

陈先意,曲绍轩,骆昕,等. 生防细菌 MS82 中 GGDEF 结构域基因对生物被膜形成及运动性的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(11):104-108.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.11.014

生防细菌 MS82 中 GGDEF 结构域基因 对生物被膜形成及运动性的影响

陈先意^{1,2}, 曲绍轩², 骆昕², 李辉平², 林金盛², 蒋宁², 侯立娟², 马林², 刘慧芹¹

(1. 天津农学院园艺园林学院, 天津 300384; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏南京 210014)

摘要:为探究荧光假单胞菌 MS82 中 GGDEF 结构域基因对 c-di-GMP 调控细菌生物被膜形成及运动能力的影响,通过抑菌圈法、小试管法、96 微孔板法以及运动性平板分别检测 GGDEF 缺失突变体 MT5092、MT0189、MT19 和 MS82 野生型菌株之间的相关生命活动能力的差异。结果显示,GGDEF 缺失突变型菌株 MT5092、MT0189、MT19 的抑菌活性、生物被膜形成能力、运动能力(游泳运动、集群运动及抽搐运动)皆低于突变前的 MS82 野生型菌株,且突变株与野生株的抑菌活性存在极显著差异($P < 0.01$);36 h 的生物被膜形成能力存在极显著差异;运动行为存在不一致的显著($P < 0.05$)或极显著差异。最终得出结论:缺失 GGDEF 结构域基因会降低胞内 c-di-GMP 浓度水平,进而影响 MS82 菌株的生物膜及运动行为。

关键词:生防细菌 MS82;GGDEF 结构域基因;生物被膜;运动性

中图分类号:S942.3;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)11-0104-04

环二鸟苷酸(c-di-GMP)是一种广泛存在于细菌中的保守第二信使,作为关键因素调控着菌落形态、细胞周期、细胞分化、生物被膜的形成与扩散、鞭毛与菌毛介导的细胞运动行为、细胞毒力、抗性分泌等重要生命活动^[1-4]。大量试验证明,假单胞菌属菌株胞内 c-di-GMP 的浓度水平,受到 DGCs(二鸟苷酸环化酶)的催化核心,同时也是 DGCs 与 2 分子 GTP 结合形成 c-di-GMP 的重要结合位点——GGDEF 结构域的调控^[5-7]。对 c-di-GMP 调控生物膜的研究中发现,高浓度的 c-di-GMP 会促进胞外多糖产生和生物膜形成量的增加,同时抑制细菌运动行为;而低水平的 c-di-GMP 有利于鞭毛介导的细菌运动却不利于生物被膜的形成^[8]。在探索荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)是否符合此结论时,选取的试验对象 Pf0-1 菌株相关数据显示,缺失了含有

GGDEF 结构域的 *RapA* 基因后,细胞内 c-di-GMP 水平降低并对生物膜形成具有抑制作用,却没有发现影响胞外多糖产生或鞭毛介导的运动性的证据^[9]。

MS82 菌株是一株从土壤中发现的荧光假单胞菌^[10],对引起食用菌菌种菌料污染、继而引发寄生性病害的绿色木霉(*Trichoderma viride*)^[11]具有良好的抑菌作用。突变体 MT19 是通过随机突变方式获得的一株 GGDEF 结构域基因破坏菌株,并导致其抑菌活性完全丧失^[12]。然而,该基因的突变是否对生物被膜形成能力和运动性方面的具体调控造成影响尚不清楚。为探索 GGDEF 结构域基因在 MS82 菌株中对 c-di-GMP 调控生物被膜及运动行为的影响,本研究对荧光假单胞菌 MS82 菌株中 3 个与 c-di-GMP 代谢相关的 GGDEF 结构域基因进行研究,检测 MS82 野生株与 3 株不同 GGDEF 结构域突变株(MT5092、MT0189:基因重组菌株、MT19:随机突变菌株)之间的抑菌活性、生物被膜形成量、运动行为等表型差异,进一步探究荧光假单胞菌中 c-di-GMP 调控生物被膜及运动性之间的关联。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和供试菌株 生防菌:MS82 野生型菌株(*P. fluorescens*),突变型菌株 MT5092、MT0189、

收稿日期:2021-09-09

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31901933);天津市科技计划(编号:20YDTPJC01330);天津农学院研究生科研创新项目(编号:2020XY005);天津市高校中青年骨干创新人才培养计划(编号:J01009030709)。

作者简介:陈先意(1997—),女,上海人,硕士研究生,从事植物病理学研究。E-mail:1156561293@qq.com。

通信作者:刘慧芹,博士,教授,从事植物病害生防研究及生防菌剂研发,E-mail:wjxlhq@126.com;马林,博士,研究员,从事食用菌栽培和病虫害防控研究,E-mail:malin1590@sina.com。

MT19;病原菌:绿色木霉。所有菌株均由江苏省农业科学院蔬菜研究所提供。试验于 2020 年 10 月至 2021 年 8 月在江苏省农业科学院蔬菜研究所食用菌研究课题组研究室内开展。

1.1.2 相关培养基制备 LB 培养基(1 L):10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl^[13];LB 固体培养基(1 L):10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl、15 g 琼脂;氨苄液体培养基:在 LB 培养基成分中加入 0.1% 50 μg/mL 氨苄青霉素(Amp);氨苄固体培养基:在 LB 固体培养基成分中加入 0.1% 50 μg/mL Amp;游泳运动(swimming motility)培养基:在 LB 培养基成分中加入 0.3% 琼脂粉;集群运动(swarming motility)培养基:在 LB 培养基成分中加入 0.7% 琼脂粉、0.5% 葡萄糖;抽搐运动(twitching motility)培养基:在 LB 培养基成分中加入 3% 琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备 MS82、MT5092、MT0189、MT19 菌株在氨苄固体培养基上活化,28 ℃ 倒置培养 16 h。选择单菌落重新划线,28 ℃ 倒置培养 16 h。将各菌株单菌落接入 5 mL LB 培养基中,28 ℃、220 r/min 振荡培养 16 h,4 ℃、4 000 r/min 离心 3 min,弃上清,用无菌水将菌体重悬并稀释至吸光度 $D_{600\text{ nm}}=0.05$,备用。

1.2.2 突变体抑菌能力测定 采用抑菌圈法^[14]测定:分别取 10 μL 制备好的菌液置于 LB 固体培养基中心,待菌液晾干后,用小喷壶喷适量用无菌水稀释的绿色木霉孢子悬浮液(孢子浓度 2 亿 CFU/mL),28 ℃ 倒置培养 2 d,测量各菌株抑菌圈直径。

1.2.3 c-di-GMP 相关基因生物膜形成测定 采用小试管法^[15]与 96 微孔板法^[16]测定 c-di-GMP 对生物膜形成的影响。(1)小试管法:分别在含有 5 mL LB 培养基的灭菌试管中加入 5 μL 各菌株菌液,28 ℃、100 r/min 振荡培养 16 h 后,静置 36 h。1% 结晶紫染色后,观察管内形成染色环状物的颜色深浅。(2)96 微孔板法:96 孔板中每孔加入 100 μL 的 LB 培养基及各菌株备用菌液 10 μL,28 ℃ 静置孵育,分别于 12、24、36 h 取出。1% 结晶紫染色后,加入 100 μL 33% 乙酸溶解 30 min。以 LB 培养基为参比,用紫外分光光度计在荧光假单胞菌最大吸光波长 590 nm 处测定菌液吸光度 $D_{590\text{ nm}}$ 。

1.2.4 c-di-GMP 相关基因运动能力测定 本研究运动能力检测方法对谢杰鹏等的方法^[17]进行改进。(1)游泳运动能力测定:各菌株分别取 10.0、

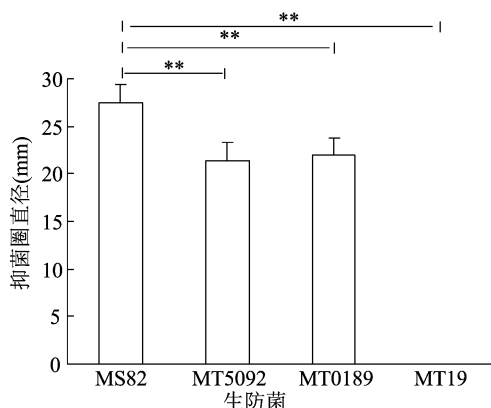
2.5 μL 菌液,接种在泳动培养基表面正中间,28 ℃ 培养 24 h 后,观察以接种中心蔓延的云雾状区域,测量该区域的直径。(2)集群运动能力测定:分别吸取 10.0、2.5 μL 菌液接种在集群运动培养基表面中心,28 ℃ 恒温培养 24 h 后,观察以接种中心生长蔓延的区域,测量该区域的直径。(3)抽搐运动能力测定:用无菌牙签蘸取各菌株菌液,接种在抽搐运动培养基底部,28 ℃ 恒温培养 48 h 后,轻轻揭去培养基,用 0.9% 生理盐水冲洗培养皿底部未黏附的细菌,1% 结晶紫溶液染色后,观察以细菌接种点为中心形成的区域,测量该区域的直径。

1.2.5 统计学方法 每组处理设置 3 个重复,测量数据采用 SPSS 17.0 统软件进行单因素方差分析计(ANOVA),采用 LSD-Tamhane's T2 进行两两比较。数据结果用“平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示。

2 结果与分析

2.1 抑菌能力分析

抑菌圈法产生的透明抑菌圈直径越大,则表明该菌株的抑菌活性越强,反之越弱。MS82 野生型菌株和 3 个 GGDEF 结构域基因突变体菌株对绿色木霉的抑菌活性如图 1 所示,可以看出,3 个突变体菌株的抑菌活性均有不同程度的降低。其中 MT19 完全丧失抑菌能力,无抑菌圈产生;MT5092 与 MT0189 产生的抑菌圈均极显著小于 MS82 野生型($P<0.01$)。4 个菌株的抑菌活性依次为 MS82 > MT0189 > MT5092 > MT19。



* 表示与 MS82 相比差异显著($P<0.05$); ** 表示与 MS82 相比差异极显著($P<0.01$)。下图同

图1 MS82 菌株野生型和突变型(MT5092、MT0189、MT19)的抑菌活性

2.2 生物被膜形成能力差异分析

MS82 菌株中 3 个含有 GGDEF 结构域的基因

分别被突变后,生物被膜的形成能力表现出了明显的变化。从小试管法的试验结果(图2)可以看出,MS82 菌株的菌体生物膜经过染色后颜色比 3 个突变菌株深,且环状完整,表明生成的细菌数量多,生物被膜形成量多,生物被膜形成能力强。96 微孔板法试验结果(图3)与图2一致,即3个基因突变后的生物被膜形成能力明显变弱,且随着时间的延长,差异逐渐增大;同时3个突变菌株的生物被膜形成能力随时间延长,逐渐趋于一致。

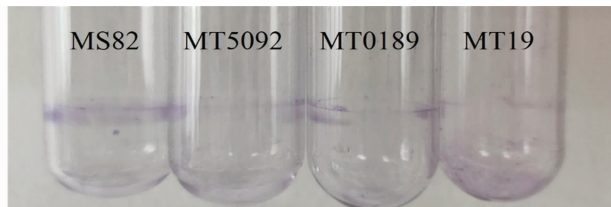


图2 MS82 菌株野生型和突变型小试管法生物被膜形成量测定

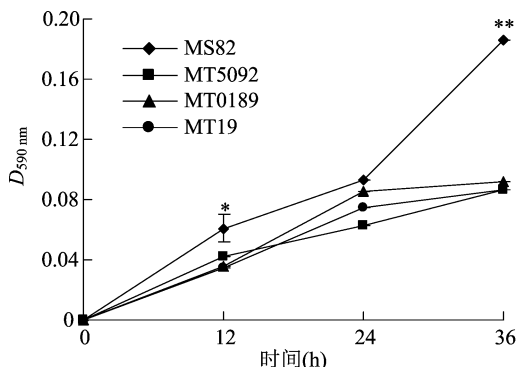


图3 MS82 菌株野生型和突变型生物膜生长曲线

2.3 运动能力差异分析

2.3.1 游泳运动 具有鞭毛的细菌在液体中借助鞭毛的旋转,使菌体能定向泳动,在培养基表面表现为类圆形云雾状扩散。图4试验结果表明,点样 10.0 μL 时各菌株的游泳圈直径大于点样 2.5 μL 时,3 株缺失 GGDEF 结构域基因的突变型菌株扩散直径小于野生型,表现出游泳运动缺陷。不同点样量下,MS82 野生型菌株与 3 株突变型菌株之间均表现为极显著差异。MS82、MT5092、MT0189、MT19 这 4 个菌株的泳动能力强弱呈现依次下降的趋势。

2.3.2 集群运动 细菌在高密度下会发生集群运动,在相应培养基上出现以接种点为中心向外蔓延的生长区域,生长区域直径越大,表明细菌的集群运动能力越强。对比数据(图5)发现,点样 10.0、2.5 μL 时各菌株之间的差异性一致。野生型 MS82 菌株的生长区域直径显著或极显著大于基因突变后的3个突变菌株。说明含有 GGDEF 结构域基因

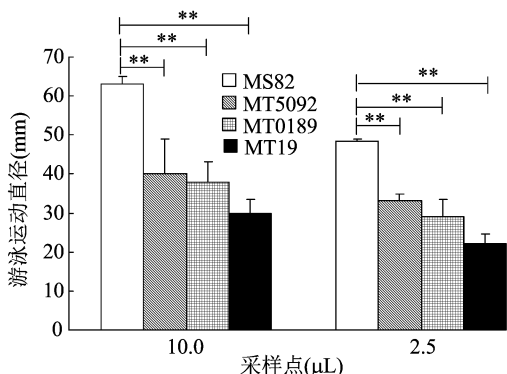


图4 MS82 菌株野生型和突变型的游泳运动能力测定

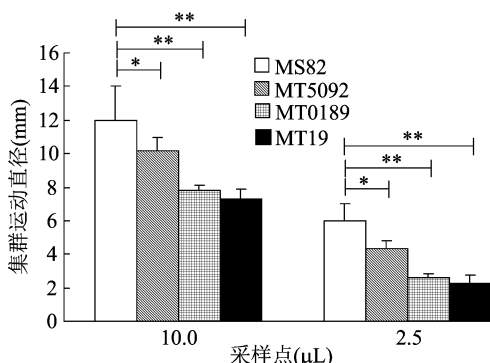


图5 MS82 菌株野生型和突变型的集群运动能力测定

的缺失影响了 MS82 菌株的集群运动能力。

2.3.3 抽搐运动 通过刺伤试验检测细菌的抽搐运动能力时,会在培养基与底部培养皿之间形成浅白色的位移区域。观察试验结果发现,相较于突变型菌株,野生型菌株 MS82 向四周发生的位移距离更大,且位移边缘不平整,表明有继续向外发生位移的趋势,而突变型菌株发生的位移距离小,边缘光滑呈类圆形。进一步分析数据(图6)可知,突变株 MT0189 位移距离虽然变小但与野生株之间无显著性差异;突变株 MT5092 位移区域显著减小,约为野生株的 1/2;突变株 MT19 位移区域极显著减小,几乎不发生位移。

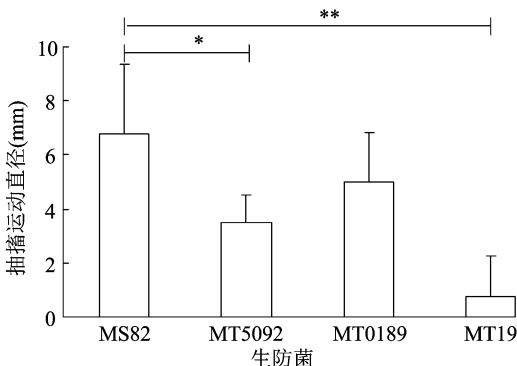


图6 MS82 菌株野生型和突变型的抽搐运动能力测定

3 讨论

c-di-GMP 作为细菌内调节多细胞行为的调节因子,胞内浓度水平由该系统的上下游信号分别调节,并影响细菌不同的生命活动。浓度低时,上游合成信号 DGCs 与 2 分子 GTP 在 GGDEF 结构域的活性部位结合形成 c-di-GMP,提高胞内 c-di-GMP 浓度水平,促进生物被膜的形成;浓度高时,多余的 c-di-GMP 会与 GGDEF 结构域的抑制位点相结合,或被特异性磷酸二酯酶(PDEs)感知并分解,抑制生物被膜的形成^[18]。同时,细胞的运动行为的表达在生物被膜形成过程中是相互联系、共同参与的^[2]。c-di-GMP 在高水平下限制细胞的运动行为,进而有利于形成生物被膜;相反 c-di-GMP 在低水平下,有利于鞭毛介导的运动行为,不利于生物被膜的形成^[19]。

c-di-GMP 信号系统接收到环境信号会使荧光假单胞菌产生包括 2,4-二乙酰基间苯三酚、藤黄绿脓菌素、硝吡咯菌素、氢氰酸等多种能够防治病原微生物的抑菌物质^[20]。此前在对荧光假单胞菌丧失 GGDEF 结构域的突变体 MT19 进行抑菌活性测定时,MT19 表现出明显的抑菌活性缺陷^[12]。本试验在此基础上进一步探究对比同源重组突变株 MT5092、MT0189 的抑菌活性,试验结果显示,抑菌活性同样有所降低,符合此前得到的结论,说明缺失 GGDEF 结构域会降低 c-di-GMP 浓度,进而抑制抑菌活性物质的产生。与此同时,发现 2 株同源重组菌株的抑菌活性比 MT19 强,推测可能是不同突变方式及位点导致的基因型存在内在差异,因此在抑菌活性表型上也存在一定的差异。

另外,通过诱变荧光假单胞菌 F113 获得缺失 GGDEF 结构域的 WspR 蛋白突变体,该突变体的运动能力强于野生型菌株,生物膜形成能力受到抑制^[21]。但在本次试验中,同源重组突变菌株 MT5092、MT0189 以及随机突变株 MT19 的游泳运动、集群运动、抽搐运动等运动行为及生物被膜形成能力都有所下降,与其他菌株如鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) ATCC17978^[22]、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) ATCC4356^[23]、普城沙雷氏菌(*Serratia puccinia*) G3^[24]、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)^[25]等菌株相关试验中所得到的结果相符,却与 F113 菌株的试验结论^[21]略有不同。同时,发现 2 株同源重组菌株的运动能力比

随机突变株 MT19 强,且两者同源重组菌株 MT5092 与 MT0189 之间也存在一定差异,推测同样可能是基因位点不同导致的表达存在差异。

本试验主要通过对比 3 个缺失 GGDEF 结构域基因的突变株 MT5092、MT0189、MT19 与 MS82 野生型菌株对绿色木霉的抑菌能力、生物被膜形成能力、运动行为能力,发现缺失 GGDEF 结构域对 c-di-GMP 信号系统调控细菌抑菌物质合成、生物被膜形成及运动能力存在抑制作用。为更深入地探索 GGDEF 结构域对 c-di-GMP 调控生物被膜与运动能力之间的关系,下一步将通过基因互补试验验证突变菌株的抑菌活性、生物被膜形成及运动能力的变化验证其基因功能。

参考文献:

- [1] 艾连中,范艺周,熊智强. 第二信使分子调控细菌胞外多糖生物合成研究进展[J]. 中国食品学报,2021,21(4):1-8.
- [2] 全旭,王鹤龄,张慧彦,等. c-di-GMP 及其对细菌生物膜调控作用的研究进展[J]. 现代口腔医学杂志,2018,32(6):352-356.
- [3] 秦文韬,王守现,荣成博,等. 我国食用菌病害发生与防控概况[J]. 中国食用菌,2020,39(12):1-7.
- [4] 杨毅,李治,高玲霞,等. 荧光假单胞菌抗生素代谢产物合成相关基因的研究现状[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(8):100-106.
- [5] 詹学良,姚严翔,芦晓红,等. 铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢相关基因 PA0575 对表型的影响[J]. 微生物学通报,2020,47(6):1927-1934.
- [6] 肖玉杰. 恶臭假单胞菌 KT2440 中 c-di-GMP 及其代谢酶 BifA, GcbA 在调控生物被膜形成和游动性中的作用[D]. 武汉:华中农业大学,2017.
- [7] 卢佳思. 固氮施氏假单胞菌环二鸟苷酸(c-di-GMP)代谢相关基因的功能鉴定[D]. 合肥:安徽农业大学,2016:3-6.
- [8] 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.
- [9] Monds R D, Newell P D, Gross R H, et al. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA[J]. Molecular Microbiology, 2007, 63(3):656-679.
- [10] Nie H L, Xiao Y J, He J Z, et al. Phenotypic-genotypic analysis of GGDEF/EAL/HD-GYP domain-encoding genes in *Pseudomonas putida* [J]. Environmental Microbiology Reports, 2020, 12(1):38-48.
- [11] 刘正慧,李丹,Leo S Frederick,等. 食用菌主要病原真菌和细菌[J]. 菌物研究,2018,16(3):158-163.
- [12] 马林,曲绍轩,王晓强,等. 食用菌木霉的生防细菌鉴定及相关基因功能预测[J]. 江苏农业学报,2016,32(3):528-533.
- [13] 萨姆布鲁克 D J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,译. 3 版. 北京:科学出版社,2016:1595.

鲁陈琳,秦敦忠. 30% 氟乐灵微囊悬浮剂的制备与性能研究[J]. 江苏农业科学,2022,50(11):108-118.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.11.015

30% 氟乐灵微囊悬浮剂的制备与性能研究

鲁陈琳, 秦敦忠

(南京林业大学化学工程学院, 江苏南京 210018)

摘要:氟乐灵是一种广泛适用于一年生禾本科杂草的芽前除草剂,为改善氟乐灵在使用过程中易光解、易挥发引起的利用率低、持效期短等问题,通过界面聚合法以氟乐灵为原药,制备了 30% 氟乐灵微囊悬浮剂,研究了乳化剂、芯材溶剂、保护胶体和其他助剂在微囊制备中的影响,并通过添加表面活性剂来改善微囊悬浮剂界面性能以调控微囊释放速率。结果表明,以 150# 芳烃溶剂油为芯材溶剂、SP-27001 为乳化剂、质量分数 3% XG 为保护胶体、SP-2206 为分散剂,最后加入硅酸镁铝、丙三醇、黄原胶、凯松,可得到达标的氟乐灵微囊悬浮剂。性能表征结果表明,所得悬浮剂性能指标达标,微囊形貌良好且分布均匀, D_{90} 为 6.260 μm ,有效含量 30.7%,悬浮率 98%,物理稳定性良好,加入助剂 SP-4028 的微囊释放速率可达乳油剂释放水平,对早熟禾防效显著,与乳油剂基本处于同一水平。

关键词:氟乐灵;微囊悬浮剂;界面性能;释放速率

中图分类号:TQ450.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)11-0108-11

氟乐灵是一种毒性低的除草剂,属于二硝基苯胺类,在澳大利亚被广泛应用于农田杂草防治中^[1-2]。现阶段氟乐灵的主流制剂是 48% 氟乐灵乳油剂,但氟乐灵光解性强,存在持效期短、药效低等问题^[3-4]。乳油制剂中含有大量有机溶剂,对环

境不友好,也会影响施药者的健康^[5-6]。微囊是具有核壳结构的微米级颗粒,农药微囊剂包括囊壁、囊芯 2 个部分,囊芯是农药的有效成分,囊壁是成膜的高分子材料^[7]。将氟乐灵制成微囊剂可以有效减少光解,提高农药实际药效,减少施药频次,且水溶性的微囊制剂可以降低由氟乐灵本身颜色导致的对施药设备和加工设备的清洗难度^[8-9]。

界面聚合法简便,对聚合单体的纯度要求不高,反应速度快^[10]。本研究壁材使用聚脲,结合界面聚合法,制备了 30% 氟乐灵微囊悬浮剂。考察了芯材溶剂、乳化剂、保护胶体等因素对微囊粒径分

收稿日期:2021-12-30

基金项目:江苏精禾界面科技有限公司基金。

作者简介:鲁陈琳(1997—),女,安徽马鞍山人,硕士研究生,主要从事农药制剂研究。E-mail:819605404@qq.com。

通信作者:秦敦忠,博士,研究员,主要从事高分子表面活性剂研究。E-mail:qindz@126.com。

[14]谭才邓,朱美娟,杜淑霞,等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. 食品工业,2016,37(11):122-125.

[15]陈朝喜. 细菌生物被膜定性和定量研究方法[J]. 湖北农业科学,2016,55(9):2177-2180.

[16]Gu G Y,Smith L,Liu A X,et al. Genetic and biochemical map for the biosynthesis of occidiofungin, an antifungal produced by *Burkholderia contaminans* strain MS14 [J]. Applied and Environmental Microbiology,2011,77(17):6189-6198.

[17]谢杰鹏,孔晋亮,陈一强,等. 美罗培南对胞内不同 c-di-GMP 浓度表型铜绿假单胞菌生物被膜形成的影响[J]. 广西医科大学学报,2020,37(6):1001-1006.

[18]郑贤惠,汪钰鸿,张明涛,等. 生物被膜与环二鸟苷酸信号系统[J]. 生命的化学,2020,40(12):2162-2169.

[19]谷维璇. c-di-GMP 对铜绿假单胞菌生物被膜调控的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2020,42(12):2289-2296.

[20]Berendsen R L,Kalkhove S I C,Lugones L G,et al. Germination of *Lecanicillium fungicola* in the mycosphere of *Agaricus bisporus*[J].

Environmental Microbiology Reports,2012,4(2):227-233.

[21]Navazo A,Barahona E,Redondo-Nieto M,et al. Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113[J]. Microbial Biotechnology,2009,2(4):489-498.

[22]乔霞,苏雅静,魏军,等. 鲍曼不动杆菌 ATCC17978 中第二信使 c-di-GMP 相关代谢蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志,2020,15(9):1005-1009,1014.

[23]何嘉辉,孙洁丽,闫文娟,等. 嗜酸乳杆菌 GCDEF 和 EAL 结构域相关蛋白的表达结构域相关蛋白的表达、纯化及活性分析[J]. 南方医科大学学报,2017,37(5):633-639.

[24]吴岩. 普城沙雷氏菌 G3 菌株 GCDEF/EAL 结构域蛋白 PigX 的功能研究[D]. 镇江:江苏大学,2016:41-42.

[25]Liu X C,Zheng G S,Wang G,et al. Overexpression of the diguanylate cyclase CdgD blocks developmental transitions and antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*[J]. Science China (Life Sciences),2019,62(11):1492-1505.