

蚯蚓体内分泌液的抗菌活性研究

张显忠, 张欣然, 武晓雯, 袁燕涛, 郭东会 (泰山医学院生命科学学院, 山东泰安 271000)

摘要 [目的] 探究蚯蚓体内分泌液的抗菌活性。[方法] 分别将蚯蚓体内分泌液作用于不同的临床致病菌株, 筛选对体内分泌液的敏感菌种, 并在此基础上分析温度、pH、蚯蚓体内分泌液浓度等因素对蚯蚓分泌液抗菌效果的影响。[结果] 蚯蚓体内分泌液均对金黄色葡萄球菌有良好的抗菌效果; 诱发最佳抗菌效果的环境条件为: 内分泌液原液、30 ℃、pH 7~8; 外分泌液原液、60 ℃、pH 7~8。[结论] 研究结果为更好地开发与利用蚯蚓资源提供了理论基础和实践依据。

关键词 蚯蚓; 分泌液; 抗菌效果; 金黄色葡萄球菌

中图分类号 S899.8 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)13-0095-03

Study on the Antibacterial Activity of Internal and External Secretory Fluid of Earthworm

ZHANG Xian-zhong, ZHANG Xin-ran, WU Xiao-wen et al (School of Life Sciences, Taishan Medical University, Tai'an, Shandong 271000)

Abstract [Objective] To study the antibacterial activity of the internal and external secretory fluid of earthworm. [Method] The internal and external secretory fluid of earthworms were conducted on different clinical pathogens to screen out sensitive strains of internal and external secretory fluids. On this basis, the influences of temperature, pH, the concentration of internal and external secretory fluid of earthworms and other environmental factors on the antibacterial effect of secretory fluid of earthworm were analyzed. [Result] The internal and external secretory fluids of earthworm had good antibacterial effects on *Staphylococcus aureus*. The environmental conditions to induce the optimum antibacterial effect were as follows: the original liquid of the internal secretory fluid, 30 ℃, pH 7-8; the original liquid of external secretory fluid, 60 ℃, and pH 7-8. [Conclusion] The research results provided theoretical basis and practical basis for better exploitation and utilization of earthworm resources.

Key words Earthworms; Secretory fluid; Antibacterial effect; *Staphylococcus aureus*

蚯蚓通常生活在具有大量致病微生物的环境中, 生命力极强且很少患病^[1]。蚯蚓不仅作为分解者在生态系统中占有重要地位, 降低工业造成的环境污染, 保护生态环境, 实现农业的可持续发展^[2], 同时由于体内存在多种抗菌成分, 当受到机械、电击、化学及热刺激时分泌的黄色分泌液中也含有抗菌肽等活性成分, 具有较强的抑菌活性^[3]。因此, 蚯蚓不仅可作为优质的动物蛋白应用于生产生活中, 而且毒副作用小, 在当今抗药性细菌泛滥的背景下更加安全环保的蚯蚓分泌液有望替代抗生素, 具有巨大的生化药理潜力。笔者通过敏感性测定试验筛选出对蚯蚓体内分泌液的敏感菌种, 并分析了蚯蚓分泌液的抗菌效果以及环境因素对其影响, 期为更好地开发与利用蚯蚓资源提供理论基础和实践依据。

1 材料与方

1.1 材料 赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*), 购自众翔蚯蚓养殖专业合作社。大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、弗氏柠檬酸杆菌, 均由泰山医学院附属医院微生物实验室提供。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 蚯蚓外分泌液的提取。取蚯蚓 250 g, 用清水反复冲洗, 浸泡 30 min, 以便吐净泥沙; 再用无菌蒸馏水冲洗 3~5 次, 用滤纸吸取体表多余水分。将蚯蚓于 60 ℃ 水浴条件下热刺激 5~10 s^[4], 待分泌出黄色分泌液后收集转移至无菌 50 mL 离心管中, 20 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 重复离心 1 次后, 用一次性针式滤器过滤备用。

1.2.2 蚯蚓内分泌液的提取。取已提取外分泌液的蚯蚓

250 g, 沥干体表水分, -12 ℃ 下预冷处理 20 min, 匀浆器研磨, 将液体经 3 层纱布过滤于 50 mL 离心管中, 20 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 重复离心 1 次后, 用一次性针式滤器过滤备用。

1.2.3 不同菌株对蚯蚓分泌液的敏感性测定。取直径 5 mm 的药敏专用滤纸片, 高压灭菌干燥。吸取 50 μL 内(外)分泌液, 滴于滤纸片上。制备大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、弗氏柠檬酸杆菌, 菌液浓度均为 15×10^8 个/mL, 分别涂布于 MH 培养基^[5], 并将上述含分泌液的滤纸片均匀贴到培养基上。置于恒温培养箱中 37 ℃ 培养 18~20 h, 试验重复 3 次, 观察并测量抑菌圈直径, 取平均值。

1.2.4 不同温度对分泌液抗菌效果的影响。采用热刺激法提取蚯蚓外分泌液, 设置外分泌液的温度梯度分别为 60、70、80、90、100 ℃; 内分泌液于室温条件下提取, 因此温度梯度设置为 30、40、50、60 和 70 ℃。

取 5 支 10 mL 无菌离心管, 各加入蚯蚓外分泌液 600 μL, 分别在 60、70、80、90、100 ℃ 下加热 10 min^[6]。吸取 50 μL 各温度梯度的外分泌液, 滴于滤纸片上。将蚯蚓分泌液敏感菌株涂布在培养基上, 滤纸片置于其中, 每个培养基上做 5 个梯度, 设置 3 次重复试验, 观察并测量抑菌圈的直径, 取平均值。另取 5 支 10 mL 无菌离心管, 各加入蚯蚓内分泌液 600 μL, 分别在 30、40、50、60 和 70 ℃ 下加热 10 min。吸取 50 μL 各温度梯度的内分泌液, 操作同上, 观察并测量抑菌圈直径, 取平均值。

1.2.5 不同浓度对分泌液抗菌效果的影响。排列 6 支试管, 分别标记为 1~6, 1 号试管仅加入 600 μL 蚯蚓内(外)分泌液作为对照, 2~6 号试管采用倍比稀释法^[7]进行稀释, 浓度依次稀释 2、4、8、16、32 倍, 吸取 50 μL 各浓度梯度内(外)分泌液, 滴于滤纸片上。将滤纸片置于涂布有敏感菌的培养

基金项目 国家级大学生创新创业训练计划项目(201610439272)。

作者简介 张显忠(1962—), 男, 山东泰安人, 副教授, 从事生物制药教学与研究。共同第一作者, 张欣然(1995—), 女, 山东菏泽人, 专业: 生物工程。

收稿日期 2018-01-19

基础上,每个培养基做5个梯度,设置3次重复试验。观察并测量抑菌圈直径,取平均值。

1.2.6 不同pH对分泌液抗菌效果的影响。配制不同pH缓冲溶液(pH 5的柠檬酸-柠檬酸钠溶液,pH分别为6、7、8的PBS缓冲液,pH 9的碳酸钠-碳酸氢钠溶液^[8];取各pH梯度缓冲液600 μL 与蚯蚓内(外)分泌液等量混合。吸取50 μL 各pH梯度的内(外)分泌液,滴于滤纸片上。将滤纸片置于涂布有敏感菌株的培养基上,每个培养基上做5个梯度,设置3次重复试验。观察并测量抑菌圈直径,取平均值。

2 结果与分析

2.1 不同菌株对蚯蚓分泌液的敏感性测定 由图1可知,对蚯蚓内、外分泌液最敏感的菌种均为金黄色葡萄球菌^[9],肺炎克雷伯菌效果次之,大肠埃希氏菌第三,而弗氏柠檬酸杆菌没有任何现象产生。作用于同一菌种时,内分泌液抑菌圈直径均大于外分泌液抑菌圈直径。究其原因,应是由于提取方法不同所致。提取外分泌液时,水浴加热可能破坏其中一部分有效成分,导致外分泌液的抑菌效果普遍稍弱于内分泌液。

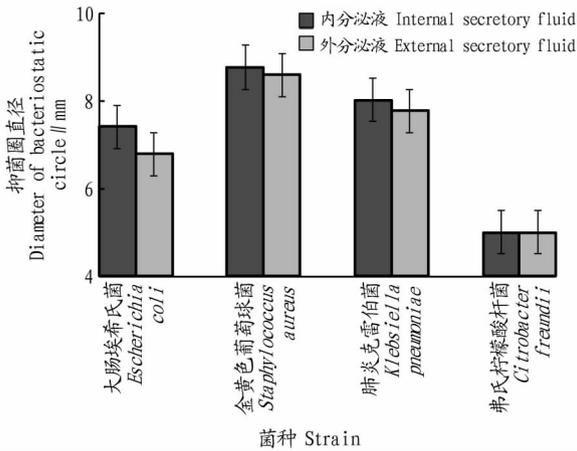


图1 不同菌株对蚯蚓分泌液的敏感性测定

Fig.1 The sensitivity determination of different strains to earthworm secretory fluid

2.2 不同温度对分泌液抗菌效果的影响 从图2可以看出,对于内分泌液,30~50 $^{\circ}\text{C}$ 时均有抑菌圈出现,其中30 $^{\circ}\text{C}$ 时抑菌圈最大,随着温度的升高,抑菌圈逐渐缩小,60 $^{\circ}\text{C}$ 时抑菌圈已完全消失。究其原因,可能是因为蚯蚓为变温动物,体温会随着外界环境的变化而上下波动,有一定的耐受范围,但随着温度的持续上升,高温会破坏有效成分的结构,导致抗菌能力消失^[10]。从图3可以看出,对于外分泌液,60~100 $^{\circ}\text{C}$ 时均有抑菌圈出现,60 $^{\circ}\text{C}$ 时抑菌圈最大,随着温度的升高,抑菌圈逐渐缩小。究其原因,可能是因为高温破坏了部分有效成分的结构,使抑菌效果变差,但总体来看,外分泌液的热稳定性相对较高,当温度升至100 $^{\circ}\text{C}$ 时仍保留了部分抑菌活性。内外分泌液对温度表现出这样的差异,可能是蚯蚓在漫长的进化过程中与环境相互作用而逐步形成的,是自然选择的结果^[11]。

2.3 不同浓度对分泌液抗菌活性的影响 从图4可以看

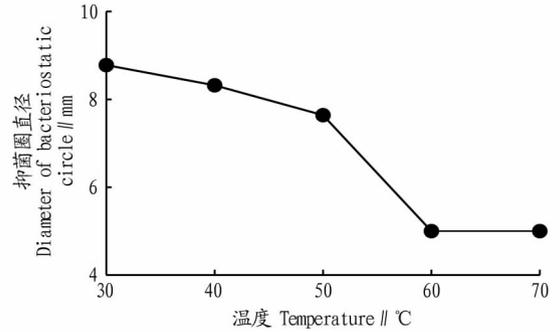


图2 不同温度对蚯蚓内分泌液抗菌活性的影响

Fig.2 The effects of different temperature on the antibacterial activity of internal secretory fluid of earthworm

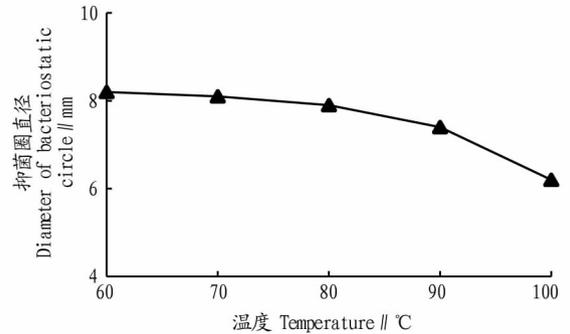


图3 不同温度对蚯蚓外分泌液抗菌活性的影响

Fig.3 The effects of different temperature on the antibacterial activity of external secretory fluid of earthworms

出,蚯蚓内、外分泌液均为蚯蚓原液的抑菌效果最明显,抑菌圈随浓度的降低而逐渐缩小,至32倍时几乎不可测,且同样浓度的内分泌液抑菌圈直径略大于外分泌液。究其原因,可能与内、外分泌液不同的提取方式有关^[12]。

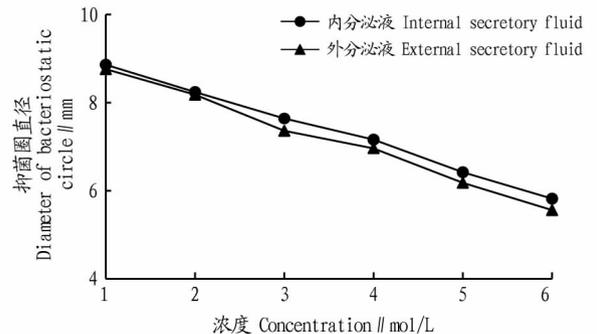


图4 不同浓度对蚯蚓分泌液抗菌活性的影响

Fig.4 The effects of different concentrations on the antibacterial activity of secretory fluid of earthworms

2.4 不同pH对分泌液抗菌活性的影响 从图5可以看出,当pH为5、7、8时蚯蚓内外分泌液抑菌圈直径较大,pH为6和9时抑菌圈直径较小。究其原因,pH 7~8的环境与蚯蚓生活的土壤所需pH相近^[13],因此内外分泌液的抗菌效果达到最大,而pH为5时出现一个明显的峰值,可能与缓冲液本身有关,较低的pH抑制了金黄色葡萄球菌的生长,对内外分泌液的抑菌产生一定的干扰。当pH为9时,外分泌液的抑菌圈均略大于内分泌液的抑菌圈,可能是由于内分泌液比外

分泌液对外界 pH 的改变更加敏感所致。

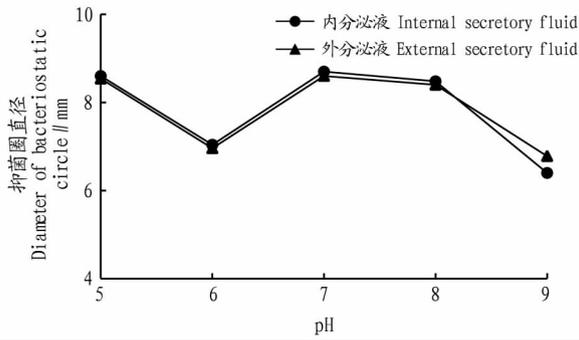


图5 不同 pH 对蚯蚓分泌液抗菌活性的影响

Fig.5 The effects of different pH on the antibacterial activity of secretory fluid

3 讨论与结论

本研究改变了通过在恒温箱内长时间溶解来获取蚯蚓内分泌液的传统方法,采用低温匀浆器研磨,将温度对蚯蚓内分泌液中活性成分的影响降至最低,另外采用一次性针式滤器过滤蚯蚓分泌液,很大程度上排除了外源微生物对试验的干扰,提高了试验结果的准确性。该研究证实了蚯蚓体内外分泌液都具有较强的抑菌效果,但由于采用热刺激法^[14]提取蚯蚓外分泌液,一定会造成蚯蚓外分泌液中抗菌活性物质的损失,总之蚯蚓内分泌液的抗菌效果强于外分泌液,也从侧面说明了温度对蚯蚓分泌液抗菌效果的影响巨大。诱发蚯蚓分泌液发挥最大抗菌效果的环境条件如下:在 30 ℃, pH 7~8 时,蚯蚓内分泌液原液的抗菌效果最佳;在 60 ℃,

pH 为 7~8 时,蚯蚓外分泌液原液的抗菌效果最佳。综上所述,不论是在生产中还是生活中,在对蚯蚓分泌液进行开发利用时,应特别注意外部理化因素尤其是温度对其带来的干扰,选择最优条件,使其发挥出最大作用。

参考文献

- [1] 贾久满,朱莲英,石洪凌. 蚯蚓水解液对大肠杆菌的抑菌效果[J]. 安徽农业科学,2007,35(4):969-971.
- [2] 张希春,孙振钧,嵇如朋,等. 蚯蚓两种抗菌肽的分离纯化及部分性质[J]. 生物化学与生物物理进展,2002,29(6):955-960.
- [3] 贾久满,李成会,张连忠. 蚯蚓浸出液对大肠杆菌抑菌效果的研究[J]. 饲料工业,2006,27(22):60-61.
- [4] 贾久满,郑素玲,李成会. 蚯蚓水解液与浸出液对大肠杆菌的抑菌效果[J]. 饲料研究,2007(10):3-4.
- [5] 郭志坚,郭书好,何康明,等. 黄柏叶中黄酮醇类含量测定及其抑菌实验[J]. 暨南大学学报(自然科学版),2002,23(5):64-66.
- [6] 吕春梅,王琨,邱海龙,等. 稀土硝酸盐对金黄色葡萄球菌抑菌活性实验[J]. 哈尔滨工业大学学报,2005,37(12):1639-1640.
- [7] 常翠,董淳,杨宏图,等. 清喉口含片动物体内、外抑菌实验研究[J]. 中国药房,2006,17(5):336-338.
- [8] 黄敏,颜水楠,桂晓春. 酶的 pH 影响实验中缓冲液配制的改善与优化组合[J]. 职业教育研究,2012(8):136-137.
- [9] 刘兵,夏先林,施晓丽. 蚯蚓体腔液对大肠杆菌抑菌效果试验[J]. 黑龙江畜牧兽医,2008(11):92-93.
- [10] 郑津辉,孟庆恒,王景安. 蚯蚓抗菌肽的提取与抗菌活性研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(10):51-53.
- [11] 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.
- [12] 戴义传. 关于蚯蚓提取液抑菌作用的研究[J]. 生物学杂志,1989(2):21-23.
- [13] 王庆华,胥清芳,龙李,等. 两种蚯蚓提取物对大肠杆菌的抑菌效果[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011(3):131-132.
- [14] 刘艳琴,王东辉,孙振钧. 蚯蚓体腔液及粗组分体外抗菌特性[J]. 家畜生态学报,2004,25(4):51-54.
- [9] 邓志武. 鱼类车轮虫病、指环虫病、烂鳃病和水霉病并发的防治技术[J]. 科学养鱼,2004(5):48.
- [10] 张元园. 氧化乐果对斑马鱼的毒性作用[D]. 青岛:青岛科技大学,2016:3-7.
- [11] BU SIC V, KATALINI C M, SINKO G, et al. Pyridoxal oxime derivative potency to reactivate cholinesterases inhibited by organophosphorus compounds [J]. Toxicology letters, 2016, 262: 114-122
- [12] 杨先乐. 渔药药理学[M]. 北京:中国农业出版社,2011:3-4.
- [13] MADSEN H C K, BUCHMANN K, MELLERGAARD S. Treatment of trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation systems in Denmark: Alternatives to formaldehyde [J]. Aquaculture, 2000, 186: 221-231.
- [14] 李文杰,朱菲莉,赵喜喜,等. 黄颡鱼养殖过程中常见病害及其防治[J]. 水产养殖,2011(8):49-51.
- [15] 王高学,赵云奎,申烨华,等. 25 种植物提取物杀灭鱼类指环虫活性研究[J]. 西北大学学报(自然科学版),2011,41(1):73-76.
- [16] 汤亚飞,王焰新,蔡鹤生. 有机磷农药的使用与污染[J]. 武汉化工学院学报,2004,26(1):11-14.
- [17] 朱松,孙彩霞. 光催化技术在农药处理中的应用[J]. 浙江农业科学,2016,57(8):1251-1254.
- [18] 赵玉琴,李丽娜,李建华. 常见拟除虫菊酯和有机磷农药对鱼类的急性及其联合毒性研究[J]. 环渤海污染与防治,2008,30(11):53-57.
- [19] 汪安泰,朱永友. 水螅体表隐鞭虫、车轮虫的防治[J]. 动物学杂志,1990,34(2):23-25.
- [20] 高莉霞,朱思华,曾可为,等. 福尔马林对鳊鱼苗种车轮虫、斜管虫病的防治研究[J]. 淡水渔业,1992(6):8-11.
- [21] 王权,王建国,陆宏达,等. 硫酸锌慢性毒性胁迫下克氏原螯虾的组织病理[J]. 中国水产科学,2012,19(1):126-137.

(上接第 89 页)

以促进药物快速渗透到机体内,其添加量为 0.8%。混合配制的杀虫药物溶液不仅具有杀虫效果,而且可以净化水质,降低药物对环境造成污染。研究结果可为水产养殖中车轮虫病防治提供用药参考。

参考文献

- [1] AL-RASHEID K A, ALI M A, SAKRAN T, et al. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of some River Nile fish, Egypt [J]. Parasitology international, 2000, 49(2):131-137.
- [2] 陈启鑫. 鱼类、蝌蚪和甲壳动物体外寄生车轮虫(Trichodina)的研究[J]. 水生生物学集刊,1963(3):99-111.
- [3] 陈启鑫. 青、鲢、鳙、鲤等家鱼寄生原生动物的研究 III. 寄生鳃和鳃的原生动物[J]. 水生生物学集刊,1956(2):279-298.
- [4] 赵元君,唐发辉,唐安科. 小车轮虫、三分虫种类及周丛小车轮虫种群周年动态:重庆地区淡水车轮虫研究[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版),2007,24(1):1-6.
- [5] XU K D, SONG W B, WARREN A. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) from the gills of cultured marine fishes in China, with the description of *Trichodinella lomi* n. sp. [J]. Systematic parasitology, 1999, 42(3):219-227.
- [6] 徐奎栋,孟繁林,宋微波. 鲈鱼的鳃寄生车轮虫病及扫描电镜观察[J]. 青岛海洋大学学报,2000,30(3):418-422.
- [7] 刘攀. 江苏射阳地区黄颡鱼鳃车轮虫的形态分类学研究及其防控药物的毒性研究[D]. 上海:上海海洋大学,2012.
- [8] 吴仲芳. 杀虫单结晶杀虫双高浓度水剂及联合法新工艺[J]. 农药,1986(2):19-20.