

DOI: 10.5846/stxb201612142570

黄春萍, 吴福忠, 张健, 岳楷, 张川, 杨万勤. 高寒森林溪流微生物群落结构的季节性变化. 生态学报, 2018, 38(1): 298-308.

Huang C P, Wu F Z, Zhang J, Yue K, Zhang C, Yang W Q. Seasonal variation of microbial community in forest streams of the high-frigid area. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(1): 298-308.

高寒森林溪流微生物群落结构的季节性变化

黄春萍^{1,2}, 吴福忠¹, 张 健¹, 岳 楷¹, 张 川¹, 杨万勤^{1,*}

1 四川农业大学生态林业研究所, 林业生态工程重点实验室, 成都 611130

2 四川师范大学生命科学学院, 成都 610068

摘要: 高寒森林溪流不仅是区域河流的源头, 而且是联系陆地与水域的生态纽带。微生物活动可能成为控制溪流生态系统过程的关键因子, 但其结构与动态过程缺乏必要关注。因此, 结合同步温度动态监测, 采用实时荧光定量 PCR 和 DGGE 技术, 在 2014 年到 2015 年冻融季节和生长季节关键时期对比研究了川西高寒森林溪流和森林林下土壤中微生物群落的动态特征。研究发现, 高寒森林溪流具有较低的真菌和细菌群落丰度; 与森林土壤相同, 溪流在冻融季节表现出相对生长季节更高的真菌/细菌比, 而且从冻融季节到生长季节, 溪流微生物丰度动态也表现出明显的季节性变化特征。与森林土壤不同的是, 溪流中细菌和真菌的丰度及其 Shannon-Wiener 多样性指数的最高值均出现在生长季节而不是冬季冻融季节, 并且溪流中细菌丰度在季节性变化的不同时期具有显著差异 ($P < 0.05$)。此外, 森林土壤细菌类群以芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 比例相对较高, 真菌类群则以格孢菌属 (*Pleosporeles* sp.)、曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 和其他一些子囊菌门 (*Ascomycota*) 的类群为优势; 而溪流细菌类群以红球菌属 (*Rhodococcus* sp.) 为主, 真菌类群则以曲霉属和空团菌属 (*Cenococcum* sp.) 为主。同时, 季节性变化中温度、pH、水溶性有机碳和溶解氧等环境因子可显著影响溪流微生物群落结构及其组成, 这些环境因子在高寒森林溪流微生物群落的季节性变化过程中具有重要的作用。

关键词: 溪流; 高寒森林; 微生物群落; 季节性变化

Seasonal variation of microbial community in forest streams of the high-frigid area

HUANG Chunping^{1,2}, WU Fuzhong¹, ZHANG Jian¹, YUE Kai¹, ZHANG Chuan¹, YANG Wanqin^{1,*}

1 Key Laboratory of Ecological Forestry Engineering of Sichuan Province, Institute of Ecology & Forest, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

2 College of life science, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China

Abstract: Forest streams in the high-frigid areas are not only the source of water for regional rivers, but they also play important roles in the ecological linkage between land and water areas. Since relative low temperature could limit the activity and productivity of microorganisms, the organism structure in the streams is relatively homogeneous, although microbial activity could be the key ecological factor regulating the ecological processes of stream ecosystem. Moreover, the available information about the structure and the dynamic processes of the microbial community has not been sufficiently documented in the high-frigid forest streams. Therefore, the structural dynamics of microbial community were investigated both in soil and streams in a coniferous forest in western Sichuan, China. Real-time fluorescent quantitative PCR and denatured gradient gel electrophoresis (DGGE) were used. Environmental factors such as temperature, pH, dissolved organic carbon, dissolved oxygen, and stream water conductivity were also monitored at different seasonal stages in the freezing-thawing and

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31500358, 31570445, 31570601)

收稿日期: 2016-12-14; 修订日期: 2017-09-19

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: scyangwq@163.com

the growing seasons from 2014 to 2015. The results showed that the microbial abundance observed in streams was relatively lower than that in soil at each key period throughout the year. The ratio of fungi to bacteria was higher in winter than in the growing season in both streams and soil. The microbial abundance and community diversity showed similar dynamic patterns both in streams and soil. In contrast, the peak of microbial abundance and Shannon-Wiener diversity index in streams appeared in the growing season, whereas in soil, this was in the winter. Moreover, there were significant differences in the bacterial abundance in each key period in streams. Furthermore, the results from sequencing analysis revealed that the main bacterial species in streams was *Rhodococcus* sp., but in soil, it was *Bacillus* sp. The main fungal species in streams were *Aspergillus* sp. and *Cenococcum* sp., whereas *Pleosporales* sp., *Aspergillus* sp. and some other Ascomycota were the main ones in soil. In addition, the environmental heterogeneity, seasonal changes, and microenvironmental factors (e.g., temperature, pH, and nutrient availability such as dissolved organic carbon and dissolved oxygen) showed substantial effects on microbial community structure and composition in streams in the high-frigid forest.

Key Words: stream; high-frigid forest; microbial community; seasonal variation

高寒森林溪流是高山森林生态系统的重要组成部分,不仅是众多江河流域的水源源头,也是陆地与水生生态系统物质与能量源/汇动态的重要纽带,在自然环境演替、森林环境和物种分布格局中发挥着重要的作用^[1-2]。溪流特有的时空变异,对链接物质循环和能量流动的微生物将产生深刻影响,从而调控相关的关键生态学过程。随着全球气候的变化,长江流域高山森林生态系统的敏感性和脆弱性逐渐增加^[3],伴随着雪被的减少、冬季温度的降低以及土壤冻结和冻融交替的增强^[4],更容易受到气候变化影响的高寒森林溪流环境中的微生物群落将受到深刻的影响。但是,这方面目前尚缺乏必要的关注。

不断增加的研究表明,高寒森林陆地生态系统中具有丰富的微生物,各类群微生物对季节性冻融均具有积极的响应。不但微生物数量和群落组成会发生变化^[5],而且由于微生物形态、生长策略以及各自的生态位之间的较大差异,使得微生物各类群间对环境变化的耐受能力和养分动态的响应也存在不同,最终表现为冬季比生长季节具有更高的真菌/细菌比例^[6-7]。与陆地生态系统相比,水生环境中的微生物数量、分布和活性不仅受到相似因子(如气候和 pH 值等)的调控^[8-9],而且还会受到溪流独特环境因子的影响,比如相对稳定的温度、充足的水源、低氧和强烈的冲刷作用等^[10-12]。然而,有关水生生态系统(如溪流)中微生物群落结构和组成的研究报道较少,尤其是有关微生物群落在高寒森林陆地生态系统和水生态系统中的季节性变化异同鲜见报道。

川西高寒森林位于青藏高原东缘,是全球变化的敏感地带,具有典型的季节性动态,环境条件随冬季雪被的形成、覆盖、消融及土壤的冻融循环过程而显著改变,且在不同生境下差异明显^[2]。同时,作为我国第二大林区的主体,在调节区域气候、涵养水源和生物多样性保育等方面有着不可替代的作用和地位^[6-7,13]。因此,本文以川西高寒森林为研究区域,结合同步温度动态和水环境特征监测,对比研究了溪流(水体环境)和土壤(陆地环境)中微生物群落结构的季节性变化动态特征及其与温度等环境因子之间的关系。本研究以期为进一步认识高寒森林土壤和水体生态过程及其季节转换提供基础资料和理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究区域概况

本研究在四川省理县高山森林生态系统定位研究站(102.53°—102.57°E, 31.14°—31.19°N, 海拔 2458—4619 m)进行。研究站地处青藏高原东缘与四川盆地的过渡带,年平均气温 3℃,温度波动范围为-18—23℃,年降水量 801—850 mm。研究区域的森林植被随海拔由低到高依次为针阔混交林、高寒针叶林、高山灌丛和草甸。实验样地位于海拔 3580 m 的典型高寒森林,乔木层主要为四川红杉(*Larix mastersiana*)、方枝柏(*Sabina saltuaria*)、岷江冷杉(*Abies faxoniana*)。林下灌丛主要为康定柳(*Salix paraplesia*)和高山杜鹃

(*Rhododendron lapponicum*)、三颗针(*Berberis sargentiana*)、扁刺蔷薇(*Rosa weginzowii*)等,草本主要是高山冷蕨(*Cystopteris montana*)、莎草属(*Cyperus* spp.)和苔草属(*Carex* spp.)植物^[2,14-15]。在研究区高寒森林典型林冠下选取3个25 m×25 m的样方,每个样方相距1 km左右。同时,在邻近林下样地的区域分别选取3条典型的森林溪流。每条溪流长约为200 m,宽30—160 cm。

1.2 样品采集及理化特征检测

基于前期相关研究,将一年划分为5个关键时期,在2014年到2015年共两年分10次采集样品,即雪被形成初期I(Early stage of snow cover I, OF I)、雪被覆盖期I(Peak of snow cover I, FP I)、雪被消融期I(Stage of snow thaw I, TP I)、生长季前期I(Early growth period I, EGP I)、生长季后期I(Later growth period I, LGP I)、雪被形成初期II(Early stage of snow cover II, OF II)、雪被覆盖期II(Peak of snow cover II, FP II)、雪被消融期II(Stage of snow thaw II, TP II)、生长季前期II(Early growth period II, EGP II)和生长季后期II(Later growth period II, LGP II)。在各采样点放置1个纽扣式温度计(iButton DS1923-F5, Maxim/Dallas Semiconductor, Sunnyvale, USA),同步记录采样点环境温度每两小时变化情况(图1)。

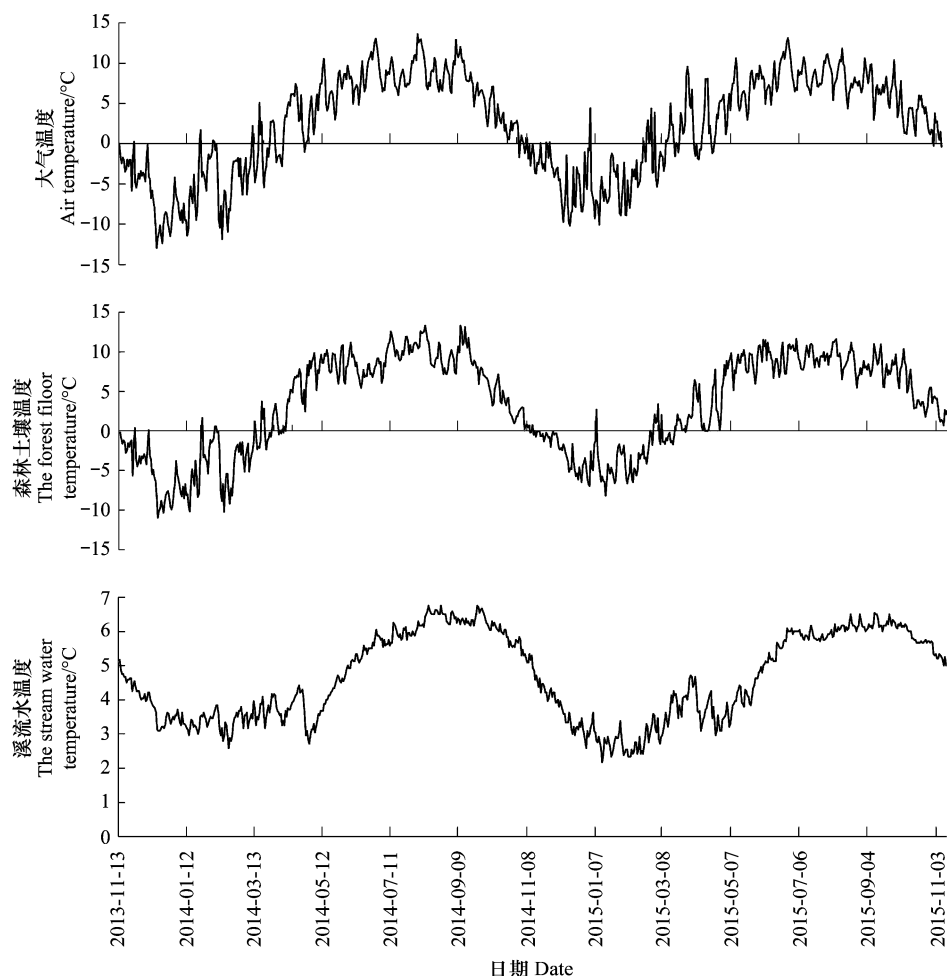


图1 监测样地和大气日平均温度动态(2013.11.13—2015.11.11)

Fig.1 Dynamics of mean daily stream, soil and air temperature at each sample plot from 13 November, 2013 to 11 November, 2015

分别于每个时期末采集林下样方有机层土壤,置灭菌的聚丙烯袋低温带回实验室,−80℃(Wizard2.0型热板真空冷冻干燥机 VirTis USA)冷冻干燥备用。用灭菌的安剖瓶采集表层10—20 cm的溪流水,低温保存带回实验室。在每次采样时即时测定采样点水样pH值和流速。取各水样用灭菌的0.22 μm的微孔滤膜过滤,滤液用于检测水溶性有机碳和溶解氧等^[2]。滤膜−80℃冷冻干燥备微生物多样性检测用。

1.3 微生物多样性

冻干土壤和水样滤膜样品的基因组 DNA 均采用北京天恩泽基因科技有限公司的 Soil DNA out 试剂盒并按操作说明提取。提取得到的微生物 DNA 呈棕色、灰白色或褐色,且含有较多有机质和腐殖酸。采用天根生化科技(北京)有限公司 Universal DNA Purification Kit 试剂盒纯化所有的样品 DNA,纯化步骤按试剂盒说明书进行。采用 338f:5'-(GC)-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 518r:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' 扩增细菌 16S rDNA^[16]。反应条件为:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 60 s,55℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 60 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。采用 U1:5'-(GC)-GTGAAATTGTTGAAAGGGAA-3' 和 U2:5'-GACTCCTTGTCCGTGTT-3' 扩增真菌 18S rDNA^[17]。反应条件为:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 60 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。扩增体系均为 25 μL 体系,包括 Premix Ex Taq 12.5 μL,上、下游引物各 1 μL,纯化后的模板 DNA(1—10 ng)1 μL,最后用 ddH₂O 补足至 25 μL。

细菌 16S rDNA 和真菌 18S rDNA 扩增产物纯化回收后分别进行变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)分析。条件为:8%聚丙烯酰胺凝胶,变性剂浓度为 30%—60%。80 V 恒压和 60℃ 恒温下持续电泳 16 h。电泳结束后,采用银染法对 DGGE 凝胶进行染色^[18],然后采用 Bio-rad GelDoc XR System 凝胶成像系统拍照。选择凝胶上的差异条带及共性条带进行切胶回收和扩增,扩增产物纯化后,连接到 pMD19-T 载体(TaKaRa),再转入大肠杆菌感受态细胞 DH5α 在培养皿中进行培养,进行蓝白斑筛选,将获得阳性克隆进行测序。

同时,选择测序后的阳性克隆并提取质粒供 qPCR 反应的标准曲线使用,质粒浓度采用 ScanDrop100 超微量核酸蛋白测定仪(Aanalytik Jena,德国)测定,然后分别进行 10 倍梯度系列稀释以作为定量 PCR 扩增的标准品在 Mini-Opticon Real-Time system (Bio-Rad, USA)上进行扩增,根据所得标准曲线计算得出样品中的基因拷贝数,最后以每克样品(干重)或每毫升水中的基因拷贝数为单位进行分析。PCR 反应效率和标准曲线的相关系数分别为:细菌 107.5%和 $r^2 = 0.998$,真菌 98.3% 和 $r^2 = 0.997$ 。

1.4 数据处理与统计分析

DGGE 图谱采用 Bio-Rad Quantity One 软件处理,样品中条带的位置和灰度分别类比于物种的种类和数量,对图谱中的主要条带进行灰度分析后,采用 Canoco 4.5 对分析得到的灰度值矩阵数据进行 PCA 分析。选择 Shannon-Wiener 多样性指数(H')表征群落结构状态。

实时荧光定量 PCR 扩增得到的不同微生物基因拷贝数经过 Ln 对数转换后进行统计分析,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),多重比较采用最小显著差异法(LSD)。微生物基因丰度与环境因子的相关关系采用 Pearson 法分析。数据整理、计算与作图均采用 Microsoft Excel 2013 软件。

2 结果与分析

2.1 微生物 rDNA 丰度分析

荧光定量 PCR 结果显示,溪流和森林土壤中冻融季节和生长季节均检测到细菌 16S rDNA 和真菌 18S rDNA 且均表现出相应的季节性变化规律。在不同关键时期相同环境中的细菌 16S rDNA 丰度均显著高于真菌 18S rDNA 丰度($P < 0.05$)(图 2)。

溪流和森林土壤中细菌 16S rDNA 丰度随时间的变化波动不大,但是表现出不同的季节性变化规律。全年溪流中 16S rDNA 丰度在生长季节前期显著性高于其它时期($P < 0.05$),雪被消融期显著性最低($P < 0.05$);而森林土壤 16S rDNA 丰度在雪被覆盖期比生长季节高,但无显著性差异($P > 0.05$)。溪流和森林土壤中真菌 18S rDNA 丰度随时间的变化与细菌 16S rDNA 相似,但波动均不大。全年溪流中 18S rDNA 丰度在生长季节前期较高,但无显著性差异($P > 0.05$),雪被消融期最低,也无显著性差异($P > 0.05$);森林土壤 18S rDNA 丰度在雪被覆盖期比生长季节高,无显著性差异($P > 0.05$)。

不同生境或者季节性变化的不同时期,真菌/细菌的比例会受到深刻影响(图 3),真菌/细菌比例在溪流

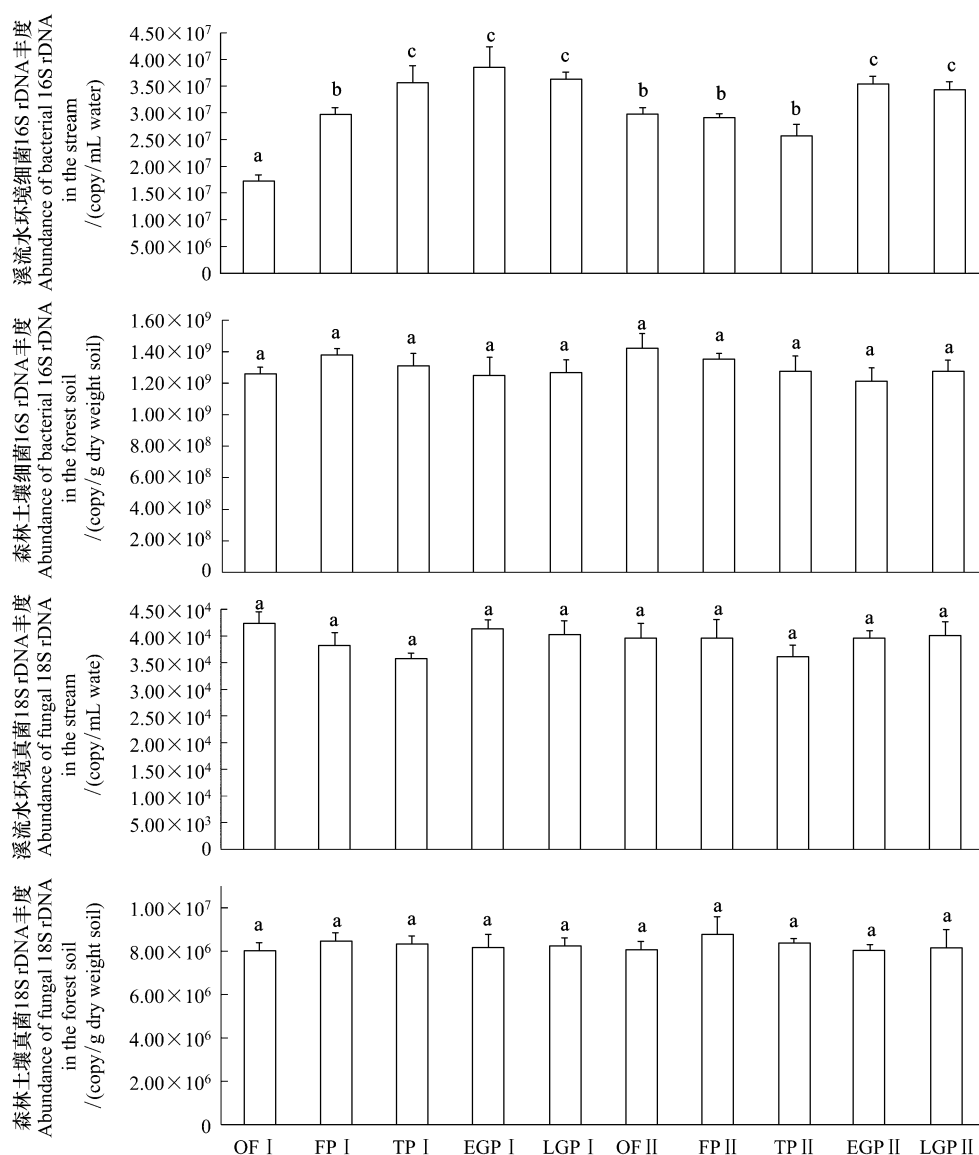


图2 溪流和森林土壤微生物 rDNA 丰度

Fig.2 Abundance of stream water and forest soil microbiology rDNA

OF I: 雪被形成初期 I Early stage of snow cover; FP I: 雪被覆盖期 I Peak of snow cover I; TP I: 雪被消融期 I Stage of snow thaw I; EGP I: 生长季前期 I Early growth period I; LGP I: 生长季后期 I Later growth period I; OF II: 雪被形成初期 II Early stage of snow cover II; FP II: 雪被覆盖期 II Peak of snow cover II; TP II: 雪被消融期 II Stage of snow thaw II; EGP II: 生长季前期 II Early growth period II; LGP II: 生长季后期 II Later growth period II; 不同小写字母表示差异达 0.05 水平

环境中和森林土壤中的季节性变化特征相似,表现为冬季高于生长季节。但森林土壤真菌/细菌比在各个时期是溪流真菌/细菌比的约 5—6 倍。

2.2 微生物 PCR-DGGE 指纹图谱分析

为了达到对结果的最佳分析,采用 Quantity one 软件对 DGGE 图谱进行定量分析后,将 DGGE 图转化为更直观的 Compare lane images,即 DGGE 指纹图谱(图 4)。从图中可以看出微生物的类群、相对数量及其动态过程在不同环境的同一关键时期或者相同环境的不同关键时期均存在明显差异,溪流水环境和森林土壤中各个时期均具有丰富的细菌多样性和真菌多样性。

为了进一步理解这种差异,对溪流和森林土壤细菌和真菌随季节性变化的不同关键时期的群落组成分别

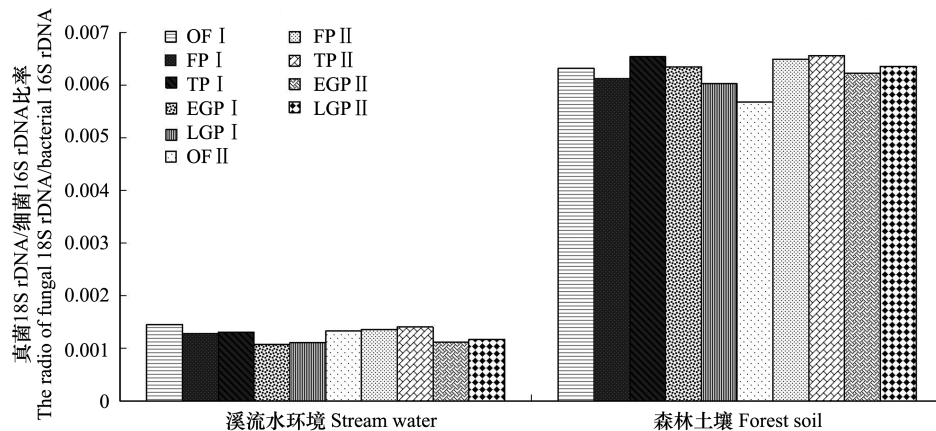


图3 溪流和森林土壤真菌 18S rDNA / 细菌 16S rDNA 比例

Fig.3 The ratio of fungal 18S rDNA / bacterial 16S rDNA in the stream water and forest soil

进行了主成分分析(图5)。分析显示,溪流中,雪被形成初期的细菌群落结构与雪被覆盖期相似;并与雪被消融期和生长季节(包括生长季前期和后期)分别具有明显的差异,而雪被消融期和生长季节之间也具有较大的差异。森林土壤中,不同关键时期细菌群落结构之间的差异与溪流中的比较结果相似。另一方面,溪流中,冻融时期的真菌群落具有相似的结构,而与生长季前期和后期具有明显的差异。同时,森林土壤中,生长季前期和雪被消融期的真菌群落结构与生长季后期、雪被形成初期及雪被覆盖期具有明显差异(图5)。

从 DGGE 凝胶中切割分离了优势条带和大部分可见条带,测序分析结果表明:溪流中的细菌类群以红球菌属(*Rhodococcus* sp.)为主(条带 S16a, S16b, S16c, S16d, S16e 和 S16g)(图4),占所测序条带的约 50%。溪流中的细菌类群在各个时期相对稳定,尽管数量上红球菌属较多,但是在各个时期均稳定且也占据优势地位的是以条带 S16f 为代表的菌群,序列比对结果显示其同源性最高的为不可培养细菌,且同源性仅 94%,与其同源性最近的已鉴定物种为 *Jatrophihabitans* sp. I14A-00812(登录号:KR184262.1)。与溪流相比,森林土壤细菌类群则以芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)比例相对较高(条带 F16a, F16b, F16c, F16d, F16e 和 F16f)(图4),占所测序条带的约 30%,流水环境中的优势细菌红球菌在森林土壤中仅少量检测到(条带 F16g, F16h 和 F16i)。溪流中的真菌类群以曲霉属(*Aspergillus* sp.)(条带 S18a, S18b 和 S18c)和空团菌属(*Cenococcum* sp.)(条带 S18d 和 S18e)为主(图4),其中空团菌属在各个时期均占据优势地位,且空团菌属的其中一个类群(条带 S18e)在溪流各个时期所占比例均较高。与溪流相比,森林土壤的真菌类群更加丰富,格孢菌属(*Pleosporales* sp.)(条带 F18a, F18d 和 F18e)、曲霉属(条带 F18f 和 F18h)和其他一些子囊菌门(*Ascomycota*)的类群(条带 F18b, F18c 和 F18g)在各个时期稳定存在并占据优势地位(图4)。

选择 Shannon-Wiener 多样性指数(H')来表征溪流和森林土壤微生物群落结构状态,无论是细菌群落结构还是真菌群落结构均表现出其独特的季节性变化特征,且两年的特征相似,见表1。溪流细菌多样性指数在各个关键时期均较森林土壤低,而两个环境均表现出相似的季节性变化特征,从雪被形成初期到雪被覆盖期逐渐降低,进入生长季节后又逐渐增加。溪流真菌多样性指数在各个关键时期也较森林土壤低,但是季节性变化特征不同。溪流真菌多样性指数从雪被形成初期开始降低,而从雪被消融期到生长季节开始升高,在生长季前期达到全年最高。而森林土壤真菌多样性指数则表现出较小的波动,从雪被形成初期开始降低,而从雪被覆盖期到雪被消融期开始升高,并达到全年最高,进入生长季节又开始降低。

2.3 微生物丰度与环境因子的相关性

采用 SPSS 17.0 软件对溪流和森林土壤中的微生物丰度与相应的环境因子进行 Pearson 相关性分析,结果见表2。溪流细菌丰度与正积温($P=0.634$)、溶解氧($P=0.473$)和水溶性有机碳($P=0.621$)呈极显著

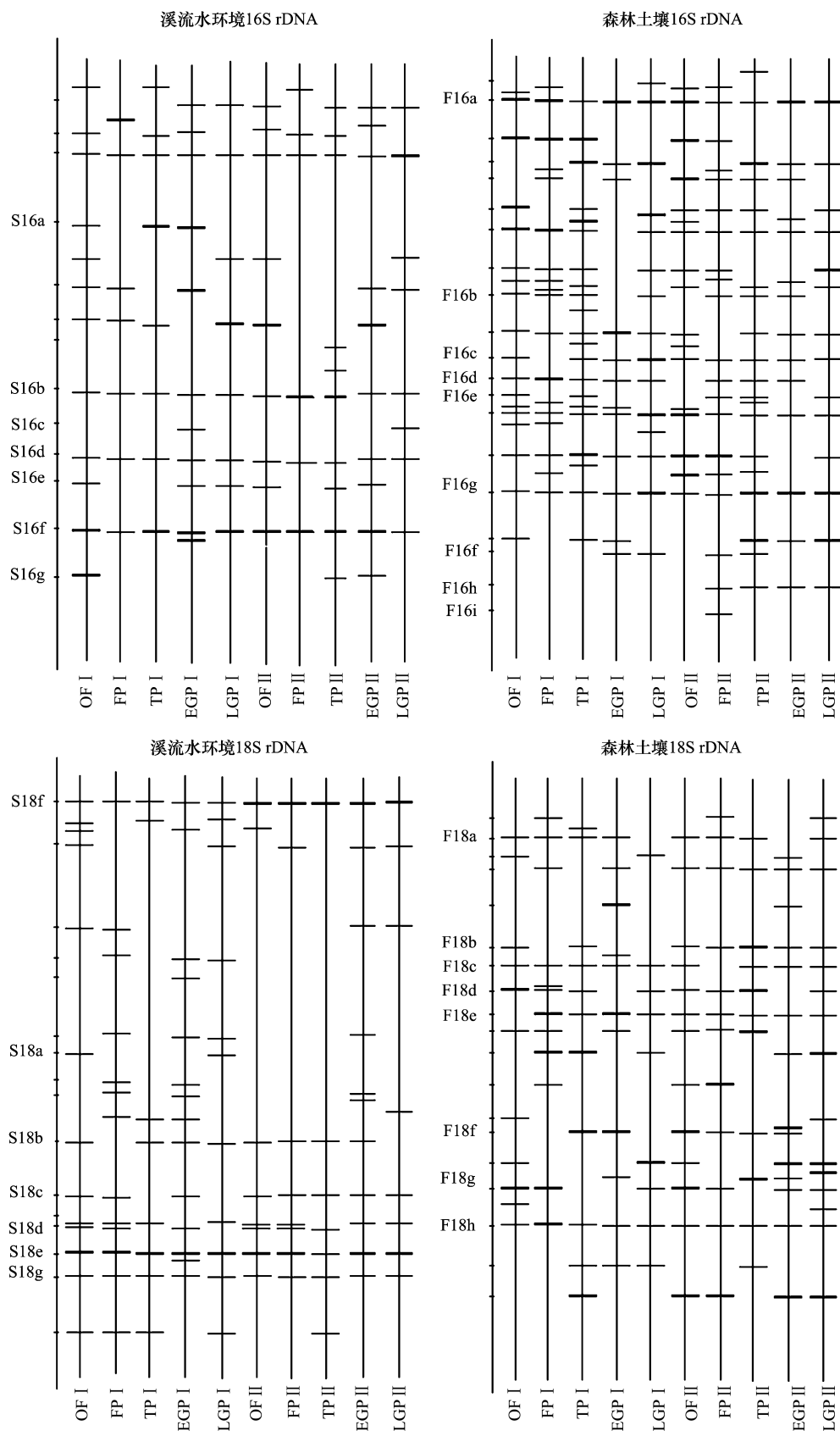


图4 溪流和森林土壤微生物 DGGE 指纹图谱

Fig.4 DGGE profile of the microbial community in the stream water and forest soil

正相关($P < 0.01$),与 pH 值($P = -0.442$)呈显著负相关($P < 0.05$);溪流中真菌丰度仅与水溶性有机碳($P = 0.390$)呈显著正相关($P < 0.05$)。另一方面,森林土壤细菌丰度与日均温($P = -0.489$)和正积温($P = -0.409$)呈极显著负相关($P < 0.01$),真菌丰度则与水溶性有机碳($P = -0.471$)呈极显著负相关($P < 0.01$)。

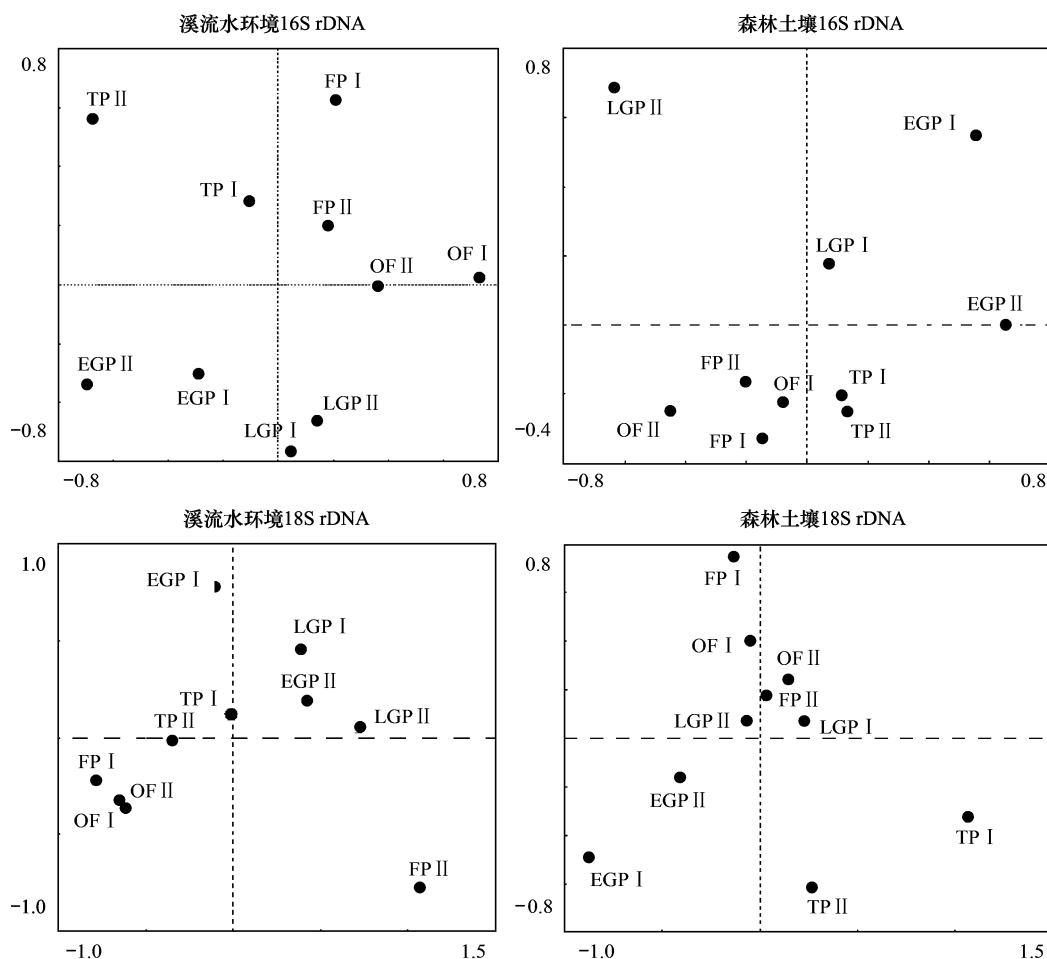


图5 溪流和森林土壤微生物群落结构的PCA分析

Fig.5 The PCA analysis of the microbial community in the stream water and forest soil

3 讨论

微生物是生态系统的重要生命体,参与生态系统物质循环与能量转换,在不同的生态系统中维持着相应的生态系统功能及其稳定性^[5,19]。研究通过以土壤(陆地环境)作为对比,研究了高寒森林溪流(水体环境)中微生物群落结构的季节性变化动态特征及其与环境因子之间的关系。

与前期在该区域的研究结果一致^[6-7,20],季节性冻融直接影响林下土壤微生物群落结构,表现出冬季比生长季节更高的微生物丰度和多样性。但是越来越多关于水生环境中微生物群落结构的研究表明区域性环境因子具有更显著的作用^[21]。流动水环境相对土壤的强烈冲刷作用,直接影响其中水体生物的活动^[10]。与此同时,高寒森林水生环境还普遍存在微环境气候、水流、水温、冻融等控制了水-气界面微环境特征^[22-23],而且雪被形成、覆盖和消融以及土壤冻融过程也会直接改变森林溪流水体环境^[14],这些都会对水体中微生物群落产生深刻的影响。本研究显示,空间差异性大且营养物质相对低的溪流中,微生物丰度和多样性指数相对较低,其中细菌丰度在不同时期表现出显著差异($P < 0.05$)。尽管溪流温度波动较土壤温度波动小,但是温度也能支配微生物的数量、分布和活性^[10-11,24]。本研究发现细菌丰度波动在溪流中比在土壤中大,而真菌丰度波

动在溪流和土壤中相差不大。这也说明了在不同生境中温度及其波动范围可能引起微生物类群的不同响应,反映了细菌比真菌更易受到温度影响的特点^[25],尤其是在冷水水域^[10]。

表 1 溪流和森林土壤微生物群落 Shannon-Wiener 指数

Table 1 Shannon-wiener diversity indexes of microbial community in the stream water and forest soil

采样时期 Sampling Time	溪流 Stream water	森林土壤 Forest soil	溪流 Stream water	森林土壤 Forest soil
	细菌 Bacteria		真菌 Fungi	
OF I	1.58	2.88	1.90	2.47
FP I	1.45	2.82	1.42	2.40
TP I	1.67	2.21	1.49	2.51
EGP I	1.73	2.93	1.86	2.43
LGP I	1.33	2.62	1.72	2.50
OF II	1.55	2.87	1.51	2.58
FP II	1.41	2.67	1.42	2.35
TP II	1.77	2.15	1.36	2.55
EGP II	2.18	2.44	2.05	2.48
LGP II	1.55	2.46	1.90	2.35

OF I:雪被形成初期 I Early stage of snow cover; FP I:雪被覆盖期 I Peak of snow cover I; TP I:雪被消融期 I Stage of snow thaw I; EGP I:生长季前期 I Early growth period I; LGP I:生长季后期 I Later growth period I; OF II:雪被形成初期 II Early stage of snow cover II; FP II:雪被覆盖期 II Peak of snow cover II; TP II:雪被消融期 II Stage of snow thaw II; EGP II:生长季前期 II Early growth period II; LGP II:生长季后期 II Later growth period II

表 2 微生物多样性与环境因子之间的 Pearson 相关性分析

Table 2 Pearson's correlation analyses between microbial diversity and environmental variables in the stream and the forest soil

环境因子 Environmental Variables	溪流 Stream Water		森林土壤 Forest Soil	
	细菌丰度 Bacterial Abundance	真菌丰度 Fungal Abundance	细菌丰度 Bacterial Abundance	真菌丰度 Fungal Abundance
日均温 Daily Mean Temperature	0.311	0.184	0.489 **	-0.207
正积温 Cumulative Positive Temperature	0.634 **	0.289	0.409 **	0.061
负积温 Cumulative negative temperature	<i>a</i>	<i>a</i>	-0.389 *	-0.262
pH	-0.442 *	-0.216	0.225	-0.005
水溶性有机碳 Dissolved Organic Carbon	0.621 **	0.390 *	0.283	-0.471 **
流速 Flow Velocity	0.268	-0.042	/	/
溶解氧 Dissolved Oxygen	0.473 **	0.097	/	/
电导率 Conductivity	-0.317	-0.351	/	/

* 表示显著相关 ($P < 0.05$), ** 表示极显著相关 ($P < 0.01$); *a* 因为溪流凋落叶中负积温在各个时期均为 0, 因此变量为常量, 无法计算

已有研究表明微生物的生长与可溶性有机碳密切相关^[26]。季节性变化过程中,随着冬季冻融循环温度降低,溪流水中可溶性有机碳浓度降低,微生物丰度随之降低;而随着生长季节的到来,温度升高,可溶性有机碳浓度升高,微生物丰度也升高。这与大量水生生境中有关微生物生物量或丰度变化的研究结果一致。相关性分析也表明细菌和真菌丰度与可溶性有机碳存在极显著或显著的正相关性(表 2, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。同时,细菌和真菌形态、生长策略以及生态位的差异可能导致了细菌和真菌对养分动态的响应存在差异,这些差异将引起其群落结构的动态变化差异,再加上真菌较细菌更可能具有更高的碳固定能力^[27],因此无论水生环境还是陆生环境冬季较生长季节高的真菌/细菌比例对冬季生态系统碳氮周转具有非常重要的意义。

除了温度和可溶性有机碳, pH 值、光照和水流,以及溶解氧等其他营养物质都会深刻影响溪流水环境中的微生物活性、群落结构及其组成^[8-10]。本研究通过分析优势类群发现,红球菌属在溪流环境中占显著的优势地位,随着季节性变化,溪水中含氧量发生改变,好气性的红球菌类群及其相对的比例在含氧量高的生长季节更高,并且各个时期变化较大。而森林土壤中,红球菌属的种类和数量均较溪流中低,这可能是由于森林土壤更容易受到季节性变化的深刻影响,而导致更耐极端环境的芽孢杆菌迅速占据优势地位,这一特点尤其表现在土壤冻融循环频繁,温度较低的冬季。另一方面,分析真菌优势类群结果表明,与真菌类群丰富的森林土

壤相比,溪流真菌优势类群明显较少。相对于细菌,真菌途径为慢周转方式,偏好低营养和难分解的高碳氮比的有机物,底物循环时间相对较长^[28-29],因此,溪流中真菌群落结构相比细菌或者土壤中的真菌更容易受到营养物质相对贫瘠的溪流区域性环境因子的深刻影响,因此也表现出全年较大的多样性指数波动。

4 结论

高寒森林溪流微生物丰度和多样性均较低,并表现出明显的季节性变化特征,且冬季较生长季节具有更高的真菌/细菌比,细菌和真菌优势类群的比例均随季节性变化发生改变。季节性变化和冬季冻融循环对溪流环境中的微生物群落结构和多样性均产生不同程度的影响,期间,温度、pH、水溶性有机碳和溶解氧等环境因子对微生物结构和多样性变化具有重要作用。本研究为深入研究高寒森林水体和土壤生态过程及其季节转换提供了一定的基础资料和理论依据。

参考文献 (References):

- [1] Sales M A, Gonçalves Jr J F, Dahora J S, Medeiros A O. Influence of leaf quality in microbial decomposition in a headwater stream in the Brazilian Cerrado: a 1-year study. *Microbial Ecology*, 2015, 69(1): 84-94.
- [2] Yue K, Yang W Q, Peng C H, Peng Y, Zhang C, Huang C P, Tan Y, Wu F Z. Foliar litter decomposition in an alpine forest meta-ecosystem on the eastern Tibetan Plateau. *Science of the Total Environment*, 2016, 566-567: 279-287.
- [3] 刘世荣, 温远光, 蔡道雄, 朱宏光, 黄雪蔓, 李晓琼. 气候变化对森林的影响与多尺度适应性管理研究进展. *广西科学*, 2014, 21(5): 419-435.
- [4] Wu F Z, Peng C H, Zhu J X, Zhang J, Tan B, Yang W Q. Impact of changes in freezing and thawing on foliar litter carbon release in alpine/subalpine forests along an altitudinal gradient in the eastern Tibetan Plateau. *Biogeosciences Discussions*, 2014, 11(6): 9539-9564.
- [5] Sharma S K, Ramesh A, Sharma M P, Joshi O P, Govaerts B, Steenwerth K L, Karlen D L. Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality // Lichtfouse E, ed. *Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture*. Netherlands: Springer, 2011: 317-358.
- [6] 刘利, 吴福忠, 杨万勤, 王奥, 谭波, 余胜. 季节性冻结初期川西亚高山/高山森林土壤细菌多样性. *生态学报*, 2010, 30(20): 5687-5694.
- [7] 张丽, 杨万勤, 吴福忠, 徐振锋, 谭波, 刘洋, 王奥, 何伟. 川西亚高山/高山森林土壤微生物对季节性冻融的响应. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(3): 505-511.
- [8] Keuskamp J A, Hefting M M, Dingenans B J J, Verhoeven J T A, Feller I C. Effects of nutrient enrichment on mangrove leaf litter decomposition. *Science of the Total Environment*, 2015, 508: 402-410.
- [9] Jenkins G B, Woodward G, Hildrew A G. Long-term amelioration of acidity accelerates decomposition in headwater streams. *Global Change Biology*, 2013, 19(4): 1100-1106.
- [10] Taylor B R, Chauvet E E. Relative influence of shredders and fungi on leaf litter decomposition along a river altitudinal gradient. *Hydrobiologia*, 2014, 721(1): 239-250.
- [11] Zhou Y, Clark M, Su J Q, Xiao C W. Litter decomposition and soil microbial community composition in three Korean pine (*Pinus koraiensis*) forests along an altitudinal gradient. *Plant and Soil*, 2015, 386(1/2): 171-183.
- [12] Graça M A S, Ferreira V, Canhoto C, Encalada A C, Guerrero-Bolaño F, Wantzen K M, Boyero L. A conceptual model of litter breakdown in low order streams. *International Review of Hydrobiology*, 2015, 100(1): 1-12.
- [13] 吴宁, 刘庆. 山地退化生态系统的恢复与重建——理论与岷江上游的实践. 成都: 四川科学技术出版社, 2007.
- [14] 张川, 杨万勤, 岳楷, 黄春萍, 彭艳, 吴福忠. 高山森林溪流冬季不同时期凋落物分解中水溶性氮和磷的动态特征. *应用生态学报*, 2015, 26(6): 1601-1608.
- [15] 岳楷, 杨万勤, 彭艳, 黄春萍, 张川, 吴福忠. 高寒森林溪流对凋落叶分解过程中木质素降解的影响. *植物生态学报*, 2016, 40(9): 893-901.
- [16] Bakke I, De Schryver P, Boon N, Vadstein O. PCR-based community structure studies of Bacteria associated with eukaryotic organisms: a simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(2): 349-351.
- [17] Sandhu G S, Kline B C, Stockman L, Roberts G D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(11): 2913-2919.
- [18] Radojkovic D, Kušić J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clinical Chemistry*, 2000, 46(6): 883-884.

- [19] 曹鹏, 贺纪正. 微生物生态学理论框架. 生态学报, 2015, 35(22): 7263-7273.
- [20] Zhang L, Wang A, Yang W Q, Xu Z F, Wu F Z, Tan B, Liu Y, Chen L H. Soil microbial abundance and community structure vary with altitude and season in the coniferous forests, China. *Journal of Soils and Sediments*, 2016, 6: 6-11.
- [21] Hobara S, Osono T, Hirose D, Noro K, Hirota M, Benner R. The roles of microorganisms in litter decomposition and soil formation. *Biogeochemistry*, 2014, 118(1/3): 471-486.
- [22] Henry H A L. Climate change and soil freezing dynamics: historical trends and projected changes. *Climatic Change*, 2008, 87(3/4): 421-434.
- [23] Bruder A, Schindler M H, Moretti M S, Gessner M O. Litter decomposition in a temperate and a tropical stream: the effects of species mixing litter quality and shredders. *Freshwater Biology*, 2014, 59(3): 438-449.
- [24] García-Palacios P, Prieto I, Ourcival J M, Hättenschwiler S. Disentangling the litter quality and soil microbial contribution to leaf and fine root litter decomposition responses to reduced rainfall. *Ecosystems*, 2016, 19(3): 490-503.
- [25] Pérez J, Galán J, Descals E, Pozo J. Effects of fungal inocula and habitat conditions on alder and eucalyptus leaf litter decomposition in streams of northern Spain. *Microbial Ecology*, 2014, 67(2): 245-255.
- [26] Berggren M, Laudon H, Jansson M. Hydrological control of organic carbon support for bacterial growth in boreal headwater streams. *Microbial Ecology*, 2009, 57(1): 170-178.
- [27] Six J, Bossuyt H, Degryze S, Denef K. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*, 2004, 79(1): 7-31.
- [28] 韩世忠, 高人, 李爱萍, 马红亮, 尹云锋, 司友涛, 陈仕东, 郑群瑞. 中亚热带地区两种森林植被类型土壤微生物群落结构. 应用生态学报, 2015, 26(7): 2151-2158.
- [29] Blagodatskaya E V, Anderson T H. Interactive effects of pH and substrate quality on the fungal-to-bacterial ratio and qCO_2 of microbial communities in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30(10/11): 1269-1274.