

高寒草甸土壤细菌生物量的研究*

I. 不同植被类型土壤中细菌生物量的测定

李家藻

(中国科学院西北高原生物研究所)

作为陆地生态系统重要一环,国外对土壤细菌的生物量已进行不少的研究 (Arisyovskaya, 1972; Clarholm, 1974; Parinkina, 1972, Skinner, 1952; Trollenier, 1973; Clarholm, 1975),国内此项工作开展甚少,特别对高寒草甸土壤细菌生物量尚未见报道。为查明细菌生物量及其在能量流中的作用,用荧光镜检法对海北高寒草甸细菌生物量进行了初步的研究。

一、材料和方法

1. 土壤样品的采集

土壤样品采自海北高寒草甸生态系统定位站不同植被的样地,即矮嵩草草甸 (*Kobresia humilis* meadow),垂穗披碱草草甸 (*Elymus nutans* meadow),退化的垂穗披碱草人工草场 (degraded artificial cultivated *Elymus nutans* grassland),金露梅灌丛 (*Potentilla fructosa* shrub),植被以华扁穗草 (*Blysmus sinocompressus*) 为主的沼泽化草甸 (swamp meadow)。采样深度为0—10厘米,10—20厘米,20—40厘米,40—60厘米。

2. 土壤悬浮液涂片的制作

将土壤样品作成 10^{-2} 的土壤悬浮液,摇匀,用0.1毫升移液管吸取0.005毫升均匀地涂抹在面积为1平方厘米的载玻片上的方框内。静置片刻,待干燥之后,轻微加热使之固定。

3. 荧光染色液的配制

用十万分之一天平称取异硫氰酸盐荧光素 (FITC, 生化试剂,上海第二军医大学朝晖制药厂出品) 1毫克,加0.5M碳酸钠缓冲液 ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 143.1克, NaHCO_3 42.0克,分别加蒸馏水溶解后,定容到1000毫升。用时取 Na_2CO_3 溶液30毫升,加 NaHCO_3 溶液70毫升混匀,即得pH为9.6的碳酸钠缓冲液) 0.25毫升,磷酸缓冲液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot$

* 朱桂如、杨涛等同志协助进行了部分工作。

12H₂O 3.58 克, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.56 克, 分别溶于蒸馏水中, 并定容到 1000 毫升。用时取 Na₂HPO₄ 溶液 72 毫升, 加 NaH₂PO₄ 溶液 28 毫升, 混匀, 即得 pH 为 7.2 的磷酸缓冲液) 1.1 毫升。溶解混匀后立即使用。此荧光染色液易变质, 在 4℃ 暗处仅能保存 6 小时左右, 因此, 每次只需配制所需之量即可。

4. 土壤涂片的染色和镜检计数

土壤悬浮液涂片用 FITC 溶液染色 3 分钟, 在 0.5M 碳酸钠缓冲液中浸洗 10 分钟, 然后在 5% 焦磷酸钠水溶液中浸洗 2 分钟。取出后, 立即用缓冲甘油(分析纯甘油, 加入 2% 碳酸钠缓冲液, 将 pH 调到 9.6) 封片, 并用荧光显微镜计算在一定面积视野内的细菌细胞数。由于细菌细胞外膜吸收 FITC 后经激发光照射显亮绿色荧光, 可以清楚地将细菌细胞与土粒等杂质区别开来。我们所用荧光显微镜为日本奥林巴斯 BF 型荧光显微镜, 目镜为 10×, 物镜为 20×, 用高压汞灯作为光源, 用透射光明视野或暗视野, 用 UV 滤光片或蓝色滤光片作为激发滤光片, 均可得到满意的结果。为保护视力和提高荧光亮度, 作者采用透射光明视野组合, 以蓝色光作为激发光源进行镜检, 并按下面的公式计算细菌细胞数:

$$\begin{aligned} \text{细菌数} &= (100/0.005 \times 1.181 \times 10^{-4}) \times M \times W \text{ 个细胞/克干土} \\ &= 1.6935 \times 10^8 \times M \times W \text{ 个细胞/克干土} \end{aligned}$$

上式中 100 为土壤悬浮液的稀释倍数, 0.005 为涂抹在 1 平方厘米载玻片的土壤悬浮液的毫升数, 1.181×10^{-4} 为计数视野面积的平方厘米数, M 为计数视野的平均细菌细胞数, W 为供试土壤的水分系数。

据不同文献报道 (Parkinson, 1971; Alexander, 1961; Parinkina, 1973), 鲜细菌细胞的平均质量分别为 0.77×10^{-12} 克, 1.5×10^{-12} 克和 1×10^{-12} 克。作者取其平均数, 设鲜细菌细胞的平均质量为 1.09×10^{-12} 克, 将细菌数乘以此数, 则可得到每克土壤中鲜细菌细胞的生物量。

按鲜重的 25% 作为干重 (Clarholm, 1974), 每克干重折合 5000 卡作为所含能量 (Lid-Torsvik, 1972) 则可计算出每克土壤中细菌所含的能量。

细菌平板计数采用涂抹法, 培养基为牛肉汁蛋白胨琼脂。

二、结果和讨论

兹将海北高寒草甸土壤细菌的荧光直接计数和平板计数结果分别列于表 1—5。

从表 1—5 可以看出, 不同植被类型土壤中直接计数法测得的细菌数量随土壤深度变化的动态与用平板计数法测得的细菌数量的变化动态, 具有基本相同的趋势, 均以表层 0—10 厘米土壤中数量为最高, 随土壤深度的加深而递减。两种计数法之间具有线性函数关系, 其线性回归曲线(为节省篇幅仅以矮嵩草草甸试验处理为例)和数据分别列于图 1 和表 6。

表 1—5 的数据表明, 各不同植被类型的 0—60 厘米深土壤直接计数法测得的平均细菌数量(个细胞/克干土 $\times 10^7$)、生物量(克鲜重/克干土 $\times 10^{-5}$)及热值(卡/克干土)以矮嵩草草甸为最高, 分别为 2.04, 222.25 和 2.7795; 金露梅灌丛次之, 分别为 1.82, 197.75

表1 矮蒿草草甸土壤细菌的数量、生物量和能量
 Table 1 Bacterial number, biomass and energy content in soil of *Kobresia humilis* meadow

土壤深度 Soil depth (cm)	计数方法 Counting method	细菌数量 (个细胞/克干土 $\times 10^7$) Bacterial number (cells/g dry soil $\times 10^7$)	细菌生物量 (克鲜重/克干土 $\times 10^{-5}$) Bacterial biomass (g fresh wt/g dry soil $\times 10^{-5}$)	能量(卡/克干土) Energy content (cal/g dry soil)
0—10cm	直接计数 Direct count	267	291	3.6379
	平板计数 Plate count	0.558	0.608	0.0076
10—20cm	直接计数 Direct count	183	199	2.4934
	平板计数 Plate count	0.115	0.125	0.0016
20—40cm	直接计数 Direct count	189	206	2.5751
	平板计数 Plate count	0.052	0.057	0.0007
40—60cm	直接计数 Direct count	177	193	2.4116
	平板计数 Plate count	0.050	0.054	0.0007

表2 垂穗披碱草草甸土壤细菌的数量、生物量和能量
 Table 2 Bacterial number, biomass and energy content in soil of *Elymus nutans* meadow

土壤深度 Soil depth (cm)	计数方法 Counting method	细菌数量 (个细胞/克干土 $\times 10^7$) Bacterial number (cells/g dry soil $\times 10^7$)	细菌生物量 (克鲜重/克干土 $\times 10^{-5}$) Bacterial biomass (g fresh wt/g dry soil $\times 10^{-5}$)	能量 (卡/克干土) Energy content (cal/g dry soil)
0—10cm	直接计数 Direct count	140	153	1.9075
	平板计数 Plate count	14.100	15.369	0.1921
10—20cm	直接计数 Direct count	72	78	0.9810
	平板计数 Plate count	0.315	0.344	0.0043
20—40cm	直接计数 Direct count	40	44	0.5450
	平板计数 Plate count	0.323	0.352	0.0044
40—60cm	直接计数 Direct count	37	40	0.5041
	平板计数 Plate count	0.011	0.012	0.0002

表 3 退化的垂穗披碱草人工草场土壤细菌的数量、生物量和能量

Table 3 Bacterial number, biomass and energy content in soil of degraded *Elymus nutans* artificial cultivated grassland

土壤深度 Soil depth (cm)	计数方法 Counting method	细菌数量 (个细胞/克干土 $\times 10^7$) Bacterial number (cells/g dry soil $\times 10^7$)	细菌生物量 克鲜重/克干土 $\times 10^{-5}$ Bacterial biomass (g fresh wt/g dry soil $\times 10^{-5}$)	能量(卡/克干土) Energy content (cal/g dry soil)
0—10cm	直接计数 Direct count	274	298	3.7333
	平板计数 Plate count	3.880	4.229	0.0529
10—20cm	直接计数 Direct count	158	172	2.1527
	平板计数 Plate count	0.330	0.360	0.0045
20—40cm	直接计数 Direct count	125	136	1.7031
	平板计数 Plate count	0.052	0.057	0.0007
40—60cm	直接计数 Direct count	62	74	0.9276
	平板计数 Plate count	0.051	0.056	0.0007

表 4 金露梅灌丛土壤细菌的数量、生物量和能量

Table 4 Bacterial number, biomass and energy content in soil of *Potentilla fruticosa* shrub

土壤深度 Soil depth (cm)	计数方法 Counting method	细菌数量 (个细胞/克干土 $\times 10^7$) Bacterial number (cells/g dry soil $\times 10^7$)	细菌生物量 克鲜重/克干土 $\times 10^{-5}$ Bacterial biomass (g fresh wt/g dry soil $\times 10^{-5}$)	能量(卡/克干土) Energy content (cal/g dry soil)
0—10cm	直接计数 Direct count	256	276	3.4880
	平板计数 Plate count	0.538	0.586	0.0073
10—20cm	直接计数 Direct count	175	191	2.3844
	平板计数 Plate count	0.466	0.508	0.0064
20—40cm	直接计数 Direct count	166	181	2.2617
	平板计数 Plate count	0.032	0.035	0.0004
40—60cm	直接计数 Direct count	131	143	1.7849
	平板计数 Plate count	0.029	0.032	0.0004

表5 沼泽化草甸土壤细菌的数量、生物量和能量

Table 5 Bacterial number, biomass and energy content in soil of swamp meadow

土壤深度 Soil depth (cm)	计数方法 Counting method	细菌数量 (个细胞/克干土 × 10 ⁷) Bacterial number (cells/g dry soil × 10 ⁷)	细菌生物量 (克鲜重/克干土 × 10 ⁻⁵) Bacterial biomass (g fresh wt/g dry soil × 10 ⁻⁵)	能量(卡/克干土) Energy content (cal/g dry soil)
0—10cm	直接计数 Direct count	124	135	1.6895
	平板计数 Plate count	0.833	0.908	0.0135
10—20cm	直接计数 Direct count	55	60	0.7494
	平板计数 Plate count	0.335	0.365	0.0045
20—40cm	直接计数 Direct count	23	25	0.3134
	平板计数 Plate count	0	0	0
40—60cm	直接计数 Direct count	14	15	0.1907
	平板计数 Plate count	0	0	0

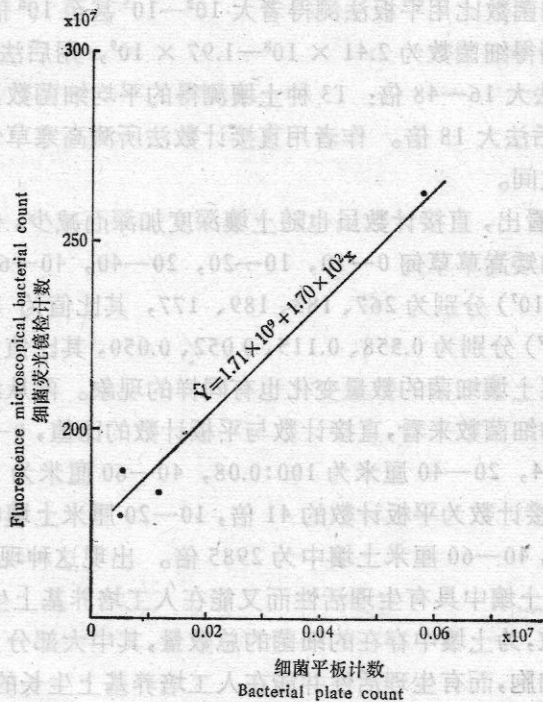


图1 矮嵩草草甸土壤细菌荧光镜检计数与平板计数的相关性

Fig. 1 Correlation between fluorescense microscopic bacterial count and bacterial plate count in soil of *Kobresia humilis* meadow

表 6 海北高寒草甸细菌平板计数对细菌直接计数的线性回归

Table 6 Linear regression of bacterial plate count (X) vs. bacterial direct count (Y) in soil of Haibei alpine meadow

试 验 处 理 Experimental treatment	回 归 方 程 Regression equation	相 关 系 数 Correlation coefficient
矮嵩草草甸 <i>Kobresia humilis</i> meadow	$\hat{Y} = 1.71 \times 10^9 + 1.70 \times 10^2 X$	$r = 0.9861$
垂穗披碱草草甸 <i>Elymus nutans</i> meadow	$\hat{Y} = 4.82 \times 10^8 + 6.53 X$	$r = 0.9472$
退化的垂穗披碱草人工草场 Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland	$\hat{Y} = 1.08 \times 10^9 + 43.5 X$	$r = 0.9159$
金露梅灌丛 <i>Potentilla fruticosa</i> meadow	$\hat{Y} = 1.41 \times 10^9 + 1.54 \times 10^2 X$	$r = 0.7959$
沼泽化草甸 Swamp meadow	$\hat{Y} = 1.72 \times 10^8 + 1.26 \times 10^2 X$	$r = 0.9955$

\hat{Y} : 细菌直接计数的估算值 (Estimated value of bacterial direct count)。

和 2.4798; 沼泽化草甸最低, 分别为 0.54, 58.75 和 0.7357。与直接计数法相比, 平板计数法测得的细菌数, 生物量及热值均远较直接计数法为低。从海北高寒草甸各植被类型 0—60 厘米深土壤细菌的平均数来看, 直接计数比平板计数大 120 倍。从 0—10 厘米表层土壤中的细菌数量来看, 不同植被类型土壤由直接计数测得的细菌数比平板计数大 10—480 倍。据 Clarholm (1975) 在芬兰斯堪的那维亚冻土地区的测定数据, 在表层土壤中, 用直接计数法测得的细菌数比用平板法测得者大 10^2 — 10^5 甚至 10^6 倍。另据 Troilldenier (1973) 报道, 用前法测得细菌数为 2.41×10^8 — 1.97×10^9 , 用后法测得者为 5×10^6 — 1.23×10^8 , 前法比后法大 16—48 倍; 13 种土壤测得的平均细菌数, 前法为 9×10^8 , 后法为 5×10^7 , 前法比后法大 18 倍。作者用直接计数法所测高寒草甸土壤细菌数, 界于上述二作者试验数据之间。

从表 1—5 还可以看出, 直接计数虽也随土壤深度加深而减少, 但减少的幅度远不如平板计数那样显著。如矮嵩草草甸 0—10, 10—20, 20—40, 40—60 厘米深土壤中直接计数测得的细菌数 ($\times 10^7$) 分别为 267, 183, 189, 177, 其比值为 100:69:71:66; 平板计数测得细菌数 ($\times 10^7$) 分别为 0.558, 0.115, 0.052, 0.050, 其比值为 100:20.6:9.3:8.9。其他植被类型草甸表层土壤细菌的数量变化也有同样的现象。再从海北高寒草甸各植被类型不同层次土壤平均细菌数来看, 直接计数与平板计数的比值, 0—10 厘米为 100:2.4, 10—20 厘米为 100:0.24, 20—40 厘米为 100:0.08, 40—60 厘米为 100:0.03。换言之, 0—10 厘米土壤中, 直接计数为平板计数的 41 倍, 10—20 厘米土壤中为 411 倍, 20—40 厘米土壤中为 1183 倍, 40—60 厘米土壤中为 2985 倍。出现这种现象的原因, 是由于平板法测得的细菌数, 系土壤中具有生理活性而又能在人工培养基上生长的细菌数。荧光直接镜检测得的细菌数, 为土壤中存在的细菌的总数量, 其中大部分为休眠细胞和不能在人工培养基上生长的细胞, 而有生理活性并能在人工培养基上生长的细胞, 仅占土壤细菌的很少一部分。生理活跃细胞主要集中在土壤表层, 其数量随土壤深度的加深而锐减。许多研究者的试验结果和报道 (Clarholm, 1974; Clark, 1970; Babiuk, 1970) 都证实和论证了上述论点。从土壤微生物生态学能流的角度看, 直接计数是研究土壤细菌总生物量

必须的手段，而平板计数则是研究土壤中具有生理活性并进行物质代谢的细胞的一种较好的方法。

三、小 结

(1) 用荧光镜检直接计数法测定了海北高寒草甸不同植被，不同深度土壤细菌数、生物量及其所含能量。

(2) 测定结果表明，细菌数及生物量以矮嵩草草甸土壤为最高，分别为 2.04×10^9 个细胞/克干土和 2.22×10^{-3} 克鲜重/克干土，所含能量为 2.78 卡/克干土；沼泽化草甸最低，分别为 0.54×10^9 个细胞/克干土和 0.59×10^{-3} 克鲜重/克干土，所含能量为 0.74 卡/克干土。

(3) 直接计数法测得的细菌数，随土壤深度的加深而逐渐减少，与平板计数法测得的菌数数量的变化具有相同的趋势，回归计算表明两者的关系为线性函数关系。

(4) 直接计数结果，显著高于平板计数，随土壤深度的加深，二者的差别更为显著。从海北高寒草甸 5 种植被类型不同土壤深度试验结果的平均数来看，0—10 厘米土壤中，直接计数为平板计数的 41 倍，10—20 厘米土壤中为 411 倍，20—40 厘米土壤中为 1183 倍，40—60 厘米中为 2985 倍。

(5) 直接计数法测得的数量高于平板计数法的原因，可能是直接计数法所测得的是土壤中细菌的总数，而平板法只能测出在土壤中只占很小一部分的具生理活跃性的细菌数。生理活跃的细胞，主要集中在土壤表层，深层土壤中存在的主要是不显示生理活性的休眠细胞。

参 考 文 献

- Arisoyovskaya, T. V. and L. V. Zyiina, 1972, Differential calculation of living and dead bacteria in soil. *Pochvovedenie*, 10: 126—132.
- Babiuk, L. A. and E. A. Paul, 1970, The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial biomass of grassland soil. *Can. J. Microbiol.*, 16: 57—62.
- Clarholm, M., 1974, Direct counts of bacteria in tundra peat for estimating generation time and biomass production. Progress Report 1973, Swedish IBP Tundra Biome Project Tech. Rep., 16: 43—57.
- Clarholm, M., V. Lid-Torsvik and J. H. Baker 1975, Bacterial populations of some Fennoscandian tundra soils. In: Wielgolaski, F. E. (Ed.), *Fennoscandian tundra ecosystems, part 1, Plant and microorganisms*, pp. 251—260, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Clark, F. E. and E. A. Paul, 1970, The microflora of grassland. *Advan. Agrom.*, 22: 375—435.
- Lid-Torsvick, V. and J. F. Hanssen, 1972, Microbiology. In: Annual Report 1971., pp. 24—34, Oslo: Norsk IBP 1972.
- Parimkina, O. M., 1972, Bacterial productivity in some soil of Western Taimyr. In: Problems of abundance, biomass and productivity of microorganisms in soil. Leningrad: Publishing House "Nauka," 95—104.
- Skinner, F. A., P. C. T. Jones and J. E. Mollison, 1952, A comparison of a direct and plate counting technique for the quantitative estimation of soil microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 6: 261.
- Trolldenler, G., 1973, The use of fluorescence microscopy for counting soil microorganisms. *Bull. Ecol. Res. Conm. (Stockholm)* 17: 53—59.

STUDIES ON BACTERIAL BIOMASS IN SOIL OF ALPINE MEADOW I. DETERMINATION OF BACTERIAL BIOMASS IN SOIL OF DIFFERENT VEGETATIONS

Li Jiazao

(Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica)

The biomass of soil bacteria in different soil depth of various vegetations of Haibei alpine meadow was studied by fluorescein microscopic counting technique in September of 1982.

The experimental results showed that the bacterial number, biomass and it's energy content were highest in soil of *Kobresia humilis* meadow and lowest in soil of swamp meadow. The bacterial number, biomass and energy content were 2.04×10^9 cells/g dry soil, 2.22×10^{-3} g fresh wt/g dry soil and 2.78 cal./g dry soil in the former and $.54 \times 10^9$ cells/g dry soil, 0.59×10^{-3} g fresh wt/g dry soil and 0.74 cal./g dry soil in the later respectively.

Bacterial direct counts decreased gradually in accordance with deepening of soil depth. This tendency of direct bacterial counts were similar to that of plate bacterial counts. regression calculation results showed that the direct bacterial counts were correlated with plate bacterial counts and follow a linear regression equation.

The direct bacterial counts were significantly higher than plate bacterial counts, and this difference was much more prominent followed with the increase of soil depth. The mean value of bacterial counts in soil of different experimental treatments indicated that the ratio of direct bacterial counts and plate bacterial counts were 1:41 in 0—10 cm depth soil, and 1:4111, 1:1183 and 1:2985 in 10—20, 20—40 and 40—60 cm depth soil successively.

The large discrepancy between above two counting technique was because of the direct counts presented the total number of physiologically viable cells and rest cells, and the plate counts only indicated physiologically viable bacterial cells. Normally, the viable bacterial cells only belong to a very small portion of the total bacterial cells, and were more rich in surface soil layer and drastically reduced in accordance with the deepening of depth of soil.