和内溶菌素(ORF 32); 而终止酶大亚基(ORF 2)和终止酶小亚基(ORF 4)参与噬菌体 DNA 包装。另外 3 个其他功能的蛋白为毒素/抗毒素系统抑制剂(ORF 27)、蛋白激酶(ORF 44)和 SAM 依赖性甲基转移酶(ORF 48)。详情见表 S1 (NMDC 编号 No. NMDCX0000221)。

2.5 系统发育树分析

通过 NCBI 噬菌体数据库比对分析, P55anc 与已知肺炎克雷伯菌噬菌体基因组序列 *Klebsiella* phage K5-4 (NC 047799)、*Klebsiella*

phage cp29 (OX 335401)、*Klebsiella* phage Kp11 (ON 148528) 及大肠杆菌噬菌体基因组 *Enterobacteria* phage K30 (NC 015719) 的匹配度较高(覆盖率>85%, 一致性>90%), 且以上已知噬菌体均为 Przondovirus 属病毒。而 P55anc 与其他 5 种不同属的噬菌体基因组覆盖率低(<60%)。基于噬菌体全基因组序列绘制的系统发育树, 如图 4 所示, P55anc 与肺炎克雷伯菌噬菌体(*Klebsiella* phage) K5-4 (NC 047799) 位于同一分支, 自展值为 81, 进一步说明 P55anc 属于 Przondovirus 属病毒。

2.6 噬菌体 P55anc 及其宿主菌共进化

对宿主-噬菌体混合培养液进行连续传代培养, 并验证共进化过程中噬菌体对原宿主菌的侵染能力。结果显示在为期 9 d 的进化实验中, 随着时间的推移, 可侵染 Kp2092 并产生透明噬菌斑的噬菌体样品个数不断下降(图 5A)。到第 9 天时, 在总共 30 个重复中, 只有 3 个重复的噬菌体仍保持对原宿主菌的强裂解能力, 占比从 100% 下降到 10%。3 个重复中分离纯化的噬菌体进化株(P55evo-1、P55evo-2、P55evo-3) 的噬菌斑形态如图 5B 所示, 中间为圆形透明斑且周围有光滑圆形晕环。

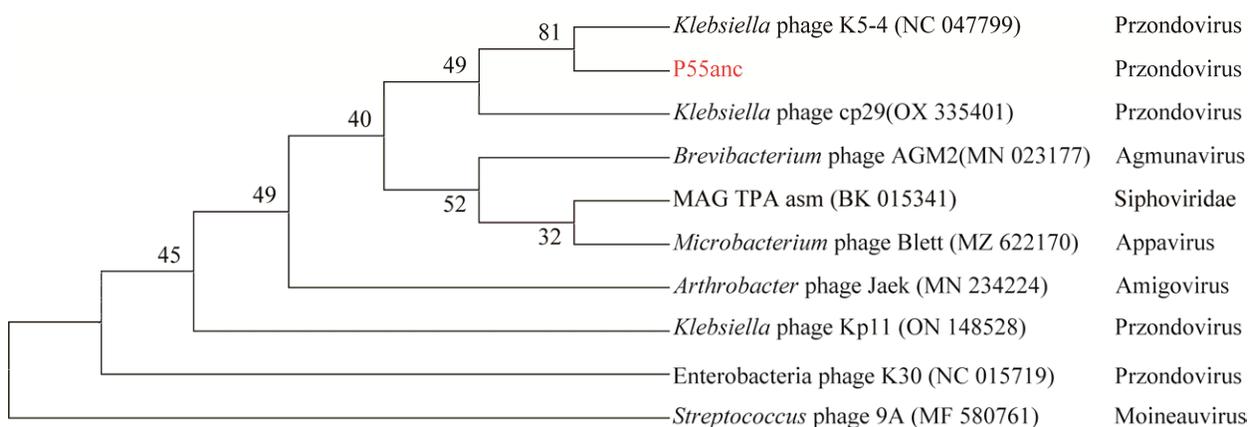


图 4 P55anc 系统发育树分析

Figure 4 Phylogenetic tree analysis of phage P55anc.

SNP 分析结果显示, 噬菌体进化株 P55evo-1 有 3 个突变位点, 分别位于尾管蛋白 (ORF 6)、尾纤维蛋白 (ORF 11) 和假定蛋白 (ORF 24) 中, 见附表 S2 (NMDC No. NMDCX0000222)。关于噬菌体受体研究将在今后的研究中进一步深入探究。

2.7 进化后噬菌体杀菌能力测定

初始噬菌体 P55anc 及 3 株进化噬菌体对 Kp2092 的杀菌曲线如图 6A 所示。由图可知,

噬菌体 P55anc 侵染的 Kp2092 在 6 h 时 OD_{600} 值开始上升, 表明 Kp2092 对 P55anc 产生了抗性; 而进化株 P55evo-1 或 P55evo-3 侵染的 Kp2092 在 24 h 呈现出很好的杀菌效果, 即 OD_{600} 无明显变化, 始终保持在 0.1, 表明 Kp2092 未对噬菌体产生噬菌体抗性。P55evo-2 侵染的 Kp2092 在 19 h 时呈现缓慢上升趋势, 到 24 h 时 OD_{600} 达到 0.2 左右, 此时依然具有杀菌能力。结果表明, 噬菌体进化株对细菌 Kp2092 有明显杀菌效果且

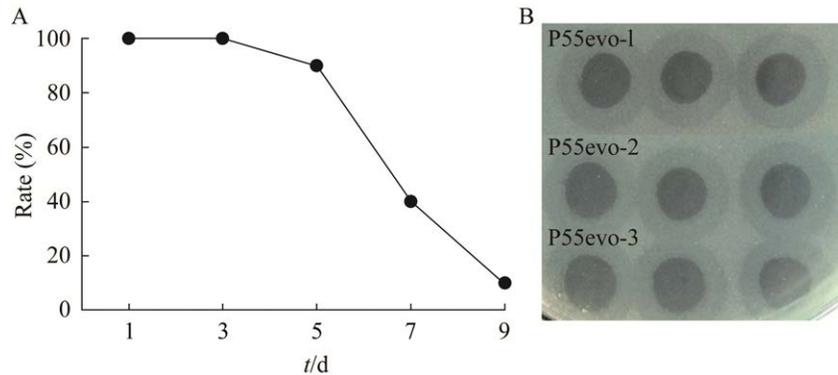


图 5 噬菌体驯化过程中噬菌体侵染能力的变化

Figure 5 The dynamics of infection ability of phage during 9-day training. A: Infection rate of the phage to Kp2092 during the co-evolutionary experiment. B: The plaque of three evolved phages at day 9.

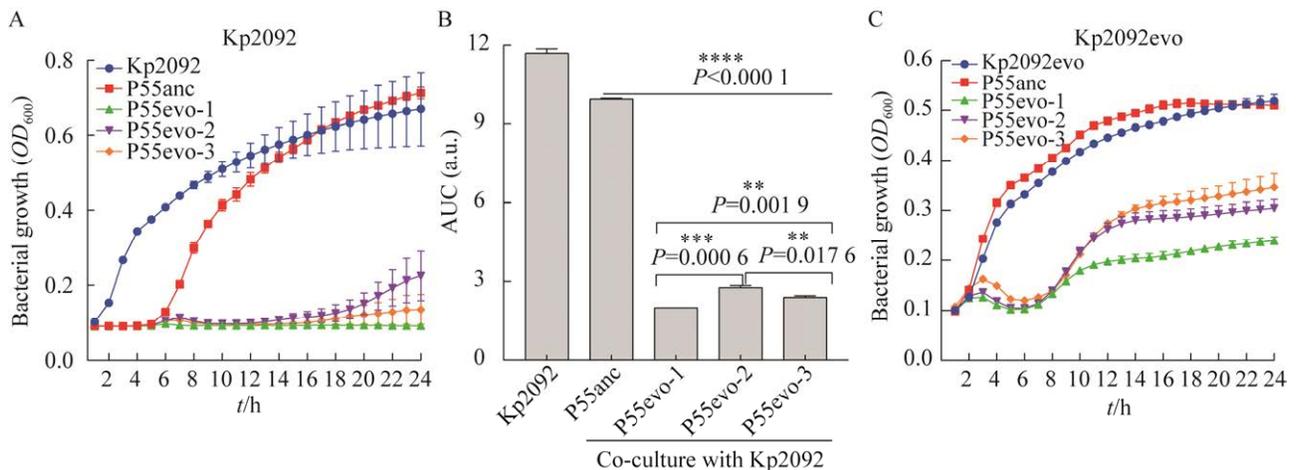


图 6 进化后噬菌体杀菌能力比较

Figure 6 Determination of bactericidal ability of evolved phages. A: Comparison of the bactericidal ability of evolved phages against Kp2092. B: Their comparisons by calculating the area under curve (AUC). C: Comparison of the bactericidal ability of evolved phages against Kp2092evo. ****: Very significant difference ($P < 0.0001$); ***: Very significant difference ($P < 0.001$); **: Significant difference ($P < 0.01$).

Kp2092 不易对噬菌体进化株产生抗性。P55anc 与 3 株进化株的曲线下面积(area under curve, AUC)均有显著差异($P < 0.0001$), 3 株进化株中两两比较也各有差异性。

与此同时, 分离一株对 P55anc 耐受的细菌 Kp2092evo, 即 P55anc 对该细菌没有杀菌或抑菌作用(图 6C)。然而, 3 株噬菌体进化株在 10 h 内对该耐受细菌保持良好杀菌能力, OD_{600} 保持在 0.2 左右, 进一步证明了进化后的噬菌体获得了比原始噬菌体更强的裂解能力。

2.8 进化后噬菌体裂解谱分析

对 P55anc 与 3 株进化后噬菌体的裂解谱进行比较分析。如图 7 所示, 与原始噬菌体相比, 进化后噬菌体增加了对 2 株 ST11 型 CRKp (Kp2219 和 Kp2300)的裂解能力, 使其裂菌谱增加至 27 株 ST11 型 CRKp。与此同时, 进化后噬菌体对其他细菌宿主的裂解能力也有所提升, 例如 P55anc 侵染 Kp1426 时产生模糊噬菌斑, 而进化株可产生透亮的噬菌斑, 表明进化噬菌体对该菌的裂解能力增强。

2.9 进化后噬菌体 MOI 及一步生长曲线测定

进化前后噬菌体的 MOI 如图 8A 所示, 当 MOI 为 0.0001 时, 噬菌体 P55anc 感染宿主后释放的子代噬菌体数量最多, 即 P55anc 的最佳 MOI 为 0.0001。而 3 株噬菌体进化株 P55evo-1、

P55evo-2 和 P55evo-3 的最佳 MOI 分别为 0.001、0.0001 和 0.001。噬菌体进化株相较于原噬菌体 P55anc 的最佳感染复数变大。

噬菌体 P55anc 及其 3 株进化株的一步生长曲线如图 8B 所示。噬菌体 P55anc 在 10 min 时开始暴发, 到 120 min 时到达平台期, 此时滴度为 1.01×10^{10} , 经计算 P55anc 裂解量为 16.8。P55evo-1 在 0–20 min 时处于潜伏期, 从 20 min 开始暴发, 到 70 min 时到达平台期, 此时滴度为 1.95×10^{10} , 裂解量为 32.5。P55evo-2 在 10 min 时处于潜伏期, 从 20 min 开始暴发, 到 100 min 时到达平台期, 此时滴度为 1.3×10^{11} , 裂解量为 216。P55evo-3 在 10 min 时处于潜伏期, 从 20 min 开始暴发, 到 100 min 时到达平台期, 此时效价为 1.5×10^{10} , 裂解量为 25。总体而言, 进化株的 MOI 增大且一步生长曲线提前 20–50 min 进入暴发期。将 4 株噬菌体的裂解量进行 t 检验分析(图 8C), 结果显示 3 株进化株的裂解量均显著高于 P55anc, 其中 P55evo-2 裂解量约为 P55anc 的 13 倍。

2.10 进化后噬菌体稳定性测定

通过不同温度、pH、紫外和血清的稳定性实验, 评估进化后噬菌体的稳定性。如图 9A 热稳定性结果所示, 噬菌体 P55anc 和 3 株噬菌体进化株(P55evo-1、P55evo-2、P55evo-3)在低

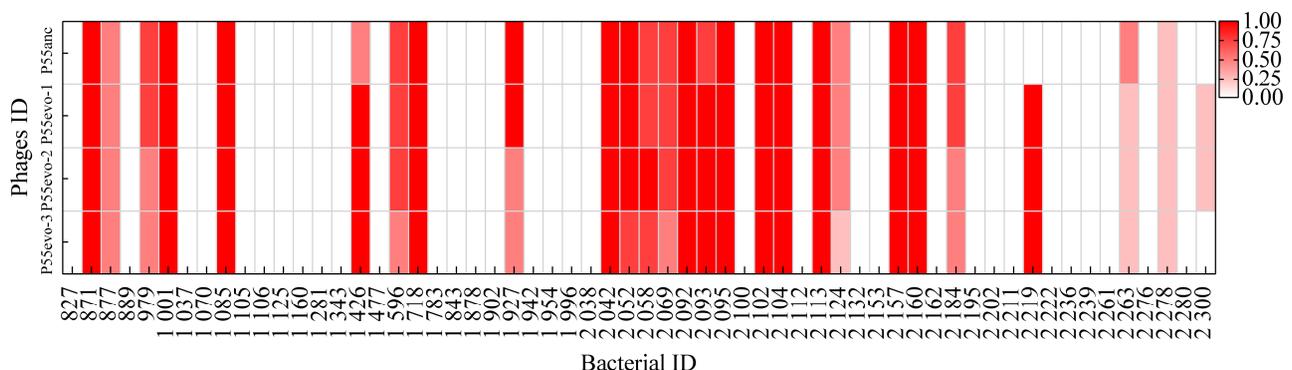


图 7 进化后噬菌体的裂解谱

Figure 7 Lytic spectrum of evolved-phages.

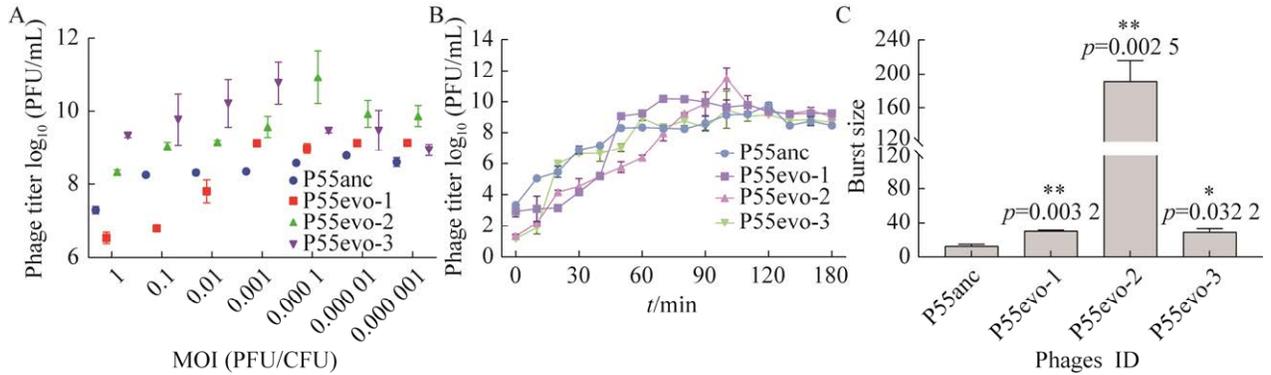


图 8 进化后噬菌体 MOI、一步生长曲线和暴发量的变化

Figure 8 Changes in phage MOI and one-step growth curve of evolved phages. A: Multiplicity of infection (MOI), it is calculated by dividing the phage PFU by bacterial density (CFU/mL). B: One-step growth curve. C: The comparison of phage burst sizes between parental and evolved phages. **: Significant difference ($P<0.01$); *: Significant difference ($P<0.05$).

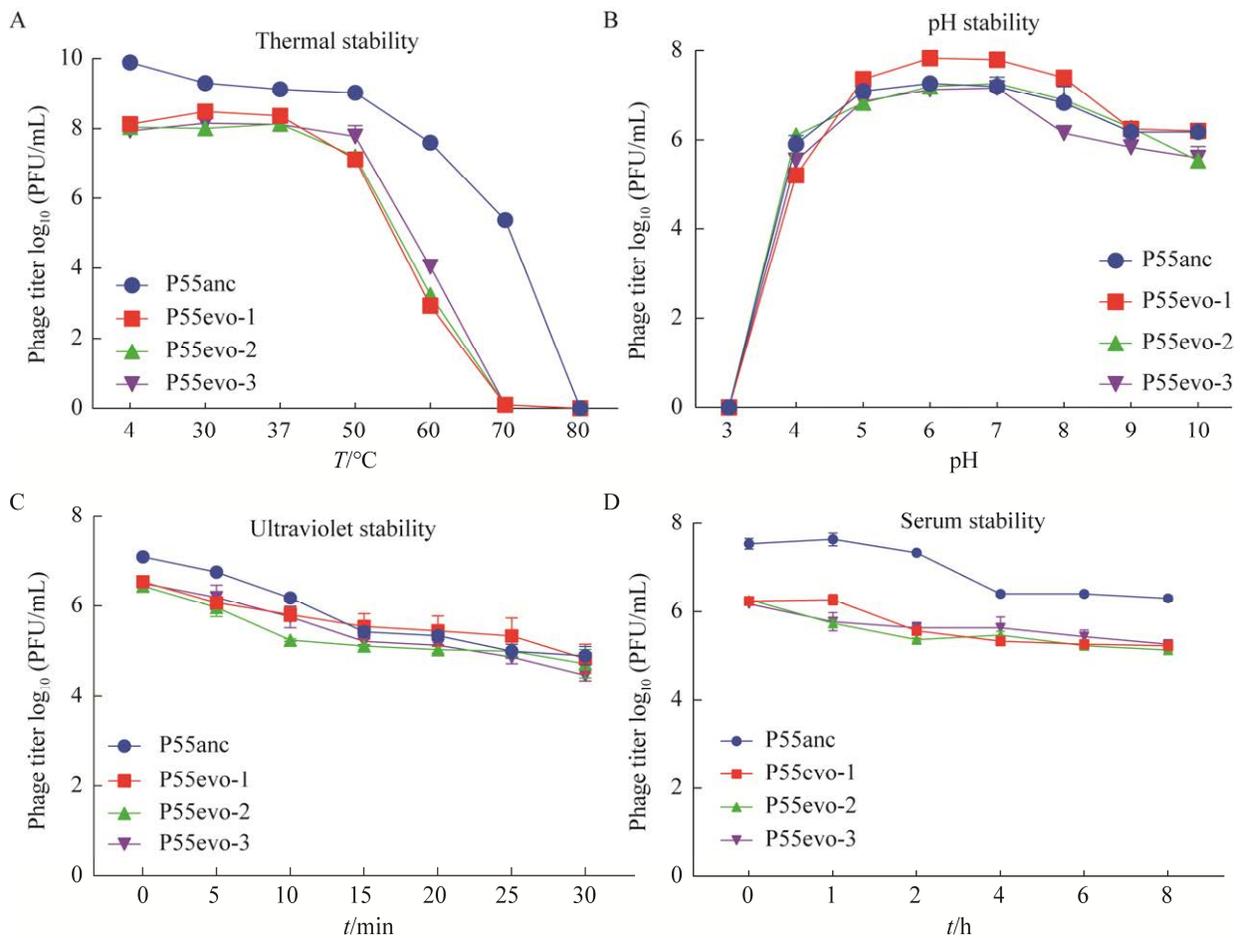


图 9 不同处理下噬菌体稳定性的比较

Figure 9 Comparison of bacteriophage stability under different treatments. A: Thermal stability comparison. B: Comparison of pH stability. C: Comparison of ultraviolet stability. D: Comparison of serum stability.

于 50 °C 时均能维持较稳定的滴度, 当温度高于 50 °C 时噬菌体滴度急剧下降。pH 稳定性实验结果(图 9B)显示, 各噬菌体在 pH 值 5–8 的环境中可稳定存在, pH 值大于 8 时滴度缓慢下降, 而 pH 值小于 4 时滴度急剧下降, 至 pH 值等于 3 时为 0。进化前后噬菌体在紫外暴露下的稳定性基本一致, 且均对紫外有较高的耐受性。在血清 8 h 处理下噬菌体稳定性高, 其各噬菌体滴度基本保持一致, 表明该噬菌体可应用于体内环境且保持较好的杀菌能力。

3 讨论与结论

肺炎克雷伯菌是临床上常见的一种条件致病菌, 可引起肺炎、脑膜炎、尿路感染与败血症等多种疾病^[19]。肺炎克雷伯菌的常规治疗方式是采用碳青霉烯类抗生素, 例如亚胺培南、美罗培南等^[20], 但由于抗生素的不规范使用, 导致临床上肺炎克雷伯菌出现多重耐药菌株^[21], 尤其是 ST11 型 CRKp 的出现给疾病的治疗带来巨大挑战。

迄今为止, 肺炎克雷伯菌耐药问题依旧严峻, 在全国细菌耐药监测网发布的 2021 年全国细菌耐药检测报告中指出, 肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物的耐药率平均为 10.9%, 且总体耐药率仍然呈缓慢上升趋势。多项研究表明噬菌体疗法在治疗肺炎克雷伯菌感染治疗中的有效性, 并已然成为抗生素的有效代替物之一^[22-23]。噬菌体广泛存在于自然环境中且易于分离, 本研究从 2 个不同地点收集污水样品, 通过双层琼脂平板法筛选出一株具有广谱型的碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌噬菌体(P55anc), 该噬菌体可侵染 25/60 株 ST11 型 CRKp, 且其中 20 株产生完全透明噬菌斑, 是侵染能力强、裂解谱广的噬菌体。通过电镜形态观察结合全基因组系统发育树分析可知, 该噬菌体为 Przondovirus 属短尾噬菌

体, 其基因组全长 40 301 bp, 包含 51 个编码序列, 其中未发现耐药或毒力相关基因, 表明 P55anc 不存在耐药和毒力扩散的问题, 可应用于临床治疗。

虽然噬菌体能很好地应用于肺炎克雷伯菌感染且对机体无害, 但噬菌体疗法因细菌对噬菌体耐受性的频繁出现而受到挑战^[24]。细菌和噬菌体在相互作用过程中共进化的推动微生物多样性的重要力量之一。在宿主和噬菌体都具有高的抗性/传染性遗传率的前提下, 宿主-噬菌体相互作用可以驱动快速的、相互的遗传变化^[25]。在与噬菌体共进化的过程中, 细菌已经发展出多种方法来抵抗噬菌体的侵染^[26]。由此宿主菌在被噬菌体侵染过程中易产生抗性, 该缺陷可能导致噬菌体疗法失败。

本研究中, 噬菌体 P55anc 侵染宿主菌 Kp2092 过程中, 前期 P55anc 可以完全抑制 Kp2092 的生长, 体现出良好的抑菌效果。但随着时间延长, Kp2092 逐渐产生对 P55anc 的抗性并逐步恢复生长活性, 直至 P55anc 无任何抑菌能力。通过共进化实验共获得 3 株进化株, 24 h 杀菌曲线表明 3 株进化株始终保持对 Kp2092 的侵染能力, 长时间内可很好地抑制细菌生长, 表明噬菌体进化株的抑菌能力更强且细菌不易产生噬菌体抗性。经计算, 噬菌体进化株裂解量均显著高于原噬菌体, 这可能是进化株抑菌能力更强的主要原因之一。与此同时, 噬菌体进化株的裂解谱与 P55anc 相比, 其侵染 CRKp 宿主菌的范围略有增加, 且总体依旧保持强裂解能力。与原噬菌体相比, 进化株的噬菌斑、MOI、一步生长曲线、热稳定性、pH 稳定性、紫外稳定性及人血清稳定性等生理特性无显著变化。基于 P55evo 进化株的特性与优势, 驯化后的噬菌体可在一定程度上解决临床上肺炎克雷伯菌的噬菌体耐受性问题, 对肺炎克雷伯菌感染疾病的治

疗具有重要意义,噬菌体进化具有提高噬菌体治疗效果方法的前景。

参考文献

- [1] GORDILLO ALTAMIRANO FL, KOSTOULIAS X, SUBEDI D, KORNEEV D, PELEG AY, BARR JJ. Phage-antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study[J]. *EBioMedicine*, 2022, 80: 104045.
- [2] YANG XM, SUN QL, LI JP, JIANG Y, LI Y, LIN JP, CHEN KC, CHAN EWC, ZHANG R, CHEN S. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 841-849.
- [3] ZURABOV F, ZHILENKOV E. Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation[J]. *Virology Journal*, 2021, 18(1): 1-20.
- [4] 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.
- [5] GOLKAR Z, BAGASRA O, PACE DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis[J]. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2014, 8(2): 129-136.
- [6] HATFULL GF. Mycobacteriophages: windows into tuberculosis[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(3): e1003953.
- [7] BHANDARE S, COLOM J, BAIG A, RITCHIE JM, BUKHARI H, SHAH MA, SARKAR BL, SU JL, WREN B, BARROW P, ATTERBURY RJ. Reviving phage therapy for the treatment of cholera[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2019, 219(5): 786-794.
- [8] HALL AR, SCANLAN PD, BUCKLING A. Bacteria-phage coevolution and the emergence of generalist pathogens[J]. *The American Naturalist*, 2011, 177(1): 44-53.
- [9] HESSE S, RAJAURE M, WALL E, JOHNSON J, BLISKOVSKY V, GOTTESMAN S, ADHYA S. Phage resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 evolves via diverse mutations that culminate in impaired adsorption[J]. *mBio*, 2020, 11(1): e02530-e02519.
- [10] BORIN JM, AVRANI S, BARRICK JE, PETRIE KL, MEYER JR. Coevolutionary phage training leads to greater bacterial suppression and delays the evolution of phage resistance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(23): e2104592118.
- [11] 王九儒, 赵飞扬, 李曼莉, 裴广倩, 范航, 张湘莉兰, 米志强, 童贻刚. 一株肺炎克雷伯菌噬菌体的生物学特性及全基因组分析[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(12): 3402-3413.
WANG JR, ZHAO FY, LI ML, PEI GQ, FAN H, ZHANG XLL, MI ZQ, TONG YG. Characterization and genome analysis of a novel *Klebsiella pneumoniae* phage[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(12): 3402-3413 (in Chinese).
- [12] 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]. *Biomedicine*, 2021, 9(4): 342.
- [13] 文物, 刘晨, 卢诗韵, 许忠兵, 艾超凡, 廖汉鹏, 周顺桂. 一株新的多重耐药福氏志贺菌噬菌体生物学特性及基因组分析[J]. *生物技术通报*, 2022(9): 127-135.
WEN C, LIU C, LU SY, XU ZB, AI CF, LIAO HP, ZHOU SG. Biological characteristics and genome analysis of a novel multidrug-resistant *Shigella flexneri* phage[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022(9): 127-135 (in Chinese).
- [14] JAKOČIŪNĖ D, MOODLEY A. A rapid bacteriophage DNA extraction method[J]. *Methods and Protocols*, 2018, 1(3): 27.
- [15] 高明明, 王灿, 李璞媛, 刘慧莹, 裴广倩, 范航, 张湘莉兰, 米志强, 童贻刚, 柏长青. 一株新型裂解 K63 荚膜型肺炎克雷伯菌的噬菌体分离鉴定和生物学特性研究及全基因组分析[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(1): 210-221.
GAO MM, WANG C, LI PY, LIU HY, PEI GQ, FANG H, ZHANG XLL, MI ZQ, TONG YG, BAI CQ. Biological characteristics and complete genomic analysis of a novel virulent bacteriophage that infects *Klebsiella pneumoniae* capsular type K63[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(1): 210-221 (in Chinese).
- [16] 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 M, WANG X, ZHAO JN, ZENG J, ZOU JH, GUO ZL, JI F, SHAO JL, ZHANG LM, Wang CM, QIN JH. Biological characteristics and comparative genomics of five *Klebsiella* phage isolates[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(8): 3110-3128 (in Chinese).

- [17] YUAN YH, PENG Q, ZHANG SW, LIU TT, YANG S, YU QH, WU Y, GAO MY. Phage reduce stability for regaining infectivity during antagonistic coevolution with host bacterium[J]. *Viruses*, 2019, 11(2): 118.
- [18] LI CC, SHI TM, SUN YC, ZHANG YY. A novel method to create efficient phage cocktails *via* use of phage-resistant bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(6): e0232321.
- [19] 杨帆, 魏纪东, 李敏, 赵永新. 动物源肺炎克雷伯菌耐药性及 MLST 分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(10): 776-780.
YANG F, WEI JD, LI M, ZHAO YX. Antibiotic resistance and multilocus sequence typing analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolated from animals[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(10): 776-780 (in Chinese).
- [20] 刘兰, 刘潺, 加明明, 万璐, 吴小军. 肺炎克雷伯菌 ATCC700603 裂解性噬菌体的分离鉴定和基因组学研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47(8): 786-792.
LIU L, LIU C, JIA MM, WAN L, WU XJ. Isolation, identification, and complete genomic analysis of a novel lytic bacteriophage that infects *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2022, 47(8): 786-792 (in Chinese).
- [21] CHEN IL, LEE CH, SU LH, TANG YF, CHANG SJ, LIU JW. Antibiotic consumption and healthcare-associated infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli at a large medical center in Taiwan from 2002 to 2009: implicating the importance of antibiotic stewardship[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e65621.
- [22] CANO EJ, CAFLISCH KM, BOLLYKY PL, van BELLEGHEM JD, PATEL R, FACKLER J, BROWNSTEIN MJ, HORNE B, BISWAS B, HENRY M, MALAGON F, LEWALLEN DG, SUH GA. Phage therapy for limb-threatening prosthetic knee *Klebsiella pneumoniae* infection: case report and *in vitro* characterization of anti-biofilm activity[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, 73(1): e144-e151.
- [23] ANAND T, VIRMANI N, KUMAR S, MOHANTY AK, PAVULRAJ S, BERA BC, VAID RK, AHLAWAT U, TRIPATHI BN. Phage therapy for treatment of virulent *Klebsiella pneumoniae* infection in a mouse model[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 21: 34-41.
- [24] XUAN GH, DOU Q, KONG JN, LIN H, WANG JX. *Pseudomonas aeruginosa* resists phage infection *via* eavesdropping on indole signaling[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(1): e0391122.
- [25] MORRAN LT, PARRISH RC II, GELARDEN IA, ALLEN MB, LIVELY CM. Experimental coevolution: rapid local adaptation by parasites depends on host mating system[J]. *The American Naturalist*, 2014, 184(S1): S91-S100.
- [26] POURCEL C, MIDOUX C, VERGNAUD G, LATINO L. The basis for natural multiresistance to phage in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(6): 339.