

文章编号: 1674-5566(2024)01-0230-12

DOI: 10.12024/jsou.20221204042

杀鱼爱德华氏菌新型抗酸系统 GadBCD 的抗酸作用与致病作用

高博^{1,2}, 官春光¹, 舒艾梅^{1,2}, 张杉杉^{1,2}, 李静林^{1,2}, 胡永华^{2,3}

(1. 河北农业大学海洋学院, 河北秦皇岛 066000; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 3. 海南省海洋生物资源功能性成分研究与利用重点实验室, 海南海口 571101)

摘要: 本研究鉴定了鱼类重要致病菌杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)抗强酸系统 GadBCD 及其功能。通过序列分析和共转录实验表明: GadBCD 系统由1个谷氨酸脱羧酶、1个谷氨酰胺酶和3个转运体组成, 它们组成1个操纵子。qRT-PCR 发现强酸和高温刺激细菌时 *gadBCD* 表达基本不变, 但过氧化氢和宿主血清刺激时 *gadBCD* 表达显著上调。利用同源重组构建了 GadBCD 系统缺失突变株 Δ *gadP*, 通过比较野生株和 Δ *gadP* 的生长曲线以及酸性压力下存活率等实验, 发现 GadBCD 系统不仅是杀鱼爱德华氏菌抗中强酸的重要参与者, 也是抗强酸所必需的; 通过比较野生株和 Δ *gadP* 在生物膜形成、运动性、抗宿主血清杀伤、感染细胞等方面的差异, 发现 GadBCD 参与了细菌的毒力。综上所述, GadBCD 系统是杀鱼爱德华氏菌重要的抗强酸系统, 并参与了细菌的致病作用。

关键词: 杀鱼爱德华氏菌; 谷氨酸脱羧酶系统; 抗酸性; 致病作用

中图分类号: S 941.4 **文献标志码:** A

杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)属肠杆菌科(Enterobacteriaceae)爱德华氏菌属(*Edwardsiella*), 曾又称迟缓爱德华氏菌(*E. tarda*)。ABAYNEH等^[1]在2013年重新分类鱼源迟缓爱德华氏菌株时, 将其更名为杀鱼爱德华氏菌。该菌形似短杆状, 是一种革兰氏阴性、无荚膜、兼性厌氧、具有运动能力的胞内菌^[2]。杀鱼爱德华氏菌广泛分布于环境中, 对多种动物具有致病性, 但其主要感染对象为鱼类, 包括罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)等^[3]。鱼体被其感染后引发爱德华氏菌病, 该病典型症状包括但不限于鱼体表面因色素沉着差异而色泽不一、皮肤有轻微至中度的溃疡、眼球浑浊且突出、体表及部分内脏出血、腹胀以及螺旋游动等^[4]。杀鱼爱德华氏菌的致病性是多元化的, 多个毒力因子/系统被鉴定, 其致病作用与机制被阐释。随着研究的深入, 杀鱼爱德华氏菌已逐渐成为一个在分子和细胞

水平上研究水产病原菌的毒力机制、毒力因子与宿主互作的模式菌株。已有的研究表明杀鱼爱德华氏菌感染鱼类主要分为以下几个阶段: 首先, 细菌凭借鞭毛产生的运动性游动至宿主附近^[5], 并利用黏附素如非菌毛血凝素和鞭毛蛋白等附着于鱼体体表、胃肠道和鳃^[6]; 接着, 利用溶血素等入侵素类似的蛋白侵袭感染宿主组织或者细胞^[7]; 随后, 借助Ⅲ型分泌系统(T3SS)和Ⅵ型分泌系统(T6SS)等毒力系统/因子逃避宿主免疫杀伤, 并通过对抗逆因子和毒力因子的表达调控来适应胞内环境^[8]; 最后, 在细胞内存活的细菌大量增殖, 释放后感染其他细胞。虽然近年来杀鱼爱德华氏菌致病机制有积极进展, 但是其耐强酸机制还未见有研究报道。

病原菌经常不可避免会遇到各种各样的环境压力, 如高温、高渗透压、氧化应激、pH波动、饥荒等。在这些环境压力中, 低pH往往是病原体最常见的困境^[9]。酸性环境包括酸性土壤、发酵食品、胃肠道强酸环境以及细胞巨噬细胞吞噬体

收稿日期: 2022-12-12 修回日期: 2023-03-29

基金项目: 海南省自然科学基金(创新团队)项目(2019CXTD413)

作者简介: 高博(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物病害。E-mail: gaobo0525@126.com

通信作者: 胡永华, E-mail: huyonghua@itbb.org.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

中的中度酸环境^[10]。为了对抗细胞内和细胞外的酸胁迫,细菌已经进化出了被动和主动的酸性耐受机制^[11]。在这些机制中,氨基酸依赖性抗酸系统(AR)是大部分细菌共有的抗酸系统,它由一个催化底物氨基酸的质子依赖性脱羧化的细胞质脱羧酶和一个用外部底物交换内部产物的内膜底物/产物逆向转运蛋白组成^[12]。在大肠杆菌中,已鉴定的 AR 系统包括谷氨酸脱羧酶系统^[13]、精氨酸脱羧酶系统^[14]、赖氨酸脱羧酶系统^[15]以及鸟氨酸脱羧酶系统^[16]。这些系统分别在不同酸强度下起主要抗酸作用,保护细菌免受各种酸胁迫的危害。

谷氨酸依赖型抗酸系统主要是利用谷氨酸脱羧酶催化的脱羧反应消耗 H⁺,从而提高胞内的 pH,所以该系统又称谷氨酸脱羧酶系统,是目前研究最为广泛的细菌抗酸应激系统。目前已在弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*)^[17]、乳酸菌 (*Lactobacillus*)^[18]、布鲁氏菌 (*Brucella*)^[19]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[20]以及单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)^[21]等多种细菌中鉴定了谷氨酸脱羧酶系统并阐明了其抗酸作用,特别是抗强酸作用。对于大肠杆菌和单增李斯特菌来说,谷氨酸脱羧酶系统是其最重要的强酸耐受机制。该系统主要由谷氨酸脱羧酶和氨基酸逆向转运蛋白 2 个组分组成。谷氨酸脱羧酶 (Glutamic acid decarboxylase, GAD) 是一种典型的依赖于磷酸吡哆醛 (Pyridoxal-5'-phosphate, PLP) 的 II 类氨基酸脱羧酶,可以催化谷氨酸脱羧形成 γ -氨基丁酸和二氧化碳,并伴有质子消耗^[22-23];氨基酸逆向转运蛋白 (GadC) 可转运谷氨酸、谷氨酰胺和 γ -氨基丁酸。GadC 是一种依赖 pH 的逆向转运蛋白,在 pH < 5.5 时具有强活性,而在 pH \geq 6.5 时无转运活性^[24]。

在前期研究中,我们鉴定了杀鱼爱德华氏菌抗弱酸系统 CadBA^[25]。在本研究中,我们鉴定了杀鱼爱德华氏菌一个新型的抗强酸系统 GadBCD,明确了其抗强酸作用、对细菌生理性能的影响以及在细菌致病过程中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株及质粒

杀鱼爱德华氏菌 (*E. piscicida* TX01) 分离自

患病的鱼体^[26],由中国科学院海洋研究所提供;*E. coli* DH5 α 购买自北京全式金生物技术股份有限公司;pDM4 质粒由中国科学院海洋研究所提供。

1.1.2 培养基及实验细胞

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10、酵母提取物 5、NaCl 10, pH 为 9.0、7.0、5.0、4.5、4.2、3.0 和 2.5 等。牙鲆腮细胞系 (FG 细胞) 和小鼠巨噬细胞 (RAW264.7 细胞) 由中国科学院海洋研究所馈赠。

1.1.3 试剂与引物

酵母浸粉、胰蛋白胨购自 Oxoid 公司;T4 连接酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司;琼脂粉、多黏菌素 B、氯霉素和氨苄青霉素购自北京索莱宝科技有限公司;逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司;DMEM 细胞培养液购自 Corning 公司;L-15 细胞培养液购自吉诺生物工程有限责任公司;胎牛血清、胰蛋白酶购自 Thermo Fisher 公司;PBS 缓冲液、PCR Master MIX 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;qPCR Super MIX 购自北京全式金生物技术股份有限公司。本研究所用引物见表 1,由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 GadBCD 系统生物学信息分析

在 NCBI 数据库中获取杀鱼爱德华氏菌 GadBCD 系统 5 个蛋白 (GadB、GadD、GadC、GadC2 和 GadC3) 的氨基酸序列,用 DNAMAN 5.0 软件对该系统 5 个蛋白的氨基酸序列进行比对分析;用在线软件对 5 个蛋白质的理化性质、跨膜结构、保守结构域和三维结构等进行在线预测分析。

1.2.2 GadBCD 系统共转录验证

将杀鱼爱德华氏菌 TX01 接种于 LB 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀=0.8;离心收集菌体,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 HP Total RNA kit 分别提取基因组 DNA (gDNA) 和总 RNA, RNA 反转录 cDNA。分别以 cDNA、gDNA 和 RNA (阴性对照) 为模板,用特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:模板 1 μ L、引物 F/R 0.5 μ L、2 \times PCR Mix 6.25 μ L、加超纯水至 20 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。实验重复 3 次。

表1 引物序列
Tab. 1 Primers sequence

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Function
GadPKOF1	ggatecATGTTGGGCTTATCCACCGA (<i>Bam</i> H I)	基因敲除
GadPKOR1	TAGCGTTACGGCGCATAACGACG	基因敲除
GadPKOF2	ATGCGCCGTAACGCTAACTAATAGATAAGAA	基因敲除
GadPKOR2	ggatecCAACATCCTGGCGCTGAA (<i>Bam</i> H I)	基因敲除
GadPKOF3	GCCTCTGAACCAAAGCG	基因敲除
GadPKOR3	CCGTTCGGGTACGATGT	基因敲除
GadC3-GadC2RTF	CGGGGGACAAAACATCGACA	RT-qPCR
GadC3-GadC2RTR	CTGGTGATGCTGCTGGTGAT	RT-qPCR
GadC2-GadDRTF	CAAAGACAAAAGGCCAGCCAG	RT-qPCR
GadC2-GadDRTR	GAAAAATGTTGGCGGACGTC	RT-qPCR
GadD-GadCRTF	GGCCAGCGTCCATACTG	RT-qPCR
GadD-GadCRTR	GGCCCAGGCACAGCAGA	RT-qPCR
GadC-GadBRTF	CTGACCACCGCGACGATAT	RT-qPCR
GadC-GadBRTR	CCAGCTGCTGATGGAGGACTT	RT-qPCR
ETAE-2863RTF	GCTAACTGTAGCACGGCCA	RT-qPCR
ETAE-2863RTR	GTCACCATAATGATCGGCATC	RT-qPCR
ETAE-2869RTF	TTTATGATCGATCGCAGCAA	RT-qPCR
ETAE-2869RTR	GCATCAGAAAGCGAAAGTGT	RT-qPCR

1.2.3 GadBCD系统在逆境条件的表达

将培养至对数期的杀鱼爱德华氏菌TX01在pH 2.5、42℃、血清和过氧化氢的条件下刺激1 h,提取总RNA反转cDNA,进行RT-qPCR检测基因的表达。RT-qPCR反应体系(20 μL): SYBR®Premix Ex *Taq*[™] 10 μL,特异性引物对各0.5 μL,100倍稀释的cDNA 2 μL,超纯水 7 μL。RT-qPCR反应条件:95℃ 30 s;95℃ 15 s,60℃ 15 s,40个循环;72℃ 20 s。采用2^{-ΔΔC_t}法计算GadBCD系统的表达水平,16S rDNA作为内参基因。实验重复3次。

1.2.4 GadBCD系统的敲除

由于GadBCD系统所属的5个基因阅读框过长,难以进行缺失突变,因而我们考虑缺失GadBCD系统启动子区域209 bp的一段序列。引物的核苷酸序列见表1。为获得同源重组序列,分别使用引物GadPKOF1/ GadPKOR1和GadPKOF2/ GadPKOR2扩增缺失区的侧翼片段,再利用引物GadPKOF1/ GadPKOR2融合侧翼片段。将融合片段克隆到自杀质粒pDM4的*Bam*H I位点,获得重组质粒命名为pDMGadP。将重组质粒pDMGadP结合转移到野生株TX01中,在含有10%蔗糖的LB琼脂平板上筛选缺失敲除株,经抗性验证和测序验证确定敲除株,命名为

ΔgadP。

1.2.5 敲除株*ΔgadP*中*gadBCD*表达水平检测

提取野生株TX01和敲除株*ΔgadP*总RNA,反转录为cDNA,通过RT-qPCR检测*gadBCD*的表达水平,以确认敲除株*ΔgadP*中*gadBCD*不表达或超低水平表达。

1.2.6 GadBCD系统对细菌生长的影响分析

将对数期的野生株和敲除株*ΔgadP*稀释至10⁵接种在不同pH(7.0~4.2)酸性条件的LB培养基,利用Bioscreen C生长测定仪监测细菌的生长情况。每组样品3个平行,实验重复3次。

1.2.7 GadBCD系统对细菌在强酸条件存活的影响分析

将对数期的野生株和敲除株稀释100倍,在pH=7、pH=2.5和pH=2.5且添加1 mmol/L Glu 3种条件下的PBS缓冲液中孵育2 h,细菌经系列梯度稀释后涂布在含有polyB的LB平板上进行菌落计数。实验重复3次。

1.2.8 GadBCD系统对细菌生物膜形成和运动性的影响分析

细菌生物膜形成能力的检测采用结晶紫染色法,具体方法参考MA等^[27]的方法:细菌在LB培养基中培养至对数期,离心收集菌体,用PBS清洗菌体3遍,并用LB培养基稀释重悬至终浓度

为 1×10^5 CFU/mL;将稀释好的菌液加入 96 孔板中,每孔 200 μ L,每个菌株 6 个平行孔,只加 LB 培养基的孔作为空白对照,28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h;将 96 孔板中的菌液吸出,使用 PBS 洗孔 3 遍,晾干后每孔加入 200 μ L Bouin 氏液室温固定 1 h;将 Bouin 氏液吸出,使用 PBS 洗孔 3 遍,自然晾干后每孔加入 200 μ L 1% 的结晶紫染色液,室温染色 30 min;将结晶紫染色液吸出,使用无菌 PBS 洗孔 3 遍,自然晾干后每孔加入 200 μ L 甲醇溶液,室温溶解 20 min;使用酶标仪测定 OD₅₇₀,实验重复 3 次。

细菌运动性分析参考 HUO 等^[28]的方法:细菌在 LB 培养基中培养至对数期,将培养好的菌液原液 1 μ L 分别滴到半固体平板两侧,设多个平行对照,28 $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h;测量拍照使用直尺测量运动圈的直径,并用相机拍照记录,实验重复 3 次。

1.2.9 GadBCD 系统对细菌致病性的影响分析

细菌对牙鲈 FG 细胞的黏附和侵染实验参考 JIN 等^[29]的方法:野生株 TX01 和敲除株 Δ *gadP* 在 DMEM 培养基中培养至对数期,按 MOI=10:1 (细菌数量与细胞数量之比)的比例感染牙鲈 FG 细胞 1 h 和 2 h;感染完后细胞用 PBS 冲洗 3 次,再用 1% Triton X-100 裂解细胞;裂解液经系列梯度稀释后,涂布在含有 polyB 的 LB 平板上进行菌落计数。每组样品 3 个平行,实验重复 3 次。

细菌在 RAW264.7 细胞中的增殖按 XIE 等^[30]的方法:细菌在 DMEM 培养基中培养至对数期,按 MOI=10:1 (细菌数量与细胞数量之比)的比例与 RAW264.7 细胞孵育;2 h 后用 PBS 冲洗 3 次,用含有 200 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 继续培养 2 h 以杀灭胞外细菌,然后用含有 10 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基培养细胞 0、2、4 和 6 h;加 1% Triton X-100 裂解细胞,裂解液经系列梯度稀释后,涂布在含有 polyB 的 LB 平板上进行菌落计数。实验重复 3 次。

细菌在罗非鱼血清的存活率实验按 FANG 等^[31]的方法:细菌在 LB 培养基中培养至对数期,离心收集菌体,用无菌 PBS 清洗菌体 3 遍并稀释重悬至终浓度 1×10^5 CFU/mL;将稀释后的菌液各取 50 μ L,分别各自加入 50 μ L 血清或 50 μ L 无菌 PBS (对照组),设 3 个平行,吹打混匀,置于室温下孵育 1 h;涂布在含有 polyB 的 LB 平板上进行菌落计数。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 杀鱼爱德华氏菌 GadBCD 系统生物学信息分析

前期在对杀鱼爱德华氏菌抗酸性能研究中,鉴定了 1 个抗弱酸系统 CadBA。然而杀鱼爱德华氏菌抗强酸系统还完全未知。通过分析杀鱼爱德华氏菌基因组序列,我们发现了 1 个疑似谷氨酸脱羧系统,命名为 GadBCD。GadBCD 系统由 GadB、GadC、GadD、GadC2 和 GadC3 共 5 个蛋白组成。GadB (ETA_E2868) 开放阅读框 (ORF) 由 1 395 bp 组成,编码 464 个氨基酸,与大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶 GadB 具有 79% 的一致性,具有脱羧酶的保守结构域,三维结构呈六聚体 (图 1a)。GadC (ETA_E2867) 开放阅读框 (ORF) 由 1 581 bp 组成,编码 526 个氨基酸,与大肠杆菌的转运蛋白 GadC 具有 32% 的一致性,具有氨基酸通透酶保守结构域,三维结构呈单体 (图 1b)。GadD (ETA_E2866) 开放阅读框 (ORF) 由 936 bp 组成,编码 311 个氨基酸,与大肠杆菌的谷氨酰胺酶 YbaS 具有 84.57% 的一致性,具有谷氨酰胺酶的保守结构域,三维结构呈二聚体 (图 1c)。GadC2 (ETA_E2865) 开放阅读框 (ORF) 由 1 302 bp 组成,编码 433 个氨基酸,与大肠杆菌的转运蛋白 GadC 具有 71.79% 的一致性,具有氨基酸转运蛋白的保守结构域,三维结构呈单体 (图 1d)。GadC3 (ETA_E2864) 开放阅读框 (ORF) 由 648 bp 组成,编码 215 个氨基酸,与大肠杆菌的 MarC 家族蛋白具有 67.79% 的一致性,具有 MarC 家族保守结构域,为多次跨越质膜的未知功能蛋白质且三维结构呈单体 (图 1e)。

2.2 GadBCD 系统共转录验证

在许多细菌如大肠杆菌和单增李斯特菌中,*gadB* 和 *gadC* 在 1 个操纵子下进行共转录,以快速的应对胞内外强酸压力。在 *E. piscicida* 中,*gadC3* 和 *gadC2* 之间有 1 个 15 bp 的基因重叠区,*gadC2* 和 *gadD* 之间有 1 个 6 bp 的基因间隔区,*gadD* 和 *gadC* 之间有 1 个 76 bp 的基因间隔区,*gadC* 和 *gadB* 之间有 1 个 37 bp 的基因间隔区 (图 2a)。为了验证这些基因的共转录关系,分别在 *gadB* 3' 末端与 *gadC* 5' 末端、*gadC* 3' 末端与 *gadD* 5' 末端、*gadD* 3' 末端与 *gadC2* 5' 末端、*gadC2* 3'

末端与 *gadC3* 5'末端设计了4对引物,以细菌总RNA、cDNA和gDNA为模板进行了PCR反应。结果显示,在cDNA和gDNA为模板的反应体系中,4对引物均扩增出了目的条带,而在RNA中未扩增出任何条带(图2b)。这些结果表明 *gadB*、*gadC*、*gadD*、*gadC2*和*gadC3*在1个操纵子下进行共转录。此外,在*gadB*和ETAE_2869之间预测到启动子区P_{gad}(图2a)。

上述结果表明,杀鱼爱德华氏菌GadBCD系统由5个蛋白组成,且谷氨酸脱羧酶和谷氨酰胺酶连同3个转运蛋白组成同1个操纵子。与其他细菌谷氨酸脱羧系统相比,杀鱼爱德华氏菌GadBCD系统具有组成的独特性和新颖性。

2.3 GadBCD系统表达与酸性环境的关系

在酸性压力环境下细菌抗酸基因往往诱导表达。为探究GadBCD表达是否受外界环境的影响,将杀鱼爱德华氏菌在酸压力、氧化压力、宿主血清和高温等逆境条件下刺激1h,RT-qPCR分析刺激前后GadBCD表达水平。由于

GadBCD系统内各个基因是共转录关系,选择检测*gadB*的表达来替代GadBCD的表达水平。结果显示,相比于正常条件下,*gadB*表达在强酸和高温刺激下基本不变,而在过氧化氢和血清刺激时分别上调了7倍和5倍(图3a)。上述结果表明GadBCD系统在酸性条件下是组成型表达,而非诱导型表达。

2.4 GadBCD系统的敲除

框内基因缺失是研究基因功能的首选方法,考虑到GadBCD系统有5个基因组成,且全长有5962bp,全部基因的缺失难以获得。为此,我们缺失了GadBCD系统上游启动子209bp区域,获得的敲除株命名为 Δ *gadP*。为验证敲除后的效果,RT-qPCR比较了野生株和敲除株GadBCD系统表达的差异。结果显示,与野生株相比,敲除株 Δ *gadP*中*gadBCD*的表达下调约1200倍,而GadBCD系统邻近的上下游基因ETAE_2863和ETAE_2869的表达不变(图3b)。这些结果表明我们成功构建了GadBCD系统的敲除株。

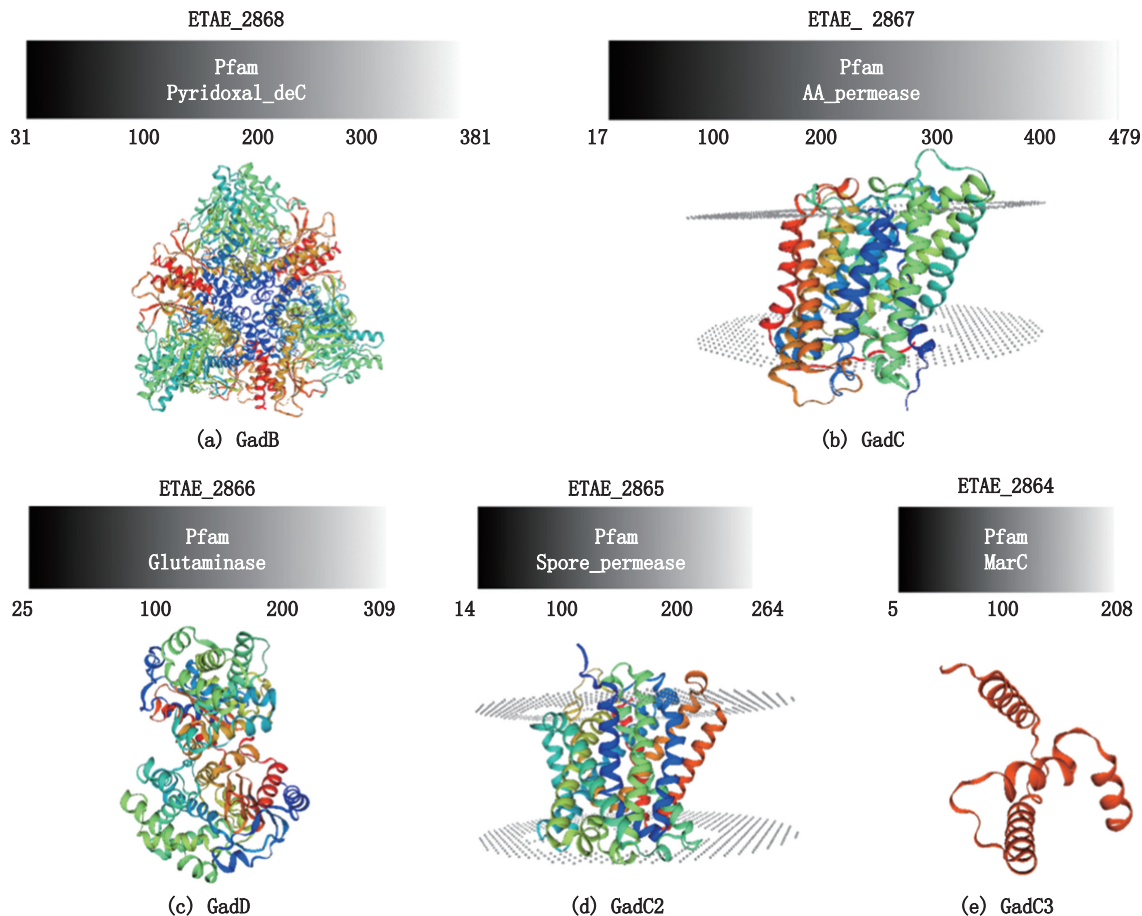
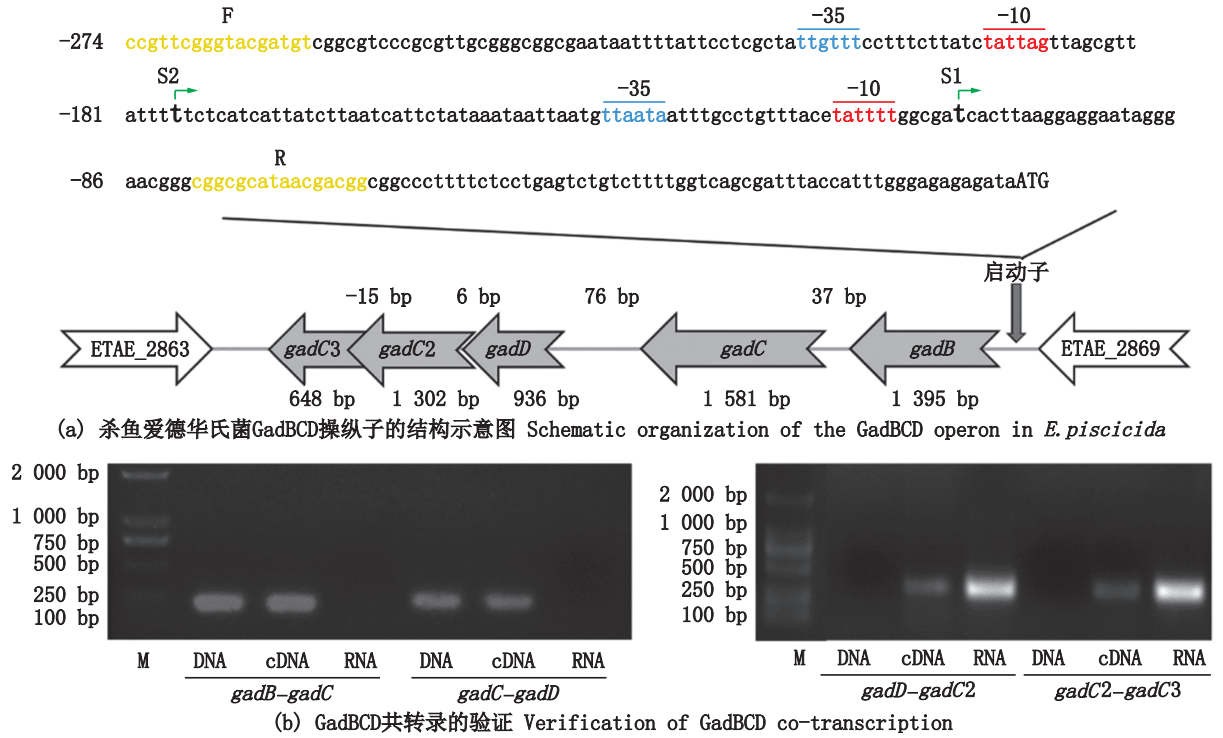


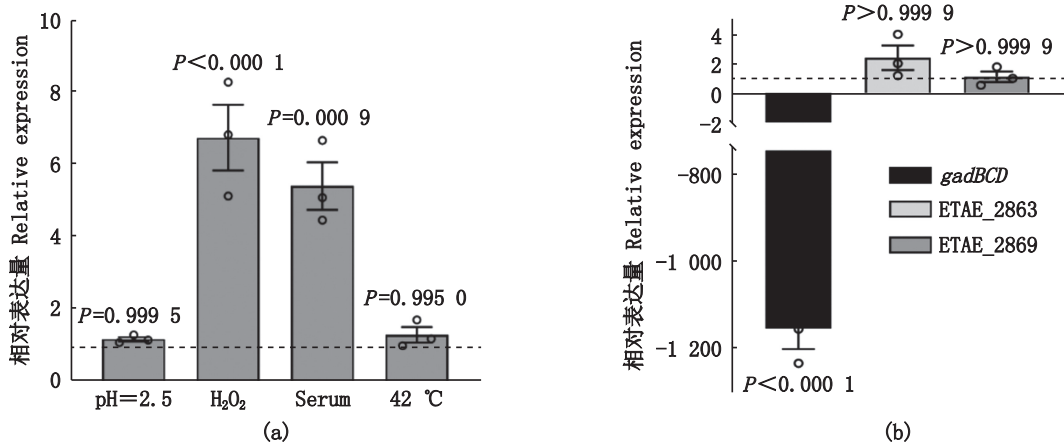
图1 杀鱼爱德华氏菌GadBCD系统5个组成的结构域分析与三维结构预测

Fig. 1 Structural domain analysis and tertiary structure prediction of *E. piscicida* GadBCD system



S1 和 S2 表示预测的 2 个转录起始位点, F 和 R 为引物。
S1 and S2 denote the predicted transcription start site, F and R are primers.

图 2 杀鱼爱德华氏菌 GadBCD 操纵子示意图和共转录验证
Fig. 2 Schematic organization and co-transcriptional verification of the GadBCD operon in *E. piscicida*



(a) 逆境条件下 *gadBCD* 的表达分析; 虚线代表 pH = 7 为对照组; (b) $\Delta gadP$ 中 *gadBCD*、ETAE_2863 和 ETAE_2869 的表达分析; 虚线代表野生株的表达为对照组。

(a) The *gadBCD* expression of TX01 under different adversity. Dashed line represents control (pH = 7); (b) The expression of *gadBCD*, ETAE_2863 and ETAE_2869 in $\Delta gadP$. Dashed line represents the expression of the wild strain as a control.

图 3 GadBCD 系统表达分析
Fig. 3 Expression of GadBCD system

2.5 GadBCD 系统与细菌抗中强酸的关系

为探明 GadBCD 系统是否在杀鱼爱德华氏菌抗酸过程中起作用, 我们将野生株 TX01 和敲除株 $\Delta gadP$ 在不同酸性环境下生长 ($4.2 < \text{pH} \leq 7.0$), 并检测细菌的生长状况。结果表明, 在中性 pH, 即 pH = 7.0 时, 野生株 TX01 和敲除株 $\Delta gadP$

的生长一致 (图 4a); 当生长环境的 pH 下降至 5.0 和 4.5 时, 敲除株的生长在对数期稍微滞后于野生株 (图 4b 和 4c); 当 pH 下降至 4.2 时, 敲除株 $\Delta gadP$ 无法生长, 而野生株依旧正常生长 (图 4d)。结果表明, GadBCD 系统的失活使杀鱼爱德华氏菌失去了在中强酸环境下的生长能力。

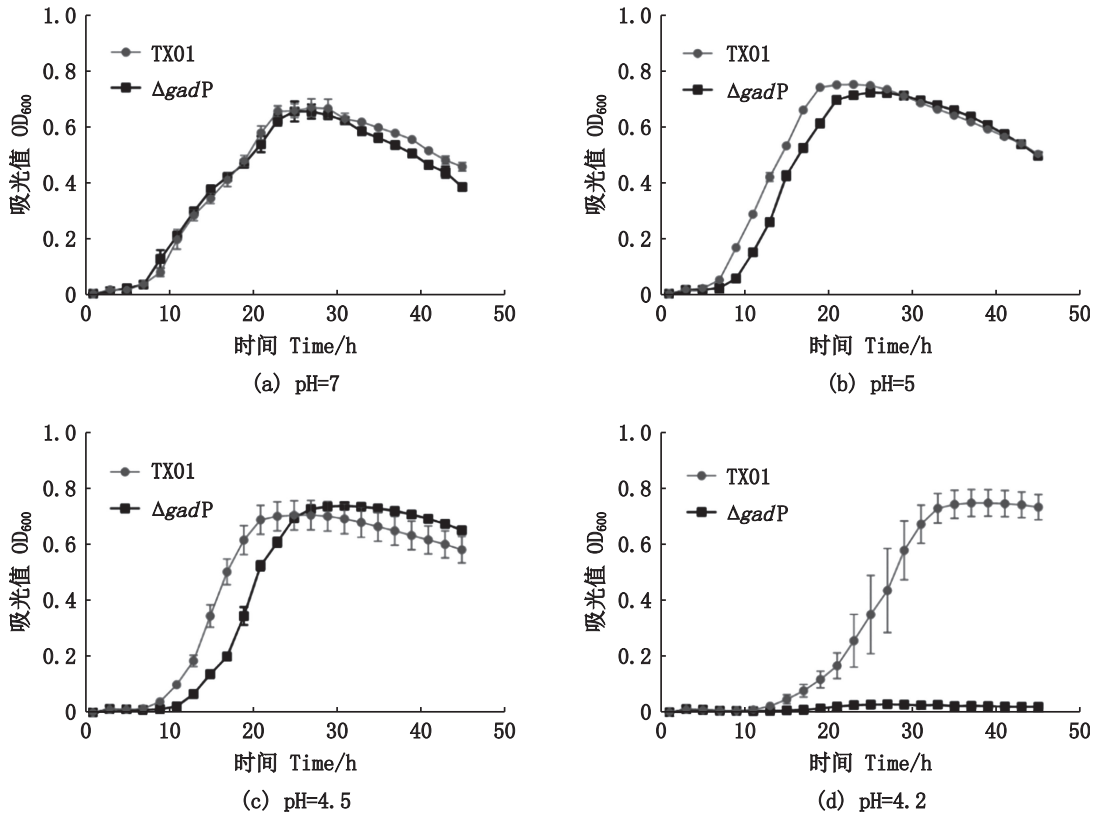


图4 杀鱼爱德华氏菌在不同条件下的生长状态
Fig. 4 Growth analysis of *E. piscicida* in different conditions

2.6 GadBCD系统与细菌抗强酸的关系

为明确GadBCD系统是否在杀鱼爱德华氏菌抗强酸过程中起作用,我们将对数期的野生株TX01和敲除株 $\Delta gadP$ 在强酸(pH=2.5)的环境中挑战2 h,然后检测存活的细菌。结果表明,野生株TX01的存活率为8.3%,而敲除株 $\Delta gadP$ 的存活率仅为0.5%,显著低于野生株(图5)。表明GadBCD系统的缺失显著削弱了杀鱼爱德华氏菌对强酸逆境的耐受。当外源添加1 mmol/L Glu,相比于未添加Glu的条件,野生株TX01存活率极显著上升(8.3%上升到77.2%),说明该菌可利用外源Glu来抵御强酸。而对于敲除株 $\Delta gadP$,添加与未添加Glu,存活率没有发生显著变化,维持在0.6%左右(图5),说明敲除株无法利用外源性Glu抵御强酸环境。上述结果表明杀鱼爱德华氏菌通过GadBCD系统介导的Glu利用来获得抵御强酸性能,GadBCD是杀鱼爱德华氏菌主要的抗强酸系统。

2.7 GadBCD系统对细菌生物膜形成和运动性的影响

在明确GadBCD系统与杀鱼爱德华氏菌耐酸

性能的关系后,我们继续探究该系统是否与细菌其他性能如生物膜形成和运动性相关。为此,利用结晶紫染色(CV)法检测了杀鱼爱德华氏菌生物膜的形成。结果显示,敲除株 $\Delta gadP$ 的生物膜形成能力明显强于野生株TX01(图6a)。这表明GadBCD系统的缺失增强了杀鱼爱德华氏菌的生物膜形成能力。

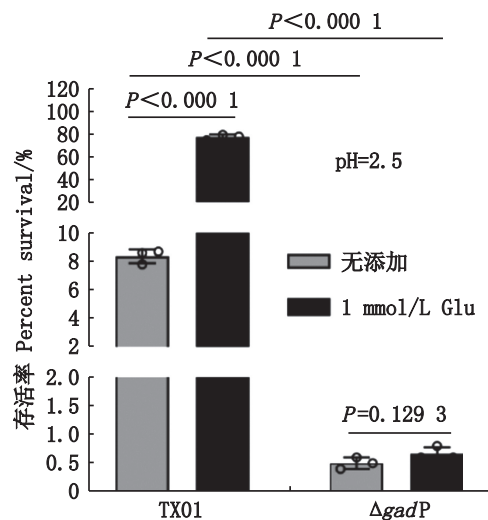


图5 酸性条件下的存活率
Fig. 5 Survival rate under acid condition

为检测 GadBCD 系统对运动性的影响,野生株 TX01 和敲除株 $\Delta gadP$ 穿刺接种到软琼脂运动性平板内,培养 18 h 后发现,敲除株 $\Delta gadP$ 的游动圈直径显著小于野生株 TX01(图 6b)。表明 GadBCD 系统的缺失削弱了杀鱼爱德华氏菌的运动性。

2.8 GadBCD 系统对细菌致病性的影响

既然 GadBCD 系统与细菌的抗酸性、生物膜形成和运动性等性能相关,推测其很可能参与

细菌的致病性。为明确 GadBCD 系统是否在杀鱼爱德华氏菌致病过程中起作用,我们将对数期的野生株 TX01 和敲除株 $\Delta gadP$ 分别感染 FG 细胞 1 h 和 2 h,然后检测黏附到细胞表面和侵入到细胞内的细菌。结果表明,在 2 个检测时间点,均发现敲除株 $\Delta gadP$ 的数量显著低于野生株 TX01(图 7a)。这表明 GadBCD 系统的缺失减弱了杀鱼爱德华氏菌的对宿主非吞噬细胞的黏附和侵入。

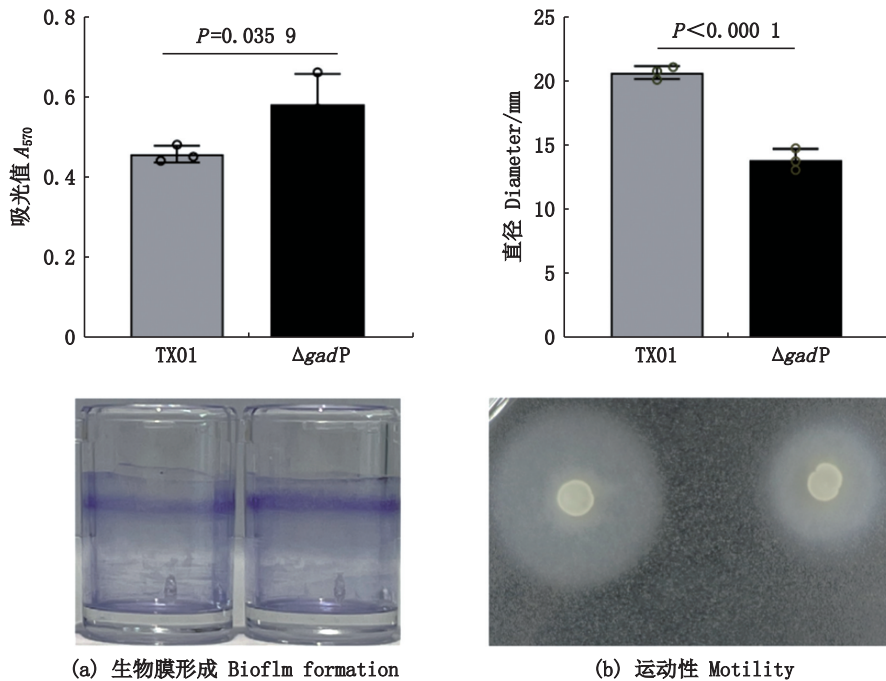


图 6 GadBCD 突变对生物膜形成和运动性的影响
Fig. 6 Effects of GadBCD mutations on biofilm formation and mutations on motility

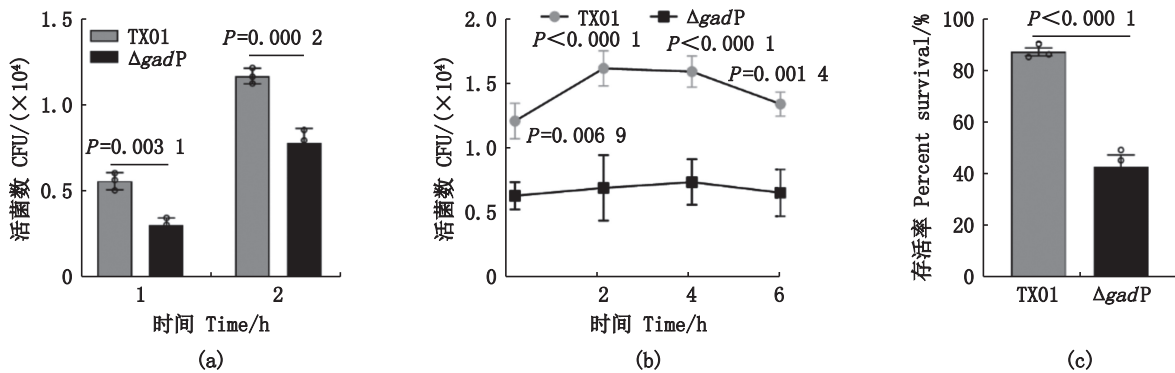


图 7 GadBCD 系统对杀鱼爱德华氏菌致病性影响
Fig. 7 Effects of GadBCD on pathogenicity of *Edwardsiella piscicida*

为检测 GadBCD 系统对细菌在宿主吞噬细胞内存活的影响,野生株和敲除株感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7,杀灭胞外细菌后检测胞内存活的细菌数。结果表明,在 4 个检测感染时间点,巨噬

细胞 RAW264.7,杀灭胞外细菌后检测胞内存活的细菌数。结果表明,在 4 个检测感染时间点,巨噬

细胞内存活的 $\Delta gadP$ 数量均明显少于野生株 TX01(图 7b)。这表明 GadBCD 系统的缺失大大减弱了杀鱼爱德华氏菌在吞噬细胞中的繁殖和存活能力。

杀鱼爱德华氏菌具有强的抗宿主血清杀菌能力,可通过血液引发系统性感染。为探究 GadBCD 系统与细菌抗宿主血清杀菌能力的关系,野生株和敲除株与罗非鱼血清孵育 1 h 后检测存活细菌的数量。结果表明,敲除株 $\Delta gadP$ 在宿主血清中的存活率仅为 40%,显著低于野生株 80% 的存活率(图 7c)。这表明 GadBCD 系统的缺失降低了杀鱼爱德华氏菌对在宿主血清中的存活能力。

3 讨论

对于许多动物病原菌来说,对中强酸和强酸的耐受能力决定其能否在宿主胃酸和吞噬细胞等酸性环境中存活,因而耐酸性是病原菌致病的一个重要性能。谷氨酸脱羧酶系统往往是众多致病菌最重要的抗强酸系统。大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶系统,由谷氨酸脱羧酶 GadA 和 GadB 以及转运蛋白 GadC 组成,且 GadB 和 GadC 处在 1 个操纵子上;研究^[32]发现 *gadA*、*gadB* 和 *gadC* 的缺失都大大降低细菌在强酸下的存活率,这表明该系统是大肠杆菌重要的抗强酸系统。BERGHOLZ 等^[33]发现虽然 *gadA* 和 *gadB* 序列同源性高达 97%,但两者在染色体上间隔较远,以不同的机制发挥抗强酸作用。与大肠杆菌不同的是,单增李斯特菌具有 3 个谷氨酸脱羧酶系统,分别是在弱酸条件下发挥抗酸应激作用的 GadD1/GadT1 和在强酸性条件下发挥作用的 GadT2/GadD2 和 GadT3/GadD3^[34]。弗氏志贺菌的谷氨酸脱羧酶系统由谷氨酸脱羧酶 GadA 和 GadB 以及转运蛋白 GadC 组成,研究证明弗氏志贺菌 *gadB* 突变体失去了抗强酸杀灭能力,通过与野生型 *gadB* 基因互补可以恢复抗酸能力^[35]。

杀鱼爱德华氏菌是水产重要致病菌,其致病机制的研究近年来取得积极进展,一些重要的毒力因子和新型的毒力因子相继被鉴定和阐释^[36],但该菌的抗强酸系统还未知。经序列与结构分析,我们发现杀鱼爱德华氏菌的谷氨酸脱羧酶系统由 GadB、GadC、GadD、GadC2 和 GadC3 共 5 个蛋白组成,命名为 GadBCD 系统。该系统 5 个蛋

白的编码基因组成 1 个操纵子,不仅有谷氨酸脱羧酶(GadB),还包括了谷氨酰胺酶(GadD);其中谷氨酰胺酶可以消耗谷氨酰胺产生 NH_3 和谷氨酸, NH_3 和 H^+ 反应生成 NH_4^+ 达到消耗 H^+ 的目的,谷氨酸脱羧过程又进一步消耗 H^+ 。因此, GadBCD 系统可同时利用 GadB 和 GadD 快速高效地消耗 H^+ 。与其他细菌相比,杀鱼爱德华氏菌谷氨酸脱羧酶系统组成具有独特性。

杀鱼爱德华氏菌 GadBCD 系统的独特性产生了 3 种效应:(1)具有抗中强酸作用。本研究结果表明, GadBCD 系统的敲除致使杀鱼爱德华氏菌在中强酸($\text{pH}=4.2$)条件下无法正常生长,而野生株可正常生长。(2)具有抗强酸作用。 GadBCD 系统缺失导致杀鱼爱德华氏菌在强酸刺激 2 h 后的存活率从 8.3% 锐降至 0.5%。(3)比其他细菌如大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶系统具有更高效的抗酸功能。本研究结果表明杀鱼爱德华氏菌在 $\text{pH} = 2.5$ 酸性环境下刺激 2 h 的存活率(8.3%)大大高于同等条件下大肠杆菌的存活率(0.2%)^[37];且外源添加 Glu 后,杀鱼爱德华氏菌增加至 78%,显著高于大肠杆菌的存活率(30%)^[37]。基于上述结果,我们认为杀鱼爱德华氏菌 GadBCD 系统是 1 个新型的谷氨酸脱羧酶系统,既具有组成上的独特性,又具有抗酸性能的高效性。

细菌的耐酸性与生物膜形成密切相关。生物膜是一种嵌入在胞外聚合物的自生成基质中的微生物聚集集体,微生物通过生物膜黏附或附着在材料表面^[38]。据报道,生物膜可增强细菌对酸胁迫的耐受性^[39],例如,生物膜的形成显著增加了临床链球菌戈登链球菌(*Streptococcus gordonii*)和口腔链球菌(*S. oralis*)的耐酸性^[40]。在本研究中,杀鱼爱德华氏菌抗酸系统 GadBCD 反而与生物膜形成负相关,其中的机制有待于今后进一步探究。细菌生物膜通常与运动性密切相关,例如,SHI 等^[41]发现生物膜形成因子 HutZ 参与了杀鱼爱德华氏菌的运动调节,CHEN 等^[42]发现 ToxR 蛋白是调节副溶血弧菌生物膜形成和运动所必需的蛋白。然而,细菌耐酸性与运动性的关系研究不多。我们之前的研究表明,杀鱼爱德华氏菌抗弱酸系统 CadBA 可促进细菌的运动性^[25],但未见有谷氨酸脱羧酶系统与运动性关系的研究报道。本研究中我们发现谷氨酸脱羧酶

系统 GadBCD 参与了杀鱼爱德华氏菌运动性。

细菌的生物膜形成和运动性等生理性能与细菌的致病性密切相关,且耐酸性也是一些肠道病原菌致病的重要因素,因此我们分析了 GadBCD 系统与细菌致病性的关系。发现 GadBCD 系统的缺失减弱了杀鱼爱德华氏菌的对宿主非吞噬细胞的黏附和侵入、减弱了细菌在宿主吞噬细胞的繁殖和存活能力、降低了细菌抵御宿主血清杀伤的能力,这充分说明 GadBCD 系统与杀鱼爱德华氏菌毒力密切相关。相似地,大肠杆菌谷氨酸脱羧酶系统也有细菌致病性,SHIN 等^[43]发现大肠杆菌谷氨酸脱羧酶的激活因子 GadX 可以调控毒力基因的表达。在单增李斯特菌中同样发现谷氨酸脱羧酶系统在毒力中起着重要作用,缺乏谷氨酸脱羧酶系统的敲除株表现出耐酸性降低,并且在口服接种后引起感染的能力受到显著下降^[44]。

综上所述,本研究首次在杀鱼爱德华氏菌中鉴定了 1 个新型的谷氨酸脱羧酶系统 GadBCD。GadBCD 系统包括了谷氨酸脱羧酶、谷氨酰胺酶以及 3 个转运体,5 个蛋白编码基因组成 1 个操纵子。该系统不仅是杀鱼爱德华氏菌耐中强酸和强酸所必需的,而且还与细菌生物膜形成和运动性相关,同时也是细菌感染宿主细胞的重要参与者,因而是杀鱼爱德华氏菌 1 个重要的毒力因子。本研究为了解杀鱼爱德华氏菌的耐酸机制与致病机制提供了新的思路。

参考文献:

- [1] ABAYNEH T, COLQUHOUN D J, SØRUM H. Multi-locus Sequence Analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 158(3/4): 367-375.
- [2] SUN Y C, LI Y, LUO Q, et al. LuxS/AI-2 quorum sensing system in *Edwardsiella piscicida* promotes biofilm formation and pathogenicity[J]. *Infection and Immunity*, 2020, 88(5): e00907-19.
- [3] YAN M C, LIU J Y, LI Y, et al. Different concentrations of *Edwardsiella tarda* ghost vaccine induces immune responses *in vivo* and protects *Sparus macrocephalus* against a homologous challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 467-472.
- [4] PARK S B, AOKI T, JUNG T S. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish[J]. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 67.
- [5] TAN Y P, LIN Q, WANG X H, et al. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of *Edwardsiella tarda*[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(11): 6475-6480.
- [6] SAKAI T, KANAI K, OSATOMI K, et al. Identification of a 19.3-kDa protein in MRHA-positive *Edwardsiella tarda*: putative fimbrial major subunit[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 226(1): 127-133.
- [7] WANG X, WANG Q Y, XIAO J F, et al. Hemolysin EthA in *Edwardsiella tarda* is essential for fish invasion *in vivo* and *in vitro* and regulated by two-component system EsrA-EsrB and nucleoid protein Hha_{Et}[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(6): 1082-1091.
- [8] OKUDA J, KIRIYAMA M, YAMANOI E, et al. The type III secretion system-dependent repression of NF- κ B activation to the intracellular growth of *Edwardsiella tarda* in human epithelial cells[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 283(1): 9-14.
- [9] LUND P, TRAMONTI A, DE BIASE D. Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(6): 1091-1125.
- [10] BRAMEYER S, HOYER E, BIBINGER S, et al. Molecular design of a signaling system influences noise in protein abundance under acid stress in different γ -Proteobacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(16): e00121-20.
- [11] XU Y, ZHAO Z, TONG W H, et al. An acid-tolerance response system protecting exponentially growing *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1496.
- [12] KRAMMER E M, PRÉVOST M. Function and regulation of acid resistance antiporters[J]. *The Journal of Membrane Biology*, 2019, 252(4/5): 465-481.
- [13] MA X Y, ZHANG S B, XU Z J, et al. SdiA improves the acid tolerance of *E. coli* by regulating GadW and GadY expression[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1078.
- [14] PEI X D, LU L H, YUE S Y, et al. Characterization of a novel *Shewanella algae* arginine decarboxylase expressed in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Biotechnology*, 2022, 64(1): 57-65.
- [15] JESSOP M, LIESCHE C, FELIX J, et al. Supramolecular assembly of the *Escherichia coli* LdcI upon acid stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(2): e2014383118.
- [16] KASHIWAGI K, SHIBUYA S, TOMITORI H, et al. Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(10): 6318-6323.
- [17] WATERMAN S R, SMALL P L C. The glutamate-dependent acid resistance system of *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* is inhibited *in vitro* by L-trans-pyrrolidine-

- 2, 4-dicarboxylic acid [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 224(1): 119-125.
- [18] ALONSO-HERNANDO A, ALONSO-CALLEJA C, CAPITA R. Comparative analysis of acid resistance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains before and after exposure to poultry decontaminants. Role of the glutamate decarboxylase (GAD) system [J]. Food Microbiology, 2009, 26(8): 905-909.
- [19] DAMIANO M A, BASTIANELLI D, AL DAHOUK S, et al. Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Brucella* spp.: distribution and contribution to fitness under extremely acidic conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(2): 578-586.
- [20] CHATTOPADHYAY M K, TABOR H. Polyamines are critical for the induction of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(47): 33559-33570.
- [21] COTTER P D, O'REILLY K, HILL C. Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods [J]. Journal of Food Protection, 2001, 64(9): 1362-1368.
- [22] SMITH J L, LIU Y H, PAOLI G C. How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2013, 59(3): 141-152.
- [23] DE BIASE D, PENNACCHIETTI E. Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the *gadBC* operon [J]. Molecular Microbiology, 2012, 86(4): 770-786.
- [24] MA D, LU P L, SHI Y G. Substrate selectivity of the acid-activated glutamate/ γ -aminobutyric acid (GABA) antiporter GadC from *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(21): 15148-15153.
- [25] DU C M, HUO X P, GU H J, et al. Acid resistance system CadBA is implicated in acid tolerance and biofilm formation and is identified as a new virulence factor of *Edwardsiella tarda* [J]. Veterinary Research, 2021, 52(1): 117.
- [26] ZHANG M, JIAO X D, HU Y H, et al. Attenuation of *Edwardsiella tarda* virulence by small peptides that interfere with LuxS/Autoinducer type 2 quorum sensing [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(12): 3882-3890.
- [27] MA D M, GU H J, SHI Y J, et al. *Edwardsiella piscicida* YefM-YoeB: a type II toxin-antitoxin system that is related to antibiotic resistance, biofilm formation, serum survival, and host infection [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 646299.
- [28] HUO X P, DU C M, HUANG H Q, et al. TCS response regulator OmpR plays a major role in stress resistance, antibiotic resistance, motility, and virulence in *Edwardsiella piscicida* [J]. Aquaculture, 2022, 559: 738441.
- [29] JIN M R, HE J J, LI J, et al. *Edwardsiella piscicida* YccA: a novel virulence factor essential to membrane integrity, mobility, host infection, and host immune response [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 126: 318-326.
- [30] XIE J H, ZHAO Q Y, HUANG H Q, et al. *Edwardsiella piscicida* HigB: a type II toxin that is essential to oxidative resistance, biofilm formation, serum survival, intracellular propagation, and host infection [J]. Aquaculture, 2021, 535: 736382.
- [31] FANG Q J, HAN Y X, SHI Y J, et al. Universal stress proteins contribute *Edwardsiella piscicida* adversity resistance and pathogenicity and promote blocking host immune response [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 95: 248-258.
- [32] MATES A K, SAYED A K, FOSTER J W. Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(7): 2759-2768.
- [33] BERGHOLZ T M, TARR C L, CHRISTENSEN L M, et al. Recent gene conversions between duplicated glutamate decarboxylase genes (*gadA* and *gadB*) in pathogenic *Escherichia coli* [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(10): 2323-2333.
- [34] COTTER P D, GAHAN C G M, HILL C. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid [J]. Molecular Microbiology, 2001, 40(2): 465-475.
- [35] WATERMAN S R, SMALL P L C. Identification of the promoter regions and σ^s -dependent regulation of the *gadA* and *gadBC* genes associated with glutamate-dependent acid resistance in *Shigella flexneri* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 225(1): 155-160.
- [36] LEUNG K Y, WANG Q Y, YANG Z Y, et al. *Edwardsiella piscicida*: a versatile emerging pathogen of fish [J]. Virulence, 2019, 10(1): 555-567.
- [37] LU P L, MA D, CHEN Y L, et al. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia [J]. Cell Research, 2013, 23(5): 635-644.
- [38] HU W B, FENG S S, TONG Y J, et al. Adaptive defensive mechanism of bioleaching microorganisms under extremely environmental acid stress: advances and perspectives [J]. Biotechnology Advances, 2020, 42: 107580.
- [39] EDWARDS S J, KJELLERUP B V. Applications of

- biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23): 9909-9921.
- [40] BOISEN G, DAVIES J R, NEILANDS J. Acid tolerance in early colonizers of oral biofilms [J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 45.
- [41] SHI Y J, FANG Q J, HUANG H Q, et al. HutZ is required for biofilm formation and contributes to the pathogenicity of *Edwardsiella piscicida* [J]. *Veterinary Research*, 2019, 50(1): 76.
- [42] CHEN L, QIU Y, TANG H, et al. ToxR is required for biofilm formation and motility of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2018, 31(11): 848-850.
- [43] SHIN S, CASTANIE-CORNET M P, FOSTER J W, et al. An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per [J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 41(5): 1133-1150.
- [44] FEEHILY C, FINNERTY A, CASEY P G, et al. Divergent evolution of the activity and regulation of the glutamate decarboxylase systems in *Listeria monocytogenes* EGD-e and 10403S: roles in virulence and acid tolerance [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112649.

Acidity resistance and pathogenicity of GadBCD system in *Edwardsiella piscicida*

GAO Bo^{1,2}, GONG Chunguang¹, SHU Aimei^{1,2}, ZHANG Shanshan^{1,2}, LI Jinglin^{1,2}, HU Yonghua^{2,3}

(1. Ocean College of Hebei Agricultural University, Qinhuangdao 066000, Hebei, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS & Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province, Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources, Haikou 571101, Hainan, China; 3. Hainan Provincial Key Laboratory for Functional Components Research and Utilization of Marine Bio-resources, Haikou 571101, Hainan, China)

Abstract: In this study, we identified the important fish pathogenic bacterium, *Edwardsiella piscicida*, GadBCD, the strong acid resistance system and its function. Sequence analysis and co-transcription experiments showed that the GadBCD system consists of one glutamic acid decarboxylase, one glutaminase and three transporters, which form a manipulator. qRT-PCR revealed that *gadBCD* expression was largely unchanged upon strong acid and high temperature stimulation of bacteria, but significantly up-regulated upon hydrogen peroxide and host serum stimulation. A GadBCD system deletion mutant strain Δ *gadP* was constructed using homologous recombination, and experiments comparing the growth curve and survival rate under acidic stress of wild strain and Δ *gadP* revealed that the GadBCD system is not only an important player in the resistance of *E. piscicida* to medium to strong acids, but is also required for resistance to strong acids. GadBCD was found to be involved in bacterial virulence by comparing wild strain and Δ *gadP* in terms of biofilm formation, motility, resistance to host serum killing, and infection of cells. In conclusion, the GadBCD system is an important strong acid resistant system of *E. piscicida* and is involved in bacterial pathogenesis.

Key words: *Edwardsiella piscicida*; Glutamic acid decarboxylase system; acid resistance; pathogenicity