

扇贝幼虫附着基的细菌组成及其作用*

徐怀恕 许 兵 纪伟尚

(青岛海洋大学, 海洋生物系)

提 要 自海湾扇贝幼虫附着基表面分离到 99 株附着细菌。经鉴定、分类至 9 属包括弧菌属、假单胞菌属、无色杆菌属、芽孢杆菌属、气单胞菌属、葡萄球菌属、微球菌属、棒杆菌属和黄杆菌属。扇贝幼虫的附着基表面具有一定数量的附着细菌。单一菌株菌膜实验表明, 不同菌株形成的菌膜对幼虫附着的吸引力大小不一。有的细菌促进幼虫附着, 有的却有抑制作用。

关键词 海湾扇贝, 幼虫附着, 细菌菌膜, 诱导作用

在海洋环境中, 细菌在物体表面的附着是复杂的生物污损过程中的一个非常重要的方面。当一个物体浸入海水中之后, 细菌首先附着到物体表面上并生长、繁殖。随后同附着的硅藻、真菌、原生动物以及有机碎屑和无机颗粒等形成一层微生物粘膜^[5]。多年来, 人们对海洋细菌的附着机理^[8,12]及其影响因素^[7]、微生物粘膜的组成^{[2][11]}以及微生物粘膜对大型附着生物附着的影响^[10,13,15]等方面进行了深入研究。Young 等(1973)^[15]发现食用牡蛎幼虫的附着变态, 对微生物粘膜有很强的依赖性。Weiner (1985)^[13]分离到一株海洋细菌(LST), 它产生的多糖化合物对牡蛎幼虫的附着和变态有很强的吸引和诱导能力。海湾扇贝(*Argopecten irradians* Lamarck)在其生活史的幼体阶段, 要靠足丝附着后变态成为稚贝, 而幼虫附着率的高低, 是扇贝工厂化育苗成败的关键之一, 直接影响着扇贝养殖业的发展。为此, 我们于 1988 年 5 月和 1989 年 4 月两次对扇贝幼虫附着基上细菌的组成及其对幼虫附着的影响进行了初步研究, 以试图分离到能促进扇贝幼虫附着的细菌。

材 料 和 方 法

本项研究由青岛崂山区沙子口育苗厂海湾扇贝育苗池中取水样, 以尼龙网片为附着基分离、计数细菌。网片使用前经 20ppm 青霉素处理(与生产上一致)。

1. 育苗池中细菌数量的测定

(1) 细菌总数计数采用吡啶橙染色荧光显微镜直接计数法(AODC)^[9]。

(2) 细菌活菌数计数采用萘啶酮酸 DVC 法^[11]。

* 青岛海洋大学科研经费资助项目; 本研究得到美国马里兰大学 R. R. Colwell 博士的帮助; 陆小红、贾素丽、刘伟同志参加部分工作, 在此一并致谢。

收稿年月: 1990 年 6 月; 1991 年 1 月修改。

(1) 徐怀恕等, 1986. 青岛港海洋附着细菌的研究. 山东腐蚀与防护, (1): 67--71.

(3) 可培养异养菌计数采用 2216E 平板涂布法(HPC)。

(4) 总大肠菌群数(TC)和粪大肠菌群数(FC)计数采用 MPN 三管法,经初发酵、伊红美兰平板确定和复发酵三步来测定。

2. 载玻片上附着细菌的计数采用修改的萘啶酮酸 DVC 法 将附着有细菌的载玻片浸于含有 0.002%萘啶酮酸和 0.025%酵母膏的无菌海水中,室温培养 6—8 小时,加 2%甲醛固定,再用 0.01%吖啶橙染色,荧光显微镜检查。

3. 荧光显微镜计数 使用 Jenamed 落射光荧光显微镜,激发光滤光片为 450nm, 荧光滤光片为 510nm。

4. 附着细菌的分离与纯化 附着基网片于幼虫附着前投入池水中, 2 天后取出一部分用于分离细菌。另一部分待幼虫附着后再取出。网片取出后,经 0.2 μ m 孔径滤膜过滤、121 $^{\circ}$ C 蒸汽灭菌的海水中漂洗三次,冲掉网片上的非附着性细菌。然后放入盛有 10ml 上述海水的灭菌研钵中,按 5ppm 加入无菌的吐温 80 溶液研磨,使细菌分散到水相。将研磨后的水样制成 10 倍梯度稀释液,定量涂布于 2216E 平板,20 $^{\circ}$ C 培养三天。挑取单个菌落划线纯化,至确认为纯菌后移入 2216E 斜面保存备用。

5. 附着细菌的分类鉴定 细菌鉴定按照《一般细菌常用鉴定方法》^[1]进行,项目包括:细菌形态,革兰氏染色,芽孢染色,鞭毛染色,发光特性,菌落色素,过氧化氢酶,氧化酶反应和葡萄糖发酵。按照《海洋调查规范》^[2]中海洋异养细菌检索表,将附着细菌分类至属。

6. 附着细菌与扇贝幼虫附着数量的关系 用 41 μ m 筛绢过滤池水,除去幼虫及其它大颗粒物质,投入载玻片(插在玻片架上)。每天换一次过滤海水,不同时间分别取出载玻片,计数附着细菌数量。按不同时间分别投入经 115 $^{\circ}$ C 蒸汽灭菌的网片(0.5 克/片),最后形成不同时间的自然附着细菌菌膜后一起取出,用于扇贝幼虫附着实验。

7. 人工菌膜对扇贝幼虫附着的影响 分别将分离纯化的部分菌株制成菌悬液(菌数约 10^8 个/ml),投入经 115 $^{\circ}$ C 蒸汽灭菌的网片,经过 24 小时,使网片上形成菌膜。取出网片用无菌海水冲洗三次,放入盛有处于附着阶段的幼虫的烧杯中(幼虫密度为 4 个/ml),每天用无菌海水换水三次,投饵三次,水温 $23^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。幼虫附着 5 天后,取出网片,解剖镜下计数幼虫附着数量。以灭菌网片不经菌液浸泡做为对照。

结 果

1. 青岛崂山区沙子口育苗场所在地区海面开阔,水质良好,对该场育苗池海水的细菌学测定结果表明,水中总细菌数、细菌活菌数及异养细菌数数量分布范围属于清洁的沿岸海水,没有检测到指示人及动物粪便污染的粪大肠菌群及总大肠菌群细菌(表 1),表明育苗用水是洁净的,适宜做为养殖用水。

表 1 扇贝育苗池中细菌数量(细菌数或菌落形成单位/毫升)

Table 1 Numbers of bacteria in hatchery tank's seawater(cells or cfu/ml)*

细菌总数 (AODC)	细菌活菌数 (DVC)	异养菌数 (HPC)	总大肠菌群数 (MPN)	粪大肠菌群数 (MPN)
2.80×10^6	1.84×10^5	9.57×10^3	<3	<3

* cfu/ml = (colony forming unit)/ml

2. 在扇贝幼虫附着前后, 由附着基网片上共分离出 99 株附着细菌。鉴定、分类结果列于表 2。

其中革兰氏阴性杆菌居多, 占总分离菌株数的 58.59%, 它们分属于弧菌属(*Vibrio*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)及未确定菌。而弧菌属和假单胞菌属又是革兰氏阴性细菌的主要组成者, 分别占 36.21%和 24.14%。革兰氏阳性细菌分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphalococcus*)、微球菌属(*Micrococcus*)和棒状杆菌属(*Corynebacterium*)。其中芽孢杆菌占优势, 占革兰氏阳性细菌总数的 37.93%。

表 2 附着细菌各属的形态及生理生化特征
Table 2 Morphological and biochemical characteristics of
bacteria isolated from settlement substratum

属 名	形态	革兰氏染色	芽孢染色	鞭毛染色	发光	菌落色素	过氧化氢酶反应	氧化反应	葡萄糖发酵
弧 菌 属 (n=21)	弧状	-	-	+	-	-	13	+	+
假单胞菌属 (n=14)	杆状	-	-	+	-	4	11	+	-
无色杆菌属 (n=11)	杆状	-	-	-	-	-	+	+	-
芽孢杆菌属 (n=11)	杆状	+	+	周生	-	-	-	+	+
气单胞菌属 (n=8)	杆状	-	-	+	-	-	+	+	+
葡萄球菌属 (n=7)	球形	+	-	-	-	4	+	-	+
微 球 菌 属 (n=6)	球形	+	-	-	-	5	+	-	-
棒状杆菌属 (n=5)	杆状	+	-	-	-	-	+	+	-
黄 杆 菌 属 (n=4)	杆状	-	-	周生	-	+	3	+	+
未 确 定 菌 (n=12)	杆状	-	-	-	-	4	8	10	11

注: 表中括号内的数字表示阳性反应菌株数

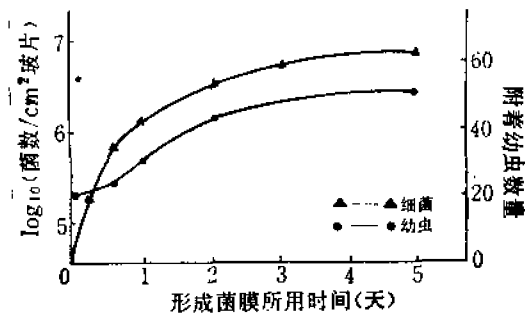
3. 扇贝幼虫附着前后, 附着基上细菌的组成有明显变化(表 3)。

可以看出, 幼虫附着前, 附着基上细菌种类较多, 各属附着细菌均有分布, 弧菌属占优势, 假单胞菌属和黄杆菌属细菌数量较少。幼虫附着后, 附着基上细菌种类明显减少, 所分离菌株均为革兰氏阴性杆菌, 其中假单胞菌属占优势, 弧菌属数量明显减少。在幼虫附着前分离菌株中占 41.41% 的革兰氏阳性细菌在幼虫附着后却没有从附着基上分离到。无色杆菌属和气单胞菌属细菌在扇贝幼虫附着前后数量变化不大。

表3 附着基上细菌的组成及其在幼虫附着前后的变化
Table 3 Component and variation of bacteria before and after settlement of larvae on substratum

属名	数量	幼虫附着前		幼虫附着后	
		数量	占分离菌株(%)	数量	占分离菌株(%)
弧菌属	21	18	29.03	3	8.11
假单胞菌属	14	1	1.61	13	35.14
无色杆菌属	11	5	8.07	6	16.22
芽孢杆菌属	11	11	17.74	0	0
气单胞菌属	8	3	4.84	5	13.51
葡萄球菌属	7	7	11.29	0	0
微球菌属	6	6	9.68	0	0
棒状杆菌属	5	5	8.07	0	0
黄杆菌属	4	1	1.61	3	8.11
未确定菌	12	5	8.06	7	18.92

4. 采用在过滤自然海水中浸泡不同时间而形成的含不同菌量的附着基网片进行附着细菌数量与幼虫附着关系的实验。结果表明, 扇贝幼虫的附着需要一定数量的附着细菌参与(附图)。在过滤的自然海水中浸泡 48 小时以及更长时间的附着基上(附着细菌数量为 10^6 个/cm² 或更多), 幼虫附着数量明显高于对照及短时间浸泡的附着基上幼虫的数量。附着基浸泡时间愈长, 幼虫附着数量愈高。



附图 附着细菌数量与扇贝幼虫附着数量随时间变化关系
Attached fig. Relationship between number of attached bacteria and settled larvae with time

5. 使用单一菌株形成的菌膜吸引扇贝幼虫附着实验, 结果表明, 某些附着细菌可以促进幼虫的附着, 有些细菌却对幼虫的附着起抑制作用(表 4)。

菌株 SS-24、SS-18 形成的菌膜, 对扇贝幼虫附着有明显的促进作用($t=0.05$), 分别较对照增加 76.92% 和 76.47%。而菌株 SS-21 和 SS-19 却明显抑制幼虫的附着($t=0.05$), 分别较对照下降 59.76% 和 54.08%。

表 4 扇贝幼虫在不同菌株菌膜上的附着数量
Table 4 Abundance of larvae settled on different single-species films

菌 株	菌 膜	对 照	增长(%)
SS-24	57.50	32.50	76.92
SS-18	45.00	25.50	76.47
SS-16	42.00	31.00	35.48
SS-13	18.00	29.25	-38.46
SS-21	16.50	41.00	-59.76
SS-19	22.50	49.00	-54.08

注:表中数据为两次重复实验的平均值

讨 论

1. 附着是一个非常基本的生物学过程。附着细菌在各种无毒的非生物表面上的附着呈现相似的规律^[2,4]。已有工作表明,物体浸入海水中 1 小时,即可从表面分离到附着细菌^[2]。附着初期菌数增加很快,1-2 天后物体表面细菌数量趋于稳定,本项研究也得到相似结果。

2. 海洋环境中附着细菌的种类很多。本项研究确定有 9 个属的细菌参与了扇贝幼虫附着基表面微生物粘膜的的形成,其中优势菌(弧菌和假单胞菌)均为海水中常见的细菌类群。微生物粘膜对于无脊椎动物幼虫的附着变态具有重要意义,同样,幼虫的附着在一定程度上也能改变粘液中微生物的组成。扇贝幼虫附着后,附着基上细菌组成由复杂变为简单,由以弧菌为优势菌变成以假单胞菌为优势菌,并再也分离不到革兰氏阳性细菌。这些现象在两次实验中(1988 年 5 月和 1989 年 4 月)均很明显。有趣的是,在对青岛港海洋附着细菌的研究中分离出的优势附着细菌是弧菌(挂片 72 小时)。而厦门港海洋附着细菌的优势类群是假单胞菌(挂片达 19 天)^[2]。与本研究结果结合起来考虑,附着基上优势类群的变化究竟是微生物粘液中细菌群落演替的必然现象,还是粘液中细菌与无脊椎动物幼虫相互作用的结果,或是由于处于不同海区,影响细菌附着的物理、化学和生物因素有所不同所致,这些均有待于进一步研究。芽孢杆菌主要存在于陆地土壤环境,在海水中数量很少。在 1989 年 4 月的实验中,我们曾从附着基上分离到 11 株芽孢杆菌。而其它研究者也有从玻片和不锈钢挂片^[2]或浸海木桩上^[6]分离到芽孢杆菌的报道。我们认为这些芽孢杆菌是来源于陆地或海泥中的。

3. 扇贝幼虫的附着需要微生物粘膜。由于投喂未经严格除菌的藻类饵料,致使无菌膜的对照组也有一定数量的幼虫附着,但仍然可以看出某些附着细菌确实可以促进扇贝幼虫的附着。尽管天然微生物粘液的总体效应是促进扇贝幼虫的附着,但是利用单一菌株菌膜进行幼虫附着实验表明并非所有附着细菌都能促进幼虫的附着。这就提醒我们,有提高现行生产中扇贝幼虫附着率的可能,这就是通过筛选对扇贝幼虫附着、变态有促进作用的细菌(或提取其有效物质)制成人工菌膜,代替现行的在天然海水中形成的自然微生

物粘膜来吸引、诱导扇贝幼虫的附着和变态。Weiner等(1985)^[14]应用海洋细菌诱导牡蛎幼虫附着变态已用于生产。从长远来看,利用生物工程技术选育出产粘附多聚物和诱导扇贝幼虫附着变态化合物的高效菌株,将会大大促进扇贝养殖业的发展。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所, 1978. 一般细菌常用鉴定方法, 111-126. 科学出版社(京).
- [2] 林燕顺等, 1983. 海洋微型附着生物的研究. 海洋通报, 2(3): 45-54.
- [3] 国家海洋局, 1975. 海洋调查规范, 第五分册, 海洋生物调查, 55-70. 国家海洋局出版(京).
- [4] 纪伟尚等, 1991. 海洋细菌在生物表面和非生物表面附着的研究. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 21(2): 61-62.
- [5] Colwell, R. R., 1984. Microbial ecology of biofouling. In: *Biotechnology in the marine Sciences*, 221-231. John Wiley & Sons Inc., New York.
- [6] Colwell, R. R. et al., 1980. Attachment of microorganisms to surfaces in the aquatic environment. *Devel. Indust. Microbiol.*, 21: 169-178.
- [7] Fletcher, M., 1988. Effects of electrolytes on attachment of aquatic bacteria to solid surfaces. *Estuaries*, 11: 226-230.
- [8] Fletcher M. & K. Marshall, 1982. Are solid surfaces of ecological significance to aquatic bacteria? In: *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 6, p199-236.
- [9] Hobbie J. E. et al., 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by epifluorescence microscope. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 1225-1228.
- [10] Kirchman D. et al., 1981. Bacteria induce settlement and metamorphosis of Janua (*Dexiospira*) *Brasilensis* Grube (Polychaeta: Spirorbidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 56: 153-163.
- [11] Kogure K. et al., 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 25: 415-420.
- [12] Silverman M. et al., 1984. Genetic control of bacterial adhesion. In: *Microbial Adhesion and Aggregation*, 95-130. Spring-Verlog, Inc. New York.
- [13] Weiner R. M., 1985. Microbial films and invertebrate settlement and metamorphosis. In: *Biotechnology of Marine Polysaccharides*, 115-130. Mc Graw Hill, New York.
- [14] Weiner R. M. et al. 1985. Applications of biotechnology to the production, recovery and uses of marine polysaccharides. *Biotechnology*, 3: 899-902.
- [15] Young L. & M. Mitchill, 1978. The role of microorganisms in marine fouling. *Int. Biodeterior. Bull.*, 9: 105-109.

COMPONENT OF BACTERIA AND THEIR EFFECTS ON SETTLEMENT SUBSTRATUM OF LARVAE OF SCALLOP

Xu Huaishu, Xu Bing and Ji Weishang

(Department of Marine Biology, Ocean University of Qingdao)

ABSTRACT Ninety-nine strains of attached bacteria were isolated from settlement substratum of larvae of *Argopecten irradians* L. in hatchery tanks. The bacteria were identified and classified into nine genera, including *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* and *Flavobacterium*. After the settlement of larvae, the bacteria isolated from subs-

tratum were all Gram's negative rods. The settlement of larvae need certain amount of attached bacteria on the surface of substratum. Experiments with single-species' films indicated that individual bacteria strain varied in their capacity in inducing settlement of larvae. Some bacteria strains could induce seventy-six percent more larvae to settle than none film's control, while others failed to induce settlement of Larvae, or even inhibited the process

KEYWORDS *Argopecten irradians* L., settlement of larvae, bacterial film, induction