



## 紫贻贝肽对细菌生物被膜诱导贻贝稚贝附着能力的影响

周中盛<sup>1,2</sup>, 贺楚晗<sup>1,2</sup>, 林倩<sup>1,2</sup>, 梁箫<sup>1,2</sup>, 杨金龙<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海海洋大学, 科技部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)

**摘要:** 为了探究生物活性肽对海洋细菌生物被膜形成和贻贝稚贝附着的影响, 实验首先通过紫贻贝肽直接刺激厚壳贻贝稚贝, 观察其对稚贝附着的诱导能力; 随后选用具有不同诱导能力的海洋细菌假交替单胞菌和南海雷辛格氏菌, 在形成生物被膜过程中分别添加不同浓度的紫贻贝肽, 分析其对生物被膜形成及膜成分的影响, 并进一步研究生物被膜的变化对厚壳贻贝稚贝附着的影响。结果显示, 紫贻贝肽可显著诱导稚贝附着, 1.0 g/L 的紫贻贝肽诱导效果最高, 且显著提高生物被膜细菌密度和被膜胞外蛋白含量; 10.0 g/L 的紫贻贝肽诱导效果最低, 且显著降低生物被膜细菌密度和被膜胞外蛋白含量。研究表明, 不同浓度的紫贻贝肽对细菌生物被膜产生不同的影响, 从而使生物被膜诱导稚贝附着能力受到影响。综上, 紫贻贝肽可以直接诱导厚壳贻贝稚贝附着, 也能通过影响海洋细菌生物被膜的形成能力和被膜胞外蛋白含量间接影响厚壳贻贝稚贝附着。本研究可为探究生物活性肽的生理功能及其在贻贝稚贝附着阶段的调控提供新的思路。

**关键词:** 紫贻贝肽; 生物被膜; 厚壳贻贝; 稚贝; 附着

**中图分类号:** S 968.3

**文献标志码:** A

贻贝科 (Mytilidae) 广泛分布于世界各地, 是具有重要水产价值的海产经济贝类, 也是我国重要养殖贝类之一<sup>[1]</sup>。贻贝的生活史包括了浮游生活阶段和底栖生活阶段两部分, 贻贝幼虫在眼点幼虫时期进行变态发育, 褪去纤毛环, 丧失游泳能力, 随后进入底栖生活阶段的稚贝时期。在稚贝时期, 贻贝会遇到环境的变化, 当它们所处的环境不利于生存时, 会选择自行切断足丝, 重新寻找适宜环境进行二次附着<sup>[2]</sup>, 成长为成体贻贝<sup>[3]</sup>。在贻贝的筏式生产养殖过程中, 前期通过室内育苗获得变态发育完成的稚贝, 随后将稚贝包苗并投放到开放海域进行人工养殖, 此过程需要依靠稚贝稳定的附着能力以确保其产量。因此, 提高

稚贝的二次附着能力成为贻贝增养殖产业所关注的关键技术之一。

生物被膜 (biofilm) 是促进诱导贻贝幼虫变态和稚贝附着的重要诱导因素<sup>[4-5]</sup>。生物被膜通常是由菌体和细菌分泌的胞外产物如胞外多糖、胞外蛋白、神经递质、游离的核酸组成<sup>[6]</sup>。相关研究发现, 不同细菌生物被膜对贻贝附着变态的诱导能力不同, 且不同细菌在形成生物被膜过程中所产生的胞外物质也直接影响其对贻贝附着的诱导能力<sup>[7-9]</sup>。目前已有多个研究表明, 在生物被膜形成过程中添加金属离子<sup>[10]</sup>、多糖类<sup>[11-12]</sup>、蛋白类<sup>[13]</sup>、维生素<sup>[14]</sup> 等外源性物质可提高生物被膜对贻贝附着的诱导活性。但上述相关研究大部分聚焦于幼

收稿日期: 2022-12-21 修回日期: 2023-04-23

资助项目: 上海市优秀学术带头人计划 (20XD1421800); 国家重点研发计划 (2020YFD0900804); 上海市 2022 年度高端外国专家项目 (22WZ2504500); 国家自然科学基金 (41876159)

第一作者: 周中盛 (照片), 从事海洋贝类分子生物学研究, E-mail: m200100003@st.shou.edu.cn

通信作者: 杨金龙, 从事海洋贝类分子生物学研究, E-mail: jlyang@shou.edu.cn



虫的变态发育<sup>[5, 15-20]</sup>, 关于稚贝附着的研究相对较少, 因此, 提高稚贝的附着率作为生产养殖上的关键技术点, 研究生物被膜诱导稚贝附着的影响因素及机制是非常必要的。

活性肽 (bioactive peptide) 作为一种内源性的生命活性物质, 易于被生物吸收和利用<sup>[21]</sup>, 并具有能量供给、免疫力调控、生殖调节等生理功能<sup>[21-24]</sup>。然而目前, 尚未有报道表明活性肽是否可以通过调节细菌生物被膜形成来调控贻贝等海洋无脊椎动物附着。因此, 本实验以厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 稚贝作为研究对象, 通过在培养细菌生物被膜过程中添加紫贻贝活性肽探究其对细菌生物被膜的形成及生物被膜对厚壳贻贝附着的影响。从而为贻贝增殖产业的技术改良、活性肽物质应用领域的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**稚贝来源** 本研究获得了上海海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准 (SHOU-DW-2021-086), 实验过程中操作人员严格遵守上海海洋大学动物实验伦理规范, 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。实验所使用厚壳贻贝稚贝源于嵊泗县东海贻贝科技创新服务有限公司。稚贝壳长为 (0.88±0.16) mm, 壳高为 (0.55±0.12) mm。稚贝实验前经实验室养殖, 养殖水体温度为 18 °C, 气石充氧, 每 2 天换 1 次水, 所换海水均是盐度为 30 的实验室过滤海水, 所过滤膜为 0.22 μm, 每天喂食 1 次, 所喂饵料为实验室养殖的湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*)。

**细菌来源** 实验所用细菌来自于实验室保存, 从浙江省舟山市嵊泗县海域 (30°72'N、122°76'E) 挂板形成的自然生物被膜分离得到的海假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas marina*)<sup>[12]</sup> 和厚壳贻贝肠道中分离得到的南海雷辛格氏菌 (*Leisingera aquaemixtae*)<sup>[7]</sup>。

**紫贻贝肽来源** 实验所用紫贻贝肽由大连深蓝肽科技研发有限公司所研制。从紫贻贝 (*M. galloprovincialis*) 中提取所得蛋白水解产生肽, 呈黄褐色粉末状, 肽分子量不超过 1 000 u。

### 1.2 方法

**生物被膜制备** 参考杨金龙等<sup>[25]</sup>的方法来

制备实验所需的单一细菌生物被膜。将分离纯化得到的海假交替单胞菌和南海雷辛格氏菌在 25 °C 的避光环境中培养 24 h, 培养基选用 Zobell 2216E 培养基, 随后在 1 600 ×g, 离心 15 min, 弃去上清液, 并使用灭菌过滤海水 (AFSW) 清洗 3 次, 用 50 mL AFSW 重新悬浮所得到的细菌, 按实验设计方案调整细菌密度, 在一次性灭菌培养皿中加入相应的细菌悬浮液, 按实验所需分别配置不同的紫贻贝肽浓度: 0、0.1、0.3、0.5、1.0、5.0、10.0 g/L。环境条件为 18 °C 避光培养, 48 h 后分别得到实验所需的海假交替单胞菌和南海雷辛格氏菌细菌生物被膜。

**紫贻贝肽作用生物被膜稚贝附着实验** 厚壳贻贝稚贝附着实验参考杨金龙等<sup>[25]</sup>的方法。在经高温灭菌的洁净玻璃培养皿中加入制备好的生物被膜, 再缓慢加入 20 mL AFSW 和 10 只稚贝。环境温度控制在 18 °C, 避光处理。记录 12、24 和 48 h 的稚贝附着率。2 株实验细菌的生物被膜初始细菌密度均设为 1×10<sup>8</sup> 个/mL, 分别暴露在不同的紫贻贝肽浓度下即 0、0.1、0.3、0.5、1.0、5.0、10.0 g/L。各组均设 6 个平行组, 以无细菌生物被膜黏附的洁净载玻片作为空白对照组。

**生物被膜细菌密度计数** 参考 Yang 等<sup>[4]</sup>的方法, 使用 5% 甲醛溶液将生物被膜固定 24 h, 固定后 0.1% 吖啶橙染液避光染色 5 min, 后去除多余染液, 避光晾干后置于荧光显微镜 (奥林巴斯 BX51)×1 000 放大倍率下进行观察, 各实验组设置 3 个平行组, 各平行组随机取 10 个均匀视野计算细菌密度。

**生物被膜形态及厚度分析** 参考 Yang 等<sup>[4]</sup>的方法, 细菌密度设置为 1×10<sup>8</sup> 个/mL, 各肽浓度设置为 0、1.0、10.0 g/L, 对实验处理的 2 株细菌的生物被膜分别进行分析。使用 5% 甲醛溶液将生物被膜固定 30 min, 5 mg/L 碘化丙啶 (PI) 溶液避光染色 20 min, 避光晾干后在徕卡激光共聚焦扫描显微镜 (Leica TCS SP8)×630 放大倍率下拍摄, 使用 FV10-ASW 3.0 软件获取激光扫描聚焦显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) 图像, 分析生物被膜形态及厚度变化。

**共聚焦生物被膜物质拍摄** 参考 Peng 等<sup>[12]</sup>的方法, 对生物被膜进行染色。每株实验细菌的初始细菌密度设为 1×10<sup>8</sup> 个/mL, 分别暴露在不同的紫贻贝肽浓度下即 0、1.0、10.0 g/L, 分别对其进行生物被膜成分的分析。生物被膜染色前用灭

菌后的 0.9% 生理盐水轻轻涮洗 3 次, 洗去表面多余物质, 再使用 ConA-TMR、CFW 和 FITC 染液对  $\alpha$ -多糖、 $\beta$ -多糖、胞外蛋白进行避光染色 20 min, 染色后同样用灭菌后的 0.9% 生理盐水轻轻涮洗, 避光晾干后在徕卡激光共聚焦扫描显微镜 (Leica TCS SP8)  $\times 630$  放大倍率下拍摄, 使用 FV10-ASW 3.0 软件获取 CLSM 图像, 分析生物被膜  $\alpha$ -多糖、 $\beta$ -多糖、胞外蛋白含量。

**CLSM 图像分析** 参考 Peng 等<sup>[12]</sup> 的分析方法。使用 Image J 软件 (美国国立卫生研究院) 计算生物被膜的生物体积, 生物体积表示生物被膜胞外产物的单个成分的量。

**紫贻贝肽包埋实验** 紫贻贝肽包埋实验参考蔡雨珊等<sup>[13]</sup> 的方法, 将紫贻贝肽融入 0.1% 琼脂糖中并设置不同的紫贻贝肽浓度: 0、0.1、0.3、0.5、1.0、5.0 和 10.0 g/L, 待其未凝固时滴至无菌载玻片上, 待其凝固后转至装有 20 mL AFSW 的无菌玻璃培养皿中, 另置装有干净无菌的空白玻片为阴性对照, 装有海假交替单胞菌生物被膜的玻片为阳性对照, 于每组加入 10 只稚贝, 18 °C 黑暗环境中放置, 分别观察并记录 12、24、48 h 的附着率。

**数据处理** 采集数据后, 先由 Excel 2016 进行初步处理。后期用 SPSS 25.0 软件对数据进行处理分析, 所有数据均以 SEM 表示。组间差异显著性采用单因素方差分析, Duncan 多重对比检验, 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 各浓度紫贻贝肽对生物被膜的影响

**紫贻贝肽影响下生物被膜对稚贝附着的影响** 本实验选取不同稚贝附着诱导活性的 2 株海洋细菌海假交替单胞菌和南海雷辛格氏菌。实验测试了不同浓度紫贻贝肽作用下的生物被膜对稚贝附着的影响。2 株细菌在所有测试时间内对稚贝的诱导趋势基本相同, 在此选用 48 h 实验组为研究对象, 结果显示, 在 1.0 g/L 浓度中, 附着率有显著提升 ( $P < 0.05$ ); 相较于 1.0 g/L, 10.0 g/L 浓度对附着率有着显著的抑制效果, 此外, 在南海雷辛格氏菌生物被膜组中, 0.3~1.0 g/L 浓度的紫贻贝肽的附着率显著提高, 而 10.0 g/L 的附着率显著低于 0 g/L 的附着率 ( $P < 0.05$ )。实验过程中未发现稚贝死亡现象 (图 1)。

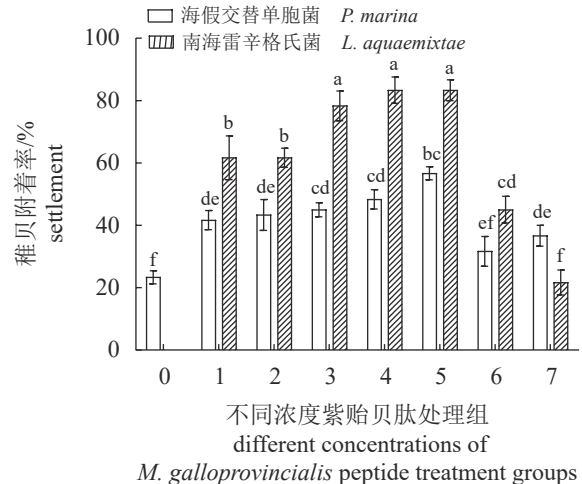


图 1 不同浓度紫贻贝肽作用的生物被膜对稚贝附着的影响

0. 空白对照, 1~7. 分别添加了 0、0.1、0.3、0.5、1.0、5.0 及 10.0 g/L 浓度紫贻贝肽。不同字母表示有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。

**Fig. 1 Percentages of *M. coruscus* juvenile settlement on biofilms with different concentrations of *M. galloprovincialis* peptide**

0. negative control, 1-7. different concentrations that 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 g/L of *M. galloprovincialis* peptide. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), the same below.

### 紫贻贝肽影响下生物被膜的细菌密度

实验探究了紫贻贝肽对 2 株海洋细菌生物被膜的细菌密度的影响。测试了各个紫贻贝肽浓度影响下的海假交替单胞菌和南海雷辛格氏菌的生物被膜细菌终密度, 结果显示, 0~1.0 g/L 的肽浓度终密度有显著提升 ( $P < 0.05$ ), 大于 1.0 g/L 的组均有显著下降, 且均小于未加肽的组 ( $P < 0.05$ ) (图 2), 此结果与稚贝附着实验结果相照应。

### 2.2 紫贻贝肽影响下生物被膜厚度及细菌形态分析

紫贻贝肽对 2 株海洋细菌生物被膜厚度及细菌形态的影响, 结果显示, 2 株细菌生物被膜的厚度均受紫贻贝肽影响, 相较于 0 g/L, 1.0 g/L 浓度会增加生物被膜的厚度, 而 10.0 g/L 浓度会显著降低生物被膜的厚度 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。观察细菌形态分布时发现, 在 10.0 g/L 浓度的紫贻贝肽影响下, 细菌分布明显减少 ( $P < 0.05$ ) (图版 I), 这与细菌密度实验结果吻合。

### 2.3 紫贻贝肽对生物被膜各物质的影响

**紫贻贝肽对海假交替单胞菌生物被膜物质的影响** 本实验发现了紫贻贝肽影响下的海假



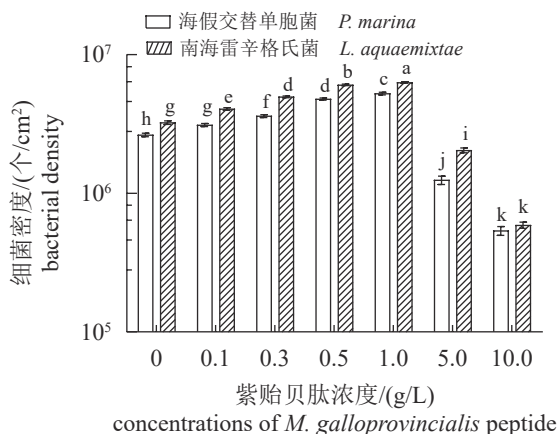


图2 紫贻贝肽对生物被膜细菌密度的影响

Fig. 2 Cell density of biofilms with different concentrations of *M. galloprovincialis* peptide

交替单胞菌生物被膜物质的变化, 结果显示,  $\alpha$ -多糖和  $\beta$ -多糖无显著变化, 1.0 g/L 的胞外蛋白相较于 0 g/L 显著提升 ( $P < 0.05$ ), 而 10.0 g/L 浓度下胞外蛋白含量显著下降, 同时显著低于 0 g/L ( $P < 0.05$ ) (图4, 图版II)。

紫贻贝肽对南海雷辛格氏菌生物被膜物质的影响 紫贻贝肽对南海雷辛格氏菌生物被膜物质的影响变化显示,  $\alpha$ -多糖含量无显著变化,

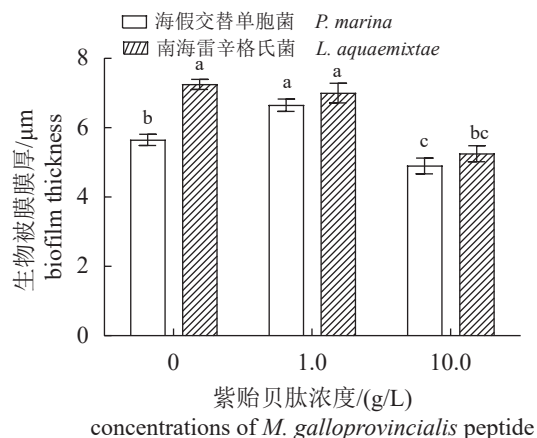


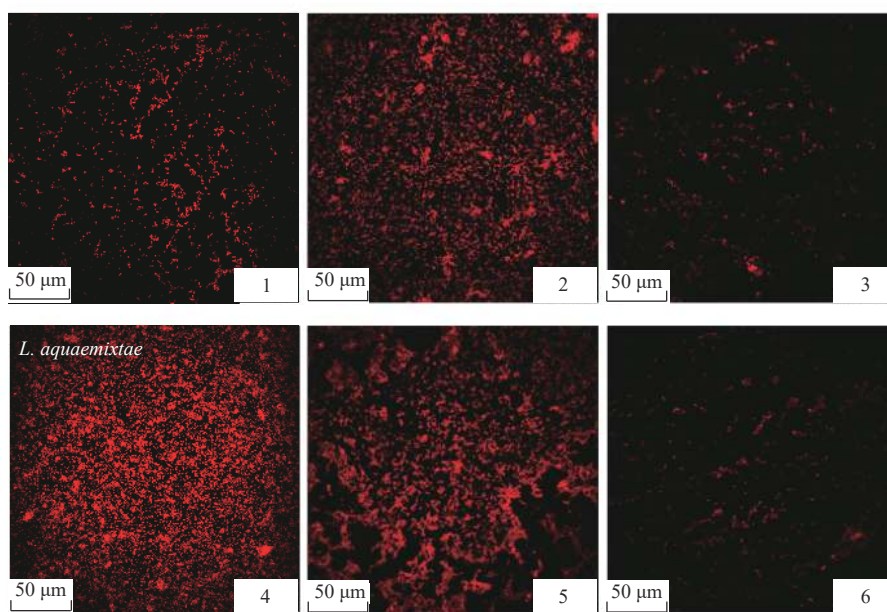
图3 紫贻贝肽对生物被膜厚度的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of *M. galloprovincialis* peptide on biofilm thickness

1.0 g/L 的  $\beta$ -多糖较 0 g/L 和 10.0 g/L 无显著变化, 胞外蛋白有显著提升 ( $P < 0.05$ ), 10.0 g/L 浓度下蛋白含量会显著下降, 且显著低于 0 g/L ( $P < 0.05$ ) (图5, 图版III)。

### 2.4 紫贻贝肽包埋实验

紫贻贝肽对稚贝附着的影响结果显示, 不同浓度紫贻贝肽在不同包埋时间对稚贝附着率无显



图版 I 激光共聚焦扫描电镜下 2 株细菌在不同紫贻贝肽浓度下形成的细菌生物被膜形态

1-3. 海假交替单胞菌分别在 0、1.0、10.0 g/L 紫贻贝肽浓度下形成的细菌生物被膜形态; 4-6. 南海雷辛格氏菌分别在 0、1.0、10.0 g/L 紫贻贝肽浓度下形成的细菌生物被膜形态; 红色代表细菌; 图版 II、III 同。

Plate I CLSM reveals the morphology of biofilms after different concentrations of *M. galloprovincialis* peptide treatment

1-3. *P. marina* biofilms formed at 0, 1.0, 10.0 g/L *M. galloprovincialis* peptide; 4-6. *L. aquaemixtae* biofilms formed at 0, 1.0, 10.0 g/L *M. galloprovincialis* peptide; the red color indicates bacteria; the same as Plate II, III.

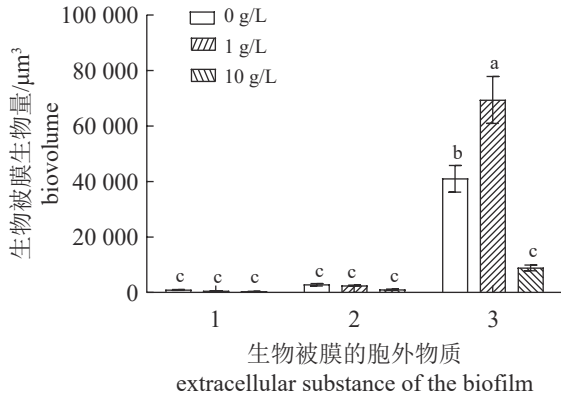


图4 紫贻贝肽对海假交替单胞菌生物被膜胞外物质的影响

1. α-多糖; 2. β-多糖; 3. 胞外蛋白; 图5同。

Fig. 4 Effect of *M. galloprovincialis* peptide on extracellular products of *P. marina* biofilms

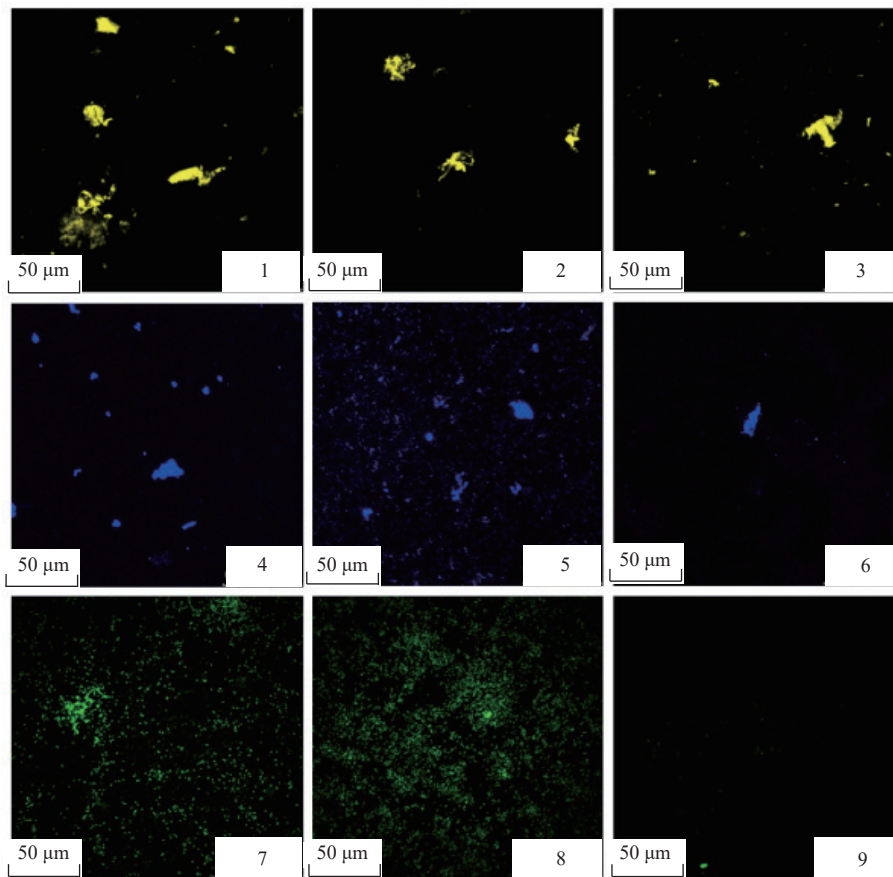
1. α-polysaccharides; 2. β-polysaccharides; 3. exoproteins; the same as Fig. 5.

著差异, 因此选用 48 h 实验组为研究对象。结果显示, 紫贻贝肽包埋组的附着诱导率均显著低于海假交替单胞菌生物被膜组 ( $P < 0.05$ ), 且除 10.0 g/L 组外其余都显著高于空白对照组和单一琼脂糖包埋组 ( $P < 0.05$ )。实验过程中未有稚贝死亡。

### 3 讨论

#### 3.1 低浓度紫贻贝肽促进生物被膜诱导稚贝附着能力

研究表明, 生物被膜上的细菌生物量和膜上物质, 如蛋白质、多糖等是影响贻贝附着的关键因素<sup>[12, 26-27]</sup>。本实验结果显示, 在细菌生物被膜形成过程中加入低浓度 (0~1.0 g/L) 的紫贻贝肽, 生物被膜的细菌密度、厚度均随肽浓度的增加而增加, 同时生物被膜对稚贝附着的诱导能力也随肽浓度的增加而增加。紫贻贝肽作为一种含氮营养



图版 II 激光共聚焦扫描电镜观察不同紫贻贝肽浓度下形成的海假交替单胞菌生物被膜胞外物质  
1~3. α-多糖; 4~6. β-多糖; 7~9. 胞外蛋白。

Plate II CLSM reveals extracellular products of *P. marina* biofilms after different concentrations of *M. galloprovincialis* peptide treatment

1-3. α-polysaccharides; 4-6. β-polysaccharides; 7-9. exoproteins.

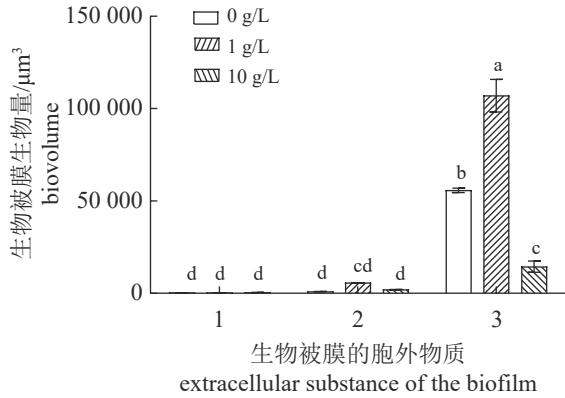
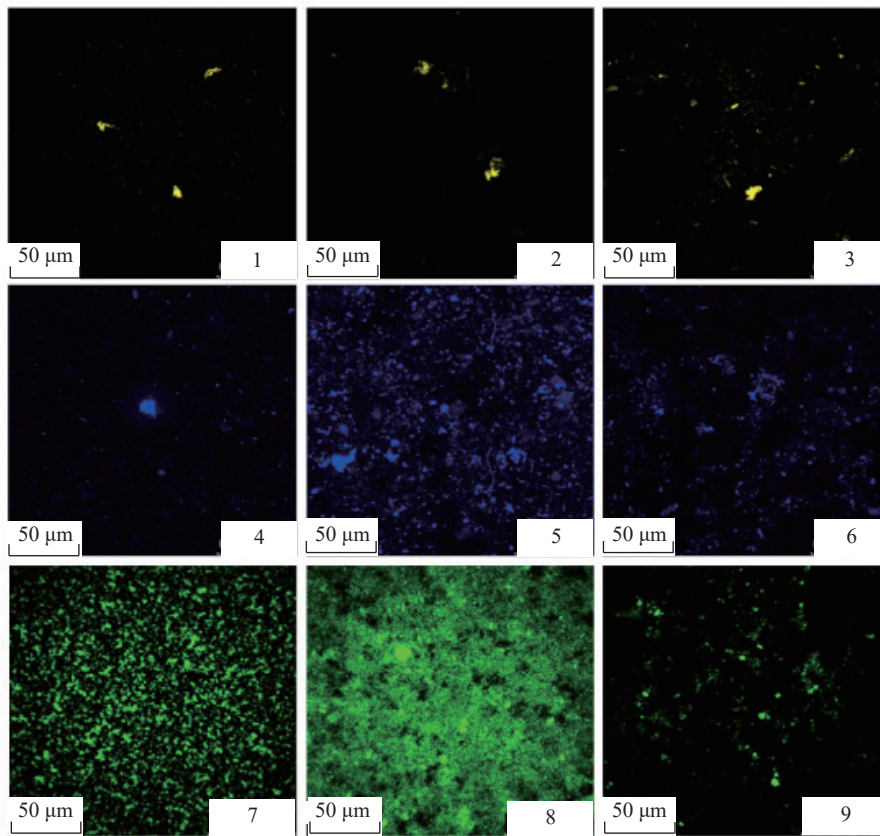


图5 紫贻贝肽对南海雷辛格氏菌生物被膜胞外物质的影响  
**Fig. 5 Effect of *M. galloprovincialis* peptide on extracellular products of *L. aquemixtae* biofilms**

素, 是细菌生长需要的必需物质, 它能够参与细胞的分裂生长<sup>[28-29]</sup>, 能够促进细菌的生长和生物被膜形成<sup>[30]</sup>。在培养细菌过程中发现 1.0 g/L 的紫贻贝肽能显著促进海假交替单胞菌的生长以及促

进南海雷辛格氏菌在对数生长期的生长。由此推测在加入较低浓度的紫贻贝肽时, 能通过增加细菌的生物量影响稚贝的附着。本实验中激光共聚焦图像发现, 在低浓度紫贻贝肽的影响下, 2 株细菌生物被膜的  $\alpha$ -多糖含量并未随着肽浓度增加而产生显著差异, 而南海雷辛格氏菌生物被膜的  $\beta$ -多糖含量却有微小的变化, 但不显著。同时, 低浓度的紫贻贝肽下, 2 株细菌生物被膜的胞外蛋白含量均随肽浓度的增加而显著提高。推测这里的生物被膜胞外蛋白含量升高, 是由于紫贻贝肽影响了生物被膜生物量, 促进生物被膜形成, 从而导致其胞外蛋白增加, 影响了稚贝的附着; 此外, Cui 等<sup>[31]</sup>的研究表示, 有的活性肽能促进细胞代谢, Lammi 等<sup>[32-33]</sup>也表示活性肽能促进细胞的葡萄糖代谢和胆固醇代谢, 因此, 推测紫贻贝肽的加入影响了生物被膜上细菌的蛋白质代谢, 即促进细菌代谢所致。针对紫贻贝肽促使细菌生物被膜胞外蛋白含量增加这一现象, 推测其是由



图版 III 激光共聚焦扫描电镜下不同紫贻贝肽浓度形成的南海雷辛格氏菌生物被膜胞外物质  
 1~3. 黄色的是  $\alpha$ -多糖; 4~6. 蓝色的是  $\beta$ -多糖; 7~9. 绿色的是胞外蛋白。

**Plate III CLSM reveals extracellular products of *L. aquemixtae* biofilms after different concentrations of *M. galloprovincialis* peptide treatment**

1-3. The yellow color indicates  $\alpha$ -polysaccharides; 4-6. The blue color indicates  $\beta$ -polysaccharides; 7-9. The green color indicates exoproteins.



于细菌生物量增加导致, 亦或是由于紫贻贝肽刺激细菌本身分泌更多代谢物质, 具体原因有待进一步研究。

### 3.2 高浓度紫贻贝肽抑制生物被膜诱导稚贝附着能力

有研究表明, 生物活性肽具有抗菌的效果<sup>[34-36]</sup>, Mitta 等<sup>[34]</sup>从紫贻贝组织中分离提取出的某些单一活性肽具有抗菌效果。本实验结果显示, 添加高浓度的紫贻贝肽 (1.0~10.0 g/L) 所形成的生物被膜会显著抑制稚贝附着, 且附着率显著低于空白对照组 (0 g/L)。为探究高浓度紫贻贝肽抑制稚贝附着的原因, 对与大于 1.0 g/L 浓度的紫贻贝肽共同形成的细菌生物被膜进一步研究, 发现高浓度的紫贻贝肽能显著降低细菌生物被膜的生物量。在培养细菌过程中发现, 10.0 g/L 浓度的紫贻贝肽对海假交替单胞菌对数生长期和南海雷辛格氏菌的整个生长时期产生显著抑制。由此推测, 高浓度的紫贻贝肽能通过抑制细菌的生物量从而影响稚贝的附着, 也印证了紫贻贝肽具有抗菌效果<sup>[34]</sup>。在激光共聚焦实验中, 2 株海洋细菌生物被膜的  $\alpha$ -多糖含量无显著差异, 南海雷辛格氏菌生物被膜的  $\beta$ -多糖含量和 2 株细菌生物被膜的胞外蛋白含量均显著下降。推测在细菌生物被膜上加入较高浓度的紫贻贝肽时, 能够显著降低生物被膜生物量, 从而使生物被膜上胞外蛋白含量显著下降, 继而影响稚贝附着。Zhong 等<sup>[37]</sup>发现, 一种类似 Brevinin-2 的抗菌肽 Brevinin-GR23 (B-GR23) 能够抑制生物被膜的形成, 且显著减少生物被膜上的胞外多糖量。Lee 等<sup>[38]</sup>发现一种从幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 核糖体蛋白中提取的 HPA3NT3 类似抗菌肽 HPA3NT3-A2, 能够抑制生物被膜形成, 消除生物被膜的胞外聚合物。Zingl 等<sup>[39]</sup>发现, 阳离子抗菌肽 PMB 能抑制细菌的高囊泡运输, 通过消耗外膜蛋白 OMP 影响细胞对外的物质输送。因此, 推测添加紫贻贝肽使生物被膜上细菌代谢水平和物质运输水平受到了抑制, 从而使胞外蛋白含量减少, 影响稚贝附着。另外, 南海雷辛格氏菌生物被膜的  $\beta$ -多糖含量的减少与低浓度下生物被膜形成能力增强时的变化趋势一致, 说明紫贻贝肽对不同种属细菌生物被膜形成过程中的影响不同, 有待进一步研究。此外, 在高浓度紫贻贝肽条件下形成的生物被膜上观察到蛋白质含量下降的现象。本实验在 1.0 g/L 浓度下形成的生物被膜上蛋白质含量上升并非由添加的紫贻贝肽本

身导致, 而是通过改变生物被膜生物学特性引起的。

### 3.3 紫贻贝肽对稚贝附着的直接影响

在添加紫贻贝肽形成生物被膜诱导稚贝附着实验中, 未排除紫贻贝肽是否对稚贝附着存在影响, 因此, 通过紫贻贝肽包埋实验进行验证。紫贻贝肽直接诱导稚贝附着实验的结果表明, 除 10.0 g/L 浓度的紫贻贝肽外, 其余浓度均对稚贝附着有着一定的促进作用, 但是其附着效果不受肽浓度影响。有研究表明, 海洋贝类源活性肽中有很多与神经相关的肽类成分<sup>[40]</sup>, 也有相关书籍记载, 神经递质可与神经肽共同参与机体调节<sup>[41]</sup>。国内外有大量实验证明了神经递质与海洋无脊椎动物的附着变态有显著相关性<sup>[18, 19, 42-44]</sup>。由此推测, 紫贻贝肽可能有神经相关成分间接参与了稚贝附着的调控。

综上, 研究发现随着紫贻贝肽浓度的升高, 低于 1.0 g/L 的紫贻贝肽可促进生物被膜中细菌密度、厚度的形成以及胞外蛋白的分泌, 进而促进稚贝附着; 高于 1.0 g/L 时结果相反。同时, 紫贻贝肽本身也对稚贝附着具有一定的诱导活性。鉴于不同浓度的紫贻贝肽影响下的生物被膜对稚贝附着有着不同的诱导趋势, 可将低浓度的紫贻贝肽应用于水产养殖行业, 为研究贻贝稚贝附着的机制提供了新的借鉴, 也为研究海洋生物活性肽的生理作用研究提供新的观点。同时, 高浓度的紫贻贝肽对稚贝附着的抑制效果能够为优化养殖环境, 防止养殖设备遭受海洋污损提供新思路。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020 (in Chinese).
- [2] 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).
- [ 3 ] 柯才焕, 冯丹青. 海洋底栖动物浮游幼体附着和变态的研究 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2006, 45(S2): 77-82.
- Ke C H, Feng D Q. Researches on larval settlement and metamorphosis of marine benthos[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(S2): 77-82 (in Chinese).
- [ 4 ] 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.
- [ 5 ] Satuito C G, Natoyama K, Yamazaki M, *et al.* Induction of attachment and metamorphosis of laboratory cultures mussel *Mytilus edulis galloprovincialis* larvae by microbial film[J]. *Fisheries Science*, 1995, 61(2): 223-227.
- [ 6 ] Flemming H C, Wingender J, Szewzyk U, *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 563-575.
- [ 7 ] 徐嘉康, 王劲松, 方怡涵, 等. 厚壳贻贝肠道细菌的生物被膜对其幼虫和稚贝附着的影响 [J]. 海洋学报, 2021, 43(9): 81-91.
- Xu J K, Wang J S, Fang Y H, *et al.* Effects of intestinal bacterial biofilms on settlement process of larvae and plantigrades in *Mytilus coruscus*[J]. *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(9): 81-91 (in Chinese).
- [ 8 ] 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).
- [ 9 ] 梁箫, 刘红雨, 杨丽婷, 等. 弧菌生物被膜的动态演替对厚壳贻贝附着的影响 [J]. 水产学报, 2020, 44(1): 118-129.
- Liang X, Liu H Y, Yang L T, *et al.* Effects of dynamic succession of *Vibrio* biofilms on settlement of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(1): 118-129 (in Chinese).
- [10] 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).
- [11] 陈慧娥, 贺康, 贺楚晗, 等. 藻酸盐对海假交替单胞菌生物被膜形成及厚壳贻贝附着变态的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(4): 620-626.
- Chen H E, He K, He C H, *et al.* Effects of alginate on biofilm formation of *Pseudoalteromonas marina* and larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(4): 620-626 (in Chinese).
- [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] 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]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2021, 43(4): 75-83 (in Chinese).
- [14] 杨金龙, 段志鸿, 丁文扬, 等. 维生素 B7 和 B12 对细菌生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫变态的影响 [J]. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 113-123.
- Yang J L, Duan Z H, Ding W Y, *et al.* Effects of VB7 and VB12 on biofilm formation and larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(5): 113-123 (in Chinese).
- [15] Hadfield M G. Why and how marine-invertebrate larvae metamorphose so fast[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2001, 12(1): 1-10.
- 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



- mental Biology, 2000, 11(6): 437-443.
- [16] Li Y F, Cheng Y L, Chen K, *et al.* Thyroid hormone receptor: a new player in epinephrine-induced larval metamorphosis of the hard-shelled mussel[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 287: 113347.
- [17] Yamamoto H, Satuito C G, Yamazaki M, *et al.* Neurotransmitter blockers as antifoulants against planktonic larvae of the barnacle *Balanus amphitrite* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Biofouling*, 1998, 13(1): 69-82.
- [18] García-Lavandeira M, Silva A, Abad M, *et al.* Effects of GABA and epinephrine on the settlement and metamorphosis of the larvae of four species of bivalve molluscs[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 316(2): 149-156.
- [19] Liang X, Chen K, Li Y F, *et al.* An  $\alpha_2$ -adrenergic receptor is involved in larval metamorphosis in the mussel, *Mytilus coruscus*[J]. *Biofouling*, 2019, 35(9): 986-996.
- [20] Yang J L, Li S H, Bao W Y, *et al.* Effect of different ions on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(1): 155-162.
- [21] 黄德娟, 黄德超. 生物活性肽 [J]. 生物学通报, 2006, 41(4): 17-18.  
Huang D J, Huang D C. Biologically active peptides[J]. *Bulletin of Biology*, 2006, 41(4): 17-18 (in Chinese).
- [22] 马文领, 秦铁军, 孙永华. 生物活性肽功能分类及研究进展 [J]. 中华损伤与修复杂志 (电子版), 2019, 14(2): 149-152.  
Ma W L, Qin T J, Sun Y H. The classification and advances of bioactive peptides[J]. *Chinese Journal of Injury Repair and Wound Healing (Electronic Edition)*, 2019, 14(2): 149-152 (in Chinese).
- [23] Daliri E B M, Oh D H, Lee B H. Bioactive peptides[J]. *Foods*, 2017, 6(5): 32.
- [24] Sánchez A, Vázquez A. Bioactive peptides: a review[J]. *Food Quality and Safety*, 2017, 1(1): 29-46.
- [25] 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]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(3): 421-428 (in Chinese).
- [26] Hadfield M G. Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2011, 3: 453-470.
- [27] 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.
- [28] Bhattacharyya S K, Banerjee A B. D-amino acids in the cell pool of bacteria[J]. *Folia Microbiologica*, 1974, 19(1): 43-50.
- [29] Tomlinson N, MacLeod R A. Nutrition and metabolism of marine bacteria. V. The inhibition of growth of a marine bacterium by amino acids and the development of resistant strains[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1957, 70(2): 477-490.
- [30] Shen Y, Zhu W, Chen C, *et al.* Biofilm formation in attached microalgal reactors[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39(8): 1281-1288.
- [31] Cui H W, Han W Y, Zhang J Y, *et al.* Advances in the regulatory effects of bioactive peptides on metabolic signaling pathways in tumor cells[J]. *Journal of Cancer*, 2019, 10(11): 2425-2433.
- [32] Lammi C, Zanoni C, Arnoldi A. Three peptides from soy glycinin modulate glucose metabolism in human hepatic HepG2 cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(11): 27362-27370.
- [33] Lammi C, Aiello G, Bollati C, *et al.* Trans-epithelial transport, metabolism, and biological activity assessment of the multi-target lupin peptide LILPKHSDAD (P5) and its metabolite LPKHSDAD (P5-Met)[J]. *Nutrients*, 2021, 13(3): 863.
- [34] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, *et al.* Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(17): 12954-12962.
- [35] Jennings M C, Ator L E, Paniak T J, *et al.* Biofilm-erad-

- icating properties of quaternary ammonium amphiphiles: simple mimics of antimicrobial peptides[J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(15): 2211-2215.
- [36] Nagant C, Pitts B, Nazmi K, *et al.* Identification of peptides derived from the human antimicrobial peptide LL-37 active against biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* using a library of truncated fragments[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(11): 5698-5708.
- [37] Zhong H R, Xie Z P, Zhang S X, *et al.* Brevinin-GR23 from frog *Hylarana guentheri* with antimicrobial and antibiofilm activities against *Staphylococcus aureus*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2020, 84(1): 143-153.
- [38] Lee J K, Mereuta L, Luchian T, *et al.* Antimicrobial peptide HPA3NT3-A2 effectively inhibits biofilm formation in mice infected with drug-resistant bacteria[J]. *Biomaterials Science*, 2019, 7(12): 5068-5083.
- [39] Zingl F G, Kohl P, Cakar F, *et al.* Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and *in vivo* adaptation of *Vibrio cholerae*[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 27(2): 225-237. e8.
- [40] 李华. 贝类神经肽研究进展 [J]. *生命科学仪器*, 2007, 5(1): 13-16.  
Li H. Advanced study of neuropeptides in the mollusks[J]. *Life Science Instruments*, 2007, 5(1): 13-16 (in Chinese).
- [41] 谢启文. 神经肽 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004: 93-96.  
Xie Q W. Neuropeptides [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2004: 93-96 (in Chinese).
- [42] Coon S L, Bonar D B. Pharmacological evidence that alpha 1-adrenoceptors mediate metamorphosis of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Neuroscience*, 1987, 23(3): 1169-1174.
- [43] 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.
- [44] Yang J L, Li W S, Liang X, *et al.* Effects of adrenoceptor compounds on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 426-427: 282-287.

## Effects of *Mytilus galloprovincialis* peptide on settlement of mussel juveniles induced by bacterial biofilms

ZHOU Zhongsheng<sup>1,2</sup>, HE Chuhan<sup>1,2</sup>, LIN Qian<sup>1,2</sup>, LIANG Xiao<sup>1,2</sup>, YANG Jinlong<sup>1,2\*</sup>

(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 Aquaculture Animals, Shanghai, 201306, China)

**Abstract:** In order to study the effects of the marine bioactive peptide on the formation of marine bacterial biofilm and settlement of the marine mussel juveniles, this study investigated *Mytilus coruscus* juvenile response stimulated by agarose encapsulation with different concentrations of *M. galloprovincialis* peptide and observed its induction capacity on *M. coruscus* juvenile settlement. Then, two strains of marine bacteria with different settlement induction abilities were selected including *Pseudoalteromonas marina* and *Leisingera aquaemixtae*. Different concentrations of *M. galloprovincialis* peptide were added into the bacterial fluid during biofilm formation. The effects of *M. galloprovincialis* peptide on biofilm formation and biological characteristics were analyzed. Meanwhile, the effect of biofilm changes on *M. coruscus* juvenile settlement was studied. The result of *M. coruscus* juvenile settlement bioassays showed that *M. galloprovincialis* peptide could significantly induce *M. coruscus* juvenile settlement ( $P<0.05$ ). Besides, the effect of 1.0 g/L *M. galloprovincialis* peptide which was added during the formation of biofilm on settlement induction of *M. coruscus* juveniles was the most significant ( $P<0.05$ ) and the effect of 10.0 g/L *M. galloprovincialis* peptide on settlement of *M. coruscus* juveniles was lowest ( $P<0.05$ ). In further experiment on biofilms, such as biofilm bacterial density counting, biofilm thickness measurement and confocal laser scanning of extracellular products of biofilms, it was found that the induction effect of 1.0 g/L *M. galloprovincialis* peptide was most significant ( $P<0.05$ ) and 1.0 g/L *M. galloprovincialis* peptide significantly increased the bacterial density and exoprotein content of biofilms ( $P<0.05$ ). However, 10.0 g/L *M. galloprovincialis* peptide was significantly decreased the bacterial density and protein content of biofilms ( $P<0.05$ ). The results showed that *M. galloprovincialis* peptide could directly affect the settlement of *M. coruscus* juveniles and indirectly affect the settlement of *M. coruscus* juveniles by affecting the biofilm formation level and exoprotein content of marine bacterial biofilms. These results provided a new insight for exploring the role of marine bioactive peptides in settlement of *M. coruscus* juveniles. This study provided a new approach for studying the physiological function of bioactive peptides from marine shellfish.

**Key words:** *Mytilus galloprovincialis* peptide; biofilm; *Mytilus coruscus*; mussel juvenile; settlement

**Corresponding author:** YANG Jinlong. E-mail: [jlyang@shou.edu.cn](mailto:jlyang@shou.edu.cn)

**Funding projects:** Program of Shanghai Academic Research Leader (20XD1421800); National Key Research and Development Program of China (2020YFD0900804); The Shanghai Foreign High-End Talent Project (22WZ2504500); National Natural Science Foundation of China (41876159)