

繁茂膜海绵的实验室养殖

张卫, 薛凌云, 付晓涛, 张骁英, 刘元令, 刘淑芬, 金美芳
(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁大连 116023)

摘要:为了实现可控条件下海绵(marine sponge)的快速生长, 获得海绵生物量, 解决海绵药物开发的“药源供给不足”的瓶颈问题, 本研究以大连周边黄渤海潮间带的繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perleux*)为研究对象, 进行室内养殖实验, 在自行设计的水体循环和不循环养殖体系水族槽内观察繁茂膜海绵的原代和继代生长过程。海绵经历贴壁、旺盛生长、出芽、静止生长和枯萎5个生长阶段。“窝”型巢穴有利于海绵生长和繁殖。实验过程中观察到繁茂膜海绵以一种拖丝迁移的方式分散新的个体以实现繁殖。扁藻和硅藻可以作为海绵的饵料。平缓的水流有利于海绵的生长。温度是影响海绵生长的关键因素, 在一定温度刺激下, 海绵会从越冬状态下苏醒, 开始生长。

关键词:海绵; 室内养殖; 静态不循环水养殖体系; 动态循环水养殖体系

中图分类号: Q178 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)04-0430-07

海绵(marine sponge)是已知的海洋活性天然产物的最大来源^[1]。目前已发现数以千计的活性物质, 包括抗癌、抗病毒(抗 HIV)、免疫调节、抗细菌、抗真菌、驱虫以及消炎止痛等活性物质^[2]。但大多数海绵活性物质在开发为海洋药物的过程中均遭遇“药源供给不足”的问题而无法临床实验所需^[3]。

从海绵组织中直接提取海绵活性物质是最为直接的一种方法^[4]。但是, 海绵体内的活性物质含量非常低, 一般只有湿重的 10^{-8} , 以海绵(*Halichondria* sp.)为例, 1 t 湿重海绵仅能提取到 310 mg^[5]的纯品, 因此需要大量的海绵作为原料来提取活性成分。目前可供采集的野生海绵的数量远远不能满足开发需要, 过量采集又会造成对生态环境的破坏。

海绵在天然海域中的自然生长速度很缓慢, 因而无法提供足够的量^[3]。水产养殖是一种较为直接、简单的海绵生产方式, 也是目前能够提供海绵活性物质的手段之一^[6]。但海绵体内的活性物质(代谢产物)受自然环境、季节等条件影响较大。因此, 人们企图寻求通过在可控条件下室内养殖海绵技术, 使海绵体内所需要的活性物质能够可控生产。对于实验室养殖, 光照、食物和水质至关重要。Osinga^[3]等人对海绵的实验室养殖进行了初步探索, 探讨了光照、食物种类等对海绵养殖的影响。目

前, 有关海绵养殖的报道绝大部分集中于自然海区大规模养殖^[7], 实验室中养殖的报道较少。

生活在不同海域的海绵生长规律会有所不同。早在 18、19 世纪, 人们就尝试在地中海地区为生产浴用海绵而进行大规模的养殖^[8-9], 并对养殖水域的自然环境, 如水流活动、光照强度、温度、季节等对海绵生物量的影响进行研究。观察到季节对海绵生长的影响较大, 热带海绵在冬季生长较旺盛, 而在夏秋季节生长缓慢^[9-10]。

本研究以大连周边潮间带的繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perleux*)为研究对象, 进行室内养殖实验。在封闭、半封闭的可控系统中, 观测繁茂膜海绵生物量变化过程, 考察饵料投喂方式、饵料种类、养殖环境、水流方式等条件对海绵生理、生殖特性的影响, 并对可能影响海绵生长的因子进行讨论, 旨在为可控条件下进行大规模的海绵养殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设备

养殖水族槽如图 1 所示, 图 1A 为静态不循环海水养殖系统, 水体为 150 L。图 1B 为动态循环海水养殖系统, 水的体积为 280 L。平均每升海水放置约 5 cm³ 海绵。

收稿日期: 2004-10-11; 修订日期: 2005-02-01。

基金项目: 国家“863”计划重大专项经费资助项目(G2003AA624040)。

作者简介: 张卫(1969-), 男, 高级研究员, 博士生导师, 主要从事海洋生物产品工程学, 分子生物工艺工程学和植物细胞生物技术方面的研究工作。E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

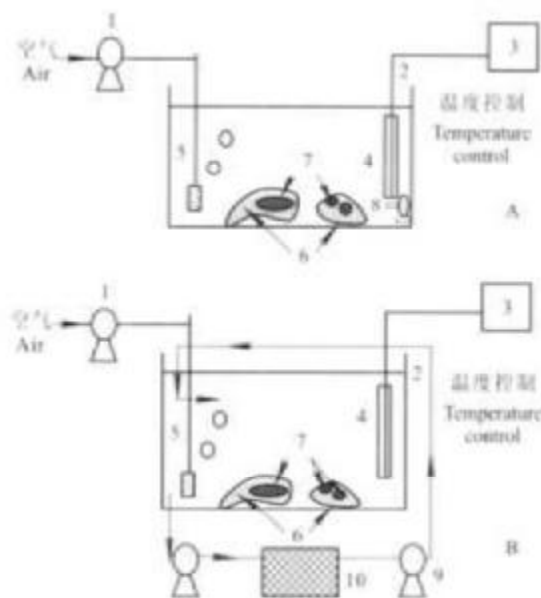


图1 实验室海绵养殖水族槽结构流程示意图

A: 静态不循环海水的养殖体系; B: 动态循环海水的养殖体系

1: 空气泵 2: 水族槽 3: 温度控制 4: 温度计 5: 气体分散 6: 礁石 7: 海绵 8: 潜水泵 9: 循环水泵 10: 海水过滤除蛋白系统

Fig.1 Systems for sponge culture in laboratory

A: The Acyclic Water Flow System (AWFS)

B: The Cyclic Water Flow System (CWFS)

1: Air pump 2: Aquarium 3: Temperature control system
4: Thermometer 5: Air bubble 6: Stone 7: Sponge 8: Water pump
9: Circular water pump 10: Equipment to filtrate protein in seawater

1.1.1 静态不循环海水的养殖体系 在养殖过程中每7天更换1次海水,注入新鲜天然海域海水,保持水族槽内亚硝酸盐水平不高于0.1 mg/L,盐度30~35。水温控制在16~18℃。同时采用气泵对培养系统持续鼓气补氧。

1.1.2 动态循环海水的养殖体系 槽内一次性注入新鲜海水280 L之后,海水经过滤装置去除蛋白等杂质后返回养殖槽内,水族槽内保持亚硝酸盐水平不高于0.1 mg/L,盐度30~35,水温控制在16~18℃。同时采用气泵对培养系统持续鼓气补氧。

1.2 实验材料

1.2.1 繁茂膜海绵 潮间带海绵,采于大连黄海海域。

1.2.2 天然海水 购于辽宁省海洋水产研究所,从附近的海域中吸取,经除杂质处理。

1.2.3 海绵饵料 亚心型扁藻(*Platymonas subcordiformis*)和新月菱形藻(硅藻)(*Nitzschia clost-*

rium),藻种由辽宁省海洋水产研究所惠赠,采用海水并添加营养剂培养至浓度 1×10^6 /mL。

1.3 实验方法

1.3.1 海绵前处理方法 采集繁茂膜海绵组织块,用线将其绑于石头或毛玻璃片上,置于静态不循环系统水族槽(图1A)及动态循环系统水族槽(图1B)内培养。

1.3.2 海绵饵料投喂方法 将密度为 10^6 /mL的藻液按比例加入养殖槽内,至槽内水体中藻液密度为 10^4 /mL,每天投喂1次。在动态循环培养的养殖体系中,投喂藻液时把循环水停止30 min。

1.3.3 生物量测量方法 通过测量海绵块的体积和重量的变化来表征海绵组织块的生长变化。

(1)海绵块体积测量法:测定时对每个海绵块按形体分解为易于测定的多面体,用卡尺测定长宽厚,然后计算海绵块的近似体积。

(2)海绵块质量测量法:测定时把海绵和附着载体一起取出,吊放5 min去水,用分析天平称量,然后以减量法测得海绵质量。

2 结果与分析

2.1 繁茂膜海绵组织块原代生长过程

2.1.1 静态不循环海水系统中繁茂膜海绵原代生长 从海边采集的海绵(图版I-1)在实验室培养系统中进行培养,该过程称为海绵组织块原代培养过程。在原代培养过程中,海绵组织块置于静态不循环海水系统的水族槽内16~20 h后会主动贴附于岩石、砂砾、玻璃等物体表面(图版I-2)。养殖到25 d后,海绵生长、增厚显著,体表出现若干个小芽球,其中亦有细长的柱体形状芽生成(图版I-3)。这一时期是海绵细胞运动活跃、繁殖力强的时期。海绵生长旺盛期过后,进入海绵生长静止期,这一时期维持20~25 d,从外观看海绵生长维持原状态不变(图版I-4和图2)。当这种生长静止的状态被突破后,海绵进入生长的枯衰期,即原代海绵生长的后期,海绵只剩下少量点状组织贴附于石块表面(图版I-5)。这一时期在40~60 d之间,海绵表面肌体开始萎缩,同时依附生长在母体海绵上的芽体生长也由盛转衰(图版I-6、7),两个过程同时进行,母体消减的过程也是母体上的芽体海绵消失的过程。图2显示了海绵在静态不循环海水养殖体系中原代生长时海绵生物量随时间变化曲线,1^a、

2[#]和3[#]海绵从同一地点采取,体积分别为0.864、0.7和0.35 cm³。从曲线可以看出3个组织块生长趋势是一致的,养殖到20 d左右海绵生物量达到最高,生物量增长倍数几乎相同,为原体积的2~4倍。

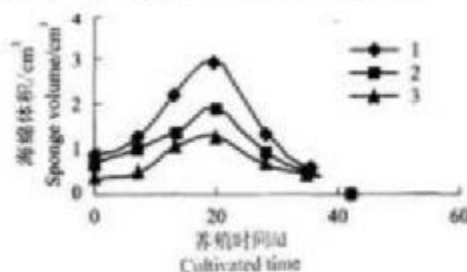


图2 静态培养系统中海绵组织块原代生物量随时间变化曲线

接种体积 1:0.86 cm³, 2:0.70 cm³, 3:0.35 cm³

Fig.2 The growth of sponge biomass in AWFS
Inoculation volume of sponge: 1:0.86 cm³; 2:0.70 cm³; 3:0.35 cm³

2.1.2 动态循环系统中蟹类膜海绵原代生长 动态培养过程中海绵块的生长变化如图3所示,从图3可看出在水体循环水族槽内(图1B)海绵生长规律与在静态不循环水体系的水族槽内(图1A)是一致的。组织块的生长也经历贴壁、旺盛生长、出芽、静止生长、枯萎5个阶段。整个过程最长维持60~80 d(图3)。图3中海绵是把同一块海绵一切为二,重量分别为9.0213 g和9.958 g,分别贴附于石块表面后,放在水体循环水族槽内养殖生长。从图3可以看出,海绵经20 d左右的生长重量由原来的重量逐渐增加到16 g左右,约为实验初始海绵质量的2倍。

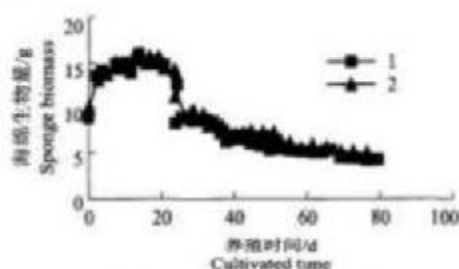


图3 动态培养系统中海绵组织块原代生物量随时间变化曲线

1:海绵初重9.0213 g; 2:海绵初重9.958 g

Fig.3 Growth of sponge biomass with culture time in CWFS

1:Initial weight 9.0213 g; 2:Initial weight 9.958 g

由此可见,在原代培养过程中,海绵组织块在静态不循环海水的养殖体系或在动态循环海水的养殖体系的环境内,生长过程和生物量变化规律相似。

2.2 蟹类膜海绵继代生长过程

观察发现,原代生长时,附近的石块上会出现扇形或条带状的海绵体,这些海绵体在培养过程中也出现显著的生长,此过程为继代生长过程。继代生长的海绵生长规律与原代海绵相同,同样经历生长、旺盛生长、出芽、静止生长、枯萎5个生长阶段。图4为继代海绵块在静态不循环海水培养体系中的生长情况,图5为继代海绵块Ⅱ和Ⅲ在动态循环培养体系中生物量随时间变化情况。从图4和图5可以看出,继代海绵在动态循环培养体系或在静态不循环培养体系中生长期都比原代生长周期长,能延伸到120~150 d。在海绵生长的前70~80天,处于生物量的快速增长期,即所谓的旺盛生长期。随后的第80~120天海绵增长停止,处于静止期;紧接着对应于组织外形上的衰亡,开始出现海绵生物量的迅速下降。但是,最终仍有少量的海绵附着于原生长处,但其生物量已难以通过体积法测量。图4中Ⅰ和图5中的Ⅱ和Ⅲ海绵块因开始时新生长点太小无法测量,长到肉眼可见时(10~30 d)开始测量。

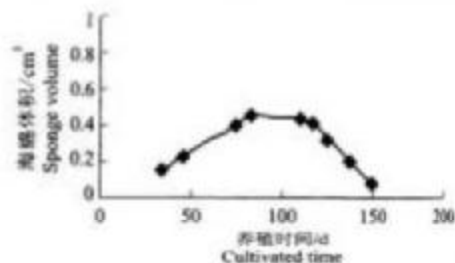
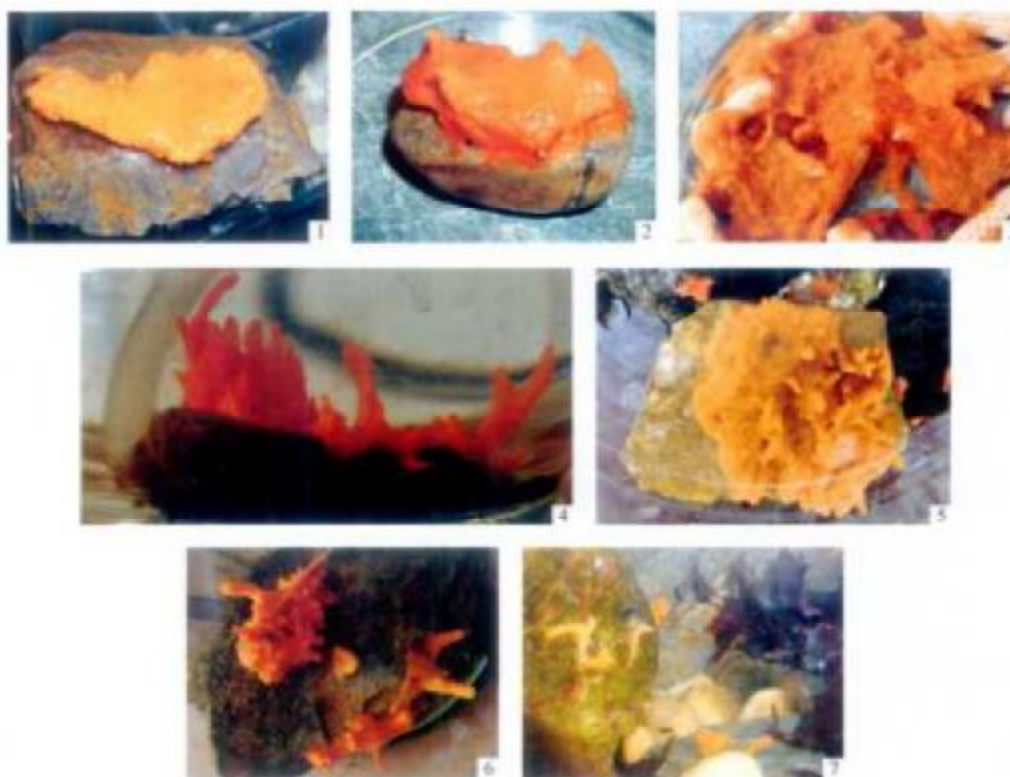


图4 静态不循环培养体系中继代生长点(I)生物量随时间变化曲线

Fig.4 The growth of subculture explants (I) with culture time in AWFS

2.3 环境对海绵生长的影响

在人工养殖过程中,参考自然生活环境,人为营造了“窝”居环境,在“窝”穴内将蟹类膜海绵随意摆放,让水流向从岩石背面环绕海绵“窝”壁缓缓流动,不直接对海绵构成水流的冲击力,海绵在“窝”内环绕的是相对静态的水流。“窝”外是动态的水流(图6a,6b)。这种构造明显适应了海绵的生活习性和需求,海绵出现了显著的旺盛生长(图6a,6b)。



图版 I 海绵的不同生长时期

1:刚从海边采回的海绵; 2:贴壁期; 3:旺盛生长期; 4:静止生长期; 5:枯衰期; 6:培养后期海绵萎缩的状态; 7:石块上只留下点状的或线状少量组织

Plate I Growth phases of sponge *Hymeniacidon peleve*

1: Sponge explant collected from inter-tidal; 2: Attachment; 3: Active growth; 4: Budding; 5: Stationary; 6: Stinking; 7: The line or dot sponge left on the stone after growth

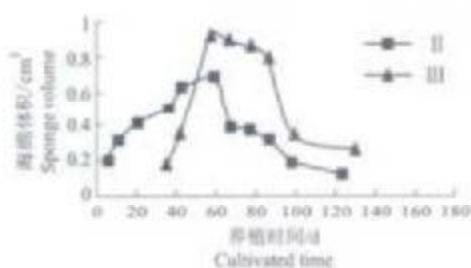


图5 动态循环培养体系中继代生长点(Ⅱ、Ⅲ)生物量随时间变化曲线

Fig.5 Growth of subculture explants (II and III) with culture time in CWES

在这种“窝”型巢穴生长条件下,同时观察到了繁茂膜海绵的拖丝繁殖方式(图7)。繁茂膜海绵以一种拖丝迁移的方式分散新的个体,实现繁殖。属

于海绵无性繁殖的一种方式。

2.4 水流对海绵生长的影响

在静态不循环系统和动态循环系统中培养的海绵,经过30 d和60 d后出现了完全不同的生长状态。静态不循环水族槽中的海绵(图8a)组织丰满,出水孔明显,显示出旺盛的生长状态。而处于水流冲击下的海绵(图8b)在30 d时就出现分散条状生长,海绵组织消瘦,没有成片生长,更不能观察到出水孔等,至60 d时组织基本消亡。

2.5 不同温度对海绵生长的影响

由表1和图版Ⅱ可见,海绵贴附:25℃时快于20℃,20℃时快于15℃。培养初始,海绵状态相同,培养到第7天,15℃下海绵与培养初始状态相比无差异,20℃已有可见贴附铺展现象,25℃培养海绵表面已有大量骨针,第3天时出现的贴附铺展

已有回缩现象。培养后期 15℃ 及 20℃ 海绵均出现不同程度的表面芽体生长现象。25℃ 海绵在短期

内死亡。而 15℃ 及 20℃ 下海绵培养能持续 40 d 以上。



图6 “窝”型巢穴培养的海绵块的生长状况

Fig.6 Growth of sponge in the "nest" substratum



图7 “窝”型巢穴中海绵出现的旺盛生长和拖枝无性繁殖

Fig.7 Fast growth and asexual propagation of fan-shaped spin threads attaching to near place in the "nest" shaped substratum



图8 不同的水流条件下海绵不同的生长状态

a: 静态不循环水流的条件下海绵经过 60 d 的生长状态; b: 循环水流的条件下, 海绵经受水流冲击 30 d 后的生长状态

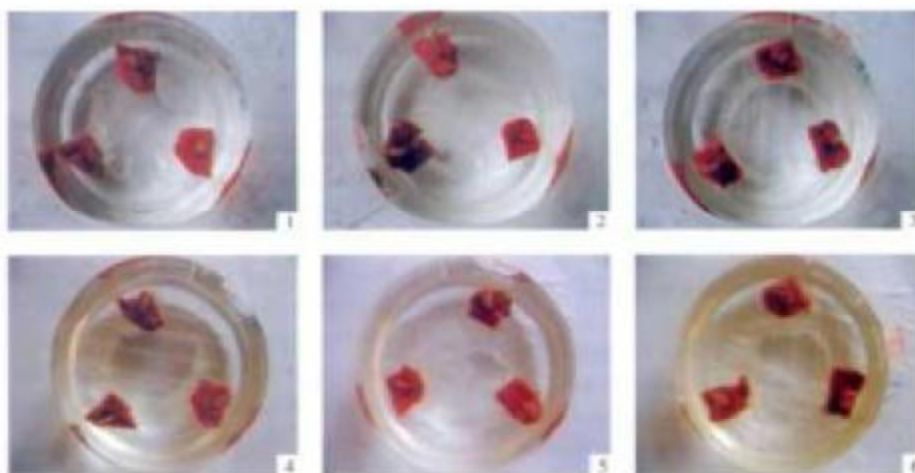
Fig.8 Different growth states of sponge under different water flow

a: Growth state of sponge after 60 days cultivation in AWFS; b: Growth state of sponge after 30 days cultivation in CWFS

表1 不同培养温度下海绵生长情况

Tab.1 Growth state of sponge under different temperature

海绵不同培养指标 Item	15℃	20℃	25℃
出现贴附点时间 The time attachment appearing	培养周期内未有可见贴附点 No	第 5 天 Fifth day	第 3 天 Third day
生长 Growth	不生长或逐渐萎缩 No growth or shrinking	有一定程度铺展生长 Growth to some extent	短时间少量生长, 出现大量骨针 Growth in short time, a little
存活 Survive	>40 d	>40 d	15~25 d 全部死亡 Totally dead within 15~25 days



图版Ⅱ 不同温度对海绵生长的影响

1~3:培养第0天海绵的状态; 4~6:培养第7天海绵的状态;

1,4:15℃; 2,5:20℃; 3,6:25℃

Plate II Growing state of sponge under different temperatures

1~3:Sponge state on the start of the experiment; 4~6:Sponge state after 7 days cultivation;

1,4:15℃; 2,5:20℃; 3,6:25℃

3 讨论

(1)在自行设计的循环和不循环养殖体系水族槽内观察繁茂膜海绵的原代和继代生长过程。海绵在自行设计的水体循环和不循环养殖体系中生长的过程和生物量的变化规律相似,都经历贴壁、旺盛、出芽、静止和枯萎等5个生长阶段。原代海绵整个生长期为40~80 d,而继代海绵的生长期都比原代的生长期长,能延伸到120~150 d。由于原代生长期按实验室养殖为起始点,海绵在海边生长的一段时间设计算在内,因此它的生长期比继代的生长期短。这表明实验室反应器培养是一种可行的培养繁茂膜海绵组织块的方式。其原代和继代生长周期为以后考察其他培养条件提供了培养时间及海绵状态的参考依据。

(2)自然海域中,繁茂膜海绵往往附着于礁石的背面或者礁石的底部低洼处,这是海绵择地的自我保护本能,以防御海潮风浪的冲击力量,也是海绵习于聚集生存繁殖的要求。利用礁石“洼”势为屏障繁生子体。本实验现象表明,所设计的“窝”型“巢穴”满足了海绵的生长繁殖需求,是一种适宜繁茂膜海绵生活的方式。这可能与海绵幼虫的存活及有效载体贴附有关,亦与海绵以居生长习性有关。“窝”型

巢穴提供给海绵一个相对稳定的生活环境,水体扰动较小,因此有利于海绵幼虫的下沉贴附及存活,从而有利于海绵的繁殖。

(3)海绵对生长环境的水流速度有一定的要求。平缓的水流中海绵可以通过领细胞的运动主动捕食微生物等有机颗粒;相反,在过于急促的水流冲击下,海绵组织中的领细胞运动可能被外界急促的水流所破坏,从而导致海绵表面的排水孔关闭,进而造成海绵摄食困难,最终导致海绵消亡。因此,水的流速调控对人工养殖海绵非常重要。

(4)温度是影响海绵新生生长的关键因素之一。自然海域的海绵具有季节性生长的现象。海绵在春末夏初时开始旺盛生长,夏季最热时生长速度减慢且表面有可见骨针层,秋季以后开始回缩,面积和体积逐渐减少。季节性主要与温度有关,这表明在一定温度刺激条件下,海绵就会从过冬期状态下苏醒,开始生长。不同温度下培养海绵的实验结果也表明,海绵生长对温度环境具有一定的要求,综合自然海域及实验室培养海绵的状态,可知20℃左右是海绵培养的适宜温度。

致谢:本研究得到辽宁省海洋水产研究所刘卫东副研究员的有益建议,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] Murray H G, Murro, John W, Blunt, Eric J, Dunde, et al. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70: 15-25.
- [2] Faulkner D J. Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 1998, 15(2): 113-158.
- [3] Pomponi S A. The bioprocess-technological potential of the sea [J]. *J Biotechnol*, 1999, 70: 5-13.
- [4] Belarbi E H, Dominguez M R, Cerón García M C, et al. Cultivation of explants of the marine sponge *Crambe crambe* in closed systems [J]. *Biomolecular Engineering*, 2003, 20: 333-337.
- [5] Osinga R, Johannes T, Rene H W. Cultivation of marine sponges [J]. *Mar Biotechnol*, 1999, 1: 509-532.
- [6] Barthel D. On the ecophysiology of the sponge *Halichondria pinnata* in Kiel Bight: I. Substrate specificity, growth and reproduction [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1986, 32: 291-298.
- [7] Alan Duckworth, Christopher Battershill, Patricia Bergquist. Influence of explant procedures and environmental factors on culture success of three sponges [J]. *Aquaculture*, 1997, 156: 251-267.
- [8] Moore H F. A practical method of sponge culture [J]. *Bull Bur Fish*, 1908, 28: 545-585.
- [9] Alan Duckworth, Christopher Battershill. Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolites: the influence of farming protocols and environment [J]. *Aquaculture*, 2003, 221: 311-329.

Cultivation rule of sponge *Hymeniacidon perleue* in bioreactors

ZHANG Wei, XUE Ling-yun, FU Wan-tao, ZHANG Xiao-ying, LIU Yuan-ling, LIU Shu-fen, JIN Mei-fang
(Dalian Institute of Chemical and Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Sponges have been proved the best source of marine biologically active metabolites among marine organisms. However, the "supply problem" hampered the exploitation of sponge drugs. To obtain fast growth of sponge biomass and high yield of bioactive metabolites, cultivation of sponge explants/aggregates in bioreactors under controlled conditions was proposed. In this study, the explants of an inter-tidal sponge *Hymeniacidon perleue* from the Yellow Sea were cultured in two self-designed bioreactor systems: the Cyclic Water Flow System (CWFS) and the Acyclic Water Flow System (AWFS). In both systems, air bubbles were used for supplying oxygen and the NO_2 concentration was controlled below 0.1 mg/L; the salinity was controlled between 30 and 36; temperature was controlled between 16 °C and 18 °C. Microalgae *Platymonas subcordiformis* and *Nitzschia closterium* was chosen as the feeding regimes with concentration of 6×10^6 /L seawater. Sponge biomass during cultivation was measured by volume and weight. The growth of sponge explants undergoes five phases in bioreactors: attachment, active growth, budding, stationary and shrinking. The average period of the growth process for the primary sponge explants is about 50 days and about 120 d for the secondary sponge explants. The active growth phase of the primary explants sustained for 20-25 days and the secondary explants sustained for 70-80 days. The "nest-shape" substratum simulating natural growing environment of sponge *Hymeniacidon perleue* promoted the growth and propagation of sponge explants. One interesting propagating method of sponge *Hymeniacidon perleue* was found that new body sponge migrated to a new place by a fan-shaped spin-thread. Mixed *Platymonas subcordiformis* and *Nitzschia closterium* as food and gentle water flow are favorable for sponge growth. The culture temperature significantly affects the growth of sponge explants. When the temperature increased from 0 °C to 12 °C, the sponge transferred from the "Hibernation" state to the growth state gradually. The suitable growth temperature for *Hymeniacidon perleue* is about 20 °C.

Key words: marine sponge; in vitro cultivation; Acyclic Water Flow System (AWFS); Cyclic Water Flow System (CWFS)