

微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响

杨金龙^{1,2*}, 慎佩晶^{1,2}, 王冲¹, 李一峰^{1,2},
梁箫¹, 沈和定¹, 徐灿¹, 李家乐¹

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学海洋科学研究院, 上海 201306)

摘要: 为研究微生物膜在厚壳贻贝稚贝附着过程中的作用, 通过海洋化学生态学和分子微生物学方法分析了微生物膜形成过程中其干重、附着细菌密度、底栖硅藻密度、叶绿素 a 含量等随日龄变化情况及其对厚壳贻贝稚贝附着的影响。同时, 利用 DGGE 指纹图谱技术对不同日龄微生物膜中的细菌群落结构多样性进行了分析。结果发现, 微生物膜的干重、附着细菌密度及底栖硅藻密度明显随着日龄的增加而增加, 在 28 d 达到最高值, 其干重、细菌和硅藻密度分别为 0.87 mg/cm^2 、 $1.5 \times 10^7/\text{cm}^2$ 、 $1.0 \times 10^6/\text{cm}^2$, 均与日龄显著相关。叶绿素 a 含量在 14 d 时达到最大, 为 $2.2 \mu\text{g/cm}^2$, 随日龄的增加呈持续下降的趋势, 相关性分析表明叶绿素 a 含量与日龄无直接关系。随着日龄的增加, 微生物膜诱导的稚贝附着率逐渐增加, 28 d 时达到最高值, 为 76%。相关性分析显示, 微生物膜的活性与干重、附着细菌密度及底栖硅藻密度显著相关, 其相关性系数分别为 0.717、0.711 和 0.754。然而, 微生物膜的附着诱导活性与叶绿素 a 无直接相关性。细菌群落结构在厚壳贻贝稚贝附着过程中发挥了重要作用。

关键词: 厚壳贻贝; 微生物膜; 稚贝; 附着; 细菌群落结构

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

一般来说, 一旦把表面洁净的载玻片等附着基浸入海中, 在数分钟到数小时内, 该附着基的表面将迅速形成微生物膜^[1]。微生物膜在许多海洋无脊椎动物幼虫的附着和变态过程中起着极其重要的作用^[2]。研究表明微生物膜可以促进贻贝等海洋无脊椎动物幼虫完成附着和变态^[3], 同时也能抑制藤壶等海洋无脊椎动物幼虫的附着和变态^[4]。不同种类的幼虫对微生物膜的反应也不尽相同。此外, 海洋无脊椎动物幼虫对不同微生物膜的日龄、密度、群落结构、代谢活动及其代谢产物做出不同反应^[5]。因此, 研究微生物膜对海洋无脊椎动物附着行为对于水产养殖苗种生产技术的改善和海洋防污技术的发展具有极其重要的理论意义和实践意义^[2]。

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 为我国重要的贝

类养殖品种, 也是主要的筏式养殖贝类之一, 分布于黄海、渤海和东海沿岸^[6], 其中以浙江沿海资源量最大。近年来, 人为过度采捕导致厚壳贻贝自然资源逐渐减少, 自然海区附苗数量和质量明显下降, 厚壳贻贝养殖产业受到影响。目前, 厚壳贻贝规模化人工繁殖技术一直没有得到很好的解决, 育苗数量不稳定, 导致苗种供不应求^[7]。厚壳贻贝幼虫在完成浮游生活阶段后, 附着变态成为稚贝, 最终发育为成贝^[8]。与许多其他海洋无脊椎动物不同, 当环境变化时, 贻贝稚贝能够自行切断足丝, 开始爬行并重新选择附着基进行再次附着。研究表明, 微生物膜能诱导诸多经济贝类幼虫的附着变态, 然而关于其对稚贝附着的影响研究较少。

本实验主要研究了厚壳贻贝稚贝对室内形成

收稿日期: 2012-12-06 修回日期: 2013-03-23

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31101885); 上海市科委重点支撑项目 (12230502100); 上海市科技启明星 (10QA1403200); 上海市教委创新项目 (10YZ123)

通信作者: 杨金龙, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

的微生物膜的附着行为反应,同时探讨了微生物膜干重、附着细菌密度、底栖硅藻密度、叶绿素 a 的含量以及细菌群落多样性,在微生物膜形成过程中与日龄的相互关系,探寻影响稚贝附着的影响因子。旨在通过本研究查明厚壳贻贝稚贝对附着基的选择性,进一步理解微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着过程的调控作用机制。

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省舟山市嵊泗县海洋科技开发服务中心,壳长(3.1 ± 0.5) mm,壳高(2.2 ± 0.5) mm,至少在实验室内暂养 1 周后用于实验。暂养期间,稚贝被放置于培养箱内,水温控制在 18 °C,充气培养,每天换水及投喂金藻。

实验所需的室内微生物膜形成于光照培养箱(新苗 GZX-300BS-III)中,温度控制在 18 °C,光照强度为 10 000 lx,光照周期比为 14 h:10 h。形成微生物膜所用的载玻片为 26 mm × 38 mm,灭菌后置于挂板上垂直放在盐度为 33 的人工海水中,借助 REF201 手持盐度折光仪进行校对,每 3 天换水一次。微生物膜的日龄设为 7、14、21 和 28 d,每个日龄设置 3 个重复。

1.2 实验方法

微生物膜的干重测量 用灭菌玻璃片将微生物膜刮至灭菌海水中,并进行过滤至 GF/C 滤膜(Whatman 玻璃纤维滤膜,1.2 μm),然后放在干燥箱中干燥 48 h,设置温度为 80 °C。最终对微生物膜的干重进行测量。

微生物膜中的附着细菌和底栖硅藻计数 细菌和硅藻密度计数参考 Bao 等^[3]的方法进行。将微生物膜固定在 5% 的甲醛溶液中,吖啶橙(AO,0.1%)染色 5 min 后,1 000 倍荧光显微镜下随机选取 10 个点进行细菌计数。将含有微生物膜的载玻片从海水中取出后,直接在 200 倍光学显微镜下随机选取 10 个点进行硅藻计数。

微生物膜叶绿素 a 的测定 将载有微生物膜的过滤滤膜(0.45 μm,纤维素酯微孔滤膜)放入具塞离心管中,加 90% 丙酮溶液 10 mL 振荡,4 °C 下放置 14 h 后,漩涡振荡仪振荡 1 h,使叶绿素 a 更充分地提取。然后,3 000 r/min,离心 10 mm,取上清液在 UNIC 2100 分光光度计上,用 1

cm 光程的比色皿,分别读取 750、664、647 和 630 nm 波长的吸光度,以 90% 丙酮浸泡的空白滤膜作为空白对照,按如下公式计算叶绿素 a 含量^[9]:

$$\text{叶绿素 a} = [12.12 \times (D_{664} - D_{750}) - 1.58 \times (D_{647} - D_{750}) - 0.08 \times (D_{630} - D_{750})] \times V_e \times d \div A$$

式中: V_e 为恒定的提取液体积(L), D 为吸光度, d 为微生物膜的面积(cm^2), A 为比色皿光程(cm)。

DNA 提取 将不同日龄的微生物膜载玻片从海水中取出,在无菌操作台中,将微生物膜收集到 2 mL 离心管中,经 10 000 × g,离心 5 min,弃上清液,-20 °C 保存备用。取冷冻保存的微生物膜样品,解冻后,用 3S 柱离心式环境样品 DNA 回收试剂盒 V2.2 进行基因组总 DNA 的提取。

PCR 扩增 采用细菌 16S rDNA V3 区序列通用引物进行扩增,引物为 357f-GC(5'-CGC CCG CCG C GC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') 和 518r(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'),扩增总体系为 50 μL:模板 DNA 2 μL,4 × dNTPs(10 μmol/L)1 μL,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)1 μL,引物(20 pmol/μL)各 1.5 μL,10 × 扩增缓冲液(含 Mg^{2+})5 μL,用 ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应在 Mastercycler gradient (Eppendorf)上进行,PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min,20 个循环的降落 PCR(94 °C 变性 1 min,退火 30 s,72 °C 延伸 3 min,退火温度由 65 °C 降到 55 °C,每一循环递减 0.5 °C),15 个循环(94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 3 min),在 72 °C 延伸 10 min,最后 4 °C 保存。PCR 扩增产物使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检验。

DGGE 分析 使用 Bio-Rad 公司 D-code System 电泳仪进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离。制备聚丙烯酰胺凝胶,浓度为 8%,变性梯度为 40%~70%(7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺为 100% 变性),电泳缓冲液为 1 × TAE,60 °C,60 V 条件下电泳 10 h。电泳结束后,用溴乙锭染色 15 min,紫外拍照,并采用软件 Quantity one (Bio-rad)对 DGGE 图谱进行多样性指数分析。

稚贝附着实验 将载有微生物膜的载玻片放入盛有 20 mL 灭菌海水的培养皿(Ø64 mm × 19 mm)中,每个培养皿中放入 10 只稚贝,每个日龄设置 5 个平行组,以空白载玻片作为对照。实

验温度为 $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$, 黑暗条件。实验 12、24 和 48 h 时, 记录稚贝的附着率, 即载玻片上附着的稚贝个数占该培养皿中稚贝总数的百分比。

数据处理 在统计分析前, 所有数据进行了正态分布检验。如满足正态分布, 且方差相同, 则通过单因素方差分析方法 (One-Way ANOVA) 进行分析。如不满足正态分布, 则通过 Kruskal-Wallis Test 检验进行评估检验。同时, 进行相关性检验。分析采用 JMP 统计软件, $P < 0.05$ 作为差异显著。DGGE 电泳图谱采用 Bio-rad Quantity One 4.6.2 分析软件对泳道和条带进行识别和定位, 计算细菌群落多样性的 Shannon 多样性指数 (H), 其计算公式为 $H = -\sum_{i=1}^{i=n} p_i \ln p_i$, 式中, n 为每个样品中条带总数, p_i 为每个条带的相对强度。

2 结果

2.1 不同日龄微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响

微生物膜在 12、24 和 48 h 对厚壳贻贝稚贝附着的诱导基本相似, 因而本研究仅出示 12 h 的诱导效果, 其结果如图 1 所示。与对照组 (0 天) 相比, 实验组微生物膜显著地诱导厚壳贻贝稚贝

附着 ($P < 0.05$)。随着日龄的增加, 微生物膜诱导的稚贝附着率出现增加, 且在 28 d 达到最高值, 为 $76\% \pm 2\%$ 。微生物膜的诱导活性与其干重、细菌密度和硅藻密度关系如表 1 所示。微生物膜的诱导稚贝附着率与干重显著相关 ($P < 0.05$)。同样, 细菌密度 ($P < 0.05$) 和硅藻密度 ($P < 0.05$) 明显与稚贝附着率呈显著性相关关系。

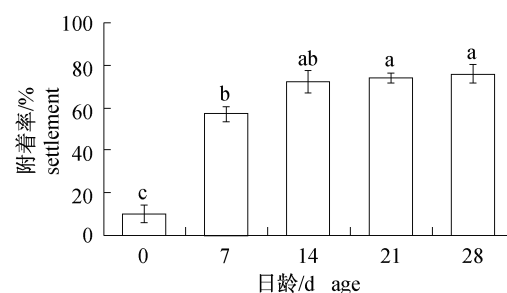


图 1 不同日龄微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的诱导效果

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。以下同此。

Fig. 1 Percentages of settlement of *M. coruscus plantigrades* on biofilms

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

表 1 微生物膜诱导的稚贝附着率、日龄与干重、细菌密度和硅藻密度之间的相关性分析结果
Tab. 1 Correlation between settlement or age and dry weight, bacterial and diatom densities

	干重 dry weight		细菌密度 bacterial density		硅藻密度 diatom density	
	r	P	r	P	r	P
附着率/% settlement	0.717	0.009	0.711	0.010	0.754	0.005
日龄/d age	0.852	<0.000 1	0.986	<0.000 1	0.902	<0.000 1

注: r 为相关系数。

Notes: r means correlation coefficient.

2.2 微生物膜干重、细菌密度和硅藻密度与日龄关系

微生物膜的干重、细菌和硅藻密度随日龄变化如图 2 所示。随着日龄的增加, 干重在 21 d 显著增加 (图 2-a), 且 28 d 时保持恒定 ($P > 0.05$)。细菌密度随着日龄的增加呈显著增加趋势 ($P < 0.05$), 28 d 时达到最高为 $(1.5 \times 10^7 \pm 0.3 \times 10^6)/\text{cm}^2$ (图 2-b)。同样, 微生物膜中的硅藻密度也随着日龄呈明显增加趋势 ($P < 0.05$)。微生物膜干重、细菌和硅藻密度与日龄关系如表 1 所示。微生物膜的干重明显与日龄呈显著性相关 ($P < 0.05$), 其相关性系数为 0.852。同样, 微生

物膜中的细菌 ($P < 0.05$) 和硅藻密度 ($P < 0.05$) 也与日龄显著相关, 其相关性系数均大于 0.9。

2.3 不同日龄微生物膜中叶绿素 a 含量变化

随着日龄的增加, 微生物膜中叶绿素 a 含量在 14 d 时达到最高, 为 $(2.2 \pm 0.4) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。随着日龄的继续增加, 叶绿素 a 含量无显著性差异 ($P > 0.05$), 但叶绿素 a 含量总体呈下降趋势。通过对叶绿素 a 含量与微生物膜日龄之间的相关性统计分析, 结果表明其与日龄无显著相关性 ($P > 0.05$)。此外, 统计结果表明微生物膜的诱导活性与叶绿素 a 含量无相关性 ($P > 0.05$)。

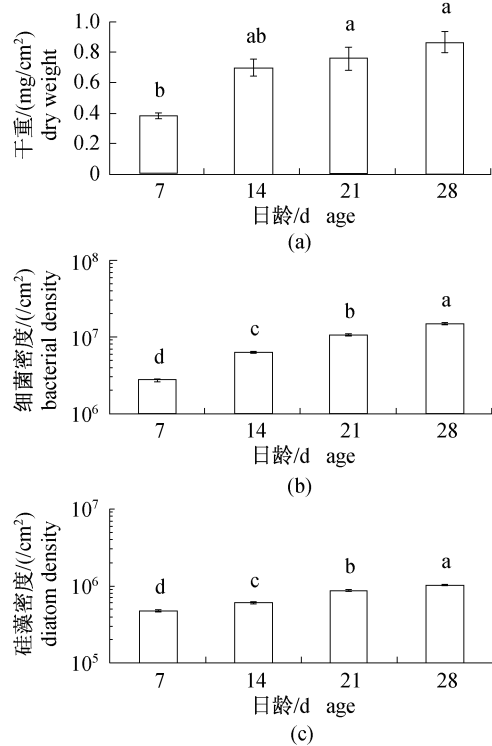


图2 不同日龄微生物膜中干重(a)、细菌密度(b)和硅藻密度(c)

Fig.2 Dry weight(a), bacterial density(b), diatom density(c) of biofilms with different ages

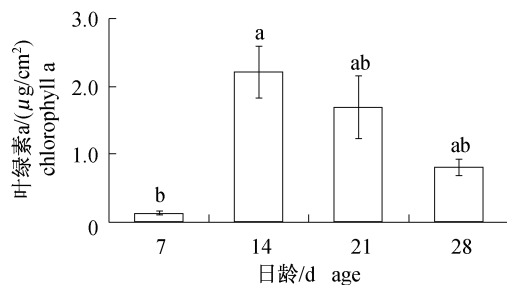


图3 不同日龄微生物膜中的叶绿素 a 含量变化

Fig.3 Chlorophyll a content in biofilms of different ages

2.4 微生物膜中细菌群落结构分析

图4所示为不同日龄下微生物膜中细菌DGGE指纹图谱。DGGE图谱中条带的数量可以反映样品的细菌多样性,条带信号的强弱可以反映细菌的相对含量^[10],通过软件Bio-rad Quantity One 4.6.2分析每个样品的条带数目和亮度,研究不同日龄的微生物膜中细菌的种类数量和相对含量,得出微生物膜中细菌多样性信息(表2)。由表2可知,随着日龄的增加,微生物膜中细菌DGGE图谱的条带数有所增加,28 d的微生物膜

中细菌多样性指数达到最高,为2.27。基于DGGE指纹图谱,细菌群落结构的聚类分析结果如图5所示。14 d微生物膜与21 d微生物膜的相似性很高为79%,这2个日龄微生物膜与7和28 d的微生物膜的相似性分别为74%和57%。

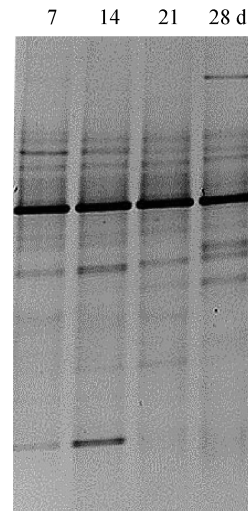


图4 不同日龄微生物膜样品DGGE指纹图谱

Fig.4 DGGE fingerprints of biofilms of different ages

表2 微生物膜中细菌群落多样性指数

Tab.2 Analysis of bacterial community diversity in biofilms

日龄/d age	条带数量 number of bands	Shannon 多样性指数 Shannon index
7	9	2.14
14	9	2.16
21	10	2.26
28	10	2.27

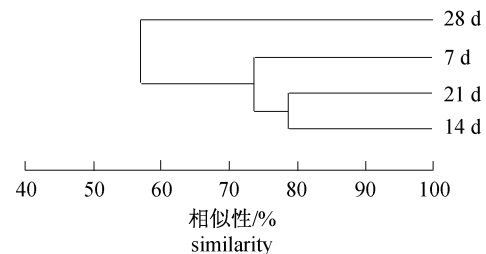


图5 微生物膜中的细菌DGGE指纹图谱的聚类分析
Fig.5 Dendrogram generated from the DGGE profiles

3 讨论

微生物膜在海洋无脊椎动物幼虫附着过程中

发挥着极其重要的调控作用^[2,11-12]。本研究首次证明室内培养的微生物膜能有效促进海产贝类厚壳贻贝稚贝的附着。然而,以往研究表明微生物膜对褐贻贝(*Perna perna*)稚贝的附着无显著性影响^[13]。另一方面,Kavouras等^[14]研究显示微生物膜能有效抑制淡水斑马贝稚贝(*Dreissena polymorpha*)附着。这些研究结果可能由于贻贝物种间的差异。此外,微生物膜的诸多特性如微生物膜日龄、附着细菌密度、底栖硅藻密度、生物量以及细菌群落结构等均对海洋无脊椎动物的附着产生影响^[14]。

研究发现,微生物膜的日龄影响海洋无脊椎动物幼虫的附着,然而不同物种对不同日龄微生物膜反应不同^[15-16]。Bao等^[3]和Toupoint等^[17]证明地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)和紫贻贝(*M. edulis*)幼虫均随着微生物膜日龄的增加其附着率也随之上升。本实验室以往研究已证明其幼虫随着日龄的增加其附着率明显呈上升趋势^[18]。在本研究中,厚壳贻贝稚贝同样在高日龄微生物膜中展现出较高的附着率,且进一步的分析表明微生物膜的诱导活性与其日龄显著相关。

附着细菌和底栖硅藻是微生物膜的重要构成生物,细菌密度和硅藻密度明显受到微生物膜日龄的影响^[19]。在目前研究中,附着细菌密度和底栖硅藻密度与微生物膜的日龄成显著相关性,其相关性系数均大于0.9。进一步的分析表明,厚壳贻贝稚贝附着明显与附着细菌密度和底栖硅藻密度相关,表明微生物膜中的细菌和硅藻密度在其稚贝附着过程发挥了一定的作用。此外,本研究发现微生物膜干重明显与日龄和其诱导活性呈显著相关,这与以往研究结果相一致^[3,18]。

细菌黏膜能够有效诱导贻贝、牡蛎及藤壶等海洋无脊椎动物幼虫的附着。然而,作为微生物膜的组分,细菌黏膜的诱导活性是否能合理解释微生物膜的诱导活性尚有待进一步验证。因而,一些学者尝试选择对微生物膜中的细菌群落结构进行分析,以此探讨其与诱导活性的相关性。本研究同样基于这一目的,研究了微生物膜日龄与细菌群落结构关系,发现细菌群落结构随着日龄增加也在不断发生变化,且在高日龄组(28 d)微生物膜的细菌群落结构多样性指数高于低日龄组(7 d),表明微生物膜中的细菌群落结构在稚贝附着过程中发挥了重要作用。随着时空变化,微生物膜的群落结构将随

之改变^[18]。叶绿素 a 是分析微生物膜群落结构的一个重要参数。然而,目前的研究发现叶绿素 a 含量没有随着日龄的增加而不断增加,而在第 14 天达到最高,随后呈现微降趋势,且与微生物膜的日龄和诱导活性均无显著相关性。因而,表明进行光合作用的生物量可能与稚贝附着无直接关联性。这个结果与本实验室之前关于厚壳贻贝幼虫与微生物膜关系研究结果相一致^[18]。

研究结果表明,室内培养的微生物膜能够有效促进厚壳贻贝稚贝的附着率,微生物膜的日龄明显影响其干重、附着细菌密度和硅藻密度。而且,细菌群落结构在稚贝附着过程中发挥了重要作用。本研究结果对于今后阐明厚壳贻贝附着机制的研究具有重要的理论意义。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Bao W Y, Satuito C G, Yang J L, et al. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms [J]. *Marine Biology*, 2007, 150(4): 565 - 574.
- [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*, 1998, 97(2): 199 - 206.
- [6] 常亚青. 贝类增养殖学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [7] 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.
- [8] 李太武. 海洋生物学 [M]. 北京: 海洋出版社, 2013: 172 - 210.
- [9] Ma M Y, Liu J L, Wang X M. Biofilms as potential indicators of macrophyte dominated lake health [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(5): 982 - 992.
- [10] 刘敏, 朱开玲, 李洪波, 等. 应用 PCR-DGGE 技术分析黄海冷水团海域的细菌群落组成 [J]. *环境科学*, 2008, 29(4): 1082 - 1091.
- [11] 张涛. 海洋无脊椎动物幼虫附着变态研究进展 I. 影响因子 [J]. *海洋科学*, 2000, 24(1): 25 - 29.
- [12] 柯才煊, 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.
- [13] Ank G, Porto T F, Pereira R C, *et al.* Effects of different biotic substrata on mussel attachment [J]. *Biofouling*, 2009, 25(2):173-180.
- [14] Kavouras J H, Maki J S. Inhibition of the reattachment of young adult zebra mussels by single-species biofilms and associated exopolymers [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(6):1236-1246.
- [15] Keough M J, Raimondi P T. Response of settling invertebrate larvae to bioorganic films: effects of different types of films [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1995, 185(2):235-253.
- [16] 于秀娟,严岩,顾继东. 微生物粘膜对杂色鲍幼虫附着和变态的影响 [J]. *海洋通报*, 2007, 26(6):32-36.
- [17] Toupoint N, Mohit V, Linossier I, *et al.* Effect of biofilm age on settlement of *Mytilus edulis* [J]. *Biofouling*, 2012, 28(9):985-1001.
- [18] 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.
- [19] Chiu J M Y, Thiyagarajan V, Pechenik J A, *et al.* Influence of bacteria and diatoms in biofilms on metamorphosis of the marine slipper limpet *Crepidula onyx* [J]. *Marine Biology*, 2007, 151(4):1417-1431.

Effects of biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*

YANG Jinlong^{1,2*}, SHEN Peijing^{1,2}, WANG Chong¹, LI Yifeng^{1,2},
LIANG Xiao¹, SHEN Heding¹, XU Chan¹, LI Jiale¹

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

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

Abstract: The effect of biofilms developed in the aquariums on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus* was examined in the laboratory. Various aspects of biofilm biology were investigated including age, dry weight, chlorophyll a (*Chl. a*) content, bacterial and diatom densities. Bacterial community in biofilms was analyzed by the DGGE fingerprint technique. The correlation between the inducing activity of the biofilms and dry weight, bacterial and diatom densities, *Chl. a* content was also investigated. With the increase of biofilm age, dry weight, bacterial and diatom densities increased significantly and the maximum values were, respectively, 0.87 mg/cm², 1.5 × 10⁷/cm² and 1.0 × 10⁶/cm² after 28 d. Furthermore, above three parameters were correlated with biofilm age. *Chl. a* content reached the maximum of 2.22 μg/cm² after 14 d and no correlation between *Chl. a* content and biofilm age was observed. Plantigrades of *M. coruscus* preferred to settle on the biofilmed surfaces rather than the surfaces unfiled. Overall the settlement of plantigrades on biofilms that formed in the aquariums increased with biofilm age, and the maximum of 76% settlement was obtained after 28 d. The enhanced settlement correlated to dry weight, bacterial density and diatom density, and their corresponding correlation coefficients were 0.717, 0.711 and 0.754. In contrast, there was no correlation between inducing activity of biofilms and *Chl. a* content. Moreover, Shannon diversity index of bacteria community in DGGE profiles increased up to 28 d following immersion. The shift in bacterial community composition over time may be responsible for the higher settlement of plantigrades of *M. coruscus* on the older biofilms, indicating that bacterial community play an important role in the settlement of plantigrades in this species.

Key words: *Mytilus coruscus*; biofilms; plantigrade; settlement; bacterial community

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