

两种生态类型蚯蚓几种消化酶活性比较研究

张宝贵, 李贵桐, 孙 钊,^① 王建奎^②

(中国农业大学 资源环境学院, 北京 100094)

摘要: 蚯蚓在有机残体转化和土壤养分循环中起着重要的作用, 为明确不同生态类型蚯蚓的食性及其消化有机物质的能力, 测定了表居型蚯蚓赤爱胜蚓(*Eisenia fetida*)和上食下居型蚯蚓威廉环毛蚓(*Pheretima guillemi*)肠道内纤维素酶、蛋白酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的活性; 同时还对威廉环毛蚓排泄物中蛋白酶、磷酸酶以及 CO₂ 呼吸强度与原土进行了比较。结果表明, 赤爱胜蚓肠道内纤维素酶活性远远高于威廉环毛蚓, 而蛋白酶和酸性及碱性磷酸酶活性显著低于威廉环毛蚓; 两种蚯蚓肠道消化酶活化的差异与赤爱胜蚓直接以植物残体为食, 而威廉环毛蚓以半分解的有机残体上的微生物为食有关。根据研究结果, 提出了饲养环毛蚓时要注意增加饵料中微生物量的观点。

关键词: 蚯蚓; 赤爱胜蚓; 威廉环毛蚓; 纤维素酶; 蛋白酶; 磷酸酶

Comparative study of digestive enzyme activities in earthworms belonging to two distinct ecological categories

ZHANG Bao-Gui, LI Gui-Tong, SUN Zhao, WANG Jian-Kui (College of Resources and Environment, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Earthworms play an important part in transformation of organic residues and soil nutrient cycling. In order to determine the diets and the capacity of degrading organic substances, cellulase, protease acid and alkaline phosphatase activities were measured in the gut of an epigeic earthworm *Eisenia fetida* and an anecic earthworm *Pheretima guillemi*. Activity of protease, phosphatases and rate of CO₂ evolution were compared between casts of *Pheretima guillemi* and uningested soil. Cellulase activity was far more important in the gut of *Eisenia fetida* than that of *Pheretima guillemi*, while the activities of protease, acid and alkaline phosphatases were significantly lower than those of *Pheretima guillemi*. The differences of digestive enzyme activities between the two earthworm species may be resulted from the fact that *Eisenia fetida* feed on plant residues, while *Pheretima guillemi* consumes micro-organisms on the organic debris. According to the results of the present study, it is recommended that in culture of *Pheretima*, it is important to increase microbial biomass in the cultural medium.

Key words: earthworm; cellulase; protease; phosphatase; *Eisenia fetida*; *Pheretima guillemi*

文章编号: 1000-0933(2001)06-0978-04 中图分类号: Q958.1 文献标识码: A

蚯蚓是温带土壤中生物量最大的无脊椎动物, 近年来, 秸秆还田及免耕、少耕为其活动和繁衍提供了有利条件。蚯蚓吞食大量土壤和地表残落物^[1], 通过其取食、挖掘和排泄活动, 将有机残体与矿质土壤混合, 加速了有机物质的降解。因而在土壤有机物质转化和养分循环中, 蚯蚓起着重要作用。在国外, 蚯蚓也被广泛利用于有机废弃物的处理中。在英国的洛桑试验站, 利用蚯蚓处理农业废弃物, 生活垃圾和污泥已达到工业化和商业化规模^[2,3]; 此外, 蚯蚓富含蛋白质, 也作为饲料的蛋白添加剂。尽管目前对蚯蚓的利用

基金项目: 国家自然科学基金资助项目

现工作单位: ①农业部农业技术推广总站, 北京 100026; ②河北省扶贫办公室, 石家庄 050051

收稿日期: 1999-04-08; 修订日期: 1999-09-30

作者简介: 张宝贵(1965~), 男, 河北人, 博士, 教授。主要从事土壤生物学生态学研究。

研究较多,但对蚯蚓食性及不同生态类型蚯蚓分解有机物质的能力的研究相对较少。对蚯蚓消化酶的研究主要集中于正蚓科^[1],所涉及的酶也主要是纤维素酶和分解其它多糖的酶^[5~8]。而与氮、磷循环关系密切的氮白酶、磷酸酶的研究很少。本研究测定了表居型赤爱胜蚓和上食下居型威廉环毛蚓的纤维素酶、蛋白酶和磷酸酶活性,目的在于:①通过研究蚯蚓肠道内及其排泄物中的消化酶活性,对其消化有机物质的能力进行评价。②探求蚯蚓生态类型与其消化酶的关系,为确定蚯蚓食性和指导蚯蚓养殖提供依据。

1 材料与方法

1.1 土壤和蚯蚓

土壤取自中国农业大学科学园 0~10cm 的表土,其理化性状如下:pH7.4,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 2mm 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饱和持水量的 50%后,25℃培养,作为蚯蚓培养基质。威廉环毛蚓(*Pheretima guillelmi*)采自北京西郊巨山农场的菜园土。赤爱胜蚓(*Eisenia fetida*)采自实验室人工养殖群体。

1.2 消化酶活性测定

在试验开始前 1d,取成体蚯蚓在培养基质中饲养,以将其肠道内容物更换为培养基质,取出蚯蚓,清水冲洗净泥土后用滤纸吸去水分,称重,解剖。取肠道壁和内容物分别在缓冲液中(pH8.1 的 Tris-HCl 缓冲液,用于蛋白酶和磷酸酶活性测定;pH4.8 的柠檬酸缓冲液,用于纤维素酶活性测定)研碎,离心后取上清液作为酶溶液。蛋白酶活性测定采用酪素法^[9],酸性和碱性磷酸酶活性测定依照 Tabatabai^[10]描述的方法;几丁质酶活性测定:以 1 ml 0.2%的预处理几丁质悬浮液^[11]为底物,加入 1ml pH5.2 的柠檬酸-磷酸缓冲液,在 37℃下培养 24h 后煮沸以终止反应,离心(3000rpm,20 min)后用 Ressig^[12]等描述的方法测定释放的 N-乙酰-D-葡萄糖胺。蚯蚓肠道内纤维素酶活性测定采用滤纸法^[13],还原糖测定采用二硝基水杨酸法^[14]。

预试验表明,蚯蚓排泄物中纤维素酶活性很低,用二硝基水杨酸法不能测到还原糖。为测定其活性,本试验在蚯蚓排泄物中加入微结晶纤维素,测定 CO₂ 呼吸强度以评估排泄物中纤维素分解的强度。在 25℃下培养 7d,用 1.0mol/L 的 NaOH 吸收释放出的 CO₂,碱液每天更换 1 次。用过量的 BaCl₂ 沉淀碳酸根后用 0.3 mol/L 的 HCl 回滴剩余的碱液。

蚯蚓肠道内消化酶活性以蚯蚓活体重为单位,排泄物中酶活性以干土重为单位,酶活性测定重复 3 次,显著性检验采用 *t*-测验。

2 结果与讨论

2.1 蚯蚓肠道内纤维素酶、蛋白酶和磷酸酶活性

蚯蚓肠道内消化酶活性测定结果显示,赤爱胜蚓肠道内纤维素酶活性远比威廉环毛蚓高,但蛋白酶活性和磷酸酶活性,则威廉环毛蚓显著高于赤爱胜蚓(表 1)。两种蚯蚓消化酶活性的差异可能与其所属生态类型及生活习性不同有关。赤爱胜蚓是表居型(Epigeic)蚯蚓^[15],生活和取食于地表的枯枝落叶层,主要以植物残落物为食,其肠道内较高的纤维素酶活性,使其能有效地利用主要构成成份为纤维素的植物残体;而威廉环毛蚓则是上食下居型(Anecic)蚯蚓,它们居住在土壤亚表层,取食富含有机质的土壤,同时将地表的残落物拖进土壤内。蚯蚓偏爱处于腐烂分解状态中的有机残体^[16,17],由于这样的有机残体上微生物较多,蚯蚓可能以其上的微生物为食。支持这种观点的证据还有,通过蚯蚓肠道后,土壤微生物量降低^[18,19]。从植物残体在分解过程中物质组成变化上,易被分解利用的物质如水溶性糖、蛋白质、淀粉、果胶质等,在有机残体分解过程中,首先被微生物利用而耗竭,其后被利用的是纤维素和半纤维素,剩余的物质是很难被微生物降解的木质素及微生物重新合成的代谢产物^[20]。微生物的原生质(Microbial cytoplasm)主要由蛋白质、DNA、RNA 等组成,比较易于利用。由于威廉环毛蚓缺乏很强的纤维素酶活性,而蛋白酶和磷酸酶活性较强,其选择取食半分解的植物残体,很可能是为了利用其上的微生物原生质。张宝贵和 Lattaud 等发现无围海蚓(*Pontoscolex corethrurus*)^[4]以及长多环毛蚓(*Polypheretima elongata*)^[5]体内分解糖类的酶活性很低。唯独 N-乙酰葡萄糖胺酶活性很高,而 N-乙酰葡萄糖胺是组成几丁质的单体,几丁质是真菌细胞壁的主要组成成分,提示蚯蚓可能利用真菌细胞壁,有报道蚯蚓肠道内有几丁质酶^[7]。在本研究中,未能在

这两种蚯蚓肠道内测到几丁质酶活性。综上所述,可以提出如下假设:威廉环毛蚓由于缺乏分解纤维素等结构物质的酶,不能直接利用初级资源(Primary resource)植物组织,而由微生物利用,其后将微生物原生质作为次级资源(Secondary resource)利用;赤爱胜蚓具有较强的纤维素酶,则可直接利用植物残体。

2.2 威廉环毛蚓排泄物中消化酶活性

威廉环毛蚓排泄物中酸性和碱性磷酸酶、蛋白酶活性均比所取食的土中低(表2)。可能消化酶在肠道后端被肠道内蛋白酶分解。据 Barois & Lavelle^[21]报道,蚯蚓分泌大量肠道粘液,主要成分为糖蛋白,及小分子的糖和蛋白质类物质;而在蚯蚓排泄物这些粘液则不复存在,他们推测粘液可能被后肠内的微生物分解利用。蚯蚓排泄物中蛋白酶和磷酸酶活性低的另一可能原因是磷酸酶和蛋白酶活性均受酶促作用产物抑制^[22],而茚三酮反应氮(氨基酸和铵态氮)和无机磷是蛋白酶和磷酸酶的作用产物,它们在蚯蚓排泄物中的浓度较高。另外,本研究结果与 Sharpley & Syers 的结果不一致,他们发现蚯蚓 *Lumbricus rubellus*、*Aporrectora caliginosa* 肠道内磷酸酶活性比原土高^[23]。

表1 两种蚯蚓肠道内纤维素酶、蛋白酶和磷酸酶活性

(分别以 μg 葡萄糖, mg 酪氨酸,
和 μg 对硝基酚/h.g 蚯蚓活体重表示)

Table 1 Activity of cellulases, protease and phosphatases in gut of two earthworm species (expresses respectively as produced/g worm live w/h)

蚯蚓	纤维素酶	蛋白酶	磷酸酶
Earthworms	Cellulase	Protease	Phosphatase
<i>E. fetica</i>	153 $\pm$ 19.0	25 $\pm$ 0.3	127 $\pm$ 0.1
<i>P. guillelmi</i>	19 $\pm$ 1.3	135.5 $\pm$ 1.2	474 $\pm$ 5.0
差异显著性	$p<0.001$	$p<0.0001$	$p<0.00001$
Significance of difference			

表2 土壤和新鲜蚯蚓排泄物中消化酶活化

Table 2 Activity of digestive enzymes in soil and in fresh casts of *Pheretima guillelmi*

	磷酸酶活性		蛋白酶活性
	Phosphatase activities		Protease activity
	酸性 Acid	碱性 Alkaline	(μg p-nitrophenol/g soil · h)
土壤 Soil	569.9 $\pm$ 2.9	748.4 $\pm$ 7.3	29.5 $\pm$ 1.7
蚓粪 Casts	327.1 $\pm$ 26.7	548.9 $\pm$ 19.7	17.8 $\pm$ 2.0
差异显著性	$p<0.001$	$p<0.0001$	$p<0.00001$
Significance of difference			

蚯蚓排泄物中 CO_2 呼出强度高于相应的原土(图1),说明蚯蚓排泄物中分解纤维素、半纤维素等糖类物质的能力高于原土。

对环毛蚓肠道内及其排泄物中消化酶的活性比较可以得出,其对有机氮、磷的分解主要在肠道内完成,而对多糖的分解则在排泄物中进行。

本研究结果对指导蚯蚓养殖具有现实意义。养殖赤爱胜蚓等消化纤维素能力强的表居型蚯蚓时,饵料可以是新鲜的植物残体,而养殖环毛蚓等上食下居型蚯蚓时,饵料应是含微生物较多的半分解的有机残体。因为完全腐熟的有机物易降解的有机分子较少,不利于微生物的生长和微生物量的形成。而在以往介绍蚯蚓养殖的科普性书籍中,推荐的饵料是已经完全腐熟有机残体。另外,利用氮、磷含量相对较少的植物残体时,应加入微生物生长所必需的有效氮、磷,同时注意使养殖饵料的环境条件有利于微生物的生长。

土壤微生物量可作为植物有效养分的供应源和贮存库,环毛蚓等上食下居型蚯蚓以微生物为食,可以加速微生物量的周转。

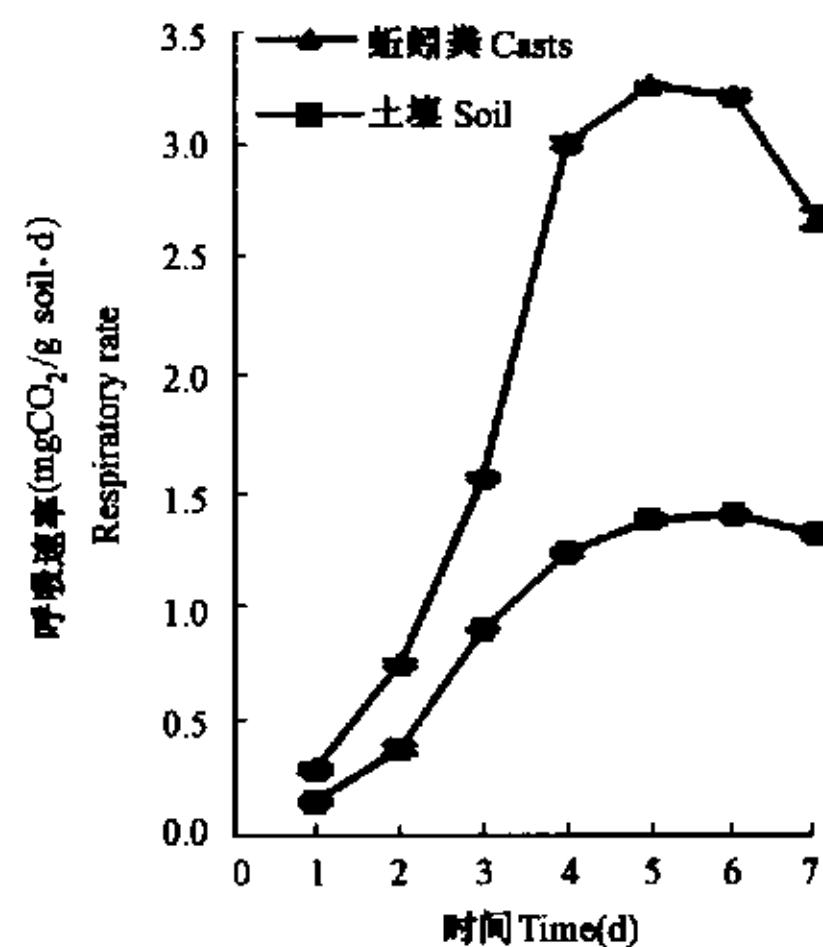


图1 土壤和蚯蚓排泄物的呼吸活性

Fig. 1 Respiratory rate of soil and earthworm casts

参考文献

- [1] Lavelle P. Les vers de 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 École Normale Supérieure*, 1978, 12: 301.
- [2] Edwards C A and Bate J E. The use of earthworms in environmental management. *Soil Biol. Biochem.*, 1992, 24: 1683~1689.
- [3] Edwards C A. Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms. In: Edwards C A and Neuhauser E P Eds. *Earthworms in waste and environmental management*. S. P. B. Academic, The Hague, 1988. 21~31.
- [4] Zhang B-G, Rouland C, et al. Activity and origin of digestive enzymes in gut of the tropical earthworm (*Pontoscolex corethrurus*). *Eur. J. Soil Biol.*, 1993, 29: 7~11.
- [5] Lattaud C, Zhang B-G, et al. Activities of the digestive enzymes in the gut of a tropical geophagous earthworm, *Polypheretima elongata* (Megascotocidae). *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 29: 335~339.
- [6] Loquet M and Vincelas M. Cellulolyse et lignilolyse liées au tube digestif d'*Eisenia fetida* andrei Bouché. *Revue col. Biol. Sol.*, 1987, 24: 559~571.
- [7] Parle J N. A microbiological study of earthworm casts. *J. General Microbiol.*, 1963, 31: 13~22.
- [8] Urbásek F. Cellulase activity in the gut of some earthworms. *Revue Écol. Biol. Sol.*, 1990, 27: 21~28.
- [9] Ladd J N and Butler H A. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology & Biochemistry*, 1972, 4: 19~39.
- [10] Tabatabai M A. Soil enzymes. In: Page A L, Miller R H and Keeney D R Eds. *Methods of soil analysis*, Part 2. *Am. Soc. Agron.*, Madison, USA, 1982. 903~947.
- [11] Skujins J J, Potgieter H J and Alexander M. Dissolution of fungal cell wall by a streptomycete chitinase and β -(1->3)glucanase. *Arch. Biochem. Biophysics*, 1965, 111: 358~364.
- [12] Reissig J L, Strominger J L and Leloir L F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminosugars. *J. Biol. Chem.*, 1955, 217: 959~966.
- [13] Mandels M, Andreotti R and Roche C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotech. Bioeng. Symp.*, 1976, 6: 21~34.
- [14] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 1969, 31: 426~428.
- [15] Bouché M B. Stratégies lombricienne. *Ecol. Bull.*, 1972, 25: 122~132.
- [16] Edwards C A and Fletcher K E. Interactions between earthworms and microorganisms in organic matter breakdown. *Agric. Ecosys. Environ.*, 1988, 24: 235~247.
- [17] Cortez J, Hameed R and Bouché M B. C and N transfer in soil with or without earthworms fed with ^{14}C and ^{15}N -labelled wheat straw. *Soil Biol. Biochem.*, 1989, 21: 491~497.
- [18] Devliegher W and 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.
- [19] Bohlen P J and 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.
- [20] Stevenson F J. Cycles of soil Carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients, John Wiley & Sons, New York, 1986. 29~30.
- [21] Barois I and Lavelle P. Changes in respiration rate and some physiochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.*, 1986, 18: 539~541.
- [22] McGill W B and Cole C V. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, 1981, 26: 267~286.
- [23] Sharpley A N and Syers J K. Potential role of earthworm casts for the phosphorus enrichment of run-off water. *Soil Biol. Biochem.*, 1976, 8: 341~346.