

## 中湿度表面的海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响

杨金龙<sup>1,2,3\*</sup>, 郭行磐<sup>1</sup>, 陈芋如<sup>1</sup>, 沈和定<sup>1</sup>, 丁德文<sup>3</sup>

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

2. 上海海洋大学海洋科学研究院, 上海 201306;

3. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

**摘要:** 为研究自然微生物膜中海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响, 通过海洋贝类生物学、分子微生物生态学等手段调查附着基表面湿度、微生物膜的密度以及细菌种属系统发育与厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 稚贝附着关系。结果表明, 所有测试海洋细菌形成微生物膜的最终密度随初始密度的增加而增加。所测海洋细菌均能不同程度地诱导厚壳贻贝稚贝的附着, 其中 *Cobetia* sp. 3 形成的微生物膜显示出最高诱导活性, 其诱导的稚贝附着率为 (70% ± 3%); *Nautella* sp. 2、*Pseudoalteromonas* sp. 9、*Pseudoalteromonas* sp. 10、*Bacillus* sp. 5 和 *Pseudoalteromonas* sp. 11 等 5 株细菌表现中等程度的诱导活性, 其诱导的附着率范围为 51% ~ 60%。所有测试菌株所形成的微生物膜密度与稚贝附着均呈显著相关, 尤其是 *Pseudoalteromonas* sp. 9 和 *Cobetia* sp. 3 诱导活性与附着率相关性极强, 其相关性系数分别为 0.774 1 和 0.723 3。系统发育分析结果表明, 微生物膜密度和厚壳贻贝稚贝的附着率显著相关, 然而海洋细菌诱导活性与细菌种属无关。因而, 中湿度表面的海洋附着细菌对厚壳贻贝的附着有着明显的促进作用, 本研究为后续开展厚壳贻贝稚贝的附着机制提供了理论依据。

**关键词:** 厚壳贻贝; 稚贝; 附着; 表面湿度; 海洋细菌

**中图分类号:** S 968.3

**文献标志码:** A

通常情况下, 表面洁净的物体一旦浸没在海洋环境中, 便会很快吸附水中的无机颗粒和有机碎屑等物质从而形成一层具有一定理化性质的薄膜, 随后海洋细菌作为初始附着的微生物会粘附到薄膜表面, 生长、繁殖并分泌胞外代谢产物, 进一步改变附着基表面的物理和化学性质, 从而调节硅藻及海洋无脊椎动物幼虫或大型海藻孢子的附着行为<sup>[1]</sup>。研究表明附着基的表面性质如表面湿度等能够影响海洋附着细菌的密度和群落结构等<sup>[2-3]</sup>。自然微生物膜、单一细菌及混合细菌形成的微生物膜均能在不同程度上诱导或抑制海洋无脊椎动物幼虫的附着变态发育过程<sup>[4-5]</sup>。以往贝类的相关研究发现细菌形成的微生物膜能够定向诱导贝类幼虫的附着并应用于水产养殖<sup>[6]</sup>,

然而, 关于稚贝附着影响的研究工作尚未见相关报道。

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*), 隶属于软体动物门 (Mollusca), 双壳纲 (Bivalvia), 贻贝目 (Mytilodia), 贻贝科 (Mytilidae), 是我国重要的海产贝类养殖品种, 自然分布于黄海、渤海和东海沿岸<sup>[7]</sup>。在厚壳贻贝生活史中, 浮游生活阶段的幼虫成熟后, 便会附着变态成为稚贝, 并最终发育为成贝<sup>[8]</sup>。在由稚贝向成贝生长发育的过程中, 当环境发生变化时, 厚壳贻贝的稚贝能够自行切断足丝, 开始爬行并重新选择适宜的附着基进行再次附着。此外, 厚壳贻贝具有生长快以及抗病能力和环境适应能力强等特点, 但由于自然资源的大量采捕和人工培育技术不足等因素, 制约了

收稿日期: 2014-11-10 修回日期: 2014-12-23

资助项目: 国家自然科学基金 (41476131); 上海市教委创新重点项目 (14ZZ143); 上海市科委重点基金项目 (12230502100); 上海高校水产学一流学科

通信作者: 杨金龙. E-mail: jlyang@shou.edu.cn

厚壳贻贝养殖产业的发展<sup>[9]</sup>。因此,探索利用细菌形成微生物膜诱导厚壳贻贝附着技术等生物工程技术显得尤为必要。

本实验从硅烷化处理后的中湿度载玻片上形成的自然微生物膜中分离、纯化和鉴定附着细菌,调查了单一菌株形成的微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响;同时构建系统发育树,分析其遗传距离与稚贝附着的相互关系。旨在通过本研究查明厚壳贻贝稚贝附着行为与海洋细菌的关系,进一步解析厚壳贻贝稚贝附着机制,为厚壳贻贝苗种的培育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用厚壳贻贝稚贝取自浙江嵊泗县东海贻贝科技创新服务有限公司,壳长(1.78 ± 0.05) mm,壳高(1.17 ± 0.03) mm,至少在实验室内暂养1周后用于实验。暂养期间,温度控制在18℃,充气培养,每天换水及投喂金藻作为饵料,供实验用。

实验所需的海洋细菌来源于浙江舟山嵊泗海域自然微生物膜,利用ZoBell 2216E平板培养法<sup>[10]</sup>分离纯化得到单株,进行实验。挂板所用载玻片经过3-氨基丙基三乙氧基硅烷(aminopropyltriethoxysilane, APS)(Sigma)处理以形成中湿度附着基表面。

### 1.2 实验方法

**海洋细菌分离** 海洋细菌分离方法参考Yang等<sup>[10]</sup>。通过使用无菌载玻片将微生物膜从载玻片表面刮至20 mL灭菌过滤海水(autoclaved filtered sea water, AFSW),形成悬浮液。经10 000倍稀释后,滴适量涂布于ZoBell 2216E琼脂平板上,在黑暗条件下25℃培养48 h后挑取菌落,在平板上反复划线分离纯化,得到纯种菌株,并于-80℃,0.9%生理盐水配15%的甘油溶液中保存。

**单一细菌16S rDNA基因序列的鉴定**  
DNA提取:将分离获得的单株海洋细菌加至100 μL无菌蒸馏水,用细菌基因组DNA抽提试剂盒(K714,上海博彩生物科技有限公司)提取。PCR扩增:采用细菌16S rDNA序列通用引物进行扩增,引物为27 F(5'-AGAGTTTGATCCTGGC-TCAG-3')和1492 R(5'-GGTTACCTTGTTAC-

GACTT-3'),扩增总体积为25 μL:模板DNA 2 μL,4 × dNTPs(10 μmol/L)0.5 μL,Taq DNA聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,引物(20 pmol/μL)各0.5 μL,10 × 扩增缓冲液(含Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL,用ddH<sub>2</sub>O补足至25 μL。PCR反应在银制梯度PCR仪(Eppendorf AG 22331,德国)上进行,PCR扩增条件:94℃预变性5 min,35个循环的降落PCR(94℃变性30 s,55℃退火30 s,每一循环递减0.5℃,72℃延伸2 min),在72℃延伸8 min,最后将PCR扩增产物置于-20℃条件下保存。PCR扩增产物使用1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检验。PCR扩增产物经上海迈浦生物技术有限公司测序,获得序列,并通过Blast程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)与GenBank中核酸数据进行比对后上传至NCBI数据库,获取序列号并确定细菌名称。

**序列比对和系统发育分析** 将从测序公司获得的序列与有亲缘关系的序列在MEGA 5.05中CLUSTALW程序进行分析。进化树的构建参考Yang等<sup>[10]</sup>的方法,使用MEGA 5.05的邻接法(NJ),最大简约法(MP)和最小进化法(ME)对测试菌株的亲缘关系进行分析(1 000次重复)。遗传距离用Jukes-Cantor方法计算。从NCBI GenBank数据库中得到*Escherichia coli* EC096/10(序列号AONF01000005.1)作为外群序列构建细菌系统发育树。

**微生物膜制备** 挑取纯种菌株到100 mL ZoBell 2216E液体培养基,25℃,48 h黑暗条件下进行扩增培养后,离心洗涤(3 500 rpm,15 min),去除上清液,收集细菌,加入50 mL AFSW,混匀后即制成悬浮液。用0.1%吖啶橙染色5 min,在荧光显微镜(Olympus BX51)×1 000倍下随机选取10个视野进行计数,确定细菌总密度。先将灭菌载玻片放入灭菌培养皿(Ø64 mm × 19 mm)中,随后适量添加单株细菌悬浮液,并通过添加灭菌过滤海水定容至20 mL,使得每株细菌的初始细菌密度分别为1.0 × 10<sup>6</sup>、3.0 × 10<sup>6</sup>、5.0 × 10<sup>6</sup>和10.0 × 10<sup>6</sup> cells/mL。每个初始密度设置12个平行组,黑暗条件下,18℃培养48 h后形成微生物膜。

**微生物膜细菌密度计数** 制备完成的微生物膜被固定在5%福尔马林溶液中。固定后的微生物膜经AFSW清洗3次,0.1%吖啶橙染色

5 min后,直接置于1 000倍荧光显微镜下随机选取10个视野进行计数,每个细菌密度梯度设置3个平行组,以确定不同初始浓度的细菌最终形成的微生物膜密度,其计算公式如下:

细菌密度 (cells/cm<sup>2</sup>) = 所有视野内细菌数 (cells) / (视野个数 × 视野面积)

式中:视野面积为10<sup>-4</sup>cm<sup>2</sup>。

**稚贝附着实验** 在每个灭菌培养皿中加入20 mL AFSW、一片附有微生物膜的载玻片以及10只稚贝,18℃黑暗条件培养。实验分别在12、24和48 h时,记录稚贝的附着个体数,每个细菌密度设置9个平行组,以空白载玻片作为对照,每次实验设置3个空白对照组。稚贝附着率计算公式如下:

稚贝附着率 (%) = (微生物膜上附着稚贝数 / 稚贝总数) × 100

当附着率 > 70% 时为高诱导活性;当 50% ≤ 附着率 ≤ 70% 时为中等程度诱导活性;附着率 < 50% 时为低诱导活性。

### 1.3 数据处理

采用 JMP 10.0.0 软件进行统计分析及相关性检验。在统计分析之前,先将附着率数据进行反正弦转化,然后所有的数据均进行正态性检验。如果满足正态分布,且方差相同,则通过单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行分析;如不满足正态性分布,则通过 Kruskal-Wallis Test 进行评估检验。同时,附着率与细菌密度之间的相关性检验使用多元分析方法,相关性系数为  $r$ ,  $P < 0.05$  时差异显著。相关系数  $r > 0.7$  时为极显著相关;当  $0.5 \leq r \leq 0.7$  为中等程度显著相关; $r < 0.5$  为低等程度显著相关。

## 2 结果

### 2.1 海洋细菌的测序与定名

本实验所用海洋细菌经 16S rDNA 测序以及 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对获得菌名、序列号等基本信息,6 株海洋细菌分属于 4 个不同菌属 (表 1)。

表 1 海洋细菌 16S rDNA 基因序列分析  
Tab.1 16S rDNA gene sequence analysis of the bacterial strains

菌株 isolate	上传序列号 accession No. of submissions	比对菌名 name of BLAST closest match	比对序列号 accession No. of closest match	相似度/% similarity
APS-1	KM369833	<i>Nautella</i> sp. 2	JN594623	99
APS-2	KM369834	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 9	AM913936	99
APS-3	KM369835	<i>Cobetia</i> sp. 3	KF146624	99
APS-4	KM369836	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 10	JQ082185	99
APS-5	KM369837	<i>Bacillus</i> sp. 5	GQ903403	100
APS-6	KM369838	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 11	EU548075	99

### 2.2 细菌密度对微生物膜形成的影响

在 4 个初始细菌密度条件下,微生物膜的最终密度随初始细菌密度的增加而呈现不同程度的增加 (图 1)。初始细菌密度为  $1.0 \times 10^6$  cells/mL 时,*Pseudoalteromonas* sp. 9 形成微生物膜的最终密度最高,为  $(3.5 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^6)$  cells/cm<sup>2</sup>; *Pseudoalteromonas* sp. 10 形成的微生物膜密度最低,为  $(3.5 \times 10^6 \pm 4.2 \times 10^4)$  cells/cm<sup>2</sup>。初始细菌密度为  $3.0 \times 10^6$  cells/mL 时,微生物膜的最终密度最高仍为 *Pseudoalteromonas* sp. 9,其细菌密度为  $(6.3 \times 10^7 \pm 6.5 \times 10^5)$  cells/cm<sup>2</sup>; *Pseudoalteromonas* sp. 10 形成微生物膜密度最低。初始密度为  $5.0 \times 10^6$  cells/mL 时,*Nautella* sp. 2、*Pseudoalteromonas* sp. 9、*Cobetia* sp. 3 和 *Bacillus* sp. 5 形成微生物膜的最终密度间无显著

性差异 ( $P > 0.05$ ), 但均显著高于 *Pseudoalteromonas* sp. 10 和 *Pseudoalteromonas* sp. 11 形成的微生物膜细菌密度 ( $P < 0.05$ )。初始密度为  $10.0 \times 10^6$  cells/mL 时,*Cobetia* sp. 3 形成微生物膜的细菌密度显著高于其他 5 株细菌 ( $P < 0.05$ ), 其密度为  $(9.5 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^6)$  cells/cm<sup>2</sup>。

### 2.3 海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响

海洋细菌形成的微生物膜在 12、24 和 48 h 时对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性结果基本相似,因而本研究仅出示 12 h 时的诱导活性结果 (图 2)。空白对照组稚贝的附着率仅为  $(17\% \pm 3\%)$ , 与空白对照组相比,所有测试菌株均显著诱导厚壳贻贝稚贝的附着 ( $P < 0.05$ )。 *Cobetia* sp. 3 显示出最高诱导活性,其附着率为  $(70\% \pm 3\%)$ 。 *Nautella* sp. 2、*Pseudoalteromonas* sp. 9、*Pseudoalteromonas* sp.

10、*Bacillus* sp. 5 和 *Pseudoalteromonas* sp. 11 5 株细菌表现中等程度的诱导活性,其诱导的稚贝附着率范围为 51%~60%。

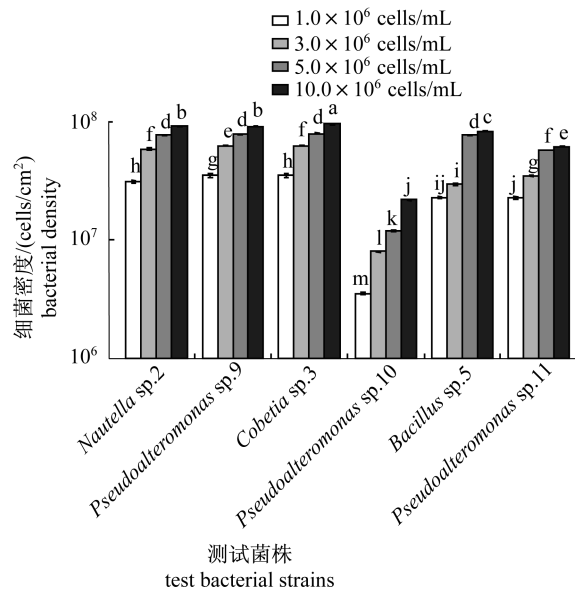


图1 不同初始细菌密度下形成生物膜的密度变化  
不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同

Fig. 1 The density of monospecific bacterial biofilms under different initial densities  
Means  $\pm$  SE ( $n = 30$ )

Values that are significantly different between each other at  $P < 0.05$  are indicated by different letters above the bars. The same as the following

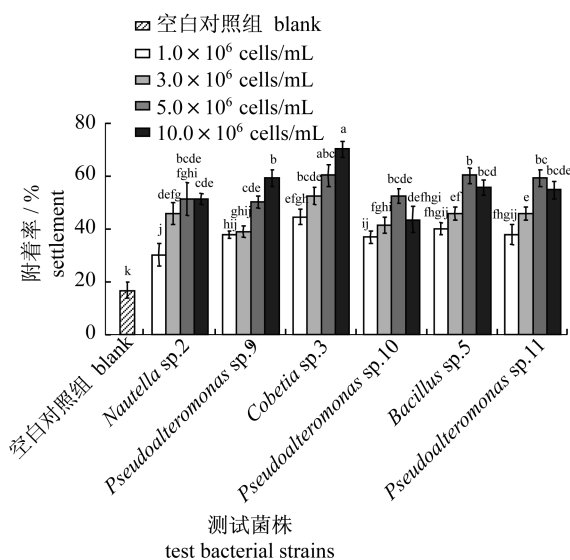


图2 不同海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的诱导作用  
Fig. 2 Percentages of settlement of *M. coruscus* plantigrades on the different monospecific bacterial biofilms

## 2.4 细菌密度对稚贝附着率的影响

实验结果表明, *Pseudoalteromonas* sp. 9 和 *Cobetia* sp. 3 海洋细菌对厚壳贻贝稚贝的诱导活性随细菌密度的增加而增加 (图 3)。*Pseudoalteromonas* sp. 10、*Bacillus* sp. 5 和 *Pseudoalteromonas* sp. 11 海洋细菌对稚贝附着的诱导活性随密度的增加,呈先增高后达到最大值,随后下降的趋势。菌株 *Nautella* sp. 2 在细菌密度为  $(7.7 \times 10^7 \pm 6.7 \times 10^5)$  cells/cm<sup>2</sup> 和  $(9.2 \times 10^7 \pm 7.4 \times 10^5)$  cells/cm<sup>2</sup> 时形成的微生物膜对稚贝的附着效果基本相同,诱导的稚贝附着率分别为  $(51\% \pm 6\%)$  和  $(51\% \pm 2\%)$ 。稚贝附着与细菌密度之间的相关性分析结果表明,6 株海洋细菌密度与稚贝附着率均显著相关 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。*Pseudoalteromonas* sp. 9 和 *Cobetia* sp. 3 的细菌密

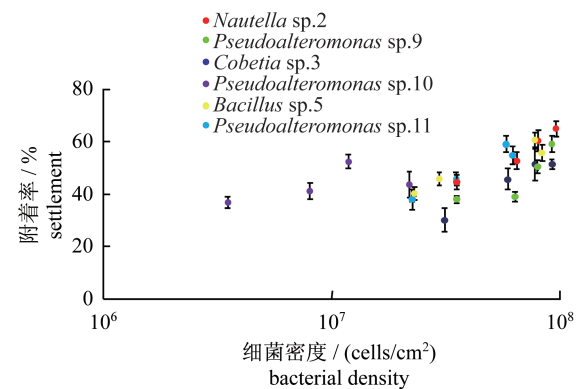


图3 单一菌株形成生物膜的不同密度对厚壳贻贝稚贝附着的诱导作用

Fig. 3 Percentages of settlement of *M. coruscus* plantigrades on monospecific bacterial biofilms of varying densities

表2 细菌密度与诱导活性相关性分析

Tab. 2 Correlation analyses between the bacterial density of biofilms and their inducing activity

测试菌株 test bacterial strains	细菌密度 bacterial density	
	$r$	$P$
<i>Nautella</i> sp. 2	0.543 6	<0.000 6 *
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 9	0.774 1	<0.000 1 *
<i>Cobetia</i> sp. 3	0.723 3	<0.000 1 *
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 10	0.400 3	<0.015 6 *
<i>Bacillus</i> sp. 5	0.651 5	<0.000 1 *
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 11	0.593 7	<0.000 1 *

注:  $r$  为相关系数;  $P$  为检验值; \* 表示显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Notes:  $r$  = correlation coefficient;  $P$  =  $P$ -value; \* significant at  $P < 0.05$

度与附着率呈极显著相关( $r > 0.7$ ), *Nautella* sp. 2、*Bacillus* sp. 5 和 *Pseudoalteromonas* sp. 11 的密度与附着率间呈中等程度显著相关( $0.5 \leq r \leq 0.7$ ), 然而 *Pseudoalteromonas* sp. 10 细菌密度与附着率间的相关性相对较弱( $r < 0.5$ )。

### 2.5 海洋细菌的系统发育分析

采用不同的方法和模式进行系统发育分析发现结果类似。测试菌株 16S rDNA 序列的系统发育树(图 4)与遗传距离(表 3)显示 *Pseudoalteromonas* sp. 10 和 *Pseudoalteromonas* sp. 11 两株细菌聚类在一起, 其遗传距离为

0.005, 而这两株细菌与同属菌株 *Pseudoalteromonas* sp. 9 的遗传距离分别为 0.030 和 0.031。不同菌属之间, *Pseudoalteromonas* sp. 和 *Cobetia* sp. 3 先聚类, 而后与 *Bacillus* sp. 5 和 *Nautella* sp. 2 聚类, 最后与外群细菌 *E. coli* EC096/10 聚类。 *Pseudoalteromonas* sp. 9 和 *Bacillus* sp. 5 之间的遗传距离为 0.240, 分别属于盐单胞菌属和芽孢杆菌属, 均表现出中等程度的诱导活性。 *Pseudoalteromonas* sp. 9 和 *Pseudoalteromonas* sp. 10 同属于交替假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp.), 也呈中等程度诱导活性。

表 3 所测海洋细菌的遗传距离

Tab. 3 Genetic distances of the bacterial strains tested

测试菌株 test bacterial strains	<i>Nautella</i> sp. 2	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 9	<i>Cobetia</i> sp. 3	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 10	<i>Bacillus</i> sp. 5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 11
<i>Nautella</i> sp. 2						
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 9	0.263					
<i>Cobetia</i> sp. 3	0.239	0.136				
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 10	0.247	0.030	0.139			
<i>Bacillus</i> sp. 5	0.261	0.240	0.226	0.239		
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 11	0.250	0.031	0.138	0.005	0.238	

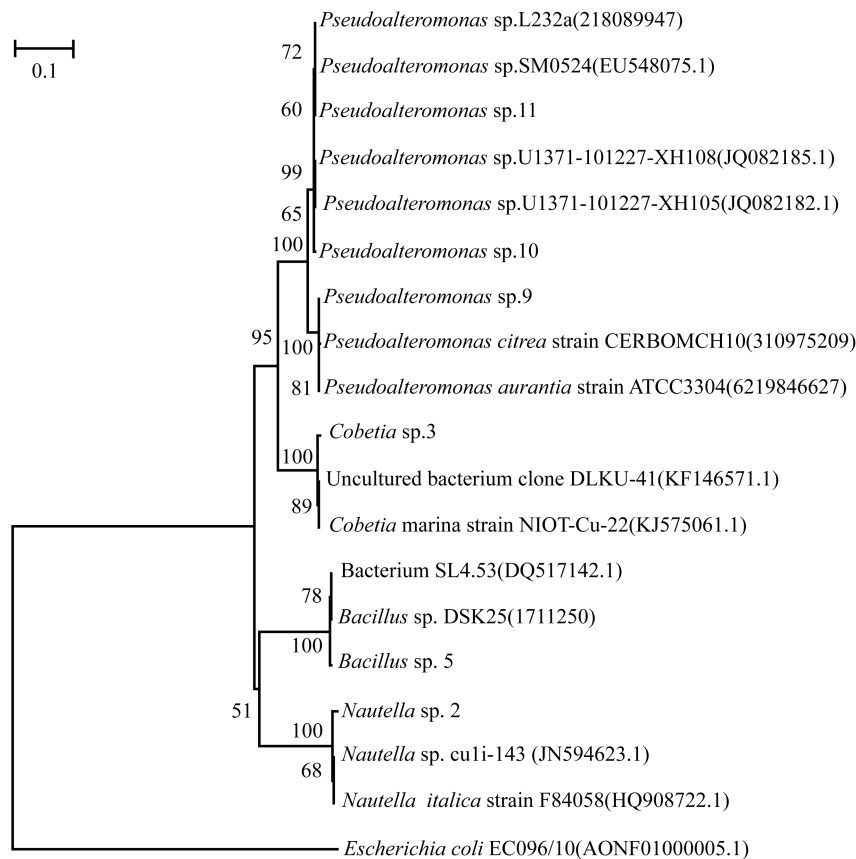


图 4 细菌 16S rDNA 用 NJ 法构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of 16S rDNA gene sequences from bacterial isolates using the Neighbor-Joining method

### 3 讨论

微生物膜是贻贝幼虫附着变态的重要化学诱因,然而关于微生物膜与贻贝稚贝附着之间的相互关系的研究相对较少<sup>[11-12]</sup>。本研究首次证明来源于中湿度表面的海洋细菌能够有效诱导海产贝类厚壳贻贝稚贝的附着。

细菌群落是海洋微生物膜的重要组成部分。以往研究表明细菌群落结构组成与一些海洋无脊椎动物幼虫的附着行为密切相关<sup>[13]</sup>。Huggett等<sup>[14]</sup>在研究不同表面湿度附着基对海洋细菌群落构成及华美盘管虫(*Hydroides elegans*)幼虫的附着时,发现表面湿度对细菌群落构成和幼虫的附着均有一定的影响。杨金龙等<sup>[11]</sup>在微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的研究中,发现高湿度的玻璃表面形成的细菌群落结构在厚壳贻贝稚贝的附着过程中发挥着重要的作用。Yang等<sup>[10]</sup>进一步从高湿度玻璃表面形成的自然微生物膜中分离出海洋细菌,研究发现其活性也不尽相同,如*Shewanella* sp. 1对厚壳贻贝幼虫显示出高效诱导活性,而*Pseudoalteromonas* sp. 1具有中等诱导活性。本研究发现源于中湿度表面形成微生物膜的海洋细菌对厚壳贻贝稚贝的诱导活性存在显著差异。这些研究表明海洋细菌的诱导活性可能与附着基表面性质无直接关系,其可能是与这些细菌自身分泌的化学信号物质有关,而这需要进一步的研究验证。

细菌密度与海洋无脊椎动物幼虫的附着也有密不可分的关联。在单一菌株研究中,Huang等<sup>[15]</sup>调查了细菌密度对微生物膜形成及其对华美盘管虫幼虫附着的影响,研究结果表明微生物膜最终密度与细菌初始密度呈相关性,且与该幼虫的附着变态率显著相关。然而,Tran等<sup>[16]</sup>研究表明尽管初始细菌密度影响单一菌株形成微生物膜的最终密度,但仅1株高诱导活性菌株密度与鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)幼虫附着显著相关,其他菌株的密度则与幼虫附着无相关性。在自然微生物膜研究中,Wang等<sup>[17]</sup>和Yang等<sup>[12,18]</sup>的研究同样表明微生物膜中附着细菌的密度与厚壳贻贝幼虫和稚贝的附着显著相关。本实验结果也显示初始细菌密度能够显著影响微生物膜的最终密度,最终形成微生物膜的终密度与厚壳贻贝稚贝附着率均呈显著性相关。由此可以

推测,细菌密度在厚壳贻贝稚贝的附着过程发挥重要作用,而其原因可能与细菌的群体感应或细菌分泌化学信号物质有关,然而这需要进一步的研究验证。细菌分泌的化学信号物质或其他群体感应信号分子能够调控微生物膜的形成过程<sup>[19]</sup>。本实验中,*Pseudoalteromonas* sp. 10、*Bacillus* sp. 5和*Pseudoalteromonas* sp. 11等3株细菌形成微生物膜的诱导活性随细菌密度呈增加先增加后降低的变化趋势可能与此相关。

不同种属的细菌对海洋无脊椎动物幼虫的附着影响也不尽相同。张朝霞等<sup>[5]</sup>研究表明无色杆菌属 H-13 能够显著地促进冠瘤海鞘(*Styela conopus Savigny*)幼虫的附着和变态,而弧菌属 H-4 对海鞘的附着和变态均起抑制作用。Tran等<sup>[16]</sup>研究发现*Pseudoalteromonas* sp. 对鹿角杯形珊瑚幼虫附着表现出很强的诱导活性。而在本实验中,交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp. 9、*Pseudoalteromonas* sp. 10 和 *Pseudoalteromonas* sp. 11)同样对厚壳贻贝稚贝的诱导作用呈现出较高诱导活性。这些研究表明交替假单胞菌属一些特定菌株可能分泌不同程度化学信号物质,从而促进这些海洋无脊椎动物附着过程,然而其具体作用机理有待进一步研究。另一方面,Bao等<sup>[20]</sup>在研究交替假单胞菌属对地中海紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)幼虫附着时证明此属细菌对该种幼虫并无显著诱导活性,然而这一发现与本实验对厚壳贻贝研究结果不一致。由此可推测,交替假单胞菌属尽管参与许多海洋无脊椎动物附着过程,但并非对所有海洋无脊椎动物附着具有促进作用。另外,本实验研究发现分属于盐单胞菌属和芽孢杆菌属的菌株 *Cobetia* sp. 3 和 *Bacillus* sp. 5 均表现出诱导活性,表明海洋微生物膜诱导海洋无脊椎动物幼虫的附着与细菌种属无特定关联,这与以往的研究结果一致<sup>[10]</sup>。

综上所述,从中湿度附着基表面分离的单一菌株形成的微生物膜能够有效提高厚壳贻贝稚贝的附着率。厚壳贻贝稚贝附着率与细菌的密度显著相关,与细菌的来源及种属无显著相关性。本研究成果对于今后阐明厚壳贻贝稚贝附着机制的研究具有重要的理论意义,同时对厚壳贻贝稚贝的培育与养殖过程中技术改良具有重要实际应用价值。

## 参考文献:

- [ 1 ] 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 ]. *Maine Sciences*, 2012, 36(8):116 - 121. [ 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. ]
- [ 2 ] Dürr S, Thomason J C. *Biofouling* [ M ]. Oxford ( UK ): Wiley-Blackwell, 2010.
- [ 3 ] Yang J L, Zhou X, Li Y F, *et al.* Plantigrade settlement of the mussel *Mytilus coruscus* in response to natural biofilms on different surfaces [ J ]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2014, 94(8):1639 - 1649.
- [ 4 ] Maki J S, Rittschof D, Costlow J D, *et al.* Inhibition of attachment of larval barnacles, *Balanus amphitrite*, by bacterial surface films [ J ]. *Marine Biology*, 1988, 97(2):199 - 206.
- [ 5 ] Zhang Z X, Ke C H, Feng D Q, *et al.* Influences of marine adhesive bacteria on settlement and metamorphosis of *Styela conopus* Savigny larvae [ J ]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 27(5):96 - 102. [ 张朝霞, 柯才焕, 冯丹青, 等. 海洋附着细菌对冠瘤海鞘幼体附着和变态的影响 [ J ]. *海洋学报*, 2005, 27(5):96 - 102. ]
- [ 6 ] Zhang T. Advancements in research on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larval II: Models and Application [ J ]. *Maine Sciences*, 2000, 24(2):38 - 41. [ 张涛. 海洋无脊椎动物幼虫附着变态研究进展 II: 附着变态模型及人工诱导物在经济贝类苗种生产中的应用 [ J ]. *海洋科学*, 2000, 24(2):38 - 41. ]
- [ 7 ] Chang Y Q. *Shellfish culture* [ M ]. Beijing: China Agriculture Press, 2007. [ 常亚青. 贝类增殖养殖学 [ M ]. 北京: 中国农业出版社, 2007. ]
- [ 8 ] Li T W. *Marine biology* [ M ]. Beijing: China Ocean Press, 2013. [ 李太武. 海洋生物学 [ M ]. 北京: 海洋出版社, 2013. ]
- [ 9 ] Chang K M, Wu J F. Study on artificial propagation of mussel *Mytilus coruscus* [ J ]. *South China Fisheries Science*, 2007, 3(3):26 - 30. [ 常抗美, 吴剑锋. 厚壳贻贝人工繁殖技术的研究 [ J ]. *南方水产*, 2007, 3(3):26 - 30. ]
- [ 10 ] 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.
- [ 11 ] Yang J L, Shen P J, Wang C, *et al.* Effects of biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus* [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6):904 - 909. [ 杨金龙, 慎佩晶, 王冲, 等. 微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响 [ J ]. *水产学报*, 2013, 37(6):904 - 909. ]
- [ 12 ] Yang J L, Li X, Wang C, *et al.* Settlement of the mussel *Mytilus coruscus* plantigrades in response to biofilms formed on low salinities [ J ]. *Maine Sciences*, 2013, 37(8):107 - 113. [ 杨金龙, 李响, 王冲, 等. 低盐度形成的微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响 [ J ]. *海洋科学*, 2013, 37(8):107 - 113. ]
- [ 13 ] Yu X J, He W H, Li H X, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the pearl oyster *Pinctada fucata* in response to biofilms [ J ]. *Aquaculture*, 2010, 306(1-4):334 - 337.
- [ 14 ] Huggett M J, Nedved B T, Hadfield M G. Effects of initial surface wettability on biofilm formation and subsequent settlement of *Hydroides elegans* [ J ]. *Biofouling*, 2009, 25(5):387 - 399.
- [ 15 ] Huang S, Hadfield M G. Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans* [ J ]. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 260:161 - 172.
- [ 16 ] Tran C, Hadfield M G. Larvae of *Pocillopora damicornis* settle and metamorphose in response to surface-biofilm bacteria [ J ]. *Marine Ecology Progress Series*, 2011, 433:85 - 96.
- [ 17 ] 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.
- [ 18 ] Yang J L, Li X, Bao W Y, *et al.* Effects of natural biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus* [ J ]. *Aquaculture*, 2014, 424 - 425:228 - 233.
- [ 19 ] Fuqua W C, Winans S C, Greenberg E P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators [ J ]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(2):269 - 275.
- [ 20 ] 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.

## Effects of bacterial biofilms formed on middle wettability surfaces on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*

YANG Jinlong<sup>1,2,3\*</sup>, GUO Xingpan<sup>1</sup>, CHEN Yuru<sup>1</sup>, SHEN Heding<sup>1</sup>, DING Dewen<sup>2</sup>

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

2. Institutes of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Marine Ecology Research Center, The First Institute of Oceanography,  
State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

**Abstract:** In order to obtain the useful information on the role of different bacterial strains isolated from middle wettability surface on the plantigrade settlement of the mussel *Mytilus coruscus*, the interaction between bacterial biofilms and plantigrade settlement was studied. The marine bacteria were isolated from the biofilms developed on the middle wettability surface and identification by 16S rDNA gene sequences was conducted. The effects of monospecific bacterial biofilms on settlement of *M. coruscus* plantigrades were investigated in the laboratory. The phylogenetic tree derived from the elected 16S rDNA sequence was constructed and the genetic distance was calculated. Of 6 different isolates, all bacterial biofilm showed significant inducing activity on settlement of *M. coruscus* plantigrades. Among the 6 bacterial species, *Cobetia* sp. 3 biofilm induced the highest percentage of plantigrade settlement and the settlement rate was  $70\% \pm 3\%$ ; Other 5 species of bacteria including *Nautella* sp. 2, *Pseudoalteromonas* sp. 9, *Pseudoalteromonas* sp. 10, *Bacillus* sp. 5 and *Pseudoalteromonas* sp. 11 showed moderate inducing activity, and the percentages of of plantigrade settlement ranged from 51% to 60%. Bacterial density was significantly correlated with the inducing activity for each test strain. The density of monospecific bacterial biofilms increased with the initial incubation density. The inducing activity of individual bacterial isolates was not correlated with their phylogenetic relationship. Thus, marine bacteria derived from biofilms developed on moderate wettability surface can promote the settlement of plantigrades of the mussel *M. coruscus*. This finding is important to understand the mechanism of settlement of *M. coruscus* plantigrades.

**Key words:** *Mytilus coruscus*; plantigrade; settlement; surface wettability; marine bacteria

**Corresponding author:** YANG Jinlong. E-mail: jlyang@shou.edu.cn