



弧菌生物被膜的动态演替对厚壳贻贝附着的影响

梁 箫^{1,2,3}, 刘红雨^{1,2}, 杨丽婷^{1,2}, 常睿珩^{1,2},
彭莉华^{1,2}, 李一峰^{1,2,3}, 杨金龙^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306;
2. 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;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为探讨生物被膜动态演替过程中如何影响海洋无脊椎动物附着, 实验选取了对厚壳贻贝附着具有不同诱导活性的弧菌 *Vibrio cyclitrophicus*、*V. chagasii* 和 *Vibrio sp. 22* 形成单一生物被膜, 观察弧菌动态演替中生物被膜细菌密度、膜厚度和胞外产物等生物学特性变化, 探究其对厚壳贻贝稚贝附着的影响。结果显示, 弧菌生物被膜动态演替过程中, 被膜细菌随着时间推移出现聚集现象, 细菌密度和膜厚度也随着时间变化呈先增多后减少。除了 *Vibrio sp. 22*, *V. cyclitrophicus* 和 *V. chagasii* 生物被膜细菌密度和膜厚度与稚贝附着均有不同程度的相关性。所测弧菌生物被膜胞外产物的显微激光共聚焦结果分析发现, 胞外多糖随着时间先增多, 然后开始下降。相对比而言, 胞外蛋白和胞外脂质无显著性变化。因而, 胞外多糖变化规律与稚贝在被膜上附着变化相一致, 表明胞外多糖是生物被膜动态演替过程中调控厚壳贻贝附着的重要因素。本实验初步探讨了生物被膜动态演替特征及其对厚壳贻贝稚贝附着的影响, 对于后续进一步在海区开展生物被膜的动态演替与海洋底栖动物附着相互关系研究具有重要的学术价值, 同时对于人工鱼礁礁体生物附着机理的研究具有重要的实践价值。

关键词: 厚壳贻贝; 稚贝; 附着; 海洋弧菌; 微生物被膜; 动态演替

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 作为我国海水养殖贝类中重要的经济品种之一, 也是代表性附着生物^[1-2]。在厚壳贻贝生长史中幼虫会经历2个阶段, 浮游阶段和附着阶段。幼虫经过变态发育成稚贝从浮游态转变成附着生活, 稚贝生长发育后变为成贝^[2]。厚壳贻贝稚贝会寻找一个合适的表面进行附着生长, 环境变化时, 稚贝会自行切断足丝重新寻找附着基进行附着^[2]。近年来, 由于厚壳贻贝自然资源被大肆破坏和过量捕捞, 苗种生产受到严重制约, 野生资源大幅下滑。选择合适区域建设人工鱼礁对于海洋渔

业资源恢复, 保障海洋生物资源可持续利用以及生态环境修复具有重要意义^[3-4]。人工鱼礁作为附着基, 浸入海水后, 其礁体表面会附着各种类型的微生物或大型藻类, 这些附着生物同时可以作为主要饵料生物、海洋底栖动物的饵料场、栖息地。同时, 附着生物群落结构及数量变化直接影响着人工鱼礁区的生态效应^[5]。

弧菌 (*Vibrio spp.*) 是一种常见的革兰氏阴性细菌, 广泛分布于海洋环境中。为了种群的繁衍以及适应环境变化, 包括弧菌在内的大多数海洋细菌均具有形成生物被膜的能力^[6-7]。在自

收稿日期: 2019-01-31 修回日期: 2019-05-01

资助项目: 国家自然科学基金(41476131, 41606147); 上海高校水产高峰学科建设项目

通信作者: 杨金龙, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

自然界中, 生物被膜是由许多种类的细菌被复杂的聚合物基质包围形成的一种复杂三维体结构^[8], 其形成过程是一个动态变化的过程, 分为5个阶段^[9]: ①细菌可逆的附着在表面上。细菌使用各种胞外细胞器和蛋白质来感测并附着到表面^[10], 这个过程是可逆的; ②细菌不可逆的附着在表面上。附着在表面的细菌开始分泌胞外产物, 由DNA、蛋白质、脂质和脂多糖组成的聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)的分泌促进细菌和表面之间的黏附^[11]; ③细菌开始聚集形成菌落。吸附在表面上的细菌复制并生长为菌落, 这些细菌分泌的EPS将菌落包埋在水凝胶层中, 在群落和胞外环境之间形成物理屏障^[9]; ④细菌菌落与胞外聚合物形成成熟的三维体膜结构^[8]; ⑤由于环境的变化, 成熟的生物被膜破裂, 细菌从膜中回归到环境中, 在遇到合适的附着基时可以形成新的生物被膜^[12]。生物被膜不仅对于微生物种群的生存与繁衍及群落自我重建有着重要的作用^[7, 12], 对于贝类等无脊椎动物的附着过程同样具有重要的意义^[13-15]。

调控厚壳贻贝附着的因素有很多, 以往研究证明, 无论是自然生物被膜还是单一细菌形成的生物被膜, 均会不同程度诱导厚壳贻贝附着^[1-2, 16-21]。生物被膜动态演替过程中, 不仅是被膜结构在逐渐发生改变, 同时在被膜中细菌的分布以及分泌的胞外产物组成也在逐渐变化, 这种变化如何影响海洋无脊椎动物附着尚未得知。本实验以海洋弧菌为对象, 探讨了不同海洋弧菌生物被膜动态演替过程中细菌密度、膜厚度和胞外产物等生物学特性的变化以及对厚壳贻贝稚贝附着的影响, 旨在为后续利用生物被膜诱导贝类附着等生物工程技术, 阐明附着基质与生物附着相互关系以及厚壳贻贝附着机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

稚贝来源 实验所使用的厚壳贻贝稚贝[壳长: (0.335 ± 0.006) cm, 壳高: (0.258 ± 0.006) cm]来自浙江舟山市嵊泗金义育苗场。稚贝在实验室中暂养1周, 暂养温度为 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, 无光照。稚贝培养时期, 每隔2 d换一次水。稚贝喂养适量湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*), 每天投喂1次。

弧菌来源 实验中使用的弧菌分别来源于嵊泗海域形成的自然生物被膜和嵊泗海域生长的厚壳贻贝表面。将不同来源的细菌通过2216E平板培养法分离、纯化3次得到单一菌株, 进行16S *rRNA*测序后进行实验。

1.2 方法

弧菌的分离与纯化 实验的细菌分别从非生物表面(载玻片)和生物表面(厚壳贻贝成贝)中分离得到。将灭菌的载玻片排放在样板上, 浸在浙江枸杞岛海域($122^{\circ}77'E$; $30^{\circ}73'N$)4周, 在自然条件下灭菌的载玻片表面即会形成生物被膜。厚壳贻贝成贝在上述挂板同一海域被采集, 贝龄2年左右。生物被膜和厚壳贻贝成贝先用无菌过滤海水(autoclaved filtered sea water, AFSW)清洗, 再使用灭菌后的无菌载玻片分别从自然生物被膜和成贝上刮取, 放在烧杯中加入AFSW形成悬浮液。将2种来源的悬浮液, 稀释10 000倍后, 滴50 μL 悬浮液涂布于ZoBell 2216E琼脂平板上, 在黑暗条件下 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养48 h后挑取单菌落, 在平板上反复划线分离纯化, 得到纯种菌株, 菌体加入0.9%生理盐水和15%的甘油溶液中混合均匀, 在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

DNA提取和基因序列鉴定 将保种细菌接种到Zobell 2216E平板上。划线得到单菌落, 挑选单菌落接种至Zobell 2216E液体培养基中, 取1 mL菌液, 利用天根生化科技(北京)有限公司的DNA抽提试剂盒提取DNA。细菌16S *rRNA*序列使用通用引物进行扩增, 引物为27F和1492R^[21]。PCR扩增产物使用1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检验。将合格的PCR扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序得到的序列结果与NCBI数据库进行BLAST比对, 确定细菌种属。

生物被膜制备 生物被膜使用杨金龙等^[2]方法制备。将鉴定后的弧菌划线分离单菌落, 挑选单菌落到100 mL Zobell 2216E液体培养基, 于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下进行扩大培养12 h。培养的细菌原液先使用吖啶橙染色(0.1%)5 min, 然后用奥林巴斯BX51荧光显微(1 000倍)的油镜下计细菌密度。在干燥无菌的培养皿中加入灭菌玻片, 根据初始密度要求计算出细菌原液的体积加入其中, 加入AFSW定溶为20 mL。黑暗条件下 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别培养3、6、12、24、48、96、144和192 h, 形成生物被膜。每个时间点设置9个平行组, 每株细菌初始密度均调整为 1.0×10^8 个/mL。

稚贝附着实验 将不同培养时间点形成

的生物被膜放入灭菌干净的培养皿中,加入20 mL AFSW。用移液管吸取10只稚贝加入含有生物被膜的培养皿中,并记录12、24和48 h稚贝附着率。无生物被膜的培养皿为空白对照组。每个时间点设置9个平行组。

生物被膜细菌密度计数 培养好的生物被膜使用AFSW先清洗3次,使用5%的福尔马林溶液固定,固定的菌膜经AFSW冲洗3次,吖啶橙(AO, 0.1%)染色5 min,染色的菌膜直接用荧光显微镜(奥林巴斯BX51)油镜下随机选取10个点进行计数,确定各个时间点的细菌密度。

激光共聚焦扫描显微镜成像 菌膜用5%的福尔马林溶液固定24 h后加入200 μ L PI (5 μ g/mL)溶液避光染色20 min,再用ASFW洗涤。在激光共聚焦扫描显微镜拍摄细菌,激发/发射波长为543/613 nm。每个菌膜随机选10个视野用于成像和分析,设置3个重复,通过得到的30个不同厚度值来确定每个微生物膜厚度。图像由Leica激光共聚焦显微镜拍摄得到。

生物被膜胞外多糖染色 生物被膜胞外多糖使用SYTO法进行染色。将培养好的菌膜(3个平行组)用1 \times PBS缓冲液清洗3次,加入200 μ L的fitc-conA(100 μ g/mL)避光染色20 min。染色完成之后用1 \times PBS缓冲液和Tris-HCl (pH=8.0)清洗。再用200 μ L STYO64(10 μ mol/L)避光染色2 min,染色完成后继续用1 \times PBS缓冲液和Tris-HCl清洗,避光自然干燥后在Leica激光共聚焦显微镜下观察生物被膜上多糖分布情况。

生物被膜胞外蛋白染色 胞外蛋白使用

考马斯亮蓝染色法。培养好的菌膜(3个平行组),使用5%的福尔马林溶液固定24 h,再使用1 \times PBS缓冲液清洗3次,加入200 μ L考马斯亮蓝避光条件下染色1 h。将菌膜放入蛋白脱色液中脱色10 min,用1 \times PBS清洗3次,避光自然干燥后在Leica激光共聚焦显微镜下观察生物被膜上蛋白分布情况。

生物被膜胞外脂质染色 培养好的菌膜(3个平行组)用5%的福尔马林溶液固定24 h后用1 \times PBS清洗3次,放入干净的培养皿中加入200 μ L苏丹红溶液避光染色20 min。放入1 \times PBS缓冲液中浸泡5 min,避光自然干燥。避光自然干燥后在Leica激光共聚焦显微镜下观察生物被膜上脂质分布情况。

数据处理 弧菌生物被膜诱导附着变态的活性用稚贝附着率表示。所有数据均采用JMP软件(版本10.0.2)进行统计分析。将附着率百分比值进行反正弦转化。在统计分析之前,所有的数据进行了正态性和同质性检测。通过多元分析方法分析稚贝附着率与细菌密度之间是否具有相关性($P<0.05$,具有显著性差异)。

2 结果

2.1 弧菌的16S rRNA测序结果

本实验中1株弧菌来源于厚壳贻贝成贝,其余2株从自然生物被膜分离纯化得到。测序得到的弧菌16S rRNA序列通过与NCBI数据库BLAST比对确定细菌种属(表1)。

表1 本实验筛选获得的3株弧菌

Tab. 1 The information of three *Vibrio* strains

菌株 isolated strains	序列号 accession no.	菌种 strains	比对序列号 accession no. of closest match	相似度/% similarity	来源 source	文献 reference
ECSMB14105	LAUL00000000	<i>V. cyclitrophicus</i>	KF488567.1	99%	glass slide	[21]
ECSMB14107	CP034970 CP034971	<i>V. chagasii</i>	LN832959.1	99%	glass slide	本实验
ECSMC28	MK368454	<i>Vibrio</i> sp. 22	LN832978.1	99%	<i>M. coruscus</i>	本实验

2.2 生物被膜动态演替对厚壳贻贝稚贝附着的影响

在相同起始浓度 1.0×10^8 cells/mL条件下,3株弧菌在8个时间点形成的单一细菌生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着具有不同程度的诱导活性,

<http://www.sexuebao.cn>

由于12、24和48 h的稚贝附着率结果相似,因此只显示12 h稚贝附着率结果(图1)。空白对照组稚贝的附着率为 $18\% \pm 3\%$ 。3株弧菌在不同时间形成的生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着均具有诱导活性,且不同时间形成的生物被膜的附着率均随着时间先升高再下降。其中*V. cyclitrophicus*

生物被膜在3~6 h稚贝附着率开始急剧, 48 h达到最大值(57%±4%), 与12 h和24 h无显著差异性($P>0.05$), 48 h后附着率开始下降。同样 *V. chagasii* 生物被膜在3~6 h稚贝附着率开始急剧上升, 48 h达到最大值(38%±3%), 在96 h附着率开始逐渐下降。对于 *Vibrio* sp. 22, 生物被膜在3~12 h附着率呈现上升趋势, 在48 h时候附着率达到最大值(40%±3%), 96 h附着率开始缓慢下降。在48 h时3株弧菌生物被膜达到最大值, 其中 *V. cyclitrophicus* 附着率与其他2株弧菌48 h时附着率具有差异性($P<0.05$), 而 *V. chagasii* 和 *Vibrio* sp. 22在48 h时附着率无显著性差异($P>0.05$)。

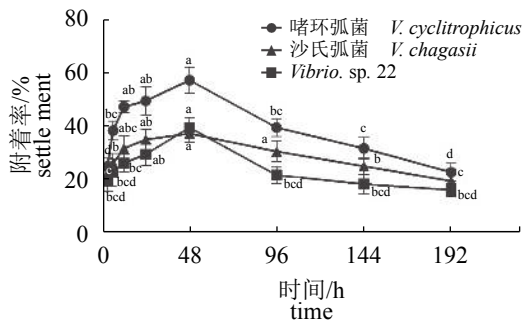


图1 弧菌生物被膜动态演替对稚贝附着率的影响
不同字母表示差异显著($P<0.05$); 下同

Fig. 1 Percentages of plantigrade settlement on the *Vibrio* biofilms developed at varying time

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

2.3 生物被膜的细菌密度动态演替

在相同起始浓度 1.0×10^8 个/mL条件下, 3株海洋弧菌形成的生物被膜密度随着时间的推移呈先递增后下降的趋势(图2)。 *V. cyclitrophicus* 生物被膜从3~48 h细菌密度逐渐递增, 从96~192 h细菌密度开始逐渐下降, 并在48 h时的细菌密度达到最大值为 1.4×10^7 个/cm。而 *V. chagasii* 生物被膜从3 h到96 h细菌密度逐渐增大, 在96 h达到峰值为 1.12×10^7 个/cm, 96 h以后细菌密度开始减少。 *Vibrio* sp. 22生物被膜从3 h开始细菌密度开始递增, 在144 h达到稳定后开始下降, 在96 h细菌密度达到最大值为 1.51×10^7 个/cm。在细菌密度与附着率相关性分析中显示, 除 *Vibrio* sp. 22外, *V. cyclitrophicus* 和 *V. chagasii* 在不同时间下形成的生物被膜细菌密度与厚壳贻贝稚贝附着率均具有一定的相关性(表2)。

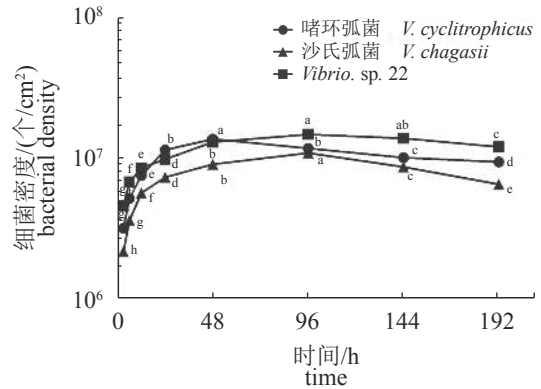


图2 不同时间下形成生物被膜的细菌密度(n=30)
Fig. 2 Density of monospecific bacterial biofilms at different time

表2 生物被膜细菌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

测试菌株 tested bacteria	细菌密度 bacterial density	
	r	P
<i>V. cyclitrophicus</i>	0.411 7	0.000 3
<i>V. chagasii</i>	0.249 4	0.034 6
<i>Vibrio</i> sp. 22	0.032 8	0.784 2

注: r为相关系数; 下同
Notes: r: correlation coefficient; the same below

2.4 生物被膜的厚度与形态

*V. cyclitrophicus*和 *Vibrio* sp. 22生物被膜厚度在3和6 h时无显著性差异($P>0.5$, 图3), 从12 h开始显著增加并在48 h时膜厚度最大, 随后被膜膜厚度开始递减。 *V. chagasii*生物被膜从3~12 h膜厚度无差异性($P>0.5$), 24 h开始生物被膜膜厚度逐渐增大, 在48 h达到最大值。在96~192 h膜厚度逐渐减小。激光共聚焦显微镜结果显示, 3株弧菌生物被膜上的细菌随着时间推移出现了不同程度的聚集现象, 其中 *V. cyclitrophicus* 细菌出现聚堆现象, 而 *V. chagasii* 和 *Vibrio* sp. 22生物被膜上细菌分布较为均匀。3株细菌分布图均符合被膜厚度变化规律, 共聚焦图片只展示了3、12、48和192 h结果(图版 I); 3株弧菌均在48 h达到最高, 随后减少。3株弧菌生物被膜厚度与附着率相关性分析发现, 除 *Vibrio* sp. 22外, *V. cyclitrophicus* 和 *V. chagasii* 膜厚度与稚贝附着率具有相关性(表3)。其中 *V. cyclitrophicus* 呈中等程度显著相关($0.5 \leq r \leq 0.7$), 而 *V. chagasii* 为低显著相关($r<0.5$)。

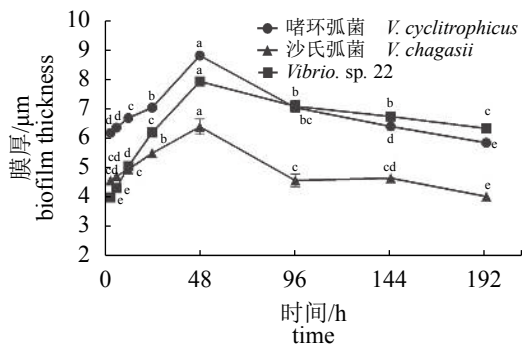


图3 不同时间时生物被膜厚度(n=30)

Fig. 3 Thickness of monospecific bacterial biofilms at different time (means±SE, n=30)

表3 弧菌被膜厚度与诱导活性相关性分析

Tab. 3 Correlation analyses between the thickness of *Vibrio* biofilms and their inducing activities

测试菌株 tested bacteria	膜厚度 biofilm thickness	
	<i>r</i>	<i>P</i>
<i>V. cyclitrophicus</i>	0.664 6	<0.000 1
<i>V. chagasii</i>	0.384 7	0.000 8
<i>Vibrio sp. 22</i>	0.194 3	0.102 0

2.5 生物被膜胞外多糖分布

3株弧菌形成的生物被膜使用Fitc-conA和SYTO-64两种荧光染色剂进行染色,在激光共聚焦显微镜下观察发现,3株弧菌生物被膜随着时间变化胞外多糖先递增后减少(图版II)。其中*V. cyclitrophicus*生物被膜从12 h开始绿色光点逐渐增多,在48 h绿色光点最明显,192 h绿色光点减弱即胞外多糖分泌减少(图版II-1~4)。*V. chagasii*弧菌生物被膜上绿色光点相较于其他2株细菌,光点颜色暗且少;随着时间变化绿色光点缓慢增加,48 h绿色光点最多,192 h减少(图版II-5~8)。*Vibrio sp. 22*生物被膜3~12 h蓝色光点无明显差异,48 h绿色光点最亮,从192 h绿色光点减少颜色变淡,胞外多糖减少(图版II-9~12)。

2.6 生物被膜的胞外蛋白分布

在激光共聚焦显微镜下观察,蓝色光点为3株弧菌在不同时间形成的生物被膜表面胞外蛋白(图版III)。*V. cyclitrophicus*生物被膜中的胞外蛋白从3~192 h膜上蓝色光点分布无显著差异(图版III-1~4)。同样,*V. chagasii*(图版III-5~8)和*Vibrio sp. 22*(图版III-9~12)生物被膜3~12 h蓝色光点无显著

差异。此外,相同时间条件下,不同弧菌生物被膜表面分泌的胞外蛋白无显著差异。

2.7 生物被膜的胞外脂质分布

红色光点为3株弧菌在不同时间条件下形成的生物被膜表面的胞外脂质(图版IV)。*V. cyclitrophicus*生物被膜中的胞外脂质从3~192 h被膜上红色光点分布无显著差异(图版IV-1~4)。同样,*V. chagasii*(图版IV-5~8)和*Vibrio sp. 22*(图版IV-9~12)生物被膜3~12 h红色光点无显著差异。相同时间条件下,不同弧菌生物被膜表面分泌的胞外脂质无显著差异。

3 讨论

生物被膜形成是一个不断变化、时刻演替的过程。以往研究发现,在一定时间范围内,弧菌生物被膜的细菌密度、厚度、膜表面聚集程度以及群落结构等生物学特性随着时间均会有所变化^[6,22]。然而,弧菌生物被膜生物学特性动态演替与后续海洋无脊椎动物附着的相互关系尚未得知。

本实验选取了3株弧菌*V. cyclitrophicus*、*V. chagasii*和*Vibrio sp. 22*为研究对象,不同时间形成的生物被膜表面细菌出现了不同的聚集现象。在激光共聚焦下染色观察不同时间段的生物被膜发现,随着时间变化,细菌生物被膜上附着的细菌开始逐渐聚集。以往的研究发现,微生物的聚集现象往往是其分泌的群体感应信号分子的调控,如Hammer等^[23]实验中*V. cholerae* ElTor拥有至少3个群体感应回路,控制毒力基因表达、蛋白酶产生以及生物膜形成。被膜形成过程中菌群会分泌信号分子,细菌通过感知信号分子浓度来检测周围细菌密度;当信号分子浓度达到一定阈值,调控生物被膜形成的基因开始表达,从而调控细菌密度可适应环境变化^[23-24]。因此,推测3株弧菌在不同时间形成生物被膜出现的聚集现象与此有关。

在生物被膜形成过程中会分泌大量的胞外产物,这些胞外产物主要是细菌生长代谢产物,主要由蛋白质、多糖和脂质等组成^[11]。使用不同的染色方法将3株弧菌不同时间点形成的生物被膜胞外多糖、蛋白以及脂质分别染色,激光共聚焦显微技术分析发现,3株弧菌生物被膜在同一菌株不同时间条件下,胞外蛋白和胞外

脂质无显著差异; 相同时间条件下, 不同菌株的胞外蛋白和胞外脂质无显著差异。相比之下, 3株弧菌被膜胞外多糖的分泌与被膜形成时间有关, 随着时间不断变化, 在成膜过程中细菌分泌的胞外多糖逐渐增多并达到一个最大值, 随后生物被膜走向衰老, 细菌大量死亡或者重归游离态, 膜上胞外多糖逐渐减少。这一发现与生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响结果是相似的。因而, 细菌生物被膜中的胞外多糖可能是影响厚壳贻贝稚贝附着的重要因素。然而, 究竟何种多糖或者哪个多糖基因发挥重要调控作用有待进一步研究。

生物被膜在海洋无脊椎动物生长发育过程中具有重要的地位, 本团队以往研究发现, 海洋弧菌形成的被膜同样能调控厚壳贻贝幼虫和稚贝的附着, 且被膜中细菌密度与稚贝附着率具有一定的相关性^[16, 21]。进一步研究发现, 海洋弧菌细菌密度与对厚壳贻贝附着诱导活性呈负相关, 推测其胞外产物随时间的变化最终抑制贻贝的附着^[16]。生物被膜形成是一个动态变化的过程, 关于被膜动态演替对贝类乃至海洋无脊椎动物附着影响的研究却很少。本实验发现, 除 *Vibrio* sp. 22, 其余2株弧菌 *V. cyclitrophicus* 和 *V. chagasii* 细菌密度与厚壳贻贝稚贝附着率呈正相关。根据胞外产物的动态变化结果发现, *V. cyclitrophicus* 和 *V. chagasii* 生物被膜的胞外多糖在弧菌生物被膜促进厚壳贻贝稚贝附着过程中发挥重要作用。

综上, 海洋弧菌生物被膜在动态演替过程中其细菌密度、膜厚度、细菌聚集、以及胞外产物情况均有不同程度的变化, 这种变化最终导致厚壳贻贝附着率的改变。本实验结果对于后续在海区开展生物被膜的动态演替与海洋底栖动物附着相互关系研究具有重要的学术价值, 同时对人工鱼礁礁体生物附着机理的研究具有重要的实践价值, 最终通过生物附着技术改良增大贝类附着率, 增加经济效益, 促进厚壳贻贝养殖农牧化, 利于海洋牧场的建设与发展。

参考文献:

[1] Wang C, Bao WY, Gu ZQ, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to natural biofilms[J]. *Biofouling*, 2012, 28(3): 249-256.

[2] 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).

[3] 杨金龙, 吴晓郁, 石国峰, 等. 海洋牧场技术的研究现状和发展趋势[J]. *中国渔业经济*, 2004(5): 48-50.

Yang J L, Wu X Y, Shi G F, *et al.* Overview of marine ranching technology[J]. *Chinese Fisheries Economics*, 2004(5): 48-50(in Chinese).

[4] 秦传新, 陈丕茂, 贾晓平. 人工鱼礁构建对海洋生态系统服务价值的影响——以深圳杨梅坑人工鱼礁区为例[J]. *应用生态学报*, 2011, 22(8): 2160-2166.

Qin C X, Chen P M, Jia X P. Effects of artificial reef construction to marine ecosystem services value: a case of Yangmeikeng artificial reef region in Shenzhen[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(8): 2160-2166(in Chinese).

[5] 周艳波, 蔡文贵, 陈海刚, 等. 人工鱼礁生态诱集技术的机理及研究进展[J]. *海洋渔业*, 2010, 32(2): 225-230.

Zhou Y B, Cai W G, Chen H G, *et al.* The mechanism and research progress on fish attraction technique for artificial reefs[J]. *Marine Fisheries*, 2010, 32(2): 225-230(in Chinese).

[6] Yildiz F H, Visick K L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(3): 109-118.

[7] Donlan R M, Costerton J W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15(2): 167-193.

[8] O'Toole G, Kaplan H B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 49-79.

[9] Renner L D, Weibel D B. Physicochemical regulation of biofilm formation[J]. *MRS Bulletin*, 2011, 36(5): 347-355.

[10] Thomas W E, Nilsson L M, Forero M, *et al.* Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(5): 1545-1557.

[11] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633.

- [12] Hall-Stoodley L, Costerton J W, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(2): 95-108.
- [13] Wieczorek S K, Todd C D. Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues[J]. *Biofouling*, 1998, 12(1-3): 81-118.
- [14] Hadfield M G. Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2011, 3: 453-470.
- [15] 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).
- [16] 黄道芬, 梁箫, 彭莉华, 等. 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[J]. *水产学报*, 2017, 41(7): 1140-1147.
Huang D F, Liang X, Peng L H, *et al.* Effects of *Vibrio* biofilms of different sources on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(7): 1140-1147(in Chinese).
- [17] 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).
- [18] 高伟, 郭行磐, 徐嘉康, 等. 微生物被膜形成因子及其对厚壳贻贝附着的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2017, 32(4): 405-409.
Gao W, Guo X P, Xu J K, *et al.* Effects of environmental factors on formation of bacterial biofilms and settlement of plantigrades of mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(4): 405-409(in Chinese).
- [19] 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).
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Watnick P I, Lauriano C M, Klose K E, *et al.* The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(2): 223-235.
- [23] Hammer B K, Bassler B L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(1): 101-104.
- [24] Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 165-199.

Effects of dynamic succession of *Vibrio* biofilms on settlement of the mussel *Mytilus coruscus*

LIANG Xiao^{1,2,3}, LIU Hongyu^{1,2}, YANG Liting^{1,2}, CHANG Ruiheng^{1,2},
PENG Lihua^{1,2}, LI Yifeng^{1,2,3}, YANG Jinlong^{1,2,3*}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

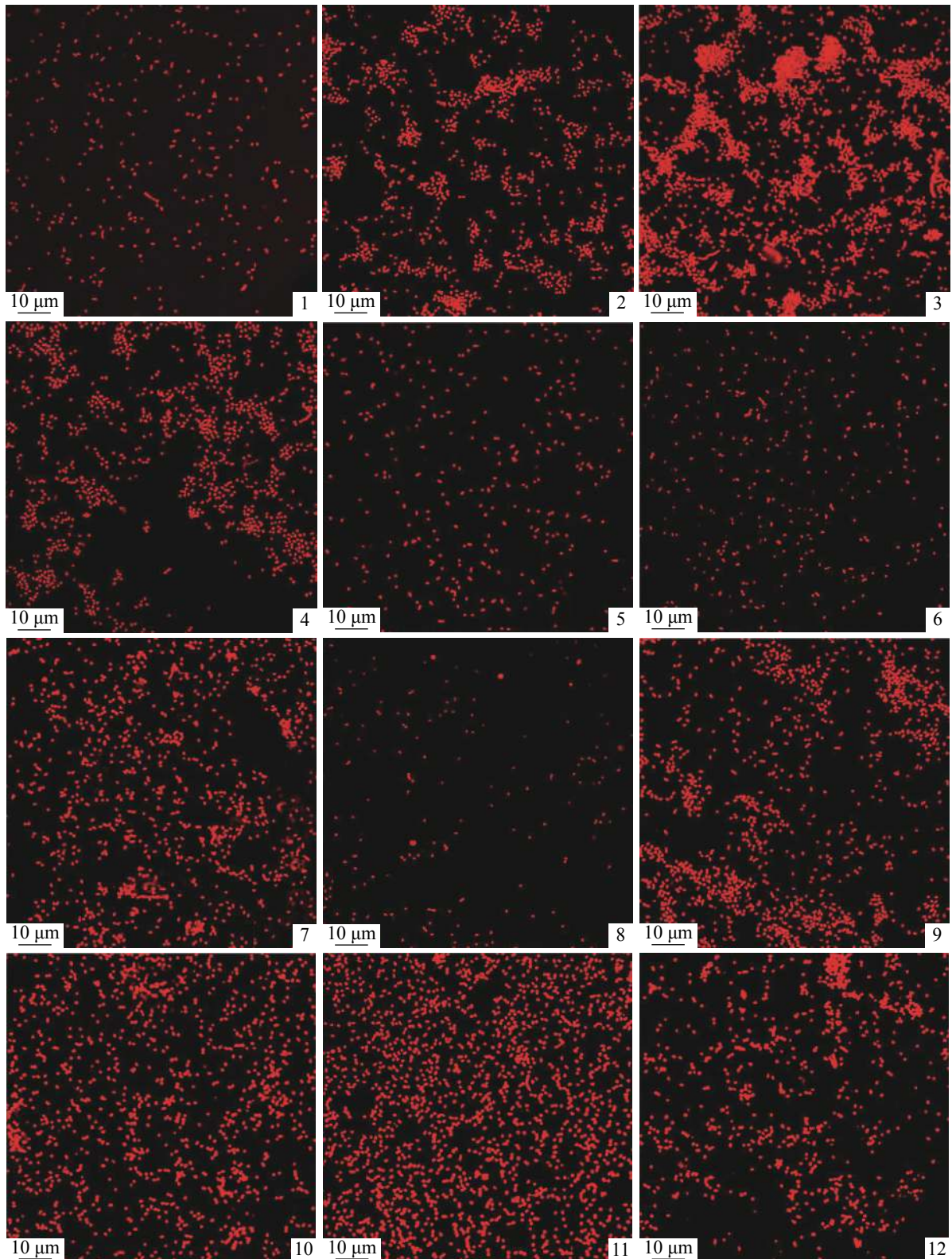
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Vibrio*, which are widely distributed in marine environments, have ability to form biofilms for the purpose of adaptation to harsh environmental conditions. Although biofilms formed by *Vibrio* have been known to promote larval and plantigrade settlement of the mussel *Mytilus coruscus*, how the dynamics succession of these biofilms during the formation impacts mussel settlement remains unknown. In this study, *V. cyclitrophicus*, *V. chagasii* and *Vibrio* sp. 22 with different settlement-inducing activities on plantigrades of the mussel *M. coruscus* were used to observe the changes of biofilm characteristics such as bacterial density, biofilm thickness and extracellular polymeric substances during the dynamic succession, and to explore subsequent effects of biofilm characteristics on mussel plantigrade settlement. The results showed that during the dynamic evolution of three *Vibrio* species, the bacteria on the biofilm were aggregated over time. The bacterial density and thickness of the *Vibrio* biofilms firstly increased with time and finally decreased. Except for *Vibrio* sp. 22, the bacterial density and biofilm thickness of *V. cyclitrophicus* and *V. chagasii* were correlated to the settlement of plantigrades. During the dynamic succession of *Vibrio* biofilms, the extracellular polysaccharides increased first with time and then began to decrease. In contrast, there was no change in the proteins and lipids on biofilms. The change trend of extracellular polysaccharide was similar to the settlement-inducing activity of biofilms, suggesting that extracellular polysaccharides play an important role in succession of biofilms regulating mussel settlement. Thus, the present finding is important to understand the interaction between biofilms and marine invertebrate settlement, and to clarify settlement mechanism of micro- and macro-organisms on artificial reefs.

Key words: *Mytilus coruscus*; plantigrade; settlement; *Vibrio*; biofilm; dynamic succession

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41476131, 41606147); Peak Discipline Program for Fisheries from the Shanghai Municipal Government

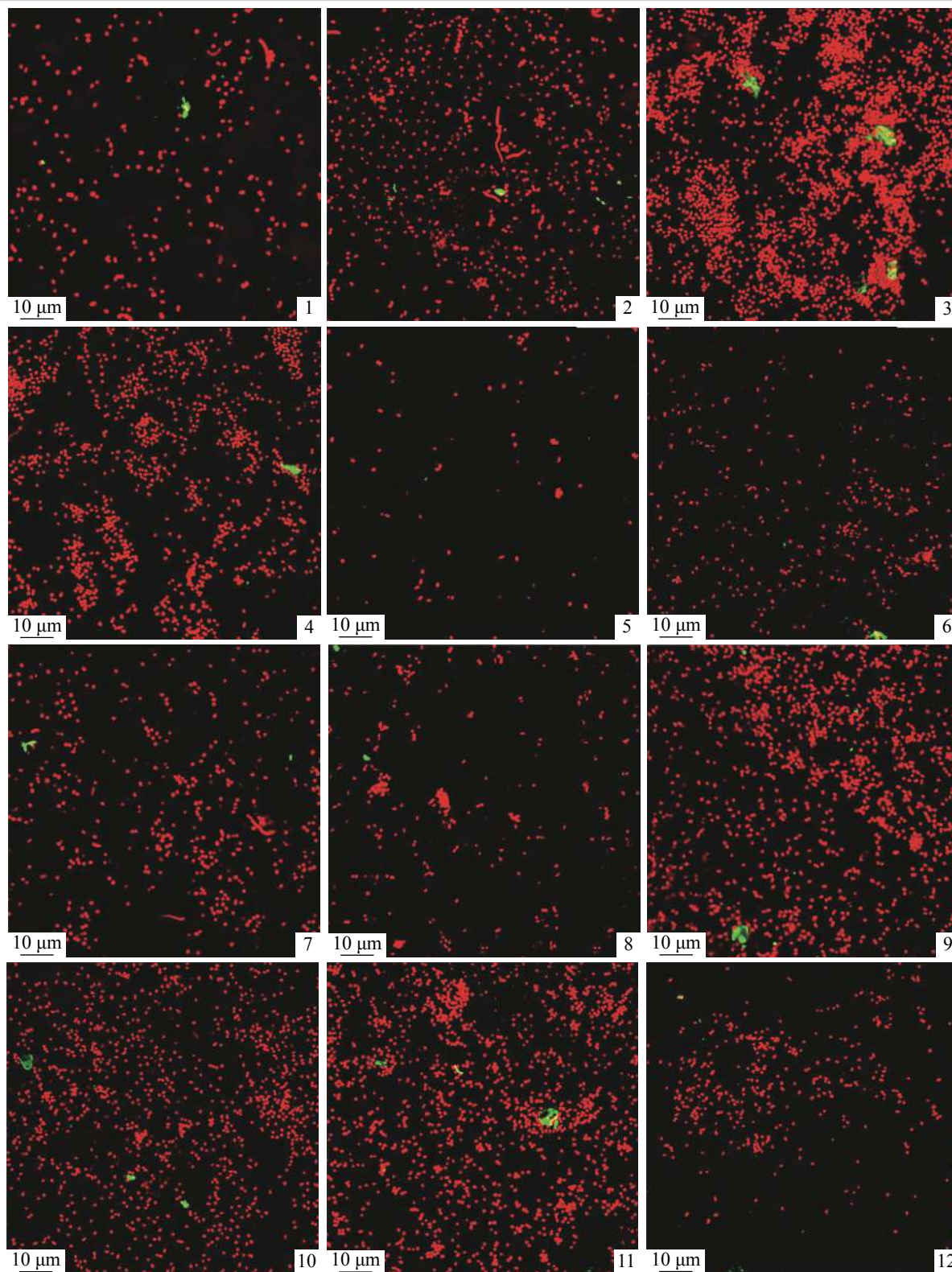


图版 I 不同时间形成的生物被膜形态和分布

图1、2、3、4是分别是嗜环弧菌在3、12、48、192 h形成生物被膜,图5、6、7、8是沙氏弧菌在3、12、48、192 h形成生物被膜,图9、10、11、12是弧菌 *Vibrio* sp. 22在3、12、48、192 h形成生物被膜; 下同

Plate I The morphology and distribution of biofilms formed at different time

Figures 1, 2, 3, 4 indicate *V. cyclitrophicus* biofilms formed at 3, 12, 48 and 192 h, figures 5, 6, 7, 8 indicate *V. chagasii* biofilms formed at 3, 12, 48 and 192 h, figures 9, 10, 11, 12 indicate *Vibrio* sp. 22 biofilms formed at 3, 12, 48 and 192 h; the same below

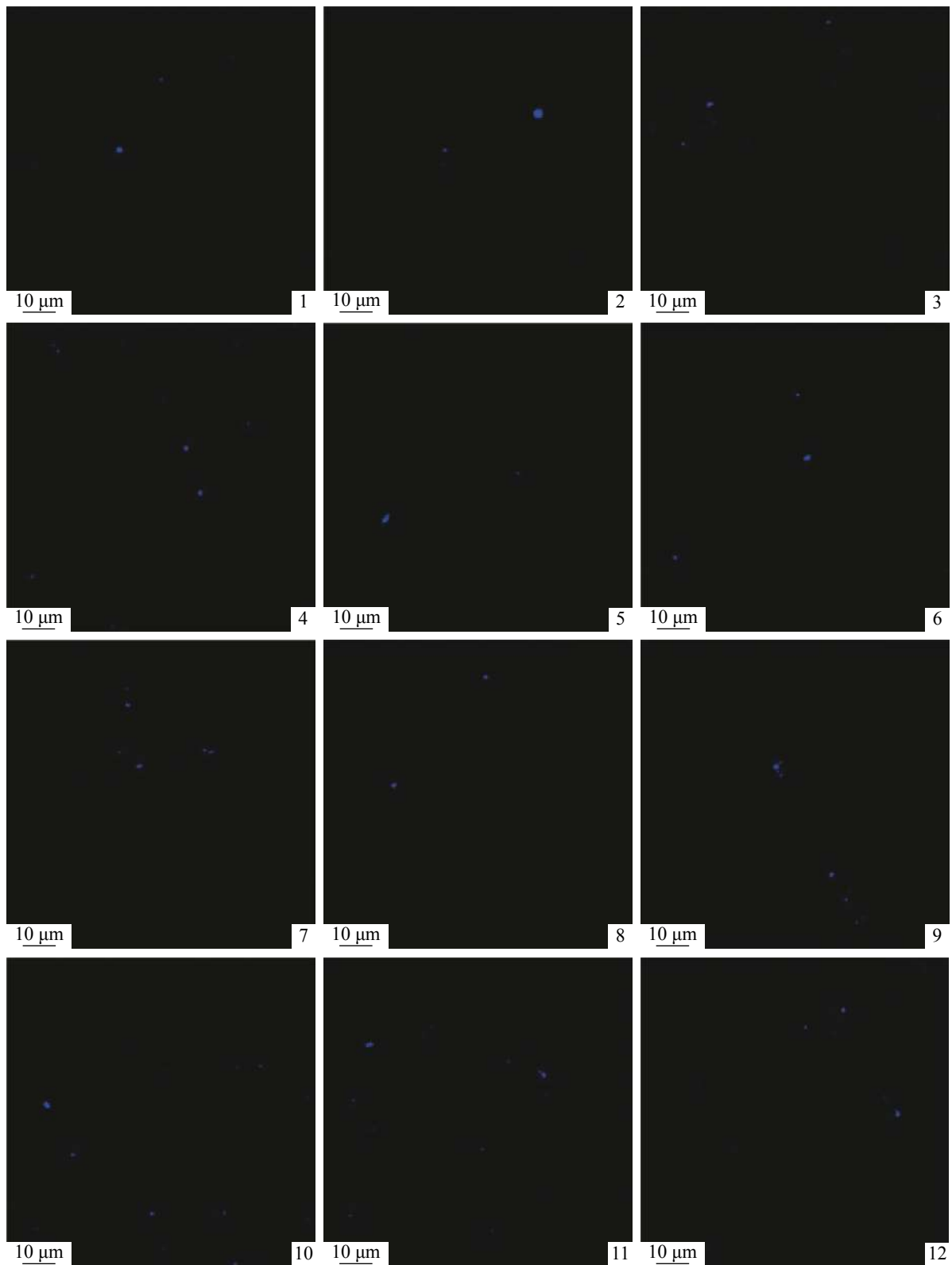


图版 II 不同时间形成的生物被膜胞外多糖分布

红色为细菌; 绿色为胞外多糖

Plate II The exopolysaccharides distribution of biofilms formed at different time

The red color denotes bacteria; the green color denotes exopolysaccharides

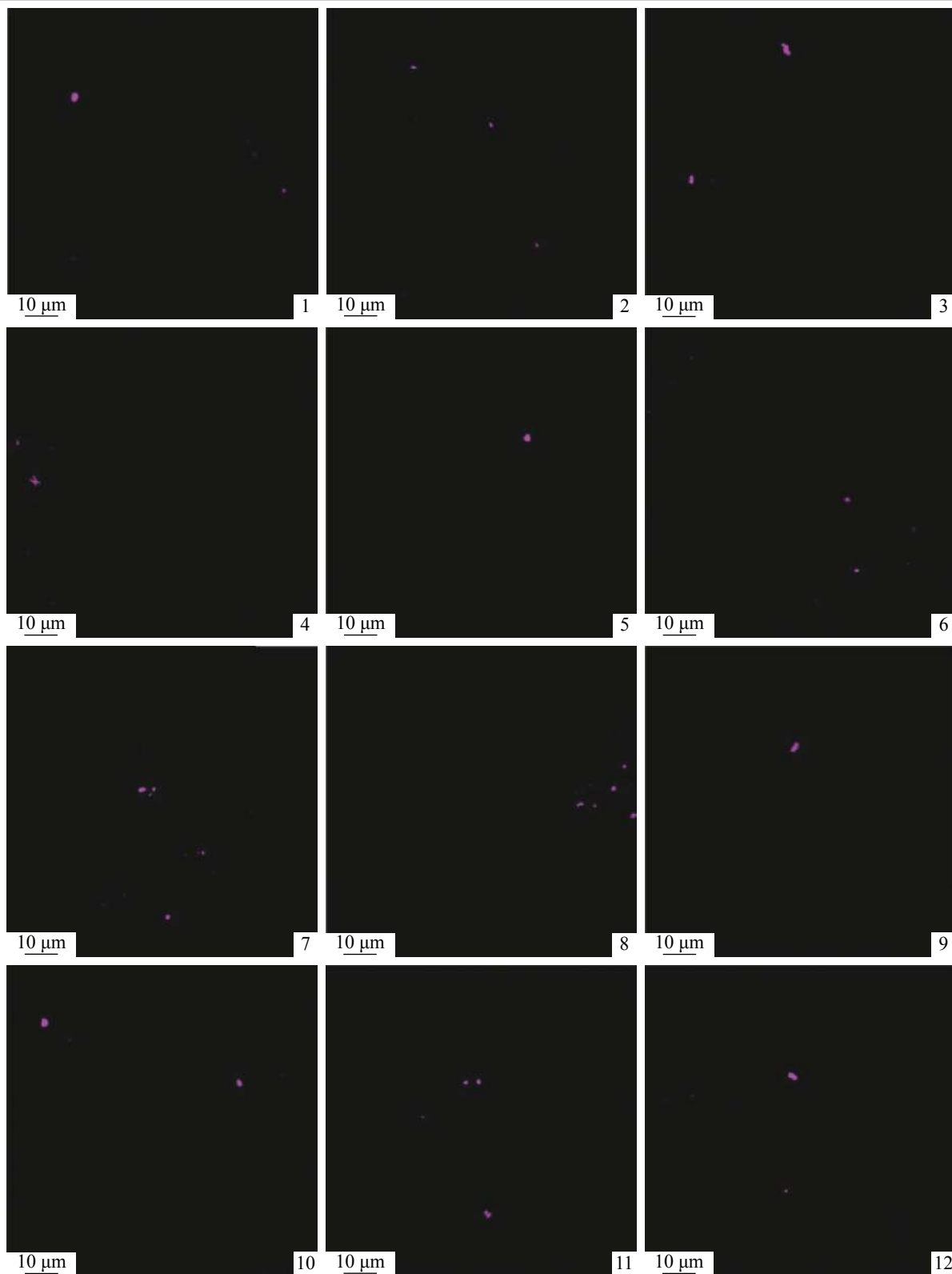


图版 III 不同时间形成的生物被膜胞外蛋白分布

蓝色为胞外蛋白

Plate III The protein distribution of biofilms formed at different time

The blue color indicates protein



图版 IV 不同时间形成的生物被膜胞外脂质分布

红色为胞外脂质

Plate IV The lipid distribution of biofilms dormed at different time

The red color indicates lipid