



孔祥宇, 杨文静, 庞申雨, 苑庆欣, 潘顺圆, 高东阳, 宋军, 王金涛. 肺炎克雷伯菌噬菌体分离鉴定及抑菌效果研究[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(9): 102-111.
KONG Xiangyu, YANG Wenjing, PANG Shenyu, YUAN Qingxin, PAN Shunyu, GAO Dongyang, SONG Jun, WANG Jintao. Isolation, identification and antibacterial effect study of *Klebsiella pneumoniae* phage[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(9): 102-111.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.09.09

肺炎克雷伯菌噬菌体分离鉴定及抑菌效果研究

孔祥宇 杨文静 庞申雨 苑庆欣 潘顺圆 高东阳 宋军 王金涛*

(黑龙江八一农垦大学 动物科技学院/农业农村部东北寒区牛病防治重点实验室/黑龙江省牛病防制重点实验室, 黑龙江 大庆 163319)

摘要 为探究噬菌体作为新型生物抗菌剂防控肺炎克雷伯菌引起的奶牛乳房炎和乳制品及其加工过程污染, 以及对生物被膜清除的能力, 以 ATCC 700603 为宿主菌从某牛场水样中分离得到 1 株肺炎克雷伯菌噬菌体 vB_KpnM-YP11, 并通过透射电镜观察噬菌体形态特征; 通过双层平板法测定噬菌体宿主谱; 通过最佳感染复数、一步生长曲线、温度和 pH 稳定性测定噬菌体生物学特性; 通过全基因组测序分析基因组的结构特征、比较其进化关系; 通过结晶紫染色法和平板计数法测定噬菌体对生物被膜的抑制和清除效果; 通过牛奶试验分析该噬菌体对牛奶中肺炎克雷伯菌的抑菌效果。结果表明: 1) 从牛场水样中分离获得肺炎克雷伯菌噬菌体 vB_KpnM-YP11, 能形成清晰透亮噬菌斑, 透射电镜观察 vB_KpnM-YP11 具有肌尾噬菌体的典型结构。2) 测定噬菌体宿主谱, 表明 vB_KpnM-YP11 能够裂解 18/34 株牛源肺炎克雷伯菌。3) 生物学特性结果表明 vB_KpnM-YP11 最佳感染复数为 0.1, vB_KpnM-YP11 感染宿主菌潜伏期为 30 min, 爆发期为 50~90 min, 110 min 后进入平台期, 平均裂解量为 69 PFU/cell, 在 pH(3~11) 和温度(4~60 °C) 范围内活性稳定。4) vB_KpnM-YP11 基因组全长 166 607 bp, GC 含量为 39.52%, 注释结果显示共有 276 个 ORF 和 15 个 tRNA, 不含耐药基因及毒力基因。5) vB_KpnM-YP11 最佳感染复数为 0.1 时, 具有显著抑制肺炎克雷伯菌生物被膜的形成能力。vB_KpnM-YP11 效价为 10^8 PFU/mL, 10^9 PFU/mL 能有效清除肺炎克雷伯菌生物被膜。在室温条件下, 12 h 内 vB_KpnM-YP11 使牛奶中细菌浓度下降 98%。综上, 本研究分离获得噬菌体 vB_KpnM-YP11 潜伏期短、裂解效率高, 不仅能抑制和清除生物被膜, 同时对牛奶中肺炎克雷伯菌也有显著的抑菌效果, 具有作为肺炎克雷伯菌生物抗菌剂的应用潜力。

关键词 肺炎克雷伯菌; 噬菌体; 生物学特性分析; 基因组分析; 生物被膜

中图分类号 S855.1+2

文章编号 1007-4333(2024)09-0102-10

文献标志码 A

Isolation, identification and antibacterial effect study of *Klebsiella pneumoniae* phage

KONG Xiangyu, YANG Wenjing, PANG Shenyu, YUAN Qingxin, PAN Shunyu, GAO Dongyang, SONG Jun, WANG Jintao*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine/Ministry of Agriculture and Rural Affairs of Key Laboratory of Prevention and Control of Bovine Diseases/Key Laboratory of Bovine Disease Control in Northeast Cold Regions of Heilongjiang Province, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract The study was to explore the phage as a new type of biological antibacterial agent to control *Klebsiella pneumoniae*, which cause dairy cow mastitis and contaminate dairy products and their

收稿日期: 2024-03-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31802226); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2022C072); 黑龙江省牛病防制重点实验室开放课题(PCBD201710)

第一作者: 孔祥宇(ORCID: 0000-0002-4524-5947), 硕士研究生, E-mail: kongxiangyu0503@126.com

通讯作者: 王金涛(ORCID: 0000-0003-3144-3763), 教授, 主要从事动物疫病防控研究, E-mail: wangjintao@byau.edu.cn

processing, and the ability of biofilm clearance. This study utilized ATCC 700603 as the host bacteria isolated a strain of *Klebsiella pneumoniae* phage vB_KpnM-YP11 from a water sample of a cattle farm and the morphological characteristics of the phage were observed by transmission electron. The host spectrum of phage was determined by double-layer plate method. The biological characteristics of phages were assessed through an optimal multiplicity of infection, one-step growth curve, as well as temperature and pH stability tests. The structural characteristics and evolutionary relationship of the genome were analyzed by whole genome sequencing. The inhibitory and scavenging effects of phage on biofilms were determined using crystal violet staining and plate counting methods. The antibacterial effect of the phage on *Klebsiella pneumoniae* in milk was analyzed. The results showed that: 1) The *Klebsiella pneumoniae* phage vB_KpnM-YP11 isolated from the water samples of cattle farms could form clear and translucent plaques. The typical structure of tailed phage was observed by TEM. 2) Determination of host spectrum showed that vB_KpnM-YP11 could lyse 18/34 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from cattle. 3) The optimal multiplicity of infection (MOI) of this phage was 0.1. The one-step growth curve showed that the latent period was 30 min, and the average lysis amount was 69 PFU/cell. The phage was stable at 4-60 °C or pH 3-11. 4) The full-length genome of vB_KpnM-YP11 was 166 607 bp, and the GC content was 39.52%. The annotation results revealed that the phage contained 276 ORF and 15 tRNA, while lacking drug resistance and virulence genes. 5) When the MOI of vB_KpnM-YP11 was 0.1, it had the ability to inhibit the biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. The mature biofilm were cleared by 10^8 PFU/mL and 10^9 PFU/mL. At room temperature, the bacterial concentration in milk decreased by 98% within 12 h. In conclusion, Phage vB_KpnM-YP11 with short incubation period and high lysis efficiency not only has a good lytic effect on *Klebsiella pneumoniae* in milk, but also can effectively remove the biofilm formed by *Klebsiella pneumoniae*. It has the potential to be used as a biological antibacterial agent for *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords *Klebsiella pneumoniae*; phage; biological characteristics; genomic analysis; biofilm

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)属肠杆菌科,克雷伯菌属,是一种无运动性、无芽孢、有荚膜的革兰阴性杆菌,主要存在于肠道、呼吸道以及自然界中^[1]。其能引起人类及动物的多种疾病,如肺炎、脓毒血症、化脓性脑膜炎、奶牛乳房炎等,对人类及动物健康构成巨大威胁,是一种重要的人畜共患条件致病菌^[2]。在奶牛养殖业中,*K. pneumoniae*感染引起的奶牛乳房炎占临床乳房炎的10%~13%,仅次于金黄色葡萄球菌,链球菌和大肠杆菌^[3]。其中临床上高毒力高耐药*K. pneumoniae*的检出,包括碳青霉烯类耐药*K. pneumoniae*的出现,对畜牧养殖业和人类健康构成极大威胁^[4]。防治*K. pneumoniae*感染,对于奶牛养殖业的健康发展至关重要。已有研究表明生物被膜形成是*K. pneumoniae*主要耐药机制之一,被膜内细菌对抗生素耐药性比浮游菌高10~1 000倍^[5]。因此,需要寻找新型抗菌剂或抗生素替代物以治疗和控制*K. pneumoniae*引起的感染。

噬菌体是一种自然存在并能够特异性感染细菌的病毒。在100多年的实践应用过程中,国

内外研究已证明噬菌体能够用于各种细菌性感染疾病的预防及治疗,特别是对耐药细菌具有良好的防治效果^[6]。Asif等^[7]利用噬菌体能有效清除食物基质中多重耐药*K. pneumoniae*生物被膜;Choo等^[8]利用噬菌体显著降低食品中大肠杆菌O157:H7的细菌数量,控制食品中的污染;Chen等^[4]利用噬菌体降低牛奶和鸡肉中*K. pneumoniae*的浓度,延长其储存时间等。牛奶中营养物质丰富,*K. pneumoniae*极易形成生物被膜附着在挤奶设备上,随着挤奶过程感染乳腺组织。目前,噬菌体用于*K. pneumoniae*感染的防治主要集中在人医临床,用于兽医临床和食品工业相对较少,但兽医临床和食品工业中使用的传统抗菌药和消毒剂难以清除*K. pneumoniae*,严重威胁人类与动物的健康安全^[9]。因此,本研究从大庆市某牛场水样中分离一株肺炎克雷伯菌噬菌体,对其进行生物学特性和全基因组分析,同时探究该噬菌体对生物被膜的抑制和清除效果,并评估噬菌体在牛奶中的抑菌能力,旨在为噬菌体作为生物抗菌剂防控肺炎克雷伯菌感染提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

LB培养基购自青岛海博生物科技有限公司;OMEGA病毒DNA提取试剂盒购自北京云肽生物科技有限公司;高速冷冻型微量离心机(湖南可成仪器设备有限公司);酶联免疫分析仪(杭州奥盛仪器有限公司);透射电子显微镜JEM-2100PLUS(日本电子株式会社)。

1.2 试验菌株及污水样品

本试验所用菌株均由黑龙江八一农垦大学动物科技学院兽医公共卫生实验室保存,其中34株牛源肺炎克雷伯菌分离自黑龙江省各地规模化牛场;宿主菌为肺炎克雷伯菌ATCC 700603,其余菌株由本实验室保存;15份水样品采集自黑龙江省大庆市不同牛场。

1.3 噬菌体的分离纯化及形态观察

参照Pacios等^[10]的方法。将10 mL水样品在8 000 g离心10 min,取上清液与对数期的ATCC 700603在37℃下孵育12 h,通过0.22 μm滤器过滤除菌后得到噬菌体原液。取噬菌体原液和对数期的ATCC 700603各100 μL加入LB半固体培养基,混匀后倒入LB固体培养基,倒置放于37℃恒温培养8 h。挑取单个噬菌斑,采用双层平板法连续纯化多次,直至双层平板上的噬菌斑透亮,形态大小一致,即纯化完成。

采用磷钨酸负染法观察噬菌体的形态,取10 μL噬菌体悬液(10^{10} PFU/mL)滴加到铜网上,静置10 min。用滤纸吸去多余的噬菌体悬液,用2%的磷钨酸负染30 s,干燥后使用透射电镜观察噬菌体形态。

1.4 噬菌体的宿主谱

参照Asghar等^[11]的方法,采用双层平板法对噬菌体vB_KpnM-YP11的宿主谱进行测定。吸取不同细菌菌液100 μL,分别加入5 mL LB半固体培养基,混匀后迅速倒入LB固体培养基。凝固后,滴加10 μL噬菌体悬液,37℃恒温培养4 h,观察是否出现噬菌斑。

1.5 噬菌体的生物学特性分析

1.5.1 最佳感染复数测定

参照阮红日等^[12]的测定方法,将宿主菌培养至对数期,按照不同感染比例(0.000 1、0.001、0.01、

0.1、1、10、100)将噬菌体和宿主菌混合,37℃振荡培养(160 r/min),4 h后采用双层平板法测定上清液中噬菌体效价,效价最高的比例即为最佳感染复数(Multiplicity of infection, MOI)。

1.5.2 一步生长曲线测定

根据最佳MOI=0.1,将噬菌体和对数期的宿主菌按照MOI为0.1进行混合,37℃振荡培养10 min后8 000 g离心10 min,弃上清,加入LB液体培养基重悬菌体沉淀,重复3次以除去未吸附的噬菌体。用LB液体培养基重悬混匀后,37℃振荡培养,每间隔10 min收集样品并测定噬菌体效价,以取样时间为横坐标,噬菌体效价为纵坐标,绘制一步生长曲线。裂解量(PFU/mL)=裂解末期噬菌体效价/初始宿主菌浓度。

1.5.3 热稳定性和pH稳定性测定

将效价约为 10^9 PFU/mL的噬菌体悬液置于不同温度(4、25、37、40、50、60、70和80℃)和不同pH(2~12)条件下,孵育1 h。采用双层平板法测定噬菌体效价。

1.6 噬菌体基因组提取和分析

噬菌体vB_KpnM-YP11的基因组提取参照Zali等^[13]的方法。使用OMEGA病毒DNA提取试剂盒提取噬菌体基因组,送至武汉博越致和生物公司进行全基因组测序。使用RAST(<http://rast.nmpdr.org/>)对噬菌体的全基因组进行功能注释,使用DNASTAR软件分析(G+C)%含量,并将全基因组序列提交到GenBank数据库中进行BLAST同源比对。使用在线数据库(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)预测噬菌体基因组中携带的毒力基因和耐药基因。根据病毒分类委员会(ICTV)分类报告,利用NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库下载不同噬菌体末端酶大亚基序列,用MEGA 11软件通过邻接法构建系统发育树^[14]。

1.7 噬菌体对生物被膜的抑制效果

将噬菌体悬液和对数期的肺炎克雷伯菌分别按不同MOI值加入至96孔板中,每个孔中加入200 μL混合液,SM Buffer作为阴性对照组,置于37℃恒温培养24 h。将上述培养液吸出,每孔加入200 μL的PBS清洗3次;每孔加入200 μL甲醇(95%)固定15 min,然后吸出甲醇,自然晾干;再每孔加入200 μL 1%的结晶紫,室温下染色15 min;用

缓流水冲洗2~3次,37℃培养箱中烘干;最后每孔加入200 μL的33%冰乙酸作用20 min;将处理好的96孔板置于酶标仪中,测定溶液在595 nm处的吸光值;每孔做3个重复,并取平均值。

1.8 噬菌体对生物被膜的清除效果

参照Hon等^[15]的方法,在96孔板上培养成熟的肺炎克雷伯菌生物被膜,用PBS洗涤3次去除游离细菌,之后每孔加入200 μL效价为 10^8 PFU/mL和 10^9 PFU/mL的噬菌体,SM Buffer作为阴性对照组,置于37℃培养24 h。每孔加入200 μL的PBS清洗3次后,刮取黏附在孔板内的生物被膜通过平板计数法测定生物被膜内细菌数量。参考1.7结晶紫染色法测定噬菌体对生物被膜的清除效果。生物被膜内细菌清除率=(对照组-试验组)/对照组×100%。

1.9 噬菌体在牛奶中的抑菌效果

参照张娥^[16]的方法,评估噬菌体在牛奶中抑制肺炎克雷伯菌的能力。将肺炎克雷伯菌(1×10^5 CFU/mL)和噬菌体(1×10^8 PFU/mL和 1×10^9 PFU/mL)分别混合后加入到20 mL牛奶中振

荡混匀,以添加SM Buffer为阴性对照组。在室温下孵育3、6和12 h后。取100 μL样品按10倍梯度稀释,进行菌落计数。

1.10 数据处理与分析

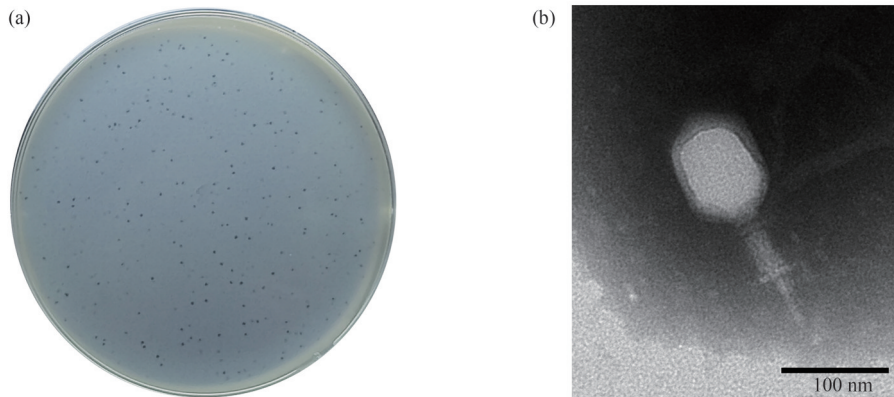
试验结果以平均值±标准差标识,数据采用GraphPad Prism 9统计学软件。所有试验重复3次,多组比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)。*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离纯化及形态观察

以肺炎克雷伯菌ATCC 700603为宿主菌,从牛场水样中分离获得1株肺炎克雷伯菌噬菌体,命名为vB_KpnM-YP11。vB_KpnM-YP11在双层平板形成透亮、边缘清晰噬菌斑,直径约为1~2 mm(图1(a))。

通过透射电镜观察,vB_KpnM-YP11具有肌尾噬菌体的典型结构,头部直径约为(80±5) nm,尾部长约(110±5) nm(图1(b))。



(a) vB_KpnM-YP11噬菌斑形态;(b) vB_KpnM-YP11透射电镜形态。

(a) vB_KpnM-YP11 plaque morphology; (b) Transmission electron microscope morphology of vB_KpnM-YP11.

图1 噬菌体vB_KpnM-YP11的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of phage vB_KpnM-YP11

2.2 噬菌体的宿主谱

由表1可知,双层平板法结果显示vB_KpnM-YP11能在18株测试的肺炎克雷伯菌双层平板上产生噬菌斑,vB_KpnM-YP11对临床分离的牛源肺炎克雷伯菌裂解率为53%(18/34)。对沙门菌、大肠杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等未裂解,表明vB_KpnM-YP11具有较强的特

异性。

2.3 噬菌体生物学特性

通过双层平板法测定vB_KpnM-YP11最佳MOI为0.1(图2(a));根据 $MOI=0.1$ 绘制一步生长曲线如(图2(b))所示,vB_KpnM-YP11的潜伏期约为30 min,而爆发期为50~90 min,110 min后进入平台期,裂解量为69 PFU/cell。vB_KpnM-YP11

表 1 vB_KpnM-YP11 宿主谱测定

Table 1 Determination of host spectrum of vB_KpnM-YP11

菌株 Strain	编号 Number	来源 Source	裂解 Lytic	菌株 Strain	编号 Number	来源 Source	裂解 Lytic
<i>K. pneumoniae</i>	KP01	奶样	—	<i>K. pneumoniae</i>	KP21	牛口腔	+
<i>K. pneumoniae</i>	KP02	奶样	+	<i>K. pneumoniae</i>	KP22	牛口腔	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP03	奶样	+	<i>K. pneumoniae</i>	KP23	牛粪	+
<i>K. pneumoniae</i>	KP04	奶样	—	<i>K. pneumoniae</i>	KP24	牛粪	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP05	奶样	—	<i>K. pneumoniae</i>	KP25	牛粪	+
<i>K. pneumoniae</i>	KP06	奶样	+	<i>K. pneumoniae</i>	KP26	牛粪	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP07	奶样	—	<i>K. pneumoniae</i>	KP27	牛粪	+
<i>K. pneumoniae</i>	KP08	奶样	+	<i>K. pneumoniae</i>	KP28	牛粪	+
<i>K. pneumoniae</i>	KP09	奶样	+	<i>K. pneumoniae</i>	KP29	牛粪	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP10	乳腺	—	<i>K. pneumoniae</i>	KP30	牛粪	+
<i>K. pneumoniae</i>	KP11	乳腺	+	<i>K. pneumoniae</i>	KP31	牛粪	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP12	乳腺	—	<i>K. pneumoniae</i>	KP32	牛粪	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP13	乳腺	+	<i>K. pneumoniae</i>	KP33	牛粪	+
<i>K. pneumoniae</i>	KP14	乳腺	+	<i>K. pneumoniae</i>	KP34	牛粪	+
<i>K. pneumoniae</i>	KP15	乳腺	+	<i>K. pneumoniae</i>	KP35	ATCC 700603	+
<i>K. pneumoniae</i>	KP16	牛口腔	—	<i>S. typhimurium</i>	ST01	ATCC 14028	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP17	牛口腔	—	<i>E. coli</i>	EC01	ATCC 25922	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP18	牛口腔	+	<i>P. mirabilis</i>	PM01	CMCC (B)49005	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP19	牛口腔	—	<i>P. aeruginosa</i>	PA01	ATCC 27853	—
<i>K. pneumoniae</i>	KP20	牛口腔	—	<i>S. aureus</i>	SA01	ATCC 43300	—

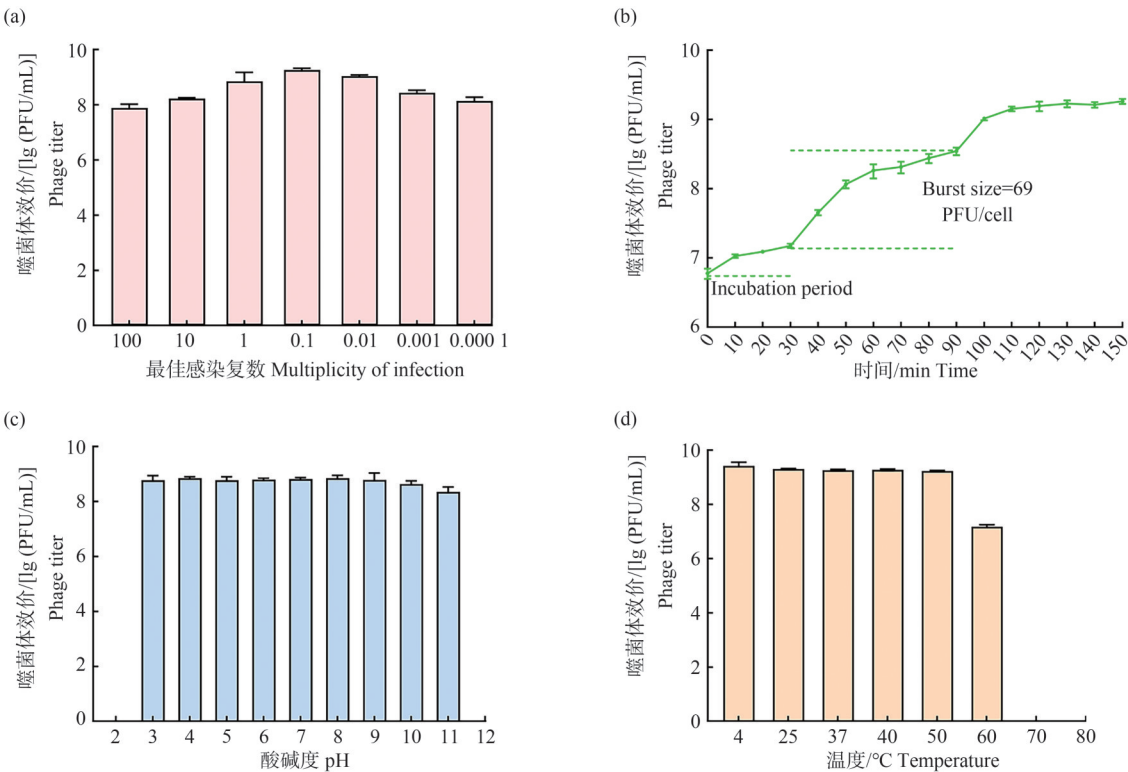
注: +, 可裂解; -, 不可裂解。
Note: +, lytic; -, no lytic.

在pH值为3~11时活性保持稳定(图2(c));当噬菌体在pH=2的酸性环境或者pH=12的碱性环境孵育1 h后,噬菌体活性完全丧失。vB_KpnM-YP11在4~50℃内活性保持稳定,随着温度的逐渐升高,在60℃条件下孵育1 h后,噬菌体滴度下降24%,而在高温70和80℃时vB_KpnM-YP11完全失活(图2(d))。

2.4 噬菌体的基因组分析

如图3所示,噬菌体vB_KpnM-YP11全基因组长度为166 607 bp,基因组为线性,其核酸序列NCBI登录号为PP531540。基因组中A、C、G和T

碱基含量分别为30.74%、18.88%、20.64%和29.74%,G+C含量为39.52%,低于肺炎克雷伯菌株平均GC的含量(57.7%)。共注释276个开放阅读框(ORF),其中大部分基因编码功能未知的假定蛋白,仅53个ORF与已知的功能基因有较高的相似性,包括噬菌体结构基因、DNA复制和细菌裂解相关酶的编码基因等。未发现编码整合酶、切除酶或阻遏物等与溶源有关的基因,表明vB_KpnM-YP11是一株烈性噬菌体。vB_KpnM-YP11基因组中发现15个tRNA,不携带耐药基因和毒力基因,具有较好的应用前景。如图4所示,vB_KpnM-YP11



(a) 最佳感染复数;(b) 一步生长曲线;(c) pH 稳定性;(d) 热稳定性。

(a) Optimal multiplicity of infection; (b) One-step growth curve; (c) pH stability; (d) Thermal stability.

图 2 噬菌体 vB_KpnM-YP11 的生物学特性

Fig. 2 Biological characteristics of vB_KpnM-YP11

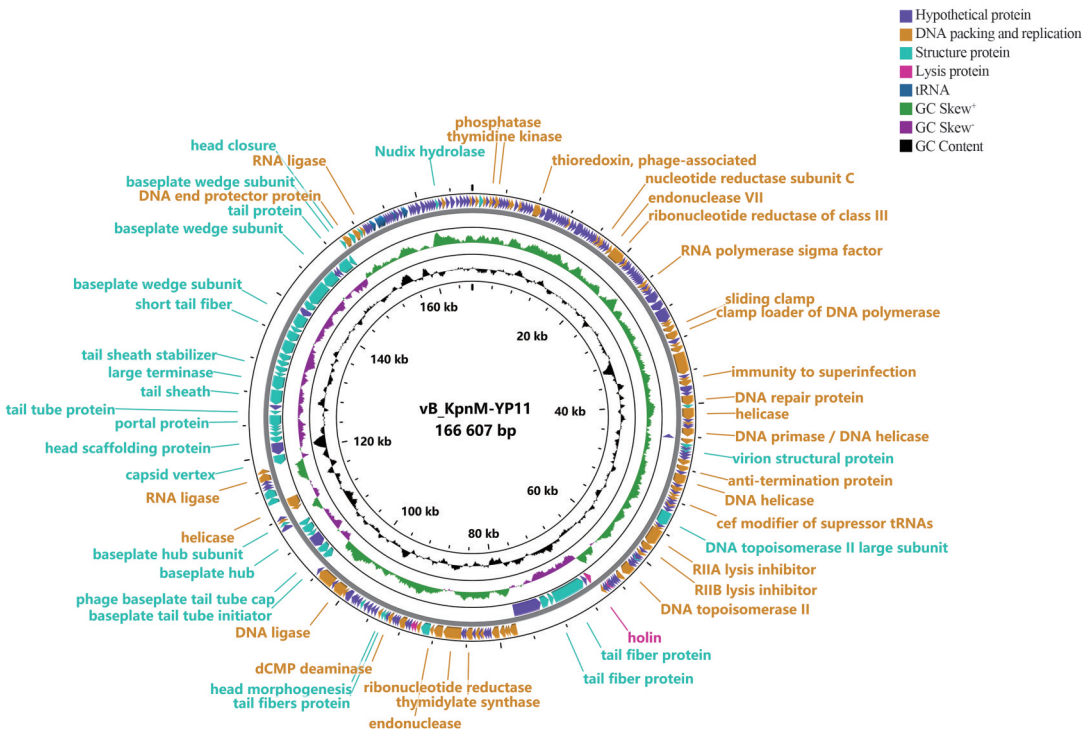


图 3 噬菌体 vB_KpnM-YP11 基因组图谱

Fig. 3 Genome map of vB_KpnM-YP11

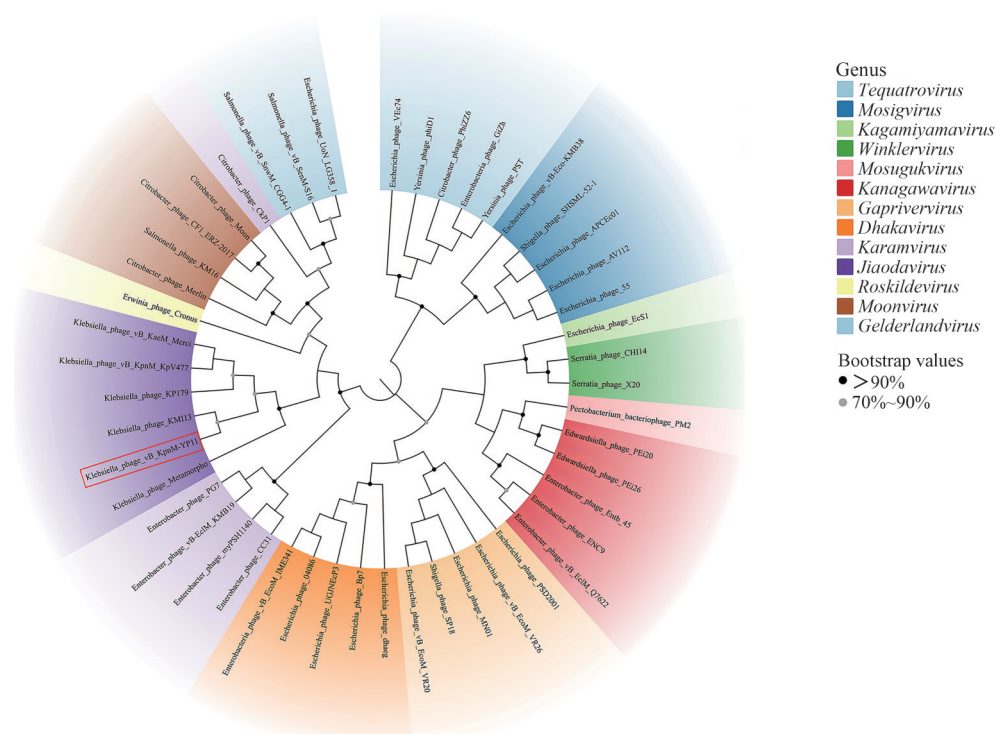


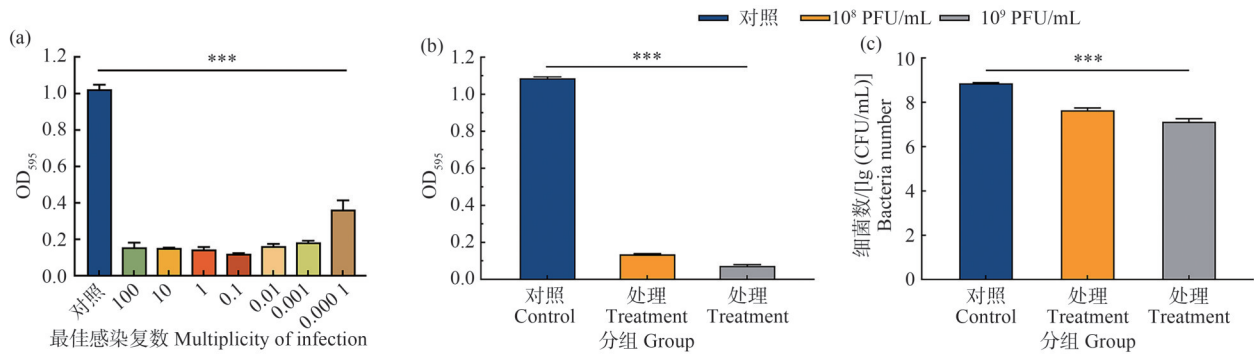
图4 噬菌体vB_KpnM-YP11末端酶大亚基系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic of vB_KpnM-YP11 large terminase subunit

与肺炎克雷伯菌噬菌体KMI13亲缘关系最近,且2株噬菌体均为同一属成员,根据国际病毒委员会(ICTV)的分类,噬菌体vB_KpnM-YP11为Myoviridae科Jiaodavirus属成员。

2.5 噬菌体对生物被膜的抑制和清除效果

生物被膜抑制试验结果表明(图5(a)),不同MOI的vB_KpnM-YP11均可显著抑制肺炎克雷伯菌

生物被膜的形成($P<0.001$)。生物被膜清除试验结果表明(图5(b)),vB_KpnM-YP11与成熟的肺炎克雷伯菌生物被膜共孵育24 h后,效价为 10^8 PFU/mL和 10^9 PFU/mL的vB_KpnM-YP11均可以有效破坏生物被膜的完整性($P<0.001$)。同时,图(5(c))平板计数结果表明vB_KpnM-YP11处理后,生物被膜内的细菌数量分别下降93.86%(1.22 lg CFU/mL)和



(a) vB_KpnM-YP11对生物被膜形成的抑制作用;(b) vB_KpnM-YP11对生物被膜的清除能力;(c) vB_KpnM-YP11处理后生物被膜内活菌数量变化。***表示差异极显著。
(a) The inhibitory effect of vB_KpnM-YP11 on biofilm formation; (b) The ability of vB_KpnM-YP11 to clearance biofilms; (c) The number of viable bacteria in biofilm after vB_KpnM-YP11 treatment. ***indicated extremely significant differences.

图5 噬菌体vB_KpnM-YP11对肺炎克雷伯菌生物被膜作用

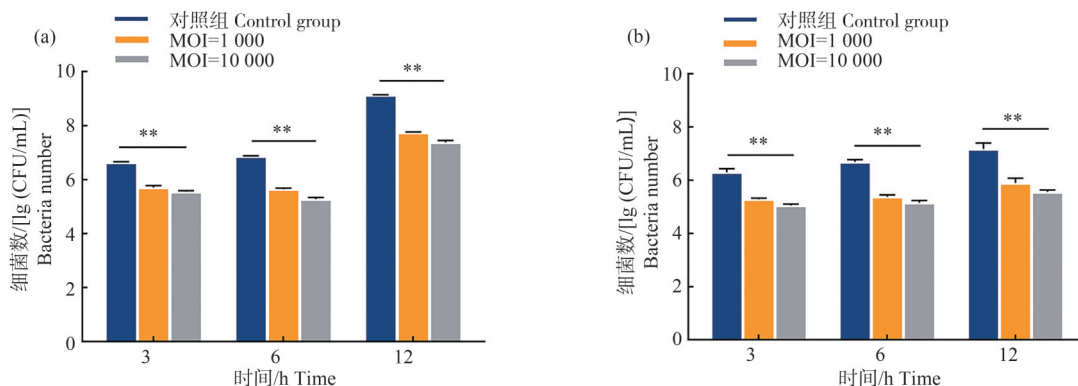
Fig. 5 The effect of vB_KpnM-YP11 on the biofilm of *Klebsiella pneumoniae*

98.14%(1.74 lg CFU/mL)($P<0.001$)。

2.6 噬菌体在牛奶中的抑菌作用

由(图 6(a))可知,室温条件下,vB_KpnM-YP11 在 3 h 内使牛奶中的活细菌数量分别下降 0.93 lg CFU/mL(MOI=1 000)和 1.08 lg CFU/mL(MOI=10 000),6 h 时内活细菌数量由 6.86 lg CFU/mL 分别下降至 5.64 lg CFU/mL(MOI=1 000)和 5.28 lg CFU/mL(MOI=10 000)。随着

vB_KpnM-YP11 处理时间的增加,细菌数量减少。vB_KpnM-YP11 作用 12 h 后,牛奶中肺炎克雷伯菌数量分别降低 1.4 lg CFU/mL(降低 96%,MOI=1 000)和 1.76 lg CFU/mL(降低 98%,MOI=10 000),结果表明 vB_KpnM-YP11 在牛奶中对肺炎克雷伯菌均具有良好的抑制作用($P<0.01$),并且牛奶并不会对噬菌体杀菌活性产生影响($P<0.01$)(图 6(b))。



(a) vB_KpnM-YP11 在牛奶中的抑菌作用; (b) vB_KpnM-YP11 在 SM Buffer 中的抑菌作用
(a) Bacteriostatic effect of vB_KpnM-YP11 in milk; (b) Bacteriostatic effect of vB_KpnM-YP11 in SM Buffer

图 6 噬菌体 vB_KpnM-YP11 的抑菌作用

Fig. 6 Bacteriostatic effect of vB_KpnM-YP11

3 讨论

K. pneumoniae 引起的乳房炎症状严重,难以治疗,给奶牛养殖业造成巨大经济损失^[17]。随着抗菌药物的广泛使用乃至滥用,导致药物残留问题愈发严峻,使得 *K. pneumoniae* 耐药性逐渐增强,碳青霉烯类耐药 *K. pneumoniae* 的检出率更是逐年升高,新型药物研发滞后,临床治疗面临着更加严峻的挑战^[18]。因此迫切需要开发新型抗菌剂以防治 *K. pneumoniae* 造成的感染。

噬菌体广泛分布在生态系统中,易于获得并且具有特异性靶向作用,裂解宿主菌时几乎不会影响其他菌群,现已广泛应用在畜牧养殖业、食品工业和临床医学中^[4]。已有研究表明,噬菌体对细菌生物被膜具有抑制和清除作用,有潜力作为新型抗菌剂防治 *K. pneumoniae* 造成的感染^[19]。

本研究从牛场水样中成功分离获得 1 株肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体 vB_KpnM-YP11,该噬菌体对肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 和牛源肺炎克雷伯菌表现出较强的特异性。基因组分析表明,噬菌体

vB_KpnM-YP11 不携带任何已知的溶源性相关基因、毒力基因和耐药基因,表明该噬菌体在实际应用中具有较好的生物安全性。噬菌体 vB_KpnM-YP11 的生物学特性表明,其最佳感染复数为 0.1,潜伏期为 30 min,爆发期为 50~90 min,在 4~60 °C 和 pH 3~11 范围内活性保持稳定。良好的环境耐受能力和高效的裂解效率是噬菌体 vB_KpnM-YP11 作为生物抗菌剂的应用基础^[20]。

K. pneumoniae 菌毛和胞外多糖赋予该菌黏性表型,能够黏附在生物和非生物表面,并极易形成生物被膜^[21]。细菌生物被膜的产生为细菌提供了天然的保护屏障,这也是其主要耐药机制之一。在奶牛养殖过程中,奶牛感染 *K. pneumoniae* 后,产出牛奶中含有 *K. pneumoniae*,严重影响乳品质^[17]。且 *K. pneumoniae* 在该过程中很可能黏附在挤奶器等设备上,若其形成生物被膜后难以清除,易在养殖场大规模传播,对其他健康奶牛也造成严重威胁。本研究通过结晶紫染色法和平板计数法,对噬菌体 vB_KpnM-YP11 抑制和清除细菌生物被膜的能力进行测定,结果表明,在不同 MOI 值条件下,

vB_KpnM-YP11均能够显著抑制肺炎克雷伯菌生物被膜的形成。vB_KpnM-YP11效价为 10^8 PFU/mL和 10^9 PFU/mL能有效清除肺炎克雷伯菌生物被膜。表明vB_KpnM-YP11具有预防和控制肺炎克雷伯菌及其生物被膜感染的能力。以牛奶作为食物基质,评价噬菌体在牛奶中的抑菌效果。虽然牛奶中含有大量的乳脂和乳蛋白等大分子物质能够影响噬菌体与细菌相互作用^[22],但vB_KpnM-YP11在室温条件下,12 h内能够显著降低牛奶中细菌数量,噬菌体vB_KpnM-YP11虽然不能完全清除乳制品中的细菌,但可以抑制细菌生物被膜的形成,显著减少细菌数量,有潜力作为乳制品杀菌消毒技术补充。未来可考虑将噬菌体与其它清洁剂、消毒剂联合应用,保障乳制品生产、加工、运输及卫生安全,以上研究结果表明,vB_KpnM-YP11有潜力作为生物抗菌剂防控乳制品加工生产过程中*K. pneumoniae*污染。

4 结 论

本研究分离获得的vB_KpnM-YP11具有爆发期短、裂解量高和耐受性强等特点。vB_KpnM-YP11不仅对*K. pneumoniae*生物被膜具有很好的抑制和清除作用,还能够显著降低牛奶中的细菌数量,说明vB_KpnM-YP11有潜力作为生物抗菌剂防控乳制品加工生产过程中*K. pneumoniae*污染。

参考文献 References

- [1] Vading M, Naucler P, Kalin M, Giske C G. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195258
- [2] 詹彤彤,王平峰,郑晓美,文琦琦,叶刚,邓林华,由玉岩,何鸣,王茜,李才武,凌珊珊. 大熊猫源肺炎克雷伯菌研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(2): 770-778
Zhan T T, Wang P F, Zheng X M, Wen Q Q, Ye G, Deng L H, You Y Y, He M, Wang Q, Li C W, Ling S S. Research progress on *Klebsiella pneumoniae* from giant pandas [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 51(2): 770-778 (in Chinese)
- [3] Shi Y X, Zhao W P, Liu G, Ali T, Chen P, Liu Y X, Kastelic J P, Han B, Gao J. Bacteriophages isolated from dairy farm mitigated *Klebsiella pneumoniae*-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells cultured in vitro[J]. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 37
- [4] Chen C R, Tao Z X, Li T T, Chen H, Zhao Y, Sun X H. Isolation and characterization of novel bacteriophage vB_KpP_HS106 for *Klebsiella pneumoniae* K2 and applications in foods[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1227147
- [5] Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 35(4): 322-332
- [6] 宋军,苑庆欣,杨书博,周志新,孙东波. 载体介导噬菌体入胞及抗胞内寄生菌研究进展[J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(6): 12-21
Song J, Yuan Q X, Yang S B, Zhou Z X, Sun D B. Recent advances in bacteriophage entry into cells by carrier delivery and against intracellular bacteria[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(6): 12-21 (in Chinese)
- [7] Asif M, Alvi I A, Waqas M, Basit A, Raza F A, Rehman S U. A K-17 serotype specific *Klebsiella* phage JKP2 with biofilm reduction potential [J]. *Virus Research*, 2023, 329:199107
- [8] Choo K W, Mao L, Mustapha A. CAM-21, a novel lytic phage with high specificity towards *Escherichia coli* O157: H7 in food products [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 386:110026
- [9] 刘子豪,梁媛,刘丹,陈红伟,杨洪早. 根除细菌生物被膜的新视角:分散[J]. 微生物学报, 2023, 63(12):4451-4466
Liu Z H, Liang Y, Liu D, Chen H W, Yang H Z. Dispersion: A new perspective for eradicating bacterial biofilm [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(12): 4451-4466 (in Chinese)
- [10] Pacios O, Fernández-García L, Bleriot I, Blasco L, Ambroa A, López M, Ortiz-Cartagena C, Cuenca F F, Oteo-Iglesias J, Pascual Á, Martínez-Martínez L, Domingo-Calap P, Tomás M. Phenotypic and genomic comparison of *Klebsiella pneumoniae* lytic phages: VB_KpnM-VAC66 and vB_KpnM-VAC13[J]. *Viruses*, 2021, 14(1):6
- [11] Asghar S, Ahmed A, Khan S, Lail A, Shakeel M. Genomic characterization of lytic bacteriophages AYL and AYM infecting ESBL *K. pneumoniae* and its therapeutic potential on biofilm dispersal and *in-vivo* bacterial clearance[J]. *Microbiological Research*, 2022, 262:127104
- [12] 阮红日,王宇辉,徐若洋,陈立,靳育琦,王建发,宋军,郑家三. 噬菌体 vB_SauM_RS对乳源金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用[J]. 食品科学, 2021, 42(1): 52-58
Ruan H R, Wang Y H, Xu R Y, Chen L, Jin Y Q, Wang J F, Song J, Zheng J S. Effect of phage vB_SauM_RS on removal of milk-derived *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. *Food Science*, 2021, 42(1): 52-58 (in Chinese)
- [13] Zaki B M, Fahmy N A, Aziz R K, Samir R, El-Shibiny A. Characterization and comprehensive genome analysis of novel bacteriophage, vB_Kpn_ZCKp20p, with lytic and anti-biofilm potential against clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1077995
- [14] Xie J M, Chen Y R, Cai G J, Cai R L, Hu Z, Wang H. Tree Visualization By One Table (tvBOT): A web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1):W587-W592
- [15] Hon K, Liu S, Camens S, Bouras G S, Psaltis A J, Wormald P J, Vreugde S. APTC-EC-2A: A lytic phage targeting multidrug resistant *E. coli* planktonic cells and biofilms [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(1): 102
- [16] 张娥. 致病性大肠杆菌广谱噬菌体的筛选及在食品中杀菌作用的评估[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022
Zhang E. Screening and evaluation of bactericidal effects in food of pathogenic *E. coli* broad-spectrum bacteriophages[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese)
- [17] 梁冰纯,赵文鹏,石玉祥,朱春燕,韩博,高健. 牛源性肺炎克雷伯菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(9): 8-11

- Liang B C, Zhao W P, Shi Y X, Zhu C Y, Han B, Gao J. Isolation, identification and biological characteristics of bacteriophage from bovine *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2022, 58(9): 8-11 (in Chinese)
- [18] Liu Y, Liu P P, Wang L H, Wei D D, Wan L G, Zhang W. Capsular polysaccharide types and virulence-related traits of epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Chinese university hospital [J]. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N. Y.)*, 2017, 23(7): 901-907
- [19] Zurabov F, Glazunov E, Kochetova T, Uskevich V, Popova V. Bacteriophages with depolymerase activity in the control of antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* biofilms [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 15188
- [20] Cai R P, Wang Z J, Wang G, Zhang H, Cheng M J, Guo Z M, Ji Y L, Xi H Y, Wang X W, Xue Y B, Ur Rahman S U, Sun C J, Feng X, Lei L C, Tong Y G, Han W Y, Gu J M. Biological properties and genomics analysis of vB_KpnS_GH-K3, a *Klebsiella* phage with a putative depolymerase-like protein[J]. *Virus Genes*, 2019, 55(5): 696-706
- [21] Paczosa M K, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2016, 80(3): 629-661
- [22] Gill J J, Sabour P M, Leslie K E, Griffiths M W. Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(2): 377-386
- 责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 孔祥宇,男,硕士研究生,研究方向为噬菌体防控细菌性疾病研究。2023年9月至今就读于黑龙江八一农垦大学动物科技学院,在校期间获得黑龙江八一农垦大学优秀学生干部、优秀实习先进个人、三好学生、一等学业奖学金等荣誉称号。



通讯作者简介: 王金涛,博士,教授,硕士生导师。主要从事动物疫病防控相关研究。以第一作者身份发表相关学术论文30余篇,其中SCI收录3篇,获得发明专利1项,实用新型专利7项。