

繁茂膜海绵清除大肠杆菌的过程

张喜昌^{1,2}, 张卫², 褚亚东², 赵宗宝², 谭海东², 梁玉波³, 许淑芬¹, 冷晓飞¹, 李丹¹

(1. 大连海宝渔业有限公司, 辽宁 大连 116045; 2. 中国科学院 大连化学物理研究所 辽宁 大连 116023; 3. 国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023)

摘要: 通过分析海绵清除大肠杆菌的过程, 研究海绵净化细菌的机理。作者利用荧光显微镜和激光共聚焦显微镜观测等手段, 监测和分析了绿色荧光大肠杆菌(*Escherichia coli*)在繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perlevis*)体内、体外水环境中数量变化过程。在 1 L 含有 3×10^7 个/mL 绿色荧光大肠杆菌的海水中放入鲜重(1.02 ± 0.11) g 的繁茂膜海绵 24 块, 处理 7 h, 海水中的荧光大肠杆菌数量逐渐降低; 而海绵体内荧光大肠杆菌数量在 2 h 时内逐渐增多, 之后的 2 h 趋于稳定, 4 h 以后开始逐渐减少。水体中大肠杆菌不仅进入海绵体内, 而且进入海绵细胞内。含有荧光大肠杆菌的海绵块转入无菌海水中后, 海绵体内及细胞中大肠杆菌逐渐消失, 而且大肠杆菌没有被释放到环境海水中。分析表明, 繁茂膜海绵能够以摄食的方式净化水环境中的大肠杆菌。

关键词: 繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perlevis*); 绿色荧光大肠杆菌; 海绵细胞; 净化

中图分类号: S965.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)05-0021-07

doi: 10.11759/hyxx20131031003

海绵是低等的多细胞滤食性动物, 由于兼有强大的滤水能力^[1-2]和特异的应对病原体侵害的免疫机制^[3], 近些年来, 国内外学者考虑利用海绵净化污染水体中的病原菌和有机质。繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perlevis*)已被发现具有很好的净化病原菌和有机质的效果^[4-9], 但其以何种机制去除病原菌, 目前尚不明确。

生物体存在如下几种去除水体中病原菌的方式:

(1)简单的物理阻留; (2)体外释放化学物质杀灭; (3)通过免疫体系将病原菌杀灭; (4)将病原菌作为食物消化利用; (5)兼用多种方式去除病原菌等。如果繁茂膜海绵对病原菌只是单纯的物理性质的阻留, 那么海绵移除病原体的作用是很有限制的, 实际应用的可能性很小; 如果繁茂膜海绵通过释放化学物质或通过免疫功能将病原菌杀死再释放到体外, 那么这个过程对海绵而言是一个纯粹的能量消耗过程, 利用海绵控制病原体时还需要考虑如何补充海绵体能的问题等; 最理想的方式是繁茂膜海绵以病原菌为食物, 或者兼用这种方式来净化细菌。在这种情况下, 繁茂膜海绵去除病原菌是化害为益的过程, 既有利于净化水环境, 又有利于海绵生物量的增加, 从而使繁茂膜海绵具有广阔的应用前景。

有研究表明, 繁茂膜海绵体内营免疫和消化功能的原细胞能够捕获大肠杆菌和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)^[4], 但繁茂膜海绵是否把这些菌体作为食物利用, 仍然需要严格证明。作者以绿色荧光大肠杆菌作为示踪细菌, 研究繁茂膜海绵净化细菌过程。

1 材料和方法

1.1 试验生物

繁茂膜海绵采自大连黑石礁海区潮间带。海绵样品运回实验室后, 切割成约 1 g 的小块, 不喂食, 在充气砂滤海水中暂养 1 d。绿色荧光大肠杆菌菌株 BL21(DE3)来自中国科学院大连化学物理研究所生物物质高效转化研究组。该菌株是将绿色荧光蛋白基因通过质粒转入大肠杆菌而获得, 经过多次扩繁, 荧光特性稳定。该菌在海水中可存活一周以上, 但在海水中不繁殖, 在高浓度($\geq 10^7$ 个/mL)时对海水养殖动物有低毒性。

收稿日期: 2013-10-31; 修回日期: 2014-10-23

基金项目: 国家海洋“863”高科技研究发展计划项目(2003AA620404)

作者简介: 张喜昌(1965-), 男, 辽宁大连人, 博士, 主要从事水产养殖技术, E-mail: zhangxczhangxc@163.com

1.2 监测水体中荧光大肠杆菌被繁茂膜海绵净化过程

在6个1.2 L玻璃缸中分别加入0.98 L经0.22 μm微孔滤膜过滤的海水,置于水浴槽中充气,水温维持在18~20℃。在每个玻璃缸海水中分别接种荧光大肠杆菌母液20 mL,使海水中菌密度达到约 3×10^7 个/mL。在其中3个玻璃缸(T1、T2、T3)中分别放入24块鲜质量(1.02 ± 0.11)g的繁茂膜海绵,另外3个玻璃缸(C1、C2、C3)不放海绵,作为对照。于30 s、1、3、5、10、25、40 min、1、2、3、4、5、6、7 h时,分别在T1、T2、T3缸内各取一块海绵,置于盛有4%中性福尔马林液的玻璃广口瓶中固定,次日观察海绵组织和细胞中的荧光大肠杆菌。于0.5、1、2、3、4、5、6、7 h时,分别在每个玻璃缸中采集1 mL水样,用血球计数板在荧光显微镜下4次检测0.1 μL水样中绿色荧光大肠杆菌数量。

1.3 监测荧光大肠杆菌在繁茂膜海绵组织和细胞中富集过程

将上述每一时刻固定于福尔马林液中的海绵块,分别切下一小块(约0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm),置于冷冻切片机冷冻托上,用优化切片温度(OCT)包埋剂(樱花牌)包埋,冷冻5 min后,进行冷冻切片(切片厚度6 μm)。对每一时刻的小海绵块,用荧光显微镜观察上、中、下位置的切片各1片,每片切片随机观察4个视野,记录每片切片每个视野内荧光菌数量,照相。根据该显微倍数下一个视野的面积,计算每平方毫米冷冻切片上荧光菌的数量。

将冷冻切片检测余下的未冷冻的各海绵块,用无菌镊子在灭菌培养皿中压碎,加入0.5 mL福尔马林液冲洗,液体部分经350目筛绢过滤后,收集于1.5 mL Eppdoff管中。在6 000 r/min条件下离心30 s,弃上层液体,沉淀部分用福尔马林液洗涤3次(每次加入1 mL福尔马林液,震荡30 s,6 000 r/min离心30 s,弃掉上清)。用一次性注射器从离心管底部吸取少许沉淀(各类海绵细胞)于载玻片上,在荧光显微镜下检测含有荧光大肠杆菌的海绵细胞比例(观察的海绵细胞数量不低于300个),照相。

将上述盛有海绵细胞的离心管用锡箔纸包裹,并向管里加入0.5 mL DiI⁺; DiIC18(3)(1,1-dioctadecyl-3,3,3-tetramethylindocarboc-yanine perchlorate)染液(sigma公司),25℃气温下震荡染色3 min。6 000 r/min离心30 s,用福尔马林液洗涤海绵细胞沉淀3次(每

次加入1 mL福尔马林液,震荡30 s,6 000 r/min离心30 s,弃掉上清),除去残余染料。将染色后的海绵细胞保存在福尔马林液中,用注射针头取少许海绵细胞于载玻片上,加上盖玻片,用指甲油封片,在激光共聚焦显微镜下,分层(厚度间隔0.54 μm)观察海绵细胞及其内部荧光大肠杆菌。

1.4 监测荧光大肠杆菌在繁茂膜海绵组织和细胞中消失过程

将上述1.2实验中T1、T2、T3缸内余下海绵块,在7 h时全部取出,用无菌海水冲洗3次后,分别转入另外3个盛有1 L无菌海水的玻璃缸(仍然标记为T1、T2、T3)。3个对照缸不动。之后,于1、2、4、6、12、24、48、72、120 h时,分别自T1、T2、T3缸中各取一块海绵,置于4%中性福尔马林液中固定。从各个固定的海绵块上切下一小块(约0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm),用于冷冻切片,在荧光显微镜下观察海绵组织中的荧光大肠杆菌,照相、计数;余下的未冷冻的海绵块用于提取海绵细胞,在荧光显微镜和激光共聚焦显微镜下观测海绵细胞内的荧光菌(操作步骤同1.3)。

于1、24、48、72 h时,分别在放置海绵玻璃缸(T1~T3)和对照缸(C1~C3)中采集1 mL水样,用血球计数板在荧光显微镜下4次检测0.1 μL水样中绿色荧光大肠杆菌数量。

1.5 数据分析方法

数据分析采用Spss 13.0分析软件。

2 结果

2.1 繁茂膜海绵对水体中荧光大肠杆菌的去除作用

引入繁茂膜海绵的处理组(T1~T3)与对照组(C1~C3)水体中荧光大肠杆菌数量变化见图1。在初始2 h内,处理组水体中荧光大肠杆菌数量迅速减少。2 h时,菌密度已由初始时的 3×10^7 个/mL降低至 $(72 \pm 8) \times 10^5$ 个/mL,降低了76.6%。2~7 h区间内,处理组水体中菌密度虽然一直在降低,但降低速度放缓。7 h时,处理组水体中菌密度降低到 $(38 \pm 2) \times 10^5$ 个/mL,比初始时菌密度降低了87.5%。而对照组水体中绿色荧光大肠杆菌的密度始终保持稳定。处理组水体中大部分荧光大肠杆菌被繁茂膜海绵除去。

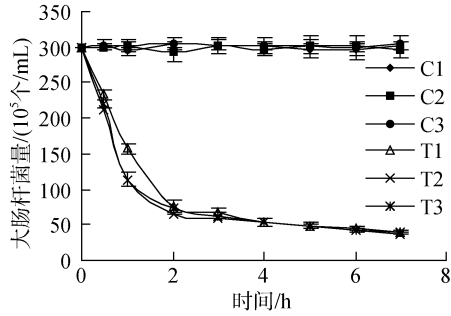


图 1 试验水体中绿色荧光大肠杆菌数量

Fig. 1 The quantity of green fluorescent *E. coli* in experimental seawater

2.2 荧光大肠杆菌在繁茂膜海绵组织内大量富集

不同监测时刻, 在含有荧光大肠杆菌水体中饲养的繁茂膜海绵的组织冷冻切片(厚度 6 μm)内荧光大肠杆菌数量见图 2、图 3。30 s 时, 绿色荧光大肠

杆菌已进入海绵体内, 但数量很少。随着饲养时间延长, 海绵组织中绿色荧光大肠杆菌的数量逐渐增多, 2 h 时, 荧光菌的密度达到(11 522 ± 2 140)个/mm²。在 2~4 h 时间段, 海绵组织中荧光菌的密度基本稳定。4 h 以后, 荧光菌的密度逐步下降, 7 h 时, 降低到(9 848 ± 1 241)个/mm²。

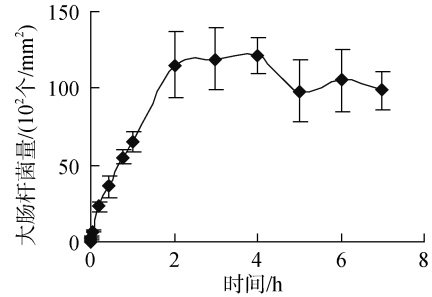


图 2 繁茂膜海绵组织切片(厚度 6 μm)内绿色荧光大肠杆菌密度

Fig. 2 The density of green fluorescent *E. coli* in refrigerant slice(6μm thick)of sponge *H. perlevis*

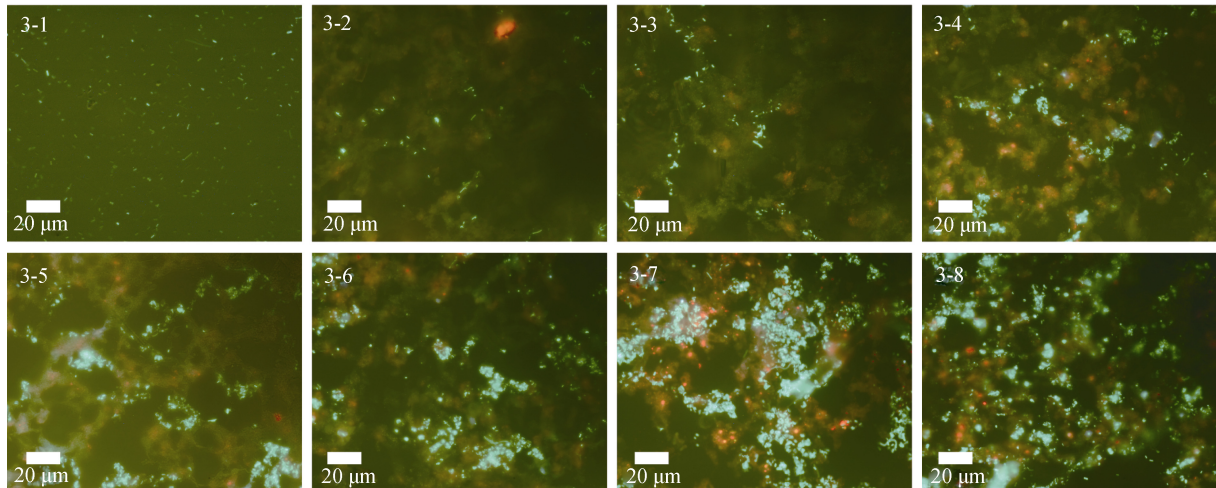


图 3 繁茂膜海绵组织冷冻切片(厚度 6 μm)中和海水中的荧光大肠杆菌

Fig. 3 The green fluorescent *E. coli* in the slices (6μm thick) of sponge *H. perlevis* and in seawater

3-1. 绿色荧光大肠杆菌菌液; 3-2. 海绵放入菌液中 1 min 时切片; 3-3. 海绵放入菌液中 3 min 时切片; 3-4. 海绵放入菌液中 10 min 时切片; 3-5. 海绵放入菌液中 25 min 时切片; 3-6. 海绵放入菌液中 40 min 时切片; 3-7. 海绵放入菌液中 2 h 时切片; 3-8. 海绵放入菌液中 7 h 时切片

3-1. The seawater containing fluorescent *E. coli*; 3-2. The slice of sponge raised in seawater containing *E. coli* for 1 min; 3-3. The slice of sponge raised in seawater containing *E. coli* for 3 min; 3-4. The slice of sponge raised in seawater containing *E. coli* for 10 min; 3-5. The slice of sponge raised in seawater containing *E. coli* for 25 min; 3-6. The slice of sponge raised in seawater containing *E. coli* for 40 min; 3-7. The slice of sponge raised in seawater containing *E. coli* for 2 h; 3-8. The slice of sponge raised in seawater containing *E. coli* for 7 h

2.3 荧光大肠杆菌在各类海绵细胞中富集

从滤菌 7 h 后的海绵组织中获取海绵细胞, 在荧光显微镜下观察, 可发现许多海绵细胞的影像范围内都有荧光大肠杆菌, 而且荧光大肠杆菌在各类形态、大小的细胞影像内都有存在(图 4)。进一步利用激光共聚焦显微镜观察, 可发现荧光大

肠杆菌确实已进入各类海绵细胞内部(图 5)。图 5 显示某一层面上被 DiI'; DiIC18(3)染料染成红色的海绵细胞剖面 and 海绵细胞内呈现黄绿色的荧光大肠杆菌。某些海绵细胞的一个剖面上同时显示出多个荧光大肠杆菌, 表明该海绵细胞吞噬了大量荧光大肠杆菌。

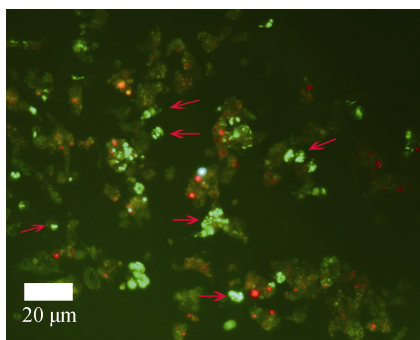


图 4 荧光显微镜下的海绵细胞图

Fig.4 Sponge cells observed by fluorescent microscope image

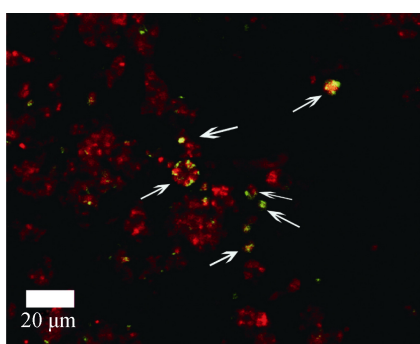


图 5 激光共聚焦镜下染色的海绵细胞

Fig.5 Stained sponge cells observed by confocal microscope image

繁茂膜海绵在含有绿色荧光大肠杆菌的水环境中滤水时,不同监测时刻,含有荧光大肠杆菌的海绵细胞比例见图 6。每一监测时刻,计数的海绵细胞在 300 个以上。繁茂膜海绵在含有荧光大肠杆菌海水里滤水时间少于 3 min 时,没有发现含有荧光大肠杆菌的海绵细胞。5 min 时,可在 6.1%的海绵细胞中观察到荧光大肠杆菌。之后,随着滤水时间的延长,含有

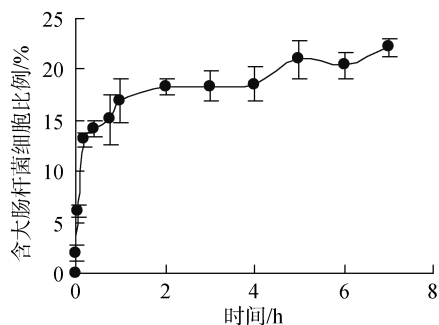


图 6 在含荧光大肠杆菌海水中时海绵体内含有荧光菌细胞的比例

Fig.6 The percentage of sponge cells containing fluorescent *E.coli* when sponge was raised in water containing fluorescent *E. coli*

荧光大肠杆菌的海绵细胞比例呈现逐渐增多的趋势。7 h 时,含有荧光大肠杆菌的海绵细胞比例达 22.2%。

2.4 进入繁茂膜海绵体内的绿色荧光大肠杆菌逐渐消失

在含荧光大肠杆菌的海水中滤水 7 h 后,海绵被转入无菌海水中。不同时刻采集无菌海水中的海绵块,海绵组织切片中荧光大肠杆菌的数量见图 7 和图 8。容易发现,转入无菌海水中后,海绵体内荧光菌的含量迅速降低。24、72 和 120 h 检测时,海绵冷冻切片中荧光菌的量分别降低到初始量的 5.7%、0.7%和 0.2%,120h 时,切片中只能发现零星单个的大肠杆菌,较均匀地分布于海绵组织中。在整个试验期内,3 个对照组水体中荧光大肠杆菌的量维持在 $2.17 \times 10^7 \sim 3.31 \times 10^7$ 个/mL,表明绿色荧光大肠杆菌在本研究期间内能够在海水中正常存活。

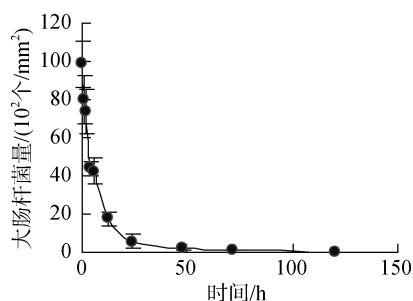


图 7 转入无菌海水中后繁茂膜海绵体内荧光大肠杆菌密度变化

Fig.7 The density of fluorescent *E.coli* in slice (6μm thick) of sponge *H.perlevis* after being transported into axenic seawater

2.5 荧光大肠杆菌在各类海绵细胞中消失

滤菌后的繁茂膜海绵转入无菌海水中后,海绵细胞中的荧光大肠杆菌的数量迅速减少,但含有荧光大肠杆菌的海绵细胞比例有一个波动(图 9)。繁茂膜海绵转入无菌海水中的前 2 h,含有荧光大肠杆菌的海绵细胞比例仍然继续增加。2 h 时,含有荧光菌的细胞比例为 24.6%。可能是海绵转入无菌海水后的一定时间内,进入海绵体内的荧光大肠杆菌继续进入海绵原细胞内,而海绵原细胞也持续将其获得的荧光大肠杆菌传递给中胶层内的其他各类细胞,使荧光大肠杆菌在海绵细胞中的分布更广。2 h 以后,含有荧光大肠杆菌的海绵细胞比例迅速降低,6 h 时,降低到 9.4%。之后降低的趋势趋缓,120 h 时,含有荧光菌的海绵细胞比例降低到 0.5%。

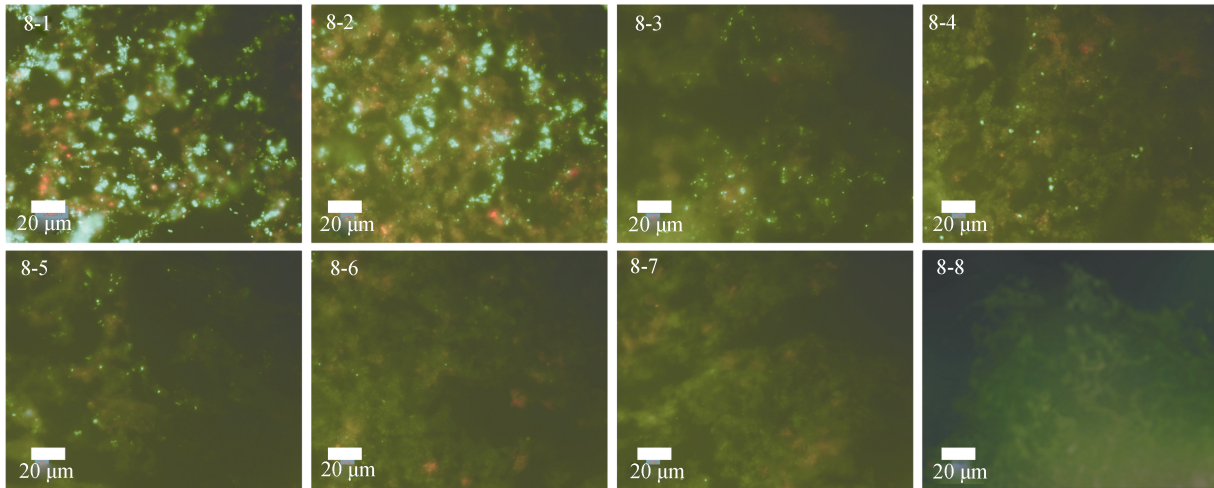


图 8 转入无菌海水中后, 繁茂膜海绵组织冷冻切片(厚度 6μm)中的荧光大肠杆菌

Fig. 8 The density of fluorescent *E. coli* in refrigerant slice (6μm thick) of sponge *H. perlevis* after being transported into axenic sea water

8-1. 转入无菌海水中 0h; 8-2. 转入无菌海水中 2h; 8-3. 转入无菌海水中 12h; 8-4. 转入无菌海水中 24h; 8-5. 转入无菌海水中 48h; 8-6. 转入无菌海水中 72h; 8-7. 转入无菌海水中 120h; 8-8. 没有荧光菌的海绵

8-1. In axenic seawater for 0 h; 8-2. In axenic seawater for 2 h; 8-3. In axenic seawater for 12 h; 8-4. In axenic seawater for 24 h; 8-5. In axenic seawater for 48 h; 8-6. In axenic seawater for 72 h; 8-7. In axenic seawater for 120 h; 8-8. The slice of sponge without fluorescent *E. coli*

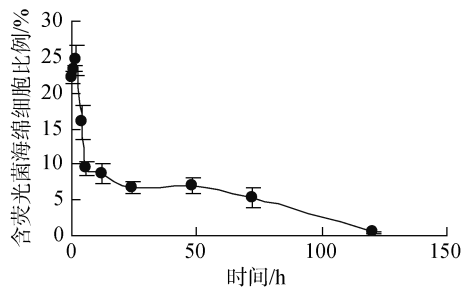


图 9 海绵转入无菌海水中后, 不同检测时刻含有荧光菌海绵细胞比例

Fig.9 The percentage of sponge cells containing green fluorescent *E. coli* after sponge was transported into axenic seawater

进入繁茂膜海绵体内的荧光大肠杆菌没有释放到环境水体中。海绵转入无菌海水中后, 1、24、48、72 h 检测时, T1、T2 和 T3 缸 0.1 μL 水样中检测到的绿色荧光大肠杆菌数量均不超过 2 个, 而且菌数量与检测时刻没有相关关系。水体中微量的荧光大肠杆菌可能来源于海绵体表残留菌, 繁茂膜海绵没有把其体内的荧光大肠杆菌释放到水环境中。

3 讨论

海绵是海洋中最大的药源生物^[10], 在医药领域已得到很多的研究。随着其净化病原体功能的发现, 海绵在海水养殖领域的研究也成为热点, 尤其是中国北方海域广泛分布的繁茂膜海绵, 其净化水环境

中病原菌和有机质的研究已有较多的报道^[4-9]。研究繁茂膜海绵清除水体中病原菌的过程, 进而弄清其清除病原菌的机理, 对进一步研究和应用繁茂膜海绵具有重要意义。

作者在监测繁茂膜海绵净化水体内荧光大肠杆菌的过程中, 水体里荧光大肠杆菌的浓度在 7 h 时间内一直在降低, 而海绵组织中大肠杆菌密度在前 2 h 内迅速增大, 2~4 h 时趋于稳定, 4~7 h 时逐渐减小。分析认为, 前 2 h, 摄入海绵体内的荧光大肠杆菌被海绵处理掉的很少, 菌量处于积累的过程; 2 h~4 h 时, 部分前期进入海绵体内的荧光大肠杆菌被海绵处理掉, 同时水体中的荧光大肠杆菌持续进入海绵体内, 被海绵处理掉的菌量与进入海绵体内的菌量接近平衡; 4 h 以后, 进入海绵体内的菌量随着水体中菌量的减少而减少, 而前期进入海绵体内的菌被海绵大量处理掉, 从而表现出海绵体内菌量逐渐减少。本研究把富集了大量荧光大肠杆菌的海绵转入无菌海水中 4~5 h 时, 菌量减少了约 50%, 余下的大肠杆菌经历数天的时间才逐渐消失。Schmidt^[11]在研究海绵 *Ephydatia fluviatilis* 滤食荧光抗体标记的大肠杆菌的过程时发现, 所有进入海绵体内的大肠杆菌在 4~5 h 后都已看不出形态。本研究的结果一方面与 Schmidt 的研究结果相吻合, 即两种海绵在 4~5 h 时间内, 都能把大量的大肠杆菌处理掉。但是另一方面, 繁茂膜海绵完全处理掉富集于体内的大肠杆菌

所需要的时间比海绵 *E. fluviatilis* 要长得多。这表现出两种海绵在处理大肠杆菌速度上的差异。

海绵是低等的滤食性动物,其营养物质通过原细胞摄取,再转移给中胶层的其他各类细胞^[12]。原细胞个体较大,具有消化和免疫功能,其他各类细胞个体较小,形态各异。本研究从滤菌后的繁茂膜海绵组织中获取海绵细胞,在荧光显微镜下观察,可发现荧光大肠杆菌不仅在个体较大的原细胞的影像内大量存在,在其他各类小细胞的影像内都有存在(图4)。从荧光显微镜下观察判断,荧光大肠杆菌似乎已进入各类海绵细胞内部,但是理论上荧光显微镜下不能辨别荧光大肠杆菌是黏附于海绵细胞表面还是进入海绵细胞内部。本研究进一步用激光共聚焦显微镜观察,发现大量的荧光大肠杆菌确实已进入各类海绵细胞内部(图5)。这种结果有两种可能性,一是繁茂膜海绵把大肠杆菌作为营养物质,由原细胞摄取,又传递给各类其他海绵细胞;二是海绵被大肠杆菌感染。由于摄取了荧光大肠杆菌的海绵被转入无菌海水中后,海绵体内的荧光大肠杆菌数量急剧减少(图7),而且荧光大肠杆菌没有排放到水环境中,所以不存在各类海绵细胞被大肠杆菌感染的问题。因此可以确认:繁茂膜海绵是把荧光大肠杆菌作为营养物质利用、处理掉,繁茂膜海绵是以摄食的方式净化水环境中的荧光大肠杆菌。Fu等^[4]把DiI⁺; DiIC18(3)染色的大肠杆菌投放到无菌海水中,让繁茂膜海绵滤水,在激光共聚焦显微镜下可观察到大肠杆菌在海绵原细胞的影像内存在。本研究的观测结果与Fu等对繁茂膜海绵原细胞中大肠杆菌的观测结果相一致,并且作者还观测到繁茂膜海绵各类小细胞内的荧光大肠杆菌。

墨汁和荧光乳胶微球都曾用于监测海绵的滤水过程,这些不能被海绵消化解体的小颗粒先被海绵的领细胞摄取,然后传递给海绵中胶层的原细胞。一段时间以后墨汁和荧光乳胶微球会在海绵的水沟系统富集,堵塞水沟^[13-14]。本研究中进入繁茂膜海绵体内的荧光大肠杆菌在海绵体内快速消失,这从另一个角度表明荧光大肠杆菌可以被繁茂膜海绵作为营养物质利用。

绿色荧光大肠杆菌发光原理是其体内的绿色荧光蛋白(GFP)结构在特定波长光的激发下发生共振,衍射出绿色荧光。GFP由238个氨基酸组成,结构非常稳定,在过热、过酸、过碱或添加某些变性剂条件下,GFP会变性,荧光消失,但结构不会

被彻底破坏。一旦恢复中性环境,或除去变性剂,荧光还可恢复^[15]。本研究中发现,荧光大肠杆菌的荧光在海绵体内内外彻底消失,这表明繁茂膜海绵已将荧光大肠杆菌体内的GFP结构破坏掉,完全解体了荧光大肠杆菌。

尽管繁茂膜海绵应对外源病原菌(如大肠杆菌)和海水养殖环境中自有病原菌(如弧菌)的方式具有共性,但其净化两类病原菌的过程也存在一定差异^[5,16]。繁茂膜海绵摄取、利用养殖环境中自有病原菌的过程,还有待进一步研究。

4 结论

本研究首次利用绿色荧光大肠杆菌作为示踪菌,研究繁茂膜海绵修复细菌污染的过程。研究发现荧光大肠杆菌被繁茂膜海绵大量摄取后,分布于海绵组织和各类细胞中,并在海绵体内和细胞中失去荧光特性和形态,最终消失。研究确认繁茂膜海绵以摄食、消化利用的方式净化荧光大肠杆菌。

参考文献:

- [1] Reiswig H M. Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1974, 14(3): 231-249.
- [2] Pfannkuchen M, Gisela B, Fritz G B, et al. In situ pumping activity of the sponge *Aplysina aerophoba*, Nardo 1886[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2009, 369(1): 65-71.
- [3] Müller W E G, Blumbach B, Müller I M. Evolution of the innate and adaptive immune systems: Relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (Porifera) and those in vertebrates[J]. *Transplantation*, 1999, 68(9): 1215-1227.
- [4] Fu W T, Sun L M, Zhang X C, et al. Potential of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* as a bioremediator of pathogenic bacteria in integrated aquaculture ecosystems[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(6): 1112-1122.
- [5] 付晚涛, 张卫, 金美芳, 等. 繁茂膜海绵滤食养殖水体中过剩饵料的研究[J]. *海洋环境科学*, 2006, 25(3): 29-32.
- [6] 付晚涛, 张卫, 吴益春, 等. 繁茂膜海绵生物修复养殖水体中病原体的初步研究[J]. *海洋环境科学*, 2007, 26(3): 217-220.
- [7] Zhang X C, Zhang W, Xue L Y, et al. Bioremediation of pathogenic bacteria using the marine sponge

- Hymeniacidon perlevis in the intensive mariculture water system of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(1): 59-68.
- [8] 张喜昌, 张卫, 薛凌云, 等. 繁茂膜海绵、抗生素和加大水交换量对大菱鲆水环境中病原细菌调控效果的比较[J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(2): 351-355.
- [9] 张喜昌, 张卫, 张弼, 等. 利用繁茂膜海绵和龙须菜集成调控牙鲆养殖水体中病原菌和氨氮污染[J]. *海洋环境科学*, 2013, 32(5): 767-771.
- [10] Blunt J W, Copp B R, Munro M H G, et al. Marine natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2003, 20(1): 1-48.
- [11] Schmidt I. Phagocytose et pynocytose chez les spongillidae Etude in vivo de l'ingestion de bactéries et de protéineis marquées à l'aide d'un colorant fluorescent en lumière ultra-violette[J]. *Z Vergl Physiol*, 1970, 66: 398-420.
- [12] Simpson T L. The cell biology of sponges[M]. New York: Springer, 1984.
- [13] Pourbaix N. Mécanisme de la nutrition chez les Spongillidae[J]. *Ann Soc Roy Zool Belg*, 1933b, 64: 12-20.
- [14] Turon X, Galera J, Uriz M J. Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies[J]. *J Exp Zool*, 1997, 278 (1): 22-36.
- [15] 杨慧敏, 李文刚, 吴高锋, 等. 绿色荧光蛋白的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(8): 29-32.
- [16] Manuel M, Zhang X C, Cao X P, et al. Selective feeding by sponges on pathogenic microbes: a reassessment of potential for abatement of microbial pollution[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 2010, 403(1): 75-89.

Study on the removal process of *Escherichia coli* by sponge *Hymeniacidon perlevis*

ZHANG Xi-chang^{1, 2}, ZHANG Wei², CHU Ya-dong², ZHAO Zong-bao², TAN Hai-dong², LIANG Yu-bo³, XU Shu-fen¹, LENG Xiao-fei¹, LI Dan¹

(1. Dalian Haibao Fishery Company Ltd., Dalian 116045, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 3. National Marine Environment Monitoring Center, Dalian 116023, China)

Received: Oct., 31, 2013

Key words: *Hymeniacidon perlevis*; green fluorescent *Escherichia coli*; sponge cells; remove

Abstract: To investigate the mechanism of sponge on bioremediation of bacteria, the removal process of *Escherichia coli* by sponge *Hymeniacidon perlevis* was explored based on analysis of the changing trend of green fluorescent *E. coli* quantity in water environment and in sponge *H. perlevis* by means of fluorescent microscope image, confocal microscope image, and other methods. 24 sponge cutting blocks weighted(1.02±0.11)g were put into 1 L seawater containing green fluorescent *E. coli* at a density of 3×10^7 cells/mL for 7 h. During the test period, the quantity of *E. coli* in seawater decreased continuously, while the quantity of *E. coli* in sponge cuts increased for the first 2 h, remained nearly unchanged for another 2 h, and then decreased gradually. The fluorescent *E. coli* in seawater was not only in the body of sponge *H. perlevis*, but also in the cells of sponge. When the sponge cuts containing *E. coli* were transferred to axenic seawater, the fluorescent *E. coli* in sponge cells or sponge body disappeared gradually, and the fluorescent *E. coli* was not released into the water environment. These findings show that sponge *H. perlevis* can remove *E. coli* in seawater by means of ingestion and digestion.

(本文编辑: 谭雪静)