

文章编号: 1000-0615(2016)08-1229-10

DOI: 10.11964/jfc.20160310318

## 培养基对微生物被膜形成和厚壳贻贝附着的影响

孙俊杰<sup>1</sup>, 梁箫<sup>1</sup>, 郭行磐<sup>1</sup>, 陈芋如<sup>1</sup>,  
丁德文<sup>2</sup>, 张德民<sup>3</sup>, 杨金龙<sup>1,2,3\*</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. 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, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 为探讨微生物被膜生物学特性、培养基以及大型生物附着三者之间的相互关系, 本实验通过微生物分子生态学和海洋贝类生态学等方法调查了不同培养基对海洋细菌所形成微生物被膜的影响及其对厚壳贻贝幼虫附着的影响。结果显示, 厚壳贻贝稚贝率与培养基类型和细菌初始密度显著相关, 进一步分析表明, ZoBell 2216E和Seawater Luria-bertani (SWLB)条件下分别有6株和9株细菌形成的微生物被膜密度与稚贝率显著相关。扫描电镜结果显示, *Staphylococcus* sp. 3在ZoBell 2216E培养基条件下形成微生物被膜的细菌分布较为紧密, *Pseudoalteromonas* sp. 8则在SWLB培养基条件下微生物被膜细菌分布较为紧密, 且形态变为短杆状。SDS-PAGE结果显示, 相比ZoBell 2216E培养基, *Staphylococcus* sp. 3在SWLB培养基条件下9条条带蛋白显著下降, 其中2个条带完全消失; *Pseudoalteromonas* sp. 8则在SWLB培养基条件下明显增加5条蛋白条带。研究表明, 微生物被膜的形成受到培养基的影响, 培养基的不同导致微生物被膜的形态结构、分布和蛋白有所差异, 最终导致微生物被膜诱导厚壳贻贝幼虫附着变态的活性差异, 本研究为后续开展厚壳贻贝附着的分子机制奠定良好基础。

**关键词:** 厚壳贻贝; 海洋细菌; 微生物被膜; 附着; 培养基

**中图分类号:** Q 938.8; S 968.31

**文献标志码:** A

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)是我国重要的经济贝类, 属于海洋无脊椎动物, 软体动物门(Mollusca), 双壳纲(Bivalvia), 贻贝目(Mytilodia), 贻贝科(Mytilidae), 俗称淡菜, 主要分布在黄海、渤海和东海沿岸<sup>[1]</sup>。浙江嵊泗具有较大的厚壳贻贝养殖规模, 属于东海海域主要养殖产区。与许多海洋无脊椎动物相似, 贻贝生活史中, 幼虫需经过浮游阶段, 寻找合适的附着基进行附着变态<sup>[1]</sup>。从另一方面来讲, 通过阻止海洋无脊椎动物幼虫附着在船体及海洋人工设施等物体表面, 可为海洋防污提供新的方向。当前, 由于人类对厚壳贻贝的需求增加, 以及过

度捕捞自然苗种, 使得自然资源数量和质量急剧下降, 阻碍了厚壳贻贝的规模化养殖<sup>[2]</sup>。因而, 通过人工技术改善厚壳贻贝的苗种繁育显得尤为重要。

微生物被膜广泛存在于海洋环境中的基质表面, 引起基质表面物理化学性质的改变, 并导致船舶和海上设施等的微型生物污损<sup>[3-4]</sup>。另一方面, 微生物被膜能促进许多海洋无脊椎动物幼虫和藻类孢子的附着, 是海洋无脊椎动物幼虫附着变态的自然诱导物<sup>[5-8]</sup>。因而, 学者们尝试将其应用于水产养殖苗种生产技术的改善<sup>[9-11]</sup>。微生物被膜的形成受到表面基质和环境

收稿日期: 2016-03-21 修回日期: 2016-04-21

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

条件等诸多因素的影响<sup>[12-13]</sup>,丰富的营养物质是细菌生长发育的物质基础。不同的营养盐影响细菌的生长代谢速率、生理生化过程和胞外产物的分泌等,进而影响微生物被膜的膜重、膜厚、形态、结构和胞外代谢产物等<sup>[13]</sup>。然而,关于微生物被膜的形成、营养盐以及海洋无脊椎动物附着三者间的相互作用关系仍有待研究。

为了探讨ZoBell 2216E和Seawater Luria-bertani (SWLB)对微生物被膜形成和厚壳贻贝幼虫附着的影响,开展了微生物被膜在不同培养基下的生物学特性研究,并调查所形成的微生物被膜与厚壳贻贝幼虫附着变态之间的关系,为后续开展微生物被膜调控厚壳贻贝幼虫附着的分子机制奠定良好的基础,同时为该物种的苗种培育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用厚壳贻贝采自浙江枸杞岛海域,人工授精和幼虫培育参考Wang等<sup>[14]</sup>和Yang等<sup>[15]</sup>方法进行。实验所用海洋细菌来自本实验室保种菌株(表1),均分离于浙江嵊泗海域自然微生物被膜。

### 1.2 实验方法

**微生物被膜制备和密度计数** 海洋细菌形成微生物被膜的方法以及密度计数法参考Yang等<sup>[15]</sup>方法开展,实验过程中采用ZoBell 2216E和SWLB

液体培养基。*Staphylococcus* sp. 3和*Pseudoalteromonas* sp. 8在不同培养基条件下形成的微生物被膜对幼虫附着变态的诱导活性存在显著性差异,因而被用于后续的微生物被膜形态、分布和总蛋白差异实验。

**微生物被膜扫描电镜图像分析** 微生物被膜用5%甲醛固定24 h, PBS洗涤3次,乙醇30%、50%、70%、90%、100%梯度脱水、每个梯度15 min,最后100%脱水15 min,室温风干后用于扫描电镜拍摄(SEM, Hitachi S-3400 II),每个微生物被膜随机选10个视野用于成像和分析,设置3个重复。

**微生物被膜总蛋白分析** 蛋白样品制备、定量和检测参考杨金龙等<sup>[16]</sup>方法进行。将初始密度为 $10^7$  CFU/mL时所形成的微生物被膜收集于1.5 mL灭菌塑料离心管中,4 °C、12 000 r/min离心20 min,弃上清液,进行样品称量。加入4倍体积的蛋白裂解液,冰上匀浆3次,每次30 s,放置4 °C摇动2 h,冷冻离心30 min,上清液即为细菌总蛋白。将制得的蛋白上清液取20  $\mu$ L稀释至100  $\mu$ L后,用RCDC法蛋白含量测定试剂盒测定蛋白样品中所含的总蛋白含量。取适量蛋白原液,加入等量SDS-buffer溶液,100 °C加热10 min制成样品。上样量为10  $\mu$ g,浓度12%的SDS-PAGE分离,考马斯亮蓝染色,伯乐凝胶成像系统拍照记录。利用CS Analyzer 3.0(ATTO, Japan)软件估算条带的相对分子量及灰度值。

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	文献 reference
ECSMB14	KJ425240	<i>Cobetia</i> sp. 1	JX065787	99	[10]
ECSMB15	KJ425241	<i>Staphylococcus</i> sp. 3	KF186664	100	[10]
ECSMB17	KJ425243	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5	KC689815	99	[10]
ECSMB18	KJ425244	<i>Bacillus</i> sp. 1	JQ716212	99	[10]
ECSMB21	KJ425247	<i>Acinetobacter</i> sp. 1	KC758142	100	[11]
ECSMB22	KJ425248	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 6	KF155238	100	[11]
ECSMB23	KJ425249	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 7	KC160912	99	[11]
ECSMB25	KJ425251	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 8	EF382695	97	[11]
ECSMB26	KJ425252	<i>Bacillus</i> sp. 3	JQ716219	99	[11]
ECSMB27	KJ425253	<i>Alteromonas</i> sp. 1	AM990853	99	[11]

幼虫附着变态实验 附着变态实验参考 Yang等<sup>[15]</sup>方法开展, 48 h后记录幼虫的附着变态个体数, 每株细菌梯度设置6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。

### 1.3 数据处理

使用软件JMP 10.0.0对数据进行统计分析和相关性检验。附着率数据经过反正弦转化后, 进行正态性检验。若满足正态分布, 并且方差相同, 则使用单因素方差分析(One-Way ANOVA); 若不满足正态性分布, 则使用KruskalWallis Test进行评估检验。附着率与细菌密度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。

## 2 结果

### 2.1 海洋细菌对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

在ZoBell 2216E和SWLB培养基培养, *Bacillus* sp. 1、*Alteromonas* sp. 1和*Acinetobacter* sp. 1等3株细菌随着初始密度的增加对幼虫附着变态的诱导作用均表现出增加趋势(图1-a, 1-b, 1-c)。ZoBell 2216E培养、初始密度为 $10^7$  CFU/mL时, *Staphylococcus* sp. 3形成的微生物被膜表现出最高的诱导活性( $P < 0.05$ )(图1-d)。随细菌初始密度的增加, *Pseudoalteromonas* sp. 7经SWLB培养后形成的微生物被膜诱导活性无明显变化( $P > 0.05$ )(图1-e), *Pseudoalteromonas* sp. 8经Zobell 2216E培养, 其诱导活性同样无明显变化( $P > 0.05$ )(图1-f)。初始密度为 $10^7$  CFU/mL时, *Staphylococcus* sp. 3

(图1-d)、*Pseudoalteromonas* sp. 5(图1-g)、*Pseudoalteromonas* sp. 7(图1-g)和*Pseudoalteromonas* sp. 8(图1-f), 不同培养基之间的诱导活性存在显著差异( $P < 0.05$ )。此外, 双因素方差分析结果显示, 幼虫附着变态与培养基类型和细菌初始密度有极显著相关性, 而且培养基与初始密度交互影响幼虫附着变态(表2)。

### 2.2 微生物被膜密度与幼虫附着变态的相互关系

稚贝率随着细菌密度的增加而增加, 如 *Bacillus* sp. 1(图2-a)和 *Staphylococcus* sp. 3(图2-b)。 *Staphylococcus* sp. 3经ZoBell 2216E培养后形成的微生物被膜在 $9.3 \times 10^6$  个/mL时呈现出最高诱导活性(图2-b)。 *Pseudoalteromonas* sp. 8经ZoBell 2216E培养后, 随微生物被膜密度的增加, 其诱导活性未显著增加( $P > 0.05$ )(图2-c)。 ZoBell 2216E培养条件下, *Acinetobacter* sp. 1(图2-d)、 *Pseudoalteromonas* sp. 8(图2-c)、 *Bacillus* sp. 3(图2-e)和 *Alteromonas* sp. 1(图2-f)等4株细菌的微生物被膜密度与幼虫附着变态无显著相关性 ( $P > 0.05$ , 表3)。然而, 在SWLB培养条件下, 除*Bacillus* sp. 3(图2-e)外, 其余细菌形成的微生物被膜密度与幼虫附着变态显著相关( $P < 0.05$ )。

### 2.3 微生物被膜细菌形态和分布差异

不同培养基影响了微生物被膜细菌的分布和数量, *Staphylococcus* sp. 3在2216E培养基条件下细菌数量增加, 细菌出现层叠, SWLB培养基下微生物被膜密度较稀疏, 且胞外具有代谢产

表 2 培养基类型与初始密度双因素对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

Tab. 2 Two-factor correlation analysis between culture media, bacterial initial density and larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus*

方差来源 source	<i>Staphylococcus</i> sp. 3				<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 8			
	自由度 df	平方和 sum of squares	F 比率 F-ratio	P 值 P-value	自由度 df	平方和 sum of squares	F 比率 F-ratio	P 值 P-value
培养基类型 medium type	1	1	4.52e+14	<0.01*	1	1620	2.05e+18	<0.01*
初始密度 initial density	3	7404	8.93e+17	<0.01*	3	2050	8.66e+17	<0.01*
培养基类型&初始密度 medium type & initial density	3	364	4.39e+16	<0.01*	3	770	3.25e+17	<0.01*
误差 error	72	1.9598e-13			72	5.6843e-14		
总和 total	79	7769			79	4440		

注: \*. 有显著差异( $P < 0.05$ ), 下同  
Notes: \*. significant at  $P < 0.05$ , the same below

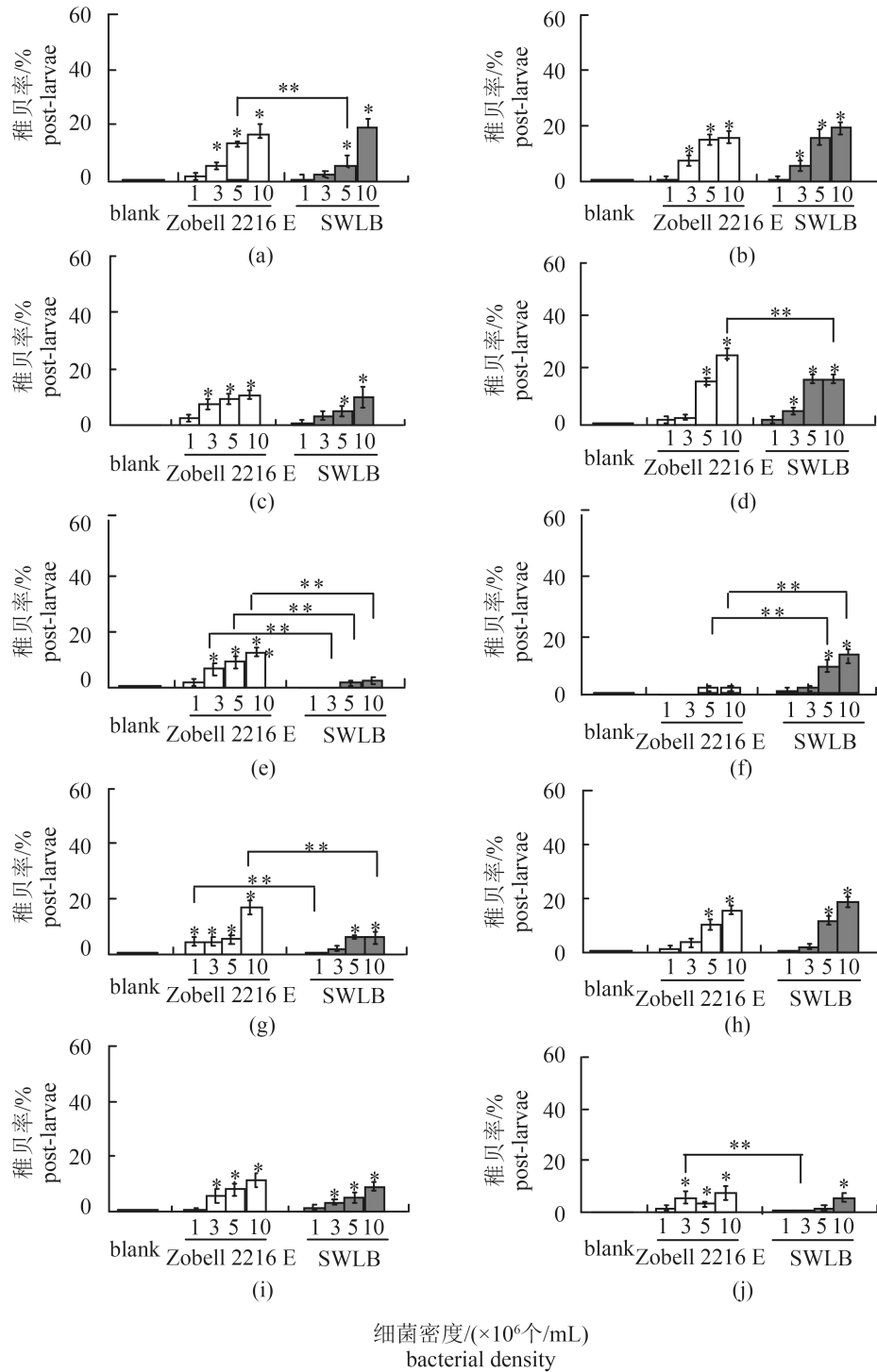


图 1 不同细菌初始密度下厚壳贻贝幼虫的附着变态率

\*. 与空白相比有差异性( $P < 0.05$ ); \*\*. 相同初始密度下有差异性( $P < 0.05$ ). (a) *Bacillus* sp. 1; (b) *Acinetobacter* sp. 1; (c) *Alteromonas* sp. 1; (d) *Staphylococcus* sp. 3; (e) *Pseudoalteromonas* sp. 7; (f) *Pseudoalteromonas* sp. 8; (g) *Pseudoalteromonas* sp. 5; (h) *Cobetia* sp. 1; (i) *Pseudoalteromonas* sp. 6; (j) *Bacillus* sp. 3;

Fig. 1 Larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus* on bacterial biofilms at different initial cell densities

\*. significant difference with control group ( $P < 0.05$ ); \*\*. significant difference at the same initial density ( $P < 0.05$ )

物(图3)。*Pseudoalteromonas* sp. 8 在不同培养基条件下形成微生物被膜的形态发生明显变化, 在

2216E培养基条件下细菌形态明显变长, 而在 SWLB条件下, 细菌呈短杆状(图3)。

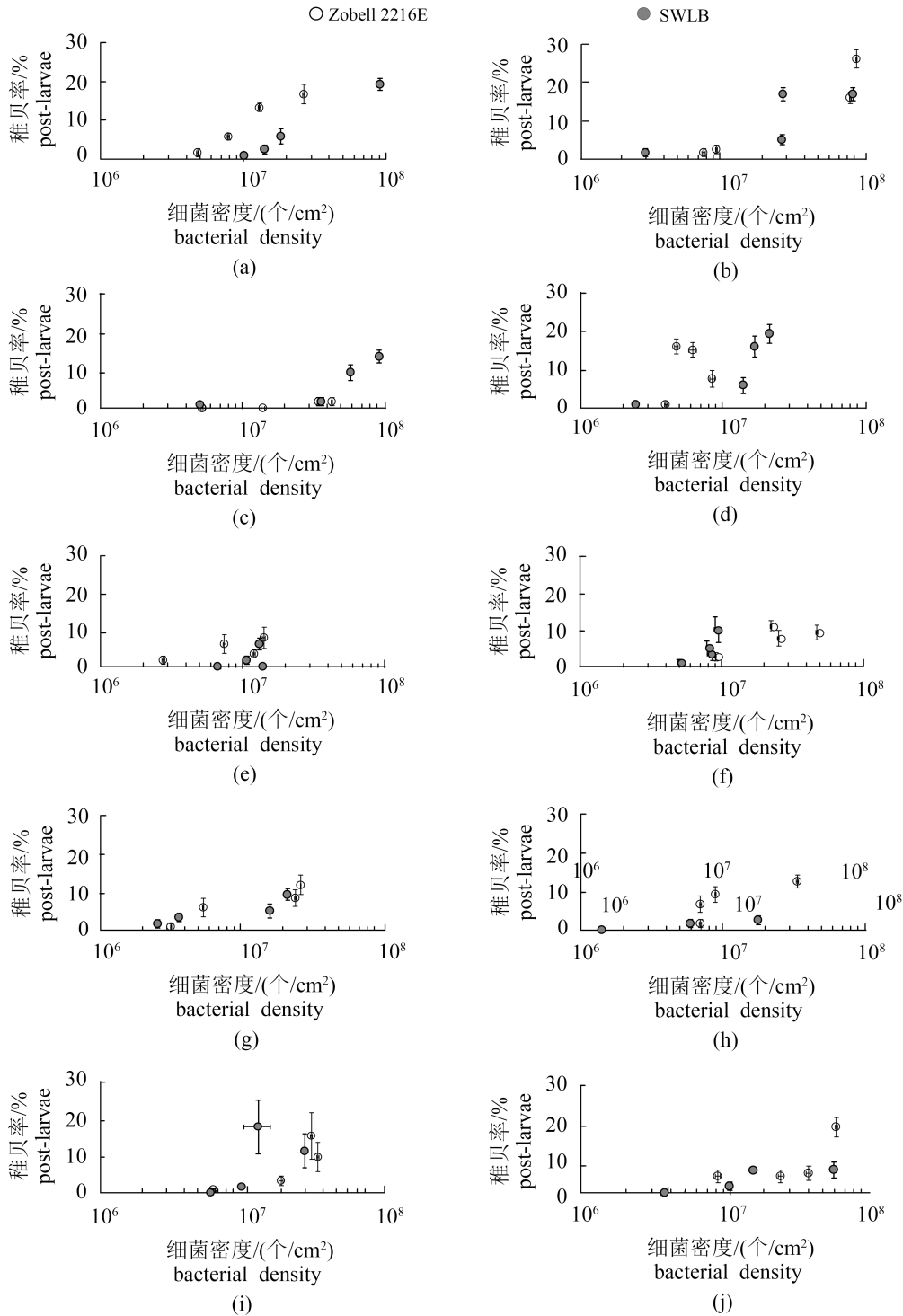


图 2 微生物被膜的密度与厚壳贻贝幼虫的附着变态率关系

(a) *Bacillus* sp. 1; (b) *Staphylococcus* sp. 3; (c) *Pseudoalteromonas* sp. 8; (d) *Alteromonas* sp. 1; (e) *Bacillus* sp. 3; (f) *Acinetobacter* sp. 1; (g) *Pseudoalteromonas* sp. 6; (h) *Pseudoalteromonas* sp. 7; (i) *Cobetia* sp. 1; (j) *Pseudoalteromonas* sp. 5

Fig. 2 Larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus* on bacterial biofilms at varying densities

2.4 微生物被膜蛋白差异

*Staphylococcus* sp. 3和*Pseudoalteromonas* sp. 8 在初始密度为10<sup>7</sup> CFU/mL时所形成的微生物被膜

的总蛋白样品SDS-PAGE结果如图4-a和图4-b所示。选取*Staphylococcus* sp. 3其中18条条带, 灰度值结果如表4所示, 第1条和第18条条带, 分子量

表 3 微生物被膜密度与诱导活性相关性分析

Tab. 3 Correlation analyses between biofilm bacterial density and their inducing activities

测试菌株 test bacterial strains	细菌密度 bacterial density			
	Zobell 2216E		SWLB	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
<i>Cobetia</i> sp.1	0.69	0.0002*	0.76	<0.0001*
<i>Staphylococcus</i> sp. 3	0.90	<0.0001*	0.84	<0.0001*
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5	0.60	<0.0001*	0.65	0.0006*
<i>Bacillus</i> sp. 1	0.86	<0.0001*	0.80	<0.0001*
<i>Acinetobacter</i> sp. 1	0.29	0.1704	0.84	<0.0001*
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 6	0.69	0.0002*	0.64	0.0008*
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 7	0.65	0.0007*	0.50	0.0119*
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 8	0.40	0.0528	0.84	<0.0001*
<i>Bacillus</i> sp. 3	0.31	0.1391	0.14	0.5294
<i>Alteromonas</i> sp. 1	0.39	0.1614	0.43	0.0350*

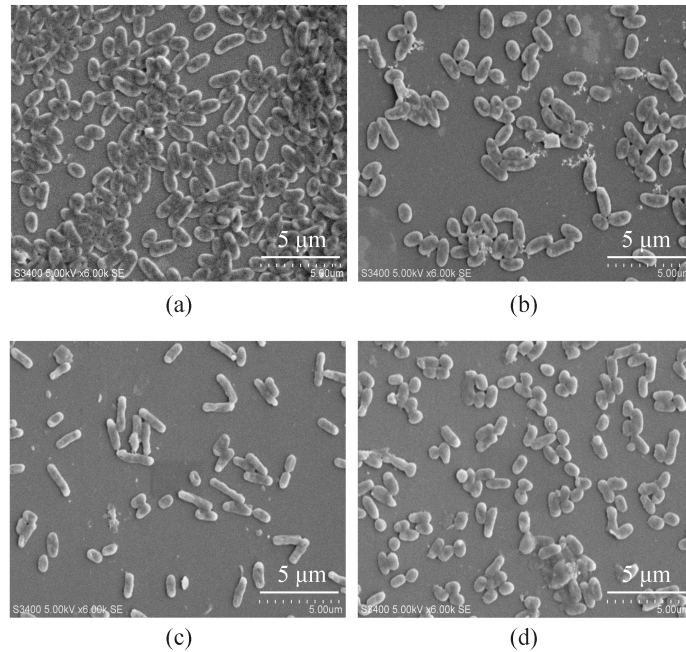


图 3 不同培养基下形成微生物被膜中细菌的形态和分布

(a) *Staphylococcus* sp. 3 在 Zobell 2216E 培养基培养; (b) *Staphylococcus* sp. 3 在 SWLB 培养基培养; (c) *Pseudoalteromonas* sp. 8 在 Zobell 2216E 培养基培养; (d) *Pseudoalteromonas* sp. 8 在 SWLB 培养基培养

Fig. 3 The morphology and distribution of bacteria in biofilms in two culture media

(a) *Staphylococcus* sp. 3 cultured in Zobell 2216 E; (b) *Staphylococcus* sp. 3 cultured in SWLB; (c) *Pseudoalteromonas* sp. 8 cultured in Zobell 2216 E; (d) *Pseudoalteromonas* sp. 8 cultured in SWLB

分别约为 108 和 22 ku, 在 SWLB 条件下条带消失, 在 ZoBell 2216E 条件下条带增加, 灰度值存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。第 3、4、5、6、7、9 和 13 等条带, 灰度值差异显著 ( $P < 0.05$ ), 尤其是第

6、7 和 13 条条带。第 2 和 11 条带, 灰度值差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

选取 *Pseudoalteromonas* sp. 8 其中 17 条条带, 其中共 11 条条带消失或增加 (表 4)。第 1、2、3、

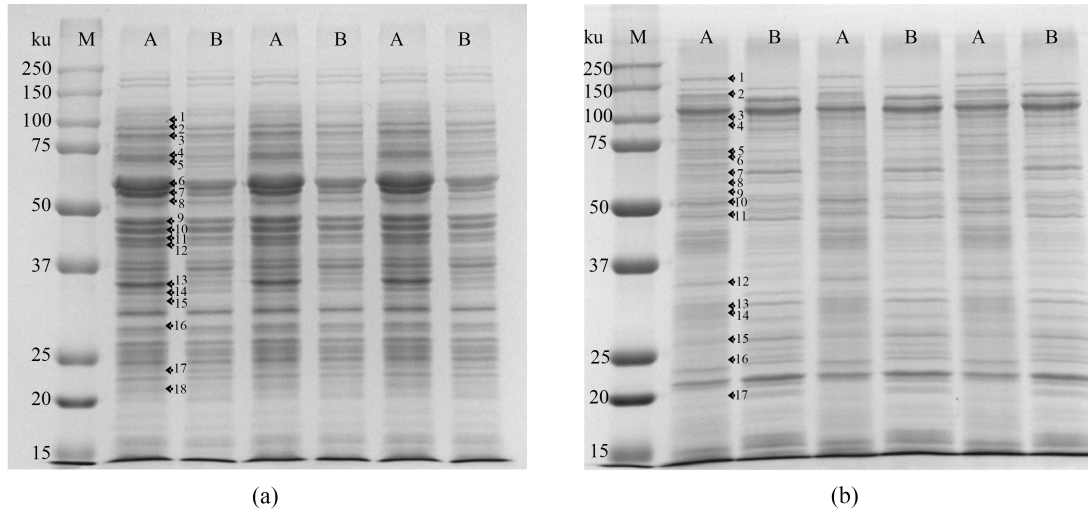


图 4 *Staphylococcus* sp. 3(a)和*Pseudoalteromonas* sp. 8(b)所形成微生物被膜的总蛋白样品SDS-PAGE

A. ZoBell 2216E; B.SWLB; M.蛋白标准

Fig. 4 SDS-PAGE of proteins of *Staphylococcus* sp. 3 (a) and *Pseudoalteromonas* sp. 8(b) biofilms

A.ZoBell 2216E; B.SWLB; M.precision protein standards

4、5和13条条带在SWLB培养基条件下条带完全消失,灰度值差异显著( $P < 0.05$ );条带7、10、15、16、17则在ZoBell 2216E条件下不存在,而在SWLB培养基条件下灰度值显著增加( $P < 0.05$ )。第6、8、9、11和12条条带灰度值差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

尽管微生物被膜在海洋无脊椎动物附着过程中发挥着极其重要的作用,但关于营养盐、微生物被膜形成以及海洋无脊椎动物幼虫附着三者之间的相互关系鲜有研究<sup>[17]</sup>。本实验首次证实培养基的类型影响了微生物被膜的形成,从而导致微生物被膜诱导厚壳贻贝幼虫附着变态的诱导活性差异。

以往的研究表明,微生物被膜密度受到初始密度的影响,且与厚壳贻贝幼虫和稚贝的附着具有相关性<sup>[10-11,15]</sup>。Huang等<sup>[17]</sup>研究纯种菌株发现,微生物被膜密度与初始密度相关,且与华美盘管虫(*Hydroides elegans*)幼虫附着变态具有相关性。在本实验中,SWLB培养基实验结果表明,除1株细菌外,其余细菌形成的微生物被膜密度均与厚壳贻贝幼虫附着显著相关;然而,在Zobell 2216E培养基实验中,增加至4株细菌形成的微生物被膜密度与幼虫附着无显著相关性,这表明营养条件对于一些特定海洋细菌在微生物被膜的形成过程中极为重要。

大量研究表明,营养因子影响微生物被膜的形成<sup>[18]</sup>。另一方面,细菌微生物被膜能够适应和通过改变它们的被膜结构以应对外界环境条件的变化<sup>[19]</sup>。本研究结果表明,不论是葡萄球菌属*Staphylococcus* sp.3还是假交替单胞菌属*Pseudoalteromonas* sp.8被膜结构在不同培养基条件下其形态和分布均发生不同程度的变化。以往研究发现,交替假单胞菌(*P. spongiae*)在含有酵母膏和蛋白胨培养基培养时能有效附着形成微生物被膜,但在仅含蛋白胨培养基培养时难以附着在基质表面形成微生物被膜<sup>[17]</sup>。进一步研究发现,含有酵母膏和蛋白胨培养基条件下,微生物被膜生物学特性如总生物量、覆盖率以及被膜厚度明显较高<sup>[17]</sup>。这些研究表明培养基组分的差异影响了海洋细菌微生物被膜的形成。

通常来讲,当细菌附着在基质表面开始形成微生物被膜时,它们将发生生理的改变,有时形态也会产生相应的变化,最终形成一个稳定的微生物被膜<sup>[20-21]</sup>。本实验发现,培养基从在Zobell 2216E更替为SWLB时,*Staphylococcus* sp.3形成的微生物被膜出现胞外产物,而在Zobell 2216E培养基条件下则不太显著,这可能是由于SWLB培养基培养时细菌生长的营养盐过于丰富所致。

以往研究证明,假单胞菌属细菌从浮游状态转为微生物被膜形成过程中,存在50%的差异蛋白<sup>[19]</sup>。本实验中,SDS-PAGE结果表明,与Zobell 2216E培养基相比,*Staphylococcus* sp.3在SWLB

表4 不同培养基下 *Staphylococcus* sp. 3和  
*Pseudoalteromonas* sp. 8蛋白条带的灰度值变化  
Tab. 4 The change in protein band greyscale values of  
*Staphylococcus* sp. 3 and *Pseudoalteromonas* sp. 8 under  
different culture media

菌株 strains	蛋白条带 protein no.	分子量 ku	灰度值/ $\times 10^4$	
			Zobell 2216E	SWLB
<i>Staphylococcus</i> sp. 3	1	108	23.1	0.0
	2	98	48.5	47.4
	3	90	71.7	42.7
	4	72	90.8	41.8
	5	69	13.5	8.2
	6	59	258.2	160.8
	7	57	125.2	51.2
	8	53	50.7	45.9
	9	47	108.4	50.6
	10	46	96.6	86.9
	11	43	66.4	68.5
	12	42	30.7	37.4
	13	35	114.9	36.1
	14	34	22.5	26.3
	15	32	10.7	8.8
	16	27	75.8	51.1
	17	23	49.3	36.9
	18	22	49.6	0.0
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 8	1	195	34.6	0.0
	2	140	29.9	0.0
	3	103	55.5	0.0
	4	95	26.5	0.0
	5	73	22.4	0.0
	6	64	35.3	36.6
	7	61	0.0	35.4
	8	54	21.6	22.1
	9	53	60.7	60.2
10	48	0.0	41.4	
11	35	33.0	31.9	
12	31	55.6	51.0	
13	30	50.9	0.0	
14	27	49.2	23.9	
15	26	0.0	31.1	
16	25	0.0	31.5	
17	21	0.0	56.1	

培养基条件下, 微生物被膜条带明显下降, 且蛋白表达量降低, 这可能是由于 *Staphylococcus* sp. 3形成微生物被膜的生物量降低所致。此外, SEM观察发现, *Staphylococcus* sp. 3在SWLB培养基条件下形成微生物被膜的覆盖度较低, Zobell 2216E培养基条件下形成微生物被膜的覆盖度明显增加。 *Staphylococcus* sp. 3形成微生物被膜对厚壳贻贝幼虫诱导活性发现, SWLB培养基条件下诱导活性显著下降, 这可能与蛋白表达量下降有关。以往研究同样证实, 交替假单胞菌在含有酵母膏和蛋白胨培养基和仅含蛋白胨培养基培养时, 微生物被膜的蛋白表达存在明显差异<sup>[17]</sup>。

早期研究发现, 交替假单胞菌在含有酵母膏和蛋白胨培养基上形成的微生物被膜能有效促进华美盘管虫幼虫的附着变态, 然而在仅含蛋白胨培养基培养时所形成的微生物被膜却无任何有效活性<sup>[17]</sup>。Zobell 2216E培养基条件下形成的 *Pseudoalteromonas* sp. 8微生物被膜对厚壳贻贝的幼虫附着变态无任何诱导效果, 而在SWLB培养基条件下, 微生物被膜则显著促进幼虫的附着变态, 表明SWLB培养基条件下显著增加的5条蛋白条带可能参与幼虫附着变态过程。

综上所述, 微生物被膜的形成受到培养基类型的影响, 这种被膜差异导致其对厚壳贻贝幼虫附着变态的差异。然而, 何种营养元素在微生物被膜的形成过程中发挥主导作用, 以及究竟调控了微生物被膜形成过程中何种基因的表达和蛋白产生, 尚有待后续研究。

#### 参考文献:

- [1] 李太武. 海洋生物学[M]. 北京: 海洋出版社, 2013.  
Li T W. Marine Biology[M]. Beijing: China Ocean Press, 2013 (in Chinese).
- [2] 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.  
Chang K M, Wu J F. Study on artificial propagation of mussel *Mytilus coruscus*[J]. South China Fisheries Science, 2007, 3(3): 26-30 (in Chinese).
- [3] Wahl M, Goecke F, Labes A, et al. The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 292.
- [4] Flemming H C, Murthy P S, Venkatesan R, et al. Marine and Industrial Biofouling[M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009: 293-313.



- [5] Zobell C E, Allen E C. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces[J]. *Journal of Bacteriology*, 1935, 29(3): 239-251.
- [6] 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).
- [7] 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.  
Zhang T. Advancements in research on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larval II: models and application[J]. *Marine Sciences*, 2000, 24(2): 38-41 (in Chinese).
- [8] 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(2): 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(2): 77-82 (in Chinese).
- [9] 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.  
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 (in Chinese).
- [10] 孙俊杰, 张显, 郭行磐, 等. 硅烷化表面海洋细菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(10): 1530-1538.  
Sun J J, Zhang X, Guo X P, *et al.* Effects of marine bacteria from silanizing surfaces on plantigrade settlement of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(10): 1530-1538 (in Chinese).
- [11] 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).
- [12] Li Y F, Chen Y R, Yang J L, *et al.* Effects of substratum type on bacterial community structure in biofilms in relation to settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 96: 41-49.
- [13] Dürr S, Thomason J C. *Biofouling*[M]. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010.
- [14] 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.
- [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] 杨金龙, 李无霜, 梁箫, 等. 不同保存方法对厚壳贻贝样品蛋白提取效果的比较[J]. *海洋科学*, 2013, 37(8): 23-27.  
Yang J L, Li W S, Liang X, *et al.* Effects of cryopreservation methods on protein extraction of the juvenile *Mytilus coruscus*[J]. *Marine Sciences*, 2013, 37(8): 23-27 (in Chinese).
- [17] Huang Y L, Dobretsov S, Xiong H R, *et al.* Effect of biofilm formation by *Pseudoalteromonas spongiae* on induction of larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(19): 6284-6288.
- [18] Huang S Y, 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.
- [19] O'Toole G, Kaplan H B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54(1): 49-79.
- [20] Srinandan C S, Jadav V, Cecilia D, *et al.* Nutrients determine the spatial architecture of *Paracoccus* sp. biofilm[J]. *Biofouling*, 2010, 26(4): 449-459.
- [21] Sauer K, Camper A K. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(2): 6579-6589.

## Effects of culture media on the biofilm formation and subsequent settlement of *Mytilus coruscus*

SUN Junjie<sup>1</sup>, LIANG Xiao<sup>1</sup>, GUO Xingpan<sup>1</sup>, CHEN Yuru<sup>1</sup>,  
DING Dewen<sup>2</sup>, ZHANG Demin<sup>3</sup>, YANG Jinlong<sup>1,2,3\*</sup>

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

2. 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:** In order to determine the interactions among the biofilm characteristics, culture media and settlement of marine invertebrate, the present study investigated the effects of the biofilm formation in two types of culture media, and the subsequent effects of bacterial biofilms on the settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus* larvae. The biofilm inducing activities on larval settlement and metamorphosis were correlated to the bacterial density with exception of one and four species in culture media Zobell 2216E and Seawater Luria-bertani (SWLB), respectively. The inducing activity of the bacterial biofilms was correlated to the culture medium type and initial cell density of bacteria. Scanning electron microscope showed that a thick *Staphylococcus* sp. 3 biofilm comprising of a stack of bacterial cells under the condition of 2216E compared to SWLB. In contrast, patchy monolayer was found under 2216E in *Pseudoalteromonas* sp. 8 biofilm, and short rod was observed under SWLB. SDS-PAGE showed that protein profiles of both *Staphylococcus* sp. 3 and *Pseudoalteromonas* sp. 8 biofilms changed distinctly in two different culture media. In *Staphylococcus* sp. 3 biofilm, eight protein bands decreased significantly and two protein bands disappeared under SWLB compared to 2216E. In *Pseudoalteromonas* sp. 8 biofilms, five protein bands appeared under SWLB. Thus, the culture media impacted the development of bacterial biofilms such as distribution, morphology and phenotypes, and changes in biofilm characteristics may contribute to the variability in the inducing activity on larval settlement and metamorphosis.

**Key words:** *Mytilus coruscus*; marine bacteria; biofilm; settlement; culture medium

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

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41476131); Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (14ZZ143); Shanghai University First-class Disciplines Project of Fisheries