

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2023.09.013

# 滤池蚯蚓活性物质对剩余污泥中病原菌的影响

孙玉珠<sup>1</sup>, 肖 璠<sup>2</sup>, 邢美燕<sup>1</sup>

(1. 同济大学 环境科学与工程学院, 上海 200092; 2. 上海市城市建设设计研究总院  
<集团>有限公司, 上海 200127)

**摘 要:** 蚯蚓天然免疫系统对病原菌具有良好的抑制效果,但在蚯蚓生物滤池(VF)工艺中蚯蚓的免疫功能需要进一步探究。为此,以无蚯蚓的生物滤池(BF)为平行对照,考察蚯蚓在生物滤池胁迫条件下的抑菌能力;同时,以牛粪饲养的蚯蚓(CDW)为对照,以活性物质(体腔液和粗脂质)为表征指标,分析VF中蚯蚓的抑菌能力变化,并通过GC/MS和iTRAQ技术分析了两种蚯蚓粗脂质中脂肪酸的组成差异,以及体腔液中发挥抑菌功能的蛋白组分并进行鉴定注释。结果表明,采用VF处理剩余污泥时对11种病原菌及指示菌的平均去除率为58.0%,较BF高出17.8%,VF中蚯蚓的抑菌能力增强;与CDW相比,VF中蚯蚓脂肪酸的抑菌能力无明显差异,但其体腔液对病原菌的抑制能力提高了14.1%;与CDW相比,VF中蚯蚓受到了连续的污泥冲击、病原菌丰度大等胁迫,但其具有更高的代谢活性和更强的免疫反馈,分子质量在3~10、10~30 ku范围的抑菌蛋白表达显著提高。

**关键词:** 蚯蚓生物滤池; 蚯蚓体腔液; 蚯蚓脂肪; 剩余污泥; 病原菌

**中图分类号:** TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2023)09-0083-08

## Effect of Earthworm Active Substances in Vermifiltration on Pathogens in Excess Sludge

SUN Yu-zhu<sup>1</sup>, XIAO Fan<sup>2</sup>, XING Mei-yan<sup>1</sup>

(1. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Shanghai Urban Construction Design & Research Institute <Group> Co. Ltd., Shanghai 200127, China)

**Abstract:** The natural immune system of earthworm has a good inhibitory effect on pathogens. However, the immune function of earthworm in vermifiltration (VF) process needs further investigation. In this paper, the antibacterial ability of earthworms under stress conditions in biofilter (BF) was investigated by using a BF without earthworms as parallel control group. In addition, the changes in antibacterial ability of earthworms in VF were analyzed by using earthworms cultivated by cow dung earthworm (CDW) as control and active substances (coelomic fluid and crude lipid) as indicators, and the difference of fatty acid composition in crude lipids of two kinds of earthworms and their antibacterial protein components in coelomic fluid were analyzed and identified by GC/MS and iTRAQ. The average removal rates of 11 kinds of pathogens and indicator bacteria in VF for treatment of excess sludge was 58.0%, which was 17.8%

基金项目: 国家自然科学基金资助面上项目(51679168); 同济大学“双带头人”教师党支部书记学术能力提升计划项目(0400219423)

通信作者: 邢美燕 E-mail: xingmeiyan@tongji.edu.cn

higher than that in BF, indicating that the antibacterial ability of earthworms in VF was enhanced. Compared with CDW, there was no significant difference in antibacterial ability of earthworm fatty acids in VF, but the antibacterial ability of coelomic fluid to pathogens increased by 14.1%. Compared with CDW, earthworms in VF were subjected to stress such as continuous sludge shock and high abundance of pathogens. However, they had higher metabolic activity and stronger immune feedback, and the expression of antibacterial proteins with molecular weights in the ranges of 3–10 ku and 10–30 ku was significantly increased.

**Key words:** vermifiltration; earthworm coelomic fluid; earthworm lipid; excess sludge; pathogen

蚯蚓生物滤池集过滤吸附、好氧分解和污泥减量处理等功能于一体,已在多个国家得到研究和实践<sup>[1-2]</sup>。蚯蚓生物滤池作为一种生态型污水污泥同步处理技术,常用于农村地区的分散式污水污泥处理,是一种绿色友好型技术<sup>[3]</sup>。病原菌的去除是剩余污泥农用的重要环节,随着蚯蚓生物滤池相关研究的深入,关于其对剩余污泥病原菌去除的研究逐渐展开。通过静态试验发现,蚯蚓生物滤池生物膜中分离纯化培养出的多个菌株对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和克雷伯氏菌等典型病原菌表现出抑制作用<sup>[4-6]</sup>,说明蚯蚓生物滤池对污水和剩余污泥中病原菌及指示菌的丰度具有削减作用,且可能与其生物膜微生物的拮抗作用有关。另外,蚯蚓体腔液含有大量免疫细胞及其分泌的活性分子,相关研究表明,蚯蚓体腔液中含有抗菌成分,对大肠杆菌<sup>[7]</sup>和金黄色葡萄球菌<sup>[8]</sup>具有良好的抑制效果;另有研究表明,蚯蚓的匀浆上清液对猪场中分离的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、链球菌及副猪嗜血杆菌都有抑制效果<sup>[9]</sup>;而蚯蚓脂肪及脂肪酸在抑菌和抗菌物理屏障中也发挥了相应作用<sup>[10]</sup>,但二者在滤池中适应环境、抵抗微生物入侵发挥的作用仍未知,蚯蚓生物滤池中蚯蚓体腔液蛋白表达是否不同于其他环境也缺少相关探索。笔者借助GC/MS分析和蛋白组学等技术手段,借鉴免疫生态学领域相关概念和研究思路,分析蚯蚓生物滤池中活性物质对典型病原菌去除的影响,以期利用蚯蚓生物滤池安全处置剩余污泥提供理论支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验装置与材料

试验用污泥为上海市曲阳污水厂二沉池污泥,其含水率为99.3%~99.6%,pH为6.8~7.3,TCOD

为4 200~9 000 mg/L,SS为4 000~7 500 mg/L,VSS/SS为52.1%~82.9%。试验装置为蚯蚓生物滤池(VF),如图1所示。试验蚯蚓采用赤子爱胜蚓,VF中添加个体质量在0.3~0.5 g范围内的健康成年蚯蚓,蚯蚓投加密度为32 g/L滤料<sup>[11]</sup>。在蚯蚓生物滤池四层结构各层中部取蚯蚓样品混合后用于后续试验,并另外挑选体质量为0.3~0.5 g牛粪养殖的健康成年蚯蚓作为对照。

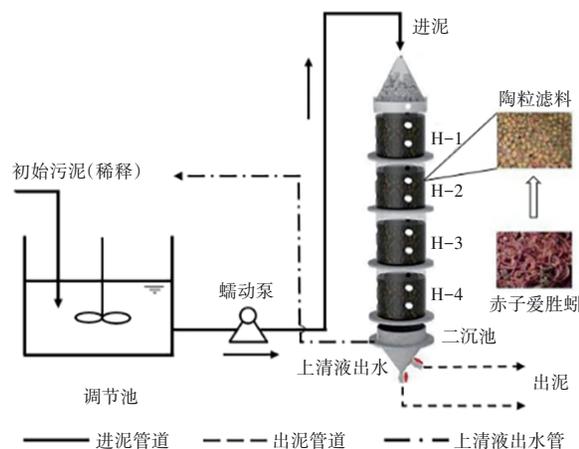


图1 蚯蚓生物滤池处理剩余污泥工艺流程

Fig.1 VF process for treatment of excess sludge

### 1.2 试验设计

采用式(1)<sup>[12]</sup>计算滤池对剩余污泥中典型病原菌的绝对去除率(RE)。

$$RE = \left( 1 - \frac{VSS_{\text{eff}} \times \text{Abund}_{\text{eff}}}{VSS_{\text{inf}} \times \text{Abund}_{\text{inf}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $VSS_{\text{inf}}$ 、 $VSS_{\text{eff}}$ 分别为进、出泥中的挥发性悬浮固体含量,mg/L;  $\text{Abund}_{\text{inf}}$ 、 $\text{Abund}_{\text{eff}}$ 分别为进、出泥中病原菌的相对丰度,%。

提取蚯蚓体腔液和组织脂肪,并对体腔液进行粗蛋白组分分离。使用超滤膜切割分子质量分别

为3、10和30 ku的Millipore超滤离心管,将体腔液中的蛋白分为0~3、3~10、10~30、>30 ku四个分子质量范围的粗蛋白。对于提取后的活性物质,通过微量稀释法测定其抑菌效果。

针对试验结果采用GraphPad Prism v8.0软件进行统计学分析,检验其统计学差异性;并采用GC/MS对提取的滤池蚯蚓和对照蚯蚓粗脂质进行脂肪酸组分分析;同时对滤池蚯蚓及对照蚯蚓体腔液进行iTRAQ蛋白质组定量并进行差异蛋白分析。

### 1.3 活性物质抑菌能力测定方法的构建

沙门氏菌、大肠杆菌与金黄色葡萄球菌均为VF去除效果较显著的菌种,以剩余污泥沙门氏菌与沙门氏菌标准菌株作为对比,可以分析剩余污泥及滤池环境对沙门氏菌抑制能力的影响;以大肠杆菌标准菌株作为常见指示菌,金黄色葡萄球菌标准菌株作为典型革兰氏阳性致病菌与前述革兰氏阴性菌作对照;因此选取剩余污泥内分离纯培养的沙门氏菌、沙门氏菌标准菌株(ATCC14028)、大肠杆菌标准菌株(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC25923)作为试验菌株。为方便记述,剩余污泥沙门氏菌记为sludge *Sal.*、沙门氏菌标准菌株记为std *Sal.*、大肠杆菌标准菌株记为std *Eco.*、金黄色葡萄球菌标准菌株记为std *Sau.*。

由于蚯蚓数量限制,根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)的说明,选用硫酸庆大霉素作为标准品,通过测定标准品的最小抑菌浓度(MIC)以及标准品二倍梯度稀释液对应的96孔板抑菌培养前后吸光度(OD)拟合标准曲线,将一倍浓度体腔液及粗蛋白溶液在抑菌反应前后对应的96孔板OD值代入标准曲线,把蚯蚓活性物质抑菌能力折算为同等抑菌强度硫酸庆大霉素浓度进行互比较。

硫酸庆大霉素对sludge *Sal.*、std *Sal.*、std *Eco.*、std *Sau.*的MIC分别为2.0、1.0、2.0、0.5  $\mu\text{g/mL}$ ,表明不同种类病原菌或指示菌对同剂量的同种抑菌药物的抗性有所不同,其中std *Sau.*对硫酸庆大霉素最为敏感,sludge *Sal.*较std *Sal.*的耐药性更强,说明剩余污泥环境驯化的沙门氏菌菌株相对而言耐药性提高,这与环境中抗性基因的传播有关<sup>[13]</sup>。参考CLSI的MIC解释标准,4种试验菌株均对硫酸庆大霉素敏感。

微孔OD值与菌液浓度呈线性关系,且试验采用的菌种均提前一天活化,同时经12 h培养并处于

对数生长期,通过延长硫酸庆大霉素浓度稀释梯度,建立浓度与微孔OD值变化量之间的指数关系,将蚯蚓活性物质抑菌能力转化为硫酸庆大霉素浓度进行对比,曲线方程如式(2)所示。针对各菌取MIC后的7个稀释梯度进行拟合,OD实测值与拟合曲线见图2。

$$y = ae^{bx} + c \quad (2)$$

式中: $y$ 为OD值变化量; $x$ 为硫酸庆大霉素浓度,  $\mu\text{g/mL}$ 。

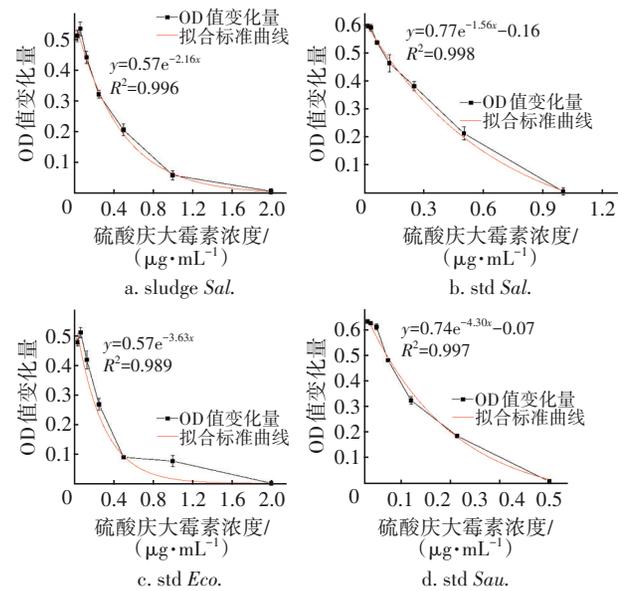


图2 硫酸庆大霉素对4种试验细菌的抑制标准曲线

### Fig.2 Antibacterial standard curve of gentamicin sulfate against four test bacteria

## 1.4 蚯蚓活性物质组分分析方法

### 1.4.1 GC/MS分析脂肪酸组分

定性分析:对检测出的成分采用MS数据库NIST11和保留时间进行定性。数据库筛选结果中要扣除杂质峰、柱流失峰。

定量分析:采用面积归一化法定量,即以鉴定成分峰面积占有所有鉴定成分面积之和的百分比作为定量结果。

$$C_i = \frac{A_i}{A_1 + A_2 + \dots + A_i + \dots + A_n} \times 100\% \quad (3)$$

式中: $C_i$ 为某一鉴定成分含量,%; $A_i$ 为对应某一鉴定成分的峰面积; $n$ 为鉴定成分总数。

### 1.4.2 iTRAQ蛋白质组学分析

由于本试验样品为蚯蚓体腔液,在搜库比对时,选择蚯蚓所属的环节动物门蛋白数据库进行蛋

白质组学分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 装置运行效果及对病原菌的抑制能力

装置运行效果由SS、VSS及VSS/SS进行表征。其中,VSS代表污泥中的有机固体含量,是污泥减量的重要指标;VSS/SS是污泥稳定化指标,其值越低即表明污泥矿化程度和稳定化效果越好。在进泥浓度为 $(424\pm 12)$  mg/L、水力负荷为 $2.0\text{ m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ 、有机负荷为 $0.3\text{ kgVSS}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ 的条件下,VF的SS和VSS减量率分别为 $(46.1\pm 2.5)\%$ 、 $(57.5\pm 1.7)\%$ ,VSS/SS值为53.1%;无蚯蚓的生物滤池(BF)的SS和VSS减量率分别为 $(31.9\pm 1.6)\%$ 、 $(36.6\pm 1.4)\%$ ,VSS/SS值为62.0%。相比之下,VF具有更好的污泥稳定化处理效果。

根据相关文献<sup>[14-16]</sup>筛选市政污水和污泥中的典型病原菌及指示菌共11种。BF对11种病原菌及指示菌的平均去除率为40.2%,VF对其平均去除率为58.0%,较BF具有更高的病原菌削减作用。在11种病原菌中,VF对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌和大肠杆菌的去除率相较于BF有显著提高,分别提高了37.2%、27.1%、24.3%和19.8%,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌在VF出泥中的相对丰度较BF出泥有明显降低,即引入蚯蚓使VF对这3种病原菌具有更优的抑制削减作用。

### 2.2 蚯蚓脂肪对典型病原菌的抑制能力

根据1.3节的方法测定蚯蚓脂肪对试验菌株的抑菌能力,结果显示,滤池蚯蚓脂肪(VEL)和对照蚯蚓脂肪(CEL)均对std *Sau.* 无抑制作用,与相关研究结果一致<sup>[10]</sup>;VEL对于sludge *Sal.*、std *Sal.* 和std *Eco.* 的抑制能力分别等同于 $(0.22\pm 0.02)$ 、 $(0.18\pm 0.02)$ 、 $(0.13\pm 0.01)$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸庆大霉素药液;CEL对其抑制能力分别等同于 $(0.23\pm 0.01)$ 、 $(0.23\pm 0.01)$ 、 $(0.13\pm 0.01)$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸庆大霉素药液。根据统计学检验结果,蚯蚓脂肪对sludge *Sal.*、std *Sal.* 的抑菌能力在CEL组和VEL组具有显著差异,但对std *Eco.* 则没有,而且CEL对前两种菌的抑制效果更好,由此认为滤池的驯化并未提高蚯蚓脂肪的抑菌能力。

### 2.3 蚯蚓脂肪酸组分与抑菌能力分析

对VEL和CEL进行GC/MS测定,结果显示VEL中含25种脂肪酸、CEL含10种脂肪酸,其中相同的

脂肪酸有10种。共有脂肪酸在CEL中的相对占比约为21.6%,而在VEL中的相对占比约为34.6%。对比差异脂肪酸组成,VEL拥有15种特有脂肪酸,且4种为中链脂肪酸,分别为环己甲酸、苯甲酸、癸酸、十一酸,但这4种中链脂肪酸的相对占比仅为0.55%,其余均为长链脂肪酸。VEL的脂质总含量、脂肪酸组分多样性和相对丰度都普遍高于CEL,但在抑菌效果上却没有表现出更强的优势,且脂肪主要分布在蚯蚓的体壁和消化道中,这些部位是蚯蚓抵抗外来物质入侵的主要物理屏障<sup>[17]</sup>,由此认为VEL脂肪酸及相对占比增加与适应滤池及剩余污泥环境有关,并不直接参与抑菌过程。

### 2.4 蚯蚓体腔液及其蛋白粗组分的抑菌能力

滤池蚯蚓体腔液(VECF)和对照蚯蚓体腔液(CECF)对不同试验菌种的抑制能力具有一定差异,其中CECF对sludge *Sal.*、std *Sal.*、std *Eco.* 和std *Sau.* 的抑制能力分别等同于 $(0.28\pm 0.01)$ 、 $(0.31\pm 0.01)$ 、 $(0.33\pm 0.02)$ 、 $(0.16\pm 0.01)$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸庆大霉素药液;VECF对4种菌的抑制能力分别等同于 $(0.35\pm 0.01)$ 、 $(0.34\pm 0.01)$ 、 $(0.38\pm 0.01)$ 、 $(0.17\pm 0.01)$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸庆大霉素药液,比BF分别高出25.0%、9.7%、15.2%和6.3%,平均高出14.1%。两类蚯蚓体腔液对std *Sau.* 的抑制作用均低于其他3种菌,推测是由于革兰氏阳性菌较革兰氏阴性菌具有宽而致密的细胞壁,因而更不容易成为抗菌药物的靶标<sup>[18]</sup>;而且根据统计学检验,蚯蚓体腔液对sludge *Sal.*、std *Sal.* 和std *Eco.* 的抑菌能力在VECF组和CECF组具有显著差异,而对std *Sau.* 则没有;对于除std *Sau.* 外的其他3种菌,VECF都表现出更高的抑制作用,由此认为滤池的驯化提高了蚯蚓体腔液的抑菌能力。

测定不同分子质量范围的粗蛋白对试验菌种的抑制能力后,换算为同等抑制能力的硫酸庆大霉素药液浓度,如表1所示。可以看出,VECF中除0~3 ku之外的3个分子质量范围粗蛋白对sludge *Sal.* 的抑制能力均高于CECF,这与VECF对sludge *Sal.* 具有更高抑菌能力的结果一致;VECF中3~10 ku粗蛋白对sludge *Sal.* 的抑制能力以及10~30 ku粗蛋白对std *Eco.* 的抑制能力分别约为CECF的1.7倍和1.4倍,说明为了适应剩余污泥和滤池环境,滤池蚯蚓提高了分子质量在3~10、10~30 ku范围的抑菌蛋白表达。

表1 蚯蚓体腔液粗蛋白对试验菌种的抑制能力

Tab.1 Antibacterial ability of crude protein in earthworm coelomic fluid

 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 

项目	滤池蚯蚓体腔液粗蛋白抑制能力				对照蚯蚓体腔液粗蛋白抑制能力			
	0~3 ku	3~10 ku	10~30 ku	>30 ku	0~3 ku	3~10 ku	10~30 ku	>30 ku
sludge <i>Sal.</i>	0.37±0.02	0.42±0.02	0.39±0.02	0.35±0.01	0.38±0.01	0.25±0.03	0.34±0.02	0.28±0.01
std <i>Sal.</i>	0.51±0.01	0.28±0.01	0.46±0.01	0.37±0.01	0.47±0.03	0.29±0.02	0.45±0.03	0.25±0.05
std <i>Eco.</i>	0.20±0.01	0.22±0.01	0.46±0.03	0.23±0.01	0.13±0.01	0.17±0.01	0.34±0.01	0.20±0.02
std <i>Sau.</i>	0.67±0.01	0.53±0.01	0.51±0.01	0.23±0.01	0.24±0.01	0.26±0.01	0.32±0.01	0.40±0.01

## 2.5 体腔液 iTRAQ 蛋白质组与抑菌能力分析

### 2.5.1 数据质控评估与样本对比

为进一步了解蚯蚓体腔液蛋白组分,对 VECF 和 CECF 进行 iTRAQ 蛋白质组分析。分别设立 3 组生物学重复,运用统计学的方法,通过肽段匹配误差分布、肽链长度分布对高分辨质谱所检测的结果进行统计和质控。图 3 宏观反映了检测结果和数据的质量,可以看出,肽段误差能够控制在  $20\times 10^{-6}$  范围内,酶解肽链长度符合多数分布在 5~20 bp 的质控要求。

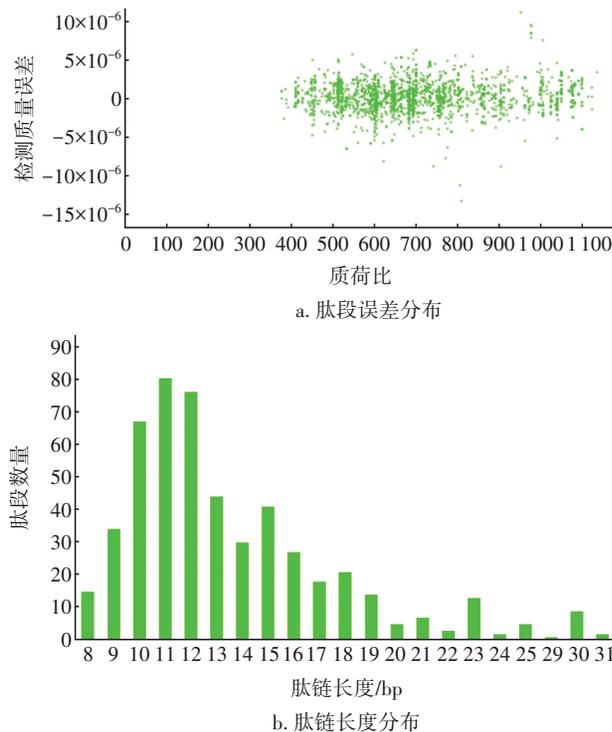


图3 蛋白数据质控信息

Fig.3 Protein data quality control information

为了分析蚯蚓体腔液样本的相关性,绘制主成分分析图(如图4所示),各个样本点之间的距离越近表明样本相似性越高。由图4可见,同组样本之间具有良好的重复性,而且CECF组和VECF组样本之间具有明显差异。

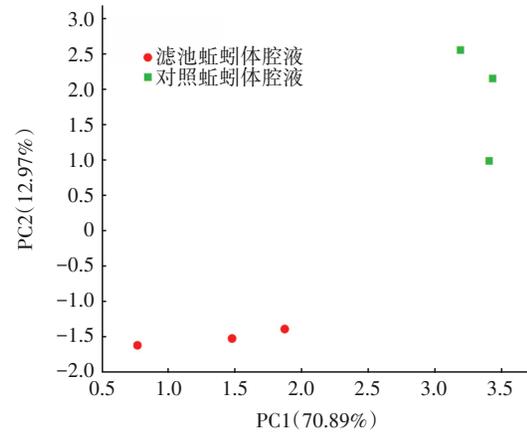


图4 样本PCA差异分析

Fig.4 Sample PCA difference analysis

### 2.5.2 全蛋白组鉴定及功能注释

试验 iTRAQ 选取环节动物蛋白库进行注释,共注释到 276 种蛋白,分子质量分布见图 5。

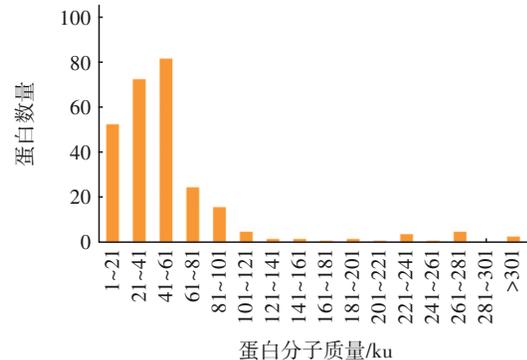


图5 蚯蚓体腔液蛋白分子质量分布

Fig.5 Protein molecular weight distribution of earthworm coelomic fluid

GO 数据库共注释到 203 种蛋白。从分子功能层面注释,二级条目中结合功能和酶的活性分别注释到 158 和 122 种蛋白,是蚯蚓体腔液蛋白的主要分子功能。结合功能三级条目以离子、杂环化合物、有机环状化合物和碳水化合物衍生物结合为主,与有机物代谢生物过程富集蛋白结果一致;酶的活性三级条目以水解酶、转氨酶和氧化还原酶活

性为主。而动物处于应激状态的典型特征是机体的氧化还原平衡被破坏,通过调控氧化还原酶和抗氧化酶的活性保证机体氧化还原平衡,提高免疫水平<sup>[19]</sup>,研究证实蚯蚓也具有通过调控氧化还原平衡进行应激免疫调节的能力<sup>[20]</sup>,可从分子功能层面证实蚯蚓体腔液对免疫系统的重要作用。

### 2.5.3 差异蛋白的筛选鉴定

以CECF为参照分析VECF中的差异蛋白,采用上调蛋白FC>1.2、下调蛋白FC<0.83、 $P<0.05$ 作为显著差异分析参数,其中FC是指两个样品中同一个蛋白的表达差异倍数。结果表明,显著上调蛋白有19种,其中分子质量在10~30 ku范围的有10种,前述抑菌试验中滤池蚯蚓10~30 ku抑菌能力显著提高,推测与这部分上调蛋白有关;另外9种上调蛋白分子质量均大于30 ku。显著下调蛋白有9种,其中分子质量>30 ku的有6种,在0~3、3~10、10~30 ku范围各1种。VECF与CECF鉴定的差异蛋白中有7种蚯蚓蛋白显著上调,具体包括4种胞外珠蛋白片段和3种血红蛋白连接链蛋白片段,血红蛋白属于珠蛋白,珠蛋白是具有携氧能力的蛋白质,即上调的蚯蚓蛋白均与机体氧气运输有关。而且胞外珠蛋白-4在蚯蚓处于金属镉污染和病原菌*Escherichia coli* O157:H7刺激时同样表达上调<sup>[21-22]</sup>,其机理尚不清楚,但推测更高的珠蛋白表达为蚯蚓机体提供更多贮存氧气,从而满足应激调节等生理功能需求。3种显著下调蚯蚓蛋白分别为lysenin相关蛋白、肌动蛋白和一种未准确定性的胞外蛋白。蚯蚓受致病细菌*Escherichia coli* O157:H7<sup>[21-23]</sup>和高浓度土霉素<sup>[24]</sup>刺激后一段时间内lysenin相关蛋白和肌动蛋白也均出现表达下调,说明滤池环境中蚯蚓机体呈现应激状态。

### 2.5.4 差异蛋白的功能注释分析

由差异蛋白的GO注释发现,大多注释到的生物过程均同时具有上调与下调蛋白,但调节生物过程和信号发送过程中均只有差异上调蛋白R7T3U1和A0A2C9K037。A0A2C9K037是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),在基因表达调控和细胞质功能活动中发挥关键作用<sup>[25]</sup>,蚯蚓免疫应激研究中也鉴定出多种MAPK通路蛋白<sup>[26]</sup>。组蛋白和MAPK都具有遗传序列保守性,在不同物种间保持较为相似的结构和序列,因而虽然以上两蛋白注释为其他物种,在蚯蚓体内应具有相似的功能。由此推测VECF中细

胞较CECF具有更高的应激活性。

另外对差异蛋白进行KEGG通路富集(见图6),可知蛋白富集率最高的均为代谢通路,其中,萜类化合物是动植物体内广泛存在的化学物质,具有杀菌作用<sup>[27]</sup>,其下调与免疫机能受损有关<sup>[28]</sup>;酮体是脂肪代谢产物,可成为能源物质参与代谢,能源代谢的提高有利于生物体抵抗病原体感染<sup>[29]</sup>。置信度最高的KEGG差异通路为细菌侵袭上皮细胞通路和沙门氏菌感染通路;肌动细胞上调除了与囊泡和SCV合成相关,也间接引发伴随细胞膜起皱的巨胞饮作用,巨胞饮作用是病原菌进入宿主细胞的快捷途径。KEGG富集通路证实滤池蚯蚓除了表现出更高的代谢能力外,也面临更强烈的病原菌胁迫,因而对病原菌(尤其是沙门氏菌)具有更高的免疫反馈。

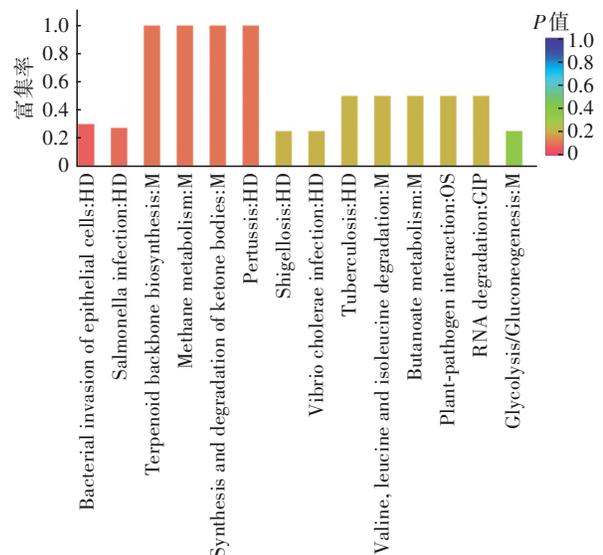


图6 差异蛋白KEGG功能注释

Fig.6 Functional annotation of differential protein KEGG

## 3 结论

① VEL中蚯蚓脂肪酸含量会增加以适应滤池及剩余污泥环境,但与抑菌免疫无直接关联;VECF较CECF表现出更明显的抑制作用,结合VF对病原菌的去除效果,认为VECF对剩余污泥中沙门氏菌、大肠杆菌的去除具有直接贡献,但对金黄色葡萄球菌的去除贡献不显著,VF对金黄色葡萄球菌的去除机理有待进一步探究;VEL抑菌水平明显弱于VECF,即体腔液对蚯蚓免疫发挥主要作用。

② 通过蛋白质组分析得出,滤池蚯蚓提高了分子质量在3~10、10~30 ku范围的抑菌蛋白表达。

当前蚯蚓体腔液中抗菌肽的研究表明,大多数已分离的蚯蚓抗菌肽分子量<50 ku,本试验将蚯蚓体腔液中蛋白质按照分子量大小分为0~3、3~10、10~30、>30 ku四个范围。iTRAQ蛋白质组的鉴定结果表明,蚯蚓体腔液中含有较多分子量>30 ku的蛋白质,对大于30 ku的不同分子量范围蛋白的抑菌作用有待进一步试验确定,未来可进行更深入的研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] FANG C X, GUO F H, LUO X Z, *et al.* Performance of a three-stage tower earthworm ecofilter for simultaneous removal of carbon and nutrients from domestic wastewater [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2011, 20(1A): 235-243.
- [ 2 ] LI Y S, ROBIN P, CLUZEAU D, *et al.* Vermifiltration as a stage in reuse of swine wastewater: monitoring methodology on an experimental farm [J]. *Ecological Engineering*, 2008, 32(4): 301-309.
- [ 3 ] 陈少华. 蚯蚓生物滤池生活污水处理性能及蚯蚓适应性研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.  
CHEN Shaohua. Studies on the Performance of Vermifiltration for Sewage Treatment and the Physiological Adaptation of Earthworm in the System [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2014 (in Chinese).
- [ 4 ] ARORA S, RAJPAL A, BHARGAVA R, *et al.* Antibacterial and enzymatic activity of microbial community during wastewater treatment by pilot-scale vermifiltration system [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 166: 132-141.
- [ 5 ] ARORA S, RAJPAL A, KUMAR T, *et al.* Pathogen removal during wastewater treatment by vermifiltration [J]. *Environmental Technology*, 2014, 35(19): 2493-2499.
- [ 6 ] ARORA S, RAJPAL A, KAZMI A A. Antimicrobial activity of bacterial community for removal of pathogens during vermifiltration [J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2016, 142(5): 04016012.
- [ 7 ] 王德凤, 栗朝芝, 吴仙. 不同方法提取蚯蚓体腔液对大肠杆菌抑菌效果的研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013(15): 131-132.  
WANG Defeng, LI Zhaozhi, WU Xian. Study on the inhibitory effect on *E. coli* of different methods that extract the earthworm cavity fluid [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2013(15): 131-132 (in Chinese).
- [ 8 ] 张显忠, 张欣然, 武晓雯, 等. 蚯蚓体内外分泌液的抗菌活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(13): 95-97.  
ZHANG Xianzhong, ZHANG Xinran, WU Xiaowen, *et al.* Study on the antibacterial activity of internal and external secretory fluid of earthworm [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(13): 95-97 (in Chinese).
- [ 9 ] 杨悦妍, 莫奕豪, 田佳敏, 等. 蚯蚓匀浆上清液对猪场常见有害菌的抗菌效果[J]. *天津农学院学报*, 2021, 28(3): 75-80.  
YANG Yueyan, MO Yihao, TIAN Jiamin, *et al.* Antibacterial activity of earthworm homogenate supernatant on common harmful bacteria in a pig farm [J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2021, 28(3): 75-80 (in Chinese).
- [ 10 ] 王冲, 郑冬梅, 冀竣玲, 等. 蚯蚓脂肪及其在抗菌物理屏障中的作用[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(4): 732-736.  
WANG Chong, ZHENG Dongmei, JI Junling, *et al.* Earthworm fat and its function as physical antibiotic barrier of *Eisenia fetida* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(4): 732-736 (in Chinese).
- [ 11 ] 刘静. 蚯蚓生物滤池处理剩余污泥系统微生物群落特征及营养级关系[D]. 上海: 同济大学, 2013.  
LIU Jing. The Microbial Community Characteristics and Trophic Level Relationship of the Surplus Sludge Treatment System of Vermifiltration [D]. Shanghai: Tongji University, 2013 (in Chinese).
- [ 12 ] LI B, JU F, CAI L, *et al.* Profile and fate of bacterial pathogens in sewage treatment plants revealed by high-throughput metagenomic approach [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(17): 10492-10502.
- [ 13 ] 陈红玲, 张兴桃, 王晴, 等. 宏基因组方法分析医药化工废水厂中抗生素耐药菌及抗性基因[J]. *环境科学*, 2020, 41(1): 313-320.  
CHEN Hongling, ZHANG Xingtao, WANG Qing, *et al.* Metagenomic analysis of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in a pharmaceutical and chemical wastewater treatment plant [J]. *Environmental Science*, 2020, 41(1): 313-320 (in Chinese).
- [ 14 ] 易鑫, 李娟, 黄京, 等. 北京市4种不同污水处理系

- 统中病原菌变化研究[J]. 环境科学学报, 2015, 35(6): 1759-1767.
- YI Xin, LI Juan, HUANG Jing, *et al.* The variety regulation of pathogens in the different process of four wastewater treatment plants in Beijing [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(6): 1759-1767 (in Chinese).
- [15] GHANEM I, ORFI M, SHAMMA M. Biodegradation of chlorpyrifos by *Klebsiella* sp. isolated from an activated sludge sample of wastewater treatment plant in Damascus [J]. *Folia Microbiologica*, 2007, 52(4): 424-427.
- [16] MAWIOO P M, GARCIA H A, HOOIJMANS C M, *et al.* A pilot-scale microwave technology for sludge sanitization and drying [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 601/602: 1437-1448.
- [17] 王冲. 蚯蚓(*Eisenia fetida*)生态免疫系统研究 I——体壁屏障系统及协同防御机理[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- WANG Chong. Research of Ecology Immunity System in the *Eisenia fetida*—Antibiotic Barrier System and Mechanism of Joint Prevention [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005 (in Chinese).
- [18] ARORA S, KAZMI A A. Reactor performance and pathogen removal during wastewater treatment by vermifiltration [J]. *Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development*, 2016, 6(1): 65-73.
- [19] ZHAO L L, SUN J L, LIANG J, *et al.* Enhancing lipid metabolism and inducing antioxidant and immune responses to adapt to acute hypoxic stress in *Schizothorax prenanti*[J]. *Aquaculture*, 2020, 519: 734933.
- [20] LEE M S, CHO S J, TAK E S, *et al.* Transcriptome analysis in the midgut of the earthworm (*Eisenia andrei*) using expressed sequence tags [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2005, 328(4): 1196-1204.
- [21] XING W. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the earthworm *Eisenia fetida* during *Escherichia coli* O157: H7 stress [J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 12(9): 6547-6560.
- [22] WANG X, CHANG L, SUN Z, *et al.* Analysis of earthworm *Eisenia fetida* proteomes during cadmium exposure: an ecotoxicoproteomics approach [J]. *Proteomics*, 2010, 10(24): 4476-4490.
- [23] WANG X, CHANG L, SUN Z. Differential expression of genes in the earthworm *Eisenia fetida* following exposure to *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(5): 525-529.
- [24] ZHAO H B, SHI S Y, ZHAO H, *et al.* Proteomic analysis of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to oxytetracycline in soil [J]. *RSC Advances*, 2019, 9: 41628-41638.
- [25] 姜勇, 罗深秋. 细胞信号转导的分子基础与功能调控 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- JIANG Yong, LUO Shenqiu. *Molecular Basis and Functional Regulation of Cell Signal Transduction* [M]. Beijing: Science Press, 2005 (in Chinese).
- [26] 张一. 基于组学的蚯蚓(*Amyntas heterochaetus*)自身免疫系统及肠道微生物群落协同防御机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- ZHANG Yi. Joint Prevention Mechanism Research (Omics-based) of the Earthworm (*Amyntas heterochaetus*) Immune System and the Intestinal Microbial Community [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [27] WANG M, WANG D, ZHANG Q, *et al.* Identification and cytochemical immunolocalization of acetyl-CoA acetyltransferase involved in the terpenoid mevalonate pathway in *Euphorbia helioscopia* laticifers [J]. *Botanical Studies*, 2017, 58: 62.
- [28] LIMONTA G, MANCIA A, BENKHALQUI A, *et al.* Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 15775.
- [29] BABAYAN S A, LIU W, HAMILTON G, *et al.* The immune and non-immune pathways that drive chronic gastrointestinal helminth burdens in the wild [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 56.

作者简介: 孙玉珠(1997-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向为污水生物处理理论与资源化。

E-mail: tongjisunyuzhu@163.com

收稿日期: 2021-09-22

修回日期: 2022-01-04

(编辑: 刘贵春)