

研究报告

海假交替单胞菌 *fliC-02330* 基因缺失影响生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态蔡雨珊^{1,2}, 任泓妤^{1,2}, 竹攸汀^{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

蔡雨珊, 任泓妤, 竹攸汀, 杨金龙, 张俊波, 万荣, 梁箫. 海假交替单胞菌 *fliC-02330* 基因缺失影响生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 899-910

Cai Yushan, Ren Hongyu, Zhu Youting, Yang Jinlong, Zhang Junbo, Wan Rong, Liang Xiao. Deletion of *fliC-02330* from *Pseudoalteromonas marina* affects the biofilm formation and the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 899-910

摘要:【背景】假交替单胞菌属是一种广泛分布于海洋环境的革兰氏阴性细菌, 存在于海底沉积物中, 能分泌大量的胞外产物形成海洋微生物被膜, 从而诱导海洋无脊椎动物的附着。【目的】探究海假交替单胞菌鞭毛蛋白 *fliC* 基因对生物被膜形成及厚壳贻贝诱导活性的影响。【方法】通过基因敲除构建海假交替单胞菌 *fliC-02330* 基因缺失突变菌, 研究突变菌和野生菌菌落形态、生物被膜形成能力、胞外物质以及对厚壳贻贝幼虫附着变态的诱导能力等的差异性。【结果】与野生菌相比, 突变菌菌落表型出现褶皱, 运动能力下降, 形成被膜膜厚增加, 以及对幼虫附着变态诱导活性下降。共聚焦扫描发现, *fliC-02330* 基因缺失突变菌胞外多糖含量下降, 而蛋白含量上升。【结论】海假交替单胞菌鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因缺失促进生物被膜形成, 但抑制厚壳贻贝幼虫附着变态。本

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); 上海市科技创新行动计划青年科技英才扬帆计划(19YF1419500)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (41876159, 41476131); National Key Research and Development Program of China (2019YFC0312104, 2020YFD0900804); Southern Ocean Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou) Talent Team Introduced Major Special Projects (GML2019ZD0402); Program of Shanghai Academic Research Leader (20XD1421800); Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan Youth Science and Technology Talents Sailing Plan (19YF1419500)

*Corresponding author: E-mail: x-liang@shou.edu.cn

Received: 2021-08-25; Accepted: 2021-10-16; Published online: 2021-11-25

研究为探究细菌鞭毛蛋白基因与厚壳贻贝幼虫的作用机制,以及后续进一步探索微生物参与海洋无脊椎动物附着变态提供一定的理论依据。

关键词: 海假交替单胞菌; *fliC-02330* 基因; 生物被膜; 厚壳贻贝; 附着变态

Deletion of *fliC-02330* from *Pseudoalteromonas marina* affects the biofilm formation and the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*

CAI Yushan^{1,2}, REN Hongyu^{1,2}, ZHU Youting^{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 Aquatic Animals, Shanghai 201306, China

3 Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, Guangdong, 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, Zhejiang, China

Abstract: [Background] *Pseudoalteromonas* is a group of Gram-negative bacteria ubiquitous in the marine environment. They exist in the seabed sediments and can secrete a large amount of extracellular products to form a biofilm, which induces the attachment of invertebrates. [Objective] To explore the effect of *fliC-02330* deletion from *Pseudoalteromonas marina* on the biofilm formation and the activity of *Mytilus coruscus*. [Methods] We constructed the *fliC-02330*-deleted mutant of *P. marina* by gene knockout and then compared the phenotype, the biofilm-forming ability, and the effect on settlement and metamorphosis of *M. coruscus* between the mutant and the wild-type strain. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was conducted to detect changes in the content of extracellular products in the biofilm. [Results] Compared with the wild-type strain, the mutant showed wrinkled colony, weakened motility, thickened biofilm, and decreased activity of inducing the larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus*. CLSM revealed that the *fliC-02330*-deleted mutant had decreased extracellular polysaccharide content and increased protein content. [Conclusion] The *fliC-02330*-deleted mutant has increased biofilm-forming ability and can inhibit the settlement and metamorphosis of *M. coruscus* larvae. This study provides a theoretical basis for exploring the mechanism of bacterial flagellin gene and the role of microorganisms in the settlement and metamorphosis of marine invertebrates.

Keywords: *Pseudoalteromonas marina*; *fliC-02330* gene; biofilm; *Mytilus coruscus*; settlement and metamorphosis

假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*) (*Gammaproteobacteria*), 分布于海洋环境中, 属于变形菌门(*Proteobacteria*) γ -变形菌纲 是自然生物被膜中可分离培养的优势菌^[1-2], 以

往研究显示, 假交替单胞菌属能产生许多具有生物活性的物质^[3], 可诱导海洋无脊椎动物的附着变态^[4-6]。目前假交替单胞菌属有 41 个种被分离鉴定, 并且超过 90 个假交替单胞菌属已经过全基因组测序^[7-9]; 其中海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas marina*) ECSMB14103 分离自自然生物被膜, 可分泌大量的胞外活性物质形成生物被膜, 并且对厚壳贻贝幼虫的附着变态具有中等诱导活性。

生物被膜作为一种广泛存在的生命模式, 能诱导海洋无脊椎动物如刺胞动物^[10]、苔藓虫^[11]、环节动物^[12]、软体动物^[13-14]和棘皮动物^[15]幼虫的附着变态。其群落演替组成、生理条件和生长阶段的变化都会改变它们对幼虫附着变态的影响^[16-17]。生物被膜由微生物和基质组成, 其中基质占据主体部分, 包括脂类、蛋白质、多糖和胞外 DNA 等, 具有聚集附着且构成支架的作用^[18-19]。Liang 等^[20]的研究发现, 鞭毛合成蛋白基因 *fliP* 的缺失导致菌株鞭毛消失、运动能力丧失、胞外产物含量改变, 从而对厚壳贻贝幼虫的诱导活性降低; 通过酸解超速离心法提取得到的海假交替单胞菌的鞭毛蛋白也能成功诱导厚壳贻贝幼虫的附着变态。

为深入了解鞭毛蛋白对海洋无脊椎动物的作用机制, 通过对海假交替单胞菌基因组^[21]测序发现 *fliC* 为鞭毛蛋白基因, 共有 4 个亚型, 分别为 *fliC-02330*、*fliC-02345*、*fliC-02346* 和 *fliC-02347*; 根据其氨基酸序列分析得知该 4 种亚型分别编码不同的蛋白, 其中 *fliC-02330* 编码的蛋白大小约为 27.21 kDa, *fliC-02345*、*fliC-02346* 和 *fliC-02347* 编码的蛋白大小约为 33.45 kDa。但是关于这 4 种蛋白表达情况及功能性作用尚无进一步的研究。为探究其作用机制, 本实验选取蛋白量较小且单一的亚基

fliC-02330 构建缺失该基因的突变菌, 检测其对生物被膜生物学特性及幼虫附着变态的影响, 以期探究鞭毛蛋白基因缺失的突变菌与幼虫附着变态之间的作用机制提供理论依据, 并为水产养殖育苗技术提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

厚壳贻贝幼虫, 均取自浙江省舟山市嵊泗县(122°46' E, 30°43' N), 定量定时投喂饵料, 间隔一日换水。在实验室暂养至壳长达约 250 μm , 具足面盘幼虫阶段(胚胎发育约 28 d), 即可用作测试附着及变态发育实验。

1.1.2 菌株、质粒、主要试剂和仪器

海假交替单胞菌(*P. marina*)分离于自然生物被膜, 保藏号为 MCCC 1K03511^[21], 保存于 -80 °C, 所用质粒详细信息见表 1。*Escherichia coli* WM3064 和质粒 pK18mobsacB-ery 由中国科学院南海海洋研究所王晓雪研究员实验室提供。

Kana 卡那霉素(Kanamycin)、Ery 红霉素(Erythromycin), 生工生物工程(上海)股份有限公司; Taq 聚合酶、dNTP、DNA 抽提试剂盒, 上海博彩生物科技有限公司。激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM), Leica 公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 荧光显微镜, Olympus 公司。

1.1.3 培养基

Zobell 2216E 培养基, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 运动性培养基(g/L): 2216E 合成培养基 37.4, 琼脂粉 30.0。

1.2 方法

1.2.1 *fliC-02330* 突变菌株的构建

本研究所用到的海假交替单胞菌为实验室

从自然生物被膜上分离得到的 *P. marina*，并通过同源重组技术构建 *P. marina* 鞭毛蛋白部分基因缺失的菌株 $\Delta fliC-02330$ ，所用引物等详细信息见表 2。

海假交替单胞菌的基因敲除方法参照文献[24]并作出改进。首先设计上下游及基因敲除验证共 4 对引物。通过限制性酶切位点连接构建重组质粒并转移至大肠杆菌 WM3064。将自杀质粒的 WM3064 转移进海假交替单胞菌中，挑选出可以在含红霉素的 Zobell 2216E 培养基上生长的细菌，利用单交换引物对 *fliC-02330-SF/LR*、*fliC-02330-LF/SR* 进行验证，然后在 20%蔗糖平板上进行双交换筛选。最后通过 *fliC-02330-SF/LR*、*fliC-02330-LF/SR*、*fliC-02330-SF/SR* 和 *fliC-02330-LF/LR* 进行引物验证，得到条带大小正确的突变菌株。

1.2.2 生物被膜的形成

P. marina 和 $\Delta fliC-02330$ 菌株接种至 2216E 液体培养基在 25 °C、200 r/min 条件下培养 2 d，菌液 3 500 r/min 离心 15 min 后得到的菌体沉淀用灭菌过滤海水 (autoclaved filtered seawater, AFSW) 吹打清洗，重复 3 遍后定容至 50 mL。将初始细菌密度稀释至 1×10^8 、 3×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 CFU/mL 并添加到每个培养皿中 (64 mm×19 mm)。皿中装好灭菌的载玻片，避光，18 °C 放置 48 h 形成生物被膜。

1.2.3 生物被膜上细菌密度计数

用甲醛溶液 (5%) 处理生物被膜 24 h，吖啶橙 (0.1%) 染色 5 min，风干后在荧光显微镜下选取 10 个视野 (随机观察)，设置 3 个平行，计算细菌的终密度，有关计算公式参照 Yang 等^[25] 的文章。

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

菌株或质粒 Strains or plasmids	相关特性 Relevant characteristics	来源 Source
<i>Pseudoalteromonas marina</i> EC SMB14103	Wild-type	[21]
<i>Escherichia coli</i> WM3064	RP4(tra) in chromosome, DAP	[22]
$\Delta fliC-02330$	In-frame deletion of <i>fliC-02330</i>	This Lab
pK18mobsacB-ery	pK18mobsacB containing the erythromycin resistant gene from pHT304, Kan ^r , Ery ^r	[23]
pK18mobsacB-ery- <i>fliC-02330</i>	Recombinant plasmid for deleting <i>fliC-02330</i> gene	This study

表 2 构建 $\Delta fliC-02330$ 菌株所使用的引物

Table 2 Primers used to construct $\Delta fliC-02330$ strain

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
<i>fliC-02330-up-S</i>	CGCGGATCCTCCATAAGTTCTTCAGGGTA	1 333
<i>fliC-02330-up-A</i>	CCGGAATTCATATTAATACTTAATAGTTA	1 333
<i>fliC-02330-down-S</i>	CCGGAATTCAGCTAACTCCTAGAATAGTA	1 057
<i>fliC-02330-down-A</i>	ACGCGTCGAC ACAAGTATCAAGGCGACA	1 057
<i>fliC-02330-SF</i>	TAAATGGCTCACAAATAAGTCC	444
<i>fliC-02330-SR</i>	TTACTGGGTGGTGCGTTC	534
<i>fliC-02330-LF</i>	AGCCAAACAGGTAGGTAA	1 783
<i>fliC-02330-LR</i>	CGTTGAGTGGGTAGAAAA	1 282

1.2.4 幼虫附着变态实验

为检测幼虫是否具备正常的变态能力, 实验前使用 10^{-4} g/mL 的肾上腺素(epinephrine, EPI)作为诱导物来处理幼虫, 以确保实验材料的可用性。随后将表面形成生物被膜的载玻片用 AFSW 润洗, 洗去表面浮游细菌。将玻片置于装有 20 mL 的 AFSW 的无菌玻璃培养皿中, 加入 20 只眼点幼虫, 同时放置无生物被膜的载玻片作为空白对照实验。18 °C 避光培养, 设置 9 组平行, 记录 24、48、72、96 h 幼虫附着变态数目。

1.2.5 细菌菌落形态拍摄及生长能力的测定

将细菌置于 25 °C、200 r/min 条件下扩大培养, 梯度稀释后涂布在 2216E 固体培养基上, 培养 5–7 d 后进行拍摄。野生菌和突变菌于 25 °C 下在 2216E 液体培养基中培养, 分别用分光光度计测量其 1、3、4、5、6、9、12、15、18、24 h 的 OD_{600} 值。

1.2.6 细菌游泳运动能力观察

将野生型和 $\Delta fliC-02330$ 菌株在 Zobell 2216E 液体培养基中(25 °C、200 r/min)培养 12 h。在运动性培养基上垂直滴入 1 μ L 菌液, 25 °C 下温育 16–18 h 后, 观察游泳运动轨迹。

1.2.7 生物被膜厚度分析

黑暗条件下, 用碘化丙啶(5 μ g/mL)染色处理 20 min, 用 1×PBS 进行清洗后将样品在激光扫描共聚焦显微镜 630×倍率下观察。每组设置 3 个生物学重复, 拍摄观察进行成像分析, 确定膜厚。

1.2.8 生物被膜上胞外产物染色实验

用相对应的染料分别对生物被膜进行染色, 滴加 30–50 μ L 染料避光染色。 α -多糖用 ConA-TMR 来染色, β -多糖用 Calcofluor White Stain 染色, DiD oil 用来染色脂肪, FITC 染色蛋白。25 min 后洗去表面浮色, 在激光扫描共

聚焦显微镜下进行拍照成像, 方法参考文献[26]。

1.2.9 数据处理

使用 JMP 软件(V10.0.0)进行差异性分析。生物被膜上 α -多糖、 β -多糖、蛋白和脂类含量图片处理使用 ImageJ 软件。

2 结果与分析

2.1 鞭毛蛋白 $\Delta fliC-02330$ 突变菌株的构建

根据 *P. marina* 基因组查找到鞭毛蛋白基因 *fliC* 的 4 个亚型, 发现其中分子大小为 27.21 kDa 的蛋白对应的亚型为 *fliC-02330*。通过构建该鞭毛蛋白亚基缺失的突变菌, 探究缺失部分鞭毛蛋白基因的突变菌的生物学特性变化及对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响。

图 1 中 1、3、5、7 泳道分别代表野生型细菌 DNA 扩增的 PCR 产物, 2、4、6、8 泳道分别代表突变型细菌 $\Delta fliC-02330$ DNA 扩增的 PCR 产物。

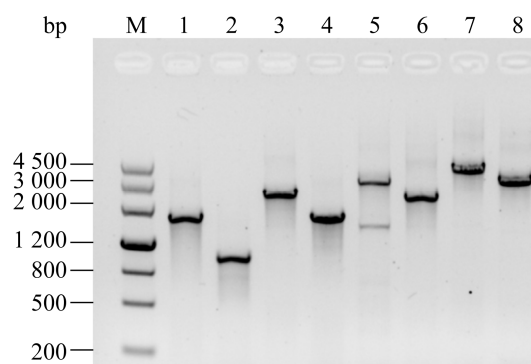


图 1 鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因缺失菌株 PCR 验证

Figure 1 The deletion of the *fliC-02330* gene was confirmed by PCR. M: DNA Maker III; 1: *fliC-02330*-SF/SR, 1 761 bp; 2: $\Delta fliC-02330$ -SF/SR, 978 bp; 3: *fliC-02330*-SF/LR, 2 509 bp; 4: $\Delta fliC-02330$ -SF/LR, 1 726 bp; 5: *fliC-02330*-LF/SR, 3 100 bp; 6: $\Delta fliC-02330$ -LF/SR, 2 317 bp; 7: *fliC-02330*-LF/LR, 3 848 bp; 8: $\Delta fliC-02330$ -LF/LR, 3 065 bp.

2.2 鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因缺失对厚壳贻贝幼虫诱导活性的影响

通过将鞭毛蛋白 *fliC-02330* 缺失的突变株与野生型对比,探究其生物被膜形成及对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响。结果表明,鞭毛蛋白 *fliC-2330* 基因的缺失显著降低了厚壳贻贝幼虫附着变态率($P<0.05$),其中当细菌密度为 5×10^8 CFU/mL 时附着变态率下降最为显著,相较于野生型菌株 33.89% 的诱导活性,突变菌仅有 17.78% 的变态率,诱导活性下降了 47.54% (图 2A)。其次,随着细菌密度的增加,变态率呈现先增后减的趋势,推测可能在高密度下细菌大量聚集,影响了幼虫正常生长发育。此外,在不同初始细菌密度下,突变菌生物被膜上的细菌密度均显著增加($P<0.05$) (图 2B)。

2.3 鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因缺失对细菌表型、运动生长能力及胞外产物的影响

2.3.1 *fliC-02330* 基因缺失对细菌表型、生长能力的影响

野生菌菌落表型规则圆润(图 3A), $\Delta fliC-02330$ 菌落呈现皱缩的褶皱表型(图 3B);野生菌与 $\Delta fliC-02330$ 菌株相比,二者生长能力无差异($P>0.05$) (图 3C)。

2.3.2 鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因缺失对运动性和被膜形成能力的影响

与野生菌相比, $\Delta fliC-02330$ 菌株运动能力减弱,野生型菌株的运动范围更大,形成的趋化圈更明显(图 4A)。鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因的缺失影响了细菌的运动性,运动性的降低又导致细菌更易聚集黏附在表面,从而提高被膜形成能力。CLSM 扫描图像显示, $\Delta fliC-02330$

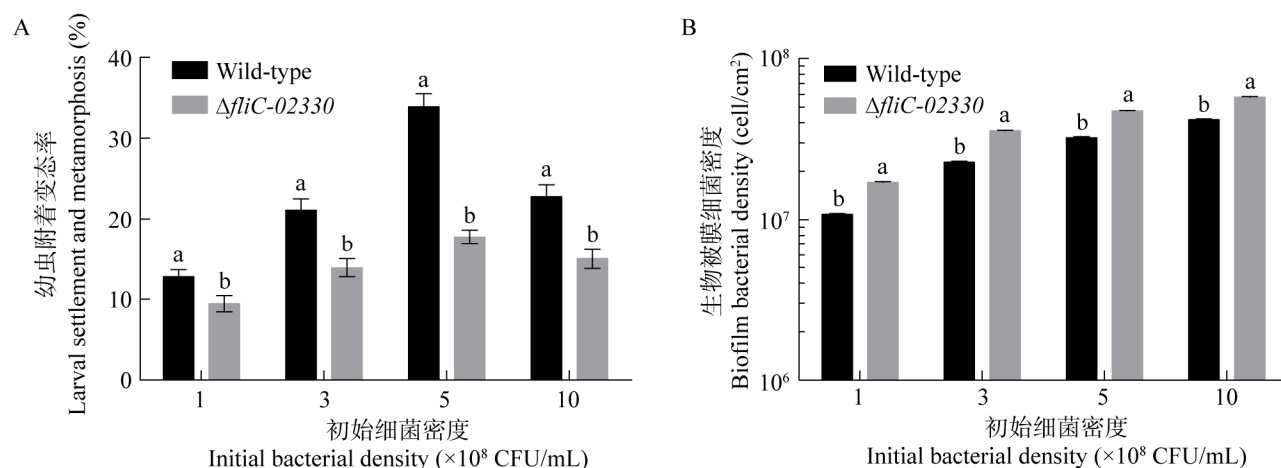


图 2 野生菌与 $\Delta fliC-02330$ 菌株生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态诱导活性 A: 细菌被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态率的影响; B: 野生型菌株与 $\Delta fliC-02330$ 菌株生物被膜的细菌密度。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 2 The inducing effect of wild-type and $\Delta fliC-02330$ biofilms on *M. coruscus* larval settlement, and metamorphosis. A: Inducing activities of biofilms formed by wild-type strain and $\Delta fliC-02330$ strain on larval settlement and metamorphosis; B: Biofilm density change of wild-type strain and $\Delta fliC-02330$ strain. Values that are significantly different between each other at $P<0.05$ are indicated by different lowercase letters.

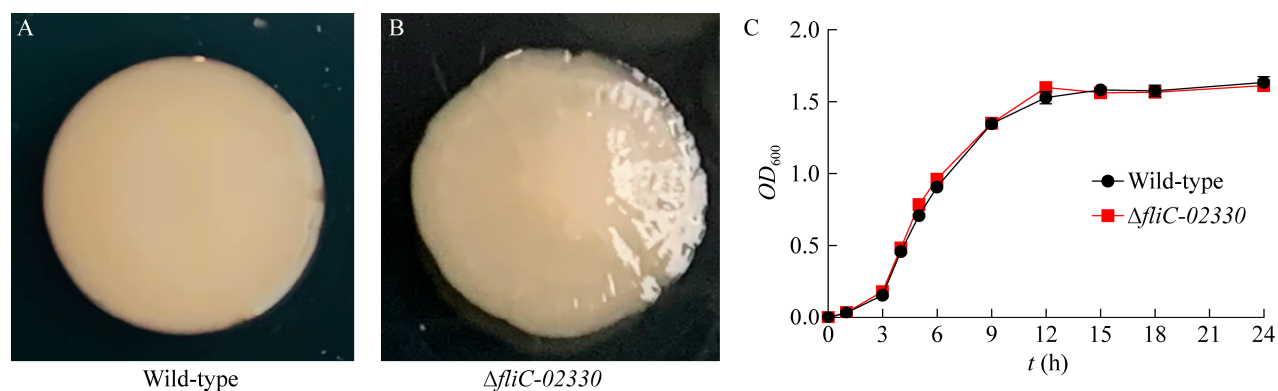


图3 野生菌与突变菌单一菌落形态拍摄及生长能力测定 A: 野生菌单一菌落形态; B: $\Delta fliC-02330$ 菌株单一菌落形态; C: 野生菌和 $\Delta fliC-02330$ 生长曲线

Figure 3 Colony morphology of wild-type and $\Delta fliC-02330$ strains and growth ability determination. A: Colony morphology of wild-type; B: Colony morphology of $\Delta fliC-02330$ strains; C: Growth curve of wild-type and $\Delta fliC-02330$.

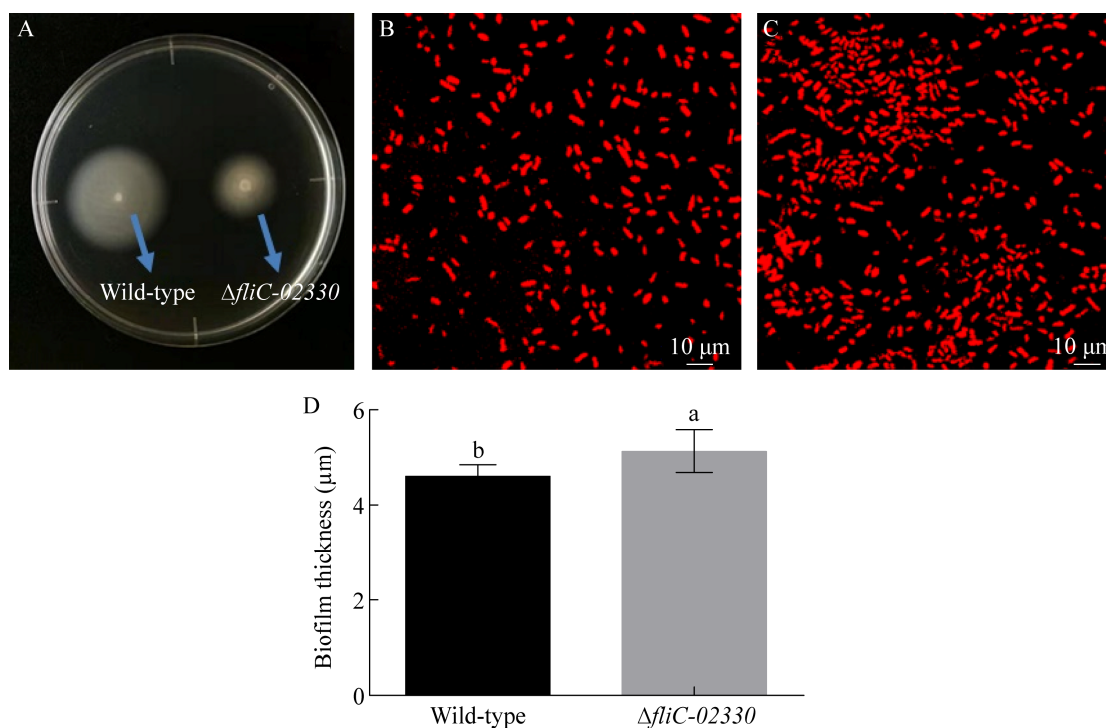


图4 野生型菌株和 $\Delta fliC-02330$ 菌株运动性、生物被膜形成和膜厚 A: 野生型菌株和 $\Delta fliC-02330$ 菌株游泳运动性; B: 野生型菌株生物被膜 CLSM 图像; C: $\Delta fliC-02330$ 菌株生物被膜 CLSM 图像; D: 生物被膜膜厚统计分析。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 4 Swimming motility, biofilm formation and thickness of wild-type and $\Delta fliC-02330$ strain. A: Swimming motility of wild-type and $\Delta fliC-02330$ strains; B: The CLSM images of biofilms formed by the wild-type strain; C: The CLSM images of $\Delta fliC-02330$ biofilms; D: Biofilm thickness statistical analysis of wild-type and $\Delta fliC-02330$ strains. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

生物被膜有更多的菌体聚集成簇, 而野生型菌株生物被膜上细菌分布均匀松散(图 4B、4C); 差异性分析显示, 缺失鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因的菌株形成的生物被膜厚度显著增加 ($P<0.05$) (图 4D)。

2.3.3 *fliC-02330* 基因缺失对生物被膜上胞外产物含量的影响

为进一步分析 *fliC-02330* 基因缺失对生物

被膜形成的影响, 通过 CLSM 显示发现, 野生菌与 $\Delta fliC-02330$ 的胞外 β -多糖和蛋白含量发生变化; α -多糖和脂质含量无显著差异 ($P>0.05$) (图 5A), 对于 4 种胞外产物的数据统计分析也显示出了与 CLSM 扫描结果一致的趋势。与野生型菌株相比较, $\Delta fliC-02330$ 菌株生物被膜上蛋白含量增加了 44.53% ($P<0.05$), β -多糖的含量降低了 67.28% ($P<0.05$) (图 5B)。

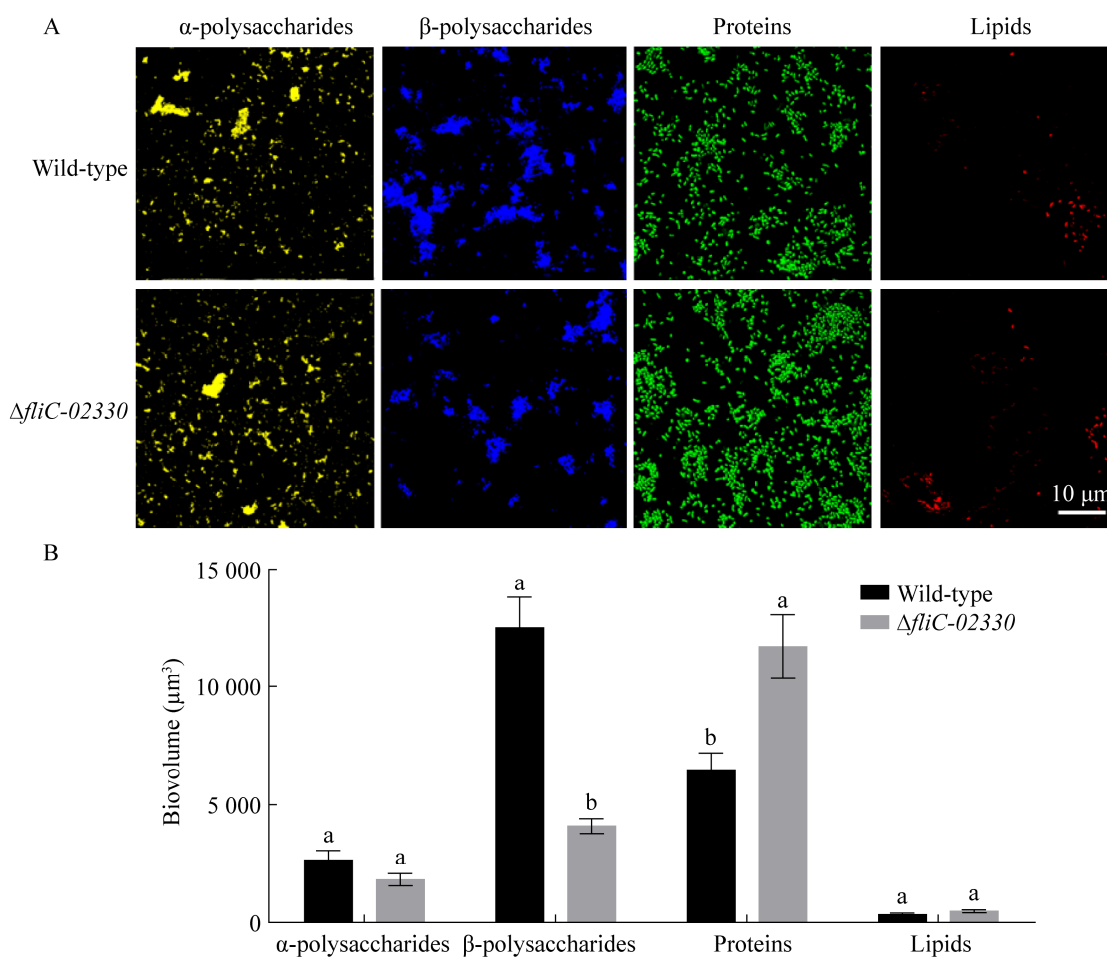


图 5 *fliC-02330* 基因缺失对生物被膜上胞外产物含量的影响 A: 野生型菌株和 $\Delta fliC-02330$ 菌株生物被膜胞外产物共聚焦扫描图像; B: 生物被膜上胞外产物生物量数据差异分析。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Figure 5 Effect of *fliC-02330* gene deletion on the content of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm. A: Differential analysis of EPS in biofilms of wild-type strains and $\Delta fliC-02330$ mutants; B: Analysis of the difference of EPS in biofilm. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

3 讨论与结论

1935年, Zobell等首次发现细菌在许多海洋无脊椎动物的变态中发挥着重要的作用^[27]。假交替单胞菌作为附着细菌中的优势属^[28], 其形成的生物被膜具有良好的诱导能力。生物被膜作为海洋系统的重要部分, 具备影响整个海洋环境的生化线索^[29], 其产生的分子信号可以与幼虫受体结合, 引起相应的应激表达。遗传学研究发现, 细菌自身的浓度、生长状态以及鞭毛、菌毛等附加结构都会影响细菌与宿主之间的作用关系, 包括由细菌聚集分泌的胞外产物也对附着起到促进或抑制作用^[30-31]。

前期关于细菌生物被膜诱导幼虫附着变态分子机制的研究, 其关注点多在筛选自发基因突变和构建转座子诱导基因突变等方法。Zeng等^[23,32]通过筛选表型突变菌和基因敲除发现, 细菌产生的纤维素、荚膜多糖和脓黑素能够调控厚壳贻贝幼虫的附着变态; Huang等^[33]通过 Tn-10 转座子诱导基因突变的方法发现, 细菌产生的噬菌体尾状结构诱导华美盘管虫幼虫附着^[34-35]。然而, 关于细菌调控海洋无脊椎动物附着变态的基因和产物的研究仍不够深入, 生物被膜对厚壳贻贝附着变态调控机制的研究也进展缓慢。

本实验通过在 *P. marina* 基因组中查到分子量较小且单一的鞭毛蛋白基因 *fliC-02330*, 构建了 *fliC-02330* 基因缺失的突变菌, 探究鞭毛蛋白部分基因缺失菌株所形成的生物被膜膜厚、细菌密度、胞外多糖、蛋白和脂等特性的变化, 以及对幼虫附着变态诱导作用的影响。通过上述实验, 探究鞭毛蛋白基因对被膜形成及调控幼虫附着变态的影响途径。

3.1 鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因缺失促进生物被膜的形成

与野生菌相比, $\Delta fliC-02330$ 运动性降低, 细菌呈现更聚集状态; 表型不规则且边缘出现褶皱。同时将 $\Delta fliC-02330$ 与 $\Delta fliP$ ^[20] 比较后发现, $\Delta fliP$ 的鞭毛消失、运动性丧失, 表型出现明显褶皱; 然而 $\Delta fliC-02330$ 的鞭毛仍然存在, 运动能力略有减弱, 表型虽然出现褶皱但变化程度不如 $\Delta fliP$ 。根据 Pratt等^[36]所提出的膜形成初始模型来看, 鞭毛蛋白介导细菌的运动性与趋化性使其不断扩散, 因此缺失部分基因的 $\Delta fliC-02330$ 运动性降低, 更易聚集成膜。在生物被膜形成的可逆阶段, 菌体分泌的粘性物质聚集使细菌与细菌之间更易形成多细胞聚合体。当细菌失去鞭毛介导的运动性, 将会以碰撞等形式进行杂乱运动, 从而使得菌落形成褶皱^[37], 增强生物被膜膜厚。

同时, 在许多研究中发现褶皱表型及被膜形成能力增强可能与其代谢的胞外产物有关。在霍乱弧菌中, 由于弧菌多糖的过量表达导致细菌出现褶皱, 进而促进被膜的形成^[38]。Wang等^[39]从生物被膜中分离出一株褶皱表型的自发突变菌 *Pseudoalteromonas atlantica* ECSMB14104, 其抗逆性增强、运动性减弱、形成的生物被膜增厚、胞外蛋白的生物量增加, 并且通过蛋白质组分析发现突变菌中上调的蛋白质普遍与代谢相关。

3.2 鞭毛蛋白 *fliC-02330* 基因缺失的菌株对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

在关于 *P. marina* 生物被膜与厚壳贻贝附着关系的研究中发现, 其生物被膜表面的胞外产物具有诱导厚壳贻贝幼虫附着变态的活性^[40]。2020年, Liang等^[20]研究发现鞭毛合成蛋白基因 *fliP* 缺失菌株的鞭毛消失导致其诱导厚壳贻贝幼虫附着变态能力降低, 并证明鞭毛蛋白

FliC 可以直接促进厚壳贻贝幼虫的附着变态。然而在本实验中, *fliC-02330* 作为鞭毛蛋白 FliC 的 4 个基因亚型之一, 其缺失虽然使厚壳贻贝幼虫的附着变态率相较于野生菌下降了 47.54%, 但并未导致突变菌的鞭毛消失。与 $\Delta fliP$ 相比, 仅缺失 *fliC-02330* 亚基的突变菌其诱导活性减弱程度较低, 推测可能由于 *fliP* 作为鞭毛合成基因, 处于上游调控基因, 对细菌功能性具有更高级别的调控作用; 而 *fliC-02330* 在功能性上可能会受到另外 3 个亚基的影响。因此, 本研究中厚壳贻贝幼虫附着变态率的降低可能并非与鞭毛蛋白 FliC 自身的诱导活性有关, 推测可能是由于 *fliC-02330* 基因缺失后引起生物被膜的生物学特性或胞外产物生物量的变化导致。

在以往的研究中发现, 鞭毛蛋白 FliC 能够通过调控生物被膜的胞外多糖、胞外脂类等物质影响厚壳贻贝稚贝的附着^[41]。自发突变菌 *Pseudoalteromonas atlantica* ECSMB14104^[39] 因其运动性丧失或减弱导致细菌在生物被膜表面过度聚集, 膜上代谢产物堆积, 在一定程度上影响了厚壳贻贝幼虫的附着变态。在本研究中, $\Delta fliC-02330$ 生物被膜的胞外产物中蛋白含量增加、 β -多糖减少, α -多糖与脂质含量无显著性变化。此变化趋势与 $\Delta fliP$ 的结果一致。有研究表明, 在鞭毛整体组装时存在蛋白外漏的情况, 即鞭毛相关基因的突变可能导致部分蛋白单体的外漏^[42]。由此可推测 *fliC-02330* 基因的缺失引起鞭毛蛋白表达量减少, 其他的胞外蛋白在膜上不断积累增加了表面阻力, 细菌运动受阻造成膜上蛋白过量, 进而降低了对幼虫变态的诱导活性。

然而对于 *P. marina* 而言, 在鞭毛的合成、组装的复杂过程中, 不同调控级别的基因存在怎样的调控关系、鞭毛蛋白 *fliC* 基因余下的 3 个亚基各自的作用及其相互间存在的联系等

问题还需进一步的研究。此外, 受 *fliC-02330* 基因调控的胞外蛋白、 β -多糖究竟是什么成分、这些蛋白及多糖是否能够直接诱导厚壳贻贝幼虫的附着变态将是接下来的研究重点。

综上所述, *P. marina* 鞭毛蛋白基因 *fliC-02330* 可以通过调控细菌表型、生物被膜形成能力及其胞外产物中蛋白和多糖的含量从而调控幼虫的附着变态。本研究进一步探索了鞭毛蛋白基因在调控厚壳贻贝幼虫附着变态中的作用, 为海洋微生物与宿主间的相互影响提供了新的探究思路。

REFERENCES

- [1] Lau S, Mak K, Chen F, Qian PY. Bioactivity of bacterial strains isolated from marine biofilms in Hong Kong waters for the induction of larval settlement in the marine polychaete *Hydroides elegans*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2002, 226: 301-310
- [2] Pinhassi J, Zweifel UL, Hagström A. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3359-3366
- [3] Holmström C, Kjelleberg S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30(4): 285-293
- [4] Webster NS, Smith LD, Heyward AJ, Watts JEM, Webb RI, Blackall LL, Negri AP. Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(2): 1213-1221
- [5] Negri AP, Webster NS, Hill RT, Heyward AJ. Metamorphosis of broadcast spawning corals in response to bacteria isolated from crustose algae[J]. Marine Ecology Progress Series, 2001, 223: 121-131
- [6] Huggett MJ, Williamson JE, Nys R, Kjelleberg S, Steinberg PD. Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae[J]. Oecologia, 2006, 149(4): 604-619
- [7] Medigue C. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125[J]. Genome Research, 2005,

- 15(10): 1325-1335
- [8] Thomas T, Evans FF, Schleheck D, Mai-Prochnow A, Burke C, Penesyan A, Dalisay DS, Stelzer-Braid S, Saunders N, Johnson J, et al. Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicata* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment[J]. PLoS One, 2008, 3(9): e3252
- [9] Qin QL, Li Y, Zhang YJ, Zhou ZM, Zhang WX, Chen XL, Zhang XY, Zhou BC, Wang L, Zhang YZ. Comparative genomics reveals a deep-sea sediment-adapted life style of *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. The ISME Journal, 2011, 5(2): 274-284
- [10] Kroiher M, Berking S. On natural metamorphosis inducers of the cnidarians *Hydractinia echinata* (Hydrozoa) and *Aurelia aurita* (Scyphozoa)[J]. Helgoland Marine Research, 1999, 53(2): 118-121
- [11] Dobretsov S, Qian PY. Facilitation and inhibition of larval attachment of the bryozoan *Bugula neritina* in association with mono-species and multi-species biofilms[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006, 333(2): 263-274
- [12] Lau SCK, Qian PY. Larval settlement in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* in response to bacterial films: an investigation of the nature of putative larval settlement cue[J]. Marine Biology, 2001, 138(2): 321-328
- [13] Bao WY, Satuito CG, Yang JL, Kitamura H. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms[J]. Marine Biology, 2007, 150(4): 565-574
- [14] Wang C, Bao WY, Gu ZQ, Li YF, Liang X, Ling Y, Cai SL, Shen HD, Yang JL. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to natural biofilms[J]. Biofouling, 2012, 28(3): 249-256
- [15] Rahim SAKA, Li JY, Kitamura H. Larval metamorphosis of the sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardaris crassispina* in response to microbial films[J]. Marine Biology, 2004, 144(1): 71-78
- [16] Wieczorek SK, Clare AS, Todd CD. Inhibitory and facilitatory effects of microbial films on settlement of *Balanus amphitrite amphitrite* larvae[J]. Marine Ecology Progress Series, 1995, 119: 221-228
- [17] Wieczorek SK, Todd CD. Inhibition and facilitation of bryozoan and ascidian settlement by natural multi-species biofilms: effects of film age and the roles of active and passive larval attachment[J]. Marine Biology, 1997, 128(3): 463-473
- [18] Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells"[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(22): 7945-7947
- [19] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 623-633
- [20] Liang X, Zhang XK, Peng LH, Zhu YT, Yoshida A, Osatomi K, Yang JL. The flagellar gene regulates biofilm formation and mussel larval settlement and metamorphosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 710
- [21] Peng LH, Liang X, Guo XP, Yoshida A, Osatomi K, Yang JL. Complete genome of *Pseudoalteromonas marina* ECSMB14103, a mussel settlement-inducing bacterium isolated from the East China Sea[J]. Marine Genomics, 2018, 41: 46-49
- [22] 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
- [23] Zeng ZS, Guo XP, Li BY, Wang PX, Cai XS, Tian XP, Zhang S, Yang JL, Wang XX. Characterization of self-generated variants in *Pseudoalteromonas lipolytica* biofilm with increased antifouling activities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(23): 10127-10139
- [24] Wang PX, Yu ZC, Li BY, Cai XS, Zeng ZS, Chen XL, Wang XX. Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 1-11
- [25] Yang JL, Shen PJ, Liang X, Li YF, Bao WY, Li JL. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms[J]. Biofouling, 2013, 29(3): 247-259
- [26] Qian PY, Lau SCK, Dahms HU, Dobretsov S, Harder T. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture[J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(4): 399-410
- [27] Zobell CE, Allen EC. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces[J]. Journal of Bacteriology, 1935, 29(3): 239-251
- [28] Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus

- Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov. and proposal of twelve new species combinations[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(4): 755-761
- [29] Dang HY, Lovell CR. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80(1): 91-138
- [30] 王睿. 细菌生物被膜耐药屏蔽及其防治[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2004, 3(1): 61-66
Wang R. Bacterial biofilm drug-resistant barrier and its prevention[J]. Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly, 2004, 3(1): 61-66 (in Chinese)
- [31] 李彤, 庄辉. 细菌生物膜的研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(3): 343-346
Li T, Zhuang H. Research progress of bacterial biofilm[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2002, 22(3): 343-346 (in Chinese)
- [32] Zeng ZS, Guo XP, Cai XS, Wang PX, Li BY, Yang JL, Wang XX. Pyomelanin from *Pseudoalteromonas lipolytica* reduces biofouling[J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(6): 1718-1731
- [33] Huang Y, Callahan S, Hadfield MG. Recruitment in the sea: bacterial genes required for inducing larval settlement in a polychaete worm[J]. Scientific Reports, 2012, 2: 228
- [34] Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, Burley SK, Almo SC, Mekalanos JJ. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin[J]. PNAS, 2009, 106(11): 4154-4159
- [35] Shikuma NJ, Pilhofer M, Weiss GL, Hadfield MG, Jensen GJ, Newman DK. Marine tubeworm metamorphosis induced by arrays of bacterial phage tail-like structures[J]. Science, 2014, 343(6170): 529-533
- [36] Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(2): 285-293
- [37] Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 634-644
- [38] Zhu J, Mekalanos JJ. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*[J]. Developmental Cell, 2003, 5(4): 647-656
- [39] Wang JS, Peng LH, Guo XP, Yoshida A, Osatomi K, Li YF, Yang JL, Liang X. Complete genome of *Pseudoalteromonas atlantica* ECSMB14104, a *Gammaproteobacterium* inducing mussel settlement[J]. Marine Genomics, 2019, 46: 54-57
- [40] Peng LH, Liang X, Xu JK, Dobretsov S, Yang JL. Monospecific biofilms of *Pseudoalteromonas* promote larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 2577
- [41] 蔡雨珊, 张秀坤, 竹攸汀, 杨金龙, 梁箫. 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 YS, Zhang XK, Zhu YT, Yang JL, Liang X. Effects of *Pseudoalteromonas marina* flagellin on biofilm formation and settlement of *Mytilus coruscus*[J]. Haiyang Xuebao, 2021, 43(4): 75-83 (in Chinese)
- [42] McCarter LL. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(3): 445-462