

蚯蚓脂肪及其在抗菌物理屏障中的作用

王 冲, 郑冬梅, 冀竣玲, 孙振钧

(中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094)

摘 要:以赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为实验动物,采用室内培养方法,研究了细菌浸浴诱导对蚯蚓体内脂肪含量和脂肪酸组成的影响。结果表明:(1)索氏抽提法不能从蚯蚓体腔液中获得脂肪,但是可从蚯蚓的组织中获得脂肪。(2)细菌诱导后,蚯蚓体内的脂肪含量增加 0.81%(干物质基础),总脂中的脂肪酸含量均有所增加,其中硬脂酸、油酸、亚油酸增加的幅度较大,分别增加了 2.62%、1.58%和 1.62%。(3)蚯蚓脂肪的抑菌作用具有选择性,对大肠杆菌的抑菌作用最强,抑菌圈直径为 1.32 cm;其次为绿脓杆菌,抑菌圈直径为 0.97 cm,但是对金黄色葡萄球菌没有抑菌作用;大肠杆菌诱导后,蚯蚓脂肪对绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用增强,但是对大肠杆菌的抑制作用减弱。(4)蚯蚓脂肪对大肠杆菌、绿脓杆菌的最低抑菌浓度(MIC)分别为:0.05、0.1 g·mL⁻¹;对金黄色葡萄球菌没有抑菌作用。但在细菌诱导后,蚯蚓脂肪对大肠杆菌、绿脓杆菌及金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)分别为:0.05、0.1、0.1 g·mL⁻¹;(5)蚯蚓的抗菌物理屏障主要是体壁和消化道,而具有抑菌作用的蚯蚓脂肪也主要分布在这些组织中,因此蚯蚓的脂肪代谢在蚯蚓的生态免疫过程中发挥着重要作用。

关键词:赤子爱胜蚓; 细菌诱导; 蚯蚓脂肪; 抗菌作用; 物理屏障

中图分类号:X174 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0732-05

Earthworm Fat and Its Function as Physical Antibiotic *Barrier of Eisenia fetida*

WANG Chong, ZHENG Dong-Mei, JI Jun-ling, SUN Zhen-Jun

(College of Resources and Environmental Sciences, CAU, Beijing 100094, China)

Abstract: The experiment was conducted to study the fat and its function in the physical antibiotic barrier of *Eisenia fetida*. The results showed that: (1) the fat could not be extracted from coelomic fluid of *Eisenia fetida* by soxhlet extraction method, but the fat could be produced from body of *Eisenia fetida* by soxhlet extraction method. (2) After the 4-hour inducement of *E. coli*, the content of fat had the increase of 0.81% (based on of dry matter). And the content fall the fatty acid was eased in the inducement. The stearic acid, oleic acid and linoleic acid had an increases of 2.62%, 1.58% and 1.62%, respectively. (3) The antibacterial function of earthworm fat to *Escherichia coli* was best and bacteriostasis circle has the diameter of 1.32 centimeter. The second was *Pseudomonas aeruginosa*, and the diameter of bacteriostasis circle was 0.97 centimeter. There was no bacteriostasis influence of earthworm fat on *Staphylococcus aureus*. So the bacteriostasis selectivity of earthworm fat could be found in the experiment. On the other hand, the bacteriostasis influence of earthworm fat to *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were increased after the earthworm was induced by *E. coli*. But the antibacterial function of earthworm fat to *Escherichia coli* was decreased after the inducement. (4) The MIC of earthworm fat to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was 0.05 g·mL⁻¹, 0.1 g·mL⁻¹ respectively. But the MIC of earthworm fat to *Staphylococcus aureus* could be 0.1 g·mL⁻¹ after the earthworm was induced by *E. coli*. And there was no change in the MIC of earthworm fat to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in the inducement. (5) The main physical antibiotic barrier in the earthworm was the body wall and the digestive system. And the bacteriostasis fat was in these tissues. So the fat metabolism in the earthworm may be playing an important role in the ecology immune system of the earthworm *Eisenia fetida*.

Keywords: *Eisenia fetida*; bacterial inducement; fat in earthworm; antibacterial function; physical antibiotic barrier

收稿日期:2004-11-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270195,30470220);中国高校博士点基金(20020019029)

作者简介:王 冲(1977—),男,汉族,江苏东台人,在读博士,主要从事蚯蚓生物学、蚯蚓免疫生态学的研究。

E-mail: Wangch7716@163.com

联 系 人:孙振钧 E-mail:Sun108@cau.edu.cn

蚯蚓作为一种腐生生物,其生长的环境中充满了各种微生物,特别是用于人工饲养和处理生活垃圾等废弃物的蚯蚓,更是生活在充满各种微生物甚至于大量致病微生物的环境中,因此在7亿多年的进化过程中,蚯蚓为了适应不利的生存环境,其体内必然产生独特的抗菌与免疫系统,并逐渐形成了防御病原细菌侵袭的有效机制。蚯蚓的免疫防御体系是由防止异物侵入的外部屏障结构和防止侵入后进一步蔓延的内部免疫机制所组成。后者又分为自然免疫和获得性免疫,包括细胞免疫和体液免疫。在蚯蚓的免疫防御体系中,屏障结构和自然免疫起主要作用,故又将这两者总称为天然抵抗力。但目前关于蚯蚓生态免疫的研究多集中在体液免疫、吞噬细胞的活性以及农药、重金属等对蚯蚓消化道的影^[1-9]响,对于蚯蚓屏障结构在抗菌过程中的作用研究得较少。而有关文献表明,蚯蚓体的脂肪主要分布在蚯蚓的体壁和消化道中,这些部位正是蚯蚓抵抗外来物质入侵的主要物理屏障。但目前对于蚯蚓脂肪的研究也仅仅局限在其营养作用上,认为脂肪是蚯蚓的重要营养之一,也是蚯蚓的一种能源,它的一些成分参与合成脂肪体、糖原及细胞膜结构;脂类中的脂肪酸、甾醇等成分在蚯蚓的生长、发育和生殖上有重要作用。对于蚯蚓脂肪代谢与免疫的关系,以及蚯蚓脂肪在蚯蚓生态免疫中作用的研究,至今仍未有详细的报道。本实验对脂肪在赤子爱胜蚓生态免疫中的作用进行了进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蚯蚓为本实验室用腐熟的牛粪进行人工饲养的赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均为本试验室保存的菌种。

1.2 试验方法

1.2.1 LB 液体培养基的配制

950 mL 重蒸水、10 g 蛋白胨、5 g 酵母浸粉、10 g 氯化钠,溶解后用 5 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠调 pH 值至 7.0,加水至 1 L,然后在压力为 0.1~0.15 MPa、温度为 121 ℃的条件下,高压蒸汽灭菌 20 min^[7]。

1.2.2 细菌诱导

按 Sumida 等(1992)方法活化大肠杆菌,并进行对数期培养。即将大肠杆菌接种于 5 mL LB 液体培养基中,然后放入 THZ-C 恒温振荡器中(江苏太仓市实

验设备厂),37 ℃振荡过夜培养(转速为 168 r·min⁻¹),将 0.2 mL 菌液加到 5 mL 新的 LB 液体中,同样温度下摇动 2 h,此时的菌液即为对数生长期的大肠杆菌液。将对数期生长的大肠杆菌液稀释到 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 后,把蚯蚓放在其中浸浴 4 h^[8]。

1.2.3 体腔液的获得^[9]

取成熟的赤子爱胜蚓放在湿滤纸吐尽肠道污物后(一般 48 h),用 pH6.8 的 PBS 缓冲液反复冲洗干净。用自制的 5 V 电压瞬间刺激蚯蚓,用移液器收集黄色分泌液。然后 4 ℃条件下离心 20 min, 转速为 3 000 r·min⁻¹,所得上清液为蚯蚓体腔液。

1.2.4 蚯蚓脂肪的提取^[10]

蚯蚓的前处理:将大肠杆菌诱导前后的赤子爱胜蚓称重,放在烈日(中午 12:00~14:00)下暴晒,自然晾干 48 h 后,在 65 ℃的烘箱中烘 24 h,测得初水分后,研碎,用天平称取每种样品干物质 5 g,用滤纸包好,保证不漏散,放入索氏提取器的浸提管内。

蚯蚓体腔液的前处理:吸取诱导前后的蚯蚓体腔液放入直径为 200 mm 的大培养皿中,放到 65 ℃的烘箱中烘约 24 h,直至得到干物质为止。用电子天平称取干物质 5 g 左右(精确到 0.000 1 g),用滤纸包好,放入索氏提取器的浸提管中。

蚯蚓脂肪的提取:将洗净索氏提取器小烧瓶在 103 ℃~105 ℃的烘箱中烘 2 h,置于干燥器内冷却,倒入约 1/2~1/3 体积的无水乙醚,最后联接索氏提取器的各部分,于 50 ℃~55 ℃水浴锅中加热回流 6 h。提取完毕,回收乙醚,将小烧瓶中的少量提取物连同剩余的少量乙醚倒入青霉素的小瓶中,放在自然通风状态下数小时,让乙醚完全挥发,得到脂类物质样品,放置于冰箱的冷冻层保存、备用。

1.2.5 蚯蚓脂肪的抑菌试验^[11]

将 10 mL 已高压蒸汽灭菌并冷却至 50 ℃左右的 LB 培养基倒入 9 cm 培养皿中,然后将 5 mL LB 培养基与 200 μL 对数生长期的菌液快速混合均匀,加入到已经铺有 10 mL LB 培养基的培养皿中。4 ℃冰箱过夜。第 2 d 在培养皿中放入 3 个牛津杯。分别在牛津杯中加入 100 μL 浓度为 0.2 g·mL⁻¹ 经 0.22 μm 滤膜除菌的诱导前后的蚯蚓脂肪样品,同时设乙醚对照。培养皿于 4 ℃放置 8 h 后 35 ℃恒温培养 24 h。用游标卡尺测量抑菌圈直径同时拍照。

1.2.6 最小抑菌浓度(MIC)的测定^[12]

按照陈秀枢(1994)的方法,在 96 孔板上每孔用 50 μL 的 LB 液体培养基将 0.2 g·mL⁻¹ 的诱导前后的

蚯蚓脂肪样品做 2 倍系列稀释,浓度分别为 0.2、0.1、0.05、0.025 g·mL⁻¹ 和 12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.40 mg·mL⁻¹。分别加入对数期生长的大肠杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌的菌液 50 μL。35 ℃孵育 20~22 h 后,加入 0.5% 的 2.3.5-氯化三苯基四氮唑(TTC) 5 μL,继续孵育 1~3 h,培养孔呈现红色为有细菌生长。结果判断以无可见细菌生长的最低药物浓度为蚯蚓脂肪对测试菌的最小抑菌浓度(MIC)。

1.2.7 蚯蚓脂肪中脂肪酸含量的测定

蚯蚓脂肪的水解与甲酯化^[12]:将得到的总脂加 6%KOH 乙醇液 10 mL,在水浴上回流 2 h,回收乙醇,加水 20 m,用乙醚萃取 3 次,每次 20 mL,合并乙醚液,水洗至中性,回收乙醚得不皂化物。水层(皂化部分)用 40%H₂SO₄ 酸化至 pH2,用乙醚萃取 3 次,20 mL·次⁻¹,合并乙醚液,水洗至中性,回收乙醚,干燥,得总脂肪酸,将所得总脂肪酸加甲醇 20 mL,浓 H₂SO₄ 1 mL,水浴回流 2 h,回收大部分甲醇,加水 20 mL,用乙醚萃取 3 次,每次 20 mL,合并乙醚液,水洗至中性,回收乙醚,干燥得总脂肪酸甲酯。

脂肪酸含量的测定:按照 GB/T 17377—1998(动植物油脂脂肪酸甲脂的气相色谱分析)的方法进行。仪器为岛津 GC-9A 气相色谱仪(日产),检测器为 FID,色谱柱为 25 mm×3 mm 不锈钢柱,内装 9.3% DEGS 涂层的 80~100 目酸洗硅烷化白色担体,载气为 99.9%的氮气,流速为 35 mL·min⁻¹,燃气 50 mL·min⁻¹,空气 500 mL·min⁻¹,纸速 15 mL·min⁻¹,进样量 1 μL,检测器温度 24 ℃,环境温度 19 ℃,湿度 27%。

1.3 统计分析

将试验所得的数据进行方差分析及 Dancun’s 新复极差多重比较(SSR 法)。

2 试验结果

2.1 赤子爱胜蚓及其体腔液中的脂肪含量

通过 3 批蚯蚓样品的分别提取、称量,发现蚯蚓体腔液中的脂肪含量低于索氏提取的最低检测限,因此不能通过索氏提取的方法从蚯蚓的体腔液中提取脂肪。但是索氏提取法可以从蚯蚓体内提取脂肪,细菌诱导后,蚯蚓体内的脂肪含量增加 0.81%(干物质基础),且差异显著。细菌诱导前后蚯蚓体内及体腔液中的脂肪含量见表 1。

表 1 赤子爱胜蚓及其体腔液中的脂肪含量(%)

Table 1 The contents of fat in the coelomic fluid and body of Eisenia fetida (%)				
	蚯蚓	诱导后的蚯蚓	体腔液	诱导后体腔液
脂肪含量	5.59±0.19 ^a	6.40±0.09 ^b	0	0
95%的置信区间	5.59±0.58	6.40±0.27	0	0

注:同一行数据右上角无相同小写字母者表示处理间差异显著(P<0.05)。

2.2 蚯蚓脂肪的抑菌作用及其最小抑菌浓度

2.2.1 蚯蚓脂肪的抑菌作用

通过 3 批(每批 2 个重复)蚯蚓脂肪样品的抑菌试验(采用牛津法),可以得出蚯蚓脂肪对大肠杆菌的抑制作用最大,当浓度为 0.2 g·mL⁻¹ 时,大肠杆菌的平均抑菌圈直径为 1.32 cm;其次为绿脓杆菌,平均抑菌圈直径为 0.97 cm,但是对金黄色葡萄球菌没有抑菌作用,各组间的差异都极显著(P<0.01)。大肠杆菌诱导后,蚯蚓脂肪对大肠杆菌的抑制作用降低,并且差异极显著(P<0.01);但对金黄色葡萄球菌的抑制作用增强,差异显著(P<0.05);对绿脓杆菌的抑制作用也有所提高,但差异不显著。见表 2。

表 2 蚯蚓脂肪的抑菌作用(cm)

Table 2 Antibacterial function of fat in the earthworm Eisenia fetida (cm)

		脂肪	诱导后的脂肪	对照
大肠杆菌	抑菌圈直径	1.32±0.03 ^{A1}	1.13±0.06 ^{B1}	0.82±0.03 ^C
<i>Escherichia coli</i>	95%的置信区间	1.32±0.09	1.13±0.18	0.82±0.09
绿脓杆菌	抑菌圈直径	0.97±0.06 ^{AII}	1.03±0.06 ^{A12}	0.80 ^B
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95%的置信区间	0.97±0.18	1.03±0.18	0.80
金黄色葡萄球菌	抑菌圈直径	0.80 ^{AIII}	0.97±0.06 ^{B2}	0.80 ^A
<i>Staphylococcus aureus</i>	95%的置信区间	0.80	0.97±0.18	0.80

注:同一行数据右上角无相同大写字母者表示处理间差异极显著(P<0.01);同一列数据右上角无相同阿拉伯数字表示处理间差异显著(P<0.05);无相同罗马数字表示处理间差异极显著(P<0.01)。

2.2.2 蚯蚓脂肪的最低抑菌浓度(MIC)

通过 3 批(每批 2 个重复)蚯蚓脂肪样品的最低抑菌浓度实验,可以发现蚯蚓脂肪对大肠杆菌、绿脓杆菌的最低抑菌浓度(MIC)分别为:0.05、0.1 g·mL⁻¹;对金黄色葡萄球菌没有抑菌作用。但在细菌诱导后,蚯蚓脂肪对大肠杆菌、绿脓杆菌及金黄色葡萄球菌的

最低抑菌浓度(MIC)分别为:0.05、0.1、0.1 g·mL⁻¹;由此可见细菌诱导后,蚯蚓脂肪对大肠杆菌和绿脓杆菌的最低抑菌浓度没有变化,但是对金黄色葡萄球菌的抑制作用增强,差异显著($P<0.05$)。

2.3 细菌诱导前后蚯蚓体内脂肪酸含量的变化

大肠杆菌诱导后,蚯蚓总脂中的各种脂肪酸含量

表 3 赤子爱胜蚓体内脂肪酸的含量(%)

Table 3 The contents of fatty acids in the earthworm (*Eisenia fetida*) (%)

项目	豆蔻酸 14:0	豆蔻油酸 14:1	棕榈酸 16:0	棕榈油酸 16:1	硬脂酸 18:0	油酸 18:1	亚油酸 18:2	亚麻酸 18:3
蚯蚓	3.10	1.45	3.90	1.45	12.66	9.81	9.52	8.86
诱导后蚯蚓	3.78	1.68	4.56	1.57	15.28	11.39	11.14	9.49

均有所提高,其中硬脂酸、油酸、亚油酸增加的幅度较大,分别增加了 2.62%、1.58%和 1.62%。细菌诱导前后蚯蚓体内脂肪酸含量的变化见表 3。

3 讨论与分析

蚯蚓性寒,味微咸,是一种传统中药^[14]。但是随着科学的发展,人们发现蚯蚓体内存在着具有抗菌性、抗霉菌性、抗肿瘤、抗癌等生物活性的物质^[14-17]。但这些活性物质大部分是从体腔液中获得的,本试验在蚯蚓脂肪提取及海洋动物脂类抗菌活性筛选的基础上^[15-18],提取了赤子爱胜蚓的脂类物质进行抗菌试验,为确定、分离蚯蚓的抗菌有效成分及研究蚯蚓的免疫生态学提供理论依据。

3.1 蚯蚓脂肪及脂肪酸的抑菌作用

癸酸、月桂酸(十二烷酸)、肉豆蔻酸、亚油酸、亚麻酸等一系列脂肪酸都具有抗微生物作用。Feldlaufer 等(1993)试验发现上述脂肪酸对幼虫芽孢杆菌(美洲幼虫腐臭病病原)的抑制圈分别为 54、80、10、68、52 mm,而棕榈酸、硬脂酸及油酸对它无活性^[21]。Ababouch 等(1992)发现亚麻酸和月桂酸对蜡样芽孢杆菌孢子有强抑制作用,癸酸、棕榈酸及硬脂酸有部分抑制作用,亚油酸及肉豆蔻酸对它无作用^[22]。本研究发现,大肠杆菌诱导后,蚯蚓体内的脂肪含量显著升高,对绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌抑制作用也显著增强,并且脂肪酸的含量也有所提高,尤其是硬脂酸,油酸,亚油酸分别增加了 2.62%、1.58%和 1.62%。由此可见,蚯蚓脂肪的确是蚯蚓体内抗菌的成分之一,至于脂类物质中哪些脂肪酸是抗菌的有效成分,有待于进一步分析、测定。

此外,用不同的提取方法所得到的物质不同,因

此筛选所得到的结果可能不同。本试验用索氏提取的方法提取蚯蚓脂类是一种初步的尝试,有关资料表明国内外用此法提取蚯蚓脂类进行抑菌试验的报道较少,因此对于用此法提取的脂类是否有可能影响试验结果,也有待于进一步讨论。

3.2 蚯蚓脂肪抑菌作用的选择性

据报道,海洋环节动物中也存在着抗菌性、抗霉菌性、抗肿瘤、抗癌等物质^[23],其显示抗菌作用的主要包括含溴的酪氨酸衍生物、吡咯及吡啶衍生物、酚衍生物、类萜等^[24],而在其他海洋动物的脂类抑菌试验中,发现脂肪的抑菌作用具有选择性。本试验得出蚯蚓脂肪对大肠杆菌、绿脓杆菌具有抑制作用,但是对金黄色葡萄球菌没有抑制作用,并且通过细菌诱导后,蚯蚓脂肪对绿脓杆菌及金黄色葡萄球菌的抑制作用增强,但对大肠杆菌的抑制作用降低。由此可见,无论在细菌诱导前后,蚯蚓脂肪的抑菌作用也具有选择性。而大肠杆菌诱导后,蚯蚓脂肪对大肠杆菌的抑制作用降低,可能与蚯蚓产生的耐受性有关。

3.3 蚯蚓脂肪在物理抗菌屏障中的作用

蚯蚓体腔液是蚯蚓为了抵御外来物质的侵害,包括细菌、真菌、病毒、重金属、农药、兽药等分泌出来的黄色液体。本试验结果表明,蚯蚓的体腔液中脂肪的含量极低,不能通过索氏提取的方法获得,因此脂肪不是蚯蚓体液免疫因子的主要组成部分。同时本试验结果也表明,细菌诱导后,蚯蚓体的脂肪含量显著增加,抗菌活性增强,而有关文献表明,蚯蚓体的脂肪主要分布在蚯蚓的体壁和消化道中,这些部位正是蚯蚓抵抗外来物质入侵的主要物理屏障。此外,Søren 等研究表明,温度变化能够改变蚯蚓体内的脂肪酸含量,影响脂肪酸的组成^[25]。而 Scripps 研究所的副教授 Luc Teyton 博士也证明人体的脂类代谢与免疫系统

之间存在着直接关联性,因此本实验蚯蚓体内的脂肪代谢也是蚯蚓生态免疫系统的重要组成部分,其在蚯蚓的物理抗菌屏障中发挥着重要作用。

参考文献:

[1] Edwin L Cooper, Philippe Roch. Earthworm immunity: a model of immune competence[J]. *Pedobiologia*, 2003,47:676–688.

[2] Joanna Homa, Maria Nikliska, Barbara Plyszc. Effect of heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allolobophora chlorotica*[J]. *Pedobiologia*, 2003,47:640–645.

[3] Patrice Ville, Philippe Roch, Edwin L Cooper, et al. PCBs Increase Molecular–Related Activities (Lysozyme, Antibacterial, Hemolysis, Proteases) but Inhibit Macrophage–Related Functions (Phagocytosis, Wound Healing) in Earthworms[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1995, 65: 217–224.

[4] 郭永灿,王振中,张友梅. 重金属对蚯蚓胃肠道上皮细胞超微结构损伤的研究[J].生态学报, 1997, 17(3):282–288.

[5] 郭永灿,赖 勤,颜亨梅. 农药污染对蚯蚓的群落结构与超微结构影响的研究[J]. 中国环境科学, 1997, 17(1):67–71.

[6] 甘雅玲,郭中伟. 溴氰菊脂对蚯蚓超微结构影响的研究[J].电子显微学报, 2002, 21(5):513–514.

[7] 沈 萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 1999.221.

[8] Sumida–M, Ichimori–H, Yuhki–T, Mori–H, Matsubara–F. Induction of antibacterial activity in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, by injection of formalin–treated *Escherichia coli* K–12 in the anterior and posterior body part of the ligated larvae[J]. *Comp–Biochem–Physiol–B–Comp–Biochem*, 1992, 101 (1/2):173–178.

[9] 刘艳琴.蚯蚓(*Eisenia fetida*)组分体外抗病毒、抗肿瘤作用和抗菌寡肽的分离纯化及部分特性[D].北京:中国农业大学博士学位论文, 2003.

[10] 王秀奇,秦淑媛,高天慧,等. 基础生物化学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999.106–108.

[11] 张明凤,黄 彬,张 锋,等. 5 种海洋动物脂类提取物的抑菌试验 [M]. 福建师范大学学报(自然科学版),2001,17(2):115–117.

[12] 陈秀枢,屠 涛. 微量肉汤稀释法测定 MIC 的评价[J]. 中华医学检验杂志, 1994, 17(2):95–98.

[13] 肖继先,陈敬炳,王先忠,等. 通俗环毛蚓的化学成分研究[J]. 时珍国医国药,2002, 13(10):586–587.

[14] 耿 晖. 地龙药理研究概况[J]. 时珍国医国药,2000, 11(10):952.

[15] 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): 955–961.

[16] Liu Yanqin,Sun Zhenjun, Wang Chong, et al. Purification of Antibacterial Short Peptide in Earthworm *Eisenia Foetid*[J]. 中国生物化学和生物物理学报, 2004,36(4):297–302.

[17] 林少琴,余 萍,兰瑞芳,等. 蚯蚓抗肿瘤成分的研究[J]. 海峡药学, 2000, 12(3):59–62.

[18] 韩 苇. 蚯蚓提取物透析组分对 MG803 胃癌细胞 DNA 合成的抑制作用[J]. 第四军医大学学报, 1991, 12:302–304.

[19] 陈寅山,郑 怡,卢海声,等.福建沿海 16 种海洋动物抗菌活性的筛选[J].中国海洋药物,1997,4:24.

[20] 帅然新,徐祖洪.青岛沿海九种海藻的类脂及酯类抗菌活性的研究 [J].中国海洋药物,1997,4:16.

[21] Feldlaufer. Antimicrobial activity of fatty acids against *Bacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood disease[J]. *Apidologie*, 1993, 24:95–97.

[22] Ababouch–L, Chaibi–A, Busta–F F. Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. J–Food–Prot. Des Moines, Iowa : International Association of Milk, Food, and Environmental Sanitarians. Dec 1992. 55 (12):980–984.

[23] Shaw P D. Antimicrobial activities from marine organisms, in "Food–Drugs from the Sea, Proceedings 1974".Published:Marine,TechnologySociety,Washington,D.C.,1976.429–433.

[24] 董定绵.海洋生物的生理活性物质[M].北京:海洋出版社,1984.194–210.

[25] Søren O Petersen, Martin Holmstru. Temperature effects on lipid composition of the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Eisenia norden-skioldi*[J]. *Soil Biology & Biochemistry*,2000,32:1787–1791.