



王玉霞, 张建云, 房慧勇, 郑玉光, 马东来, 谷仙. 蚯蚓肥中养分、微生物群落及抑菌功能研究——以华北平原牛粪堆肥为例[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(9): 135-146.

WANG Yuxia, ZHANG Jianyun, FANG Huiyong, ZHENG Yuguang, MA Donglai, GU Xian. Nutrients, microbial communities and microbial inhibitory functions in vermicomposting: A case study of cow dung composting in the North China Plain [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(9): 135-146.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.09.12

蚯蚓肥中养分、微生物群落及抑菌功能研究 ——以华北平原牛粪堆肥为例

王玉霞¹ 张建云¹ 房慧勇^{1,2,3} 郑玉光^{1,2,3} 马东来^{1,2,3*} 谷仙^{1,2,3*}

(1. 河北中医药大学 药学院, 石家庄 050200;

2. 河北省中药炮制技术创新中心, 石家庄 050200;

3. 河北省中药资源利用与质量评价国际联合研究中心, 石家庄 050200)

摘要 为探究蚯蚓肥中微生物群落组成及其抑菌功能, 首先采用赤子爱胜蚓对牛粪进行规范化堆肥, 待充分腐熟后测得蚯蚓肥中有机质、全氮、全磷和重金属等含量; 其次应用高通量测序技术对蚯蚓肥中的真菌和细菌进行物种注释, 并对其群落结构特征进行分析及功能预测; 最后, 采用平板对峙的方法, 以提取的蚯蚓肥浸提液进行灭菌为对照, 验证蚯蚓肥浸提液中的微生物对易引起植物腐烂的腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)的抑制作用。结果显示: 蚯蚓肥中有机质含量为24.4%, 全氮、全磷和全钾含量分别为16.2%、13.2%、19.4%, 总铅、总铬和总砷的重金属含量未超过有机肥标准; 蚯蚓肥细菌群落中, 优势菌门为变形菌门、放线菌门和拟杆菌门。真菌群落中, 优势菌门为子囊菌门和被孢霉门。功能预测结果显示, 细菌有6条代谢通路, 63项功能分组, 与化能异养、好氧化能异养和发酵作用相关基因信息占比最高。真菌功能预测结果以腐生营养型和病理营养型为主, 未定义的腐生菌占主导地位; 此外, 蚯蚓肥浸提液能有效抑制腐皮镰刀菌菌丝的生长, 其灭菌后的抑制效果明显减弱。该研究结果为探究蚯蚓肥微生物群落多样性、拮抗病原菌及土传病害的生物防治提供基础。

关键词 蚯蚓肥; 微生物多样性; 有机肥; 功能预测; 蚯蚓肥浸提液

中图分类号 S154.1

文章编号 1007-4333(2024)09-0135-12

文献标志码 A

Nutrients, microbial communities and microbial inhibitory functions in vermicomposting: A case study of cow dung composting in the North China Plain

WANG Yuxia¹, ZHANG Jianyun¹, FANG Huiyong^{1,2,3}, ZHENG Yuguang^{1,2,3},

MA Donglai^{1,2,3*}, GU Xian^{1,2,3*}

(1. College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Province Processing Technology Innovation Center of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

3. International Joint Research Center of Resource Utilization and Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine of Hebei Province, Shijiazhuang 050200, China)

收稿日期: 2024-01-02

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(H2022423004); 河北省中医药管理局科研计划项目(2022098); 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2023026); 河北中医药大学博士科研基金项目(BS22021019); 河北省现代农业产业技术体系创新团队项目(HBCT2023080201, HBCT2023080205)

第一作者: 王玉霞(ORCID: 0009-0002-9671-0105), 硕士研究生, E-mail: wangyuxia@163.com

通讯作者: 马东来(ORCID: 0000-0002-5398-1725), 教授, 主要从事中药质量分析与控制研究, E-mail: mdl_hebei@aliyun.com

谷仙(ORCID: 0000-0002-1115-9290), 副教授, 主要从事中药资源生态学研究, E-mail: guxianer18@163.com

Abstract The objective of this study was to investigate the microbial community composition of vermicompost and its bacteriostatic function. Firstly, *Eisenia foetida* was employed to standardize the composting of vermicompost, and the organic matter, total nitrogen, total phosphorus, and heavy metals content in the vermicompost were identified after decomposition. Secondly, the high-throughput sequencing technology was employed to identify the species of fungi and bacteria present in the vermicompost and to analyze the structural characteristics of the community and predict its function. Finally, the inhibitory effect of the microorganisms in the extract from vermicompost on *Fusarium solani*, a fungus that is prone to cause plant rot, was verified by using a plate standoff method and the sterilized extracted vermicompost extract was taken as control. The results showed that: The organic matter content of the vermicompost was 24.4% and the contents of total nitrogen, phosphorus, and potassium contents were 16.2%, 13.2% and 19.4%, respectively. The contents of heavy metals such as total Pb, Cr and As did not exceed the standards for organic fertilizer; The dominant phyla of the vermicompost bacterial community were *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. Among the fungal community, the dominant phyla were *Ascomycota* and *Mortierellomycota*. The results of functional prediction indicated that bacteria had six metabolic pathways and 63 functional groups. The highest percentage of gene information related to chemoenergetic heterotrophy, aerobic heterotrophy and fermentation. The results of fungal function prediction displayed that the dominant types were saprotrophic and pathotrophic, and mainly was undefined saprotrophic bacteria. This study also demonstrated that vermicompost extract could effectively inhibit the growth of *F. solani* mycelium. However, the inhibitory effect was significantly weakened after extract sterilization. These findings would provide a basis for exploring the diversity of microbial communities in vermicompost, antagonizing pathogenic bacteria and biologically controlling soil-borne diseases.

Keywords vermicompost; microbial diversity; organic fertilizer; functional prediction; vermicompost extract

随着农业规模化种植的进程加快,土传病害愈发严重,其具有不易被发现、强传染性、爆发性和摧毁性,治理困难^[1]。农业生产中为追求作物高产,盲目使用和滥用农药、化肥的情况时有发生,致使土壤有机养分降低及微生物群落结构失衡、病虫害频发,最终导致农作物、蔬菜和中药材品质下降^[1-2]。为了解决上述问题,寻找对生态友好的有机肥成为重要途径,已有研究发现蚯蚓肥及其衍生物,不仅可以增加作物生长和产量,还可以可持续地抑制土传病害发生^[3]。2022年蚯蚓堆肥技术被农业农村部列为4种典型农村有机废弃物资源化利用技术模式之一,而华北平原作为重要农牧区,存在着大量农牧废弃物资源,促成该区域蚯蚓养殖技术成熟,蚯蚓养殖规模位居全国前列,成为国内主要优质蚯蚓肥供应地^[4]。因此,华北平原蚯蚓肥应用潜力巨大,蚯蚓堆肥有助于推动该地区生态循环农业的发展。

蚯蚓肥是蚯蚓在降解有机废弃物后的产物,是一种集植物营养、植物保护和生物活性激素为一体的优质长效有机肥和土壤改良剂^[5-6]。施用蚯蚓肥一方面可以通过富含的营养成分和生物活性物质改变土壤理化性状;另一方面,与传统堆肥相比,蚯蚓肥具有出色的生物学特性,能改善并扩大土壤中

有益微生物群落的多样性和数量;此外,利用自带的微生物直接参与土壤生物化学活动,同时还能拮抗植物病害^[7-9]。蚯蚓肥因富含大量有益细菌而成为抑制土传病害和调控微生物区系的重要手段^[2-3]。

蚯蚓肥的使用方法存在差异,多数研究倾向于选择使用蚯蚓肥浸提液^[3,10]。蚯蚓肥浸提液作为蚯蚓肥的衍生物,是蚯蚓肥与水混合并经过发酵制成^[11]。蚯蚓肥中的可溶性营养物质和微生物转移到液体溶液中,同样适用于农田生产^[12-14]。研究表明蚯蚓肥浸提液能提高种子活力,促进幼苗生长并增加叶绿素含量^[15]。蚯蚓肥浸提液也能促进微生物的活性和多样性^[13]。Singh等^[16]研究发现,蚯蚓肥浸提液的应用不仅减少了白化病和果实畸形等生理障碍,而且还减少了灰霉病的发生。因此,无论使用固体蚯蚓肥还是蚯蚓肥浸提液,对促进植物的生长和保护都能发挥出巨大的潜力。

目前多认为蚯蚓肥和蚯蚓肥浸提液发挥作用主要是其中含有生物酶和激素等物质^[6,11,17],但有研究认为二者对病原菌的抑制作用本质上是生物因素引起,而不是由化学物质主导^[2]。因此,为探明蚯蚓肥抑菌作用机制,本研究拟以华北平原牛粪蚯蚓

堆肥为研究对象,采用微生物高通量测序方法,分析蚯蚓肥细菌、真菌群落结构和其代谢功能,并运用平板对峙方法,以灭菌的蚯蚓肥浸提液为对照,对引起作物腐烂病的茄病镰刀菌进行抑菌试验,以此来验证蚯蚓肥中的微生物是否发挥抑菌作用。以期为实现蚯蚓肥资源高值化利用和减少化学杀菌剂的投入提供依据。

1 材料与方法

1.1 蚯蚓堆肥过程及样品采集

蚯蚓堆肥地点为河北省石家庄市行唐县兴农蚯蚓养殖基地,以牛粪作为主要苗床养殖基质,同时添加适量草炭、碎木屑和碎秸秆并混合均匀,调整碳氮质量比,促进蚯蚓繁殖。所用的蚓种为赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*),品种是大平2号,该品种个头小、产卵数量多,从卵到成虫需要20~40 d,接种一次就可进行大量繁殖。采用林下覆膜繁殖方法,苗床宽×长×高=1.8 m×10.0 m×0.8 m。通过喷淋措施,保持养殖蚯蚓的苗床湿度控制在40%~60%,温度25℃,此时蚯蚓生长迅速,繁殖能力最强。养殖时间4—10月,通过机械将蚯蚓过筛后,剩余基质经过一周左右晾晒灭菌,即得优质蚯蚓肥。供试蚯蚓肥按照 $m(\text{水}):m(\text{土})=35\%$ 配制。

由于赤子爱胜蚓按照生态型分类属于表土层^[18],即主要消耗表层的有机物。因此,为保证样品的代表性,本研究选择已经完全腐熟的表层蚯蚓肥为研究对象,蚯蚓肥采集时避开表面杂质,去除牛粪、石块以及其他杂物后,用土钻随机采样5次并混合均匀,取样深度约40 cm,将土钻预先经过消毒灭菌处理,将蚯蚓肥过10目土壤筛后,一部分自然晾干,待测定蚯蚓肥pH及过200目筛后测定元素含量;另一部分分装到无菌离心管里,每管3~5 g,密封后立即-80℃储存备用。

1.2 蚯蚓肥中养分测定

土壤pH采用电位法测定($V(\text{水}):m(\text{土})=2.5:1$),采用重铬酸钾氧化加热法测定蚯蚓肥中有机质含量(OM)。采用凯氏定氮法和FOSS凯氏8200(FOSS, Hilleroed, Denmark)分析总氮(TN)含量^[19]。蚯蚓肥样品在 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-HF}$ 溶液中用高压消解容器消解后,使用电感耦合等离子体-光学发射光谱仪(ICP-OES)测定总磷(TP)、总钾(TK)、总铅(Pb)、总铬(Cr)和总砷(As)^[20]。

1.3 蚯蚓肥微生物高通量测序

1.3.1 DNA提取和PCR扩增

采用CTAB法提取蚯蚓肥样本中DNA,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度,取适量的蚯蚓肥于离心管中,使用无菌水将蚯蚓肥稀释至1 ng/ μL ,用稀释后的基因组DNA作为模板,使用高效和高保真酶、Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer及带Barcode的特异引物341F(CCTAYGGGRBGCASCAG)和806R(GGACTACNNGGGTATCTAAT)对V3+V4可变区进行细菌PCR扩增,蚯蚓肥中真菌扩增区域为ITS2区,ITS3-KYO2(GATGAAGAACGYAGYRAA)和ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)。

1.3.2 PCR产物的混样与纯化

采用Illumina NovaSeq对测序样本进行测序。根据PCR产物的浓度进行等浓度混样,在充分混匀后,用1×TAE浓度为2%的琼脂糖凝胶电泳纯化PCR产物,对目的条带使用胶回收试剂盒(Qiagen公司, Germany)回收产物。文库的构建通过使用Illumina公司(San Diego, CA, USA)TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit建库试剂盒进行,经Qubit定量和文库检测,合格后,使用NovaSeq 6000 PE250进行上机测序。图1展示了蚯蚓肥中细菌和真菌Alpha多样性稀释曲线。可见:稀释曲线随着测序量的增加逐渐趋于平缓,表明对蚯蚓肥的测序深度已经接近饱和,足以反映当前样本的物种多样性。

1.3.3 测序数据处理

测序完成后,采用QIIME软件进行生物信息学分析。测序数据经过barcode拆分后,运用QIIME2插件中的DADA2插件对所有样品的全部原始序列(input)进行质量控制(filtered),去噪(denoised),拼接(merged),并且去嵌合体(non-chimeric),形成OTU^[21]。选取OTU的代表性序列,与数据库(16S默认Greengenes Database 13.8版本,ITS默认UNITE数据库8.2版本)进行比对从而获得物种注释信息^[22]。使用PICRUST2和FAPROTAX对蚯蚓肥细菌群落进行功能预测,利用QIIME获得的colsed OTU Table与KEGG数据库进行比对,获得功能预测信息。通过FUNGuild工具对真菌营养类型及其功能类群分类。使用微科盟生科云平台(<https://www.bioincloud.tech/>)进行绘图。

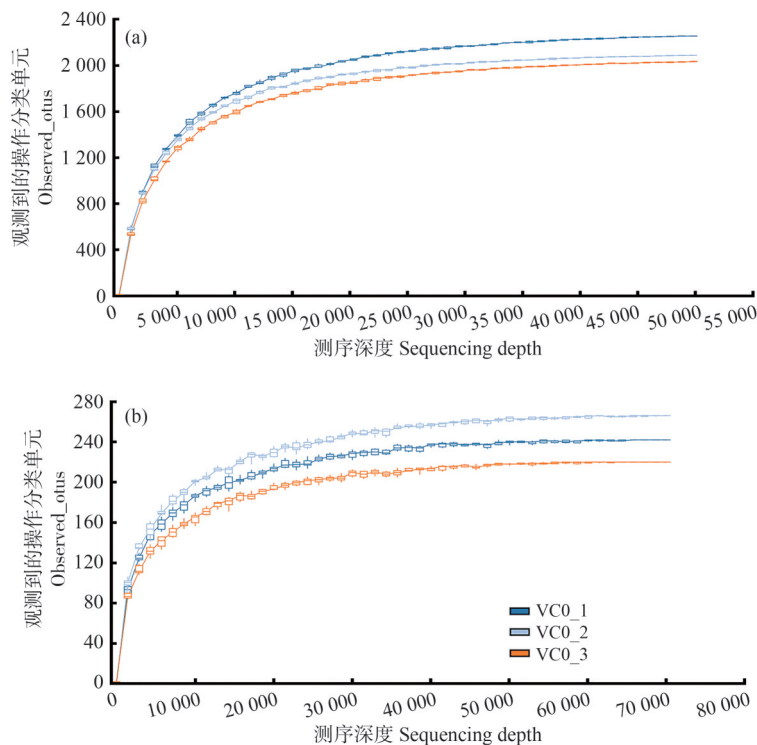


图1 蚯蚓肥中细菌(a)和真菌(b)Alpha多样性稀释曲线图

Fig. 1 Alpha diversity rarefaction curves of bacteria (a) and fungi (b) in vermicompost

1.4 蚯蚓肥浸提液提取及病原菌培养

蚯蚓肥浸提液制作方法主要参考^[23-24],称取20 g 风干粉碎的蚯蚓肥样品于250 mL 锥形瓶中,加入100 mL 无菌去离子水,密封好后置于常温摇床内振荡72 h。经过4层无菌纱布和真空漏斗过滤使其不含颗粒物后转移到锥形瓶内,即为本试验用蚯蚓肥浸提液。采用平板对峙的方法,研究蚯蚓肥浸提液对引起作物腐烂的主要病原菌腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)的抑制作用^[25]。病原菌在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)上4℃保存至使用。浸提液的提取方法如下:在无菌锥形烧瓶(250 mL)中加入蚯蚓肥(10 g)和无菌反渗透水(100 mL)。为了避免污染,摇瓶盖上无菌密封膜,在定轨摇床(ZWY-240, Zhicheng, Shanghai, China)中以180 r/m 摇动12 h。浸提液以4200 r/m (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)离心10 min,收集上清液并分成两部分。其中一部分在使用前放置在4℃的冰箱中,其他部分立即用高压灭菌锅(MLS-3750; SANYO, Osaka, Japan)在121℃下灭菌20 min。用移液枪将灭菌和未灭菌的浸提液(100 μL)加入培养皿中,并用溅射镀膜仪均匀涂布。然后,在病原体菌落的边缘用5 mm 直径的打孔机获得菌丝块^[26],并用灭菌

镊子将菌丝块放在培养皿的中央。最后,根据菌丝生长情况观察蚯蚓肥浸提液抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 蚯蚓肥中养分特点

经过土壤酸碱度、土壤养分和重金属含量测定发现:蚯蚓肥pH 7.98,有机质含量24.4%,全氮16.2%,全磷13.2%,全钾19.4%;总铅含量为21.6 mg/kg,总铬含量为68.5 mg/kg,总砷含量为8.3 mg/kg。说明按照本试验方法所得蚯蚓肥中养分丰富,能够满足作物生长,与NY 525—2012《有机肥料》^[27]重金属含量相比,没有超过规定的标准。

2.2 蚯蚓肥中微生物种群多样性

2.2.1 蚯蚓肥细菌菌群结构特征

根据16S rRNA 扩增子测序结果,分析得出蚯蚓肥细菌菌群结构特征见图2。可见:在门水平上,细菌群落中变形菌门Proteobacteria为相对丰度最大的优势菌门,占33%;群落中放线菌门Actinobacteria(17%)和拟杆菌门Bacteroidetes(13%)的相对丰度>10%,其次是绿弯菌门Chloroflexi(9%)、酸杆菌门Acidobacteria(9%)、厚壁菌门Firmicutes(7%)、芽单胞菌门

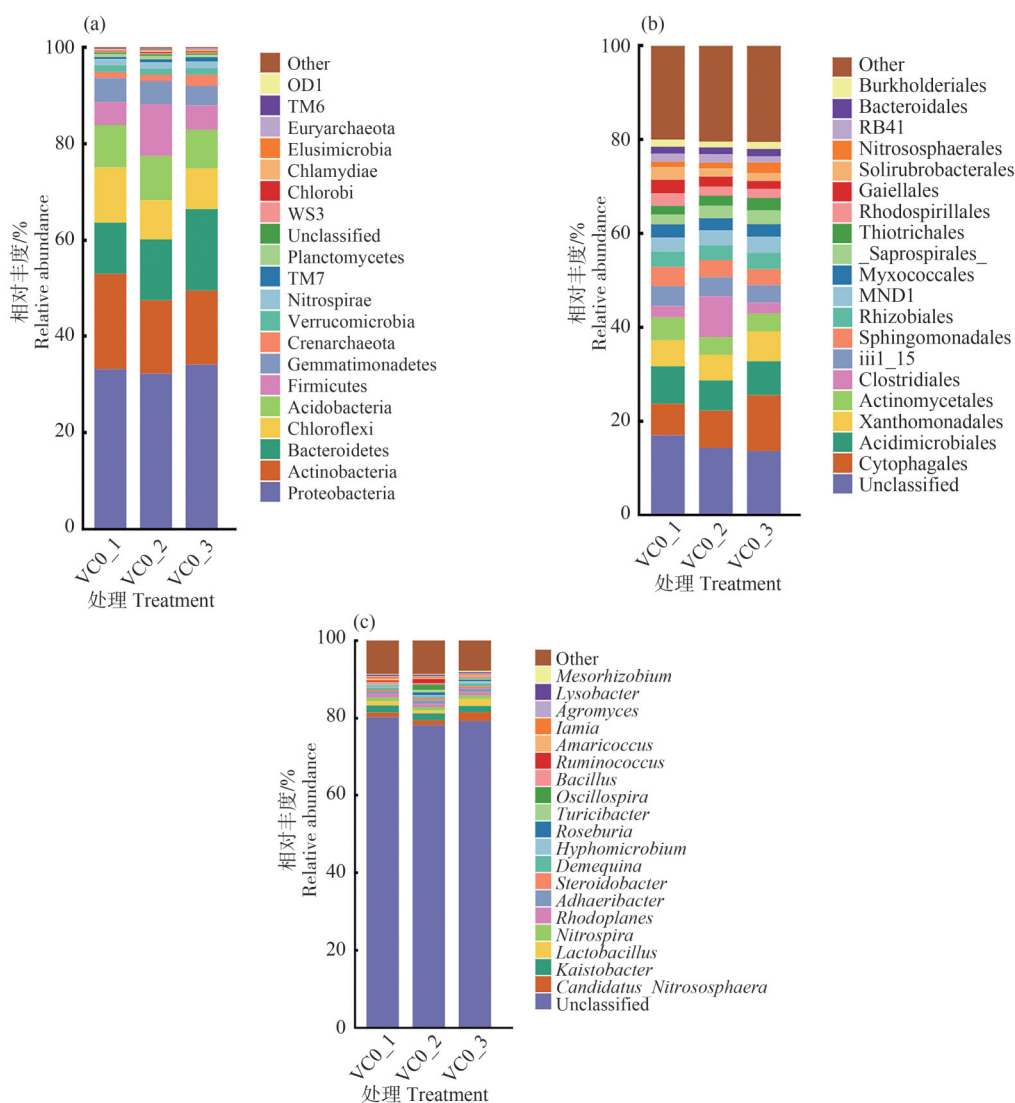


图 2 蚯蚓肥中细菌群落在门水平(a)、目水平(b)及属水平(c)的相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of bacterial communities in vermicompost at Phylum (a), Order (b) and Genus (c)

Gemmatimonadetes (5%) (图 2(a)); 在目水平上, 相对丰度 > 5% 的有 3 个目, 分别为噬纤维菌目 Cytophagales (9%)、酸微菌目 Acidimicrobiales (7%)、黄色单胞菌目 Xanthomonadales (6%), 未分类群共占 15% (图 2(b)); 在属水平上平均丰度 > 1% 的有凯氏杆菌属 *Kaistobacter* (2%)、氨氧化菌属 *Candidatus_Nitrososphaera* (2%)、乳酸杆菌属 *Lactobacillus* (1%) 3 个, 未分类群占 79%。

2.2.2 蚯蚓肥真菌菌群结构特征

根据 ITS 扩增子测序结果得出蚯蚓肥真菌菌群结构特征见图 3。可见: 在门水平上, 真菌群落中相对丰度最大的优势菌门为子囊菌门

Ascomycota 和被孢霉门 Mortierellomycota, 分别占 75% 和 24% (图 3(a))。在目水平上, 优势目为小子囊菌目 Microascales, 占 44%, 其次为被孢霉目 Mortierellales 和粪壳菌目 Sordariales, 分别占 24% 和 18%。平均丰度 > 1% 的有 2 个目, 为肉座菌目 Hypocreales (3%) 和盘菌目 Pezizales (1%)。未分类群平均丰度占 10% (图 3(b))。在属水平上, 优势属为被孢霉属 *Mortierella*, 占 24%。其中平均丰度 > 0.1% 的有 4 个属, 分别为镰刀菌属 *Fusarium* (1%)、盾盘菌属 *Scutellinia* (0.9%)、假阿利什霉属 *Pseudallescheria* (0.4%) 和奈尼兹皮属 *Nannizzia* (0.1%)。未分类群平均丰度占 72% (图 3(c))。

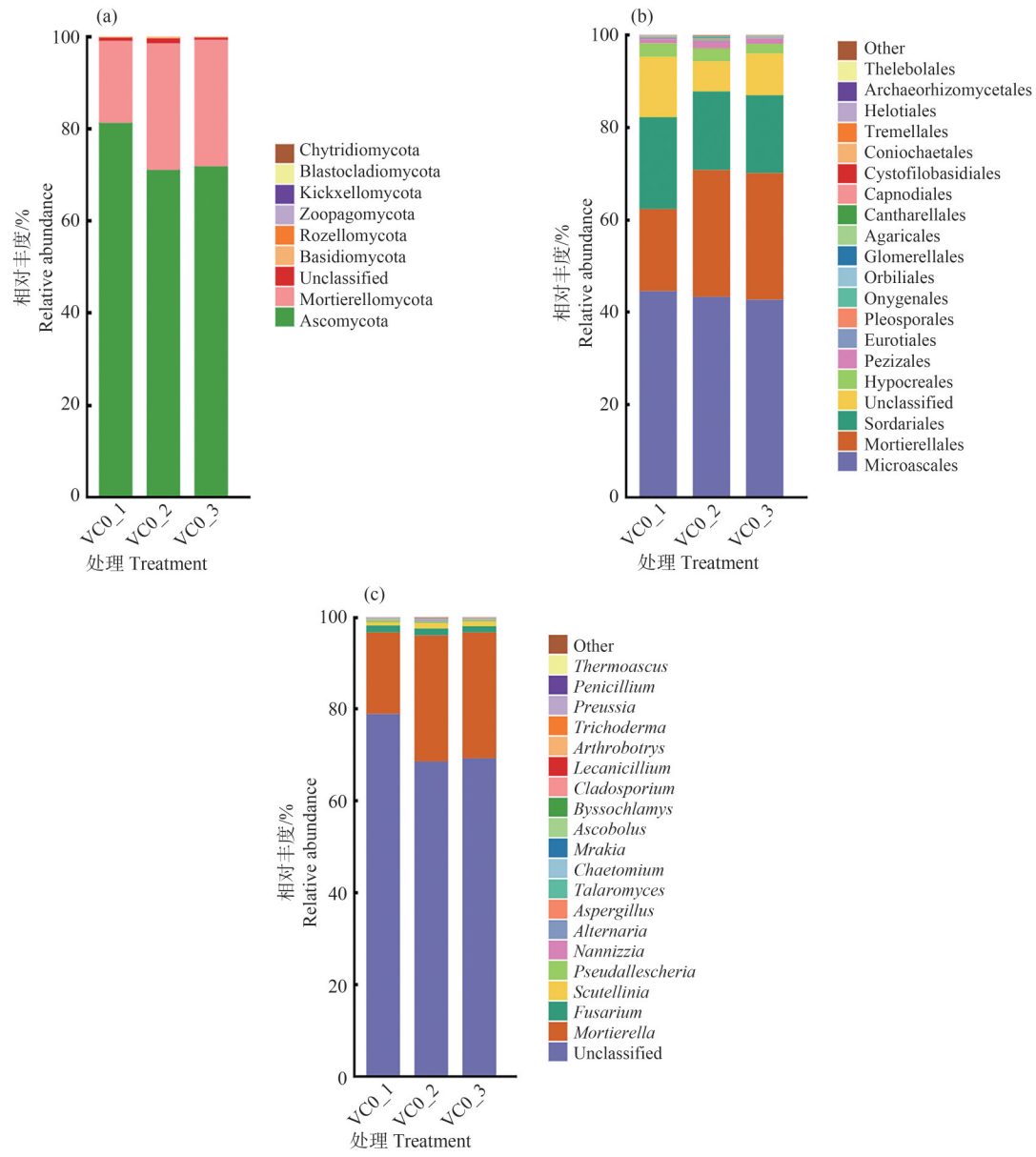


图3 蚯蚓肥中真菌群落在门水平(a)、目水平(b)及属水平(c)的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of fungal communities in vermicompost at Phylum (a)、Order (b) and Genus (c)

2.3 蚯蚓肥中微生物群落功能预测

基于KEGG pathway,运用PICRUSt2对蚯蚓肥细菌群落进行代谢功能预测,结果见图4(a)。可见:在Pathway level 2中,代谢(74%)所占比例最高,其次是遗传信息处理(10%)。蚯蚓肥细菌群落在代谢水平中,氨基酸代谢(15%)、辅因子和维生素的代谢(13%)和碳水化合物代谢(13%)的功能丰度较其他功能最高。为进一步分析细菌群落的功能信息,本研究通过FAPROTAX对蚯蚓肥细菌菌群进行生态功能预测(图4(b))。共获得63项功能分组,其中与化能异养、好氧化

能异养和发酵作用相关基因信息所占比例最高,分别为11%、8%和3%。

图4(c)为所测样本中真菌群落功能注释结果。共统计分析了相对丰度较高的8类预测功能,其中:有4类被标记为腐生营养型、3类为病理营养型、1类为共生营养型;未定义腐生真菌(Undefined Saprotrophs)的相对丰度占比最高,土壤腐生真菌(Soil Saprotroph)和木腐生真菌(Wood Saprotroph)次之,动物病原真菌(Animal pathogen)、昆虫寄生虫(Insect parasite)和植物病原真菌(Plant pathogen)等的相对丰度最低。

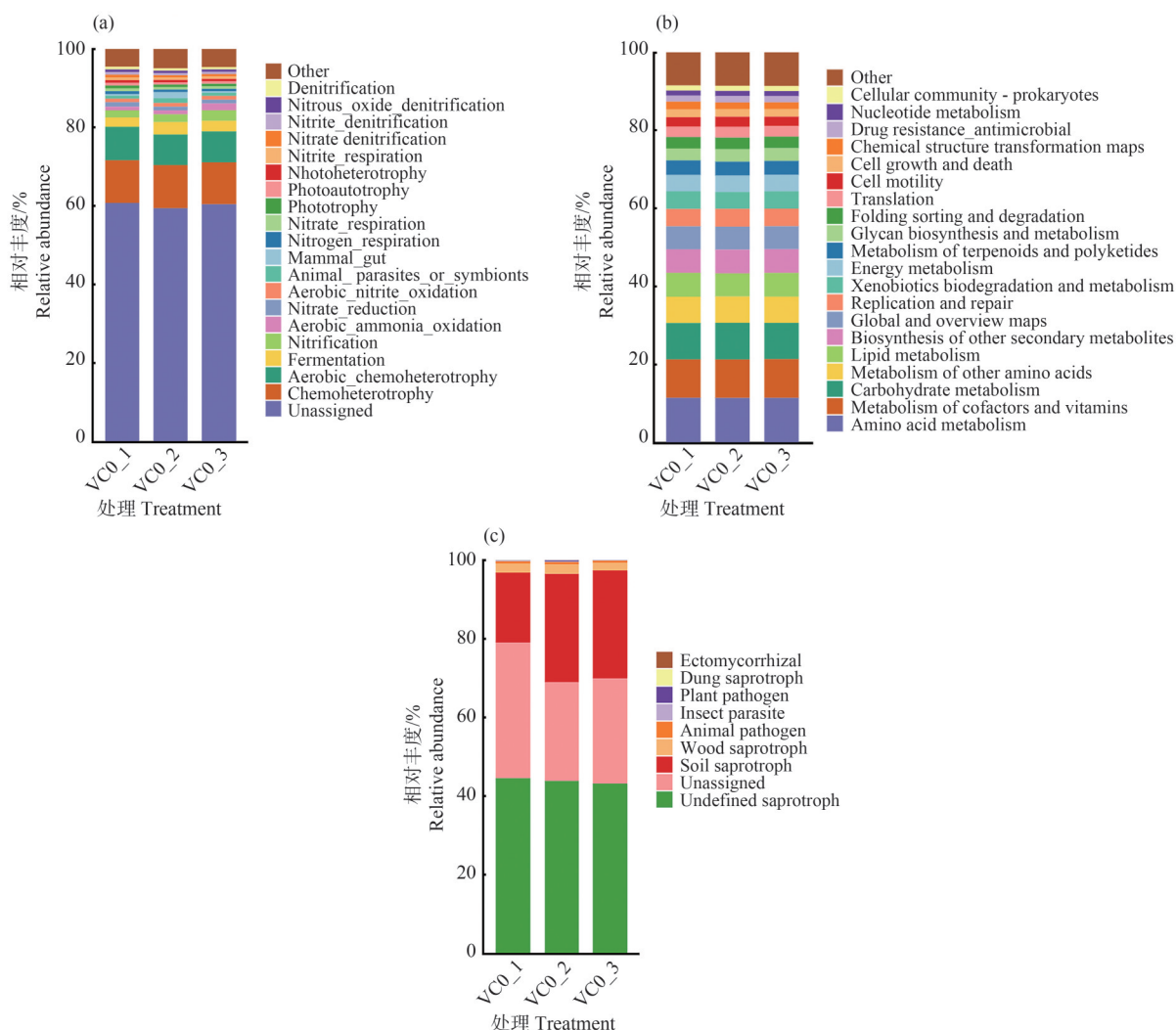


图4 蚯蚓肥细菌代谢功能(a)细菌生态功能(b)和真菌营养功能(c)预测

Fig.4 Functional predictions of vermicompost bacterial metabolism (a)、bacterial ecology (b) and fungal trophic (c) communities

2.4 蚯蚓肥浸提液对植物病原菌的抑制作用

本研究对易导致农作物腐烂的病原菌茄病镰刀菌进行了平板对峙试验,结果见图5。可见:与图5(a)正常培养的茄病镰刀菌相比,蚯蚓肥浸提液能够有效抑制土传病原真菌菌丝 *F. solani* 的生长(图5(c)~(f));随着蚯蚓肥浸提液的所含比例的增加,菌丝块生长逐渐受到抑制,200 μ L处理下的浸提液抑菌效果最佳(图5(f)),而灭菌后的蚯蚓肥浸提液抑菌效果(图5(b))则明显减弱,说明蚯蚓肥浸提液中的抑菌效果与蚯蚓肥中有益微生物活性相关。

3 讨论

从理化性质来分析,本研究测定的蚯蚓肥 pH 接近8,这可能与堆肥时间从4—10月,蚯蚓肥中微生物活动丰富、螯合物的形成以及游离氨的释放有

关^[28-29],这与赵懿等^[30]以牛粪为饵料,蚯蚓堆肥达到45 d后 pH 超过8结果一致。对有机肥而言,除了基本的理化性质外,重金属含量是人们最为关注的指标。NY 525—2012《有机肥料》^[27]规定的总铅、总铬和总砷含量不能超过50、150和15 mg/kg,本研究中的蚯蚓肥这3种重金属含量分别为21.6、68.5和8.3 mg/kg,均未超过此标准,说明本研究所用蚯蚓肥比较安全。

已有研究表明蚯蚓堆肥中使用污泥、厨房、植物和动物废弃物等原料会影响蚯蚓肥中细菌群落的丰度和多样性^[31-33]。宋晓贺等^[34]从蚯蚓肥中共检测到34个菌门,其中变形菌门相对丰度占比最大。蔬菜、牛粪和污泥3种蚯蚓肥中丰度最高的同样为变形菌门,分别占48%、31%和36%^[35]。上述细菌群落的高通量测序结果与本研究结果一致,即变形

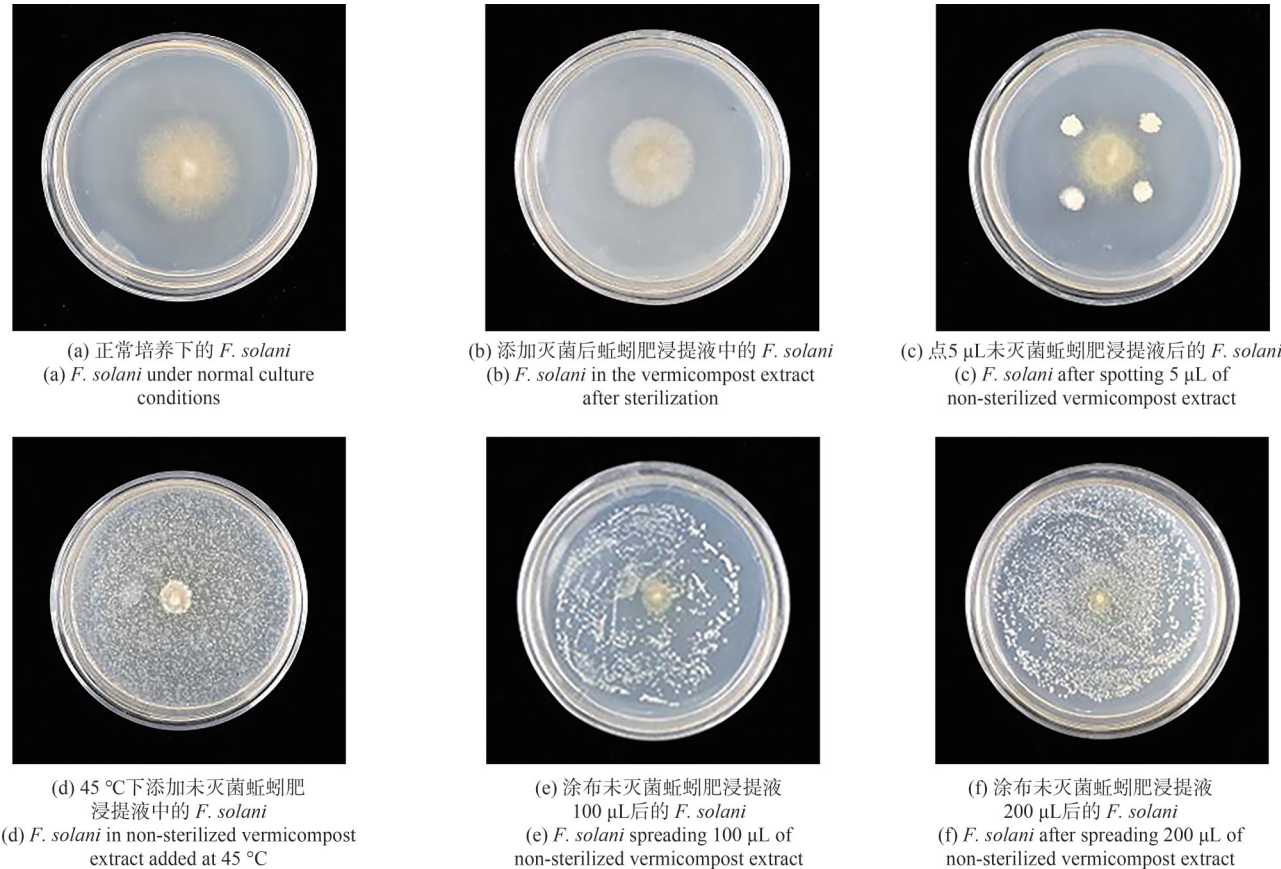


图5 蚯蚓肥浸提液对腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)抑制效果

Fig. 5 Inhibitory effect of vermicompost extract on *Fusarium solani*

菌门是蚯蚓肥细菌群落中的主要菌门。变形菌门在营养丰富的环境中被刺激生长,并且能够降解复杂的有机化合物^[36],在促植物生长以及土壤中的碳、氮和硫循环中,具有重要作用^[37-39]。对真菌群落进行高通量测序,本研究子囊菌门相对丰度最大,而牛粪和白葡萄渣为原料进行蚯蚓堆肥^[40]的测序结果同样显示子囊菌门为优势菌门。因此,尽管堆肥原料不一致,但蚯蚓肥细菌和真菌菌群中的优势菌群不会有显著改变。

蚯蚓肥作为一种质优、环境友好的多功能型天然有机肥,在促进作物生长方面发挥着积极作用。Mu等^[41]从蚓肥中筛选出具有广谱抗真菌能力的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* M29,该菌释放具有挥发性的有机化合物,其能对灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 发挥显著的拮抗作用。真菌群落中,毛壳菌属 *Chaetomium* 如球毛壳 *Chaetomium globosum* 和角毛壳 *Chaetomium cupreum* 的一些特定品系能抑制植物病原菌、促进植物生长和诱导植物产生抗性^[42]。其

次,被孢霉属的成员可产生花生四烯酸,是一种植物病原真菌的抑制剂^[43]。此外,蚯蚓肥中的微生物还能促进养分转化,间接调控土壤微生物群落结构。如土壤中的大量磷素约有95%不能被植物直接吸收,可以利用蚯蚓肥中的溶磷菌来研制菌肥以代替传统化肥,提高土壤中可溶性磷的含量,改良土质^[44]。

本研究基于KEGG数据库,应用PICRUST2预测蚯蚓肥中细菌微生物的代谢功能。代谢组所占比例明显高于其他途径,其次相对丰度较高的是氨基酸代谢,而传统堆肥系统中相对丰度最高的则是碳代谢^[45]。表明细菌的氨基酸代谢群可以增加氨基酸和腐殖酸的含量,氨基酸在堆肥过程中可充当微生物生长和代谢的能量和碳源。此外,碳水化合物代谢可通过降解纤维素和半纤维素提供各种基质,意味着碳相关代谢和有机物质的生物转化具有高活性^[45-46]。本研究对蚯蚓肥真菌群落功能进行预测分析发现,其主要以腐生营养型和病理营养型为主,未定义的腐生菌在序列丰度中占主导地位,该

结果与 Nguyen 等^[47]的研究结果相似。可能是由于蚯蚓肥中微生物种类丰富, 本研究中采用扩增子技术挖掘微生物群落, 对物种的注释程度存在一定局限性, 未来可以继续采用宏基因组技术深入挖掘有益微生物种类及其功能。

病原真菌腐皮镰刀菌(*F. solani*)是黄连、黄芪、枸杞、半夏等药材根腐病的主要致病菌之一, 目前对其防治手段仍是以化学防治为主^[48]。已有研究表明蚯蚓肥能够显著抑制腐皮镰刀菌^[49]。本研究中, 蚯蚓肥浸提液能够对病原真菌的生长起到抑制作用, 而其灭菌后的抑制作用减弱, 表明可能是蚯蚓肥浸提液中聚集的潜在活性微生物起到了抑制致病菌的效果, 结果与 Yattoo 等^[2]研究发现蚯蚓肥浸提液防治植物病害的本质是生物因素的观点一致。与蚯蚓肥相比, 蚯蚓肥浸提液中微生物的多样性不仅没有降低, 而且对病原菌有抑制作用的假单胞菌(*Pseudomonads*)和梭状芽胞杆菌(*Clostridia*)的相对丰度则明显增加^[50]。蚯蚓肥浸提液所含毛霉菌门和变形菌门显示出高比例, 而毛霉菌在促进有机物分解方面发挥关键作用^[51], 说明蚯蚓肥浸提液中不仅存在防治病害的微生物, 而且这类微生物数量较蚯蚓肥中更加丰富。蚯蚓肥浸提液中的矿物质、腐殖酸含量、pH 和电导率与蚯蚓堆肥中已知的含量非常相似^[52], 蚯蚓肥浸提液代替固体蚯蚓肥, 很大程度上减少了所需固体蚯蚓肥的用量^[53]。本研究结果进一步证明了蚯蚓肥中微生物在生物防治方面的开发潜力。

4 结 论

本研究以华北平原牛粪蚯蚓堆肥为研究对象, 探究蚯蚓肥中养分、细菌和真菌微生物群落结构及其抑菌功能, 主要结论如下: 1) 蚯蚓肥中富含大量有机质和氮磷钾等, 总铅、总铬和总砷的重金属含量远低于现行有机肥标准; 2) 蚯蚓肥中变形菌门和放线菌门是细菌群落的优势菌门, 真菌群落中优势菌门为子囊菌门和被孢霉门; 3) 蚯蚓肥中细菌群落以氨基酸代谢功能为主, 而真菌群落以腐生营养型较多, 能够有效促进腐殖质分解。与对照相比, 灭菌后蚯蚓肥浸提液抑制茄病镰刀菌的活性减弱, 进一步说明蚯蚓肥对病原菌的抑制作用是由微生物本身主导。因此, 蚯蚓肥可以作为一种潜在的实现作物养分供应和病害防治双赢的优质有机肥料, 在

生态农业中具有广阔应用前景。

参考文献 References

- [1] 曹塬程, 刘晓漫, 郭美霞, 王秋霞, 李园, 欧阳灿彬, 颜冬冬. 作物土传病害的危害及防治技术[J]. 植物保护, 2017, 43(2): 6-16
Cao A C, Liu X M, Guo M X, Wang Q X, Li Y, Ouyang C B, Yan D D. Incidences of soil-borne diseases and control measures [J]. *Plant Protection*, 2017, 43(2): 6-16 (in Chinese)
- [2] 孙喜军, 吕爽, 高莹, 蔡苗, 王小荣. 蚯蚓粪对作物连作障碍抑制作用研究进展[J]. 土壤, 2020, 52(4): 676-684
Sun X J, Lü S, Gao Y, Cai M, Wang X R. Research progresses on inhibition effect of vermicompost to continuous cropping obstacles [J]. *Soils*, 2020, 52(4): 676-684 (in Chinese)
- [3] Yattoo A M, Ali M N, Ahmad Baba Z, Hassan B. Sustainable management of diseases and pests in crops by vermicompost and vermicompost tea: A review [J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2021, 41(1): 7
- [4] 谷仙, 房慧勇, 王乾, 赵云生, 郑玉光, 郑开颜. 河北省蚯蚓养殖产业现状研究及发展对策分析[J]. 中药材, 2021, 44(12): 2743-2746
Gu X, Fang H Y, Wang Q, Zhao Y S, Zheng Y G, Zheng K Y. Research on present situation of pheretima culture industry in Hebei Province and analysis of development countermeasures [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2021, 44(12): 2743-2746 (in Chinese)
- [5] 纪宇航. 蚓粪养分和安全性评价及蚓粪茶制作工艺研究[D]. 沈阳农业大学, 2020
Ji Y H. Evaluation of the nutrients and safety of vermicompost and Research on the Production Process of Vermicompost Tea [D]. Liaoning: Shenyang Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [6] Guo L Y, Wu G L, Li C H, Liu J W, Yu X F, Cheng D, Jiang G M. Vermicomposting with maize increases agricultural benefits by 304% [J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2015, 35(3): 1149-1155
- [7] Pathma J, Sakthivel N. Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential [J]. *SpringerPlus*, 2012, 1: 26
- [8] Das D, Abhishek K, Banik P, Swain D K. Comparative evaluation of changes in soil bio-chemical properties after application of traditional and enriched vermicompost [J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2022, 28: 102956
- [9] 赵凤艳. 蚓粪改善设施番茄连作土壤质量和番茄品质的机理[D]. 辽宁: 沈阳农业大学, 2018
Zhao F Y. Mechanism of improvements of soil quality and tomato fruit quality by vermicompost in greenhouse [D]. Liaoning: Shenyang Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [10] Voko M P, Kulkarni M G, Ngoroyemoto N, Gupta S, Finnie J F, Van Staden J. Vermicompost leachate, seaweed extract and smoke-water alleviate drought stress in cowpea by influencing phytochemicals, compatible solutes and photosynthetic pigments [J]. *Plant Growth Regulation*, 2022, 97(2): 327-342
- [11] Aydin D, Yuksel B. Lessening the toxic effect of the methylisothiazolinone via vermicompost tea on *Pisum sativum* [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022,

- 29(33): 50443-50453
- [12] Ingham E R. *The Compost Tea Brewing Manual* [M]. Corvallis: Soil Foodweb Incorporated, 2005
- [13] Fritz J I, Franke-Whittle I H, Haindl S, Insam H, Braun R. Microbiological community analysis of vermicompost tea and its influence on the growth of vegetables and cereals [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58(7): 836-847
- [14] Pant A P, Radovich T J K, Hue N V, Talcott S T, Krenek K A. Vermicompost extracts influence growth, mineral nutrients, phytonutrients and antioxidant activity in *Pak choi* (*Brassica rapa* cv *Bonsai*, *Chinensis* group) grown under vermicompost and chemical fertilizer [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(14): 2383-2392
- [15] 张明含, 赵树兰, 多立安. 垃圾堆肥与蚓粪浸提液对草坪植物种子萌发及初期生长的作用 [J]. 草业科学, 2008, 25(8): 113-117
- Zhang Y H, Zhao S L, Duo L A. Effects of soaking treatment with earthworm cast and domestic rubbish compost extract on seed germination and seedling growth of turfgrass [J]. *Pratacultural Science*, 2008, 25(8): 113-117 (in Chinese)
- [16] Singh R, Gupta R K, Patil R T, Sharma R R, Asrey R, Kumar A, Jangra K K. Sequential foliar application of vermicompost leachates improves marketable fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria* × *Ananassa* Duch) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 124(1): 34-39
- [17] Vuković A, Velki M, Ečimović S, Vuković R, Štolfa Č, Magajevac I, Lončarić Z. Vermicomposting: Facts, benefits and knowledge gaps [J]. *Agronomy*, 2021, 11(10): 1952
- [18] 崔莹莹, 吴家龙, 张池, 周波, 任宗玲, 戴军. 不同生态类型蚯蚓对赤红壤和红壤团聚体分布和稳定性的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 83-90
- Cui Y Y, Wu J L, Zhang C, Zhou B, Ren Z L, Dai J. Impacts of different ecological types of earthworm on aggregate distribution and stability in typical latosolic red and red soils [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2020, 41(1): 83-90 (in Chinese)
- [19] Bremner J M, Tabatabai M A. Use of an ammonia electrode for determination of ammonium in Kjeldahl analysis of soils [J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1972, 3(2): 159-165
- [20] Asefa M, Cao M, Zhang G C, Ci X Q, Li J, Yang J. Environmental filtering structures tree functional traits combination and lineages across space in tropical tree assemblages [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 132
- [21] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, Han A W, Johnson A J A, Holmes S P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data [J]. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 581-583
- [22] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie E L, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen G L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5069-5072
- [23] 刘大伟, 韩文昊, 张艳菊, 吴凤芝, 刘霞. 蚯蚓粪及浸提液对番茄根结线虫的防治效果 [J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(5): 686-691
- Liu D W, Han W H, Zhang Y J, Wu F Z, Liu T. Evaluation of control effect of vermicompost and its extracts on tomato root-knot nematode [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2017, 33(5): 686-691 (in Chinese)
- [24] 徐大兵, 田亨达, 张丽, 徐阳春, 杨兴明, 沈其荣, 黄启为. 用于液体肥料的堆肥浸提液提取工艺参数 [J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5): 1189-1195
- Xu D B, Tian H D, Zhang L, Xu Y C, Yang X M, Shen Q R, Huang Q W. Technology of extraction of compost extracts to make liquid fertilizer [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(5): 1189-1195 (in Chinese)
- [25] 石建龙, 李玉权, 胡琨敏, 任建国, 刘红美. 贵州半夏块茎腐烂病原菌的分离与鉴定 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 289-299
- Shi J L, Li Y Q, Hu K M, Ren J G, Liu H M. Isolation and identification of pathogens from rotted root of *Pinellia ternata* in Guizhou Province [J]. *Microbiology China*, 2015, 42(2): 289-299 (in Chinese)
- [26] Yin Y J, Chen C J, Guo S W, Li K M, Ma Y N, Sun W M, Xu F R, Cheng Y X, Dong X. The fight against *Panax notoginseng* root-rot disease using Zingiberaceae essential oils as potential weapons [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1346
- [27] 农业农村部. 有机肥料: NY 525—2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Organic Fertilizer: NY 525—2012 [S]. Beijing: China Standards Press, 2012 (in Chinese)
- [28] 杨祥波. 松针凋落物与蚯蚓粪好氧腐解的最佳质量比 [J]. 北方园艺, 2020(8): 93-100
- Yang X B. The optimum mass ratio of pine needle litter and earthworm excrement in aerobic decomposition [J]. *Northern Horticulture*, 2020(8): 93-100 (in Chinese)
- [29] Ganguly R K, Chakraborty S K. Succession of enzymes and microbial biomarkers in the process of vermicomposting: An insight towards valorization of toxic paper mill wastes using *Perionyx excavatus* (*Oligochaeta*; Perrier, 1872) [J]. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2021, 19(2): 1457-1472
- [30] 赵懿, 赵丽霞, 朱志刚, 赵静, 高媛. 露天条件下蚯蚓处理牛粪—农林废弃物生产蚯蚓粪的理化性质特征 [J]. 天津农业科学, 2023, 29(5): 41-46
- Zhao Y, Zhao L X, Zhu Z G, Zhao J, Gao Y. Evaluation of physical and chemical properties of earthworm manure produced by earthworm treatment of agricultural and forestry wastes under open-air conditions [J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2023, 29(5): 41-46 (in Chinese)
- [31] Warman P R, AngLopez M J. Vermicompost derived from different feedstocks as a plant growth medium [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(12): 4479-4483
- [32] Fuchs J G, Cuijpers W J M. Compost types, feedstocks and composting methods [M]. *Handbook for composting and compost use in organic horticulture*, 2016: 29
- [33] Van der Wurff A W G, Fuchs J G, Raviv M, Termorshuizen A. *Handbook for Composting and Compost Use in Organic Horticulture* [M]. COST: BioGreenhouse, 2016
- [34] 宋晓贺, 李彦凯, 宋亚玲, 郑彦坤, 侯振林, 于道平. 蚯蚓粪中微生物群落特征分析 [J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 2021, 45(5): 92-97
- Song X H, Li Y K, Song Y L, Zheng Y K, Hou Z L, Yu D P. Characteristic analysis of microbial community in vermicompost [J]. *Journal of Anhui University: Natural Science Edition*, 2021, 45(5): 92-97 (in Chinese)
- [35] 李建辉, 张莹莹, 黄魁, 夏慧. 宏基因组学解析蚯蚓粪中微生物种群及耐药基因的组成 [J]. 中国环境科学, 2020, 40(12): 5375-5382
- Li J H, Zhang Y Y, Huang K, Xia H. Composition of microbial

- community and antibiotic resistance genes in vermicomposts revealed by metagenomic analysis[J]. *China Environmental Science*, 2020, 40(12): 5375-5382 (in Chinese)
- [36] Francioli D, Schulz E, Lentendu G, Wubet T, Buscot F, Reitz T. Mineral vs. organic amendments: Microbial community structure, activity and abundance of agriculturally relevant microbes are driven by long-term fertilization strategies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1446
- [37] Dincă L C, Grenni P, Onet C, Onet A. Fertilization and soil microbial community: A review[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(3): 1198
- [38] Ma S L, Zhu W Z, Wang W W, Li X, Sheng Z L. Microbial assemblies with distinct trophic strategies drive changes in soil microbial carbon use efficiency along vegetation primary succession in a glacier retreat area of the southeastern Tibetan Plateau[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 867: 161587
- [39] Spain A M, Krumholz L R, Elshahed M S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria [J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(8): 992-1000
- [40] Pérez-Losada M, Narayanan D B, Kolbe A R, Ramos-Tapia I, Castro-Nallar E, Crandall K A, Domínguez J. Comparative analysis of metagenomics and metatranscriptomics for the characterization of vermicompost microbiomes [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 854423
- [41] Mu J J, Li X P, Jiao J G, Ji G M, Wu J, Hu F, Li H X. Biocontrol potential of vermicompost through antifungal volatiles produced by indigenous bacteria[J]. *Biological Control*, 2017, 112: 49-54
- [42] 迟玉杰, 杨谦. 毛壳菌对植物病害的生物防治及存在的问题[J]. 农业系统科学与综合研究, 2002, 18(3): 215-218
- Chi Y J, Yang Q. Biological control of plant diseases with *Chaetomium* spp and the problems in its application [J]. *System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture*, 2002, 18(3): 215-218 (in Chinese)
- [43] Grantina-Ievina L, Andersone U, Berkolde-Pire D, Nikolajeva V, Ievinsh G. Critical tests for determination of microbiological quality and biological activity in commercial vermicompost samples of different origins[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(24): 10541-10554
- [44] 秦利均, 杨永柱, 杨星勇. 土壤溶磷微生物溶磷、解磷机制研究进展[J]. 生命科学研究, 2019, 23(1): 59-64, 86
- Qin L J, Yang Y Z, Yang X Y. Advances in mechanisms of soil phosphorus solubilization and dissolution by phosphate solubilizing microorganisms[J]. *Life Science Research*, 2019, 23(1): 59-64, 86 (in Chinese)
- [45] Ding J L, Wei D, An Z Z, Zhang C J, Jin L, Wang L, Li Y, Li Q. Succession of the bacterial community structure and functional prediction in two composting systems viewed through metatranscriptomics [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 123688
- [46] Zhao R X, Liu J, Feng J, Li X Y, Li B. Microbial community composition and metabolic functions in landfill leachate from different landfills of China [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 767: 144861
- [47] Nguyen N H, Song Z W, Bates S T, Branco S, Tedersoo L, Menke J, Schilling J S, Kennedy P G. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild [J]. *Fungal Ecology*, 2016, 20: 241-248
- [48] 张恒, 何静, 张小彦, 张树衡, 李彦湘, 张金花, 程永, 李红磊. 几种杀菌剂对腐皮镰刀菌的抑制效果[J]. 甘肃农业大学学报, 2021, 56(5): 77-82
- Zhang H, He J, Zhang X Y, Zhang S H, Li Y X, Zhang J H, Cheng Y, Li H L. The inhibitory effect of several fungicides on *Fusarium solani* [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2021, 56(5): 77-82 (in Chinese)
- [49] Zhao F Y, Zhang Y Y, Dong W G, Zhang Y Q, Zhang G X, Sun Z P, Yang L J. Vermicompost can suppress *Fusarium oxysporum* f sp lycopersici via generation of beneficial bacteria in a long-term tomato monoculture soil[J]. *Plant and Soil*, 2019, 440(1): 491-505
- [50] Uribe-Lorio L, Brenes-Guillén L, WingChing-Jones R, Uribe L, García F, Rodríguez C, Aráuz L F. Valorization of cow manure: Unraveling bacterial community changes driven by vermicomposting and their impact on vermicompost tea production [J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2024, 15(4): 2175-2190
- [51] Koskey G, Avio L, Turrini A, Sbrana C, Barberi P. Biostimulatory effect of vermicompost extract enhances soil mycorrhizal activity and selectively improves crop productivity[J]. *Plant and Soil*, 2023, 484(1): 183-199.
- [52] Chaichi W, Djazouli Z, Zebib B, Merah O. Effect of vermicompost tea on faba bean growth and yield[J]. *Compost Science & Utilization*, 2018, 26(4): 279-285
- [53] Renčo M, Kováčik P. Assessment of the nematocidal potential of vermicompost, vermicompost tea, and urea application on the potato-cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*[J]. *Journal of Plant Protection Research*, 2015, 55(2): 187-192

责任编辑: 杨爱东



第一作者简介: 王玉霞, 硕士研究生, 现就读于河北中医药大学药学院中药学专业。本科就读于河北中医药大学中药栽培与鉴定专业。主持省级大学生创新创业项目“药渣-蚓粪复合基质在中药材功能性专用肥的实践”, 并获校级奖学金和三好学生荣誉。参与“苦杏仁工艺优化”和“桔芦清肺颗粒”课题项目。



通讯作者简介: 谷仙,博士,河北中医药大学药学院副教授,兼任河北省中药材学会酸枣专业委员会理事。主要研究方向为中药资源学。目前主持河北省自然科学基金1项、主持厅局级课题等其他课题4项,参与国家自然科学基金项目2项;以第一作者或通讯作者在 *Global Change Biology*、*Frontiers in Plant Science* 等国内外学术期刊发表论文12篇。



通讯作者简介: 马东来,博士,河北中医药大学教授,硕士生导师,河北省“三三三”人才工程三层次人选,兼任中华中医药学会中药化学分会常务委员。主要研究方向为中药药效物质及质量控制方法研究。目前主持河北省重点研发计划、河北省自然科学基金、河北省高等学校科学技术研究等科研项目14项,参与国家自然科学基金项目2项。以第一作者或通讯作者在 *International Immunopharmacology*、《高等学校化学学报》、《中成药》等国内外学术情况发表论文83篇,其中SCI收录24篇;出版著作12部,其中主编5部,副主编3部;授权发明专利5件,实用新型专利6件。获得河北省中医药学会科学技术奖一等奖2项。