

威廉环毛蚯蚓对土壤微生物量及活性的影响

张宝贵, 李贵桐, 申天寿

(中国农业大学资源环境学院, 北京 100094)

摘要:探讨威廉环毛蚯蚓(*Pheretima guillelmi*)对土壤总微生物量、活性微生物量的影响。蚯蚓处理中(土壤与蚯蚓的比例为 5 : 1, 干重 : 活体重, 处理时间为 24h), 用熏蒸提取法测定的土壤总微生物量下降, 用底物诱导呼吸法测定的活性微生物量和真菌与细菌比例无显著变化; 蚯蚓处理土壤促进了被微生物固持的养分的释放和土壤微生物群体年轻化, 增强了微生物的代谢商和纤维素分解活性。结合对文献资料的分析, 讨论了土壤微生物量的不同组分对通过蚯蚓肠道的反应。

关键词: 蚯蚓; 威廉环毛蚯蚓; 微生物量; 活性微生物量; 底物诱导呼吸

Influence of the earthworm *Pheretima guillelmi* on soil microbial biomass and activity

ZHANG Bao-Gui, LI Gui-Tong, SEHN Tian-Shou (China Agricultural University, College of Resources & Environment, Beijing, 100094)

Abstract: Influence of earthworm (*Pheretima guillelmi*) on soil microbial biomass, and active biomass was studied. Earthworm treatment (soil to earthworm ratio = 5 : 1) reduced soil total microbial biomass while the active microbial biomass and fungal to bacterial ration were not significantly affected. The earthworm treatment enhanced release of microbially immobilised nutrients, and resulted a rejuvenation of microbial population, and an increase of microbial qCO_2 quotient and cellulolytic activity. The influence of earthworm on various components of microbial biomass was discussed.

Key words: earthworm; *Pheretima guillelmi*; microbial biomass; active biomass; substrate induced respiration
文章编号: 1000-0933(2000)01-0168-05 中图分类号: Q938.1, Q958.1 文献标识码: A

蚯蚓是分布非常广泛的土壤动物, 在温带土壤无脊椎动物中其生物量最大。它们吞食大量土壤、有机质和土表植物残落物, 以至于有人认为, 在蚯蚓密度大的土壤中, 整个土壤表层都是不同时期蚯蚓排泄物积累的产物^[1]。对蚯蚓食性研究表明, 蚯蚓喜食处于腐烂分解状态的有机残体, 由于该阶段残体上微生物较多, 蚯蚓的取食可能会影响微生物的数量和活性, 进而影响有机物质的分解和有效养分的释放; 同时, 微生物在养分转化中起着枢纽作用, 微生物量既是土壤有效养分的供应源又是其储存库。明确蚯蚓对土壤微生物的影响具有重要意义, 在这方面研究者众说纷纭^[2]。Parle 早在 1963 年报道, 通过蚯蚓肠道后, 细菌、放线菌的数目大幅度增加, 而真菌的数目无变化^[3]; Daniel 和 Anderson 发现蚯蚓排泄物中细菌数目比原土中高, 而土壤微生物量则两者无差别^[4]; 也有著者报道蚯蚓的取食作用降低了土壤微生物量^[5, 6]。本研究测定了土壤加入蚯蚓前后土壤总微生物量碳、氮、磷以及活性微生物量、微生物群落结构的变化, 将所得结果与文献报道综合分析, 以期获得蚯蚓对土壤微生物影响的较为合理的结论。由于蚯蚓在土壤中选择取食富含有机质和微生物的组分^[7], 而且不是所有的微生物在通过蚯蚓肠道后都死亡^[8]; 若简单地将蚯蚓排泄物与原土相比较, 蚯蚓排泄物中微生物量的增加, 完全有可能是土壤微生物在排泄物中富积的结果, 而不是现实的增大。换句话说, 蚯蚓排泄物中微生物量的增加, 并不必然代表土壤微生物量的增加。为了排除蚯蚓选择性取食习性对研究结果的影响, 本研究采用加入蚯蚓后一定时间的土壤与未加入蚯蚓的土壤相比较。

1 材料与方法

1.1 土壤和蚯蚓

土壤取自中国农业大学校内科学园 0~10cm 表土,其理化性状为 pH(H₂O)7.4,粘粒、粉粒和砂粒含量分别为 16%,41%和 43%,有机质含量为 1.8%。土壤经风干后过 2 mm 筛,并与腐熟的小麦秸秆堆肥以 4:1(重量比)的比例混合。在试验开始 10d 以前,将混合物的水分含量调整至其持水量的 50%后,在 25℃培养,作为蚯蚓培养基质。试验所用蚯蚓威廉环毛蚯蚓(*Pheretima guillelmi*)采自北京西郊巨山农场绿色食品基地的菜园土,在试验开始前 1d,取成体蚯蚓在预培养基质中饲养,以将其肠道内容物更换为培养基质,然后将用清水冲洗净后的蚯蚓用滤纸吸去水分,称重。

1.2 培养过程

为了使蚯蚓处理中大部分培养基质都能通过蚯蚓肠道,并且蚯蚓排泄物的日龄相对一致,蚯蚓与培养基质的比例应较大,培养时间则应尽可能的短。大多数蚯蚓种类食物通过其肠道的时间为 2~20h^[1,3,9],据此,培养时间被定为 24h;预备试验表明,当蚯蚓与培养基质的比例为 1:5(蚯蚓活体:土壤干重)时,24h 内 50%以上的培养基质均通过了蚯蚓肠道。将称重后的蚯蚓加入培养基质后,在 25℃培养 24h,然后将蚯蚓取出,培养基质则在无蚯蚓的条件下继续培养;取出的蚯蚓洗净,拭干重新称重后再放入另一培养基质中培养 24h;然后将培养基质和蚯蚓按前描述的步骤继续进行处理。这样处理 3d 后就得到了蚯蚓处理(24h)且又培养了 3d、2d 和 1d 的培养基质。

1.3 土壤微生物量 C、N、P 和无机养分的测定

培养结束后,将经蚯蚓处理的各种培养基质和对照基质分别取样,氯仿熏蒸 24h 后用 0.5 M K₂SO₄ 溶液提取,提取液中的有机 C、茚三酮反应 N 和无机磷分别用重铬酸钾氧化法^[10]、茚三酮试剂^[11]、钼蓝比色法测定。生物量 C、N、P 的计算系数分别采用 0.37^[11]、0.2^[11]和 0.38^[12];NH₄-N、NO₃-N 分别用 indo 酚蓝比色法^[13]和水杨酸硝化比色法^[14]测定。

1.4 呼吸强度、活性微生物量和细菌真菌比例的测定

底物诱导呼吸强度测定用 10mg/g 葡萄糖作物诱导底物。基础呼吸(不加葡萄糖)和底物诱导呼吸强度,用连续通气 CO₂ 吸收方法测定^[15]。链霉素(华北制药厂)和放线菌酮(Sigma Chemical Co. st Louis, Mo.)分别被用作细菌和真菌呼吸抑制剂。预备试验表明,抑制剂的合适用量为 8 mg/g 土壤,由于链霉素含氮,且可被非目标微生物用作氮源,在不加链霉素的处理中加入(NH₄)₂SO₄ 溶液,以使各处理的氮量相同。土壤中真菌和细菌比例=(不加抗生素呼吸强度—加放线菌酮呼吸强度)/(不加抗生素呼吸强度—加链霉素呼吸强度);呼吸商(qCO₂)=基础呼吸/土壤总微生物量;另取蚯蚓处理 24h 土样和对照土样加入(1%)微结晶纤维素(avicel),测定呼吸强度。

所有结果都以烘干土重计,试验重复 3 次,做 *t*-显著性检验。

2 结果

2.1 蚯蚓对总土壤微生物量的影响

加入蚯蚓培养 24h 后土壤微生物量碳、氮、磷均显著下降;与此同时,土壤可提取有机碳、茚三酮反应氮及 NaHCO₃ 可提取无机磷显著升高(表 1)。

2.2 蚯蚓对土壤活性微生物量的影响

尽管土壤总微生物量因加入蚯蚓而下降,但活性微生物量却没有显著变化,底物诱导呼吸法活性蚯蚓处理与对照无显著差异,说明以葡萄糖为碳源和能源的微生物群体不因蚯蚓处理而下降;称为代谢商(qCO₂)的单位微生物量的 CO₂ 呼吸强度,蚯蚓处理反而比对照高(表 2)。

2.3 蚯蚓对土壤微生物群落结构的影响

同时加入抑制真菌活性的放线菌酮和抑制细菌活性的链霉素时,底物诱导呼吸强度在蚯蚓处理土壤和对照土壤中的抑制率分别达到 40.9%和 47.6%,在其他研究者报道的结果范围之内^[16];两种抗生素分别加入时抑制效果与同时加入时效果之比接近于 1.0,说明抗生素对两类微生物抑制的选择性比较理想。根据两种抗生素对底物诱导呼吸强度的抑制率的计算,蚯蚓处理和对照土壤中真菌/细菌的比率分别

为 1.61 和 1.35(表 3)。

表 1 土壤微生物生物量,水溶性有机 C 和有效 N、P
Table 1 Soil microbial biomass,soluble organic C and available N and P

处理 Treatments	微生物生物量(μg/g soil)† Microbial biomass			土壤可提取 C、N 和 P(μg/g soil) Soil extractable C,N and P		
	C	N	P	重铬酸钾氧化 C	茚三酮反应 N	NaHCO ₃ 无机磷
				Dichromate-	Ninhydrin-	NaHCO ₃ -
				oxidable organic C	reactive N	inorganic P
对照						
Control	920.6(67.5)	205.25(3.4)	102.9(6.6)	84.6(7.6)	10.43(0.02)	94.3(1.6
蚯蚓处理						
Earthworm	791.1(11.1)	146.35(10.9)	74.9(1.7)	110.7(7.9)	37.54(0.29)	104.1(1.6)
显著水平						
Significant level	*	***	**	*	***	**

注:表内数值为 3 次重复的平均数,括号内为标准误;† :微生物生物量 C、N、P 的 Ke 分别取 0.41、0.2 和 0.37;*,**和 *** 分别代表蚯蚓处理和对照间差异显著水平为 $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$ (t 测验)。

表 2 土壤底物诱导呼吸强度和 qCO₂ 代谢商
Table 2 Mean values for soil substrate-induced respiration, and metabolic quotient qCO₂

	底物诱导呼吸强度 Substrate-induced respiration(μg CO ₂ -C/g soil · h)	代谢商 qCO ₂ † (μgCO ₂ -C/mg C _{mb} · h)
对照 Control	2.95(0.07, $n=4$)	5.09(0.48, $n=3$)*
蚓处理 Earthworm treatment	2.85(0.17, $n=4$)	10.66(1.9, $n=2$)

注:括号内为平均值的标准误和重复数;† :qCO₂=基础呼吸强度/微生物量 C;*:蚯蚓处理和对照间差异显著水平 $p<0.05$ (t 测验)。

2.4 蚯蚓对土壤微生物活性的影响

蚯蚓排泄物的纤维素分解能力高于对照,说明微生物利用纤维素的活性不但没有减小反而有所增大(图 1)。

3 讨论

环毛蚓在中国分布最为广泛,其中威廉环毛蚯蚓(*Pheretima guillelmi*)属生态类型的上食表居型(anecic),是北京、天津、河北等地的常见种。上食土居型蚯蚓居住在距土表 10~50cm 土层,将土壤表面的有机残体拖入土内,对促进有机物质的分解,具有重要意义。本研究对蚯蚓通过影响微生物生物量和活性,影响有机物质的分解的机理进行了探讨。

对文献资料的分析表明,用不同的试验方法测定土壤微生物群体,测得的微生物组分不同,用平板计数法测定的是可培养的微生物群体,尤其是生长迅速和能产生孢子的微生物占优势,由于缺乏适用于所有微生物的培养基,能够分离培养的微生物仅占土壤微生物总量的 1%左右,因此用该方法估测微生物群体,结果比实际值偏低;用氯仿熏蒸提取法测定的是总微生物量,测定结果中包括可培养的微生物、休眠的微生物,甚至可能为死微生物;用底物诱导呼吸法测定的微生物群体为利用该底物(在本研究中为葡萄糖)的活性微生物。

表 3 抗生素对底物诱导呼吸的选择性抑制及蚯蚓对土壤真菌与细菌比例的影响

Table 3 Selective inhibition of substrate-induced respiration and effect of earthworm treatment on soil fungal to bacterial ratio

处理 Treatments	CO ₂ 呼出速率(mg CO ₂ /100 g 土壤 h ⁻¹) CO ₂ evolution rate				同时加入时 抑制百分率 % of the total combined inhibition ¹	抑制迭加率 Inhibitor additivity ratio ²	真菌细菌比 Fungal to bacterial ratio ³
	无抑制剂 None (Non)	链霉素 Streptomycin (Str)	放线菌酮 Cycloheximide (Cyc)	同时加入 Combined (Com)			
对照 Control	4.37(0.21)	3.38(0.13)	3.03(0.04)	2.29(0.04)	47.6	1.118	1.35
蚯蚓处理 Earthworm	4.43(0.21)	3.71(0.13)	3.27(0.09)	2.62(0.04)	40.9	1.040	1.61

括号内为平均值的标准误;1 总抑制百分率=(Non-Com)/Nom 100;2 抗生素的抑制迭加率 Inhibitor additivity ratio=[(Non-Str)+(Non-Cyc)]/(Non-Com);3 真菌/细菌比=(Non-Cyc)/(Non-Str)。

本研究表明,蚯蚓处理降低土壤总微生物量(表 1),与 Devliegher & Verstraete^[5]和 Bohlen & Edwards^[6]的结果一致。Daniel & Anderson^[4]发现蚯蚓排泄物与原土中总微生物量无差异,并不一定与本研究结论相矛盾。如前所述,蚯蚓选择取食富含有机质和微生物的土壤组分;与原土相比,蚯蚓排泄物中总微生物量不减少,并不能说明整个土壤中的微生物总量不因蚯蚓处理而减小,原因在于存在着总微生物量在蚯蚓排泄物以外的土壤中减少而在排泄物中富积的可能性。本研究中将加入蚯蚓处理一段时间的土壤(而不仅仅其中的蚯蚓排泄物)与原土相比较,排除了蚯蚓选择性取食对测定结果的可能影响。

蚯蚓取食使得土壤总微生物量减小,而固持于微生物组织内的有效养分得以释放(表 1)。综合文献中用计数法获得的结果可以看出,通过蚯蚓肠道后,可培养的微生物群体增大^[3~5],这可能与通过蚯蚓肠道后土壤内可利用的养分增多有关^[17]。有效养分的提高可能是微生物休眠体(如孢子)萌发和微生物可培养性提高的诱因^[18]。

本研究结果表明,蚯蚓促进活性微生物量的提高(表 2),这与 Scheu 的研究结果相符。微生物代谢商的提高(表 3)标志着蚯蚓处理土壤中微生物群落的年轻化(Rejuvenation),因为‘年轻’的微生物比‘老龄’微生物代谢商高^[19]。微生物群落的年轻化以及有效养分的增多可能是蚯蚓处理土壤中纤维素分解活性增大(图 1)的原因。综上所述,通过蚯蚓肠道后,土壤总微生物量降低,而活性微生物量无显著变化;由于蚯蚓杀死微生物而使微生物固持的养分释放,以及微生物群落的年轻化,使微生物的活性提高,微生物群落结构中真菌和细菌的比例则无显著变化。

参考文献

[1] Lavelle J. La vie de la terre de la savane de Lamto(Côte d'Ivoire):Peuplements, populations et fonctions dans l'écosystème. Thèse Doctorat, Paris P. & M. Curie, Publications du Laboratoire de Zoologie Ecole Normale

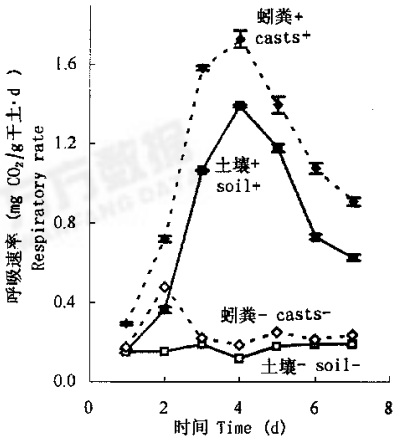


图 1 土壤和蚯蚓排泄物的 CO₂ 呼吸活性
Fig.1 CO₂ evolution rate of soil and earthworm sasts

- Supérieure, 1978, **12**, 301.
- [2] 张宝贵. 蚯蚓与微生物的相互作用. 生态学报, 1997, **17**(5), 556~560.
- [3] Parle J N. A microbiological study of earthworm casts. *J. General Microbiol.*, 1963, **31**, 13~22.
- [4] Daniel O & Anderson J M. Microbial biomass and activity in contrasting soil material after passage through the gut of earthworm *Lumbricus rubellus* Hoffmeister. *Soil Biol. Biochem.*, 1992, **24**: 465~470.
- [5] Devliegher W & Verstraete W. *Lumbricus terrestris* in a soil core experiment; Nutrient enrichment processes (NEP) and gut-associated processes (GAP) and their effect on microbial biomass and microbial activity. *Soil Biol. Biochem.*, 1995, **27**: 1573~1580.
- [6] Bohlen P J & Edwards C A. Earthworm effects on N dynamics and soil respiration in microcosms receiving organic and inorganic nutrients. *Soil Biol. Biochem.*, 1995, **27**: 341~348.
- [7] Pedersen J C & Hendriksen N B. Effect of passage through the intestinal tract of detritivore earthworms (*Lumbricus* spp.) on the number of selected Gram-negative and total bacteria. *Biol. Fert. Soils*, 1993, **16**: 227~232.
- [8] Hendriksen N B. Leaf litter selection by detritivore and geophagous earthworms. *Biol. Fert. Soils*, 1990, **10**: 17~21.
- [9] Lee K E. Earthworms: their ecology and relationships with soil and land use. Academic Press, Sydney, 1985.
- [10] Vance E D, Brookes P C & Jenkinson D S. An extraction method for measuring microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 1987, **19**: 697~702.
- [11] Joergensen R G & Brookes P C. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5M K₂SO₄ soil extracts. *Soil Biol. Biochem.*, 1990, **22**: 1023~1027.
- [12] Brookes P C, Powlson D S & Jenkinson D S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1982, **14**: 319~321.
- [13] Keeney D R & Nelson D W. Nitrogen-inorganic forms. In: Page A L, Miller R H & Keeney D R (Eds) Methods of soil analysis, Part 2. pp. 1982, 643~698. American Society of Agronomy, Madison, USA
- [14] Cataldo D A, Haroon M, Schrader L E & Youngs V L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communication Soil Sci. Plant Anal.*, 1975, **6**: 71~80.
- [15] Cheng W X & Coleman D C. A simple method for measuring CO₂ in a continuous air-flow system; modification to the substrate-induced respiration technique. *Soil Biol. Biochem.*, 1989, **21**: 385~388.
- [16] Alphei J, Bonkowski M & Scheu S. Application of the selective inhibition method to determine bacterial:fungal ratios in three beechwood soils rich in carbon-Optimization of inhibitor concentrations. *Biol. Fert. Soils*, 1995, **19**: 173~176.
- [17] Martin A, Cortez J, Barois I & Lavelle P. Les mucus intestinaux de ver de terre, moteur de leurs interactions avec la microflore. *Revue Ecol. Biol. Sol.*, 1987, **24**: 549~558.
- [18] Fischer K, Hahn D, Hönerlage W & Zeyer J. Effect of passage through the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. on *Bacillus megaterium* studied by whole cell hybridization. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, **29**: 1149~1152.
- [19] Anderson J P E & Domsch K H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1978, **10**: 215~221.