

## 一株产 1,3-丙二醇的克雷伯氏菌的噬菌体生物学特性

南南, 曹放, 沈俊涛, 绳傲楠, 孙亚琴, 牟英, 修志龙\*

大连理工大学生命科学与技术学院, 大连 116024

**摘要:** 【目的】克雷伯氏菌发酵生产 1,3-丙二醇过程中发生噬菌体感染会严重影响宿主菌的生长和目标产物的生成, 因此分离克雷伯氏菌噬菌体并考察其生物学特性对预防和控制噬菌体感染具有重要意义。【方法】采用敏感指示菌法及 Adams 双层平板法从感染噬菌体的肺炎克雷伯氏杆菌发酵液中分离得到一株噬菌体; 纯化后用磷钨酸负染法电镜观察; 手工法提取噬菌体核酸, 酶切后琼脂糖凝胶电泳分析; 同时考察了其最佳感染复数、一步生长曲线及对温度、pH、紫外线、乙醚和氯仿等理化因素的敏感性等生理特性; 最后考察了噬菌体对肺炎克雷伯氏杆菌生长和发酵的影响。【结果】分离出一株肺炎克雷伯氏杆菌溶源性噬菌体, 其噬菌斑为无晕环透明圆斑, 直径约 1.5 mm; 其头部为直径约 60 nm - 70 nm 的球体, 有一长约 160 nm 的丝状长尾; 基因组核酸能被双链 DNA 内切酶 *EcoR* I 及 *Hind* III 切开, 大小约 42 kb; 对高温和紫外线敏感, 耐碱性而受强酸抑制, 对氯仿不敏感; 最佳感染复数为 1, 潜伏期与裂解期均为 50 min, 裂解量为 343 个; 感染噬菌体的肺炎克雷伯氏杆菌的细胞生长延滞约 8 h, 代谢流偏向乳酸途径。【结论】该噬菌体属于无包膜长尾噬菌体, 能改变克雷伯氏菌发酵生产 1,3-丙二醇的代谢规律, 为 1,3-丙二醇发酵生产过程中噬菌体感染的预防和控制研究奠定了基础。

**关键词:** 肺炎克雷伯氏杆菌, 噬菌体, 发酵, 生物学特性

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 09-0943-07

1,3-丙二醇 (1,3-Propanediol, 1,3-PD) 具有独特的结构, 与对苯二甲酸反应生成的聚合物 (PTT) 有着特殊的性质, 如良好的弹性、印染性、生物降解性等。与化学法制备 1,3-PD 相比, 微生物发酵法生产 1,3-PD 具有条件温和、操作简单、环境友好等特点, 受到国内外的广泛关注<sup>[1-3]</sup>。其中肺炎克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 发酵甘油生产 1,3-PD 的底物转化率、产物浓度和生产强度都比较高, 是目前研究开发最为广泛的生物过程, 国内已有几家公

司在开展产业化工作。

在微生物尤其是细菌发酵的工业生产中极易感染噬菌体, 导致发酵异常, 造成严重损失。目前微生物发酵工业生产中感染噬菌体的报道主要集中在乳制品工业以及少数的大宗化学品产业, 如乳酸<sup>[4-5]</sup>、丙酮/丁醇<sup>[6-7]</sup>和谷氨酸<sup>[8]</sup>等, 1,3-PD 发酵生产过程中噬菌体的感染及防治尚无文献报道。研究噬菌体的生物学特性是认识噬菌体的基本前提, 也对预防和控制噬菌体感染具有重要意

**基金项目:** 国家“863 计划” (SQ2011AAZY2805-2); 大连理工大学基本科研业务费专项项目 (DUT12JN09)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-411-84706369; E-mail: zhixiu@dlut.edu.cn

**作者简介:** 南南 (1987-), 女, 山东省淄博市人, 硕士研究生, 生物化学与分子生物学专业。E-mail: nanfang1382@163.com

**收稿日期:** 2013-01-21; **修回日期:** 2013-03-18

义,因此本文在考察噬菌体对肺炎克雷伯氏杆菌发酵影响的基础上,对其理化和生物学特性作了进一步的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种及噬菌体样品来源:**发酵菌种为肺炎克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) KpM30,是经本实验室诱变 *Klebsiella pneumoniae* CGMCC2028(中国微生物菌种保藏管理中心)筛选得到。克雷伯氏菌的噬菌体分离自某公司的中试试验现场。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**种子及发酵培养基<sup>[8]</sup>,SM缓冲液<sup>[9]</sup>,双层平板培养基:上层 LB 培养基(含 0.7% 琼脂),下层 LB 培养基(含 1.5% 琼脂)。化学试剂均为分析纯及以上级(天津市科密欧化学试剂有限公司)。Mitomycin C (Roche);DNA Marker, DNase I, Rnase, Proteinase K, DNA 内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 等 (TaKaRa), Eppendorf 低温离心机 (Eppendorf), JEOL JEM-2100 (HR) 透射电子显微镜 (日本电子株式会社), C-2010 气相色谱仪 (日本岛津公司), Agilent-1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司),全自动发酵罐 (上海保兴有限公司)。

### 1.2 溶源性噬菌体的分离与纯化

电镜法<sup>[10]</sup>鉴定发酵菌株含有溶源性噬菌体。用 mitomycin C 将发酵菌株溶源性噬菌体诱导为裂解态,从实验室保存的 11 株肺炎克雷伯氏杆菌中筛选出敏感菌株 2001GBF 作为生产菌株溶源性的指示菌<sup>[10]</sup>。发酵菌株的 mitomycin C 诱导液与指示菌混合用 Adams 双层平板法<sup>[11]</sup>培养。挑取平板上长出的形态大小一致的噬菌斑,单个噬菌斑经 5 次纯化,将纯化的噬菌体重复进行富集培养<sup>[11]</sup>,制成高浓度噬菌体原液 ( $> 10^{11}$  PFU/mL)。

### 1.3 噬菌体电镜形态学观察

噬菌体的制片采用磷酸钨复染法<sup>[12]</sup>,自然干燥后在 JEOL JEM-2100 (HR) 透射电子显微镜下观察形态。

### 1.4 噬菌体核酸的提取及酶切分析

参照分子克隆实验指南(第二版)<sup>[9]</sup>中  $\lambda$  噬菌体 DNA 提取方法提取核酸,溶解定量后用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切,根据酶切图谱鉴定核酸近似大小。

### 1.5 噬菌体的生理学特性

**1.5.1 噬菌体氯仿敏感性:**氯仿处理终浓度为 5%, 摇匀后于 37℃ 作用 30 min, 4000 × g 离心 15 min, 上清液用于测定效价。

**1.5.2 温度对噬菌体活性的影响:**噬菌体纯培养液分别置于不同温度 (25、37、50、60 和 70℃) 水浴 30 min 及 60 min 后,取出立即置于冰浴中冷却,测定其效价。

**1.5.3 pH 对噬菌体活性的影响:**将噬菌体纯培养液接于不同 pH (3、4、5、6、7、8、9、10、11、12) 的 LB 培养基中,37℃ 恒温水浴中培育 14 h 后测定其效价。

**1.5.4 紫外线照射对噬菌体的灭活作用:**取噬菌体纯培养液于  $\Phi 6$  cm 的培养皿中,置于紫外灯 (20 W, 60 cm) 下分别处理 0、3、6、9、12、15、18 及 21 min,然后在暗处放置 30 min,测定其效价,并计算存活率。

**1.5.5 噬菌体最佳感染复数的测定:**参照 Lu 等<sup>[13]</sup>的方法,略有改动。

**1.5.6 噬菌体一步生长曲线的测定:**参照 Lu 和 Weiss 等<sup>[14]</sup>的方法,略有改动。以感染时间为横坐标,感染体系中噬菌体效价的对数值为纵坐标,绘制一步生长曲线,得出噬菌体的潜伏期、裂解期和裂解量。裂解量计算公式:裂解量 = 裂解末期噬菌体滴度 / 初始感染细菌浓度

### 1.6 肺炎克雷伯氏杆菌的发酵

**1.6.1 种子培养条件:**微氧培养,250 mL 三角瓶装液量 100 mL,培养温度 37℃,摇床转速 150 r/min,培养 12 h。

**1.6.2 批式流加发酵条件:**采用 5 L 全自动发酵罐 (上海保兴有限公司),装液量 2 L,接种量 10% (噬菌体感染组接种后按  $MOI = 10^{-6}$  比例添加噬菌体,该比例根据引起发酵异常的菌株携带的噬菌体比例确定),发酵温度 37℃,转速 200 r/min,5 mol/L NaOH 溶液控制 pH 值为 7.0,发酵过程中通入 200 mL/min 氮气维持厌氧状态,中间补加甘油使其浓度在发酵前期维持在 10 g/L 以内,中后期维持在 10 - 15 g/L,发酵时间 31 h。

### 1.7 分析方法

菌体浓度采用 650 nm 下的比浊法测定,以  $OD_{650}$  表示。发酵过程中甘油浓度采用高碘酸钠氧化滴定法<sup>[15]</sup>测定。发酵产物乙醇、乙偶姻、2,3-丁二醇 (2,3-BD) 及 1,3-PD 浓度采用气相色谱法<sup>[16]</sup>检测,乳酸、乙酸、琥珀酸及柠檬酸采用高效液相色谱<sup>[17]</sup>测

定。

## 2 结果和分析

### 2.1 噬菌体的形态观察

双层平板噬菌斑结果见图 1-A, 可见该噬菌斑形态为约  $\phi 1.5$  mm 的无晕环透明圆斑 (培养 12 h)。通过透射电镜对噬菌体进行观察, 如图 1-B 所示, 噬菌体头部近球体, 直径约 60 nm - 70 nm, 有一丝状长尾, 长约 160 nm。根据 ICTV 病毒分类第八次报告<sup>[18]</sup>, 所分离得到的噬菌体属于长尾噬菌体 (*Siphoviridae*)。

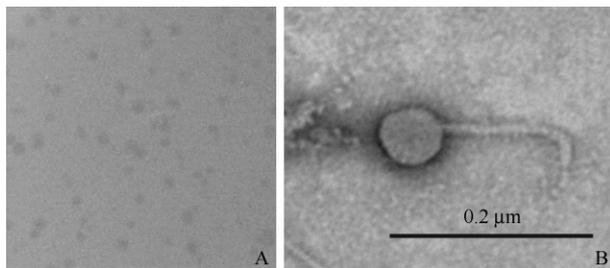


图 1. 噬菌体的形态观察

Figure 1. A: Bacteriophage plaques on double-agar medium. B: Morphology of the phage under electron microscope.

### 2.2 噬菌体的核酸酶切分析

选用 *EcoR* I 和 *Hind* III 两种限制性内切酶对噬菌体 DNA 进行酶切分析, 结果见图 2。由于 *EcoR* I 和 *Hind* III 均为 dsDNA 酶, 表明该噬菌体的核酸为 dsDNA。根据酶切图谱估算的噬菌体基因组大小约为 42 kb。

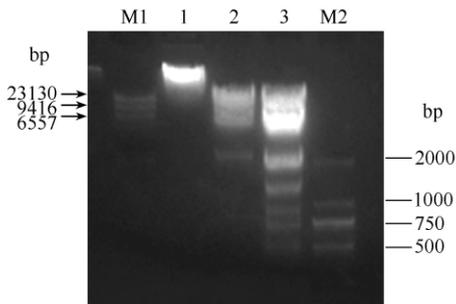


图 2. 噬菌体基因组 DNA 的限制性酶切电泳图谱

Figure 2. Electrophoresis analysis of phage DNA. M1,  $\lambda$ -*Hind* III digest; lane 1, phage DNA; lane 2, *EcoR* I digested phage DNA; lane 3, *Hind* III digested phage DNA; M2, DL2000 DNA marker.

### 2.3 噬菌体的生理特性

#### 2.3.1 噬菌体氯仿敏感性: 噬菌体经氯仿处理后,

裂解宿主菌的效价与对照组相比无明显变化, 存活率均在 90% 以上, 表明该噬菌体对氯仿不敏感。

**2.3.2 温度和 pH 对噬菌体活性的影响:** 图 3 表明该噬菌体对温度比较敏感, 其最适温度为 37°C, 经 60°C 处理后存活率低于 1%, 经 70°C 处理 30 min 即完全失活。除 37°C 下处理 60 min 噬菌体效价高于处理 30 min 外, 其余温度下处理 60 min 的噬菌体效价均略低于 30 min 的处理效果。图 3 表明噬菌体的最适 pH 为 8, 偏酸性条件下噬菌体较易失活, 尤其是 pH < 4 时; 碱性条件下较稳定, pH > 9 以上影响较小。

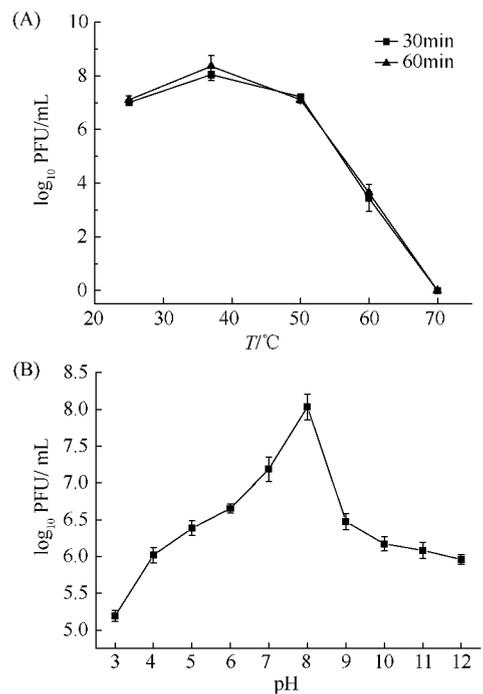


图 3. 温度 (A) 和 pH (B) 对噬菌体活性的影响

Figure 3. Influences of temperature (A) and pH (B) on the phage activity.

**2.3.3 紫外线照射对噬菌体活性的影响:** 图 4 表明噬菌体对紫外线照射非常敏感, 照射 3 min 活性即下降 90% 以上, 随后照射时间延长而逐渐丧失活性; 照射 9 min 后, 活性略微有上升, 但存活率仍低于 1%; 12 min 之后基本完全失活。

**2.3.4 噬菌体最佳感染复数的测定:** 按下表加入噬菌体和宿主菌培养 4 h 后, 测定噬菌体效价, 结果见表 1。可见感染复数 (MOI) 为 1 时, 产生子代噬菌体数量最多, 因此噬菌体最佳感染复数为 1。

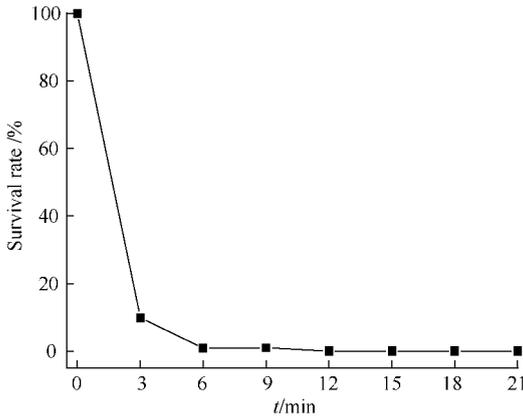


图 4. 紫外线对噬菌体灭活作用

Figure 4. The effect of UV on the phage survival.

表 1. 噬菌体最佳感染复数的测定

Table 1. Determination of optimal multiplicity of infection (MOI)

Tube No.	Number of bacteria	Number of bacteriophages	MOI	Titer at 4h / (PFU/mL)
1	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^6$	0.0001	$1.03 \times 10^{10}$
2	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^7$	0.001	$2.9 \times 10^{10}$
3	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^8$	0.01	$4.6 \times 10^{10}$
4	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^9$	0.1	$1.9 \times 10^{10}$
5	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{10}$	1	$5.7 \times 10^{10}$
6	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{11}$	10	$3.67 \times 10^{10}$

**2.3.5 噬菌体一步生长曲线的测定:**由图 5 中的噬菌体一步生长曲线可以看出,该噬菌体感染宿主菌的潜伏期为 50 min,裂解期为 50 min,裂解量约为 343 个。

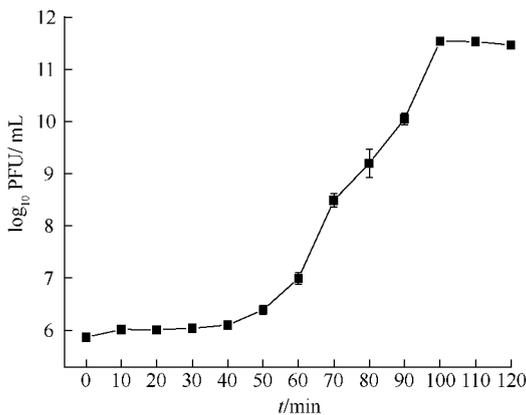


图 5. 噬菌体的一步生长曲线

Figure 5. One-step growth curve of the phage.

## 2.4 噬菌体感染对肺炎克雷伯氏杆菌发酵的影响

批式流加发酵中细胞浓度的变化如图 6 所示,发酵初期(0-4 h)噬菌体感染组菌体生长情况与未感染组基本一致, $OD_{650}$  达到 2-3 之间;4-12 h感

染组菌体生长停滞,此时发酵液泡沫增多,甘油消耗缓慢,pH 上升;12 h后菌体以明显低于正常组的速率生长至 28 h达到稳定期,比正常组延迟约 10 h,且最高菌体浓度( $OD_{650}$ )比正常组低 33%。

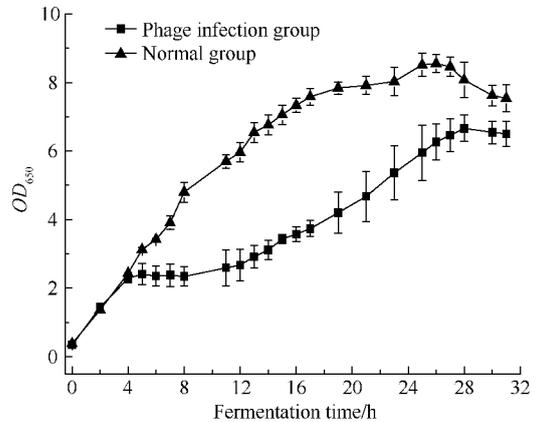


图 6. 噬菌体感染组和正常组批式流加发酵过程中菌体浓度变化曲线

Figure 6. Comparison of biomass between phage infection group and normal group in fed-batch fermentations.

图 7 显示了主要代谢产物在两种情况下的比较,噬菌体感染组的 1,3-PD 最终浓度为 52.9 g/L,甘油的平均质量转化率为 37.7%,与正常组相比分别降低 38% 和 11.4%;感染组的副产物产量与正常组相比,乙醇、乙偶姻、琥珀酸产量均略低或基本相当,而乳酸、乙酸和柠檬酸生成量均高于正常组,分别为正常组的 3.5 倍、1.6 倍和 3.9 倍,其中乳酸产量达 21.5 g/L。

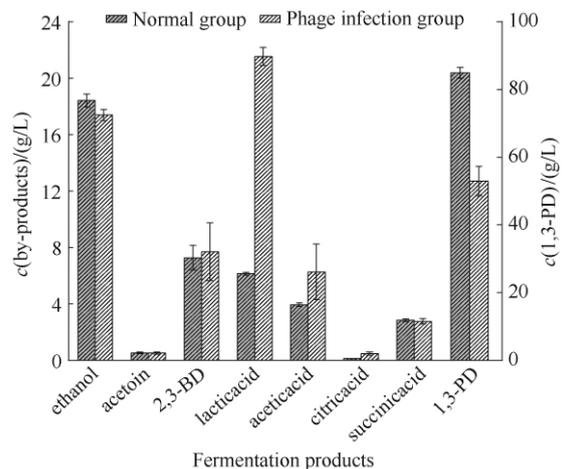


图 7. 噬菌体感染组和正常组批式流加发酵过程中主要产物的变化趋势对比

Figure 7. Comparison of the main products between phage infection group and normal group in fed-batch fermentations.

### 3 讨论

肺炎克雷伯氏杆菌的噬菌体研究报道并不多见,唯一一篇论文是从海水中筛选出一株肺炎克雷伯氏杆菌及其 3 株噬菌体<sup>[19]</sup>。与这 3 株噬菌体相

比,本文从 1,3-丙二醇发酵现场分离的肺炎克雷伯氏杆菌噬菌体既有相似之处,又有差异。相似之处体现在它们均为有尾噬菌体,其核酸为 dsDNA,对氯仿不敏感性,对紫外线和高温敏感,对酸碱有一定抗性;不同之处在于基因组大小、最适温度、裂解量,如表 2 所示。

表 2. 噬菌体生物学特性比较

Table 2. Comparison of biological properties between different phages

Phages	Genome size/kb	Optimal temperature/°C	Optimal pH	Optimal multiplicity of infection	Latent phase/min	Rise phase/min	Burst size
KP1 <sup>[19]</sup>	31.4	25	8	1	50	60	133
KP2 <sup>[19]</sup>	29.8	25	7	0.01	10	70	59
KP3 <sup>[19]</sup>	31.9	25	8	1	20	60	42
This article	47	37	8	1	50	50	343

噬菌体的最适温度与宿主菌密切相关。本文所用肺炎克雷伯氏杆菌的生长和发酵最适温度为 37°C,最佳 pH 为 7,其噬菌体的最适温度为 37°C,最适 pH 为 8,耐碱性,酸性条件抑制作用稍强。感染噬菌体的肺炎克雷伯杆菌发酵过程中 pH 是异常变化的,例如在对应的噬菌体裂解期发酵液 pH 上升,这与细胞裂解释放出生物碱等物质有关,同时也更适于噬菌体的存活;而最终细胞代谢流向乳酸等有机酸的途径增强(图 7),可能是菌体自救的表现,一定程度上可以抑制噬菌体的活性,为抗性菌株的产生争取了时间。至于是否导致部分噬菌体由裂解态转化为溶源态,使得菌种生长得以恢复,这有待进一步的研究。

噬菌体感染宿主菌的潜伏期和裂解期的长短以及裂解量的大小与噬菌体、宿主菌及环境条件都有关系。有尾噬菌体的潜伏期范围从 11 min 到 40 h,裂解量范围从 2 - 2000 个不等<sup>[20]</sup>。该噬菌体的潜伏期和裂解期均为 50 min,裂解量为 343。实际发酵过程中噬菌体的潜伏期、裂解期与纯粹噬菌体培养差异较大,这既与感染复数相关,又与培养条件以及宿主细胞代谢密不可分。对应噬菌体的一步生长曲线(图 5),发酵初期约 4 h 内菌体正常生长,此时应为噬菌体的潜伏期,之后 8 h 细胞生长停滞对应于噬菌体的裂解期(图 6)。因菌种与噬菌体的添加比例( $10^{-6}$ )远小于测得的最佳感染复数(表 1),所以发酵过程中噬菌体增殖的数量只能使菌体生长延滞,而不能使菌体浓度大幅下降。噬菌体数量达到稳定后,未被感染或有抗性的活菌缓慢增殖,感染现象逐

渐减弱,这与报道中提到的 1% - 5% 比例的菌体细胞被感染时没有明显的理化现象一致<sup>[21]</sup>。

从噬菌体的防治角度看,通过改变发酵过程中的温度与 pH 来达到抑制噬菌体的目的显然行不通,而发酵前后紫外线照射和高温灭菌是杀灭噬菌体的有效手段。紫外线照射一段时间后噬菌体浓度小幅上升(图 4),表明噬菌体对紫外线可以产生一定的抗性;长时间照射可以达到完全灭活的效果<sup>[19, 22]</sup>,因此在实际操作过程中通过适时紫外线照射可以减少噬菌体的感染,尤其适于实验室操作。70°C 以上高温处理能使噬菌体完全失活(图 3A),这种方式更适合于工业装置。

### 4 结论

从感染噬菌体的克雷伯氏菌发酵液中分离出一株无包膜的长尾噬菌体,其最佳感染复数为 1,潜伏期与裂解期均为 50 min,裂解量为 343 个,对高温和紫外线敏感,耐碱性而受强酸抑制。与正常克雷伯氏菌相比,感染噬菌体的宿主细胞生长停滞期约 8 h,最高菌体浓度下降了 33%。其主要产物 1,3-PD 产量下降 38%,代谢流偏向有机酸,如乳酸等途径。

### 参考文献

- [1] Xiu Z. Microbial analysis method of production of 1,3-propanediol. *Modern Chemical Industry*, 1999, 19 (3): 33-35. (in Chinese)  
修志龙. 1,3-丙二醇的微生物法生产分析. *现代化工*, 1999, 19(3): 33-35.

- [2] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD. Microbial production of 1, 3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52: 289-297.
- [3] Xiu Z. Advances in research on microbiological fermentation method producing 1, 3-propanediol. *Microbiology China*, 2000, 27 (4): 300-302. (in Chinese)  
修志龙. 微生物发酵法生产 1, 3-丙二醇的研究进展. *微生物通报*, 2000, 27(4): 300-302.
- [4] Vedamuthu ER, Washam C. Food and food production with microorganisms. *Biotechnology*, 1983, 5: 231.
- [5] McCoy E, McDaniel LE, Sylvester JC. Bacteriophage in a butyl fermentation plant. *Bacteriology*, 1944, 47: 433.
- [6] Ogata S, Hongo M. Bacteriophages of the genus *Clostridium*. *Advances in Applied Microbiology*, 1979, 25: 241-273.
- [7] Barthomomew WH, Engstrom DE, Goodman NS, O'Toole AL, Shelton JL, Tannen LP. Reduction of contamination in an industrial fermentation plant. *Biotechnology and Bioengineering*, 1974, 16: 1005.
- [8] Xiu Z. Studies on Medium Design and pH Control Strategy in the Bioconversion of Glycerol to 1, 3-propanediol. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2001, 15 (4): 397-402. (in Chinese)  
修志龙. 甘油连续生物歧化过程培养基 pH 调控策略研究. *高校化学工程学报*, 2001, 15(4): 397-402.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [10] Liao W, Song S, Chen W, Xue Q, Ai Y, Pang Y. Detection of lysogenic phage from *Bacillus thuringiensis* fermentative strain MZ1. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14 (1): 149-150 (in Chinese)  
廖威, 宋少云, 陈维春, 薛清华, 艾云灿, 庞义. 鉴别苏云金芽胞杆菌生产菌株 MZ1 的溶原性噬菌体. *农业生物技术学报*, 2006, 14 (1): 149-150.
- [11] Adams MH. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers, 1959.
- [12] Huang J, Hu X, Rao X, Zhang K, Jin X, Zhou Y, Li M, Shen X, Zhu J, Hu F. Biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP2. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2004, 26 (13): 1133-1136. (in Chinese)  
黄建军, 胡晓梅, 饶贤才, 张克斌, 金晓琳, 周莹冰, 李明, 申晓冬, 朱军民, 胡福泉. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 生物学特性的研究. *第三军医大学学报*, 2004, 26(13): 1133-1136.
- [13] Lu Z, Breidt FJ, Fleming HP. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ΦJL21, from a cucumber fermentation. *Food Microbiology*, 2003, 84 (2): 225-235.
- [14] Weiss BD, Capage MA, Kessel M, Benson SA. Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Bacteriology*, 1994, 176(11): 3354.
- [15] Wang J, Xiu Z, Fan S. Determination of glycerin concentration during the fermentation of glycerin to 1, 3-propanediol. *Industrial Microbiology*, 2001, 3 (12): 33-35. (in Chinese)  
王剑锋, 修志龙, 范圣第. 甘油转化生产 1, 3-丙二醇发酵液中甘油含量的测定. *工业微生物*, 2001, 3(12): 33-35.
- [16] Zhu X, Nan N, Xiu Z. Complex mutation of *Klebsiella pneumoniae* producing 1, 3-propanediol from biodiesel-derived glycerol. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2011, 11 (6): 1030-1037. (in Chinese)  
朱晓丽, 南南, 修志龙. 以粗甘油为原料高产 1, 3-丙二醇菌株的等离子体复合诱变. *过程工程学报*, 2011, 11(6): 1030-1037.
- [17] Mu Y, Wang Y, Xiu Z, Wang L, Xiao H. Determination of organic acids in 1, 3-Propanediol fermentation broth by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34: 183-186. (in Chinese)  
牟英, 王元好, 修志龙, 王龙星, 肖红斌. 高效液相色谱法测定 1, 3-丙二醇发酵液中的有机酸. *分析化学*, 2006, 34: 183-186.
- [18] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus Taxonomy. VIII th report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [19] Liu B, Günter J, Juliane S, Arite W, Huang X, Gu L, Wang Y, Ye D. Biological characteristics of 3 lytic bacteriophages from the same host *Klebsiella* sp. AC-11. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 33 (4): 147-154. (in Chinese)  
刘斌, Günter J, Juliane S, Arite W, 黄翔玲, 谷力, 王玉桥, 叶德赞. 源于肺炎克雷伯氏杆菌 *Klebsiella* sp. AC-11 的 3 株噬菌体的生物学特性. *海洋学报*, 2011, 33(4): 147-154.
- [20] 司稚东, 何晓青. 噬菌体学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996: 30.

- [21] Primrose SB. Controlling bacteriophage infections in industrial bioprocesses. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 1990, 43:1-10.
- [22] Yang S, Guo C, Zhao W. Influence of some physical and chemical factors upon survival rate of bacteriophages of

*Bacillus thuringiensis*. *Journal of Shaanxi Normal University*, 1998, 26: 225-228. (in Chinese)

杨水云, 郭春林, 赵文明. 理化因素对苏云金芽胞杆菌噬菌体活性影响的研究. *陕西师范大学学报*, 1998, 26: 225-228.

## Characterization of a bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol

Nan Nan, Fang Cao, Juntao Shen, Aonan Sheng, Yaqin Sun, Ying Mu, Zhilong Xiu\*

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

**Abstract:** [Objective] Phage infection could seriously influence cell growth and metabolism in the fermentation of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. Isolation of the *Klebsiella pneumoniae* phage and research on its physiological characteristics would be of great significance. [Methods] A *K. pneumoniae* phage was isolated by using Adams double plate method from the infected fermentation broth of 1,3-propanediol. After the electron microscope observation, the genome of the phage was extracted and its size was identified with restriction enzyme analysis. The physiological characteristics of the phage were also tested, such as the optimal multiplicity of infection, the one-step growth curves and the sensitivity to temperature, pH, UV light and chloroform. And the phage infected fermentation was carried out and compared with normal fermentation. [Results] The phage had an isometric polyhedral head (about 60 nm – 70 nm in diameter) and a long noncontractile tail (about 160nm long). The nucleic acid could be cut off by dsDNA restriction enzyme *EcoR* I or *Hind* III and its complete size was about 42 kb. It was sensitive to high temperature and UV light, insensitive to chloroform. The optimal multiplicity of infection for the phage was 1, the latent phase and rise phase were both 50min, and the burst size was 343. Compared with the normal fed-batch fermentation of 1,3-propanediol, the phage infected fermentation indicated that cell growth was delayed about 8 h and metabolic flow was changed to organic acid (e. g. lactic acid) pathway. [Conclusion] The phage was a non-envelop long-tailed phage, and could change the metabolism of the 1,3-propanediol fermentation from glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. This work would be helpful for prevention and controlling of phage infection during the 1,3-propanediol fermentation.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, bacteriophage, 1,3-propanediol fermentation, biological characteristics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Chinese National Programs for High Technology Research and Development (SQ2011AAZY2805-2) and by the Fundamental Research Funds for Special Projects of Dalian University of Technology (DUT12JN09)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-411-84706369; E-mail: zhlxu@dlut.edu.cn

Received: 21 January 2013/Revised: 18 March 2013