

细叶亚菊入侵对高寒草甸垂穗披碱草人工草场土壤中反硝化细菌及其活性的生化他感作用的生化他感作用*

张宝琛 杜伊光 白雪芳 顾立华

(中国科学院西北高原生物研究所)

摘 要

在探讨垂穗披碱草 (*Elymus nutans*) 人工草场自然退化现象的过程中, 经调查和实验证明: 反硝化细菌数的增长和土壤可利用氮素的下降与垂穗披碱草人工草场年龄增加没有紧密的关系, 与细叶亚菊 (*Ajania tenuifolia*) 的入侵程度有关; 细叶亚菊挥发油 (主要有效成分为樟脑) 对土壤中反硝化细菌数量及活性的增加有最强的促进作用; 细叶亚菊对土壤中反硝化细菌数及其活性的明显促进作用, 导致土壤中已矿化氮素的损失, 而土壤的贫瘠化是导致垂穗披碱草人工草场自然退化的重要原因之一。

关键词: 垂穗披碱草; 细叶亚菊; 反硝化细菌; 人工草场; 自然退化; 生化他感作用

植物生化他感作用 (allelopathy) 是指植物在其生长发育过程中, 通过排出体外代谢产物 (包括尸体腐败后残留物) 在环境中的积累, 改变了周围微生态环境, 从而导致同一生境中植物与植物以及土壤微生物之间相互排斥或相互促进的自然现象。由于各种代谢产物均为化合物, 因此, 植物生化他感作用实质上是各物种生存竞争过程中“化学关系”的表现。

在高寒草甸垂穗披碱草 (*Elymus nutans*) 人工草场自然退化现象研究过程中, 张宝琛等 (1989a, b) 已注意到人工草场退化速度与杂类草细叶亚菊 (*Ajania tenuifolia*) 入侵程度有密切关系, 并通过细叶亚菊植株各部位排出体外的代谢产物对牧草种子萌发和幼苗初期生长影响的实验, 证实了细叶亚菊对垂穗披碱草生化相克作用的客观存在。这种生化相克作用直接危害草场上垂穗披碱草的正常生长, 成为加速人工草场自然退化

* 国家自然科学基金资助项目。

本文 1989 年 12 月 26 日收到。

的重要原因之一。

据李家藻等 (1984) 报道, 退化前后垂穗披碱草人工草场土壤氮素代谢微生物氨化和硝化作用强度有显著差异, 已退化的人工草场土壤氨化、硝化及固氮作用强度均表现出明显降低的现象。在调查中发现随着草场年龄的增加土壤中总氮含量有明显增加的趋势; 但随着细叶亚菊入侵程度的增加, 其可利用氮素总量明显下降 (张宝琛等, 1989a)。为了弄清这种土壤实际“贫瘠化”的现象是否为细叶亚菊生化他感作用所导致, 又进行了细叶亚菊入侵程度与草场土壤中各类氮素代谢微生物数量消涨关系调查及细叶亚菊代谢产物对各种氮素代谢微生物繁殖及活性影响的研究, 为延缓垂穗披碱草人工草场自然退化速度措施提供理论依据。本文将着重报道有关反硝化细菌研究结果。

一、材料与方 法

(一) 草场植被调查及土壤样品采集

以高寒草甸生态系统定位站 (青海省海北州风匣口) 1 年生, 3 年生垂穗披碱草人工草场及距定位站 10 公里永安城马场二队 6 年生, 9 年生垂穗披碱草人工草场为调查对象 (海拔均为 3 200 米), 于 1986 年 5 月 27 日在各草场分别随机选取 10 个样方调查 (样方为 25×25 厘米²), 记录其中垂穗披碱草及细叶亚菊株数, 统计学处理后, 比较细叶亚菊入侵量及草场退化程度。与此同时, 取各样方 0—20 厘米深土样各 500 克, 过 40 目筛后, 混匀, 按分割法取土样备用。

(二) 土壤中反硝化细菌计数

土壤中反硝化细菌计数采用稀释法进行, Giltay 培养基培养 (李家藻等, 1984)。

1. 培养基配方

溶液甲: 硝酸钾 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, 硫酸镁 1.0 克, 三氯化铁 0.05 克, 磷酸二氢钾 1.0 克, 氯化钙 0.2 克, 蒸馏水 500 毫升。

将甲、乙两液混匀后, 调 pH 到 7.0—7.2 备用。

2. 计数测定方法: 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试管 (6×35 毫米) 倒置放入盛有培养基的大试管中, 注意勿使倒立小管中有气泡。灭菌后接种 10^{-1} — 10^{-21} 土壤稀释液各 1 毫升, 每个土样稀释度接种 3 管, 26°C 培养 10 天, 取出后检查试管中培养基是否变色, 倒立管中是否有气泡产生。培养基由绿色变为深蓝色 (表明硝酸还原菌生长), 并且倒立玻管中有气泡产生 (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。

(三) 代谢产物生化他感作用的测定

各类代谢产物的获得见张宝琛等 (1989b)。

将各类代谢产物配制成相当于每毫升含细叶亚菊鲜重 100 克的水溶液, 冷藏备用。

取统一土样, 均匀处理后, 分别以每盒 10 克量装入铝制土壤盒, 加入代谢产物 0.5

毫升混匀。每种代谢产物分别处理 3 组重复；对照组以蒸馏水代替代谢产物溶液；挥发油测定时，在每盒土样表面放置 1 小团脱脂棉，小心地将 50 微升挥发油滴在脱脂棉上。各项处理完后，盖紧土壤盒，置 26°C 室内放置 24 小时，打开土壤盒盖，重新均匀土样，分别以分割法取样，按 (二) (2) 方法测定土壤中反硝化细菌数。

(四) 细叶亚菊挥发油及其主要化学成分对土壤中反硝化作用活性影响的测定

1. 实验用细叶亚菊挥发油， α -蒎烯。樟脑及桉叶油精均由本组分离提供；实验用统一土样为海北定位站周围所取混合土样，经均匀处理，分割法取样备用。

2. 实验用气相色谱仪型号为：Pye series 104 型。

3. 测定方法：B.P. Timothy (1984)。

取水分含量为 36.5% 的混合土样 100 克，装入塑胶管内 ($\phi = 4$ 厘米，长 24 厘米)，每个塑胶管两端加塞密封，利用抽气法用高纯氮气取代管中空气，造成厌氧环境，然后注入 3% (V/V) 乙炔气及处理组代谢产物溶液；每组处理溶液取 2 个浓度组，同时设置对照组，每组 3 个重复，37°C 恒温室内培养 24 小时。随后采用气体循环土样柱的方法，利用气相色谱仪定量分析 N_2O 产生量。本测定方法原理为用乙炔气阻抑反硝化细菌 N_2O 还原酶的活性，使反硝化的终产物不再是 N_2 ，而是 N_2O ；然后将土壤柱用蠕动泵，六通阀相连即可直接将土柱中土壤产生的 N_2O 送入气谱仪进行定量测定，然后根据峰面积计算出各处理组与对照组之间活性相对比。

二、调查及实验结果

(1) 不同年龄垂穗披碱草人工草场植被及土壤中反硝化细菌数、氮素含量调查结果 (表 1) 表明：草场年龄的增长并不影响土壤中总氮含量的积累，可利用氮素 (NO_3-N 和 NH_4-N) 总量的改变也并不完全决定于草场年龄。然而，细叶亚菊入侵程度与土壤中反硝化细菌数的增涨、土壤中可利用氮素总量的下降确有密切的关系。6 年生人工草场由于未受到细叶亚菊入侵的干扰，土壤中反硝化细菌数低于 3 年生被细叶亚菊入侵严重的 b 地块，而可利用氮素总量大大高于该地块的含量；以 3 年生，9 年生人工草场被

表 1 不同年龄垂穗披碱草人工草场植被及土壤中反硝化细菌数，氮素含量调查

Table 1 The investigation of vegetation, number of denitrifying bacteria and utilizable nitrogen contents of soil on *Elymus nutans* artificial grassland

草场年龄 Age of grassland	土壤含水量 M. C. %	细叶亚菊株 数/样方 Individual num. of <i>A. ten-</i> <i>uifolia</i> /Sp.	垂穗披碱草株 数/样方 Individual num. of <i>E. nutans</i> /Sp.	反硝化细菌计数 个/克干土 Num. of denitri- fying bacteria/ g. d. soil	土壤氮素含量 (ppm) N		
					总氮 Total N	硝态氮 NO_3-N	氨态氮 NH_4-N
1	25.7	0	169.0 \pm 62	5.297 \times 10 ⁵	138.0	85.6	33.8
3a	28.0	12.1 \pm 4.8	169.4 \pm 44	3.966 \times 10 ⁶	192.0	36.4	26.0
3b	27.0	51.7 \pm 7.4	108.1 \pm 44	1.170 \times 10 ¹¹	175.0	30.5	18.6
6	25.6	0	221.3 \pm 64	1.179 \times 10 ¹⁰	182.5	62.3	52.4
9a	32.1	0.11 \pm 0	123.9 \pm 34	1.175 \times 10 ¹²	201.2	33.2	26.5
9b	25.9	61.2 \pm 21.9	15.5 \pm 8	2.871 \times 10 ¹⁵	209.1	22.4	23.3

细叶亚菊入侵干扰程度差异很小的 a, b 两地块相比, 入侵严重的 b 地可利用氮总量均明显低于 a 地, 而反硝化细菌数明显高于 a 地。可见, 细叶亚菊入侵明显地促进了反硝化细菌数量的增长。

(2) 细叶亚菊各部位代谢产物及鲜全草水提液处理对土壤中反硝化细菌繁殖的影响实验结果 (表 2): 表明各类代谢产物均可不同程度的促进反硝化细菌的繁殖, 而以地上部分挥发油对反硝化细菌数目的增长最明显。说明细叶亚菊对反硝化细菌生长繁殖的生化他感作用的存在。

表 2 细叶亚菊各部位代谢产物对土壤反硝化细菌繁殖的影响

Table 2 The influence of metabolites of *Ajania tenuifolia* on the reproduction of denitrifying bacteria of soil.

代谢产物 Metabolites	处理用量 Volume of treatment	反硝化细菌计数个/克干土 Number of denitrifying bacteria/g.d.soil
根系分泌物 Secretion of roots	0.5毫升溶液 0.5ml	4.119×10^7
地上部挥发油* Volatile oil	50微升纯油 50 μ l	2.821×10^{21}
鲜草提取液 Extractive solution	0.5毫升溶液 0.5ml	7.412×10^7
对照 Contrast	0.5毫升蒸馏水 0.5ml	6.147×10^8

* 挥发油处理组另加蒸馏水 0.5 毫升

Volatile treatment group added to 0.5 ml. extra water.

(3) 细叶亚菊挥发油及其主要化学成分对土壤反硝化作用活性影响的测定结果 (表 3、4、5、6) 表明, 细叶亚菊挥发油确实可以明显促进土壤反硝化作用活性。当挥发油在土壤柱中浓度达到 20ppm 时, 土壤反硝化作用活性在 24 小时内可提高 3.6 倍; 当挥发油浓度达到 40ppm 时, 土壤反硝化作用活性在 24 小时内提高 33.27 倍。细叶亚菊挥

表 3 细叶亚菊挥发油对土壤反硝化作用的影响

Table 3 The influence of volatile oil of *Ajania tenuifolia* on the denitrifying action in soil

处理浓度 Treating density	N ₂ O 产量(峰面积)(厘米 ²) N ₂ O area of peak (cm ²)	相对比 Treatment/Contrast
对照 Contrast	0.252	1.000
20 ppm	0.910	3.611
40 ppm	8.383	33.270

表 4 α -蒎烯对土壤反硝化作用的影响

Table 4 The influence of α -pinene on the denitrifying action in soil

处理浓度 Treating density	N ₂ O 产量(峰面积)(厘米 ²) N ₂ O area of peak (cm ²)	相对比 Treatment/Contrast
对照 Contrast	3.053	1.000
20 ppm	3.048	0.998
40 ppm	3.024	0.991

表5 樟脑对土壤反硝化作用的影响

Table 5 The influence of Canphore on the denitrifying action in soil

处理浓度 Treating density	N ₂ O 产量(峰面积)(厘米 ²) N ₂ O area of peak(cm ²)	相对比 Treatment/Contrast
对 照 Contrast	3.162	1.000
5微克(μg)/100毫升(ml)	11.420	3.612
10微克(μg)/100毫升(ml)	12.170	3.849

表6 桉叶油精对土壤反硝化作用的影响

Table 6 The influence of 1.8- Cinea on the denitrifying action in soil

处理浓度 Treating density	N ₂ O 产量(峰面积)(厘米 ²) N ₂ O area of peak(cm ²)	相对比 Treatment/Contrast
对 照 Contrast	2.010	1.000
10ppm	1.892	0.940
20ppm	2.020	1.004
100ppm	2.310	1.144

发油中主要化学成分(报告另发)α-蒎烯,樟脑及桉叶油精处理对土壤反硝化作用活性影响实验证明,樟脑是细叶亚菊挥发油中影响土壤反硝化细菌数量及活性的有效化学成分之一。

讨 论

(1) 在青海省海北高寒草甸上,垂穗披碱草不同年龄人工草场植被及土壤中反硝化细菌数,氮素含量调查表明:退化人工草场牧草产量的减少,土壤反硝化细菌数量的明显增加,可利用氮素含量明显下降均与细叶亚菊入侵程度有密切关系。

(2) 细叶亚菊各种代谢产物对土壤中反硝化细菌繁殖的影响及细叶亚菊挥发油和挥发油主要化学成分对土壤反硝化作用活性的影响实验表明,细叶亚菊代谢产物对土壤中反硝化细菌的繁殖及活性确实有明显的促进作用,证明细叶亚菊对土壤氮素代谢微生物生化他感作用的客观存在,而代谢产物中樟脑为其主要生化他感有效成份之一。

(3) 细叶亚菊对土壤中反硝化细菌数量及活性的生化他感作用,促进了反硝化细菌的繁殖及活性,导致土壤中可利用氮素的大量损失是造成土壤实际贫瘠化的重要原因之一;土壤的实际贫瘠化不利于喜高氮禾本科牧草生长而有利于耐低氮先锋杂类草的入侵,因此,细叶亚菊和土壤中反硝化细菌之间以相促形成表现出来的生化他感作用关系是加速垂穗披碱草人工草场自然退化进程的重要原因之一。

参 考 文 献

- 李家藻、杨 涛、朱桂茹、叶启智、程双宁,1984,高寒草甸土壤氮素代谢微生物数量及活性的研究,高原生物学集刊,(3): 193—207。
张宝琛、顾立华、甄润德、白雪芳,1989a, b, 生化他感作用与高寒草甸上人工草场自然退化现象研究 I. 细叶亚菊入侵程度与垂穗披碱草人工草场退化速度的相关性调查。II. 垂穗披碱草与细叶亚菊种子萌发过程中的植物种内

及种间生化他感现象实验观察, 高寒草甸生态系统国际学术讨论会论文集, 189—190。

Timothy, B. P., Heinrich F. K., Alan J. S. and James M. T., 1984, A gas-flow core method to measure field denitrification rates, *Soil Biol. Biochem.*, 16(4):323-330.

THE ALLELOPATHY OF INVASED *AJANIA TENUIFOLIA* UPON THE DENITRIFYING BACTERIA OF SOIL OF ARTIFICIAL *ELYMUS NUTANS* GRASSLAND ON ALPINE MEADOW

Zhang Baochen, Du Yiguang, Bai Xuefang and Gu Lihua

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining)

In the process of probing into the reason about the natural degenerated phenomenon of the artificial *Elymus nutans* grassland, we noticed that the allelopathy of *Ajania tenuifolia* is very important. For the sake of proving the allelopathic relationship existing between *A. tenuifolia* and denitrifying bacteria of soil, the experiments are carried out. The results are as follows:

1. The increase of denitrifying bacteria number and the reduction of utility nitrogen contents of soil have relationship with the invasion level of *A. tenuifolia* and no close relationship with the increase of artificial *E. nutans* grassland age.

2. The experiments of allelopathic actions showed that the volatile oil of *A. tenuifolia* has strongest stimulating effect on the increase of the number and the activity of denitrifying bacteria of soil; the Camphore is the most effective compound in all the metabolites.

3. The invasion of *A. tenuifolia* stimulated the increase of the number and the activity of denitrifying bacteria of soil and made the loss of utility nitrogen of soil, and it also made the soil of artificial grassland realistically impoverished. That should be one of the important reasons which led the artificial *E. nutans* grassland to degeneration.

Key words: *Elymus nutans*; *Ajania tenuifolia*; Denitrifying bacteria; Artificial grassland; Natural degeneration; Allelopathy