

文章编号: 1000- 0615(2005)01- 0038- 05

## 细薄星芒海绵体内微生物分布特点的 透射电子显微镜观察与分析

李志勇, 秦恩昊, 蒋 群, 黄 奕, 何丽明  
(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

**摘要:** 采用透射电子显微镜对我国南海细薄星芒海绵体内微生物的分布进行了观察研究, 同时结合海绵的结构特点与摄取营养的方式对分布特点进行了分析讨论。研究证明: 在细薄星芒海绵体内除骨骼外的细胞间中质层、细胞内、海绵内腔等部位均分布着形态多样的微生物, 其中海绵中质层是共(寄)生微生物最为丰富的地方。海绵微生物的分布特点与海绵腔状多孔的结构以及依靠过滤海水获取营养的方式有关, 这对于将来揭示微生物在海绵体内的聚集机制及其与环境的关系具有重要价值。

**关键词:** 海绵; 微生物; 透射电子显微镜

中图分类号: S917

文献标识码: A

## Distribution characteristics of sponge *Stelletta tenui* associated microorganisms by TEM

LI Zhi-yong, QIN En-hao, JIANG Qun, HUANG Yi, HE Li-ming  
(School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** In this paper, the distribution of sponge *Stelletta tenui* associated microorganisms was investigated by transmission electron microscope and the characteristics were discussed on the basis of sponge structure and nutrition ingestion. It was proved that there are abundant microorganisms in sponge mesohyl, sponge cells and the inner cavity except for the sponge bone, in which sponge mesohyl is the main site for symbiotic microorganisms. It was suggested that the microbial distribution characteristics are due to the cavity structure and the nutrition ingestion of sponge by water filtration to some extent, which is useful for us to understand the mechanism of microbial accumulation in sponge and the relationship between sponge associated microorganisms and the water environment in the future.

**Key words:** sponge; microorganism; transmission electron microscope

海绵是海洋微生物良好的宿主<sup>[1,2]</sup>。由于海绵化合物具有抗病毒、抗肿瘤、抗菌、心血管扩张、增强免疫力、酶抑制、抑制细胞分裂等功能<sup>[3,4]</sup>, 因此海绵成为海洋活性化合物重要的来源。由于海绵采集受自然环境、采集条件等限制, 海绵活性物质含量一般都非常低而且结构复杂, 不易提取和人工合成, 以至于目前海绵活性物质来源已经成为相关海洋药物研发的瓶颈。越来越多的研究表明海绵的活性物质可能来自于其体内丰富的微

生物<sup>[5,6]</sup>, 海绵微生物也因此而成为国际上海绵研究的热点。

我国拥有比较丰富的海绵资源, 2001 年前针对海绵的研究仅局限于从海绵中提取活性物质方面<sup>[7]</sup>, 2001 年开始尝试进行海绵细胞的离体培养<sup>[8]</sup>, 目前我国的海绵微生物的研究才刚刚开始<sup>[9-12]</sup>。上海交通大学 2002 年在国家 863 计划资助下开展海绵共生细菌种群结构组成的分子诊断技术研究, 并且已在海绵微生物分离培养与生

收稿日期: 2004-02-20

基金项目: 国家高新技术发展计划(863 计划)项目(2002AA628080 和 2004AA628060); 上海市青年科技启明星计划项目(04QMX1411)

作者简介: 李志勇(1969-), 男, 回族, 河南信阳人, 副教授, 博士, 主要从事海洋微生物方面的研究。Tel: 021-54743351; Fax: 021-

54743348; E-mail: zlyli@sjtu.edu.cn

物多样性揭示方面取得了进展<sup>[9-11]</sup>。

本文采用透射电子显微镜对我国南海细薄星芒海绵(*Stelletta tenui*)体内的微生物进行观察,并结合海绵的组成特点与摄取营养的方式进行了讨论,在对我国南海海绵体内微生物分布特点进行初步原位揭示的同时,为进一步揭示微生物在海绵体内集聚机制以及与环境海水微生物的关系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 海绵样品

采集自我国海南三亚周边 5~20m 海域,水温 20℃左右,经中国科学院海洋研究所李锦和研究员鉴定为细薄星芒海绵 *Stelletta tenui* (Lindgren, 1897)。

### 1.2 海绵微生物的透射电子显微镜观察

透射电子显微镜样品的制备与观察成像过程如下: 2% 戊二醛 PBS 固定液 4℃ 固定 2h; 4℃ PBS 缓冲液洗涤两次, 每次 10min; 1% 锇酸 PBS 固定液 4℃ 固定 2h; PBS 缓冲液 4℃ 洗涤两次, 每次 10min; 30% - 50% - 70% 乙醇 (70% 乙醇含 3% 醋酸双氧铀) 4℃ 逐级脱水, 每次 10min, 块染, 80% - 95% - 100% - 100% 乙醇逐级脱水, 每次 10min; 环氧丙烷处理两次, 每次 10 分钟; 618 包埋液与环氧丙烷 1:1 浸透 2h, 618 包埋液与环氧丙烷 2:1 浸透过夜; 纯 618 包埋液 37℃ 浸透 6h; 60℃ 烘箱内 48h; LKB V 型超薄切片机制片; 枸橼酸铅电子染色, 采用 HITACHI (日本日立公司) H-500 型透射电镜观察、拍照。

## 2 结果与讨论

### 2.1 海绵体内微生物分布的电镜观察

海绵中质层的微生物 海绵细胞比较大 (直径一般大于 5 μm), 很容易与微生物细胞 (直径 1 μm 左右) 区别开 (图 1)。图 1 中 a 为海绵细胞的细胞核, b 和 c 为一些细胞器, 在照片中颜色比较浅 (白色)。d 显示的是一些细胞颗粒, 极小 (直径小于 1 μm) 而集中。

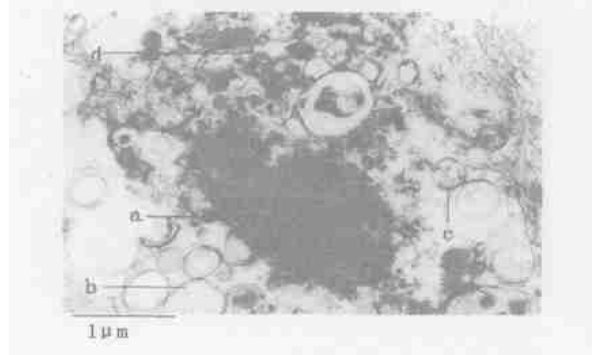


图 1 海绵细胞  
Fig. 1 Sponge cell

海绵是多细胞动物, 细胞间部位被称为海绵中质层。图 2 显示的是海绵细胞间中质层微生物观察的结果。图 2-1 中 a 为海绵细胞, b、c、d 为海绵细胞间的微生物; 图 2-2 可以很清楚地显示出形态各异的丰富的微生物。a 所指的是海绵中质层。b (杆状)、c、d、e (椭圆形)、f、g (球形) 分别为形态、大小不同的微生物细胞。海绵中质层是微生物尤其是那些和海绵具有共 (寄) 生关系的微生物的主要分布场所。

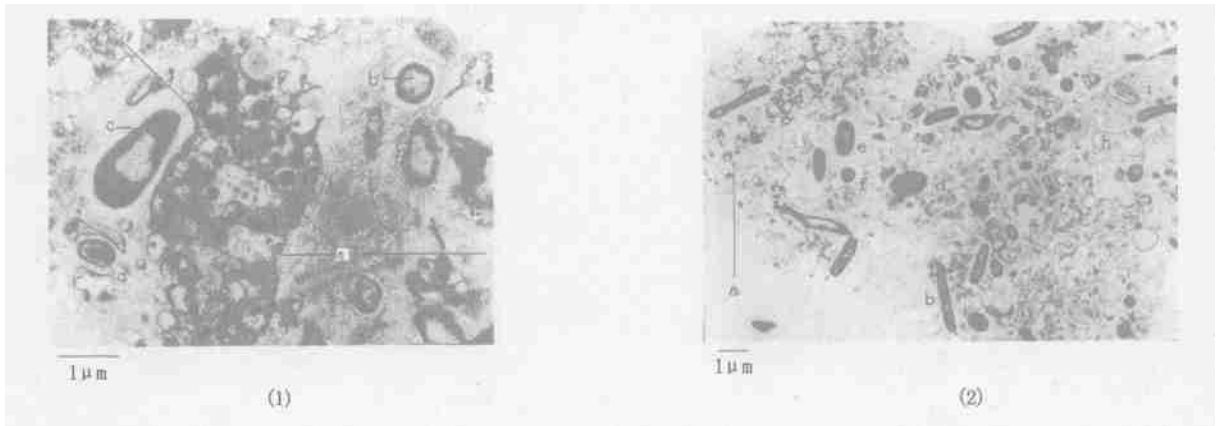


图 2 海绵中质里的微生物

Fig. 2 Microorganisms in sponge mesohyl

**海绵细胞内的微生物** 图3显示海绵细胞内微生物的存在。图中a~f为微生物细胞,其中d和e的细胞内含物已经消失,很大可能是已经死亡的微生物细胞。这可能是由于海绵细胞分泌的代谢物作用的结果,而能存活下来的微生物是可以耐受这种代谢物或自身能分泌拮抗物质。g、h分别代表海绵细胞的组成物质和颗粒物,与微生物细胞有着明显区别。

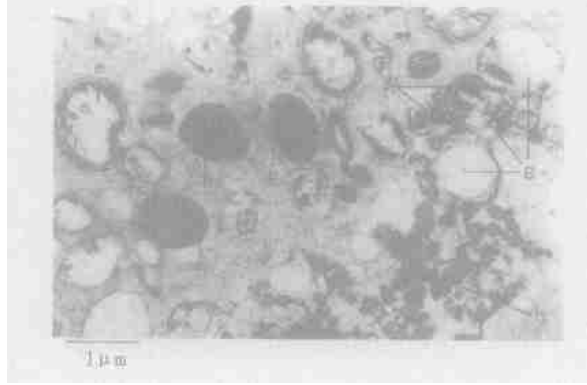


图3 海绵细胞内的微生物

Fig. 3 Microorganisms in the cells of sponge

**海绵内腔的微生物** 在海绵体内分布着众多的内腔(管道)或孔状结构,在电镜照片中显示为白色。从图4中可以发现,在这些海绵内腔区域存在着大量的微生物,并具有两个显著的特点:一是这些微生物个体普遍比进入海绵体内或细胞内的微生物细胞大(如图4.1中的a~f普遍比g、h大),二是存活微生物比较多(如图4.2中的a~k)。这是由于从内腔表层到海绵内部,过滤海水的孔径越来越小,以至于海水中进入海绵内比较

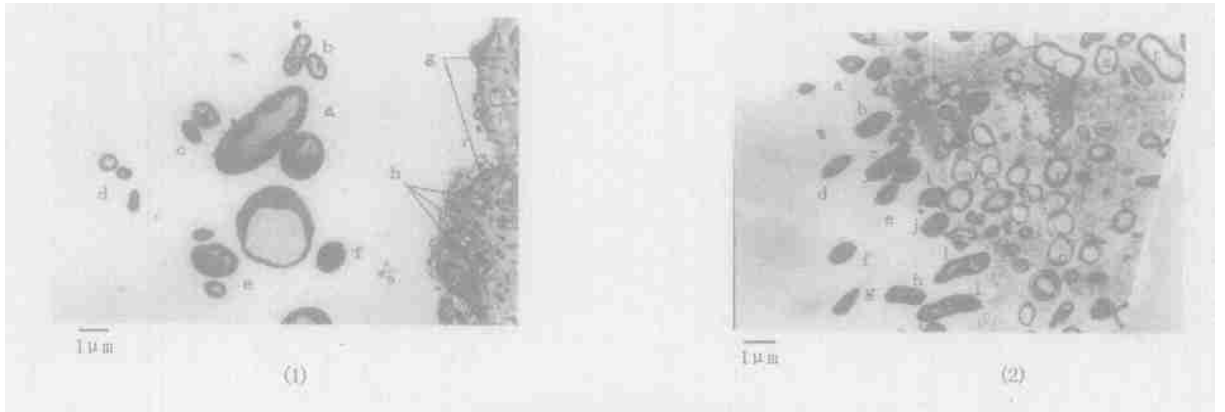


图4 海绵内腔中的微生物

Fig. 4 Microorganisms in the inner cavity of sponge

大的微生物都被阻挡在管道内腔内或领细胞腔内,而进入海绵内部(中质层、细胞内)的微生物细胞普遍个体比较小。

**海绵骨骼附近的微生物** 海绵除了海绵细胞、细胞间中质层外,另外一个重要的组成部分就是海绵骨骼(骨针)了。海绵骨骼(骨针)一般由含钙或硅的胶原蛋白组成,在电子显微镜下呈现均匀的深灰色(见图5-1中的a与图5-2中的a、b、c)。图5证明在海绵骨骼(骨针)中不存在微生物,这是由于海绵骨骼(骨针)非常坚固,微生物细胞不能穿透而进入。但是在骨骼(骨针)周围存在大量的微生物,例如图5-1中的b~h,其中e~h显示的是已经死亡的微生物,而b~d显示的是仍然活着的微生物细胞。图5-2中的d~k也显示的是不同形状的微生物。

## 2.2 微生物在海绵内分布特点的分析

海绵体内微生物的这种分布特点是由海绵独特的腔状、多孔、多管道的组成特点以及依靠过滤海水摄取营养的方式决定的。

海绵是由多细胞组成的最低等的海洋动物,还没有形成组织或器官。海绵的身体结构由两层细胞构成体壁,体壁围绕形成一中央腔,中央腔以出水口与外界相通。体壁上也有许多小孔或管道与外界或中央腔相通。海绵细胞间的部分为由胶原纤维构成的中质层,这里分布着丰富的管道与矿物质骨架。海绵遍布全身的管道(内腔)和孔状系统是海绵摄取营养、排泄废物的主要渠道,这种结构特点非常利于捕获海水中的有机颗粒与微生物、藻类或原生动物等,也因此而使海绵成为微生物良好的宿主。

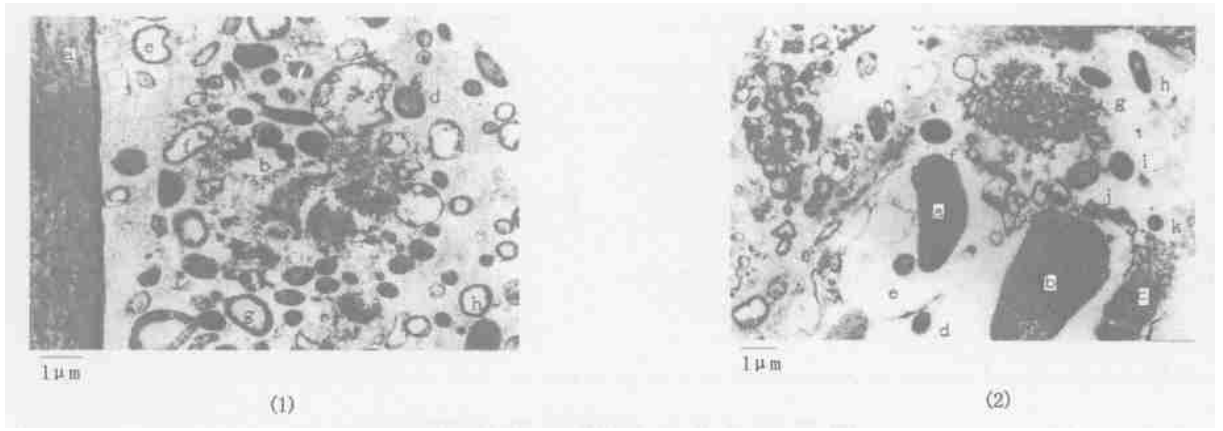


图 5 海绵骨骼附近的微生物

Fig. 5 Microorganisms near the skeleton of sponge

海绵摄食机制可以被描述为一套网眼尺寸递减的筛子。首先是海绵体壁上散布的直径约 50  $\mu\text{m}$  的小孔, 这些小孔一般与海绵内部的管道或内腔相连, 允许小于该尺寸的颗粒(微生物、藻类、有机颗粒等)进入; 其次是中质层内细胞之间的空间组成的筛网, 可以捕捉水流中的一些小颗粒; 第 3 道筛网是直径约 5  $\mu\text{m}$  的空间构成的领细胞室; 最后是由围绕在领细胞鞭毛周围由微绒毛交叉形成的最大筛网网眼平均为 0.1  $\mu\text{m}$  的孔隙。

与海绵相关的微生物一般可分为 3 类:

(1) 作为食物的微生物: 被海绵细胞(一般是原始细胞)吞噬的这些微生物一般都被消解掉为海绵细胞提供营养, 由于来自于周围海水, 量比较丰富, 一般被称之为遍生微生物。

(2) 海绵细胞共生或寄生的微生物: 大多数由海水进入海绵体内的微生物直接进入了海绵细胞间中质层而躲过了海绵细胞的吞噬作用(图 2), 也有在细胞内存活了下来(图 3)。这类幸存下来的微生物, 我们称之为共(寄)生微生物, 占了海绵体内微生物的大多数。除此之外, 还有通过母细胞传给后代的细胞内微生物<sup>[13]</sup>, 这主要是核内共(寄)生微生物。这些微生物与海绵宿主的关系比较复杂, 但最有可能具备产生某些活性物质的能力。这些物质一方面可以作为海绵细胞的营养物质, 另一方面可能参与海绵的化学防御。因此这类微生物是海绵微生物资源中最重要的一部分。

(3) 附生微生物: 这类微生物附着在海绵表面或内腔表面(图 4), 随意性较大, 会随着海水的流动会有很大变化, 但是一些也能较长时间内存

在与海绵体内或体表, 并对海绵的化学防御起到一定的作用。

### 3 结论

(1) 细薄星芒海绵体内分布着形态各异的丰富微生物, 在海绵体内细胞间中质层内、细胞内以及海绵内腔等部位均有分布, 其中海绵中质层中共(寄)生微生物最为丰富。骨骼是海绵中唯一不存在微生物的地方。

(2) 海绵体内微生物的分布特点与海绵独特的腔状、多孔的结构特点与依靠过滤海水获取营养的方式有关。

(3) 本文揭示的海绵体内微生物的分布特点对于将来揭示微生物在海绵体内的聚集机制以及与环境的关系具有重要价值。

(4) 丰富多样的海绵微生物是海绵活性物质研究的宝贵资源。

### 参考文献:

- [1] Jensen P R, Fenical W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives[J]. Annual Review of Microbiology, 1994, 48: 559- 584.
- [2] Lee Y K, Lee J H, Lee K. Microbial symbiosis in marine Sponges[J]. Journal of Microbiology, 2001, 39: 254- 264.
- [3] Cutignano A, Bifulco G, Bruno I, et al. Dragmacidin F: a new antiviral bromoindole alkaloid from the Mediterranean sponge *Halictoria* sp. [J]. Tetrahedron, 2000, 56: 3743- 3748.
- [4] Bergmann W, Feeney R J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges[J]. J Am Chem Soc, 1990, 72: 2809 - 2810.
- [5] Guyot M. Intricate aspects of sponge chemistry[J]. Zoosystema, 2000, 22 (2) : 419- 431.
- [6] Perovic S, Wichels A, Schitt C, et al. Neuroactive compounds produced by bacteria from the marine sponge *Halichondria panicea*: activation of the neuronal NMDA receptor [J].

- Environmental Toxicology and Pharmacology, 1998, 6: 125-133.
- [7] 李文林, 毛士龙, 易杨华, 等. 丰头皮海绵化学成分研究[J]. 中国海洋药物, 2000, (3): 1-4.
- [8] 张骁英, 虞星炬, 金美方, 等. 海绵细胞离体培养新技术: 海绵原细胞细胞团培养[C]. 第一届海洋生物技术论坛论文集, 2003, 505-511.
- [9] 黄 弈, 李志勇. 可培养的海绵放线菌基因多样性的初步揭示[C]. 第一届海洋生物技术论坛论文集, 2003, 848-851.
- [10] 秦恩昊, 李志勇. 海绵微生物基因多样性的RAPD初步分析[C]. 第一届海洋生物技术论坛论文集, 2003, 851-856.
- [11] 胡 叶, 李志勇. 海绵细菌的初步分离及生物多样性研究[C]. 第一届海洋生物技术论坛论文集, 2003, 1052-1056.
- [12] 刘 丽, 胡江春, 王书锦. 繁茂膜海绵中两株放线菌的生物学特性及其鉴定[C]. 第一届海洋生物技术论坛论文集(补遗), 2003, 32-38.
- [13] Webster N S, Wilson K J, Blackall L L, *et al.* Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopalocoides alorabile*[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 67: 434-444.

## 关于举办“水产健康养殖新技术 及水产品安全管理”培训班的通知

### 一、培训内容

1. 介绍我国工厂化养殖现状和发展前景(包括目前应注意的问题和解决办法);
2. 海水工厂化养殖新技术(包括新品种养殖、育苗饵料、节能、水处理等问题);
3. 健康养殖营养平衡控制技术与新型饲料开发利用;
4. 养殖过程中的病害防治(包括用药安全,并介绍一些常见鱼药的性能和使用);
5. 介绍渔业水域环境保护和水质管理;
6. 介绍无公害水产品规范生产技术,包括现有的一些规范;
7. 介绍我国水产品质量安全标准与安全监督检测认证体系和实施情况;介绍我国水产品质量安全管理的现状及对策。

### 二、授课专家及形式

本次研讨班将邀请国内知名水产养殖专家、教授做专题主讲。会议将采用主题演讲与实地参观交流等形式。

### 三、培训对象

全国各市、县渔业局,水产局,水产养殖研究机构,水产技术推广人员、养殖专业户和相关企业人员。

### 四、研讨地点与时间

2005年3月25日-27日            厦门

### 五、收费标准

培训费每人600元,食宿、考察由会务组统一安排,费用自理。

### 六、报名方式

参加研讨会的代表,请填写报名表传真至会议秘书处,秘书处将提前5天电传报到通知,详告学习地点及乘车路线。

### 七、联系人

会议秘书处: 郝 强 陈 芳

咨询电话: 010-68161579, 68165647 传真: 010-68161579

中国水产学会: 郭继娥 刘雅丹

电 话: 010-64194237 传 真: 010-64194235

通讯地址: 北京朝阳区麦子店街22号楼809室, 邮 编: 100026