

肺炎克雷伯氏菌 VBNC 状态转化突变株的筛选与特性研究

沈 菊 胡章立 黎双飞

(深圳大学生命科学学院,深圳 518060)

摘要: 采用双亲本接合法对从文山湖富营养化水体中分离得到肺炎克雷伯氏菌进行 Tn5转座子插入诱变,在含四环素和卡那霉素的 LB培养基上获得接合子,利用饥饿冷冻高渗透压法对接合子进行细菌 VBNC状态转化突变株的筛选和特性的研究。结果表明,带有卡那霉素基因的 Tn5成功地插入到了肺炎克雷伯氏菌的染色体中,在双抗性培养基上获得约 2.3×10^4 cell/mL的接合子,转座效率为 6.58×10^{-4} 。对多个接合子和对照肺炎克雷伯氏菌的诱导、筛选及比较,发现 KPQT-7是最快进入 VBNC状态的突变株,该突变株在胁迫诱导 9d后超过 30%的细胞都进入了 VBNC状态,而对照的肺炎克雷伯氏菌至少要在诱导 21d后才大部分进入 VBNC状态。在此基础上,对 VBNC转化突变株 KPQT-7作进一步的遗传学分析将会为细菌 VBNC状态分子机理的研究奠定坚实的基础。

关键词: VBNC; Tn5转座子;肺炎克雷伯氏菌

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)01-0028-06

细菌“活的非可培养状态 (Viable but non-culturable state, VBNC)”是徐怀恕等^[1]在 1982年首次报道的细菌的一种特殊存活形式,该状态下的细菌在常规培养条件下不能繁殖,但仍然处于活的状态,当给予合适的条件,细菌又能恢复生长繁殖。迄今为止,已先后报道 40多种细菌可以进入 VBNC状态。诱导细菌进入 VBNC状态的因素有很多,主要包括温度^[2]、盐度^[3]、寡营养^[4]、紫外照射^[5]、生物或化学因子^[6]等。VBNC细菌在这些胁迫条件下可以存活很长时间,有的甚至超过一年。目前国外有关细菌 VBNC状态方面的研究比较多,国内相对较少,关于细菌 VBNC状态的分子机理研究则更少。Romanova *et al.*^[7]利用转座子插入突变法得到若干鼠伤寒沙门氏菌的变异株,尽管这些变异株中转座子插入染色体的部位不同,但都具干扰细胞进入 VBNC状态的功能。根据这些表型的差异,将变异株划分为 3个组,通过基因克隆和序列分析,最后得到 3个能控制鼠伤寒沙门氏菌进入 VBNC状态的基因,分别是 *hpf*(脂褐素)、*pqi*(SoxRS调节子的组成部分)和 *glgC*(腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶)。最新研究^[8,9]发现编码过氧化氢酶的 *KatG* 基因在大肠杆菌与霍乱弧菌进入 VBNC状态的过程中起着重要

调控作用,表明了细菌进入 VBNC状态与基因调控有关,不同的细菌其进入 VBNC状态受不同或相同的基因所调控。当前,研究工作者对细菌如何由正常生活状态转变为 VBNC状态及 VBNC状态如何转化成可培养细胞等形成机理还知之甚少,而更深层次地揭示细菌 VBNC状态的生态、生理和分子生物学机理是解决与细菌 VBNC细胞相关的卫生学、预防医学和环境生物学问题的前提。

利用转座子插入突变法将转座子导入染色体 DNA,使转座子插入位点处基因发生插入突变,通过筛选功能发生变化的突变株来研究突变株中被插入位点相邻的 DNA 序列。该方法已成为当今开展基因定位及其功能研究,特别是一系列调控基因研究的有效方法^[10,11]。20世纪 50年代美国遗传学家 Barbara McClintock通过对玉米籽粒色斑不稳定现象的研究而发现了转座子 (Transposon),它是一类能在基因组间或组内“跳跃”的 DNA 片段,它可以从遗传物质的一部分跳跃到另一部分,从而引起遗传变异。细菌转座子可分成插入序列 (Insertion sequences)、复合转座子 (Composite transposons)、TnA 转座子家族 (TnA family) 和可转移噬菌体 (Muphage)。Tn5属于复合转座子,其两端具有两段倒置

收稿日期: 2007-03-15 修订日期: 2008-02-28

基金项目: 国家自然科学基金 (30470281, 30770340); 国家重点基础研究发展计划课题 (2002CB412309)资助

作者简介: 沈菊 (1981—), 女, 汉族, 广东高州人; 硕士研究生; 主要从事环境微生物方面的研究。E-mail: rosaline34@vip.sina.com

通讯作者: 胡章立, E-mail: huzl@szu.edu.cn

的 IS50序列,右末端 (IS50R)编码转座酶 (Tnp)和一个阻遏转座蛋白 (Inh);左末端 (IS50L)存在一个赭石突变,不能编码有功能的转座酶^[12]。由于 Tn5是非复制型转座子,因此相对于其他转座子来说,更被广泛地应用于新基因的发现、基因功能的分析和突变体库的构建。

本研究主要通过 M₁₃mp18-Tn5转座子对自然水体中分离出来的与微囊藻种群动态之间存在一定相关性的肺炎克雷伯氏菌进行转座插入突变,筛选肺炎克雷伯氏菌“VBNC”状态转化突变株,为今后寻找和鉴定调控细菌 VBNC 状态的相关基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒 供体菌株 *E. coli* S17-1/Pm⁺ Tn5为中国农业科学院植物保护研究所生物技术研究组提供^[13];受体菌株肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)为本实验室分离保存菌种。

1.2 受体菌与供体菌抗生素敏感性测定 受体菌和供体菌各取 100μL 分别加入到含氨苄青霉素 (Ampicillin)、卡那霉素 (Kanamycin)、利福平 (Rifampicin)和四环素 (Tetracycline)的 LB 培养基中涂布均匀,4种抗生素的使用浓度分别为 100μg/mL、50μg/mL、100μg/mL 和 15μg/mL。每个抗性实验重复 3次,以确保受体菌和供体菌抗生素敏感性测定的准确性。

1.3 转座子的诱变 供体菌和受体菌分别被接种到 LB培养液中,37℃震荡培养 (转速为 200r/min),待其生长到对数期,取供体菌 600μL 和受体菌 300μL 于同一张无菌纤维素滤膜 (0.22μm)上过滤,滤膜有菌面朝上置于 LB 培养基上,37℃培养过夜,次日用无菌 PBS缓冲液将滤膜上生长的菌苔洗下,洗下的菌液充分混匀,10 mmol/L MgSO₄ 稀释 1000倍后涂布于含利福平和卡那霉素的 LB 培养基上,37℃倒置培养 24h。

1.4 接合子的 DNA 提取 按碱裂解法提取接合子质粒,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行观察,方法参考文献 [14]。基因组 DNA 的提取方法参考文献 [15]。

1.5 接合子 PCR 鉴定 根据 Tn5转座子卡那霉素基因上的一段序列,设计出引物 IS1 (5′-gctattgggcgaagtgcgg-3′) 和 IS2 (5′-cga tgcgtgcgaatcggg-3′),通过引物 IS1和 IS2对接合子基因组 DNA 进行扩增。扩增条件 94℃变性 5min,94℃,30s,60℃,

30s,72℃,1min,30个循环;72℃延伸 10min。PCR 反应完成后,取 5μL 样品进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 肺炎克雷伯氏菌 VBNC 状态转化突变株的筛选 双抗培养基上随机挑取 10个转座接合子进行 VBNC 状态的检测。转座接合子被接种到 LB 培养液中,37℃震荡培养 (转速为 200r/min),待其生长到对数期,按 1% 的接种量加入到含 3% NaCl 的无菌蒸馏水中,置于 4℃低温培养。定期取样观察,利用 4,6-联脒-2-苯基吡啶 (DAPI) 荧光显微镜直接计数法检测活菌总菌数的变化,每毫升菌液用 100μL 浓度为 1ppm 的 DAPI进行染色;而可培养细菌数的变化则通过平板菌落计数法检测,采用 2个稀释度平板法,菌液稀释 10000倍和 100000倍后,分别吸取 100μL 接种到 LB 平板培养基上,37℃培养 24h,计数。

2 结果

2.1 受体菌与供体菌抗生素敏感性测定结果 接合转座前须对受体菌与供体菌的耐药谱进行测试,选择一种供体菌敏感而受体菌耐受的抗生素进行接合子的筛选。测定结果表明,受体菌对利福平、四环素和氨苄青霉素都具有抗性作用,而在含卡那霉素的单抗培养基上无法生长。由于本研究所用的供体菌株对卡那霉素耐受,因此,可以选择含四环素和卡那霉素的双抗培养基对接合子进行筛选。

表 1 受体菌与供体菌抗生素敏感性测定结果
Tab. 1 Fastness sensitivity test of receptor and host

	氨苄青霉 (Amp)	卡那霉素 (Km)	利福平 (Rif)	四环素 (Tc)
	100μg/mL	50μg/mL	100μg/mL	15μg/mL
受体菌 Receptor	+	-	+	+
供体菌 Host	+	+	+	-

2.2 接合转座

采用 1.3描述的双亲本滤膜接合法进行转座诱变,结果在四环素和卡那霉素双抗培养基上筛选到约 2.3×10^4 cell/mL 的接合子,其转座效率达到 6.58×10^{-4} 。

2.3 接合子的分子鉴定

质粒 Pm⁺Tn5中编码卡那霉素的片段位于可移动片段内,会随着转座子随机插入到受体菌的染色体上 (肺炎克雷伯氏菌对卡那霉素敏感)。通过对接合子抗生素敏感测定,发现所有的接合子都对卡那霉素具有抗性。随机对 10个接合子进行质粒

提取, 结果没有发现质粒, 这说明了接合子对卡那霉素的抗性是由染色体而非质粒编码的。为了进一步确定 Tn5 已插入到受体菌染色体中, 随机挑取了 10 个接合子进行 PCR 鉴定, 根据 Tn5 片段内的编码卡那霉素的 DNA 片段设计了 1 对引物, 对所提取的基因组 DNA 进行扩增, 获得 488bp 的目的片段, 测序结果表明, 该片段为编码卡那霉素的 DNA 片段 (图 1)。

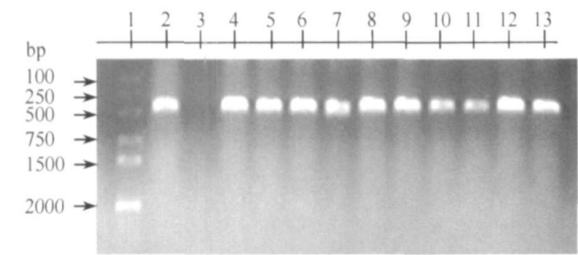


图 1 菌落 PCR 扩增的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product

泳道 1 为 Mark DL 2000 泳道 2 为阳性对照; 泳道 3 为阴性对照;
泳道 4—13 为接合子
Lanes 1 Mark DL 2000; Lanes 2 positive control; lanes 3 negative control; lanes 4—13 mutants

2.4 肺炎克雷伯氏菌 VBNC 状态转化突变株的筛选
利用饥饿、冷冻、高渗透压法筛选能更快或更慢进入 VBNC 状态的突变株。通过对多个接合子和对照肺炎克雷伯氏菌的诱导、筛选及比较, 发现 KPQT-7 是最快进入 VBNC 状态的突变株。由图 2 可以看出, 利用 4,6-联脒-2-苯基喹啉 (DAPI) 荧光显微镜直接计数法^[16]检测的活细菌总数一直处于 10^6 与 10^7 之间, 平板菌落计数法检测到的可培养细菌数则随着时间的推移逐渐减少, 其中 KPQT-7 株的可培养细菌数在培养前期减少得最快, 失去培养性的细胞都进入了 VBNC 状态。在活细菌总数一定的情况下, KPQT-7 株在胁迫诱导 9d 后, 其超过 30% 的细胞都已进入了 VBNC 状态, 而对照的肺炎克雷伯氏菌至少要在诱导 21d 后才大部分进入 VBNC 状态。VBNC 细菌数与可培养细菌数百分比变化示意图 (图 3) 显示出, 培养 9d 后的 KPQT-7 株进入 VBNC 的细菌数是可培养细菌数的 0.45 倍, 与培养起始时的 0.2 倍增加了 0.25, 而对照的肺炎克雷伯氏菌进入 VBNC 状态的细菌数与可培养细菌数的百分比则由起始的 0.1 上升到 0.2, 升幅约为 0.1, 这说明了在活细菌总数一定的情况下, KPQT-7 株的可培养细菌数能更快地转化为 VBNC 状态, 这可能与 KPQT-7 中 Tn5 插入的位点有关。

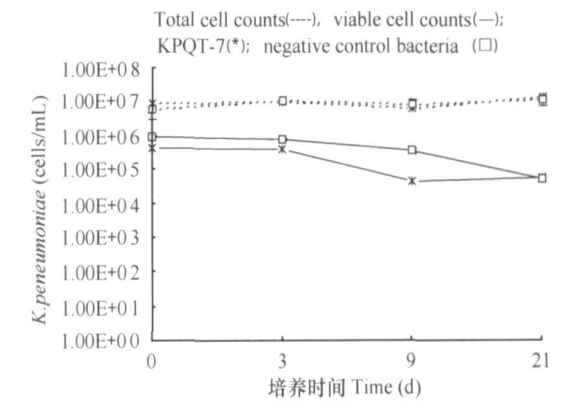


图 2 肺炎克雷伯氏菌的存活曲线

Fig. 2 Bacterial count of *K. pneumoniae* at different times (in days)

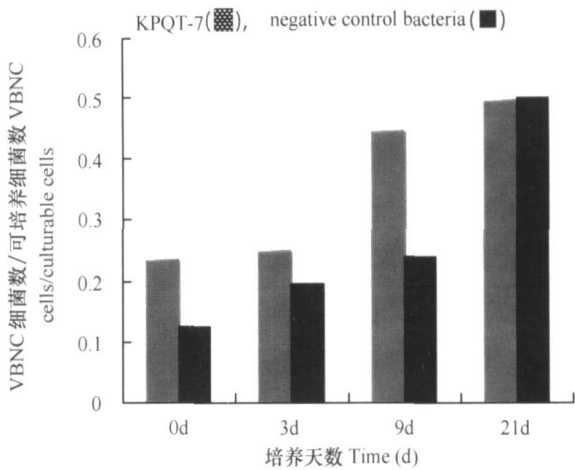


图 3 VBNC 细菌数与可培养细菌数百分比变化示意图

Fig. 3 The changes of the ratio of VBNC cells to culturable cells at different times (in days)

3 讨论

肺炎克雷伯氏菌为革兰氏阴性杆菌, 广泛存在于河水、湖水中的致病菌, 甚至存在于甲鱼等水生生物的体内。到目前为止, 关于自然水体中肺炎克雷伯氏菌的 VBNC 状态方面国内外还没有相关的报道, 而研究肺炎克雷伯氏菌的 VBNC 状态对环境公共卫生、水产疾病检测等方面都具有非常重要的意义。
迄今为止, 大部分关于 VBNC 细菌的遗传学研究都集中在核酸水平上。Ravel *et al.*^[17] 通过转座子插入的诱变方法, 获得 2500 多个霍乱弧菌的变异株, 将这些变异株于 4℃ 和 25℃ 下置入工海水中, 使进入 VBNC 状态, 他们发现其中的 JRO9H1 株能更快地进入这种休眠状态, 提示细菌在不良环境条件下进入 VBNC 状态可能是由基因控制的; Romano-

va, et al.^[7]通过转座子 TnPhoA 的插入诱变, 得到若干鼠伤寒沙门菌的变异株, 尽管这些变异株中转座子插入染色体的部位不同, 但都能干扰细胞进入 VBNC 状态, 通过对变异株的基因进行分析, 发现 3 个能控制鼠伤寒沙门菌进入 VBNC 状态的基因。二者都是利用转座子插入突变获得影响细菌进入 VBNC 状态的相关基因, 表明转座子插入突变法是研究细菌 VBNC 状态分子机理的行之有效的方法。本研究采用了具有卡那霉素选择标志的 MⁱⁿTn5 转座子对肺炎克雷伯氏菌进行诱导, 卡那霉素标志位于 Tn5 转座末端序列之间, 当转座子接合到受细菌的染色体后, 该菌就获得了转座子所编码的性状, 能很容易地与未诱变的菌体区分开来, 而转座必需的转座酶 *tnp* 则位于 Tn5 转座末端序列之外, 因此在发生转座后, 染色体上的转座片段不会再发生第二次转移。与其他转座子相比, 本研究采用的 MⁱⁿTn5 转座子诱导突变株具有明显的优势, 诱变率高且是插入性单突变, 不会出现多重突变, 而这些都是利于本研究的深入性与准确性^[18]。

丛延广等^[18]在利用 MⁱⁿTn5 转座子诱导弗氏枸橼酸杆菌插入突变的研究中, 从 4047 株转座接合子中共筛选出 97 株营养缺陷株, 转座突变频率为 0.024。本研究采用的 MⁱⁿTn5 转座子对肺炎克雷伯氏菌的转座突变频率为 0.1, 二者相比, 后者的转座突变频率较高, 这说明相同的转座子对不同的细菌具有不同的转座突变频率。

细菌尤其是革兰氏阴性杆菌 VBNC 状态的形成与环境中的温度、盐度、寡营养等条件有着密切的关系, 其中最显著的影响因子是温度^[19-21], 低温比高温更能促进细菌进入 VBNC 状态。此外, 国外研究得比较多的就是盐度^[23,24]对细菌 VBNC 状态的影响, 研究表明, 盐度为 3% 左右的培养水体比盐度低于 2% 的培养水体更能促进细菌 VBNC 状态的形成。通常情况下都是两种或多种胁迫条件共同作用促使细菌进入 VBNC 状态的。本研究采用的 VBNC 状态转化突变株筛选方法为饥饿冷冻高渗透压法。由于细菌在生长过程中必须从外界环境中摄取营养物质合成和能量代谢的需要, 为了产生饥饿(寡营养)胁迫, 本研究采用的培养水体是无菌蒸馏水, 其水体中的营养物含量很低。同时又处于低温(4℃)和高渗透压(3% NaCl)的胁迫条件下, 所以使接合子逐渐进入 VBNC 状态。该实验前后重复了 2 次, 每次都得到相同的结果, 培养过程中活细菌总数一直保持在 10⁶ 数量级左右, 可培养的细菌数则

随着时间的推移逐渐减少。而通过对多个突变株和对照肺炎克雷伯氏菌的诱导、筛选及比较, 发现 KPQT-7 株的可培养细菌数在培养前期减少得最快, 即其 VBNC 状态的细胞数增加得最快。在活细菌总数保持在 10⁶ 数量级的情况下, 该突变株在胁迫诱导 9d 后超过 30% 都已进入 VBNC 状态, 对照的肺炎克雷伯氏菌至少要在诱导 21d 后才大部分进入 VBNC 状态。这显示了肺炎克雷伯氏菌在不良环境条件下进入 VBNC 状态可能是由基因调控的, 因为转座子 Tn5 的插入使 KPQT-7 株进入 VBNC 状态的相关基因发生了插入突变, 促使 KPQT-7 株更快更容易进入 VBNC 状态。由此推测, KPQT-7 株中 Tn5 插入位点的侧翼序列可能在肺炎克雷伯氏菌进入 VBNC 状态的过程中起着正负调控的作用, 而有关该类细菌进入 VBNC 状态前后相关基因的表达调控变化还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Xu H S, Roberts N, Singleton E, *et al*. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment [J]. *Microbiol Ecol*, 1982, **8**(4): 313—323
- [2] Lázaro B, Cárcano J, Audicana A, *et al*. Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral campylobacters jejuni cells after long-term exposure to low temperatures [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(10): 4677—4681
- [3] Marco-Noales E, Bisca E G, Amaro C. Effects of Salinity and Temperature on Long-Term Survival of the Eel Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 2 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(3): 1117—1126
- [4] Trainor V C, Udy R K, Brenner P J *et al*. Survival of *Streptococcus pyogenes* under stress and starvation [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **176**(2): 421—428
- [5] Chamberlin C E, Mitchell R A. Decay model for enteric bacteria in natural waters New York: John Wiley [A]. In: Mitchell (Eds.), *Water Pollution Microbiology* [M]. New York: John Wiley, 1978: 325—348
- [6] Han Q G, Hu Z L, Lei A P, *et al*. The studies on the relationship between Microcystin-LR and viviform state of bacterium in natural bodies of water [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(2): 199—202 [韩庆国, 胡章立, 雷安平, 等. 微囊藻毒素与自然水体中细菌 VIVIFORM 状态的相关性. 水生生物学报, 2005, **29**(2): 199—202]
- [7] Romanova I M, Kirilov M I, Terekhov A A, *et al*. Identification of genes controlling the transition of *Salmonella typhimurium* bacteria to a non-culturable state [J]. *Genetida*, 1996, **32**(9): 1184—1190
- [8] Rhee J H, Kim C M, Lee S E, *et al*. Cloning and molecular biological characterization of the catalase-peroxidase *katG* gene of *Vibrio vulnificus* [C]. *Abstr Annu Meet Am. Soc Microbiol B*

- 2000 112
- [9] Storz G, Zheng M. Oxidative stress [A]. In: Storz G, Hengge A, von J. (Eds.), Bacterial Stress Responses [M]. Washington D C: American Society Microbiology Press, 2000: 47—60
- [10] Russell D, Monds P, D. et al. Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(3): 1910—1924
- [11] Iurescia S, Marconi A M, Tofani D, et al. Identification and sequencing of β -Myrcene catabolism genes from *Pseudomonas* sp. strain M1 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(7): 2871—2876
- [12] Tang J T, He Y Q, Tang J L. Research development of Tn5 transposition mechanism [J]. *Journal of Guangxi Agric. and Biol. Science*, 2003, **4**: 316—321 [唐江涛, 何勇强, 唐纪良. 细菌转座子 Tn5 转座机理的研究进展. 广西农业生物科学, 2003, **4**: 316—321]
- [13] Zhang X J, Sun F Z, Zhao T C, et al. A stably transgenic NA *Enterobacter cloacae* for control of insect pests [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, **37**(2): 227—232 [张新建, 孙福在, 赵廷昌, 等. 促冻杀虫基因工程菌的构建. 中国农业科学, 2004, **37**(2): 227—232]
- [14] Joseph Sambrook, David W, Russell. Molecular cloning: A laboratory manual (3rd edition) [M]. Beijing: Science Press, 2001, 27—30 [(美) 萨姆布鲁克, 等. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2001: 27—30]
- [15] Ausubel F M, et al. Short protocols in molecular biology (3rd edition) [M]. Beijing: Science Press, 1995: 39 [(美) F. 奥斯伯, 等. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1995: 39]
- [16] Troxler et al. Predominance of nonculturable cells of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the surface horizon of large outdoor lysimeters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(10): 3776—3782
- [17] Ravel J, Hill R T, Colwell R R. Isolation of a *Vibrio cholerae* transposon-mutant with an altered viable but nonculturable response [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, **120**(1—2): 57
- [18] Cong Y G, Xu Q W. Insertion mutagenesis in *Citrobacter freundii* by MiniTn5 transposon [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2004, **13**: 1145—1147 [丛延广, 徐启旺. 利用 MiniTn5 转座子诱导弗氏枸橼酸杆菌插入突变的研究. 第三军医大学学报, 2004, **13**: 1145—1147]
- [19] Jiang X P, Chai T J. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable nonculturable cells [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(4): 1300—1305
- [20] Oliver J D, Hite F M, Dougald D, et al. Entry into and resuscitation from the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(7): 2624—2630
- [21] Randa M ark A, Polz M F, Lin E. Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(9): 5469—5476
- [22] Oliver J D, Nilsson L, Kjelleberg S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**(9): 2640—2644
- [23] Thorsen B K, Enger O, Norland S et al. Long-term starvation survival of *Yersinia Ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**(5): 1624—1628
- [24] Hoff K A. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, **55**(7): 1775—1786

STUDIES ON THE SCREENING FOR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VBNC MUTANTS AND ITS TRANSFORMATION CHARACTERISTICS

SHEN Ju HU Zhang-Li and LI Shuang-Fei

(College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060)

Abstract VBNC (viable but non-culturable state) bacteria are considered to represent a sub-population of cells which are not able to grow in the usual culture media but yet remain metabolically active and can be resuscitated when conditions become favorable. So far, the molecular basis for entry into and resuscitation from the VBNC state are still poorly known, and all these observations must make clear because VBNC bacteria is concerned about public health, evaluating water quality, epidemic prevention. To better understand the molecular mechanism of bacterial VBNC state, this study used transposon Tn5 to induce the gram negative bacteria *Klebsiella pneumoniae* by parental conjugation method. Exconjugations were isolated from culture medium with 50 $\mu\text{g/mL}$ km and 15 $\mu\text{g/mL}$ Tc and detected by PCR using primers S1 and S2 which had been designed using Tn5 as the template. PCR products were visualized on a 1% agarose gel. After that, exconjugations were incubated in sterilized distilled water with 3% sodium chloride at 4°C for screening mutants which was the fastest and the easiest entered the VBNC state. The results showed that transposon Tn5 were inserted in chromosome of *K. pneumoniae* successfully, about 2.3×10^4 cell/mL exconjugations were obtained and its transposon frequency was high at 7.6×10^{-5} . Exconjugations could be detected by PCR using primers S1 and S2. Comparing with the other strains, a mutant KPQT-7 was found much faster and easier to enter VBNC state throughout the incubation, total direct cell counts remained near the original inoculum level of 10^6 to 10^7 cell/mL, and the plate cell counts decreased day by day more than 30% of KPQT-7 population had been into VBNC state after 9d stress treatment, while the control strain entered the VBNC state after 21d stress treatment. It can be concluded that *K. pneumoniae* entered the VBNC state might deal with the sequence flanking the Tn5 insertion site. The genetic analysis on the mutant KPQT-7 are ongoing, this experiment has laid a solid foundation for the further research on molecular mechanism of the VBNC transformation in aquatic bacteria.

Key words VBNC; Tn5 transposon; *Klebsiella pneumoniae*