

沙棘林土壤微生物多样性研究

李玉新, 赵 忠, 陈金泉, 刘恩田

(西北农林科技大学 西部环境与生态教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究不同林龄沙棘人工林土壤微生物多样性的差异,为沙棘林分的衰败机制研究奠定基础。**【方法】**采用 BIOLOG-ECO 微平板法,对不同林龄(8,13,18 年生)沙棘人工林表层土(0~10 cm)微生物利用碳源的动力学特征和土壤微生物多样性进行研究,比较分析土壤微生物利用碳源能力、土壤微生物多样性与沙棘人工林林龄的相关性。**【结果】**18 年生沙棘人工林表层土在短期内(培养 24~60 h)对单一碳源底物的利用能力高于 13 和 8 年生沙棘林表层土,说明 13 和 8 年生沙棘人工林表层土中微生物生长的启动速度较慢,生长停滞期较长。随着林龄的延长,土壤微生物群落的 Shannon 指数(H')、Simpson 指数(D)和 McIntosh 指数(U)的变化规律不同,13 年生沙棘人工林表层土微生物群落的 D 、 H' 值均最大,但 U 值最小;8 和 18 年生沙棘人工林表层土微生物群落的 D 、 H' 、 U 值差异很小。13 年生沙棘人工林表层土微生物利用羧酸类化合物的能力,在培养 72 h 后相对于 8 和 18 年生沙棘人工林均有明显提高;8 和 18 年生沙棘人工林表层土微生物利用醌类化合物的能力,在培养 24~144 h 时相对于 13 年生沙棘人工林有明显优势。在其他化合物的利用能力上,8,13 和 18 年生沙棘人工林表层土微生物未表现出明显的差异。只有 18 年生沙棘人工林表层土在主成分 1 上可以与 13 年生沙棘人工林表层土很好地分离,其他林龄沙棘林表层土在主成分 1,2,3,4 上均未实现分离。**【结论】**沙棘林的微生物多样性与其林龄存在一定关系。

【关键词】 沙棘林;林龄;表层土;微生物功能多样性

【中图分类号】 S714.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)08-0067-08

Study on soil microbial diversity of seabuckthorn forest

LI Yu-xin, ZHAO Zhong, CHEN Jin-quan, LIU En-tian

(Key Laboratory of Environment and Ecology in Western China, Ministry of Education, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The comparative study on soil microbial diversity in seabuckthorn plantations of different ages is to provide theoretical basis for the decay mechanism of seabuckthorn forest. **【Method】** BIOLOG-ECO micro-plate methodology was taken to study dynamic characteristics of micro-organisms using carbon and soil microbial diversity of seabuckthorn plantations in different ages(8,13,18-year)topsoil(0—10 cm), a comparative analysis of the relationship among ability of use carbon, soil microbial diversity and seabuckthorn plantation's age. **【Result】** In the short term(incubation 24—60 h), a single carbon substrate utilization capacity of 18-year topsoil of seabuckthorn plantations is more than that of 13-year and 8-year topsoil, indicating that 13-year, 8-year microbial growth of surface soil starts slowly, and microbial stagnation lasts longer; With the extension of the stand age, the Shannon index(H'), Simpson index(D) and McIntosh index(U) of soil microbial communities shows a different regularity. The D index and the H' index of 13-year topsoil of seabuckthorn plantations microbial communities are the largest, but the U index is the smallest, the D index, H' index, U index of 8-year, 18-year topsoil of seabuckthorn plantations microbial

* [收稿日期] 2010-01-15

[基金项目] 国家“十一五”林业科技支撑计划项目(2006BAD03A1207)

[作者简介] 李玉新(1983—),男,山东潍坊人,在读硕士,主要从事森林培育研究。E-mail:285913693@qq.com

[通信作者] 赵 忠(1958—),男,甘肃宁县人,教授,博士生导师,主要从事半干旱地区植被恢复与重建研究。

E-mail:zhaozh@nwsuaf.edu.cn

communities make little difference; Compared to 8-year and 18-year the capable of using carboxylic acids of topsoil micro-organisms, 13-year seabuckthorn plantations after 72 h culture has a clear advantage. 8, 18-year seabuckthorn plantations on topsoil microorganisms in the use of capacity of sugar compounds from 24 h to 144 h has an obvious advantage than 13-year. The capacity of using other compounds on topsoil micro-organisms of seabuckthorn plantation in different ages doesn't show a great difference; Only 18-year on the main component PCA1 of topsoil has a good separation from 13-year, others are not met. 【Conclusion】 Difference in microbial diversity has a certain relationship with seabuckthorn's ages.

Key words: seabuckthorn forest; stand age; topsoil; microbial functional diversity

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,其参与了土壤有机质分解、腐殖质形成、土壤养分转化和循环等过程,其群落结构组成及活性变化是衡量土壤质量、土壤肥力和作物生产力的一个重要指标^[1]。土壤微生物的多样性及活性,不仅提高了土壤生态系统的稳定性与和谐性,也提高了对抗土壤微生态环境恶化的缓冲能力,对于促进林区土壤生态、微环境气候改善等有积极作用。由于方法上的限制和微生物自身的变异性,目前还不可能将土壤中的全部微生物培养出来,而且对于土壤微生物种属的鉴定分类也是一件不易的工作。因此,在实际研究中,通常从某一侧面或某一角度来近似或间接地描述土壤微生物的多样性状况。

研究土壤微生物多样性的方法很多,从国内外目前采用的方法来看,大致上包括以下几类^[2]:(1)传统的微生物平板纯培养方法;(2)Biolog 微平板分析方法;(3)脂肪酸分析方法;(4)分子生物学方法;(5)其他方法,如用于微生物生物量测定的氯仿熏蒸法(Fumigation-incubation)、底物诱导呼吸法(Substrate-induced respiration)和光合微生物色素法等。由于土壤微生物群落结构组成复杂、数量巨大,对其研究的难度较大。传统的研究方法主要是纯培养技术,但这种方法只能分离到 1%~10% 的微生物,并不能够全面、真实地反映自然状况下土壤微生物群落结构的变化^[3-4]。Biolog 微平板法常用于描述土壤中快速生长型或富营养微生物类群的活性,其虽不能反映土壤中生长缓慢的微生物信息,但可用于估价土壤微生物群落的代谢多样性和功能多样性,获得土壤微生物群落结构和代谢功能方面的信息,如比较不同土壤类型^[5]、同类土壤不同植物物种^[6]、不同植被^[7]根际土壤微生物群落的功能多样性等。脂肪酸分析方法、分子生物学方法等,无需分离培养就可反映微生物的群落结构信息,但试验条件要求高,耗时长,成本高,且无法获得有关微生物群落总体活性与代谢功能的信息。

近年来,我国北方部分地区,如陕西省永寿县渡马乡马莲滩流域十几年林龄的人工林内,大面积沙棘出现了衰败或死亡的现象,给当地的生态环境和区域经济发展造成了巨大损失,已经引起了人们的高度重视。为了探讨沙棘人工林的死因,本研究采用 BIOLOG-ECO 微平板法,对陕西永寿县马莲滩流域不同林龄沙棘人工林表层土壤微生物的多样性进行了研究,旨在揭示土壤微生物的差异与沙棘林衰败的关系,从而为沙棘林分的衰败机制研究及沙棘死亡的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2009-06-23 在陕西永寿县马莲滩流域崑顶立地上,选择不同林龄(8, 13, 18 年)的沙棘人工纯林各 3 块,共设置 9 块面积为 20 m×20 m 的样地。在每一样地四周及中部随机选 5 株沙棘样木,在距离样木 50 cm 处,分 4 个方位采用土柱法(规格 20 cm×20 cm)采取 0~10 cm 土层土样,将每一样地表层土分别采集到装有冰袋的自封袋中,带回实验室,过孔径 2 mm 筛,去掉植物残体和可见土壤动物,置于 4 ℃ 冰箱贮存。不同林龄沙棘表层土样品的编号及其基本理化性质如表 1 所示。不同林龄沙棘人工林样地的概况如表 2 所示。

1.2 试验方法

1.2.1 试验步骤 称取 10 g 新鲜土置于 100 mL 灭菌的 8.5 g/L 生理盐水中,于 70 r/min 振荡 30 min。在超净台上吸取 1 mL 稀释液加入到装有 19 mL 8.5 g/L 灭菌生理盐水的试管中,得到 5×10^{-2} mL/mL 的稀释液。将上述稀释液倒入灭菌的 V 型槽中,用加样器向 BIOLOG-ECO 96 孔板的各孔中分别添加 150 μ L 稀释液(使用加样枪的 prog1),每个土壤样品 3 个重复,25 ℃ 恒温培养,于培养 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 h 后,使用 BIOLOG EMAX 读板仪读取各孔在 590

nm 波长下的吸光度(OD₅₉₀)。

表 1 供试土壤样品的基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of the tested soils

样地编号 No.	林龄/年 Stand age	体积质量/(g·cm ⁻³) Bulk density	pH	全 N/(g·kg ⁻¹) Nitrogen	速效 N/(mg·kg ⁻¹) Available nitrogen
1	8	1.33±0.03 aA	8.67±0.07 aA	78.20±1.70 bB	35.41±1.55 bB
2	13	1.29±0.06 aA	8.57±0.07 aA	113.10±10.80 aA	59.76±6.82 aA
3	18	1.30±0.04 aA	8.66±0.14 aA	86.60±2.60 abAB	43.31±1.72 bAB

注:同列数据后标相同字母者表示差异不显著;标不同小写字母表示在 $P=0.05$ 水平显著;标不同大写字母表示在 $P=0.01$ 水平显著(DPS 检验)。下表同。

Note:Column data marked with the same letter show no significant difference;superscript lowercase letters in the level of $P=0.05$ is significant;superscript capital letters in the level of $P=0.01$ is significant(DPS test). The same as below.

表 2 不同林龄沙棘人工林样地的概况

Table 2 The plot overview of Seabuckthorn plantations at different ages

样地 编号 No.	郁闭(覆盖)度/% Canopy (Coverage) density	平均株高/m Average high	平均直径/cm Average diameter	平均冠幅/m Average crown		密度/(株·hm ⁻²) Density	更新幼苗数/ (株·hm ⁻²) Update the number of seedlings
				东西 E&W	南北 S&N		
1	88.33±1.67 aA	2.47±0.32 bB	3.97±0.13 bB	1.53±0.18 bA	1.47±0.15 bB	8 925±101 aA	1 566±88 aA
2	76.67±1.67 bA	3.20±0.20 bB	5.17±0.12 bB	2.33±0.15 aA	2.43±0.09 aAB	6 808±87 bB	833±60 bB
3	86.67±3.33 aA	5.10±0.23 aA	10.23±0.79 aA	2.57±0.26 aA	2.77±0.34 aA	5 333±44 cC	241±22 cC

1.2.2 数据处理 数据使用 Excel 2003 软件进行制图和线性回归。微生物整体活性指标采用平均吸光度(Average Well Color Development,AWCD)来描述,计算 AWCD 并绘制 AWCD 随温育时间的变化曲线。采用 Shannon、Simpson 和 Mcintosh 3 种多样性指数计算土壤微生物碳源利用多样性^[8]。选取合适的时间点,将数据转入 SPSS 统计软件进行多样性指数的计算和主成分分析(应用 SPSSV.13.0软件的数据 Reduction 程序)。

1.2.3 各种指数的计算 平均吸光度(AWCD)可以评判微生物群落对碳源利用的总能力,其计算公式为:

$$AWCD=\sum(A_i-A_{A_1})/31。$$

式中: A_i 为第 i 孔的相对吸光度, A_{A_1} 为 A_1 孔的相对吸光度。

Shannon 指数(H')可用于评估物种的丰富度,其计算公式为:

$$H'=-\sum P_i\ln(P_i)。$$

式中: P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

Simpson 指数(D)是用来评估优势度的指数,常用其变型 Gini 指数来评价多样性,具体计算公式为:

$$D=1-\sum(P_i)^2。$$

式中: P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

Mcintosh 指数(U)是基于群落物种多维空间距离的多样性指数,实际上是均一性的量度,可用下式

进行计算:

$$U=\text{SQRT}(\sum N_i^2)。$$

式中: N_i 是第 i 孔的相对吸光值。

2 结果与分析

2.1 不同林龄沙棘林土壤微生物利用碳源的动力学特征

BIOLOG-ECO 微平板每组 31 个孔(除去对照孔)相对吸光度的平均值(即 AWCD 值)随温育时间的变化,可以作为评价微生物群落整体活性高低的一个有效指标,而且 AWCD 值与土壤微生物群落中能利用单一碳源的微生物数目和种类有关^[9]。永寿县马莲滩流域不同林龄沙棘人工林的表层土,在温育过程中 AWCD 的变化曲线如图 1 所示。从图 1 可以看出,随着温育时间的延长,不同林龄沙棘人工林表层土的单一碳源底物利用能力(Sole-carbon-source Utilization,SCSU),呈先逐渐增加最后趋于平稳的趋势。说明随着温育时间的延长,不同林龄沙棘人工林表层土中能够利用单一碳源底物的微生物数目逐渐增加,导致单一碳源底物的消耗量增加,即发生颜色反应的程度越大,颜色越深,AWCD 相应增大。

由图 1 还可以看出,不同林龄沙棘人工林表层土的单一碳源底物利用能力存在差异,但差异并不显著;在温育的 24~96 h,18 年生沙棘人工林表层土对单一碳源底物的利用能力总体较高,之后随着温育时间的延长,其对单一碳源底物的利用能力较 8,13 年生人工林表层土低;13 年生沙棘人工林表层

土对单一碳源底物的利用能力在温育的24~72 h最低,72 h后逐渐增加,在108~168 h时达到最高;温育的24~72 h和120~168 h,8年生沙棘人工林表层土对单一碳源底物的利用能力介于13和18年生沙棘人工林之间,在72~120 h时,其对单一碳源

底物的利用能力较低。18年生沙棘人工林表层土在温育前期的较短时期内(24~60 h),对单一碳源底物的利用能力高于13和8年生沙棘人工林表层土,说明13和8年生沙棘人工林表层土中微生物的生长启动速度慢,生长停滞期较长。

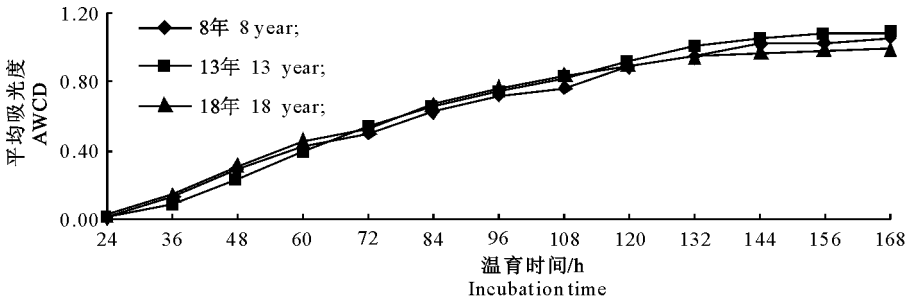


图 1 不同林龄沙棘人工林表层土微生物群落温育过程中 AWCD 的变化

Fig. 1 Variation of AWCD with the incubation of microbial community of surface soil in seabuckthorn plantations of different ages

分析不同林龄沙棘人工林土壤微生物利用碳源的动力学特征可以发现,在利用单一碳源底物的能力达到稳定的状态下,3种林龄表层土的 AWCD 值表现为13年>8年>18年,说明13年生沙棘人工林表层土微生物利用单一碳源底物的能力最强,微生物群落总数最高;8年生沙棘人工林表层土微生物利用单一碳源底物的能力较强,微生物群落总数

居中;18年生沙棘人工林表层土微生物利用单一碳源底物的能力最弱,微生物群落总数最低。由图2和表3可见,比较不同林龄沙棘根系活力和沙棘根瘤状况,可知13年生沙棘林生长状况最好,18年生沙棘林最差,这与上述3种林龄沙棘人工林表层土壤微生物利用单一碳源底物能力的研究结论相一致。

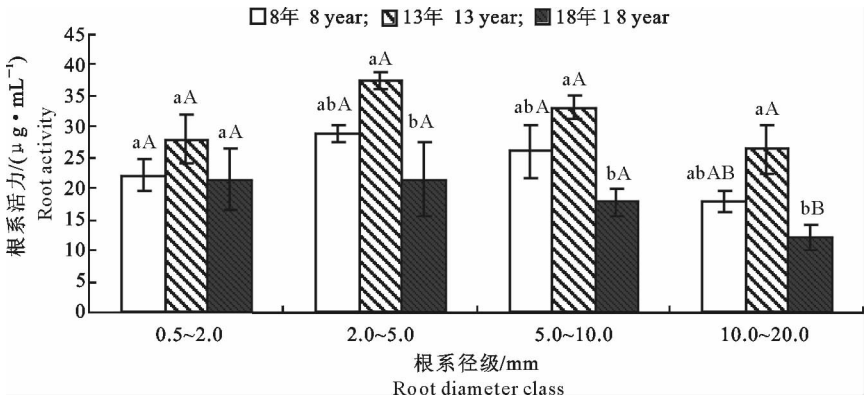


图 2 不同林龄沙棘林根系活力的比较(0~10 cm 土层)

Fig. 2 Effects of different forest ages seabuckthorn forest root activity (0—10 cm soil layer)

表 3 不同林龄沙棘人工林根瘤情况的比较

Table 3 Seabuckthorn plantations of different ages nodule status

土层深度/cm Soil depth	林龄/年 Age	活根瘤数目 Number of live nodule	活根瘤比例/% Proportion of live root nodule	活根瘤横径/cm Live nodule diameter	活根瘤纵径/cm Live nodule longitudinal diameter	活根瘤鲜质量/(g·m ⁻²) Nodule fresh weight of living	活根瘤干质量/(g·m ⁻²) Live nodule dry heavy
0~10	8	27.67±2.73 abA	0.85±0.02 bB	0.91±0.03 cC	0.56±0.03 cC	9.10±0.38 cB	2.76±0.31 cB
	13	35.67±1.67 aA	0.93±0.01 aA	1.49±0.04 bB	0.90±0.03 bB	14.35±0.88 bB	4.72±0.32 bB
	18	25.00±2.65 bA	0.63±0.00 cC	1.89±0.01 aA	1.21±0.03 aA	25.25±1.52 aA	8.27±0.59 aA

2.2 不同林龄沙棘人工林土壤微生物利用不同种类碳源的动力学特征

按化学基团的性质将 ECO 板上的 31 种碳源分

成 6 类,即胺/氨基化合物类、氨基酸类、酯类、羧酸类、双亲化合物类和聚合物,并测定每类碳源的平均 OD 值。由图 3 可见,6 类碳源 OD₅₉₀ 值总体上均随

着培养时间的延长而增大,表明微生物利用碳源的量呈逐渐增加的趋势。在培养 72 h 后,13 年生沙棘人工林表层土微生物利用羧酸类化合物的能力相对于 8,18 年生沙棘人工林有明显优势。在培养 24~

144 h 时,8,18 年生沙棘人工林表层土微生物利用醣类化合物的能力较 13 年生沙棘人工林有明显优势。在对其他化合物的利用上,不同林龄沙棘人工林表层土微生物未表现出较大的差异。

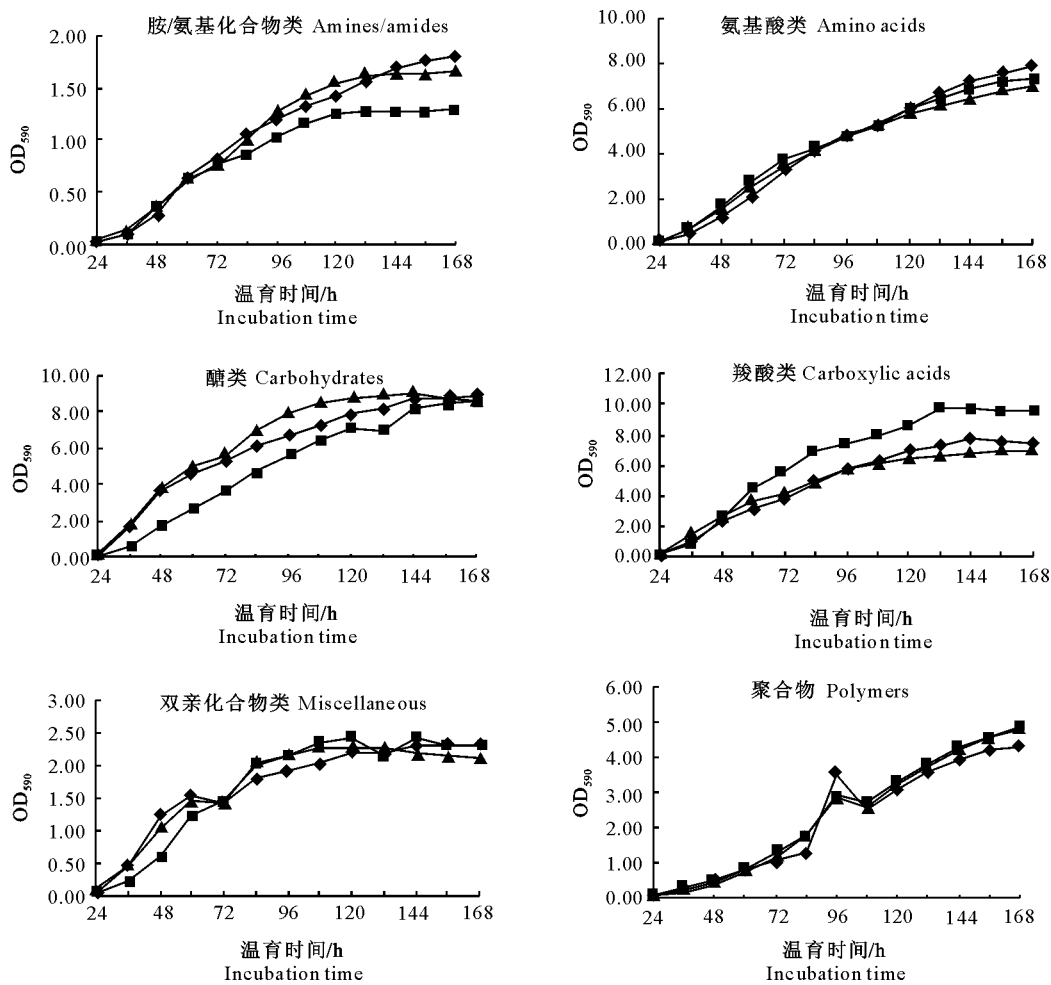


图 3 不同林龄沙棘人工林表层土微生物利用不同种类碳源时吸光度(OD₅₉₀)的变化
—◆—. 8 年;—■—. 13 年;—▲—. 18 年

Fig. 3 OD₅₉₀ for different carbon sources utilized by microbe of surface soil in seabuckthorn plantations of different ages
—◆—. 8 year;—■—. 13 year;—▲—. 18 year

2.3 不同林龄沙棘林土壤微生物群落功能的多样性

BIOLOG-ECO 微平板每组 31 种碳源的测定结果形成了描述微生物群落代谢特征的多元向量,不易直观比较,因此应用主成分分析(Principal component analysis,PCA)来比较不同林龄沙棘表层土微生物群落对微平板上 31 种碳源的利用情况。本试验采用温育 36 h 的数据进行主成分分析,结果如图 4 所示。从图 4 可以看出,只有 18 年生沙棘人工林表层土在主成分 1 (PCA1)上与 13 年生沙棘人工林表层土有很好的分离,其他林龄沙棘人工林在主成分 1 (PCA1)和主成分 2 (PCA2)上均未实现分

离;各林龄沙棘人工林表层土在主成分 3 (PCA3)和 4(PCA4)上也均未实现分离。由此可见,沙棘林龄对其表层土中微生物群落的碳源利用特性未产生太大的影响。

主成分 1、主成分 2、主成分 3、主成分 4 分别占总变异的 26.6%,25.6%,16.6%和 10.9%,4 种主成分共占总变异的 79.7%,因此这 4 种主成分是变异的主要来源。由 31 种碳源在 4 种主成分上的载荷值(表 4)可见,集中在主成分 1,2,3,4 上的碳源分别有 13,10,6 和 2 种。由于沙棘林龄对表层土中微生物群落的碳源利用特性没有太大影响,所以不同林龄表层土中微生物群落利用的主要碳源有:胺/

氨基化合物类 1 种(苯乙胺)、氨基酸类 3 种(L-精氨酸、L-天门冬酰胺、L-丝氨酸)、醣类 4 种(β -甲基-D-葡萄糖苷、D-纤维二糖、D-甘露醇、N-乙酰-D 葡萄糖氨)、羧酸类 7 种(γ -羟丁酸、 α -丁酮酸、2-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸、D-半乳糖酸 γ -内酯、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖胺酸)、双亲化合物类 2 种(D, L- α -磷酸甘油、1-磷酸葡萄糖)、聚合物 3 种(α -环式糊精、吐温 40、吐温 80)。

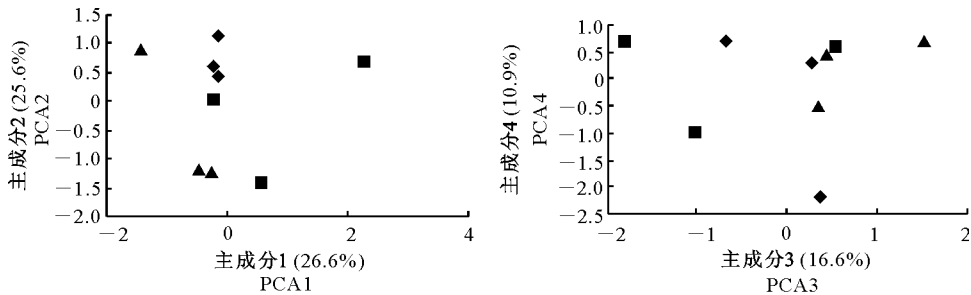


图 4 不同林龄沙棘人工林表层土微生物功能多样性的主成分分析

—◆—, 8 年; —■—, 13 年; —▲—, 18 年
Fig. 4 PCA on microbial function diversity of surface soil in seabuckthorn plantations of different ages
—◆—, 8 year; —■—, 13 year; —▲—, 18 year

表 4 ECO 板上 31 种碳源在主成分 1,2,3,4 上的载荷值

Table 4 Thirty-one carbon substrates loaded on the first, second, third and fourth of principal components in analysis of ECO microplate data

碳源化学类别 Chemical guild	底物 Substrate	分子式 Chemical formula	主成分 1 PCA1	主成分 2 PCA2	主成分 3 PCA3	主成分 4 PCA4
胺/氨基化合物类 Amines/amides	苯乙胺 Phenyletyl hylamine	C ₈ H ₁₁ N	0.03	0.59	-0.13	-0.51
	腐胺 Putrescine	C ₄ H ₁₂ N ₂	-0.16	0.64	0.01	0.45
氨基酸类 Amino acids	甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L glutamic acid	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₅	0.14	-0.70	-0.53	-0.33
	L-精氨酸 L-Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	-0.74	0.60	-0.01	-0.07
	L-天门冬酰胺 L-Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	-0.58	0.70	0.19	0.23
	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	-0.37	0.39	-0.80	-0.03
	L-丝氨酸 L-Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	-0.43	0.25	0.85	-0.14
	L-苏氨酸 L-Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	-0.14	-0.63	0.50	0.24
醣类 Carbohydrates	α -D-乳糖 α -D-Lactose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.06	-0.90	0.11	-0.17
	β -甲基-D-葡萄糖苷 β -Methyl-D-glucoside	C ₇ H ₁₄ O ₆	0.14	0.95	0.00	-0.17
	D-纤维二糖 D-Cellobiose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.64	0.17	-0.48	0.35
	D-甘露醇 D-Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	-0.02	0.65	0.07	-0.24
	D-木糖/戊醛糖 D-Xylose	C ₅ H ₁₀ O ₅	0.65	0.49	0.18	0.28
	i-赤藓糖醇 i-Erythritol	C ₄ H ₁₀ O ₄	-0.07	0.43	0.14	-0.81
	N-乙酰-D 葡萄糖氨 N-Acetyl-D-glucosamine	C ₈ H ₁₅ NO ₆	0.36	0.80	-0.05	-0.19
羧酸类 Carboxylic acids	γ -羟丁酸 γ -Hydroxybutyric acid	C ₄ H ₈ O ₃	-0.27	-0.52	0.64	0.32
	α -丁酮酸 α -Ketobutyric acid	C ₄ H ₆ O ₃	0.68	0.32	-0.34	0.44
	2-羟基苯甲酸 2-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	-0.12	0.09	0.76	0.34
	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	0.57	0.51	-0.04	0.51
	D-半乳糖酸 γ -内酯 D-Galactonicacid γ -lactone	C ₆ H ₁₀ O ₆	0.60	0.17	0.31	0.08
	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonicacid	C ₆ H ₁₀ O ₇	0.62	0.51	0.05	0.40
	D-葡萄糖胺酸 D-Glucosaminicacid	C ₆ H ₁₃ NO ₆	0.85	-0.24	0.22	-0.02
	D-苹果酸 D-Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	0.24	0.29	0.47	0.35
	衣康酸 Itaconic acid	C ₅ H ₆ O ₄	-0.75	0.22	-0.10	0.19
	D, L- α -磷酸甘油 D, L- α -Glycerolphosphate	C ₃ H ₉ O ₆ P	0.14	0.68	0.26	-0.64
双亲化合物类 Miscellaneous	1-磷酸葡萄糖 Glucose-1-phosphate	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	0.89	0.29	0.17	-0.18
	丙酮酸甲酯 Pyruvicacidmethylester	C ₄ H ₆ O ₃	0.50	0.45	-0.38	0.24
聚合物 Polymers	α -环式糊精 α -Cyclodextrin	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	0.91	0.20	0.23	-0.13
	肝糖 Glycogen	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	0.41	-0.16	-0.82	-0.07
	吐温 40 Tween 40	—	0.51	0.24	0.57	0.29
	吐温 80 Tween 80	—	0.85	0.11	0.37	0.23

2.4 不同林龄沙棘林的土壤微生物多样性

由图 5 可以看出,随着沙棘人工林林龄的增加,其表层土微生物群落的 3 种多样性指数呈现出不同的变化规律。其中 Shannon 指数(H') (统计量 $F=14.043$,相伴概率值 $P=0.006$)的相关系数最大,说明沙棘林龄差异的最主要影响是改变微生物物种的丰富度。13 年生沙棘人工林表层土微生物群落的 D 和 H' 值均最大,但是 U 值最小,说明温育 36 h 时,13 年生沙棘人工林表层土微生物群落多样性指数最大,但均一性最差,即 13 年生沙棘人工林表层土微生物群落种类最多,这与 AWCD 值的分析结果基本一致。由图 5 可知,8,18 年生沙棘人工林表层土微生物群落 D 、 H' 、 U 值的差异均较小。

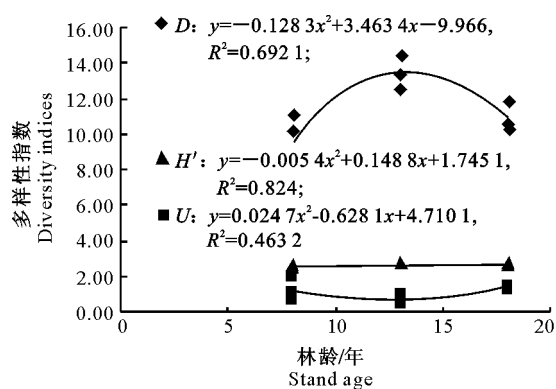


图 5 不同林龄沙棘人工林表层土微生物群落功能多样性的比较

Fig. 5 Comparison of microbial community functional diversity indices of surface soil in seabuckthorn plantations of different ages

3 讨 论

目前,BIOLOG 测试系统作为一种研究微生物群落的快速简便方法,已被广泛应用于土壤微生物代谢功能多样性的分析^[10-11]。BIOLOG 系统是基于微生物群落中微生物的存活、生长以及竞争需要不同的碳源,从而根据微生物对碳源利用模式的差异来鉴定微生物群落功能的多样性。虽然 BIOLOG 技术与传统的培养法有相似的缺点^[12-13],即均会抑制某些种群的生长,但在微孔中的微生物群落并不会被定向选择为一种,而且底物碳源的多样性决定了 BIOLOG 能产生广泛的选择压,从而使不可培养的微生物种群也能在微孔板上得以生存,并使其发生颜色反应^[14]。本试验中,不同林龄沙棘人工林表层土微生物利用碳源的差异性研究结果,充分说明了 BIOLOG 是研究微生物群落功能多样性的较理想方法之一。

本研究中,18 年生沙棘人工林表层土在温育早期对单一碳源底物的利用能力高于 13 和 8 年生沙棘人工林表层土,说明 13 和 8 年生沙棘人工林表层土中微生物生长启动速度较慢,生长停滞期较长。18 年生沙棘人工林表层土在 PCA1 上与 13 年表层土有很好的分离,这表明随着沙棘林龄的增加,微生物群落的碳源利用特性发生了一定的变化,微生物功能多样性得到了一定的加强。

从总体上看,8,13 和 18 年生沙棘人工林表层土中微生物群落类型和功能多样性的差异不大,只有特定功能菌群的数量和活性存在差异。这可能是由于土壤微生物群落的结构和活性已基本达到稳定状态,土壤微生物对碳源底物的利用能力自然强而稳定,且在短期内不容易被破坏,这与胡君利等^[15]关于种植水稻对古水稻土与现代水稻土微生物功能多样性影响的研究结论类似。特定功能菌群的数量和活性存在差异,说明不同林龄沙棘通过改变土壤的理化性质,间接地影响土壤中特定功能菌群的数量和活性,进而影响沙棘表层土的生物化学环境质量,这与胡君利等^[16]对浙江慈溪不同利用年限水稻土主要微生物过程强度的研究结果基本一致。

由于 BIOLOG 微平板仅通过微生物群落对单一碳源底物利用能力的差异,来反映物种多样性的不同,因而常常会忽视物种的差异,进而干扰分析的准确性^[17]。沙棘为固氮植物,本研究中,3 种不同林龄沙棘人工林表层土的矿质氮含量均较高(因为沙棘具根瘤,固氮能力较强,根瘤死后矿质氮释放到土壤中),土壤中的 C/N 相对较低,从而影响微生物利用碳源的活性^[15]。因为 BIOLOG 系统是利用微生物对单一碳源的利用程度和强度,获取土壤微生物群落结构和代谢功能方面的信息,3 种不同林龄沙棘林表层土中大量氮底物利用微生物或自养性微生物的存在,影响了土壤微生物群落结构及其对碳源的利用能力,即部分微生物对单一碳源利用能力较弱,对氮源利用能力较强,仅用 BIOLOG 系统无法将这部分微生物分离出来。另外,还有部分微生物由于土壤中矿质氮含量较高而导致其活性受到抑制,这与薛冬等^[18]对不同利用年限茶园土壤矿化、硝化作用特性的研究结论基本一致。因此,土壤微生物对氮底物的利用能力是判定土壤微生物群落功能多样性的另一个重要指标,是测定碳底物利用能力的 BIOLOG 系统的一个有效补充,如区余端等^[19]在对车八岭山地常绿阔叶林冰灾后土壤微生物群落功能多样性的研究中考虑了该因素的影响。因此,

在研究沙棘土壤微生物时应将此因素考虑在内,但由于条件限制,本研究对其未进行具体分析,在后续研究中应对其进行深入探讨。

4 结 论

在利用单一碳源底物能力达到稳定的状态下,不同林龄沙棘人工林表层土的 AWCD 值表现为 13 年>8 年>18 年,说明 13 年生沙棘人工林表层土微生物群落总数最为稳定,代谢活性最强,18 年生沙棘人工林表层土微生物群落总数最不稳定,代谢活性最弱。这与不同林龄沙棘人工林生长状况的研究结论(13 年林龄沙棘林的生长状况最好,18 年林龄沙棘生长状况最差,处于衰败状态)基本一致,从而进一步说明沙棘人工林表层土微生物的差异,与沙棘林的衰败存在一定关系。

13 年生沙棘人工林表层土微生物利用羧酸类化合物的能力较强,8 和 18 年生沙棘人工林表层土微生物利用酯类化合物的能力较强,但在其他化合物利用能力上,不同林龄沙棘人工林表层土微生物没有表现出很大的差异,说明不同林龄沙棘人工林表层土共同具有多数种类的微生物,单独具有的特定功能微生物较少。

13 年生沙棘人工林表层土微生物多样性(数目、种类)最高,而 8 和 18 年生沙棘人工林表层土微生物多样性差异不大。说明 8 和 18 年生沙棘人工林表层土微生物群落特定功能菌群的数量不稳定,而 13 年生沙棘人工林表层土微生物群落特定功能菌群的数量较为稳定,而特定功能菌群如根瘤菌越稳定,则越有利于根瘤菌与沙棘根瘤的互利共生关系,对沙棘的生长就越有利,因此特定功能菌群的稳定性从侧面反映了沙棘林的生长状况。

不同林龄沙棘对表层土中微生物群落的碳源利用特性没有太大影响,不同林龄林分表层土中微生物群落利用的主要碳源中,胺/氨基化合物类、氨基酸类、酯类、羧酸类、双亲化合物类和聚合物分别有 1,3,4,7,2 和 3 种。

[参考文献]

- Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review [J]. *Biol Fertil Soils*, 1999, 29: 111-129.
- 章家恩,蔡燕飞,高爱霞,等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述 [J]. *土壤*, 2004, 36(4): 346-350.
Zhang J E, Cai Y F, Gao A X, et al. Experimental research methods outlined in soil microbial diversity [J]. *Soils*, 2004, 36(4): 346-350. (in Chinese)
- Bakken L R. Separation and purification of bacteria from soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49: 1482-1487.
- Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a nature community [J]. *Nature*, 1990, 344: 63-65.
- Ritz K, Dighton J, Giller K E. Beyond the biomass: Compositional and functional analysis of soil microbial communities [M]. Chichester, UK: John Wiley Sons, 1994.
- Zak C J. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach [J]. *Soil Biology Biochemistry*, 1994, 26: 1101-1108.
- Grayston S J, Wang S, Campbell C D, et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere [J]. *Soil Biology Biochemistry*, 1998, 30: 369-378.
- Magurran A E. Ecological diversity and its measurement [M]. New Jersey: Princeton University Press, 1988: 141-162.
- Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of bioluminescence microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3): 203-213.
- 郑 华, 欧阳志云, 方志国, 等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究的应用 [J]. *土壤学报*, 2004, 41(3): 456-461.
Zheng H, Ouyang Z Y, Fang Z G, et al. Application of BIOLOG to study on soil microbial community functional diversity [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(3): 456-461. (in Chinese)
- 席劲瑛, 胡洪营, 钱 易. BIOLOG 方法在环境微生物群落研究中的应用 [J]. *微生物学报*, 2003, 43(1): 138-141.
Xi J Y, Hu H Y, Qian Y. Application of BIOLOG system in the study of microbial community [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(1): 138-141. (in Chinese)
- Haack S K, Garchow H, Klug M J. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns [J]. *Applied and Environment Microbiology Ecology*, 1995, 61: 1458-1468.
- Konopka A, Oliver L, Turco R F J. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 35: 103-115.
- Marschner P, Neumann G, Kania A, et al. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) [J]. *Plant Soil*, 2002, 246: 167-174.
- 胡君利, 林先贵, 褚海燕, 等. 种植水稻对古水稻土与现代水稻土微生物功能多样性的影响 [J]. *土壤学报*, 2007, 44(2): 280-287.
Hu J L, Lin X G, Zhu H Y, et al. Effects of rice cultivation on microbial functional diversity in ancient and present paddy soils [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(2): 280-287. (in Chinese)