

张驰, 王劲松, 杨金龙, 等. 海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas marina*) *pilZ* 基因缺失抑制厚壳贻贝附着变态[J]. 海洋学报, 2022, 44(4): 95–103, doi:10.12284/hyxb2022090

Zhang Chi, Wang Jinsong, Yang Jinlong, et al. Knockout of *Pseudoalteromonas marina pilZ* gene inhibited the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(4): 95–103, doi:10.12284/hyxb2022090

海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas marina*) *pilZ* 基因缺失抑制厚壳贻贝附着变态

张驰^{1,2}, 王劲松^{1,2}, 杨金龙^{1,2,3}, 张俊波^{4,5}, 万荣^{4,5,6}, 梁箫^{1,2*}

(1. 上海海洋大学 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 2. 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心, 上海 201306; 3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458; 4. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306; 5. 国家远洋渔业工程技术研究中心, 上海 201306; 6. 国家远洋渔业工程技术研究中心舟山分中心, 浙江 舟山 316014)

摘要: 为探究海假交替单胞菌 *pilZ* 基因的缺失对生物被膜形成及突变菌生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响, 本文通过同源重组构建 *pilZ* 基因缺失菌, 分析了基因缺失菌生物被膜的细菌密度、膜厚、c-di-GMP 水平和胞外产物含量等特性的变化及其对厚壳贻贝幼虫附着变态的调控作用。结果表明: 与野生型菌株相比, *pilZ* 基因缺失菌形成的生物被膜膜厚增加、细菌数量增多, 胞外产物中 β -多糖、蛋白含量减少, 抑制了厚壳贻贝幼虫的附着变态 ($p < 0.05$); 而 c-di-GMP 水平、 α -多糖和脂质含量无显著变化 ($p > 0.05$)。由此可见, 海假交替单胞菌 *pilZ* 基因的缺失可调控细菌生物被膜形成和胞外产物包括 β -多糖、蛋白质的含量, 从而抑制厚壳贻贝幼虫的附着变态。

关键词: *pilZ*; 生物被膜; 厚壳贻贝; 附着变态; 胞外产物

中图分类号: S968.31; Q938.8

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)04-0095-09

1 引言

附着变态是厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 等海洋无脊椎动物幼虫生长发育过程中必经的重要阶段, 一般受到自然环境中所存在的化学因子和动物自身的内源性因子所调控^[1]。其中, 生物被膜 (Biofilm, BF) 作为重要的化学诱因被广泛研究。生物被膜是细菌在成长过程中为应对环境变化而呈现出的一种不同于游离生长形式的菌体, 其为聚集黏附于基质表面的被膜状生物群体^[2]。环二鸟苷单磷酸 (cyclic di-GMP 或 c-di-GMP) 是细菌胞内普遍存在的一种重要的第二信使, 可以通过结合多种不同类型的效应蛋白来调控细

菌的诸多生物功能和行为, 同时其胞内水平的变化会影响细菌生物被膜的形成^[3]。在生物被膜形成的复杂过程中, 细菌需要感知、转导、传递来自细胞内外的化学信号, 将多糖、蛋白、脂类等物质分泌到胞外形成胞外产物 (Extracellular Polymeric Substances, EPS) 包裹菌体。

海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas marina*), 一株分离自海洋环境中所形成的生物被膜上的革兰氏阴性菌, 其自身形成的生物被膜及其分泌的多种具有生物学活性的胞外产物均能诱导厚壳贻贝幼虫的附着变态^[4-8]。例如, Peng 等^[5]在对 *P. marina orf01912* 基因敲除后发现, 细菌胞内 c-di-GMP 水平显著增加, 同

收稿日期: 2021-11-10; 修订日期: 2021-12-27。

基金项目: 国家自然科学基金 (41876159, 41476131); 国家重点研发计划 (2019YFC0312104, 2020YFD0900804); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项 (GML2019ZD0402); 上海市优秀学术带头人计划 (20XD1421800)。

作者简介: 张驰 (1996—), 男, 江苏省徐州市人, 从事海洋贝类分子生物学研究。E-mail: M190100015@st.shou.edu.cn

* 通信作者: 梁箫 (1983—), 女, 主要从事海洋贝类分子生物学研究。E-mail: x-liang@shou.edu.cn

时使生物被膜上可拉酸(Colanic Acid, CA)含量增多,从而促进了厚壳贻贝幼虫的附着变态;同年,研究发现,当 *P. marina* 中 *fliP* 基因缺失后,突变菌形成的生物被膜诱导厚壳贻贝附着变态的能力显著降低,而从野生菌中提取的鞭毛蛋白可以提高幼虫的附着变态率^[6];此外,研究表明, *P. marina* 野生菌提取的鞭毛蛋白能够促进生物被膜上胞外产物的产生^[8];近期研究发现, *P. marina* 中 *tesA* 基因缺失会导致胞内 c-di-GMP 水平升高,同时导致生物被膜中脂肪酸含量下降,从而抑制了厚壳贻贝幼虫的附着变态^[7]。以上研究表明,海假交替单胞菌中某一基因的缺失会影响细菌胞内 c-di-GMP 水平的变化,改变生物被膜胞外产物的含量,从而间接调控厚壳贻贝幼虫的附着变态。

c-di-GMP 已被证实的胞内效应蛋白或受体包括 PilZ 结构域蛋白、转录因子、退化的 GGDEF、EAL 或 HD-GYP 结构域蛋白、AAA ATPase 结构域蛋白以及 RNA 核糖开关等^[9-10]。PilZ 结构域蛋白作为典型的 c-di-GMP 结合蛋白近年来被广泛研究,两者结合可调控细菌的运动性^[11-12]、毒性^[13] 以及纤维素、藻酸盐^[14-15] 等胞外多糖的合成和生物被膜形成^[16]。但值得注意的是,并不是所有的 PilZ 结构域蛋白都具有与 c-di-GMP 结合的能力,有些 PilZ 结构域蛋白通过与具有 GGDEF 和 EAL 结构域的蛋白相互作用,参与到 c-di-GMP 调控某些生物因子如 IV 型菌毛 (Type IV pili, T4P) 的生物合成信号通路中^[17]。

本研究通过 *P. marina* 基因组数据^[18] 筛选出同时被注释为“PilZ 结构域蛋白基因”和“IV 型菌毛生物合成基因”的 *pilZ* 基因,并利用同源重组的方法构建了 *P. marina pilZ* 基因的缺失菌。通过比较野生菌与 *pilZ* 基因缺失菌的菌落表型、运动性、形成生物被膜的能力及其生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响,为解析 *P. marina* 生物被膜的形成机制、生物被膜与厚壳贻贝附着变态的互作关系提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料

厚壳贻贝眼点期幼虫均取自浙江省舟山市嵊泗县(30°73'N, 122°44'E),幼虫在实验室条件下暂养 1 周后进行试验。暂养在盐度为 30,经孔径为 0.45 μm 的滤膜(Whatman)过滤后的自然海水中,每隔 2 d 更换 2/3 水体,每日按时投喂 1 次湛江等鞭金藻(5×10⁴ cells/mL),放置于 18℃ 暗室内充气培养。

文章所用菌株和质粒详见表 1。实验使用的细菌菌株为 *P. marina* ECSMB14103(保藏号: MCCC1K03511),

其从形成于浙江省舟山市枸杞岛海域(30°73'N, 122°77'E) 0.5~1.0 m 水深的自然生物被膜上分离出来。*P. marina* 野生菌和突变菌均在 25℃ 条件下,于 Zobell 2216E 培养基(5%蛋白胨、0.01%柠檬酸铁、1%酵母提取物和 15%琼脂)中进行培养,配制 Zobell 2216E 培养基的试剂均购买于 Sigma 公司。本文用到的 *Escherichia coli* WM3064 和 pK18mobsacB-ery 由中国科学院南海海洋研究所王晓雪研究员实验室课题组馈赠, *E. coli* WM3064 菌株于 37℃ 下在含有 0.3 mmol/L DAP (2,6-diamino-pimelic acid)(Sigma)的 LB(Luria-Bertani)(Sangon)培养基上培养。在培养含有 pK18mobsacB-ery 质粒的菌株时,应加入终浓度为 50 μg/mL 的卡那霉素(Sangon)和 25 μg/mL 的红霉素(Sangon)以维持抗性。其他情况下的菌株和质粒按照先前的研究进行培养^[19]。

表 1 本研究使用的细菌菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	相关特性	来源
菌株		
<i>P. marina</i> ECSMB14103	野生型	文献[18]
<i>E. coli</i> WM3064	DAP缺陷型	文献[20]
$\Delta pilZ$	<i>pilZ</i> 基因敲除菌株	本研究
质粒		
pK18mobsacB-ery	具有Kan和Ery抗性基因位点	文献[19]
pK18mobsacB-ery- <i>pilZ</i>	敲除 <i>pilZ</i> 基因的重组质粒	本研究

2.2 方法

2.2.1 *pilZ* 基因突变菌株的构建

参考 Zeng 等^[21] 的同源重组方法构建 $\Delta pilZ$ 突变菌株。用带有限制性酶切位点的引物对,通过 PCR 扩增出 *pilZ* 基因的上下游片段。然后通过双酶切和连接,PCR 产物连接到空载体 pK18mobsacB-ery 上,从而构建出重组载体。将重组载体导入到 *E. coli* WM3064 中,再将导入成功的 WM3064 菌株和 *P. marina* 野生菌株混合,滴加在 1/2 SW-LB-DAP 平板(正常配制 LB 固体培养基的情况下,加入 1/2 的过滤海水并在灭菌后加入 0.3 mmol/L 的 DAP 溶液)上进行接合转移培养。25℃ 条件下培养 2~5 d 后,将菌苔按浓度梯度稀释涂布于含有红霉素的 Zobell 2216E 平板上筛选出单菌落,并用 LF/SR 和 SF/LR 引物对进行 PCR 验证。将验证正确的菌株涂布于 20% 蔗糖培养基上培养 2 d,挑取单菌落用 LF/LR 和 SF/SR 引物对进行 PCR 验证。 $\Delta pilZ$ 菌株利用 SF/SR、LF/SR、SF/LR 和 LF/LR 引物对进行最终验证。文章所用引物详见表 2。

表2 构建 $\Delta pilZ$ 菌株所使用的引物及其序列Table 2 Primers used to construct $\Delta pilZ$ strain and its sequences

引物	序列(5'-3')
<i>pilZ</i> -up-F	CGGGATCCAGGTGAACCTTGACCGAATA
<i>pilZ</i> -up-R	CGGAATTCGGTTAATCCTTTTATTATT
<i>pilZ</i> -down-F	CGGAATTCTAAAAACAGGCCCAATTTT
<i>pilZ</i> -down-R	AACTGCAGGACAATGCCTGAAATAGAAA
<i>pilZ</i> -SF	CCCTGTGGGTGTAGGTAA
<i>pilZ</i> -SR	CGTCGCGTGTATGAATAA
<i>pilZ</i> -LF	CGACCGTCACGACTTATC
<i>pilZ</i> -LR	TGTTTCGCTGACACTTTGC

2.2.2 生物被膜培养

参考 Yang 等^[22]的方法来培养生物被膜。挑取野生菌和 $\Delta pilZ$ 菌单菌落于 2216E 液体培养基中培养 16~18 h (25°C, 200 r/min)。用 50 mL 无菌离心管收集菌液, 离心 (3 500 r/min, 15 min)、弃上清, 保留细菌沉淀。加入 50 mL 灭菌过滤海水 (Autoclaved Filtered Seawater, AFSW) 吹打混匀, 离心后弃上清, 保留沉淀, 上述步骤重复 3 次。最终使用 AFSW 充分混匀细菌沉淀, 并定容至 50 mL。吸取 100 μ L 定容后的菌液加入到 9 900 μ L AFSW 中稀释混匀后吸取 1 mL 用孔径为 0.22 μ m 的滤膜过滤, 然后使用 0.1% 吖啶橙对滤膜染色 5 min (吖啶橙使用前需用孔径为 0.22 μ m 滤膜过滤), 待滤膜风干后制片, 使用荧光显微镜 (Olympus BX51) 观察计数, 在 10 \times 目镜、100 \times 油镜下随机选取 10 个均匀视野进行细菌计数, 每组分别设置 3 个平行, 最终通过计算确定 1 mL 稀释菌液的细菌数量。根据所得细菌密度向装有无菌载玻片 (12.7 mm \times 38.1 mm) 的无菌培养皿 (64.0 mm (Φ) \times 19.0 mm (高)) 中加入相应量菌液, 并使用 AFSW 补加定容至 20 mL, 一共设置了 1 \times 10⁸ cells/mL、3 \times 10⁸ cells/mL、5 \times 10⁸ cells/mL 和 1 \times 10⁹ cells/mL 4 种初始浓度。最后将培养皿放置于 18°C 条件下培养 48 h。

2.2.3 生物被膜上细菌密度计数

取出制备好的生物被膜放入甲醛溶液 (5%) 中固定 24 h 后, 再用 AFSW 轻轻润洗载玻片 3 次后染色, 染色及观察方法同 2.2.2 节, 有关计算公式参照文献 [22]。

2.2.4 幼虫附着变态鉴定

按上述方法培养好野生菌和 $\Delta pilZ$ 菌的生物被膜, 用 AFSW 轻轻润洗 3 次生物被膜, 然后将 1 片附有生物被膜的载玻片和 20 只活性良好的幼虫放入盛

有 20 mL AFSW 的无菌玻璃培养皿中。将其置于 18°C 下避光培养, 使用体视显微镜在 10 \times 目镜、5 \times 物镜下观察幼虫和附着变态幼虫。与幼虫相比, 附着变态的幼虫纤毛环消失、具有鳃和稚贝壳, 幼虫附着变态的个数可间接反映不同单一生物被膜对幼虫附着变态影响的差异。无生物被膜的灭菌短玻片 (12.7 mm \times 38.1 mm) 作为阴性对照, 10⁻⁴ g/mL 的肾上腺素 (Epinephrine, EPI) 作为阳性对照。不同菌株生物被膜每个浓度下做 9 个生物学重复。

2.2.5 细菌菌落形态

挑取单菌落于 2216E 液体培养基中培养 16~18 h (25°C, 200 r/min) 后, 按浓度梯度稀释涂布于 Zobell 2216E 固体平板上, 于 25°C 恒温培养箱中培养 2~5 d, 选取大小均匀的单菌落进行表型拍摄。

2.2.6 细菌运动性

方法参照 Zeng 等^[21]的描述。挑取野生菌和 $\Delta pilZ$ 菌株单菌落于 5 mL 的 2216E 液体培养基中, 同时设置无菌的 2216E 培养基作为空白对照, 置于 25°C、200 r/min 条件下震荡培养至指数期 (OD₆₀₀ 约为 1.0)。吸取 1 μ L 培养后的菌液垂直悬浮滴加到 0.3% 琼脂平板上, 在 25°C 下培养 2 d。本试验设置了 3 个独立的生物学重复。

2.2.7 生物被膜膜厚观察

使用甲醛溶液 (5%) 将形成好的野生菌和 $\Delta pilZ$ 菌株生物被膜固定 24 h, 5 μ g/mL 的碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 用来对生物被膜染色。避光染色 15 min 后, 用 AFSW 轻轻洗掉生物被膜上多余的染料。每个载玻片随机选择 3 个显微镜视野观察, 使用徕卡 TCS SP8 共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 观察细菌分布和生物被膜膜厚。本试验设置了 3 个独立样片。

2.2.8 生物被膜胞外产物染色

P. marina 生物被膜染色方法参考 González-Machado 等^[23]和 Peng 等^[5]的方法, 具体信息参考表 3。使用

表3 激光共聚焦显微镜荧光染料信息

Table 3 Laser confocal microscopy fluorescence dye information

荧光染料名称	结合物质	工作液浓度/ (μ g \cdot mL ⁻¹)	波长范围/ nm
碘化丙啶(PI)	死细菌	5	560~700
刀豆蛋白A(ConA-TMR)	α -多糖	944.8	552~578
荧光增白剂(CFW M2R)	β -多糖	189.0	254~432
DilC ₁₈ (5)油(DiD'oil)	脂类	7.94	648~670
异硫氰酸荧光素异构体1(FITC)	蛋白质	46.6	495~519

150 mmol/L 氯化钠溶液润洗附有生物被膜的载玻片,再避光染色 20 min,然后用 150 mmol/L 氯化钠溶液轻轻洗去多余染料,处理后的样片使用共聚焦激光扫描显微镜和 LAS X 软件采集共聚焦图像。野生菌和 $\Delta pilZ$ 菌株生物被膜分别制备 3 个重复样片,每个样片随机选取 3 个均匀视野进行拍摄。

2.2.9 胞内 c-di-GMP 定量

将野生型和 $\Delta pilZ$ 突变菌株用 2216E 液体培养基摇瓶在 25℃、200 r/min 条件下培养 16~18 h,并用干净无菌的 2216E 培养基稀释至 OD₆₀₀ 值为 0.3。取 5 mL 稀释后的菌液于 12 000×g 下离心 5 min,弃去上清,保留沉淀。将沉淀风干后,加入 100 μL 的 c-di-GMP 提取液(0.1%(V/V)甲酸、40%(V/V)乙腈、40%(V/V)甲醇和 19.9%(V/V)水),吹打混匀后在冰上孵育 15 min;然后于 16 000×g 下离心 5 min。取上清液用于 LC-MS/MS 定量分析,方法参考文献 [24]。c-di-GMP 标准品(Sigma)标准曲线用于计算上清液浓度,该实验设置了 9 个生物学重复。

2.2.10 数据分析

附着变态的幼虫所占的百分比要通过 Arcsine 转换以提高数据正态性。在数据统计分析前,利用 JMP™ 软件(10.0.0 版)的 Shapiro-Wilk's W 检验来检验数据的正态性。采用 Kruskal-Wallis 和 Steel-Dwass All Pairs 检验组间差异显著性。相关性分析采用 Spearman 秩相关检验。 $p < 0.05$ 作为差异显著性的临界值。使用 Image J 软件处理共聚焦图像,计算生物被膜胞外产物中各个成分的含量(单位: μm³)。

3 结果与分析

3.1 PCR 鉴定 *pilZ* 基因缺失

如图 1A 所示, M 表示 DNA 标记,自上而下条带大小分别为 4 500 bp、3 000 bp、2 000 bp、1 200 bp、800 bp、500 bp、200 bp。第 1、3、5、7 号条带是用野生型菌株的总 DNA 为模板扩增的 PCR 产物,第 2、4、6、8 号条带是用突变菌总 DNA 为模板扩增出的 PCR 产物。1 号和 2 号条带所用引物对为 *pilZ*-SF/-SR,3 号和 4 号条带所用引物对为 *pilZ*-LF/-SR,5 号和 6 号条带所用引物对为 *pilZ*-SF/-LR,7 号和 8 号条带所用引物对为 *pilZ*-LF/-LR。野生型菌株的 PCR 产物对应大小分别为 1 991 bp(条带 1)、2 155 bp(条带 3)、2 849 bp(条带 5)和 3 013 bp(条带 7); $\Delta pilZ$ 的 PCR 产物对应大小则分别为 1 664 bp(条带 2)、1 828 bp(条带 4)、2 522 bp(条带 6)和 2 686 bp(条带 8)。图 1B 为 *P. marina pilZ* 基因敲除前后的基因簇。

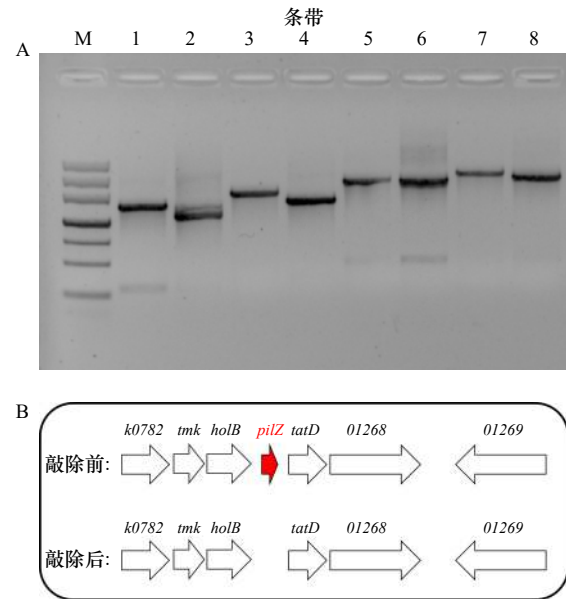


图 1 *pilZ* 基因缺失验证(A)和缺失前后基因簇(B)
Fig. 1 The *pilZ* gene deletion verification (A) and gene cluster (B) before and after knockout

3.2 $\Delta pilZ$ 生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

对野生型和 $\Delta pilZ$ 菌株生物被膜的幼虫附着变态率进行分析比较显示, $\Delta pilZ$ 生物被膜的幼虫附着变态率显著低于野生菌生物被膜($p < 0.05$)(图 2A),抑制了厚壳贻贝幼虫的附着变态。其中,初始细菌密度 5×10^8 cells/mL 下, $\Delta pilZ$ 附着变态率较野生菌下降极为显著,相比较于野生型菌株 33.88% 的附着变态率, $\Delta pilZ$ 菌株附着变态率仅为 10.56%,附着变态率下降了 68.87% ($p < 0.01$)。此外, $\Delta pilZ$ 生物被膜的细菌密度在不同初始细菌浓度下,均显著高于野生菌生物被膜,初始细菌密度 5×10^8 cells/mL 下, $\Delta pilZ$ 生物被膜细菌密度较野生型增加了 35.76% ($p < 0.05$)(图 2B)。相关性分析结果表明,无论是野生菌还是 $\Delta pilZ$ 菌,生物被膜的细菌密度与其幼虫附着变态率均无显著关系($p > 0.05$)。

3.3 *pilZ* 基因缺失对菌体形态的影响

P. marina 野生菌单一菌落表型为规则的圆形,表面光滑(图 3A), $\Delta pilZ$ 菌株单个菌落表型与野生菌相比,未显示出明显不同的变化(图 3B)。

3.4 $\Delta pilZ$ 菌运动性和生物被膜 CLSM 图像分析

野生菌在半固体培养基上形成了明显的趋化圈,但与野生型菌相比, $\Delta pilZ$ 菌株的运动性降低(图 4A)。CLSM 图像显示, $\Delta pilZ$ 生物被膜上聚集的细菌比野生菌生物被膜多,二者数量明显不同(图 4C,图 4D)。野生菌生物被膜的膜厚为 (5.16 ± 0.16) μm,而 $\Delta pilZ$ 菌生物被膜膜厚为 (6.2 ± 0.18) μm,较野生菌增加了 20.16%,差异性分析显示,二者之间存在显著性差异($p < 0.05$)(图 4B)。

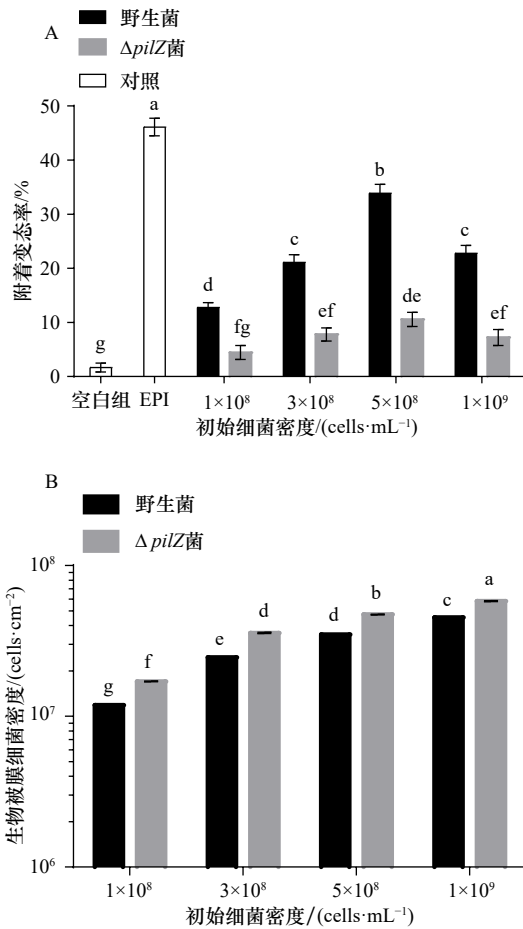


图2 不同初始细菌密度下野生菌与 $\Delta pilZ$ 菌生物被膜对幼虫附着变态的影响(A)及生物被膜细菌密度的分析(B)

Fig. 2 Effect of wild-type and $\Delta pilZ$ biofilms formed with different initial bacterial density on larval settlement and metamorphosis (A) and the analysis of biofilm bacterial density (B)

图中不同字母表示在该初始细菌密度下, *P. marina* 野生菌与 $\Delta pilZ$ 菌生物被膜的附着变态率或细菌密度组间有显著差异 ($p < 0.05$)

Bars with different letters in the figure indicate that at the initial bacterial density, there's a significant difference between the rate of larval settlement and metamorphosis or the bacterial density of *P. marina* wild-type and $\Delta pilZ$ biofilms ($p < 0.05$)

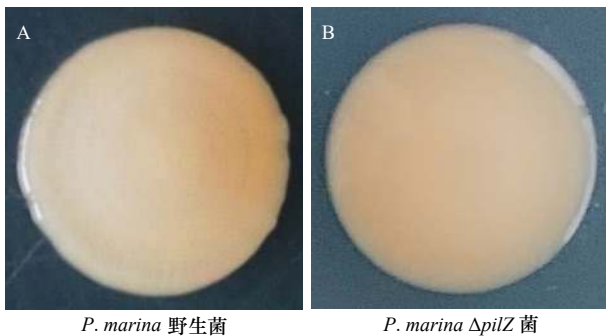


图3 菌落形态

Fig. 3 Colony morphology of bacteria

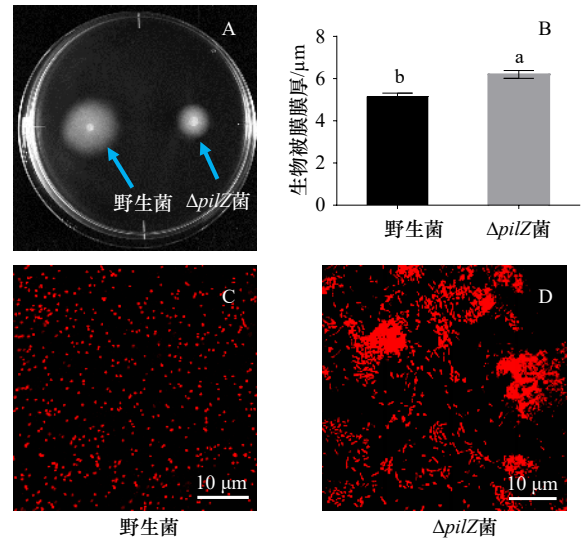


图4 野生型菌株和 $\Delta pilZ$ 菌株运动性(A)、生物被膜(C、D)和膜厚(B)

Fig. 4 Motility (A), biofilm (C, D) and biofilm thickness (B) of wild-type and $\Delta pilZ$ strains

3.5 $\Delta pilZ$ 生物被膜胞外产物 CLSM 图像分析

共聚焦图像及生物量数据统计分析结果比较显示, 与野生型菌株相比, $\Delta pilZ$ 菌株生物被膜胞外产物中 β -多糖和蛋白含量变化不同(图5A)。CLSM图像处理结果表明, 其中 β -多糖含量降低了42.57%, 蛋白含量下降了19.34%, 而对于 α -多糖和脂质未观察到差异($p > 0.05$, 图5B)。

3.6 细菌 c-di-GMP 水平

根据 LC-MS/MS 定量分析结果以及 c-di-GMP 标准曲线得出, $\Delta pilZ$ 胞内 c-di-GMP 水平为 (20.50±1.09) ng/mL, 野生菌胞内 c-di-GMP 水平为 (21.10±1.35) ng/mL, 突变菌株与野生菌胞内 c-di-GMP 水平无显著性差异($p > 0.05$)(图6)。

4 结论与讨论

c-di-GMP 作为细菌胞内第二信使早已在 30 多年前被首次报道过^[14], 且被证实与细菌运动、细菌聚集、胞外产物的生成和生物被膜形成有关^[25-27]。在绝大多数细菌中, 胞内 c-di-GMP 水平调控细菌由浮游生活向固着生物被膜生活方式的转变^[28-30]。Jenal 等^[31]研究表明, 当细菌胞内 c-di-GMP 处于较高水平时会使细菌聚集靠拢, 进而促进生物被膜的形成。同时, 胞内 c-di-GMP 的水平与纤维素^[31-32]、藻酸盐^[15]、Pel 多糖^[33]等细菌胞外多糖的产生也紧密相关; 藻酸盐和 Pel 多糖^[34-35]等胞外多糖又可影响铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 生物被膜的形成。因此, 细菌胞内 c-di-GMP 水平不仅可以直接影响生物被膜的

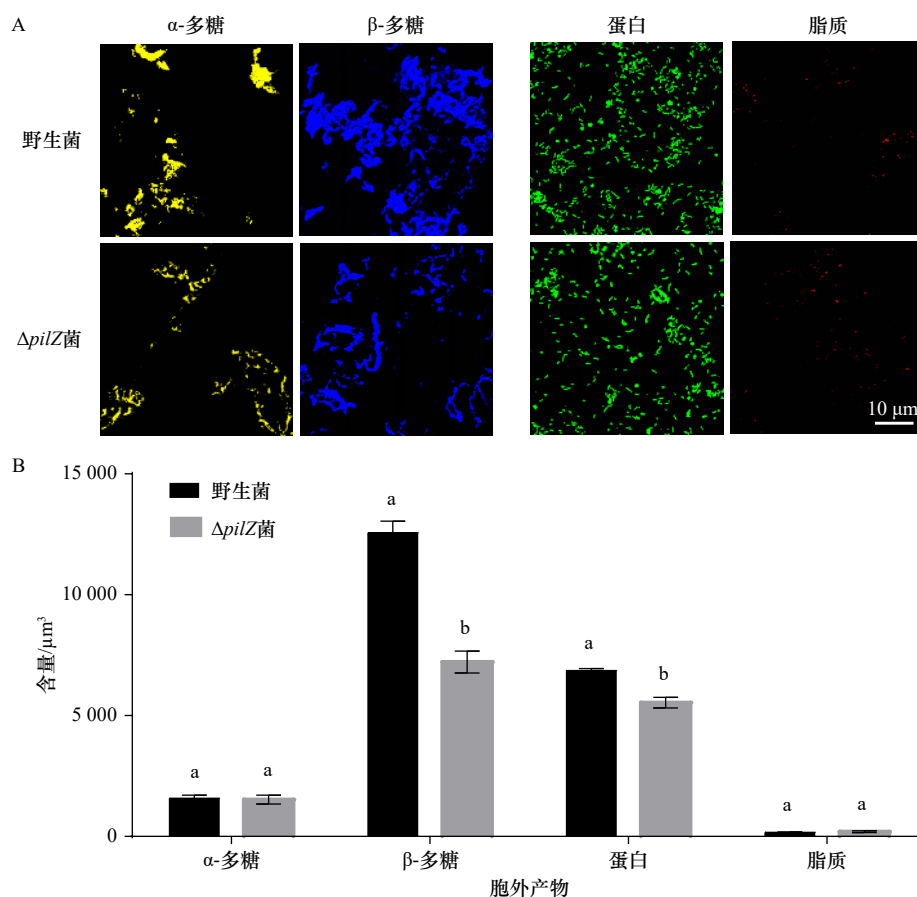


图 5 野生型菌株和 $\Delta pilZ$ 菌株生物被膜共聚焦扫描图像(A)和统计结果(B)

Fig. 5 Confocal scanning images (A) and statistical results (B) of biofilm of wild-type and $\Delta pilZ$ strains

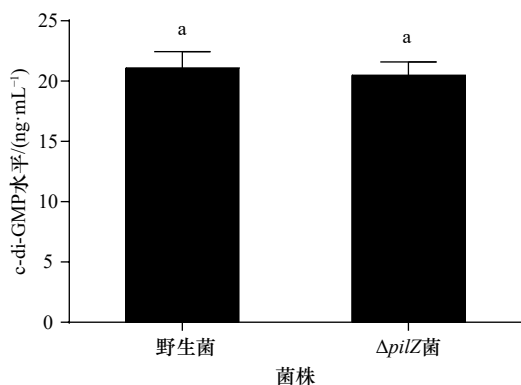


图 6 野生菌和 $\Delta pilZ$ 菌的胞内 c-di-GMP 水平

Fig. 6 The c-di-GMP levels of wild-type and $\Delta pilZ$ strains

形成,还可以通过调控胞外多糖的含量来影响生物被膜形成。在海假交替单胞菌以往的研究中,当菌体多糖合成相关基因 *orf01912*、脂肪酸合成基因 *tesA* 和纤维素合成基因 *BcsQ* 缺失后,细菌胞内 c-di-GMP 水平发生变化,影响生物被膜胞外产物的含量,进而影响厚壳贻贝幼虫的附着变态^[5,7,36]。其中,胞外多糖合成相关基因 *01912* 表达蛋白的结构域中含有可与 c-di-GMP 结合的 AAA ATPase 结构域,当 c-di-GMP 的靶

基因 *01912* 缺失后,菌体胞内 c-di-GMP 水平升高^[5],表明菌体某些结合蛋白基因的缺失会影响到胞内 c-di-GMP 水平的改变,从而引起生物被膜胞外产物的变化。在本研究中,*pilZ* 基因缺失后形成的生物被膜胞外 β-多糖和蛋白的含量、诱导厚壳贻贝幼虫附着变态的能力均显著降低 ($p < 0.05$)。然而,野生菌与 $\Delta pilZ$ 菌株胞内 c-di-GMP 水平的定量结果显示,两株菌胞内 c-di-GMP 水平并无显著性变化 ($p > 0.05$),与此前的研究呈现出相反的结果。通过对 *pilZ* 基因表达产物的结构预测发现其具有 PilZ 结构域,表明该表达产物是 c-di-GMP 结合蛋白。然而当 *P. marina pilZ* 基因缺失后并未像此前的研究结果那样可以通过影响菌体胞内 c-di-GMP 的水平来改变胞外产物的含量,从而影响厚壳贻贝附着变态。因此,推测该基因可能通过其他途径调控生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态。

pilZ 基因最初发现是作为 IV 型菌毛生物合成和抽搐运动所必需的调控基因^[18]。Welker 等^[37]研究表明, T4P 运动马达的活性可调节细菌微菌落的局部结构和黏度,微菌落作为生物被膜的前体结构直接影响

生物被膜的成熟与否。在脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)中, T4P的收缩可以增强菌落的流动性, 从而有利于生物被膜的扩散、成熟^[38]。在铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*)中, 抽搐运动作为菌体的另一种特殊运动方式影响生物被膜形成^[39-41]。在本研究中, 相较于野生菌, *pilZ*基因缺失后菌体运动能力下降, 生物被膜上细菌密度、膜厚明显增加($p < 0.05$), 这可能是因为*pilZ*基因缺失影响T4P的抽搐运动, 进而导致细菌附着在载玻片上时运动性减弱, 使细菌更容易聚集在一起形成生物被膜。

同时, 在对黄色黏球菌的研究中发现^[42], 菌体S运动过程中, 细菌胞外多糖可以调节T4P的反应, 且二者之间存在相互作用, T4P的缺失会影响到胞外多糖的含量。而多糖作为生物被膜胞外产物的主要成分^[2], 可诱导海洋无脊椎动物幼虫的附着变态。如纤维素的过量产生、荚膜多糖的减少均可以抑制厚壳贻贝幼虫的附着变态^[21, 43]; 可拉酸含量增加, 会促进厚壳贻贝幼虫的附着变态^[5]。本研究中, 与野生型菌株相比,

$\Delta pilZ$ 菌株所形成的生物被膜显著抑制了厚壳贻贝幼虫的附着变态; 通过共聚焦图像分析结果可以看出, $\Delta pilZ$ 菌株较野生型菌株而言, 胞外产物中 β -多糖和胞外蛋白含量显著下降, 相关性分析结果表明, 幼虫附着变态率与二者显著相关($p < 0.05$)。由此可见, *pilZ*基因缺失后菌体可能因无法正常组装T4P而引起菌体运动性下降、生物被膜上的胞外多糖含量及蛋白减少, 进而抑制了厚壳贻贝幼虫的附着变态。另外, *pilZ*基因缺失后菌体表面的T4P变化以及该基因的表达产物与c-di-GMP之间的相互作用仍需进一步探究。

综上所述, 本研究利用同源重组方法构建*P. marina pilZ*基因缺失菌, 菌体*pilZ*基因的缺失会影响T4P的正常组装和抽搐运动, 细菌运动性减弱, 形成的生物被膜膜厚增加、细菌密度增加, 胞外产物中 β -多糖和蛋白含量减少, 进而降低了对厚壳贻贝幼虫附着变态的诱导能力。本研究为进一步了解海洋细菌生物被膜形成的分子机制及其对厚壳贻贝幼虫附着变态的诱导机制提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 李一峰, 杨金龙, 包卫洋, 等. 人工诱导物影响海洋无脊椎动物幼体附着变态的研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(8): 102-107.
Li Yifeng, Yang Jinlong, Bao Weiyang, et al. A review on artificial inducers influencing larval settlement and metamorphosis of marine invertebrates[J]. Marine Sciences, 2011, 35(8): 102-107.
- [2] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633.
- [3] Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(5): 271-284.
- [4] Peng Lihua, Liang Xiao, Xu Jiakang, et al. Monospecific biofilms of *Pseudoalteromonas* promote larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 2577.
- [5] Peng Lihua, Liang Xiao, Chang Ruiheng, et al. A bacterial polysaccharide biosynthesis-related gene inversely regulates larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. *Biofouling*, 2020, 36(7): 753-765.
- [6] Liang Xiao, Zhang Xiukun, Peng Lihua, et al. The flagellar gene regulates biofilm formation and mussel larval settlement and metamorphosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 710.
- [7] Hu Xiaomeng, Zhang Junbo, Ding Wenyang, et al. Reduction of mussel metamorphosis by inactivation of the bacterial thioesterase gene via alteration of the fatty acid composition[J]. *Biofouling*, 2021, 37(8): 911-921.
- [8] 蔡雨珊, 张秀坤, 竹攸汀, 等. 海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas marina*)鞭毛蛋白对生物被膜形成及厚壳贻贝附着的影响[J]. 海洋学报, 2021, 43(4): 75-83.
Cai Yushan, Zhang Xiukun, Zhu Youting, et al. Effects of *Pseudoalteromonas marina* flagellin on biofilm formation and settlement of *Mytilus coruscus*[J]. *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(4): 75-83.
- [9] Breaker R R. Prospects for riboswitch discovery and analysis[J]. *Molecular Cell*, 2011, 43(6): 867-879.
- [10] Matsuyama B Y, Krasteva P V, Baraquet C, et al. Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(2): E209-E218.
- [11] Ryjenkov D A, Simm R, Römling U, et al. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(41): 30310-30314.
- [12] Baker A E, Diepold A, Kuchma S L, et al. PilZ domain protein FlgZ mediates cyclic di-GMP-dependent swarming motility control in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(13): 1837-1846.
- [13] Valentini M, Filloux A. Multiple roles of c-di-GMP signaling in bacterial pathogenesis[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 387-406.
- [14] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid[J]. *Nature*, 1987, 325(6101): 279-281.

- [15] Merighi M, Lee V T, Hyodo M, et al. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(4): 876–895.
- [16] Klausen M, Heydom A, Ragas P, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(6): 1511–1524.
- [17] Guzzo C R, Salinas R K, Andrade M O, et al. PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 393(4): 848–866.
- [18] Peng Lihua, Liang Xiao, Guo Xingpan, et al. Complete genome of *Pseudoalteromonas marina* ECSMB14103, a mussel settlement-inducing bacterium isolated from the East China Sea[J]. *Marine Genomics*, 2018, 41: 46–49.
- [19] Wang Pengxia, Yu Zichao, Li Baiyuan, et al. Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 11.
- [20] Dehio C, Meyer M. Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(2): 538–540.
- [21] Zeng Zhenshun, Guo Xingpan, Li Baiyuan, et al. Characterization of self-generated variants in *Pseudoalteromonas lipolytica* biofilm with increased antifouling activities[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(23): 10127–10139.
- [22] Yang Jinlong, Shen Peijing, Liang Xiao, et al. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to mono-specific bacterial biofilms[J]. *Biofouling*, 2013, 29(3): 247–259.
- [23] González-Machado C, Capita R, Riesco-Peláez F, et al. Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella agona* biofilms at different stages of development[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200011.
- [24] Bobrov A G, Kirillina O, Ryjenkov D A, et al. Systematic analysis of cyclic di-GMP signalling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(2): 533–551.
- [25] Hickman J W, Tifrea D F, Harwood C S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(40): 14422–14427.
- [26] Chua Songlin, Hultqvist L D, Yuan Mingjun, et al. *In vitro* and *in vivo* generation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-dispersed cells via c-di-GMP manipulation[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(8): 1165–1180.
- [27] Whiteley C G, Lee D J. Bacterial diguanylate cyclases: structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(1): 124–141.
- [28] Simm R, Morr M, Kader A, et al. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(4): 1123–1134.
- [29] Hengge R, Gründling A, Jenal U, et al. Bacterial signal transduction by cyclic di-GMP and other nucleotide second messengers[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(1): 15–26.
- [30] Yoon S H, Waters C M. The ever-expanding world of bacterial cyclic oligonucleotide second messengers[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2021, 60: 96–103.
- [31] Omadjela O, Narahari A, Strumillo J, et al. BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for *in vitro* cellulose synthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(44): 17856–17861.
- [32] Richter A M, Possling A, Malysheva N, et al. Local c-di-GMP signaling in the control of synthesis of the *E. coli* biofilm exopolysaccharide pEtN-cellulose[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(16): 4576–4595.
- [33] Lee V T, Matewish J M, Kessler J L, et al. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(6): 1474–1484.
- [34] Ghafoor A, Hay I D, Rehm B H A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(15): 5238–5246.
- [35] Ryder C, Byrd M, Wozniak D J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10(6): 644–648.
- [36] Liang Xiao, Zhang Junbo, Shao Anqi, et al. Bacterial cellulose synthesis gene regulates cellular c-di-GMP that control biofilm formation and mussel larval settlement[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2021, 165: 105330.
- [37] Welker A, Cronenberg T, Zöllner R, et al. Molecular motors govern liquidlike ordering and fusion dynamics of bacterial colonies[J]. *Physical Review Letters*, 2018, 121(11): 118102.
- [38] Bonazzi D, Lo Schiavo V, Machata S, et al. Intermittent pili-mediated forces fluidize *Neisseria meningitidis* aggregates promoting vascular colonization[J]. *Cell*, 2018, 174(1): 143–155.e16.
- [39] O'Toole G A, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2): 295–304.
- [40] Semmler A B T, Whitchurch C B, Mattick J S. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology*, 1999, 145(10): 2863–2873.
- [41] Ward M J, Zusman D R. Regulation of directed motility in *Myxococcus xanthus*[J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 24(5): 885–893.
- [42] Li Yinuo, Sun Hong, Ma Xiaoyuan, et al. Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus*

xanthus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(9): 5443–5448.

- [43] Zeng Zhenshun, Guo Xingpan, Cai Xingsheng, et al. Pyomelanin from *Pseudoalteromonas lipolytica* reduces biofouling[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1718–1731.

Knockout of *Pseudoalteromonas marina pilZ* gene inhibited the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*

Zhang Chi^{1,2}, Wang Jinsong^{1,2}, Yang Jinlong^{1,2,3}, Zhang Junbo^{4,5}, Wan Rong^{4,5,6}, Liang Xiao^{1,2}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green-Culture of Aquaculture Animals, Shanghai 201306, China; 3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China; 4. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 5. National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Shanghai 201306, China; 6. Zhoushan Branch of National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Zhoushan 316014, China)

Abstract: To investigate the effect of *Pseudoalteromonas marina pilZ* gene knockout on the biofilm formation and its influence on the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus* larvae, $\Delta pilZ$ was constructed by homologous recombination, and the changes in bacterial density, biofilm thickness, c-di-GMP level and extracellular polymeric substances (EPS) of $\Delta pilZ$ bacteria biofilm were analyzed, as well as the regulation of the settlement and metamorphosis of *M. coruscus* larvae. The results showed that compared with the wild-type strain, the biofilm formed by $\Delta pilZ$ strain significantly increased the biofilm thickness, the number of bacteria, while the contents of β -polysaccharides and proteins in EPS were decreased and the settlement and metamorphosis of *M. coruscus* larvae were inhibited ($p < 0.05$). There was no significant difference in c-di-GMP level, α -polysaccharide and lipid contents ($p > 0.05$). In conclusion, *P. marina pilZ* gene knockout can regulate the bacterial biofilm and the content of EPS including β -polysaccharides and proteins contents, then inhibit the settlement and metamorphosis of *M. coruscus* larvae.

Key words: *pilZ*; biofilm; *Mytilus coruscus*; settlement and metamorphosis; extracellular polymeric substances