

DOI: 10.5846/stxb201811222534

张秀娟, 安丽芸, 刘勇, 刘菊, 李君剑. 基于梯度稀释法分析细菌多样性对土壤碳代谢的影响. 生态学报, 2020, 40(3): 768-777.

Zhang X J, An L Y, Liu Y, Liu J, Li J J. Effects of soil bacterial diversity on soil carbon metabolism based on gradient dilution method. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(3): 768-777.

## 基于梯度稀释法分析细菌多样性对土壤碳代谢的影响

张秀娟<sup>1</sup>, 安丽芸<sup>1</sup>, 刘 勇<sup>1</sup>, 刘 菊<sup>2</sup>, 李君剑<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 山西大学黄土高原研究所, 太原 030006

<sup>2</sup> 山西省林业科学院, 太原 030012

**摘要:**为探究土壤微生物多样性对土壤碳代谢过程的影响,利用梯度稀释法(处理 D1、D3 和 D5 分别为稀释  $10^{-1}$ 、 $10^{-3}$  和  $10^{-5}$  倍)改变土壤样品中原始土壤微生物群落的多样性,以探究土壤微生物群落多样性减少对土壤碳代谢的影响。进行为期 6 周的预培养实验,以消除梯度稀释法对土壤样品中微生物群落丰度的影响,并通过 Q-PCR 和高通量测序测定预培养结束后 3 种土壤样品中细菌丰度及其基因多样性指数(ACE、Chao1、Shannon),以验证预培养实验结果。后加入等量葡萄糖(0.5g/100g 干土)继续培养,并于培养期间测定 3 种处理土壤的碳矿化速率,进行 biolug ECO 板实验,分析计算各土壤样品中细菌的功能多样性指数(Shannon 指数( $H$ )、Simpson 指数( $D$ )、McIntosh 指数( $U$ ))及碳源代谢强度。结果表明:(1)3 种处理土壤样品碳矿化速率及累积碳矿化量大小排序为:D1 > D3 > D5,且 D1 与 D3、D5 处理均有显著差异( $P < 0.05$ )。(2)D1 处理下土壤样品中微生物群落的孔平均颜色变化率(AWCD)、功能多样性指数(Shannon 指数( $H$ )、McIntosh 指数( $U$ ))均显著高于 D3、D5 处理( $P < 0.05$ )。(3)对 31 种碳源吸光度做主成分分析(PCA)分析,发现 3 种稀释处理下土壤样品的碳源利用模式存在差异,且 D1 处理下的土壤微生物群落对碳源的代谢功能大于 D3、D5 处理。因此,该研究表明土壤微生物多样性的减少会降低土壤的碳矿化速率及其碳源代谢强度,对土壤碳代谢过程产生一定程度的不利影响。

**关键词:**土壤微生物多样性;碳矿化;碳源代谢特征;梯度稀释;Biolog ECO

## Effects of soil bacterial diversity on soil carbon metabolism based on gradient dilution method

ZHANG Xiujuan<sup>1</sup>, AN Liyun<sup>1</sup>, LIU Yong<sup>1</sup>, LIU Ju<sup>2</sup>, LI Junjian<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

<sup>2</sup> Shanxi Academy of Forestry Science, Taiyuan 030012, China

**Abstract:** In order to investigate the relationship between soil microbial diversity and soil carbon metabolism, this study used gradient dilution method to modify the diversity of the original soil microbial community (the dilution of  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-5}$  times for treatments of D1, D3 and D5, respectively). Six weeks of pre-culture experiment was carried out to eliminate the effects of gradient dilution on microbial community abundance in soils. To evaluate the results of pre-culture experiments, the bacterial abundance and gene diversity index (ACE, Chao1 and Shannon) were determined by the Q-PCR and high-throughput sequencing, respectively. Thereafter, the same amount of glucose (0.5 g/100 g dry soil) was added in the culture, and the carbon mineralization rates of the three treated soils were measured during the incubation period. The Biolog ECO plate experiment was performed to analyze the functional diversity index (Shannon Index ( $H$ ), Simpson index ( $D$ ), and McIntosh index ( $U$ )) and carbon source metabolic intensity of bacteria in each soil sample. The results showed that the soil carbon mineralization rates and cumulative carbon mineralization were the greatest in D1 treatment, followed by

基金项目:国家自然科学基金项目(41771548)

收稿日期:2018-11-22; 网络出版日期:2019-11-20

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lijunjian@sxu.edu.cn

D3 and D5. The average well color development (AWCD),  $H$  and  $U$  were significantly higher under D1 treatment than those under D3 and D5 treatments ( $P < 0.05$ ). Principal component analysis for 31 kinds of carbon sources also indicated that the patterns of carbon source utilization of the three treatments were different, and the effect of soil microbial community on carbon source utilization under D1 was more significant than that under D3 and D5 ( $P < 0.05$ ). Taken together, this study showed that the decreases of soil microbial diversity would alter the soil carbon metabolic intensity and mineralization processes.

**Key Words:** soil microbial biodiversity; soil mineralization; carbon source utilization patterns; gradient dilution; Biolog Eco

微生物对于许多生态系统而言是必不可少的一部分,作为土壤的重要组成部分,土壤微生物在土壤的元素循环中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。虽然生物多样性目前已被确定为推动生态系统循环过程的一个重要驱动力,但土壤微生物群落丰富的多样性使我们对其物种多样性功能的了解甚少,并且有学者提出,不同土壤微生物间存在着功能冗余<sup>[2]</sup>。功能冗余观点认为,在生态系统中,微生物多样性的减少几乎不会对生态系统造成影响,其他微生物可以承担丧失物种的功能,一个物种的丧失可以由另一物种来替代。但 Pierre 等<sup>[3]</sup>通过研究,发现微生物群落组成的变化改变了群落在不同时空尺度上的整体功能属性,从而提出了不同观点。

土壤的碳循环是生态系统碳循环的重要组成部分,该过程中有极其丰富的微生物参与,但目前国内外学者对影响土壤碳代谢过程因素的研究多集中于土壤的水温,土地利用方式和土壤碳氮含量等方面<sup>[4-8]</sup>,而关于土壤微生物多样性在土壤碳循环过程中是否存在功能冗余尚未存在明确的结论。因此开展土壤微生物多样性对土壤碳代谢影响的研究对我们了解土壤固碳微生物的功能及土壤的碳循环过程具有重要意义。本研究采集山西省庞泉沟自然保护区阔叶混交林 0—10 cm 处表层土壤为土壤样品,通过浓度梯度稀释法改变土壤中原始细菌群落的多样性,该方法与传统的人工配置方法相比,可更加真实反映自然土壤生态系统中微生物多样性减少对土壤碳代谢的影响。经过 6 周预培养后测定不同稀释处理下土壤样本中细菌的丰度及基因多样性指数(ACE、Chao1、Shannon)。于各土壤样品中加入等量葡萄糖(0.5 g/100 g 干土)继续培养,期间采用碱式滴定法测定土壤碳矿化速率,利用 Biolog Eco 板实验分析不同稀释处理下土壤样本中细菌的功能多样性指数(Shannon 指数( $H$ )、Simpson 指数( $D$ )、McIntosh 指数( $U$ ))及碳源利用模式,通过以上指数综合分析土壤微生物多样性对土壤碳代谢过程的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及稀释处理

于山西省庞泉沟自然保护区阔叶混交林(111°22'—111°33'E, 37°45'—37°55'N),清除表面覆盖物,采集 0—10 cm 处表层土壤。该样品土壤类型为褐土,土壤有机碳含量为(26.27 ± 1.87) g/kg,全氮含量为(1.79 ± 0.09) g/kg, pH 为 7.26 ± 0.04。将所得的土壤样品分为两份放入袋中,一份于 4 °C 冰箱保存,一份风干后过 2 mm 孔径土壤筛。

取已过 2 mm 土壤筛的风干土样进行高压蒸汽锅灭菌处理。同时配置不同稀释梯度的土壤悬浊液:将 100 g 新鲜土样加入盛有 300 mL 无菌蒸馏水的三角瓶中,放于恒温床震荡摇匀 20 min,使土样与水充分混合,分散菌体,得到 100 mL 土壤悬浮液,通过梯度稀释将土壤悬浮液稀释为  $10^{-1}$ 、 $10^{-3}$  和  $10^{-5}$  倍数的土壤悬浮液(D1、D3 和 D5 处理)。将 3 种稀释处理的土壤悬浊液接种于灭菌的土壤样品中,共 3 个稀释梯度,每个梯度 3 个重复,20 °C 条件下预培养 6 周,为细菌群落定殖提供时间。

### 1.2 DNA 提取、定量 PCR 及高通量测序

预培养 6 周结束后,测定 3 种处理下土壤样品中细菌群落的丰度及其基因多样性。使用 Ultra-clean TM 土壤 DNA 分离试剂盒(MoBio Laboratory, USA)从 0.25 g 土壤中提取各稀释条件下土壤 DNA。通过定量 PCR

测定土壤细菌丰度,定量 PCR 的引物、反应体系和条件如下:引物为 338F(5'-ACTCCTACGAGGAGCA-3')和 534R(5'-TTACCGCGCTGCTGGCAC-3'),反应体系为 20  $\mu$ L:7.6  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,10.0  $\mu$ L SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II,2.0  $\mu$ L 样本 DNA,PCR 条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,53 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,35 个循环。

利用引物 341F(5'-CAGACAT (barcode) ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGG TWTCTAAT-3')对 16S rRNA 的 V3—V4 区进行 PCR 扩增,并使用 Illumina MiSeq 平台对细菌 16S rDNA 进行双端测序,随后在 Greengenes 数据库(Release 13.8, <http://greengenes.secondgenome.com/>)进行基因比对,获得各稀释样品中细菌群落的基因多样性指数(ACE、Chao1、Shannon)。此处的多样性指数是指基于分类学的多样性指标(taxonomic diversity),这些指标在一定程度上反映了群落或生态系统的某些特性,其中,Chao1 和 ACE 指数反应细菌群落的丰富度,指数越大,群落的丰富度越高;Shannon 指数综合反应细菌群落的丰富度和均匀度,Shannon 指数越大,群落的多样性越高<sup>[9]</sup>。

### 1.3 碳矿化速率及土壤微生物功能多样性的测定

由于预培养期间各土壤样品碳源大量消耗,为进一步探究各细菌多样性梯度下土壤样品的碳代谢情况,预培养结束后,于不同稀释梯度的土壤样本中加入等量碳源(本实验选用葡萄糖为碳源),葡萄糖加入量为每 100 g 干土 0.5 g。20  $^{\circ}$ C 下继续培养。期间采用碱式滴定法测定 3 种处理下土壤样品的碳矿化速率(每隔 2 d 测定一次),直到培养期第 30 d 为止。

Biolog 是一种通过测定微生物对不同碳源利用程度的差异来反映微生物群落的总体活性和代谢功能的方法,该方法在研究空间及时间尺度上微生物群落变化有较好的应用<sup>[10-11]</sup>,故本研究利用该方法进一步研究不同稀释处理下土壤样品的碳的代谢强度和代谢活性。将接种好培养期第 14 天时 D1、D3、D5 稀释处理下土壤样品溶液的测试板加盖,并于 25 $^{\circ}$ C 下恒温培养 7 d,每隔 24 h 在 590 nm 下读取各孔的吸光度值,并根据吸光度数值分析计算 3 种不同多样性梯度的土壤细菌群落的孔平均颜色变化率(AWCD)及功能多样性指数(Shannon 指数( $H$ )、Simpson 指数( $D$ )、McIntosh 指数( $U$ ))以研究土壤微生物多样性对土壤碳代谢的影响,具体实验步骤和指数计算公式详见文献<sup>[11-12]</sup>。与上文提到的基因多样性指数不同,此处的多样性指数是通过 Biolog ECO 平板技术测定的孔平均颜色变化率(AWCD)经过计算所得,Biolog ECO 平板技术的是利用不同种类的微生物或不同微生物类群对碳源的利用能力不同而产生的不同碳源利用模式来表征微生物群落差异,故用以上 3 种指数表征细菌群落的功能多样性。

Biolog ECO 平板技术测定的群落功能多样性指数是利用不同种类的微生物或不同微生物类群对碳源的利用能力不同而产生的不同碳源利用模式来表征微生物群落差异<sup>[11]</sup>。其中,Shannon 指数( $H$ )可反映土壤微生物群落的种类和均匀度;Simpson 指数( $D$ )可以反应群落中的优势物种,评估土壤中微生物群落优势度;McIntosh 指数( $U$ )可用来区分不同的碳源利用程度<sup>[13]</sup>。

### 1.4 数据处理

采用 Excel 2010 软件对数据进行初步统计分析;用 SPSS 23.0 软件对 3 种处理下土壤样品的细菌拷贝数、基因多样性指数、累积碳矿化量、孔平均颜色变化率(AWCD)、功能多样性指数进行单因素方差分析(One-way ANOVA)分析,并采用最小显著差数(Least significant difference, LSD)进行差异显著性检验;用 Canoco 4.5 软件对土壤生物群落 31 种碳源的 AWCD 值进行主成分分析(Principal component analysis, PCA),并作图;用 Origin9.0 软件制作文中所有统计图表。

## 2 结果

### 2.1 稀释处理对土壤细菌群落的影响

本研究为探明预培养实验对 3 种稀释处理下土壤细菌群落的影响,在预培养 6 周后,采用定量 PCR 来定量不同稀释梯度样本土壤中细菌群落的 DNA 拷贝数,用其表征 3 种处理下土壤样品中的细菌丰度。结果如图 1 所示,预培养结束后,不同土壤样本中细菌的 DNA 拷贝数相似,且没有显著性差异( $P < 0.05$ ),这表明经预培养 6 周后,梯度稀

释处理对微生物丰度的影响基本消除。

通过高通量测序分析不同稀释浓度下土壤细菌群落的基因多样性,以探究梯度稀释处理和预培养实验对土壤样品中细菌群落多样性的影响。采用多种多样性指数表示不同稀释处理中土壤细菌物种的丰富度和多样性的变化,结果如表 1 所示:除 ACE 指数外,D1 样本中微生物群落 Chao1 指数与 Shannon 指数均高于 D3 和 D5 处理,且 D1 处理显著高于 D5 处理( $P<0.05$ )。3 种处理下的 ACE 多样性指数之间虽无显著差异( $P<0.05$ ),但稀释倍数最大的 D5 处理土壤样品中微生物群落 ACE 指数最低。由此可以断定,不同稀释处理下土壤样品中微生物多样性不同,稀释处理改变细菌群落的多样性,且预培养实验并未消除稀释处理对各本土壤中细菌群落多样性的影响。由此,得到含有有显著基因多样性差异但无明显丰度差异细菌群落的 3 种土壤样品( $P<0.05$ ),为后期研究提供实验基础。

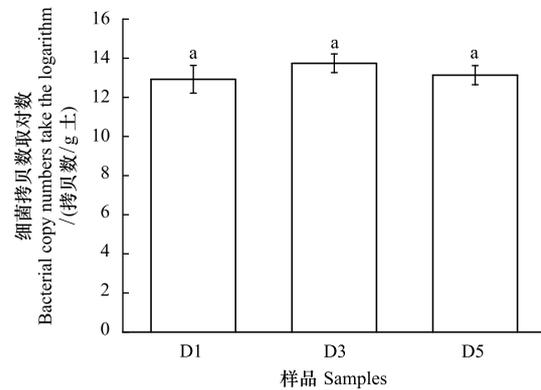


图 1 不同处理下土壤细菌丰度

Fig.1 The bacterial abundance in different treatment

相同字母表示无显著差异( $P<0.05$ ); D1:稀释倍数为  $10^{-1}$  的土壤悬浮液 Dilution1; D3: 稀释倍数为  $10^{-3}$  的土壤悬浮液 Dilution3; D5: 稀释倍数为  $10^{-5}$  的土壤悬浮液 Dilution5

表 1 不同土壤样本基因多样性指数

Table 1 The gene diversity index in different treatments

处理 Treatment	ACE 指数	Chao1 指数	香浓指数 Shannon
D1	2258.73±20.79a	1642.00±34.27a	8.96±0.049a
D3	2559.54±372.90a	1389.33±125.53b	7.95±0.13b
D5	2132.67±132.81a	1296.33±24.76b	7.81±0.13b

不同字母表示有显著差异( $P<0.05$ ); D1:稀释倍数为  $10^{-1}$  的土壤悬浮液 Dilution1; D3: 稀释倍数为  $10^{-3}$  的土壤悬浮液 Dilution3; D5: 稀释倍数为  $10^{-5}$  的土壤悬浮液 Dilution5

## 2.2 微生物群落多样性对土壤碳矿化速率及碳矿化量的影响

为探究 3 种细菌多样性条件下土壤碳代谢情况,本研究在预培养实验结束后,于 3 种土壤样品加入等量葡萄糖继续培养,期间测定并计算培养期 0—30 d 各土壤样品的碳矿化速率(图 2)。由图 2 可知,整个测量期间,3 种稀释处理下土壤样品的碳矿化速率总体大小排序为: D1 > D3 > D5,且各处理下每个测量时间点的土壤的碳矿化速率均不同,由此可见各土壤样品中细菌群落的多样性持续影响土壤的碳矿化速率。3 种稀释处理下土壤样品的碳矿化速率变化存在阶段性特征,即, D1、D3、D5 处理下土壤样品的碳矿化速率在培养期第 2—4 天急剧增长,且出现第一个峰值(约  $0.4 \text{ g mg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ),之后平稳增长;培养期第 8—10 天,除 D5 处理, D1、D3 处理下土壤样品的碳矿化速率开始急剧增长,并出现第二个峰值(约  $0.8 \text{ g mg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )之后趋于平稳,直到培养期第 26 d, D1、D3、D5 处理下土壤的碳矿化速率开始下降。

测量结束后,对 D1、D3 和 D5 处理下土壤样本中 30 d 的累积碳矿化量做单因素方差分析并做差异性检验,结果如图 2。D3、D5 处理下土壤样品累积碳矿化量较 D1 处理分别降低了  $3.43 \text{ mg/g}$  (17.77%) 和  $1.94 \text{ mg/g}$  (10.04%),且 D1 处理累积碳矿化量显著高于 D3 和 D5 处理( $P<0.05$ ); D5 处理较 D3 处理累积碳矿化量降低了  $1.49 \text{ mg/g}$  (8.59%),且 D3 处理累积碳矿化量显著高于 D5 处理( $P<0.05$ )。综上,土壤微生物多样性的减少会降低土壤的碳矿化速率及其累积碳矿化量。

## 2.3 土壤微生物利用 31 种碳源特征分析

平均颜色变化率(AWCD)是表征土壤微生物活性的重要指标,其值的变化可以反映土壤微生物对某一碳源的利用能力,AWCD 值越大,表明土壤中微生物活性越高,对碳源的利用能力越强<sup>[14]</sup>。对培养期第 14 天

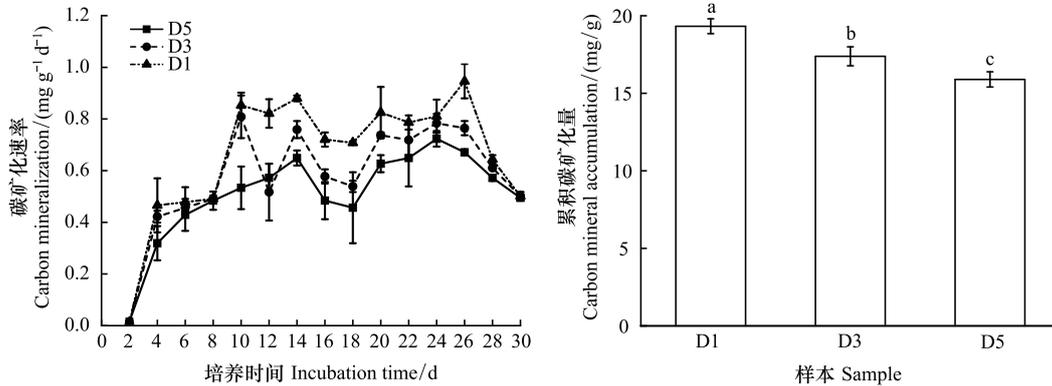


图2 培养期间土壤碳矿化速率分析

Fig.2 Analysis of Cumulative amount of soil carbon mineralization rate during cultivation

不同字母表示有显著差异( $P < 0.05$ )

整个测量时间段每隔 24 h 测定计算的 AWCD 进行分析,结果如图 3。每一个微板在接种培养期第 14 天的土壤细菌悬浊液后,随着时间的延长,其平均吸光值(AWCD)逐渐增加,说明随着培养时间的延长 3 种处理下土壤细菌对碳源的利用强度逐渐增强。且 D1 处理的 AWCD 值显著高于 D3、D5 处理( $P < 0.05$ ),说明 D1 处理下的土壤中细菌群落的微生物活性最大,碳源利用效率最高。第 14 天测量时间段内 3 种稀释处理下的 AWCD 值在 24—96 h 的斜率最大,表明在该时间段,样品中微生物生长最为迅速,碳源代谢强度迅速增强;之后各处理的 AWCD 增长速率均有所降低且趋于稳定,可见在第 14 天时采用 96 h 的吸光值分析更能真实地反映实际情况。

群落功能多样性指数可以反映土壤微生物群落对不同类碳源的利用差异,各稀释条件下培养期第 14 天时土壤样品中细菌群落功能多样性指数如表 2 所示。

与 AWCD 相似,D1 处理的 Shannon 指数、McIntosh 指数均最大,且与 D3、D5 处理均有显著差异( $P < 0.05$ ),表明稀释  $10^{-1}$  处理下土壤样品中细菌群落的物种多样性、分布的均匀程度及其对源利用强度较  $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$  处理高。D3 处理的 McIntosh 指数和 Shannon 指数均显著高于 D5 处理( $P < 0.05$ ),但 D1、D3、D5 处理下的土壤微生物 Simpson 指数无显著性差异( $P < 0.05$ ),说明  $10^{-1}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$  稀释处理对土壤样品细菌群落中的优势种影响不大。

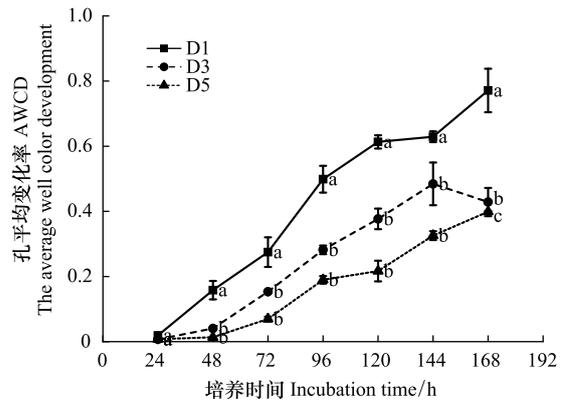


图3 各稀释处理下土壤微生物培养过程中平均颜色变化率(AWCD)

Fig3 AWCD changes of soil microbial communities in three tested soils

不同字母表示有显著差异( $P < 0.05$ )

表2 土壤微生物功能多样性指数和 AWCD

Table 2 AWCD and functional diversity indices of soil microbial communities

处理 Treatment	平均颜色变化率(AWCD) The average well color development(AWCD)	Simpson 指数(D) Simpson Index (D)	McIntash 指数(U) McIntash Index (U)	Shannon 指数(H) Shannon Index(H)
D1	0.61±0.01a	0.94±0.01a	4.43±0.22a	2.68±0.1a
D3	0.47±0.04b	0.98±0a	2.22±0.26b	2.14±0.1b
D5	0.46±0.02b	0.99±0a	1.42±0.25c	1.18±0.1c

不同字母表示有显著差异( $P < 0.05$ )

## 2.4 土壤微生物生理碳代谢指纹图谱分析

研究微生物对微平板上不同碳源利用能力的图被定义为 Biolog 代谢指纹图谱,其有助于较为全面地了解微生物群落代谢功能特征<sup>[12]</sup>。测定培养第 14 天,96 h 3 种稀释处理下土壤微生物对 31 种单一碳源的代谢能力(AWCD<sub>i</sub> 值),得到土壤微生物生理碳代谢指纹图谱(图 4)。由图 4 可知,D1 处理下的土壤样品中土壤微生物对 31 种碳源的利用能力高于 D3、D5 处理,且 3 种稀释处理下的土壤微生物对酯类、碳水化合物类、氨基酸类和胺类碳源的利用能力较强。培养期第 14 天,土壤代谢指纹图谱中 D1 处理下 AWCD<sub>i</sub> ≥ 0.8 的碳源有 8 种(酯类 3 种,醇类 1 种,酸类 1 种,氨基酸类 2 种,胺类 1 种),占总碳源的 64.41%;D3 处理下 AWCD<sub>i</sub> ≥ 0.8 的碳源有 1 种(酯类 1 种),占总碳源的 9.61%;D5 处理下 AWCD<sub>i</sub> ≥ 0.8 的碳源有 1 种(氨基酸类 1 种),占总碳源的 11.54%。此外,除碳水化合物类碳源,D1 处理下的土壤微生物对其他五类碳源的利用强度远高于 D3、D5 处理。D3 处理下土壤微生物碳源利用代谢功能与 D1 相比差异显著的碳源分别有 13 种( $P < 0.05$ );D5 处理下土壤微生物碳源利用代谢功能与 D1 相比差异显著的碳源分别有 14 种( $P < 0.05$ );D3 与 D5 处理下土壤微生物对 31 种碳源的利用代谢功能差异不十分显著( $P < 0.05$ ),碳源利用代谢功能有显著性差异的碳源仅有 1 种( $P < 0.05$ )。说明  $10^{-1}$  稀释处理使土壤微生物对单一碳源的利用能力发生改变,而  $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$  浓度的稀释处理对土壤微生物对单一碳源的利用能力影响较  $10^{-1}$  稀释处理小。

## 2.5 土壤微生物对碳源利用多样性的主成分分析

采用第 14 天,96 h 的吸光值对土壤微生物群落碳源利用情况进行主成分分析,分析不同稀释处理下土壤微生物群落功能的综合差异和相似状况,结果见表 3。从 31 个因子中共提取了 6 个主成分因子,累积方差贡献率达到了 95.79%,从中选取累积方差贡献率达到 72.71% 的前两个主成分 PC1 和 PC2(特征根分别为 15.87 和 6.67) 来分析微生物群落功能多样性。

从图 5 可以看出,不同稀释处理在 PC 轴出现了明显的分异,整体可分为 3 大类,D1 处理,D3 处理,D5 处理各为一类,D1 处理分布于 III 区,D3 处理分布于 I 区,D5 处理分分布于 II 区。可见 PC1 和 PC2 能区分不同稀释处理土壤微生物的群落特征。

表 3 主成分特征根

Table 3 Eigenvalues of principal components

主成分 Principal component	特征根 Eigenvalues	方差贡献率/% Percent of variance	累积方差贡献率/% Percent of total variance
PC1	15.87	51.19	51.19
PC2	6.67	21.52	72.71
PC3	2.57	8.3	81.02
PC4	2.22	7.16	88.17
PC5	1.36	4.38	92.56
PC6	1	3.23	95.79

考虑到各个主成分反应的变异问题,本研究进一步计算了 PC1 与 PC2 的综合得分,结果见表 4。不同处理在 PC1 和 PC2 上得分系数出现显著差异( $P < 0.05$ )。在 PC1 轴上,D1 处理、D3、D5 处理均有显著性差异( $P < 0.05$ );在 PC2 轴上,D1 与 D5 处理无显著性差异,D3 处理与 D1、D5 处理均有显著差异( $P < 0.05$ );从第一主成分第二主成分的综合得分来看,D1、D3、D5 处理均有显著性差异( $P < 0.05$ )。说明这 3 种稀释处理下的土壤样品中土壤细菌群落具有不同的碳源利用模式,土壤细菌群落代谢功能不同。

考察 PCA 的相关性矩阵可知,对前 3 个主成分贡献的特征向量系数大于 0.60 的碳源类型进行分析,结果见表 4。培养时间为第 14 天时,对 PC1 贡献大的碳源有 19 种,其中,碳水化合物类,酯类和酸类均占 21.10%,氨基酸类占 15.79%。可见影响 PC1 的主要为碳水化合物,酯类和酸类,其次是氨基酸类;对 PC2 贡献最大的碳源为碳水化合物类,占 37.50%;其次是氨基酸类,占 25%。

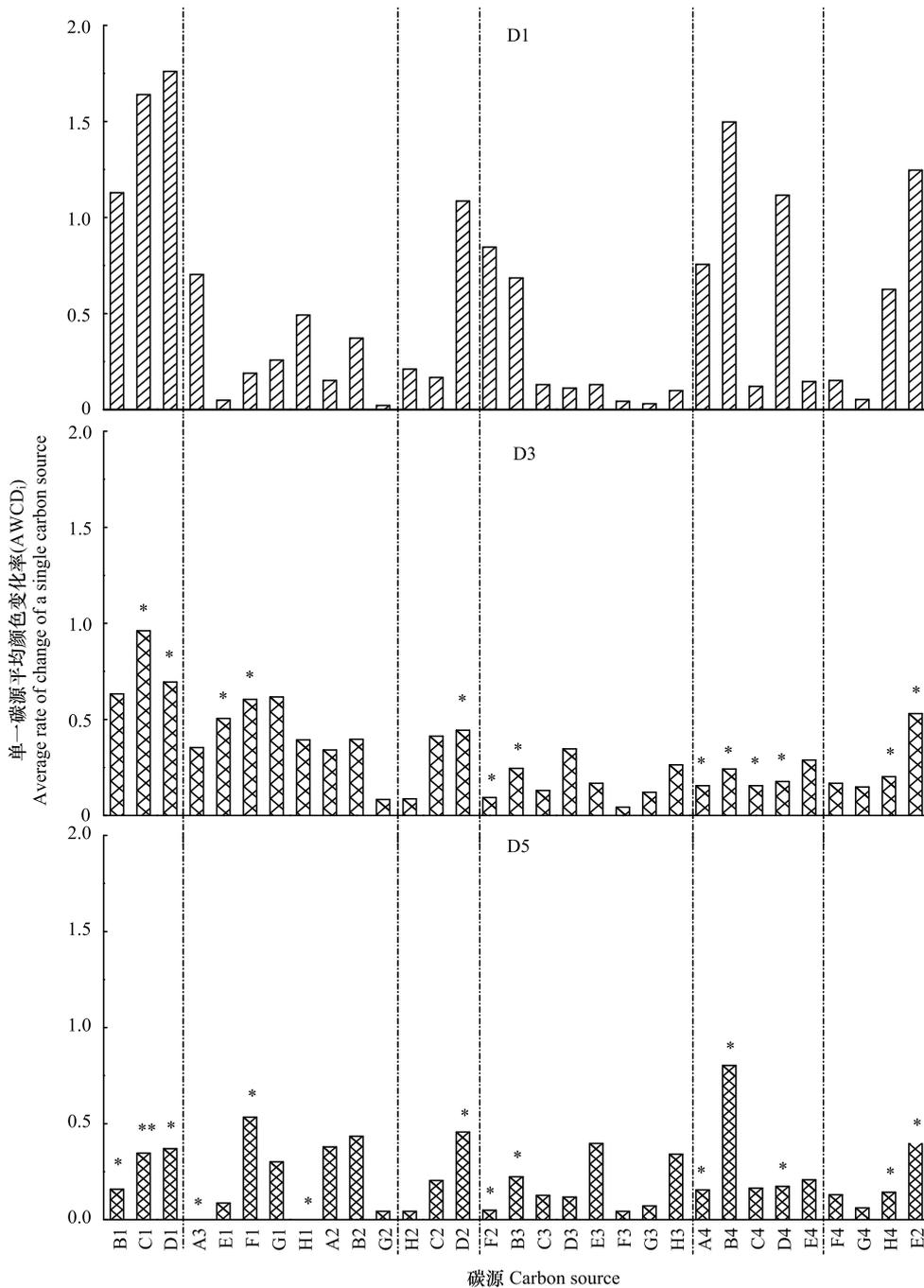


图 4 土壤微生物生理碳代谢指纹图谱

Fig.4 Metabolic fingerprint of carbon level physiological profiles of microbial community

B1—A3: 酯类; E1—G2: 碳水化合物类; H2—D2: 醇类; F2—H3: 酸类; A4—F4: 氨基酸类; G4—E2: 胺类; AWCD<sub>i</sub> 值为 Biolog 板上 3 次重复的平均值; \* 标注显著差异性, P<0.05, “\*”代表与 D1 处理显著性差异, “\*\*”代表与 D1、D3 处理均有显著性差异

表 4 各时间不同处理下主成分得分

Table 4 Principal component scores in different treatments among every time

处理 Treatment	第一主成分 PC1	第二主成分 PC2	综合主成分 Comprehensive principal components
D1	1.02±0.03a	0.28±0.03a	0.09±0.01a
D3	0.12±0.03b	0.45±0.12b	0.09±0.03b
D5	0.53±0.03c	0.14±0.01a	0.04±0c

不同字母表示有显著差异 (P<0.05)

表 5 主成分贡献的特征向量 $\geq 0.60$ 的碳源数目Table 5 Numbers of C sources with eigenvector loadings $\geq 0.60$ 

主成分 Principal component	碳源种类 Carbon source	相关系数 Correlation coefficient	主成分 Principal component	碳源种类 Carbon source	相关系数 Correlation coefficient	
PC1	酯类	丙酮酸甲酯	0.83	PC1	氨基酸类 L-精氨酸	0.94
		吐温 40	0.97		天冬酰胺酸	0.94
		吐温 80	0.88		L-丝氨酸	0.95
		D-半乳糖酸 $\gamma$ 内酯	0.72		胺类 N-乙酰基-D-葡萄糖胺	0.98
	碳水化合物类	肝糖	-0.65		腐胺	0.96
		葡萄糖苷	-0.79		PC2	碳水化合物类 环状糊精
		木糖	-0.57	纤维二糖		0.66
	葡萄糖-1-磷酸盐	-0.66	乳糖	0.9		
	醇类	D,L-a-甘油	0.97	I-赤藻糖醇	0.77	
		D-甘露醇	0.94	酸类 a-丁酮酸	0.54	
	酸类	氨基葡萄糖酸	0.95	氨基酸类 L-苏氨酸	0.69	
		4-羟基苯甲酸	0.95	甘氨酸-L-谷氨酸	0.65	
		a-丁酮酸	-0.69	胺类 苯乙基胺	0.88	
		D-苹果酸	-0.76			

### 3 讨论

#### 3.1 微生物群落多样性对土壤有机碳矿化速率的影响

梯度稀释的方法经常被用来做微生物分离计数和改变微生物多样性,该方法理论上可以通过稀释来减少微生物的丰度和多样性,移除稀有的微生物类群<sup>[15]</sup>。Davis 等<sup>[16]</sup>通过梯度稀释法获得不同浓度接种物,并且从土壤中分离了许多新微生物种类,由此证实了梯度稀释法的作用。本研究为了消除因梯度稀释法接种微生物而造成的微生物丰度差异对后来实验中土壤碳矿化进程的影响,进行了为期 6 周的预培养实验,结果如图 1,培养结束后 D1、D3、D5 处理下的土壤样品中细菌丰度无显著性差异( $P < 0.05$ ),此结果与 Philippot 等<sup>[17]</sup>的实验结果一致,由此推断,预培养实验基本消除了梯度稀释处理造成的细菌丰度差异。为了评估预培养实验对 D1、D3、D5 处理下土壤样品中细菌多样性的影响,对预培养结束后 3 种稀释处理下土壤样品中的 PCR 扩增片段进行高通量测序,结果正如预期的一样,稀释处理导致土壤样品中微生物多样性整体下降。因此,我们基本可以确定之后实验中使土壤碳矿化速率变化的原因是由于由梯度稀释处理造成的土壤微生物多样性改变而非丰度差异。

土壤微生物作为参与土壤碳循环过程中的至关重要的一部分,其多样性对土壤碳代谢过程的影响是一个重要课题。为了探究该影响,本研究以土壤碳矿化速率为指标,对土壤微生物多样性对土壤碳矿化过程的影响进行说明。实验结果发现,加入碳源以后,3 种处理下土壤样品碳矿化速率大小排序为: D1 > D3 > D5。且 3 种处理下土壤样品的碳矿化速率均有其特有变化趋势,培养前期 D1、D3、D5 处理下的土壤碳矿化速率均会出现一个峰值,当稳定增长一段时间之后 D1、D3 处理再次出现矿化速率峰值, D5 处理继续稳定增长,之后时

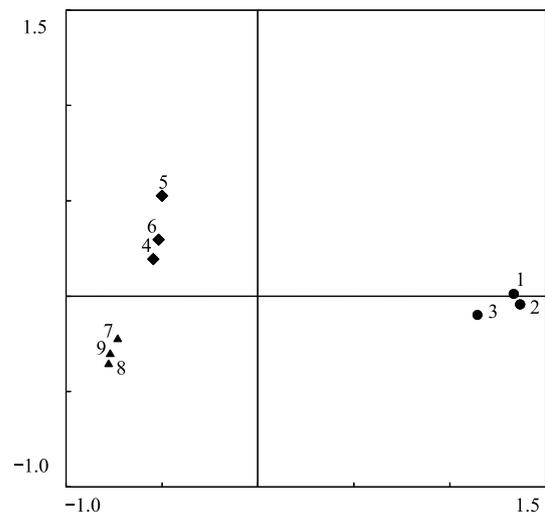


图 5 土壤微生物碳源利用特性的主成分分析 (PCA)

Fig.5 Principal component analysis (PCA) of carbon utilization of microbial community

D1: 1—3, D3: 4—5, D5: 7—9

间段 3 种处理的土壤矿化速率变化基本稳定,直至培养后期开始降低。培养期前的峰值可能是由于,前期碳源的加入产生了激发效应,使易降解可利用的碳迅速释放,促进了微生物的活性,从而使土壤中的矿化作用显著增强;培养中期出现的又一峰值可能是因为:在培养中期,土壤中的有机碳得到活化且微生物对较难分解的有机碳及代谢产物利用能力增强,因此出现另一个呼吸小高峰<sup>[17-20]</sup>。培养后期可能是由于加入的碳源中,易分解和较难分解的有机碳已被微生物利用,开始转向难分解部分,微生物对碳源的利用率降低,从而导致土壤的碳矿化速率开始下降。综上可得,土壤微生物群落多样性的减少会对土壤的碳矿化速率降低造成影响。另外,在测量结束后,对 30 d D1、D3、D5 处理下土壤样品中的累积碳矿化量做差异性分析,结果发现 D1 处理显著高于 D3、D5 处理,D3 处理显著高于 D5 处理( $P < 0.05$ )。因此,土壤微生物多样性的减少会降低土壤的碳矿化强度,减少土壤的累积碳矿化量,对土壤的碳矿化作用造成不利影响。

### 3.2 微生物多样性对碳源利用特征的影响

AWCD 值用以衡量微生物利用不同碳源的整体能力,表征的是样品中微生物整体碳源代谢利用强度,其值越大表明样品具有较高的碳源利用能力,往往也具有较高的微生物丰度<sup>[21]</sup>。在整个 Biolog 实验测量过程中,D1 处理下土壤样品中的 AWCD 值与 D3、D5 处理存在显著性差异,而 D3、D5 处理之间并无显著差异( $P < 0.05$ )。造成该结果的原因可能是在一定限度内,微生物多样性的大小会对土壤碳矿化作用产生影响,而当多样性低于某一程度时,其多样性的大小对土壤的碳矿化强度影响较为微弱。3 种稀释处理下土壤样品 AWCD 值的大小排序为:D1 > D3 > D5,可见与微生物多样性较低的土壤样品相比,微生物多样性较大的土壤样品碳代谢强度更大。造成该结果的原因可能是因为在许多不同物种的存在下,土壤微生物丰富的多样性增强了生态位互补效应并促进了微生物之间的相互作用,促使微生物对碳源的利用能力提高,最终使土壤的碳代谢强度增强<sup>[22]</sup>。由此可见,微生物多样性减少会降低土壤中微生物对碳源的利用能力,进而减弱土壤的碳代谢强度,影响土壤的碳代谢过程。

功能多样性指数是综合反映群落功能的指标,不同的功能多样性指数可以反映土壤微生物群落组成的不同方面,故将所有的指数结合起来可以综合全面的分析土壤微生物群落的功能多样性。从结果看(表 2),梯度稀释处理改变了土壤样品中微生物群落的 McIntash 指数( $U$ )和 Shannon 指数( $H$ ),D1 显著大于 D3、D5 处理,D3 处理显著大于 D5 处理( $P < 0.05$ ),由此可得 D1 土壤中的微生物群落功能多样性优于 D3、D5 处理,D3 处理优于 D5 处理。但对于土壤样品中微生物的 Simpson 指数( $D$ ),3 种处理之间并无显著性差异( $P < 0.05$ ),且 3 种处理的 Simpson 指数( $D$ )大小排序为:D5 > D3 > D1。产生该结果的原因可能是因为多样性的减少不仅不会影响土壤微生物群落当中的优势种,反而会降低种间竞争,使优势种因更加有竞争力而迅速增长,同时优势物种的定殖会加剧种群中其他微生物物种的生境位置丧失,导致次要物种种群流失,这对微生物群落的物种多样性减少也有一定的影响,且该影响产生的结果与本实验结果一致<sup>[23]</sup>。

主成分分析的结果表明,不同梯度稀释处理下土壤样品中的微生物群落功能多样性差异显著( $P < 0.05$ ),PC1 和 PC2 可以把 D1、D3、D5 处理很好地区分开来,其中与 PC1 显著相关的碳源有 19 种,主要为酯类,碳水化合物类和酸类;与 PC2 显著相关的碳源有 6 种,主要为氨基酸类和碳水化合物类。从碳代谢指纹图谱也可发现,D1 处理下土壤样品中的土壤微生物对 31 种碳源的利用能力几乎均大于 D3、D5 处理,其中 D1 处理下土壤微生物对酯类(吐温 40、吐温 80)、醇类(D-甘露醇)、酸类(氨基葡萄糖酸、半乳糖醛酸)、氨基酸类(L-精氨酸、天冬酰胺酸、L-丝氨酸)和胺类(腐胺、N-乙酰基-D-葡萄糖胺)的代谢利用能力显著高于 D3、D5 处理,而对碳水化合物类(环状糊精、肝糖)的代谢利用能力显著低于 D3、D5 处理( $P < 0.05$ )。造成该结果的原因可能是:稀释处理过后,D3、D5 处理土壤样品当中利用碳水化合物类碳源的优势种群迅速定殖,使该土壤样品中微生物群落对碳水化合物类碳源的利用强度大大增强。由此 D3、D5 处理下土壤样品中的细菌群落对碳水化合物类碳源利用强度显著高于 D1 处理( $P < 0.05$ )。总体说来,D1 处理下的土壤微生物群落对 31 种碳源的总体代谢功能大于 D3、D5 处理下土壤微生物群落,土壤微生物群落的多样性减少会对土壤中微生物对碳源的利用强度造成影响。

综上所述,土壤微生物多样性的减少会减弱土壤碳矿化过程,降低土壤对碳源的利用强度,进而减弱土壤的碳代谢强度,土壤的微生物多样性对土壤碳代谢过程有十分重要的影响。

#### 4 结论

(1)梯度稀释处理可以改变土壤微生物群落的多样性,并且预培养时间可以基本消除梯度稀释处理造成的样本间生物量的差异而不影响其多样性。

(2)土壤微生物多样性的降低会使土壤的碳矿化速率减弱,碳源利用强度降低,进而影响土壤的碳代谢过程。

#### 参考文献(References):

- [ 1 ] Mummey D L, Stahl P D, Buyer J S. Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21(3): 251-259.
- [ 2 ] Roger F, Bertilsson S, Langenheder S, Osman O A. Effects of multiple dimensions of bacterial diversity on functioning, stability and multifunctionality. *ECOLOGY*, 2016, 97(10): 2716-2728.
- [ 3 ] Galand P E, Pereira O, Hochart C, Auguet G C, Debroas D. A strong link between marine microbial community composition and function challenges the idea of functional redundancy. *The ISME Journal*, 2018, 12(10): 2470-2478.
- [ 4 ] Dean C, Wardell-Johnson G W, Harper R J. Carbon management of commercial rangelands in Australia: Major pools and fluxes. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2012, 148:44-64.
- [ 5 ] Lochon I, Carrère P, Revaillet S, Juliette M G B. Interactive effects of liming and nitrogen management on carbon mineralization in grassland soils. *Applied Soil Ecology*, 2018, 130:143-148.
- [ 6 ] Gao J, Ouyang H, Lei G, Xu X L, Zhang M X. Effects of temperature, soil moisture, soil type and their interactions on soil carbon mineralization in Zoig alpine wetland, Qinghai-Tibet Plateau. *CHINESE GEOGRAPHICAL SCIENCE*, 2011, 21(1): 27-35.
- [ 7 ] 樊金娟,李丹丹,张心昱,何念鹏,部金凤,王倩,孙晓敏,温学发. 北方温带森林不同海拔梯度土壤碳矿化速率及酶动力学参数温度敏感性. *应用生态学报*, 2016, 27(01): 17-24.
- [ 8 ] 徐洪文,卢妍. 土壤碳矿化及活性有机碳影响因子研究进展. *江苏农业科学*, 2014, 42(10): 4-7.
- [ 9 ] 贾鹏,杜国祯. 生态学的多样性指数:功能与系统发育. *生命科学*, 2014, 26(2):153-157.
- [ 10 ] Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY*, 1996, 28(2): 213-221.
- [ 11 ] 王强,戴九兰,吴大千,余悦,申天琳,王仁卿. 微生物生态研究中基于 BILOG 方法的数据分析. *生态学报*, 2010(3): 817-823.
- [ 12 ] 华建峰,林先贵,蒋倩,张华勇,陈茜,殷云龙. 砷矿区农田土壤微生物群落碳源代谢多样性. *应用生态学报*, 2013, 24(02): 473-480.
- [ 13 ] 李娟,赵秉强,李秀英,姜瑞波. 长期不同施肥制度下几种土壤微生物学特征变化. *植物生态学报*, 2008(4): 891-899.
- [ 14 ] 杜毅飞,方凯凯,王志康,李会科,毛鹏娟,张向旭,王婧. 生草果园土壤微生物群落的碳源利用特征. *环境科学*, 2015, 36(11): 4260-4267.
- [ 15 ] Hol W H G, de Boer W, de Hollander M, Euramae E E, Meisner A, Wim H, Putten V D. Context dependency and saturating effects of loss of rare soil microbes on plant productivity. *FRONTIERS IN PLANT SCIENCE*, 2015, 6: 485.
- [ 16 ] Davis K, Joseph S J, Janssen P H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 2005, 71(2): 826-834.
- [ 17 ] Philippot L, Spor A, Henault C, Bru D, Bizouard F, Jones C M, Sarr A, Maron P A. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME JOURNAL*, 2013, 7(8): 1609-1619.
- [ 18 ] 杨雪玲,陈群,周育智,夏文博,李兴薇,周助,陈孝杨. 不同土地利用类型对土壤有机碳矿化过程的影响. *安徽农业科学*, 2017(4): 110-114.
- [ 19 ] 管元元,张心昱,温学发. 添加葡萄糖对不同深度红壤碳矿化及其温度敏感性的影响. *土壤通报*, 2017, 48(05): 1132-1140.
- [ 20 ] 赵勇. 应用分子生物学技术解析不同处理状况下土壤微生物群落结构的变化[D]. 南京:南京农业大学, 2005.
- [ 21 ] 孙凤霞. 长期施肥对中国 3 种典型土壤微生物量碳氮和微生物碳源利用率的影响[D]. 内蒙古:内蒙古农业大学, 2010.
- [ 22 ] Baumann K, Dignac M, Rumpel C, Bardoux G, Sarr A, Steffens M, Maron P A.. Soil microbial diversity affects soil organic matter decomposition in a silty grassland soil. *BIOGEOCHEMISTRY*, 2013, 114(1-3): 201-212.
- [ 23 ] Nagelkerken I, Goldenberg S U, Coni E O C, Sean D C. Microhabitat change alters abundances of competing species and decreases species richness under ocean acidification. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT*, 2018, 645: 615-622.