

# 选择性呼吸抑制技术在土壤细菌和真菌生物量测定中的应用

林启美

(中国农业大学土壤和水科学系, 北京, 100094)

**摘要:**放线菌酮和链霉素可以选择性地抑制土壤中真菌和细菌的葡萄糖诱导呼吸作用, 但抑制效果仅 50% 左右。二者的最适用量每克土分别为 8~12mg 和 4~8mg, 培养时间以低于 4h 为好。在两个土壤上选择性呼吸抑制方法测定的结果与直接显微镜计数法所得的结果相当, 但是, 加入链霉素时, 一个粘性土壤的葡萄糖诱导呼吸量不但不被抑制, 反而随链霉素加入量的增加, 诱导呼吸量增加, 是否与其高的粘粒含量有关乃需要做进一步的研究。另还详细地讨论了应用此方法的有关问题。

**关键词:**细菌生物量; 真菌生物量; 选择性诱导呼吸抑制作用

## The application of selective inhibition technique in the measurement of soil bacterial and fungal ratio

LIN Qi-Mei (Department of Soil and Water Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Glucose-induced respiration can be selectively inhibited by cycloheximide and streptomycin. The optimal quantities used in the three soils were 8~12 mg/g soil for cycloheximide and 4~8 mg/g soil for streptomycin. The incubation time following glucose addition was less than 4 hours. The total inhibition was about 50% of glucose-induced respiration. The bacterial and fungal ratios for soil samples No. 1 and No. 2 were comparable with these measured by agar-film direct microscopy. It failed in determining the proportion of bacteria and fungi for a clay soil since substrate-induced respiration increased as streptomycin addition. Whether the high clay content results in the failure measurement needs more study. The precaution using this techniques is discussed too.

**Key words:** bacterial biomass; fungal biomass; selective inhibition

文章编号: 1000-0933(1999)06-0921-06 中图分类号: Q958 文献标识码: A

一般来说, 由于缺乏碳源, 土壤中的微生物呼吸量很低。如果向土壤加入易分解的有机物, 如葡萄糖, 则微生物的呼吸量在极其短的时间内迅速增加, 并且可维持近 4h 没有大的变化, 这时的呼吸量与土壤原有的微生物生物量之间存在直线关系, 又称为基质诱导呼吸量, 可作为土壤微生物生物量的指标<sup>[1]</sup>。如果在加入葡萄糖的同时, 向土壤加入细菌或真菌的抗生素, 基质诱导呼吸就受到选择性的抑制, 使土壤中细菌和真菌的生物量被分别测定出来, Anderson & Domsch<sup>[2,3]</sup>发现在一定的用量范围, 放线菌酮只抑制真菌的生长, 对细菌和放线菌的生长没有影响; 而链霉素只抑制细菌和放线菌的生长, 对真菌的生长没有影响, 并且成功地测定出几个耕地土壤细菌和真菌的生物量<sup>[4-7]</sup>。用此方法, 根际和根表土壤<sup>[8]</sup>及腐烂植物<sup>[9]</sup>中的细菌和真菌生物量也被测量出来。但是, Ross 等<sup>[10]</sup>报道这两种抗生素对基质诱导 O<sub>2</sub> 的消耗没有选择性抑制作用, West<sup>[11]</sup>没有测定出一个生物量低的土壤的细菌和真菌生物量, Bewley & Parkinson<sup>[12]</sup>在一个有机质含量很高的土壤也遭到失败。因此, Insam 等<sup>[13]</sup>提出, 必须十分谨慎地应用此技术。

直接显微镜计数法是一个比较传统的方法<sup>[14]</sup>, 尽管非常繁琐费时, 但仍然被广泛用于土壤中细菌和真菌生物量的测定<sup>[15,16]</sup>。本研究将用选择性诱导呼吸抑制技术, 测定 3 种不同土壤中的细菌和真菌生物

**基金项目** BBSRC 和 BASF 的资助项目

本文在 P. C. Brookes 博士的指导下完成, 在此深表谢意!

收稿日期: 1997-08-24; 修订日期: 1998-06-22

量,并与直接显微镜计数法所得的结果进行比较,从而对选择性诱导呼吸抑制技术进行全面地评价。

## 1 材料和方法

### 1.1 土壤

3个土壤采自洛桑试验站长期定位试验地,用荷兰土钻采集,土壤1和土壤2采0~10cm土层土壤,土壤3采0~23cm土层土壤,3种土壤的理化性质见表1。

采集的湿土迅速过2mm筛,去掉植物残体和可见的土壤动物,将土壤湿度调节至40%的田间持水量,放入密封的铁桶内,桶内有水和苏打石灰粉(以保持湿度和吸收培养过程中释放的CO<sub>2</sub>),25℃下培养7d,迅速分析或放在5℃的冷藏室中保存。

### 1.2 选择性抑制基质诱导CO<sub>2</sub>呼吸的测定

称取相当于10~30g烘干土的湿土,放入250ml磨口三角瓶中,分别加入(a)葡萄糖,(b)葡萄糖+链霉素,(c)葡萄糖+放线菌酮,(d)葡萄糖+链霉素+放线菌酮。葡萄糖用量为每克土6mg,用前按1:4的比例与滑石粉研细混匀,抗生素也一同研细混匀。与土壤充分混合,0.5h后,盖上盖子,在25℃下培养,定期用气相色谱测定三角瓶中CO<sub>2</sub>浓度,并计算真菌和细菌的诱导呼吸量。

$$\text{细菌生物量比例: } (A-B)/(A-D) \times 100$$

$$\text{真菌生物量比例: } (A-C)/(A-D) \times 100$$

A为仅加入葡萄糖土壤的呼吸量,B为加入葡萄糖和链霉素土壤的呼吸量,C为加入葡萄糖和放线菌酮土壤的呼吸量,D为加入葡萄糖链霉素及放线菌酮土壤的呼吸量;A-B为细菌基质诱导呼吸量,A-C为真菌基质诱导呼吸量。

### 1.3 直接显微镜计数法测定土壤细菌和真菌的生物量

称少量湿土(0.5g左右),加入融化的琼脂(1%)和土壤分散剂,在可控温超声波水浴土壤分散仪上处理15min(水浴60℃左右),用滴管吸取少量土壤悬浮液于血板池内,制成1mm厚度的琼脂薄片,用台酚蓝染色,在显微镜下计数,并测量个体大小,根据细胞密度、干重和干物质含碳量,计算细菌和真菌的生物量碳,详细方法见林启美的文章<sup>[17]</sup>。

所有测定做3次重复,用烘干土表示,但直接显微镜计数做4次平行,数据处理用Genstat软件进行。

## 2 结果

### 2.1 不同剂量抗生素对葡萄糖诱导呼吸的抑制作用

如图1所示,当向土壤加入一系列剂量的链霉素时,诱导呼吸受抑制作用呈S型,大于8mg/g土的用量时,抑制作用提高,小于4mg/g土的用量时,抑制作用降低,4~8mg/g土的用量,抑制作用程度保持不变,为10%左右。诱导呼吸对加入放线菌酮的反应有所不同,用量超过8mg/g土时,抑制作用迅速增加,达到40%。两个土壤结果非常一致。十分令人不解的是,当向3号土壤加入链霉素时,诱导CO<sub>2</sub>呼吸量反而随加入链霉素增加而增加(表2)。

### 2.2 葡萄糖诱导呼吸的选择抑制作用

如果放线菌酮用量为8和12mg/g土,链霉素用量为4和6mg/g土,二者以不同配比加入土壤中,在连续培养时,分阶段测定CO<sub>2</sub>呼吸受抑制的程度,并计算细菌和真菌的百分比。结果如表3和表4所示。在最初的2h(0.5~2.5h),单独加入抗生素对诱导呼吸的抑制作用,与两抗生素同时加入时,其对诱导呼吸抑制作用的效果相同,亦即 $[(A-B)+(A-C)]/(A-D)$ 的比值接近1。但随着培养时间的延长,比值增大。当两抗生素同时加入时,诱导呼吸作用仅抑制50%,且随着培养时间的延长而增加。

表1 土壤的理化性质

Table 1 Soil properties

土壤 Soil	地点 Location	有机碳 O. C. (g/kg)	全氮 T. N. (g/kg)	pH	粘粒	
					Clay (<2μm) g/kg	植被 Coverly
1	Highfield	40.8	3.640	4.8	220	牧草 <sup>①</sup>
2	Woburn	12.1	1.120	6.4	140	牧草
3	Woburn	16.0	1.130	6.2	560	冬小麦 <sup>②</sup>

注:①Forage grass,②Winter wheat

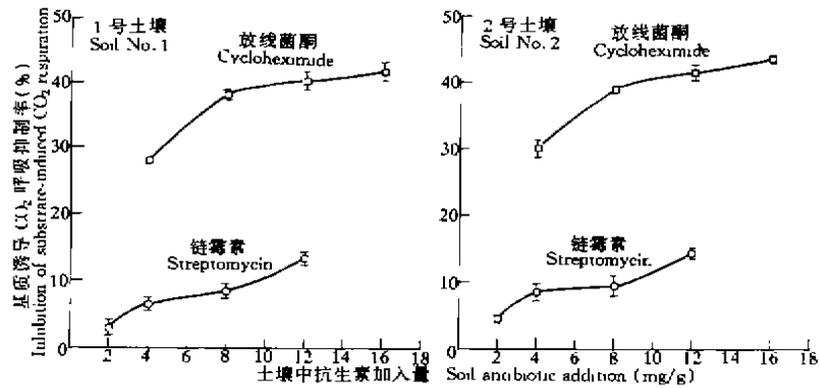


图 1 抗生素加入量与基质诱导 CO<sub>2</sub> 呼吸抑制的关系(竖线表示标准误差)

Fig. 1 Relationship between antibiotic addition and inhibition of substrate-induced CO<sub>2</sub> respiration (Bar is standard deviation)

表 2 抗生素对 3 号土壤基质诱导呼吸的抑制作用

Table 2 Inhibition of substrate-induced respiration by antibiotics in soil No. 3

	对照*		链霉素(mg/g 土)			放线菌酮(mg/g 土)			
	Control		Streptomycin			Cycloheximide			
基质诱导呼吸 <sup>①</sup>	0.4	1.6	3.2	8.0	16.0	4	8	12	16
(CO <sub>2</sub> μL/h/g/h)	20	20	19	20	23	25	17	16	16

\* 仅加入葡萄糖 Only adding glucose. ①Substrate-induced respiration

表 3 细菌和真菌生物量比例的测定(1 号土壤)

Table 3 Measurement of the proportions of bacterial and fungal biomass for soil No. 1

时间间隔(h)	Time interval	放线菌酮 Cycloheximide 链霉素 Streptomycin	抗生素配对浓度(mg/g 土)			
			Paired antibiotic concentration			
			8	8	12	12
			4	6	4	6
0.5~2.5	$[(A-B)+(A-C)]/(A-D)$		1.03±0.03	1.02±0.01	1.00±0.02	1.00±0.01
	细菌(%):真菌(%) <sup>①</sup>		18:85	23:79	17:78	22:78
	诱导呼吸抑制率(%) <sup>②</sup>		43.4±2.3	46.5±3.1	45.1±3.5	47.7±2.9
2.5~4.5	$[(A-B)+(A-C)]/(A-D)$		0.98±0.03	1.04±0.03	0.93±0.02	1.01±0.01
	细菌(%):真菌(%)		12:86	24:80	nc*	22:79
	诱导呼吸抑制率(%)		45.0±3.1	48.3±1.9	49.6±3.1	51.5±2.1
4.5~6.5	$[(A-B)+(A-C)]/(A-D)$		1.07±0.05	1.18±0.03	1.04±0.03	1.18±0.04
	细菌(%):真菌(%)		nc	nc	16:88	nc
	诱导呼吸抑制率(%)		50.7±1.9	54.0±2.3	53.3±3.2	57.4±2.5

\* nc: 没有计算,下同。Not calculated, same as other tables. ①Bacteria:fungi ②Inhibition of substrate-induced respiration

### 3.3 直接显微镜计数法测定的细菌和真菌生物量

若微生物的比重为 1.1,干物质含量为 25%,干物质含碳量为 47%,镜检法测定的细菌和真菌生物量的结果如表 5 所示。

表4 细菌和真菌生物量比例的测定(2号土壤)

Table 4 Measurement of the proportions of bacterial and fungal biomass for soil No. 2

时间间隔(天)	Time interval	放线菌酮 Cycloheximide 链霉素 Streptomycin	抗生素配对浓度(mg/g土)			
			Paired antibiotic concentration			
			8	4	12	12
			4	8	4	6
0.5~2.5		$[(A-B)+(A-C)]/(A-D)$	1.06±0.04	0.95±0.02	1.05±0.08	0.98±0.01
		细菌(%) : 真菌(%)	26 : 80	24 : 71	26 : 80	24 : 74
		诱导呼吸抑制率(%) <sup>②</sup>	12.2±3.1	47.3±2.1	13.1±1.5	46.5±1.7
2.5~4.5		$[(A-B)+(A-C)]/(A-D)$	1.21±0.05	1.24±0.02	1.11±0.04	1.23±0.03
		细菌(%) : 真菌(%)	nc	nc	nc	nc
		诱导呼吸抑制率(%)	44.0±3.1	48.2±1.8	48.2±2.5	48.2±3.1
4.5~6.5		$[(A-B)+(A-C)]/(A-D)$	1.21±0.05	1.36±0.04	1.15±0.03	1.19±0.02
		细菌(%) : 真菌(%)	nc	nc	nc	nc
		诱导呼吸抑制率(%)	48.2±1.5	51.5±3.1	50.9±1.9	52.5±2.8

① Bacteria : fungi ② Inhibition of substrate-induced respiration

表5 镜检法测定的细菌和真菌生物量

Table 5 Bacterial and fungal biomass measured by direct microscopic method

土壤	微生物	生物体积(mm <sup>3</sup> /g土)	生物量碳(mg/kg土)	细菌/真菌
Soil	Microorganisms	Biovolume	Biomass C	Bacteria/fungi
1	细菌	1.383	178.5	15 : 85
	真菌	7.833	1012.4	
2	细菌	0.674	87.1	16 : 84
	真菌	3.675	475.5	

### 3 讨论

放线菌酮仅抑制含有 80S RNA 细胞的蛋白质合成,真核细胞中含有 80S RNA,所以放线菌酮对真菌、藻类及原生动物的作用。一般土壤中藻类和原生动物的生物量比起真菌生物量要低得多,在此处忽略不计。链霉素抑制含有 70S 和 80S RNA 细胞的蛋白质合成,原核生物细胞中仅有 70S RNA,所以链霉素不仅对细菌起作用,而且对真菌也起作用。但是,原位培养和培养基培养试验证实,在一定的用量范围内,链霉素仅抑制原核生物细胞蛋白质的合成<sup>[2,3]</sup>。放线菌酮呈中性,吸附于土壤颗粒上较少。而链霉素呈碱性,可以强烈地吸附在土壤颗粒上,由于不同的土壤吸附能力不一样,所以在实际操作时,必须预先确定每一种土壤的抗生素最合适的用量。图1的结果表明,如果每克土加入链霉素超过 8mg/g 土,诱导呼吸受抑制增强,在 4~8mg/g 土的用量,抑制作用几乎不变化,低于 4mg/g 土的用量,抑制作用迅速降低。显然,1号 和 2号土壤,链霉素的合适用量为 4~8mg/g 土,而放线菌酮的最适用量大于 3mg/g 土。Anderson & Dom-sch<sup>[4]</sup>每克土用链霉素 0.5~3 mg,放线菌酮 0.5~4 mg, Bewley & Parkinson<sup>[1]</sup>链霉素和放线菌酮的用量分别为 1~16 mg/g 土和 1~32 mg/g 土; Wardle & Parkinson<sup>[5]</sup>则每克土用 10 mg 链霉素和 15 mg 放线菌酮。可见不同的供试材料,抗生素的用量差异很大。3号土壤粘粒含量最高,尽管链霉素用量加大到 16mg/g 土,诱导呼吸没有受到任何抑制作用,反而随着链霉素加入量的增加而呈比例的提高,是否与其粘粒含量高有关,目前还没有直接的证据,需要进一步研究。

如果放线菌酮和链霉素选择性地抑制诱导呼吸作用,则  $[(A-B)+(A-C)]/(A-D)$  的比值等于 1.0,但事实上如表3和表1所示,其比值为 0.93~1.36,并且随培养时间延长而增大,亦即抑制作用失去

了选择性。Beare 等<sup>[9]</sup>也发现同样的现象。其原因不清楚。

根据 Anderson & Domsch<sup>[4]</sup>的方程,只有当  $A - [(A-B) + (A-C)] = D \pm 5\%$  时,计算出的细菌和真菌的百分比才有效。据此,本文所用的 2 个土壤细菌和真菌的比例为 1 号土壤,细菌占 12%~24%,真菌占 78~88%,平均值分别为  $19\% \pm 4.2\%$  和  $82\% \pm 4.0\%$ ; 2 号土壤则为  $25\% \pm 1.2\%$  和  $76\% \pm 4.5\%$  (表 3、表 4)。可见真菌是供试的两个土壤绝对优势的微生物群落,Anderson & Domsch<sup>[4]</sup>和 Wardle & Parkinson<sup>[6]</sup>也得到相似的结果。

Ivarson & Sowden<sup>[14]</sup>发现如果向培养基加入放线菌酮,细菌生长加快;如果培养基中有链霉素存在时,真菌生长加快。Anderson & Domsch<sup>[4]</sup>也提出抗生素抑制某一微生物的生长,同时刺激另一微生物的生长,如果发生这一现象,  $(A-B)/(A-C)$  的比值将大大改变。但表 6 的结果表明这一比值的变化并不太大,尤其在短时间培养时,几乎没有变化。这充分说明加入放线菌酮时,并没有由于抑制真菌呼吸,而刺激细菌的呼吸作用,反之亦然。

综上所述,在一定的浓度范围内,放线菌酮和链霉素可以分别选择性地抑制土壤中的真菌和细菌基质诱导呼吸作用,并由此测定出土壤的细菌和真菌的生物量,其测定的结果与直接显微镜计数法所得的结果极为接近。由于抗生素可以吸附于土壤颗粒上而失效,同时又可作为微生物的 C 源,所以在最适用量范围内,尽可能地加大用量,同时缩短培养时间,以少于 4h 为宜。但是由于仅一半左右的诱导呼吸作用受到抑制,现在还没有直接的证据证实受与不受抗生素抑制的微生物生物量,是否有同样比例的细菌和真菌生物量。所以正如 Bewley & Parkinson<sup>[12]</sup>警告的那样,必须同时应用其它的方法,以检查结果的准确确定。

#### 参考文献

- [1] 林启美. 葡萄糖加入形式对基质诱导呼吸量测定的影响. 中国农业大学学报, 1997, 2: 53~58.
- [2] Anderson J P E & Domsch K H. Selective inhibition as a method for estimation of the relative activities of microbial populations in soils. *Bul. of Ecol. Res. Commun.* (Stockholm), 1973, 17: 281~282.
- [3] Anderson J P E & Domsch K H. Quantity of bacterial and fungal contribution to soil respiration. *Arch. of Microbiol.* 1973, 93: 113~127.
- [4] Anderson J P E & Domsch K H. Measurement of bacterial and fungal contribution to respiration of selected agricultural and forest soils. *Can. J. of Microbiol.* 1975, 21: 314~332.
- [5] West A W, et al. Relationship between mycelial and bacterial populations in stored, air-dried and glucose-amended arable and grassland soils. *Soil Biol. & Biochem.* 1987, 19: 599~605.
- [6] Wardle D A & Parkinson D. Response of the soil microbial biomass to glucose, selective inhibitors across a soil moisture gradient. *Soil Biol. & Biochem.* 1990, 22: 825~834.
- [7] Wardle D A & Parkinson D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant & Soil.* 1990, 122: 21~28.
- [8] Nakas J P & Klein D A. Mineralization capacity of bacteria and fungi from the rhizosphere-rhizoplane of a semi arid grassland. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1980, 39: 113~117.
- [9] Beare M H, et al. A substrate-induced respiration (SIR) method for measurement of fungal and bacterial biomass on plant residues. *Soil Biol. & Biochem.* 1990, 22: 585~594.
- [10] Ross D J, et al. Microbial biomass estimates in soils from Tussock grassland by three biochemical procedures. *Soil*

表 6 细菌与真菌呼吸的比值  $(A-B)/(A-C)$  (1 号土)

Table 6 The ratio of bacterial to fungal respiration for soil No. 1

抗生素配对浓度 (mg/g 土) Paired antibiotic concentration	时间间隔 (h) Time interval		
	0.5~	2.5~	4.5~
S <sub>4</sub> C <sub>8</sub>	0.22	0.13	0.20
S <sub>4</sub> C <sub>12</sub>	0.22	0.13	0.18
S <sub>6</sub> C <sub>8</sub>	0.29	0.29	0.40
S <sub>6</sub> C <sub>12</sub>	0.28	0.28	0.37
S <sub>8</sub> S <sub>8</sub>	0.31	0.22	0.36
S <sub>8</sub> C <sub>12</sub>	0.31	0.21	0.33

\* S<sub>2</sub>链霉素, Streptomycin. C<sub>1</sub>放线菌酮, Cycloheximide.

- Biol. & Biochem.* 1980, 12:375~383.
- [11] West A W. Improvement of the selective respiratory inhibition techniques to measure eukaryote, prokaryote ratios in soils. *J. of Microbiol. Methods.* 1986, 5:125~138.
- [12] Bewley R J F & Parkinson D. Bacterial and fungal activity in sulphur dioxide polluted soils. *Can. J. of Microbiol.* 1985, 31:13~15.
- [13] Insam H, *et al.* Selective-inhibition techniques: does it really reveal the bacterial/fungal ratio? In *Beyond the Biomass, Compositional and Functional Analysis of Soil Microbial Communities.* Wye college University of London, Kent, UK, 1993.
- [14] Skinner F A, *et al.* A comparison of a direct and a plate-counting technique for the quantitative estimation of the soil microorganisms. *J. Gen. Microb.* 1952, 6:261~271.
- [15] Jenkinson D S, *et al.* The effects of biocidal treatments on metabolism in soil I. The relationship between soil biovolume, measured by optical microscopy, and the flush of decomposition caused by fumigation. *Soil Biol. & Biochem.*, 1976, 8:189~202.
- [16] Vance E D. *Microbial biomass in Forest Soils.* PhD thesis, University of Missouri-Columbia, 1986.
- [17] 林启美. 琼脂薄片法在土壤细菌和真菌生物量测定中的应用. *中国农业大学学报(增刊)*, 1997, 2:59~64.
- [18] Ivarson K C & Sowden F J. Decomposition of forest litters I. production of ammonia and nitrogen, changes in microbial population, and rate of decomposition. *Plant & Soil.* 1959, 11:237~248.