

未干扰黑土土壤微生物群落特征的季节变化^①

范瑞英，杨小燕，王恩姮，邹莉，陈祥伟*

(东北林业大学林学院，哈尔滨 150040)

摘要：采用稀释平板法和 Biolog-ECO 微平板检测法，以山杨天然次生林土壤为对象，研究了典型黑土区未经开垦干扰黑土表层土壤(0~10 cm)微生物群落的季节变化特征。结果表明：①土壤微生物数量表现为夏季最多，春季次之，秋季最少，且总菌数、细菌、真菌和放线菌数量的变化范围分别为 $(4.76 \sim 16.44) \times 10^6$ 、 $(4.68 \sim 16.19) \times 10^6$ 、 $(4.29 \sim 10.07) \times 10^4$ 和 $(3.97 \sim 14.96) \times 10^4$ cfu/g 干土。②在培养 168 h 时，土壤微生物碳源平均颜色变化率(AWCD)的变化范围为 0.81~1.21，并表现为夏季最高，春季次之，秋季最低。③土壤微生物群落功能多样性指数则表现为夏季显著高于秋季和春季($P < 0.05$)，而春、秋两季间无显著性差异，且夏季丰富度指数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数分别为 27、3.18、0.95 和 8.19。初步确定氨基酸类、多聚物类和羧酸类碳源是未经开垦干扰黑土土壤微生物利用率较高的碳源类型。研究结果为科学评价典型黑土区土壤生境质量退化与恢复过程中微生物特征的变化提供了本底值参考。

关键词：未干扰黑土；土壤微生物群落；碳源利用率；群落多样性；季节变化

中图分类号：S154.36；S718.89

土壤微生物群落是土壤生物区系中最重要的功能组分^[1~2]，其群落的结构组成及活性的变化能敏感地反映出土壤质量和健康状况^[3]，是土壤环境质量评价不可缺少的重要生物学指标。可培养微生物数量是反映微生物群落大小的一个重要指标^[4]；而土壤微生物群落功能多样性(Biolog)反映了微生物群落总体活性与代谢功能的信息^[5~6]，是表征土壤微生物群落状态与功能的敏感指标^[7~8]。土壤微生物群落结构与底物利用能力的变化主要受自然环境温度、湿度、植物残体及作物生长等周而复始的季节波动的影响^[9~12]。已有研究表明，土壤微生物群落结构与活力因季节更替引起的变化，要比因养分施用和土壤利用方式引起的变化大得多^[9,13~14]。

东北黑土区是我国重要的粮食生产基地，但开垦耕作和植被破坏使得黑土土壤质量严重衰退。为了防止黑土土壤退化，实现黑土资源的持续利用，学者们围绕土壤生境质量开展了大量的研究，但在结果分析时均采用撂荒地或休闲地作为对照^[9,15~16]。正是由于撂荒地或休闲地都经历了不同程度的人为干扰，致使研究结果的对比分析针对性不强，不能客观或准确地反映黑土质量的变化。为此，本文以东北典型黑土区

山杨天然次生林土壤为研究对象，采用稀释平板法和 Biolog-ECO 微平板检测法，通过可培养微生物数量、平均颜色变化率、丰富度指数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数等指标的测定、计算与分析，研究了未经干扰黑土土壤微生物群落的季节性变化特征，以期为科学评价典型黑土土壤生境质量退化与恢复过程中微生物特征的变化提供参考。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集与制备

研究地点位于黑龙江省西北部的克山县境内的克山农场($48^{\circ}12' \sim 48^{\circ}23'N$, $125^{\circ}8' \sim 125^{\circ}37'E$)，区域内土壤类型以黏化湿润均腐土为主，属典型黑土区。于 2012 年 4 月 23 日、8 月 2 日、10 月 17 日，分别代表春季、夏季和秋季，在 26 连队的山杨天然次生林内设置 $20 m \times 20 m$ 的临时标准地 1 块，样地海拔为 298 m，坡度为 10° ，坡向为 W，黑土层厚度为 100 cm，腐殖质层厚度为 15 cm，主要下层植被有毛榛子(*Corylus mandshurica*)、野梨(*Pyrus ussuriensis*)等树种组成，盖度为 65%。采用“Z”型五点取样法，分别选取 3 个试验点，采集表层(0~10 cm)新鲜土样，

* 基金项目：“十二五”国家科技计划课题资金项目(2011BAD38B02)资助。

* 通讯作者(chenxwnefu@yahoo.com.cn)

作者简介：范瑞英(1987—)，女，内蒙古呼和浩特人，硕士研究生，主要从事土地生产力恢复技术研究。E-mail: fanruiying1987@126.com

将样品分两份，一份放入 4℃ 冰箱保存，用于可培养微生物的分离、计数及土壤微生物群落功能多样性

的测定；另一份风干过筛测定土壤理化性质。试验地的林分特征与理化性质见表 1。

表 1 试验地的林分特征与理化性质

Table 1 Stand characteristics and soil physical and chemical properties of the sampling plots

季节	有机碳 (g/kg)	全氮 (g/kg)	全磷 (g/kg)	速效氮 (mg/kg)	速效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)	含水量 (%)	pH
春	34.2	3.32	0.84	604.39	2.24	281.35	25.39	6.07
夏	54.6	5.32	0.91	982.80	23.64	597.54	31.57	6.10
秋	30.9	2.87	0.77	514.44	2.76	406.79	26.84	6.03

1.2 分析方法

采用半微量凯氏法测定全氮，碱解扩散法测定速效氮，钼锑钪比色法测定全磷和有效磷，火焰光度计法测定速效钾，酸度计法测定 pH，烘干法测定含水量^[17]。用德国产的 muti EA400 型元素分析仪测定有机碳。

采用稀释涂抹平板计数法测定和计算可培养微生物的数量^[18]。采用 Biolog-ECO 板技术分析微生物群落代谢特征，即功能多样性^[19]。利用 Excel 2007 和 SPSS 16.0 软件对 Biolog 微平板培养 168 h 的数据进行统计分析。微生物整体活性指标采用微平板每孔颜色平均变化率(AWCD)来描述^[7, 20]。土壤微生物群落多样性采用丰富度指数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数来表征^[21-22]。

2 结果与分析

2.1 可培养微生物类群及数量的变化

土壤微生物数量直接影响土壤的生物化学活性及土壤养分的组成与转化，是林地土壤肥力的重要指标之一^[23]。研究发现，未干扰黑土土壤微生物的数量随季节变化表现为夏季最多，春季次之，秋季最少(表 2)。其中，土壤微生物总数的变化范围为(4.76 ~ 16.44)×10⁶ cfu/g 干土，细菌的变化范围为(4.68 ~

16.19)×10⁶ cfu/g 干土，春季与秋季之间、夏季与秋季之间达显著差异水平($P<0.05$)；真菌的变化范围为(4.29 ~ 10.07)×10⁴ cfu/g 干土，春季与夏季之间、夏季与秋季之间达显著差异水平($P<0.05$)；对放线菌而言，各季节之间差异均达显著水平($P<0.05$)，变化范围为(3.97 ~ 14.96)×10⁴ cfu/g 干土之间。土壤微生物数量随季节的变化与有机物的供应、植物生长状况以及温湿等环境因素有关^[24]，夏季温度高、降雨量多、植物生长旺盛、土壤的有机物质含量高，所以夏季土壤微生物数量高于春季和秋季。

从表 2 还可以看出，未干扰黑土土壤微生物以细菌为主，数量级可达 10⁶ cfu/g 干土，占微生物总数量的 98.3% ~ 98.6%；真菌和放线菌的数量相对较少，数量级只达 10⁴ cfu/g 干土。不同季节之间土壤微生物组成类群上存在一定差异，在春季土壤中，放线菌的数量多于真菌，分别占微生物总数量的 0.97% 和 0.40%；在夏季土壤中，放线菌的数量也多于真菌，分别占微生物总数量的 0.91% 和 0.61%；而在秋季土壤中，真菌的数量则多于放线菌，分别占微生物总数量的 0.90% 和 0.84%。这表明未干扰黑土土壤微生物中，细菌数量相对最多，为微生物的绝对优势类群，这是由于细菌是土壤微生物中数量最多的类群，与顾峰雪等^[25]的研究结果一致。

表 2 不同季节土壤微生物的数量与组成(cfu/g 干土)

Table 2 Quantity and composition of soil microorganisms in different seasons

季节	总菌数 (×10 ⁶)	细菌		真菌		放线菌	
		数量 (×10 ⁶)	百分比 (%)	数量 (×10 ⁴)	百分比 (%)	数量 (×10 ⁴)	百分比 (%)
春	11.22 ± 1.87 a	11.07 ± 1.87 a	98.6	4.51 ± 0.33 b	0.40	10.90 ± 0.55 b	0.97
夏	16.44 ± 2.80 a	16.19 ± 2.81 a	98.5	10.07 ± 0.74 a	0.61	14.96 ± 0.62 a	0.91
秋	4.76 ± 0.43 b	4.68 ± 0.44 b	98.3	4.29 ± 0.67 b	0.90	3.97 ± 0.95 c	0.84

注：同一列中，小写字母不同表示季节间差异显著($P<0.05$)，下同。

2.2 土壤微生物群落碳源平均颜色变化率(AWCD)

平均颜色变化率(AWCD)可作为微生物整体活性的有效指标，与土壤微生物群落中能利用单一碳源

的微生物的数目和种类有关，反映微生物群落对碳源利用的总体能力^[26-27]。测定结果表明，未干扰黑土在不同季节土壤微生物 AWCD 的总体变化规律一

致，均表现出随着培养时间的延长而逐渐增加的趋势；但不同培养时段内的变化幅度有所不同，从接种至培养 24 h，AWCD 无明显变化，表明该阶段微生物几乎没有代谢碳源；培养 24~168 h 期间，AWCD 快速增加，表明微生物生长处于对数生长期，碳源被大量利用；培养 168 h 之后，AWCD 升高幅度平缓直至试验结束，表明微生物生长减缓并步入稳定期(图 1)。据此确定培养时间 168 h 是所研究土壤的微生物生长对数期和稳定期的临界值，亦可称之为“拐点”^[7,19]，采用此时的光密度值进行微生物代谢整体活性的比较和功能多样性指标的计算。

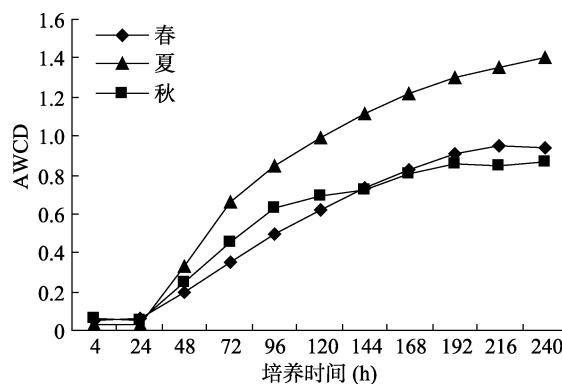


图 1 不同季节微生物群落平均颜色变化率(AWCD)随培养时间的变化

Fig. 1 Soil average well color development (AWCD) in different seasons with culture time

从图 1 中可以看出，不同季节之间土壤 AWCD 随培养时间延长而增加的幅度存在一定差异。其中夏季的 AWCD 在整个培养过程中均保持较高水平，且增加幅度最大，增长斜率可达 0.149 1；春季次之，斜率为 0.102 7；而秋季土壤 AWCD 则始终维持较低水平，且增加幅度最小，斜率仅为 0.089 9。鉴于培

养 168 h 时，春季、夏季和秋季土壤的 AWCD 分别为 0.82、1.21 和 0.81，可以认为未干扰黑土土壤微生物对相同碳量碳源的利用，以夏季碳源消耗量最大、速率最高，春季次之，秋季消耗量最小且速率最低，表现为夏季土壤微生物较春季和秋季代谢快、活性强。这主要是因为夏季温度高、降雨量多、植物生长旺盛，使进入土壤的植物残体和根系分泌物数量多，进而导致土壤的有机物质含量高，可为微生物提供更多的碳源和养分，促进了土壤微生物的生长和繁殖，最终提高了土壤微生物的代谢活性^[28]。

2.3 土壤微生物群落功能多样性指数的变化

不同的多样性指数反映土壤微生物群落组成的不同方面，把它们结合起来可以分析土壤微生物群落的功能多样性。丰富度指数指被利用的碳源的总数目^[19]，Shannon-Wiener 指数是反映群落物种及其个体数和分布均匀程度的综合指标，受群落物种丰富度影响较大，Simpson 指数较多地反映群落中最常见物种的优势度，而 McIntosh 指数被用来衡量群落中物种的均一性^[27]。

从表 3 可以看出，未干扰黑土土壤微生物群落的丰富度指数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数均表现为夏季高于春季和秋季。其中夏季丰富度指数为 27，是春季和秋季的 1.24 和 1.17 倍，Shannon-Wiener 指数为 3.18，是春季和秋季的 1.04 倍；Simpson 指数为 0.95，是春季和秋季的 1.01 倍；McIntosh 指数为 8.19，是春季和秋季的 1.39 倍。方差分析表明，春季与夏季之间、夏季与秋季之间差异达显著水平($P<0.05$)，而春季和秋季之间无显著差异。这说明夏季土壤微生物群落的物种丰富度和均一性，以及群落中常见物种的优势度均显著高于春季和秋季。

表 3 不同季节土壤微生物群落多样性指数动态变化
Table 3 Changes of the microbial functional diversity indices in different seasons

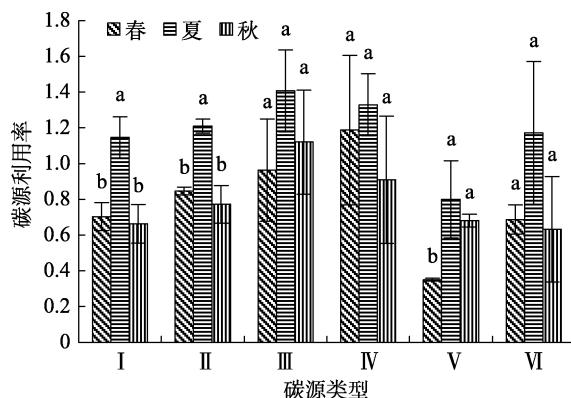
季节	丰富度	Shannon-Wiener 指数	Simpson 指数	McIntosh 指数
春	22 ± 1 b	3.04 ± 0.02 b	0.94 ± 0.00 b	5.89 ± 0.27 b
夏	27 ± 0 a	3.18 ± 0.01 a	0.95 ± 0.00 a	8.19 ± 0.18 a
秋	23 ± 0 b	3.06 ± 0.00 b	0.94 ± 0.00 b	5.90 ± 0.34 b

2.4 土壤微生物群落对碳源利用率的变化

Biolog ECO 微平板的碳源包括碳水类 10 种，羧酸类 7 种，氨基酸类 6 种，多聚物类 4 种，芳香类 2 种和胺类 2 种^[19]。研究结果表明，未干扰黑土土壤微生物对碳水类、羧酸类、多聚物类和胺类碳源的利用率均表现出夏季最高，春季次之，秋季最低的一致性规律；而对氨基酸类和芳香类碳源的利用率则表现为夏季最高，秋季次之，春季最低(图 2)。从不同季

节土壤微生物对各类碳源利用情况来看，碳水类的变化范围为 0.663~1.146，羧酸类的变化范围为 0.772~1.208，且春季与夏季之间、夏季与秋季之间达显著差异水平($P<0.05$)；氨基酸类的变化范围为 0.963~1.407，多聚物类的变化范围为 0.909~1.329，胺类的变化范围为 0.633~1.171，各季节之间差异均未达显著水平；对芳香类而言，春季与夏季之间、春季与秋季之间达显著差异水平($P<0.05$)，变化范围为 0.350~

0.800 之间。这充分说明夏季土壤微生物群落对碳源的利用能力高于春季和秋季。鉴于土壤微生物对氨基酸类、多聚物类和羧酸类碳源的利用率在不同季节中均维持相对较高水平,可以初步确定未干扰黑土土壤微生物比较偏好且利用率较高的碳源类型为氨基酸类、羧酸类和多聚物类。



(图中不同小写字母表示不同季节下土壤微生物对同一类型碳源的利用程度差异显著($P<0.05$)；I : 碳水类；II : 羧酸类；III : 氨基酸类；IV : 多聚物类；V : 芳香类；VI : 胺类)

图 2 微生物群落对不同碳源的利用率

Fig. 2 Use efficiency of carbon sources by soil microbial communities

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(PCA)来比较不同季节土壤微生物群落对微平板上 31 种碳源的总体利用情况,其中第 1 主成分(PC1)聚集了 35.8% 的数据变异,第 2 主成分(PC2)为 16.6%。研究结果表明,不同季节土壤在主成分分析图中可以集聚成两大集团:第一集团为夏季,第二集团为春季和秋季(图 3)。该结果表明,不同季节未干扰黑土土壤微生物群落的碳源利用情况可以分为两类:夏季为一类,春季和秋季为一类。

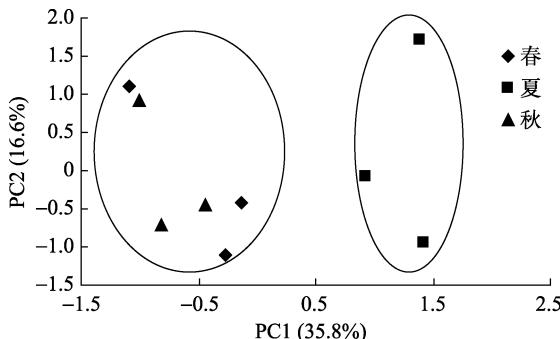


图 3 不同季节土壤微生物碳源利用特性的主成分分析(PCA)

Fig. 3 Principal component analyses (PCA) of carbon utilization by soil microbial community in different seasons

3 结论

(1) 未经开垦干扰黑土土壤微生物数量随季节变化表现为夏季最多,春季次之,秋季最少。其中,土壤微生物总数、细菌、真菌和放线菌数量的变化范围分别为 $(4.76 \sim 16.44) \times 10^6$ 、 $(4.68 \sim 16.19) \times 10^6$ 、 $(4.29 \sim 10.07) \times 10^4$ 和 $(3.97 \sim 14.96) \times 10^4 \text{ cfu/g 干土}$ 。

(2) 土壤微生物活性的变化范围为 0.82 ~ 1.21,且随季节变化表现出夏季最高,春季次之,秋季最低的规律。

(3) 土壤微生物功能多样性表现为夏季高于春季和秋季。夏季土壤微生物群落丰富度指数为 27,Shannon-Wiener 指数为 3.18, Simpson 指数为 0.95, McIntosh 指数为 8.19。

(4) 土壤微生物群落对各类碳源的利用率均表现为夏季高于春季和秋季,且氨基酸类、多聚物类和羧酸类碳源属东北黑土区未经干扰土壤微生物比较偏好、利用率较高的碳源类型。

参考文献 :

- [1] 于树, 汪景宽, 李双异. 应用 PLFA 方法分析长期不同施肥处理对玉米地土壤微生物群落结构的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(9): 4 221-4 227
- [2] 孔滨, 孙波, 郑宪清, 陈小云, 隋跃宇, 王帘里. 水热条件和施肥对黑土中微生物群落代谢特征的影响[J]. 土壤学报, 2009, 46(1): 100-106
- [3] 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 龙健, 姚槐应. 铅锌银尾矿区土壤微生物活性及其群落功能多样性研究[J]. 土壤学报, 2004, 41(1): 113-119
- [4] 郑华, 欧阳志云, 王效科, 方治国, 赵同谦, 苗鸿. 不同森林恢复类型对土壤微生物群落的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(11): 2 019-2 024
- [5] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 赵同谦. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J]. 土壤学报, 2004, 41(3): 456-461
- [6] 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
- [7] 曹成有, 姚金冬, 韩晓妹, 张颖. 科尔沁沙地小叶锦鸡儿固沙群落土壤微生物功能多样性[J]. 应用生态学报, 2011, 22(9): 2 309-2 315
- [8] Insam H, Hutchinson TC, Reber HH. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28(4/5): 691-694
- [9] 白震, 何红波, 解宏图, 张明, 张旭东. 施肥与季节更替对黑土微生物群落的影响[J]. 环境科学, 2008, 29(11): 3 230-3 239
- [10] 胡婵娟, 刘国华, 陈利顶, 吴雅琼. 黄土丘陵沟壑区坡面上土壤微生物生物量碳、氮的季节变化[J]. 生态学杂志, 2011, 30(10): 2 227-2 232

- [11] Schutter M, Sandeno J, Dick R. Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 34(6): 397–410
- [12] Spedding T, Hamel C, Mehuys GR, Madramootoo CA. Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(3): 499–512
- [13] Bardgett RD, Lovell RD, Hobbs PJ, Jarvis SC. Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grasslands[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(7): 1 021–1 030
- [14] Bossio DA, Scow KM, Gunapala N, Graham KJ. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles[J]. *Microbial Ecology*, 1998, 36(1): 1–12
- [15] 白震, 张明, 宋斗妍, 张旭东. 不同施肥对农田黑土微生物群落的影响[J]. *生态学报*, 2008, 28(7): 3 244–3 253
- [16] 时鹏, 高强, 王淑平, 张妍. 玉米连作及其施肥对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. *生态学报*, 2010, 30(22): 6 173–6 182
- [17] 陈立新. 土壤试验实习教程[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2005: 85–89
- [18] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 91–99
- [19] 邵元元, 王志英, 邹莉, 吴韶平. 百菌清对落叶松人工防护林土壤微生物群落的影响[J]. *生态学报*, 2011, 31(3): 819–829
- [20] Garland JL. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28 (2): 213–221
- [21] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 170–172
- [22] Zak JC, Willig MR, Moorhead DL, Wildman HG. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26(9): 1 101–1 108
- [23] 张社奇, 王国栋, 田鹏, 郭满才. 黄土高原刺槐林地土壤微生物的分布特征[J]. *水土保持学报*, 2004, 18(6): 128–131
- [24] 高雪峰, 韩国栋, 张功, 赵萌莉, 卢萍. 放牧对荒漠草原土壤微生物的影响及其季节动态研究[J]. *土壤通报*, 2007, 38(1): 145–148
- [25] 顾峰雪, 文启凯, 潘伯荣. 人工植被下风沙土演变研究综述[J]. *干旱区研究*, 1999, 16(2): 67
- [26] Choi KH, Dobbs FC. Comparison of two kinds of biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3): 203–213
- [27] 胡君利, 林先贵, 褚海燕, 尹睿, 张华勇, 王俊华, 曹志洪, 胡正义. 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
- [28] 孟庆杰, 许艳丽, 李春杰, 韩晓增, 裴希超. 不同植被覆盖对黑土微生物功能多样性的影响[J]. *生态学杂志*, 2008, 27(7): 1 134–1 140

Seasonal Variations of Soil Microbial Communities of Undisturbed Typical Black Soil, Northeastern China

FAN Rui-ying, YANG Xiao-yan, WANG En-heng, ZOU Li, CHEN Xiang-wei*

(School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Seasonal variations of soil microbial communities in surface soil (0–10 cm) of undisturbed typical black soil (the *Populus davidiana* natural secondary forest in Keshan farm, Heilongjiang Province of northeastern China) was studied by using the method of dilution-plate method and Biolog ECO-microplate culture. Results showed that soil microbial population was the maximum in summer, fewer in spring, and the minimum in autumn. The quantity of soil microorganism, bacteria, fungi and actinomycetes was $(4.76\text{--}16.44)\times 10^6$, $(4.68\text{--}16.19)\times 10^6$, $(4.29\text{--}10.07)\times 10^4$ and $(3.97\text{--}14.96)\times 10^4$ cfu/g dry soil, respectively. The peak value of the average well color development (AWCD) was found in summer followed by spring and autumn in consequence, varying from 0.81 to 1.21 (168 h). The microbial functional diversity was significantly higher in summer than in spring and autumn ($P<0.05$) and showed no significant difference in spring and autumn. For summer, Richness index was 27, Shannon-Wiener index was 3.18, Simpson index was 0.95 and McIntosh index was 8.19. The carbon sources with higher utilization efficiency or utilization intensity by soil microbes were amino acids, polymers and carboxylic acids. Above all, this result would provide more important primitive characteristics of microbial features in the degradation and restoration process of the quality of the soil habitat scientifically.

Key words: Undisturbed black soil, Soil microbial community, Carbon source utilization, Community diversity, Seasonal variations