

蚯蚓摄食污泥对其肠道功能区微生物种群及耐药基因的影响

彭兰生,关孟欣,黄 魁*,夏 慧,桑春雷 (兰州交通大学环境与市政工程学院,甘肃 兰州 730070)

摘要: 以赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为实验蚯蚓,研究蚯蚓消化污泥前后,其肠道各功能区微生物种群结构及耐药基因(ARGs)丰度的变化情况.为表征活体功能性微生物,所取新鲜样品均采用叠氮溴化丙锭(PMA)预处理后,再进行DNA相关分析.结果表明:蚯蚓消化污泥5d后,细菌16S rDNA和真核生物18S rDNA的丰度在其胃中分别显著增加了28.2倍和42.2倍($P<0.05$),而在砂囊和后肠中均显著性降低($P<0.05$).此外,蚯蚓消化污泥使其砂囊中的优势菌门由变形菌门变为软壁菌门,胃中的优势菌门由拟杆菌门变为厚壁菌门,而对后肠微生物种群结构的影响较小.对于ARGs而言,大环内酯类耐药基因*ermF*、四环素类耐药基因*tetX*和磺胺类耐药基因*sul2*在蚯蚓胃中的丰度分别显著升高了 1.9×10^2 倍、 8.4×10^5 倍和25.9倍($P<0.05$),而在其砂囊和后肠中ARGs总丰度分别显著下降了11.0倍和45.2倍($P<0.05$).基于网络分析结果显示,蚯蚓摄食污泥可影响其肠道内ARGs宿主细菌的结构多样性.

关键词: 污泥资源化; 蚯蚓堆肥; 抗性基因; 肠道微生物; 生物污染物

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2022)01-0465-09

Effects of excess sludge fed by earthworms on microbial community and antibiotic resistance genes in their intestinal functional area. PENG Lan-sheng, GUAN Meng-xin, HUANG Kui*, XIA Hui, SANG Chun-lei (School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China). *China Environmental Science*, 2022,42(1): 465~473

Abstract: This study aimed to investigate the changes of microbial community structure and their antibiotics resistance genes (ARGs) abundances in the intestinal tract of *Eisenia fetida*, via detecting the sludge passing through different functional areas in earthworms' gut. Prior to the DNA extraction, all fresh samples were pretreated with propidium monoazide (PMA) to characterize active functional microorganisms. The results showed that the abundances of bacterial 16S rDNA and eukaryotic 18S rDNA significantly increased ($P<0.05$) by 28.2 and 42.2 times in stomach, and they significantly decreased ($P<0.05$) in the gizzard and hindgut, after 5 days of earthworm digestion. In addition, the sludge digested by earthworms changed dominant proteobacteria to tenericutes in gizzard, and modified dominant bacteroidetes to firmicutes in stomach. However, the digestion process of earthworms had little effect on bacterial community structure in hindgut. For the ARGs, the abundances of *ermF*, *tetX* and *sul2* significantly increased ($P<0.05$) by 1.9×10^2 , 8.4×10^5 and 25.9 times in stomach of earthworm, respectively. While the total abundances of ARGs in gizzard and hindgut significantly decreased ($P<0.05$) by 11.0 and 45.2 times, respectively. Moreover, network analysis revealed that the feeding behavior of earthworms for sludge could indicate effects on the structural diversity of host bacteria of ARGs in their intestine.

Key words: sludge recycling; vermicomposting; resistance genes; gut microbiota; biological pollutants

随着我国污水处理能力的快速提升,污泥产量亦逐年增加.截止2019年底,我国污泥年产量达3904万t(以含水率80%计)^[1],污水污泥的处理处置已成为水处理行业亟需解决的难题^[2].脱水污泥作为污水处理的终端副产物,积蓄了丰富的新兴污染物如雌激素、微塑料、耐药基因(ARGs)及病毒等^[3].研究证实污泥是ARGs最丰富的储库之一^[4].由于污泥具有较高的微生物群落多样性,致使促进ARGs可通过质粒、整合子、转座子等可移动遗传元件在不同微生物之间发生水平转移^[5-6].ARGs一旦转移到人类致病菌中形成超级细菌,将给人类疾病的治疗带来很大的困难.现有的研究表明传统污泥资源化方法难以有效去除污泥中的ARGs^[7-8],给污水污泥的

处理处置带来了新的挑战.

蚯蚓堆肥是利用蚯蚓和微生物共同作用的环境友好型污泥资源化技术^[9].蚯蚓肠道消化行为被认为是影响污泥蚯蚓堆肥效率的关键因素^[10].蚯蚓砂囊、胃及后肠共同组成了其完整的消化系统链.砂囊是蚯蚓肠道消化系统的前端,它主要通过机械研磨作用破碎食物和微生物^[11],蚯蚓胃部能够分泌淀粉酶和蛋白酶,促使食物进一步被消化.蚯蚓后肠可以分泌多种酶类消化有机物,并吸收转化为自身

收稿日期: 2021-5-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51868036;52000095);兰州交通大学百人计划(第二批);甘肃省青年博士基金项目(2021-QB051);甘肃省优秀研究生“创新之星”项目(2021CXZX-629)

* 责任作者, 副教授, huangk1199@hotmail.com

的营养物质,已被认为是蚯蚓消化系统中最关键的部分.先前的研究表明,蚯蚓堆肥可显著去除污泥中四环素和氟喹诺酮类 ARGs^[12-13],且去除效果与蚯蚓肠道消化过程及其定植微生物结构多样性密切相关.因此,针对蚯蚓肠道各功能区消化过程对污泥 ARGs 的影响研究能揭示蚯蚓肠道削减 ARGs 的关键机制.

本研究以污泥在蚯蚓肠道消化过程为研究对象,比较蚯蚓肠道消化污泥前后其各功能区微生物的种群演化及 ARGs 丰度的变化特征,旨在为污泥

蚯蚓堆肥削减 ARGs 提供理论参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用健康有明显环带的赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为供试蚓种,单体重约 0.5g,为本实验室饲养.采用底部开孔的长方体塑料箱(46cm×17cm×13cm)作为堆肥反应器.本实验所使用的脱水污泥取自兰州市安宁污水处理厂脱水车间的新鲜污泥.污泥的理化性质见表 1.

表 1 实验所用污泥理化性质
Table 1 Physicochemical properties of sludge

样品名称	含水率(%)	pH 值	有机质(%)	氨氮(mg/kg)	电导率(μS/cm)	溶解性有机碳(mg/g)
原始污泥	73.00±0.30	6.77±0.07	40.10±0.40	554.17±13.89	405.00±2.16	15.03±0.13

1.2 实验方法

为防止堆肥体系缺氧,先将脱水污泥制成粒径为 5mm 的污泥颗粒,之后将已过夜清肠的 400 条健康的赤子爱胜蚓接种至 3kg 新鲜污泥颗粒中.蚯蚓堆肥实验在生化培养箱恒温 20℃下进行,实验设置 3 组重复.所有反应器用带孔的保鲜膜覆盖,每隔 3d 喷洒少量水分保持湿度在 60%~70%左右.蚯蚓消化 5d 后,分别从每个反应器中随机挑选 3~5 条健康的赤子爱胜蚓,将其迅速放进装有无水乙醇的培养皿中杀死.然后在无菌超纯水中清洗 3 次,去除蚯蚓表层微生物的影响.致死后的蚯蚓按照环节数分区后,立即在无菌操作台上用镊子和刀片进行解剖并获取蚯蚓砂囊、胃及后肠组织样品.每 3~5 条蚯蚓组织作为一个样品.

1.3 测试方法

1.3.1 理化指标 理化测试方法参考黄魁等^[14]方法进行.简述如下:含水率及有机质含量均采用恒重法.将研磨后的风干样与去离子水(干样:水=1:50kg/L)混匀后测定 pH 值(雷磁 PHS-3C,上海)和电导率(雷磁 DDS-307,上海).氨氮采用纳氏试剂分光光度计法(HJ 535-2009)^[15].溶解性有机碳(DOC)为上述混合液稀释 10 倍后,过 0.45μm 滤膜,用碳氮分析仪(耶拿 MULTI N/C,2100,德国)进行测定.

1.3.2 叠氮溴化丙锭(PMA)处理及 DNA 提取 将蚯蚓砂囊、胃与后肠组织样品分别放入无菌研钵,

加入 2mL 磷酸盐缓冲液(pH=7.4)研磨成液体状.随后将组织样品收集到无菌离心管中,加入 5μL 的 25μmol/L PMA,于 4℃静置 10min.然后置于 LED 灯(EM200,Takara)下照射 20min,每隔 5min 将离心管取出摇晃一次,以确保 PMA 能充分与死菌 DNA 结合.采用 DNeasy PowerSoil Kit(QIAGEN,德国)试剂盒分别提取蚯蚓砂囊、胃及后肠组织总 DNA.并用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测浓度,最后将 DNA 样品于 -20℃冰箱保存备用.

1.3.3 荧光定量 PCR 荧光定量 PCR 反应在 Thermal Cycler Dice Real Time System Lite TP700(Takara,大连)仪器上进行.定量反应为 25μL 体系:12.5μL TB Green II(Takara,大连),20μmol/L 上下游引物各 0.5μL,1μL DNA 模板以及 10.5μL DNA-free 超纯水.采用携带目的基因的大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E.coli*)质粒,经连续 10 倍稀释作为定量 PCR 的标准品.用 DNA-free 超纯水作为阴性对照,每个样品做 3 次重复.所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列及反应条件见表 2.

1.3.4 质粒的制备 目的基因进行 PCR 扩增后,切胶回收与纯化,利用 T-A 克隆将其连接至 pMD20-T 载体(Takara,大连).而后转化至 *E.coli* DH5α 感受态细胞内,Luria-Bertani 固体培养基中培养 16h 后,筛选白色阳性克隆子进行培养富集.使用质粒提取试剂盒(Takara,大连)提取质粒 DNA.利用 Nanodrop(Thermo,美国)检测质粒 DNA 浓度.

表 2 耐药基因引物及其 PCR 反应条件
Table 2 Primers of antibiotic resistance genes and their amplified condition

目的基因	引物(5'-3')	变性	退火	延伸	循环数
16S rDNA	Forward: CCTAYGGGRBGCASCAG	95℃, 30s	57℃, 30s	72℃, 40s	32
	Reverse: GGACTACNNGGTATCTAAT				
18S rDNA	Forward: GCGGTAATTCAGCTCCAA	94℃, 30s	50℃, 30s	68℃, 60s	32
	Reverse: AATCCRAGAATTTACCTCT				
<i>int11</i>	Forward: CCTCCGCACGATGATC	94℃, 45s	57℃, 30s	72℃, 45s	32
	Reverse: TCCACGCATCGTCAGGC				
<i>ermF</i>	Forward: CGACACAGCTTTGGTTGAAC	95℃, 30s	56℃, 30s	70℃, 45s	32
	Reverse: GGACCTACCTCATAGACAAG				
<i>tetX</i>	Forward: CAATAATTGGTGGTGACCC	95℃, 45s	55℃, 30s	72℃, 45s	32
	Reverse: TTCTTACCTTGGACATCCCG				
<i>tetM</i>	Forward: ACAGAAAGCTTATTATATAAC	94℃, 30s	50℃, 30s	72℃, 30s	32
	Reverse: TGGCGTGTCTATGATGTTAC				
<i>sul1</i>	Forward: CGGCGTGGGCTACCTGAACG	94℃, 60s	66℃, 45s	72℃, 60s	32
	Reverse: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG				
<i>sul2</i>	Forward: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	94℃, 60s	66℃, 45s	72℃, 60s	32
	Reverse: GCGTTTGATACCGCACCCGT				

1.3.5 PCR 和高通量测序 采用细菌通用引物 341F(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3')和 806R(5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3')对细菌 16S rDNA 的 V3-V4 区进行扩增.使用 Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer(M0531NEB)高保真酶进行扩增.PCR 反应体系为 30μL.PCR 扩增条件为:95℃预变性 1min;30 个循环包括 98℃变性 10s,50℃退火 30s,72℃延伸 30s;72℃终延伸 5min.使用 2%的琼脂糖凝胶电泳对产物进行检测后,利用 GeneJET 胶回收试剂盒(Thermo Scientific)对产物进行纯化.使用 TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 对文库进行定量,接头效率检测,合格后使用 NovaSeq6000 平台进行测序(诺禾致源生物信息科技有限公司,北京).测序完成后,使用 FLASH (v1.2.7)对序列进行拼接,测序结果使用 QIIME(1.9.1)软件对序列进行质控过滤后,将获得高质量的 tags 序列使用 VSEARCH 二进制文件(<https://github.com/torognes/vsearch/>)与物种注释数据库进行比较,去除嵌合序列.随后使用 Uparse 软件(Uparse v7.0.1001)将相似度 97%OTUs (Operational Taxonomic Units)进行聚类.而后对 OTUs 序列进行物种注释,通过 MUSCLE 3.8.31 与 Silva132 数据库(<http://www.arb-silva.de/>)进行对比,获得各 OTU 的分类学信息.测序结果已上传至 NCBI 数据库,上传序列号为:SAMN19321836~SAMN19321856.

1.4 统计分析

使用 SPSS 26 统计软件对各测试指标在各组之间的差异进行单因素方差分析,显著性水平为 0.05.使用 Heml 1.0 进行热图绘制并进行聚类.图 1、2、4 均用 OriginPro 2018(version 9.5)绘制.微生物与耐药基因之间的关系网络图用 Gephi(0.9.2)绘制.

2 结果与讨论

2.1 蚯蚓肠道功能区活体微生物数量及种群结构变化

2.1.1 活体微生物数量的变化 如图 1 所示,蚯蚓摄食污泥后其砂囊和后肠中活体细菌丰度分别显著性降低了 1.1×10^2 倍和 2.9 倍($P<0.05$),而胃中活体细菌丰度则显著性增加了 28.2 倍($P<0.05$).对于真核生物而言,其丰度在蚯蚓砂囊和后肠中分别显著性降低了 1.6×10^3 倍和 1.3×10^2 倍,但在胃中显著性增加了 42.2 倍.由此可见,受摄食污泥的影响,蚯蚓肠道各功能区中细菌与真核生物的数量均表现出相近的变化趋势.蚯蚓砂囊中活体微生物数量显著降低,可能是因为微生物数量在砂囊区域存在瓶颈效应^[16-18].Hu 等^[11]研究发现蚯蚓摄食牛粪或污泥,在其砂囊和后肠区域细菌丰度均显著性降低,但砂囊区域降低幅度大于后肠.这与本研究的结果相近.另外,蚯蚓胃中活体微生物数量显著增加归因于蚯蚓胃作为内源性微生物和外源性微生物交互的场所,致使大量的微生物群落在蚯蚓胃中集聚.

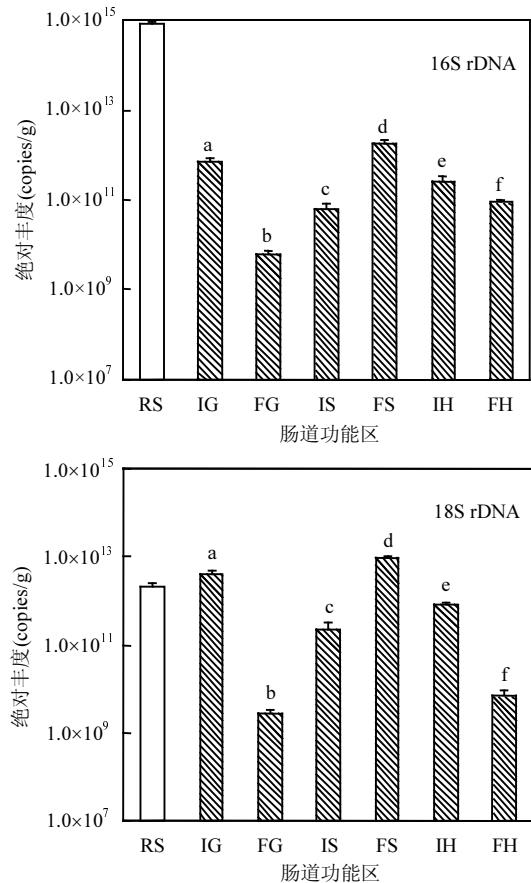


图1 蚯蚓摄食污泥前后肠道功能区细菌 16S rDNA 和真核 18S rDNA 绝对丰度

Fig.1 Absolute abundances of bacterial 16S rDNA and eukaryotic 18S rDNA in different functional areas of earthworms' gut before and after feeding by sludge

RS 代表原始污泥,IG 和 FG 分别代表原始蚯蚓砂囊和消化后蚯蚓砂囊,IS 和 FS 分别代表原始蚯蚓胃和消化后蚯蚓胃,IH 和 FH 分别代表原始蚯蚓后肠和消化后蚯蚓后肠;同种功能区(如 IG 和 FG)之间不同字母表示其之间具有显著性差异($P<0.05$),相同字母表示没有显著性差异($P>0.05$),不同功能区之间没有比较意义,下同

表3 蚯蚓摄食污泥前后蚯蚓功能区细菌种群的 Shannon 指数与 Simpson 指数

组别	Shannon 指数	Simpson 指数
RS	8.05±0.04	0.99±0.00
IG	4.91±1.57a	0.73±0.19b
FG	4.18±1.87a	0.63±0.27b
IS	6.64±0.18c	0.95±0.02d
FS	7.75±0.63c	0.98±0.15d
IH	6.49±0.32e	0.94±0.18f
FH	5.95±0.42e	0.94±0.01f

注:同种功能区(如IG和FG)之间相同字母表示没有显著性差异($P>0.05$),不同功能区之间没有比较意义.

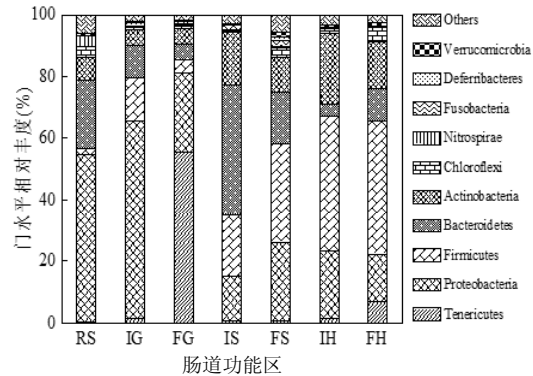


图2 蚯蚓摄食污泥前后肠道功能区细菌门水平种群结构

Fig.2 Bacterial community structure at the phylum level in different functional areas of earthworms' gut before and after feeding by sludge

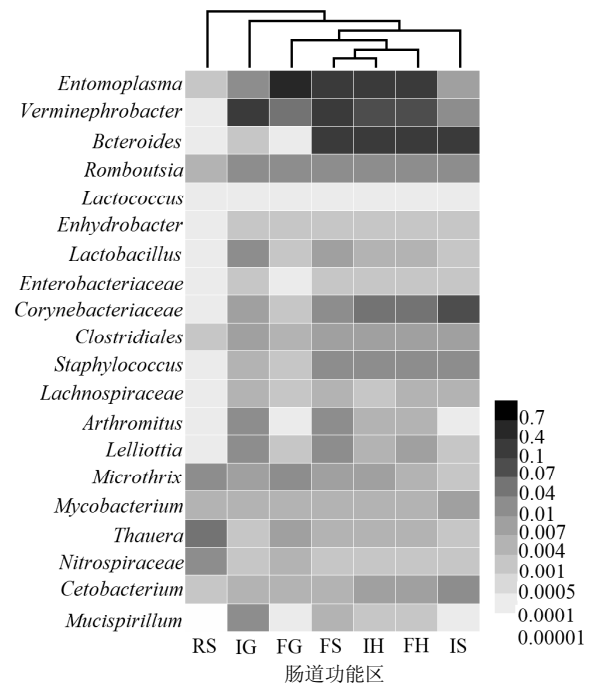


图3 蚯蚓摄食污泥前后蚯蚓肠道功能区细菌优势菌属的丰度热图

Fig.3 Relative abundance of dominant bacterial genus in different functional areas of earthworms' gut before and after feeding by sludge

2.1.2 活体微生物种群结构的变化 由表 3 可见,蚯蚓摄食污泥后其砂囊和后肠中细菌种群的 Shannon 指数和 Simpson 指数均有所降低,但不具有显著性($P>0.05$).该结果说明蚯蚓消化污泥会降低其砂囊和后肠中活体细菌种群的丰富度和均匀度.相似研究发现,蚯蚓吞食牛粪或污泥,其砂囊区域细菌种群多样性和均匀度均显著下降^[11].本研究中蚯蚓后肠中降低的活体细菌多样性和丰富度,可能是由

于蚯蚓后肠近乎厌氧的微环境^[19]致使摄入的好氧微生物出现死亡所致.同时,蚯蚓胃中细菌种群的

Shannon 指数和 Simpson 指数分别增加了 16.7%和 3.2%,这种增加的趋势与微生物数量的变化类似.

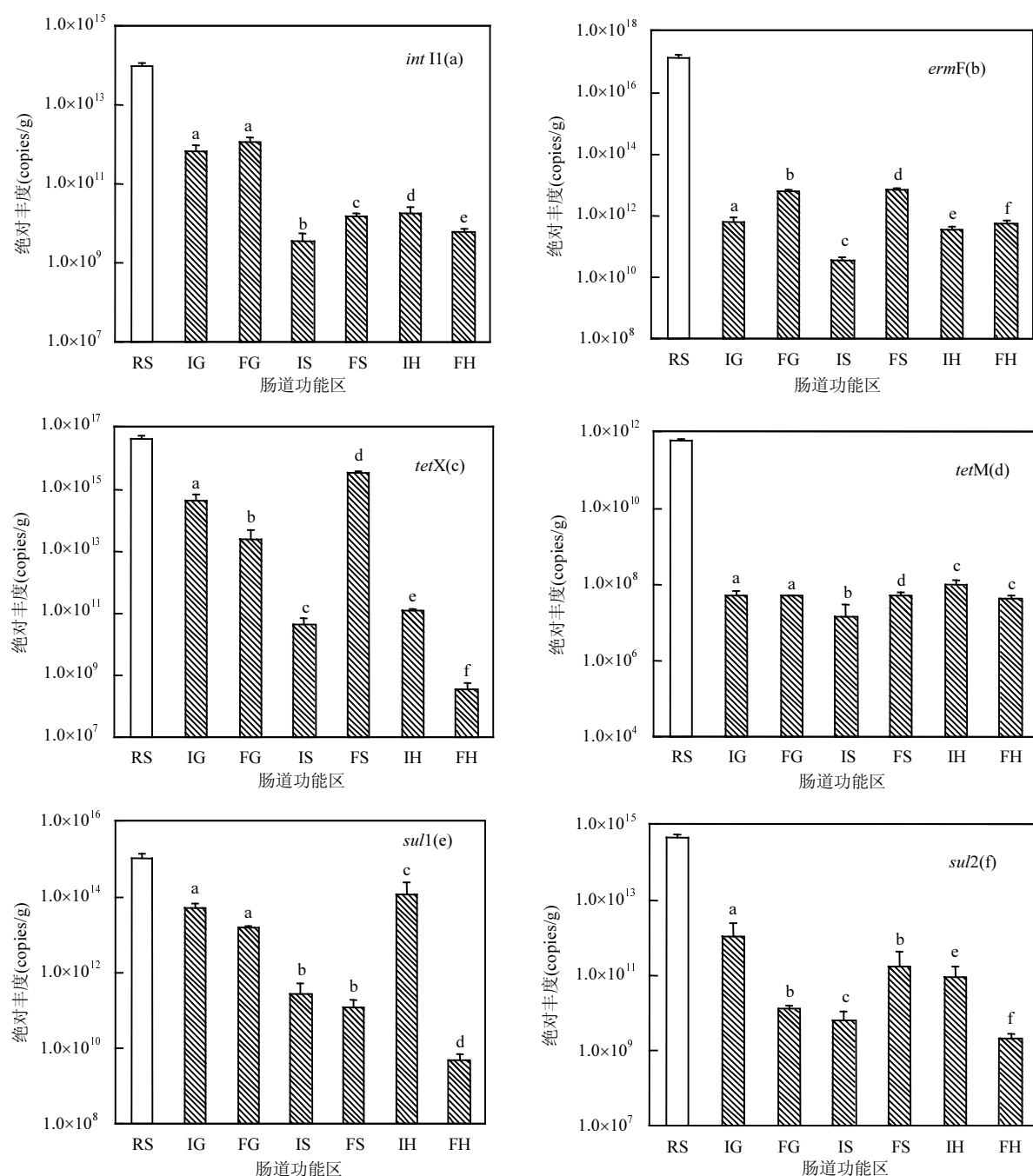


图4 蚯蚓摄食污泥前后肠道功能区 ARGs 的绝对丰度

Fig.4 Absolute abundances of *int11* and ARGs in functional areas of earthworms' gut before and after feeding by sludge

由图 2 可得,蚯蚓摄食污泥前,其砂囊中定殖的活体细菌菌门主要有变形菌门(64.2%)、厚壁菌门(13.8%)、拟杆菌门(10.5%)和放线菌门(5.2%);而摄食后砂囊中软壁菌门占绝对优势,其丰度由 1.5%激增至 55.7%.已有研究表明软壁菌具有较强的核酸降解能力^[20],其丰度的剧增表明蚯蚓砂囊可能是降

解污泥中耐药基因的主要场所.而砂囊中变形菌门的丰度显著($P < 0.05$)降低了 60.4%.变形菌门丰度经蚯蚓砂囊显著下降一方面可能是由于蚯蚓常以 γ -变形菌门和 δ -变形菌门下属微生物为食^[11,21],另一方面可能是被砂囊中分泌的一些抗菌物质所抑制^[22].此外,陈景阳等^[23]研究发现四环素会抑制变形

菌门的丰度,且这种抑制与其剂量无关,这也可能是造成变形菌门丰度下降的原因.由图 2 可见,蚯蚓摄食污泥前,蚯蚓胃中拟杆菌门(42.3%)、厚壁菌门(19.8%)、放线菌门(16.9%)与变形菌门(14.5%)为细菌优势菌门,而摄食后胃中优势菌门转变为厚壁菌门(31.9%)、变形菌门(25.4%)、拟杆菌门(17.0%)、放线菌门(11.3%)与绿弯菌门(3.0%).相比而言,摄食污泥致使蚯蚓胃中变形菌门与厚壁菌门的相对丰度分别显著($P<0.05$)增加 75.2%和 61.1%,可能与其摄食污泥的微生物种群结构有关.同时,蚯蚓摄食污泥后,后肠中软壁菌门和拟杆菌门的相对丰度分别显著($P<0.05$)增加了 402.3%和 170.4%.这是由于拟杆菌门是大分子有机物的主要降解者并且软壁菌门对氮、磷等元素的循环有重要的驱动作用^[20,24],其二者丰度的激增表明蚯蚓后肠是污泥中大分子有机物的降解场所.Wang 等^[22]也研究发现有机物的分解消化主要发生在蚯蚓后肠.本研究发现,与原始污泥相比,蚯蚓消化污泥后的蚓粪中有机质含量下降了 13.4%,电导率升高了 2.0%,表明蚯蚓肠道是加速有机物的矿化和降解的重要场所.

由图 3 可知,蚯蚓摄食前,砂囊中优势菌属为 *Verminephrobacter*、*Lelliottia*、*Arthromitus*、*Romboutsia*、*Lactobacillus*、*Entomoplasma* 和 *Mucispirillum*,其中 *Verminephrobacter* 的丰度占绝对主导地位.而蚯蚓消化污泥后,砂囊中 *Entomoplasma* 占主导地位,且显著增加了 37.1 倍($P<0.05$).同时,蚯蚓摄食污泥后胃中 *Entomoplasma* 与 *Verminephrobacter* 的丰度分别增加了 28.9 倍和 10.8 倍($P<0.05$).*Entomoplasma* 属于虫原体属,可利用碳水化合物磷酸转移酶发酵葡萄糖,同时具有水解精氨酸的能力^[25],其在砂囊和胃中丰度的剧增,表明其参与了大量的能量和物质的代谢.*Verminephrobacter* 是属于 β -变形菌门的一种蚯蚓体内的共生菌.研究显示其丰度的增加能够促进蚯蚓更早的性成熟,而且孵化成茧的成功率更高^[26].相比而言,蚯蚓摄食前后,其后肠中细菌属水平结构的变化较小,未呈现出显著性差异($P>0.05$).有研究发现食物来源会影响蚯蚓肠道微生物种群结构,但是与蚯蚓肠道相关的核心微生物种群基本保持不变^[27].Hu 等^[11]分别以污泥和牛粪为食物饲养蚯蚓,发现相比于污泥,蚯蚓摄食牛粪后其肠道微生物种群结构变化较小,这与本研

究相似.王洪涛等^[28]研究了含砷土壤对 4 种蚯蚓肠道微生物种群的影响,发现变形菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、放线菌门和酸杆菌门是土壤中的优势菌群,占比高达 73.4%.而 4 种蚯蚓肠道内的优势菌基本一致,主要是放线菌、厚壁菌和变形菌等,它们的相对丰度总和为 76.6%.这说明底物与蚯蚓肠道微生物种群间既相互影响,又相互共存.由聚类分析(图 3)可见,IG 组和 FG 组、IS 组和 FS 组之间种群结构存在较大差异,而 IH 组和 FH 组种群结构差异较小,表明蚯蚓摄食污泥对后肠中微生物种群结构影响较小.这可能是因为蚯蚓后肠特殊的生境构建了能够满足其生理需求的功能性微生物库,该库能够较好地抵抗外源微生物菌群与环境条件变化的胁迫,其形成的过程与肠道内微生物不断适应新环境与重金属、抗生素等污染物有一定的关联^[29-30].

2.2 蚯蚓肠道功能区 ARGs 丰度变化

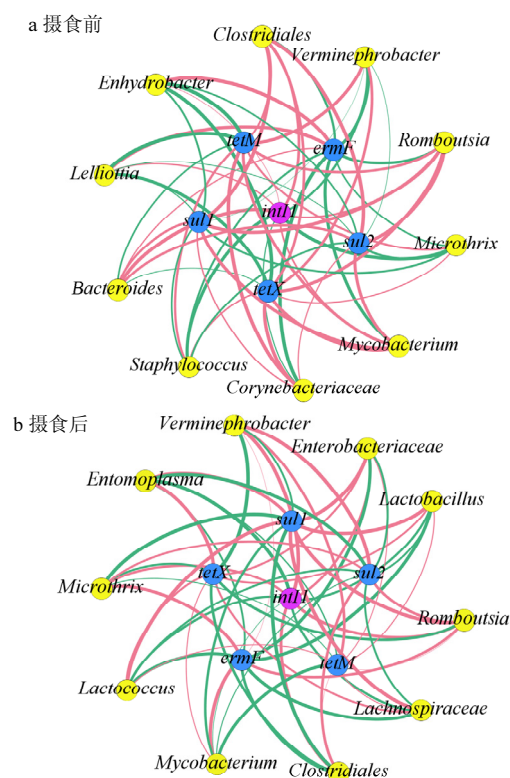


图 5 ARGs 与微生物之间共选择模式的网络分析
Fig.5 Network analysis showing co-occurrence patterns among ARGs and microbe

紫色节点代表可移动遗传元件,蓝色节点代表 ARGs,黄色节点代表微生物;节点之间的连线表示节点之间显著性的相互关系,红色连线代表正相关,绿色连线代表负相关;连线的粗细与节点间的显著性成正比

如图 4a 所示,蚯蚓摄食污泥后,*intI1*(整合子基

因)丰度在其砂囊中略有增加($P>0.05$),而其在胃中显著增加了 4.4 倍($P<0.05$),但其在后肠中显著降低了 3.0 倍($P<0.05$). *intI1* 作为一种携带 ARGs 的遗传元件,生物介质中较高的细菌数量和多样性会增加 *intI1* 水平传播的可能性^[6,31].李建辉等^[32]通过宏基因组学研究牛粪蚯蚓粪、蔬菜蚯蚓粪和污泥蚯蚓粪中的微生物组成结构,发现含有较高微生物丰度和多样性的污泥蚯蚓粪中整合子所占比例也较高.本研究中蚯蚓胃和后肠中 *intI1* 的增减与胃和后肠中微生物数量及多样性的变化有密切关联.

对于 ARGs 而言(图 4b~f),蚯蚓摄食污泥后,砂囊中除 *ermF* (大环内酯类 ARGs) 丰度显著升高了 10.7 倍($P<0.05$) 外, *tetX*、*tetM* (四环素类耐药基因 ARGs)、*sul1* 和 *sul2* (磺胺类 ARGs) 均有所降低,其中 *tetX* 显著下降了 18.9 倍($P<0.05$), *sul2* 显著下降了 87.4 倍($P<0.05$), 耐药基因总丰度显著下降 11.0 倍($P<0.05$). 蚯蚓胃中除 *sul1* 外, *ermF*、*tetX*、*tetM* 和 *sul2* 丰度在摄食污泥后均有不同程度升高,其中 *ermF*、*tetX*、和 *sul2* 分别显著升高了 1.9×10^2 倍、 8.4×10^5 倍和 25.9 倍($P<0.05$). 对于蚯蚓后肠,除 *ermF* 外, *tetX*、*tetM*、*sul1* 和 *sul2* 在摄食污泥后均有不同程度的降低,其中 *tetX*、*sul1* 和 *sul2* 分别显著降低了 3.4×10^2 倍、 8.4×10^5 倍和 45.0 倍($P<0.05$), 耐药基因总丰度显著下降 45.2 倍($P<0.05$). 以上结果说明蚯蚓胃会对污泥中的 ARGs 具有选择性富集作用,而蚯蚓砂囊和后肠对 ARGs 具有一定的抑制作用.这主要是因为胃中发生了微生物种群的聚集效应,使得聚集的细菌群落成为了 ARGs 的受体^[33-34],而蚯蚓后肠中的黏液具有选择性杀菌作用,可导致某些 ARGs 的宿主细菌死亡,如粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)及抗坏血酸克吕沃尔氏菌(*Kluyvera ascorbata*)等变形菌门中的细菌^[35-36].而变形菌门可同时携带四环素类和磺胺类 ARGs^[37],从而致使后肠中四环素类和磺胺类 ARGs 丰度降低.值得注意的是,蚯蚓摄食污泥后,肠道总 ARGs 丰度较摄食前仍显著增加了 3.3 倍($P<0.05$),这可能是污泥中较高含量的 ARGs 所致.污泥中抗生素的胁迫也会影响肠道 ARGs 的产生与传播^[38].例如,长期暴露于抗生素下导致蜜蜂肠道中四环素类 ARGs 中的 8 种亚型发生了富集^[39]. Ding 等^[40]对长期施用

污泥及鸡粪肥土壤蚯蚓肠道中的 ARGs 进行研究发现,污泥和鸡粪的施用显著增加了蚯蚓肠道中 ARGs 的丰度和多样性,在 9 种主要的 ARGs 中共检测到 98 个亚型.虽然 *ermF* 与 *sul1* 的丰度在蚯蚓肠道中表现出下降趋势,但蚯蚓作为污泥蚯蚓堆肥的关键主导者,其蚯蚓肠道总 ARGs 丰度的增加说明蚯蚓肠道是可移动的 ARGs 储蓄库,这亦是污泥蚯蚓堆肥难以完全削减污泥中的 ARGs 的重要原因之一.

2.3 ARGs 与活体微生物的网络分析

依据 ARGs 与活体微生物的共线性,利用网络分析可揭示 ARGs 的潜在宿主细菌^[41-42].如图 5 所示,ARGs 与活细菌之间构建的网络共包括 16 个节点和 60 条边.蚯蚓摄食污泥前(图 5a),蚯蚓肠道内有 6 种细菌菌属与 *intI1* 呈正相关,说明其为 *intI1* 潜在的宿主细菌.相比而言, *ermF* 潜在的宿主细菌有 3 种, *tetX* 和 *tetM* 潜在的宿主细菌均有 7 种,而 *sul1* 和 *sul2* 潜在的宿主细菌都为 5 种.蚯蚓摄食污泥后(图 5b), *intI1* 潜在的宿主细菌变为 4 种, *ermF* 潜在的宿主细菌变为 5 种, *tetX* 和 *tetM* 潜在的宿主细菌分别为 6 种和 7 种,而 *sul1* 和 *sul2* 潜在的宿主细菌分别为 5 种和 4 种.这些结果表明蚯蚓摄食污泥可影响其肠道内 ARGs 宿主细菌菌群的结构多样性.不仅如此,蚯蚓堆肥还可显著影响超级细菌的种群结构多样性^[43].有研究表明,环境中的重金属铜与大环内酯类 ARGs 之间能够形成共选择作用,从而激活大环内酯类 ARGs 的表达^[44].因此可推测本研究中 *Romboutsia*、*Microthrix*、*Clostridiales*、*Verminephrobacte* 及 *Mycobacterium* 等细菌从摄食前的非 *ermF* 宿主变为摄食后 *ermF* 宿主,可能与污泥中的重金属等污染物激活了 *ermF* 的表达有关.

3 结论

3.1 蚯蚓摄食污泥会增加其胃中活体微生物的数量、多样性和均匀度,而对其砂囊和后肠则表现出相反的结果.

3.2 蚯蚓摄食污泥后,蚯蚓肠道总 ARGs 丰度略有增加.蚯蚓砂囊和后肠具有削减耐药基因的作用,而蚯蚓胃对 ARGs 具有一定的富集作用.

3.3 蚯蚓摄食污泥可影响其肠道内 ARGs 宿主细菌的结构多样性.

参考文献:

- [1] Wei L, Zhu F, Li Q, et al. Development, current state and future trends of sludge management in China: Based on exploratory data and CO₂-equivalent emissions analysis [J]. *Environment International*, 2020, 144: 106093.
- [2] 薛重华, 孔祥娟, 王 胜, 等. 我国城镇污泥处理处置产业化现状、发展及激励政策需求 [J]. *净水技术*, 2018, 37(12): 41-47.
Xue C, Kong X, Wang S, et al. Industrialization status, development analysis and incentive policy demands of municipal sludge treatment and disposal industry in China [J]. *Water Purification Technology*, 2018, 37(12): 41-47.
- [3] Marcoux M, Matias M, Olivier F, et al. Review and prospect of emerging contaminants in waste – Key issues and challenges linked to their presence in waste treatment schemes: General aspects and focus on nanoparticles [J]. *Waste Manage*, 2013, 33(11): 2147-2156.
- [4] Calero-Cáceres W, Melgarejo A, Colomer-Lluch M, et al. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(13): 7602-7611.
- [5] Liu Z, Klümper U, Liu Y, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal activity and hosts of antibiotic resistance genes in activated sludge [J]. *Environment International*, 2019, 129: 208-220.
- [6] Cui G, Lü F, Zhang H, et al. Critical insight into the fate of antibiotic resistance genes during biological treatment of typical biowastes [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 317: 123974.
- [7] Su J, Wei B, Ouyang W, et al. Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(12): 7356-7363.
- [8] Tong J, Lu X, Zhang J, et al. Factors influencing the fate of antibiotic resistance genes during thermochemical pretreatment and anaerobic digestion of pharmaceutical waste sludge [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 238: 1403-1413.
- [9] Xia H, Wu Y, Chen X, et al. Effects of antibiotic residuals in dewatered sludge on the behavior of ammonia oxidizers during vermicomposting maturation process [J]. *Chemosphere*, 2019, 218: 810-817.
- [10] Aira M, Olcina J, Pérez-Losada M, et al. Characterization of the bacterial communities of casts from *Eisenia andrei* fed with different substrates [J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 98: 103-111.
- [11] Hu J, Zhao H, Wang Y, et al. The bacterial community structures in response to the gut passage of earthworm (*Eisenia fetida*) feeding on cow dung and domestic sludge: Illumina high-throughput sequencing-based data analysis [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 190: 110-149.
- [12] Huang K, Xia H, Wu Y, et al. Effects of earthworms on the fate of tetracycline and fluoroquinolone resistance genes of sewage sludge during vermicomposting [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 259: 32-39.
- [13] Cui G, Li F, Li S, et al. Changes of quinolone resistance genes and their relations with microbial profiles during vermicomposting of municipal excess sludge [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 644: 494-502.
- [14] 黄 魁, 夏 慧, 陈景阳, 等. 蚯蚓对城市污泥蚯蚓堆肥过程中微生物特征变化的影响 [J]. *环境科学学报*, 2018, 38(8): 3146-3152.
- Huang K, Xia H, Chen J, et al. Effects of earthworms on changes of microbial feature during vermicomposting of municipal sludge [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(8): 3416-3452.
- [15] HJ 535-2009 水质氨氮的测定纳氏试剂分光光度法 [S].
HJ 535-2009 Water quality-Determination of ammonia nitrogen-Nessler's reagent spectrophotometry [S].
- [16] Gómez-Brandón M, Aira M, Lores M, et al. Epigeic earthworms exert a bottleneck effect on microbial communities through gut associated processes [J]. *The Public Library of Science One*, 2011, 6(9): e24786.
- [17] Gómez-Brandón M, Lores M, Domínguez J, et al. Species-specific effects of epigeic earthworms on microbial community structure during first stages of decomposition of organic matter [J]. *The Public Library of Science One*, 2012, 7(2): e31895.
- [18] Gómez-Brandón M, Lores M, Domínguez J. Changes in chemical and microbiological properties of rabbit manure in a continuous-feeding vermicomposting system [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128(1): 310-316.
- [19] 晁会珍, 孙明明, 朱国繁, 等. 蚯蚓肠道细菌生态功能及毒理学研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(5): 35-48.
Chao H, Sun M, Zhu G, et al. Ecological functioning of the earthworm intestinal bacteria and their role in toxicology research [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15(5): 35-48.
- [20] Zheng R, Liu R, Shan Y, et al. Characterization of the first cultured free-living representative of *Candidatus Izemoplasma* uncovers its unique biology [J]. *The ISME Journal*, 2021, 15: 2676-2691.
- [21] Aira M, Monroy F, Domínguez J. Changes in microbial biomass and microbial activity of pig slurry after the transit through the gut of the earthworm *Eudrilus eugeniae* [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2006, 42(4): 371-376.
- [22] Wang N, Wang W, Jiang Y, et al. Variations in bacterial taxonomic profiles and potential functions in response to the gut transit of earthworms (*Eisenia fetida*) feeding on cow manure [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 787: 147392.
- [23] 陈景阳, 夏 慧, 黄 魁, 等. 四环素对污泥蚯蚓粪中微生物种群和抗性基因的影响 [J]. *环境科学*, 2019, 40(7): 3263-3269.
Chen J, Xia H, Huang K, et al. Effects of tetracycline on microbial communities and antibiotic resistance genes of vermicompost from dewatered sludge [J]. *Environmental Science*, 2019, 40(7): 3263-3269.
- [24] De Gannes V, Eudoxie G, Hickey W. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 573-580.
- [25] Gasparich G E. The Family *Entomoplasmataceae* [M]. *The Prokaryotes*, 2014: 505-514.
- [26] Lund M B, Holmstrup M, Lomstein B A. et al. Beneficial effect of *Verminephrobacter* nephridial symbionts on the fitness of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14): 4738-4743.
- [27] Liu D, Lian B, Wu C, et al. A comparative study of gut microbiota profiles of earthworms fed in three different substrates [J]. *Symbiosis*, 2018, 74: 21-29.
- [28] 王洪涛, 丁 晶, 邵元虎, 等. 4 种蚯蚓肠道微生物对砷毒性响应差异研究 [J]. *生态学报*, 2022, DOI: 10.5846/stxb202010132612.

- Wang H, Ding J, Shao Y, et al. Comparative study on the responses of gut microbiota of four species of earthworms to arsenic toxicity [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, DOI:10.5846/stxb202010132612.
- [29] Yin J, Zhang X, Wu B, et al. Metagenomic insights into tetracycline effects on microbial community and antibiotic resistance of mouse gut [J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24(10):2125–2132.
- [30] Zhu D, An X, Chen Q, et al. Antibiotics disturb the microbiome and increase the incidence of resistance genes in the gut of a common soil collembolan [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(5): 3081–3090.
- [31] Zhou G, Qiu X, Wu X, et al. Horizontal gene transfer is a key determinant of antibiotic resistance genes profiles during chicken manure composting with the addition of biochar and zeolite [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 408:124883.
- [32] 李建辉, 张莹莹, 黄 魁, 等. 宏基因组学解析蚯蚓粪中微生物种群及耐药基因的组成 [J]. *中国环境科学*, 2020, 40(12):5375–5382.
- Li J, Zhang Y, Huang K, et al. Composition of microbial community and antibiotic resistance genes in vermicomposts revealed by metagenomic analysis [J]. *China Environmental Science*, 2020, 40(12): 5375–5382.
- [33] Boucher Y, Labbate M, Koenig J, et al. Integrins: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria [J]. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(7):301–309.
- [34] Ramsden S, Ghosh S, Bohl L, et al. Phenotypic and genotypic analysis of bacteria isolated from three municipal wastewater treatment plants on tetracycline-amended and ciprofloxacin-amended growth media [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(5):1609–1618.
- [35] Bykov B, Khomyakov N, Kharin S, et al. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2007, 43(1):149–156.
- [36] Khomyakov N, Kharin S, Nechitailo T, et al. Reaction of microorganisms to the digestive fluid of earthworms [J]. *Microbiology*, 2007, 76(1):45–54.
- [37] Zhang J, Liu J, Wang Y, et al. Profiles and drivers of antibiotic resistance genes distribution in one-stage and two stage sludge anaerobic digestion based on microwave-H₂O₂ pretreatment [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241:573–581.
- [38] 卢文强, 孙昊宇, 王雅娟, 等. 抗生素的胁迫与抗生素抗性基因产生与传播关系的研究 [J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(4):129–138.
- Lu W, Sun H, Wang Y, et al. The relationship of antibiotic stress with emergence and dissemination of antibiotic resistance genes [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15(4):129–138.
- [39] Tian B, Fadhil N, Powell J, et al. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees [J]. *Combining Chemistry and Biology*, 2012, 3(6):e00377–12.
- [40] Ding J, Zhu D, Hong B, et al. Long-term application of organic fertilization causes the accumulation of antibiotic resistance in earthworm gut microbiota [J]. *Environment International*, 2019, 124: 145–152.
- [41] Li B, Yang Y, Ma L, et al. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes [J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(11):2490–2502.
- [42] Zhu B, Chen Q, Chen S, et al. Does organically produced lettuce harbor higher abundance of antibiotic resistance genes than conventionally produced? [J]. *Environment International*, 2017, 98: 152–159.
- [43] Huang K, Xia H, Zhang Y, et al. Elimination of antibiotic resistance genes and human pathogenic bacteria by earthworms during vermicomposting of dewatered sludge by metagenomic analysis [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 297:122451.
- [44] 程 晨, 张璐璐, 赵晓祥. 重金属铜对养殖场周边土壤菌群及其大环内酯类抗生素抗性水平相关基因的影响 [J]. *东华大学学报(自然科学版)*, 2019, 45(6):943–950.
- Chen C, Zhang L, Zhao X, et al. Effects of copper on microflora and macrolide resistance genes in soil surrounding the farm [J]. *Journal of Donghua University (Natural Science)*, 2019, 45(6):943–950.

作者简介: 彭兰生(1995–), 男, 甘肃兰州人, 兰州交通大学硕士研究生, 主要研究方向为污泥资源化. 发表论文 1 篇.