

高寒草甸土壤氮素代谢微生物数量 及活性的研究

李家藻 杨 涛 朱桂如 叶启智 程双宁

(中国科学院西北高原生物研究所)

关于参加氮素代谢的某些土壤微生物生理群的研究,国外已有不少报道(Stefanson, 1973; Mishustin, 1973; Klevenskaya, 1974; Labroue, 1977; Araragi, 1979)。国内在60年代也进行了一些研究(曹正邦等, 1960; 张宪武等, 1960、1960a; 陈华癸等, 1961)但近年来研究较少,对草原生态系统氮素循环微生物的研究,报道更少。青藏高原是世界上最大的高原,而高寒草甸又是青藏高原的主要草场。土壤中氮素代谢微生物的活动与土壤肥力又有密切的关系。因之,进行此项研究,在理论上和实践上都具有重要的意义。

一、材料和方法

1. 土壤样品的采集

1982年8月中旬,在海北定位站不同植被类型的样地采取土壤样品。采样深度为0—10厘米、10—20厘米、20—40厘米和40—60厘米。采集土壤样品的样地为:矮嵩草草甸(*Kobresia humilis* meadow);垂穗披碱草草甸(*Elymus nutans* meadow);原来种植垂穗披碱草,现已退化的人工草场;金露梅灌丛(*Potentilla fruticosa* shrub)和植被以华扁穗草(*Blysmus sinocompressus*)为主的沼泽化草甸(swamp meadow)。

2. 各有关土壤微生物类群的计数

(1) 氨化细菌 采用营养琼脂平板法,接种 10^{-4} 土壤稀释液,涂抹均匀后,26°C培养3天后计数。

(2) 硝化细菌 硝化细菌计数采用稀释法(铃木達彦等, 1979),培养基配方:(NH_4)₂·SO₄, 0.5克; NaCl, 0.3克; K₂HPO₄, 1.0克; MgSO₄·7H₂O, 0.8克; FeSO₄·7H₂O, 0.3克; CaCO₃, 7.5克; 蒸馏水, 1000毫升。每只试管(15×150毫米)装入上述培养基3毫升、灭菌后,接种 10^{-1} — 10^{-13} 土壤稀释液1毫升,每个土壤稀释度接种3只试管,26°C培养28天。取出后在每支试管中滴入2滴 Griess-Ilosvay 试剂。显红褐色表明亚硝酸细菌的存在。两分钟后,在不显色的试管中加入少量锌粉,静置观察,若再显红褐色,表明仍有亚硝酸细菌的存在,但由于共存有硝酸细菌,已将亚硝酸氧化为硝酸。按各稀释

度显色试管数,查 MPN (most probable number) 表,计算硝化细菌数。

(3) 反硝化细菌 反硝化细菌用稀释法计数,采用 Giltay 培养基,(铃木達彦等,1979)其配方如下:

溶液甲: KNO_3 , 1.0 克;精氨酸, 1.0 克; 1% 溴百里香酚蓝 (B.T.B) 5 毫升, 蒸馏水, 500 毫升。

溶液乙: 柠檬酸钠, 8.5 克; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 克; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 克; KH_2PO_4 , 1.0 克; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 克; 蒸馏水 500 毫升。

甲、乙两液混匀,将 pH 调至 7.0—7.2。

在 15×150 毫米试管中装入上述培养基 10 毫升,再将装满培养基的小玻管 (6×35 毫米) 倒置入盛有培养基的试管中,装时注意不能使倒立管中有气泡。灭菌后,接种 10^{-1} — 10^{-16} 土壤稀释液各 1 毫升,每个土壤稀释度接种 3 只试管, 26°C 培养 10 天。取出,检查试管中培养基是否变色,倒立管中有无气泡产生。培养基由绿色变为深蓝色(表明硝酸还原菌生长),并在倒立管中有气泡产生(表明脱氮菌生长)均表明有反硝化细菌生长。记录各稀释度显色试管数,由 MPN 表计算出反硝化细菌数。

(4) 好气性自生固氮菌 在改良的阿须贝氏无氮琼脂平板上,用涂抹法接种 10^{-1} 土壤稀释液, 26°C 培养 10 天计数。

(5) 嫌气性自生固氮菌 采用依姆采夫(Емцев, 1962)半固体培养基其配方为:葡萄糖, 20 克;蛋白胨, 5 克; 酵母浸膏, 0.053 克; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 克; NaCl , 0.5 克; FeSO_4 , 0.01 克; MnSO_4 , 0.01 克; 费德罗夫微量元素溶液(H_3BO_3 , 5 克; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 0.5 克; K , 0.5 克; NaBr , 0.5 克; ZnSO_4 , 0.2 克; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 0.3 克), 1 毫升; 琼脂, 2 克。将 pH 调到 7.0。将半固体培养基分装入 15×150 毫米试管中,每管装 10 毫升。灭菌后,趁热在每只试管中加 1—2 毫升无菌液体石蜡,以防止空气中氧气渗入。接种 10^{-1} — 10^{-10} 土壤稀释液各 1 毫升,每个土壤稀释度接种 3 只试管, 26°C 培养 7 天。取出,若试管内半固体培养基中有气泡生成,表明有嫌气性自生固氮菌生长,由 MPN 表查出菌数近似值,计算每克干土中的嫌气性自生固氮菌数。

3. 土壤微生物的生化活性强度测定

(1) 氨化作用 氨化作用强度测定采用波爽氏培养基(J. 波爽, 1959)。其配方为:蛋白胨, 2 克; K_2HPO_4 , 0.25 克; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.125 克; CaCl_2 , 0.125 克; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 2.5 毫克; MnSO_4 , 2.5 毫克; 蒸馏水 1000 毫升。调 pH 到 7.2。将培养基分装于 20×200 毫米试管中,每管 10 毫升。灭菌后,接种 10^{-1} 土壤悬浮液 1 毫升, 26°C 培养 48 小时,取出过滤。用移液管吸取 2 毫升,置入 50 毫升容量瓶中,加蒸馏水到刻度,摇匀后,吸取 5 毫升置于 25 毫升容量瓶中,加水稀释到 20 毫升左右。加入 25% 酒石酸钾钠溶液 1 毫升,摇匀,静置 5 分钟使其与钙镁离子络合。加入 5 滴 1% 阿拉伯胶水溶液,摇动后,再加入 1 毫升纳氏试剂显色,定容到刻度,摇匀后,用 Unicam SP 600 型分光光度计 490 毫微米波长进行比色,在氨态氮标准曲线上查出培养液中氨态氮的微克数,再换算为每克干土氨态氮的毫克数。

(2) 硝化作用 配制硝化作用强度培养基(铃木達彦等,1979),其配方为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 克; K_2HPO_4 , 0.75 克; NaH_2PO_4 , 0.25 克; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 克; MnSO_4 ,

0.01 克; CaCO_3 , 5.0 克; 蒸馏水 1000 毫升。将培养基分装于 50 毫升三角瓶中, 每瓶装入 10 毫升。灭菌后, 接种 10^{-1} 土壤稀释液 1 毫升, 26°C 培养 21 天。取出, 过滤入瓷蒸发皿中, 在 60°C 水浴上蒸干(若有腐殖质颜色, 加 10% H_2O_2 溶液少许氧化之)。加 1 毫升酚二磺酸试剂。10 分钟后, 加水约 15 毫升, 再加氨水使呈碱性反应, 显色后, 移入 25 毫升容量瓶中, 加水到刻度, 用 Unicam SP 600 型分光光度计 420 毫微米波长比色, 从硝态氮标准曲线查出硝态氮的微克数, 再换算成每克干土中硝态氮的毫克数。

(3) 固氮作用强度和固氮率的测定 采用维诺格拉德斯基无氮培养基, 其配方为: 葡萄糖, 20 克; K_2HPO_4 , 1.0 克; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 克; NaCl , 0.01 克; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 毫克; CaCO_3 , 5 克; 蒸馏水, 1000 毫升。将上述无氮培养基分装于 15×150 毫米试管中, 每管 5 毫升。灭菌后, 接种 10^{-1} 的土壤稀释液 1 毫升, 每个土壤样品接种 6 只试管。 26°C 培养 15 天。取出, 其中 3 只试管的培养液分别移入 3 只 25 毫升凯氏烧瓶中, 加入浓硫酸 3 毫升, 1:9 硫酸铜、硫酸钾混合物 0.2 克, 加热消化。冷却后, 移入 50 毫升容量瓶中, 加水稀释到 40 毫升左右, 加 25% 酒石酸钾钠溶液 1 毫升, 摇匀, 静置 5 分钟后, 加 0.5 毫升 1% 阿拉伯胶的水溶液, 摇匀后, 加 2 毫升纳氏试剂, 显色后按测定氨态氮同样的方法测定每克干土氨态氮的毫克数。另 3 只试管的培养液分别用常用的 Shaffer-Hartman-Somogi 法测定其剩余的葡萄糖, 并由耗用的葡萄糖量计算出固氮率(消耗 1 克葡萄糖固定的氮的毫克数)。为进一步证实高寒草甸土壤中是否存在嫌气性固氮微生物, 同时接种 10^{-1} 土壤稀释液入另 6 只试管, 用生物吸氧法在嫌气条件下, 26°C 培养 15 天, 按同上方方法测定固氮量和固氮率。

二、实验结果

海北高寒草甸不同植被、不同深度土壤氨化细菌、硝化细菌、反硝化细菌、嫌气性自生固氮菌的数量测定结果列于表 1—4。氨化作用强度、硝化作用强度、固氮作用强度和固

表 1 海北高寒草甸土壤中氨化细菌的数量 (10^4 个细胞/克干土)
Table 1 Number of ammonifying bacteria in soil of Haibei alpine meadow
(10^4 cells/g dry soil)

试验处理 Experimental treatment	土壤深度(厘米) Soil depth (cm)			
	0—10	10—20	20—40	40—60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	1998	1687	1966	210
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	4690	2540	1310	1220
退化的垂穗披碱草人工草场 (degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	3110	594	374	268
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)	2150	509	68	132
沼泽草甸 (swamp meadow)	8130	2750	639	205

表2 海北高寒草甸土壤中硝化细菌数量 (10⁴个细胞/克干土)

Table 2 Number of nitrifying bacteria in soil of Haibei alpine meadow (10⁴cells/g dry soil)

试验处理 Experimental treatment	土壤深度 (厘米) Soil depth (cm)			
	0-10	10-20	20-40	40-60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	558	115	52	50
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	14100	315	323	11
退化的垂穗披碱草草场 (degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	3880	330	52	51
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)	538	466	32	29
沼泽草甸 (swamp meadow)	833	335	0	0

表3 海北高寒草甸土壤中反硝化细菌数量 (10⁴个细胞/克干土)

Table 3 Number of denitrifying bacteria in soil of Haibei alpine meadow (10⁴cells/g dry soil)

试验处理 Experimental treatment	土壤深度 (厘米) Soil depth			
	0-10	10-20	20-40	40-60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	144.00	256.00	1.96	1.89
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	1.80 × 10 ¹¹	1.77 × 10 ⁹	19.40	5.66
退化的垂穗披碱草人工草场 (degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	389.00	186.00	5.87	0.32
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)	7.68 × 10 ⁷	2.50 × 10 ⁷	437.00	59.30
沼泽草甸 (swamp meadow)	4.67 × 10 ⁸	1.12 × 10 ⁷	3.05 × 10 ⁹	2.42 × 10 ⁹

表4 海北高寒草甸土壤中嫌气性自生固氮菌数量 (10⁴个细胞/克干土)

Table 4 Nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria in soil of Haibei alpine meadow (10⁴cells/g dry soil)

试验处理 Experimental treatment	土壤深度 (厘米) Soil depth (cm)			
	0-10	10-20	20-40	40-60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	39.20	14.10	1.44	0.57
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	5.78	1.77	1.81	1.38
退化的垂穗披碱草人工草场 (degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	0.58	0.33	0.12	0.01
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)	7688.00	3330.00	2.19	0.21
沼泽草甸 (swamp meadow)	6.65 × 10 ⁷	5.60 × 10 ⁴	240.00	177.00

表5 海北高寒草甸土壤氨化作用强度 (毫克 $\text{NH}_4\text{-N}$ /克干土)

Table 5 Ammonification activity of Haibei alpine meadow soil cultured in liquid medium (mg $\text{NH}_4\text{-N}$ /g dry soil)

试验处理 Experimental treatment		土壤深度 (厘米) Soil depth (cm)			
		0-10	10-20	20-40	40-60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)		13.320	7.243	10.880	8.219
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)		16.145	11.176	4.205	2.811
退化的垂穗披碱草人工草场 (Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)		11.176	9.882	3.649	1.556
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)		22.966	15.567	5.038	4.364
沼泽草甸 (Swamp meadow)		39.796	48.574	25.993	19.964

表6 海北高寒草甸土壤硝化作用强度 (毫克 $\text{NO}_3\text{-N}$ /克干土)

Table 6 Nitrification activity of Haibei alpine meadow soil cultured in liquid medium (mg $\text{NO}_3\text{-N}$ /g dry soil)

试验处理 Experimental treatment		土壤深度 (厘米) Soil depth (cm)			
		0-10	10-20	20-40	40-60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)		0.082	0.046	0.022	0.020
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)		0.144	0.043	0.052	0.014
退化的垂穗披碱草人工草场 (Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)		0.047	0.048	0.055	0.076
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)		0.104	0.077	0.070	0.005
沼泽草甸 (Swamp meadow)		0.077	0.028	0.001	0.004

表7 海北高寒草甸土壤好气培养的固氮作用强度 (毫克氮/克干土)

Table 7 Nitrogen fixation activity of Haibei alpine meadow soil aerobic cultured in liquid medium (mg N/g dry soil)

试验处理 Experimental treatment		土壤深度 (厘米) Soil depth (cm)			
		0-10	10-20	20-40	40-60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)		2.308	3.414	2.326	2.398
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)		1.856	1.579	2.807	1.814
退化的垂穗披碱草人工草场 (Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)		1.404	1.452	1.189	1.199
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)		1.932	3.364	1.085	1.483
沼泽草甸 (Swamp meadow)		1.846	3.477	2.103	0.935

表 8 海北高寒草甸土壤嫌气培养的固氮作用强度 (毫克氮/克干土)

Table 8 The nitrogen fixation activity of Haibei alpine meadow anaerobic cultivated in liquid medium (mg N/g dry soil)

试验处理 Experimental treatment	土壤深度 (厘米) Soil depth (cm)			
	0—10	10—20	20—40	40—60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	2.061	2.255	2.096	1.808
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	1.497	1.575	1.794	1.779
退化的垂穗披碱草人工草场 (Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	0.359	1.185	1.263	1.119
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)	0.887	0.629	0.660	0.588
沼泽草甸 (Swamp meadow)	1.527	2.059	1.444	0.814

表 9 海北高寒草甸土壤好气培养的固氮率 (毫克氮/克葡萄糖)

Table 9 Nitrogen fixation efficiency of Haibei alpine meadow soil aerobic cultured in liquid medium (mg N/g glucose)

试验处理 Experimental treatment	土壤深度 (厘米) Soil depth (cm)			
	0—10	10—20	20—40	40—60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	1.581	3.035	2.967	2.910
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	1.273	1.433	2.264	1.435
退化的垂穗披碱草人工草场 (Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	1.011	1.028	0.885	1.050
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)	1.464	2.999	0.710	0.989
沼泽草甸 (Swamp meadow)	1.194	2.229	1.330	0.643

表 10 海北高寒草甸土壤嫌气培养的固氮率 (毫克氮/克葡萄糖)

Table 10 Nitrogen fixation efficiency of Haibei alpine meadow soil anaerobic cultured in liquid medium (mg N/g glucose)

试验处理 Experimental treatment	土壤深度 (厘米) Soil depth (cm)			
	0—10	10—20	20—40	40—60
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	1.344	1.803	1.326	1.144
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	0.947	1.088	2.816	1.182
退化的垂穗披碱草草场 (Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	0.695	0.960	1.681	2.716
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)	1.008	0.807	0.851	0.829
沼泽草甸 (Swamp meadow)	0.974	1.313	0.919	0.664

氮率等的测定结果分别列于表 5—10。同 1980 年的试验结果相同，仍未发现有好气性自生固氮菌的存在。

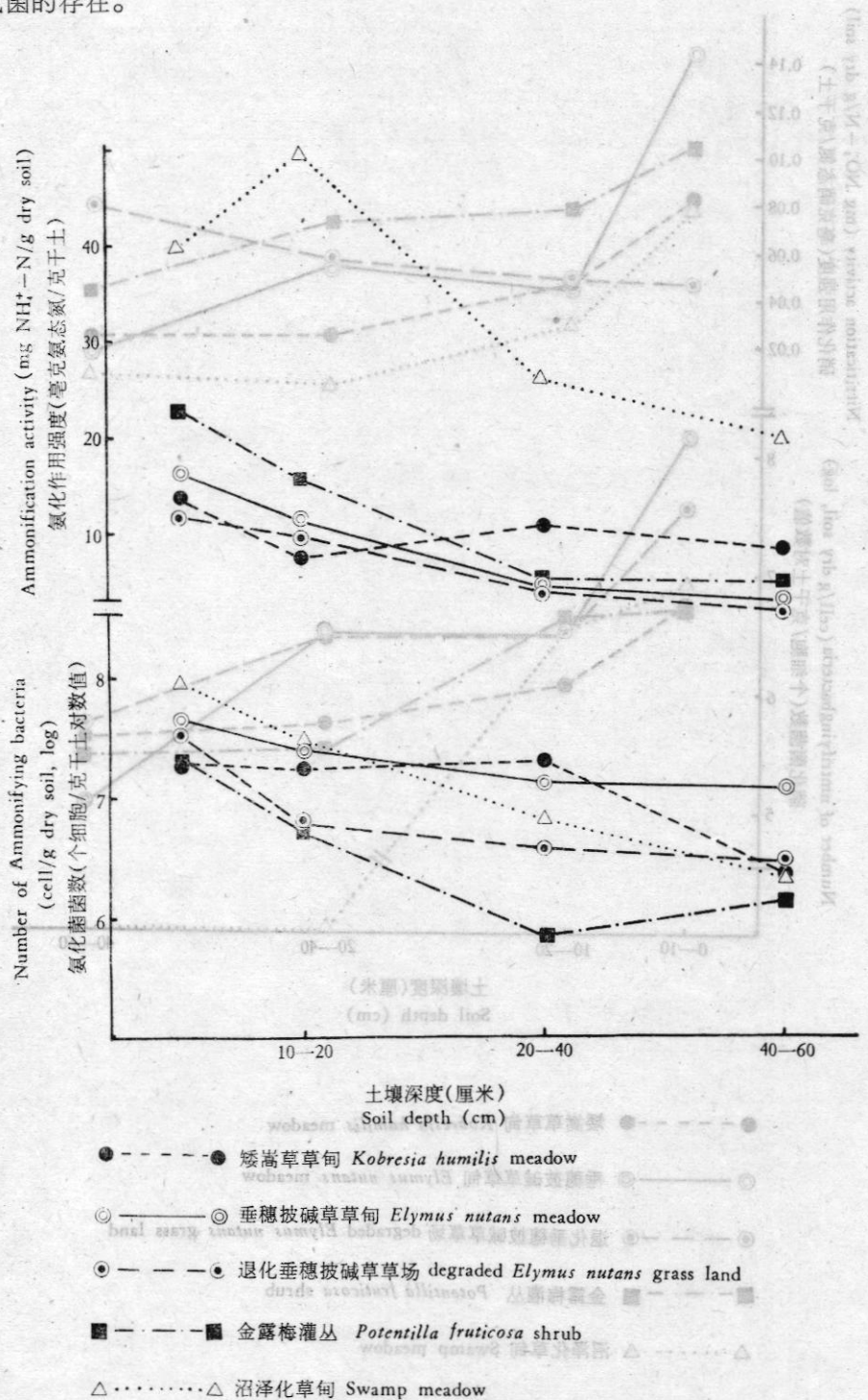
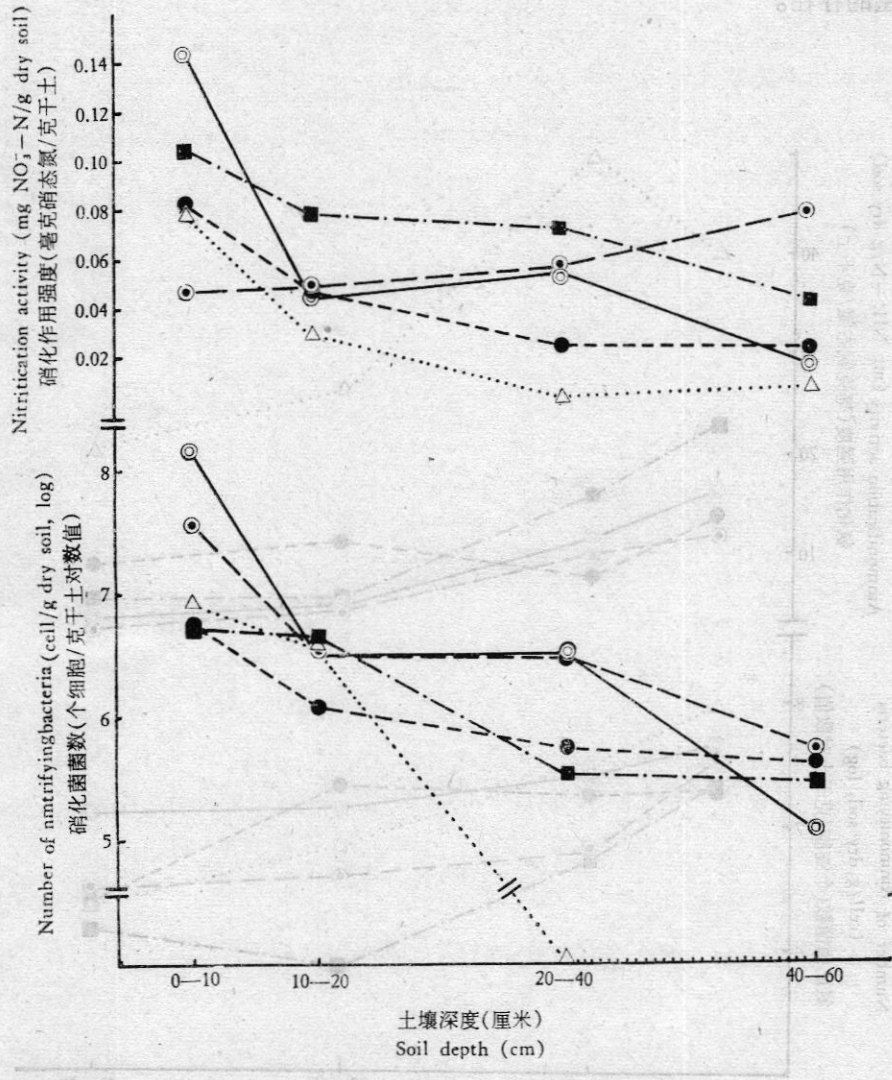


图 1 河北高寒草甸氨化菌菌数及氨化作用强度
 Fig. 1 The number of ammonifying bacteria and ammonification activity in soil of Haibei alpine meadow



- - - - ● 矮嵩草草甸 *Kobresia humilis* meadow
- ◎ ——— ◎ 垂穗披碱草草甸 *Elymus nutans* meadow
- ◎ - · - · ◎ 退化垂穗披碱草草甸 degraded *Elymus nutans* grass land
- - · - · ■ 金露梅灌丛 *Potentilla fruticosa* shrub
- △ ····· △ 沼泽化草甸 Swamp meadow

图2 河北高寒草甸硝化菌菌数及硝化作用强度

Fig. 2 The number of nitrifying bacteria and nitrification activity in soil of Haibei alpine meadow

三、讨论

1. 高寒草甸土壤氮素代谢微生物各生理群的数量

从表1—4的数据可以看出,不同深度土壤中各生理群菌数均有明显的差异,0—10厘米土壤中菌数量最高,随着土壤深度的加深,菌数也随之减少。从图1—4中更能看出这

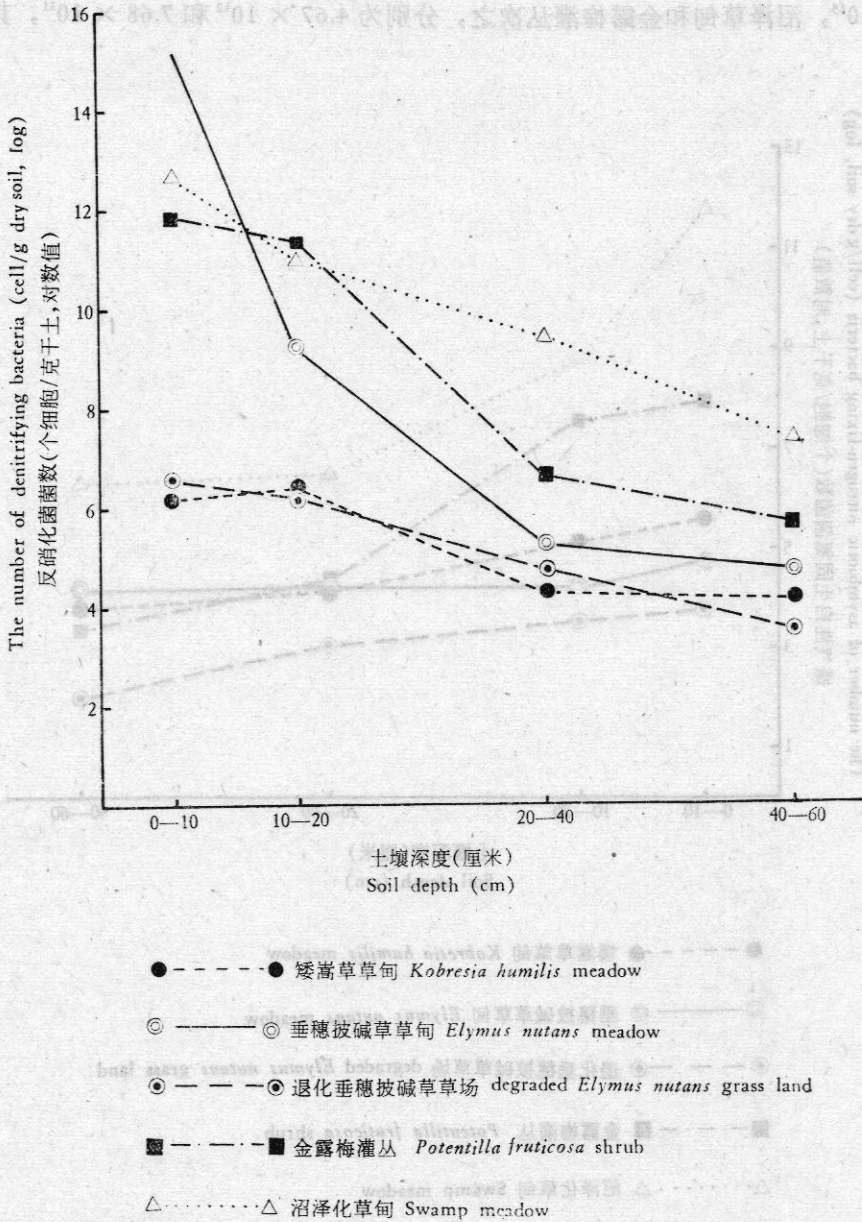


图3 海北高寒草甸反硝化菌数(个细胞/克干土)

Fig. 3 The number of denitrifying bacteria in soil of Haibei alpine meadow (cell/g dry soil)

种趋势。

从海北高寒草甸各植被土壤表层0—10厘米土壤中各生理群菌数(个细胞/克干土)的平均值来看,反硝化菌数量最高,达 3.61×10^{14} ;嫌气性固氮菌次之,达 1.33×10^{11} ;再次为硝化细菌,达 4.02×10^7 ;氨化细菌最低,为 3.98×10^7 。但从不同植被0—10厘米土壤中各生理群细菌数量(个细胞/克干土)来看,则另有不同情况。氨化细菌以沼泽草甸和垂穗披碱草草甸较高,分别为 8.13×10^7 和 4.69×10^7 ;硝化细菌也以垂穗披碱草草甸为最高,为 1.41×10^8 ,其他植被类型较低;反硝化细菌以垂穗披碱草草甸最高,达 1.80×10^{15} ,沼泽草甸和金露梅灌丛次之,分别为 4.67×10^{12} 和 7.68×10^{11} ,其他植被

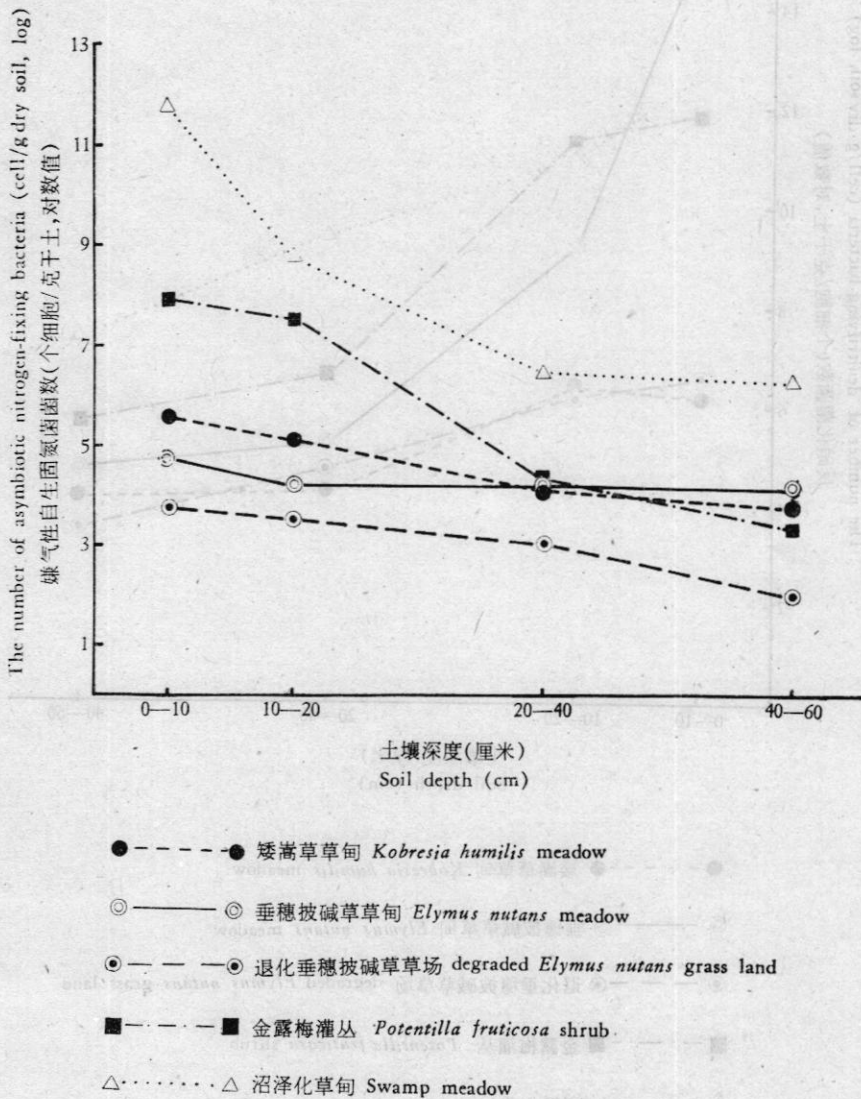


图4 海北高寒草甸嫌气性固氮菌数(个细胞/克干土)

Fig. 4 The number of anaerobic asymbiotic nitrogenfixing bacteria (cell/g dry soil)

类型则显著较低。试验结果查明,高寒草甸土壤中存在有嫌气性自生固氮菌,其数量以沼泽化草甸最高,达 6.65×10^{11} , 金露梅灌丛次之,为 7.69×10^7 , 再次为矮嵩草草甸,为 3.92×10^5 。

2. 高寒草甸土壤微生物的氨化和硝化作用

从表 1、表 2 和图 1、图 2 可以看出,各试验处理不同深度土壤氨化作用强度、硝化作用强度的变化和不同深度土壤中氨化细菌、硝化细菌数量的变化基本上具有同样的趋势:0—10 厘米土壤氨化作用和硝化作用较强,并随土壤深度加深而下降。回归分析表明,二者具有线性函数关系。除退化的人工草场试验处理硝化细菌对硝化作用强度呈负相关外,其他各试验处理均呈正相关(表 11、12)。各植被类型 0—10 厘米土壤氨化作用强度(毫克 $\text{NH}_4\text{-N}$ /克干土)平均为 20.68,硝化作用强度(毫克 $\text{NO}_3\text{-N}$ /克干土)为 0.09,前者与后者的比值为 230:1,说明高寒草甸土壤氨化作用强度远远大于硝化作用强度。

从不同土壤植被类型来看,0—10 厘米土壤氨化作用强度(毫克 $\text{NH}_4\text{-N}$ /克干土)以沼泽草甸和金露梅灌丛较高,分别为 39.80 和 22.97,其次为垂穗披碱草草甸和矮嵩草草甸。

表 11 氨化细菌菌数的对数对氨化作用强度的线性回归

Table 11 Linear regression of logarithmic numbers of ammonifying bacteria (x) vs. ammonification activity (y)

试验处理 Experimental treatment	线性回归方程 Linear regression equation	相关系数 Correlation coefficient
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	$\hat{Y} = -9.1539 + 2.7103x$	$r = 0.4716$
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	$\hat{Y} = -156.8266 + 22.5974x$	$r = 0.9962$
退化的垂穗披碱草人工草场 (Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	$\hat{Y} = -50.7968 + 8.4148x$	$r = 0.8483$
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)	$\hat{Y} = -73.3874 + 13.1379x$	$r = 0.9767$
沼泽草甸 (Swamp meadow)	$\hat{Y} = -77.5746 + 15.6192x$	$r = 0.8439$

\hat{Y} : 氨化作用强的估算值 (estimated value of ammonification activity)。

表 12 硝化细菌的对数对硝化作用强度的线性回归

Table 12 Linear regression of logarithmic numbers of nitrification bacteria (x) vs. nitrification activity (y)

试验处理 Experimental treatment	线性回归方程 Linear regression equation	相关系数 Correlation coefficient
矮嵩草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	$\hat{Y} = -0.3132 + 0.0587x$	$r = 0.9972$
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	$\hat{Y} = -0.2142 + 0.0424x$	$r = 0.9568$
退化的垂穗披碱草人工草场 (Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	$\hat{Y} = 0.1231 - 0.0104x$	$r = -0.6889$
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> shrub)	$\hat{Y} = -0.2102 + 0.0450x$	$r = 0.7535$

\hat{Y} : 硝化作用强度的估算值 (estimated value of nitrification activity)。

甸,分别为 16.15 和 13.32,退化的人工草场最低,仅为 11.18。硝化作用强度(毫克 $\text{NO}_3\text{-N}$ /克干土)以垂穗披碱草甸和金露梅灌丛较高,分别为 0.144 和 0.104,其次为矮蒿草甸和沼泽化草甸,分别为 0.082 和 0.077,退化的人工草场最低,仅为 0.047。

3. 高寒草甸土壤微生物的固氮作用

上述嫌气性自生固氮菌计数的结果(表 4)已经表明,海北高寒草甸土壤存在有嫌气性自生固氮菌。为进一步了解其固氮作用强度,设置了嫌气性培养和好气培养两种试验处理,设置前一种试验处理的目的是进一步证实嫌气性自生固氮菌的存在。因为在嫌气性条件下,好气性微生物是难以生长并显示其活性的。设置后一试验处理的目的是了解嫌气性自生固氮菌较为接近自然状况的固氮作用活性。试验结果(表 7、表 8)表明,不论是好气培养或嫌气培养,均能固定大气氮素。其固氮作用强度(毫克氮/克干土),好气培养为 0.935—3.477,不同植被类型,不同土壤深度平均为 1.999;嫌气培养为 0.359—2.255,平均为 1.370。 t 检验表明, t 值为 4.242,大于 $t_{(0.01)}$ 值 2.861,表明好气性培养的固氮作用强度与嫌气培养的固氮作用强度有极显著的差异。作者以往的工作证明,嫌气性自生固氮菌在嫌气条件下培养可以固氮,在自然状况好气条件下与土壤中其他好气性微生物共同生长时,由于好气菌耗用了氧气,给嫌气性自生固氮菌的生长创造了条件,因而也能固氮,且固氮作用强度高于在嫌气条件下单独培养时的固氮作用强度。海北高寒草甸土壤的固氮作用强度试验结果,又一次印证了这种现象。

与氨化作用和硝化作用不同,固氮作用的动态另具特色。从表 7 表 8 可以看出,随土壤深度变化的固氮作用强度的动态是: 0—10 厘米土壤较低,而 20 厘米左右土壤较高,40—60 厘米土壤又趋于下降。和不同土壤深度嫌气性自生固氮菌数量的变化不相关。产生这种情况的原因可能和不同深度土壤嫌气性自生固氮菌的固氮效率有关,而固氮率是固氮作用强度的决定因素之一。表 9、表 10 的数据表明,各植被类型不同深度土壤固氮率与固氮作用强度变化的趋势基本上是一致的。以固氮率作为自变数,固氮作用强度作为因变数进行了二次多项式回归。计算的结果(表 13)表明,不论是那种土壤植被类型,不论是好气培养还是嫌气培养,相关指数 R^2 值均非常接近于 1,说明固氮作用强度与固氮率密切相关。

4. 草场退化对土壤氮素代谢微生物数量和活性的影响

从表 1—10 可以明显地看出,退化的垂穗披碱草人工草场土壤中各有关氮代谢微生物的数量均明显地低于未退化的天然的垂穗披碱草草场。特别是从与土壤肥力有关的几种微生物生化活性指标表明,未退化的天然垂穗披碱草草场均明显地高于已退化的垂穗披碱草人工草场。以 0—10 厘米土壤的氨化作用、硝化作用、好气性固氮作用强度来看,前者为 16.145 毫克 $\text{NH}_4\text{-N}$ /克干土,0.144 毫克 $\text{NO}_3\text{-N}$ /克干土和 1.856 毫克氮/克干土;而后者仅分别为 11.176, 0.047 和 1.404。 t 检验表明,前者与后者氨化作用和硝化作用均有极显著的差异 ($P < 0.01$)。

垂穗披碱草是 1978 年种植的,在 1980 年以前长势很好,但因未进行有效的管理,到 1982 年已全部退化,几乎全部为杂类草所取代。作者在 1981 年同一时期在该人工草场采取 0—10 厘米土壤进行测定,氨化作用强度为 13.595 毫克 $\text{NH}_4\text{-N}$ /克干土,硝化作用强

表 13 海北高寒草甸土壤固氮率对固氮作用强度的二次多项式回归

Table 13 Second degree polynomial regression of nitrogen fixation efficiency (x) vs. nitrogen fixation activity (y) in soil of Haibei alpine meadow (R^2 = correlation index)

试验处理 Experimental treatment	培养条件 Culture condition	回归方程 Regression equation	R^2
矮蒿草草甸 (<i>Kobresia humilis</i> meadow)	好气培养 Aerobic culture	$\hat{y} = 29.54 - 26.54x + 5.89x^2$	0.7976
	嫌气培养 Anaerobic culture	$\hat{y} = -2.17 + 5.26x - 1.56x^2$	0.9853
垂穗披碱草草甸 (<i>Elymus nutans</i> meadow)	好气培养 Aerobic culture	$\hat{y} = 7.37 - 7.31x + 2.34x^2$	0.9684
	嫌气培养 Anaerobic culture	$\hat{y} = -0.25 + 2.37x - 0.58x^2$	0.9021
退化的垂穗披碱草人工草场 (Degraded artificial cultivated <i>Elymus nutans</i> grassland)	好气培养 Aerobic culture	$\hat{y} = -43.52 + 92.88x - 47.87x^2$	0.8299
	嫌气培养 Anaerobic culture	$\hat{y} = -0.72 + 2.23x - 0.57x^2$	0.7267
金露梅灌丛 (<i>Potentilla fruticosa</i> meadow)	好气培养 Aerobic culture	$\hat{y} = 0.23 + 1.31x - 0.09x^2$	0.9988
	嫌气培养 Anaerobic culture	$\hat{y} = 3.47 - 7.46x + 4.86x^2$	0.9635
沼泽草甸 (Swamp meadow)	好气培养 Aerobic culture	$\hat{y} = -0.22 + 1.84x - 0.08x^2$	0.9998
	嫌气培养 Anaerobic culture	$\hat{y} = -1.55 + 4.39x - 1.25x^2$	0.9995

\hat{y} : 固氮作用强度的估算值 (estimated value of nitrogen fixation activity)。

度为 1.368 毫克 $\text{NO}_3\text{-N}$ /克干土。而 1982 年在已退化的同一地块采样测定, 氨化作用强度为 11.176 毫克 $\text{NH}_4\text{-N}$ /克干土, 硝化作用强度为 0.047 毫克 $\text{NO}_3\text{-N}$ /克干土。说明人工草场退化后氨化作用和硝化作用活性均明显地降低了。

5. 氮素代谢微生物生理群的数量、活性与高寒草甸土壤氮素肥力水平的关系

从表 1—10 可以看出, 高寒草甸土壤中没发现有好气性自生固氮菌, 仅有嫌气性自生固氮菌, 固氮作用强度平均为 2 毫克氮/克干土。氨化作用较强, 而硝化作用较弱, 前者比后者高 230 倍, 说明土壤中经氨化细菌作用产生的氨态氮仅有很少一部分经硝化菌转化为硝态氮而绝大部分氨态氮仍存在于土壤中。加之, 高寒草甸土壤中反硝化菌数量(个细胞/克干土)甚多, 0—10 厘米土壤中反硝化菌的数量平均高达 3.61×10^{14} 。氨化作用强度较高的沼泽化草甸, 金露梅灌丛和垂穗披碱草草甸, 反硝化菌数量也是很高的。这样土壤中的氨态氮, 在被植物充分利用之前, 可能大部分均被数量较多的反硝化菌转化为气态氮而散失到大气中去。上述这些不利因素, 限制了土壤氮素肥力水平的提高, 是不利于牧草良好生长的重要因素之一。因之, 采用人工措施, 对氮素代谢微生物各生理群加以调节和控制, 使不利因素转化为有利因素, 可能是增加土壤中可给态氮素水平, 提高牧草产量的重要途径之一。

四、小 结

(1) 对高寒草甸不同植被、不同深度土壤氮素代谢微生物生理群的数量及活性进行了研究。试验结果表明, 各有关微生物生理群的数量均以 0—10 厘米土壤为最高, 并随土壤深度的加深而减少。40—60 厘米土壤数量最低。总的看来, 高寒草甸 0—10 厘米土壤中, 反硝化细菌数量最高, 嫌气性自生固氮菌次之, 再次为氨化细菌及硝化细菌。

(2) 各生理群在不同植被 0—10 厘米土壤中的分布, 氨化细菌以沼泽草甸土壤最高,

达 8.13×10^7 个细胞/克干土,硝化细菌以垂穗披碱草草甸最高,达 1.41×10^8 个细胞/克干土,反硝化细菌在沼泽草甸、金露梅灌丛和垂穗披碱草草甸土壤中均较高,达 7.6×10^{11} — 1.80×10^{15} 个细胞/克干土,嫌气性自生固氮菌以沼泽草甸最高,达 6.65×10^{11} 个细胞/克干土。

(3) 高寒草甸土壤的氨化作用强而硝化作用弱,从各植被类型 0—10 厘米土壤的平均数来看,前者为 20.68 毫克 $\text{NH}_4\text{-N}$ /克干土,后者仅为 0.09 毫克 $\text{NO}_3\text{-N}$ /克干土,前者与后者的比值为 230:1。氨化作用、硝化作用强度的变化和氨化细菌、硝化细菌的数量的变动有相同的趋势,回归分析表明,二者之间呈线性函数关系。

(4) 高寒草甸土壤未发现有好气性自生固氮菌,其大气氮素固定作用主要是由嫌气性自生固氮菌来完成的,各植被类型土壤固氮作用强度平均为 1.68 毫克氮/克干土。不同深度土壤的固氮作用强度变化别具特色,表层土壤固氮作用强度较低,而 20 厘米左右土壤固氮作用强度较高。回归分析表明,固氮作用强度与固氮率之间的关系符合于二次多项式回归方程。相关指数 R^2 非常接近于 1。

(5) 草场退化导致氮素代谢微生物活性降低,从而使土壤肥力下降,退化的垂穗披碱草人工草场与天然垂穗披碱草草甸相比,土壤的氨化作用、硝化作用和固氮作用强度都显著降低,特别是氨化作用与硝化作用强度退化前后的差异,极为显著($P < 0.01$)。退化的垂穗披碱草人工草场与退化前一年同一时期的数据比较,氨化作用和硝化作用也明显降低。

(6) 高寒草甸土壤氨化作用强,也有嫌气性自生固氮菌固定大气氮素。但由于硝化作用弱,更由于反硝化菌数量高,限制了土壤肥力的提高。采取适当措施对氮素代谢微生物加以调节和控制,可能是提高高寒草甸土壤肥力的途径之一。

参 考 文 献

- 陈华癸、周启,1961,水稻田土壤中的硝化作用和硝化微生物的研究1.水稻田土壤中的硝化作用.土壤学报,9(1—2) 56—63.
- 张宪武、周煦卿、郑洪元、陈祝春、范露兮、于燕,1960,深耕施肥对小麦丰产田微生物区系及其动态影响的研究,微生物,2(4): 158—163.
- 张宪武、周煦卿、郑洪元、陈祝春、范露兮、于燕,1960a,深耕施肥对水稻土微生物区系及其动态影响的研究.微生物,2(5): 202—209.
- 曹正邦、郝文英、游长芬、顾希贤,1959,水稻土中的微生物学特性(1)华东华中主要类型水稻土中微生物数量及其活性的研究.土壤学报,7(3—4): 218—226.
- 波 爽, J. 土壤微生物分析技术手册, 1959. 科学出版社.
- 鈴木達彦, 1979, 土壤微生物生態研究法, 共立出版株式会社.
- Araragi, Michio; Phetchawee, Samnao and Tantitanapat, Prapit 1979 Microflora related to the nitrogen cycle in the tropical upland from soils. *Soil Sci. Plant Nutr. (Tokyo)*, 25(2): 235—244.
- Klevenskaya, I. L. 1974 Biological nitrogen fixation by different types of western Siberian soils. *Tr. Biol. Inst., Akad. Nauk SSSR Sib. Otd.*, 27: 139—144.
- Labroue, L. and J. Carles 1977 The nitrogen cycle in the alpine soil of Pic du Midi de Bigorre (Hautes Pyrenees). *Oecol. Plant.*, 12(1): 55—77.
- Mishustin, E. N. and V. T. Emtsev 1973 Anaerobic nitrogen-fixing bacteria in USSR soils. *Soil Biol. Biochem.*, 5(1): 97—107.
- Stefanson, R. C. 1973 Relative rates of denitrification and nonsymbiotic nitrogen fixation in the soil-plant system. *Soil Biol. Biochem.* 5(6): 869—880.
- Емцев В. Т. 1962 об источниках углеродного питания для азотфиксирующих микроорганизмов рода *Clostridium*. *микробиол. т. 31, Вып 1, стр.18—23.*

STUDIES ON THE NUMBER AND ACTIVITY OF NITROGEN METABOLIC MICROORGANISMS IN SOIL OF ALPINE MEADOW

Li Jiazao Yang Tao Zhu Guiru Ye Qizhi Cheng Shuangning
(Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica)

The number and activity of nitrogen metabolic microorganisms in soil of alpine meadow were studied in September, 1982. The experimental results indicated that the number of physiological groups of nitrogen metabolic microorganisms was highest in 0—10 cm depth of soil and decreased following with the deepening of soil depth. It attained the lowest counts in 40—60 cm depth of soil. Generally, in the soil of surface layer of soil, the number of denitrifying bacteria was dominant, the next one was anaerobic nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria. The number of ammonifying and nitrifying bacteria was lower than previously mentioned microbes.

As for the distribution of different physiological groups in soil of various vegetations, the ammonifying and nitrifying bacteria were dominant in soil of swamp meadow (8.13×10^7 and 8.33×10^6 cells/g dry soil) and *Elymus nutans* meadow (4.69×10^7 and 1.41×10^8 cells/g dry soil) respectively; the number of denitrifying bacteria was very high in most soil of Haibei alpine meadow (1.44×10^6 — 1.80×10^{15} cells/g dry soil) and the anaerobic nonsymbiotic bacteria were highest in soil of swamp meadow (6.65×10^{11} cells/g dry soil).

The ammonification in 0—10 cm depth soil of alpine meadow was rather strong (average to 20.68 mg $\text{NH}_4\text{-N/g}$ dry soil). On the contrary, the nitrification was comparatively weak (average to 0.09 mg $\text{NO}_3\text{-N/g}$ dry soil). The ratio of the former and the later was 230:1. The dynamics of quantitative changes of ammonification and nitrification activities were similar to that of ammonifying and nitrifying bacteria, and followed a linear regression equation.

Azotobacter could not be found in all soils of Haibei alpine meadow. Most probably, the fixation of N_2 was mainly accomplished by anaerobic nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria. It was the characteristic of nitrogen fixation in soil of Haibei alpine meadow that the nitrogen fixation in lower layer of soil was more active than upper layer of soil. Probably, it might attributed to the nitrogen fixation efficiency of anaerobic nonsymbiotic bacteria in corresponding soil layers. This assumption was supported by biological statistics. Regression calculation showed that the nitrogen fixation efficiency was significantly correlated nitrogen fixation activity the later and fitted a second degree regression equation.

The experimental data also indicated that the degradation of grassland results in dropping down of soil fertility. As an example, in comparison with the natural *Elymus nutans* meadow, the ammonification, nitrification and nitrogen fixation was significantly decreased, and it was also obviously lower than that of the same artificial grassland which have not yet degraded in the same season of the previous year.