

# 富硒蚯蚓的培养及其硒富集作用研究

孙小斐, 乔玉辉\*, 孙振钧, 王冲, 李花粉, 岳士忠

(中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193)

**摘要:**以赤子爱胜蚓为生物载体,在蚯蚓饲料中添加亚硒酸钠进行富硒蚯蚓培养试验,利用蚯蚓的生物富集作用将无机硒转化为有机硒。以存活率、硒含量为优化指标,研究5种硒浓度(20、40、60、80、100 mg·kg<sup>-1</sup>)和4种培养时间(第15、30、45、60 d)对蚯蚓生长和硒含量的影响规律,筛选存活率高、硒含量高、培养时间短的富硒蚯蚓培养方法。试验结果表明:蚯蚓饲料中亚硒酸钠含量越高、培养时间越长,蚯蚓的存活率越低,硒含量越高,且当硒添加量为80 mg·kg<sup>-1</sup>,培养时间为45 d时,培养条件最优,此时蚯蚓体内硒含量可达33.25 mg·kg<sup>-1</sup>。

**关键词:**赤子爱胜蚓;存活率;蚯蚓硒含量;培养条件

中图分类号:S154.5

文献标志码:A

文章编号:2095-6819(2014)06-0570-05

doi: 10.13254/j.jare.2014.0247

## The Cultivation and Selenium Enrichment of Selenium Enriched Earthworm

SUN Xiao-fei, QIAO Yu-hui\*, SUN Zhen-jun, WANG Chong, LI Hua-fen, YUE Shi-zhong

(College of Resources and Environment, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** As a bio-carrier, *Eisenia fetida* was fed with cow dung that added with sodium selenite in order to transfer inorganic selenium (Se) into organic selenium. Targeting on survival rate and selenium content, the effects of five Se concentrations (0, 20, 40, 60, 80, 100 mg·kg<sup>-1</sup>) and four cultivation periods (15, 30, 45, 60 d) on earthworm growth and Se contents were investigated. The cultivation method with high survival rate, high Se content of earthworm and short breeding time would be screened out. The experimental results showed that the earthworm survival rate decreased and the Se content in earthworm increased with the increase of Se application and the extension of breeding time. The most optimum method was screened out when the Se concentration was 80 mg·kg<sup>-1</sup> and the cultivation period was 45 days, Se content in earthworm was up to 33.25 mg·kg<sup>-1</sup>.

**Keywords:** *Eisenia fetida*; survival rate; selenium content in earthworm; condition of culture

硒是生物体内重要的微量元素之一,具有多种生物学功能。目前常用的补硒制剂主要包括有机硒和无机硒,有机硒相对于无机硒具有毒性较弱、吸收率较高、活性强、安全性好等优点<sup>[1]</sup>。基于有机硒补剂的优越性和天然有机硒资源的限制性,有机硒补剂代替无机硒补剂成为必然趋势,如何把无机硒转化为可以被生物体利用的有机硒就成为研究热点。国内外学者对利用生物作为生物载体对外源性无机硒富集转化为有机硒补剂进行了大量的研究,目前已经通过人工生

物转化的方式生产出各种富硒动、植物和微生物产品,如富硒蚕蛹、富硒水稻、富硒大豆、富硒酵母、富硒灵芝等<sup>[2-6]</sup>。刘向辉等<sup>[6]</sup>和欧阳培等<sup>[7]</sup>通过人工培养蚯蚓、饲喂不同浓度的无机硒,发现蚯蚓具有富集硒的特点,但未同时明确蚯蚓饲养最适硒添加浓度及高硒浓度下蚯蚓的存活情况。刘军<sup>[8]</sup>和杨永元等<sup>[9]</sup>的研究结果均发现随着培养时间的延长,蚯蚓对硒的富集量有所增加,但均未对蚓体有机硒含量随时间变化的动态特征进行分析。本研究以赤子爱胜蚓为生物载体,以牛粪和沼渣(牛粪:沼渣=2:1)为混合基质,以蚯蚓存活情况、体内硒含量、培养时间为优化指标,筛选出存活率高、硒含量高、培养时间短的一组富硒蚯蚓,同时对蚓体有机硒占总硒含量百分比随时间的动态变化特征进行了探究,不仅同时利用2种农业废弃物,而且探讨富硒蚯蚓的最佳培养方案,为农业废弃物的综合

收稿日期:2014-09-25

基金项目:国家自然科学基金(31070454);公益性行业(农业)科研专项(201303106)

作者简介:孙小斐(1989—),女,硕士,主要从事污染生态方面的研究。  
E-mail: xfsun8901@gmail.com

\*通信作者:乔玉辉 E-mail: qiaoyh@cau.edu.cn

利用和富硒蚯蚓的工业化生产及富硒饲料产品的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

成年健康赤子爱胜蚓:中国农业大学资源与环境学院提供;发酵牛粪:中国农业大学科学试验园提供;沼渣:中国农业大学科学试验园提供。牛粪和沼渣的基本化学性质见表1。

表1 供试牛粪和沼渣的基本化学性质

Table 1 Basic chemical properties of the cow dung and biogas residues

指标	牛粪	沼渣
有机质 Organic matter/%	32.85	42.25
pH 值	8.96	6.85
全氮 Total N/%	1.47	1.26
全磷 Total P/%	1.14	0.83
全钾 Total K/%	0.43	0.91
全硒 Total Se/mg·kg <sup>-1</sup>	0.11	0.085

### 1.2 试验设计与样品采集

在试验盆里进行亚硒酸钠的最适宜添加量试验,基质中添加硒元素的量分别为0、20、40、60、80、100 mg·kg<sup>-1</sup>。根据不同的硒浓度,分别将准确称量好的亚硒酸钠用适量水溶解,均匀搅拌至50 g玉米面中,得到含有不同浓度亚硒酸钠的玉米面,再将其逐渐与基质(牛粪:沼渣=2:1)混合均匀,制成不同处理的饲养基质。取72个口径为20 cm、底部有透气孔的塑料盆,在盆底垫一层纱布,保证良好的透气性,然后分别装入不同浓度亚硒酸钠处理的基质混合物各500 g,每个浓度梯度作12个重复。基质陈化2周后,在各盆中分别接种30条赤子爱胜蚓,在盆上做好标记,并将其放在阴凉的暗处培养,定期喷射少量的水以保持饵料的湿度,试验在室温下进行。

分别在试验的第15、30、45、60 d对试验组进行破坏性取样,每次每组取3盆,记录每个盆中蚯蚓条数,将每组蚯蚓置于玻璃培养皿中清肠12 h后洗净,用蒸馏水冲洗3遍,擦干后测定其硒含量。

### 1.3 样品测定与数据分析

每组蚯蚓样品用高压消解法和ICP-MS法进行硒含量的测定。蚯蚓体总硒含量:精确称取0.10 g完全混匀的样品放入20 mL钢衬聚四氟乙烯消解罐,而后加入4.00 mL硝酸和2.00 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>冷消化过夜。次日盖上内盖,将消解内罐放入不锈钢外套中,旋紧外

盖,置于电热恒温鼓风干燥箱中加热消解。消解程序:样品在100℃保持1 h后,升温至180℃保持8 h。样品消解完成之后,将消解罐从鼓风干燥箱中取出,置于通风橱中降温,待温度降至室温时开启消解罐,取出内罐,置于电热板上赶酸。赶酸完毕后,蒸至尽干(切不可蒸干),用0.5%硝酸转移至100 mL容量瓶中,摇匀,静置,溶液澄清后利用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定样品中的硒含量。

蚯蚓体无机硒含量<sup>[8]</sup>:精确称取0.10 g完全混匀的样品于150 mL锥形瓶中,加水约30 mL,置于水浴锅上加热至近沸,保持10 min(适时补水),冷却后,转移入50 mL容量瓶中,定容至刻度线,摇匀,干过滤。取2 mL滤液于25 mL钢衬聚四氟乙烯消解罐内,后面步骤同上述总硒含量测定。

蚯蚓体有机硒含量=蚯蚓体总硒含量-蚯蚓体无机硒含量。

用SPSS 21.0统计分析软件的One-Way ANOVA进行方差分析,采用最小显著极差法(LSD)对差异显著的数据进行多重比较,显著性差异以 $P<0.05$ 为基准。

## 2 结果与分析

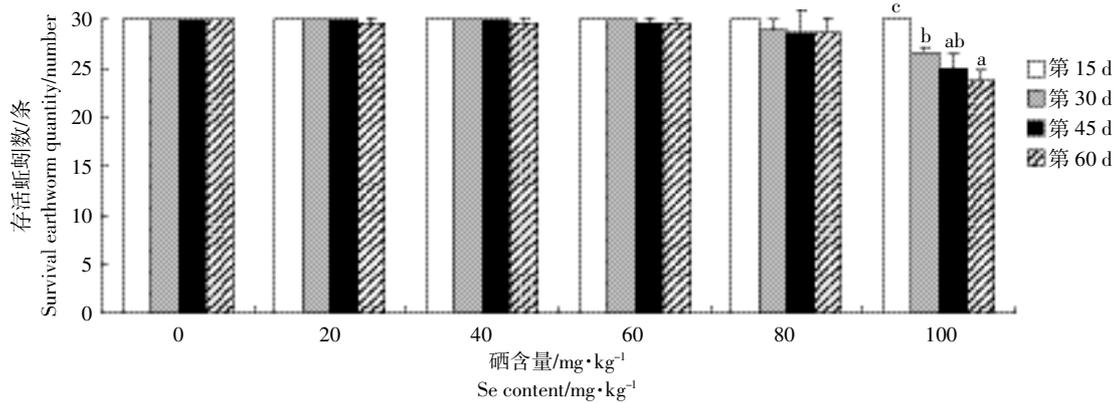
### 2.1 硒处理对蚯蚓存活情况的影响

硒浓度对蚯蚓存活情况的影响如图1所示。从图1可以看出,对于整个试验期来说,蚯蚓的存活率保持较高的水平,随着亚硒酸钠添加量的升高,蚯蚓的存活率有下降的趋势。在相同的培养时间下,相对于对照组来说,当硒的添加量分别为20、40、60、80 mg·kg<sup>-1</sup>时,蚯蚓的存活率没有显著的变化。而当硒的添加量达到100 mg·kg<sup>-1</sup>时,蚯蚓存活率会显著降低,且第30、45、60 d的存活率分别降低了11.11%、16.67%、21.11%。

从图1还可以看出,随着培养时间的延长,蚯蚓的存活率有下降的趋势,随着饲料中硒添加量的增高,蚯蚓存活的时间缩短,当饲料中硒含量为20 mg·kg<sup>-1</sup>,培养时间在60 d时才出现蚯蚓死亡的情况,但当硒添加量为100 mg·kg<sup>-1</sup>时,在硒添加后的第15 d就影响到蚯蚓的存活。并且随着时间的延长,蚯蚓的存活率随着时间的延长发生了显著的降低,第60 d的存活率只有78.89%。

### 2.2 不同硒处理蚯蚓体内硒含量的影响

硒浓度对蚯蚓硒含量的影响如表2和表3所示。从表2和表3可以看出,在不施硒的条件下,蚯蚓体



同一列中每一数值标小写字母不同者表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 未注明的进行无差异, 下同。

Numbers within a column with different letter superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ), and unspecified means no difference, the same as follows.

图 1 硒浓度对蚯蚓存活情况的影响

Figure 1 Effect of selenium content on earthworm survival situation

表 2 硒浓度对蚯蚓总硒含量的影响(mg·kg<sup>-1</sup>)

Table 2 Effect of selenium concentration on total selenium content in earthworm (mg·kg<sup>-1</sup>)

硒含量 Total selenium content/mg·kg <sup>-1</sup>	第 15 d Day 15	第 30 d Day 30	第 45 d Day 45	第 60 d Day 60
0	5.59 ± 0.74a	5.73 ± 1.61a	5.56 ± 2.44a	5.80 ± 2.20a
20	12.17 ± 3.14b	12.93 ± 2.06b	13.99 ± 4.18b	16.42 ± 4.12b
40	14.62 ± 4.54b	21.51 ± 1.30c	26.92 ± 5.08c	30.01 ± 4.74c
60	17.05 ± 3.54bc	21.45 ± 5.40c	30.13 ± 1.61c	36.38 ± 1.51cd
80	17.47 ± 5.57bc	18.18 ± 5.35bc	33.25 ± 1.61cd	41.99 ± 5.39d
100	22.85 ± 0.76c	28.34 ± 2.49d	39.14 ± 4.85d	42.42 ± 4.23d

注:同一列中每一数值标小写字母不同者表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 未注明的进行无差异, 下同。

Note: Numbers within a column with different letter superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ), and unspecified means no difference, the same as follows.

表 3 硒浓度对蚯蚓有机硒含量的影响(mg·kg<sup>-1</sup>)

Table 3 Effect of selenium concentration on organic selenium content in earthworm (mg·kg<sup>-1</sup>)

硒含量 Organic selenium content/mg·kg <sup>-1</sup>	第 15 d Day 15	第 30 d Day 30	第 45 d Day 45	第 60 d Day 60
0	5.17 ± 0.55a	5.23 ± 1.33a	5.13 ± 2.33a	5.32 ± 2.15a
20	11.15 ± 2.86b	11.43 ± 1.86b	12.58 ± 3.71b	15.12 ± 3.10b
40	13.54 ± 4.24b	20.26 ± 1.21c	25.21 ± 4.96c	28.25 ± 4.23c
60	15.77 ± 3.35bc	20.05 ± 4.88c	27.74 ± 1.72c	33.38 ± 1.20cd
80	16.01 ± 5.37bc	16.02 ± 5.75bc	29.64 ± 1.91cd	36.99 ± 5.39d
100	20.55 ± 0.89c	25.11 ± 1.79d	33.41 ± 4.68d	34.89 ± 5.32d

内的总硒含量基本稳定在 5.56~5.80 mg·kg<sup>-1</sup> 的范围内,有机硒含量稳定在 5.13~5.32 mg·kg<sup>-1</sup> 范围内。在培养基质施硒的条件下,随着硒添加量的增加,蚯蚓体内总硒及有机态硒含量均有显著的升高。培养至第 15 d 时,相对于对照组来说,硒添加量为 20、40、60、80 mg·kg<sup>-1</sup> 组的蚯蚓总硒及有机态硒含量都有显著提高,但这 4 个处理之间蚯蚓的硒含量差异并不明显,但 100 mg·kg<sup>-1</sup> 硒的添加量较其他处理的蚯蚓的硒含

量又有明显提高。培养至第 45 d 时,相对于对照组来说,硒添加量为 20 mg·kg<sup>-1</sup> 的处理蚯蚓体内硒含量明显提高,20、40、60、80 mg·kg<sup>-1</sup> 的蚯蚓总硒含量较对照组分别显著提高了 151.62%、384.17%、441.91%、498.02%;100 mg·kg<sup>-1</sup> 处理的蚯蚓总硒含量是对照组的约 7 倍,同时也较 40 mg·kg<sup>-1</sup> 和 60 mg·kg<sup>-1</sup> 的处理组蚯蚓体内总硒含量明显提高。培养至第 60 d 时,相对于对照组来说,硒添加量为 20、40、60、80、100 mg·

$\text{kg}^{-1}$  组的蚯蚓总硒含量分别显著提高了183.10%、417.41%、527.24%、623.97%、631.38%;最高的蚯蚓总硒含量达到了  $42.42 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

对于整个试验期来说,随着培养时间的延长,对照组、 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  处理的蚯蚓总硒及有机硒含量没有显著的变化,维持在一个较为稳定的范围内。当硒添加量为  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,培养时间为第45、60 d的蚯蚓总硒含量较前30 d有了提高,分别提高了84.10%、105.22%,而有机态硒分别提高了86.19%和108.64%。当硒添加量为  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,蚯蚓体内总硒和有机硒随着时间的延长在不断增加,但是差异不明显。当硒添加量为  $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,第15 d的蚯蚓总硒含量就达到了  $17.47 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,培养时间为第30 d的蚯蚓硒含量变化不明显,培养时间为45、60 d时蚯蚓硒含量分别显著提高了90.26%、140.28%,有机硒含量分别增加91.38%、143.54%,均有了明显增加。当硒添加量为  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,第15 d的蚯蚓总硒含量就达到了  $22.85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,相当于  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  培养30 d的水平,培养时间为第30 d的蚯蚓总硒含量提高了24.06%,培养时间为第45、60 d的蚯蚓总硒含量分别显著提高了71.32%、85.66%,有机硒含量分别提高了77.18%、84.38%。

图2表示蚯蚓体内有机硒占总硒含量的百分比随时间变化情况。从图中可以看出,在第15 d时,硒添加量为0、20、40、 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的4个处理组有机态硒占总硒百分比相差不大,均在91%~93%之间波动,并且随着时间的延续,有机硒所占比例没有十分明显的变化,均在88%~95%之间波动。 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  硒处理组有机态硒所占百分比在第15 d时就比低

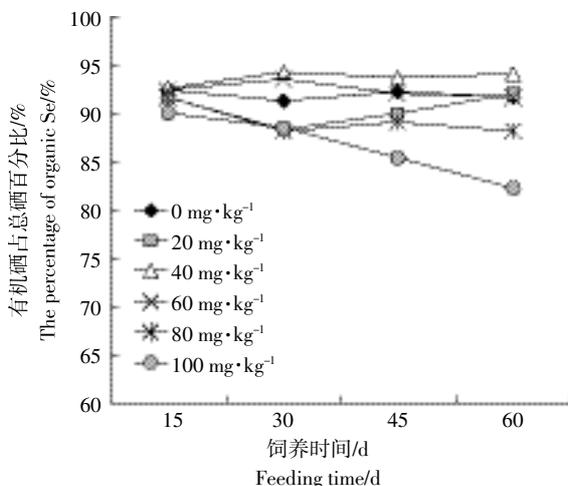


图2 蚓体有机硒占总硒的百分比随时间变化趋势

Figure 2 The percentage of organic selenium trends over time

浓度处理组的要低,并且随着时间的延长,蚓体有机硒含量所占比例逐渐下降,在第60 d时降至最低,只占82.25%。 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  硒处理组蚓体有机硒所占比例相对较稳定,没有随着时间的推移呈现明显变化。与其他处理组相比, $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  硒处理组蚓体有机硒所占总硒比例相对较高,并且随着时间的延长,有机硒占百分比略微增加。

### 3 讨论

#### 3.1 硒浓度和培养时间对蚯蚓生长情况的影响

从试验数据结果可以看出,硒作为动物生长发育所必需的营养元素,在培养过程中添加一定量的硒对于赤子爱胜蚓的生长具有极大的促进作用,然而当硒的添加量超过一定浓度时,则会对蚯蚓产生极大的毒害作用,进而影响蚯蚓的正常生长。欧阳培等<sup>[7]</sup>和刘向辉等<sup>[6]</sup>分别研究了蚯蚓对亚硒酸钠的富集作用和毒性作用,研究发现,蚯蚓饲料中添加的亚硒酸钠的量越高,随着时间的延长,蚯蚓的存活率越低。本试验的结果也验证了当硒添加量为  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,蚯蚓的生长受到了明显的抑制作用,并且蚯蚓的存活率会随着时间的延长而降低。根据饲料添加硒浓度和培养时间对蚯蚓生长情况的影响,确定了获得富硒蚯蚓的最佳硒添加量为  $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的浓度下培养45 d,为富硒蚯蚓的规模化生产提供了一定的理论依据。硒添加量过大会抑制蚯蚓生长,这是因为蚯蚓对硒的富集量有一定的上限,超过这一阈值,就会对蚯蚓的正常生长产生不利影响。然而,本研究只对蚯蚓生长情况进行了研究,而关于硒对蚯蚓生长抑制作用机理和对蚯蚓的繁殖情况的影响还需进行进一步的研究。

#### 3.2 硒浓度和培养时间对蚯蚓硒含量的影响

欧阳培等<sup>[7]</sup>根据试验结果指出,利用蚯蚓的生物富集和转化作用将无生物活性的无机硒转化为具有生物活性的有机硒,可以作为畜、禽和水产品的动物性蛋白添加剂以及防病治病的重要药用资源,从而发展富硒蚯蚓为动物饲料添加剂。刘军<sup>[8]</sup>在牛粪中添加亚硒酸钠后测定蚯蚓体内的硒含量,发现饲养一段时间之后,与不加硒处理的对照相比,蚯蚓体内的总硒含量和有机硒含量均有增加。本试验结果发现,超过一定浓度范围后,随着硒添加浓度的升高,蚓体内有机硒含量逐渐降低。杨咏元等<sup>[9]</sup>发现,培养时间越长,蚯蚓富集的硒量就越多,并指出培养富硒蚯蚓制成动物饲料添加剂,既可以就地生产廉价的动物蛋白,又可以防治禽畜的缺硒病症。从本试验结果可以看出,

随着亚硒酸钠添加量的升高和培养时间的延长,蚯蚓体内的硒含量均有不同程度的升高。对比相同饲养时间内不同硒添加量的蚯蚓组的硒富集量可以得知,添加硒的各处理组总硒含量和有机硒含量都比对照组含量有显著的提高,而  $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组和  $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组之间、 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组和  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组之间没有显著性差异。对比同一硒水平内不同培养时间下的蚯蚓组总硒和有机硒含量可以得知,除了空白对照组以外,其他处理组总硒和有机硒水平在第 45、60 d 比第 15、30 d 均有所提高,且均在第 60 d 时达到最高值。根据硒浓度和培养时间对蚯蚓总硒含量的影响可知,富硒蚯蚓的最佳培养时间为 45 d 或 60 d,且硒添加量为  $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组在此培养时间下培养的蚯蚓体内硒含量无显著性差异。

图 2 中  $0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  硒处理组蚯蚓有机硒占总硒百分比随时间变化不大;与其他 5 组处理相比,  $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  处理组蚯蚓有机硒所占比例随时间增加的最为明显,这可能是因为硒添加量为  $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,蚯蚓对硒的有效利用率达到最大,所以有机硒含量相对较高;与第 15 d 相比,第 30、45、60 d 时,  $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  硒处理组有机硒所占比例有轻微的降低,而  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  硒处理组蚯蚓有机硒随着时间的推移降低的相对较快,这可能是因为这一浓度略微超出了蚯蚓对硒的耐受范围,致使后期蚯蚓对硒的吸收利用效率有所下降,或者部分无机硒通过蚯蚓体表直接进入其体内,未被充分吸收利用。

#### 4 结论

试验结果表明,在一定硒添加量范围内,蚯蚓饲料中添加的亚硒酸钠含量越高、培养时间越长,蚯蚓的存活率越低、蚓体富集的硒含量越高。当基质中的硒添加量为  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,蚯蚓的生长受到了明显的抑制;相同培养时间条件下,硒添加量为  $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  或  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的蚯蚓总硒和有机硒含量均显著高于添加量为  $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  或  $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的处理组;同一较高水平的硒添加量下,培养 45 d 或 60 d 的处理组蚯蚓总硒和有机硒含量均显著高于培养 15 d 或 30 d 的处理组。 $0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  硒处理组蚯蚓有机硒占总硒百分比随时间变化不大,相比较而言,  $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  处理组蚯蚓有机硒所占比例随时间增加的最为明显,  $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  硒处理组有机硒所占比例有轻微的降低,而  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  硒处理组蚯蚓有机硒随着时间的推移降低的相对较快。根据硒添加量和培养时间对

蚯蚓存活率、蚯蚓体内硒含量的影响,通过比较,确定了富硒蚯蚓的最佳培养方案为: 硒添加量为  $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 培养时间为 45 d。

#### 参考文献:

- [1] 黄 峙. 硒的环境生物学及含硒食品[J]. 广州食品工业科技, 2001, 17(3): 30-33.  
HUANG Zhi. The biological cycle of Se and Se sources of foodstuff[J]. *Guangzhou Food Science and Technology*, 2001, 17(3): 30-33. (in Chinese)
- [2] Yang Y, Zhang S Z, Wen B. Accumulation and speciation of selenium in plants as affected by arbuscular mycorrhizal fungus *glomus mosseae*[J]. *Biological Trace Element Research*, 2011, 143(3): 1789-1798.
- [3] 赵 镭, 赵振东, 陈 鹏, 等. 生物富硒对灵芝营养成分的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1275-1280.  
ZHAO Lei, ZHAO Zhen-dong, CHEN Peng, et al. Effect of selenium on the nutritional components of *Ganoderma lucidum*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, 24(7): 1275-1280. (in Chinese)
- [4] 杜 明, 赵 镭, 赵广华, 等. 生物样品中微量硒测定方法的进展[J]. 理化检验(化学分册), 2007(9): 797-802.  
DU Ming, ZHAO Lei, ZHAO Guang-hua, et al. Recent advances of the determination of microamounts of selenium in biological samples[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2007(9): 797-802. (in Chinese)
- [5] Pezzarossa B, Remorini D, Gentile M L, et al. Effects of foliar and fruit addition of sodium selenate on selenium accumulation and fruit quality [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92(4): 781-786.
- [6] 刘向辉, 戈 峰, 徐张红, 等. 亚硒酸钠对蚯蚓的毒性及蚓体富硒作用的研究[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(5): 457-460.  
LIU Xiang-hui, GE Feng, XU Zhang-hong, et al. The toxicity of sodium selenite to earthworm and selenium-accumulating effect of earthworm [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2001, 7(5): 457-460. (in Chinese)
- [7] 欧阳培, 童 斌. 富硒蚯蚓含硒蛋白研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1993, 32(6): 795-798.  
OUYANG Pei, TONG Bin. Study on Se-proteins in the selenium rich earthworm[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1993, 32(6): 795-798. (in Chinese)
- [8] 刘 军. 富硒肥料的研制及其对韭菜生长和品质的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.  
LIU Jun. Research on the processing of selenium-enriched fertilizer and its effects on growth and quality of Chinese chive[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [9] 杨咏元, 杜宝珍, 黄福珍. 蚯蚓富硒作用及其在地方病区应用前景的探讨[J]. 中国环境科学, 1989, 9(3): 197-200.  
YANG Yong-yuan, DU Bao-zhen, HUANG Fu-zhen. A study on the Se enriched earthworms and their future application in endemic regions[J]. *China Environmental Science*, 1989, 9(3): 197-200. (in Chinese)