

三江源区不同退化演替阶段高寒草甸土壤酶活性和微生物群落结构的变化

胡雷¹, 王长庭^{1*}, 王根绪², 马力¹, 刘伟³, 向泽宇⁴

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610041; 2. 中国科学院水利部成都山地灾害与环境研究所, 四川 成都 610041; 3. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 4. 中国科学院水生植物与流域生态重点实验室 中国科学院武汉植物园, 湖北 武汉 430074)

摘要:对三江源区不同退化演替阶段的高寒草甸土壤酶活性和微生物群落结构进行分析, 结果表明: 1) 土壤微生物种类和数量并不随着高寒草甸的退化而降低, 而是在中度退化阶段达到最高; 2) 不同退化演替过程, 中度退化阶段土壤微生物的结构更加复杂; 3) 不同土层中, 0~10 cm 土壤微生物的多样性更加丰富, 其群落结构能更好地适应外界环境的变化; 4) 5 种土壤酶的酶活性均随土层深度的增加而显著降低 ($P < 0.05$)。在不同退化演替阶段, 碱性磷酸酶的活性随演替的进行而显著降低 ($P < 0.05$); 蛋白酶和多酚氧化酶的酶活性最大值出现在中度退化演替阶段, 最小值则在未退化阶段(原生植被)出现; 蔗糖酶和脲酶活性在 4 个演替阶段中均无显著变化 ($P > 0.05$)。不同酶活性对外界环境变化敏感性不同, 蛋白酶、碱性磷酸酶和多酚氧化酶具有较高的敏感性, 而脲酶和蔗糖酶活性的敏感性较低; 5) 土壤酶活性与土壤微生物在高寒草甸不同退化演替阶段具有显著相关性 ($P < 0.05$)。土壤酶活性、土壤微生物群落结构可以作为一个综合指标, 来指示三江源区高寒草甸的演替阶段和退化程度。

关键词:高寒草甸; 退化演替阶段; 土壤酶活性; 土壤微生物群落; 磷脂脂肪酸(PLFA)

中图分类号: S812.2; Q948.15 文献标识码: A 文章编号: 1004-5759(2014)03-0008-12

DOI: 10.11686/cyxb20140302

三江源区(又称江河源区)地处青藏高原腹地, 是青藏高原重要组成部分, 也是我国长江、黄河和澜沧江的发源地, 被誉为“中华水塔”^[1]。该地区生态系统类型主要包括森林生态系统、草原生态系统、荒漠生态系统、草甸生态系统、湿地生态系统和农田生态系统, 这些生态系统孕育了种类繁多、特有的动植物种类, 发挥着多种重要的生态服务功能, 如水源涵养、养分循环、气候调节、生物多样性维持和牧业生产等^[2]。三江源区草地以高寒草原化草甸为主要草地类型, 其分布面积占三江源区总草地面积的 53.78%^[3], 高寒草甸多分布在海拔 3000 m 以上, 长期受高寒气候环境条件影响, 植被类型主要为寒冷湿中生的多年生草本植物群落, 包括以矮嵩草(*Kobresia humilis*)草甸、金露梅灌丛(*Potentilla fruticosa* shrub)草甸、小嵩草(*Kobresia pygmaea*)草甸以及藏嵩草(*Kobresia tibetica*)沼泽草甸为主要建群种^[4]。近年来由于受到全球气候变化和人类活动的干扰, 青藏高原草地退化严重, 特别是三江源地区高寒草甸发生大面积退化, 如青海“黑土滩”面积在 1988 年已达到 619.1 万 hm^2 ^[5], 在 1999 年时达到 703.19 万 hm^2 ^[6]。研究表明, 长期过度放牧使草地的植被覆盖度和初级生产力降低, 植被碳储量和土壤有机碳含量下降, 生物多样性减少, 土壤养分和含水量下降, 土壤侵蚀和水土流失严重, 对气候的敏感性增强等^[1,7-11], 直接威胁到该地区人类和家畜的生存和发展, 也威胁到长江、黄河中下游地区的生态平衡^[6]。然而, 有关高寒草甸生态系统退化原因、过程和修复机理的研究多以地上部分植被生物量的变化、土壤理化性质和土壤微生物活性为主要对象^[12-13], 而土壤微生物群落结构和多样性变化的研究相对较少^[14], 严重制约着受损高寒草甸生态系统的修复理论的拓展。

土壤微生物作为土壤的重要组成部分, 受土壤环境和地上生物多样性的影响, 可以用来较早地预测土壤环境

* 收稿日期: 2013-09-26; 改回日期: 2013-11-12

基金项目: 西南民族大学优秀人才培养工程项目(13ZYXS81), 国家自然科学基金项目(31370542), 国家 973 计划项目(No. 2007CB411504)和西南民族大学研究生创新型科研项目资助。

作者简介: 胡雷(1991-), 男, 河南舞阳人, 在读硕士。E-mail: hl007873@sohu.com

* 通讯作者。E-mail: wangct6@163.com

的变化,是土壤质量和土壤恢复性能评价的一项重要指标^[15];土壤酶是由微生物、动植物活体分泌及由动植物残体、遗骸分解释放于土壤中的一类具有催化能力的生物活性物质^[16],作为土壤生态系统的组分之一,在土壤物质循环和能量转化过程中起着重要作用。土壤酶活性作为土壤生物功能多样性和微生物活性潜力的指标,可以及时反映土壤生物的改变^[17]。近年来,以 Biolog 平板法、磷脂脂肪酸(phospholipids fatty acid, PLFA)法、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)法等用于评价土壤微生物群落结构、功能多样性等方法的利用,促进了土壤微生物生态研究的蓬勃发展,如 Rasmussen 和 Sørensen^[18]用 DGGE 技术研究了模拟 Hg 污染土壤中微生物遗传多样性的改变;胡元森等^[19]采用该技术直接以土壤微生物总基因组 DNA 为研究对象,分析了不同种植茬次黄瓜根区土壤微生物群落的动态变化。

PLFA 是活体微生物细胞膜恒定组分,具有种、属特异性,对环境因素敏感,在生物体外迅速降解,因此特定菌群 PLFA 的数量变化可反映出原位土壤真菌、细菌活体生物量与菌群结构^[20],同时 PLFA 可以作为微生物生物量和群落结构变化的特征微生物标记物,且适合于微生物群落的动态监测^[21]。因此,研究土壤酶活性、土壤微生物群落结构以及二者之间的关系,有助于了解高寒草甸退化对土壤生态系统结构、功能与过程的影响,揭示高寒草甸生态系统现状和发展趋势,为研究三江源区受损高寒草甸生态系统生物地球化学循环,特别是微生物群落对地下生态系统过程的影响、适应和修复提供生态学基础资料。

1 材料与方法

1.1 研究区概况及试验设计

本研究于 2010 年 8 月下旬在三江源区腹地青海省果洛藏族自治州玛沁县进行。地理位置为 34°30′~33°34′ N, 100°29′~99°54′ E, 平均海拔 4150 m, 典型高原大陆性气候, 冷季漫长、干旱而寒冷, 持续时间达 7~8 个月; 暖季短暂、湿润而凉爽, 为 4~5 个月。温度年差小而日差较为悬殊, 太阳辐射强烈, 日照充足。年平均气温为 -1.7℃, 1 月平均气温为 -14.8℃, 7 月平均气温为 9.8℃, 年平均降水量 600 mm, 主要降水量集中在 5~9 月, 约占年降水量的 80%, 蒸发量 1160.3 mm。土壤为高山草甸土和高山灌丛草甸土, 而高山嵩草草原化草甸为该地区主要的草地类型, 其建群种为小嵩草, 主要的伴生种有羊茅 (*Festuca ovina*)、针茅 (*Stipa capillata*) 等禾草, 杂类草有高山紫菀 (*Aster alpine*)、湿生篇蓄 (*Gentianopsis paludosa*)、高山唐松草 (*Thalictrum alpinum*)、异叶米口袋 (*Gueldenstaedtia diversifolia*) 等植物^[9]。

试验样地利用空间分布代替时间演替的方法^[22], 根据草地退化程度, 采用草地退化五级梯度标准^[23]来研究不同演替阶段高寒草甸土壤微生物群落结构的变化。以距离牧民定居点远近划分并选择不同演替阶段的高寒嵩草草甸样地, 共 4 处, 依次为原生植被(normal steppe, NS)、轻度退化(light degradation, LD)、中度退化(moderate degradation, MD)和重度退化(heavy degradation, HD)草地, 以各样地地上生物量、植被盖度、优良牧草比例和土壤紧实度作为划分高寒草甸退化演替阶段的主要参考标准^[7,24](表 1)。在不同退化演替阶段试验样地(面积为 50 m×50 m), 对角线法设置 10 个 50 cm×50 cm 的观测样方, 用收获法测定地上生物量后, 用内径 5 cm 土钻分层(0~10 cm、10~20 cm)采集土壤样品, 每个样方按“V”字型钻取 5 钻, 每个样地的每个土层共 50 钻土样混合, 用保鲜盒立即带回实验室, 土样过 2 mm 筛, 取出一部分新鲜土样(4℃保存), 用于土壤酶活性的测定; 剩余土样 -20℃ 冷冻, 用于磷脂脂肪酸(PLFA)的测定。

1.2 土壤酶活性测定

用比色法测定鲜土的土壤蛋白酶、碱性磷酸酶、脲酶、多酚氧化酶和蔗糖酶的活性^[25-26]。

1.3 PLFA 测定

土壤微生物群落结构的测定采用磷脂脂肪酸法^[27]。土壤微生物磷脂脂肪酸提取参照修正的 Bligh-Dyer 方法^[28], 根据现有的研究结果, 本研究采用磷脂脂肪酸生物标记法分析(表 2)。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003 进行数据的基本统计和分析, SPSS 19.0 用于土壤微生物 PLFA 含量的主成分分析(PCA)、显著性分析 Duncan ($P=0.05$)、相关性分析 Pearson ($P=0.05$)。

表 1 研究地点地理位置和地上植被特征^[7,9]

Table 1 Geographical and plant characteristics of the study sites in *K. pygmaea* meadow

项目 Item	原生植被 Normal steppe (NS)	轻度退化 Light degradation (LD)	中度退化 Moderate degradation (MD)	重度退化 Heavy degradation (HD)
方位 Location	34°30.405' N 100°05.897' E	34°29.957' N 100°07.432' E	34°25.229' N 100°21.055' E	34°21.937' N 100°29.697' E
海拔 Altitude (m)	4000	3910	3892	3972
坡度和坡向 Slope and aspect	5°, SW	15°, SW	15°, SW	10°, SW
土壤类型 Soil type	AMS	AMS	AMS	AMS
地上生物量 Above-ground biomass (%)	100	70~85	50~70	<50
盖度 Coverage (%)	>85	70~85	50~70	<50
优良牧草比例 Proportion of palatable herbage (%)	>70	50~70	30~50	<30
土壤紧实度 Soil hardness (kg/cm ²)	>4	3~4	2~3	<2

SW:西南 Southwest; AMS:高寒草甸土壤 Alpine meadow soil.

表 2 不同退化演替阶段土层 PLFA 组成

Table 2 PLFA composition in *K. pygmaea* meadow

脂肪酸 Fatty acid	代表性细菌 Marker	脂肪酸 Fatty acid	代表性细菌 Marker
14:0	一般性细菌 B ^[29]	18:1 ω 9c	真菌 F ^[30-32]
15:0	一般性细菌 B ^[33]	18:2 ω 6,9	真菌 F ^[30-32]
16:0	一般性细菌 B ^[29]	i14:0	革兰氏阳性菌 G ⁺ , B ^[34-35]
17:0	一般性细菌 B ^[33]	i16:0	革兰氏阳性菌 G ⁺ , B ^[32,36]
18:0	一般性细菌 B ^[29]	i17:0	革兰氏阳性菌 G ⁺ , B ^[31,36]
19:0	一般性细菌 B ^[29]	i18:0	革兰氏阳性菌 G ⁺ , B ^[34-37]
cy17:0	革兰氏阴性菌 G ⁻ , B ^[36-38]	a15:0	革兰氏阳性菌 G ⁺ , B ^[31,36]
16:1 ω 7t	革兰氏阴性菌 G ⁻ , B ^[31,36]	a17:0	革兰氏阳性菌 G ⁺ , B ^[31,36]
16:1 ω 9t	革兰氏阴性菌 G ⁻ , B ^[31,36]	br15:0	革兰氏阳性菌 G ⁺ , B ^[37]
18:1 ω 5c	革兰氏阴性菌 G ⁻ , B ^[31-32]	br17:0	革兰氏阳性菌 G ⁺ , B ^[37]
18:1 ω 7c	革兰氏阴性菌 G ⁻ , B ^[31-32]	br18:0	革兰氏阳性菌 G ⁺ , B ^[37]

B: 一般性细菌 Bacteria; G⁺: 革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria; G⁻: 革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria; F: 真菌 Fungi; 下同 The same below.

2 结果与分析

2.1 不同退化演替阶段土壤微生物类群的变化

高寒草甸不同退化演替阶段,在 0~10 cm 和 10~20 cm 土层中,其微生物总量呈现以下变化规律,即 MD>LD>HD>NS 和 MD>HD>LD>NS(图 1a);在 NS 中,标记细菌的 PLFA 与总 PLFA 的比值(细菌 PLFA 含量/总 PLFA 含量, B/T)高于高寒草甸其他演替阶段(图 1b),与 G⁻ 在该样地中所占比例下降有较大的关系,NS 阶段 G⁻ 含量在高寒草甸所有演替阶段最低(图 1d),与 G⁺ 的变化无直接相关性,NS 阶段 G⁺ 含量在 0~10 cm 土层中随着演替的进行没有发生变化(图 1c)。各微生物菌群变化在不同的土层差异较大:在 0~10 cm 土层中,革兰氏阳性菌(G⁺)随着草甸退化程度的增加其所占比例降低,革兰氏阴性菌则相反,即随着高寒草甸演替的进行,G⁺/G⁻ 逐渐下降(图 1e);在 NS 中,由饱和脂肪酸(saturated, Sat)标记的土壤微生物比例高于退化样地,而不饱和脂肪酸(unsaturated, Unsat)所标记的土壤微生物在演替阶段,其百分含量均高于 NS 样地(图 1f)。在 10~20 cm 土层中,NS 土壤中 G⁺/G⁻、Sat/Unsat 值和 HD 植被无差异,且 G⁺ 和 Sat 两种类群土壤微生物百分比均高于 LD 和 MD 样地;LD 和 MD 样地在较深层土壤中 4 类微生物类群则不存在差异(图 1e,f)。

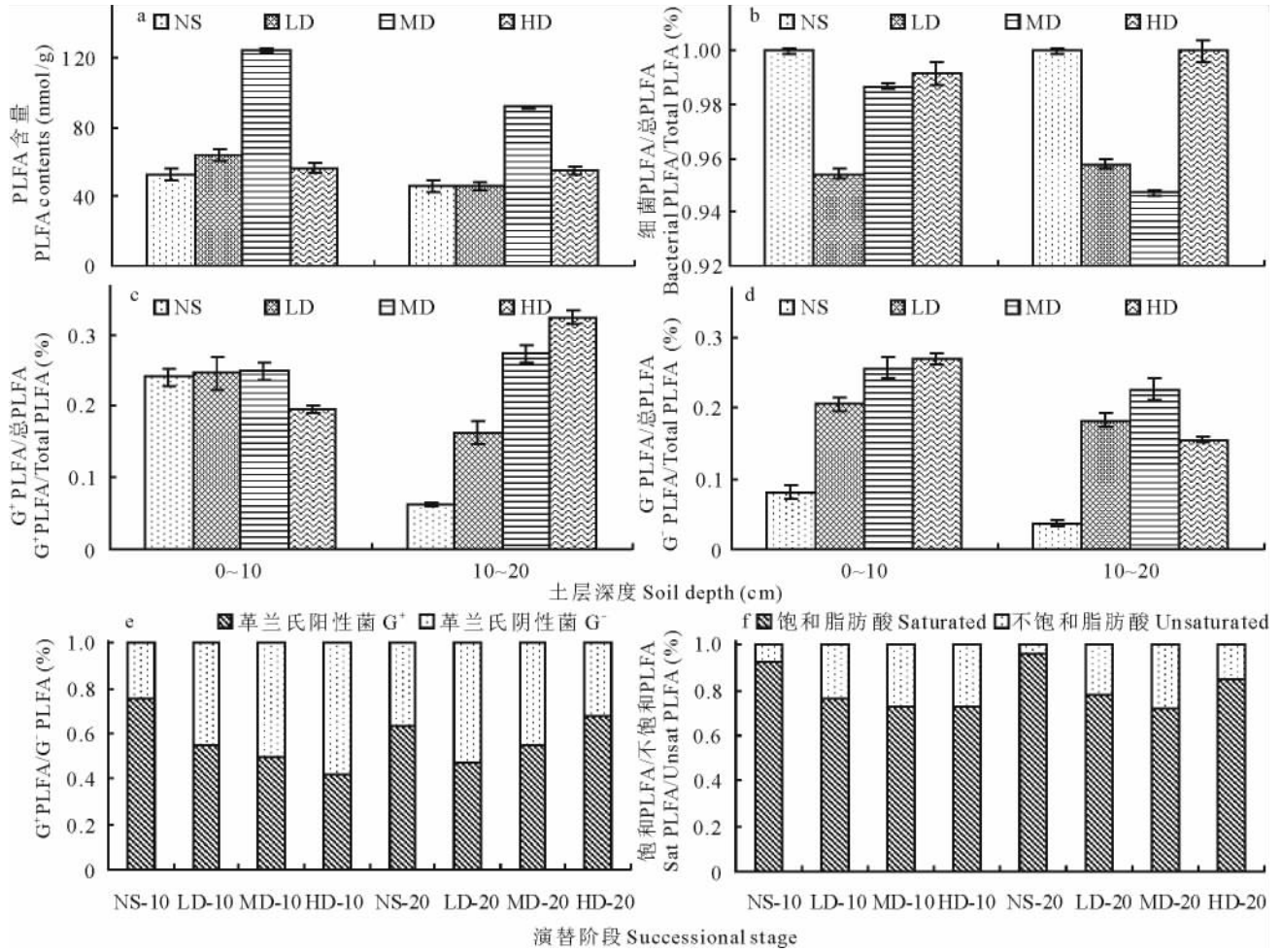


图 1 不同退化演替阶段各菌群含量的变化

Fig. 1 Changes of each microbial group content at the different degraded successional stages

2.2 不同退化演替阶段 PLFA 种类的变化

实验测定土壤中含量大于 0.05 nmol/g 的 PLFA 总计 22 种(C14~C19)(图 2)。其中,NS 土壤中共计 14 种、LD 17 种、MD 20 种、HD 17 种,各 PLFA 在不同退化演替阶段不同土层(0~10 cm 和 10~20 cm)的变化如图 2 所示。在 0~10 cm 土层中:不同退化演替阶段(NS,LD,MD 和 HD)土壤微生物的种类分别为 11, 15, 18 和 14 种,微生物 a15:0、16:0、i16:0、16:1 ω 7t、a17:0、19:0 均出现在 4 个高寒草甸土壤中,其中 a15:0、16:0、16:1 ω 7t 和 i16:0 在 MD 阶段含量最高,a17:0 在 LD 演替阶段含量最大,而 NS 土壤中 19:0 的含量最高,6 种 PLFA 的含量之和分别占不同退化演替阶段(NS,LD,MD 和 HD)总 PLFA 含量的 83.2%, 70.2%, 64.0% 和 68.6%;在 10~20 cm 土层中:不同退化演替阶段土壤微生物的种类分别为 7, 13, 13 和 9 种。其中,在 NS 土壤中,含量比例大于 10% 的 PLFA 为 16:0 和 18:0,是其主要土壤微生物种类,二者占总 PLFA 含量的 81.4%;在 LD 土壤中,15:0、16:0 和 16:1 ω 7t 是该演替阶段土壤的主要 PLFA,占总 PLFA 的 59.1%;在 MD 土壤中,16:0 和 16:1 ω 7t 含量分别占总 PLFA 含量的 29.1% 和 17.3%,共计 46.5%;HD 土壤中的 15:0 (37.8%)、br15:0 (10.9%)、16:1 ω 9t (15.3%) 和 i18:0 (11.4%) 含量之和占总 PLFA 总含量的 75.4%,为该演替阶段土壤中的主要 PLFA。在 10~20 cm 土层中,LD 和 MD 样地中均存在而 NS 和 HD 土壤中却不存在的 PLFA 种类有 3 种,分别为 i14:0、a17:0 和 18:1 ω 9c。

2.3 PLFA 主成分分析 (PCA)

对不同退化演替阶段不同土层土壤微生物群落 PLFA 进行主成分分析发现,第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 33.7% 和 23.4%,累计贡献率为 57.1%。PC 载荷值显示,16:1 ω 7t、a15:0、i14:0、18:2 ω 6、9、

18:1 ω 7c、16:0、18:1 ω 5c、i17:0(载荷值>0.60)这8种 PLFA 与 PC1 正相关,其中 18:2 ω 6,9 为 F,i14:0、a15:0、i17:0 为 G⁺,16:1 ω 7t、18:1 ω 7c、18:1 ω 5c 为 G⁻,16:0 为一般性细菌;22 种 PLFA 中,15:0 和 19:0 载荷值分别为 -0.502 和 -0.625,均小于 -0.50,与 PC1 负相关。与 PC2 具有相关性的正 PLFA(载荷值>0.60)共有 6 种,其中 br18:0、i16:0、br15:0 为 G⁺,16:1 ω 9t 为 G⁻,15:0 和 19:0 为一般性细菌;没有任何 PLFA 载荷值小于 -0.45 的,因此 PLFA 与 PC2 无负相关关系(图 3)。

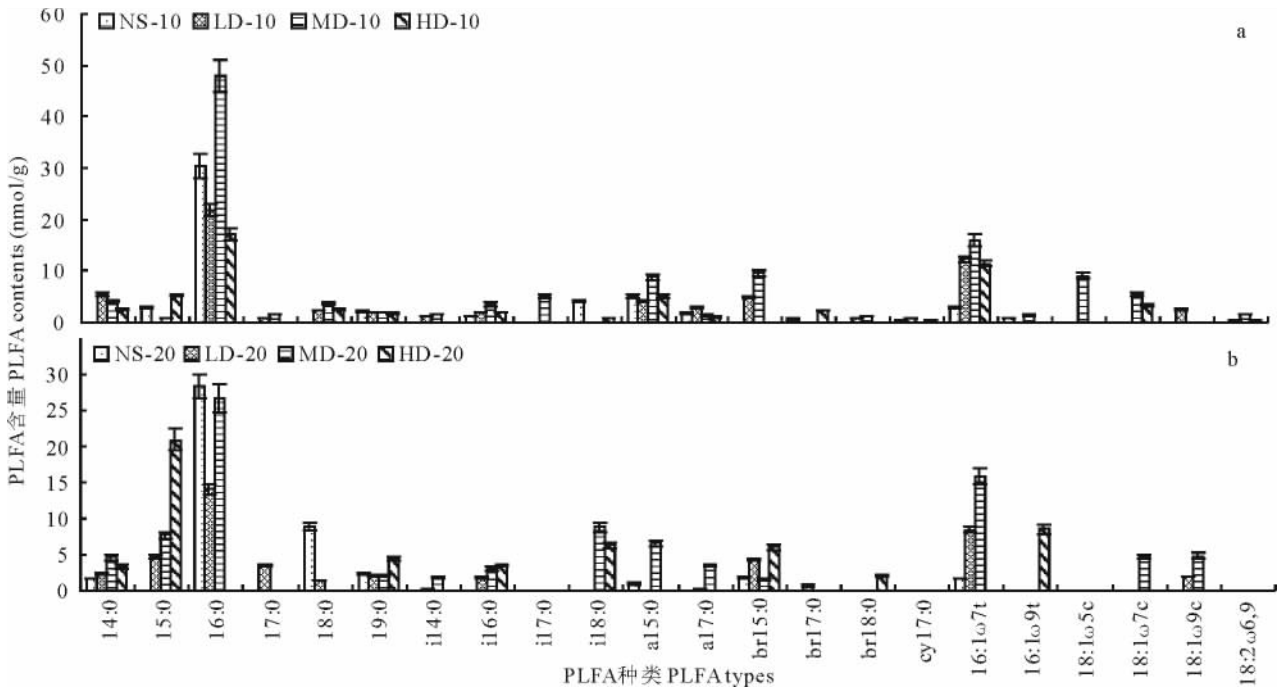


图 2 不同退化演替阶段 PLFA 含量的变化

Fig. 2 Changes of each PLFA content in the degraded successional stages

由图 4 看出,MD-10 和 MD-20 位于 PC1 右侧,与 PC1 正相关,LD-10 靠近 PC1 轴,与 PC1 无显著相关性,NS-10、NS-20、LD-20、HD-10 和 HD-20 均位于 PC1 轴左侧,表明和 PC1 负相关,由图 3 可知,与 PC1 正相关的共有 8 种 PLFA,具有 F、G⁺、G⁻ 和一般性细菌,而与 PC1 负相关的 PLFA 均为一般性细菌,因此 MD 土壤中微生物群落结构多样性更加复杂合理,HD 土壤微生物群落结构较为单一,且以一般性细菌为主要群落,NS 和 LD 土壤微生物群落结构多样性位于二者之间;HD-10、NS-10 和 NS-20 在 PC2 轴下侧,与 PC2 负相关;MD-10 和 HD-20 则相反,位于 PC2 轴上侧,与 PC2 正相关,其代表性 PLFA 为 br18:0、i16:0、br15:0、16:1 ω 9t、15:0 和 19:0,LD-10、LD-20 和 MD-20 靠近 PC2 轴,与 PC2 无明显相关性。NS、LD、MD 和 HD 0~10 cm 土层中 PLFA 均位于相对应的 10~20 cm 土层右侧,表明扰动致使不同退化程度高寒草甸 0~10 cm 土层微生物 PLFA 具有更高的 PC1 载荷值(图 4),因此 0~10 cm 土层的微生物物种多样性更加丰富,其群落结构也能更好地应对外界环境的变化。不同退化演替阶段的不同土层的位置表现在距离差异(图 4),在 PC1 方向上,NS 的 0~10 cm 和 10~20 cm 土层的 2 个位置差距最小,其次为 HD 和 LD,位置差距最大的为 MD,值得注意的是,在 HD 样地中,HD-10 和 HD-20 位置在 PC2 方向上具有较大的差异,其他 3 个样地在 PC2 上无明显差异,说明在 NS 中,虽然 0~10 cm 土层中土壤微生物含量、物种多样性和结构多样性高于 10~20 cm,但差异较其他 3 个退化演替阶段要小。在 3 种退化演替阶段,MD 两个土层之间的差异程度最高,外界干扰虽然直接影响到 0~10 cm 土层,但对 10~20 cm 土层影响较小,中度干扰对表层土壤微生物的影响决定了不同土层的位置差异,即 MD-10 与 MD-20 的距离更大;NS-10、LD-10 和 MD-10 在 PC2 方向上均位于 NS-20、LD-20 和 MD-20 上侧,而 HD 则相反,说明重度退化样地 0~10 cm 土层已经遭受较为严重的破坏,10~20 cm 土层也受到外界环境的影响但不及 0~10 cm 严重。

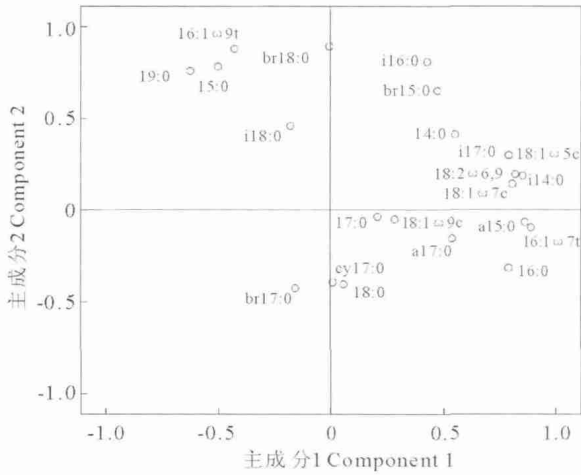


图 3 不同退化演替阶段土壤微生物 PLFA 主成分分析
Fig. 3 PCA of soil microorganisms PLFA at the different degraded successional stages

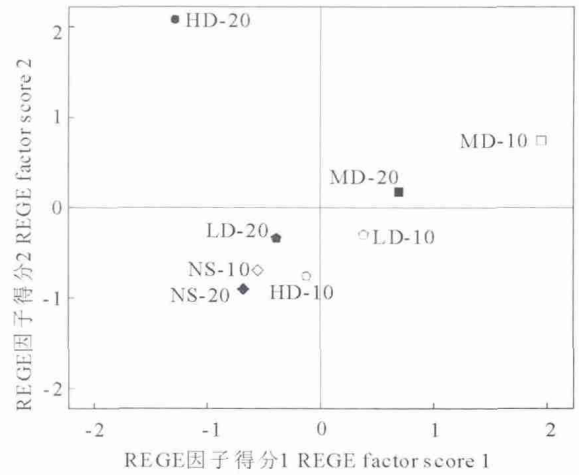


图 4 不同退化演替阶段土壤微生物 PLFA 因子得分
Fig. 4 PCA showing variations at the different degraded successional stages in soil microbe PLFA

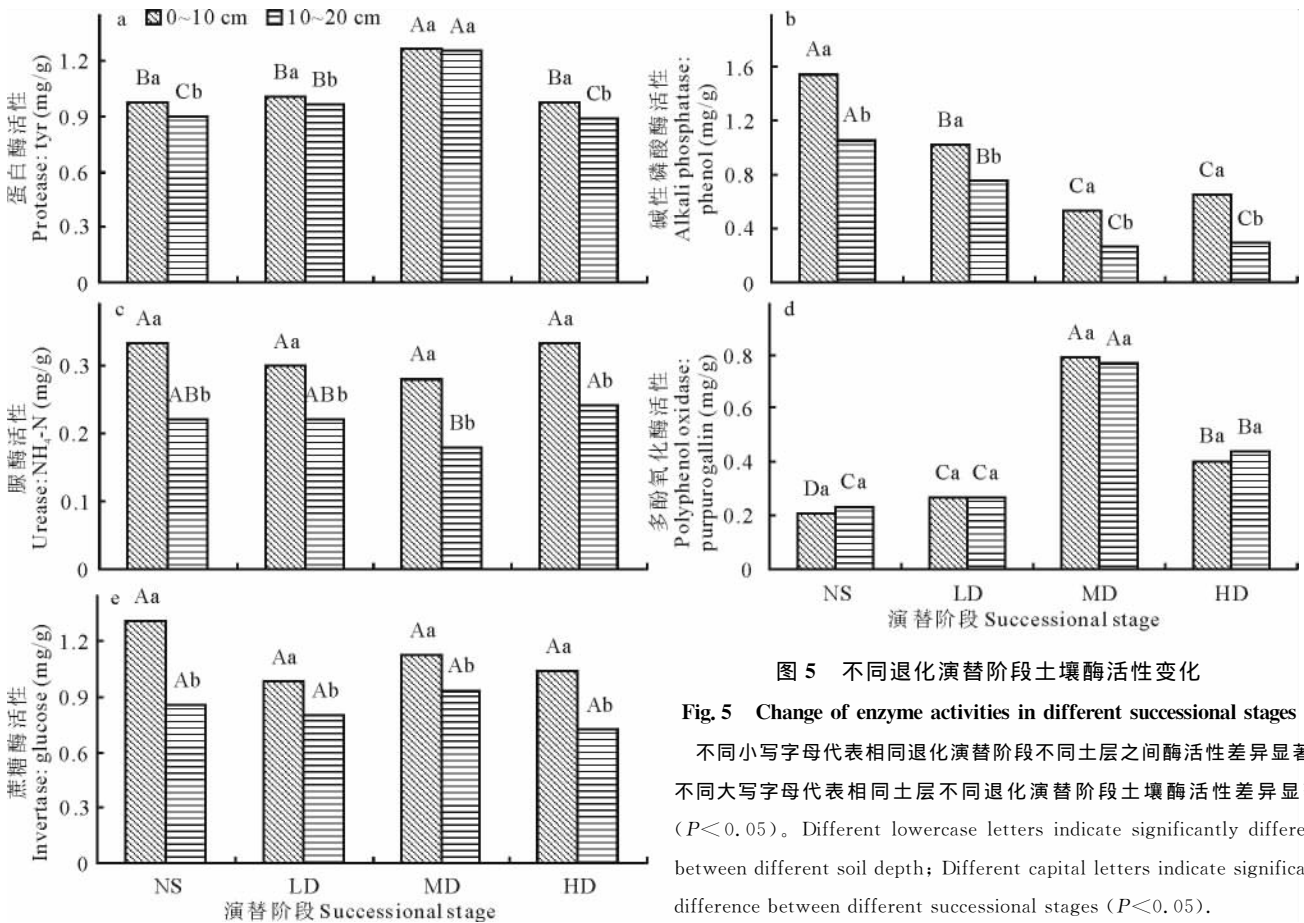


图 5 不同退化演替阶段土壤酶活性变化

Fig. 5 Change of enzyme activities in different successional stages

不同小写字母代表相同退化演替阶段不同土层之间酶活性差异显著, 不同大写字母代表相同土层不同退化演替阶段土壤酶活性差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate significantly different between different soil depth; Different capital letters indicate significant difference between different successional stages ($P < 0.05$).

2.4 不同退化演替阶段土壤酶活性的变化

采用不同退化演替阶段(4个水平)和空间土壤层次(0~10 cm, 10~20 cm 共2个水平)进行双因素方差分析及 Duncan 检验发现, 不同退化演替阶段、不同土层深度及其交互作用对碱性磷酸酶活性均达到极显著影响 ($P < 0.01$), 不同演替阶段对蛋白酶、多酚氧化酶和碱性磷酸酶活性具有极显著影响 ($P < 0.01$), 不同土层深度对脲酶、蛋白酶、蔗糖酶和碱性磷酸酶活性均有极显著影响 ($P < 0.01$), 而对多酚氧化酶活性无显著影响 ($F = 0.068$, $P = 0.797$) (表 2)。

对不同土层酶活性变化研究可以看出,蛋白酶和多酚氧化酶活性均表现为 NS<LD<HD<MD,碱性磷酸酶活性表现为 MD<HD<LD<NS,脲酶和蔗糖酶活性在 4 个退化演替阶段无显著差异。不同演替阶段,蛋白酶、碱性磷酸酶、脲酶和蔗糖酶活性均表现出随着土层深度的增加而降低(图 5a,b,c,e),多酚氧化酶活性则不同,随土层的加深而无显著变化($P>0.05$)(图 5d)。

2.5 微生物类群 PLFA 含量与土壤酶活性相关性分析

土壤酶活性与土壤微生物存在着显著的相关性,一切导致土壤微生物数量变化的因素都间接的影响土壤酶活性的变化。从表 3 可知,蛋白酶和多酚氧化酶活性与 B、G⁺、G⁻、F 数量及总 PLFA 之间均呈极显著的正相关关系,碱性磷酸酶与不同土壤微生物类群的 PLFA 均表现出负相关关系,其中与 G⁺ PLFA 达到极显著水平,与 G⁻ PLFA 和总 PLFA 呈显著水平,蔗糖酶活性仅与土壤中细菌 PLFA 含量有显著正相关性,脲酶活性与土壤各微生物类群无明显的相关性(表 4)。

表 3 不同退化演替阶段土壤剖面酶活性的 ANOVA 分析(0~20 cm)

Table 3 ANOVA for soil enzyme activity in the 0—20 cm soil profile under different degraded successional stages

因子 Factors	df	脲酶		蛋白酶		蔗糖酶		多酚氧化酶		碱性磷酸酶	
		Urease		Protease		Invertase		Polyphenol oxidase		Alkali phosphatase	
		F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
处理 Treatment	3	8.302	0.002	199.598	<0.001**	4.955	0.014	267.383	<0.001**	721.087	<0.001**
土层深度 Depth	1	164.831	<0.001**	19.139	=0.001**	53.694	<0.001**	0.068	0.797	504.460	<0.001**
土层深度×处理 Depth×Treatment	3	0.918	0.456	1.508	0.253	2.660	0.086	0.224	0.878	11.388	<0.001**

** 表示极显著相关($P<0.01$)。

** indicate highly significant correlation ($P<0.01$).

表 4 土壤酶活性与不同微生物类群 PLFA 含量的相关性分析

Table 4 Pearson correlation analysis between different microbial PLFA content and soil enzyme activity

酶 Enzyme	项目 Item	细菌 PLFA Bacterial PLFA	真菌 PLFA Fungal PLFA	革兰氏阳性菌 G ⁺ PLFA	革兰氏阴性菌 G ⁻ PLFA	总 PLFA Total PLFA
蛋白酶 Protease	Pearson 相关性 Pearson correlation	0.761**	0.890**	0.843**	0.751**	0.912**
	双侧显著 P 值 Sig. (2-tailed)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	23	23	23	23	23
碱性磷酸酶 Alkali phosphatase	Pearson 相关性 Pearson correlation	-0.080	-0.380	-0.571**	-0.512*	-0.422*
	双侧显著 P 值 Sig. (2-tailed)	0.709	0.067	0.004	0.011	0.040
	N	24	24	24	24	24
脲酶 Urease	Pearson 相关性 Pearson correlation	0.019	0.104	-0.039	-0.037	0.008
	双侧显著 P 值 Sig. (2-tailed)	0.929	0.628	0.858	0.863	0.970
	N	24	24	24	24	24
多酚氧化酶 Polyphenol oxidase	Pearson 相关性 Pearson correlation	0.671**	0.803**	0.877**	0.718**	0.872**
	双侧显著 P 值 Sig. (2-tailed)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	24	24	24	24	24
蔗糖酶 Invertase	Pearson 相关性 Pearson correlation	0.456*	0.304	0.143	0.022	0.281
	双侧显著 P 值 Sig. (2-tailed)	0.025	0.148	0.505	0.920	0.183
	N	24	24	24	24	24

* 表示显著相关 ($P<0.05$); ** 表示极显著相关 ($P<0.01$)。

* indicate significant correlation ($P<0.05$); ** indicate highly significant correlation ($P<0.01$).

3 讨论

群落演替是对其初始状态的异化过程,不但体现在种类组成和结构上,也体现在土壤环境的改变,而土壤微生物是土壤中具有生命力的主要组成部分,在土壤形成和演化过程中起着主导作用,同时由土壤微生物生命活动和植物根系分泌产生的土壤酶则是土壤生物化学反应的实际参与者和主要推动者,其活性大小既反映着土壤营养物质的储量,也体现在土壤中生物化学反应的方向和强度^[39],加之自身反应灵敏,专一性和综合性等特点,土壤酶也是作为土壤生态胁迫或土壤生态恢复的敏感性指标^[15]。土壤微生物群落结构多样性是反映生态系统受到一定干扰后细小变化的重点监测因子,可以描述微生物群落变化、微生物群落生态学机理以及自然或人为干扰对群落的影响^[40]。

本研究表明,尽管 4 个不同演替阶段的样地在土壤微生物群落结构和土壤酶活性上有差异,但中度退化演替阶段和原生植被之间的差异尤为明显,轻度退化和重度退化阶段差异处于二者之间。中度退化演替阶段土壤微生物种类与生物量均显著高于原生植被、轻度退化和重度退化演替阶段,0~10 cm 和 10~20 cm 土层中土壤微生物群落结构合理、种群多样性丰富;中度退化演替阶段土壤蛋白酶和多酚氧化酶活性最高,说明随着演替的进行,土壤中的化学和生物学指标并不呈现出持续下降的趋势,而是在受到一定程度干扰时达到最大值,然后开始降低。蔡晓布等^[12]对不同退化程度高寒草原土壤微生物活性进行研究时也发现:土壤微生物活性和含量在受到一定干扰后才达到最大值,并非在未退化阶段。研究发现,中度退化演替阶段群落资源丰富度和复杂程度增加,维持了草地群落的稳定性,有利于群落生产力的提高,致使植物凋落物归还给土壤的量增加,土壤肥力提高^[9]。土壤微生物种类、组成和功能多样性受到作为碳源基质的植物凋落物和土壤有机质的质量和数量的影响。表现在:1)限制植物生长的资源有效性影响着生物群落的组成;2)土壤微生物群落资源的可获取性受到枯死叶和根(凋落物)的化学组分限制,因为凋落物能够被用于产生能量;3)植物物种组成的改变可能引起生物多样性的改变进而导致凋落物有机组分的变化,因此会影响异养微生物群落的组成和功能^[41-42]。地上植被较高的生物多样性可以引起作为地下生物资源的凋落物质量和类型的多样性,而资源的异质性可以引起分解者的多样性,在较大程度上改良土壤的理化性质,提高土壤生物的数量、活性和多样性^[43],同时土壤微生物的增多会产生反馈调控作用强化上行效应,土壤中的分解者及其共生真菌能促进矿物质营养释放,提高初级生产力,从而有利于植物生长及其多样性的维持。本研究还发现,0~10 cm 土层中,原生植被土壤微生物中 G^+/G^- 和 Sat/Uosat 值均高于不同退化演替阶段。从原生植被到不同退化演替阶段的转变过程中,微生物群落结构上表现为革兰氏阳性菌向革兰氏阴性菌的转变,饱和性脂肪酸向不饱和性脂肪酸的转变,这与图 4 所得结论相符。在图 4 中,NS-10 位于其他 3 个退化演替阶段 0~10 cm 土层最右侧,与 PC1 轴负相关程度最大;而且与 PC1 轴呈负相关的 PLFA 均为饱和性 PLFA,大多数标记革兰氏阳性菌的 PLFA 为饱和性 PLFA,标记革兰氏阴性菌的 PLFA 一般为不饱和脂肪酸。

还有研究发现,不同退化演替阶段高寒草甸土壤细菌与真菌生物量的比值(B/F)表明:中度退化演替阶段 B/F 值显著高于重度退化、原生植被和轻度退化阶段^[12]。本研究表明,细菌与总 PLFAs 的比值在原生植被中最高,轻度退化演替阶段最低(图 1b),说明随着演替的进行,细菌生物量的增加速度高于真菌;革兰氏阳性菌与总 PLFAs 的比值(图 1c)和革兰氏阴性菌与总 PLFAs 的比值(图 1d)在不同退化演替阶段所呈现的规律不尽相同,代表革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的 PLFA 并没有分别位于一个相对单独的区域(图 3)。本研究还发现,含有异构甲基支链(iso)的 PLFA(i14:0,i16:0,i17:0 和 i18:0)和前异构甲基支链(anteiso)的 PLFA(a15:0 和 a17:0)分别位于 PC2 轴的上侧和下侧(图 3),中度退化演替阶段(MD-10,MD-20)位于 PC2 轴上侧,其他 3 个演替阶段则位于 PC2 轴下侧(图 4),iso 和 anteiso PLFA 在 4 个退化演替过程中的转变可能与立地条件的营养胁迫,物理或化学干扰,或者土壤微生物组成的改变有关^[44-46]。对相应的 PLFA 进行 PCA 分析证明了不同退化演替阶段,土壤微生物群落结构在中度退化演替阶段形成更为合理的群落结构来适应环境的压力。

草地生态系统中地上植物、地下微生物和土壤微环境之间的相互响应机制与群落演替存在着明显的关联性。第一,在高寒草甸不同退化阶段,群落的多样性、均匀度和物种丰富度在中度退化演替阶段最高^[47];土壤容重、土

壤有机质输入以及土壤微生物熵在中度退化演替阶段均高于其他演替阶段^[9]。地上部分高的生物多样性可能会引起作为地下生物资源的凋落物质量和类型的多样性,而资源的差异性也可能引起分解者的多样性,这能在很大程度上改良土壤的理化性质、提高土壤生物的数量、多样性和活性。因此,植物—土壤间的相互作用也许是高寒草甸退化演替过程中最重要的反馈之一。第二,本研究中碱性磷酸酶活性随着高寒草甸退化演替的进行而显著降低。碱性磷酸酶是促进有机磷化合物分解的酶类,能增加土壤中磷元素和易溶性营养物质,与土壤碳氮含量正相关,与有机磷含量及土壤 pH 也有关^[25],随着高寒草甸退化演替的进行,土壤各种营养物质(土壤有机碳、全氮和全磷)含量均显著下降,土壤 pH 随之降低^[11,44];多酚氧化酶和蛋白酶在中度退化演替阶段其活性显著高于其他 3 个处理样地。在不同退化演替阶段,土壤全氮含量和速效氮含量均在中度退化阶段最低^[48],原生植被由于群落生物量较高,土壤中凋落物和植物根系的归还量增加,较多土壤养分在一定程度上提高了碱性磷酸酶活性,但降低了多酚氧化酶和蛋白酶的活性。有研究表明,施氮能够降低土壤多酚氧化酶的活性,尤其是高氮处理,抑制作用更为明显;脲酶与蔗糖酶活性在不同演替阶段无显著差异,土壤脲酶是一种分解含氮有机物的水解酶,是植物氮素营养的直接来源,与地上植被的多样性有关,土壤全氮和速效氮是导致植物多样性变化的显著性影响因子^[49],蔗糖酶活性则同样受到多种土壤因子的影响,如土壤有机质和土壤呼吸强度^[25],而土壤呼吸速率与土壤温度、土壤含水量、根系生物量、地上植被生物量凋落物有显著正相关,与人为干扰强度呈显著负相关性^[50],同时蔗糖酶活性与土壤微生物生物量碳、氮也存在着相关性^[51],因此,复杂的影响因子是导致土壤脲酶和蔗糖酶活性在不同退化演替阶段无显著差异的重要原因。第三,土壤酶与土壤微生物在高寒草甸不同退化演替阶段呈现出的显著相关性。杨志新和刘树庆^[52]发现,当土壤微生物的生长和繁殖受到抑制时,其体内酶的合成和分泌便会减少,从而降低了土壤酶活性,当植物根际的生物活性物质和动物残体腐解使土壤微生物活动旺盛时,土壤酶活性便会提高;单贵莲等^[53]在研究典型草原恢复演替过程中也发现,土壤微生物和土壤酶活性呈密切的正相关关系,土壤酶活性、真菌数量、微生物总量间的相关关系较显著,相关系数均达到显著水平。在本研究中,碱性磷酸酶活性只与总 PLFAs、革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌含量呈显著或极显著负相关,与真菌($r = -0.380$)和细菌($r = -0.080$)含量无显著相关性,这表明碱性磷酸酶活性会受到土壤中总微生物生物量和革兰氏细菌的抑制,尤其是革兰氏阳性菌的抑制作用更加强烈;多酚氧化酶和蛋白酶活性与革兰氏阳性菌($r = 0.877$)、总 PLFAs($r = 0.872$);真菌($r = 0.890$)、总 PLFAs($r = 0.912$)间呈显著正相关。土壤微生物群落结构(种类、数量、生物量和不同微生物类群 PLFA 比值)、土壤微生物活性通过影响有机物分解、营养物质传递,从而促进植物生长。土壤微生物受到强烈的自上而下的调控,它们反过来又通过影响营养物质的释放对地上植物群落结构产生重要的反馈调控作用。

总之,土壤是一个复杂的生态系统,评价土壤质量和土壤肥力、指示高寒草甸演替阶段和退化程度有许多指标,如土壤理化性质、酶活性和微生物状况等。土壤微生物是土壤生态系统中养分来源的原动力,在动植物残体的降解和转化,养分的释放和循环及改善土壤理化性质中起着重要作用;土壤酶能够促进土壤中物质转化与能量交换,土壤酶类和微生物一起推动着土壤的代谢过程。因此,本研究建议将土壤酶活性和土壤微生物群落结构(种类、数量)结合起来,评价三江源区高寒草甸群落的演替阶段、退化程度。

参考文献:

- [1] 曹广民,龙瑞军.三江源区“黑土滩”型退化草地自然恢复的瓶颈及解决途径[J].草地学报,2009,(1):4-9.
- [2] 尚占环,龙瑞军,马玉寿.青藏高原江河源区生态环境安全问题分析与探讨[J].草业科学,2007,(3):1-7.
- [3] 王根绪,程国栋.江河源区的草地资源特征与草地生态变化[J].中国沙漠,2001,(2):101-107.
- [4] 李英年,赵新全,曹广民,等.海北高寒草甸生态系统定位站气候、植被生产力背景的分析[J].高原气象,2004,(4):558-567.
- [5] 李希来,黄葆宁.青海黑土滩草地成因及治理途径[J].中国草地,1995,(4):64-67.
- [6] 马玉寿,王启基.“黑土型”退化草地研究工作的回顾与展望[J].草业科学,1999,16(2):5-9.
- [7] 刘伟,李有福.高寒草甸“黑土型”退化草地的成因及生态过程[J].草地学报,1999,7(4):300-307.

- [8] 汪诗平. 青海省“三江源”地区植被退化原因及其保护策略[J]. 草业学报, 2003, 12(6): 1-9.
- [9] 王长庭, 龙瑞军, 王启兰, 等. 三江源区高寒草甸不同退化演替阶段土壤有机碳和微生物量碳的变化[J]. 应用与环境生物学报, 2008, (2): 225-230.
- [10] 萨茹拉, 侯向阳, 李金祥. 不同放牧退化程度典型草原植被—土壤系统的有机碳储量[J]. 草业学报, 2013, 22(5): 18-26.
- [11] 安慧, 徐坤. 放牧干扰对荒漠草原土壤性状的影响[J]. 草业学报, 2013, 22(4): 35-42.
- [12] 蔡晓布, 周进, 钱成. 不同退化程度高寒草原土壤微生物活性变化特征研究[J]. 土壤学报, 2008, (6): 1110-1118.
- [13] 王学霞, 董世魁, 李媛媛, 等. 三江源区草地退化与人工恢复对土壤理化性状的影响[J]. 水土保持学报, 2012, (4): 113-117, 122.
- [14] 张莉, 党军, 刘伟, 等. 高寒草甸连续围封与施肥对土壤微生物群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2012, (11): 3072-3078.
- [15] Garcia C, Hernández T. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1997, 29(2): 171-177.
- [16] 王冬梅, 王春枝, 韩晓日, 等. 长期施肥对棕壤主要酶活性的影响[J]. 土壤通报, 2006, (2): 2263-2267.
- [17] Salam A K, Katayama A, Kimura M. Activities of some soil enzymes in different land use systems after deforestation in hilly areas of west lampung, south sumatra, indonesia[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1998, 44(1): 93-103.
- [18] Rasmussen L D, Sørensen S J. Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 36(1): 1-9.
- [19] 胡元森, 吴坤, 李翠香, 等. 黄瓜连作对土壤微生物区系影响——基于 DGGE 方法对微生物种群的变化分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2267-2273.
- [20] Liu B R, Jia G M, Chen J, *et al.* A review of methods for studying microbial diversity in soils[J]. Pedosphere, 2006, 16(1): 18-24.
- [21] 张瑞福, 崔中利, 李顺鹏. 土壤微生物群落结构研究方法进展[J]. 土壤, 2004, (5): 476-480, 515.
- [22] Barbour M G, Burk J H, Pitts W D. Terrestrial Plant Ecology[M]. California: Benjamin/Cummings, 1980.
- [23] 郑度, 姚檀栋. 青藏高原隆升与环境效应[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [24] Zhou H, Zhao X, Tang Y, *et al.* Alpine grassland degradation and its control in the source region of the Yangtze and Yellow rivers, China[J]. Grassland Science, 2005, 51(3): 191-203.
- [25] 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [26] 王启兰, 曹广民, 王长庭. 放牧对小嵩草草甸土壤酶活性及土壤环境因素的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, (5): 856-864.
- [27] Frostegård Å, Bååth E, Tunlio A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1993, 25(6): 723-730.
- [28] Bligh E, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911-917.
- [29] Phillips R L, Zak D R, Holmes W E, *et al.* Microbial community composition and function beneath temperate trees exposed to elevated atmospheric carbon dioxide and ozone[J]. Oecologia, 2002, 131(2): 236-244.
- [30] Madan R, Pankhurst C, Hawke B, *et al.* Use of fatty acids for identification of am fungi and estimation of the biomass of am spores in soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(1): 125-128.
- [31] Zak D R, Ringelberg D B, Pregitzer K S, *et al.* Soil microbial communities beneath *Populus grandidentata* grown under elevated atmospheric CO₂[J]. Ecological Applications, 1996, 6(1): 257-262.
- [32] Zogg G P, Zak D R, Ringelberg D B, *et al.* Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming[J]. Soil Science Society of America Journal, 1997, 61(2): 475-481.
- [33] Chinalia F, Killham K S. 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-d) biodegradation in river sediments of northeast-scotland and its effect on the microbial communities (PLFA and DGGE)[J]. Chemosphere, 2006, 64(10): 1675-1683.
- [34] McKinley V, Peacock A, White D. Microbial community PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tallgrass prairie soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(10): 1946-1958.

- [35] Zelles L. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities[J]. *Chemosphere*, 1997, 35(1): 275-294.
- [36] Frostegård Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22(1-2): 59-65.
- [37] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(2): 111-129.
- [38] White D, Stair J, Ringelberg D. Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis[J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 17(3-4): 185-196.
- [39] 孙波, 张桃林, 赵其国. 我国中亚热带缓丘区红粘土红壤肥力的演化——化学和生物学肥力的演化[J]. *土壤学报*, 1999, (2): 203-217.
- [40] Loranger-Merciris G, Barthes L, Gastine A, *et al.* Rapid effects of plant species diversity and identity on soil microbial communities in experimental grassland ecosystems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(8): 2336-2343.
- [41] Tilman D. *Resource Competition and Community Structure*[M]. Princeton: Princeton University Press, 1982.
- [42] 蒋婧, 宋明华. 植物与土壤微生物在调控生态系统养分循环中的作用[J]. *植物生态学报*, 2010, (8): 979-988.
- [43] 王文颖, 王启基, 王刚. 高寒草甸土地退化及其恢复重建对土壤碳氮含量的影响[J]. *生态环境*, 2006, (2): 362-366.
- [44] Fierer N, Schimel J P, Holden P A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(1): 167-176.
- [45] Peacock A, Macnaughton S, Cantu J, *et al.* Soil microbial biomass and community composition along an anthropogenic disturbance gradient within a long-leaf pine habitat[J]. *Ecological Indicators*, 2001, 1(2): 113-121.
- [46] Pinkart H, Ringelberg D, Piceno Y, *et al.* Biochemical approaches to biomass measurements and community structure analysis[J]. *Manual of Environmental Microbiology*, 2002, 2: 101-113.
- [47] 柳小妮, 孙九林, 张德罡, 等. 东祁连山不同退化阶段高寒草甸群落结构与植物多样性特征研究[J]. *草业学报*, 2008, 17(4): 1-11.
- [48] 冯瑞章, 周万海, 龙瑞军, 等. 江河源区不同退化程度高寒草地土壤物理、化学及生物学特征研究[J]. *土壤通报*, 2010, (2): 263-269.
- [49] 王兴, 宋乃平, 杨新国. 放牧扰动下草地植物多样性对土壤因子的响应[J]. *草业学报*, 2013, 22(5): 27-36.
- [50] 邓钰, 柳小妮, 闫瑞瑞, 等. 呼伦贝尔草甸草原土壤呼吸及其影响因子对不同放牧强度的响应[J]. *草业学报*, 2013, 22(2): 22-29.
- [51] 沈宏, 曹志洪, 徐本生. 玉米生长期间土壤微生物量与土壤酶变化及其相关性研究[J]. *应用生态学报*, 1999, 10(4): 471-474.
- [52] 杨志新, 刘树庆. 重金属 Cd、Zn、Pb 复合污染对土壤酶活性的影响[J]. *环境科学学报*, 2001, (1): 60-63.
- [53] 单贵莲, 初晓辉, 罗富成, 等. 围封年限对典型草原土壤微生物及酶活性的影响[J]. *草原与草坪*, 2012, (1): 1-6.

Changes in the activities of soil enzymes and microbial community structure at different degradation successional stages of alpine meadows in the headwater region of Three Rivers, China

HU Lei¹, WANG Chang-ting¹, WANG Gen-xu², MA Li¹, LIU Wei³, XIANG Ze-yu⁴

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

2. Institute of Hazards and Environment, Chinese Academic of Sciences, Chengdu 610041, China;

3. Plateau Biology, Chinese Academic of Sciences, Xining 810001, China; 4. Northwest

Institute of Key Laboratory of Aquatic Botany and Watershed Ecology, Wuhan

Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: An analysis was carried out on the soil enzyme activities and the soil microbial community structure of alpine meadows in the headwater area of the Yellow River, the Yangtze River and the Lancang River at four successional degraded stages (NS: Normal Steppe, LD: Light Degradation, MD: Moderate Degradation, HD: Heavy Degradation) using the colorimetric method and phospholipids fatty acid (PLFA). 1) The species and quantity of soil microbes did not reduce with degradation of the alpine meadow and they reached the highest level at MD. 2) The soil microbial structure at MD was the most complex one among the four stages. 3) The soil microbial diversity in the 0–10 cm layer was richer than that at 10–20 cm, which made the microbial community structure better adapted to the changes of ambient environment. 4) The activities of all five enzymes decreased significantly ($P < 0.05$) with soil depth and the activity of alkali phosphatase decreased considerably as the alpine meadow degraded ($P < 0.05$). The maximum activities of protease and polyphenol oxidase appeared at MD, with the minimum in NS, but the activities of invertase and urease ($P > 0.05$) seldom changed in any of the four stages. Enzyme activities responded differently to changes of the ambient environment. Alkali phosphatase, protease and polyphenol were more sensitive than invertase and urease. 5) There was a significant correlation between soil enzyme activities and soil microbes at successional degraded stages of the alpine meadow ($P < 0.05$). Soil enzyme activities and soil microbial community structure could be comprehensive indicators to show the stage of succession and the degree of degradation on the alpine meadows in the headwater areas of the three rivers.

Key words: alpine meadow; successional degraded stages; soil enzyme activities; soil microbial community structure; PLFA