



不同温度下形成的深海菌膜对厚壳贻贝幼虫变态的影响

梁 箫^{1,2,3}, 杨丽婷^{1,2}, 彭莉华^{1,2}, 魏玉利^{1,4}, 方家松^{1,4}, 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. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广东 广州 511458;

4. 上海海洋大学, 深渊科学技术中心, 上海 201306)

摘要: 为探讨深海细菌生物被膜对温度的适应性及对厚壳贻贝幼虫变态的影响, 分别在 4、18、25、37 °C 条件下培养生物被膜, 调查温度对细菌密度、膜厚和胞外产物等生物学特性的影响, 以及被膜对幼虫变态发育的影响。结果显示, 4 个温度条件下产生的生物被膜均可有效促进幼虫变态发育。其中, 深海菌株 *Virgibacillus* sp. 1 在 18 °C 时生物被膜的变态诱导活性最高 (35%), 且 α 胞外多糖含量较高, 诱导活性与温度和细菌密度均显著相关; 同时温度与其细菌密度和膜厚均显著相关。2 株深海假交替单胞菌诱导活性与细菌密度均显著相关, 温度仅影响 *Pseudoalteromonas* sp. 33 细菌密度。研究表明, 3 株深海细菌均有很好的温度适应性, 且都能形成生物被膜; 温度变化导致生物被膜的生物学特性改变, 最终影响其对幼虫的诱导效果。

关键词: 厚壳贻贝; 深海细菌; 幼虫变态; 生物被膜; 温度

中图分类号: Q 958; S 917.1

文献标志码: A

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 隶属于软体动物门 (Mollusca)、瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、贻贝目 (Mytilodia)、贻贝科 (Mytilidae), 是我国沿海地区常见的经济贝类^[1]。近年来, 大量人工采捕导致厚壳贻贝自然资源枯竭, 人工养殖贻贝幼苗技术不稳定, 制约了人工养殖产业的大规模发展^[2]。附着变态是厚壳贻贝幼苗生长发育过程中的一个重要阶段, 附着变态的高低直接影响着厚壳贻贝的养殖产量和质量。本团队以往研究证明, 生物被膜在诱导厚壳贻贝的附着过程中发挥着显著促进作用^[3-7]。然而, 影响生物被膜形成的因素有很多。Flemming 等^[8]认为生物被膜具有“应急特性”: 当外界环境变得恶劣时, 菌体通过形成生物被膜来提升自身对外界恶劣环境的耐受能力。因此, 环境因子的变化直接影响生物

被膜的形成并改变其生物学特性。例如, 海洋细菌生物被膜的蛋白含量和细菌分布受营养盐的影响^[9], 希瓦氏 (*Shewanella*) 菌株生物被膜的生物学特性受盐度和温度的影响^[10]。

深海微生物作为生态系统的最重要的驱动者之一, 其生存环境为高静水压力 (高达 1 100 atm)、低温、无光、普遍营养匮乏^[11-12]。研究发现深海假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. SM9913) 产生的蛋白酶在 0 °C 仍具有 3% 的活性^[13]。深海微生物的开发与利用存在巨大的潜力, 是目前医学和生物学研究的一个热点。然而, 其生物被膜及对温度的适应性和在水产养殖贝类方面的应用有待研究。温度是深海细菌生存所面临的问题, 深海环境和厚壳贻贝生存环境截然不同, 对于水产养殖贝类的应用, 重点为生物被膜对

收稿日期: 2019-12-10 修回日期: 2020-03-25

资助项目: 国家自然科学基金 (41876159, 41476131); 南方海洋科学与工程广东省实验室人才团队引进重大专项 (GML2019ZD0402); 国家重点研发计划 (2018YFC0310600)

通信作者: 杨金龙, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

温度的适应，进而为在厚壳贻贝幼虫在发育过程中对附着基质的选择。

本实验主要研究深海细菌生物被膜对温度的适应性及在此条件下对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响，同时探究了温度对生物被膜细菌密度、膜厚和胞外产物的影响，探索温度、生物被膜和厚壳贻贝幼虫三者的相互关系，为深海细菌到近海的应用及其生物被膜形成能力和生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着机理研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所使用的厚壳贻贝幼虫 [壳长 (282.3±3.1) μm，壳高 (253.3±2.8) μm)] 选自于浙江枸杞岛海域 (122°77'E，30°73'N)。培养条件：海水盐度为30，水温为21℃，pH为7.8，无光照，每2天更换100%海水，持续充气，每天投喂2次，投喂湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*)，饵料密度为5×10⁴个/mL。

实验中使用的细菌共有两个来源 (表1)，为枝芽孢杆菌属 (*Virgibacillus* sp. 1)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp. 32 和 *Pseudoalteromonas* sp. 33)，分别来自太平洋下北半岛的沉积物和新不列颠海沟沉积物及海水。

1.2 深海细菌的分离和鉴定

细菌的分离纯化 海洋细菌分离方法参照 Yang 等^[14]。制备细菌悬浮液，依次浓度梯度稀释，涂布于 ZoBell 2216E 琼脂平板上，放置 37℃ 培养箱，避光培养 48 h 后挑取单菌落，在平板上划线分离，3 组重复，挑单菌落到液体培养基扩大培养，与 30% 的甘油溶液 1：1 混合均匀，-80℃ 保存。

深海细菌 16S rDNA 基因测序 DNA 提取采用试剂盒 (上海博彩生物科技有限公司)。细菌 16S rDNA 序列扩增引物为 27 F 和 1492 R，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 扩增产物送至上海生工生物工程有限公司测序，测序得到的序列结果通过 Blast 程序与 NCBI 数据库进行比对，确定细菌种属^[2] (表1)。

1.3 生物被膜的制备与生物学特性分析

生物被膜制备 生物被膜制备参考杨金龙等^[3]的方法。挑取分离鉴定成功的单菌落到 80 mL ZoBell 2216E 液体培养基，37℃，48 h 黑暗条件下进行扩大培养，3 500 r/min 离心 15 min，弃上清液，用灭菌过滤海水 (autoclaved filtered seawater, AFSW) 清洗 3 次，最后定容于 50 mL。用 0.1% 吖啶橙染色，在荧光显微镜 (Olympus BX51) 下计数，确定细菌浓度。将适量的细菌原液加入到装有灭菌玻片的无菌培养皿中，并通过加入 AFSW 定容至 20 mL。每株细菌 4 个初始密度分别为 1.0×10⁸、3.0×10⁸、5.0×10⁸ 和 1.0×10⁹ 个/mL，黑暗条件下分别置于 4、18、25 和 37℃ 培养 48 h 形成生物被膜。被膜培养温度设置参考 Yang 等^[14] 和 Zeng 等^[15] 的方法。每个密度设置 12 个平行。

生物被膜细菌密度计数 细菌密度计数参照杨娜等^[16]的方法。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，0.1% 吖啶橙染色 5 min，染色的菌膜直接在荧光显微镜下随机选取 10 个视野进行计数，确定各个温度条件下生物被膜的细菌密度。

生物被膜膜厚分析 膜厚拍摄处理参照 Yang 等^[14]的方法。用 5% 的福尔马林溶液固定 24 h，用 5 μg/mL 碘化丙啶溶液避光染色 20 min，再用 1×PBS 洗涤 3 次。然后在激光共聚焦扫描显微镜 (confocal laser scanning microscopy, CLSM) (Leica TCS SP8) 下拍摄，激发/发射波长为 543/613 nm。每个菌膜随机选 3 个视野用于成像和分析，设置 3 个重复，产生的 9 个不同厚度值以确

表 1 深海细菌 16S rDNA 基因序列分析
Tab. 1 16S rDNA gene sequence analysis of the three isolated bacterial strains

菌株 isolate	上传序列号 accession no.	比对菌名 BLAST closest match	比对序列号 accession no. of closest match	相似度/% similarity	来源 isolated source
6R	MK389412	<i>Virgibacillus</i> sp. 1	CP017762	99	沉积物
M7NS11	MK368455	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 32	NR116629	99	沉积物
M7E11	MK368458	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 33	KT036405	99	海水

定每个生物被膜膜厚。

生物被膜胞外产物分析 染色参考 González-Machado 等^[17]的方法。将培养好的生物被膜,先使用 0.9%生理盐水清洗 3 次,用对应染料染色,避光染色 20 min,染色完成之后用 0.9%生理盐水清洗,避光自然干燥,然后在 CLSM 下拍摄,设置 3 个平行,随机选取 3 个视野用于成像和分析。 α 多糖染料为 conA-TMR(concanavalin A, tetramethylrhodamine conjugate), β 多糖染料为 CFW(calcofluor white M2R), 蛋白染料为 FITC (fluorescein isothiocyanate isomer I), 脂质染料为 DiD[®] oil[DiIC₁₈(5) oil, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate]。

1.4 幼虫变态实验

将不同培养温度形成的深海细菌生物被膜放入灭菌干净的培养皿中,加入 20 mL AFSW。用毛细移液管吸取 20 只眼点幼虫加入放有生物被膜的培养皿中,并记录 24、48、72 和 96 h 时的幼虫变态率。实验分为实验组(生物被膜)、空白对照组(blank, 灭菌玻片)和肾上腺素对照组(epinephrine, EPI),每个组 9 个平行。幼虫变态实验均在 21 °C 条件下完成。

1.5 数据分析

实验数据分析采用 JMP 软件(ver.10.0.0)。首先变态率百分比进行反正弦转化,进行正态分布检测,若符合正态分布,进行单因素差异性分析,反之则进行 Kruskal-Wallis Test 分析。幼虫变态率和细菌密度的相关性使用 Spearman 多元分析方法进行分析, P 为检验值, r 为相关性系数,显著性水平设为 0.05。使用 image 软件分析胞外产物含量。

表 2 温度与细菌密度双因素对厚壳贻贝幼虫变态的影响

Tab. 2 Two-factor correlation analysis between temperature, bacterial density and larval metamorphosis of <i>M. coruscus</i>												
方差来源 source	<i>Virgibacillus</i> sp. 1				<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 32				<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 33			
	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	自由度 df	平方和 sum of squares	F 比率 F -ratio	P 值 P -value
温度 temperature	1	192.47	14.12	<0.000 1*	1	1.86	0.11	0.75	1	14.04	1.04	0.31
细菌密度 bacterial density	1	1 633.12	119.79	0.000 3*	1	1238.36	70.28	<0.000 1*	1	1439.56	106.13	<0.000 1*
温度×细菌密度 temperature × bacterial density	1	2.92	0.21	0.64	1	0.10	0.01	0.94	1	23.85	1.758 1	0.19

注: * 表示有显著影响($P<0.05$)

Notes: * means significant effect ($P<0.05$)

2 结果

2.1 不同温度条件下形成深海细菌生物被膜对幼虫变态的影响

由于深海细菌生物被膜在 48、72 和 96 h 后幼虫变态率结果基本相似,文中仅显示 48 h 的结果(图 1)。肾上腺素诱导幼虫的变态率为 $43\% \pm 2\%$ 。与 blank 相比,3 株深海细菌生物被膜均能显著诱导厚壳贻贝幼虫完成变态发育($P<0.05$)。*Virgibacillus* sp. 1 在 18 °C 时形成的生物被膜对幼虫变态诱导活性最高($35\% \pm 1\%$), 37 °C 时诱导活性最低,4 和 25 °C 时诱导活性无显著性差异($P>0.05$),温度与变态诱导活性显著相关($P<0.000 1$, 表 2)。*Pseudoalteromonas* sp. 32 和 *Pseudoaltero-*

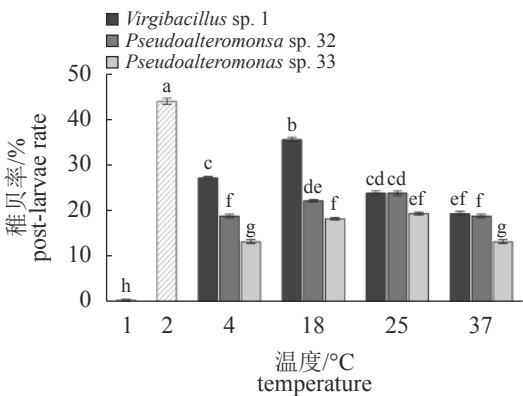


图 1 深海细菌在不同温度条件下形成的生物被膜对厚壳贻贝幼虫变态的影响 (48 h)

“1”为空白对照组,“2”为肾上腺素对照组。不同字母表示组间差异显著($P<0.05$),下同

Fig. 1 Percentages of post-larvae on the deep-sea bacterial biofilms at different temperature (48 h)

“1” indicates blank control, “2” indicates positive control. Means with different letters have significant differences between groups ($P<0.05$), the same below

monas sp. 33 在 25 °C 形成的生物被膜变态诱导活性最高，与 18 °C 无显著差异 ($P>0.05$)。18 °C 时形成的 *Virgibacillus* sp. 1 生物被膜变态诱导活性明显高于其他 2 株菌 ($P<0.05$)。3 株细菌生物被膜诱导活性随培养温度的升高均出现先升高后降低的趋势。

2.2 不同温度条件下深海细菌生物被膜细菌密度的变化

相同初始浓度为 5.0×10^8 个/mL 条件下，*Virgibacillus* sp. 1、*Pseudoalteromonas* sp. 32 和 *Pseudoalteromonas* sp. 33 均在 18 °C 时形成的被膜细菌密度最高 (图 2)，分别为 4.5×10^7 、 2.4×10^7 和 5.2×10^7 个/cm²；且不同温度条件下生物被膜细菌密度均存在显著性差异 ($P<0.05$)。*Pseudoalteromonas* sp. 33 在 4 °C 时生物被膜细菌密度最低，*Virgibacillus* sp. 1 和 *Pseudoalteromonas* sp. 32 在 37 °C 下细菌密度最低，3 株细菌生物被膜的细菌密度均随着温度的升高呈现先增加后降低的趋势。除 *Pseudoalteromonas* sp. 32 外，温度与 *Virgibacillus* sp. 1 和 *Pseudoalteromonas* sp. 33 生物被膜细菌密度显著相关 (表 3)。

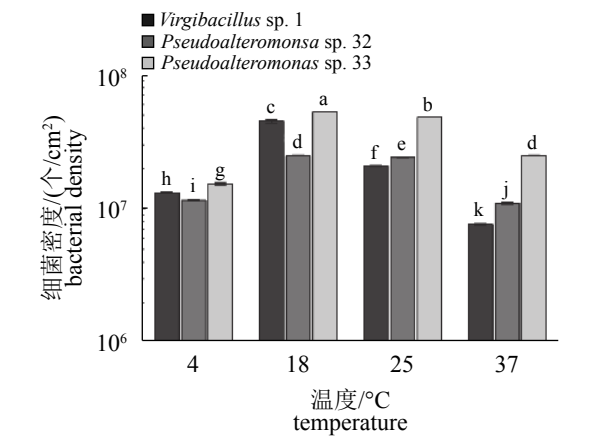


图 2 不同温度下深海细菌生物被膜的密度
Fig. 2 Density of monospecific deep-sea bacterial biofilms at different temperatures ($n = 30$)

2.3 深海细菌生物被膜细菌密度和幼虫变态的关系

Virgibacillus sp. 1 在 18 °C、初始细菌密度为 5.0×10^8 个/mL 时，幼虫变态诱导活性达到最高，为 $35\%\pm1\%$ ，被膜细胞密度为 4.5×10^7 个/cm²；被膜培养温度由 4 °C 升到 25 °C 时，其诱导活性随细菌密度的升高而逐渐升高 (图 3)。*Pseudoal-*

表 3 温度与深海细菌生物被膜细菌密度和膜厚相关性分析

Tab. 3 Correlation analysis between temperature and bacterial density and biofilm thickness

菌株 bacteria	细菌密度 bacterial density		膜厚 biofilm thickness	
	r	P	r	P
<i>Virgibacillus</i> sp. 1	-0.24	0.003 4*	-0.33	0.049 9*
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 32	-0.08	0.31	0.24	0.16
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 33	0.30	0.000 2*	-0.27	0.11

注: * 表示显著相关 ($P<0.05$)
Notes: * means significant correlation ($P<0.05$)

teromonas sp. 32 在 25 °C 时诱导活性达到最高 ($23\%\pm1\%$)，被膜细菌密度为 2.4×10^7 个/cm²；生物被膜诱导活性均随细菌密度的增加出现先升高后降低的趋势。*Pseudoalteromonas* sp. 33 在 18 °C 时随细菌密度增加出现先增加后平稳的趋势，最高变态率为 $18\%\pm1\%$ ；在 4 和 37 °C 时诱导活性随细菌密度增加呈现先增加后下降的趋势；在 25 °C 时，诱导活性随细菌密度增加而增加，最高变态率为 $20\%\pm1\%$ 。双因素分析结果表明，3 株深海细菌密度均与变态诱导活性显著相关 ($P<0.05$ ，表 2)；温度仅影响 *Virgibacillus* sp. 1 被膜的变态诱导活性，与其他 2 株细菌诱导活性无显著相关性 ($P>0.05$)。

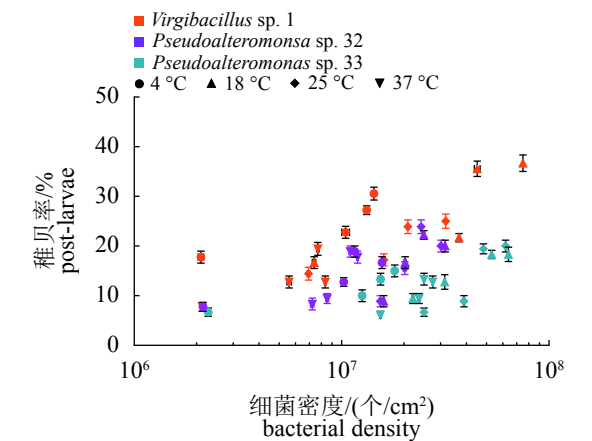


图 3 深海细菌生物被膜密度与厚壳贻贝幼虫变态的关系
Fig. 3 Percentages of post-larvae on deep-sea bacterial biofilms with varying densities

2.4 深海细菌生物被膜形态和膜厚

随着生物被膜培养温度的升高，膜厚无显著差异 (图 4)。18 °C 时，3 株深海细菌生物被膜膜厚与其他 3 个温度间无显著差异 ($P>0.05$)。在

18 °C 条件下, *Pseudoalteromonas* sp. 32 与 *Pseudoalteromonas* sp. 33 生物被膜膜厚存在显著性差异 ($P<0.05$)。共聚焦图片结果显示 (图版 I), *Virgibacillus* sp. 1 菌株 (图版 I -1~4) 为杆状, *Pseudoalteromonas* sp. 32 菌株 (图版 I -5~8) 和 *Pseudoalteromonas* sp. 33 菌株 (图版 I -9~12) 为短棒状。相关性分析显示, *Virgibacillus* sp. 1 生物被膜膜厚与温度显著相关, *Pseudoalteromonas* sp. 32 和 *Pseudoalteromonas* sp. 33 膜厚与温度无显著相关性 (表 3)。

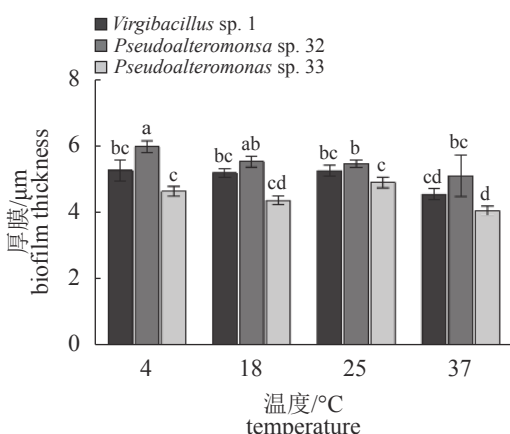


图 4 激光共聚焦扫描电镜下不同温度条件形成的深海细菌生物被膜膜厚

Fig. 4 CLSM reveals thickness of deep-sea bacterial biofilms at different temperatures

2.5 深海细菌生物被膜胞外产物的变化

图版 II 中, 黄色为深海细菌生物被膜 α 多糖; 18 °C 条件下, *Virgibacillus* sp. 1 形成生物被膜 (图版 II -1~4) 中的 α 多糖含量最高。图版 III 中蓝色为 β 多糖, 18 和 25 °C 条件下, *Virgibacillus* sp. 1 形成生物被膜 (图版 III -1~4) 中的 β 多糖含量较高。

3 株深海细菌生物被膜胞外蛋白和脂质如图版 IV 和 V 所示。绿色亮点为胞外蛋白分布情况, 结果表明 *Pseudoalteromonas* sp. 32 菌株 (图版 IV -5~8) 在 25 和 37 °C 时生物被膜中的胞外蛋白含量较高。红色亮点为胞外脂质分布情况, 3 株深海细菌被膜中的脂质分布较少 (图版 V -1~12)。

3 株深海细菌生物被膜 α 多糖、 β 多糖、蛋白和脂质含量如图 5。18 °C 时 *Virgibacillus* sp. 1 生物被膜的 α 多糖含量最高, 含量达 $1\ 209\ \mu\text{m}^3$, 与其他 3 个温度之间差异显著 ($P<0.05$) (图 5-a)。 *Pseudoalteromonas* sp. 32 和 *Pseudoalteromonas* sp.

33 生物被膜 α 多糖生物量在 18 和 25 °C 间无显著性差异 ($P>0.05$)。3 株深海细菌 α 多糖含量均随温度升高呈现先升高后降低的趋势。

18 °C 时 *Virgibacillus* sp. 1 生物被膜的 β 多糖含量最高, 与 4 和 25 °C 组间无显著差异 ($P>0.05$)。 *Pseudoalteromonas* sp. 32 生物被膜 β 多糖含量在 25 °C 最高, 与其他温度差异显著 ($P<0.05$) (图 5-b)。 *Pseudoalteromonas* sp. 33 生物被膜 β 多糖含量不受温度影响。

Virgibacillus sp. 1 生物被膜胞外蛋白含量在 37 °C 时最低。 *Pseudoalteromonas* sp. 32 在 37 °C 时最高, 但与 25 °C 时无显著差异 ($P>0.05$) (图 5-c)。 *Pseudoalteromonas* sp. 33 胞外蛋白含量随温度升高无差异 ($P>0.05$)。18 °C 时, 3 株深海细菌生物被膜胞外蛋白含量均没有显著性差异 ($P>0.05$)。

Virgibacillus sp. 1 胞外脂质含量不受温度的影响。 *Pseudoalteromonas* sp. 32 胞外脂质含量在 18 °C 最高, 与 25 °C 无显著差异 ($P>0.05$) (图 5-d)。 *Pseudoalteromonas* sp. 33 胞外脂质含量在 18 °C 最高, 仅与 37 °C 差异显著 ($P<0.05$)。3 株深海细菌胞外脂质含量均在 18 °C 最高, 相互之间没有显著性差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

以往研究发现, 温度可改变单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的生物被膜形成能力, 37 °C 条件下单增李斯特菌被膜形成能力明显强于 30 °C^[18]。高伟等^[10]研究发现, 近海来源的光伏希瓦氏菌 (*S. loihica* ECSMB14101) 生物被膜的生物学特性受温度的影响明显, 温度上升导致被膜细菌密度和膜厚发生显著增加。本实验发现温度对深海细菌生物被膜细菌密度的影响较大, 但与近海细菌 *S. loihica* 变化趋势不同, 3 株深海细菌随温度的升高生物被膜细菌密度呈现先增加后降低的趋势。此外, 温度改变对 3 株深海细菌生物被膜膜厚影响较小。Zeng 等^[15]研究发现了深海细菌 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 在 4 °C 时, 生物被膜形成能力最强, 随着温度升高, 被膜形成能力逐渐降低, 在 37 °C 最低。本研究调查的 3 株深海细菌对温度的响应与 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 存在明显差异, 表明不同深海菌株对温度的适应能力差异较大, 但具体原因需要进一步研究。

生物被膜在促进贻贝和管虫等幼虫附着变

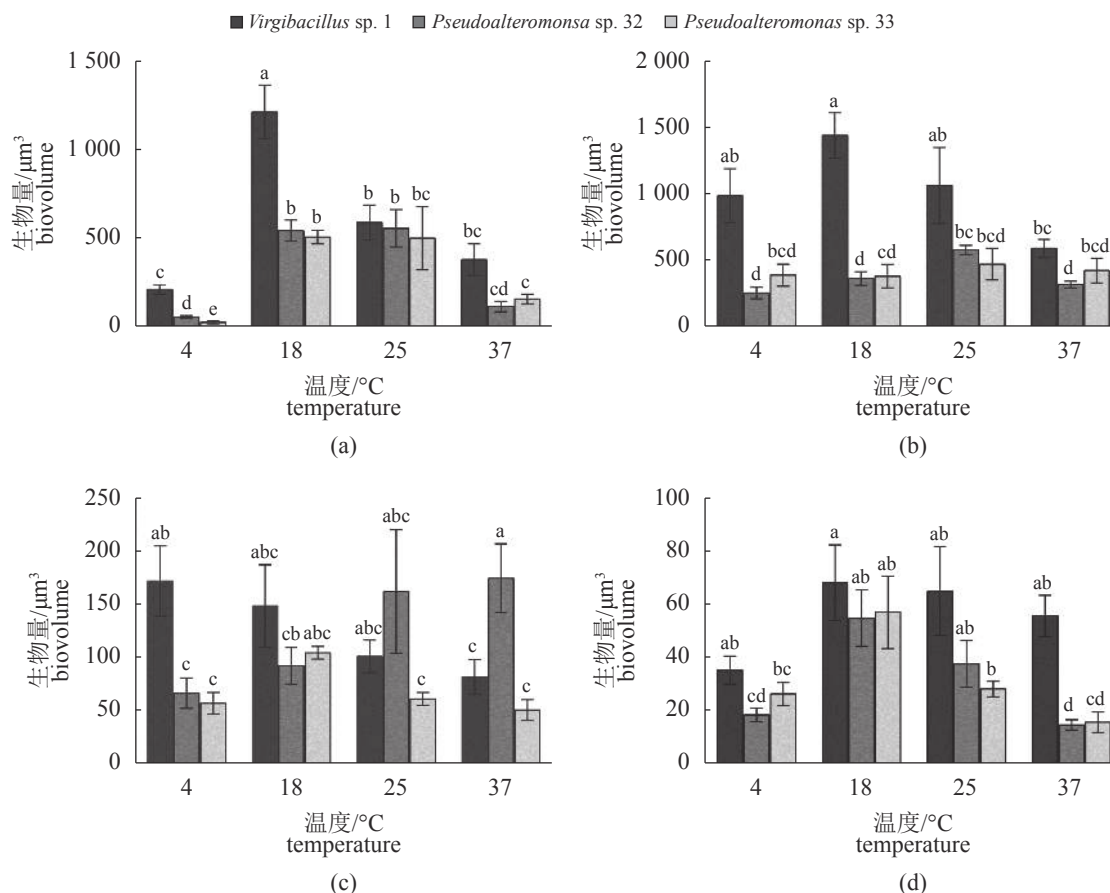


图 5 激光共聚焦扫描电镜下不同温度条件形成的深海细菌生物被膜胞外 α 多糖 (a)、 β 多糖 (b)、蛋白 (c) 和脂质 (d) 含量

Fig. 5 CLSM reveals α -polysaccharides (a), β -polysaccharides (b), proteins (c) and lipids (d) biovolume of biofilms at different temperatures

态过程中发挥着重要作用^[19-20]。例如, 华美盘管虫 (*Hydroides elegans*) 幼虫附着变态过程的研究发现, 细菌密度与幼虫的附着率相关^[19]。生物被膜中细菌密度的高低与海产贝类的附着也存在关系^[21]。本实验中, 3 株深海细菌生物被膜均对厚壳贻贝幼虫变态有促进作用, 其中在 18 °C 条件下, *Virgibacillus* sp. 1 诱导活性最高, 达 35%, 呈现中诱导活性。3 株深海细菌生物被膜诱导活性与细菌密度均显著相关, 与以往的近海细菌研究结论相似^[2, 5-6, 14]。

生物被膜主要是由细菌及其胞外产物组成, 胞外产物是形成成熟生物被膜的关键条件, 其主要由多糖、蛋白质和脂质三大类组成; 其中多糖是胞外产物中最主要的成分, 在维持生物被膜结构、促进细胞与细胞间相互作用, 以及保持细胞生存所需的营养物质等方面发挥作用^[22-25]。本实验发现胞外多糖也是深海细菌生物被膜中的主要成分。3 株深海细菌被膜表面的 α 多糖含

量均随温度升高呈现先升高后降低的趋势, *Virgibacillus* sp. 1 被膜的胞外 α 多糖含量在 18 °C 最高。温度变化对 3 株深海细菌生物被膜 β 多糖生物量影响较小, 而不同菌株之间存在显著性差异, *Virgibacillus* sp. 1 生物量明显高于其他 2 株细菌。温度变化对 3 株深海菌株生物被膜胞外蛋白的影响不同; *Virgibacillus* sp. 1 胞外蛋白生物量随着温度的升高逐渐降低; *Pseudoalteromonas* sp. 32 菌株与其相反。Zeng 等^[15] 研究发现了温度变化对深海细菌 *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 胞外产物产生影响, 37 °C 高温下, 生物被膜的胞外产物脓黑素产量明显高于 15 °C。这些研究表明, 深海细菌对温度变化适应性存在差异, 影响了胞外基质的组分。Kives 等^[26] 发现, 铜绿假单胞菌 (*P. fluorescens*) 生物被膜上的胞外多糖含量是正常液体培养状态多糖含量的 4 倍, Danese 等^[27] 研究了野生型菌株与多糖基因缺失菌株的被膜形成情况, 发现缺失多糖基因的菌株无法

形成成熟的生物被膜。本研究中胞外产物参与调控厚壳贻贝幼虫变态。其中, *Virgibacillus* sp. 1 生物被膜胞外 α 多糖、 β 多糖与诱导活性呈正相关, 表明胞外多糖能有效促进厚壳贻贝幼虫的变态发育过程; *Pseudoalteromonas* sp. 32 被膜胞外 α 多糖和脂生物量与诱导活性呈正相关, 表明 α 多糖和脂类促进幼虫变态发育; *Pseudoalteromonas* sp. 33 生物被膜胞外 α 多糖和蛋白生物量与诱导活性呈正相关, 表明 α 多糖和蛋白促进幼虫变态发育。Zeng 等^[28] 研究发现深海菌株 *P. lipolytica* 生物被膜胞外产物纤维素对厚壳贻贝幼虫的附着变态产生抑制效果。这些结果表明, 不同深海菌株形成生物被膜的胞外产物对幼虫发挥不同的作用。

以往发现近海细菌对幼虫诱导活性不限于一个特定属^[2]。Yang 等^[14] 研究发现近海希瓦氏菌生物被膜对厚壳贻贝幼虫具有高效诱导活性, 不同近海假交替单胞菌形成的生物被膜对厚壳贻贝幼虫诱导活性存在差异。本团队以往研究发现近海芽孢杆菌 *Bacillus* sp. 5 和 *Bacillus* sp. 6 生物被膜对厚壳贻贝稚贝均具有一定程度的诱导活性^[16]。同样, 本研究发现不同种属深海菌株对厚壳贻贝幼虫诱导活性存在差异。其中, 深海菌株 *Virgibacillus* sp. 1 诱导活性最高, 深海菌株 *Pseudoalteromonas* sp. 32 相对稳定, 温度与细菌密度和诱导活性间均没有相关性。

综上, 3 株深海细菌均有很好的温度适应性, 且都能形成生物被膜, 能够有效促进厚壳贻贝幼虫完成变态发育。相比 2 株深海假交替单胞菌, 深海 *Virgibacillus* sp. 1 菌株表现出较强的温度敏感性, 温度能影响其生物被膜细菌密度、诱导活性、膜厚和胞外产物等生物学特性。本实验可为深海细菌今后应用于该种苗附着生产技术的改良、生物被膜形成能力与厚壳贻贝幼虫变态互作关系的研究奠定基础。

参考文献 (References):

- [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] 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, 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).
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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).
- [7] 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).
- [8] 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.
- [9] 孙俊杰, 梁箫, 郭行磐, 等. 培养基对微生物被膜形成和厚壳贻贝附着的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(8): 1229-1238.
Sun J J, Liang X, Guo X P, et al. Effects of culture media on the biofilm formation and subsequent settlement of *Mytilus coruscus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(8): 1229-1238 (in Chinese).
- [10] 高伟, 郭行磐, 徐嘉康, 等. 微生物被膜形成因子及其中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 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).
- [11] Verma P, Raghavan R V, Jeon C O, *et al.* Complex bacterial communities in the deep-sea sediments of the Bay of Bengal and volcanic Barren Island in the Andaman Sea[J]. *Marine Genomics*, 2017, 31: 33-41.
- [12] Jørgensen B B, Boetius A. Feast and famine-microbial life in the deep-sea bed[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(10): 770-781.
- [13] 陈秀兰, 张玉忠, 王运涛, 等. 深海适冷菌SM9913产生的低温蛋白酶[J]. *海洋科学*, 2001, 25(1): 4-8.
- Chen X L, Zhang Y Z, Wang Y T, *et al.* Psychrotrophic alkaline protease from a deep sea psychrotrophic strain *Pseudomonas* sp. SM9913[J]. *Marine Sciences*, 2001, 25(1): 4-8(in Chinese).
- [14] 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.
- [15] Zeng Z S, Cai X S, Wang P X, *et al.* Biofilm formation and heat stress induce pyomelanin production in deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1822.
- [16] 杨娜, 梁箫, 彭莉华, 等. 肠道细菌对厚壳贻贝稚贝附着的作用研究[J]. *海洋科学*, 2017, 41(11): 45-54.
- Yang N, Liang X, Peng L H, *et al.* Effects of gut bacteria on the settlement of spats of *Mytilus coruscus*[J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(11): 45-54(in Chinese).
- [17] González-Machado C, Capita R, Riesco-Peláez F, *et al.* Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella* Agona biofilms at different stages of development[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200011.
- [18] Ochiai Y, Yamada F, Mochizuki M, *et al.* Biofilm formation under different temperature conditions by a single genotype of persistent *Listeria monocytogenes* strains[J]. *Journal of Food Protection*, 2014, 77(1): 133-140.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 徐嘉康, 彭莉华, 高伟, 等. 光照、水温和密度对厚壳贻贝稚贝群聚性的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(3): 275-279.
- Xu J K, Peng L H, Gao W, *et al.* Effects of light intensity, water temperature and density on aggregation of juvenile mussel *Mytilus coruscus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(3): 275-279(in Chinese).
- [22] 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.
- [23] Landini P, Antoniani D, Burgess J G, *et al.* Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(3): 813-823.
- [24] Beule A G, Hosemann W. Bacterial biofilms[J]. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 2007, 86(12): 886-898.
- [25] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [26] Kives J, Orgaz B, SanJosé C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, 52(2): 123-127.
- [27] Danese P N, Pratt L A, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(12): 3593-3596.
- [28] Zeng Z S, Guo X P, Li B Y, *et al.* Characterization of self-generated variants in *Pseudoalteromonas lipolytica* biofilm with increased antifouling activities[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(23): 10127-10139.

Effects of biofilms of deep-sea bacteria at varying temperatures on larval metamorphosis of *Mytilus coruscus*

LIANG Xiao^{1,2,3}, YANG Liting^{1,2}, PENG Lihua^{1,2}, WEI Yuli^{1,4},
FANG Jiasong^{1,4}, 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. Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and
Engineering Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, China;

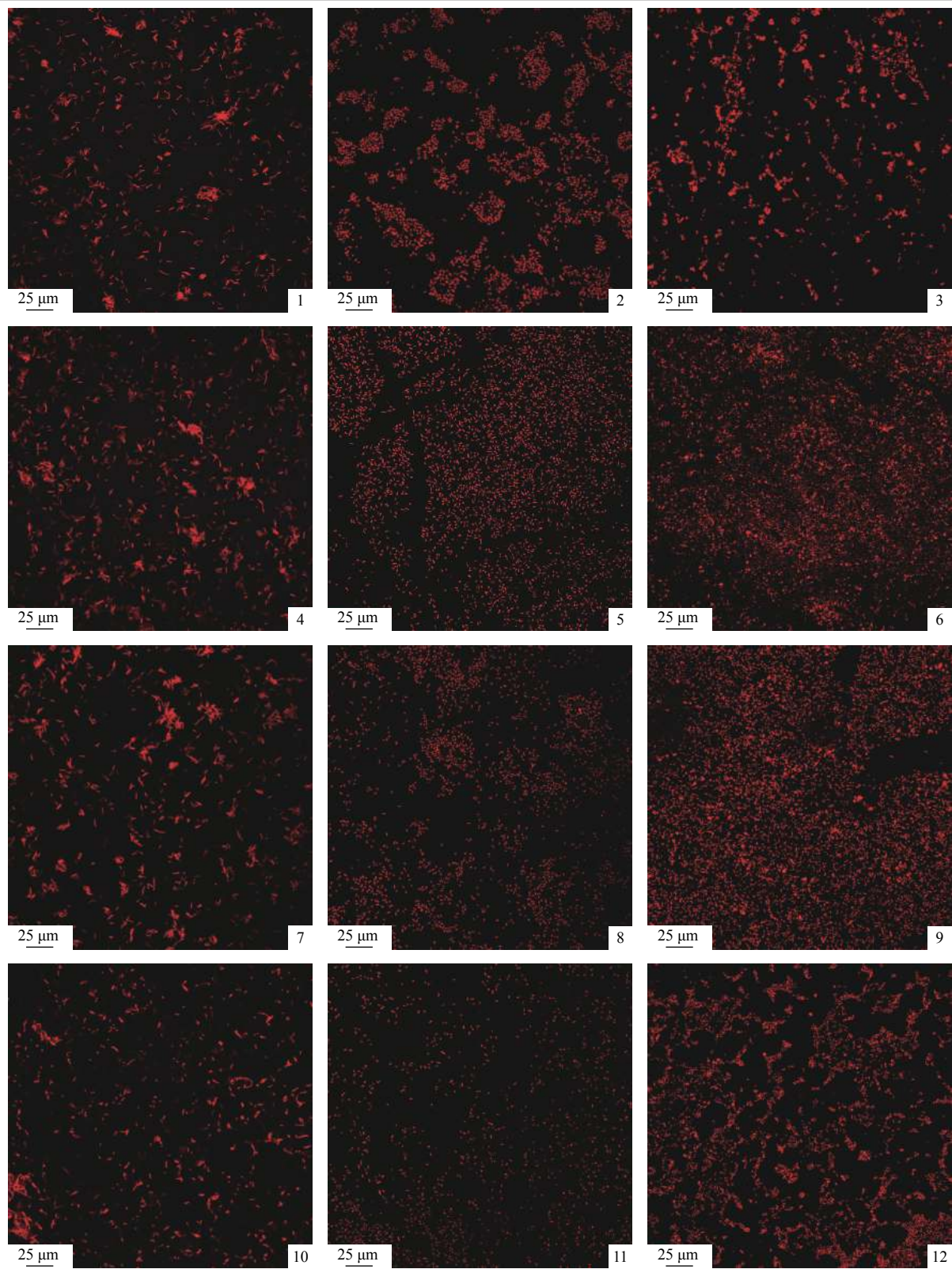
4. Hadal Science and Technology Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Effects of water temperature (4, 18, 25 and 37 °C) on deep-sea bacterial biofilms and subsequent effect on metamorphosis of larvae of the mussel *Mytilus coruscus* were studied. The confocal laser scanning microscopy technique was used to clarify the characteristics of biofilms including biofilm thickness and the distribution of extracellular polymeric substances. The biofilms formed by the deep-sea bacteria could promote the metamorphosis of larvae under four temperature conditions. *Virgibacillus* sp.1 showed the highest inductive activity (35%), with high α -extracellular polysaccharide secretion. The *Virgibacillus* sp.1 biofilm inducing activities on larval metamorphosis were correlated to seawater temperature and bacterial density. Temperature was significantly correlated with bacterial density, induction activity and biofilm thickness. The densities of bacteria in the biofilms of the two *Pseudoalteromonas* strains were significantly correlated with the induced activity. The present study shows that deep-sea bacteria exhibited good potential for temperature change to form the biofilms, and impacted larval metamorphosis.

Key words: *Mytilus coruscus*; deep-sea bacteria; larval metamorphosis; biofilm; temperature

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41876159, 41476131); Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (GML2019ZD0402); National Key R & D Program of China (2018YFC0310600)

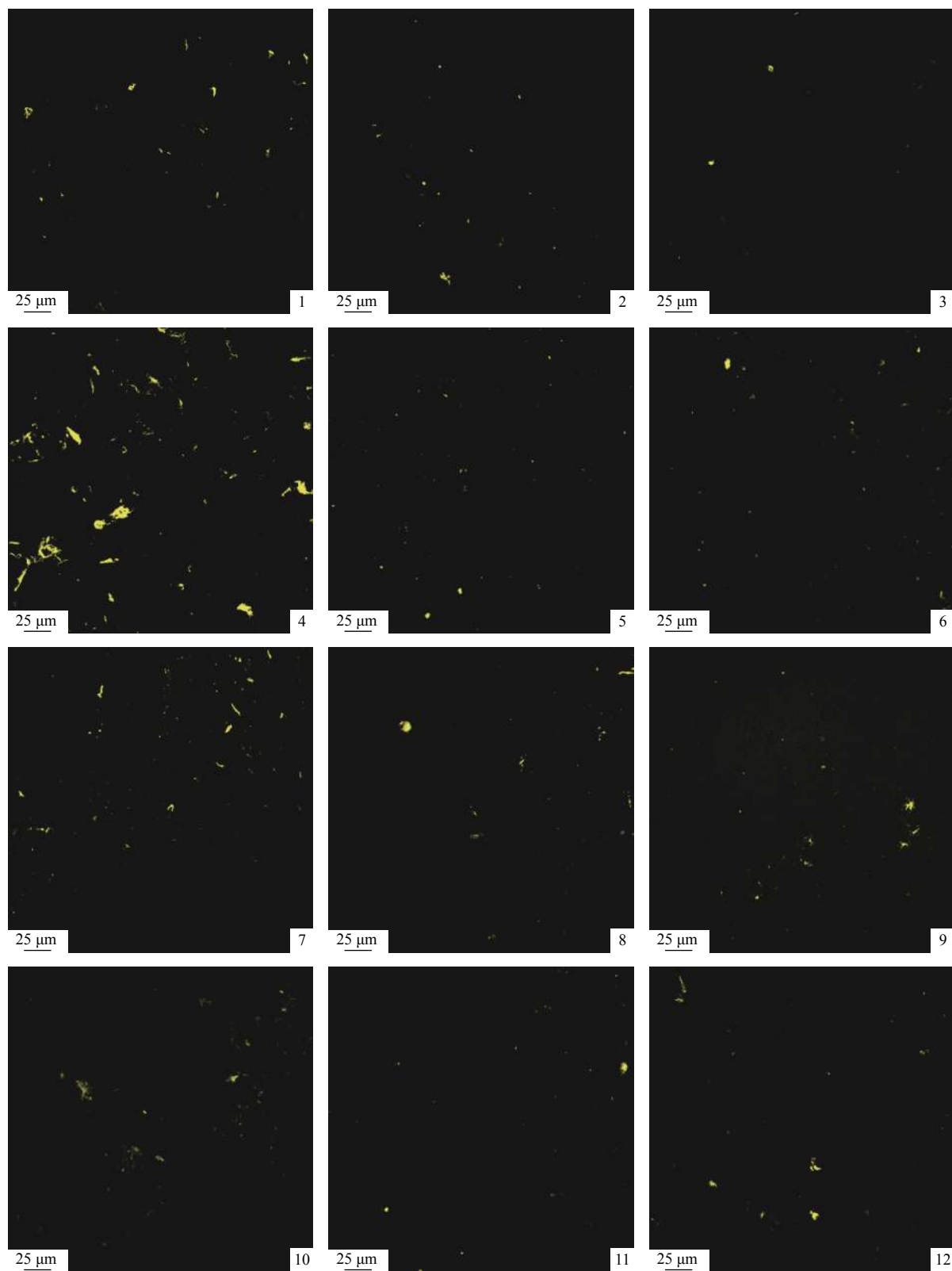


图版 I 激光共聚焦扫描电镜下不同温度条件形成的深海细菌生物被膜形态

1~4.枝芽孢杆菌 *Virgibacillus* sp. 1 分别在 4、18、25 和 37 °C 形成的生物被膜；5~8.假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas* sp. 32 分别在 4、18、25 和 37 °C 形成的生物被膜；9~12.假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas* sp. 33 分别在 4、18、25 和 37 °C 形成的生物被膜。红色是细菌。图版 II~V 同

Plate I CLSM reveals morphology of deep-sea bacterial biofilms at different temperatures

1-4. *Virgibacillus* sp. 1 biofilms formed at 4, 18, 25, 37 °C, respectively; 5-8. *Pseudoalteromonas* sp. 32 biofilms formed at 4, 18, 25, 37 °C, respectively; 9-12. *Pseudoalteromonas* sp. 33 biofilms formed at 4, 18, 25, 37 °C, respectively. The red color indicates bacteria. The same as Plate II-V

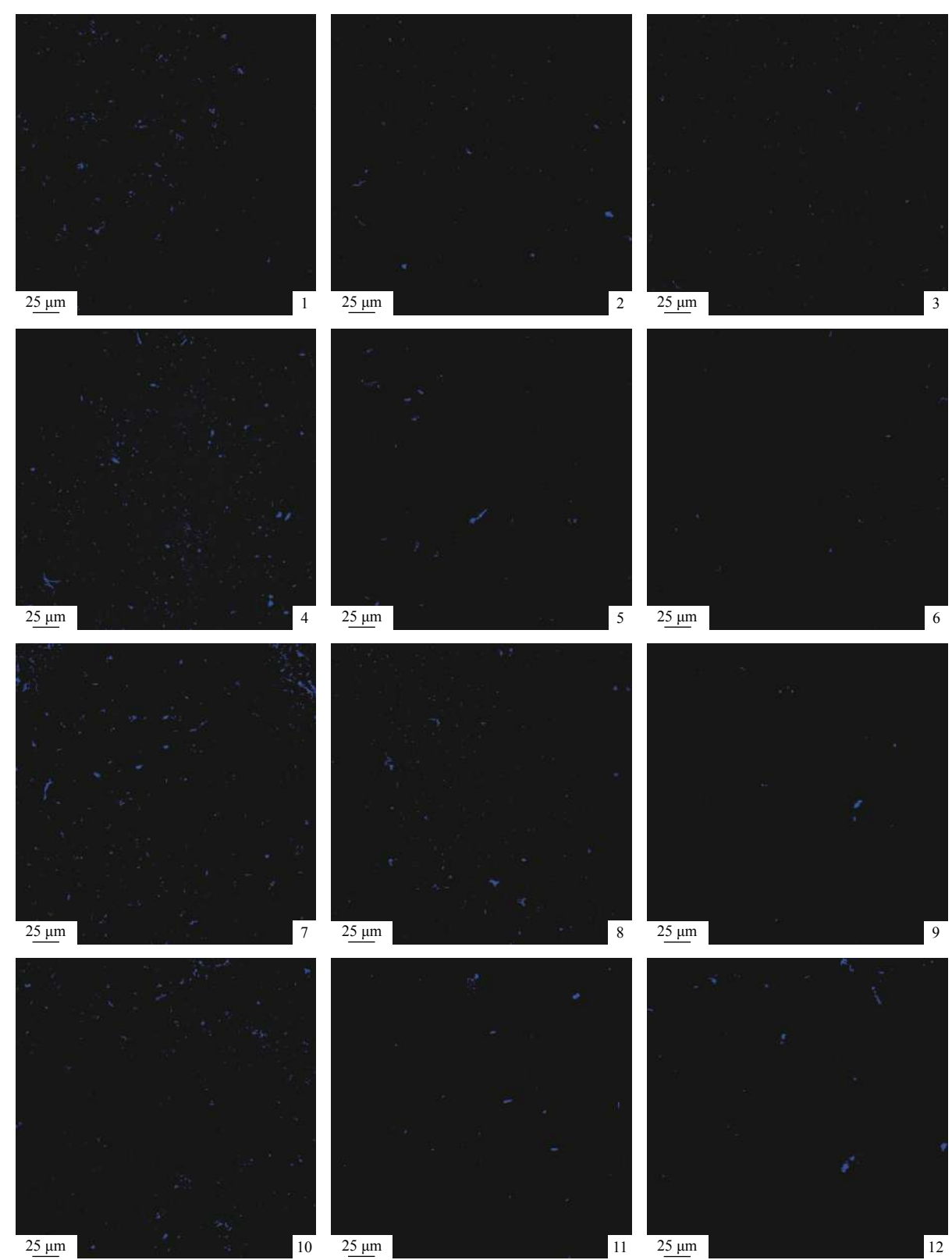


图版 II 激光共聚焦扫描电镜下不同温度条件形成的深海细菌生物被膜 α 多糖

黄色是 α 多糖

Plate II CLSM reveals α -polysaccharides distribution of deep-sea bacterial biofilms at different temperatures

The yellow color indicates α -polysaccharides

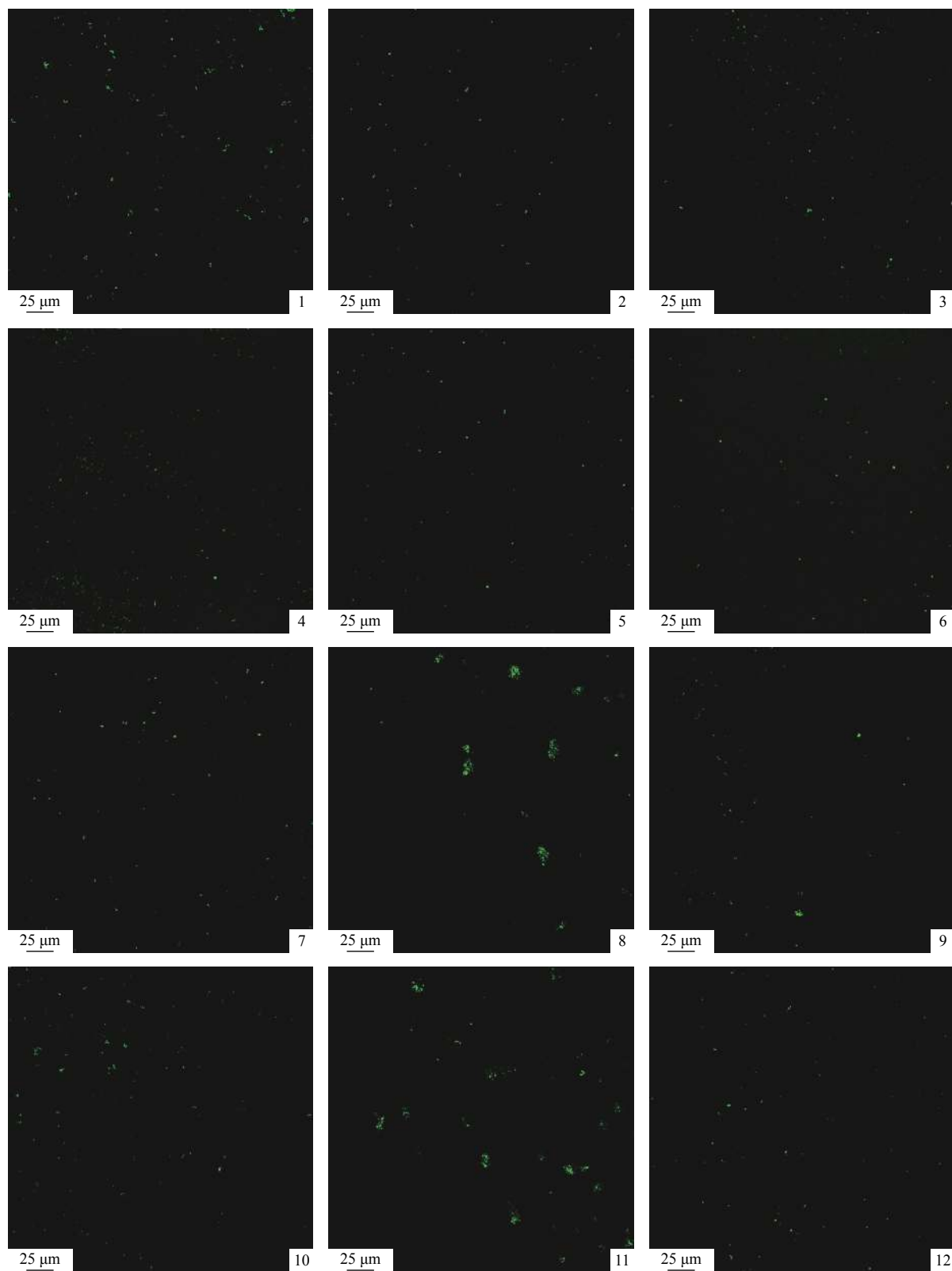


图版 III 激光共聚焦扫描电镜下不同温度条件形成的深海细菌生物被膜 β 多糖

蓝色是 β 多糖

Plate III CLSM reveals β-polysaccharides distribution of deep-sea bacterial biofilms at different temperatures

The blue color indicates β-polysaccharides

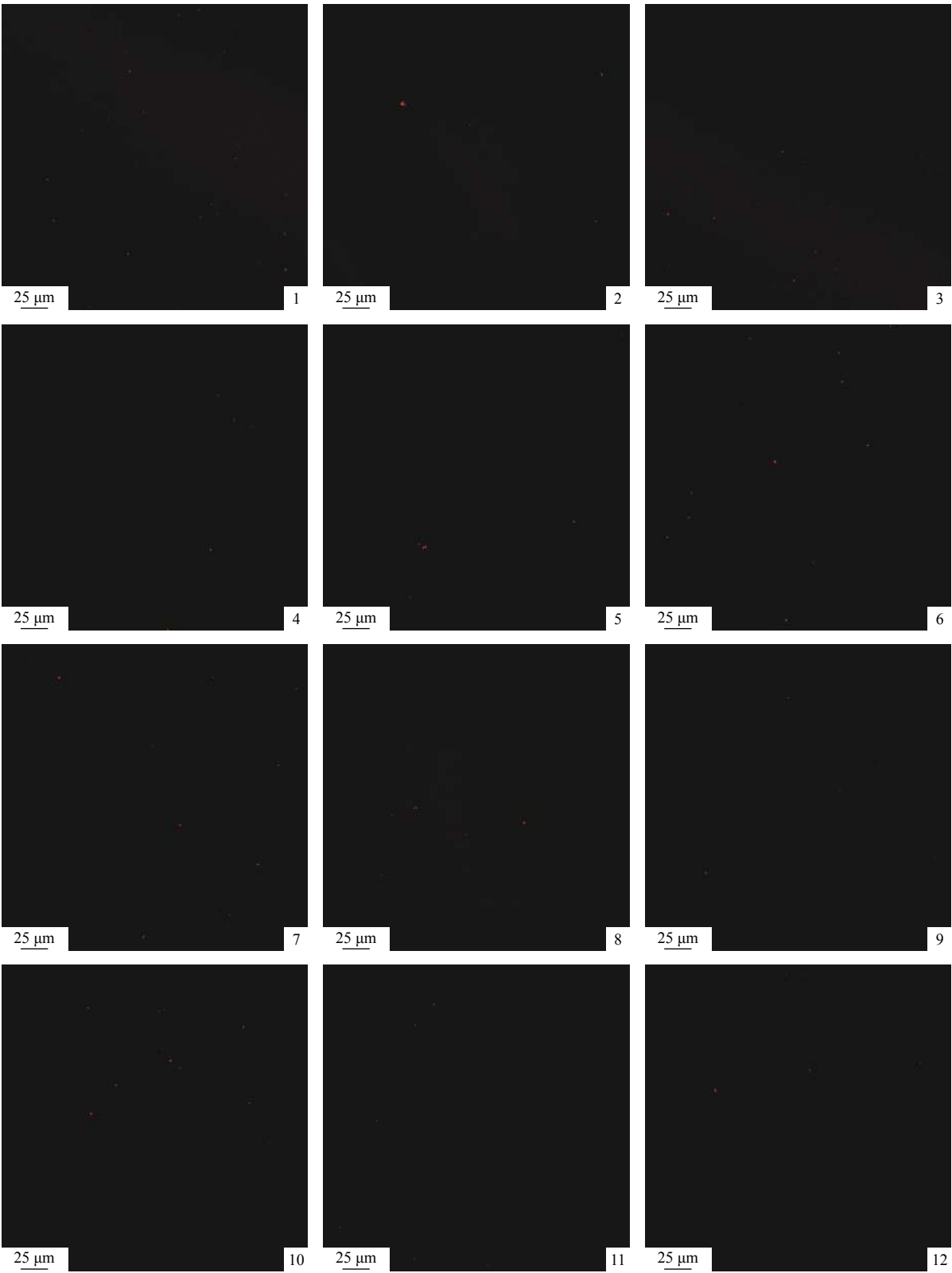


图版 IV 激光共聚焦扫描电镜下不同温度条件形成的深海细菌生物被膜蛋白

绿色是蛋白

Plate IV CLSM reveals proteins distribution of deep-sea bacterial biofilms at different temperatures

The green color indicates proteins



图版 V 激光共聚焦扫描电镜下不同温度条件形成的深海细菌生物被膜脂质

红色是脂质

Plate V CLSM reveals lipids distribution of deep-sea bacterial biofilms at different temperatures

The red color indicates lipids