

硅烷化表面海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响

孙俊杰¹, 张显¹, 郭行磐¹, 陈芋如¹, 沈和定¹, 丁德文², 杨金龙^{1,2,3*}

(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. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061;

3. 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 宁波大学, 浙江 宁波 315211)

摘要:为探讨厚壳贻贝稚贝对自然微生物膜中海洋细菌的附着行为反应,研究了厚壳贻贝稚贝附着与硅烷化附着基表面、微生物膜密度以及细菌种属系统发育之间的相互关系。结果发现所测海洋细菌均能显著促进厚壳贻贝稚贝的附着;其中 *Staphylococcus* sp. 1 和 *Cobetia* sp. 1 表现出较低诱导活性,且这两株细菌形成的微生物膜密度与稚贝附着率之间无显著相关性;其他 7 株海洋细菌均表现出中等程度诱导活性,且所形成的微生物膜密度与稚贝附着率之间呈显著相关性。系统发育分析表明所测海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性与细菌种属无关。研究表明,硅烷化表面的海洋附着细菌对厚壳贻贝附着有着显著性促进作用,本研究将为后续开展厚壳贻贝稚贝附着机制奠定基础。

关键词:厚壳贻贝;稚贝;附着;硅烷化;海洋细菌

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

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), 俗称淡菜, 是我国常见的经济海产贝类养殖品种, 在我国黄海、渤海和东海沿岸均有所分布^[1]。与其他海洋无脊椎动物一样, 厚壳贻贝幼虫经过浮游生活阶段后, 便会发生附着变态过程, 成为稚贝, 并最终发育为成贝^[2]。在厚壳贻贝稚贝生长发育过程中, 当环境不适宜其生长时, 稚贝便会自行切断足丝, 开始爬行并重新选择适宜的附着基进行再次附着^[3]。目前, 厚壳贻贝人工繁育技术一直没有得到很好的解决, 育苗数量不稳定, 影响厚壳贻贝养殖产业的发展。因此, 附着变态完成初期稚贝的附着及健康生长至关重要。

在海洋环境中, 自然微生物膜广泛存在且能够影响许多海洋无脊椎动物幼虫附着变态^[4]。在单一细菌及混合细菌的研究中发现, 微生物膜也能在不同程度上诱导或抑制海洋无脊椎动物幼虫或稚贝附着过程的发生^[3,5]。微生物膜的诱导

活性与其生物学特性密切相关^[6], 而附着基质的表面性质能够影响海洋细菌的附着, 从而调节微生物膜的群落构成等生物学特性^[7]。硅烷化处理形成的附着基表面能够显著影响自然微生物膜的细菌群落构成, 并且能够不同程度地诱导厚壳贻贝稚贝的附着^[8]。然而, 关于硅烷化处理后形成的疏水表面附着的海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响有待深入研究。

本实验从硅烷化处理后附着基表面形成的自然微生物膜中分离和纯化海洋附着细菌, 并研究了其对厚壳贻贝稚贝附着的影响, 旨在查明厚壳贻贝稚贝附着行为与海洋细菌的关系, 进一步探索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

实验所用厚壳贻贝稚贝取自浙江省嵊泗县东海贻贝科技创新服务有限公司。在实验室暂养期

收稿日期:2015-04-30 修回日期:2015-08-16

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);上海高校水产学一流学科建设项目

通信作者:杨金龙, E-mail:jlyang@shou.edu.cn

间,培养箱温度控制 18 ℃、无光照、充气培养;每天换水并投喂金藻 (*Isochrysis galbana*) 5×10^4 个/mL 作为饵料,暂养 1 周后用于实验。实验时,稚贝壳长为 (1.80 ± 0.05) mm,壳高为 (1.17 ± 0.03) mm。

实验所用海洋细菌均来源于浙江嵊泗海域自然微生物膜,该微生物膜形成于(3-氯丙基)三甲氧基硅烷((3-Chloropropyl) trimethoxysilane, CLPRS, Sigma)处理后形成的硅烷化表面。微生物膜取回实验室后,利用 ZoBell 2216E 平板培养法分离纯化得到单株细菌,进行后续实验。

1.2 实验方法

海洋细菌分离 海洋细菌分离参考 Bao 等^[9]的方法。先使用无菌载玻片将微生物膜从硅烷化载玻片表面刮至 20 mL 灭菌过滤海水 (autoclaved filtered sea water, AFSW),充分混匀后,形成悬浮液。经 10 000 倍稀释后,滴适量细菌悬浮液并涂布于 ZoBell 2216E 琼脂平板上,黑暗条件下 25 ℃ 培养 48 h 后挑取单菌落,并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。

细菌 16S rDNA 基因序列的鉴定 将分离获得的单株细菌加至 100 μ L 无菌蒸馏水,按照细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (K714, 上海博彩生物科技有限公司) 的实验方法提取 DNA。PCR 扩增引物设计、体系配制及条件参照杨金龙等^[10]。PCR 扩增产物使用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳进行检验。经检测质量良好的 PCR 扩增产物送至上海迈浦生物技术有限公司测序,获得细菌 16S rDNA 基因序列,并通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对并上传至 NCBI 数据库,获取序列号并确定菌名。

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)。细菌间的遗传距离用 Jukes-Cantor 方法计算。从 NCBI GenBank 数据库中得到 *Thermocrinis albus* (序列号 AJ278895.1) 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 r/min, 15 min),去上清收集细菌,加入 50 mL AFSW,混匀后即制成细菌悬浮液。用 0.1 % 吖啶橙染色 5 min,在荧光显微镜 (奥林巴斯 BX51) $\times 1 000$ 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 (64 mm \times 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 1×10^6 、 3×10^6 、 5×10^6 和 10×10^6 CFU/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。

微生物膜密度计数 制备完成的微生物膜固定在 5% 甲醛溶液中。固定后的微生物膜经 AFSW 清洗 3 次,0.1 % 吖啶橙染色 5 min 后,直接放在 1 000 倍荧光显微镜 (奥林巴斯 BX51) 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,其计算公式参照杨金龙等^[10]的方法。

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,每个细菌梯度设置 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及诱导活性评价指标参照杨金龙等^[10]的方法。

1.3 数据处理

采用 JMP 软件 (版本 10.0.0) 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方法 (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^[10]。

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 测序并通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对和上传序列,得到海洋细菌菌名、上传序列号等基本

信息(表 1)。所测 9 株海洋细菌分属于 6 个菌属,其中 *Tenacibaculum* sp. 1 属于拟杆菌门, *Staphylococcus* sp. 1、*Staphylococcus* sp. 2、

Staphylococcus sp. 3 和 *Bacillus* sp. 1 属于厚壁菌门,其他 4 株细菌属于变形菌门。

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
ECSMB10	KJ425236	<i>Tenacibaculum</i> sp. 1	NR043080	99
ECSMB11	KJ425237	<i>Staphylococcus</i> sp. 1	JX501706	99
ECSMB12	KJ425238	<i>Staphylococcus</i> sp. 2	KC865281	99
ECSMB13	KJ425239	<i>Vibrio</i> sp. 2	AF410778	99
ECSMB14	KJ425240	<i>Cobetia</i> sp. 1	JX065787	99
ECSMB15	KJ425241	<i>Staphylococcus</i> sp. 3	KF186664	100
ECSMB16	KJ425242	<i>Cobetia</i> sp. 2	JN128271	100
ECSMB17	KJ425243	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5	KC689815	99
ECSMB18	KJ425244	<i>Bacillus</i> sp. 1	KC012891	99

2.2 初始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 1.0×10^6 CFU/mL 时,不同细菌形成的微生物膜密度存在显著性差异 ($P < 0.05$), *Cobetia* sp. 1 形成的微生物膜密度最高为 $(4.7 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5)$ 个/cm², *Pseudoalteromonas* sp. 5 形成的微生物膜密度最

低为 $(1.3 \times 10^6 \pm 6.6 \times 10^4)$ 个/cm²。初始细菌密度为 3.0×10^6 CFU/mL 时, *Vibrio* sp. 1 形成的微生物膜密度最高为 $(1.4 \times 10^7 \pm 3.2 \times 10^5)$ cells/cm²,且与 *Staphylococcus* sp. 1 形成的微生物膜密度之间无显著性差异 ($P > 0.05$),与其他细菌形成的微生物膜均具有显著性差异,密度最低的仍然是 *Pseudoalteromonas* sp. 5 形成的微生物膜。

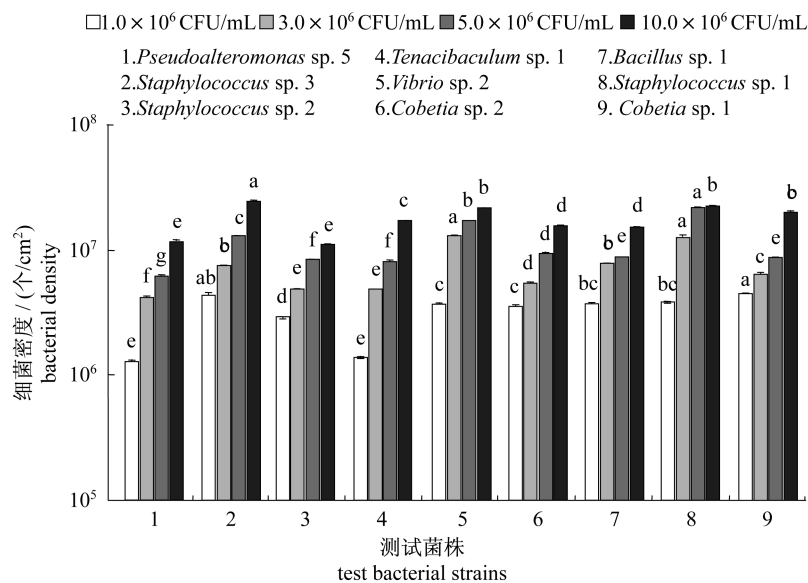


图 1 不同初始细菌密度下形成微生物膜密度的变化

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

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

初始密度为 5.0×10^6 CFU/mL 时, *Staphylococcus* sp. 1 形成的微生物膜密度显著高于其他 8 株细菌 ($P < 0.05$), 其密度为 $(2.3 \times 10^7 \pm 4.4 \times 10^5)$ 个/cm², 同时, *Pseudoalteromonas* sp. 5 形成的微生物膜密度仍为最低。初始密度为 10×10^6 CFU/mL 时, *Staphylococcus* sp. 3 形成的微生物膜密度最高, 且与其他 8 株细菌形成的微生物膜密度存在显著性差异 ($P < 0.05$), 而同属细菌 *Staphylococcus* sp. 2 形成的微生物膜密度最低并且与 *Pseudoalteromonas* sp. 5 形成的微生物膜密度无显著差异 ($P > 0.05$)。此结果表明, 葡萄球菌属的三株细菌相对于其他 6 株细菌具备良好形成微生物膜的能力。

2.3 海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响

不同海洋细菌形成的微生物膜在 12、24 和 48 h 对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性结果基本相似, 因而本实验仅出示 12 h 时的诱导活性结果 (图 2)。结果显示, 空白对照组稚贝的附着率仅为 $13\% \pm 3\%$, 且显著低于所有实验组的诱导活性, 即所有测试细菌均能显著诱导厚壳贻贝稚贝附着 ($P < 0.05$)。 *Pseudoalteromonas* sp. 5、 *Staphylococcus* sp. 3、 *Staphylococcus* sp. 2、 *Tenacibaculum* sp. 1、 *Vibrio* sp. 2、 *Cobetia* sp. 2 和 *Bacillus* sp. 1 等 7 株细菌诱导厚壳贻贝稚贝的附着率范围在 $50\% \sim 66\%$, 均表现出中等程度的诱导活性。 *Staphylococcus* sp. 1 和 *Cobetia* sp. 1 则表现出低诱导活性, 稚贝附着率分别为 $47\% \pm 2\%$ 和 $43\% \pm 2\%$ 。

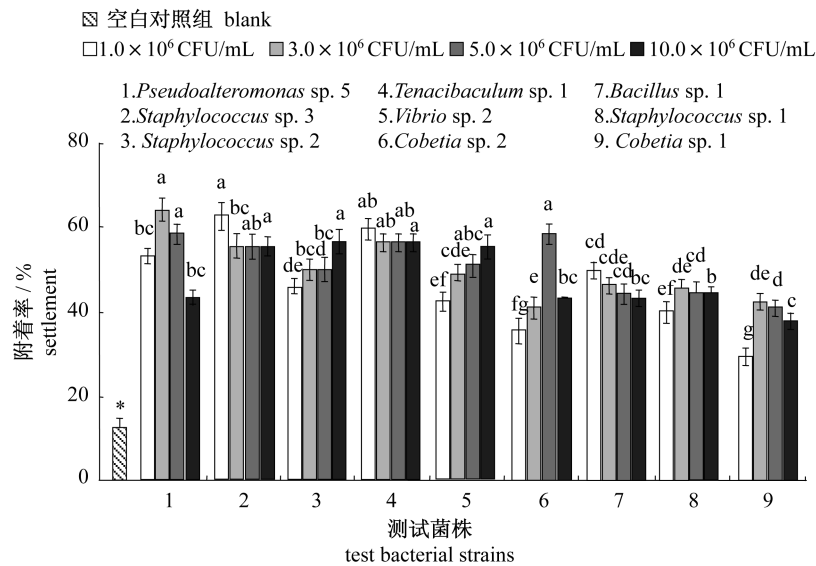


图 2 海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的诱导作用

Fig. 2 Percentages of settlement of *M. coruscus* plantigrades on the different monospecific bacterial biofilms

2.4 微生物膜密度对稚贝附着率的影响

结果表明, *Staphylococcus* sp. 2 和 *Vibrio* sp. 2 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); *Staphylococcus* sp. 3、 *Tenacibaculum* sp. 1 和 *Bacillus* sp. 1 等 3 株细菌对稚贝的诱导活性随细菌密度的增加无明显变化; *Pseudoalteromonas* sp. 5、 *Cobetia* sp. 2、 *Cobetia* sp. 1 和 *Staphylococcus* sp. 1 等 4 株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, 其中 *Pseudoalteromonas* sp. 5 形成的微生物膜在低密度 ($4.4 \times 10^6 \pm 1.2$

$\times 10^5$) 个/cm² 时对稚贝的诱导活性最后为 $66\% \pm 3\%$ 。

稚贝附着与细菌密度之间的相关性分析结果表明, 仅 *Staphylococcus* sp. 1 和 *Cobetia* sp. 1 形成的微生物膜密度与稚贝附着率之间无显著相关性 ($P > 0.05$) (表 2), *Pseudoalteromonas* sp. 5、 *Staphylococcus* sp. 3、 *Tenacibaculum* sp. 1 和 *Bacillus* sp. 1 等 4 株细菌形成的微生物膜密度与稚贝附着率之间呈负显著相关性 ($P < 0.05$), 其他 3 株细菌呈正显著相关性 ($P < 0.05$)。在 7 株显著性相关的细菌中, *Pseudoalteromonas* sp. 5 形

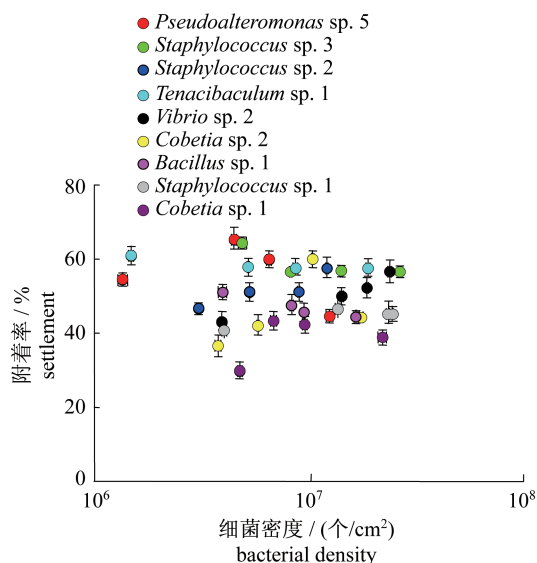


图3 单一菌株形成微生物膜的密度与厚壳贻贝稚贝附着的关系

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

成的微生物膜密度与附着率呈中等程度显著相关 ($0.5 \leq |r| \leq 0.7$), 其他6株细菌形成的微生物膜密度与附着率均呈极显著相关 ($|r| > 0.7$)。

2.5 海洋细菌的系统发育分析

海洋细菌的系统发育分析结果表明, 邻接法 (NJ), 最大简约法 (MP) 和最小进化法 (ME) 等3种方法分析的结果基本类似, 本实验仅出示邻接法 (NJ) 分析的系统发育结果 (图4) 和遗传距离 (表3)。同属细菌 *Staphylococcus* sp. 3、*Staphylococcus* sp. 2 和 *Staphylococcus* sp. 1 之间

的遗传距离较近, 先聚类在一起; 前两者表现出相对较高诱导活性, 而 *Staphylococcus* sp. 1 表现出相对较低诱导活性。同样, *Cobetia* sp. 1 和 *Cobetia* sp. 2 之间的遗传距离为 0.001, 两者先聚类, 而后与不同菌属 *Pseudoalteromonas* sp. 5、*Vibrio* sp. 2 和 *Tenacibaculum* sp. 1 聚类, 再与前一个分支聚类, 最后与外群细菌 *T. albus* 聚类。另外, *Tenacibaculum* sp. 1 和 *Pseudoalteromonas* sp. 5 之间的遗传距离为 0.300, 分属黄杆菌属和假交替单胞菌属; *Vibrio* sp. 2 和 *Cobetia* sp. 2 之间的遗传距离为 0.157, 分属弧菌属和盐单胞菌属, 这4株细菌均表现出相对较高诱导活性 (图4)。

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 activities

测试菌株 test bacterial strains	细菌密度 bacterial density	
	<i>r</i>	<i>P</i>
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5	-0.387 6	0.013 5 *
<i>Staphylococcus</i> sp. 3	-0.919 1	< 0.000 1 *
<i>Staphylococcus</i> sp. 2	0.918 8	< 0.000 1 *
<i>Tenacibaculum</i> sp. 1	-0.750 3	< 0.000 1 *
<i>Vibrio</i> sp. 2	0.966 9	< 0.000 1 *
<i>Cobetia</i> sp. 2	0.775 1	< 0.000 1 *
<i>Bacillus</i> sp. 1	-0.960 0	< 0.000 1 *
<i>Staphylococcus</i> sp. 1	0.306 4	0.054 5
<i>Cobetia</i> sp. 1	0.193 6	0.230 9

注: * 表示显著性差异 ($P < 0.05$)

Notes: * significant at $P < 0.05$

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>Pseudoal- teromonas</i> sp. 5	<i>Staphylo- coccus</i> sp. 3	<i>Staphylo- coccus</i> sp. 2	<i>Tenacib- aculum</i> sp. 1	<i>Vibrio</i> sp. 2	<i>Cobetia</i> sp. 2	<i>Bacillus</i> sp. 1	<i>Staphylo- coccus</i> sp. 1	<i>Cobetia</i> sp. 1
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5									
<i>Staphylococcus</i> sp. 3	0.267								
<i>Staphylococcus</i> sp. 2	0.274	0.015							
<i>Tenacibaculum</i> sp. 1	0.300	0.351	0.362						
<i>Vibrio</i> sp. 2	0.116	0.287	0.293	0.335					
<i>Cobetia</i> sp. 2	0.149	0.268	0.277	0.326	0.157				
<i>Bacillus</i> sp. 1	0.285	0.089	0.104	0.353	0.292	0.264			
<i>Staphylococcus</i> sp. 1	0.271	0.001	0.015	0.352	0.291	0.276	0.093		
<i>Cobetia</i> sp. 1	0.149	0.263	0.270	0.323	0.151	0.001	0.258	0.267	

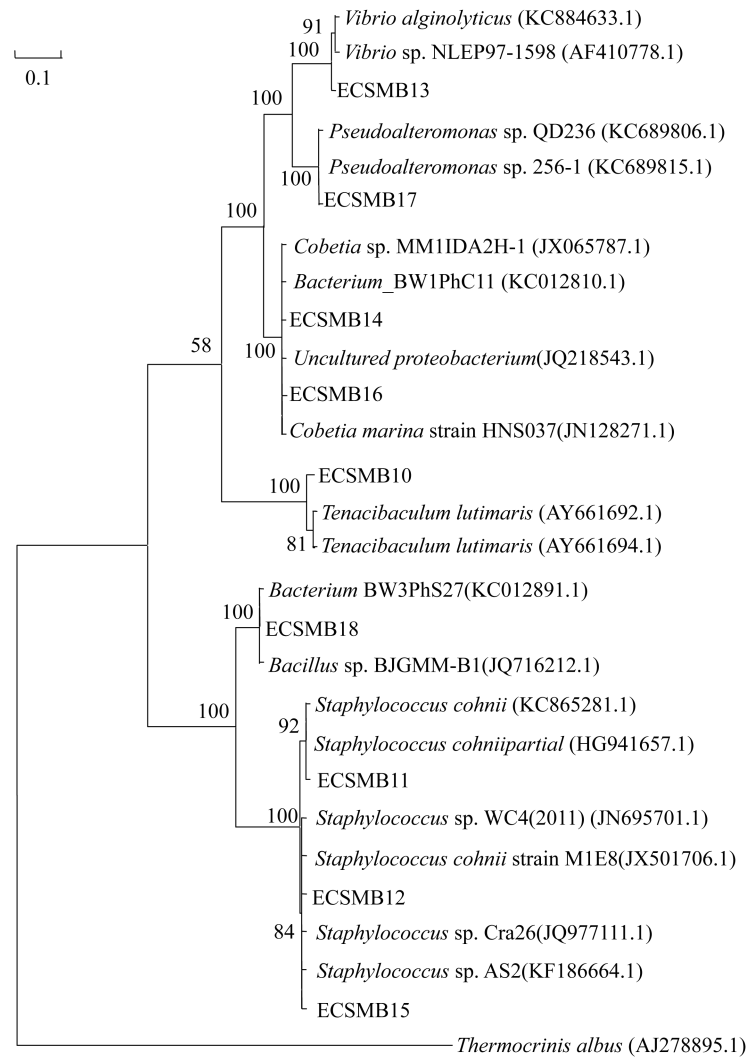


图4 海洋细菌的16S rDNA系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of the bacteria

3 讨论

单一细菌形成的微生物膜是贻贝幼虫附着变态的重要化学诱因,不同来源的海洋细菌对微生物膜形成及其与厚壳贻贝稚贝附着之间的相互关系的研究相对较少。本研究首次证明来源于(3-氯丙基)三甲氧基硅烷处理表面的海洋细菌能够有效促进厚壳贻贝稚贝的附着。

附着基表面性质能够影响微生物膜的群落构成及海洋无脊椎动物的附着,其中硅烷基化处理能够形成湿度不同的表面。细菌群落是海洋微生物膜的重要组成部分,其结构组成与海洋无脊椎动物幼虫的附着行为密切相关^[11]。有研究表明不同烷基化处理形成的附着基表面对海洋细菌群

落构成和华美盘管虫(*Hydroides elegans*)幼虫的附着均有一定的影响^[12]。以往研究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^[20]。此外,源于高湿度玻璃表面形成的自然微生物膜中的海洋细菌对厚壳贻贝幼虫和稚贝的附着诱导活性也不尽相同,如 *Shewaella* sp. 1 显示出高效诱导活性,而 *Pseudoalteromonas* sp. 1 具有中等诱导活性^[15,18]。本研究中,厚壳贻贝稚贝对源于烷基化表面的海洋细菌的附着行为同样存在显著差异,表明海洋细菌对稚贝附着的诱导活性可能与附着基表面性质无直接关系。

以往研究发现微生物膜密度与华美盘管虫(*H. elegans*)幼虫的附着密切相关^[14]。Yang

等^[15]发现,除一株弧菌外,其余单一细菌形成的微生物膜密度与厚壳贻贝幼虫附着变态显著相关。对比而言,Tran 等^[16]发现仅 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,微生物膜的密度受到初始细菌密度的影响。本研究同样表明初始细菌密度能够显著影响微生物膜的密度,且微生物膜密度在厚壳贻贝稚贝的附着过程中发挥重要作用,但并非对所有细菌适用。以往研究表明微生物膜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及其相关功能^[17],这可能是产生本实验结果中微生物膜的诱导活性随密度增加先增加后降低变化现象的主要原因,然而这有待进一步的实验验证。

海洋无脊椎动物幼虫对不同种属的细菌的附着反应也不尽相同^[3-5]。关于贻贝稚贝对海洋细菌的行为反应,本研究调查发现所用测试菌株虽然对厚壳贻贝稚贝附着均起诱导作用,但是诱导程度明显不同;其中,*Staphylococcus* sp. 1 形成的微生物膜密度相对较高,但诱导活性低于同属的另外两株细菌,表明葡萄球菌属的一些特定菌株可能分泌不同程度化学信号物质,从而促进厚壳贻贝稚贝的附着过程,具体分子作用机理有待深入研究。另一方面,Tran 等^[16]表明葡萄球菌属细菌对鹿角杯形珊瑚幼虫的附着无任何促进作用。大量研究表明交替假单菌属的细菌能够不同程度地诱导厚壳贻贝^[18]、地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*)^[9]、珊瑚 (*Acropora millepora*)^[19] 和华美盘管虫 (*H. elegans*)^[20] 等海洋无脊椎动物的附着。本实验中,*Pseudoalteromonas* sp. 5 形成的微生物膜密度相对较低,但是其能够显著诱导厚壳贻贝稚贝的附着,表明特异性的交替假单胞菌属可能参与许多该种的附着过程。另外,本研究发现即使按照门分类,不同门类别的细菌也呈现出不同的诱导活性,这些结果均表明海洋形成的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^[10,14-15]。

综上所述,附着于烷基化处理的附着基表面的海洋细菌明显影响厚壳贻贝稚贝的附着行为,且均能不同程度地促进稚贝的附着。本研究结果对于阐明厚壳贻贝稚贝附着机制的奠定良好基础,同时对厚壳贻贝稚贝的中间培育技术改良具

有重要潜在应用价值。

参考文献:

- [1] Chang Y Q. Shellfish culture [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007. [常亚青. 贝类增殖学. 北京: 中国农业出版社, 2007.]
- [2] Li T W. Marine biology [M]. Beijing: China Ocean Press, 2013. [李太武. 海洋生物学. 北京: 海洋出版社, 2013.]
- [3] Zhou X, Guo X P, Chen Y R, et al. Effects of bacterial biofilms formed on low surface wettability on the settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2015, 30(1): 30 - 35. [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. 大连海洋大学学报, 2015, 30(1): 30 - 35.]
- [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. 海洋学报, 2005, 27(5): 96 - 102.]
- [6] 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. 水产学报, 2013, 37(6): 904 - 909.]
- [7] Dürr S, Thomason J C. Biofouling [M]. Oxford (UK): Wiley - Blackwell, 2010.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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. [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. 水产学报, 2015, 39(3): 421 - 428.]
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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]. Marine 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. 海洋科学, 2013, 37(8): 107 - 113.]
- [14] 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.
- [15] 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.
- [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] 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.
- [18] Li Y F, Guo X P, Yang J L, *et al.* Effects of bacterial biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus* [J]. Aquaculture, 2014, 433: 434 - 441.
- [19] Tebben J, Tapiolas D M, Motti C A, *et al.* Induction of larval metamorphosis of the coral *Acropora millepora* by tetrabromopyrrole isolated from a *Pseudoalteromonas* bacterium [J]. PLoS one, 2011, 6(4): e19082.
- [20] Huang Y L, Li M, Yu Z L, *et al.* Correlation between pigmentation and larval settlement deterrence by *Pseudoalteromonas* sp. sf57 [J]. Biofouling, 2011, 27(3): 287 - 293.

Effects of marine bacteria from silanizing surfaces on plantigrade settlement of the mussel *Mytilus coruscus*

SUN Junjie¹, ZHANG Xian¹, GUO Xingpan¹, CHEN Yuru¹, SHEN Heding¹,
DING Dewen², YANG Jinlong^{1,2,3*}

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

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

3. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency
and Healthy Aquaculture, Ningbo 315211, China)

Abstract: To understand plantigrade settlement of the mussel *Mytilus coruscus* in response to the different bacterial strains isolated from silanizing surfaces, the relationship between bacterial biofilms and plantigrade settlement was conducted. All test marine bacteria were isolated from the biofilms formed on the silanizing surfaces and identified by 16S rDNA gene sequences. In the laboratory, the effects of monospecific bacterial biofilms on settlement of *M. coruscus* plantigrades were also investigated. The phylogenetic tree derived from the elected 16S rDNA sequence was constructed and the genetic distance was calculated. The results showed that the density of monospecific bacterial biofilms increased with the initial incubation density and all test bacterial biofilms showed significantly inducing activity on settlement of *M. coruscus* plantigrades. Among the 9 bacterial species, the biofilms of *Staphylococcus* sp. 1 and *Cobetia* sp. 1 induced the lower percentage of plantigrade settlement of 47% and 43%, and there was no significant correlation between the settlement and biofilm density. The biofilms of other 7 bacteria showed moderate inducing activity, and significant correlation between cell densities of these 7 bacterial strains and inducing activity were observed. The inducing activity of individual bacterial isolates was not correlated with their phylogenetic relationship. Thus, marine bacteria derived from biofilms developed on silanizing surfaces can promote the settlement of plantigrades of the mussel *M. coruscus*. Those results will provide some useful information to understand the relationship between bacterial biofilms and the settlement mechanism of *M. coruscus* plantigrades.

Key words: *Mytilus coruscus*; plantigrade; settlement; silanisation; marine bacteria

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