

DOI:10.13350/j.cjpb.221003

• 论著 •

肺炎克雷伯菌持留菌形成特征分析*

王鑫¹,徐卫皓²,马文汝¹,陕江帆³,王雨鑫⁴,张玉梅^{1**}

(1. 滨州医学院基础医学院,山东烟台 264003;2. 烟台毓璜顶医院检验中心;
3. 滨州医学院第二临床医学院;4. 滨州医学院公共卫生与管理学院)

【摘要】 目的 探讨肺炎克雷伯菌持留菌形成的基本特征。方法 采用微量肉汤稀释法测定 12 种常用抗生素对肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。分别用 5、10、20、50、100 倍 MIC 浓度的左氧氟沙星(Levofloxacin, LVX)、妥布霉素(Tobramycin, TOB)、阿米卡星(Amikacin, AMK)、美罗培南(Meropenem, MEM)和头孢替坦(Cefotetan, CTT)筛选肺炎克雷伯菌的持留菌;分别用 20 倍 MIC 浓度的 LVX、TOB、MEM 测定不同生理阶段的肺炎克雷伯菌持留菌的形成情况,并检测不同稀释度的稳定期肺炎克雷伯菌持留菌的形成情况。使用基于萤火虫荧光素酶的 ATP 检测试剂盒检测肺炎克雷伯菌持留菌细胞内 ATP 水平。结果 药敏试验测定标准菌株肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 对大部分抗生素敏感。抗生素暴露试验显示,肺炎克雷伯菌在 LVX、TOB、MEM 3 种抗生素作用下可形成持留菌。不同种类的抗生素处理得到的持留菌数量不同,并随着抗生素浓度的升高持留菌数量减少。对数期的细菌菌群中的持留菌数量低于稳定期。不同稀释度的稳定期肺炎克雷伯菌抗生素暴露后持留菌形成比例不同。持留菌中的 ATP 含量与对照组比较显著降低。结论 肺炎克雷伯菌持留菌的形成主要取决于抗生素的浓度及类型,并且与细菌的生理阶段有关,与细菌菌群密度有关系,ATP 也参与肺炎克雷伯菌持留菌形成。

【关键词】 肺炎克雷伯菌;持留菌;耐药菌;密度;ATP

【中图分类号】 R378.99

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)10-1125-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Oct.;17(10):1125-1129,1135.]

Characteristic analysis of *Klebsiella pneumoniae* persisters

WANG Xin¹, XU Wei-hao², MA Wen-ru¹, SHAN Jiang-fan³, WANG Yu-xin⁴, ZHANG Yu-mei¹ (1. College of Basic Medical Sciences, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China; 2. Inspection Center of Yantai Yuhuangding Hospital; 3. College of Second Clinical Medicine, Binzhou Medical University; 4. College of Public Health and Management, Binzhou Medical University)***

【Abstract】 **Objective** To discuss the basic characteristics of the formation of *Klebsiella pneumoniae* persisters.

Methods The broth dilution was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) of *K. pneumoniae* to 12 selected antibiotics. 5, 10, 20, 50, and 100 times MIC concentrations of Levofloxacin (LVX), Tobramycin (TOB), Amikacin (AMK), Meropenem (MEM), and Cefotetan, CTT) were used to screen the *K. pneumoniae* persisters. Levofloxacin, tobramycin and meropenem of 20 times MIC concentration were used to determine the formation level of *K. pneumoniae* persisters in different physiological states. The formation level of *K. pneumoniae* persisters in stable period with different dilution levels was detected. Intracellular ATP levels of *K. pneumoniae* persisters were measured using firefly luciferase based ATP detection kit. **Results** The results of drug sensitivity test showed that *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 was sensitive to LVX, TOB, MEM, CTT, CIP, AMK and IMP. The results of antibiotic exposure experiment showed that *K. pneumoniae* persisters could be formed under the action of levofloxacin, tobramycin and meropenem. Although they all showed a typical biphasic death curve, the number of persisters varied, remaining at about $10^2 - 10^8$. After 6h treatment with LVX at 5, 10, 20, 50 and 100MIC concentrations the persisters levels were 10^7 , $10^{6.6}$, $10^{5.5}$, $10^{3.9}$ and $10^{2.5}$, respectively. The persisters levels of TOB and MEM at different concentrations were also different. The number of persisters in stationary phase was about 20 times that in logarithmic phase. After exposure to LVX at 20MIC concentration the proportion of persisters of 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} dilution bacteria in the stationary phase was 0.024%, 0.072%, 0.058%, 0.045% and 0.03%, respectively. After TOB exposure the proportion of persisters in each dilution was 17%, 7.1%, 7%, 6.9% and 6.8%, respectively. After MEM exposure, the proportion of persisters in each dilution was 23%, 9.7%, 12%, 11% and 3.8%, respectively. The proportion of persisters in *K. pneumoniae* at stable

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 50012301171),滨州医学院 2022 年创新创业训练立项项目。

** **【通讯作者】** 张玉梅, E-mail: meiyuzh@163.com

【作者简介】 王鑫(1996-),女,山东临沂人,硕士研究生。主要研究方向:持留菌的形成机制。E-mail: wangxin1996316@163.com

stage with different dilutions was different after antibiotic exposure experiment ($P < 0.05$). The content of ATP in the persisters was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The level of *K. pneumoniae* persisters mainly depends on the type and concentration of antibiotics. Not only the physiological state of bacteria but also the density of bacteria has a certain relationship with persisters. ATP is also involved in the formation of *K. pneumoniae* persisters.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; persisters; drug-resistant bacteria; density; ATP

肺炎克雷伯菌是一种革兰阴性杆菌,可引起肺炎、菌血症,膀胱炎,肝脓肿等感染性疾病^[1-2]。随着肺炎克雷伯菌多重耐药菌和高毒力菌株的出现,肺炎克雷伯菌的耐药情况日益严重,给临床治疗带来困难^[3-4]。

近年来人们对细菌的耐药性研究的越来越深入,非遗传或表观遗传耐药机制开始引起广泛关注。持留菌是指细菌在致死浓度的抗生素影响下,因机体应激而被迫进入一种以休眠或缓慢生长为主的状态,但在去除抗生素之后,细菌能够重新恢复生长,并恢复对抗生素的敏感性^[5],它是敏感菌株群体中存在的具有明显耐药表型的细菌亚群^[6-7]。持留菌能促进耐药突变菌的产生,也是临床上慢性感染和感染后复发的原因之一^[8-9]。目前对持留菌形成的具体机制尚不完全了解,有研究证实毒素-抗毒素系统、氧化应激、SOS反应、ATP等参与持留菌的形成过程^[10-14]。崔鹏等^[15]报道不同菌种的持留特性及形成存在着共同点,但又具有一定的差异。肺炎克雷伯菌的耐药情况日益严重,然而目前对其持留菌的了解有限,本实验拟检测和分析肺炎克雷伯菌在不同种类及不同浓度抗生素作用下持留菌形成水平的差异性,比较不同生理状态和不同细菌密度条件下持留菌形成变化,并检测肺炎克雷伯菌持留菌的ATP水平,为肺炎克雷伯菌持留菌形成机制研究提供参考。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株 肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 购于卫生部临床检验中心。

1.2 主要试剂 LB培养基购自海博生物公司;磷酸盐缓冲液和抗生素均购于美仑生物技术公司;ATP检测试剂盒为碧云天生物公司生产。

2 方 法

2.1 肺炎克雷伯菌生长曲线测定 将-80℃冻存的肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 复苏,三区划线培养后挑单个菌落重新接种到 LB 液体培养基中,在 37℃、200 r/min 震荡培养过夜。在新鲜 LB 液体培养基中按 1:100 的比例重新接种细菌过夜培养物,测定肺炎克雷伯菌 24 h 生长曲线。

2.2 药敏试验 采用微量肉汤稀释法测定 12 种常用

抗生素对肺炎克雷伯菌的 MIC。药敏试验结果参考临床与实验室标准研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准和每种抗生素的 MIC 判定。

2.3 持留菌的筛选和定量分析 挑取肺炎克雷伯菌单菌落接种到 LB 液体培养基中并过夜培养。取过夜培养物以 1:100 的比例接种 LB 液体培养基,37℃、200 r/min 震荡培养 3 h 至 A_{600} 值为 0.190,取 10 μ L 菌液梯度稀释后平板计数,作为 $t=0$ 时的基线。将 5、10、20、50、100 倍 MIC 浓度的 LVX、TOB、AMK、MEM、CTT 分别加入剩余菌液中进行抗生素暴露试验,每隔 1h 取适量菌液计数活菌数,绘制抗生素作用 6 h 的杀菌曲线。为了确定细菌生理状态对持久性的影响,分别在培养 1、3、6、9、12 h 后加入抗生素作用 6 h 后进行活菌计数。

2.4 肺炎克雷伯菌抗饥饿试验 取肺炎克雷伯菌过夜培养物重新接种并培养 12 h 至稳定期,为了消除培养基成分的影响用 PBS 洗涤 2 次后重悬,并作 1:10、1:100、1:1000 和 1:10000 释度,37℃ 孵育 7 h 后活菌计数,测定各稀释度菌液在 7 h 内的抗饥饿能力。

2.5 不同稀释度的肺炎克雷伯菌持留菌形成情况观察 将原液及 1:10、1:100、1:1000 和 1:10000 稀释度的稳定期肺炎克雷伯菌 37℃ 静置 7 h 后进行抗生素(TOB、LVX 和 MEM)暴露试验,抗生素作用 6 h 后活菌计数,测定持留菌的形成情况。

2.6 菌体 ATP 含量测定 参考 ATP 检测试剂盒说明测量细菌内 ATP 含量。

2.7 统计学处理 使用 SPSS 软件进行统计学分析。多组资料间的比较采用单因素方差分析,两组资料的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 的生长曲线及抗生素 MIC 值

测定肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 的生长曲线,并确定指数期和稳定期的培养时间(图 1)。培养的第 1 h 内菌量未见增殖,此时处于迟缓期;第 1 h 后生长速率快速升高,进入指数增殖期并在第 3 h 达到最高值;培养 9 h 后生长速率几乎接近为 0,菌群

进入稳定期。测定 12 种常用抗生素对肺炎克雷伯菌的 MIC 值,结果如表 1。肺炎克雷伯菌对头孢曲松和氨基糖甙耐药,对头孢呋辛、庆大霉素和哌拉西林处于中介状态,对其它 7 种抗生素敏感。

表 1 肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 的抗生素抗性谱
Table 1 Antimicrobial susceptibility profile of *K. pneumoniae* ATCC 700603

抗生素	缩写词	药敏试验判定标准($\mu\text{g}/\text{mL}$)			MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	结果判定
		S (敏感)	I (中介)	R (耐受)		
妥布霉素 Tobramycin	TOB	4.00	8.00	16.00	2.0000	S
头孢曲松 Ceftriaxone	CRO	1.00	2.00	4.00	4.0000	R
头孢呋辛 Cefuroxime	CXM	8.00	16.00	32.00	16.0000	I
庆大霉素 Gentamycin	GEN	4.00	8.00	16.00	8.0000	I
氨基糖甙 Aztreonam	ATM	4.00	8.00	16.00	32.0000	R
左氧氟沙星 Levofloxacin	LVX	0.50	1.00	2.00	0.2500	S
哌拉西林 Piperacillin	PIP	16.00	32.00-64.00	128.00	64.0000	I
头孢替坦 Cefotetan	CTT	16.00	32.00	64.00	0.5000	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	CIP	0.25	0.50	1.00	0.1250	S
美罗培南 Meropenem	MEM	1.00	2.00	4.00	0.0625	S
阿米卡星 Amikacin	AMK	16.00	32.00	64.00	0.5000	S
亚胺培南 Imipenem	IMP	1.00	2.00	4.00	0.5000	S

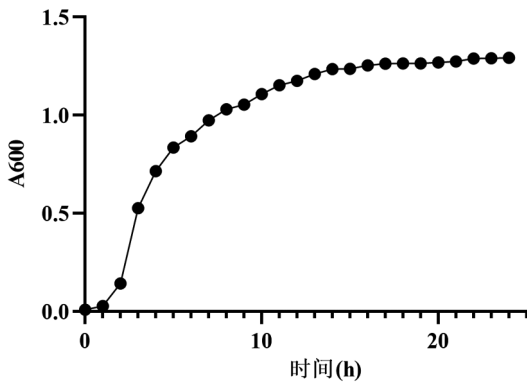
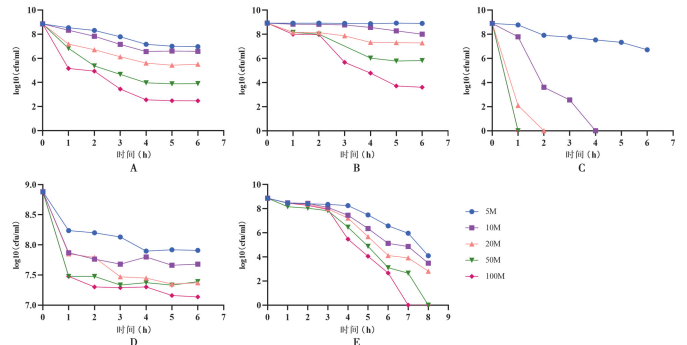


图 1 肺炎克雷伯菌标准 ATCC 700603 生长曲线
Fig. 1 Growth curve of the standard strain of *K. pneumoniae* ATCC 700603

2 抗生素的种类及浓度对肺炎克雷伯菌持留菌水平的影响

为了探讨不同类型及不同浓度抗生素对持留菌形成水平的影响,挑选了 5 种肺炎克雷伯菌 ATCC 70003 敏感的抗生素,然后以 5、10、20、50、100 倍 MIC

浓度的抗生素分别处理对数期细菌,结果如图 2。除 AMK、CTT 外,其余 3 种抗生素药物(LVX、MEM 和 TOB)在作用 6 h 均出现明显的二相型杀菌曲线(二相型杀灭曲线是筛选持留菌的标准^[7]),表明抗生素作用 1 h 内具有较高的杀菌效率,作用 4 h 后达到稳定水平,这部分已进入休眠或缓慢生长状态并对抗生素具有耐受性的细菌亚群为持留菌。图 2A,2B,2D 显示肺炎克雷伯菌在不同种类的抗生素作用下形成的持留菌水平不同。



A、B、C、D、E 分别为 LVX、TOB、AMK、MEM、CTT 杀菌曲线。

图 2 不同种类及不同浓度(5、10、20、50、100 倍 MIC 值) 抗生素杀菌曲线

A、B、C、D 和 E are the killing curves of LVX, TOB, AMK, MEM and CTT respectively.

Fig. 2 The killing curves of antibiotics of different types and concentrations (5, 10, 20, 50, 100 times MIC value)

不同浓度的 LVX、TOB、MEM 分别处理肺炎克雷伯菌后持留菌的形成水平不同,这 3 种抗生素处理后形成的持留菌数量均随抗生素浓度的升高而减少,表明肺炎克雷伯菌持留菌的形成依赖于抗生素的种类和浓度。

3 肺炎克雷伯菌生理状态对持留菌形成水平的影响

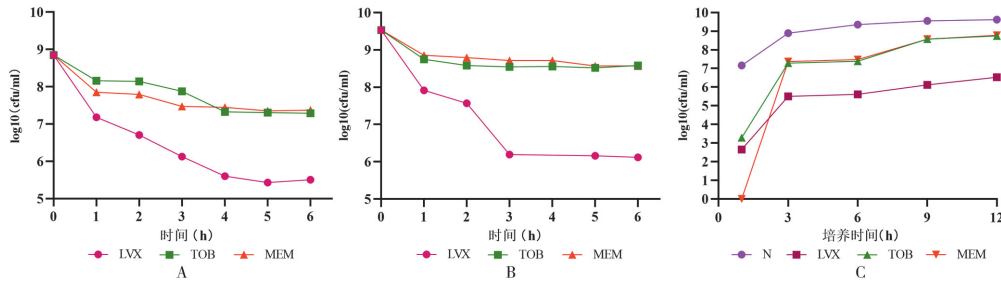
用 LVX、TOB、MEM 3 种抗生素分别作用于对数期和稳定期细菌,稳定期处理后的杀菌曲线与对数期的相似(图 3A, 3B),呈明显的二相型杀菌曲线,但稳定期持留菌的量高于对数期,稳定期形成的持留菌量约是对数期的 20 倍。20MIC 浓度的 LVX、TOB、MEM 分别处理培养 1、3、6、9、12 h 的细菌,结果如图 3C。肺炎克雷伯菌持留菌指数早期阶段呈低水平的持久性,指数中期阶段急剧增加,稳定期趋于平坦。表明肺炎克雷伯菌形成持留菌的能力与菌株的生理状态有关,稳定期的菌株能形成数量更多的持留菌。

4 肺炎克雷伯菌持留菌水平与细菌密度的关系

为了探讨细菌密度对持留菌形成的影响,排除抗生素暴露试验中因营养物质缺乏而导致细菌死亡的影响,本研究分析了不同密度肺炎克雷伯菌稳定期细菌的抗饥饿能力,结果如图 4A。37 °C 孵育 7 h 后,各稀释度菌液中细菌数量并未因营养物质缺乏而减少。

LVX、TOB 和 MEM 对肺炎克雷伯菌稳定期的各稀释度细菌进行抗生素暴露试验,测定不同稀释度肺炎克雷伯菌稳定期细菌残留菌比例,结果如图 4B。10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 和 10⁻⁴ 稀释度的稳定期菌液在左氧氟沙星作用下残留菌比例分别为 0.024%、0.072%、0.058%、0.045% 和 0.03%。妥布霉素暴露后,各稀释度的稳定期菌液中残留菌的比例分别为 17%、

7.1%、7%、6.9% 和 6.8%。美罗培南暴露后,残留菌的比例分别为 23%、9.7%、12%、11% 和 3.8%。未稀释的稳定期细菌在上述 3 种抗生素暴露试验中残留菌的形成比例均显著高于其它稀释度细菌(均 P < 0.05),表明肺炎克雷伯菌残留菌的形成水平与细菌密度有关。



A、B 分别为 20MIC 浓度的 LVX、TOB、MEM 作用于对数期及稳定期菌液的杀菌曲线 C 不同培养时间的肺炎克雷伯菌抗生素暴露 6 h 残留菌数量(N:正常培养肺炎克雷伯菌)。

图 3 不同浓度 LVX、TOB、MEM 杀菌曲线及抗生素暴露 6h 残留菌数量

A and B are the killing curves of LVX, TOB and MEM at 20MIC concentration on cultures in logarithmic phase and stable phase C is the number of persisters of *K. pneumoniae* with different culture time after antibiotic exposure for 6 h; N in represents the growth curve of *K. pneumoniae* under normal culture.

Fig. 3 Killing curves of LVX, TOB and MEM at different concentrations and the number of persisters after antibiotic exposure for 6 h

5 残留菌持久性形成与 ATP 消耗的关系

有研究发现,ATP 水平的变化通过降低抗生素靶标的活性从而导致残留菌形成。ATP 限制、三羧酸循环失活以及电子传递链的扰动均被证明与持久性的增加有关^[13,16]。本实验测定了用 LVX、TOB 和 MEM 处理稳定期和对数期后残留菌细胞内 ATP 含量,结果显示,对数期残留菌细胞内 ATP 水平分别减少 1 634. 8、1 200. 6、798. 3 nmol/mg;稳定期残留菌细胞内 ATP 水平分别减少 5 055. 4、5 980. 4、5 546. 3 nmol/mg(均 P < 0.05)(图 5),表明 ATP 水平的变化影响肺炎克雷伯菌残留菌的形成。

讨论

近年来,肺炎克雷伯菌多重耐药性成为临床治疗中的一大难题。同时,抗生素广泛耐药性的出现也增加了医院内感染发生的风险。细菌对抗生素耐药是目前面临的非常棘手的挑战,研究耐药机制及寻找应对方法刻不容缓。近年随着对细菌耐药性研究的逐渐深入,人们开始关注非遗传或表观遗传耐药机制。残留菌是敏感菌群中的一小部分具有耐药表型的细菌亚群,其遗传基因未发生改变,属于表型变异^[6-7]。在临床上,残留菌感染会导致反复出现且难以被抗生素根除的慢性感染^[6,17]。因此,研究残留菌的形成和寻找根除方法具有重要临床意义。

本研究通过 5、10、20、50、100MIC 的 LVX、TOB、AMK、MEM、CTT 杀菌曲线判断是否有肺炎克雷伯

菌残留菌的存在。结果表明,经 LVX、TOB、MEM 处理后的肺炎克雷伯菌也会得到与其它菌种类似的二相型杀菌曲线,从而获得残留菌。而用 AMK 和 CTT 处理肺炎克雷伯菌无法筛选出残留菌。AMK 是一种氨基糖苷类抗生素,通过抑制蛋白质合成发挥杀菌作用。CTT 是一种 β-内酰胺类抗菌药物,在细菌增殖期可抑制细胞壁的合成,从而产生杀菌效果。本研究中这两种抗生素均可显著降低细菌的存活率,作用一定时间后均可完全清除肺炎克雷伯菌,可能是由于这两种抗生素均可破坏肺炎克雷伯菌的残留机制。另外,不同浓度的上述 3 种抗生素作用后的杀菌曲线仍是二相型杀灭曲线,说明菌群中仍存在残留菌,但随着抗生素浓度的升高,菌群中存活细菌的比例明显下降。5、10、20、50、100 倍 MIC 浓度的 LVX、TOB、MEM 处理对数期和稳定期菌液的杀菌曲线相似,在高浓度的抗生素作用下大量敏感细菌被杀死,部分细菌数量保持相对稳定,进入残留状态。稳定期残留菌水平高于对数期,可能是由于稳定期菌液密度较高,营养物质减少,细菌代谢产物堆积等原因激活了某些与残留菌形成机制相关的通路。

观察不同密度的肺炎克雷伯菌稳定期细菌的残留菌水平,发现在高密度菌液中更容易形成残留菌。细菌密度可在一定程度上调控残留菌的形成,这也可能是稳定期残留菌数量更多的原因之一。有研究表明细菌密度可通过调控与代谢过程相关的基因影响金黄色

葡萄球菌持留菌的产生^[18]。细菌密度对肺炎克雷伯菌持留菌形成水平的影响还需进一步探讨。

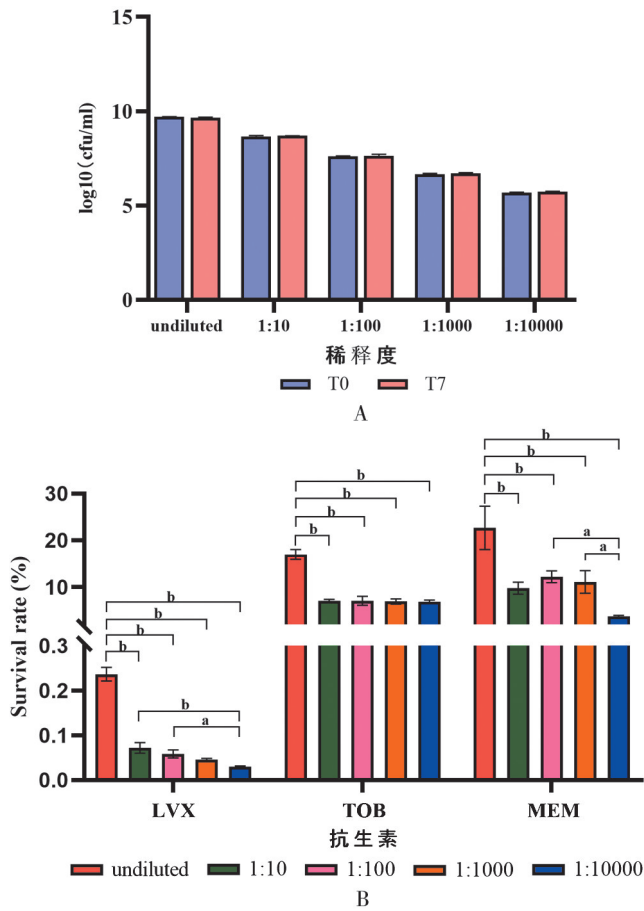


图 4 稳定期肺炎克雷伯菌饥饿耐受试验及抗生素暴露 6 h 存活情况
A 肺炎克雷伯菌稳定期不同密度菌液 6 h 内饥饿耐受试验结果 (T0 和 T7 分别代表稳定期菌液稀释后直接计数和 37℃ 孵育 7 h 后计数) B 肺炎克雷伯菌稳定期不同密度菌液在抗生素暴露 6 h 后细菌存活率 (%)。组间比较, ^a*P*<0.05; ^b*P*<0.01。

图 4 稳定期肺炎克雷伯菌饥饿耐受试验及抗生素暴露 6 h 存活情况
A Results of hunger tolerance test of *K. pneumoniae* in stable period with different density within 6 h (T0 and T7 respectively represent the counting results after dilution of stationary culture and after incubation at 37 °C for 7 h) B The bacterial survival rate of *K. pneumoniae* at stable phase with different density after antibiotic exposure for 6 h. ^a*P*<0.05; ^b*P*<0.01.

Fig. 4 *K. pneumoniae* starvation tolerance test and survival at 6h of antibiotic exposure in stationary phases

在大肠埃希菌,通过使用砷酸盐处理降低 ATP 水平会减慢翻译并防止在氟喹诺酮类药物处理后形成 DNA 双链断裂,从而降低抗生素作用靶标活性导致持留菌形成^[13]。本研究检测了肺炎克雷伯菌持留菌细胞内 ATP 水平,结果表明持留状态下的肺炎克雷伯菌 ATP 水平降低,分析认为 ATP 水平的变化可能通过降低抗生素靶标从而导致肺炎克雷伯菌持留菌形成。

由于持留菌因缺乏特异性标志物及持留状态不稳定导致难以分离和鉴定,且持留菌的形成机制十分复杂,因此目前关于持留菌形成的确切机制尚未完全阐明。不同细菌参与持留菌形成的生理通路具有相似

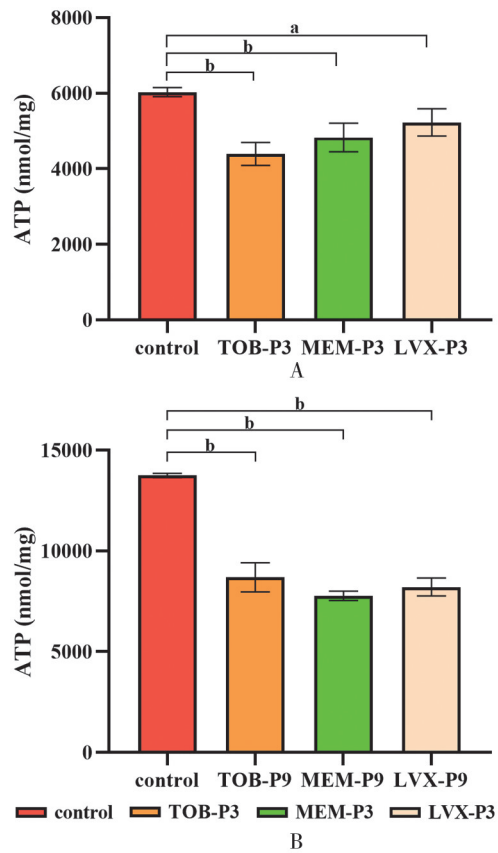


图 5 对数期、稳定期持留菌 (LVX、TOB、MEM 暴露 6 h) ATP 含量
A 对数期、稳定期 LVX、TOB、MEM 暴露 6 h 持留菌 ATP 含量 B 未加抗生素对照菌 ATP 含量。组间比较, ^a*P*<0.05; ^b*P*<0.01。

图 5 对数期、稳定期持留菌 (LVX、TOB、MEM 暴露 6 h) ATP 含量
A and B Represent the intracellular ATP content of persisters in the logarithmic phase and stable phase (exposed to LVX, TOB, MEM for 6h) and control samples (without antibiotics), respectively. ^a*P*<0.05; ^b*P*<0.01.

Fig. 5 ATP content of persisters (LVX, TOB and MEM exposure 6h) in logarithmic and stationary phases

性,但相关持留基因不一定有同源性^[15]。本研究以体外培养并用不同抗生素筛选肺炎克雷伯菌持留菌模型,分析持留菌形成的基本特征及规律,可为进一步探讨肺炎克雷伯菌持留菌形成机制提供依据。

【参考文献】

[1] Tan TY, Ong M, Cheng Y, et al. Hypermucoviscosity, rmpA, and aerobactin are associated with community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2019, 52(1): 30-34.
[2] 陈小卫, 谢晓斌. 脓毒血症患者临床特征及其感染的肺炎克雷伯菌耐药机制分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(4): 473-476.
[3] Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance [J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(3): 252-275.
[4] Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria [J]. Curr Opin Microbiol, 2018(45): 131-139.

(下转 1135 页)

- Type II CRISPR-Cas system[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(16):8632-8648.
- [5] Heuler J, Fortier LC, Sun X. *Clostridioides difficile* phage biology and application[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2021, 45(5): fuab012.
- [6] Safari F, Sharifi M, Farajnia S, et al. The interaction of phages and bacteria; the co-evolutionary arms race[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, 40(2):119-137.
- [7] Meader E, Mayer MJ, Steverding D, et al. Evaluation of bacteriophage therapy to control *Clostridium difficile* and toxin production in an *in vitro* human colon model system[J]. *Anaerobe*, 2013(22):25-30.
- [8] Koonin EV, Makarova KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, 374(1772):20180087.
- [9] Zhang M, Bi C, Wang M, et al. Analysis of the structures of confirmed and questionable CRISPR loci in 325 *Staphylococcus* genomes[J]. *J Basic Microbiol*, 2019, 59(9):901-913
- [10] 王梦园, 毕春霞, 兰蕾, 等. 沙雷菌 CRISPR-Cas 系统的基因结构分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(4):396-401.
- [11] Mortensen K, Lam TJ, Ye Y. Comparison of CRISPR-Cas Immune Systems in Healthcare-Related Pathogens[J]. *Front Microbiol*, 2021(12):758-782.
- [12] 付恒霞, 毕春霞, 张蒙蒙, 等. 不动杆菌 CRISPR 系统基因结构的分析及其与耐药性关系的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(10):1073-1077, 1083.
- [13] Alkhnbashi OS, Meier T, Mitrofanov A, et al. CRISPR-Cas bioinformatics[J]. *Methods*, 2020(172):3-11.
- [14] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(3):181-186.
- [15] Boudry P, Semenova E, Monot M, et al. Function of the CRISPR-Cas System of the human pathogen *Clostridium difficile*[J]. *mBio*, 2015, 6(5):e01112-e1115.
- [16] Peng L, Pei J, Pang H, et al. Whole genome sequencing reveals a novel CRISPR system in industrial *Clostridium acetobutylicum*[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(11):1677-1685.
- [17] Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, et al. CRISPR-Cas-Finder, an update of CRISPR-Finder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1):W246-W251.
- [18] Maikova A, Severinov K, Soutourina O. New insights into functions and possible applications of *Clostridium difficile* CRISPR-Cas System[J]. *Front Microbiol*, 2018(9):1740.
- [19] Mandin P, Repoilá F, Vergassola M, et al. Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(3):962-974.
- [20] Sesto N, Touchon M, Andrade JM, et al. A PNPase dependent CRISPR system in *Listeria* [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(1): e1004065.
- [21] Wheatley RM, MacLean RC. CRISPR-Cas systems restrict horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *ISME J*, 2021, 15(5):1420-1433.

【收稿日期】 2022-05-02 【修回日期】 2022-07-20

(上接 1129 页)

- [5] Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(23):7116-7121.
- [6] Fisher R A, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(8):453-464.
- [7] Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(2):267-274.
- [8] Yamasaki R, Song S, Benedik MJ, et al. Persister cells resuscitate using membrane sensors that activate chemotaxis, lower cAMP levels, and revive ribosomes[J]. *Science*, 2020, 23(1):100792.
- [9] Poddighe D, Vangelista L. *Staphylococcus aureus* infection and persistence in chronic rhinosinusitis; Focus on leukocidin ED[J]. *Toxins*, 2020, 12(11):678.
- [10] Podlesek Z, Zgur Bertok D. The DNA Damage inducible SOS response is a key player in the generation of bacterial persister cells and population wide tolerance[J]. *Front Microbiol*, 2020(11):1785.
- [11] Wagner EG, Unoson C. The toxin-antitoxin system *tisB-istR1*: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes[J]. *RNA Biol*, 2012, 9(12):1513-1519.
- [12] Dorr T, Vulic M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the *TisB* toxin in *Escherichia coli*[J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(2):e1000317.
- [13] Shan Y, Brown GA, Rowe SE, et al. ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli*[J]. *mBio*, 2017, 8(1):e02267-16.
- [14] Svenningsen MS, Veress A, Harms A, et al. Birth and resuscitation of (p)ppGpp induced antibiotic tolerant persister cells[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):6056.
- [15] 崔鹏, 许涛, 张文宏, 等. 细菌持留与抗生素表型耐药机制[J]. *遗传*, 2016, 38(10):859-871.
- [16] Wang Y, Bojer MS, George SE, et al. Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):10849.
- [17] Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, et al. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis[J]. *J Bacteriol*, 2010, 192(23):6191-6199.
- [18] 余瑶. 密度对金黄色葡萄球菌持留形成的影响及分子机制初步研究[D]. 兰州:兰州大学, 2020.

【收稿日期】 2022-05-07 【修回日期】 2022-07-28