

## 研究报告

## 海洋希瓦氏菌群体感应对生物被膜形成及厚壳贻贝附着变态的影响

张力伟<sup>1,2,3</sup>, 侯明仪<sup>1,2,3</sup>, 陶钰<sup>1,2,3</sup>, 杨金龙<sup>1,2,3</sup>, 梁箫<sup>\*1,2,3</sup>

1 上海海洋大学 水产与生命学院 国家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

3 中国-葡萄牙星海“一带一路”联合实验室, 上海 200120

张力伟, 侯明仪, 陶钰, 杨金龙, 梁箫. 海洋希瓦氏菌群体感应对生物被膜形成及厚壳贻贝附着变态的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3422-3437.

ZHANG Liwei, HOU Mingyi, TAO Yu, YANG Jinlong, LIANG Xiao. Quorum sensing of *Shewanella marisflavi* influences biofilm formation and the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3422-3437.

**摘要:**【背景】细菌群体感应系统调控生物被膜形成, 其在海洋无脊椎动物附着变态中发挥重要作用, 因此了解群体感应、生物被膜和海洋无脊椎动物变态之间的关系具有重要意义。【目的】通过添加群体感应抑制剂探究细菌群体感应与生物被膜形成及厚壳贻贝附着变态三者之间的关系。

【方法】将不同的群体感应抑制剂(2-5H-呋喃酮、2-4-噻唑烷二酮、邻苯三酚、呋喃酮 C-30、香豆素)作用于海洋希瓦氏菌(*Shewanella marisflavi*), 利用激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)观察其生物被膜胞外物质的含量, 并以厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)为模型, 探究群体感应抑制剂干扰后的细菌生物被膜对厚壳贻贝附着变态的影响。【结果】群体感应抑制剂可改变希瓦氏菌生物被膜特性, 通过减少生物被膜胞外  $\alpha$  多糖、蛋白含量, 进而降低生物被膜对厚壳贻贝附着变态的诱导率。【结论】希瓦氏菌群体感应系统可调控生物被膜胞外活性物质的含量, 进而间接影响厚壳贻贝幼虫变态能力。

**关键词:** 生物被膜; 群体感应; 厚壳贻贝; 附着变态

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFE0204600, 2023YFE0115500, 2023YFD2401902)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFE0204600, 2023YFE0115500, 2023YFD2401902).

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

Received: 2023-12-11; Accepted: 2024-02-07; Published online: 2024-04-07

# Quorum sensing of *Shewanella marisflavi* influences biofilm formation and the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*

ZHANG Liwei<sup>1,2,3</sup>, HOU Mingyi<sup>1,2,3</sup>, TAO Yu<sup>1,2,3</sup>, YANG Jinlong<sup>1,2,3</sup>, LIANG Xiao<sup>\*1,2,3</sup>

1 International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green-culture of Aquaculture Animals, Shanghai 201306, China

3 China-Portugal Belt and Road Joint Laboratory on Space & Sea Technology Advanced Research, Shanghai 200120, China

**Abstract:** [Background] Biofilms as the main existing form of marine bacteria are related to the settlement and metamorphosis of marine invertebrates and regulated by quorum sensing, and thus it is of great significance to understand the relationship between quorum sensing, biofilm formation, and marine invertebrate metamorphosis. [Objective] To explore the relationship between quorum sensing, biofilm formation, and settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus* by adding quorum sensing inhibitors. [Methods] Different quorum sensing inhibitors (2-5H-furanone, 2-4-thiazolidinedione, pyrogallol, furanone C-30, and coumarin) were applied to *Shewanella marisflavi*, and the extracellular polymeric substance content of the biofilm was observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). With *M. coruscus* as the model, the effects of bacterial biofilms interfered by quorum sensing inhibitors on the settlement and metamorphosis of *M. coruscus* were studied. [Results] Quorum sensing inhibitors decreased the content of extracellular  $\alpha$ -polysaccharide and protein in the biofilm of *Shewanella*. Furthermore, the post-larval rate of *M. coruscus* was decreased. [Conclusion] The quorum sensing system of *S. marisflavi* can regulate the extracellular polymeric substance content of the biofilm, thus indirectly influencing the settlement and metamorphosis of *M. coruscus*.

**Keywords:** biofilm; quorum sensing; *Mytilus coruscus*; settlement and metamorphosis

在海洋环境中, 生物被膜是海洋细菌的主要存在形式<sup>[1]</sup>, 由细菌菌体和其分泌的蛋白质、多糖、DNA 等胞外聚集体(extracellular polymeric substance, EPS)构成<sup>[2]</sup>。细菌生物被膜可诱导许多海洋无脊椎动物如棘皮动物<sup>[3]</sup>、软体动物<sup>[4]</sup>、环节动物<sup>[5-6]</sup>幼体的变态行为, 其种属、日龄、密度、群落组成、代谢产物等都会影响它们对幼虫变态的影响<sup>[7-9]</sup>。

以往许多研究证实, 群体感应(quorum sensing, QS)可调控细菌生物被膜的形成<sup>[10]</sup>。细

菌群体感应是一种响应种群密度及自诱导物后与转录因子相互作用进而调节一系列功能基因的表达<sup>[11]</sup>。不同类型群体感应系统通过不同自诱导物发挥功能<sup>[12]</sup>, AI-1 信号分子包括两类, 革兰氏阳性菌可释放小分子寡肽类物质(auto-inducing peptide, AIP)进行种内交流, 革兰氏阴性菌则依靠酰基高丝氨酸内酯类(acyl-homoserine lactone, AHL)物质进行种内交流<sup>[13]</sup>; 而在细菌种间还存在一种呋喃酰硼酸二酯(autoinducer-2, AI-2)的信号分子<sup>[14]</sup>, 对自然环境中的细菌交流具有重要

意义。Davies 等<sup>[15]</sup>在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的研究中发现 AHL 可以调控细菌的黏附及游动能力; Davey 等<sup>[16]</sup>的研究发现, 群体感应可调控细菌鼠李糖脂的表达, 而其在维持生物被膜的结构稳定中发挥重要作用; 在对洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)的研究中发现, 其生物被膜的发育与成熟受到群体感应的影响<sup>[17]</sup>。

群体感应对生物被膜形成的调控机制研究较为透彻, 但其对海洋无脊椎动物幼虫变态的影响研究较少。本研究选取海洋希瓦氏菌(*Shewanella marisflavi*) ECSMB14101<sup>[18]</sup>为研究对象, 通过在其生物被膜形成过程中添加信号分子 AHL 和 AI-2 的抑制剂, 观察细菌群体感应对生物被膜形成及厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)附着变态的影响, 探究细菌群体感应与生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态三者之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

厚壳贻贝幼虫处于眼点阶段, 取自浙江省舟山市嵊泗县, 实验开始前, 幼虫在室内 18 °C 黑暗环境中暂养 7 d 后使用  $10^{-4}$  mol/L 肾上腺素(epinephrine, EPI)对幼虫进行活性测试, 达标后进行后续变态试验。

海洋希瓦氏菌(*Shewanella marisflavi*) ECSMB14101 分离自东海自然生物被膜(NCBI 保藏号: MCCC1K03543)<sup>[18]</sup>。

#### 1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

2216E 培养基, Sigma 公司。2(5H)-呋喃酮、呋喃酮 C-30、香豆素、邻苯三酚、2-4-噻唑烷二酮、N-(3-氧代十二烷酰基)-L-高丝氨酸内酯(N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone)、4,5-二羟基-2,3-戊二酮(4,5-dihydroxy-2,3-

pentanedione, DPD)、吖啶橙、半胱氨酸盐酸盐和品红, Sigma 公司; 荧光染料 PI、ConA-TMR、Calcofluor white、DiD'oil、异硫氰酸荧光素酯(fluorescein isothiocyanate, FITC), 英潍捷基上海贸易有限公司。荧光显微镜, Olympus 公司; 激光扫描共聚焦显微镜, Leica 公司。

### 1.2 菌悬液的制备

菌悬液的制备参考 Yang 等<sup>[19]</sup>的方法并稍加改进, 吸取 *S. marisflavi* 保种液接种于 2216E 液体培养基中, 25 °C、200 r/min 培养过夜。培养后的菌液于 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 保留沉淀, 加入过滤灭菌海水(autoclaved filtered seawater, AFSW)吹打混匀, 重复上述步骤 3-4 次, 洗去多余培养基及代谢产物, 直至上清液清澈, 经过吖啶橙染色计数得到离心管中细菌浓度。

### 1.3 群体感应抑制剂的配制

前期预实验发现抑制剂的最适浓度如表 1 所示, 2(5H)-呋喃酮、呋喃酮 C-30、香豆素和邻苯三酚均溶于灭菌过滤海水; 2-4-噻唑烷二酮需用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)助溶, 现配现用。

表 1 群体感应抑制剂及靶标信号分子<sup>[20]</sup>

Table 1 Quorum sensing inhibitors and target signaling molecules<sup>[20]</sup>

名称 Name	最适浓度 Optimum concentration (mol/L)	靶标信号分子 Target signaling molecule
2(5H)-呋喃酮	$10^{-5}$	AI-2
2(5H)-furanone		
2-4-噻唑烷二酮	$10^{-5}$	AI-2
2-4-thiazolidinedione		
邻苯三酚 Pyrogallol	$10^{-5}$	AI-2
呋喃酮 C-30	$10^{-3}$	AHL
Furanone C-30		
香豆素 Coumarin	$10^{-4}$	AHL

AHL: 酰基高丝氨酸内酯

AHL: Acyl-homoserine lactone.

#### 1.4 抑制剂与 *Shewanella marisflavi* 共同培养形成生物被膜

将灭菌后的干净玻片放入无菌一次性培养皿中,充当细菌附着基质,加入 2(5H)-呋喃酮、呋喃酮 C-30、香豆素、邻苯三酚、2-4-噻唑烷二酮母液与 1.2 中制备的菌悬液,使用 AFSW 定容至 20 mL,使其细菌终浓度均为  $5 \times 10^8$  cells/mL,2(5H)-呋喃酮、2-4-噻唑烷二酮及邻苯三酚的终浓度为  $10^{-5}$  mol/L,呋喃酮 C-30 终浓度为  $10^{-3}$  mol/L,香豆素终浓度为  $10^{-4}$  mol/L,每个浓度设有 9 个平行,设置 DMSO 对照组,18 °C 黑暗环境下培养 48 h,在玻片上形成生物被膜。

#### 1.5 生物被膜细菌密度计数

取出生物被膜浸没于福尔马林溶液 24 h,使用 0.1% 吖啶橙染液染色 5 min,避光干燥后在玻片中央滴加一滴镜油,盖上盖玻片后,在荧光显微镜下随机选取 10 个均匀视野进行计数,目镜上存在  $10 \times 10$  的计数格(每个小格大小为  $0.01 \text{ cm} \times 0.01 \text{ cm}$ ),计数 100 格中细菌数量,每个视野下平均 100 格内的细菌个数 $\times$ 物镜放大倍数的平方得出此视野下的细菌密度,每组设置 3 个平行,相关步骤方法参考 Yang 等<sup>[19]</sup>。

#### 1.6 厚壳贻贝幼虫变态试验

取出培养 48 h 的生物被膜,用 AFSW 缓缓洗去生物被膜表面浮游细菌与抑制剂,在每个灭菌玻璃皿中加入 20 mL AFSW,放入 1 片生物被膜,并挑选 20 只游动、活力好的眼点幼虫加到玻璃皿中,在 18 °C 黑暗环境下每隔 12 h 观察变态幼虫个体数,持续到 96 h,并以 96 h 的变态数除以所加幼虫数,计算 96 h 变态率。

#### 1.7 生物被膜胞外物质及膜厚分析

取出抑制剂处理后的细菌生物被膜,拍摄膜厚的生物被膜提前放入福尔马林溶液中固定 2 h,后使用 PI 染色 20 min;胞外物质染色方

法参考 González-Machado 等<sup>[21]</sup>并稍加改进,拍摄胞外物质的生物被膜用 AFSW 轻轻冲洗后,使用 ConA-TMR 染色  $\alpha$  多糖,用 Calcofluor white 染色  $\beta$  多糖,用 DiD'oil 染色脂质,均染色 20 min,用 FITC 染色蛋白,染色 30 min 后洗去多余染料,避光干燥,利用激光扫描共聚焦显微镜的 LAS X 软件拍摄胞外物质染色图像及生物被膜膜厚,在  $63 \times$  油镜下观察图像。软件参数设置:像素  $1024 \times 1024$ , z-step 为  $0.2 \mu\text{m}$ ,逐层扫描。生物被膜膜厚通过单层膜厚( $0.2 \mu\text{m}$ )乘以拍摄层数得出,胞外物质图像使用 Image J 计算阈值,阈值转换为生物量(体积)。软件分析参考 <https://cnij.imjoy.io/> 及 <https://imagej.nih.gov/ij/>。

#### 1.8 可拉酸的定量及定性

可拉酸的定性及定量参考 Obadia 等<sup>[22]</sup>的方法并稍加改进,提前配制 100 mL 溶液甲( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}$  体积比为 6:1)与 10 mL 溶液乙(3%的半胱氨酸盐酸盐)。*S. marisflavi* 与抑制剂共同成膜 48 h 后,将其刮取到 1.5 mL 离心管中,蒸馏水定容至 1 mL,水煮 10 min 后  $13000 \text{ r/min}$  离心 15 min,收集上清,分装到 15 mL 无酶离心管后加入 4.5 mL 溶液甲,水煮 20 min。冷却至室温后,取上述溶液分别检测 396 nm 和 427 nm 处吸光度(分别记为 A、B)。向剩余溶液中加入 100  $\mu\text{L}$  溶液乙,混匀后在 25 °C 黑暗环境下反应 1 h,在 396 nm 和 427 nm 下测吸光度(分别记为 A'、B')。通过不同浓度 L-岩藻糖构建标准曲线,按照公式  $(A'-A)-(B'-B)$  计算吸光度的差值,将计算结果代入标准曲线计算得到可拉酸的浓度。

品红溶液: 0.3 g 碱性品红溶于 90 mL 5% 苯酚与 10 mL 95% 乙醇的混合液。媒染剂: 5 mL 浓度为 2 g/L 的硫酸铝钾与 2 mL 0.3 g/L 三氯化铁和 2 mL 浓度为 1.5 g/L 的单宁酸充分混合。使用吹风机冷风远距离吹干培养 48 h 的细菌生物被膜,品红溶液染色 10 min,用蒸馏水洗净多余

染料,干燥后使用媒染剂染色 5 min,蒸馏水洗净干燥后用亚甲基蓝(1%)染色 1 s,蒸馏水洗净干燥后油镜(100×)观察并拍照。

### 1.9 信号分子直接刺激对厚壳贻贝幼虫变态的影响

将 AHLs (N-(3-氧代十二烷酰基)-L-高丝氨酸内酯)与 AI-2 (DPD)加入无菌玻璃培养皿中,用 AFSW 定容至 20 mL,使其终浓度分别为 0.2、0.5、1.0 和 2.0 mg/L,加入眼点期幼虫后,变态试验具体方法同 1.6。

### 1.10 数据分析

使用软件 Prism 6 作图,使用 JMP 10 进行差异性分析,使用 SPSS 软件分析各实验结果之间的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 群体感应抑制剂对生物被膜细菌密度及膜厚的影响

抑制剂对 *S. marisflavi* 生物被膜细菌密度及膜厚的影响如图 1 所示,添加抑制剂后生物被膜细菌密度显著降低( $P<0.05$ ),不同种类的抑制剂对细菌密度的抑制效果不同,添加 2(5H)-呋喃酮的细菌密度( $3.54\times 10^7$  cells/cm<sup>2</sup>)最显著( $P<0.05$ ),降低 48.55% (图 1A)。相较于单一细菌生物被膜的膜厚(5.83  $\mu\text{m}$ ),添加抑制剂后形成的生物被膜膜厚均显著下降( $P<0.05$ ),效果最显著的邻苯三酚(3.20  $\mu\text{m}$ ),膜厚下降 41.68% (图 1B);添加香豆素的生物被膜细菌较为聚集,呈块状分布(图 1C)。

### 2.2 群体感应抑制剂对细菌生物被膜胞外 $\alpha$ 多糖的影响

为进一步探究抑制剂对 *S. marisflavi* 生物被膜胞外产物的影响,通过 CLSM 发现, $\alpha$  多糖含量较未添加抑制剂的生物被膜( $5\,077.22\,\mu\text{m}^3$ )均显著下降( $P<0.05$ ),其中添加呋喃酮 C-30

( $2\,078.43\,\mu\text{m}^3$ )的效果最为显著,下降 59.06% (图 2)。

### 2.3 群体感应抑制剂对细菌生物被膜胞外 $\beta$ 多糖的影响

添加抑制剂后 *S. marisflavi* 生物被膜胞外  $\beta$  多糖含量如图 3 所示, $\beta$  多糖相较于未添加抑制剂的细菌生物被膜无显著变化( $P>0.05$ )。

### 2.4 群体感应抑制剂对细菌生物被膜胞外蛋白的影响

抑制剂对胞外蛋白的影响如图 4 所示,添加呋喃酮 C-30 的细菌生物被膜胞外蛋白含量无显著变化( $P>0.05$ ),而添加 2(5H)-呋喃酮、香豆素、邻苯三酚与 2-4-噻唑烷二酮的细菌生物被膜胞外蛋白含量显著下降( $P<0.05$ ),其中添加 2-4-噻唑烷二酮的细菌生物被膜胞外蛋白含量( $612.36\,\mu\text{m}^3$ )变化最为显著( $P<0.05$ ),降低 85.40%。

### 2.5 群体感应抑制剂对细菌生物被膜胞外脂质的影响

抑制剂对胞外脂质的影响如图 5 所示,添加呋喃酮 C-30 的细菌生物被膜胞外脂质含量( $254.47\,\mu\text{m}^3$ )显著上升( $P<0.05$ ),增加了 3.85 倍;而添加其他抑制剂的实验组细菌生物被膜胞外脂质含量均无显著变化( $P>0.05$ )。

### 2.6 群体感应抑制剂对细菌生物被膜胞外多糖可拉酸的影响

如图 6 所示,添加不同群体感应抑制剂的细菌生物被膜胞外可拉酸含量均显著下降( $P<0.05$ ),其中添加邻苯三酚的细菌生物被膜胞外可拉酸含量( $147.71\,\mu\text{g/mL}$ )降低了 36.10%。

### 2.7 群体感应抑制剂对厚壳贻贝幼虫变态的影响

由图 7 可知,抑制剂的添加降低了厚壳贻贝幼虫的变态率,其中添加 2(5H)-呋喃酮后变态率降低了 41.18%,效果最为显著。

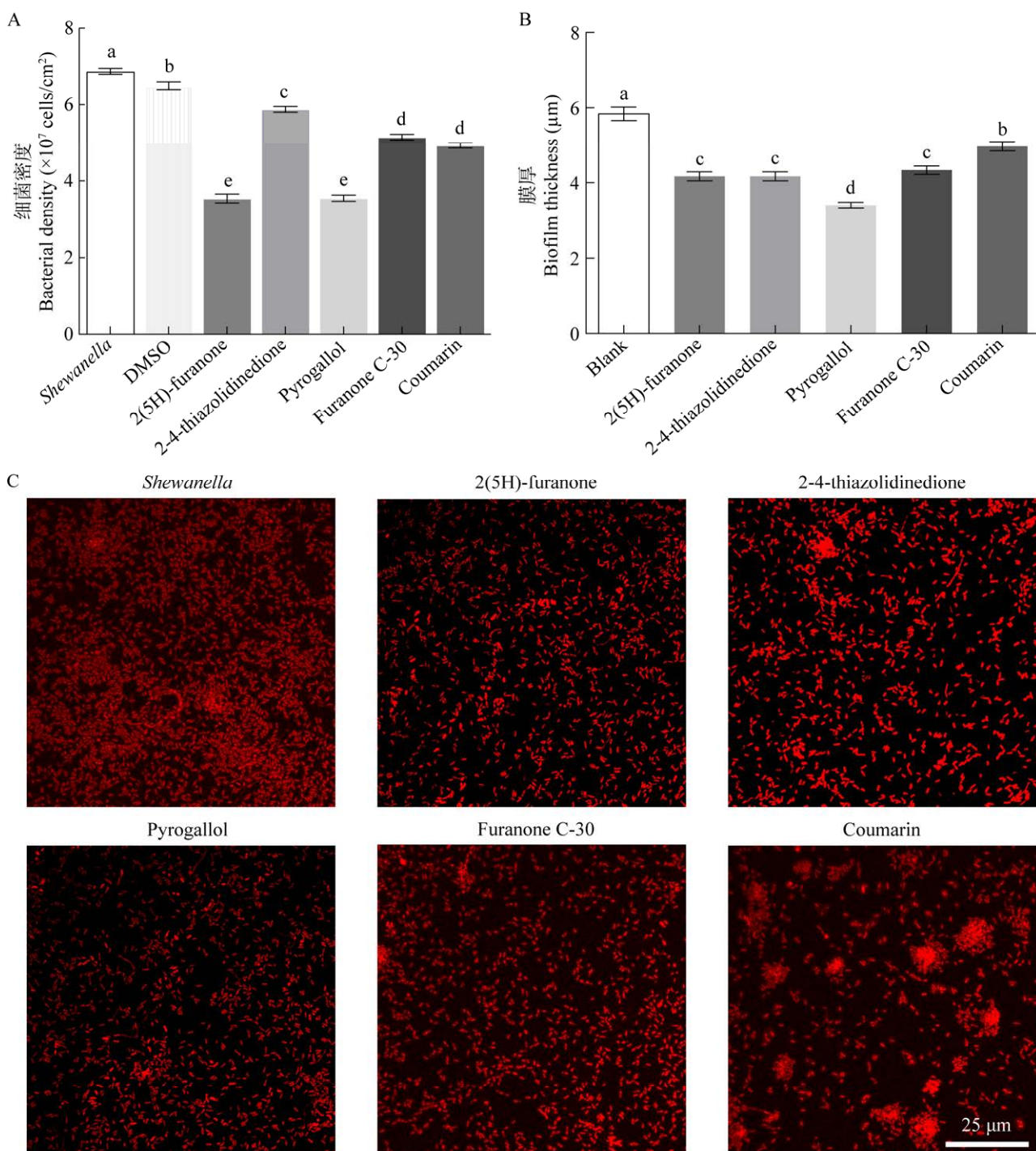


图 1 群体感应抑制剂对生物被膜的细菌密度(A)、膜厚(B)及染色图像(C)的影响 *Shewanella*: 未添加抑制剂的单一希瓦氏菌生物被膜. 不同小写字母表示柱间差异显著( $P<0.05$ ), 下同

Figure 1 The effect of quorum sensing inhibitors on bacterial density (A), membrane thickness (B), and staining image (C) of biofilms. *Shewanella*: Single *shewanella* biofilm without added inhibitor. Different lowercase letters indicate significant differences between columns ( $P<0.05$ ). The same below.



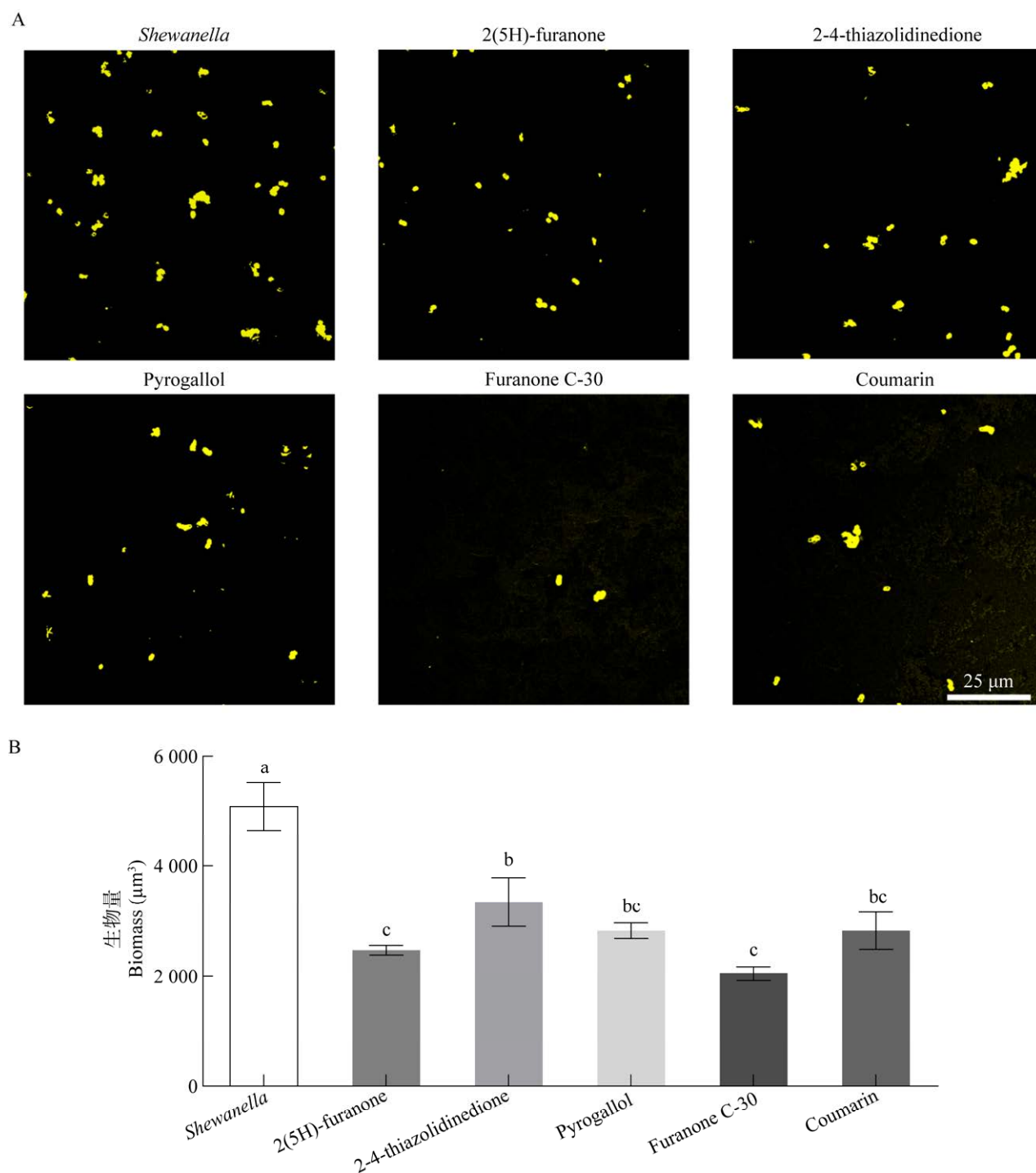


图2 群体感应抑制剂对生物被膜胞外 $\alpha$ 多糖的染色图像(A)和生物量(B)的影响 *Shewanella*: 未添加抑制剂的单一希瓦氏细菌生物被膜

Figure 2 The effect of quorum sensing inhibitors on staining images (A) and biomass (B) of extracellular  $\alpha$  polysaccharides in biofilms. *Shewanella*: Single *shewanella* biofilm without added inhibitor.

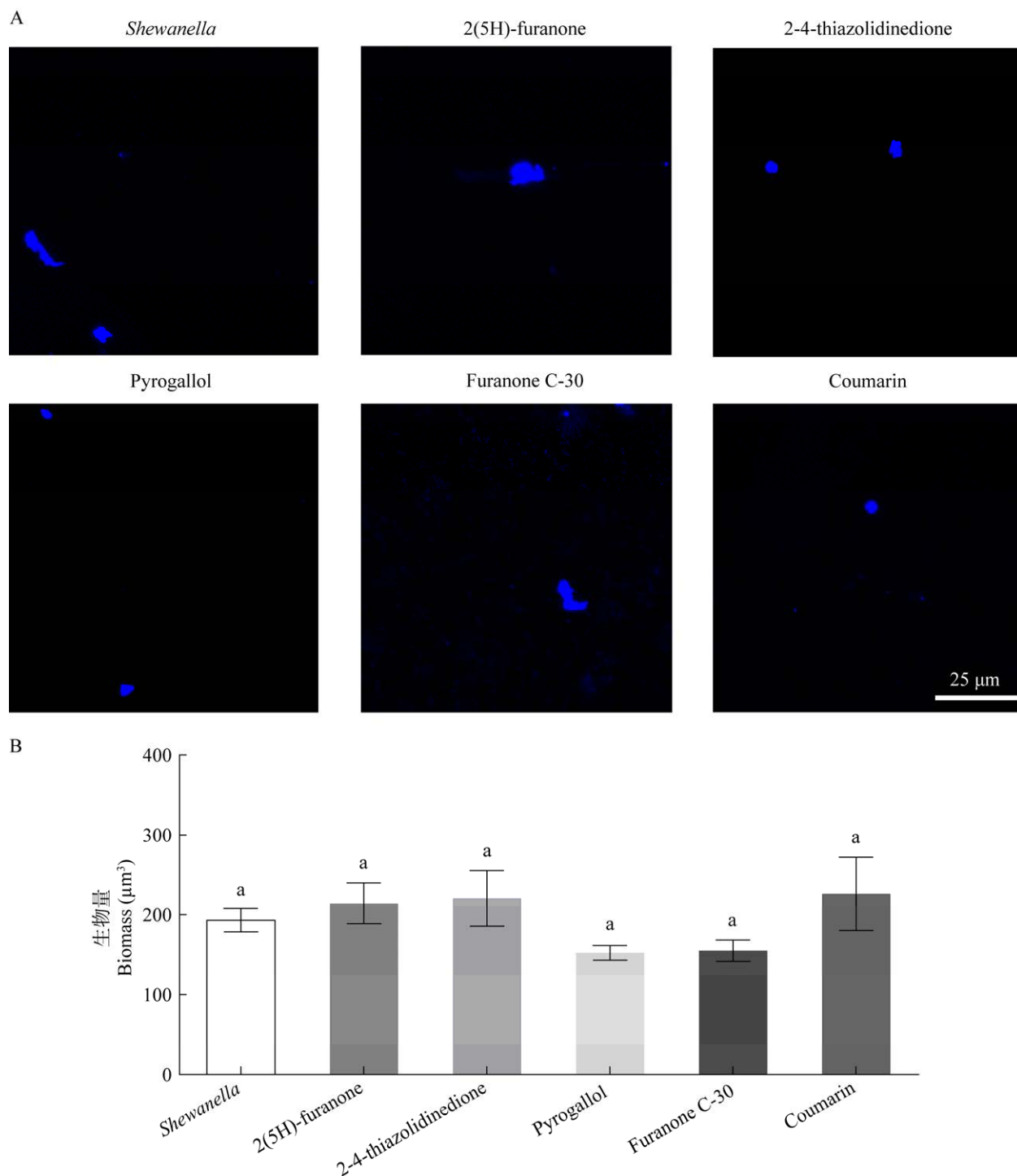


图 3 群体感应抑制剂对生物被膜胞外  $\beta$  多糖染色图像(A)和生物量(B)的影响 *Shewanella*: 未添加抑制剂的单一希瓦氏细菌生物被膜

Figure 3 The effect of quorum sensing inhibitors on staining images (A) and biomass (B) of extracellular  $\beta$  polysaccharides in biofilms. *Shewanella*: Single *Shewanella* biofilm without added inhibitor.



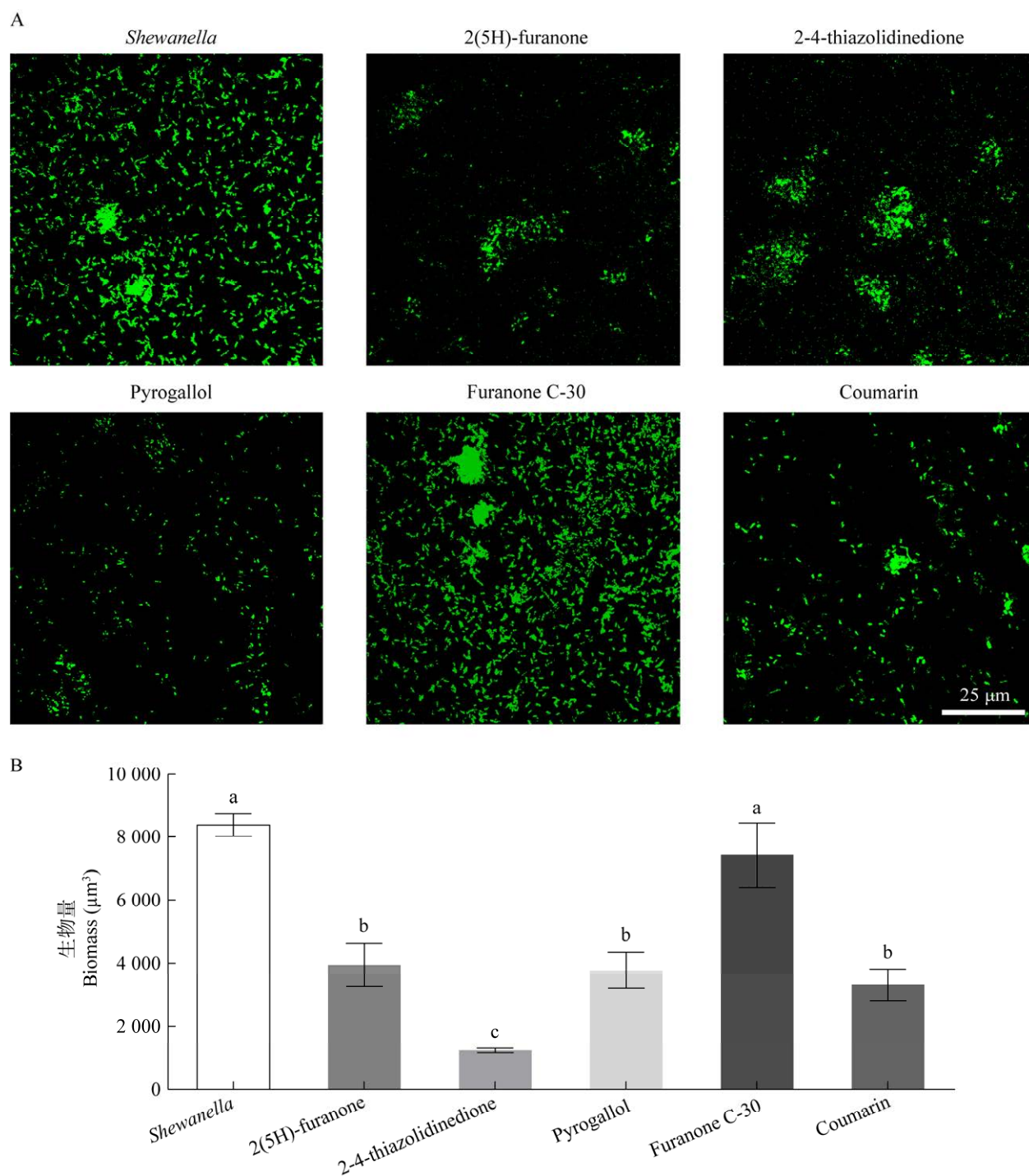


图4 群体感应抑制剂对生物被膜胞外蛋白染色图像(A)和生物量(B)的影响 *Shewanella*: 未添加抑制剂的单一希瓦氏细菌生物被膜

Figure 4 The effect of quorum sensing inhibitors on staining images (A) and biomass (B) of extracellular proteins in biofilm. *Shewanella*: Single *Shewanella* biofilm without added inhibitor.

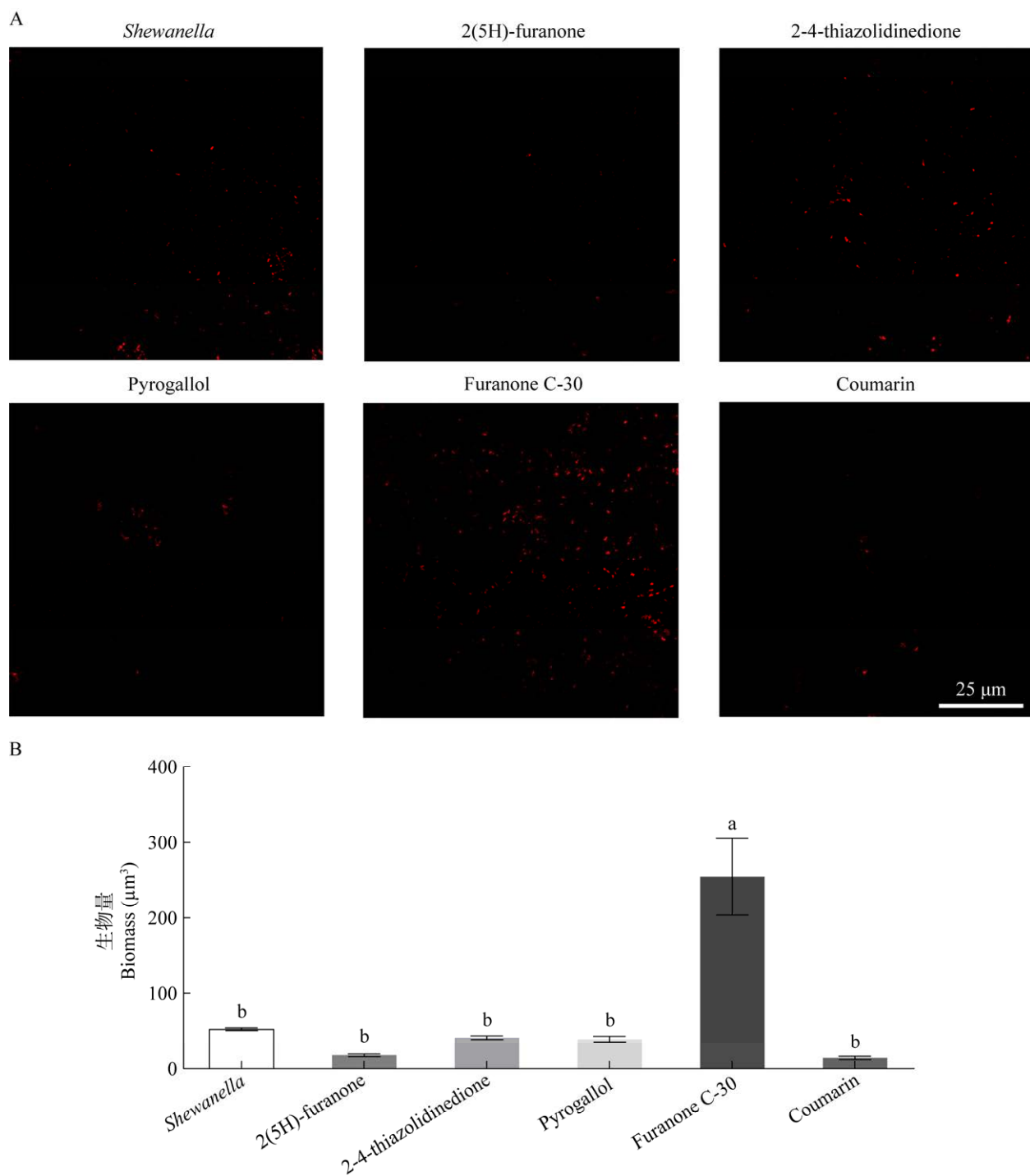


图5 群体感应抑制剂对生物被膜胞外脂质染色图像(A)和生物量(B)的影响 *Shewanella*: 未添加抑制剂的单一希瓦氏细菌生物被膜

Figure 5 The effect of quorum sensing inhibitors on staining images (A) and biomass (B) of extracellular lipids in biofilm. *Shewanella*: Single *Shewanella* biofilm without added inhibitor.

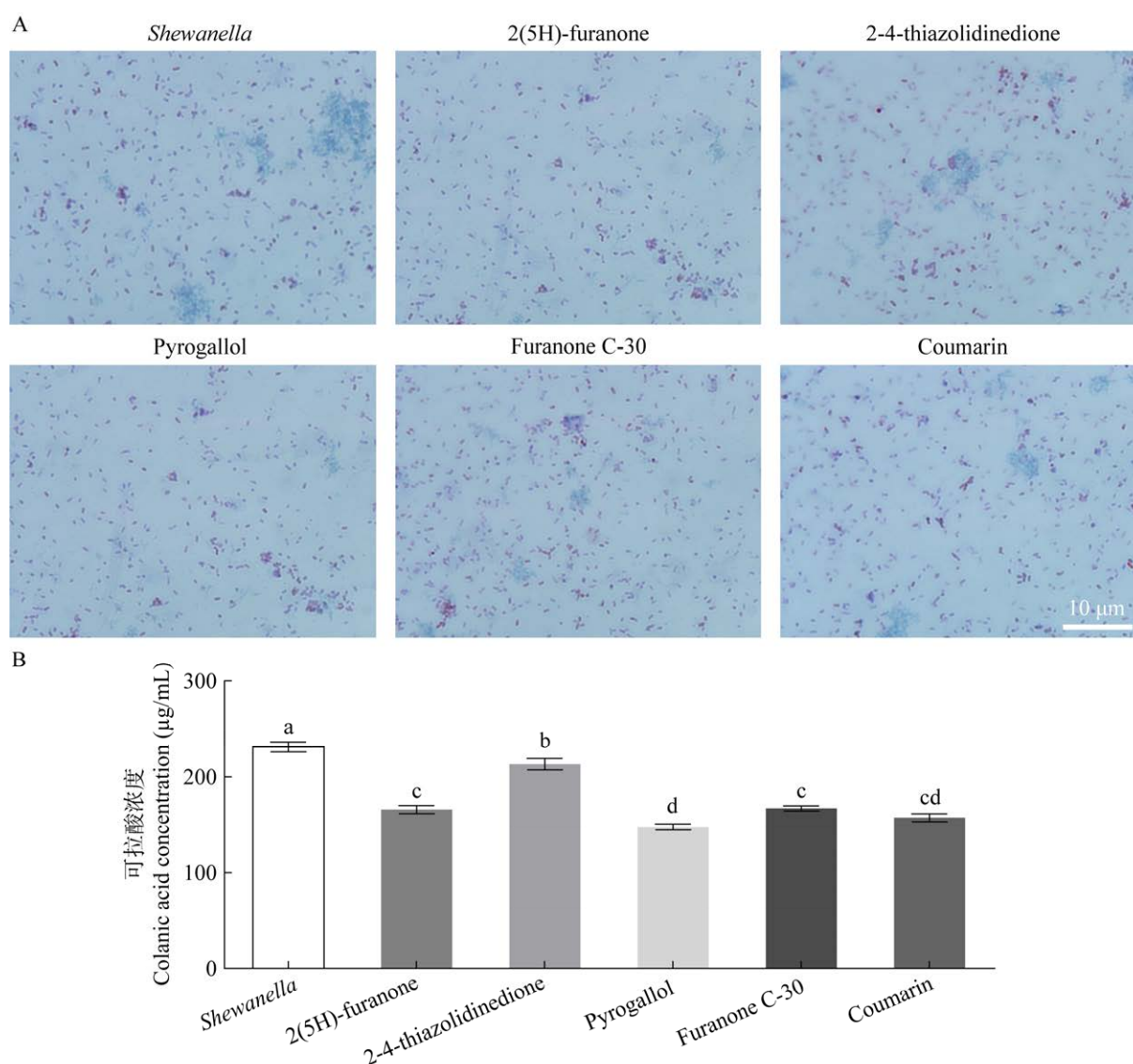


图6 群体感应抑制剂对生物被膜可拉酸染色图像(A)和含量(B)的影响 *Shewanella*: 未添加抑制剂的单一希瓦氏细菌生物被膜

Figure 6 The effect of quorum sensing inhibitors on the staining image (A) and content (B) of biofilm with colchicine. *Shewanella*: Single *Shewanella* biofilm without added inhibitor.

## 2.8 群体感应信号分子对厚壳贻贝幼虫变态的影响

如图8所示, N-(3-氧代十二烷酰基)-L-高丝氨酸内酯(AHL)与DPD (AI-2)两种信号分子分别在0.5 mg/L和1.0 mg/L时具有最好的诱导活性, 但无直接诱导能力。

## 2.9 相关性分析

相关性结果如图9所示, 厚壳贻贝附着变态率的下降与海洋希瓦氏菌(*S. marisflavi*)生物被膜细菌密度、胞外 $\beta$ 多糖和脂质变化无相关性, 而与胞外 $\alpha$ 多糖和蛋白变化呈显著性相关; 细菌密度的变化与胞外 $\alpha$ 多糖和蛋白含量的变化无关。

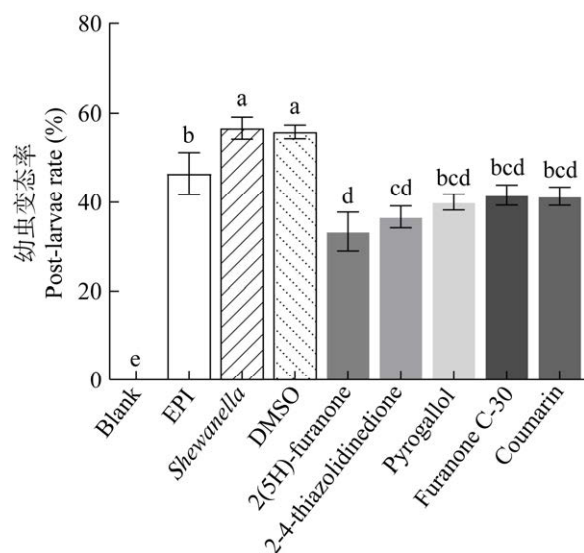


图 7 群体感应抑制剂干扰后的生物被膜对厚壳贻贝幼虫变态的影响 Shewanella: 未添加抑制剂的单一希瓦氏细菌生物被膜; Blank: 干净玻片; EPI:  $10^{-4}$  mol/L 肾上腺素刺激

Figure 7 Effects of biofilm on larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus* after quorum sensing inhibitor interference. *Shewanella*: Single *Shewanella* biofilm without added inhibitor; Blank: Clean slide; EPI:  $10^{-4}$  mol/L adrenaline stimulation.

### 3 讨论与结论

群体感应是目前学术界研究较多的细菌调控机制, Davies 等<sup>[15]</sup>描述了铜绿假单胞菌中 *las* 系统可调控细菌黏附与鼠李糖脂的产生, 首次揭示了 QS 与生物被膜形成之间的关系; 张译兮等<sup>[23]</sup>证明铜绿假单胞菌 QS 对 III 型分泌系统具有调节作用。海洋无脊椎动物如紫贻贝 (*Mytilus edulis galloprovincialis*)、华美盘管虫 (*Hydroides elegans*)、纹藤壶 (*Balanus Amphitrite*) 等<sup>[24-26]</sup>幼虫变态受到生物被膜的调控。以往对于生物被膜诱导无脊椎动物幼虫变态的研究多聚焦在表面活性物质上, 对细菌群体感应系统的功能研究较少。因此本研究通过添加群体感应抑制剂干扰细菌的群体感应系统, 探究群体感应对生物被膜细菌密度、膜厚、胞外物质及厚壳贻贝幼虫变态的影响。

#### 3.1 群体感应对细菌生物被膜的影响

生物被膜是细菌在自然界中的主要存在形式, 主要由细菌与胞外多糖、蛋白、脂质、eDNA

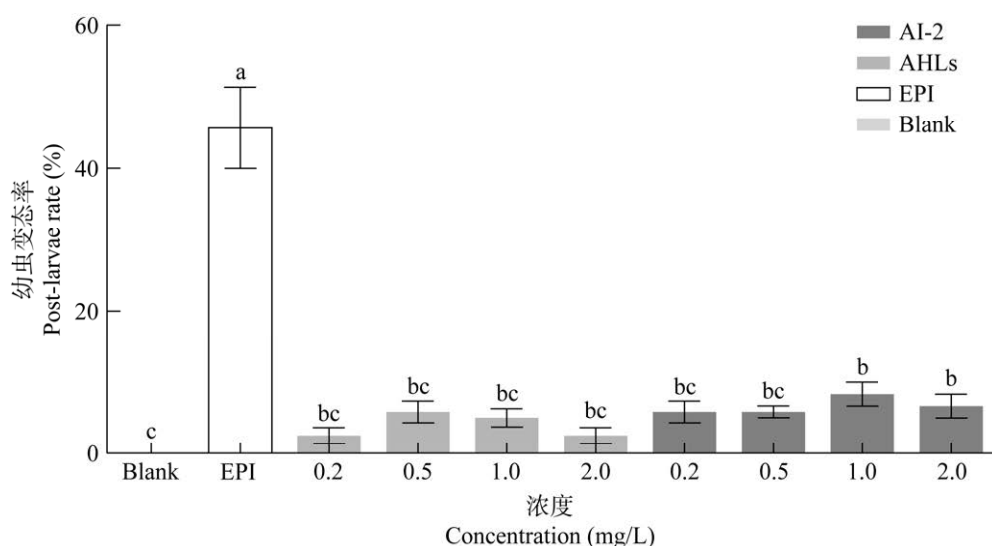


图 8 群体感应信号分子对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响 Blank: 过滤灭菌海水; EPI:  $10^{-4}$  mol/L 肾上腺素刺激

Figure 8 Effects of quorum-sensing signaling molecules on larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*. Blank: Autoclaved filtered seawater; EPI:  $10^{-4}$  mol/L adrenaline stimulation.



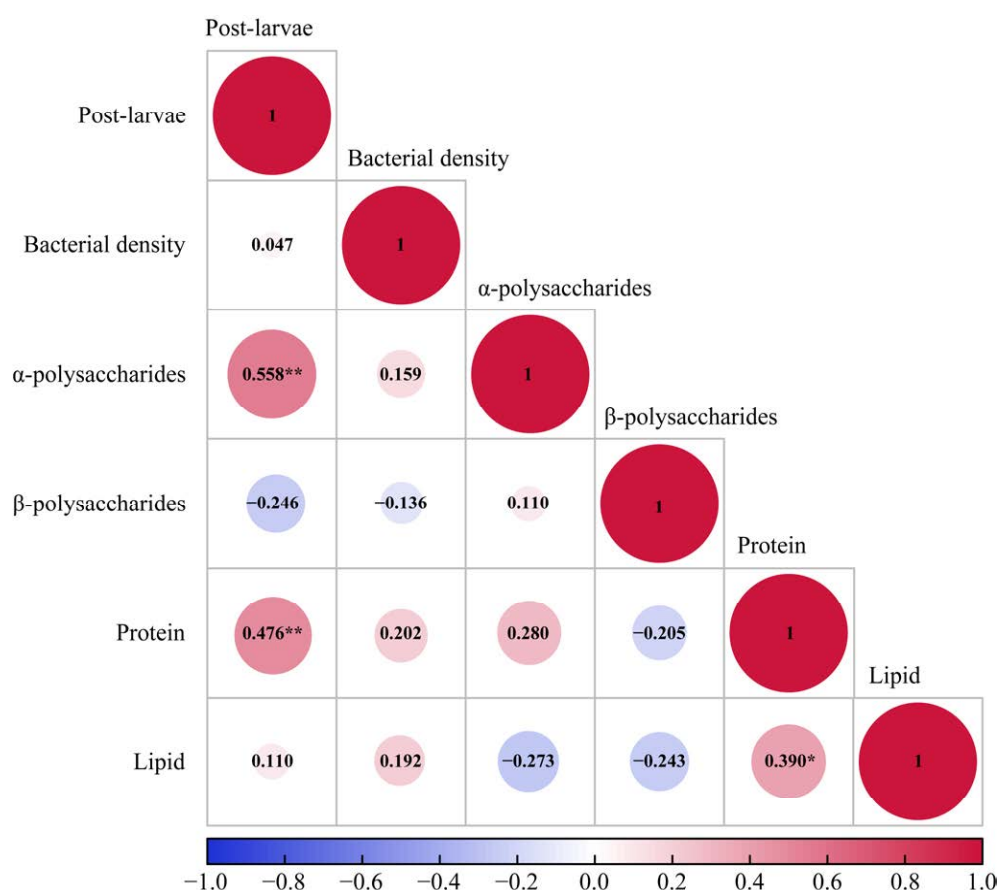


图9 厚壳贻贝附着变态率、细菌密度及胞外产物之间的相关性分析 \*代表显著性相关( $P<0.05$ ); \*\*代表极显著性相关( $P<0.01$ )

Figure 9 Correlation analysis among post-larvae rate, bacterial density and extracellular polymeric substances. \*: Significant correlation ( $P<0.05$ ); \*\*: Extremely significantly correlation ( $P<0.01$ ).

等物质构成<sup>[27]</sup>。研究发现斯氏欧文氏菌(*Erwinia stewartii*)的 QS 可调控荚膜多糖的合成<sup>[28]</sup>, 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)通过 QS 调控胞外多糖的产生<sup>[29]</sup>, 进而调控细菌的聚集与表面附着促进生物被膜的形成。本研究在生物被膜形成过程中添加群体感应抑制剂后, 生物被膜细菌密度及膜厚均发生下降, 共聚焦图像及生物量分析结果显示  $\alpha$  多糖与蛋白含量也发生显著下降; 而胞外  $\beta$  多糖含量无变化, 脂质含量除呋喃酮 C-30 处理组显著增加, 其余无显著变化。胞外多糖是生物被膜的重要组成部分, 作为生物被膜的骨架成分, 通过多糖链之间的相互作用影

响着生物被膜的稳定性<sup>[30]</sup>, 胞外蛋白对细菌的黏附也发挥着重要作用<sup>[31]</sup>。相关性结果显示, 胞外  $\alpha$  多糖和蛋白含量与细菌密度的变化无相关性, 由此推测, *S. marisflavi* 群体感应被干扰后抑制了细菌胞外多糖与蛋白的释放, 减弱了细菌与基质表面的黏附作用, 同时也破坏了生物被膜的稳定性, 不利于生物被膜的形成。

### 3.2 生物被膜对厚壳贻贝幼虫变态的影响

海洋无脊椎动物在其发育过程中存在一个关键节点——附着变态, 此过程对其个体发育与种群延续具有重要意义<sup>[32]</sup>。前期实验室对海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas marina*)生物

被膜的研究发现,细菌产生的胞外物质可以直接诱导厚壳贻贝幼虫变态<sup>[33]</sup>,*P. marina* 的鞭毛蛋白与脂多糖可以促进厚壳贻贝幼虫的变态<sup>[34-35]</sup>。在本研究中,添加群体感应抑制剂后,幼虫变态率均发生显著性下降( $P<0.05$ ),相关性结果显示,幼虫变态率与胞外  $\alpha$  多糖与蛋白含量显著相关。由此推测,*S. marisflavi* 生物被膜中  $\alpha$  多糖与蛋白含量的减少是导致厚壳贻贝幼虫变态率降低的主要原因。

可拉酸是细菌胞外一种高黏度的荚膜多糖<sup>[36-38]</sup>,由  $\alpha$  多糖与  $\beta$  多糖构成,生物被膜中可拉酸含量的增加促进厚壳贻贝幼虫的附着变态<sup>[39]</sup>。实验结果显示,群体感应抑制剂的添加降低了胞外杂多糖可拉酸含量,推测  $\alpha$  多糖含量的减少阻碍了可拉酸的合成,降低了厚壳贻贝幼虫的变态率。

但是对于 *S. marisflavi* 而言,其群体感应系统调控通路尚未研究透彻,群体感应通过什么途径影响胞外物质的含量还须深入研究。此外,受群体感应调控的胞外物质还有哪些种类,具有什么样的成分,是否可以影响生物被膜的形成或直接诱导厚壳贻贝幼虫变态还须进一步研究。

### 3.3 群体感应信号分子对幼虫变态的影响

群体感应信号分子被细菌分泌到胞外作为细菌之间交流的小分子物质,本身能否对厚壳贻贝幼虫的附着变态产生影响尚未可知,有研究结果显示<sup>[40]</sup>,每日添加浓度为 1 mg/L 的 AHL 混合物可显著影响罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的幼虫阶段指数(larval stage index, LSI)和存活率,分别降低了 12%和 41%,推测 AHL 的添加影响了幼虫体内菌群的改变进而影响了幼虫行为的变化。本实验使用 N-(3-氧代十二烷酰基)-L-高丝氨酸内酯与 AI-2 直接刺激厚壳贻贝幼虫。结果显示,2 种信号分子分别在 0.5 mg/L 与 1.0 mg/L 时效果最高,诱导率为

5.83%和 8.33%,对幼虫无明显诱导效果,因此群体感应信号分子并不能作为活性物质诱导厚壳贻贝幼虫变态。

综上所述,*S. marisflavi* 群体感应系统可调控其生物被膜的形成及胞外  $\alpha$  多糖、蛋白和可拉酸的含量,从而影响厚壳贻贝幼虫变态。本研究为进一步探究群体感应信号分子对生物被膜形成的调控机制及对厚壳贻贝幼虫变态的诱导机理提供新思路。

## REFERENCES

- [1] JAMAL M, AHMAD W, ANDLEEB S, JALIL F, IMRAN M, NAWAZ MA, HUSSAIN T, ALI M, RAFIQ M, KAMIL MA. Bacterial biofilm and associated infections[J]. Journal of the Chinese Medical Association: JCMA, 2018, 81(1): 7-11.
- [2] RENNER LD, WEIBEL DB. Physicochemical regulation of biofilm formation[J]. MRS Bulletin, 2011, 36(5): 347-355.
- [3] RAHIM SAKA, LI JY, KITAMURA H. Larval metamorphosis of the sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocardis crassispina* in response to microbial films[J]. Marine Biology, 2004, 144(1): 71-78.
- [4] LAU SCK, QIAN PY. Larval settlement in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* in response to bacterial films: an investigation of the nature of putative larval settlement cue[J]. Marine Biology, 2001, 138(2): 321-328.
- [5] BAO WY, SATUITO CG, YANG JL, KITAMURA H. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms[J]. Marine Biology, 2007, 150(4): 565-574.
- [6] WANG C, BAO WY, GU ZQ, LI YF, LIANG X, LING Y, CAI SL, SHEN HD, YANG JL. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to natural biofilms[J]. Biofouling, 2012, 28(3): 249-256.
- [7] HUANG S, HADFIELD MG. Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2003, 260: 161-172.
- [8] LAM C, HARDER T, QIAN PY. Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by



- extracellular polymers of benthic diatoms[J]. Marine Ecology Progress Series, 2005, 286: 145-154.
- [9] WIECZOREK SK, TODD CD. Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues[J]. Biofouling, 1998, 12(1/2/3): 81-118.
- [10] FREDERICK MR, KUTTLER C, HENSE BA, EBERL HJ. A mathematical model of quorum sensing regulated EPS production in biofilm communities[J]. Theoretical Biology & Medical Modelling, 2011, 8: 8.
- [11] 万春云, 汪庆, 李思敏, 孙岩, 张晓婷, 陈信任, 李双双, 魏贺红. 群体感应对细菌生物膜及细菌耐药性影响的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(1): 149-159.
- WAN CY, WANG Q, LI SM, SUN Y, ZHANG XT, CHEN XR, LI SS, WEI HH. Research progress on influence of quorum sensing on bacterial biofilm and bacterial drug resistance[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(1): 149-159 (in Chinese).
- [12] 孙长龙, 吴思, 张倩楠, 马信, 齐笑萱, 张阳. 基于群体感应调控细菌生物膜形成研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(2): 89-91.
- SUN CL, WU S, ZHANG QN, MA X, QI XX, ZHANG Y. Advances in the regulation of bacterial biofilm formation based on quorum sensing[J]. Shandong Chemical Industry, 2021, 50(2): 89-91 (in Chinese).
- [13] EBERHARD A, BURLINGAME AL, EBERHARD C, KENYON GL, NEALSON KH, OPPENHEIMER NJ. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase[J]. Biochemistry, 1981, 20(9): 2444-2449.
- [14] THOMPSON JA, ALMEIDA OLIVEIRA R, DJUKOVIC A, UBEDA C, XAVIER KB. Manipulation of the quorum sensing signal AI-2 affects the antibiotic-treated gut microbiota[J]. Cell Reports, 2015, 10(11): 1861-1871.
- [15] DAVIES DG, PARSEK MR, PEARSON JP, IGLEWSKI BH, COSTERTON JW, GREENBERG EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm[J]. Science, 1998, 280(5361): 295-298.
- [16] DAVEY ME, CAIAZZA NC, O'TOOLE GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(3): 1027-1036.
- [17] BRACKMAN G, HILLAERT U, van CALENBERGH S, NELIS HJ, COENYE T. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*[J]. Research in Microbiology, 2009, 160(2): 144-151.
- [18] YANG JL, GUO XP, DING DW. Draft genome sequence of *Shewanella* sp. ECSMB14101, isolated from the East China Sea[J]. Genome Announcements, 2015, 3(1): e01388-14.
- [19] YANG JL, SHEN PJ, LIANG X, LI YF, BAO WY, LI JL. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms[J]. Biofouling, 2013, 29(3): 247-259.
- [20] 郭冰怡, 董燕红. 细菌群体感应抑制剂研究进展[J]. 农药学学报, 2018, 20(4): 408-424.
- GUO BY, DONG YH. Research progress on inhibitors toward quorum sensing system[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2018, 20(4): 408-424 (in Chinese).
- [21] GONZÁLEZ-MACHADO C, CAPITA R, RIESCO-PELÁEZ F, ALONSO-CALLEJA C. 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.
- [22] OBADIA B, LACOUR S, DOUBLET P, BAUBICHON-CORTAY H, COZZONE AJ, GRANGEASSE C. 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.
- [23] 张译兮, 张亚妮, 马艳玲, 罗威, 肖雅, 孔伟娜. 铜绿假单胞菌中III型分泌系统调控机制及针对性治疗的研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 362-373.
- ZHANG YX, ZHANG YN, MA YL, LUO W, XIAO Y, KONG WN. Progress in the regulation mechanism and targeted treatment of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology China, 2019, 46(2): 362-373 (in Chinese).
- [24] SATUITO CG, NATOYAMA K, YAMAZAKI M, FUSE TANI N. Induction of attachment and metamorphosis of laboratory cultures mussel *Mytilus edulis galloprovincialis* larvae by microbial film[J]. Fisheries Science, 1995, 61(2): 223-227.
- [25] MAKI JS, RITTSCHOF D, COSTLOW JD, MITCHELL R. Inhibition of attachment of larval barnacles, *Balanus amphitrite*, by bacterial surface films[J]. Marine Biology, 1988, 97(2): 199-206.
- [26] DOBRETISOV S, QIAN PY. The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement[J]. Journal of Experimental Marine Biology

- and Ecology, 2004, 299(1): 35-50.
- [27] van HOUTD R, MICHIELS CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(4): 1117-1131.
- [28] 肖梦圆, 武瑞赞, 谭春明, 李平兰. 群体感应系统及其抑制剂对细菌生物被膜调控的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(13): 227-234.  
XIAO MY, WU RY, TAN CM, LI PL. Recent advances in understanding the role of quorum sensing system and quorum sensing inhibitors in regulating bacterial biofilm formation[J]. Food Science, 2020, 41(13): 227-234 (in Chinese).
- [29] 叶晓敏, 陆春. 霍乱弧菌群体感应系统影响生物膜形成的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(1): 80-83.  
YE XM, LU C. Advance in quorum-sensing system to affect *Vibrio cholerae* biofilm formation[J]. Journal of Microbiology, 2010, 30(1): 80-83 (in Chinese).
- [30] COSTERTON JW, GEESEY GG, CHENG KJ. How bacteria stick[J]. Scientific American, 1978, 238(1): 86-95.
- [31] NOBILE CJ, NETT JE, ANDES DR, MITCHELL AP. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation[J]. Eukaryotic Cell, 2006, 5(10): 1604-1610.
- [32] SHIKUMA NJ, PILHOFER M, WEISS GL, HADFIELD MG, JENSEN GJ, NEWMAN DK. Marine tubeworm metamorphosis induced by arrays of bacterial phage tail-like structures. Science, 2014, 343(6170): 529-533.
- [33] 蔡雨珊, 任泓妤, 竹攸汀, 杨金龙, 张俊波, 万荣, 梁箫. 海假交替单胞菌 *flhC*-02330 基因缺失影响生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 899-910.  
CAI YS, REN HY, ZHU YT, YANG JL, ZHANG JB, WAN R, LIANG X. Deletion of *flhC*-02330 from *Pseudoalteromonas marina* affects the biofilm formation and the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 899-910 (in Chinese).
- [34] LIANG X, ZHANG XK, PENG LH, ZHU YT, YOSHIDA A, OSATOMI K, YANG JL. The flagellar gene regulates biofilm formation and mussel larval settlement and metamorphosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 710.
- [35] 吴静娴, 李嘉政, 胡晓梦, 丁文扬, 杨金龙, 梁箫. 脂多糖对细菌生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫变态的影响[J]. 水产学报, 2022, 46(11): 2134-2142.  
WU JX, LI JZ, HU XM, DING WY, YANG JL, LIANG X. Effects of lipopolysaccharide on biofilm formation and larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(11): 2134-2142 (in Chinese).
- [36] SUTHERLAND IW. Enzymic hydrolysis of colanic acid[J]. European Journal of Biochemistry, 1971, 23(3): 582-587.
- [37] SUTHERLAND IW. Structural studies on colanic acid, the common exopolysaccharide found in the Enterobacteriaceae, by partial acid hydrolysis. Oligosaccharides from colanic acid[J]. The Biochemical Journal, 1969, 115(5): 935-945.
- [38] JOHNSON JG, WILSON DB. Role of a sugar-lipid intermediate in colanic acid synthesis by *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1977, 129(1): 225-236.
- [39] PENG LH, LIANG X, CHANG RH, MU JY, CHEN HE, YOSHIDA A, OSATOMI K, YANG JL. A bacterial polysaccharide biosynthesis-related gene inversely regulates larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. Biofouling, 2020, 36(7): 753-765.
- [40] BARUAH K, CAM DTV, DIERCKENS K, WILLE M, DEFOIRDT T, DEFOIRDT T, SORGELOOS P, BOSSIER P. *In vivo* effects of single or combined N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals on the performance of *Macrobrachium rosenbergii* larvae[J]. Aquaculture, 2009, 288(3/4): 233-238.