

# 麦角固醇与不同粒级团聚体土壤的相关性<sup>\*</sup>

曹良元 蒋先军 张磊<sup>†</sup> 石杰 张学军 李艳宾

(西南大学资源环境学院, 重庆 400715)

## CORRELATION BETWEEN CONTENT OF ERGOSTEROL AND SIZE FRACTION OF SOIL AGGREGATES

Cao Liangyuan Jiang Xianjun Zhang Lei<sup>†</sup> Shi Jie Zhang Xuejun Li Yanbin

(College of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China)

关键词 麦角固醇; 高效液相色谱; 土壤团聚体; 真菌生物量; 土壤有机质  
中图分类号 Q93 文献标识码 A

土壤团聚体是由单个土粒与有机物质胶结而成的复杂结构,是构成土壤结构的基本单位,在很大程度上决定土壤的质量特征<sup>[1]</sup>。其形状、大小和稳定性直接影响土壤中水和空气的含量,决定土壤孔隙的大小分布,并由此影响土壤的其他属性以及作物生长<sup>[2]</sup>。目前对各种不同土壤团聚体的研究已受到专家们的普遍重视。

土壤微生物是土壤有机组分和生态系统中最活跃的部分,被认为是最敏感的土壤质量生物学指标<sup>[3]</sup>。Bearden等<sup>[4]</sup>和 Degens等<sup>[5]</sup>发现土壤团聚体中菌丝将砂粒联结在一起,证实真菌菌丝可有效提高土壤结构和土壤团聚体的稳定性;同时,在土壤团聚体形成过程中,许多菌丝体还通过分泌胶结物质(多糖类物质)使微团聚体粘结在一起<sup>[6]</sup>。对真菌生物量及其群落结构的定量分析,比较不同利用方式下土壤真菌的生长量、组成、活性的差异和变化特点,能全面地了解微生物在土壤质量变化中的作用。故有效、快速、准确地测定真菌生物量具有重要意义。

研究表明,麦角固醇是真菌细胞膜的重要组成部分,而在许多高等生物中含量极少甚至没有。麦角固醇的结构稳定,其浓度在整个细胞生长过程中保持恒定,不受培养条件的影响,并且与真菌生物

量有明确的比例关系,可作为真菌生长的指示物质<sup>[7, 8]</sup>。国外一些研究表明,通过测定麦角固醇来估计土壤中真菌的生物量是有效的。通过仪器分离,能为低菌体含量的测定提供一个灵敏方法,且麦角固醇的测定便捷,是目前表征真菌生物量最为可行可靠的方法<sup>[9, 10]</sup>。目前国内利用麦角固醇对土壤中真菌生物量的测定还未见报道,只见用于酵母菌<sup>[11]</sup>、土曲霉<sup>[12]</sup>等极少数某种真菌纯菌丝体生物量的测定的报道。平板计数法是一个比较传统的方法,尽管操作非常繁杂费时,但仍然被广泛应用于土壤中细菌和真菌生物量的测定<sup>[13]</sup>。本研究将通过麦角固醇的含量来测定三种不同处理土壤中不同粒级团聚体中真菌生物量,并与平板计数法所得到的真菌数进行比较,从而对利用麦角固醇估计真菌生物量的可行性进行全面地评价,以此来探讨真菌与不同团聚体的作用关系,进而说明真菌与土壤团聚体相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验地点设在重庆市北碚区西南大学试验农场,1990年开始建立的紫色水稻土不同耕作制的长

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金项目(40501033)、中国博士后基金项目(20060390683)资助

<sup>†</sup> 通讯作者, Tel: 023 - 68250437; E-mail: echozhanglei@yahoo.com.cn

作者简介:曹良元(1983~),男,安徽安庆人,硕士研究生,主要从事于农业微生物研究。E-mail: caoliangyuan@126.com

收稿日期:2007-04-25;收到修改稿日期:2007-09-26

期定位试验点。供试土样来自三个小区:(1)冬水稻田(中稻-冬水田),按传统方法耕种,冬季休闲;(2)垄作免耕(中稻-油菜);(3)水旱轮作(中稻-油菜),按传统方法耕种,冬季种油菜。每个处理小区4次重复,随机区组排列<sup>[14]</sup>。分析样品于2006年11月6日采集,每个小区按“S”形选取4或5个点<sup>[15]</sup>,采集(0~10 cm)表层土壤,尽量避免挤压,以保持原状土壤结构,其中垄作免耕只取垄埂土壤,采回样品保存于4℃的冰箱中。

## 1.2 土样处理

将采回的湿土及时进行处理,在室内沿自然结构将土块小心掰成约1 cm的小土块,除去植物残体、小石块以及蚯蚓等动物。接着以湿筛法<sup>[16]</sup>和离心法<sup>[17]</sup>对土样进行处理:将分成小块的土样置于2.0 mm分样筛中,去离子水浸泡5 min。然后小心地上下移动浸在水中的筛子,移动幅度3 cm,移动速度约每分钟25次,保持2 min,通过2.0 mm筛的水土的混合物再以同样操作依次通过0.25、0.053 mm的分样筛,将保留在筛中的土收集起来,即为相应粒径土样。孔径<0.053 mm的土样采用离心法(3 000 r min<sup>-1</sup>,离心5 min)获得。最后得到粒径>2.0 mm、2.0~0.25 mm、0.25~0.053 mm、<0.053 mm的土壤微粒和未经湿筛处理的土样5种,各土样充分混匀,装袋于4℃冰箱中保存。

## 1.3 土壤含水量的测定

105℃烘干至恒重称重,计算含水量及水分系数<sup>[18]</sup>。

## 1.4 有机质的测定

重铬酸钾外加热法(K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>法)进行测定<sup>[15]</sup>。

## 1.5 真菌数的测定

取10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>三个梯度的土壤稀释液,以酵母膏培养基进行平板计数<sup>[18]</sup>。

## 1.6 麦角固醇的测定

仪器:高效液相色谱仪 SSI单元等度系统, Model 500紫外/可见可变波长检测器,7725进样阀。

试剂:甲醇(色谱级),三蒸水(自制),乙醇和正己烷为分析纯,麦角固醇对照品。

色谱条件:色谱柱 C18柱(5 μm),流动相甲醇-水(97:3),流速1 ml min<sup>-1</sup>,检测波长282 nm,用外标法按峰面积进行定量<sup>[19]</sup>。

### 1.6.1 土壤中真菌麦角固醇的测定

分别称取10 g经处理的新鲜土样进行超声波萃取,接着依次加入20 ml甲醇、5 ml乙醇和2 g氢氧化钾,70℃水浴处理30 min后过滤于烧杯中,加入30 ml正己烷,取上层液体于40℃下蒸馏至干燥,而后加入2 ml甲醇,过0.45 μm滤膜,最后高效液相色谱仪测定<sup>[20,21]</sup>。每个土样重复3次。

1.6.2 标准曲线的绘制 精确称取100 mg麦角固醇,用甲醇定容于100 ml容量瓶中,作标准储备液。用标准储备液分别配制标准液0.01 mg ml<sup>-1</sup>、0.005 mg ml<sup>-1</sup>、0.002 mg ml<sup>-1</sup>、0.001 mg ml<sup>-1</sup>、0.0008 mg ml<sup>-1</sup>、0.0005 mg ml<sup>-1</sup>、0.0001 mg ml<sup>-1</sup>。各浓度标准液进样3次,与上述样品一起于高效液相色谱仪下测定。以峰面积的均值为纵坐标y,样品溶液x为横坐标作标准曲线,得出麦角固醇在0.0001~0.01 mg ml<sup>-1</sup>范围内的线性回归方程:y=1.0×10<sup>7</sup>x+1 289,(R<sup>2</sup>=0.9948)。

1.6.3 真菌生物量的计算 真菌生物量通过麦角固醇计算。它们之间的关系为:真菌生物量/麦角固醇的含量=250 l<sup>[10]</sup>。计算公式如下:

$$\text{真菌生物量}(\mu\text{g g}^{-1}) = C \times V \times 250 \times \text{水分系数} \times 1000$$

式中,C为根据样品吸收值,从标准曲线方程计算麦角固醇浓度,C(mg ml<sup>-1</sup>)=(峰面积-1 289)/10 000 000。V为萃取液的体积(ml)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同土壤团聚体中真菌生物量

表1数据表明,4种不同粒径的土壤团聚体中真菌生物量呈两极分化现象,<0.053 mm粒径的团聚体中真菌生物量最大,其他粒径的团聚体中土壤真菌生物量随土壤团聚体粒径的减小而减小。方差分析表明,<0.053 mm粒径的团聚体中真菌生物量均显著(p<0.05)高于其他三种粒径的团聚体。粒径>2.0 mm、2.0~0.25 mm、0.25~0.053 mm团聚体的土样中真菌生物量除了冬水稻田土样有显著差异,其他两种的差异都不明显。

真菌菌丝参与团聚体的形成过程。大团聚体由于结构疏松、通气良好,有利于微生物的生长,故团聚体中真菌生物量是与团聚体粒径成正比的<sup>(1)</sup>。同时Denef又指出,大团聚体是由小团粒通过真菌菌丝、有机物质等逐级联结而成,每一级复合和团聚均产生相

(1) 文倩. 半干旱荒漠化地区不同土地利用方式下土壤团聚体微生物量与群落功能特性分析. 中国农业大学博士学位论文, 2004

应孔隙,因此在土样用湿筛法制备过程中,有小部分大孔隙中微生物可能进入到小颗粒团聚体<sup>[22]</sup>。可能由此造成了 <0.053 mm 粒级的团聚体中真菌生物量最大,这也很好地解释了本次实验的结果。

表 1 还显示 3 个土样中各级粒径团聚体的真菌生物量高低存在差异:<0.053 mm 粒径的土壤团聚体中,垄作免耕的最高;0.25~0.053 mm、2.0~0.25 mm 中,水旱轮作的最高;>2.0 mm 团粒中,冬水稻田的最高。未经湿筛法处理原样的生物量(表 1)结果表明,垄作免耕中真菌生物量要高于冬水稻田和水旱轮作中的真菌生物量。造成垄作免耕稻田土壤真菌生物量较高的原因可能与垄作免耕稻田土壤微生态环境有关,高明等认为垄作免耕因表层长期出露在水面,长期以毛管水浸润,通气良好,水热状况稳定,为微生物的生长创造了良好的条件<sup>[23]</sup>;也可能是因为在垄作免耕条件下土壤团聚体的构成更有利于真菌的繁殖且较少受到机械扰动的原因<sup>[24]</sup>。

表 1 各土样中不同粒径团聚体内真菌的生物量

(×10 <sup>3</sup> μg g <sup>-1</sup> )			
团聚体粒径 (mm)	冬水稻田	垄作免耕	水旱轮作
原样	5.32b	5.47b	6.22b
> 2.0	7.02b	2.05c	4.57bc
2.0~0.25	1.74c	1.65c	3.69c
0.25~0.053	0.82c	1.43c	3.45c
< 0.053	10.09a	13.64a	12.26a

注:表中数字均为 3 次测定的平均值,数字同列右侧小写字母相同,表示之间无显著差异;标有不同小写字母表示达到 95% 的显著差异

2.2 不同土壤团聚体中真菌数量分布

真菌属真核微生物,土壤真菌主要包括丝状体的霉菌和单细胞的酵母菌。丝状真菌的主要活性表现在降解复杂分子,如木质素、纤维素等。通过对动、植物残体的降解,真菌在腐殖质的形成中起重要作用。图 1 为通过平板计数法所得的各样品真菌、霉菌、酵母菌数量及分布。

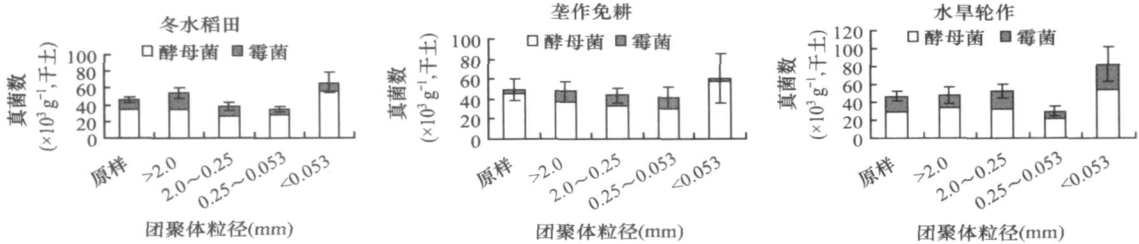


图 1 各土壤团聚体中真菌数量(误差线表示标准差)

不同粒径的团聚体中真菌个数的从大到小的顺序为:粒径 <0.053 mm、>2.0 mm、0.25~2.0 mm、0.053~0.25 mm。<0.053 mm 粒径团聚体的真菌个数明显高于其他粒径的团聚体,这种变化趋势与用麦角固醇测得的真菌生物量随团聚体粒径的变化趋势一致。其中酵母菌含量占真菌总量的大部分;冬水稻田、水旱轮作中丝状真菌的比例要高于垄作免耕的。

2.3 真菌生物量与真菌数的比较

为探讨用麦角固醇测得的真菌生物量与用平板计数法测得的真菌数之间的关系,对此进行了相关性分析(图 2)。结果表明二者之间具有较好的相关性,其中冬水稻田土样中两者之间的相关性系数达到了 0.978 5。平板计数法是测定微生物量的经典方法,目前仍被用于测定微生物量的常规方法<sup>[13]</sup>,通过相关性系数说明可以利用麦角固醇含量作为估计土壤真菌生物量指标。

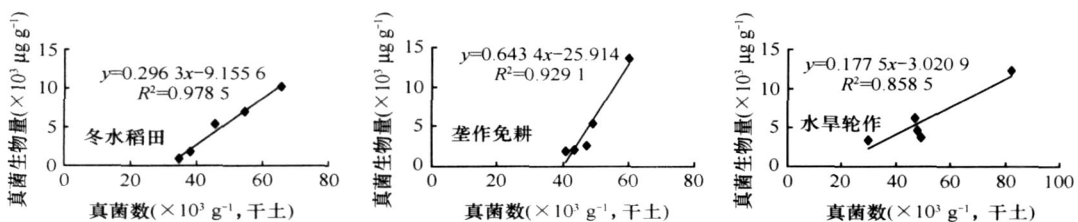


图 2 平板计数法真菌个数与麦角固醇真菌生物量的相关分析

### 2.4 土壤团聚体含量

真菌在团聚体的形成和稳定性等方面起重要作用,菌丝体在大团聚体中起缠绕物理作用,同时还通过分泌胶结物质使微团聚体粘结在一起。土样的机械组成(图3)中,>2.0 mm粒级的团聚体含量最多,接近总量的50%。其他粒级的团聚体含量相对较低,含量从高到低依次为:<0.053 mm、

0.053~0.25 mm、0.25~2.0 mm。垄作免耕、冬水稻田、水旱轮作的各粒径团聚体的百分含量有所不同,垄作免耕与冬水稻田和水旱轮作相比,垄作免耕>2.0 mm粒级团聚体的百分含量要高,达到了52%,分别较冬水稻田、水旱轮作的高7.16%和3%;同时垄作免耕<0.053 mm粒级团聚体的百分含量较小,冬水稻田最大,二者相差达到9.0%。



图3 土壤中不同团聚体的含量

根据前述结果,3种耕作的土样,垄作免耕中真菌生物量及生物数量最高,冬水稻田的最小。可见当真菌量较高时,土壤大团聚体百分含量亦较高,而小团聚体含量较低;反之亦然。说明真菌对土壤大团聚体的形成具有重要作用。

### 2.5 土壤有机质含量

土壤有机质是指存在于土壤中的所有有机物质,包括土壤中新鲜有机物质(未分解的生物残体)、土壤微生物、微生物代谢产物和腐殖质。真菌

等微生物对土壤有机质的循环起着重要作用,同时有机物质可提高土壤结构的稳定性<sup>[25, 26]</sup>。

图4显示不同粒径土壤团聚体的有机质含量呈单峰分布,含量最高的为0.25~2.0 mm粒级团聚体。除水旱轮作,其他两个处理的>2.0 mm粒级团聚体的有机质含量均仅次于最高含量。由于0.25 mm是大团聚体和微团聚体的分界线,因此大团聚体中有机质含量较高,说明有机物质可促使大团聚体的形成。

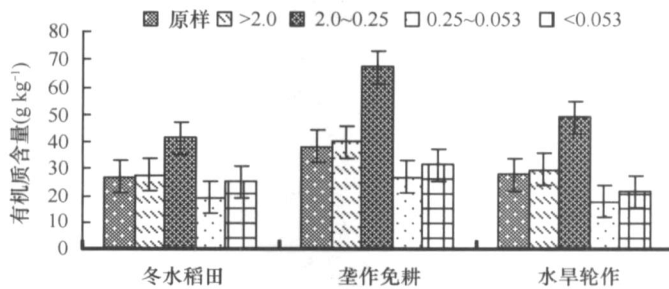


图4 土壤中不同团聚体的有机质含量(误差线表示标准差)

比较3种耕作方式土样,试验中有机质含量较高的垄作免耕土样中真菌生物量也较高,垄作免耕土样中有机质、真菌生物量较冬水稻田、水旱轮作中高,这一现象与张磊等历年在此实验点调查的有机质、真菌数的大小趋势相一致<sup>(2)</sup>,但有机质与真菌间的相关性还有待进一步的研究分析。

## 3 结 语

平板计数法是目前公认的测定微生物量的常规和传统方法,但操作繁杂费时。本实验结果显示,利用麦角固醇含量测定土壤中真菌生物量与平

(2) 张磊. 稻田自然免耕体系土壤微生物及有机质周转研究. 西南农业大学博士学位论文, 2002

板计数法所得结果相关性较高(图2),同时由于麦角固醇是真菌细胞膜上特有的组成成分、含量稳定,通过高效液相色谱法进行测定,能精确测得麦角固醇量,且测定迅速、便捷。所以通过测定麦角固醇的含量能够在一定程度上反映真菌生物量,为研究真菌与土壤之间的关系提供了良好保障。但在其测定过程中需要注意一些事项,如测定过程须迅速,采回的新鲜土样应立即进行处理,测定过程须避光进行,以免麦角固醇损失;同时麦角固醇与真菌的关系还受到真菌种类、生长介质、pH及温度等因素的影响,故对此方法的应用还需要做进一步的研究,找出合适条件,以便更好地应用于科学研究。

土壤团聚体是由小团聚体复合而成,产生相应的孔隙空间,故大团聚体土壤具备更好的通气条件,有利于微生物生长的环境;同时微生物量的增加也可促使大团聚体的形成。试验中,大粒级(>2.0 mm)土壤团聚体中真菌生物量相对于小粒径团聚体高;而真菌生物量较高的垄作免耕土样,其土壤大团聚体含量也较其他两个处理高。由此,说明真菌与土壤团聚体之间存在相关性,真菌有助于大团聚体的形成。

## 参考文献

- [1] Tisdall J M, Oades J M. Organic matter and water-stable aggregates. *Journal of Soil Science*, 1982, 33: 141~163
- [2] Soren M K, Per S J, Ingrid K T, *et al*. Similarity of differently sized macro-aggregates in arable soils of different texture. *Geoderma*, 2006, 137: 147~154
- [3] 唐玉姝,魏朝富,颜廷梅,等.土壤质量生物学指标研究进展. *土壤*, 2007, 39(2): 157~163
- [4] Bearden B N, Petersen L. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of vertisols. *Plant and Soil*, 2000, 218: 173~183
- [5] Degens B, Graham S. Changes in aggregation do not correspond with changes in labile organic C fractions in soil amended with  $^{14}\text{C}$ -glucose. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28: 453~462
- [6] Jastrow J D. Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28: 665~676
- [7] Cecilia M L, Wachenfeldt E V, Tranvik L J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: Persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 59: 253~262
- [8] Ruzicka S, Edgerton D, Norman M, *et al*. The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 989~1005
- [9] Parsi Z, Górecki T. Determination of ergosterol as an indicator of fungal biomass in various samples using non-discriminating flash pyrolysis. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1130: 145~150
- [10] Montgomery H J, Monreal C M, Young J C, *et al*. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 1207~1217
- [11] 谢和金,卢毅,邱咏梅,等.高效液相色谱法测定酵母中麦角固醇含量. *生物工程进展*, 2000, 20(4): 75~76
- [12] 孙伯申,周立平,陈旭峰,等. HPLC法测定红曲霉发酵样品中麦角固醇的含量. *中国食品添加剂*, 2004, 2: 89~92
- [13] Piqueres A P, Hemann V E, Alabouvette C, *et al*. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38: 460~470
- [14] 高明,魏朝富,张磊,等.不同耕作方式对稻田土壤动物、微生物及酶活性的影响研究. *应用生态学报*, 2004, 15(7): 1177~1181
- [15] 杨剑虹.土壤农化分析与环境监测.重庆:西南农业大学出版社,2004.2,3,7~15
- [16] Deneff K, Zotarelli L, Boddey R M, *et al*. Microaggregate-associated carbon as a diagnostic fraction for management-induced changes in soil organic carbon in two Oxisols. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39: 1165~1172
- [17] Fedotov P S, Bauer C, Popp P, *et al*. Dynamic extraction in rotating coiled columns, a new approach to direct recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1023: 305~309
- [18] 程丽娟主编.微生物学实验技术.西安:世界图书出版社,2000.80~81
- [19] Joergensen R G. Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 647~652
- [20] Gong P, Guan X, Witter E. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption. *Applied Soil Ecology*, 2001, 17: 285~289
- [21] Chiu C Y, Chen T H, Imberger K, *et al*. Particle size fractionation of fungal and bacterial biomass in subalpine grassland and forest soils. *Geoderma*, 2006, 130: 265~271
- [22] Deneff K, Johan S, Bossuyt H, *et al*. Influence of dry-wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter, and microbial community dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 1599~1611
- [23] 高明,魏朝富,谢德体,等.稻田长期垄作免耕对土壤肥力性状的影响研究. *水土保持学报*, 2005, 19(3): 29~33
- [24] Georg G B, Elliott T E, Frey S D, *et al*. Microbial contributions to the aggregation of a cultivated grassland soil amended with starch. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 407~419
- [25] Zhang B, Peng X H. Organic matter enrichment and aggregate stabilization in a severely degraded ultisol after reforestation. *Pedosphere*, 2006, 16(6): 699~706
- [26] 彭新华,张斌,赵其国.土壤有机碳库与土壤结构稳定性关系的研究进展. *土壤学报*, 2004, 41(4): 618~623