

蚯蚓及蚓粪对白腐真菌降解土壤中菲的动态影响

田 蕾, 陈小云, 胡 淼, 杨淑莉, 李辉信, 胡 锋

(南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095)

摘 要:通过接入白腐真菌、蚯蚓和蚓粪,研究了通过蚯蚓及蚓粪的作用来改善土壤环境,从而提高土壤原位生物修复的可行性。结果显示,在 30 d 的黑暗培养试验里,土壤中菲浓度随着时间逐渐减少,蚓粪和蚯蚓自身均能促进土壤中菲的降解,但蚓粪的促进作用要优于蚯蚓的作用;在 100 mg·kg⁻¹ 菲处理浓度下,蚓粪处理中菲残留浓度在培养的第 4 d 显著低于其他处理。试验结果还表明,在加入白腐真菌的土壤中,蚓粪和蚯蚓都能促进白腐真菌对菲的降解,且显著高于只接入白腐真菌的处理。同时加入蚯蚓和白腐真菌的处理中木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP)酶活性虽然在一直下降,但蚯蚓的加入减缓了酶活性的下降趋势,从而使得蚯蚓提高了处理中白腐真菌对菲的降解率。而同时加入蚓粪和白腐真菌的处理中的 LiP 和 MnP 酶活性变化则要相对复杂,在培养前、中期,两种酶的活性分别表现出不同的变化趋势,而在培养后期,两种酶的活性均显著增高。因此,同时加入蚓粪和白腐真菌处理的菲浓度在培养后期才与只加入白腐真菌的处理产生显著差异。结果表明,蚓粪和蚯蚓可能是通过改善土壤环境条件、促进微生物活性、增强土壤中过氧化物酶活性来提高白腐真菌对菲的降解率。但是,其中的作用机制需要进一步试验证实。

关键词:蚯蚓; 蚓粪; 白腐真菌; 菲

中图分类号: X53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)01-0221-05

Effect of Earthworms and Earthworm Casts on The Degradation of Phenanthrene in Artificially Contaminated Soil by White-rot Fungi (*P.chrysosporium*)

TIAN Lei, CHEN Xiao-yun, HU Miao, YANG Shu-li, LI Hui-xin, HU Feng

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Through dark incubation with white-rot fungi, earthworms and earthworm casts, the study was to discuss the feasibility of in-situ bioremediation of contaminated soil by earthworms and earthworm casts. The results showed that the concentration of phenanthrene in soil gradually reduced and the effect of earthworm casts was significantly superior to that of earthworms. Average removal of phenanthrene by earthworm casts alone was significantly higher than that by other treatments at the fourth day. In the treatments added with white-rot fungi, both earthworm casts and earthworms could stimulate the degrading effect of white-rot fungi on phenanthrene in soil. Although the activities of LiP and MnP in treatment with white-rot fungi and earthworms reduced, the earthworms slowed down the reduction of enzyme activities, which stimulated the degradation of phenanthrene by white-rot fungi. Compared with earthworms, the treatment added with both earthworm casts and white-rot fungi showed more complicated changes of enzyme activities. During most time of incubation, two enzyme activities changed differently. But at the end of incubation, both of the two enzyme activities were significantly promoted. So phenanthrene concentration of this treatment was significantly different with the treatment only added with white-rot fungi at the end of incubation. The results indicated that earthworm casts and earthworms might stimulate the effect of white-rot fungi by enhancing the enzyme activities. However, the mechanism might need further experiments.

Keywords: earthworm; earthworm casts; white-rot fungi; phenanthrene

收稿日期: 2007-02-12

基金项目: 国家环境保护总局项目(江苏省土壤污染调查); 南京农业大学 SRT(0607A11)项目。

作者简介: 田 蕾(1980—), 女, 浙江兰溪人, 硕士研究生, 主要从事有机污染物生态修复研究。E-mail: leitian1215@hotmail.com

通讯作者: 胡 锋 E-mail: fenghu@njau.edu.cn

多环芳烃(PAHs)是土壤中多见的一类重要有机污染物,在一些重污染区,土壤中 PAHs 含量为每千克土可达上万微克,严重危害土壤的生产和生态功能,影响农产品安全和人类健康。如何修复 PAHs 污染土壤受到国内外广泛关注^[1]。目前,PAHs 降解菌中研究最广和最深入的其中之一是白腐真菌。它对木质素降解具有很强的特异性,并成为持久性有机污染物降解中最有应用前景的一类真菌。但是如果土壤环境不利于 PAHs 降解菌的生长和代谢,对土壤进行原位生物修复的可行性就会受到限制。然而这些限制因子可以通过人为改变土壤状况或加入有机、无机添加物来调控。

蚯蚓,作为土壤中生物量最大的动物类群之一,在维持土壤生态系统功能中起着不可替代的作用,它们具有改善土壤物理结构、改善土壤通气性和透水性、增强土壤肥力的能力。如果将蚯蚓引入土壤中,将有利于退化的污染土壤生态系统的恢复^[2];另外,由于蚯蚓体内能携带各种微生物^[3,4],如果将蚯蚓引入污染土壤,随同蚯蚓一起,可以向土壤中引入各种微生物,提高土壤中活性微生物量^[5]。Luepromchai 等^[6]研究发现,蚯蚓能提高多氯联苯(PCBs)降解菌的传播,促进土壤中联苯降解菌种群数量的增加。另一方面,添加物可以被用于提高污染物生物可利用性和用于增加或是刺激降解菌的数量。很多试验对添加物的作用从各种不同的方面(如用不同的污染物,混合或不混合微生物,不同的环境介质下)进行研究,发现结果各不相同^[7-9]。在大多数的试验中,关于添加物对微生物种群变化的作用没有能够很好地解释。

蚓粪是蚯蚓吞食土壤通过蚯蚓肠道消化后的排泄物,富含 N、P、K 等养分^[10]以及各类活性物质^[11],作为一种优质有机肥已经普遍应用于土壤的改良培肥和作物增产^[10]。然而有关蚯蚓和蚓粪对土壤多环芳烃的降解动态的研究,国内外尚未见报道。本文选择三环的多环芳烃菲作为研究对象,动态研究蚯蚓及蚓粪对污染土壤中菲降解的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤

采自江西红壤,土壤采集后去除碎石、枯叶等杂物,自然风干,过 2 mm 筛备用。基本理化性状见表 1。土壤染毒:将溶于正己烷中的菲与土样充分搅拌均匀,使土壤染毒浓度到 100 mg·kg⁻¹。在黑暗条件下于

通风橱处敞口放置 24 h,待溶剂挥发完毕后,于黑暗处老化 7 d。^[12]

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Physiochemical properties of the study soil

土壤全氮 /g·kg ⁻¹	土壤有机碳 /g·kg ⁻¹	pH	阳离子交换量 /cmol·kg ⁻¹	最大田间 持水量/%
0.51	5.80	5.41	1.69	31.22

1.1.2 白腐真菌(*Phanerochaete chrysosporium* 5.0776)

购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。真菌的活化和培养:将购买菌种在无菌操作下接入马铃薯培养基,28℃下培养 7 d。将玉米秆(2 g,直径小于 1 mm,77%湿度,m/m)放入培养皿中,121℃灭菌 30 min,然后接入已培养一周的白腐真菌。真菌和玉米秆一起在 28℃下培养 7 d,然后加入土中。

1.1.3 蚯蚓与蚓粪

蚯蚓为赤子爱胜蚓,购自南京市大厂区长芦镇普桥二组个体蚯蚓养殖场。蚓粪为赤子爱胜蚓处理牛粪后的新鲜排泄物。蚓粪的 pH 为 7.37,有机质含量为 665.07 g·kg⁻¹,全氮为 38.19 g·kg⁻¹。

1.1.4 化学品

菲(>97% HPLC,FLUKA),其他常用试剂为分析纯。

1.2 研究方法

1.2.1 处理方法

本试验设 6 个处理,CK 表示空白试验、E 表示加入蚯蚓、EC 表示加入蚓粪、F 表示接种真菌、FE 表示接入真菌和蚯蚓、FEC 表示接入真菌和蚓粪。将 150 g 受菲污染的土壤加入 400 mL 细长玻璃杯,其中,在 EC 及 FEC 处理加入 20 g 蚓粪,其他处理则另加入 20 g 土壤使各处理间的重量相同,然后在 F、FE 及 FEC 处理中小心加入 2 g 已长好白腐真菌的玉米秆(白腐真菌含量为 10⁶ 个·g⁻¹)^[13],最后在 E 及 FE 处理中加入 5 条体重为(0.2±0.05) g 的蚯蚓。将上述设置好的玻璃杯置于 28℃恒温培养箱中黑暗培养 30 d,试验中土壤水分维持在田间最大持水量的 60%。培养期间进行动态采样,前 20 d 每 4 天进行一次破坏性采样,后 10 d 只采样一次,每个处理在各个采样时间点各设 3 个重复。

1.2.2 土壤及蚯蚓中菲的提取与测定

土壤中菲采用二氯甲烷-超声波萃取,硅胶柱净化,HPLC 测定^[14]。蚯蚓洗净后放置 24 h 使其排净肠道物,称重,液氮冷冻后放于研钵中,加入其体重 1.5

倍的 Na_2SO_4 混合磨碎后待用。蚯蚓体内菲的提取和测定方法与土壤相同。

1.2.3 酶活性测定

粗酶液的配制:将土壤与缓冲液混合,在冰块上放置 1 h,不时用手振荡,然后将悬浊液在 $15\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $15\ 000\times\text{g}$ 离心 15 min。将获得的上清在 $15\text{ }^\circ\text{C}$ 下 $5\ 000\times\text{g}$ 离心 15 min,即得粗酶液^[5]。

LiP 酶活性测定:以 LiP 在 H_2O_2 存在下氧化 Azure B 染料来表示 LiP 活力的方法^[6], $125\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的酒石酸钠缓冲液 (pH 3.0) 1 mL, $0.160\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Azure B 溶液 $500\ \mu\text{L}$, 培养基滤出液 $500\ \mu\text{L}$, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下加入 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液 $500\ \mu\text{L}$ 启动反应,测反应最初 3 min 内 $651\ \text{nm}$ 处 OD 值减小速率,1 个酶活力单位以每分钟每毫升的培养基滤出液降低 0.1 个 OD 值来表示。

MnP 酶活性测定^[7]: $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乳酸钠缓冲液 (pH 4.5) $3.4\ \text{mL}$, $1.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MnSO_4 溶液 $0.1\ \text{mL}$, $0.4\ \text{mL}$ 的培养基滤出液,预热至 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 加入 $1.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液 $0.1\ \text{mL}$ 启动反应,测反应最初 3 min 内 $240\ \text{nm}$ 处吸光度变化,1 个酶活力单位用每分钟吸光值增加 0.1 的酶量来表示。

1.2.4 统计方法

本试验所有数据经 SPSS13.0 软件处理分析。

2 结果

2.1 蚯蚓及蚓粪对白腐真菌降解土壤中菲的促进作用

从图 1 中可以看出,所有处理中菲的残留浓度都随着时间的推移而减少。其中 EC 处理减少得要比其他处理快,其减少率在开始培养后 0~8 d 最大,然后逐渐降低,处理中的菲残留浓度在培养的第 4 d 就显

著低于其他处理。加入白腐真菌的处理 (F、FE 和 FEC) 在开始培养后的 0~4 d 里菲的减少率也很大,菲残留浓度显著小于 CK 和 E 处理,从 4~8 d 开始,EC、F、FE 及 FEC 4 处理间差异在其后培养时间里不显著。

与 EC 及加入白腐真菌的处理 (F、FE 和 FEC) 相比, E 处理中的菲浓度减少率要慢很多,而且在整个培养阶段该处理中的菲浓度都显著高于除对照外其他处理。从各处理不同的降解率来看, EC 处理的降解率最高,比 CK 提高了 82.2%,表明蚓粪自身具有降解土壤中菲的能力,而且它的这种能力在本试验条件下要优于白腐真菌。蚯蚓自身也有促进土壤中菲降解的能力,比 CK 提高了 34.5%,但其能力不如蚓粪和白腐真菌。而蚯蚓的引入可以促进白腐真菌对菲的降解, FE 处理的降解率比 CK 高 78.7%,而且显著高于 F 处理。

2.2 土壤中白腐真菌酶活性的动态变化

如图 2 所示, F 和 FE 处理的 LiP 酶和 MnP 酶活性在培养时间里一直呈下降趋势, F 处理的下降速度要比 FE 处理大,其中 LiP 酶以 4~8 d 及 12~16 d 的减少率最大, MnP 酶则在 4~8 d 的减少率最大。FE 处理的 LiP 酶和 MnP 酶活性在培养初期要显著小于 F 处理,但由于 FE 处理的酶活性下降速度要比 F 处理小,因此在培养后期反而显著大于 F 处理。与酶活性变化趋势相对应, F 和 FE 处理在培养初期的菲浓度的减少率最高,然后逐渐减少,在培养后期, FE 处理中的菲浓度要显著小于 F 处理。这就表明了蚯蚓可以通过影响过氧化物酶活性来提高白腐真菌对菲的降解作用。

与 F、FE 处理不同, FEC 处理在起始阶段的 LiP 酶和 MnP 酶虽都显著小于 F 处理,但在其后的培养

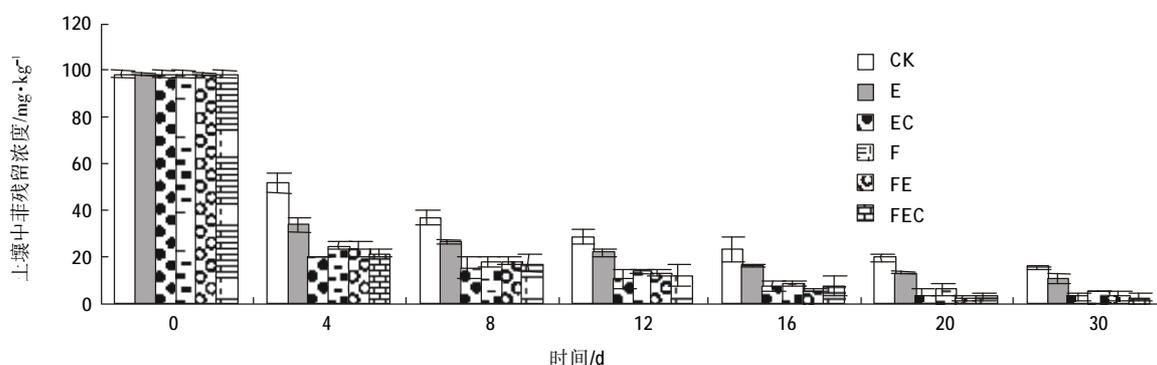


图 1 土壤中菲残留浓度的动态变化

Figure 1 Dynamics of phenanthrene residues in soil during 30 days

时间里, FEC 处理的 Lip 酶活性在 4-8 d 里, 先下降然后上升, 在第 30 d 时达到最高点, 显著高于 F 及 FE 处理; 另一方面, FEC 处理的 MnP 酶活性先增高后在 16 d 时降到最低点, 在培养后期又开始增加, 到 30 d 时, MnP 酶活性达到最高点, 同样显著高于 F 及 FE 处理。这种变化趋势表明蚓粪也可以显著影响过氧化物酶的活性。但是, FEC 处理的菲浓度与 F 处理间在培养后期才出现显著差异, 这可能是因为蚓粪对白腐真菌分泌的两种主要用于降解菲的酶(Lip 酶和 MnP 酶)的影响效果和时间不同, 从而使得前者的菲浓度虽然一直在降低, 但只在培养快结束时, 在两种过氧化物酶活性均显著高于后者的条件下, 才使得处理中的菲浓度显著低于后者。

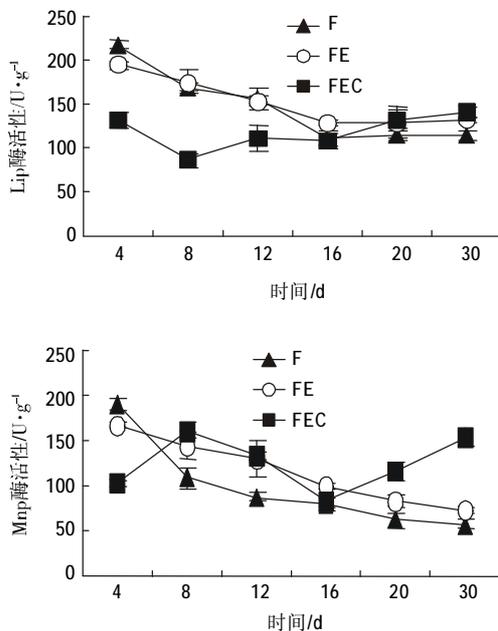


图 2 土壤中 Lip 酶和 MnP 酶的活性 30 d 的动态变化
Figure 2 Dynamics of Lip and Mnp enzyme activity in soil during 30 days

2.3 蚯蚓体内菲浓度的变化

蚯蚓体内菲浓度随时间逐渐减少, 变化趋势与土壤中菲浓度的变化大致相同。从图 3 中可以看出, 在培养初期(0-8 d)及后期(16-30 d), FE 处理蚯蚓体内的菲浓度都要显著高于 E 处理。FE 处理中蚯蚓体内的菲浓度在 4-8 d 时减少得很快, 在培养的第 8 d 开始起逐渐变缓。

为了更好地了解蚯蚓体内菲浓度下降的原因, 本文用生物浓度系数 (The bioconcentration factor, BCF) 来表示有机污染物的生物有效性: $BCF = Ce/Cs$, 式中,

Ce 为生物体内的有机污染物浓度, Cs 为土壤中的有机污染物浓度。图 4 表示了培养期间蚯蚓生物浓度系数, 从图 4 中可以看出, 在整个培养过程中, 土壤中的菲的浓度与蚯蚓体内菲的浓度呈现很好的线性关系 ($r^2 = 0.9575$), 生物浓度系数并没有发生显著的变化, 从而说明蚯蚓对土壤中菲的吸收利用作用在试验期间并没有改变, 蚯蚓体内菲的减少可能仅是因为取食土壤中菲的减少, 而非其他作用的结果。

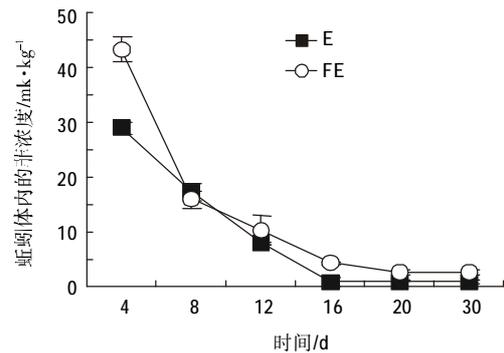


图 3 蚯蚓体内菲浓度在 30d 中的动态变化
Figure 3 Dynamics of phenanthrene residues in earthworms during 30 days

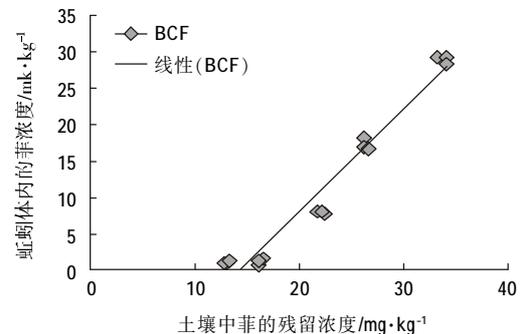


图 4 土壤中与蚯蚓体内菲浓度变化关系
Figure 4 The relationship between phenanthrene concentrations in soil and earthworms

3 结果与讨论

通过试验可以看出, 蚓粪不但可以通过影响过氧化物酶活性而影响白腐真菌对菲的降解率, 而且其自身也具有促进土壤中菲降解的作用。这可能是因为蚓粪具有很好的通气性、透水性和持水性, 为提高土壤微生物数量与活性提供了有利的环境^[8], 从而进一步影响了土壤中微生物的酶活性。另外, 蚓粪中含有丰富的有机物, 有些有机物如 DOM 是土壤微生物可直接利用的有机物质, 可以为土壤微生物的生长代谢或

共代谢提供碳源^[19]。因此蚓粪中微生物数量和活性比周围土壤中高,且微生物呼吸量也增加了^[20]。Scheu^[21]就曾发现在 *A. caliginosa* 新鲜蚓粪的 4 个星期培养中,接近 90%的微生物呼吸量增加了。因此蚓粪可以提供十分适宜的环境供微生物生长及活动,从而使土壤中的有机污染物的降解率提高。

与蚓粪作用相似,蚯蚓也可以促进白腐真菌对土壤中菲的降解,其自身虽然也有促进土壤中菲降解的作用,但效果并没有蚓粪及白腐真菌明显,这可能由蚯蚓的作用机制决定的。首先,蚯蚓在土壤中的运动、取食、挖掘等行为可以很好地改善土壤物理结构,改善土壤的通气性和透水性,这样可能使土壤环境变得更有利于有机污染物发生化学反应而转化。当然,由于菲在土壤具有较高的稳定性,这种作用效果不会很明显。其次,蚯蚓体内携带各种微生物^[3,4],将蚯蚓引入污染土壤,随同蚯蚓一起,可以向土壤中引入各种微生物,提高土壤中活性微生物量^[6]。由于微生物在降解有机污染物中起着举足轻重的作用^[22],所以向污染土壤中引入蚯蚓有助于有机污染物的降解^[2]。此外,有研究指出,蚯蚓能够通过自身的生命活动促进土壤接种菌的传播^[23-25]。在本试验中蚯蚓可能就是通过以上途径促进了白腐真菌的传播,提高了白腐真菌过氧化物酶活性。

参考文献:

- [1] Zhu L Z, Gao Y Z. Prediction of phenanthrene uptake by plants with a partition-limited model [J]. *Environmental Pollution*, 2004, 131:505-508.
- [2] 高岩, 骆永明. 蚯蚓对土壤污染的指示作用及其强化修复的潜力 [J]. *土壤学报*, 2005, 42(1):140-148.
- [3] 张宝贵. 蚯蚓与微生物的相互作用 [J]. *生态学报*, 1997, 17(5):556-560.
- [4] Fischer O A, Matlova L, Bartl J. Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria [J]. *Veterinary Microbiology*, 2003, 91(4): 325-338.
- [5] 张宝贵, 李贵桐, 申天寿. 威廉环毛蚯蚓对土壤微生物量及活性的影响 [J]. *生态学报*, 2000, 20(1):168-172.
- [6] Luepromchai E, Singer A C, Yang C H. Interactions of earthworms with indigenous and bioaugmented PCB-degrading bacteria [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 41 (3): 191-197.
- [7] Manilal, Alexander M. Factors effecting the microbial degradation of phenanthrene in soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 35:401-405.
- [8] Swindoll C M, Aelion C M, Pfaender F K. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation responses of subsurface microbial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 212-217.
- [9] Mihelcec J R, Luthy R G. Sorption and microbial degradation of naphthalene in soil-water suspensions under denitrification conditions [J]. *Environ Sci Technol*, 1991, 25: 169-177.
- [10] 崔玉珍, 牛明芬. 蚯蚓粪对土壤培肥作用及草莓产量和品质的影响 [J]. *土壤通报*, 1998, 29 (4): 156-157.
- [11] 胡佩, 刘德辉, 胡锋, 等. 蚓粪中的植物激素及其对绿豆插条不定根发生的促进作用 [J]. *生态学报*, 2002, 22(8):1211-1214.
- [12] Silvia M, Contreras-Romos, Dioselina Alvarez-Bernal, et al. *Eisenia fetida* increased removal of pah from soil [J]. *Environmental Pollution*, 2005, 1-6.
- [13] 陈静, 胡俊栋, 王学军, 等. 白腐真菌对土壤中多环芳烃(PAHs)降解的研究 [J]. *环境化学*, 2005, 24:270-274.
- [14] Gao Y Z, Zhu L Z. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils [J]. *Chemosphere*, 2004, 55:1169-1178.
- [15] Lang E, Nerud F, Zadrazil F. Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 167:239-244.
- [16] Archibald F S. A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye Azure B [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:3110-6.
- [17] 毕鑫, 路福平, 杜连祥. 白腐菌产木素过氧化物酶发酵条件的优化 [J]. *天津轻工业学院学报*, 2002, 10:41-48.
- [18] 林淑芬, 李辉信, 胡锋. 蚓粪对黑麦草吸收污染土壤重金属铜的影响 [J]. *土壤学报*, 2006, 43(6):911-918.
- [19] Arvola L, Tulonen T. Effects of allochthonous dissolved organic matters and inorganic nutrients on the growth of bacteria and algae from a highly humic lake [J]. *Environ Int*, 1998, 24: 509-520.
- [20] Edwards C A. Function interaction between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants. In: Edwards, C.A. (2nd ed.), *Earthworm Ecology* [M]. CRC Press, Boca Raton, London, 2004. 213-231.
- [21] Scheu S. Microbial activity and nutrient dynamics in earthworm casts [J]. *Biol Fertil Soils*, 1987, 5:230-234.
- [22] Singer A C, Jury W, Luepromchai E. Contribution of earthworms to PCB bioremediation [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(6): 765-776.
- [23] Daane L L, Molina J A E, Sadowsky M J. Plasmid transfer between spatially separated donor and recipient bacteria in earthworm containing soil microcosm [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (2):679-686.
- [24] Doube B M, Ryder M H, Davoren C W. Enhanced root nodulation of subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* in the presence of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae) [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1994, 18(3): 169-174.
- [25] Thorpe I S, Prosser J I, Glover L A. The role of the earthworm *Lumbricus terrestris* in the transport of bacterial inocula through soil [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 23(2):132-139.