

不同来源海洋弧菌微生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响

黄道芬^{1,2}, 梁 箫^{1,2}, 彭莉华^{1,2}, 郭行磐^{1,2}, 张德民³, 杨金龙^{1,2,3*}

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

2. 上海海洋大学海洋生物科学国际联合研究中心, 中国科学技术部, 上海 201306;

3. 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为探讨广泛存在于近海环境中海洋弧菌和贝类附着的相互作用关系, 实验从自然微生物被膜和厚壳贻贝成体肠道内分离了海洋弧菌, 测定其种属及亲缘性, 调查了这些不同来源弧菌形成的微生物被膜与厚壳贻贝稚贝附着的调控作用。结果显示, 测试弧菌形成的微生物被膜密度随着初始细菌密度的增加呈现不同程度的增加。源于自然微生物被膜和贻贝肠道内的10株弧菌均能显著促进厚壳贻贝稚贝的附着, 不同菌株形成微生物被膜的诱导活性存在显著差异, 附着率变化范围为17%~67%, 其中稚贝在*Vibrio* sp. 17微生物被膜上的附着率为67%±2%。微生物被膜对稚贝附着诱导活性与被膜密度呈显著相关性, 其中弧菌*V. crassostreae* ECSMB14106的相关性系数最高, 为0.8992。此外, 微生物被膜的诱导活性与弧菌的来源无关。本实验初步探明了海洋弧菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响, 有助于进一步理解微生物被膜调控厚壳贻贝的附着分子机理。

关键词: 厚壳贻贝; 稚贝; 附着; 海洋弧菌; 微生物被膜

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

弧菌(*Vibrio* sp.)隶属于变形菌门(Proteobacteria), γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria), 弧菌目(Vibrionales), 弧菌科(Vibrionaceae), 弧菌属(*Vibrio*), 广泛分布于水域生态系统中。除部分弧菌与真核生物宿主构成病原或共生外, 大多弧菌均为浮游生活^[1]。由于水域生态系统的动态变化, 适应性对于弧菌物种的生存和附着演替等极为关键^[1]。包括弧菌在内的诸多海洋细菌具有形成微生物被膜的能力, 这也是细菌自我保护的一种模式。微生物被膜是地球上分布最为广泛和成功的生命模式^[2], 几乎存在于海洋环境中所有的附着基表面。微生物被膜在生物地球化学循环过程以及海洋无脊椎动物附着过程中发挥关键性调控作用^[3-4]。

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)是我国常见的水产经济贝类, 隶属于软体动物门(Mollusca), 双壳纲(Bivalvia), 贻贝目(Mytilodia), 贻贝科

(Mytilidae), 在我国沿海均有分布^[5]。近年来大量人工采捕野生资源以及幼虫的低附着率导致厚壳贻贝增殖业面临危机^[6]。本团队以往研究发现微生物被膜在厚壳贻贝稚贝附着过程中发挥着重要的诱导作用^[7-11]; 初步证实海洋弧菌*Vibrio* sp. 1和*Vibrio* sp. 2能够影响厚壳贻贝稚贝的附着, 且被膜的诱导活性与细菌形成的微生物被膜密度等生物学特性相关^[9]。然而, 海洋弧菌种类较多, 不同弧菌对海洋无脊椎动物附着的影响有待进一步研究。

本研究从自然微生物被膜和贻贝肠道中分离纯化出海洋弧菌的单一菌株, 探究了其在不同初始密度下形成微生物被膜的细胞密度, 以及对应的诱导活性; 建立系统发育树分析其亲缘关系, 探究了弧菌遗传距离对诱导稚贝附着的影响。本实验旨在探明海洋弧菌对厚壳贻贝稚贝附着的影响, 并深入研究厚壳贻贝的附着

收稿日期: 2017-02-08 修回日期: 2017-03-22

资助项目: 国家自然科学基金(41476131); 上海高校水产高峰学科建设项目; 上海高校高原学科建设项目(海洋科学)

通信作者: 杨金龙, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

机制。开展海洋弧菌所形成微生物被膜对厚壳贻贝附着行为影响的系统性研究对于改善水产经济物种的附着技术具有极大的应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

厚壳贻贝稚贝由浙江嵊泗县东海贻贝科技创新服务有限公司提供。稚贝壳长(2.30 ± 0.06) mm,壳高(1.43 ± 0.04) mm。所用稚贝需提前至少1周运至实验室内暂养,培养条件:充气培养,水温为18℃,无光照,每24 h更换海水并投喂饵料。

用于分离纯化海洋弧菌的自然微生物被膜和野生厚壳贻贝均来自浙江舟山嵊泗县海域,细菌分离纯化利用ZoBell 2216E平板培养划线法^[6]。

1.2 实验方法

海洋细菌分离 自然微生物被膜上的细菌分离参照Bao等^[12]的方法。实验前准备充足的灭菌过滤海水(autoclaved filtered sea water, AFSW),实验所用器材均需经过灭菌处理,并在无菌操作台上进行。制备微生物被膜细菌悬浮液:收集适量自然微生物被膜至20 mL灭菌过滤海水中并混匀;制备肠道细菌悬浮液:厚壳贻贝肠道细菌分离时,剪取厚壳贻贝肠道,解剖后刮取肠道内壁物质至AFSW中并混匀。将上述两种不同来源的细菌悬浮液稀释10 000倍后用于分离细菌。实验时将悬浮液滴在琼脂培养基上涂布均匀。放置在25℃黑暗环境的培养箱中培养48 h后,挑选单一的菌落在新的培养基中反复分离纯化即可得到纯种菌株。

弧菌菌属鉴定 参照Li等^[9]的方法,经上海博彩生物科技有限公司的细菌基因组DNA抽提试剂盒提取DNA后,进行16S rDNA序列的PCR扩增,将扩增产物进行测序,获得其16S rDNA序列。之后将序列用BLAST在基因库中进行比对,并上传至NCBI数据库,得到序列号与菌名。

微生物被膜的制备 微生物被膜制备参考周轩等^[10]的方法,将鉴定得到的弧菌菌株进行扩大培养,形成初始细菌原液。细菌原液通过0.1%吖啶橙染色的方法,在1000倍的荧光显微镜(奥林巴斯BX51)下计数,测定其细菌密度后,将适量的细菌原液加入到装有灭菌载玻片的无菌

(Φ 64 mm $\times$ 19 mm)培养皿中,并加入AFSW定容至20 mL。每株细菌需形成 1.0×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 、 5.0×10^8 个/mL 4个初始密度,每个密度12个平行。完成上述步骤后将培养皿放置在18℃、无光照的培养箱中,培养48 h形成微生物被膜。

被膜细菌密度计数 被膜细菌密度计数参照杨金龙等^[6]的方法。实验前用5%福尔马林溶液固定。细菌密度计数时需用AFSW清洗微生物被膜3次,0.1%吖啶橙染液染色3~5 min。荧光显微镜放大倍数为1000倍,挑选10个随机视野进行计数,计数完成之后按照公式计算即可得到微生物被膜上的细菌密度。

稚贝附着实验 稚贝附着实验及诱导活性评价指标参照Yang等^[8]的方法。实验时将微生物被膜取出并放置在装有20 mL AFSW的无菌培养皿中,在微生物被膜中加入10个实验前暂养厚壳贻贝稚贝,随后放置在18℃环境中。12、24和48 h后观察并记录稚贝附着个数。实验设置9个平行组和3个对照组,对照组用无菌载玻片替代微生物被膜。

数据处理 实验数据的统计分析和相关性检测在JMP软件(版本10.0.0)中进行。首先将附着活性数据进行反正弦转化,再将所有数据进行正态性检测,分析方法按照是否满足正态分布条件进行不同分析,若分析结果方差相同且满足正态分布则进行单因素方差分析,反之则进行Kruskal-Wallis Test分析。另外通过多元分析方法分析附着活性与细菌密度之间的相关性,当 $P<0.05$ 时表现为显著性差异。

2 结果

2.1 海洋弧菌的测序与定名

本实验使用源于自然微生物被膜和野生厚壳贻贝肠道各5株弧菌,通过将16S rDNA测序结果在BLAST程序中与GenBank核酸数据对比,得到所用菌株的菌名与序列号(表1)。

2.2 海洋弧菌的系统发育分析

采用不同的方法和模式进行系统发育分析,本文仅列出Neighbor-Joining method分析结果,测试菌株16S rDNA序列的系统发育树(图1)。结果发现分离自自然微生物被膜的细菌与厚壳贻贝肠道细菌之间的亲缘关系都比较接近。

表 1 实验所用10株海洋弧菌

Tab. 1 The information of the ten marine *Vibrio* strains

测试菌株 test isolate	来源 source	上传所得序列号 submission no.	对照菌名 closest match name of BLAST	对比序列号 closest match no.	对照相似度/% submission similarity	文献 reference
ECSMB14106	glass slide	JX458859	<i>Vibrio crassostreae</i>	X99761	98	[13]
ECSMB62	glass slide	KP126920	<i>Vibrio</i> sp. 13	KC210810.1	99	本研究
ECSMB63	glass slide	KP126921	<i>Vibrio</i> sp. 14	KF220489.1	99	本研究
ECSMB64	glass slide	KP126922	<i>Vibrio</i> sp. 15	JQ799134.1	99	本研究
ECSMB65	glass slide	KP126924	<i>Vibrio</i> sp. 16	KJ841877.1	99	本研究
ECSMC66	<i>Mytilus coruscus</i>	KU845385	<i>Vibrio</i> sp. 17	KC210810	99	本研究
ECSMC67	<i>Mytilus coruscus</i>	KU845387	<i>Vibrio</i> sp. 18	HQ908739	99	本研究
ECSMC68	<i>Mytilus coruscus</i>	KU845389	<i>Vibrio</i> sp. 19	CP013484	99	本研究
ECSMC69	<i>Mytilus coruscus</i>	KU845392	<i>Vibrio</i> sp. 20	KC210816	99	本研究
ECSMC70	<i>Mytilus coruscus</i>	KU845393	<i>Vibrio</i> sp. 21	CP013484	99	本研究

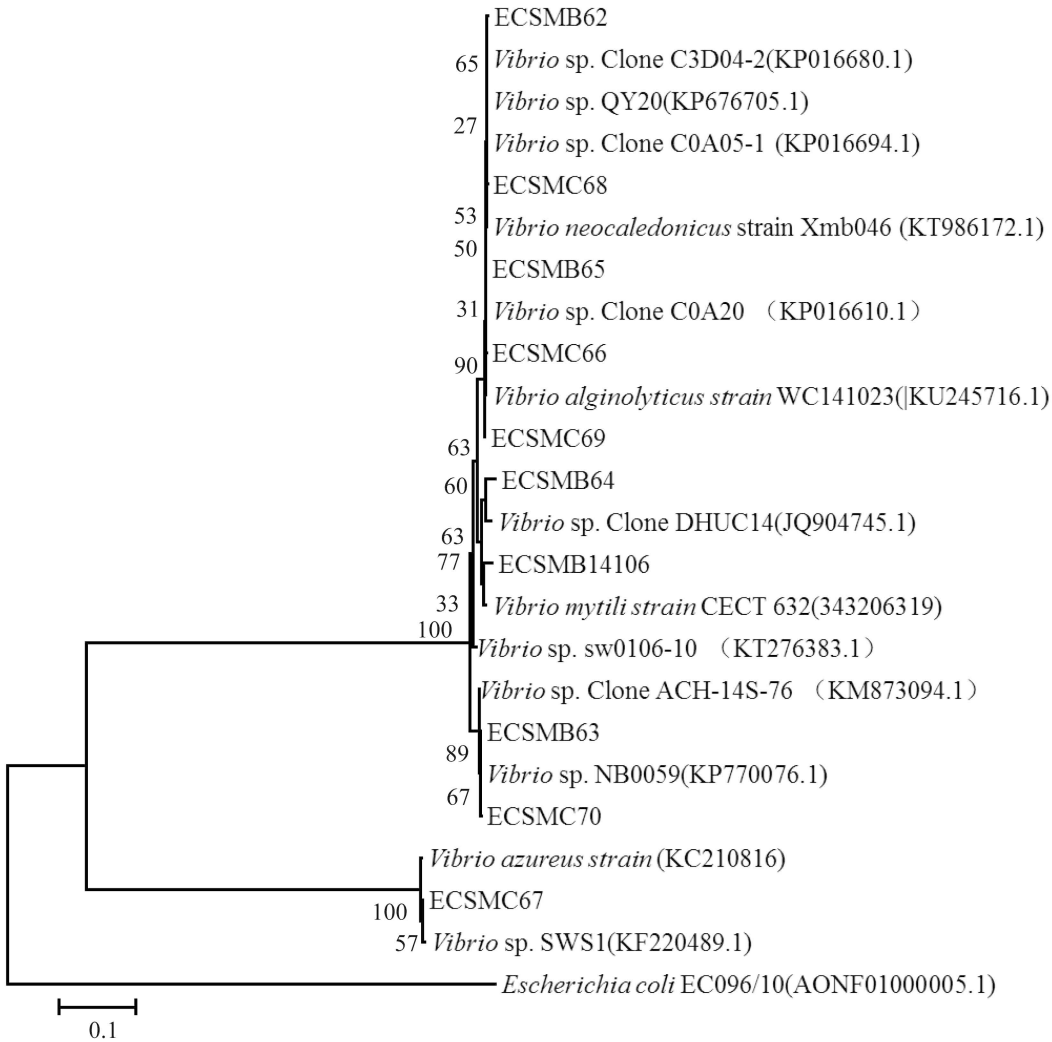


图 1 10株海洋弧菌的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the ten species of *Vibrio* sp.

2.3 初始细菌密度对微生物被膜形成的影响

在4个初始细菌密度条件下,实验所用各株弧菌所形成微生物被膜最终密度均随初始细菌密度的增加而呈现不同程度的增加(图2),仅当初始密度增加至 5.0×10^8 个/mL时,由野生厚壳贻贝肠道分离出的菌株*Vibrio* sp. 17和*Vibrio* sp. 20形成的微生物被膜的密度呈现下降趋势。初始细菌密度为 1.0×10^6 个/mL时,来源于厚壳贻贝肠道的菌株*Vibrio* sp. 17形成的被膜终密度最低,为 $(1.2 \times 10^6 \pm 2.4 \times 10^4)$ 个/cm²;源于厚壳贻贝肠道菌株*Vibrio* sp. 21形成被膜密度最高,为 $(3.4 \times 10^6 \pm 3.8 \times 10^4)$ 个/cm²;当初始细菌密度为 1.0×10^7 个/mL时,

来源于厚壳贻贝肠道菌株*Vibrio* sp. 21形成的被膜终密度最低,为 $(5.0 \times 10^6 \pm 4.3 \times 10^4)$ 个/cm²,源于自然微生物被膜中的菌株*V. crassostreae* ECSMB14106膜密度最高,为 $(1.6 \times 10^7 \pm 5.8 \times 10^5)$ 个/cm²。当初始密度为 1.0×10^8 个/mL时,来源于自然微生物被膜的菌株*Vibrio* sp. 14形成的被膜终密度最低,为 $(1.7 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^5)$ 个/cm²;源于厚壳贻贝肠道中的菌株*Vibrio* sp. 19膜密度最高,为 $(3.2 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^5)$ 个/cm²。当初始密度为 5.0×10^8 个/mL时,厚壳贻贝肠道菌株*Vibrio* sp. 18形成被膜终密度显著高于其他9株细菌($P < 0.05$),其密度为 $(5.5 \times 10^7 \pm 2.5 \times 10^5)$ 个/cm²。

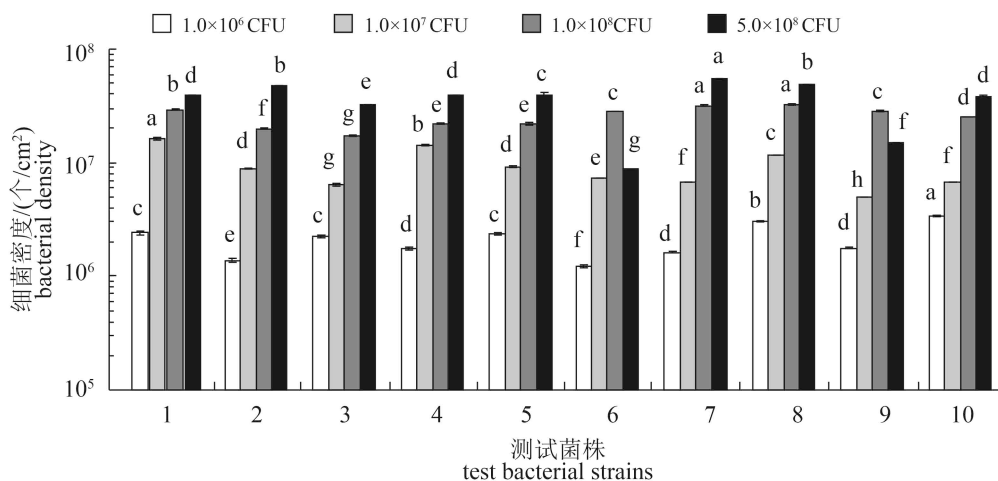


图2 不同初始密度下形成弧菌微生物被膜的密度

不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同

Fig. 2 The density of *Vibrio* biofilms at different initial densities (mean $\pm$ SE, $n=30$)

Values that are significantly different between each other at $P < 0.05$ are indicated by different letters above the bars. 1. *Vibrio crassostreae* ECSMB14106; 2. *Vibrio* sp. 13; 3. *Vibrio* sp.; 4. *Vibrio* sp. 15; 5. *Vibrio* sp. 16; 6. *Vibrio* sp. 17; 7. *Vibrio* sp. 18; 8. *Vibrio* sp. 19; 9. *Vibrio* sp. 20; 10. *Vibrio* sp. 21. The same below

2.4 弧菌被膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响

弧菌被膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响结果在12、24和48 h相近,因此本实验仅展示12 h时的影响结果(图3)。结果显示空白对照组稚贝的附着率仅为 $18\% \pm 2\%$,与空白对照组相比,所有实验菌株均对厚壳贻贝稚贝附着呈现出显著诱导活性($P < 0.05$)。菌株*Vibrio* sp. 17形成的微生物被膜对稚贝附着的诱导活性最高,其附着率为 $67\% \pm 2\%$,且与菌株*Vibrio* sp. 19无显著性差异($P > 0.05$)。 *Vibrio* sp. 14、*Vibrio* sp. 15、*Vibrio* sp. 16、*Vibrio* sp. 18、*Vibrio* sp. 21等细菌微生物被膜对稚贝附着的诱导活性为50%~70%,其余菌株

诱导活性低于50%。

2.5 被膜终密度对稚贝附着的影响

Vibrio sp. 14、*Vibrio* sp. 17和*Vibrio* sp. 20这3株弧菌所形成的微生物被膜对厚壳贻贝稚贝的诱导活性随细菌密度的增加而增加,菌株*Vibrio* sp. 16、*Vibrio* sp. 19和*Vibrio* sp. 21这3株弧菌所形成的微生物被膜对稚贝附着的诱导活性随细菌密度的增加而降低(图4)。其中,*Vibrio* sp. 19形成的微生物被膜密度最大时为 4.8×10^7 个/cm²,而此时其诱导稚贝的附着率仅为16.7%,低于空白对照组,呈现无诱导活性($P > 0.05$)。其余4株弧菌对稚贝的诱导活性随密度的增加而呈现先增加

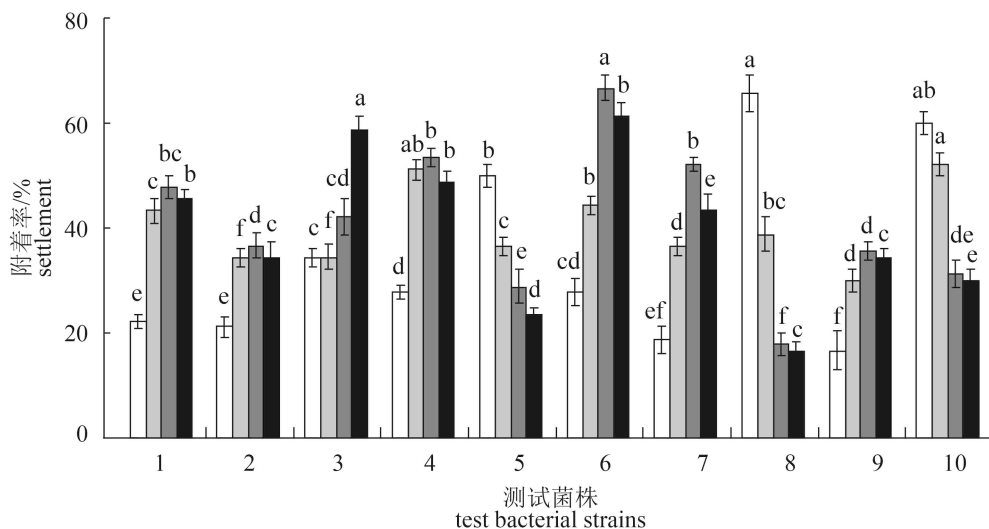


图3 弧菌被膜对稚贝附着的诱导率

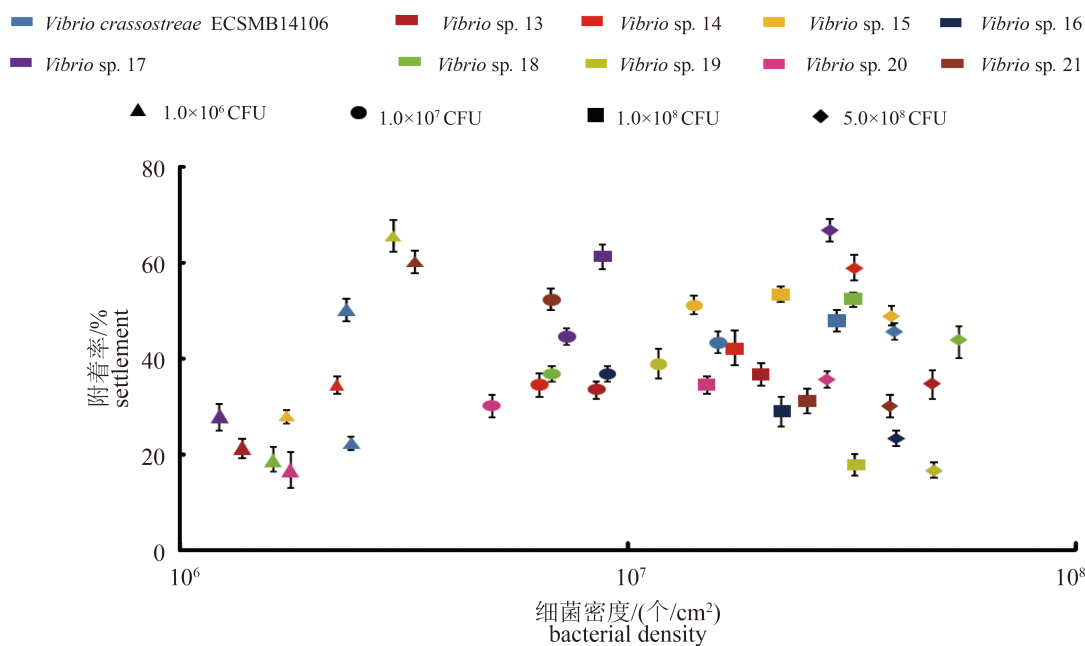
Fig. 3 Percentages of plantigrade settlement on the ten *Vibrio* biofilms

图4 弧菌被膜密度与稚贝附着率之间的关系

Fig. 4 Interaction between settlement rate of plantigrades and cell densities of *Vibrio* biofilms

后降低的趋势。稚贝附着与微生物被膜密度之间的相关性分析表明,实验用各株弧菌所形成的微生物被膜密度与稚贝附着率均显著相关($P<0.05$) (表2)。菌株 *V. crassostreae*、*Vibrio* sp. 14、*Vibrio* sp. 16和 *Vibrio* sp. 21等4株弧菌的诱导活性与细菌密度呈极显著相关性($|r|>0.7$),其余6株弧菌的诱导活性与细菌密度均呈中等程度显著相关($0.5<|r|<0.7$)。其中, *Vibrio* sp. 14、*Vibrio* sp. 16和

Vibrio sp. 21等3株弧菌表现出负相关性。

3 讨论

弧菌属细菌能够适应淡水和海水环境且广泛分布,这种适应性对于其生存和附着过程极其关键^[1]。本团队对浙江嵊泗附近海域中自然微生物被膜的细菌群落结构进行了高通量测序,发现海洋弧菌在整个微生物被膜中占据了很大

表 2 弧菌被膜密度与诱导活性相关性分析
Tab. 2 Correlation analyses between the bacterial density of *Vibrio* biofilms and their inducing activities

菌株 bacterial strains	细菌终密度 finally bacterial density	
	<i>r</i>	<i>P</i>
<i>Vibrio crassostreae</i>	0.8992	<0.0001*
<i>Vibrio</i> sp.13	0.6992	<0.0001*
<i>Vibrio</i> sp.14	-0.8852	<0.0001*
<i>Vibrio</i> sp.15	0.6669	<0.0001*
<i>Vibrio</i> sp.16	-0.8443	<0.0001*
<i>Vibrio</i> sp.17	0.6548	<0.0001*
<i>Vibrio</i> sp.18	0.5127	0.0014
<i>Vibrio</i> sp.19	0.6954	<0.0001*
<i>Vibrio</i> sp.20	0.5677	0.0003
<i>Vibrio</i> sp.21	-0.8302	<0.0001*

注: *P*为检验值; *r*为相关系数; *表示显著性差异(*P*<0.05)
Notes: *P*=*P* value; *r*=correlation coefficient; *. significant at *P*<0.05

的比例。Yang等^[13]和Huggett等^[14]研究表明海洋弧菌被膜在厚壳贻贝和海胆(*Heliocidaris erythrogramma*)等幼虫附着中也发挥着重要的调控作用。

微生物被膜是促进贻贝、华美盘管虫(*Hydroides elegans*)等海洋无脊椎动物幼虫的附着和变态发育的重要因素之一^[15-16]。不同物种的幼虫对微生物被膜的反应不同,同一种类幼虫对不同菌种所形成微生物被膜的反应也不尽相同。例如,Tran等^[17]的研究发现弧菌能诱导鹿角珊瑚(*Pocillopora damicornis*)幼虫的附着,Maki等^[18]的研究却发现*V. fluvialis*对藤壶(*Balanus amphitrite*)幼虫附着具有抑制作用。然而,关于海洋无脊椎动物稚体对微生物被膜附着行为的影响尚有待研究。

贻贝是具有二次附着行为的海洋无脊椎动物^[5],海洋环境的改变会导致贻贝自行切断足丝,选择到其他适宜的环境中附着栖息。另外,贻贝是检测微生物被膜调控附着的理想生物。本实验使用厚壳贻贝稚贝来检测海洋弧菌所形成的微生物被膜的附着诱导活性,结果显示不同来源海洋弧菌所形成的微生物被膜对厚壳贻贝稚贝的附着均具有诱导活性,且其活性具有显著性差异。其中,分离自厚壳贻贝肠道的菌株*Vibrio* sp. 17诱导活性最高,但与分离微生物被膜的最高活性菌株*Vibrio* sp. 19之间并无显著性差

异。因而,海洋弧菌所形成的微生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着诱导活性的高低与其来源并不相关,可能是由于不同细菌产生的胞外多糖、脂类以及蛋白的种类和含量不同而呈现出不同的诱导活性^[1]。

微生物被膜的细菌密度与海洋无脊椎动物幼虫的附着具有密不可分关联。在以往的研究中,不论是自然海域中形成微生物被膜或是实验室内海水环境中形成微生物被膜,其细菌密度均显著影响贻贝附着^[7, 19]。同样,本实验结果发现不同来源10株海洋弧菌的初始细菌密度显著影响微生物被膜的终密度。其中,有7株弧菌的最终密度与厚壳贻贝稚贝附着呈显著相关性,其余3株弧菌呈现负相关,推测这3株弧菌可能在低密度下分泌的胞外代谢产物能够诱导稚贝的附着,但随着细菌自身密度的增加,其分泌的胞外代谢产物的种类和浓度发生变化,甚至产生抑制性活性物质,从而导致稚贝附着率的降低,但具体作用机理还有待进一步研究。张朝霞等^[20]研究发现弧菌属H-4对冠瘤海鞘(*Styela conopus*)幼虫的附着变态起抑制作用。这些研究表明海洋弧菌对于贝类等海洋无脊椎动物附着影响较为多样,具有有利和不利的一面性。

海洋弧菌系统发育分析的结果表明,分离自自然微生物被膜的细菌与厚壳贻贝肠道细菌之间的亲缘关系都比较接近,推测这可能与弧菌同时生活在同一海洋环境相关。分析各株弧菌形成的微生物被膜中最终细菌密度发现,各株弧菌在不同的条件下均具有较好的形成微生物被膜的能力,但来源不同的菌株形成被膜的能力有所不同。此外,实验中各株弧菌所形成微生物被膜的最终细菌密度以及形成微生物被膜的能力与弧菌的来源并无明显关系。同样,从玻璃表面形成的微生物被膜中分离的海洋弧菌形成单一微生物被膜的能力也不尽相同^[9]。这样的结果可能是因为弧菌本身具有如鞭毛、纤毛等黏附素,使其天生就能附着在其他细菌或基质表面^[21],从而导致形成微生物被膜的能力不同。

综上,源于自然微生物被膜以及野生厚壳贻贝肠道中的10株弧菌对厚壳贻贝稚贝附着具有显著诱导活性。弧菌被膜诱导活性与弧菌的来源无关,但与微生物被膜密度显著相关。本研究对于今后进一步阐明厚壳贻贝附着机理具有

重要学术价值。同时,对于微生物被膜在贝类等水产经济物种附着过程中作用的研究奠定良好基础。

参考文献:

- [1] Yildiz F H, Visick K L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(3): 109-118.
- [2] Stoodley P, Sauer K, Davies D G, *et al.* Biofilms as complex differentiated communities[J]. Annual Review of Microbiology, 2002, 56: 187-209.
- [3] Flemming H C, Wingender J, Szewzyk U, *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(9): 563-575.
- [4] 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).
- [5] 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).
- [6] 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[J]. 水产学报, 2015, 39(3): 421-428.
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(in Chinese).
- [7] 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.
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(in Chinese).
- [8] Yang J L, Li X, Liang X, *et al.* Effects of natural biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. Aquaculture, 2014, 424-425: 228-233.
- [9] 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.
- [10] 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).
- [11] 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).
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Huggett M J, Williamson J E, de Nys R, *et al.* Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae[J]. Oecologia, 2006, 149(4): 604-619.
- [15] 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).
- [16] Chung H C, Lee O O, Huang Y L, *et al.* Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*[J]. The ISME Journal, 2010, 4(6): 817-828.
- [17] Tran C, Hadfield M G. Larvae of *Pocillopora damicornis* (Anthozoa) settle and metamorphose in

- response to surface-biofilm bacteria[J]. Marine Ecology Progress Series, 2011, 433: 85-96.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 潘晓艺, 沈锦玉, 尹文林, 等. 水生动物的弧菌病及其致病机理[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(3): 272-277.
- Pan X Y, Shen J Y, Yin W L, *et al.* Vibriosis and their mechanisms in aquatic animals[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2006, 21(3): 272-277(in Chinese).

Effects of *Vibrio* biofilms of different sources on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*

HUANG Daofen^{1,2}, LIANG Xiao^{1,2}, PENG Lihua^{1,2},
GUO Xingpan^{1,2}, ZHANG Demin³, 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. International Research Center for Marine Biosciences at Shanghai Ocean University,
Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306, China;

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

Abstract: Marine biofilms play a crucial role in the settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*, but the effect of *Vibrio* derived from different sources on the settlement of plantigrades of the mussel *M. coruscus* remains unknown. Ten marine *Vibrio* species were isolated from natural biofilms and the intestine of the wild adult mussel *M. coruscus* and identified to investigate the relationship between these biofilms and mussel plantigrade settlement. The results showed that *Vibrio* biofilm cell densities increased with the increasing initial cell density. All test *Vibrio* biofilms can significantly promote mussel settlement, and the percentage of plantigrade settlement ranged from 17% to 67%. The inducing activities of these bacterial biofilms were significantly correlated to the microbial biofilm density, and the correlation coefficient in *V. crassostreae* ECSMB14106 was the highest (0.8992). In addition, the inducing activity of these bacterial strains was not correlated to the source of *Vibrio*. This study showed that marine *Vibrio* of the different sources induced mussel settlement and the finding is important for understanding the potential molecular mechanism of the biofilms mediating the settlement process in this species.

Key words: *Mytilus coruscus*; plantigrade; settlement; marine *Vibrio*; biofilm

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41476131); the Peak Discipline Program for Fisheries from the Shanghai Municipal Government; Shanghai Universities Plateau Discipline Project of Marine Sciences