

文章编号: 1674-5566(2025)01-0069-11

DOI: 10.12024/jsou.20240904650

铁离子对海洋希瓦氏菌生物被膜诱导厚壳贻贝附着变态能力的影响

陶钰^{1,2,3}, 马蕃^{1,2,3}, 彭莉华^{1,2,3}, 梁箫^{1,2,3}, 杨金龙^{1,2,3}

(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. 上海海洋大学 水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为研究铁离子对海洋希瓦氏菌 (*Shewanella marisflavi* ECSMB14101) 生物被膜诱导厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 幼虫附着变态能力的影响, 采用不同铁离子浓度培养的单一细菌生物被膜来诱导厚壳贻贝幼虫附着变态, 分析了铁离子浓度对海洋希瓦氏菌生物被膜诱导厚壳贻贝幼虫附着变态诱导率、细菌密度、胞外物质以及细胞色素 C 含量的影响。结果显示, 在铁离子浓度分别为 0、1、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 7 个实验组中, 20 $\mu\text{mol/L}$ 铁离子浓度培养的海洋希瓦氏菌生物被膜诱导厚壳贻贝幼虫附着变态能力最高, 生物被膜细菌密度和细胞色素 C 等胞外蛋白含量在此浓度下达到最高水平。胞外多糖和胞外脂质不受铁离子浓度的影响。研究表明, 在铁离子影响下, 海洋希瓦氏菌生物被膜通过调节细胞色素 C 等胞外蛋白的产生来调控厚壳贻贝幼虫附着变态。本研究可为深入探索厚壳贻贝幼虫附着变态的分子调控机制, 以及贝类与细菌相互作用关系的研究奠定坚实的理论基础与参考依据。

关键词: 厚壳贻贝; 附着变态; 海洋希瓦氏菌; 铁离子; 细胞色素 C

中图分类号: S 968.3 **文献标志码:** A

随着经济的迅速发展, 海洋运输业的繁荣促使船舶数量激增, 船舶排放的油污以及船舶拆解产生的大量金属离子对海洋环境构成了严重威胁。某些细菌可以利用材料释放的金属离子来作为电子终端受体进行呼吸, 促进船体表面细菌生物被膜的形成, 进而加快了从单一微生物污损向包含藻类、贝类及其他海洋生物附着的宏观生物污损转变的过程^[1]。厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 是一种常见的海洋宏观污损生物, 作为海洋底栖无脊椎动物的代表物种, 其眼点幼虫通过附着变态发育为稚贝, 是成长过程中的重要阶段^[2-4]。它们的附着对海洋设施、船舶底部等造成严重的污染和损害, 严重影响海洋运输、水产养殖及海洋工程等经济活动。很多研究^[5-7]表明, 海洋无脊椎动物的附着变态不仅受到自身内源因子的调控, 同时受到外界因子的影响。细菌生物被膜作为主要的外界化学因子对厚壳贻贝的附着变态起着极为重要的作用^[7-8]。

细菌生物被膜是广泛存在于海洋环境基质表面的一种细菌群体结构, 分泌多糖、蛋白质和脂质等胞外聚合物 (Extracellular polymeric substances, EPS) 紧密包裹在一起, 形成一个高度复杂的三维立体结构。细菌生物被膜的形成受到多种因素的影响, 包括环境条件^[9]、营养物质^[10]以及微生物之间的相互作用^[11]等。其中, 环境条件中的金属离子在细菌生物被膜的形成过程中发挥着关键作用^[12]。在革兰氏阴性菌中, 铁是细菌生长以及在生物被膜的形成过程中所必需的营养元素^[13], 细菌关键生物过程中的许多酶和蛋白质辅助因子依靠铁的参与^[14-16], 能调节生物被膜的形成^[17-18]。已有实验证实铁离子能够促进铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 混合细菌生物被膜形成^[19]; 高浓度铁离子可以抑制铜绿假单胞菌褐藻多糖的产生, 从而抑制细菌生物被膜的形成^[20]。

收稿日期: 2024-09-30 修回日期: 2024-12-09

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFE0115500, 2023YFD2401902)

作者简介: 陶钰 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋贝类分子生物学。E-mail: m220100122@st.shou.edu.cn

通信作者: 杨金龙, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

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

<http://www.shhydx.com>

为了深入探讨铁离子对海洋希瓦氏菌(*Shewanella marisflavi* ECSMB14101)生物被膜诱导厚壳贻贝幼虫附着变态能力的影响,本研究在形成单一细菌生物被膜的过程中,通过改变人工海水中铁离子浓度,分析了铁离子对生物被膜细菌密度、胞外物质含量、细胞色素C含量和诱导厚壳贻贝幼虫附着变态能力的影响,为大型海洋生物污染防治奠定坚实的理论基础与科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用海洋希瓦氏菌分离自东海自然生物被膜。该菌株保藏于海洋微生物菌种保藏管理中心(保藏号为MCCC 1 K03543)。厚壳贻贝幼虫取自福建漳州龙加大水产养殖发展有限公司,壳长为 $(280.3\pm 0.5)\mu\text{m}$,壳高为 $(240.5\pm 0.5)\mu\text{m}$ 。自然海水(Natural sea water, NSW)取自浙江省舟山市沿海区域($122^{\circ}46'E$ 、 $30^{\circ}43'N$)。人工海水(Artificial seawater, ASW)配置参照常睿珩等^[21]的方法,其中铁离子浓度为 $17.84\mu\text{mol/L}$,人工海水铁离子浓度设置为0、1、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 共7个实验组。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌生物被膜制备

参考YANG等^[22]的方法,将 -80°C 超低温冰箱保种的菌株划线纯化,纯化后的海洋希瓦氏菌接种至Zobell 2216E液体培养基,25 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min恒温摇床活化培养。培养18 h后的菌液3 500 r/min的条件下离心15 min,去除上清,用高压灭菌过滤海水(Autoclaved filtered seawater, AFSW)对菌体进行洗涤,重复3次。吸取100 μL 菌液稀释100倍后,取1 mL稀释菌液真空抽滤至0.22 μm 滤膜上,滤膜放至0.1%吡啶橙中染色5 min,晾干制片。在OlympusBX-51荧光显微镜下计数,并计算离心管中菌液的细菌浓度。将菌液按照最终总体积为20 mL、细菌初始密度为 $5\times 10^8\text{ cells/mL}$ 的要求加入装有灭菌载玻片(12 mm \times 38 mm)的一次性培养皿[64 mm(直径) \times 19 mm(高)]中,再加入无菌海水将总体积定容为20 mL,18 $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗条件下放置48 h。对于自然海水与人工海水的比较实验,所使用的水为灭菌过滤自然海水和灭菌过滤人工海水;对于不同铁离子浓度下形成的生物被膜实验,所使用的水为调节铁离子

浓度后的灭菌过滤人工海水。

1.2.2 生物被膜细菌密度计数

参考YANG等^[22]的方法,培育48 h的生物被膜在甲醛溶液中固定10 h后,在0.9%的生理盐水中润洗3次去除浮菌,用0.1%的吡啶橙溶液避光染色制片,在OlympusBX-51荧光显微镜随机计数。最终生物被膜细菌密度(cells/cm^2)=区域内细菌数(cells)/[区域个数 \times 区域面积(10^{-4} cm^2)]。每组设30个重复。

1.2.3 厚壳贻贝幼虫附着变态

将培养48 h后的生物被膜玻片转移至含有20 mL AFSW、20只厚壳贻贝幼虫的灭菌玻璃皿中,无生物被膜的灭菌玻片作为阴性对照, 10^{-4} g/mL 的肾上腺素(Epinephrine, EPI)作为阳性对照,在18 $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗环境下静置,依次观察24、48、72、96 h的附着变态情况,并计算附着变态率(%)=附着变态个数/总幼虫数 $\times 100\%$,每组设9个重复。

1.2.4 生物被膜胞外物质拍摄

参考GONZÁLEZ-MACHADO等^[23]的方法进行共聚焦染色,将制备好的生物被膜玻片在0.9%的生理盐水中润洗3次去除浮菌,滴加50 μL 染料工作液于生物被膜玻片上,避光染色制片,样片使用Leica SP8共聚焦激光扫描显微镜和LASX软件采集共聚焦图像,每组9个重复,染料相关信息见表1。

1.2.5 细胞色素C含量分析

每个实验组中各取36片生物被膜,每12片生物被膜作为1个重复组,每组共设置3个重复组。每个重复组的12片生物被膜用灭菌玻片刮取,置于含有灭菌双蒸水的1.5 mL离心管中,定容至1 mL。3 000 r/min离心10 min,取上清后用微生物细胞色素C ELISA检测试剂盒在450 nm处检测细胞色素C含量。

1.2.6 数据统计分析

使用JMP 10.0.0对数据进行显著性差异检测(显著性水平设为0.05),图像中字母变化作为显著差异的反映。通过OriginPro(Version 2021)进行Pearson相关性分析,验证不同铁离子浓度下,幼虫附着变态率与生物被膜细菌密度、胞外产物、细胞色素C含量之间的相关性,以 $P<0.05$ 作为显著性相关的条件。用Image J软件计算胞外产物生物量。

表 1 激光共聚焦显微镜荧光染料信息
Tab. 1 Laser confocal microscopy fluorescence dye information

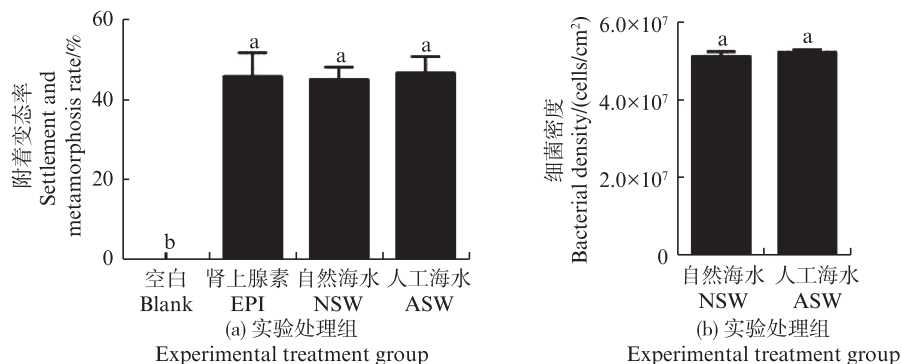
| 染料 Dye | 染色物质 Stained substance | 浓度 Concentration/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 检测波长 Detection wavelength/ nm |
|--|--|---|-------------------------------------|
| 刀豆蛋白四甲基罗丹明偶联物 A Concanavalin A, tetramethylrhodamine conjugate | α 多糖 α -polysaccharides | 944.8 | 400.0~700.0 |
| 卡尔科弗卢尔荧光增白剂 M2R Calcofluor white M2R | β 多糖 β -polysaccharides | 189.0 | 400.0~560.0 |
| 1,1'-双十八烷基-3,3',3'- 四甲基吡啶菁高氯酸盐 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetra- methylindodicarbocyanine perchlorate | 胞外脂类 Extracellular proteins | 7.9 | 645.0~700.0 |
| 异硫氰酸荧光素(异构体 I) Fluorescein isothiocyanate isomer I | 胞外蛋白 Extracellular lipid | 46.6 | 400.0~700.0 |

2 结果

2.1 自然海水和人工海水形成的生物被膜比较

加入幼虫 96 h 后, NSW 生物被膜的幼虫附着变态诱导率为 44.17%, ASW 生物被膜的幼虫附着变态诱导率为 43.33%。对比 NSW 与 ASW 培养条件下生物被膜幼虫附着变态诱导率, 统计分

析结果显示两者无显著性差异 ($P>0.05$)。与空白对照组相比, NSW 和 ASW 培养的生物被膜均显著提高幼虫附着变态诱导率 ($P<0.05$), 见图 1a; 初始菌液密度为 5.00×10^8 cells/mL 情况下, NSW 培养的生物被膜细菌密度为 5.10×10^7 cells/cm², ASW 培养的生物被膜细菌密度为 5.21×10^7 cells/cm², 二者间无显著差异 ($P>0.05$), 见图 1b。



空白和肾上腺素分别为阴性对照与阳性对照; 自然海水为在自然海水状态下形成的细菌生物被膜诱导幼虫附着变态情况与细菌密度; 人工海水为在人工海水状态下形成的细菌生物被膜诱导幼虫附着变态情况与细菌密度。图中误差棒上方字母为显著差异的反映, 相同代表组别之间无差异 ($P>0.05$), 不同代表组别之间存在显著差异 ($P<0.05$)。

Blank and EPI are used as negative and positive controls, respectively; NSW is the induced larval settlement and metamorphosis and bacterial density of bacterial biofilms formed in natural seawater. ASW is the induced larval settlement and metamorphosis and bacterial density of bacterial biofilms formed in artificial seawater. The letters above the error bars in the graphs are a reflection of significant differences. The same letter represents no difference between groups ($P>0.05$); different letters represent significant difference between groups ($P<0.05$).

图 1 NSW 和 ASW 形成的生物被膜诱导活性和细菌密度

Fig. 1 Inducing activity and bacterial density of the biofilm formed in natural seawater and artificial seawater

2.2 不同铁离子浓度对生物被膜细菌密度的影响

在菌液初始密度为 5×10^8 cells/mL 下, ASW 中的铁离子浓度为 $20\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 生物被膜细菌密度最高, 达到 6.61×10^7 cells/cm²; ASW 中的铁离子浓度为 $0\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 生物被膜细菌密度达到 6.58×10^7 cells/cm², 与铁离子浓度为 $20\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 条件下的细菌密度之间无显著差异 ($P>0.05$); 当 ASW 中的

铁离子浓度为 $50\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 生物被膜细菌密度最低, 为 3.93×10^7 cells/cm² (图 2)。

2.3 不同铁离子浓度对生物被膜幼虫附着变态诱导率的影响

加入幼虫 96 h 后, ASW 中的铁离子浓度为 $0\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 生物被膜幼虫附着变态诱导率为 29.17%; 铁离子浓度升高至 $20\ \mu\text{mol}/\text{L}$, 附着变态

诱导率达到最高,与铁离子浓度为 $0 \mu\text{mol/L}$ 的附着变态诱导率相比升高了 62.86%;铁离子浓度升高至 $50 \mu\text{mol/L}$,生物被膜幼虫附着变态诱导率仅为 27.50%(图 3)。

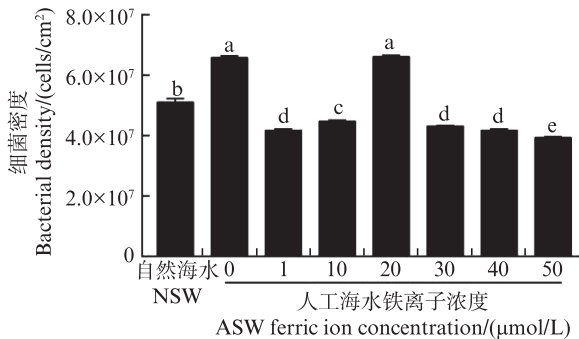


图 2 铁离子浓度对生物被膜细菌密度的影响

Fig. 2 Effect of ferric ion concentration on bacterial density in biofilms

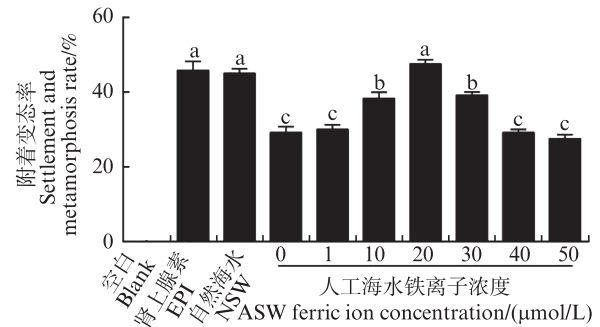
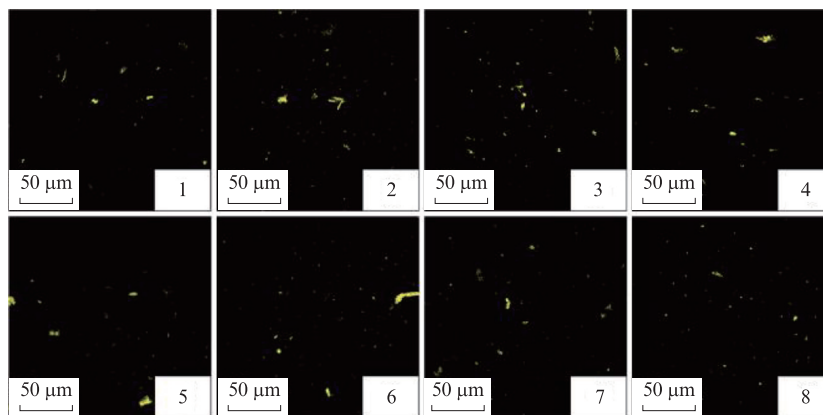


图 3 铁离子浓度对生物被膜诱导幼虫附着变态的影响

Fig. 3 Effect of ferric ion concentration on biofilm-induced larval settlement and metamorphosis

2.4 不同铁离子浓度对生物被膜胞外多糖的影响
通过共聚焦显微镜观察胞外多糖(图版 I、图版 II)发现,随着铁离子浓度从 $0 \mu\text{mol/L}$ 升高至 $50 \mu\text{mol/L}$,生物被膜的胞外 α 多糖(图 4)和 β 多糖(图 5)生物量无明显差异($P > 0.05$)。

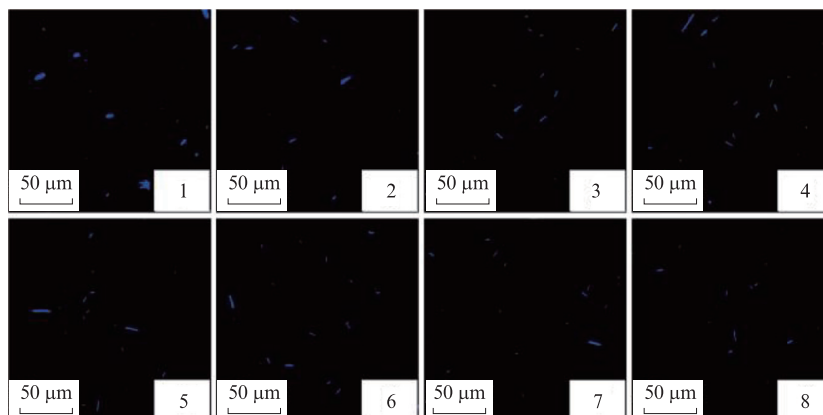


1 代表 NSW, 2-8 分别是铁离子浓度为 0 、 1 、 10 、 20 、 30 、 40 和 $50 \mu\text{mol/L}$ 的组别。

1 represents NSW, and 2-8 are groups with ferric ion concentrations of 0 , 1 , 10 , 20 , 30 , 40 , and $50 \mu\text{mol/L}$, respectively.

图版 I 生物被膜 α -多糖 CLSM 图像

Plate I CLSM images of α -polysaccharides of biofilms



1 代表 NSW, 2-8 分别是铁离子浓度为 0 、 1 、 10 、 20 、 30 、 40 和 $50 \mu\text{mol/L}$ 的组别。

1 represents NSW, and 2-8 are groups with ferric ion concentrations of 0 , 1 , 10 , 20 , 30 , 40 , and $50 \mu\text{mol/L}$, respectively.

图版 II 生物被膜 β -多糖 CLSM 图像

Plate II CLSM images of β -polysaccharides of biofilms

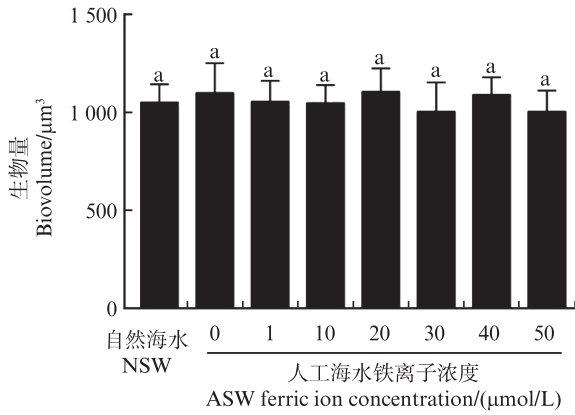


图4 生物被膜 α -多糖生物量

Fig. 4 Biovolume of α -polysaccharides of biofilms

2.5 不同铁离子浓度对生物被膜胞外蛋白的影响

通过共聚焦显微镜观察胞外蛋白(图版 III)发现,ASW 中的铁离子浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时,海洋希瓦氏菌生物被膜胞外蛋白的生物量最少,为 9 385.88 μm^3 ; ASW 中的铁离子浓度升高至

20 $\mu\text{mol/L}$,海洋希瓦氏菌生物被膜胞外蛋白生物量显著上升($P<0.05$),此时生物被膜胞外蛋白生物量为 61 032.80 μm^3 ; ASW 中的铁离子浓度升高至 50 $\mu\text{mol/L}$,生物被膜胞外蛋白生物量显著下降($P<0.05$),见图 6。

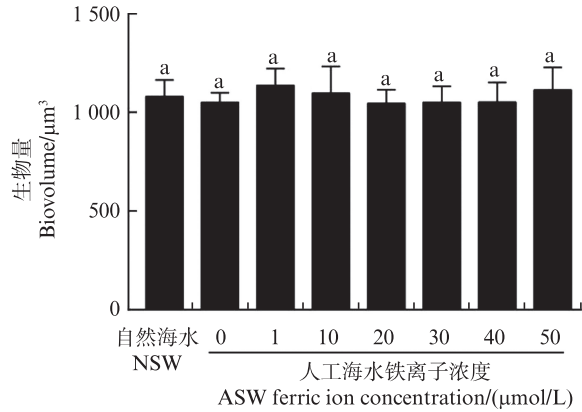
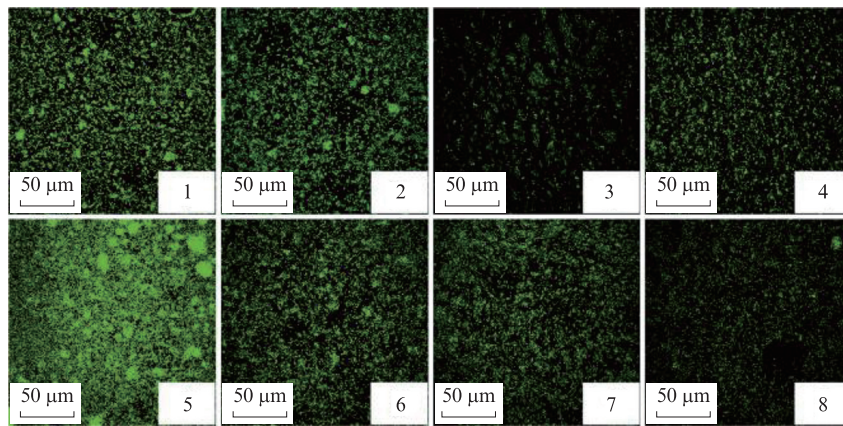


图5 生物被膜 β -多糖生物量

Fig. 5 Biovolume of β -polysaccharides of biofilms



1代表 NSW,2-8 分别是铁离子浓度为 0、1、10、20、30、40 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的组别。

1 represents NSW, and 2-8 are groups with ferric ion concentrations of 0, 1, 10, 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

图版 III 生物被膜胞外蛋白 CLSM 图像

Plate III CLSM images of extracellular proteins of biofilms

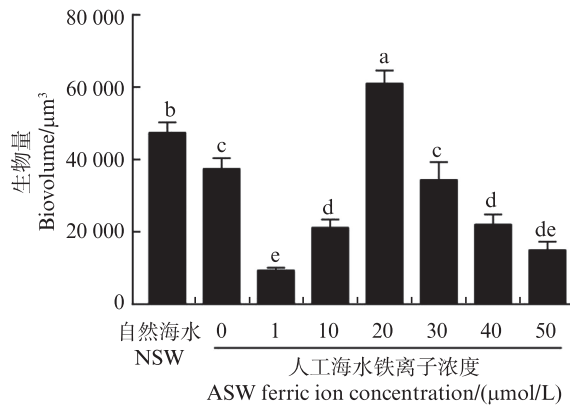
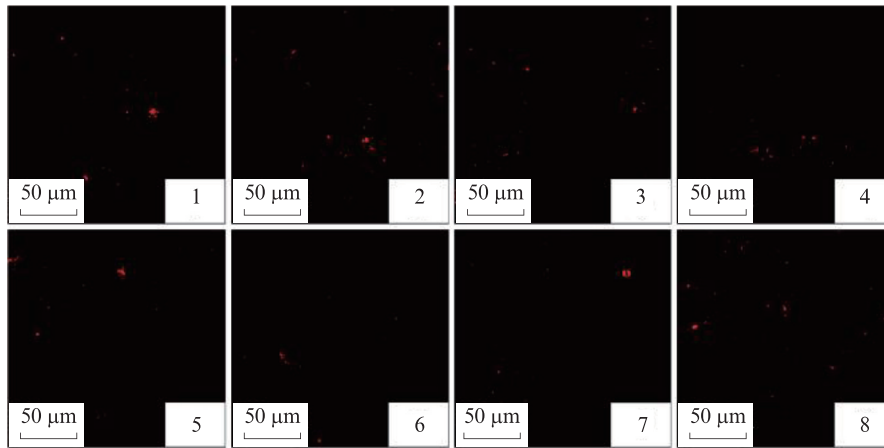


图6 生物被膜胞外蛋白生物量

Fig. 6 Biovolume of extracellular proteins of biofilms

2.6 不同铁离子浓度对生物被膜胞外脂类的影响
通过共聚焦显微镜观察胞外脂类(图版IV)
发现,铁离子浓度从0 $\mu\text{mol/L}$ 升高至 50 $\mu\text{mol/L}$,

生物被膜的胞外脂类生物量均无显著性差异($P > 0.05$),见图7。



1代表NSW,2-8分别是铁离子浓度为0、1、10、20、30、40和50 $\mu\text{mol/L}$ 的组别。

1 represents NSW, and 2-8 are groups with ferric ion concentrations of 0, 1, 10, 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

图版IV 生物被膜胞外脂类 CLSM 图像

Plate IV The CLSM images of extracellular lipids of biofilms

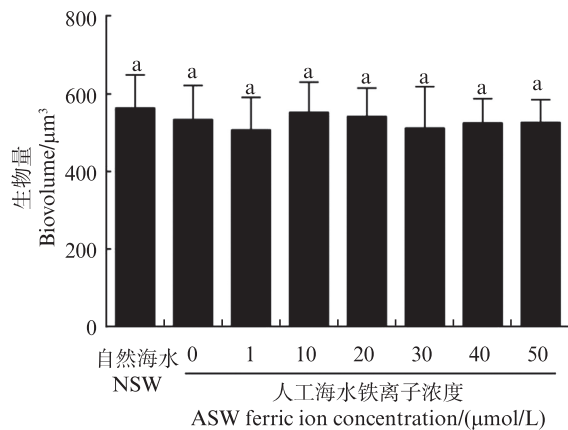


图7 生物被膜胞外脂类生物量

Fig. 7 Biovolume of extracellular lipids of biofilms

2.7 不同铁离子浓度对生物被膜细胞色素C的影响

通过微生物细胞色素C ELISA试剂盒检测在不同铁离子浓度培养条件下的生物被膜中细胞色素C的具体含量发现,海洋希瓦氏菌生物被膜细胞色素C在铁离子浓度为0 $\mu\text{mol/L}$ 时最少,为52.09 nmol/L;铁离子浓度升高至20 $\mu\text{mol/L}$,生物被膜细胞色素C含量最高,与0 $\mu\text{mol/L}$ 实验组的生物被膜细胞色素C含量相比升高了12.58%;铁离子浓度升高至40 $\mu\text{mol/L}$,细胞色素

C含量变化无明显差异($P > 0.05$),见图8。

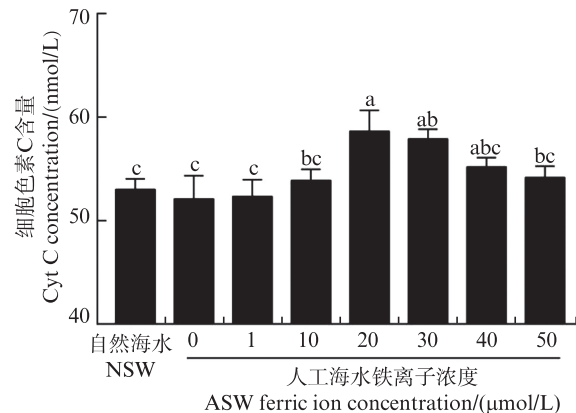
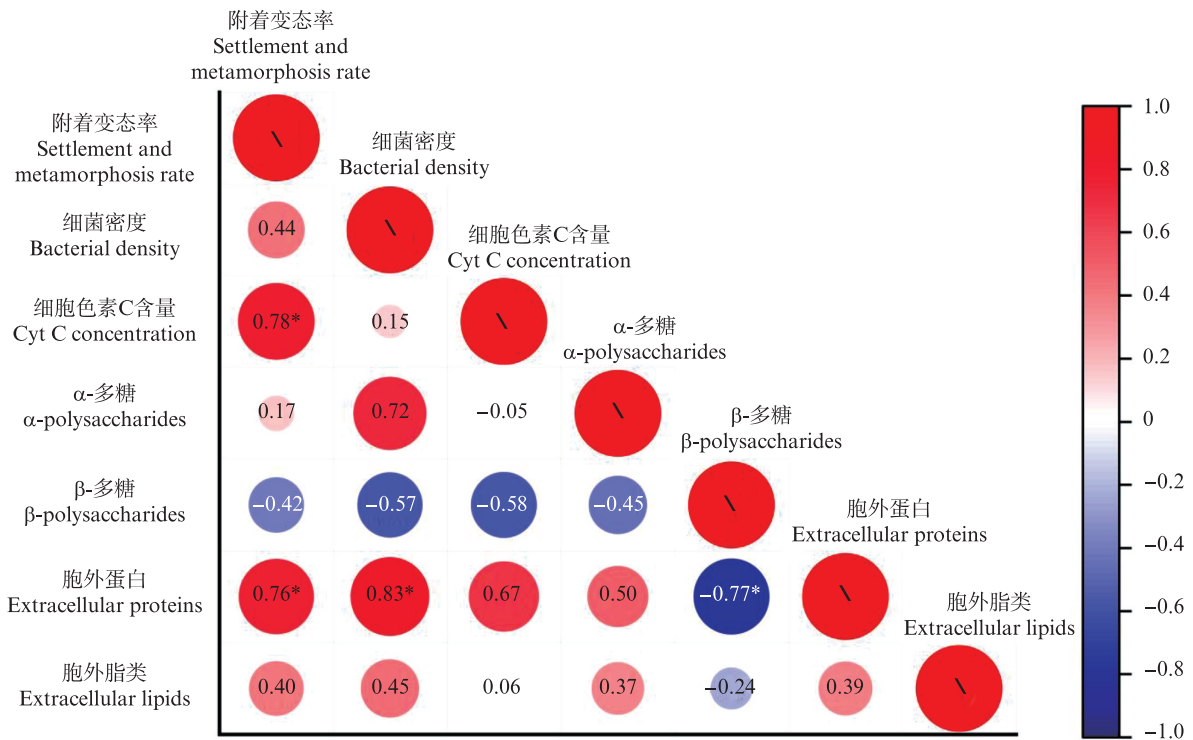


图8 铁离子浓度对生物被膜细胞色素C的影响

Fig. 8 Effect of ferric ion concentration on Cyt C of biofilms

2.8 幼虫附着变态与生物被膜组成成分相关性分析

通过相关性分析可知(图9),幼虫附着变态率与生物被膜胞外蛋白和细胞色素C含量呈显著相关($P < 0.05$);此外,幼虫的附着变态率与细菌密度、 α -多糖及胞外脂质的含量呈正相关趋势,与 β -多糖的含量呈负相关趋势,但相关性均未达到统计学显著性水平($P > 0.05$)。



*表示与对应组有显著性差异($P < 0.05$), 数字代表相关系数, 红色为正相关, 蓝色为负相关。

*means significant difference compared with the group ($P < 0.05$), numbers represent correlation coefficients, positive correlation in red, negative correlation in blue.

图9 厚壳贻贝附着变态与生物被膜组成成分相关性分析

Fig. 9 Correlation analysis between the settlement and metamorphosis of *M. coruscus* and the composition of biofilms

3 讨论

3.1 自然海水和人工海水的比较

本研究旨在探究铁离子浓度对海洋希瓦氏菌生物被膜形成与诱导厚壳贻贝幼虫附着变态能力的影响, 因此调整铁离子浓度为本研究的前提条件之一。在NSW中, 铁离子含量难以直接调控, 采用ASW替代NSW可以实现对铁离子浓度精准调节。为此, 首要步骤是验证ASW在生物被膜形成及诱导幼虫附着变态方面的效果是否与NSW一致。实验结果显示, 与NSW相比, ASW在对海洋希瓦氏菌生物被膜形成与诱导幼虫附着变态能力的影响上, 无显著性差异。因此, ASW可作为有效的替代介质, 用于本实验中以替代NSW进行后续的实验研究。

3.2 铁离子对细菌生物被膜形成的影响

细菌生物被膜形成是一个连续的过程, 首先浮游细菌附着在基质表面, 随后分泌多糖、蛋白质等胞外聚合物, 逐渐形成成熟生物被膜^[24-25]。在此过程中铁离子对其结构和功能具有重要影响。铁离子浓度低的情况下, 金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*)减少了多糖细胞间黏附素的形成, 导致生物被膜形成能力减弱^[26]。当铁离子浓度适宜时, 铁离子通过刺激eDNA和胞外多糖的产生, 促进了空肠弯曲菌(*Staphylococcus aureus*)生物被膜的形成^[27]; 铜绿假单胞菌Psl操纵子的转录抑制因子AmrZ的表达受到抑制, 鼠李糖脂合成量减少, 胞外多糖Psl合成量增加^[28]。但过高的铁浓度抑制铜绿假单胞菌生物被膜形成^[29]。综合以往研究发现, 铁离子缺乏或过量均不利于细菌生物被膜的形成, 并且铁离子主要影响生物被膜中的胞外多糖含量。相较于以往研究, 本研究显著区别在于: 铁离子主要影响海洋希瓦氏菌生物被膜中细胞色素C等胞外蛋白的含量, 胞外多糖和脂质并未受到影响。希瓦氏菌属(*Shewanella*)展现的特异性, 为这一现象提供了独特背景。希瓦氏菌属是一类具有金属还原能力的革兰氏阴性菌, 同时也是电活性微生物的模式菌属, 广泛存在于自然界中^[30]。希瓦氏菌以拥有物质基础为含铁蛋白的多样化呼吸途径著称, 尤其是含有丰富的细胞色素C蛋白^[31-32]。以往对海洋希瓦氏菌进行全基因组测序, 发现其存

在大量的细胞色素C功能基因^[33]。因此,我们对海洋希瓦氏菌生物被膜细胞色素C含量检测发现,其含量同样受到铁离子浓度的强烈影响(图8)。

但值得注意的是,当铁离子浓度被设定为0 $\mu\text{mol/L}$ 时,即环境中几乎不存在铁元素的情况下,海洋希瓦氏菌生物被膜细菌密度却达到相对较高的水平。有研究^[34]表明,在缺铁($\text{Fe}^{3+} < 0.1 \mu\text{mol/L}$)的情况下,变形链球菌(*Streptococcus mutans*)生物被膜形成能力增强,铁的缺乏诱导了变形链球菌聚集。这种现象是微生物对压力条件的早期适应性反应,使细菌能够在有害环境中生存和持续存在。另外,随着铁离子浓度的改变,细菌密度发生改变,但胞外多糖和脂质并未发生变化。通常情况下,胞外聚合物的产生与代谢能力和细菌密度有关^[25]。而代谢能力与细菌密度之间不存在直接关联,但与营养物质等因素有关^[35]。在本研究中,铁离子浓度的变化影响了细菌胞外蛋白代谢的能力,对胞外多糖与胞外脂质的代谢能力无影响。

3.3 铁离子对细菌生物被膜诱导厚壳贻贝幼虫附着变态能力影响

细菌生物被膜具有诱导无脊椎动物附着变态的能力,其胞外聚合物在此过程中发挥着关键作用^[36]。藤黄紫假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas luteoviolacea*)能够产生一种胞外噬菌体尾状结构阵列,诱导华美盘管虫(*Hydroides elegans*)附着变态^[37]。海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas marina*)生物被膜可以通过产生可拉酸、脂多糖、鞭毛蛋白等多种胞外多糖和蛋白来诱导厚壳贻贝附着变态^[38-40]。实验室以往发现海假交替单胞菌在不同浓度钙离子的影响下,外膜蛋白的表达抑制了胞外产物的分泌,进而影响厚壳贻贝附着^[21]。而在本研究中,铁离子浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 时,海洋希瓦氏菌生物被膜附着变态诱导率达到最高,此时细胞色素C含量也达到最高水平,并且与附着变态率的变化趋势一致。结合以往研究与本实验结果推测,海洋希瓦氏菌生物被膜可能通过细胞色素C来诱导厚壳贻贝附着变态。然而,目前缺少细菌细胞色素C能够诱导无脊椎动物附着变态的直接证据。细胞色素C广泛存在于动物、植物、微生物体内,主要在呼吸电子转移和细胞凋亡等生物过

程中发挥重要作用^[41]。HU等^[42]研究发现,白斑综合征病毒刺激南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)体内细胞色素C上调,进而引起caspase-3细胞凋亡,促进生长发育。除此之外,包括螺类^[43],海胆^[44]等多种无脊椎动物都需要依靠细胞色素C的释放来激活caspase通路。厚壳贻贝幼虫在附着变态过程中展现出的显著生物学特征为面盘萎缩和纤毛环脱落,这个过程与复杂的细胞凋亡紧密相关。实验室先前研究已经明确caspase信号通路在厚壳贻贝附着变态早期阶段发挥着关键作用^[45],进一步支持了细胞凋亡在附着变态过程中的重要性和细菌细胞色素C调控caspase信号通路的可能性。然而,关于细菌细胞色素C是否能被宿主利用从而调控caspase信号通路导致细胞凋亡,目前缺乏直接证据。

值得注意的是,当铁离子浓度从20 $\mu\text{mol/L}$ 升高至40 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞色素C含量变化无明显差异(图8),细菌生物被膜胞外蛋白(图6)以及附着变态率(图3)却呈现显著下降趋势,此现象说明厚壳贻贝附着变态的过程还受到其他胞外蛋白的调控。WANG等^[46]发现铁离子通过调节鞭毛组装介导克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)的群集运动能力。本实验室以往的研究证明了海假交替单胞菌鞭毛蛋白能够促进厚壳贻贝附着变态^[38]。因此,铁离子是否还通过影响海洋希瓦氏菌的鞭毛蛋白来影响厚壳贻贝附着变态需要进一步研究。另外,自然海水组与铁离子浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 人工海水组的附着变态率无明显差异(图3),但细胞色素C含量却有明显差异(图8)。在本研究里,人工海水配方得以确定的依据是:由该人工海水与自然海水所形成的细菌生物被膜,在诱导厚壳贻贝幼虫附着变态能力上处于相同水平。由于人工海水无论作出何种调整,都不能与自然海水中相应的成分与浓度完全一致,因此人工海水与自然海水成分存在差异,从而导致细菌生物被膜胞外产物存在差异。细胞色素C是一种含有血红素C的电子传递蛋白,而血红素C以铁卟啉环为中心结构^[47],因此铁离子对于细胞色素C的合成十分重要。而自然海水中铁离子浓度^[48]低于该人工海水浓度,因此推测自然海水中的细胞色素C含量相对较少,与本实验结果相符合(图8)。但相较于ASW中的铁离子浓度为0 $\mu\text{mol/L}$ 时,铁离子浓

度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 条件下的生物被膜细胞色素 C 显著增加,厚壳贻贝附着变态率显著增加。综合相关性分析,进一步推断铁离子、细胞色素 C 和厚壳贻贝幼虫的附着变态存在一定的相关性。

综上所述,铁离子影响了海洋希瓦氏菌细胞色素 C 等胞外蛋白的分泌,进而影响了细菌生物被膜的形成和诱导幼虫附着变态的能力。本研究结果为深入探索厚壳贻贝幼虫附着变态过程的分子调控机制,以及贝类与细菌之间复杂相互作用关系的后续研究奠定了坚实的理论基础与参考依据。

作者声明本文无利益冲突

参考文献:

- [1] QIAN P Y, CHENG A F, WANG R J, et al. Marine biofilms: diversity, interactions and biofouling [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(11): 671-684.
- [2] STRATHMANN R R. Hypotheses on the origins of marine larvae [J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 1993, 24(1): 89-117.
- [3] HADFIELD M G, CARPISO-ITUARTE E J, DEL CARMEN K, et al. Metamorphic competence, a major adaptive convergence in marine invertebrate larvae [J]. *American Zoologist*, 2001, 41(5): 1123-1131.
- [4] ALMEDA R, RIST S, CHRISTENSEN A M, et al. Crude oil and its burnt residues induce metamorphosis in marine invertebrates [J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(48): 19304-19315.
- [5] CARBONNE C, COMEAU S, CHAN P T W, et al. Early life stages of a Mediterranean coral are vulnerable to ocean warming and acidification [J]. *Biogeosciences*, 2022, 19(19): 4767-4777.
- [6] SIDDIK A A, SATHEESH S. Interactive effects of light and substrate colour on the recruitment of marine invertebrates on artificial materials [J]. *Community Ecology*, 2021, 22(1): 69-78.
- [7] 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.
- [8] HARDER T, QIAN P Y. Induction of larval attachment and metamorphosis in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* by dissolved free amino acids: isolation and identification [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1999, 179: 259-271.
- [9] 莘似韵, 孙晓红, 徐忆宁, 等. 超高压对单增李斯特菌生物被膜形成的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(2): 294-300.
- [10] 付娇娇, 王旭, 刘海泉, 等. 不同培养条件下 *sigB* 对单增李斯特菌生物被膜形成的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(4): 634-640.
- [11] FU J J, WANG X, LIU H Q, et al. Effects of *sigB* on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* under various culture conditions [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(4): 634-640.
- [12] YANG N, RØDER H L, WICKAKSONO W A, et al. Interspecific interactions facilitate keystone species in a multispecies biofilm that promotes plant growth [J]. *The ISME Journal*, 2024, 18(1): wrac012.
- [13] SHI H J, MAO X S, YANG F, et al. Multi-scale analysis of acidophilic microbial consortium biofilm's tolerance of lithium and cobalt ions in bioleaching [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 474: 134764.
- [14] BANIN E, VASIL M L, PETER GREENBERG E. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(31): 11076-11081.
- [15] DONG Y R, SHAN Y W, XIA K M, et al. The proposed molecular mechanisms used by archaea for Fe (III) reduction and Fe (II) oxidation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 690918.
- [16] MÜHLENHOFF U, BRAYMER J J, CHRIST S, et al. Glutaredoxins and iron-sulfur protein biogenesis at the interface of redox biology and iron metabolism [J]. *Biological Chemistry*, 2020, 401(12): 1407-1428.
- [17] RODEN E E. Microbial iron-redox cycling in subsurface environments [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2012, 40(6): 1249-1256.
- [18] QIN Y X, HE Y H, SHE Q X, et al. Heterogeneity in respiratory electron transfer and adaptive iron utilization in a bacterial biofilm [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3702.
- [19] CORNELIS P, MATTHIJS S, VAN OEFFELEN L. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *BioMetals*, 2009, 22(1): 15-22.
- [20] CHEN X, STEWART P S. Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(6): 718-720.
- [21] WIENS J R, VASIL A I, SCHURR M J, et al. Iron-regulated expression of alginate production, mucoid phenotype, and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *mBio*, 2014, 5(1): e01010-13.
- [22] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] O'TOOLE G, KAPLAN H B, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development [J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54(1): 49-79.
- [25] BRANDA S S, VIK Å, FRIEDMAN L, et al. Biofilms: the matrix revisited [J]. Trends in Microbiology, 2005, 13(1): 20-26.
- [26] LIN M H, SHU J C, HUANG H Y, et al. Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus* [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34388.
- [27] OH E, ANDREWS K J, JEON B. Enhanced biofilm formation by ferrous and ferric iron through oxidative stress in *Campylobacter jejuni* [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1204.
- [28] YU S, WEI Q, ZHAO T H, et al. A survival strategy for *Pseudomonas aeruginosa* that uses exopolysaccharides to sequester and store iron to stimulate Psl-dependent biofilm formation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(21): 6403-6413.
- [29] MUSK D J, BANKO D A, HERGENROTHER P J. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chemistry & Biology, 2005, 12(7): 789-796.
- [30] CHANG W W, LI Y Y, LI Z Y, et al. The effect of riboflavin on the microbiologically influenced corrosion of pure iron by *Shewanella oneidensis* MR-1 [J]. Bioelectrochemistry, 2022, 147: 108173.
- [31] FREDRICKSON J K, ROMINE M F, BELIAEV A S, et al. Towards environmental systems biology of *Shewanella* [J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(8): 592-603.
- [32] LEMAIRE O N, MÉJEAN V, IOBBI-NIVOL C. The *Shewanella* genus: ubiquitous organisms sustaining and preserving aquatic ecosystems [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2020, 44(2): 155-170.
- [33] CHANG R H, FENG D D, PENG L H, et al. Complete genome sequence of *Shewanella marisflavi* ECSMB14101, a red pigment synthesizing bacterium isolated from the East China Sea [J]. Marine Genomics, 2021, 58: 100846.
- [34] FRANCESCA B, AJELLO M, BOSSO P, et al. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans* [J]. Biometals, 2004, 17(3): 271-278.
- [35] MA L Z, WANG D, LIU Y W, et al. Regulation of biofilm exopolysaccharide biosynthesis and degradation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Annual Review of Microbiology, 2022, 76(1): 413-433.
- [36] 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(1): 453-470.
- [37] SHIKUMA N J, PILHOFER M, WEISS G L, et al. Marine tubeworm metamorphosis induced by arrays of bacterial phage tail-like structures [J]. Science, 2014, 343(6170): 529-533.
- [38] 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.
- [39] 陈慧娥, 贺康, 贺楚哈, 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 Fisheries University, 2022, 37(4): 620-626.
- [40] 吴静娴, 李嘉政, 胡晓梦, 等. 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 J X, LI J Z, HU X M, et al. 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.
- [41] JIANG X J, WANG X D. Cytochrome *c*-mediated apoptosis [J]. Annual Review of Biochemistry, 2004, 73(1): 87-106.
- [42] HU W Y, YAO C L. Molecular and immune response characterizations of a novel AIF and cytochrome *c* in *Litopenaeus vannamei* defending against WSSV infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 56: 84-95.
- [43] PIRGER Z, RÁCZ B, KISS T. Dopamine-induced programmed cell death is associated with cytochrome *c* release and caspase-3 activation in snail salivary gland cells [J]. Biology of the Cell, 2009, 101(2): 105-116.
- [44] ROBERTSON A J, CROCE J, CARBONNEAU S, et al. The genomic underpinnings of apoptosis in

- Strongylocentrotus purpuratus* [J]. *Developmental Biology*, 2006, 300(1): 321-334.
- [45] 刘志显, 李嘉政, 梁邻利, 等. 厚壳贻贝 *McCaspase 3-4* 基因的克隆及其在幼虫变态中的作用[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(8): 1168-1176.
- LIU Z X, LI J Z, LIANG L L, et al. Molecular cloning of *McCaspase 3-4* and its functions in *Mytilus coruscus* larval metamorphosis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(8): 1168-1176.
- [46] WANG Y, LING N, WANG Y P, et al. Effect of ferric ions on *Cronobacter sakazakii* growth, biofilm formation, and swarming motility [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 408: 110418.
- [47] SMITH L J, KAHRAMAN A, THORNTON J M. Heme proteins—diversity in structural characteristics, function, and folding [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2010, 78(10): 2349-2368.
- [48] 吴瑶, 姚佳佳, 杨茹君, 等. 夏季长江口海域溶解态铁的分布及混合行为研究[J]. *海洋科学*, 2022, 46(11): 15-28.
- WU Y, YAO J J, YANG R J, et al. Distribution and mixing behavior of dissolved iron in the Changjiang River Estuary during summer [J]. *Marine Sciences*, 2022, 46(11): 15-28.

Effects of ferric ions on the capacity of *Shewanella marisflavi* ECSMB14101 biofilms to induce the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*

TAO Yu^{1,2,3}, MA Fan^{1,2,3}, PENG Lihua^{1,2,3}, LIANG Xiao^{1,2,3}, YANG Jinlong^{1,2,3}

(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 Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To study the impact of ferric ions on the ability of *Shewanella marisflavi* ECSMB14101 biofilms to induce larval settlement and metamorphosis in *Mytilus coruscus*, single bacterial biofilms cultivated with different ferric ion concentrations were used to induce larval settlement and metamorphosis. The effects of ferric ion concentration on the inducing activity of larval settlement and metamorphosis, bacterial density, extracellular polymeric substances, and cytochrome C content of *S. marisflavi* biofilms were analysed. Results showed that among the seven groups with ferric ion concentrations of 0, 1, 10, 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{mol/L}$, the biofilm of *S. marisflavi* cultivated at a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$ exhibited the highest inducing activity. Furthermore, at this concentration, both the bacterial density of the biofilm and the levels of extracellular proteins and cytochrome C reached their peak among all seven tested concentrations. Extracellular polysaccharides and lipids were not significantly affected by ferric ion concentration. It was shown that under the effects of ferric ions, *S. marisflavi* biofilms regulate the larval settlement and metamorphosis in *M. coruscus* by modulating the production of extracellular proteins, including cytochrome C. This research offered a solid theoretical foundation and served as a valuable reference for the in-depth investigation of the molecular regulatory mechanisms underlying larval settlement and metamorphosis in *M. coruscus*. Additionally, it contributes to the understanding of interactions between shellfish and bacteria.

Key words: *Mytilus coruscus*; settlement and metamorphosis; *Shewanella marisflavi* ECSMB14101; ferric ions; cytochrome C