

徐嘉康, 王劲松, 方怡涵, 等. 厚壳贻贝肠道细菌的生物被膜对其幼虫和稚贝附着的影响[J]. 海洋学报, 2021, 43(9): 81–91, doi:10.12284/hyxb2021112

Xu Jiakang, Wang Jinsong, Fang Yihan, et al. Effects of intestinal bacterial biofilms on settlement process of larvae and plantigrades in *Mytilus coruscus*[J]. Haiyang Xuebao, 2021, 43(9): 81–91, doi:10.12284/hyxb2021112

厚壳贻贝肠道细菌的生物被膜对其幼虫和稚贝附着的影响

徐嘉康^{1,2}, 王劲松^{1,2}, 方怡涵^{1,2}, 杨金龙^{1,2,3}, 梁箫^{1,2*}

(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(广州), 广东 广州 511458)

摘要: 为研究肠道细菌在厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 幼虫和稚贝生长发育过程中的作用, 本研究从成体厚壳贻贝肠道中分离出了 10 株细菌, 通过分别形成单一细菌生物被膜, 检验其对厚壳贻贝幼虫和稚贝附着的影响和生物被膜特性。实验结果发现, 10 株肠道细菌所形成的生物被膜均能诱导厚壳贻贝幼虫和稚贝的附着, 但不同种类肠道细菌的诱导能力不同, 其中 *Bacillus* sp.4 对厚壳贻贝幼虫具有高诱导活性, *Phaeobacter* sp.1 具有低诱导活性; *Phaeobacter* sp.1 对厚壳贻贝稚贝具有高诱导活性, *Bacillus* sp.4 具有低诱导活性。通过比较分析 *Bacillus* sp.4 和 *Phaeobacter* sp.1 生物被膜的生物量及胞外产物发现, 肠道细菌被膜细菌密度、膜厚和胞外脂类对厚壳贻贝幼虫的附着变态无影响, 而胞外蛋白和胞外多糖可以影响幼虫的附着变态; 对于厚壳贻贝稚贝的附着, 肠道细菌被膜细菌密度、膜厚和胞外 α -多糖均能影响其诱导活性, 而胞外脂类和胞外蛋白无影响。本研究成果可为提高厚壳贻贝的健康生态养殖相关技术提供相关的指导, 为解析生物被膜调控厚壳贻贝附着机制和该物种生态健康养殖提供理论依据。

关键词: 肠道细菌; 厚壳贻贝; 生物被膜; 诱导活性; 附着

中图分类号: Q178.53

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2021)09-0081-11

1 引言

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 和大多数海洋无脊椎动物一样, 幼虫在发育到一定阶段后会经历“附着变态”而发育成稚贝、长成成贝^[1-2]。同时, 厚壳贻贝的稚贝或成贝在周围生活环境发生变化时会自动切断足丝, 爬到其他生态位寻找到新的附着基质后, 经过“二次附着”后在新的环境中生长^[1-5]。厚壳贻贝作为我国重要的海水经济贝类之一, 附着变态的成功与否直接影响育苗过程中的苗种产量和质量, 稚贝的二次

附着则影响贻贝的包苗和中间培育, 因此在厚壳贻贝的养殖产业中, 幼虫附着变态和稚贝二次附着是决定其经济效益与发展前景的重要技术环节。

海洋细菌所形成的生物被膜在海洋无脊椎动物的生长发育过程中扮演着重要的角色^[6-8]。研究表明, *Shewanella*^[9]、*Vibrio*^[10-11]、*Pseudoalteromona*^[12-13]、*Bacillus*^[13] 等属的海洋细菌都能调控厚壳贻贝幼虫的附着变态和稚贝的二次附着。海洋细菌种类繁多且分布广泛, 在海水、海洋沉积物和海洋生物体内均能发现并分离^[13-15]。然而, 并非所有海洋细菌都适

收稿日期: 2020-12-30; 修订日期: 2021-03-31。

基金项目: 上海市优秀学术带头人计划(20XD1421800); 国家自然科学基金(41876159); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402); 国家重点研发计划项目(2020YFD0900804)。

作者简介: 徐嘉康(1996—), 男, 辽宁省沈阳市人, 从事海洋贝类分子生物学的研究。E-mail: m180100004@st.shou.edu.cn

* 通信作者: 梁箫(1983—), 女, 博士, 从事海洋贝类分子生物学的研究。E-mail: x-liang@shou.edu.cn

合于实际生产应用,例如弧菌在一定条件下会具有一定的致病性^[16-19],这一特性使得在养殖过程中对贻贝健康和产品的品质管控存在一定的风险^[20-22],所以在实际的贻贝生产应用中,选取一种有效且安全的细菌至关重要。

肠道细菌在脊椎动物和无脊椎动物中均能发现其踪迹,并在一定的相互作用下形成较稳定的微生态系统^[23]。肠道细菌种类丰富而且数量庞大,具有提高宿主的免疫力、调节生长发育、提高肠的屏障功能等^[24-25]特殊的生理功能。研究表明^[13],一些肠道细菌可以促进厚壳贻贝稚贝进行二次附着,但肠道细菌能否诱导其幼虫的附着变态以及肠道细菌、生物被膜、贝类的附着行为三者之间的关系等问题报道较少。

本研究从厚壳贻贝的肠道中分离出 10 株细菌分别形成生物被膜,检测其对厚壳贻贝幼虫附着变态和稚贝二次附着的影响,筛选出在诱导厚壳贻贝附着过程中有高、低诱导活性的肠道细菌,对其所形成生物被膜的胞外产物的分布和量进行分析,旨在通过本研究阐明厚壳贻贝的附着与不同种类的肠道细菌之间的关系,为肠道细菌在贝类人工育苗和海区养殖过程中的应用提供理论依据。

2 材料和方法

2.1 实验材料

从浙江省嵊泗县枸杞岛附近海域(30.72°N, 122.76°E)取回实验所需的成体厚壳贻贝。取回时壳长为(9.5±0.5)cm,壳高为(4.7±0.5)cm。

本实验所使用的厚壳贻贝眼点幼虫和稚贝源于东海贻贝科技创新服务有限公司。眼点幼虫壳长为(279.5±21.5)μm,壳高为(247.0±17.5)μm,稚贝壳长为(0.85±0.15)mm,壳高为(0.56±0.11)mm。

2.2 肠道细菌的相关分析

2.2.1 肠道细菌的分离

将肠道细菌从成体厚壳贻贝肠道中分离的方法参照 Li 等^[26]的方法,使用灭菌的解剖剪将肠道从成体厚壳贻贝中分离并置于离心管中,刮取肠道内壁物质于灭菌过滤海水(Autoclaved Filtered Sea Water, AFSW)中,将所得到的细菌悬浮液进行梯度稀释 10 000 倍后用于分离细菌,所分离的菌株都储存在含有 30% 甘油的 0.9%NaCl 的溶液中,并置于实验室-80℃冰箱中低温保存。

2.2.2 肠道细菌 16S rRNA 基因测序

细菌 16S rRNA 基因序列 PCR 扩增及序列比对参照 Li 等^[26]的实验方法,使用细菌基因组 DNA 试剂盒

(上海博彩生物科技有限公司)提取细菌 DNA,将提取的 DNA 序列 PCR 扩增后送到上海生工生物工程有限公司进行基因测序,将所得到的基因序列上传至 NCBI 数据库获得 Accession No. 等信息。

2.2.3 系统发育分析

系统发育分析参照杨金龙等^[2]的方法,使用 MEGA 6.06 程序进行测序,序列与其近源物种的 16S rRNA 基因序列比对。系统发育分析使用最大简约法、最小进化法和邻接法 3 种方法进行构建,物种间遗传距离使用 Jukes-Cantor 法。选取大肠杆菌(*Escherichia coli*)(序列号为 AONF01000005.1)作为外群序列来进行构建系统发育树。

2.3 生物被膜的相关分析

2.3.1 生物被膜的制备

参照杨金龙等^[2]的方法来制备实验所需的单一细菌生物被膜,分离纯化得到的单株肠道细菌使用 ZoBell 2216E 培养基在 25℃ 的黑暗条件下进行扩大培养,培养 24 h 后在 3 500 r/min 的条件下离心 15 min,倒掉培养液用 AFSW 清洗 3 次,用 50 mL AFSW 悬浮所得到的细菌,按照实验所需的 1×10⁶ cells/mL、1×10⁷ cells/mL、1×10⁸ cells/mL、3×10⁸ cells/mL、5×10⁸ cells/mL 和 1×10⁹ cells/mL 这 6 个初始细菌密度计算加入灭菌培养皿中的细菌悬浮液体积,在 18℃ 的黑暗条件下培养 48 h 得到实验所需的生物被膜。

2.3.2 生物被膜的细菌密度计数

参考 Yang 等^[27]的方法来对生物被膜上的细菌进行计数,使用 5% 甲醛溶液将生物被膜固定 24 h,固定后使用 0.1% 吖啶橙染液避光染色 5 min,染色后去除多余染液,避光晾干后置于荧光显微镜(奥林巴斯 BX51)×1 000 放大倍率下进行观察,每株细菌的每个初始细菌密度设置 3 个平行组,每个平行组随机取 10 个视野计算细菌密度。其计算公式为

$$\begin{aligned} & \text{生物被膜的细菌密度 (cells/cm}^2\text{)} \\ & = (\text{显微镜下计数}/100) \times 10^8. \end{aligned} \quad (1)$$

2.3.3 生物被膜形态及厚度分析

生物被膜形态及厚度分析按照 Yang 等^[27]的方法,选取在 5×10⁸ cells/mL 浓度下对 *Bacillus* sp.4 和 *Phaebacter* sp.1 的生物被膜进行分析。使用 5% 甲醛溶液将生物被膜固定 24 h,用 5 mg/L 的碘化丙啶(PI)溶液避光染色 15 min,避光晾干后在徕卡激光共聚焦扫描显微镜(Leica TCS SP8)×630 放大倍率下拍摄,使用 FV10-ASW 3.0 软件获取激光扫描聚焦显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)图像,分析生物被膜细菌胞外产物含量。

2.4 厚壳贻贝附着实验

2.4.1 厚壳贻贝幼虫附着变态实验

厚壳贻贝幼虫附着变态实验参考 Yang 等^[27]的方法,在高温灭菌的玻璃培养皿中放入附有生物被膜的载玻片,加入 20 mL AFSW 和 20 个幼虫,在 18℃ 黑暗条件下培养 24 h、48 h、72 h 和 96 h 后记录幼虫的附着变态率,每株实验细菌的各个初始细菌密度均设 9 个平行组,以高温灭菌的没有生物被膜黏附的洁净载玻片作为对照组。

2.4.2 厚壳贻贝稚贝附着实验

厚壳贻贝稚贝附着实验参考杨金龙等^[2]的方法,在高温灭菌的玻璃培养皿中放入附有生物被膜的载玻片,加入 20 mL AFSW 和 10 个稚贝,在 18℃ 黑暗条件下培养 6 h、12 h、24 h 和 48 h 后记录稚贝的附着率,每株实验细菌的各个初始细菌密度均设 9 个平行组,以高温灭菌的没有生物被膜黏附的洁净载玻片作为对照组。

2.5 胞外产物分析

2.5.1 生物被膜的荧光染色

参考 Peng 等^[12]的方法对生物被膜进行染色,在 5×10^8 cells/mL 浓度下对 *Bacillus* sp.4 和 *Phaeobacter* sp.1 的生物被膜进行分析。生物被膜分别使用 DiD' oil、FITC、ConA-TMR 和 CFW 染液对胞外脂类、蛋白质、 α -多糖和 β -多糖进行避光染色 25 min,其中进行胞外蛋白质染色的生物被膜需提前使用 5% 甲醛溶液固定 24 h,染色后去除多余染液,避光晾干后在徕卡激光共聚焦扫描显微镜(Leica TCS SP8)×630 放大倍率下拍摄,使用 FV10-ASW 3.0 软件获取 CLSM 图像,分

析生物被膜细菌胞外产物含量。

2.5.2 CLSM 图像分析

CLSM 图像分析方法按照 Peng 等^[12]的分析方法。使用 Image J 软件(美国国家卫生研究院)计算生物被膜的生物体积,生物体积表示生物被膜胞外产物的单个成分的量。其计算公式为

$$\text{生物体积}(\mu\text{m}^3) = \text{各图层荧光区域数值化之和}(\mu\text{m}^2) \times 0.2(\mu\text{m}) \text{ (每一图层的厚度)}. \quad (2)$$

2.6 数据处理

数据处理按照杨金龙等^[2]的方法,使用 JMP 软件进行数据分析和相关性检验。相关性分析方法使用 Spearman'多元分析方法分析,其中 p 为检验值, p 小于 0.05 时说明具有显著性的差异。

3 结果

3.1 肠道细菌的测序与表型

本实验所分离纯化的 10 株肠道细菌的信息见表 1。本实验所分离的细菌均为不同的菌属,其中 *Bacillus* sp.4 属于厚壁菌门,*Flavobacterium* sp.1、*Arenibacter* sp.1、*Mesoflavibacter* sp.1 和 *Tenacibaculum* sp.3 属于拟杆菌门,而另外 5 株细菌 *Paracoccus* sp.2、*Pseudoalteromonas* sp.30、*Ruegeria* sp.2、*Ahrensia* sp.1 和 *Phaeobacter* sp.1 属于变形菌门。不同肠道细菌的表型如图 1 所示。

3.2 肠道细菌的生物被膜诱导活性

本实验中的 10 株肠道细菌在测试时间内对厚壳贻贝附着的诱导活性趋势基本相同,因此幼虫仅展示 48 h、稚贝仅展示 24 h 的诱导活性结果。如图 2A 所示,所

表 1 肠道细菌 16S rRNA 基因序列分析

Table 1 16S rRNA gene sequence analysis of the intestinal bacterial strains

菌株来源	比对菌株	比对序列号	测试菌株	上传序列号	相似度/%
厚壳贻贝肠道	<i>Bacillus</i> sp.4	KF933662	ECSMC2	KU845379	98
厚壳贻贝肠道	<i>Paracoccus</i> sp.2	KJ648494	ECSMC12	KU845388	97
厚壳贻贝肠道	<i>Flavobacterium</i> sp.1	KF933689	ECSMC8	KU845384	99
厚壳贻贝肠道	<i>Arenibacter</i> sp.1	JQ898120	ECSMC15	KU845393	99
厚壳贻贝肠道	<i>Mesoflavibacter</i> sp.1	NR134082	ECSMC14	KU845390	99
厚壳贻贝肠道	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.30	NR114190	ECSMB30	KX099925	100
厚壳贻贝肠道	<i>Tenacibaculum</i> sp.3	JN128275	ECSMC3	KU845380	99
厚壳贻贝肠道	<i>Ruegeria</i> sp.2	MF359423	ECSMC5	KU845381	99
厚壳贻贝肠道	<i>Ahrensia</i> sp.1	KJ700633	ECSMC1	KU845378	99
厚壳贻贝肠道	<i>Phaeobacter</i> sp.1	HE584770	ECSMC6	KU845382	100

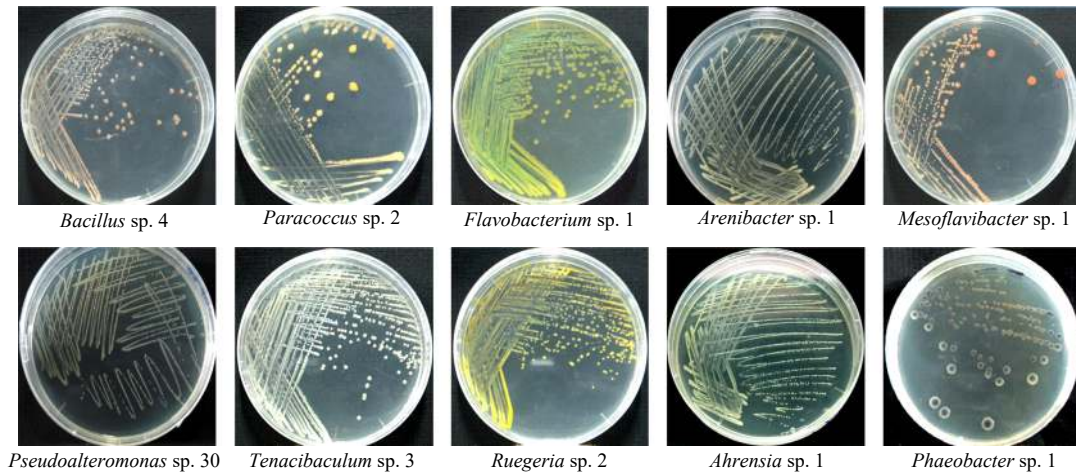


图 1 实验所用贻贝肠道细菌的表型

Fig. 1 Phenotypes of the different bacterial strains from mussel intestinal in tested

用肠道细菌均具有诱导活性, 幼虫的稚贝率为 10%~50%。*Bacillus* sp.4 具有最高的诱导活性 ($p<0.05$), 诱导活性为 $(42.78\pm 1.21)\%$, *Phaeobacter* sp.1 具有最低的诱导活性, 诱导活性为 $(10.50\pm 1.30)\%$ 。

如图 2B 所示, 所用肠道细菌均具有诱导活性, 稚贝的附着率为 20%~95%。*Phaeobacter* sp.1 具有最高的诱导活性 ($p<0.05$), 诱导活性为 $(92.22\pm 2.35)\%$, *Flavobacterium* sp.1 具有最低的诱导活性, 诱导活性为 $(20.00\pm 1.75)\%$ 。

3.3 生物被膜细菌密度

在本实验中, 所测试的 10 株肠道细菌的最终细菌密度会因为初始细菌密度的变化呈现出不同的趋势, 实验所用肠道细菌大部分在 5×10^8 cells/mL 时成

膜效果最好, 因此这里选取在 5×10^8 cells/mL 时形成生物被膜的细菌密度进行展示。10 株肠道细菌中 *Flavobacterium* sp.1 的细菌密度最高, 和除 *Phaeobacter* sp.1 以外的 8 株细菌均有显著性差异 ($p<0.05$), *Arenibacter* sp.1 的细菌密度最低 (图 3)。

3.4 生物被膜细菌密度与其诱导活性之间的相关性

10 株细菌生物被膜的细菌密度与其对厚壳贻贝幼虫和稚贝诱导活性的相关性关系见表 2。10 株肠道细菌中 *Paracoccus* sp.2、*Pseudoalteromonas* sp.30 和 *Ruegeria* sp.2 对幼虫和稚贝诱导活性均显著相关 ($p<0.05$)。*Bacillus* sp.4 和 *Ahrensia* sp.1 对幼虫的诱导性显著相关 ($p<0.05$)。*Flavobacterium* sp.1、*Arenibacter* sp.1 和 *Phaeobacter* sp.1 对稚贝的诱导活性显著相

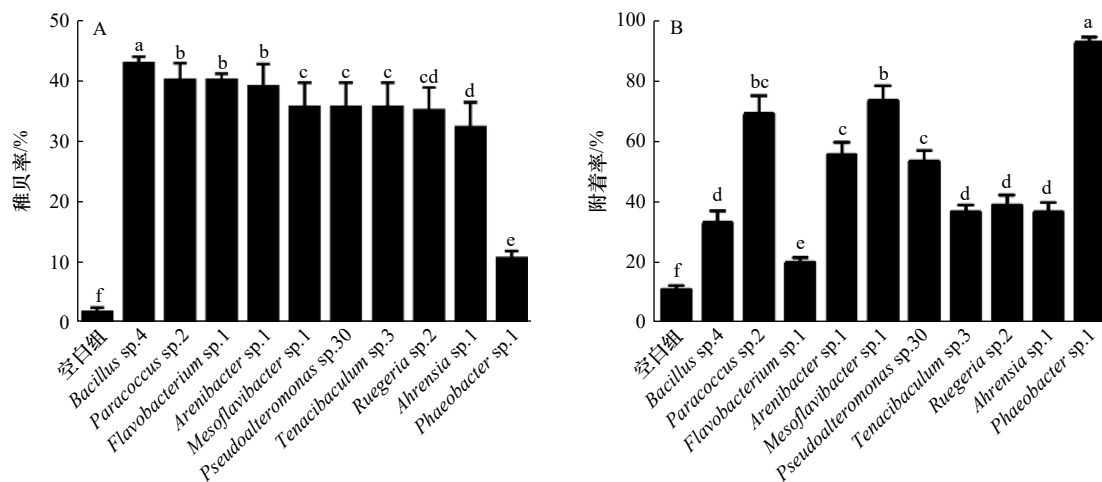


图 2 不同肠道细菌对厚壳贻贝的诱导作用

Fig. 2 Induction of settlement of *Mytilus coruscus* on the different intestinal bacterial biofilms

A. 对幼虫变态附着的诱导活性; B. 对稚贝附着的诱导活性; 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)

A. Inducing activity of larval settlement and metamorphosis; B. inducing activity of plantigrade settlement; values that are significantly different between each other at $p<0.05$ are indicated by different letters

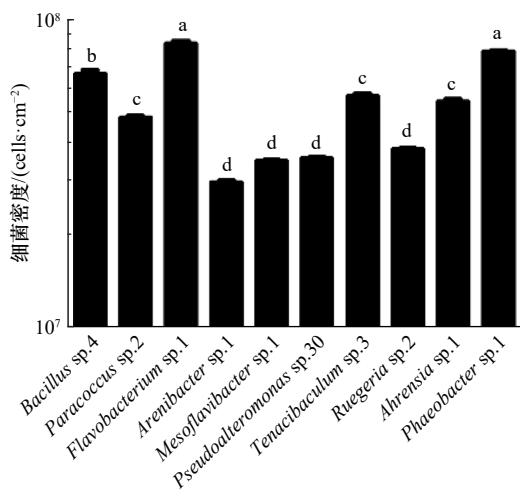


图3 不同肠道细菌生物被膜的细菌密度

Fig. 3 The bacterial density of different intestinal bacterial biofilms

不同字母表示差异显著($p < 0.05$)Values that are significantly different between each other at $p < 0.05$ are indicated by different letters

表2 细菌密度与诱导活性的相关性分析

Table 2 Correlation analyses between the bacterial density and inducing activity

测试菌株	细菌密度			
	幼虫诱导活性		稚贝诱导活性	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>Bacillus</i> sp.4	0.912 9	0.000 1*	-0.642 0	0.118 7
<i>Paracoccus</i> sp.2	0.804 1	0.000 1*	0.835 2	0.000 1*
<i>Flavobacterium</i> sp.1	0.227 2	0.182 7	0.874 2	0.000 1*
<i>Arenibacter</i> sp.1	-0.010 8	0.950 0	0.747 4	0.002 7*
<i>Mesoflavibacter</i> sp.1	0.247 0	0.146 5	0.426 1	0.196 3
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.30	-0.672 7	0.000 1*	0.638 7	0.002 2*
<i>Tenacibaculum</i> sp.3	0.260 4	0.125 0	0.174 7	0.237 4
<i>Ruegeria</i> sp.2	-0.461 9	0.004 6*	0.791 6	0.000 1*
<i>Ahrensia</i> sp.1	0.344 1	0.039 9*	0.277 4	0.208 5
<i>Phaeobacter</i> sp.1	0.630 7	0.172 5	0.965 4	0.000 1*

注: *表示差异显著($p < 0.05$)。

关 ($p < 0.05$)。 *Mesoflavibacter* sp.1 和 *Tenacibaculum* sp.3 对幼虫和稚贝的诱导活性均不相关 ($p > 0.05$)。

3.5 肠道细菌的系统发育分析

通过3种分析进行肠道细菌的系统发育发现, 所得到的结果一致, 因此本研究以邻接法的分析结果进行展示(图4), 表3为本研究所用细菌的遗传距离。

结果显示, *Paracoccus* sp.2 与 *Flavobacterium* sp.1 的遗传距离为 0.011, 是测试肠道细菌中遗传距离最近的。上述2株细菌聚为一支后与 *Ruegeria* sp.2 及 *Phaeobacter* sp.1 聚为一支。这一分支再与同属于变形菌门的 *Bacillus* sp.4、*Ahrensia* sp.1 和属于厚壁菌门的 *Pseudoalteromonas* sp.30 这3株细菌聚为另一分支, 最后再和 *Arenibacter* sp.1、*Mesoflavibacter* sp.1 和 *Tenacibaculum* sp.3 这3株细菌聚类。

3.6 肠道细菌的生物被膜形态和厚度

通过 CLSM 图片明显发现, *Bacillus* sp.4 和 *Phaeobacter* sp.1 生物被膜的状态明显不同(图5A)。 *Phaeobacter* sp.1 的膜厚为 $(8.86 \pm 0.25) \mu\text{m}$, 且 *Phaeobacter* sp.1 比 *Bacillus* sp.4 的细菌分布更加的聚集。

通过分析膜厚和诱导活性的相关性发现(表4), *Bacillus* sp.4 的膜厚与幼虫和稚贝的诱导活性均不相关 ($p > 0.05$); *Phaeobacter* sp.1 的膜厚与稚贝的诱导活性显著相关 ($p < 0.05$) 而对幼虫的诱导活性不相关 ($p > 0.05$)。

3.7 CLSM 图像和胞外产物含量

如图6所示, 2株细菌胞外产物中蛋白质、 α -多糖和 β -多糖的分布和含量具有显著性差异 ($p < 0.05$)。 *Bacillus* sp.4 的胞外蛋白质、 α -多糖和 β -多糖含量显著高于 *Phaeobacter* sp.1 ($p < 0.05$), *Bacillus* sp.4 分泌胞外产物的能力高于 *Phaeobacter* sp.1。

通过分析胞外产物与其诱导活性的相关性发现(表5, 表6), *Bacillus* sp.4 的胞外产物中, 胞外蛋白、 α -多糖和 β -多糖与幼虫的诱导活性显著相关 ($p < 0.05$), 而胞外脂类与幼虫的诱导活性不相关 ($p > 0.05$)。 α -多糖与稚贝的诱导活性显著相关且呈负相关性 ($p < 0.05$), 而脂类、蛋白质和 β -多糖与对稚贝的诱导活性不相关 ($p > 0.05$)。

Phaeobacter sp.1 形成的生物被膜胞外产物中, 蛋白质与幼虫的诱导活性显著相关且呈负相关性 ($p < 0.05$), 而脂类、 α -多糖和 β -多糖与幼虫的诱导活性不相关 ($p > 0.05$)。 α -多糖与稚贝的诱导活性显著相关 ($p < 0.05$), 而脂类、蛋白质和 β -多糖与稚贝的诱导活性不相关 ($p > 0.05$)。

4 讨论

本研究所测试的10株厚壳贻贝肠道细菌均为不同的菌属, 经培养都能够形成生物被膜, 并且最终形成生物被膜的细菌密度会根据初始细菌密度变化而变化, 具体变化趋势根据菌种的不同具有不同的趋势。10株肠道细菌形成的生物被膜对厚壳贻贝幼虫

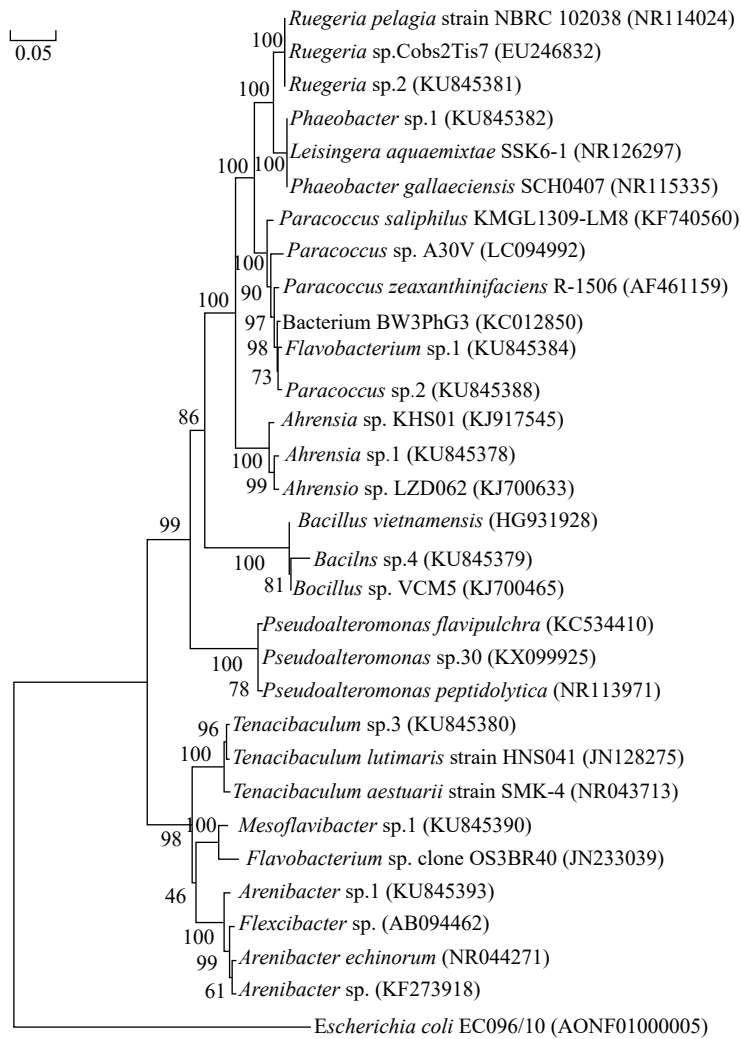


图 4 本实验中肠道细菌的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of intestinal bacterial in tested

表 3 本实验中肠道细菌的遗传距离

Table 3 Genetic distances of intestinal bacterial in tested

测试菌株	2	12	8	15	14	30	3	5	1	6
2										
12	0.267									
8	0.254	0.011								
15	0.319	0.286	0.308							
14	0.317	0.307	0.294	0.097						
30	0.265	0.194	0.221	0.303	0.290					
3	0.336	0.285	0.305	0.118	0.099	0.274				
5	0.253	0.063	0.076	0.118	0.314	0.230	0.311			
1	0.255	0.144	0.117	0.303	0.295	0.217	0.292	0.139		
6	0.303	0.102	0.084	0.310	0.315	0.237	0.317	0.039	0.138	

注: 1, 2, ..., 30 分别表示菌株ECSMC1, ECSMC2, ..., ECSMC30。

和稚贝均具有诱导活性, 并且因菌种不同表现出不同的诱导活性, 这表明, 细菌菌种与诱导活性之间没有

必然联系, 这与以往的研究结果一致^[2, 4, 13, 26-27]。

以往研究表明, 在厚壳贻贝肠道及东海近海海区的自然生物被膜中均分离出相同的菌属。与本研究相比较, 在 2017 年研究中^[13], 从厚壳贻贝肠道分离出与本研究相同的 *Tenacibaculum*、*Bacillus*、*Ruegeria* 和 *Paracoccus* 菌属; 从自然生物被膜中也曾分离出 *Tenacibaculum*^[4, 26-27]、*Bacillus*^[4, 28] 和 *Pseudoalteromonas*^[4, 26-28] 3 个与本研究相同菌属的细菌。以往研究已证明了宿主生存的环境会影响肠道细菌的群落^[29-30], 肠道作为厚壳贻贝主要的消化器官, 可能会因滤食作用将环境中的细菌摄入到肠道内, 因此推测, 本研究的 10 株细菌可能来源于厚壳贻贝生存的外界环境。

4.1 肠道细菌的生物被膜对厚壳贻贝幼虫附着变态的诱导活性

在以往的研究中, 单一菌株形成生物被膜后的细菌密度、膜厚、胞外产物等生物学特性与海洋无脊椎

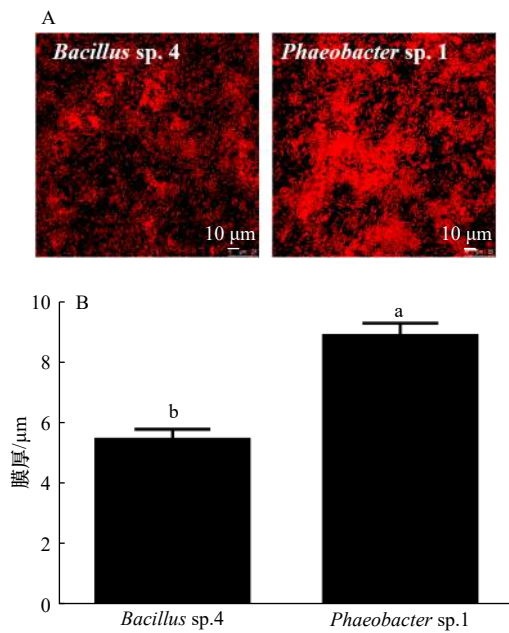


图5 *Bacillus sp.4* 和 *Phaeobacter sp.1* 的生物被膜图像(A)及膜厚(B)

Fig. 5 Biofilm images (A) and biofilm thickness (B) of *Bacillus sp.4* and *Phaeobacter sp.1*

不同字母表示差异显著($p < 0.05$)

Values that are significantly different between each other at $p < 0.05$ are indicated by different letters

表4 膜厚与诱导活性的相关性分析

Table 4 Correlation analyses between the biofilm thickness and inducing activity

测试菌株	生物被膜膜厚			
	幼虫诱导活性		稚贝诱导活性	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>Bacillus sp.4</i>	0.376 4	0.108 7	0.264 2	0.075 6
<i>Phaeobacter sp.1</i>	0.375 3	0.115 4	0.886 4	0.000 1*

注: *表示差异显著($p < 0.05$)。

动物幼虫附着变态具有一定的相关性。Peng等^[12]的研究发现,7株 *Pseudoalteromonas* 中有3株的生物被膜细菌密度与 *M. coruscus* 幼虫诱导活性呈显著相关性,与另外4株细菌无相关性。Bao等^[31]的实验结果发现,5株细菌中仅有 *Alteromonas sp.1* 这1株的细菌密度与 *Mytilus galloprovincialis* 幼虫的诱导活性呈显著相关性。Tran和Hadfield^[32]的研究中,仅有 *Pseudoalteromonas luteoviolacea* 细菌生物被膜的细菌密度与 *Pocillopora damicornis* 幼虫的诱导活性呈显著相关性,其余细菌与诱导活性均没有相关性。在本研究所测试的10株肠道细菌被膜的细菌密度与诱导活性

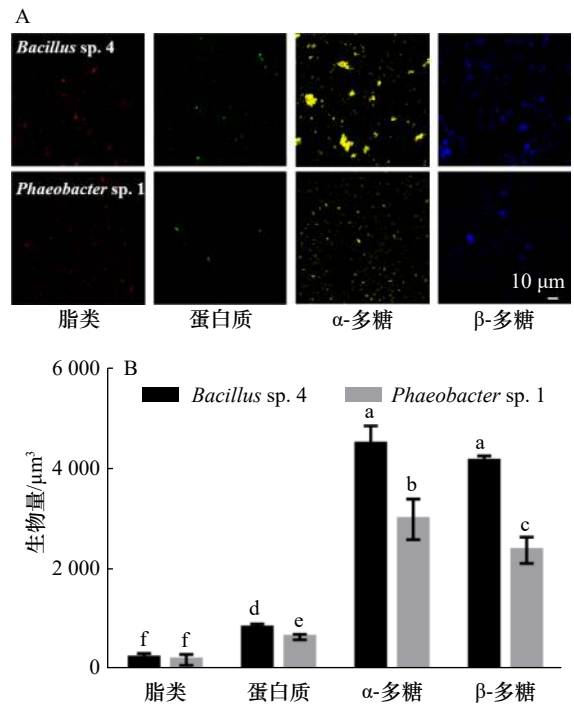


图6 生物被膜的CLSM图像分析

Fig. 6 The analysis of CLSM images of biofilms

脂类、蛋白质、α-多糖和β-多糖在生物被膜上的分布(A)和生物量(B);不同字母表示差异显著($p < 0.05$)

The distribution (A) and biovolume (B) of lipids, proteins, α-polysaccharide and β-polysaccharide on BFs; values that are significantly different between each other at $p < 0.05$ are indicated by different letters

中,有5株细菌呈相关性,另外5株无相关性,表明细菌呈现出相关性不具有普遍性,因而生物被膜的细菌密度并不是影响厚壳贻贝幼虫附着变态的主要因素。

根据Yang等^[27]的研究发现,诱导活性无显著差异的 *Tenacibaculum sp.1* 和 *Pseudoalteromonas sp.1* 的膜厚和其他测试的细菌相比有显著差异。本研究中, *Phaeobacter sp.1* 形成的生物被膜的膜厚显著高于 *Bacillus sp.4*,但 *Bacillus sp.4* 的诱导活性显著高于 *Phaeobacter sp.1*,因此生物被膜的膜厚不是影响厚壳贻贝幼虫附着变态的主要因素。本研究针对细菌的遗传进化对厚壳贻贝幼虫的附着变态诱导活性相关性分析,结果表明具有较远遗传距离的 *Bacillus sp.4* 和 *Arenibacter sp.1* 的诱导活性无差异,遗传距离较近的 *Ruegeria sp.2* 和 *Flavobacterium sp.1* 有显著性差异。这一结果证明了细菌遗传距离与诱导活性之间没有必然联系,与以往研究结果一致^[27]。

Peng等^[12]的研究表明,胞外产物中的表面活性物质可以促进厚壳贻贝幼虫的附着行为和附着变态率。Liang等^[33]的研究表明,Δ*filP*菌株分泌的鞭毛蛋白可以促进厚壳贻贝幼虫的附着变态,Peng等^[34]的

表 5 胞外产物与幼虫诱导活性的相关性分析

Table 5 Correlation analyses between extracellular product and inducing activity of larvae

测试菌株	生物被膜胞外产物生物量							
	脂类		蛋白质		α -多糖		β -多糖	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>Bacillus</i> sp.4	0.363 4	0.094 2	0.486 5	0.000 1*	0.886 5	0.000 1*	0.753 2	0.000 1*
<i>Phaeobacter</i> sp.1	0.484 5	0.265 8	-0.864 3	0.028 7*	-0.642 4	0.147 5	-0.448 6	0.084 5

注: *表示差异显著($p < 0.05$)。

表 6 胞外产物与稚贝诱导活性的相关性分析

Table 6 Correlation analyses between the extracellular product and inducing activity of plantigrade

测试菌株	生物被膜胞外产物生物量							
	脂类		蛋白质		α -多糖		β -多糖	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>Bacillus</i> sp.4	0.765 3	0.219 5	0.592 5	0.120 9	-0.764 3	0.037 1*	-0.343 6	0.129 1
<i>Phaeobacter</i> sp.1	0.464 2	0.107 5	0.556 3	0.075 3	0.669 8	0.044 3*	0.562 1	0.085 9

注: *表示差异显著($p < 0.05$)。

研究表明, $\Delta 01912$ 菌株的胞外产物可拉酸过量分泌同样可以促进厚壳贻贝幼虫的附着变态。本研究发现, 具有高诱导活性的 *Bacillus* sp.4 生物被膜胞外产物中胞外蛋白、 α -多糖和 β -多糖的含量显著高于 *Phaeobacter* sp.1。通过对胞外产物和诱导活性相关性分析发现, 2 株肠道细菌的胞外蛋白与厚壳贻贝幼虫的诱导活性均具有显著相关性, 但与 *Phaeobacter* sp.1 呈现为负相关。因而, α -多糖和 β -多糖在诱导厚壳贻贝幼虫中起重要作用, 胞外蛋白会因菌属的不同而影响厚壳贻贝幼虫的附着。

4.2 肠道细菌的生物被膜对厚壳贻贝稚贝附着的诱导活性

在以往单一菌株形成生物被膜对厚壳贻贝稚贝的研究中发现, 实验所用细菌中, 大部分细菌生物被膜的细菌密度与诱导活性呈显著相关性。本研究中, 10 株细菌中有 6 株的细菌密度与诱导活性呈相关性。梁箫等^[9]的研究结果发现, 厚壳贻贝稚贝的附着率会根据弧菌形成生物被膜的膜厚变化而变化, 且变化趋势相同。本研究中, 同一初始细菌密度下形成的生物被膜, 高诱导活性的 *Phaeobacter* sp.1 的膜厚显著高于 *Bacillus* sp.4。相关性分析表明, *Phaeobacter* sp.1 的膜厚和诱导活性之间是显著相关的。由此可见, 生物被膜的细菌密度、膜厚可以影响厚壳贻贝稚贝的附着。而细菌的遗传进化与厚壳贻贝稚贝的附着没

有相关性^[2, 4, 13]。本研究中, 遗传距离最近的 *Paracoccus* sp.2 和 *Flavobacterium* sp.1 的诱导活性具有显著性差异, 遗传距离最远的 *Bacillus* sp.4 和 *Tenacibaculum* sp.3 的诱导活性没有显著性差异。这一结果和细菌遗传进化与诱导活性之间无必然联系的结论相一致。

生物被膜胞外产物对厚壳贻贝稚贝的附着起重要作用。梁箫等^[10]的实验结果发现, 3 株弧菌生物被膜胞外多糖含量与形成时间有关, 随时间增加, 胞外多糖含量先增多再减少, 胞外多糖含量变化与 3 株弧菌生物被膜对厚壳贻贝稚贝的诱导活性结果相似。本研究中, 2 株肠道细菌的生物被膜胞外产物中, α -多糖与诱导活性均呈显著相关, 但 *Bacillus* sp.4 呈现为负相关。因而, α -多糖可能在诱导厚壳贻贝稚贝中发挥了重要作用, 存在会因菌属的不同而影响厚壳贻贝稚贝的附着。

4.3 同株肠道细菌的生物被膜对厚壳贻贝幼虫和稚贝附着的影响

以往研究中, 单一细菌生物被膜对厚壳贻贝幼虫和稚贝呈现出相同或相似的诱导活性。高伟等^[35]和梁箫等^[9]的研究中, *Shewanella loihica* 对厚壳贻贝幼虫和稚贝均具有中等诱导活性; 周轩等^[28]和 Peng 等^[12]的研究中, *Pseudoalteromonas marina* 对厚壳贻贝幼虫和稚贝均具有中等诱导活性。在本研究中同样发现 *Paracoccus* sp.2 和 *Pseudoalteromonas* sp.30 对幼虫和稚

贝均具有中等诱导活性;同时也发现了比较有趣的现象,*Phaeobacter* sp.1和*Bacillus* sp.4的诱导活性结果呈现出截然相反的结果,*Bacillus* sp.4对幼虫具有高诱导活性而对稚贝具有低诱导活性,而*Phaeobacter* sp.1对幼虫具有低诱导活性,对稚贝具有高诱导活性,推测可能由于肠道细菌对厚壳贻贝幼虫和稚贝的诱导机制不同。以往研究中,当细菌对海洋无脊椎动物具有较高诱导活性时,其生物被膜分泌胞外产物的能力也相对较强^[33-34]。然而*Phaeobacter* sp.1的胞外产物显著低于*Bacillus* sp.4,但对稚贝的诱导活性反而显著高于后者,推测可能是*Phaeobacter* sp.1中具有特殊的成膜机制,使其对稚贝具有高诱导活性,这一推测有待后续进一步研究。

综上所述,本研究中的肠道细菌都能够诱导厚壳贻贝幼虫和稚贝的附着,但诱导能力根据菌种的不同有所差异。通过对*Bacillus* sp.4和*Phaeobacter* sp.1这2株肠道细菌的生物被膜生物量和胞外产物的分析发现,肠道细菌被膜的细胞密度、膜厚和胞外产物中的脂类对厚壳贻贝幼虫的附着变态无影响,而胞外蛋白和胞外多糖可以影响幼虫的附着变态;对于厚壳贻贝稚贝的附着,肠道细菌被膜的细胞密度、膜厚和胞外 α -多糖均能影响其诱导活性,而胞外脂类和胞外蛋白无影响。本研究成果为今后深入探讨肠道细菌与厚壳贻贝之间的相互作用提供了理论基础,对肠道细菌在贝类人工育苗和海区生态健康养殖具有潜在应用价值。

参考文献:

- [1] 常亚青. 贝类增养殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
Chang Yaqing. Stock Enhancement and Culture in Mollusks[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007.
- [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 Jinlong, Guo Xingpan, Chen Yuru, 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.
- [3] 李太武. 海洋生物学[M]. 北京: 海洋出版社, 2013.
Li Taiwu. Marine Biology[M]. Beijing: China Ocean Press, 2013.
- [4] 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 Junjie, Zhang Xian, Guo Xingpan, 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.
- [5] 张义浩, 赵盛龙. 嵊山列岛贻贝养殖种类生长发育调查[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2003, 22(1): 67-73.
Zhang Yihao, Zhao Shenglong. Mussel species and growth developing investigation around Shengshan archipelago[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2003, 22(1): 67-73.
- [6] Dobretsov S, Qian Peiyuan. Facilitation and inhibition of larval attachment of the bryozoan *Bugula neritina* in association with mono-species and multi-species biofilms[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 333(2): 263-274.
- [7] 柯才焕, 周时强, 田越, 等. 盘鲍幼体附着诱导的研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(1): 9-14.
Ke Caihuan, Zhou Shiqiang, Tian Yue, et al. Induction of settlement in Japanese abalone, *Haliotis discus discus*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2001, 20(1): 9-14.
- [8] Jouuchi T, Satuito C G, Kitamura H. Sugar compound products of the periphytic diatom *Navicula ramosissima* induce larval settlement in the barnacle, *Amphibalanus amphitrite*[J]. *Marine Biology*, 2007, 152(5): 1065-1076.
- [9] 梁箫, 童欢, 彭莉华, 等. 纤维素对海洋细菌生物被膜形成及厚壳贻贝幼虫附着变态的调控[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(1): 75-82.
Liang Xiao, Tong Huan, Peng Lihua, et al. Regulation of formation of biofilms and larval settlement and metamorphosis of mussel *Mytilus coruscus* by cellulose[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020, 35(1): 75-82.
- [10] 梁箫, 刘红雨, 杨丽婷, 等. 弧菌生物被膜的动态演替对厚壳贻贝附着的影响[J]. 水产学报, 2020, 44(1): 118-129.
Liang Xiao, Liu Hongyu, Yang Liting, et al. Effects of dynamic succession of *Vibrio* biofilms on settlement of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(1): 118-129.
- [11] 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 Daofen, Liang Xiao, Peng Lihua, 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.
- [12] Peng Lihua, Liang Xiao, Xu Jiakang, et al. Monospecific biofilms of *Pseudoalteromonas* promote larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 2577.
- [13] 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 Na, Liang Xiao, Peng Lihua, et al. Effects of gut bacteria on the settlement of spats of *Mytilus coruscus*[J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(11): 45-54.
- [14] 张德, 张长生, 田新朋, 等. 中国海洋微生物多样性研究[J]. 中国科学院院刊, 2010, 25(6): 651-658.

- Zhang Si, Zhang Changsheng, Tian Xinpeng, et al. The study of diversities of marine microbes in China[J]. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 2010, 25(6): 651–658.
- [15] 张庆芳, 杨超, 于爽, 等. 黄海海域海洋沉积物细菌多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(2): 370–378.
Zhang Qingfang, Yang Chao, Yu Shuang, et al. Bacterial diversity of marine sediments in the Yellow Sea[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(2): 370–378.
- [16] Li Yifeng, Chen Yanwen, Xu Jiakang, et al. Temperature elevation and *Vibrio cyclitrophicus* infection reduce the diversity of haemolymph microbiome of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 16391.
- [17] Dong Pengsheng, Guo Haipeng, Wang Yanting, et al. Gastrointestinal microbiota imbalance is triggered by the enrichment of *Vibrio* in subadult *Litopenaeus vannamei* with acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736199.
- [18] Riquelme C, Toranzo A E, Barja J L, et al. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1996, 67(3): 213–218.
- [19] Ardiç N, Ozyurt M. Case report: otitis due to *Vibrio alginolyticus*[J]. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2004, 38(1/2): 145–148.
- [20] 封会茹, 游京蓉, 刘玉堂, 等. 溶藻弧菌引起暴发型食物中毒的病原学研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2003, 15(4): 331–334.
Feng Huiru, You Jingrong, Liu Yutang, et al. Research of one abrupt food poisoning caused by *Vibrio alginolyticus*[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2003, 15(4): 331–334.
- [21] 白瑶, 叶淑瑶, 江涛, 等. 水产品中创伤弧菌检测方法建立与应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2018, 30(6): 592–597.
Bai Yao, Ye Shuyao, Jiang Tao, et al. Development and application of detection method for *Vibrio vulnificus* in aquatic products[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2018, 30(6): 592–597.
- [22] 杨春晓, 方艳梅, 魏泉德, 等. 珠海市海产品中2种致病性弧菌污染状况[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(14): 1784–1785, 1792.
Yang Chunxiao, Fang Yanmei, Wei Quande, et al. Contamination of two kinds of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in Zhuhai[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2018, 28(14): 1784–1785, 1792.
- [23] Eckburg P B, Bik E M, Bernstein C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635–1638.
- [24] He Qi, Wang Lin, Wang Fan, et al. Microbial fingerprinting detects intestinal microbiota dysbiosis in zebrafish models with chemically-induced enterocolitis[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13(1): 289.
- [25] Bates J M, Mittge E, Kuhlman J, et al. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation[J]. *Developmental Biology*, 2006, 297(2): 374–386.
- [26] Li Yifeng, Guo Xingpan, Yang Jinlong, et al. Effects of bacterial biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 433(6): 434–441.
- [27] Yang Jinlong, Shen Peijing, Liang Xiao, et al. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to mono-specific bacterial biofilms[J]. *Biofouling*, 2013, 29(3): 247–259.
- [28] 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 Xuan, Guo Xingpan, Chen Yuru, 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.
- [29] Han Shaofeng, Liu Yuchun, Zhou Zhigang, et al. Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 42(1): 47–56.
- [30] Cahill M M. Bacterial flora of fishes: a review[J]. *Microbial Ecology*, 1990, 19(1): 21–41.
- [31] Bao Weiyang, Yang Jinlong, Satuito C G, et al. Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to *Aeromonas* sp.1: evidence for two chemical cues?[J]. *Marine Biology*, 2007, 152(3): 657–666.
- [32] 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.
- [33] Liang Xiao, Zhang Xiukun, Peng Lihua, et al. The flagellar gene regulates biofilm formation and mussel larval settlement and metamorphosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 710.
- [34] Peng Lihua, Liang Xiao, Chang Ruiheng, et al. A bacterial polysaccharide biosynthesis-related gene inversely regulates larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*[J]. *Biofouling*, 2020, 36(7): 753–765.
- [35] 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 Wei, Guo Xingpan, Xu Jiakang, 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.

Effects of intestinal bacterial biofilms on settlement process of larvae and plantigrades in *Mytilus coruscus*

Xu Jiakang^{1,2}, Wang Jinsong^{1,2}, Fang Yihan^{1,2}, Yang Jinlong^{1,2,3}, Liang Xiao^{1,2}

(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. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China)

Abstract: Ten strains of bacteria were isolated from the gut of *Mytilus coruscus* to study its role in the settlement of larvae and plantigrade by forming biofilms. Results showed that the inducing ability of the biofilms formed by ten bacteria were different, although all of them could induce the settlement of larvae and plantigrade. In larvae, *Bacillus* sp.4 showed high inducing activity, while *Phaeobacter* sp.1 had low inducing activity. In plantigrades, *Phaeobacter* sp.1 showed high inducing activity, while *Bacillus* sp.4 showed low inducing activity. The polysaccharides and proteins from biofilms formed by *Bacillus* sp.4 and *Phaeobacter* sp.1 impacted larval settlement and metamorphosis, and the cell density, thickness and extracellular lipids of biofilm showed no effect on inducing activity of larval settlement and metamorphosis. For plantigrades, biofilm's bacterial density, thickness and extracellular α -polysaccharide could induce plantigrades to the settlement, and the extracellular lipids and proteins of biofilms did not affect the settlement. This study is helpful for improving the healthy ecological culture of *M. coruscus* and to understand the settlement mechanism of *M. coruscus*.

Key words: intestinal bacteria; *Mytilus coruscus*; biofilm; inducing activity; settlement