



## 纤维素对海假交替单胞菌生物被膜生物学特性及厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

邵安琪<sup>1,2</sup>, 李嘉政<sup>1,2</sup>, 张俊波<sup>3,4</sup>, 万荣<sup>3,4,5</sup>, 杨金龙<sup>1,2,6</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, 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. 上海海洋大学, 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:** 为探究纤维素对海假交替单胞菌生物被膜的生物学特性及其对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响, 实验设置海假交替单胞菌(初始细菌密度  $5 \times 10^8$  个/mL) 分别与浓度为 0.02、0.20、2.00、20.00 mg/L 的纤维素共孵育形成生物被膜, 检测形成的生物被膜对厚壳贻贝幼虫变态的诱导作用变化, 比较生物被膜成膜能力、胞外产物等生物学特性变化, 并分析其与厚壳贻贝幼虫附着变态的关系。纤维素浓度为 2.00 或 20.00 mg/L 时, 所形成的生物被膜对幼虫附着变态的诱导活性显著降低。通过分析加入纤维素后海假交替单胞菌形成的生物被膜生物学特性发现, 随着纤维素浓度升高, 生物被膜中细菌的分布更为分散, 细菌密度和膜厚呈逐渐降低趋势, 生物被膜胞外产物中  $\alpha$ -多糖、 $\beta$ -多糖和脂质的生物量显著降低, 而蛋白无明显变化。在海假交替单胞菌生物被膜形成过程中, 纤维素主要通过降低胞外  $\alpha$ -多糖、 $\beta$ -多糖和脂质的产生, 进而间接调控厚壳贻贝幼虫附着变态。研究结果为探究海假交替单胞菌纤维素对生物被膜形成及对厚壳贻贝附着变态调控分子机制提供理论依据, 为整治生物污损等实际问题提供新思路。

**关键词:** 厚壳贻贝; 海假交替单胞菌; 生物被膜; 纤维素; 附着变态

**中图分类号:** S 968.31

**文献标志码:** A

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 是我国重要的海水养殖贝类, 同时也是典型的大型海洋污损生物, 具有较强的附着能力和环境适应能力<sup>[1]</sup>。厚壳贻贝在其生活史中会经历由浮游阶段向底栖阶段转变的过程, 这一过程被称为附着变态<sup>[2-3]</sup>。附着变态是幼虫存活的必要条件, 若不能完成则会死亡, 因此, 研究其附着变态机制对于水产养殖以及大

型海洋生物污损防治具有重要的意义。生物被膜是大部分细菌在自然环境中生存的主要形式, 在海洋环境中, 大多数菌株如假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas*)、弧菌 (*Vibrio*)、希瓦氏菌 (*Shewanella*), 可通过形成生物被膜及产生具有生物活性的化合物如脓黑素、鞭毛蛋白而影响无脊椎动物幼虫的附着和变态<sup>[4-6]</sup>。

收稿日期: 2021-04-06 修回日期: 2021-05-24

资助项目: 国家自然科学基金(41876159, 41476131); 国家重点研发计划(2019YFC0312104, 2020YFD0900804); 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(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402)

第一作者: 邵安琪, 从事海洋贝类分子生物学研究, E-mail: m180100021@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



纤维素是通过  $\beta$ -1,4-糖苷键将 D-吡喃葡萄糖联结而成的线形高分子, 广泛分布于自然界中<sup>[7-8]</sup>。纤维素最早是在 1886 年 Brown<sup>[9]</sup> 发现木醋杆菌 (*Acetobacter xylinum*) 在有氧的情况下使用葡萄糖作为碳源产生, 此后又有多种细菌被发现可以生物合成纤维素<sup>[8-11]</sup>。细菌纤维素可参与生物被膜的形成, 有助于生物被膜的完整性和稳定性, 在细胞外起到机械和化学保护作用, 具有重要的生物学功能。研究发现, AT00\_08 765 基因中一个碱基点突变导致突变菌过量产生纤维素, 且突变菌所形成的生物被膜对厚壳贻贝幼虫的诱导活性下降<sup>[12]</sup>。在 *S. loihica*、大西洋假交替单胞菌 (*P. atlantica*) 生物被膜形成前后分别加入纤维素一起孵育的生物被膜, 均能改变生物被膜生物学特性, 进而降低厚壳贻贝幼虫的附着变态率<sup>[13]</sup>。

本实验选取对厚壳贻贝幼虫附着变态具有诱导活性的海洋细菌海假交替单胞菌 (*P. marina*) 菌株<sup>[6]</sup> 为研究对象, 探究纤维素是否会影响海假交替单胞菌生物被膜生物学特性, 包括细菌密度、膜厚、胞外产物 (主要为脂、糖、蛋白) 的变化, 及其对幼虫诱导活性的影响, 旨在为研究纤维素对生物被膜形成及对厚壳贻贝幼虫附着变态调控分子机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用海假交替单胞菌株 ECSMB14 103 分离于自然生物被膜,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

实验所用的厚壳贻贝眼点幼虫均于 2019 年 4 月取自浙江省舟山市枸杞岛 ( $30^{\circ}43' \text{N}$ ,  $122^{\circ}46' \text{E}$ ), 暂养 1 周后用于实验。暂养期间, 水温控制在  $18^{\circ}\text{C}$ , 充气培养, 无光照, 每天更换海水及投喂  $1 \times 10^4$  个/mL 湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*)。实验所用的纤维素标准品购置于默克化工技术 (上海) 有限公司。实验过程中操作人员严格遵守动物实验伦理规范, 并按照上海海洋大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 生物被膜的制备

制备生物被膜参照 Yang 等<sup>[6]</sup> 的方法并略有改动。海假交替单胞菌菌株在  $25^{\circ}\text{C}$ , 2216E 液体培养基, 200 r/min 振荡培养, 生长 16~18 h。以  $1\ 600 \times g$ , 15 min 离心菌体, 除去上清液, 并用高压灭菌的过滤 (孔径:  $0.45 \mu\text{m}$ ) 海水 (autoclaved

filtered seawater, AFSW) 将沉淀的菌体洗涤 3 次, 最后用 50 mL AFSW 悬浮菌体配置成细菌原液。细菌原液按 1:1 000 (体积比) 稀释, 1 mL 菌液用滤膜过滤, 吡啶橙溶液 (0.1%, 质量体积比) 染色 5 min。在荧光显微镜 (Olympus BX51) 下观察计数 (10 个随机视野)。细胞浓度为  $5 \times 10^8$  个/mL 的海假交替单胞菌混合于纤维素 (0.02、0.20、2.00、20.00 mg/L) 中, 用  $\phi 64 \text{ mm} \times 19 \text{ mm}$  的培养皿培养, 每个培养皿中均装有一片玻片 ( $38 \text{ mm} \times 26 \text{ mm}$ ), 随后加入适量 AFSW 至总体积为 20 mL。设置 9 个平行组,  $18^{\circ}\text{C}$  黑暗环境中放置 48 h。

### 1.3 纤维素与海假交替单胞菌共同形成生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

载玻片在有 AFSW 的烧杯中润洗, 用镊子转移至无菌培养皿 (提前移入 20 mL AFSW), 没有任何细菌生长的玻片为对照组, 每个培养皿中放入 20 只眼点幼虫。统计 48 h 的附着率。

### 1.4 生物被膜细菌密度检测

将形成生物被膜的玻片放入 5% 甲醛水溶液中, 48 h 后用吡啶橙溶液 (0.1%, 质量体积比) 染色 5 min。每个生物被膜在奥林巴斯 BX51 荧光显微镜  $\times 1\ 000$  倍下选取 10 个随机视野计算细菌密度 (个/mL), 有关计算公式参照 Yang 等<sup>[6]</sup>, 每组 3 个重复。

### 1.5 生物被膜荧光染色和共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 图像分析

按照 González-Machado 等<sup>[14]</sup> 的方法对生物被膜进行染色。荧光染料的详细信息见表 1。海假交替单胞菌和海假交替单胞菌加入纤维素 (2 mg/L) 共孵育的生物被膜分别滴加染色液浸染 20 min, 全程避光。将染色结束的生物被膜用 150 mmol/L NaCl 清洗 3 次去除残留的染色液, 室温避光晾干。使用 CLSM 拍摄, CLSM 图像通过 LAS X 版本 (Leica, Wetzlar, 德国) 以  $1\ 024 \times 1\ 024$  像素和 z-step 为  $0.20 \mu\text{m}$  采集。每组 3 个平行的载玻片, 每个载玻片拍摄 3 个随机视野。

### 1.6 数据分析

为了提高数据正态性, 将幼虫附着变态生物测定的百分比转换为 Arcsine。所有数据的正态性使用 JMP™ 软件 (SAS, Cary, NC, American, version 10.0.0) 中的 Shapiro-Wilk' W 进行测试。

表 1 染色中使用的荧光染料

Tab. 1 Fluorescent dyes used in dyeing

染料 dye	染色目标 binding target	激光波长/nm Ex/Em wavelength	工作液/( $\mu\text{L}/\text{mL}$ , $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) working solution
卡尔科弗卢尔荧光增白剂 Calcofluor white M2R	$\beta$ -多糖 $\beta$ -polysaccharides	254/432	189
四甲基罗丹明共轭物刀豆蛋白A9 Concanavalin A, tetramethylrhodamine conjugate	$\alpha$ -多糖 $\alpha$ -polysaccharides	552/578	944.8
1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚二碳花菁高氯酸盐 DiIC 18(5)oil,1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetra-methylindodicarbocyanine perchlorate	脂类 lipids	648/670	79.4
异硫氰酸荧光素 fluorescein isothiocyanate isomer I	蛋白质 proteins	495/519	46.6
碘化丙啶 Propidium Iodide	死细菌 dead bacteria	561	5

显著差异由 Kruskal-Wallis 确定, 然后由 Steel-Dwass All Pairs 检验确定。使用 Spearman's rank 相关检验进行相关性分析,  $P < 0.05$  为存在显著差异。

## 2 结果

### 2.1 海假交替单胞菌用纤维素进行孵育形成的生物被膜对幼虫附着变态的影响

以海假交替单胞菌单独培养的生物被膜为对照, 海假交替单胞菌细菌初始浓度  $5 \times 10^8$  个/mL, 用纤维素进行孵育形成的生物被膜对幼虫的附着变态诱导率, 添加 0.02、0.20 mg/L 未有明显变化, 2、20 mg/L 时明显抑制诱导活性 ( $P < 0.05$ , 图 1-a)。纤维素加入海假交替单胞菌后进行孵育的生物被膜的诱导活性在 2 mg/L 时达到最低, 诱导率为

25%, 以海假交替单胞菌单独培养的生物被膜为对照, 诱导率降低了 30.55% ( $P < 0.05$ , 图 1-a)。在海假交替单胞菌生物被膜培养过程中加入纤维素, 细菌密度显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 1-b), 且随着纤维素浓度增高而降低。

### 2.2 生物被膜上细菌分布和被膜膜厚分析

初始浓度  $5 \times 10^8$  个/mL 的海假交替单胞菌单独培养的生物被膜、加入纤维素 (2.00 mg/L) 一起孵育的生物被膜上细菌形态和分布情况显示, 海假交替单胞菌加入纤维素一起孵育的生物被膜上细菌疏松, 聚集程度低于海假交替单胞菌单独培养的生物被膜 (图 2-a)。相比于海假交替单胞菌单独培养的生物被膜, 海假交替单胞菌加入纤维素一起孵育的生物被膜厚度降低了 30.62% (图 2-b)。

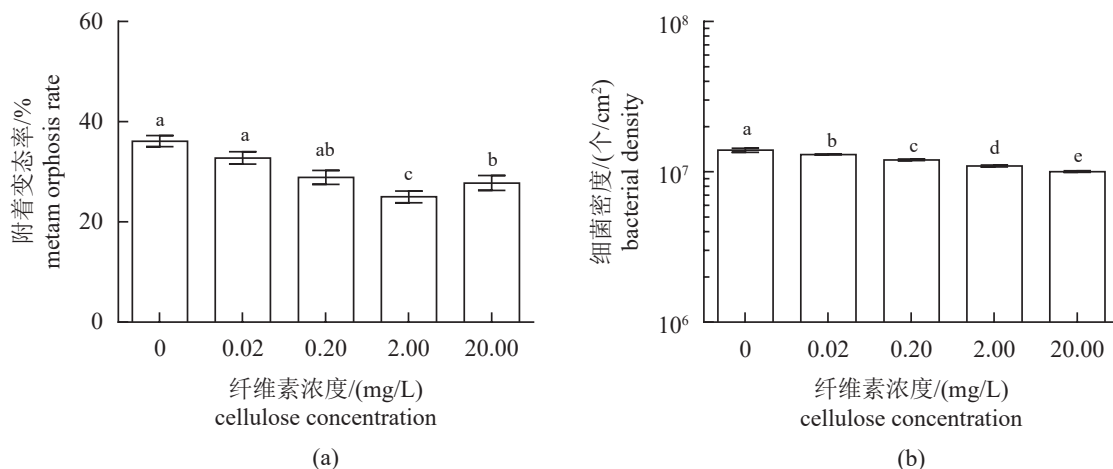


图 1 海假交替单胞菌用纤维素孵育形成的生物被膜抑制厚壳贻贝幼虫附着变态

(a) 不同梯度的纤维素加入海假交替单胞菌共同孵育的生物被膜诱导率; (b) 海假交替单胞菌初始细胞浓度  $5 \times 10^8$  个/mL 时, 不同梯度纤维素孵育的生物被膜上细菌的密度。标有不同字母表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。

Fig. 1 *P. marina* and cellulose co-formed biofilm inhibiting the larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus*

(a) percentage of larval settlement and metamorphosis in response to biofilms cultured by different concentrations of cellulose with *P. marina*. (b) bacterial density of biofilms formed by different concentration of cellulose and *P. marina* whose initial concentration was  $5 \times 10^8$  cells/mL. The means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



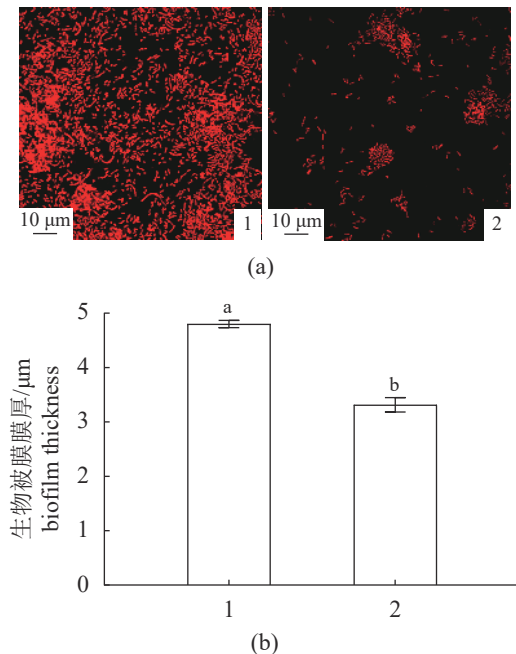


图2 海假交替单胞菌单独培养的生物被膜和加入纤维素(2.00 mg/L)形成生物被膜的 CLSM 图像(a)和厚度(b)

(a)1. 海假交替单胞菌单独培养的生物被膜, 2. 纤维素加入海假交替单胞菌共孵育的生物被膜; (b) 1. 海假交替单胞菌单独培养的生物被膜厚度分析, 2. 海假交替单胞菌加入纤维素共孵育的生物被膜的厚度分析。

Fig. 2 The bacterial density and thickness of monospecific bacterial biofilm and *P. marina* and cellulose (2 mg/L) co-formed biofilm

(a) 1. biofilm formed by *P. marina*, 2. biofilm formed by *P. marina* and cellulose; (b) 1. thickness of *P. marina* biofilms analysis, 2. thickness of *P. marina* and cellulose co-formed biofilms analysis. The means with different letters are significantly different at the 0.05 probability level and the means with the same letter are not significantly different.

### 2.3 生物被膜细胞外多糖、脂质、蛋白含量差异分析

CLSM 图像显示, 纤维素、海假交替单胞菌(浓度分别为 2.00 mg/L、 $5 \times 10^8$  个/mL)一起孵育的生物被膜上的多糖和脂质分布与海假交替单胞菌单独培养的生物被膜不同(图 3-a), 而对与蛋白质, 未观察到差异(图 3-a)。生物量分析也显示出与 CLSM 结果相似的趋势(图 3-b)。与海假交替单胞菌单独培养的生物被膜相比, 纤维素加入海假交替单胞菌一起孵育的生物被膜, 其  $\alpha$ -多糖含量降低了 72.55%,  $\beta$ -多糖生物量降低了 62.01%。相比于海假交替单胞菌单独培养的生物被膜, 纤维素加入海假交替单胞菌一起孵育的生物被膜上的脂质含量降低了 66.23% ( $P < 0.05$ , 图 3-b)。

## 3 讨论

生物被膜是大部分细菌在自然环境中生存的主要形式, 是大多数海洋生态系统的重要组成部分, 大多数海洋细菌形成的生物被膜能够促进或抑制不同种属的海洋无脊椎动物幼虫附着变态<sup>[15]</sup>。一些研究表明细菌胞外产物(如多糖、脂质、蛋白等)对海洋细菌生物被膜的形成及其对管虫 [*Janua (Dexiospira) brasiliensis*]<sup>[16]</sup>、玻璃海鞘 (*Ciona intestinalis*)<sup>[17]</sup>、*Hydractinia echinata*<sup>[18]</sup> 和纹藤壶 (*Balanus amphitrite*)<sup>[19]</sup> 等海洋无脊椎动物幼虫附着变态具有调控作用。

假交替单胞菌属能产生多种具有生物活性的物质<sup>[20]</sup>, 其所形成的生物被膜能诱导或抑制海洋无脊椎动物幼虫的附着变态<sup>[21-23]</sup>。以往研究证明, 纤维素对厚壳贻贝幼虫的附着变态并无直接影响, 但在大西洋假交替单胞菌或 *S. loihica* 菌生物被膜形成前后添加纤维素会显著降低其生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的诱导活性<sup>[13]</sup>。在本实验中, 以海假交替单胞菌单独培养的生物被膜为对照, 添加纤维素的量超过 2 mg/L 时, 共同孵育的生物被膜诱导活性降低 ( $P < 0.05$ ), 细菌密度与膜厚下降,  $\alpha$ -多糖、 $\beta$ -多糖的产生分别减少 62.21%、62.01%, 脂质含量降低 50% 以上, 且对蛋白分泌没有影响。此结果表明, 纤维素可能累计到一定量之后通过减少生物被膜胞外多糖和胞外脂来进一步降低幼虫的附着变态。

在之前的研究中, 生物被膜的细菌密度与厚壳贻贝的附着之间具有明显相关性, 且在一定范围内呈线性相关<sup>[24]</sup>。生物被膜上的细菌密度与诱导活性呈负相关<sup>[25-26]</sup> 或者正相关<sup>[27-28]</sup>。结果显示, 在海假交替单胞菌细胞浓度  $5 \times 10^8$  个/mL 时, 纤维素加入后一起孵育的生物被膜, 细菌密度随纤维素浓度的增加而逐渐减少, 但是生物被膜只有在 2.00 和 20.00 mg/L 时对厚壳贻贝幼虫的诱导活性下降。因此, 纤维素加入海假交替单胞菌后进行孵育的生物被膜对幼虫的诱导活性与细菌密度无关。

细菌生物被膜是一种不可逆的黏附于非生物或生物表面的微生物细胞菌落, 并包裹于细胞外多聚物, 如脂类、多聚糖、蛋白质、核酸等的细菌聚集膜样物<sup>[29]</sup>。细胞外多聚物生物量高于细菌, 是生物被膜的重要组成部分, 40%~95% 的成份是胞外多糖<sup>[30-31]</sup>。Zeng 等<sup>[5]</sup> 证明, 解脂假交替单胞

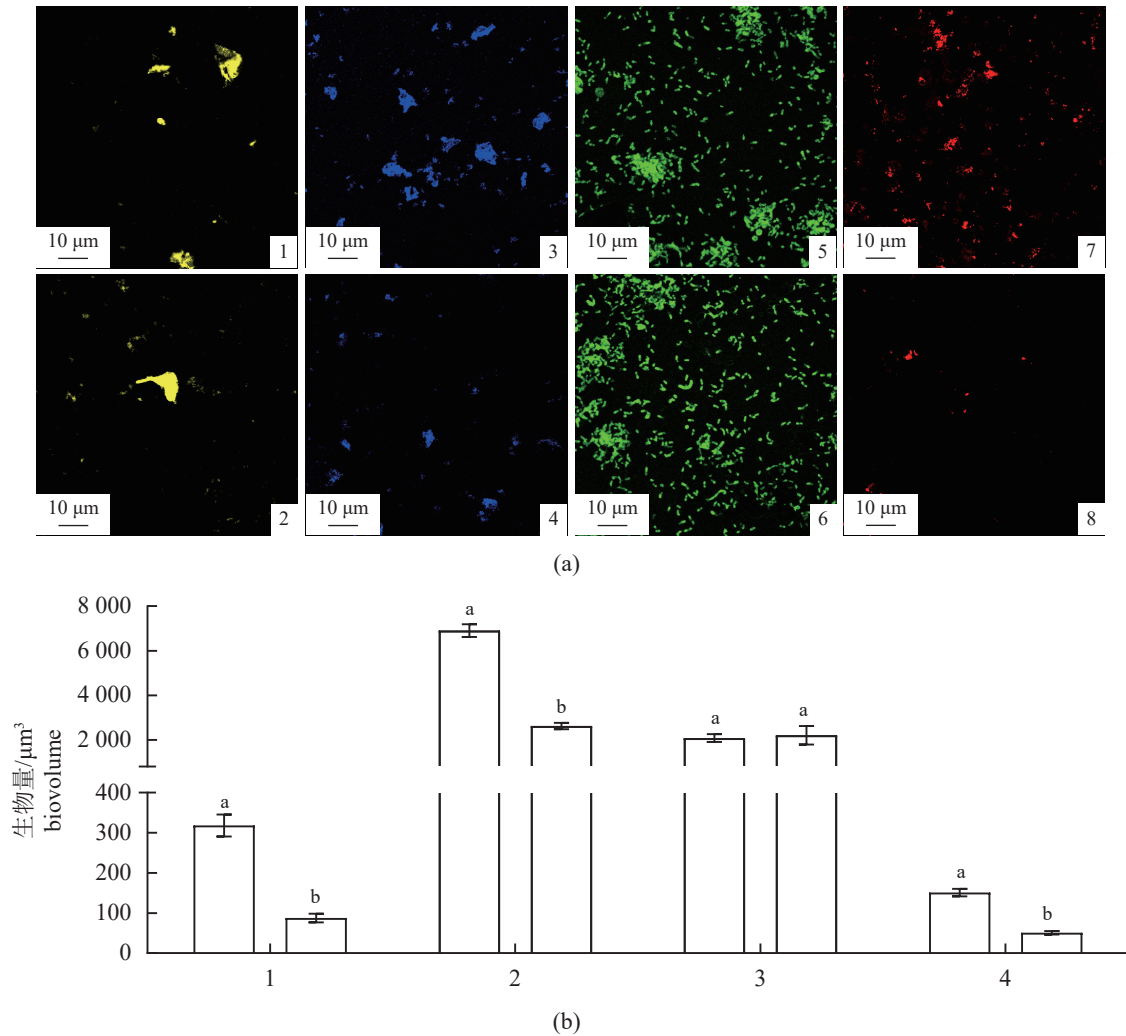


图3 海假交替单胞菌单独培养的生物被膜、海假交替单胞菌加入纤维素共孵育的生物被膜胞外产物差异 (a)1、3、5、7分别是海假交替单胞菌生物被膜中 $\alpha$ 多糖、 $\beta$ 多糖、蛋白、脂质的CLSM图像, 2、4、6、8分别是纤维素加入海假交替单胞菌共孵育的生物被膜中 $\alpha$ 多糖、 $\beta$ 多糖、蛋白、脂质CLSM图像; (b)1~4分别是海假交替单胞菌生物被膜中 $\alpha$ 多糖、 $\beta$ 多糖、蛋白、脂质的生物量。

Fig. 3 CLSM analysis of extracellular products of monospecific bacterial biofilm and *P. marina* and cellulose co-incubated biofilm

(a) 1, 3, 5, 7 are CLSM images of  $\alpha$ -polysaccharides,  $\beta$ -polysaccharides, proteins and lipids in the biofilms of *P. marina*. 2, 4, 6, 8 are the CLSM images of  $\alpha$ -polysaccharides,  $\beta$ -polysaccharides, proteins and lipids in the biofilms co-incubated with cellulose and *P. marina*; (b) 1-4 are the analysis of the difference of  $\alpha$ -polysaccharides,  $\beta$ -polysaccharides, proteins and lipids biomass in *P. marina* biofilms.

菌 (*P. lipolytica*) 的荚膜多糖水平与厚壳贻贝附着呈负相关。Bao 等<sup>[32]</sup>发现, 将培养中的交替单胞菌属 (*Alteromonas* sp. 1) 生物被膜刮下处理后, 发现糖蛋白或胞外多糖参与了紫贻贝 (*M. galloprovincialis*) 的诱导过程。Peng 等<sup>[33]</sup>发现海假交替单胞菌的多糖生物合成相关基因 01912 可能通过协同 c-di-GMP 调节可拉酸的产生, 从而负调控厚壳贻贝的附着。另外, 生物被膜上与凝集素结合的胞外多糖或糖蛋白调控管虫<sup>[34]</sup>, 藤壶<sup>[35-36]</sup>幼虫的

附着变态。纤维素是胞外多糖的重要成分<sup>[37]</sup>。Zeng 等<sup>[12]</sup>证实了解脂假交替单胞菌生物被膜中纤维素的含量与其生物被膜的抗污损能力呈正相关, 梁箫等<sup>[13]</sup>发现大西洋假交替单胞菌和 *S. loihica* 生物被膜经过纤维素处理后, 明显降低了对厚壳贻贝幼虫的诱导活性。结果发现, 海假交替单胞菌在加入纤维素一起孵育生物被膜的过程中,  $\alpha$ -多糖、 $\beta$ -多糖和脂质生物量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而对蛋白质来说没有变化。这表明  $\alpha$ -多糖、 $\beta$ -多糖

和脂质有助于细菌在生物被膜内扩散和聚集, 并随后改变生物被膜的结构。因此推测, 纤维素加入海假交替单胞菌一起孵育成生物被膜过程中, 主要是通过降低  $\alpha$ -多糖、 $\beta$ -多糖含量, 其次是胞外脂, 进而降低厚壳贻贝附着变态诱导活性。

综上所述, 在海假交替单胞菌生物被膜形成过程中, 当纤维素生物量累计到一定量时, 会通过降低生物被膜胞外  $\alpha$ -多糖、 $\beta$ -多糖和脂质的分泌, 进而间接调控厚壳贻贝幼虫附着变态。此研究成果对于了解纤维素与生物被膜形成, 及生物被膜影响厚壳贻贝等海洋无脊椎动物附着变态的分子机制提供了理论依据, 同时为海洋生物污染的防治提供了新的研究方向。

(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, Li S H, Li Y F, *et al.* Effects of neuroactive compounds, ions and organic solvents on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2013, 396-399: 106-112.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Zeng Z S, Guo X P, Cai X S, *et al.* Pyomelanin from *Pseudoalteromonas lipolytica* reduces biofouling[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1718-1731.
- [6] 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.
- [7] Nishiyama Y, Sugiyama J, Chanzy H, *et al.* Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I<sub>a</sub> from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(47): 14300-14306.
- [8] Römmling U. Molecular biology of cellulose production in bacteria[J]. *Research in Microbiology*, 2002, 153(4): 205-212.
- [9] Brown A J. XLIII. —On an acetic ferment which forms cellulose[J]. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 1886, 49: 432-439.
- [10] Kawano Y, Saotome T, Ochiai Y, *et al.* Cellulose accumulation and a cellulose synthase gene are responsible for cell aggregation in the cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus* RKN[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(6): 957-966.
- [11] Monteiro C, Saxena I, Wang X D, *et al.* Characterization of cellulose production in *Escherichia coli* Nissle 1917 and its biological consequences[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(5): 1105-1116.
- [12] 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.
- [13] 梁箫, 童欢, 彭莉华, 等. 纤维素对海洋细菌生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态的调控[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(1): 75-82.
- Liang X, Tong H, Peng L H, *et al.* Regulation of formation of biofilms and larval settlement and metamorphosis of mussel *Mytilus coruscus* by cellulose[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(1): 75-82 (in Chinese).
- [14] 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.
- [15] 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).
- [16] Kirchman D, Graham S, Reish D, *et al.* Bacteria induce settlement and metamorphosis of *Janua (Dexiospira) brasiliensis* Grube (Polychaeta: Spirprbidae)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 1981, 56(2-3): 153-163.
- [17] Szewzyk U, Holmström C, Wrangstadh M, *et al.* Relev

- ance of the exopolysaccharide of marine *Pseudomonas* sp. strain S9 for the attachment of *Ciona intestinalis* larvae[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1991, 75(2-3): 259-265.
- [18] Leitz T, Wagner T. The marine bacterium *Alteromonas espejiana* induces metamorphosis of the hydroid *Hydractinia echinata*[J]. *Marine Biology*, 1993, 115(2): 173-178.
- [19] Maki J S, Rittschof D, Samuelsson M Q, *et al.* Effect of marine bacteria and their exopolymers on the attachment of barnacle cypris larvae[J]. *Bulletin of Marine Science*, 1990, 46(2): 499-511.
- [20] 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.
- [21] Holmström C, Egan S, Franks A, *et al.* Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 41(1): 47-58.
- [22] Huggett M J, Williamson J E, de Nys R, *et al.* 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.
- [23] Mieszkin S, Callow M E, Callow J A. Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: a mini review[J]. *Biofouling*, 2013, 29(9): 1097-1113.
- [24] 周轩, 郭行磐, 陈芋如, 等. 低湿度表面的海洋附着细菌对厚壳贻贝附着的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(1): 30-35.  
Zhou X, Guo X P, Chen Y R, *et al.* Effects of bacterial biofilms formed on low surface wettability on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(1): 30-35 (in Chinese).
- [25] Olivier F, Tremblay R, Bourget E, *et al.* Barnacle settlement: Field experiments on the influence of larval supply, tidal level, biofilm quality and age on *Balanus amphitrite* cyprids[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 199: 185-204.
- [26] Rao D, Webb J S, Holmström C, *et al.* Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(24): 7844-7852.
- [27] 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.
- [28] Tran C, Hadfield M G. Larvae of *Pocillopora damicornis* (Anthozoa) settle and metamorphose in response to surface-biofilm bacteria[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2011, 433: 85-96.
- [29] Donlan R M. Biofilms: Microbial life on surfaces[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(9): 881-890.
- [30] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8: 623-633.
- [31] Hall-Stoodley L, Costerton J W, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(2): 95-108.
- [32] Bao W Y, Yang J L, Satuito C G, *et al.* Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to *Alteromonas* sp. 1: evidence for two chemical cues?[J]. *Marine Biology*, 2007, 152(3): 657-666.
- [33] 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.
- [34] Kirchman D, Graham S, Reish D, *et al.* Lectins may mediate in the settlement and metamorphosis of *Janua (Dexiospira) brasiliensis* (Grube) (Polychaeta: Spirorbidae)[J]. *Marine Biology Letters*, 1982, 3(3): 131-142.
- [35] Matsumura K, Nagano M, Fusetani N. Purification of a larval settlement-inducing protein complex (SIPC) of the barnacle, *Balanus amphitrite*[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281(1): 12-20.
- [36] Khandeparker L, Anil A C, Raghukumar S. Relevance of biofilm bacteria in modulating the larval metamorphosis of *Balanus amphitrite*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 58(3): 425-438.
- [37] Moradali M F, Rehm B H A. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(4): 195-210.



## Effect of cellulose on *Pseudoalteromonas marina* biofilm biological characteristics and larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*

SHAO Anqi<sup>1,2</sup>, LI Jiazheng<sup>1,2</sup>, ZHANG Junbo<sup>3,4</sup>, WAN Rong<sup>3,4,5</sup>,  
YANG Jinlong<sup>1,2,6</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;

4. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

5. National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

6. Zhoushan Branch of National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Zhoushan 316014, China)

**Abstract:** *Mytilus coruscus* is an important economic shellfish and a typical marine macrofouling organism in China. The process of settlement and metamorphosis in its life history is a necessary condition for the survival of larvae. The effects of cellulose on the biofilms of *Pseudoalteromonas marina* biological characteristics and its effect on the larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus* were explored. Biofilms were cultured by different concentrations of cellulose (0.02, 0.2, 2 and 20 mg/L) with *P. marina* (initial bacterial density:  $5 \times 10^8$  cells/mL). The inducing activity of biofilms formed under different conditions was tested. The results showed, when *P. marina* biofilm formed with the cellulose concentration of 2 mg/L, the percentage of larval settlement and metamorphosis was 25%, which was significantly lower than that of monospecific bacterial biofilm. As the cellulose concentration increased, the bacterial density of the biofilm formed by *P. marina* and cellulose was greatly reduced, and reached the minimum at a certain concentration (20 mg/L). The bacteria were more dispersed and biofilm thickness were significantly reduced. Compared with monospecific bacterial biofilm, the biomass of  $\alpha$ -polysaccharides,  $\beta$ -polysaccharides and lipids of biofilms formed with addition of cellulose was reduced by 72.55%, 62.01% and 66.23%, respectively. While for proteins, no significant difference was observed in the presence or absence of cellulose. In the process of *P. marina* biofilm formation, cellulose indirectly regulated the larval settlement and metamorphosis by reducing the production of extracellular polysaccharides and lipids. The findings may provide a theoretical basis for exploring the molecular mechanism of *P. marina* cellulose on the formation of biofilms and the settlement and metamorphosis of *M. coruscus*, and also provide new ideas for the treatment of biofouling.

**Key words:** *Mytilus coruscus*; *Pseudoalteromonas marina*; biofilm; cellulose; settlement and metamorphosis

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

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41876159, 41476131); National Key Research and Development Program of China (2019YFC0312104, 2020YFD0900804); Program of Shanghai Academic Research Leader (20XD1421800); Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (GML2019ZD0402)