

污损生物附着机理及酶在生物防污中的应用

The adhesive strategies of fouling organism and application of enzyme in antibiofouling

段东霞^{1,2}

(1. 海洋腐蚀与防护国防科技重点实验室, 山东 青岛 266001; 2. 中国船舶重工集团公司第七二五所 青岛分部, 山东 青岛 266001)

中图分类号: Q14

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)07-0107-06

生物污损(biofouling)是指生物在材料表面附着生长并造成危害的现象,根据附着生物类型可将生物污损分为微生物污损(microfouling)和大型生物污损(macrofouling)。微生物污损主要指细菌等微生物在材料表面附着并形成生物膜(biofilm)的现象。对于海洋工程材料,生物污损不仅涉及细菌等的附着,同时也包含藤壶、牡蛎等大型海洋生物的附着,后者称为大型生物污损。

微生物污损会加速金属材料腐蚀^[1]、非金属材料的降解^[2-3],降低构件的使用性能和安全性能,降低冷却管路的冷却效率,在医疗行业会导致人员感染患病,食品腐败等;宏观生物污损会增加船舶动力消耗、降低航行速度,影响舰船的机动性和战斗性能的发挥^[4],因而控制生物污损对国民经济和国防安全都非常重要。传统的防污方法主要通过使用有毒物质杀灭污损生物发挥防污作用,常用的包括施加杀菌剂和使用氧化亚铜防污涂料等,但随着抗药菌的出现及世界各国环保意识的增强,发展长效环保防污材料已经成为各国的研究重点。

不同于传统防污材料,环保型防污材料主要通过改变材料表面结构、物理化学性质及寻找环境友好的高效生物防污剂达到抑制污损生物附着,减少污损危害的目的。酶能够在温和条件下高效地催化化学反应,且自身在环境中容易降解,对环境没有危害,因而酶作为一种潜在的防污材料被广泛研究。本文结合污损生物附着机理,综述了酶在防污领域的最新研究进展。

1 典型污损生物的附着机理

生物污损过程大致分为 4 个阶段:第一个阶段

是蛋白质、多糖等可溶性有机碳(Dissolved organic carbon, DOC)在材料表面吸附形成条件膜;第二个阶段是细菌等原核微生物的附着和生物膜(biofilm)的形成;第三个阶段是真菌、藻类等生物的附着;最后是大型污损生物藤壶、牡蛎、贻贝等的附着。诸多研究结果表明生物污损发展的前一阶段对后续阶段生物的附着有重要影响:条件膜的形成不仅改变材料表面的物理化学性质,也影响后期细菌、微藻等的附着^[5-7];生物膜在材料表面的形成情况及性质决定了后续大型生物的附着情况^[8-11]。若前期生物膜演替过程被阻止则后续大型生物,特别是硬壳生物的附着将被阻止,因此对材料表面初期微生物污损进行防控不仅能够避免生物膜带来的危害,而且能够防止大型污损生物的附着。

1.1 细菌

生物膜是细菌生长过程中为适应生存环境而在固体表面上生长的一种与浮游状态相对应的存在形式。

生物膜广泛分布水环境中,它的形成经历了三个阶段:首先是细菌通过疏水性作用、静电作用力等在材料表面形成初始附着;随后细菌通过其表面的蛋白样成分与材料表面的受体形成特异性的吸附;最后细菌与细菌之间相互聚集,形成生物膜。

生物膜中 97% 以上的含量是水,除了水和细菌外,生物膜中还包括胞外多聚物(Extracellular poly-

收稿日期: 2010-07-15; 修回日期: 2010-10-23

基金项目: 国防基金项目(9140C250405100C25)

作者简介: 段东霞(1976-),女,博士,主要从事生物污损与腐蚀研究,电话: 0532-68725023, E-mail: duandx@sunrui.net

meric substance, EPS)、吸附的营养物质及细菌裂解产物等,因此生物膜中存在各种主要的生物大分子如蛋白质、多糖、DNA、RNA、肽聚糖、磷脂等物质^[12]。细菌浓度、菌龄、表面鞭毛、菌毛等附加结构、环境温度、流体力学、营养物种类与浓度、材料表面的物理化学性质等都影响细菌生物膜的形成。细菌到达物体表面时,其合成 EPS 的某些基因被激活,细菌大量分泌产生胞外多聚物。EPS 是形成生物膜的重要物质,它由多聚糖、蛋白质、核酸、糖蛋白、磷脂等构成。

不同细菌 EPS 的多糖组分差异很大,既可以是简单的均一多糖,也可以是复杂的非均一多糖,分子质量从 $10^3 \sim 10^8$ kDa 不等,主要由中性己糖、6-脱氧己糖、多元醇、糖醛酸和氨基糖构成。均一多糖主要由中性己糖,一般为 D-葡聚糖构成。非均一多糖通常是由双糖至八糖形成的规则重复单位构成,而这些重复单位则是由 2~4 种单糖所组成,其中许多糖被乙酰基团所修饰^[13]。

除多糖外,胞外多聚物中的另一个重要组分是蛋白质。生物膜中的蛋白质对膜结构有重要影响。虽然不同细菌形成的生物膜中蛋白质组分差异非常大,但是在不同细菌的生物膜中都发现了葡萄球菌 BAP 蛋白的同系物,该蛋白对于形成生物膜结构非常重要^[14]。另外,多种细菌生物膜的蛋白质中都含有 GGDEF 和 EAL(GlyGlyAspGluPhe/GluAlaLeu)序列,这些蛋白在调整胞外多糖分泌中具有重要作用^[14,15]。

生物膜的细菌间并不是孤立存在的,细胞与细胞之间通过群体感应信号分子(Quorum sensing, QS)相互交流, QS 能帮助细菌判断环境中同类细菌的数量,决定自身的生长、基因表达等。

1.2 微藻

海洋微藻具有种类多、数量大的特点,其中底栖硅藻是一种典型的污损微藻。硅藻的附着过程包括到达表面后的随机着陆、初始附着、滑行及永久附着四个步骤。硅藻的初始附着和永久附着都依赖于 EPS 的分泌。EPS 直接关系到生物膜的形成、垂直结构和硅藻栖息地的稳定。硅藻的胞外多糖各不相同,主要是糖醛和含硫的酸性多糖和蛋白糖,通常它们由戊糖、己糖、脱氧己糖、甲氧基和氨基己糖通过糖苷键连接形成的重复序列构成。不同硅藻分泌的多糖在单元组成和糖苷键链接上都存在很大差异。虽然硅藻 EPS 的组成非常复杂,不过学者们利

用二级离子飞行时间质谱发现 *Cylindrotheca closterium*, *Navicula mutica* 和 *Nitzschia cf. brevisissima* 的胞外多糖具有相同的结构片段^[18]。尽管目前尚未明确硅藻 EPS 中的何种成分(包括多糖、糖蛋白和蛋白糖等)主导硅藻细胞的附着过程,但相关研究已取得了一定进展。Wang 等^[19]发现抑制胞外多糖合成的药物 2, 6-二氯苯甲氰及其类似物能可逆地阻止长柄曲壳藻的附着和滑行,并导致柄状 EPS 永久附着结构无法形成。Lind 等^[20]研究表明硅藻胞外蛋白糖调节主要依靠蛋白糖中的蛋白质结构部分。

1.3 大型污损生物

大型污损生物主要包括藤壶、贻贝和巨型海藻等,它们在附着过程中具有相似性,都是以浮游阶段的孢子或幼虫形式附着在材料表面,然后发育成熟为产生严重危害的污损生物。

藤壶是常见的甲壳类动物,也是主要的污损生物。藤壶在整个生命周期中经历了营浮游生活的无节幼虫期和腺介幼虫期及固着生活时期。藤壶在腺介幼虫期寻找合适的基底材料附着、变态,在这一过程中向体外分泌胶质——醌-丹宁蛋白质。藤壶分泌的初生胶是透明的、无黏性流体,在 6 h 内通过键合作用逐渐聚合成不透明的“橡胶块”。在形成稳定的化学键前,胶质借助于表面细微结构,吸收或排水以利于对基材的成功黏接与材料表面形成交联膜。胶质与基材的实际黏接有时间依赖性,随时间的增长,黏结力有一个渐近增长^[21]。

藤壶胶质主要含有分子质量分别为 100, 68, 52, 20kDa 的蛋白质,并依次命名为 CP-100K, CP-68K, CP-52K, CP-20K。其中 CP-100K 和 CP-52K 是胶质的主要组分,他们不溶于水,主要通过二硫键和疏水作用相互聚合在一起。CP-68K 溶于水,该组分对于藤壶幼虫附着的影响不大。CP-20K 在藤壶胶质中虽然所占含量不高,但却具有重要作用,该组分约含有 17.5% Gly, 11.5% Asp, 10.4% Glu, 10.4% His。研究发现该组分中含有大量半胱氨酸残基,但是分子之间却没有二硫键,只在分子内部发现了二硫键^[22,23]。

贻贝也是沿岸和近海中较普遍的一种生物,在分类地位上属于软体动物门,瓣鳃纲。贻贝的足丝腺能分泌足丝使其附着在材料表面。足丝由胶原腺和辅助腺分泌的蛋白质类物质组成。蛋白质主要为多酚蛋白质。富含赖氨酸的多酚蛋白质与黏液腺分泌

的富含硫酸盐的黏多糖能在基材表面置换水。实验表明贻贝的实际黏接聚合物是多酚蛋白。化学作用键主要包括氢键，多酚蛋白的赖氨酸与生物膜黏液中的硫酸基团形成的离子键，及多酚蛋白与细菌膜酸性聚合物之间形成的离子键。足丝的产生受温度、盐度、流速和贻贝的年龄等因素的影响^[21]。贻贝足丝中主要含有 5 种蛋白质，其中组分 Mefp 1 研究的最清楚。Mefp 1 含有 75 ~ 80 个六肽和十肽重复单元构成的线性序列。Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Dhp-Hyp-Thr-DOPA-Lys 是最常见的重复序列，重复单元中很多残基被羟基化和二羟基化。Mefp 1 中酪氨酸经羟基化后形成苯丙氨酸(DOPA)。Mefp 2 和 Mefp 4 是构成足丝的主要蛋白，这两种蛋白中 DOPA 的含量较低。Mefp3、Mefp5 在刚分泌的足丝液体中含量较高，这两种组分中含有较高含量的 DOPA，其中 Mefp 5 中的 DOPA 残基很快与赖氨酸反应形成

连接^[21,23-24]。

孔石莼作为大型海藻的代表在污损生物中具有代表性。孢子的附着和细菌的附着过程相似，都有初始附着和永久附着两个阶段，当孔石莼孢子黏附在材料表面时，孢子会产生大量糖蛋白。

藤壶、贻贝和大型海藻分泌的蛋白质中都含有丰富的赖氨酸，这决定了大型污损生物的胶质具有类似的等电点。另外，这些蛋白质中丝氨酸和甘氨酸的含量也很高，这就造成大型海洋生物的胶黏蛋白在构象上具有弹性。除藤壶胶黏剂之外，其他大型生物的胶质中都含有大量苯丙氨酸，苯丙氨酸被生物体中的酶氧化成苯丙氨酸-醌后可以与其他氨基酸进一步发生交联，使得胶黏蛋白固化^[25]。

表 1 中列出了主要污损生物胶黏剂的化学性质，从表中可知大部分污损生物，特别是大型污损生物胶质的主要成分蛋白质。

表 1 主要污损生物胶黏剂成分一览表

生物种类	细菌	微藻	巨型藻	藤壶	贻贝
胶黏剂成分	多聚糖 /蛋白质	多聚糖 络合物	多聚糖- 蛋白络合物	醌-丹宁蛋白	多酚蛋白

大型污损生物在材料表面的附着受材料表面微观结构、光照情况、流体动力学和基底材料性质影响，同时也受材料表面生物膜的影响。一些种类的海洋细菌可以促进大型生物的附着，另外一些菌种则对相同的海洋生物附着有抑制作用。生物膜的这种作用在藤壶、多毛环虫、贻贝、扇贝、苔藓虫、海星、海鞘、鲍鱼、海参、孔石莼中都有发现。生物膜对大型污损生物的附着可解释为生物膜中的微生物产生了对大型海洋生物附着不利的代谢产物。目前发现的由微生物产生的防污活性物质包括 8-泛醌、类生物碱物质等^[4]。Dobretsov^[26]在生物膜对苔藓虫附着影响的研究过程中发现若生物膜中的微生物能够产生蛋白酶，则该生物膜对苔藓虫的附着有抑制作用，相反对藤壶幼虫附着有促进作用的生物膜中则不含蛋白酶。

2 酶的特性

酶是由生物细胞产生的，具有催化能力的生物催化剂。除少数为核酸外，绝大多数酶的本质为蛋白质。作为生物催化剂，酶对催化的底物有高度的选择性，往往只能催化一种或一类反应。根据各种酶所催

化的化学反应类型可把酶分为 6 大类，即水解酶、氧化还原酶类、转移酶、裂合酶、异构酶和连接酶。

生物细胞产生的酶有两类，一类是由细胞分泌到细胞外进行作用的酶，即胞外酶，这类酶大多数是水解酶类。另一类酶在细胞内合成后并不分泌到细胞外，而是在细胞内起催化作用，称为胞内酶。

根据酶大多数属于蛋白质这一特性，用一系列分离蛋白质的方法可以进行酶的分离纯化，例如盐析、等电点沉淀、有机溶剂分级及选择性热变性等方法可用于酶的粗分离。粗酶可利用层析、高效液相及电泳方法进一步纯化。一般而言，胞外酶壁胞内酶更易于分离纯化。

3 酶在防污中的应用

在各种类型的酶中，水解酶的防污研究最为广泛。水解酶能够催化脂键、糖苷键、醚键、肽键、酸苷键及其他 C-N 键共 11 个亚类的水解反应，常见的有蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等。水解酶主要通过四个途径实现其防污作用：(1)分解生物膜中的高分子聚合物，主要是 EPS；(2)分解生物信息交换的群感

效应信号分子; (3)直接分解污损生物分泌并用于附着的胶质; (4)促进材料中防污物质的释放。

3.1 酶在微生物污损防治中的应用

几乎所有的细菌在一定条件下都可以形成生物膜,造成微生物污损。水解酶通过降解生物膜中的EPS和群感效应信号分子实现防涂生物膜目的。

因为生物膜的主要成分是多糖、蛋白质等生物大分子,它们对细菌、硅藻的附着产生重要影响。因而分解糖和蛋白质的水解酶就可能具有控制生物膜的作用,这一猜测已被很多研究所证实。Yannick等^[27-31]研究了多种商业化的水解酶对细菌生物膜的清除效果。研究表明,水解酶对生物膜的清除效果受水解酶性质和生物膜中细菌的种类影响。在所研究的糖酶(淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶、葡聚糖酶、几丁质酶、壳聚糖酶等)、蛋白酶(枯草杆菌蛋白酶,木瓜蛋白酶等)和脂肪酶中,蛋白酶和糖酶的防污效果较好,其余水解酶的防污效果一般,甚至会对生物膜的形成起促进作用。丝氨酸蛋白酶对生物膜的清除具有广谱性^[27],不仅对多种单一细菌的生物膜有很好的去除效果^[29],对混合细菌的生物膜也有很好的去除效果^[31]。水解酶对生物膜的清除效果受环境pH影响,在碱性缓冲液中水解酶能够清除更多种细菌的生物膜,清除率也更高。利用添加了表面活性剂的溶液溶解酶,并进行适当的分散、螯合后生物膜的去除效果更好^[29]。水解酶不仅能很好地预防生物的形成,也能有效地清除材料表面已形成的生物膜。水解酶对生物膜的分解和抑制作用,不受添加时间的影响。水解酶对生物膜的防除作用主要是通过分解生物膜内大分子起作用,而不是通过抑制细菌的呼吸即杀灭细菌细胞本身起作用^[27]。糖酶对细菌^[27]和硅藻^[32-33]的作用在大多数情况下不如丝氨酸蛋白酶,这主要是因为生物膜中胞外多糖结构复杂多变,很难找到对多种细菌和硅藻的胞外多糖起作用的糖酶。

群感效应信号分子在生物膜形成过程中具有重要作用。革兰氏阴性菌的群感效应分子N-酰化高丝氨酸内酯类物质(acyl-homoserine lactone, AHL)是快速形成生物膜的基础。近来,科学家已经发现能够水解AHL酰胺键的酰胺酶,该酶对生物膜的形成有抑制作用^[34]。另外,因为高浓度的AHL能够促进石莼孢子和多毛环虫幼虫的附着^[35],因而可以推断酰胺酶也能够抑制大型生物污损。

3.2 酶对大型污损生物的防污作用

目前全球已知的大型污损生物共有4000多种,我国海域的污损生物有600多种,其中主要包括海藻、藤壶、苔藓虫、海绵、水螅等。污损生物主要附着在船舶的水下部位、水线区、螺旋桨和海水管道等,可引起舰船表面粗糙度增加、自重增大、航行阻力增大、航速减慢、燃料消耗增多,造成舰船进坞维修频率增多,严重影响舰船在航率和使用寿命,而且污损生物还会阻塞海水管道、干扰声纳信号、造成材料结构损坏,严重影响舰船战斗力的发挥。

Pettitt^[33]研究了包括脂肪酶、纤维素酶、葡萄糖淀粉酶、混合酶等24种酶的防污效果。其中丝氨酸蛋白酶(Alcalase)在防止绿藻孢子和藤壶幼虫附着方面具有最佳效果。Nick Aldred利用原子力显微镜研究了丝氨酸蛋白酶Alcalase对藤壶(*Balanus amphitrite*)胶质的分解作用,结果显示蛋白酶作用600~1400s后,胶质的黏附力从340pN降至150pN,随后附着力直线降至0。蛋白酶Alcalase作用26min后藤壶幼虫分泌的胶质就可被完全分解。研究还发现蛋白酶对藤壶幼虫的活动如游动速度(velocity)、移动距离(distance moved)、移动角度(turn angle)都没有影响。不过与微生物污损不同,水解酶对已经固化的藤壶胶质没有分解作用^[35]。

4 酶在防污应用中需要解决的问题

酶应用于防污有两大优点:第一,很多酶已经实现工业化生产且广泛应用于医药、食品、洗涤剂等行业;第二,酶在海水中12天内即被完全分解为氨基酸并进一步分解为水和二氧化碳,所以酶作为防污材料不会额外增加环境负担。目前很多廉价的酶制剂已经表现出较好的防污效果且以丝氨酸蛋白酶为代表的水解酶具有较好的广谱性,不仅能清除材料表面的生物膜而且对藤壶胶质有很强的分解作用,因而酶作为防污材料表现出良好的应用前景。当然我们也应看到酶作为防污材料若要获得实际应用还要攻克很多技术难题。首先要解决酶在涂料中活性的长期保持问题。酶作为工业化产品,一般都比较稳定,具有较长的保质期。但是涂料作为一种复杂的有机体系会对酶产生多种影响,甚至会导致酶失活,所以选择与防污酶相匹配的涂料体系,同时采用多种技术手段增强酶在涂料中的稳定性就成为目前科研工作者的研究重点。Tasso等^[36]已成功将丝氨酸蛋

白酶 Subtilisin A 接枝到马来酸酐树脂上并形成了涂料, 实验结果显示酶经处理后防污效果显著提高。另外, 对水解酶的筛选和进一步复配是一个长期工程, 除了对商业化生产的酶进行防污效能评价, 筛选出有防污应用前景的酶外, 还应注意开发新的适于海洋环境和涂料体系的防污用酶。

5 展望

利用酶作为防污材料为我们提供了一种新的生物污损防除方法, 它的应用适应了目前环保型防污材料的需求, 并推动了对污损生物生态、附着机理及防除等各个方面研究的深入。水解酶特别是丝氨酸蛋白酶表现出的良好防污效果, 已经引起各国科研机构及相关生产厂商的重视, 纷纷投入巨资开发酶防污涂料。例如丹麦的 Biolocus 公司已开发出多种应用与海洋防污的酶制剂并与 JOTUN 公司合作生产了酶涂料。该种涂料已在快艇上推广应用。GENECORE 公司和 HEMPEL 公司合作开发了基于己糖酶和过氧化氢酶联合生产过氧化氢进行防污的防污涂料。我国酶防污材料的研究还处于起步阶段, 与国外的差距比较大。鉴于酶作为防污材料具有容易实现工业化生产、防污效果佳且对环境友好等特点, 所以有必要加大酶作为防污材料的研究力度。

参考文献:

- [1] Little B, Wagner P, Mansfeld F. Microbiologically influenced corrosion of metals and alloys[J]. International Materials Reviews, 1992, 36(6): 253-272.
- [2] Legonkova O A, Selitskaya O V. Microbiological destruction of composite polymeric materials in soils[J]. Eurasian Soil Science, 2009, 42(1): 62-68.
- [3] Ji-Dong Gu. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 52(2): 69-91.
- [4] 方芳, 严涛, 刘庆. 化学生态学在海洋污损生物防除中的应用 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(10): 1997-2002.
- [5] Wahl M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling—some basic aspects[J]. Marine Ecology Progress Series, 1989, 58(12): 175-189.
- [6] Schneider R P, Chadwick B R, Pembrey R, et al. Retention of the Gram-negative bacterium Sw8 on surfaces under conditions relevant to the subsurface environment effects of conditioning films and substratum[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1994, 14(3): 243-254.
- [7] Jain A, Bhosle NB. Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion[J]. Biofouling, 2009, (25): 13-19.
- [8] 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.
- [9] Holmström C, Kjelleberg S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30(4): 285-293.
- [10] Tait K, Joint I, Daykin M, et al. Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(2): 229-240.
- [11] Zardus J D, Nedved B T, Huang Y, et al. Microbial biofilms facilitate adhesion in biofouling invertebrates[J]. the Biological Bulletin, 2008, 214 (1): 91-98.
- [12] Sutherland I W. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment[J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(5): 222-227.
- [13] 李江, 陈靠山, 郝林华, 等. 细菌胞外多糖的研究进展[J]. 海洋科学, 2006, 30(4): 74-77.
- [14] Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development[J]. International Microbiology, 2006, 9(1): 21-28.
- [15] Latasa C, Solano C, Penadés J R, et al. Biofilm-associated proteins[J]. Comptes Rendus Biologies, 2006, 329: 849-857.
- [16] Poulsen N C, Spector I, Spurck T P, et al. Diatom gliding is the result of an actin—myosin motility system[J]. Cell Motility Cytoskel, 1999, 44(1): 23-33.
- [17] Holland R, Dugdale T, Wetherbee R, et al. Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer[J]. Biofouling, 2004, 20(6): 323-329.
- [18] Brouwer J F C, Cooksey K E, Wigglesworth-Cooksey B, et al. Time of flight-secondary ion mass spectrometry on isolated extracellular fractions and intact

- biofilms of three species of benthic diatoms[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65: 562-572.
- [19] Wang Y, Lu J, Mollet J C, et al. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae) II. 2,6-dichlorobenzonitrile inhibition of motility and stalk production in the marine diatom *Achnanthes longipes*[J]. Plant Physiology, 1997, 113(4): 1071-1080.
- [20] Lind J L, Heimann K, Miller E A, et al. Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans[J]. Planta, 1997, 203(2): 213-221.
- [21] 宋永香, 王志政. 海洋生物及其黏附机理——藤壶、帽贝、海葵、管栖蠕虫[J]. 中国胶黏剂, 2003, 12(4): 60-63.
- [22] Aldred N, Clare S A. The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings[J]. Biofouling, 2008, 24(5): 351-363
- [23] Wiegemann M. Adhesion in blue mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): mechanisms and technical adaptations[J]. Aquatic Science, 2005, 67(2): 166-176.
- [24] Sagert J, Sun C, Waite J H. Chemical subtleties of mussel and polychaete holdfasts[C]. Smith A M, Callow J A. Biological Adhesives. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2006.
- [25] Callow J A, Stanley M S, Wetherbee R, et al. Cellular and molecular approaches to understanding primary adhesion in Enteromorpha: an overview[J]. Biofouling, 2000, 16(2): 141-150.
- [26] Dobretsov S, Xiong H, Xu Y, et al. Novel antifoulants: inhibition of larval attachment by proteases[J]. Marine Biotechnology, 2007, 9: 388-397.
- [27] Johansen C, Falholt P, Gram L. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms[J]. Applied Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3724-3728.
- [28] Xavier J B, Picioreanu C, Rani S A, et al. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix- a modelling study[J]. Microbiology, 2005, 12(151): 3817-3832.
- [29] Yannick L, Gauthier B, Martine C, et al. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry[J]. Biofouling, 2010, 26(4): 421-431
- [30] Leroy C, Delbarre C, Ghillebaert F, et al. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium[J]. Biofouling, 2008, 24(1): 11-22.
- [31] Hangler M, Burmølle M, Schneider I B, et al. The serine protease Esperase HPF inhibits the formation of multispecies biofilm[J]. Biofouling, 2009, 25(7): 667-674.
- [32] Chiovitti A, Higgins M J, Harper R E, et al. The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae) [J]. Journal of Phycology, 2003, 39: 543-554.
- [33] Pettitt M, Henry S, Callow J, et al. Activity of commercial enzymes on settlement and adhesion of cypris larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*, spores of the green alga *Ulva linza*, and the diatom *Navicula perminuta*[J]. Biofouling, 2004; 20(6): 299-311.
- [34] Zhang L H, Lin Y H, Xu J L. Ralstonia AHL-acylase gene, WO/2003/068951, 2003-08-21.
- [35] Huang S, Hadfield M G. Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2003, 260: 161-172.
- [36] Tasso M, Pettitt M E, Cordeiro AL, et al. Antifouling potential of Subtilisin A immobilized onto maleic anhydride copolymer thin films[J]. Biofouling, 2009, 25(6): 505-516.

(本文编辑: 康亦兼)