

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2021.02.014

孙月, 潘彦硕, 曾军, 等. 木质素与蚯蚓对黑麦草生物量及土壤微生物群落的影响. 土壤, 2021, 53(2): 313–320.

木质素与蚯蚓对黑麦草生物量及土壤微生物群落的影响^①

孙月^{1,2}, 潘彦硕³, 曾军¹, 吴宇澄^{1,2*}, 林先贵^{1,2}

(1 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 采集农田土壤, 设置添加木质素和蚯蚓不同组合处理的黑麦草盆栽试验, 在测定植物生物量的基础上, 结合定量 PCR、高通量测序等方法, 研究木质素和蚯蚓及其联合作用对土壤细菌、真菌群落的影响。结果显示: 木质素显著降低了黑麦草的生物量, 而蚯蚓能够缓解木质素的抑制作用, 促进黑麦草生长。木质素明显抑制了土壤细菌、真菌数量, 并改变群落结构, 以 Sphingomonadaceae、Methylophilaceae 为标志的降解细菌和担子菌等潜在降解真菌显著富集; 单一加入蚯蚓对土壤微生物的影响相对较小, 木质素和蚯蚓组合处理显著提高细菌、真菌数量, 改变上述降解微生物的丰度。这些结果表明, 木质素降低土壤微生物数量, 并可能通过其自身降解释放的酚类化感物质抑制植物生长, 对土壤生态系统健康产生不利影响; 蚯蚓与木质素联合处理影响土壤中木质素降解微生物组成, 微生物数量与植物生物量均表现增加趋势, 蚯蚓有利于土壤中木质素的微生物代谢, 并为植物生长提供更多的养分。本研究为农田生态系统木质素资源化利用提供了科学依据。

关键词: 木质素; 蚯蚓; 黑麦草; 土壤微生物

中图分类号: X172; X173 **文献标志码:** A

Effects of Lignin and Earthworm on Ryegrass Biomass and Soil Microbial Community

SUN Yue^{1,2}, PAN Yanshuo³, ZENG Jun¹, WU Yucheng^{1,2*}, LIN Xiangui^{1,2}

(1 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 College of Natural Resources and Environment, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to investigate the effects of lignin and earthworms and their combined effects on plant biomass and soil microorganisms, farmland soils were collected, and ryegrass pot experiments with different combinations of lignin and earthworms were setup. Based on the determination of biomass, combined with methods such as quantitative PCR and high-throughput sequencing, the effects of lignin and earthworms on soil bacterial and fungal communities were studied. The results showed that lignin significantly reduced ryegrass biomass, while earthworms could alleviate the inhibitory effect of lignin and promote ryegrass biomass. Lignin significantly inhibited the numbers of soil bacteria and fungi, and changed the community structures, and potential degrading bacteria such as Sphingomonadaceae and Methylophilaceae were significantly enriched. The effect of adding earthworms on soil microorganisms was relatively small, and the combined treatment of lignin and earthworms significantly increased the copy numbers of bacteria and fungi and changed the abundance of the aforementioned degrading microorganisms. These results indicated that lignin reduced the copy number of soil microorganisms, and may inhibit plant growth through phenolic allelopathic substances released by its own degradation, which adversely affected the health of soil ecosystems. The combined treatment of earthworm and lignin affected the composition of lignin-degrading microorganisms in the soil, and both microorganism population and plant biomass tended to increase, suggesting that earthworm is beneficial to the microbial metabolism of lignin and lignin-derived phenolic compounds in the soil. This study provides a scientific basis for the utilization of lignin resources in farmland ecosystems.

Key words: Lignin; Earthworm; Ryegrass; Soil microorganisms

①基金项目: 国家自然科学基金项目(41977132, 41671266)资助。

* 通讯作者(ycwu@issas.ac.cn)

作者简介: 孙月(1994—), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向为有机污染土壤的生物修复。Email: ysun@issas.ac.cn

木质素是构成植物木质部的复杂高分子化合物,是仅次于纤维素的第二大丰富的植物源材料。作为一种复杂的交叉连接的多酚聚合物,木质素主要由 3 种类型的对羟基苯基丙基醇(单体醇)组成,即松柏醇(愈创木基型)、芥子醇(紫丁香基型)和香豆素醇(对羟基苯基型)。木质素应用广泛,可作环氧树脂、橡胶及热塑性塑料等的添加剂、高分子原料、动物饲料添加剂以及土壤的改良剂和修复剂。研究发现,木质素能够提高土壤有效磷含量,促进无机磷向有机磷的转化,提高磷肥利用率^[1]。木质素还可以作为共代谢底物刺激土壤微生物促进多环芳烃的降解^[2]。在土壤中,木质素的降解依赖于微生物作用。一般认为,真菌首先解聚木质素,所产生的酚酸类单体化合物经由细菌进行矿化^[3]。酚酸类物质属于自毒物质,可能产生植物化感作用,抑制植物生长^[4]。

蚯蚓是常见的土壤动物,被誉为土壤生态系统的“工程师”,在有机质分解和养分循环、土壤理化性质的改良、土壤微生态平衡等方面均有促进作用。许多研究表明蚯蚓能缓解植物生长障碍。例如,蚯蚓能促进酚类物质的降解,抑制化感作用,改善草莓的连作障碍,这种调控主要通过微生物实现^[5];蚯蚓分泌的黏液能促进土壤污染物的去除,同时促进黑麦草生长^[6];蚯蚓还可以与菌根真菌互作,改善植物营养和生长,并协同修复土壤重金属^[7]。

黑麦草(*Lolium perenne* L.),属禾本科黑麦属,是一种优质的饲草,也常用于污染农田土壤的修复。前期研究表明,木质素对黑麦草的生长有抑制作用^[2],不利于其实际应用。为解决这一问题,有必要利用包括投加蚯蚓在内的各种手段,缓解黑麦草生长障碍,而木质素和蚯蚓对土壤生态系统的作用,也将在土壤微生物群落响应中得到反映。为此,本研究设立了盆栽试验,以黑麦草为模式植物,研究木质素、蚯蚓及其联合作用对植物生物量的影响,并通过 qPCR 和高通量测序深入解析木质素、蚯蚓及其联合作用对土壤微生物丰度、群落组成的影响,以揭示蚯蚓缓解木质素对植物生长胁迫的作用及其对相关土壤微生物群落的效应。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤:采自江苏省南京市某钢铁厂附近的农田表层土壤。土样放置室内自然风干,过 2 mm 筛。土壤的基本理化性质为: pH 6.84,有机质 12.7 g/kg,全氮 1.3 g/kg,全磷 0.57 g/kg,全钾 19.3 g/kg。

供试植物:黑麦草(*Lolium perenne* L.),种子购于江苏省南京市玄武区东郊种业公司。

供试蚯蚓:威廉环毛蚓(*Pheretima guillelmi*),购于江苏省句容市某蚯蚓养殖场。

化学试剂:木质素购于 Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.2 试验设计

盆栽试验于中国科学院南京土壤研究所玻璃温室内进行,设置 4 个处理,见表 1,每个处理 4 个重复。试验采用底部有孔的塑料盆,便于水分沥出,盆下放置托盘,收集沥出的水分。加入土壤之前,将孔径 1 mm 的尼龙网铺在盆底,以防蚯蚓游出。每盆包 2 kg 土壤,木质素加入量为 8 g/kg,充分混匀后加入盆中,加水调节土壤含水量至田间持水量的 60%。加入威廉环毛蚓 6 条/盆,未钻入土壤的用其他蚯蚓取代,保证每条蚯蚓健壮。黑麦草种子用温水浸种 24 h,经催芽后分别穴播于上述盆钵中,每盆 20 粒。出苗 1 周后间苗,每盆留苗 10 株。温室培育 3 个月收集植物样品和土壤样品。每盆用不锈钢土钻随机取 5 个点土样混合,并将土样置于 -20℃ 保存以供微生物分析。

表 1 试验处理
Table 1 Experimental Treatment

处理	木质素(L)	蚯蚓(E)	黑麦草(R)
RLE	+	+	+
RE	-	+	+
RL	+	-	+
R	-	-	+

注: +为有, -为无

1.3 测定项目及方法

1.3.1 植物生物量测定 植物生物量采用常压恒温干燥法测定^[8]。

1.3.2 土壤 DNA 的提取 采用 FastDNA Spin Kit for soil 试剂盒(MP Biomedicals, Solon, USA)提取土壤 DNA,每个样品约 0.5 g,微量分光光度计(NanoDrop 2000)和琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 的浓度和质量。DNA 经 10 倍稀释后用于下游分析,以防共提取杂质的干扰。

1.3.3 定量 PCR 采用定量 PCR 方法测定土壤中细菌 16S rRNA 基因和真菌 18S rRNA 基因的数量。引物分别是 515F/907R^[9-10]、nu-SSU-0817-5'/nu-SSU-1196-3'^[11]。定量 PCR 采用 SYBR Green 方法,每个样品重复 3 次。克隆目标基因提取质粒后,测定其浓度并计算拷贝数作为标准品,进行梯度稀释、测定后

绘制标准曲线(拷贝数范围 $10^2 \sim 10^8$ copies/ μ l), 细菌 16S rRNA 基因标准曲线的 $R^2=0.997$, 扩增效率 117%, 真菌 18S rRNA 基因标准曲线的 $R^2=0.995$, 扩增效率 99%。

1.3.4 高通量测序及数据分析 采用通用引物 515F/907R 扩增细菌 16S rRNA 基因片段, ITS1f/ITS2^[12] 扩增真菌 ITS 基因, 其中正向引物序列中包含 5 bp 的条形码(barcode)序列。将 PCR 扩增后的产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化后建立文库, 采用 Illumina MiSeq 系统进行双向高通量测序(上海美吉)。基于 QIIME2 分析平台进行高通量数据分析。序列经拼接、比对后在 97% 相似性水平划分操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 通过与 Silva 数据库(<https://www.arb-silva.de/>)比较确定细菌序列的系统学分类, 通过与 Unite 数据库(<http://unite.ut.ee/>)比对确定真菌序列的系统学分类。

1.4 数据处理

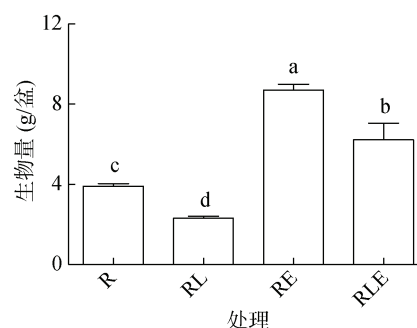
本试验数据采用 SPSS19.0 进行单因素方差分析(ANOVA), 用 R Studio 的 vegan 包计算布雷距离(bray distance)进行非度量多维尺度分析(nonmetric multidimensional scaling, NMDS), 采用 pheatmap 包(<https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>)进行热图分析, 用 Graphpad Prism 5 分析作图, 图中数据均为平均值。

2 结果与分析

2.1 黑麦草生物量

经过 3 个月的温室培养, 各处理黑麦草的生物量如图 1 所示。R 处理黑麦草的生物量平均为 3.91 g/盆; 添加木质素(RL 处理)对黑麦草生长的抑制作用明显, 植物生物量平均为 2.32 g/盆, 抑制率为 41%; 添加蚯蚓(RE 处理)显著促进黑麦草的生物量, 平均

达 8.70 g/盆; RLE 处理中, 蚯蚓部分解除了木质素的抑制作用, 植物生物量平均达到 6.22 g/盆, 显著高于 R 处理。



(图中不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$); 下同)

图 1 黑麦草生物量

Fig. 1 Dry biomass of *Lolium perenne* L.

2.2 基因丰度

定量 PCR 测定结果(图 2)显示, 4 个处理细菌 16S rRNA 基因拷贝数在 $1.21 \times 10^9 \sim 2.93 \times 10^9$ copies/g。其中 R 处理细菌 16S rRNA 基因丰度为 2.11×10^9 copies/g, RL 处理明显降低了细菌的基因拷贝数, RE 与 R 处理的基因拷贝数基本相同, 表明单一蚯蚓处理对土壤细菌丰度没有产生显著效应; RLE 处理与 RL 处理相比, 土壤细菌基因拷贝数显著增加, 达到 2.93×10^9 copies/g, 是 RL 处理的 2 倍。

从图 2 还可知, 4 个处理真菌 18S rRNA 基因拷贝数在 $1.64 \times 10^6 \sim 1.11 \times 10^7$ copies/g, 趋势和细菌基本保持一致。木质素明显降低了真菌的基因拷贝数, 而蚯蚓增加了真菌的基因拷贝数, 从 R 处理的 6.36×10^6 copies/g 增加至 RE 处理的 9.04×10^6 copies/g。木质素、蚯蚓共存下真菌 18S rRNA 基因丰度的增幅更加明显, RLE 处理的基因拷贝数是 RL 处理的 6 倍之多。

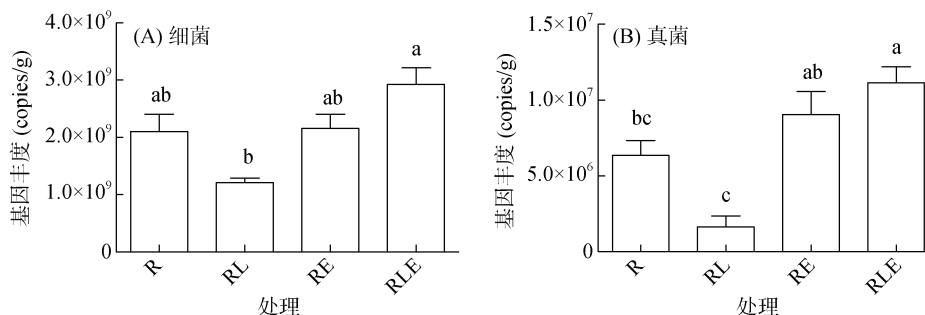


图 2 细菌(A)、真菌(B)的基因丰度

Fig. 2 Gene abundances of bacteria (A) and fungi (B)

2.3 细菌群落

在细菌 16S rRNA 基因的高通量测序中, RL 处理 4 个重复中有 1 个未能成功扩增, 其余 15 个样品

共获得 43 万条序列, 单个样品的序列数在 9 309 ~ 43 850, 在 97% 序列相似性水平获得 9 277 个 OTU。每个样品随机抽样 9 000 条序列做 OTU 表, 在此基

基础上对土壤细菌群落组成进行分析。结果显示, 经过 3 个月的温室培养, 各处理的土壤细菌群落结构出现了显著变化(图 3A)。R 与 RE 处理聚集在一起, RL

与 RLE 处理聚集在一起, 表明木质素对细菌群落结构产生了较大的影响, 而蚯蚓对细菌群落结构的影响相对较小。

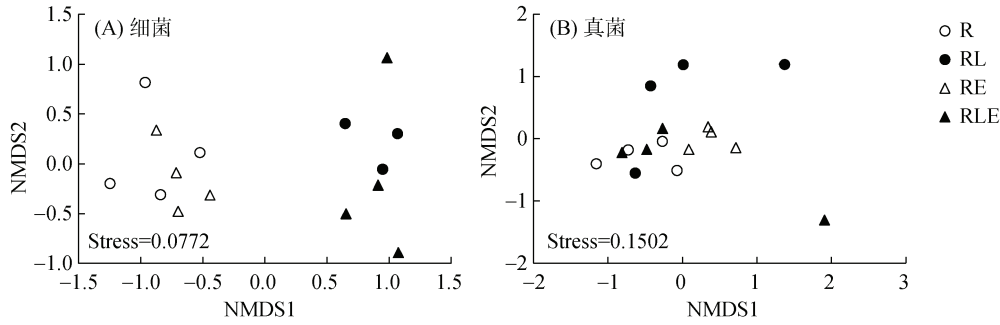


图 3 细菌(A)、真菌(B)群落的 NMDS 分析
Fig. 3 NMDS analyses of bacteria (A) and fungi (B) communities

对相对丰度大于 2% 的细菌门进行分析(图 4A), 结果显示, 在 R 处理中, 土壤中的优势细菌为 γ -变形菌门 (Gamma Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、 α -变形菌门 (Alpha Proteobacteria), 分别占比 32.00%、17.09%、16.31%、9.45%; 与 R 处理相比, 添加木质素明显改变了细菌门水平的组成, 促进了 α -变形菌门、 δ -变形菌门 (Delta Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、厚壁菌门 (Firmicutes) 的相对丰度, 降低了 γ -变形菌门 Gamma Proteobacteria、酸杆菌门、拟杆菌门的相对丰度; 而添加蚯蚓主要促进了 α -变形菌门、酸杆菌门和蓝藻 (Cyanobacteria) 的相对丰度, 降低了拟杆菌门的相对丰度; RLE 处理与 RL 处理相比, γ -变形菌门、酸杆菌门的相对丰度有

一定的升高, 厚壁菌门有一定的降低。

为探究各处理的作用特征, 在科水平对相对丰度大于 1%, 且处理间具有显著性差异的细菌做热图分析(图 5)。根据细菌对木质素的响应, R 与 RE、RL 与 RLE 处理分别聚为一类, 比较可见, 蚯蚓对细菌的影响不大, 主要显著富集了酸杆菌的 *Blastocaulaceae*、*Pyrinomonadaceae* 和变形菌的 *Caulobacteraceae*、*Rhizobiaceae*、*Burkholderiaceae* 等。木质素导致多个科, 如拟杆菌中的 *Lentimicrobiaceae*、*Prolixibacteraceae*、*Bacteroidetes vadinHA17*, 酸杆菌中的 *Koribacteraceae*, 变形菌中的 *Sphingomonadaceae*、*Methylophilaceae*、*Archangiaceae*、*Geobacteraceae*, 厚壁菌中的 *Christensenellaceae* 等丰度显著增加。

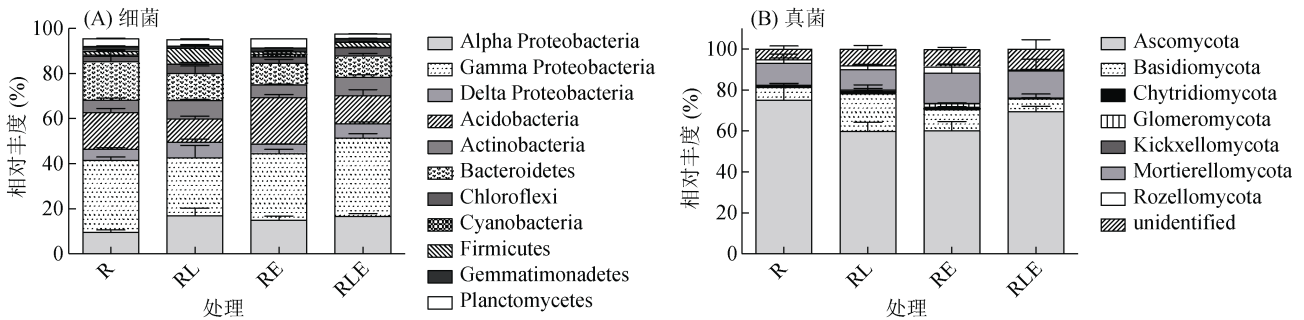


图 4 细菌(A)、真菌(B)门水平的相对丰度
Fig. 4 Relative abundances of bacterial (A) and fungal (B) at phylum level

进一步分析各处理中相对富集程度较高的类群, 结果如图 6 所示。Ignavibacteriales/Other、*Lentimicrobiaceae*、*Methylophilaceae*、*Prolixibacteraceae*、*Christensenellaceae*、*Bacteroidetes vadinHA17*、*Koribacteraceae*、*Sphingomonadaceae*、*Archangiaceae* 和 *Anaerolineaceae* 在 R、RE 处理中的相对丰度极低,

在 RL 处理中均有较高的相对丰度, 而在 RLE 处理中的相对丰度虽低于其在 RL 处理中的相对丰度, 但大多高于仅加入蚯蚓的 RE 处理, 仍然显示出木质素的作用。

2.4 真菌群落

在真菌 18S rRNA 基因的高通量测序中, 16 个样

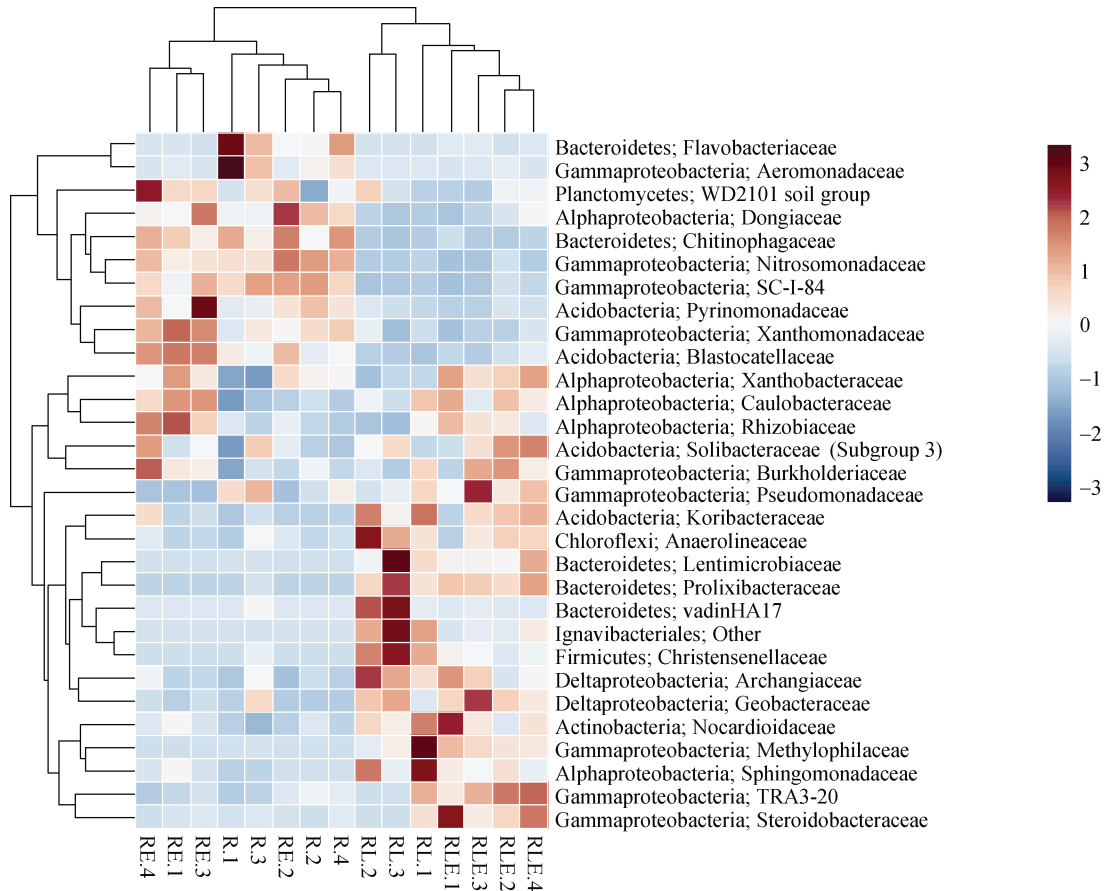


图 5 科水平各处理的相对丰度热图

Fig. 5 Heatmap of relative abundance at genus level under different treatments

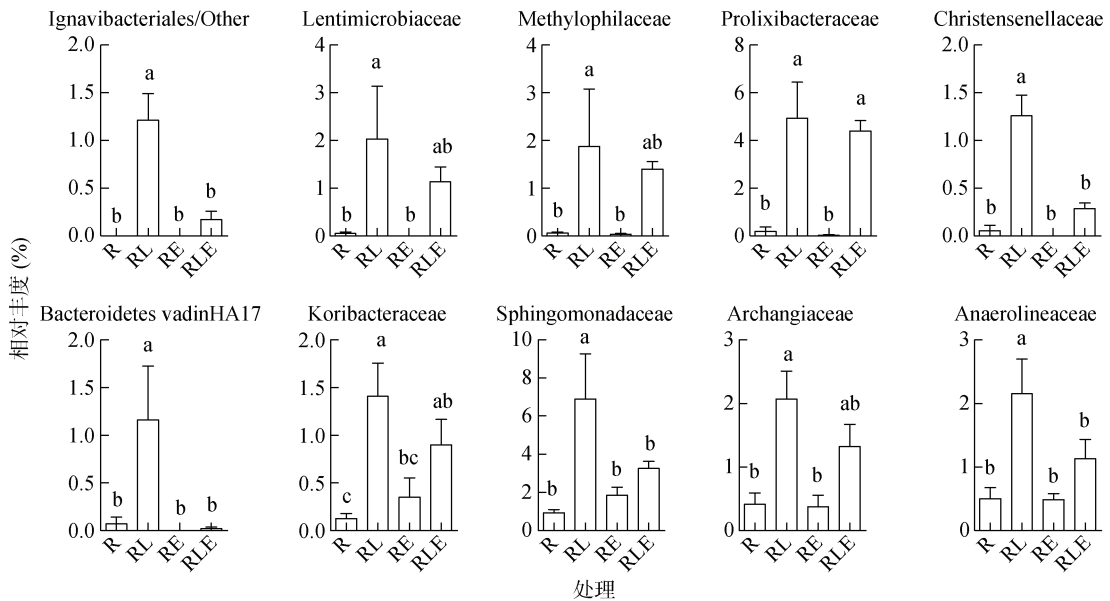


图 6 潜在的木质素降解菌在各处理中的相对丰度

Fig. 6 Relative abundance of potential lignin-degrading bacteria under different treatments

品一共获得 181 万条 ITS 基因序列, 单个样品的序列数为 35 534 ~ 73 266, 在 97% 序列相似性水平获得 1 780 个 OTU。每个样品随机抽样 35 534 条做 OTU

表, 在此基础上分析土壤真菌的群落组成。结果显示, 经过 3 个月的培养之后, 真菌的群落结构发生了一定的变化(图 3B), R 处理与 RE 处理有一定的分离, 表

明蚯蚓对真菌群落产生了一定的影响; RL 处理与 R 处理相距较远, 除了一个异常点, 提示木质素对真菌群落也同样产生了较大的影响; 而 RLE 处理却与 R 处理聚集在一起, 与 R 处理的群落结构类似。

将相对丰度大于 1% 的真菌做堆积图(图 4B), 可见, 在 R 处理中主要的门是子囊菌门(Ascomycota)、Mortierellomycota、担子菌门(Basidiomycota), 分别占比 75.01%、10.78%、6.25%。木质素促进了担子菌的相对丰度, 降低了子囊菌的相对丰度; 蚯蚓同样提高了担子菌的相对丰度, 降低了子囊菌的相对丰度。但这一趋势在 RLE 处理中得到逆转, 相比单一木质素 RL 处理, 蚯蚓加木质素促进了子囊菌的相对丰度, 降低了担子菌的相对丰度。

3 讨论

木质素可以被用作土壤改良剂、肥料等, 也是具有修复潜力的污染土壤生物刺激材料^[13]。本研究中, 木质素显著降低了黑麦草的生物量, 这与 Wu 等^[2]的研究结果一致。可能原因是, 木质素结构复杂, 在其降解过程中会产生酚酸类的小分子化合物^[3], 而这些酚酸类物质与生物碱、萜类共同被称为自毒物质, 对植物的生长有抑制作用。Blum^[4]发现从植物组织或分泌物中分离出来的多种酚酸类物质会抑制植物生长, 刘晓珍等^[14]发现引起菊花连作障碍的主要原因包括酚酸类物质的积累和微生物区系的改变。酚酸类物质通过影响植物的膜系统、光合作用、土壤理化性质、酶活性和土壤微生物等, 对植物生长产生抑制作用^[15]。

在本研究中, 木质素对细菌、真菌的数量具有明显的抑制作用, 对细菌、真菌的群落结构也产生了很大的影响。这些变化可能与木质素的降解过程有关。木质素的分解释放出酚酸类结构单体和甲基, 具有不同的降解途径。从细菌群落分析可以看出, 在单一木质素 RL 处理中富集的 Prolixibacteraceae、Bacteroidetes vadinHA17、Christensenellaceae、Sphingomonadaceae、Archangiaceae 等门类, 在植物生物降解中常被刺激。例如, Ji 等^[16]研究发现, 秸秆降解过程中后期土壤中 Prolixibacteraceae 的 WCHB1-32 和 Bacteroidetes vadinHA17 类群增加, 表明它们可能参与秸秆难降解组分如木质素的分解; Christensenellaceae 属于梭菌目, 包括多种潜在的纤维素降解类群^[16]; Sphingomonadaceae 中的 Sphingobium 常用作木质素酚酸类单体的模式降解菌, Sphingobium SYK-6 的降解途径已经得到深入研究^[3]; Arch-

giaceae 的 *Anaeromyxobacter* 主要是参与卤代芳香化合物的厌氧降解^[17]。木质素代谢过程中释放出大量甲基, 可以进入 C1 代谢, 这解释了木质素对 Methylophilaceae 的促进作用, 提示甲基营养代谢方式的存在^[18]。另外, 木质素明显地促进了真菌担子菌的相对丰度, 主要是 Tremellomycetes 和 Agaricomycetes, 两者均具有降解木质素、纤维素和酚类物质的潜力^[19], Agaricomycetes 中含有白腐真菌, 而白腐真菌能够分泌胞外氧化酶降解木质素^[20]。总的来说, 本研究中的木质素处理导致许多潜在降解菌属的富集, 是木质素分解的有力证据, 而分解中释放大量的酚酸, 可能是导致木质素胁迫黑麦草生长的主要原因。

蚯蚓是土壤生态系统的重要组成部分, 蚯蚓的活动(取食、消化、排泄、分泌和掘穴)可以影响微生物的数量、活性和群落结构, 从而影响植物生长^[21]。本研究发现, 蚯蚓能够显著促进黑麦草的生长, 几乎达到未加蚯蚓处理的 2 倍。蚯蚓对细菌的数量和群落结构影响不大, 显著富集 Blastocatellaceae 和 Rhizobiaceae 等。Blastocatellaceae 与多聚物类碳源代谢显著正相关^[22]; Rhizobiaceae 的 *Rhizobium* 属于禾草内生固氮菌, 具有固氮酶活性、溶磷、分泌植物生长激素等多种性能^[23]。蚯蚓对真菌的数量有所提高, 可能刺激根际土壤生物活性^[24], 促进菌丝向植物传递养分作用, 从而促进植物生长^[25]。

蚯蚓能够缓解木质素对植物的抑制作用, 显著促进植物的生物量。究其原因, 一方面, 可能是由于蚯蚓的作穴、搅动活动增加土壤的孔隙度^[26], 加速包括木质素在内的土壤养分物质的循环^[27], 促进植物吸收, 并体现在土壤微生物数量方面; 另一方面, 蚯蚓可能影响木质素及其酚酸类产物的降解过程, 缓解其对植物产生的化感作用, 调节微生物群落, 从而提高植物的生物量。毕艳孟和孙振钧^[21]发现蚯蚓能够显著降低土壤中酚类化合物的残留, 并且其降解过程主要是通过微生物作用。从本文结果可以看到, RLE 处理中细菌和真菌 rRNA 基因拷贝数在 4 个处理中最高, 是 RL 处理的 2 倍以上, 表明在木质素和蚯蚓组合处理下, 微生物活动也增强, 这离不开木质素和蚯蚓的共同作用。添加了木质素的土壤经蚯蚓消化道后性质得到改善, 有利于细菌对养分的利用, 在这过程中蚯蚓分泌的代谢产物如黏液、尿素等, 对土壤有机质产生刺激效应, 从而刺激细菌的迅速生长^[28]。郝月崎等^[29]研究发现蚯蚓的加入对细菌和真菌数量的恢复都有一定的促进作用, 添加了蚯蚓的处理组土壤 pH 更接近中性, 可溶性有机碳含量更高, 为土壤微

生物提供了适宜的生长环境。对于木质素的潜在降解菌 *Prolixibacteraceae*、*Sphingomonadaceae*、*Methylophilaceae* 等, 在木质素蚯蚓组合处理中, 虽然其相对丰度比单一木质素处理略有降低, 但鉴于微生物总体数量的增加, 它们的绝对丰度或活性很可能得到提高。这些结果表明蚯蚓可能在培养过程中影响了木质素的降解过程, 缓解了其分解过程中产生的酚酸类物质对植物的化感作用, 从而促进了黑麦草的生长。张尊昊^[30]在蚯蚓堆制处理花生壳的研究中发现, 接种蚯蚓处理的羧甲基纤维素酶、微晶纤维素酶等酶活力高于未接种蚯蚓对照处理, 纤维素、半纤维素、木质素的降解率也明显高于未接种蚯蚓对照处理。对于真菌而言, 蚯蚓改善了木质素对真菌群落结构的影响, 尽管 RLE 处理的担子菌相对丰度相对 RL 处理有所降低, 但 RLE 处理的真菌数量几乎是 RL 处理的 6 倍以上, 木质素降解菌的绝对丰度很可能得到提高, 菌丝对养分的传递作用也可能得到增强。总体而言, 蚯蚓可能在改善土壤微结构的同时, 调节土壤微生物群落, 影响了木质素及其酚酸类产物的降解, 促进了养分供应, 从而促进了黑麦草的生长。

4 结论

木质素显著降低黑麦草的生物量, 蚯蚓可以缓解木质素对黑麦草的胁迫作用。木质素影响土壤微生物群落, 潜在木质素降解菌的富集表明木质素发生降解, 而降解过程中释放出的酚酸类化感物质, 可能是导致黑麦草生长受阻的主要原因。蚯蚓和木质素的联合作用, 改善了土壤微生物群落结构, 显著增加了细菌和真菌的数量, 并改变了木质素降解菌的丰度, 可见蚯蚓通过调节土壤中木质素及其酚酸类产物的转化, 缓解其对植物的化感作用, 从而改善植物的生长状况。本研究可为农业生产中木质素类物质的资源化利用提供科学依据。

参考文献:

[1] 陈倩, 穆环珍, 黄衍初, 等. 木质素对土壤磷素形态转化及对磷有效性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(6): 745-748.

[2] Wu Y C, Ding Q M, Zhu Q H, et al. Contributions of ryegrass, lignin and rhamnolipid to polycyclic aromatic hydrocarbon dissipation in an arable soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 118: 27-34.

[3] Kamimura N, Takahashi K, Mori K, et al. Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: New findings in a recent decade: Update on bacterial lignin catabolism[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2017, 9(6): 679-705.

[4] Blum U. Effects of microbial utilization of phenolic acids and their phenolic acid breakdown products on allelopathic interactions[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1998, 24(4): 685-708.

[5] 毕艳孟. 蚯蚓缓解草莓连作障碍的效应及机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.

[6] 史志明, 马丽丽, 胡飞龙, 等. 蚯蚓黏液对黑麦草幼苗生长及其对菲吸收的影响[J]. *土壤*, 2013, 45(6): 1091-1096.

[7] 李欢, 李晓林, 张俊伶, 等. 蚯蚓与丛枝菌根真菌的相互作用及其对植物的影响[J]. *土壤学报*, 2011, 48(4): 847-855.

[8] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.

[9] Whiteley A S, Bailey M J. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2400-2407.

[10] Frossard A, Gerull L, Mutz M, et al. Disconnect of microbial structure and function: Enzyme activities and bacterial communities in nascent stream corridors[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(3): 680-691.

[11] Borneman J, Hartin R J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4356-4360.

[12] Bokulich N A, Mills D A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(8): 2519-2526.

[13] 林先贵, 吴宇澄, 曾军, 等. 多环芳烃的真菌漆酶转化及污染土壤修复技术[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(7): 1720-1727.

[14] 刘晓珍, 肖逸, 戴传超. 盐城药用菊花连作障碍形成原因初步研究[J]. *土壤*, 2012, 44(6): 1035-1040.

[15] 尹淇淋, 谢越. 酚酸类物质导致植物连作障碍的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(34): 20977-20978, 20985.

[16] Ji Y, Liu P F, Conrad R. Response of fermenting bacterial and methanogenic archaeal communities in paddy soil to progressing rice straw degradation[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 124: 70-80.

[17] Chen L L, Shao J J, Chen H, et al. Cathode potential regulation in a coupled bioelectrode-anaerobic sludge system for effective dechlorination of 2, 4-dichloronitrobenzene[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 254: 180-186.

[18] Chaignaud P, Morawe M, Besaury L, et al. Methanol consumption drives the bacterial chloromethane sink in a forest soil[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(11): 2681-2693.

[19] 何伟. 川西高山森林林窗位置对两种灌木凋落叶分解的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.

[20] Liers C, Pecyna M J, Kellner H, et al. Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(13): 5839-5849.

- [21] 毕艳孟, 孙振钧. 蚯蚓调控土壤微生态缓解连作障碍的作用机制[J]. 生物多样性, 2018, 26(10): 1103–1115.
- [22] 王晶, 马丽娟, 龙泽华, 等. 秸秆炭化还田对滴灌棉田土壤微生物代谢功能及细菌群落组成的影响[J]. 环境科学, 2020, 41(1): 420–429.
- [23] 李倍金. 禾草内生固氮菌的分离及固氮促生效能研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2008.
- [24] 邵承斌, 汪春燕, 陈英, 等. 植物与蚯蚓联合修复镉和镉污染土壤的研究[J]. 三峡生态环境监测, 2016, 1(2): 31–38.
- [25] 于英钊, 王冲, 孙梦实, 等. 蚯蚓-菌根互作对滨海盐碱土的改良作用[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(5): 123–129.
- [26] Marinissen J C Y, Bok J. Earthworm-amended soil structure: its influence on Collembola population in grasland[J]. Pedobiologia, 1988, 32(3): 243–252.
- [27] Akca İ, Yilmaz N D K, Kızılkaya R. Evaluation of suppression of rhizomania disease by earthworm (*Lumbricus terrestris* L.) and its effects on soil microbial activity in different sugar beet cultivars[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2014, 60(11): 1565–1575.
- [28] 曹佳, 王冲, 皇彦, 等. 蚯蚓对土壤微生物及生物肥力的影响研究进展[J]. 应用生态学报, 2015, 26(5): 1579–1586.
- [29] 郝月崎, 孙扬, 李晓晶, 等. 赤子爱胜蚓对乙草胺污染土壤微生物群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(11): 2456–2466.
- [30] 张尊昊. 蚯蚓堆制处理花生壳的技术方法研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.