



## 脂多糖对细菌生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫变态的影响

吴静娴<sup>1,2</sup>, 李嘉政<sup>1,2</sup>, 胡晓梦<sup>1,2</sup>, 丁文扬<sup>1,2</sup>, 杨金龙<sup>1,2,3</sup>, 梁箫<sup>1,2\*</sup>

(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. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广东广州 511458)

**摘要:** 为探究脂多糖 (LPS) 对海洋细菌生物被膜形成、海洋贝类幼虫变态所产生的作用, 深入了解影响厚壳贻贝附着变态的因素, 本实验使用不同浓度的 LPS 直接刺激厚壳贻贝幼虫, 观察其对幼虫附着变态的直接作用; 同时在海假交替单胞菌形成生物被膜的过程中添加不同浓度的 LPS, 分析生物被膜生物学特性的变化, 及变化后的生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响。结果显示, 3 种浓度的 LPS 均可直接诱导厚壳贻贝幼虫的变态; 10.0 mg/L 浓度 LPS 处理后的生物被膜其细菌密度、膜厚度明显降低, 且膜厚度降低了 12.1%, 胞外产物中多糖、脂类显著增加, 其中代表性多糖可拉酸的含量增加了 35.4%, 同时其对幼虫变态的诱导作用也提高了 53.3%。因而, 在厚壳贻贝幼虫的附着变态过程中, LPS 具有直接诱导作用, 同时还可以通过调控生物被膜胞外物质, 特别是可拉酸的生成, 间接影响厚壳贻贝幼虫的附着变态。本研究成果对海洋细菌互作关系研究、厚壳贻贝养殖产业的改善以及海洋防污技术研发具有重要推动价值。

**关键词:** 厚壳贻贝; 脂多糖; 海洋细菌; 生物被膜; 变态

**中图分类号:** S 968.3

**文献标志码:** A

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*), 作为我国东海重要的海产经济贝类, 营养价值较高且能够适应多变的环境<sup>[1-3]</sup>。近年来, 随着贻贝养殖产业的不断发展, 其经济效益、社会效益、生态效益均显著提高, 同时也出现了苗种供应不稳定、苗种质量不可控、成活率低等问题, 对贻贝养殖产业的可持续发展造成了一定的影响<sup>[4]</sup>。而厚壳贻贝生长发育过程中由浮游生活向附着生活转变的“附着变态”过程<sup>[5]</sup>则是解决上述问题的关键。研究证明, 许多海洋无脊椎动物的附着变态受到海洋细菌的影响, 例如海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas marina*) 可通过形成生物被膜进而对厚壳贻贝幼虫的附着变态过程起到调节作用<sup>[5]</sup>。

细菌生物被膜几乎存在于海洋环境中的所有基质表面, 其结构依赖于细菌胞外物质的维持, 其中多糖是生物被膜胞外物质的重要组成部分之一。有研究发现, 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 可以产生脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 等多种胞外多糖, 它们都与生物被膜的形成相关<sup>[6]</sup>。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的研究中发现, LPS 缺失菌形成生物被膜的能力增强<sup>[7]</sup>。除此之外, 外源添加去酰化 LPS 可以抑制革兰氏阴性菌生物被膜的形成<sup>[8]</sup>。然而, 在海假交替单胞菌生物被膜形成过程中添加脂多糖是否影响生物被膜的形成, 对厚壳贻贝幼虫的附着变态是否有影响, 目前尚未见报道。

收稿日期: 2021-02-16 修回日期: 2021-05-14

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

第一作者: 吴静娴, 从事海洋贝类分子生物学领域的研究, E-mail: m180100019@st.shou.edu.cn

通信作者: 梁箫 (照片), 从事海洋贝类分子生物学研究, E-mail: x-liang@shou.edu.cn



本研究中, 研究对象选择了对厚壳贻贝附着具有诱导活性的海假交替单胞菌属<sup>[1,5,9-10]</sup>, 以往实验证明, 假交替单胞菌能诱导多毛类管虫<sup>[11]</sup>的幼虫附着, 而海假交替单胞菌生物被膜的表面结合物与生物被膜诱导相似的附着行为, 可诱导厚壳贻贝幼虫的变态, 当采用抗生素、甲醛水溶液、乙醇等方法处理海假交替单胞菌后再进行诱导实验, 幼虫的附着变态率显著降低<sup>[12]</sup>。此外, 添加海假交替单胞菌中提取的鞭毛蛋白可增加对厚壳贻贝幼虫附着变态的诱导活性<sup>[13]</sup>。本研究通过探究其膜厚、细菌密度和胞外物质等生物学特性, 分析了 LPS 对生物被膜形成的影响, 此外, 检测了该生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响。旨在通过以上实验了解脂多糖、生物被膜和厚壳贻贝附着变态三者之间的关系, 为贻贝增殖产业的发展, 以及贻贝与海洋细菌互作关系的深入研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与生物被膜的制备

实验所用细菌为海假交替单胞菌, 参照 Yang 等<sup>[1]</sup>的方法, 取-80 °C 保存的海假交替单胞菌划线于 ZoBell 2216E 平板上, 25 °C 下培养 12 h, 挑取单菌落接种于 80 mL 液体培养基, 避光环境于 200 r/min 摇床中培养 24 h, 离心 15 min, 去除培养液, 用灭菌处理的海水 (autoclaved filtered seawater, AFSW) 清洗 3 次后定容至 50 mL, 均匀混合为细菌悬浮液, 取 10  $\mu$ L 稀释 100 倍后, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜 (Whatman) 过滤 1 mL 菌液, 将生物被膜用 0.1% 吡啶橙溶液染色 5 min, 用 Olympus BX51 显微镜以 1 000 $\times$ 放大倍数计算细菌密度 (个/cm<sup>2</sup>)。每个生物被膜随机选择 10 个视野, 重复测定 3 次<sup>[14]</sup>。

### 1.2 脂多糖处理

将脂多糖和 AFSW 相溶, 调节 pH=7.6 作为母液, 将母液加入无菌培养皿 (直径为 64 mm $\times$ 19 mm) 中, 并加入 AFSW 定容至 20 mL, 使脂多糖终浓度为 0 (对照)、0.1、1.0、10.0 mg/L, 每个浓度设置 9 个平行, 18 °C 下避光培养 48 h 形成生物被膜。每个浓度取 9 个无菌培养皿, 每个培养皿中添加 20 只眼点幼虫, 18 °C 环境中避光培养 96 h。记录 12、24、48、96 h 的幼虫附着变态数, 并计算幼虫附着变态率。本实验商品化脂多糖来源于提纯的大肠杆菌 O55:B5, 购于 Sigma 公司。

### 1.3 脂多糖与海假交替单胞菌共同形成生物被膜

将适量的菌液和脂多糖的混合物加入装有无菌载玻片的无菌培养皿中, 加入适量的 AFSW 定容至 20 mL, 并使细菌的初始浓度为  $5.0 \times 10^8$  个/mL, 脂多糖最终浓度为 0 (对照) 和 10 mg/L, 每组设置 9 个生物学重复, 避光 18 °C 条件下培养 48 h, 以制备生物被膜。

### 1.4 厚壳贻贝幼虫附着变态实验

实验幼虫为育苗后 35 d 左右, 取自浙江省舟山市嵊泗县 (30°69'N、122°46'E), 均为眼点期厚壳贻贝幼虫, 镜检眼点幼虫率 100%。取回后需适应 1 周方可进行实验, 幼虫培养于 18 °C 避光环境下、盐度为 30 的自然海水中, 密度为 10<sup>4</sup> 个/L, 每日投饵 1 次, 投喂湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) ( $1 \times 10^4$  个/mL), 每隔 2 d 换水 1 次。

将生物被膜转移至 20 mL AFSW 无菌培养皿中, 每个浓度 9 个培养皿, 向每个培养皿中添加 20 只眼点幼虫, 避光 21 °C 条件下记录 12、24、48 和 96 h 幼虫附着变态率。该实验以空白 (blank, 无菌玻片) 为对照组, 以肾上腺素 (epinephrine, EPI)、自然生物被膜 (BF) 为实验组 (生物被膜), 每组设置 9 个生物学重复<sup>[15]</sup>。

### 1.5 生物被膜细菌密度的计数

参考杨金龙等<sup>[14]</sup>的方法对细菌密度值进行记录, 用 5% 的甲醛水溶液固定生物被膜 48 h 后, 将生物被膜用 0.1% 吡啶橙溶液染色 5 min。在 1 000 $\times$ 放大倍数下用 Olympus BX51 显微镜观察并计算细菌密度 (个/cm<sup>2</sup>)。每个生物被膜随机选择 10 个视野, 重复测定 3 次。

### 1.6 生物被膜膜厚度分析

参照 Yang 等<sup>[1]</sup>方法分析膜厚度, 将生物被膜固定在 5% 的甲醛溶液中 24 h, 避光条件下 5  $\mu$ g/mL 碘化丙啶 (PI) 浸染处理 20 min, 之后通过 1 $\times$ PBS 进行多次清洗。借助激光共聚焦显微镜 (CLSM, Leica TCS SP8, 德国) 展开详细观察, 针对每组设置 3 个生物学, 并自由挑选出 10 个视野进行成像分析, 以确定生物被膜膜厚度。

### 1.7 共聚焦激光扫描显微镜图像分析

按照 Peng 等<sup>[5]</sup>和 González 等<sup>[16]</sup>的方法对生物被膜进行染色, 表 1 中列出了使用的荧光染料。将染色溶液添加到海假交替单胞菌的生物被膜上无光染色 20 min。将染色的生物被膜通过 0.9% 的

盐水洗涤,用 CLSM 拍摄。CLSM 图像是通过 LAS X 版本(徕卡,德国)仪器以 1 024×1 024 像素,厚度为 0.20 μm 模式进行采集。使用 Image J 软件

计算阈值(美国国立卫生研究院),阈值转换为生物量(μm<sup>3</sup>)。每个生物被膜随机选择 3 个视野,每种染料进行 3 个生物学重复。

表 1 本研究中使用的荧光染料

Tab. 1 The fluorescent dyes used in this study

荧光染料 fluorescent dye	结合物质 binding target	Ex/Em 波长/nm Ex/Em wavelength	储备溶液 stock solution	工作液/(μg/mL) working solution
CFW	β-多糖	254/432	189 μL/mL	189
ConA-TMR	α-多糖	552/578	将 10 mg 溶于含 168 mg NaHCO <sub>3</sub> 的 2 mL 蒸馏水中	944.8
DiD'oil	脂质	648/670	将 25 mg 溶于 25 mL 无水乙醇	79.4
FITC	蛋白质	495/519	将 2 mg 溶于 100 μL 无水乙醇	46.6

## 1.8 生物被膜可拉酸染色

参照 Yang 等<sup>[1]</sup>方法制备生物被膜。从载玻片刮下生物被膜,涂布于玻璃片,风干后染色。可拉酸染色参考 Peng 等<sup>[5]</sup>和 Ren 等<sup>[17]</sup>的方法,将碱性品红、苯酚和乙醇混合制成品红溶液,将玻璃片染色 3 min,再用媒染剂溶液染色 3 min;用 1% 亚甲基蓝溶液染色 30 s。每次染色前需用蒸馏水冲洗,以去除上一种染色液。细菌细胞染成红色,可拉酸染成蓝色。每组设置 3 个生物学重复。

## 1.9 可拉酸的测定

参考 Obadia 等<sup>[18]</sup>方法定量可拉酸。每个样品需从 12 个生物被膜中收集细菌细胞,并将其悬浮于 1 mL 蒸馏水中。通过煮沸、离心收集上清液定量可拉酸。加入 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O 溶液(6:1,体积比)于 1 mL 上清液中制成混合液,100 °C 下反应后,于 25 °C 将 2 mL 混合液用于检测 396 nm ( $A_{396}$  co) 和 427 nm ( $A_{427}$  co)。将半胱氨酸盐酸溶液与剩余混合液在 25 °C 下避光孵育 1 h 后,在 396 nm ( $A_{396}$  cy) 和 427 nm ( $A_{427}$  cy) 下测吸光度并代入 L-岩藻糖浓度标准曲线(10~100 μg/mL)中计算可拉酸浓度。

## 1.10 数据统计分析

将测定的厚壳贻贝稚贝附着的百分比进行反正弦变换,并通过 Shapiro-Wilk 的  $W$  值检验数据的正态性。使用 Steel-Dwass 的 Kruskal-Wallis 来确定显著差异,通过 Spearman's 进行相关性分析。用 JMP<sup>TM</sup> 软件(版本 10.0)进行数据处理。

## 2 结果

### 2.1 脂多糖对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

在海假交替单胞菌中分别添加 0.1 和 1.0 mg/L 的脂多糖共同形成的生物被膜,其诱导厚壳

贻贝幼虫附着变态率与细菌生物被膜相比无显著变化( $P>0.05$ );当脂多糖的浓度增至 10.0 mg/L 时所形成的生物被膜对幼虫附着变态的诱导活性上升 53.3% ( $P<0.05$ ),且高于细菌生物被膜活性(图 1)。结果表明,脂多糖可诱导厚壳贻贝幼虫附着变态,且变态率不随脂多糖浓度增加而提高。

### 2.2 脂多糖对生物被膜形成能力的影响

在海假交替单胞菌中添加 10.0 mg/L 脂多糖,共同培养生物被膜结果显示,单一细菌培养的生物被膜和与脂多糖共同培养的生物被膜中,加入 10.0 mg/L 脂多糖后,形成的生物被膜较海假交替单胞菌单独形成的生物被膜的细菌密度下降,且 2 种生

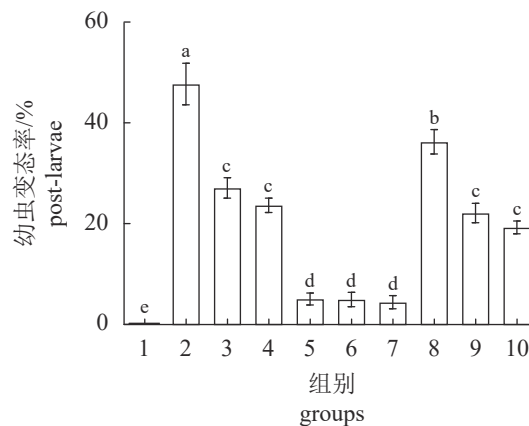


图 1 LPS 处理后的海假交替单胞菌生物被膜对厚壳贻贝幼虫变态的影响(48 h)

1. 空白对照, 2. 肾上腺素, 3. 自然微生物被膜, 4. 细菌, 5. 10.0 mg/L LPS, 6. 1.0 mg/L LPS, 7. 0.1 mg/L LPS, 8. 细菌 + 10.0 mg/L LPS, 9. 细菌 + 1.0 mg/L LPS, 10. 细菌 + 0.1 mg/L LPS

Fig. 1 Percentages of post-larvae on the *P. marina* biofilms after treatment with LPS (48 h)

1. blank, 2. EPI, 3. BF, 4. *P. marina*, 5. 10.0 mg/L LPS, 6. 1.0 mg/L LPS, 7. 0.1 mg/L LPS, 8. *P. marina* + 10.0 mg/L LPS, 9. *P. marina* + 1.0 mg/L LPS, 10. *P. marina* + 0.1 mg/L LPS



物被膜的细菌密度与初始密度变化趋势一致(图2)。CLSM 图像结果显示, 单一细菌生物被膜上的细菌呈现密集分布状态, 且有局部细菌聚合的现象(图版 I-1); 而添加脂多糖共同培养的生物被膜上细菌较少, 多数细菌以聚集的状态出现(图版 I-2)。加入脂多糖后, 与海假交替单胞菌单独形成的生物被膜相比, 膜厚降低 12.1% ( $P < 0.05$ , 图3)。

### 2.3 生物被膜胞外物质的比较

CLSM 图像显示, 黄色是  $\alpha$  多糖(图版 II-1, 5), 蓝色是  $\beta$  多糖(图版 II-2, 6), 红色是脂质(图版 II-3, 7), 绿色是蛋白(图版 II-4, 8)。与海假交替单胞菌相比, 脂多糖处理后生物被膜上,  $\alpha$  多糖、 $\beta$  多糖和脂质的分布观察到不同的变化

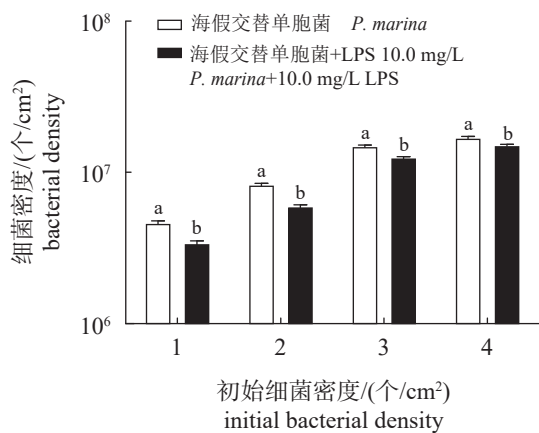
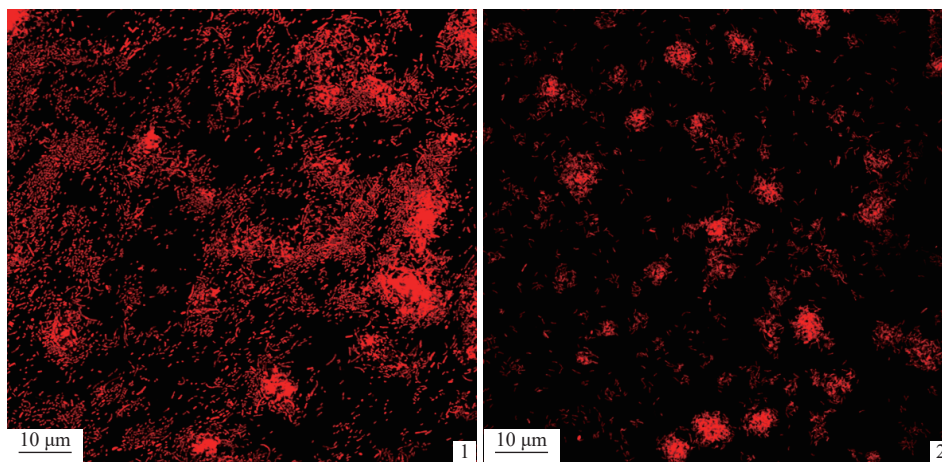


图2 LPS 处理后的海假交替单胞菌生物被膜细菌密度  
1.  $1.1 \times 10^6$ , 2.  $2.1 \times 10^7$ , 3.  $3.1 \times 10^8$ , 4.  $5 \times 10^8$  (个/cm<sup>2</sup>)

Fig. 2 Density of *P. marina* biofilms after treatment with LPS  
1.  $1.1 \times 10^6$ , 2.  $2.1 \times 10^7$ , 3.  $3.1 \times 10^8$ , 4.  $5 \times 10^8$  (cell/cm<sup>2</sup>)



图版 I 激光共聚焦扫描电镜下 LPS 处理后的海假交替单胞菌生物被膜形态

1. 细菌被膜, 2. 细菌被膜 + 10.0 mg/L LPS; 下同

### Plate I CLSM-revealed morphology of *P. marina* bacterial biofilms after LPS treatment

1. *P. marina* biofilms, 2. *P. marina* biofilms + 10.0 mg/L LPS; the same below

(图版 II-1 ~ 3, 4 ~ 6)。与海假交替单胞菌相比,  $\alpha$  多糖和脂质的含量显著增加,  $\beta$  多糖含量更是增加了 2 倍以上 ( $P < 0.05$ , 图4)。对于蛋白质未观察到差异(图版 II-4, 8), 生物量的分析也呈现出与 CLSM 结果相似的趋势(图4)。

### 2.4 生物被膜可拉酸含量的比较

通过媒染剂染色生物被膜光学显微镜的观察, 细菌被染成红色, 可拉酸被染成蓝色(图版 III)。结果显示, 相比于单一细菌生物被膜(图版 III-1), 脂多糖处理后生物被膜可拉酸含量明显提高(图版 III-2)且具有更密集的分布; 统计分析发现, 脂多糖处理后的海假交替单胞菌生物被膜可拉酸含量上升了 35.4% ( $P < 0.05$ , 图5)。

## 3 讨论

脂多糖由类脂 A、核心寡糖链以及 O-抗原组成, 是革兰氏阴性细菌细胞壁结构的主要成分<sup>[19]</sup>。有研究表明菌膜的形成能力与 LPS 结构密切相关<sup>[20-21]</sup>, LPS 在菌膜形成过程中的直接和间接作用在大肠杆菌已有报道<sup>[22]</sup>。然而尚未有实验证明 LPS 是否可通过影响生物被膜的形成而影响厚壳贻贝幼虫的附着变态。因此, 本实验通过用 LPS 处理生物被膜, 探究对生物被膜密度、膜厚度及胞外产物的变化以及对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响。

### 3.1 脂多糖影响细菌生物被膜的形成

LPS 是细胞外膜的主要结构成分<sup>[23]</sup>, 也是细

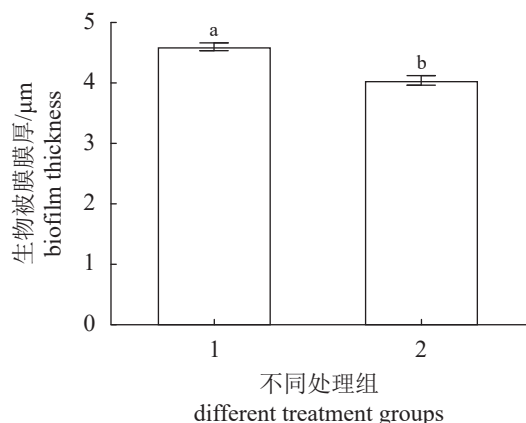


图3 LPS 处理后的海假交替单胞菌生物被膜厚度

1. 细菌被膜, 2. 细菌被膜 + 10.0 mg/L LPS; 下同

Fig. 3 Thickness of *P. marina* bacterial biofilms after treatment with LPS

1. *P. marina* biofilms, 2. *P. marina* biofilms + 10.0 mg/L LPS; the same below

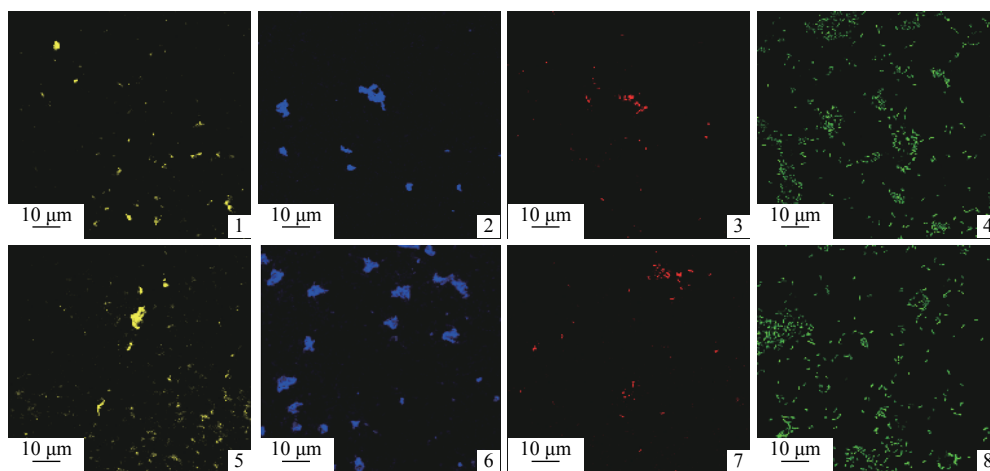
菌生物被膜的组成部分之一。有研究表明, 当牙龈卟啉单胞菌的 LPS 终浓度达 10 mg/L 时, 脐静脉内皮细胞的增殖活性和内皮细胞黏附分子的相对表达量均出现明显下降, 这表明较高浓度的 LPS 能够直接抑制脐静脉内皮细胞增殖<sup>[24]</sup>。本研究在生物被膜形成过程中加入 LPS 后, 生物被膜的细菌密度降低、膜厚度变薄, CLSM 图像显示,  $\alpha$  多糖和脂质含量显著增加,  $\beta$  多糖含量更是增加了 2 倍以上, 细菌多以聚集成团的形式存在于生物被膜中, 推测是由加入的 LPS 影响了细菌细胞

的黏附性而造成。同时, 脂多糖普遍被认为是一种细胞内毒素, 将其加入到细菌生物被膜的形成过程中, 可能会影响细菌的繁殖与生长从而影响最终所形成生物被膜的细菌密度及膜厚度。

### 3.2 LPS 及处理后的生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

**脂多糖对幼虫的直接诱导作用** 海洋无脊椎动物幼虫的附着变态是一个关键的过渡期, 在其自然种群的生态意义和进化意义上都有极为重要的作用<sup>[25]</sup>。而实验室以往的研究表明, 厚壳贻贝 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 可能参与了其幼体发育过程, 同时可能参与或调控厚壳贻贝幼虫的变态发育<sup>[26]</sup>。TLR 作为 LPS 的信号转导受体与 LPS 结合参与生物体的多种生命活动。例如, 有研究发现 TLR4 参与 LPS 诱导肾小管上皮细胞的炎症反应<sup>[27]</sup>。LPS 刺激栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 后其 TLR 信号通路相关基因发生响应激活其免疫系统<sup>[28]</sup>。本研究实验结果显示, 终浓度为 0.1、1.0、10.0 mg/L 浓度的 LPS 均可以直接诱导厚壳贻贝幼虫变态。这可能是由于脂多糖通过与 TLR 识别结合增强厚壳贻贝幼虫的免疫系统功能, 进而促进厚壳贻贝幼虫的附着变态。然而, 有关脂多糖对厚壳贻贝附着变态的分子调节机制仍有待研究。

生物被膜与幼虫变态的关系 在自然环境



图版 II 激光共聚焦扫描电镜下 LPS 处理后的海假交替单胞菌生物被膜胞外产物

1-4. 分别是未处理海假交替单胞菌生物被膜的  $\alpha$ -多糖,  $\beta$ -多糖, 脂质和蛋白; 5-8. 分别是 10.0 mg/L LPS 处理海假交替单胞菌生物被膜的  $\alpha$ -多糖,  $\beta$ -多糖, 脂质和蛋白

Plate II CLSM-revealed extracellular products of *P. marina* biofilms after LPS treatment

1-4.  $\alpha$ -polysaccharides,  $\beta$ -polysaccharides, lipids and proteins of *P. marina* biofilms; 5-8.  $\alpha$ -polysaccharides,  $\beta$ -polysaccharides, lipids and proteins of *P. marina* biofilms treated with 10.0 mg/L LPS

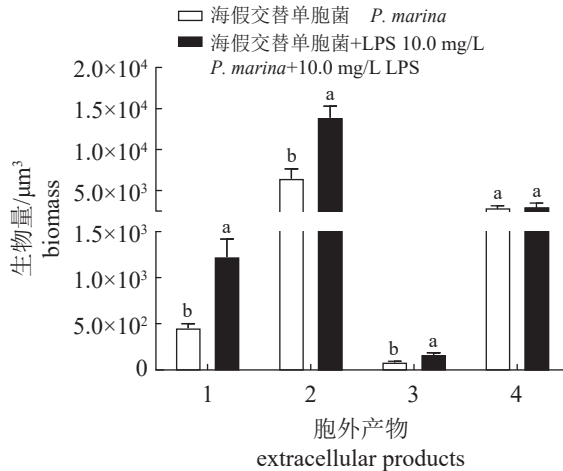


图 4 LPS 处理后的海假交替单胞菌生物被膜胞外产物含量

1. α 多糖, 2. β 多糖, 3. 脂质, 4. 蛋白; 浓度数据为 9 个重复的平均值 (±SE)

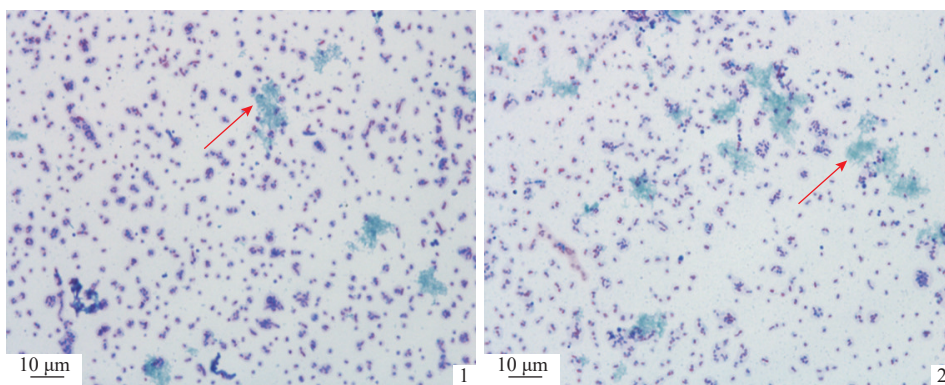
Fig. 4 Content of extracellular products of *P. marina* biofilms after LPS treatment

1. α-polysaccharides, 2. β-polysaccharides, 3. lipids, 4. proteins; data for concentration are means (±SE) of nine replicates

下, 细菌生物被膜可以通过改变附着基表面的物理和化学性质从而调节硅藻及海洋无脊椎动物幼虫或大型海藻孢子的附着行为<sup>[29]</sup>。海洋无脊椎动物幼虫的附着与生物被膜的细菌密度之间具有一定相关关系<sup>[30]</sup>。Huang 等<sup>[21]</sup>发现, 微生物被膜的最终密度与华美盘管虫 (*Hydroides elegans*) 幼虫的附着变态率显著相关。而 Peng 等<sup>[12]</sup>对 7 株不同假交替单胞菌生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响进行研究时发现, 仅有 3 株假交替单胞菌 (*P. nigrifaciens*) 生物被膜的细菌密度与幼虫附着变态

率相关, 其中 1 株细菌呈负相关, 其余 4 株细菌无相关性。本研究中 LPS 处理后的生物被膜促进厚壳贻贝幼虫的附着变态, 但生物被膜的细菌密度却明显降低。由此可见, 在本研究中 LPS 虽然降低生物被膜的细菌密度, 但这并不是其促进厚壳贻贝附着变态的主要原因。

以往的研究发现, 生物被膜的胞外产物可以影响厚壳贻贝的附着变态。例如, 解脂假交替单胞菌 (*P. lipolytica*) 突变菌中多糖的过量产生, 抑制了厚壳贻贝幼虫的附着<sup>[31]</sup>。那么, LPS 是否通过影响生物被膜胞外产物的分泌, 进而调节厚壳贻贝幼虫的附着变态。本研究通过共聚焦染色分析法测定了生物被膜胞外产物的含量, 结果显示, LPS 处理后的生物被膜其胞外脂质和胞外多糖的含量显著增加。胞外多糖能够诱导许多海洋无脊椎动物幼虫附着变态<sup>[31-32]</sup>, 其中极具代表性的是含有生物学重复单元(葡萄糖、岩藻糖、半乳糖和葡萄糖醛酸)的可拉酸<sup>[33-34]</sup>。实验室之前的研究也表明, 海假交替单胞菌中 O1912 基因的缺失导致可拉酸含量增加, 从而促进了厚壳贻贝幼虫的附着变态<sup>[5]</sup>。而脂多糖结构中也含有葡萄糖和半乳糖, 可见可拉酸和脂多糖在组成上有相似之处<sup>[17]</sup>。有研究表明, 大肠杆菌中可拉酸的合成与脂多糖密切相关, 可能与脂多糖和可拉酸共享前体物质的积累和利用有关, 其特殊的 LPS 结构可能会通过激活 Rcs 系统来促进可拉酸的分泌<sup>[17]</sup>。本研究通过可拉酸染色技术, 对 LPS 处理后的海假交替单胞菌生物被膜进行可拉酸分析, 结果显示, LPS 处理后的生物被膜可拉酸含量显著增加, LPS 影响了生物被膜可拉酸的含量。由此推测,



图版 III 媒染剂染色生物被膜光学显微镜的观察

细菌被染成红色, 可拉酸被染成蓝色, 红色箭头所指是可拉酸

Plate III Light microscopic observation of mordant stained biofilms

The strains were stained red and the colonic acid was stained blue, the red arrow points to colonic acid



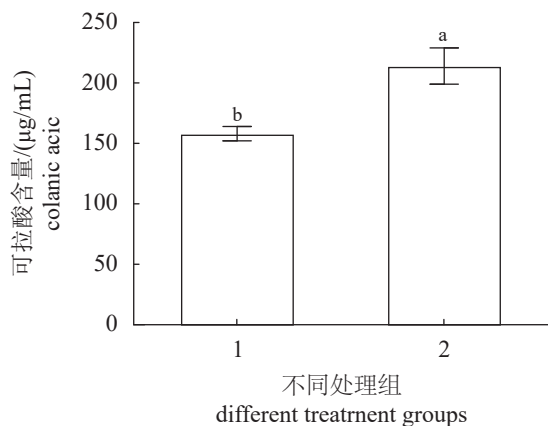


图5 LPS处理后的海假交替单胞菌生物被膜可拉酸含量浓度数据为4个重复的平均值(±SE)

Fig. 5 Colanic acid production in *P. marina* biofilms after LPS treatment

Data for concentration are means (±SE) of four replicates

LPS在细菌生物被膜的形成过程中可以促进生物被膜胞外物质如可拉酸的增多,从而诱导了厚壳贻贝幼虫的附着变态。

综上所述,本研究首次发现LPS可以直接诱导厚壳贻贝的附着变态,并且可以通过促进海假交替单胞菌生物被膜可拉酸的产生,从而间接促进厚壳贻贝幼虫的附着变态。本研究为探究厚壳贻贝幼虫附着变态的分子机制提供了新的理论依据和创新思路。同时也为脂多糖在提高厚壳贻贝幼虫的附着变态率、改进养殖方法、改善厚壳贻贝养殖问题等方面提供了理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] Yang J L, Shen P J, Liang X, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms[J]. *Biofouling*, 2013, 29(3): 247-259.
- [2] Wang C, Bao W Y, Gu Z Q, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to natural biofilms[J]. *Biofouling*, 2012, 28(3): 249-256.
- [3] Li Y F, Guo X P, Yang J L, *et al.* Effects of bacterial biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 434-441.
- [4] 李一峰, 杨金龙, 王冲, 等. 厚壳贻贝早期幼虫低温保存的影响研究[J]. *水产学报*, 2012, 36(1): 73-77.
- Li Y F, Yang J L, Wang C, *et al.* Study on refrigeration of the early larvae of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(1): 73-77 (in Chinese).
- [5] Peng L H, Liang X, Chang R H, *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] Ma L Y, Wang J, Wang S W, *et al.* Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(8): 1995-2005.
- [7] Nakao R, Ramstedt M, Wai S N, *et al.* Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in hep biosynthesis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51241.
- [8] Lee K J, Lee M A, Hwang W, *et al.* Deacylated lipopolysaccharides inhibit biofilm formation by gram-negative bacteria[J]. *Biofouling*, 2016, 32(7): 711-723.
- [9] 常睿珩, 许康豪, 蔡雨珊, 等. 钙离子对海假交替单胞菌生物被膜形成及厚壳贻贝附着的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(6): 893-900.
- Chang R H, Xu K H, Cai Y S, *et al.* Effects of calcium on biofilm formation of the bacterium *Pseudoalteromonas marina* and settlement of mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(6): 893-900 (in Chinese).
- [10] 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 Y S, Zhang X K, Zhu Y T, *et al.* Effects of *Pseudoalteromonas marina* flagellin on biofilm formation and settlement of *Mytilus coruscus*[J]. *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(4): 75-83 (in Chinese).
- [11] Lau S C K, Mak K K W, Chen F, *et al.* 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.
- [12] Peng L H, Liang X, Xu J K, *et al.* Monospecific biofilms of *Pseudoalteromonas* promote larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 2577.
- [13] Liang X, Zhang X K, Peng L H, *et al.* The flagellar gene regulates biofilm formation and mussel larval settlement and metamorphosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 710.
- [14] 杨金龙, 郭行磐, 陈芋如, 等. 中湿度表面的海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(3): 421-428.
- Yang J L, Guo X P, Chen Y R, *et al.* Effects of bacterial biofilms formed on middle wettability surfaces on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries*

- Journal of Fisheries of China, 2015, 39(3): 421-428 (in Chinese).
- [15] 梁箫, 杨丽婷, 彭莉华, 等. 不同温度下形成的深海菌膜对厚壳贻贝幼虫变态的影响[J]. 水产学报, 2020, 44(10): 1728-1741.
- Liang X, Yang L T, Peng L H, *et al.* Effects of biofilms of deep-sea bacteria at varying temperatures on larval metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(10): 1728-1741 (in Chinese).
- [16] 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.
- [17] Ren G, Wang Z, Li Y, *et al.* Effects of lipopolysaccharide core sugar deficiency on colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(11): 1576-1584.
- [18] Obadia B, Lacour S, Doublet P, *et al.* Influence of tyrosine-kinase Wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 367(1): 42-53.
- [19] Wang C H, Zhang H L, Wang J I, *et al.* Colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli* is dependent on lipopolysaccharide structure and glucose availability[J]. *Microbiological Research*, 2020, 239: 126527.
- [20] Lau P C Y, Lindhout T, Beveridge T J, *et al.* Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(21): 6618-6631.
- [21] Huang T P, Somers E B, Wong A C L. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(8): 3116-3120.
- [22] Amini S, Goodarzi H, Tavazoie S. Genetic dissection of an exogenously induced biofilm in laboratory and clinical isolates of *E. coli*[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(5): e1000432.
- [23] Shi J, Zhao Y, Wang Y, *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 2014, 514(7521): 187-192.
- [24] 吴贇, 叶春玲, 林李嵩, 等. 牙龈卟啉单胞菌脂多糖对人脐静脉内皮细胞超微结构及细胞间黏附分子1表达的影响[J]. 中华高血压杂志, 2020, 28(5): 420-425.
- Wu Y, Ye C L, Lin L S, *et al.* The effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides on the ultra-structure and intercellular adhesion molecule-1 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Chinese Journal of Hypertension*, 2020, 28(5): 420-425 (in Chinese).
- [25] Williams E A, Degnan S M. Carry-over effect of larval settlement cue on postlarval gene expression in the marine gastropod *Haliotis asinina*[J]. *Molecular Ecology*, 2009, 18(21): 4434-4449.
- [26] 刘钰珠. Toll 样受体在厚壳贻贝免疫和发育中的作用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- Liu Y Z. Effect of toll-like receptor on immunity and development of *Mytilus coruscus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [27] 陈缘, 易扬, 杨海波, 等. TLR4介导自噬流在脂多糖诱导肾小管上皮细胞炎症反应中的作用研究[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(5): 811-816.
- Chen Y, Yi Y, Yang H B, *et al.* The role of TLR4-mediated autophagic flux in lipopolysaccharide-induced inflammatory response in tubular epithelial cells[J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2020, 37(5): 811-816 (in Chinese).
- [28] Song L, Wang L, Zhang H, *et al.* The immune system and its modulation mechanism in scallop. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1), 65-78.
- [29] 杨金龙, 王冲, 顾忠旗, 等. 微生物膜对海洋无脊椎动物幼体附着变态的影响研究[J]. 海洋科学, 2012, 36(8): 116-121.
- Yang J L, Wang C, Gu Z Q, *et al.* A review on the role of marine biofilms on larval settlement and metamorphosis of marine invertebrates[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(8): 116-121 (in Chinese).
- [30] Tebben J, Tapiolas D M, Motti C A, *et al.* Induction of larval metamorphosis of the coral *Acropora millepora* by tetrabromopyrrole isolated from a *Pseudoalteromonas* bacterium[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19082.
- [31] Zeng Z S, Guo X P, Li B Y, *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.
- [32] Bao W Y, Satuito C G, Yang J L, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms[J]. *Marine Biology*, 2007, 150(4): 565-574.
- [33] Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 75: 39-68.
- [34] Schmid J, Sieber V, Rehm B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 496.



## Effects of lipopolysaccharide on biofilm formation and larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*

WU Jingxian<sup>1,2</sup>, LI Jiazheng<sup>1,2</sup>, HU Xiaomeng<sup>1,2</sup>, DING Wenyang<sup>1,2</sup>,  
YANG Jinlong<sup>1,2,3</sup>, LIANG Xiao<sup>1,2\*</sup>

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering  
Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, China)

**Abstract:** *Mytilus coruscus* is an important marine cultured shellfish in China, and it is also a fouling organism. Once the larvae of *M. coruscus* have the ability of the settlement and metamorphosis, they need to undergo behavior changes and body structure remodeling, complete the settlement and metamorphosis, and start benthic life. If the larvae cannot complete the settlement and metamorphosis, they eventually die. Therefore, the settlement and metamorphosis is very important for the normal development and population maintenance of *M. coruscus*. Previous studies have shown that biofilm can significantly improve the settlement and metamorphosis rate of larvae. In addition, lipopolysaccharide (LPS) plays an important role in the process of biofilm formation. To explore the effects of LPS on the formation of marine bacterial biofilm and the settlement and metamorphosis of mussel larvae, this study used firstly different concentrations of LPS to directly stimulate the larva of *M. coruscus* to observe the direct effect of LPS on larval metamorphosis. In addition, the biofilm was formed by adding different concentrations of LPS and *Pseudoalteromonas marina*, to analyze the changes in biological characteristics of the biofilm and the influence of the changed biofilm on the metamorphosis of the mussel larvae. The results showed that LPS at three concentrations could directly induce metamorphosis of *M. coruscus* larvae. The bacterial density and thickness of biofilm treated with 10.0 mg/L LPS were significantly decreased, especially the thickness of biofilm decreased by 12.1%. After being treated with 10.0 mg/L LPS, the polysaccharides and lipids in extracellular products were significantly increased, the content of colanic acid increased by 35.4%, and the induction of larval metamorphosis was also increased by 53.3%. Thus, LPS has a direct effect on the settlement and metamorphosis of *M. coruscus* larvae, and LPS might indirectly affect the settlement and metamorphosis of *M. coruscus* larvae by regulating the production of extracellular substances in the biofilm, especially colanic acid. The finding of this study is helpful for underpinning the mechanism of biofilm regulating the settlement and metamorphosis of *M. coruscus*, improving seedling production technology, and providing a theoretical basis for marine antifouling.

**Key words:** *Mytilus coruscus*; lipopolysaccharide (LPS); marine bacteria; biofilms; larval metamorphosis

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

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41876159); Program of Shanghai Academic Research Leader (20XD1421800); Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (GML2019ZD0402); National Key Research and Development Program of China (2020YFD0900804)