

低盐度形成的微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响

杨金龙^{1,2,3}, 李响¹, 王冲⁴, 凌云¹, 包卫洋⁵, 沈和定^{1,2,3}, 李家乐^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物遗传育种中心, 上海 201306; 4. 滨州市海洋与渔业研究所, 山东 滨州 256616; 5. 扬州大学海洋科学与技术研究所, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为研究环境因子在厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)稚贝附着过程中的调控作用, 作者探讨了低盐度对微生物膜生物构成、群落结构的影响及所形成微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响。在实验室条件下, 研究微生物膜的日龄与干质量、细菌密度和硅藻密度、叶绿素 a 含量的关系及其对厚壳贻贝稚贝附着的影响。通过 DGGE 指纹图谱技术对微生物膜中的细菌群落结构多样性进行了分析。研究发现, 盐度 13 和 23 时形成的微生物膜能有效促进厚壳贻贝稚贝的附着, 且盐度 23、28 d 时稚贝附着率最高, 达到 72%。相关性分析表明, 微生物膜的诱导活性与盐度、干质量、细菌密度、硅藻密度、日龄呈显著正相关性, 与叶绿素 a 无相关性。微生物膜的干质量、附着细菌密度及底栖硅藻密度明显随着日龄的增加而增加, 叶绿素 a 含量与微生物膜日龄无显著相关性。细菌群落在厚壳贻贝稚贝附着过程中发挥重要调控作用。

关键词: 厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*); 稚贝; 微生物膜; 盐度; 附着

中图分类号: Q958 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)08-0107-07

在海洋环境中, 当一个物体浸入海水, 海洋细菌将迅速附着在其表面, 并生长、繁殖, 随后同繁殖的硅藻、真菌、原生动物以及有机碎屑和无机颗粒等形成一层微生物膜^[1-2]。微生物膜是污损生物的重要组成部分, 能诱导海洋污损动植物的附着变态, 与生物污损的形成关系密切^[3-4], 是许多海洋无脊椎动物附着和变态的重要自然诱导物。同时, 微生物膜是船舶等浸水设施表面上最早附着的生物层, 是一个复杂但可控的微型生态系统^[5], 其形成加速了大型污损生物的附着, 从而引起船舶及海上工程设施的生物污损及微生物腐蚀, 由此而造成巨大的经济损失^[6]。因此, 研究微生物膜对海洋无脊椎动物幼虫的附着变态行为对于水产养殖苗种生产技术的改善和海洋防污技术的发展具有极其重要的理论意义和实践意义^[7]。

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)作为中国重要的贝类养殖品种, 而且也是主要的海洋筏式养殖附着生物之一, 分布于黄海、渤海和东海沿岸, 其中以浙江沿海资源量最大。近年来, 人为过度采伐导致厚壳贻贝自然资源逐渐减少, 自然海区附苗数量和质量明显下降, 厚壳贻贝养殖产业受到影响。目前, 厚壳贻贝规模化人工繁殖技术一直没有得到很好的解决,

育苗数量不稳定, 导致苗种供不应求。与许多其他海洋无脊椎动物一样, 厚壳贻贝幼体也要经过重要的阶段——附着和变态, 在变成附着稚贝后, 其附着数量直接影响着苗种的产量。

大量研究证明微生物膜能诱导地中海紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)^[8]、新西兰贻贝(*Perna canaliculus*)^[9]、大珠母贝(*Pinctada maxima*)^[10]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[11]、杂色鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)^[12]等多种经济贝类幼体的附着和变态, 但有关微生物膜对贝类稚贝附着的影响的研究鲜有报道。本课题组已证明微生物膜诱导厚壳贻贝幼体附着和变态^[13]。然而, 不同盐度条件下形成的微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响的尚未得知。作者研究了低盐度下形成的微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响, 通过分析微生物膜的干质量、细菌密度、硅藻密度、叶绿素 a 的含量以及微生物膜细菌群落多样性, 来探究微生物膜对厚壳贻贝稚

收稿日期: 2013-06-06; 修回日期: 2013-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101885); 上海市科委重点支撑项目(12230502100)

作者简介: 杨金龙(1980-), 男, 山东烟台人, 副教授, 博士, 主要从事海洋贝类幼体生物学、海洋化学生态学及分子微生物学等方面的研究, 电话: 021-61900440, E-mail: jlyang@shou.edu.cn

贝附着的影响因素,旨在为提高厚壳贻贝苗种中间培育提供相应的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 稚 贝

实验用厚壳贻贝稚贝取自浙江省舟山市嵊泗县海洋科技开发服务中心,壳长(3.1 ± 0.5)mm,壳高(2.2 ± 0.5)mm,运回实验室后暂养1周后用于实验。暂养期间,培育水温为 18℃,充气培育,每天换水及投喂金藻(*Isochrysis galbana*)。

1.1.2 微生物膜形成

实验所需的室内微生物膜形成于光照培养箱(新苗 GZX-300BS-)中,温度控制在 18℃,光照强度为 10 000 lx,光照周期比为 14 h: 10 h。形成微生物膜所用的玻璃片为 26 mm × 38 mm,灭菌后垂直置于人工配置的海水中。海水盐度为 13、23,借助 REF201 手持盐度折光仪进行校对,每隔 3 d 换一次水。微生物膜的日龄设为 7、14、21、28 d,每个日龄设置 3 个重复。

1.2 实验方 法

1.2.1 微生物膜干重测量

用灭菌玻璃片将微生物膜从载玻片上刮至灭菌海水中,过滤至 GF/C 滤膜(whatman 玻璃纤维滤膜,1.2 μm),干燥箱中干燥,设置温度为 80℃,48 h 后对其干质量进行测量。

1.2.2 微生物膜中的附着细菌和底栖硅藻计数

细菌和硅藻密度计数参考 Bao 等^[3]的方法进行。简单来说,细菌计数时,将微生物膜固定在 5%的福尔马林溶液中,吖啶橙(0.1%)染色 5 min 后,1000 倍荧光显微镜下随机选取 10 个点进行计数。硅藻计数时,将含有微生物膜的载玻片直接置于 200 倍光学显微镜下、随机选取 10 个点进行计数。

1.2.3 微生物膜叶绿素 *a* 的测定

将载有微生物膜的过滤滤膜(0.45 μm,纤维素酯微孔滤膜)放入具塞离心管中,加 90%丙酮溶液 10 mL 摇荡,4℃14 h 后,漩涡振荡仪振荡 1 h。然后,离心 3 000 r/min,10 min 后取上清液在 UNIC 2100 分光光度计上,用 1 cm 光程的比色皿,分别读取 750、664、647、630 nm 波长的吸光度,以 90%丙酮浸泡的空白滤膜作为空白对照,按如下公式计算叶绿素 *a* 含量^[14]:

叶绿素 $a = [12.12 \times (D_{664} - D_{750}) - 1.58 \times (D_{647} - D_{750}) - 0.08 \times (D_{630} - D_{750})] \times V_e \times d \div A$

式中: V_e 为恒定的提取液体积(L), D 为吸光度, d 为微生物膜的面积(cm^2), A 为比色皿光程(cm)。

1.2.4 附着细菌的 DNA 提取

将不同日龄的微生物膜载玻片从海水中取出,在无菌操作台中,将微生物膜收集到 2 mL 离心管中,经 10 000 g,离心 5 min,弃上清液,-20℃保存备用。解冻保存的微生物膜样品,使用 3S 柱离心式环境样品 DNA 回收试剂盒 V2.2 进行基因组总 DNA 的提取。

1.2.5 PCR 扩增

采用细菌 16S rDNA V3 区序列通用引物进行扩增,引物为 357f-GC(5'-CGC CCG CCG C GC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')和 518r(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'),扩增总体系为 50 μL: 模板 DNA 2 μL,4×dNTPs (10 μmol/L)1 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)1 μL,引物(20 pmol/μL)各 1.5 μL,10×扩增缓冲液(含 Mg^{2+})5 μL,用 ddH₂O 补至 50 μL。PCR 反应在 Mastercycler gradient(eppendorf)上进行,PCR 扩增条件:94℃预变性 5 min,20 个循环的降落 PCR(94℃变性 1 min,退火 30 s,72℃延伸 3 min,退火温度由 65℃降到 55℃,每一循环递减 0.5℃),15 个循环(94℃变性 1 min,55℃退火 30s,72℃延伸 3 min),72℃延伸 10 min,4℃保存。PCR 扩增产物使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检验。

1.2.6 细菌群落结构分析

使用 Bio-Rad 公司 D-code System 电泳仪进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离。制备聚丙烯酰胺凝胶,浓度为 8%,变性梯度为 40%~70%(7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺为 100%变性),电泳缓冲液为 1×TAE,60℃,60V 条件下电泳 10 h。电泳结束后,用溴乙锭染色 15 min,紫外拍照,并采用软件 Quantity one(Bio-rad)对 DGGE 图谱进行多样性指数分析。

1.2.7 稚贝附着实验

将载有微生物膜的载玻片放入盛有 20 mL 灭菌海水的培养皿(Ø64 mm × 19 mm)中,每个培养皿中放入 10 只稚贝,每个日龄设置 5 个平行组,以空白载玻片作为对照。实验温度为(18±1)℃,黑暗条件。实验 12、24 和 48 h 时,记录稚贝的附着率,即载玻片上附着的稚贝个数占该培养皿中稚贝总数的百分比。

1.2.8 数据处理

在统计分析前,所有数据进行了正态分布检验。

如满足正态分布,且方差相同,则通过单因素方差分析方法(One-Way ANOVA)进行分析。如不满足正态分布,则通过 Kruskal-Wallis Test 检验进行评估检验。同时,进行相关性检验。分析采用 JMP 统计软件, $P < 0.05$ 作为差异显著。DGGE 电泳图谱采用 Bio-rad Quantity one 4.6.2 分析软件对泳道和条带进行识别和定位,计算细菌群落多样性的 Shannon 多样性指数(H),其计算公式为 $H = -\sum_{i=1}^{i=n} p_i \ln p_i$, 式中, n 为每个样品中条带总数, p_i 为每个条带的相对强度。

2 结果

2.1 低盐度下形成的微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着的影响

同一盐度下,微生物膜在 12、24 和 48 h 对厚壳贻贝稚贝附着的诱导基本相似,因而本研究仅出示 12 h 的诱导效果,其结果如图 1 所示。与对照组(0 d)相比,盐度 13 和 23 时形成的微生物膜均能促进厚壳贻贝稚贝的附着($P < 0.05$)。盐度 13 时,不同日龄的微生物膜对稚贝附着诱导效果之间无显著差异($P > 0.05$),21 d 的微生物膜对稚贝附着的诱导达到最大,为 50%。同样,盐度 23 时,不同日龄的微生物膜对

稚贝诱导活性之间无显著差异($P > 0.05$),在 28d 的微生物膜诱导下附着率达到最大,为 72%。在高日龄(28 d)时,两者活性无显著性差异($P > 0.05$),但随着盐度的增大,稚贝附着率也随之升高,相关性分析表明微生物膜的诱导活性与盐度显著相关($P < 0.05$, 表 1)。低盐条件下,微生物膜的诱导稚贝附着率与干质量显著相关($P < 0.05$)。同样,细菌密度($P < 0.05$)和硅藻密度($P < 0.05$)明显与稚贝附着率呈显著性相关关系(表 1)。

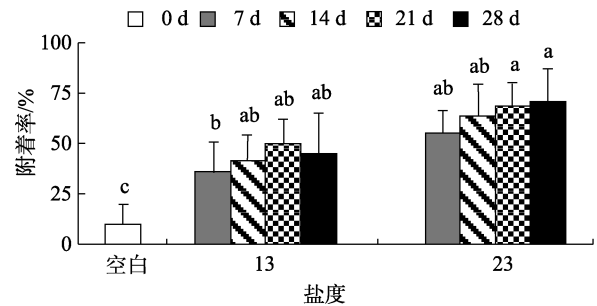


图 1 低盐度时形成的微生物膜对厚壳贻贝稚贝附着率的影响

Fig. 1 Settlement rates of *Mytilus coruscus* plantigrades on biofilms formed on low salinities

图中不同小写字母表示显著性差异,以下同此

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

表 1 低盐时,微生物膜日龄及诱导稚贝附着率与干质量、细菌密和硅藻密度间的相关性

Tab. 1 Correlation between age or settlement (%) and dry weight, bacterial and diatom densities

	盐度	干质量		细菌密度		硅藻密度	
		r	P	r	P	r	P
日龄	13	0.892	<0.0001	0.970	<0.0001	0.946	<0.0001
	23	0.787	0.002	0.979	<0.0001	0.958	<0.0001
附着率	13	0.736	0.006	0.592	0.042	0.665	0.018
	23	0.712	0.009	0.639	0.025	0.618	0.032

r 为相关系数

2.2 微生物膜中的干质量、细菌密度、硅藻密度与盐度、日龄的关系

低盐条件下,微生物膜的干质量、细菌和硅藻密度随日龄变化如图 2 所示。盐度 13 时,随着日龄的增加,干质量逐渐增加,在 28 d 达到最大值($P < 0.05$, 图 2-A)。盐度 23 时,干质量 14 d 时明显增加($P < 0.05$),21 d 和 28 d 虽有增加,但无显著性差异($P > 0.05$)。低盐条件下,附着细菌密度均随着日龄的增加呈显著增加趋势($P < 0.05$),28 d 时达到最高,分别为 $9.4 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^6$ 个/cm² 和 $11.1 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^6$ 个/cm² (图 2-B)。同样,盐度 13 和 23 时形成微生物膜中的硅

藻密度均随着日龄增加呈明显增加趋势($P < 0.05$, 图 2-C)。低盐条件下,微生物膜干质量、细菌和硅藻密度与日龄关系如表 1 所示。盐度 13 和 23 时,微生物膜的干质量明显与日龄呈显著性相关($P < 0.05$),其中的细菌($P < 0.05$)和硅藻密度($P < 0.05$)也与日龄显著相关,其相关性系数均大于 0.9。

2.3 低盐条件下形成微生物膜中叶绿素 a 含量变化

微生物膜中叶绿素 a 的含量,在盐度 13 时,14 d 与 21 d 叶绿素 a 含量之间无显著差异($P > 0.05$, 图 3),其他日龄间存在显著差异($P < 0.05$)。盐度 23、14 d

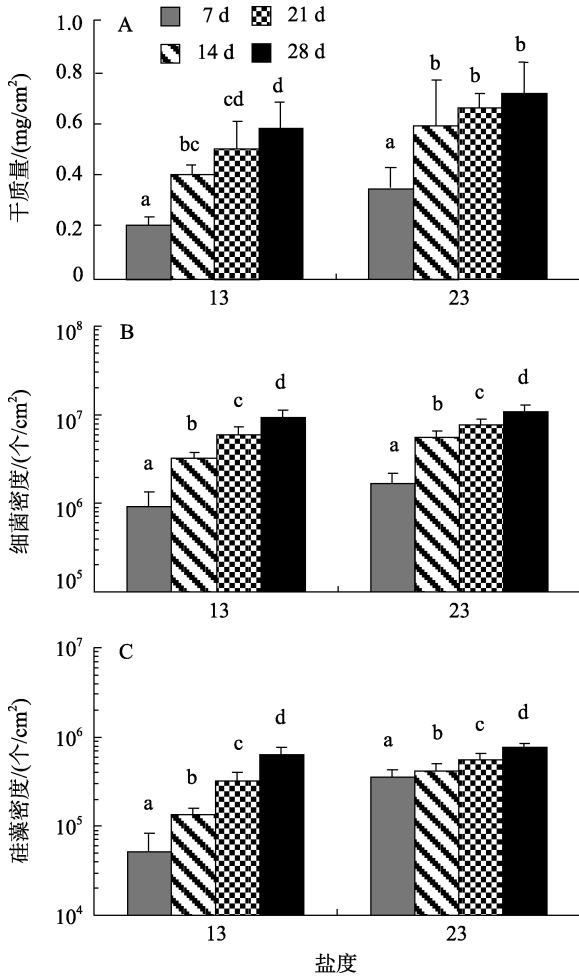


图2 低盐时形成的微生物膜中的干质量(A)、细菌密度(B)和硅藻密度(C)

Fig. 2 Dry weight(A), bacterial density(B) and diatom density(C) of biofilms formed on low salinities

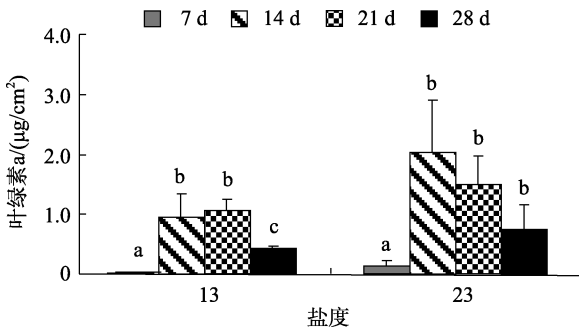


图3 低盐时形成微生物膜中的叶绿素 a 含量变化

Fig. 3 Chlorophyll a content in biofilms formed on low salinities

时叶绿素 a 的含量达到最高值, 为 2.03 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 21、28 d 微生物膜中的叶绿素 a 含量之间无显著性增加 ($P > 0.05$)。相关性分析发现, 盐度 13 时形成的微生物膜其日龄与叶绿素 a 无显著的正相关性 ($P > 0.05$)。

同样, 盐度 23 时形成的微生物膜, 其日龄与叶绿素 a 无正相关性 ($P > 0.05$)。

2.4 微生物膜中细菌群落多样性分析

不同盐度、日龄下微生物膜中细菌 DGGE 指纹图谱如图 4 所示。DGGE 图谱中条带的数量可以反映样品的细菌多样性, 条带信号的强弱可以反映细菌的相对含量, 通过软件 Bio-rad Quantity one 4.6.2 分析每个样品的条带数目和亮度, 研究低盐条件下、日龄的微生物膜中细菌的种类数量和相对含量, 得出微生物膜中细菌多样性信息(表 2)。由表 2 可知, 在不同的盐度下, 随着日龄的增加, 微生物膜中细菌 DGGE 图谱的条带数有所增加, 其中盐度 13 时最为明显。同时, 低盐度条件下, 微生物膜中的细菌多样性指数随着日龄的增加不断上升, 在 28 d 时细菌多样性指数均达到最高, 分别为 1.98 和 2.27。在 DGGE 指纹图谱基础, 开展了细菌群落结构的聚类分析, 其结果如图 5 所示。研究发现, 盐度 13 时, 7 d 微生物膜与 14 d 微生物膜的相似性很高为 64%, 21 d 微生物膜与 28 d 微生物膜的相似性很高为 59%。盐度 23 时, 21 d 微生物膜与 28 d 微生物膜的相似性很高为 62%, 这 2 个日龄微生物膜与 14 d 和 7 d 的微生物膜的相似性分别为 58%和 50%。

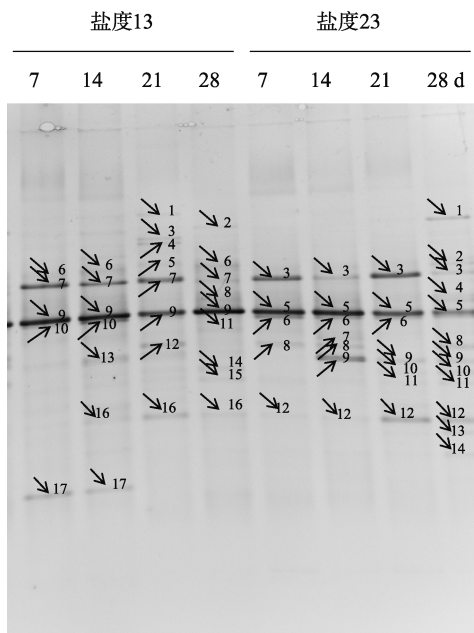


图4 低盐条件下, 不同日龄微生物膜样品 DGGE 指纹图谱
Fig. 4 DGGE fingerprints of biofilms formed on low salinities

表 2 低盐时形成微生物膜中细菌群落多样性指数
Tab.2 Analysis of bacterial community diversity in biofilms formed on low salinities

盐度	日龄(d)	条带数(条)	Shannon 多样性指数
13	7	5	1.53
	14	7	1.77
	21	8	1.87
	28	9	1.98
23	7	5	1.73
	14	7	1.85
	21	7	1.85
	28	12	2.27

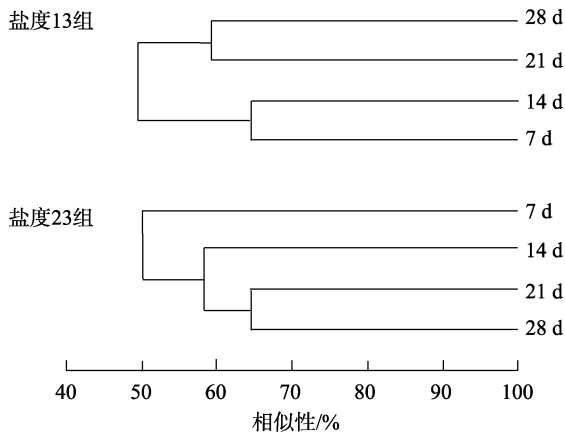


图 5 低盐时形成微生物膜中的细菌 DGGE 指纹图谱的聚类分析
Fig. 5 Dendrogram generated from the DGGE profiles

3 讨论

本研究首次证明盐度影响微生物膜形成过程中的生物构成、群落结构，从而影响其对厚壳贻贝稚贝的附着率也随之升高，微生物膜的诱导活性与盐度呈显著相关。因而，盐度不仅是海洋无脊椎动物生存的一个重要环境因子，而且也是影响海洋无脊椎幼体附着和变态的物理因子^[15]。

目前的研究发现，在单一盐度条件下，厚壳贻贝稚贝在微生物膜表面的附着率无显著性差异，但随微生物膜日龄的增长而呈逐渐增加的趋势，这与以往微生物膜对厚壳贻贝幼体附着的研究结果一致^[13]。然而，杂色鲍的研究中发现其幼虫的附着变态并不随着微生物膜日龄的增加而增加^[12]，这有可能与研究的物种不同而有区别。另外，低盐时所形成微生物膜其日龄与均与微生物膜的干质量、细菌密度和硅藻密度存在显著的正相关性，而与所含的叶绿素 a 却不存在显著性相关。同样，在海域形成的自然微生

物膜研究中发现，其日龄与微生物膜的干重、细菌密度和硅藻密度显著相关，而与所含的叶绿素 a 含量无相关性。因而，表明盐度尽管引起微生物膜形成过程中的生物量的变化，但在同一盐度时对生物量与日龄的两者之间关系无显著性影响。

本实验结果表明，不同盐度、日龄下微生物膜诱导厚壳贻贝稚贝的附着率与微生物膜的硅藻密度存在显著的正相关性。在盐度 23 时，28 d 的微生物膜下稚贝的附着率最高。硅藻作为许多经济贝类幼体的主要饵料，能够为贝类的幼体及其稚贝附着过程中提供充足的饵料，也有可能参与厚壳贻贝稚贝的附着过程，且释放出一些化学信号物质，促进了稚贝的附着，如硅藻的胞外聚合物。然而，这需要进一步的研究来证实这种假说。此外，很多研究表明，海洋细菌会对多毛类^[16]、棘皮动物^[17]、腔肠动物^[18]、软体动物^[19]、甲壳类^[20]、苔藓动物^[21]和海鞘^[22]等诸多海洋无脊椎动物的浮游幼体的附着变态产生显著影响。本实验结果表明，厚壳贻贝稚贝的附着率与组成微生物膜的细菌密度存在显著的正相关性，随着细菌密度的增加，附着率也随之增加，表明细菌对厚壳贻贝稚贝的附着产生了相应的影响，但是细菌是如何影响稚贝附着以及是否与诱导厚壳贻贝幼体附着的方式一样仍需进一步的研究。

微生物膜作为一个微型生物群落，在不同的盐度下，其生物群落的组成和生物数量也不相同。叶绿素 a 作为一类特殊的色素，是藻类细胞重要组成部分，在一定程度上可以反映出微生物膜中能进行光合作用的生物现存量。目前结果表明，微生物膜的诱导活性与叶绿素 a 之间无显著相关性，因而微生物膜中的能进行光合作用生物与稚贝附着可能无必然联系性。通过采用 DGGE 指纹图谱技术，对微生物膜中细菌群落结构进行分析发现，在不同的盐度时，微生物膜中所含细菌种类数量和相对含量有所不同。分析发现，7~21 d 日龄范围，盐度 13 时的 DGGE 图谱条带数与相对较高盐度时的条带数相近，而在 28d 日龄、盐度 13 时的 DGGE 图谱条带数明显低于相对较高盐度时的条带数。同样，28 d 日龄微生物膜中的细菌多样性指数也在盐度 23 时相对较高，表明盐度影响且参与调控微生物膜形成过程中的细菌群落结构。然而，究竟何种菌属在整体细菌群落中发挥主导作用仍需进一步的研究。

总之，微生物膜的形成受海域环境中的盐度变化影响而发生不断群落演替，不同盐度形成的微生

物膜对厚壳贻贝稚贝的附着行为产生影响。因而,在贻贝稚贝的附着基的选择过程中,盐度应作为一个重要因素考虑进来。本研究成果为今后贝类中间培育技术的改善提供了重要科学依据,同时对于厚壳贻贝稚贝的附着机制的理解具有重要的理论意义。

参考文献:

- [1] Zobell C E, Allen E C. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces [J]. *J Bacteriol*, 1935, 29:239-251.
- [2] 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.
- [3] 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): 81-118.
- [4] Qian P Y, Lau S C, Dahms H U, et al. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macro organisms: implications for antifouling and aquaculture [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2007, 9(4): 399-410.
- [5] Wahl M, Goecke F, Labes A, et al. The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms [J]. *Front Microbiol*, 2012, 3:1-21.
- [6] Flemming H C, Murthy P S, Venkatesan R, et al. *Marine and industrial biofouling* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 2009, 293-313.
- [7] McClintock J B, Baker J B. *Marine chemical ecology* [M]. Boca Raton: CRC Press, 2001: 431-461.
- [8] Bao W Y, Satuito C G, Yang J L, et al. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms [J]. *Mar Biol*, 150: 565-574.
- [9] Ganesan A M, Alfaro A C, Higgins C M, et al. Characterization of biofilm exudates and their effects on settlement of mussel (*Perna canaliculus*) larvae [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2012, 434-435:34-46.
- [10] Zhao B, Zhang S, Qian P Y. Larval settlement of the silver-or goldlip pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson) in response to natural biofilms and chemical cues [J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1-4):883-901.
- [11] Fitt W K, Labare M P, Fuqua W C, et al. Factors influencing bacterial production of inducers of settlement behavior of larvae of the oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Microb Ecol*, 1989, 17: 287-298.
- [12] 于秀娟, 严岩, 顾继东. 微生物粘膜对杂色鲍幼虫附着和变态的影响 [J]. *海洋通报*, 2007, 26(6): 32-36.
- [13] 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, 28:249-256.
- [14] Ma M Y, Liu J L, Wang X M. Biofilms as potential indicators of macrophyte dominated lake health [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20:982-992.
- [15] 冯丹青, 柯才焕, 周时强, 等. 盐度对冠瘤海鞘幼体附着与变态的影响 [J]. *海洋科学*, 2003, 27(1): 42-46.
- [16] Unabia C R C, Hadfield M G. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans* [J]. *Mar Biol*, 1999, 133(1): 55-64.
- [17] 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, 149:604-619.
- [18] Tran C, Hadfield M G. Larvae of *Pocillopora damicornis* (Anthozoa) settle and metamorphose in response to surface-biofilm bacteria [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 2011, 433:85-96.
- [19] 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]. *Mar Biol*, 2007, 152:657-666.
- [20] Maki J S, Rittschof D, Mitchell R. Inhibition of larval barnacle attachment to bacterial films: an investigation of physical properties [J]. *Microb Ecol*, 1992, 23:97-106.
- [21] Dobretsov S, Qian P Y. Facilitation and inhibition of larval attachment of the bryozoan *Bugula neritina* in association with mono-species and multi-species biofilms [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2006, 333: 263-274.
- [22] 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.

Settlement of the mussel *Mytilus coruscus* plantigrades in response to biofilms formed on low salinities

YANG Jin-long^{1,2,3}, LI Xiang¹, WANG Chong⁴, LING Yun¹, BAO Wei-yang⁵, SHEN He-ding^{1,2,3}, LI Jia-le^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai University Knowledge Service Platform, Shanghai Ocean University Aquatic Animal Breeding Center, Shanghai 201306, China; 4. Binzhou Ocean and Fisheries Research Institute, Binzhou 256616, China; 5. Marine Science and Technology Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Received: Jun., 6, 2013

Key words: plantigrade; *Mytilus coruscus*; biofilms; salinity; settlement

Abstract: The influence of low salinity formed biofilms on the settlement of the plantigrade *Mytilus coruscus* was investigated in the laboratory. Various aspects of biofilms were examined including age, dry weight, chlorophyll *a* concentration, bacterial and diatom density. The diversity of bacterial community structure was analyzed by fingerprint technique DGGE. It is found that the settlement of *M. coruscus* was promoted by the biofilms which are formed when the salinity is 13 or 23. Furthermore the adhesive rate reached maximum value 72% when the salinity is 13 or 23. It is indicated that the inducing activity of biofilm was positively correlated with salinity, biofilm age, dry weight and bacterial and diatom densities, but uncorrelated with chlorophyll *a* concentration. The dry weight, bacterial densities and diatom densities in biofilm increased with biofilm age, but chlorophyll *a* was uncorrelated with biofilm age. Overall, this investigation indicates that bacterial structure may play an important role in the adhesion of the plantigrade *M. coruscus*, which can be induced by low salinity formed biofilms.

(本文编辑: 谭雪静)