广东农业科学 2017，44（11）：68-74
Guangdong Agricultural Sciences doi：10.16768/j.issn.1004-874X.2017.11.011

周玉杰，李建华，张广宇，等 . 橡胶林土壤微生物碳代谢功能多样性及其变化［J］. 广东农业科学，2017，44（11）：68-74.

# 橡胶林土壤微生物碳代谢功能多样性及其变化

周玉杰[1,2]，李建华[1]，张广宇[1]，王 宁[1]，谭文丽[1]，王永鹏[1]，王春燕[1]，曹启民[1]
（1. 海南省农垦科学院，海南 海口 570206；2. 海南省农垦农业科学研究所，海南 海口 570311）

**摘 要：**为了解橡胶林土壤微生物群落功能多样性特征，运用 Biolog-ECO 技术对海南省大丰农场 6 个不同林龄橡胶林割胶前后土壤微生物碳代谢功能多样性进行研究。结果表明：随着培养时间延长，土壤微生物碳代谢活性增强，培养 144 h 后趋于平稳。橡胶林土壤微生物利用羧酸类、氨基酸类、胺类和糖及衍生物类碳源能力较强，而对酚酸类和多聚物类碳源利用能力较差；除未开割的林龄 5 年橡胶林外，林龄 10、13、18、25、30 年橡胶林割胶后（11 月）土壤微生物 AWCD 值、Shannon-Wiener 指数、McIntosh 指数和利用碳源能力均低于割胶前（5 月），说明割胶引起了橡胶林土壤微生物碳代谢功能多样性下降。不同林龄橡胶林土壤微生物 AWCD 值、Shannon-Wiener 指数、McIntosh 指数和利用碳源能力的差异在割胶前后均不同。

**关键词：**橡胶林；土壤微生物；Biolog-ECO 技术；功能多样性
**中图分类号：**S154.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1004-874X（2017）11-0068-07

# Functional diversity of soil microbial carbon metabolism of rubber tree plantations and its changes

ZHOU Yu-jie[1,2], LI Jian-hua[1], ZHANG Guang-yu[1], WANG Ning[1], TAN Wen-li[1],
WANG Yong-peng[1], WANG Chun-yan[1], CAO Qi-min[1]
（1. *Hainan State Farms Academy of Science*, *Haikou* 570206, *China*;
2. *Agricultural Science Research Institute of Hainan State Farms*, *Haikou* 570311, *China*）

**Abstract**: The functional diversity soil microbial carbon metabolism and its changes at different aged rubber tree plantations in Dafeng farm of Hainan province were studied by Biolog-eco technique. The results indicated that: the carbon metabolic activity of soil microbial increased with the extend of culture time, and its tend to was stable after 144 hours. The utilization carbon capacity of soil microbial communities in rubber tree plantations was strong for the sources of carboxylic acids, amino acids, amines and carbohydrates, but the capacity of using phenolic acids and polymers was poor. The average well color development (AWCD), Shannon-wiener index, McIntosh index and capacity of utilization carbon source in tapping after (November) were lower than those in indicated tapping before (May). This that tapping caused the functional diversity of soil microbial carbon metabolism of rubber tree plantations decreased.There were differences of average well color development (AWCD), Shannon-wiener index, McIntosh index and capacity of utilization carbon source at different ages of rubber tree plantations in tapping before and after.

**Key words**: rubber tree plantation; soil microbial; Biolog-ECO technique; functional diversity

收稿日期：2017-07-21
基金项目：海南省自然科学基金（317204）；国家现代农业产业技术体系建设专项资金（CARS-34-GW10，CARS-34-ZP3）；海南省重点研发计划项目（ZDYF2016105）；海南耕地改良关键技术研究与示范专项（HNGDhs 2015）；海南农业遥感技术推广应用与示范研究项目（ZDKJ2016021-02-05）
作者简介：周玉杰（1980-），女，博士，助理研究员，E-mail：zhou-yujie@163.com

土壤微生物是土壤的重要组成部分，是生态系统的分解者，它积极参与生态系统中的物质循环和能量流动，在维持生态系统的结构、功能方面起着极其重要的作用，研究土壤微生物群落功能多样性是理解生态系统过程的核心内容之一[1]。随着全球生态系统 $CO_2$ 气体浓度的持续升高，如何减少碳释放及增强固碳能力成为当前人们关注和研究的热点。而土壤是陆地生态系统中最大的碳库，同时也是最活跃的碳库之一，土壤微生物影响着土壤有机碳的转化，是整个生态系统碳循环的“关键”和“动力”[2]，但两者之间的相互作用复杂而微妙，土壤微生物与土壤碳循环以及其他生态服务功能之间的关系及相互作用机制一直以来都是土壤生态学研究的难点和热点。开展土壤微生物碳代谢功能多样性研究，将有利于推进微生物介导的土壤生态系统乃至整个陆地生态系统碳循环机制及其他生态服务功能研究。

我国自 1904 年开始引种橡胶树以来，经过长期的艰苦奋斗，打破了橡胶树种植的传统禁区，形成了海南、云南、广东三大主要植胶区。橡胶树成为我国热带地区的主要经济作物，橡胶林生态系统已成为较大的人工生态系统之一，橡胶林对维持区域生态系统平衡发挥着重要的作用。但我国的第一代橡胶林基本上都是在自然植被的土地上建立起来的，橡胶树作为多年生乔木，在长期大规模替代自然植被背景下，随着时间的不断推移，是否对土壤微生物群落结构和功能产生影响？在实际研究工作当中，土壤生态系统中起关键作用的微生物往往被忽视。

土壤微生物对不同碳源利用能力的差异，是描述土壤微生物群落特征的一个重要指标，土壤微生物群落功能多样性可反映群落总体的动态变化。以往土壤微生物功能多样性的测定方法主要有磷脂脂肪酸法（PLFA）[3]和基于 PCR 的分子生物学分析方法[4]，但这两种方法技术要求高，耗费时间长，实验灵活性较差，又难以在较短时间内进行大量样品处理。基于碳代谢的 Biolog-ECO 技术为微生物群落功能多样性定量研究提供了一种灵敏度高、分辨性强、更加简便快捷的方法，该方法已广泛应用于不同土壤类型、不同植被物种下土壤及不同管理策略下的农业土壤微生物群落功能多样性研究中[5-8]。因此，我们以海南大丰农场 6 个不同林龄橡胶林样地为研究对象，运用 Biolog-ECO 技术对橡胶林土壤微生物群落碳代谢功能多样性进行研究，分析橡胶林土壤微生物群落碳代谢功能多样性在割胶前后的变化，以及对不同林龄橡胶林土壤微生物群落碳代谢功能多样性的差异，为橡胶林土壤生态系统健康提供理论基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　研究区概况

本研究区域位于海南省琼中黎族苗族自治县大丰农场。该区域为热带海洋季风气候，年平均温度 22.8℃，最冷月平均气温为 16～18℃，年平均降雨量 2 278 mm。试验选取林龄 5、10、13、18、25、30 年常规栽培橡胶林作为试验样地，位于 19° 14′～19° 16′ E、109° 44′～109° 45′ N，海拔 175～207 m，每个样地面积 1 $hm^2$。橡胶树栽培品系为 PR107，株行距 3 m×7 m。各样地的立地条件、栽培管理措施和割胶制度基本一致。

### 1.2　土壤样品采集

土壤样品采集时间为割胶前（5 月）和割胶后（11 月）。在每个林龄橡胶林样地内随机选取 5 个采样点，采集 0～20 cm 土层土壤，充分混合，迅速装入样品袋并置于冰块上，土样带回实验室后去掉植物根系和石块，放入 4℃恒温冰箱内低温保存。

### 1.3　土壤微生物功能多样性测定

取样后 48 h 内采用含有 31 种碳源的 Biolog-ECO 微平板培养技术测定土壤微生物群落碳代谢功能多样性。具体方法为：称取新鲜土样 5.00 g，加入 45 mL 无菌水后在摇床上振荡 30 min，然后将土壤样品稀释至 $10^{-3}$，再从中取 150 μL 该悬浮液接种到 Biolog-ECO 微平板的每一个孔中，1 h 内测定第一次吸光值，最后将接种的微平板放在 28℃的恒温培养箱中暗培养 216 h，每隔 24 h 采用 BIOLOG 读数仪

（BIOLOG，Hayward，USA）测定各孔在 750 nm 和 590 nm 波长下的光吸收值。

### 1.4 数据分析

在一定培养时间内 Biolog-ECO 微平板的孔数变化和每孔颜色变化的程度与土壤微生物群落功能密切相关。根据相关研究文献的方法[9]，测试板孔中溶液吸光值平均颜色变化率（AWCD），计算方法为：

$$AWCD=\frac{\sum(C-R)}{n}$$

式中，$C$ 为每个培养基孔的光密度值，$R$ 为对照孔的光密度值，$n$ 为培养基碳源种类数，Biolog-ECO 微平板 $n$ 为 31。

采用培养至 72 h 的 Shannon-Wiener 指数表征土壤中微生物群落多样性，McIntosh 指数表征土壤中微生物群落丰富度。

$$Shannon\text{-}Wiener=\sum(P_i \log P_i)$$

$$McIntosh=\sum n_i 2$$

式中，$P_i$ 为第 $i$ 孔的相对吸光值与所有反应孔相对吸光值总和的比值，即 $P_i=\frac{(C-R)}{\sum(C-R)}$；$n_i$ 为第 $i$ 孔的相对吸光值（$C$-$R$）。

根据有关 Biolog-ECO 微平板培养时间对微生物相关数据分析的影响研究结果[10]，以及本研究中各样地土壤微生物的 AWCD 增长曲线图，多样性指数选择 AWCD 值处于快速增长时（72 h）的数据进行分析。采用 EXCEL2003 计算土壤微生物 AWCD 值及多样性指数，DPS7.05 进行方差分析，SPSS19.0 进行主成分分析，Canoca4.5 软件进行典范对应分析（CCA）。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤微生物 AWCD 值及变化

AWCD 值可作为衡量微生物群落整体活性的有效指标，AWCD 值的变化速率和最终达到值反映了土壤微生物群落利用碳源的能力。AWCD 值越大，表明微生物的碳代谢活性越高，利用碳源的能力越强。培养 0～24 h，各样地土壤微生物 AWCD 值变化均较小，培养 24～72 h 土壤微生物 AWCD 值快速增长，培养 72 h 后增长速度减慢并一直延续到 144 h，培养 144 h 后增长速率趋于平稳（图 1）。

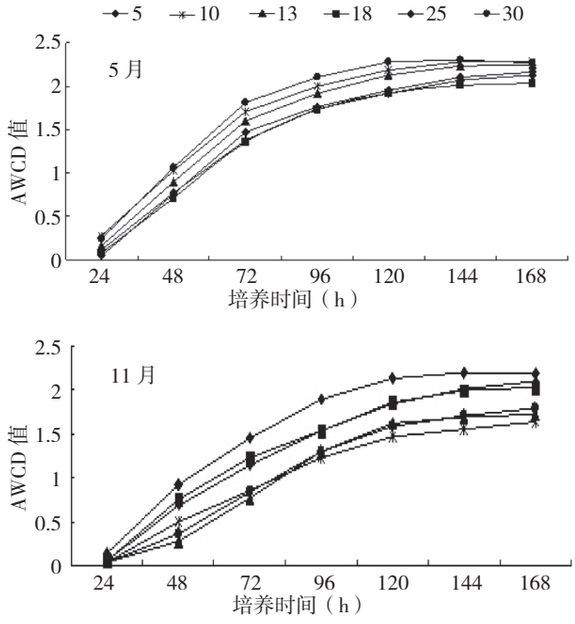



**图 1 橡胶林土壤微生物 AWCD 增长曲线**

培养至 72 h 的 AWCD 值，除林龄 5 年橡胶林割胶前后差异不明显外，林龄 10、13、18、25、30 年橡胶林 5 月份均高于 11 月份。不同林龄橡胶林 AWCD 值在割胶前后的变化不同。割胶前（5 月）林龄 10、30 年橡胶林极显著高于林龄 5、18、25 年橡胶林，林龄 13 年橡胶林极显著高于林龄 18 年橡胶林，其他林龄橡胶林间差异不显著；而割胶后（11 月）AWCD 值以林龄 5 年橡胶林最高，其次为林龄 8 年和 25 年橡胶林，林龄 10、13、30 年橡胶林较低。其中林龄 5 年橡胶林显著高于林龄 25 年橡胶林，极显著高于林龄 10、13、25、30 年橡胶林；林龄 18 年和 25 年橡胶林极显著高于林龄 10、13、30 年橡胶林（图 2）。

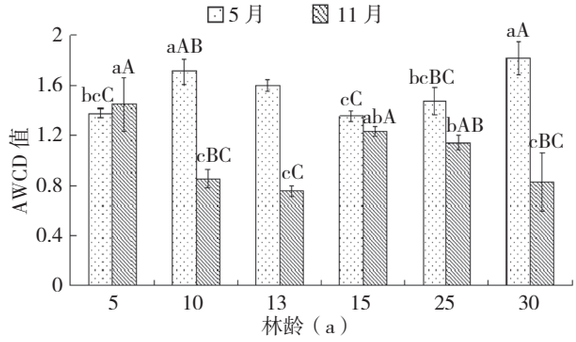



**图 2 不同林龄橡胶林土壤微生物 AWCD 值**

### 2.2 土壤微生物碳代谢功能多样性指数

**2.2.1** 割胶前后土壤微生物群落功能多样性指数变化 割胶前林龄 10、13、30 年橡胶林 Shannon–Wiener 指数极显著高于割胶后，林龄 5、18、25 年橡胶林间割胶前与割胶后的 Shannon–Wiener 指数差异不明显。McIntosh 指数除林龄 5 年橡胶林外，其他林龄橡胶林间割胶前 McIntosh 指数均极显著高于割胶后（图 3）。

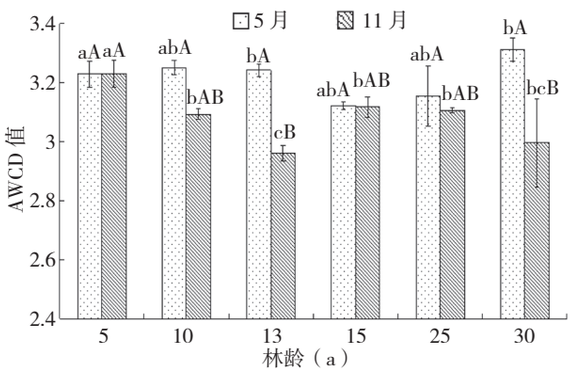



**图 3 不同林龄橡胶林土壤微生物 Shannon–Wiener 指数**

**2.2.2** 不同林龄橡胶林土壤微生物群落功能多样性指数变化 割胶前 Shannon–Wiener 指数以林龄 30 年橡胶林最高，林龄 18 年橡胶林最低，林龄 5、10、13、25 年橡胶林间差异不显著。McIntosh 指数以林龄 30 年橡胶林最高，林龄 5 年橡胶林最低，林龄 10、13、18、25 年橡胶林间差异不显著（图 3、图 4）。

割胶后 Shannon–Wiener 指数以林龄 5 年橡胶林最高，林龄 13 年橡胶林最低，林龄 10、18、25、30 年橡胶林间差异不显著。McIntosh 指数以林龄 5 年橡胶林最高，其次为林龄 18 年和 25 年橡胶林，林龄 10、13、30 年橡胶林较低（图 3、图 4）。

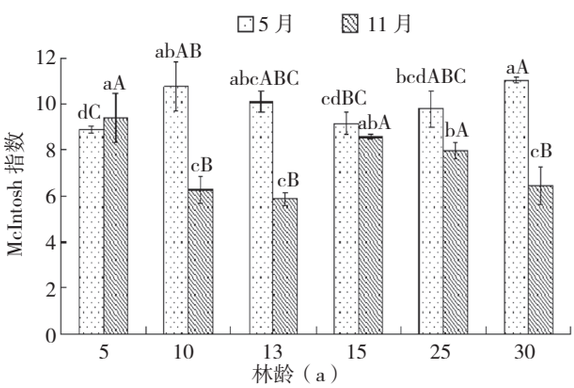
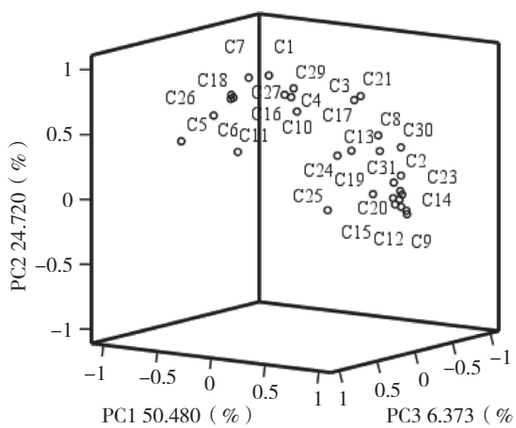



**图 4 不同林龄橡胶林土壤微生物 McIntosh 指数**

### 2.3 橡胶林土壤微生物对碳源的利用及变化

**2.3.1** 橡胶林土壤微生物对碳源的利用 对 31 种碳源的利用情况进行主成分分析，其中前 3 个主成分累积贡献率为 86.077%，说明主成分 1、2、3 是变异的主要来源。3 个主成分的特征值分别为 15.649、7.663、1.976，贡献率分别为 50.480%、4.720% 和 6.373%（图 5）。




C1：β–甲基–D 葡萄糖苷；C2：D–半乳糖酸–r–内酯；C3：D–纤维二糖；C4：α–D 乳糖；C5：D–木糖；C6：赤藓糖醇；C7：1–磷酸–葡萄糖；C8：D–甘露醇；C9：N–乙酰 D–葡萄糖胺；C10：D–α–磷酸甘油；C11：D–半乳糖醛酸；C12：D–葡糖胺酸；C13：L–精氨酸；C14：L–天冬氨酸；C15：L–苯丙氨酸；C16：L–丝氨酸；C17：L–苏氨酸；C18：甘氨酰–L–谷氨酸；C19：R–羟丁酸；C20：衣康酸；C21：α–丁酮酸；C22：D–苹果酸；C23：丙酮羧甲酯；C24：4–羟基苯甲酸；C25：2–羟基苯甲酸；C26：肝糖；C27：环式糊精；C28：吐温–40；C29：吐温 80；C30：苯乙胺；C31：腐胺。图 6 同

**图 5 橡胶林土壤微生物利用碳源的主成分分析**

通过计算 31 种碳源的综合得分，可以看出橡胶林土壤微生物群落利用 D–甘露醇、腐胺、苯乙胺、R–羟丁酸及衣康酸能力较强（综合得分＞ 0.5），而对环式糊精、吐温 80、甘氨酰–L–谷氨酸、α–D 乳糖、肝糖、D–木糖和赤藓糖醇利用能力较差，综合得分低于平均水平（图 6）。

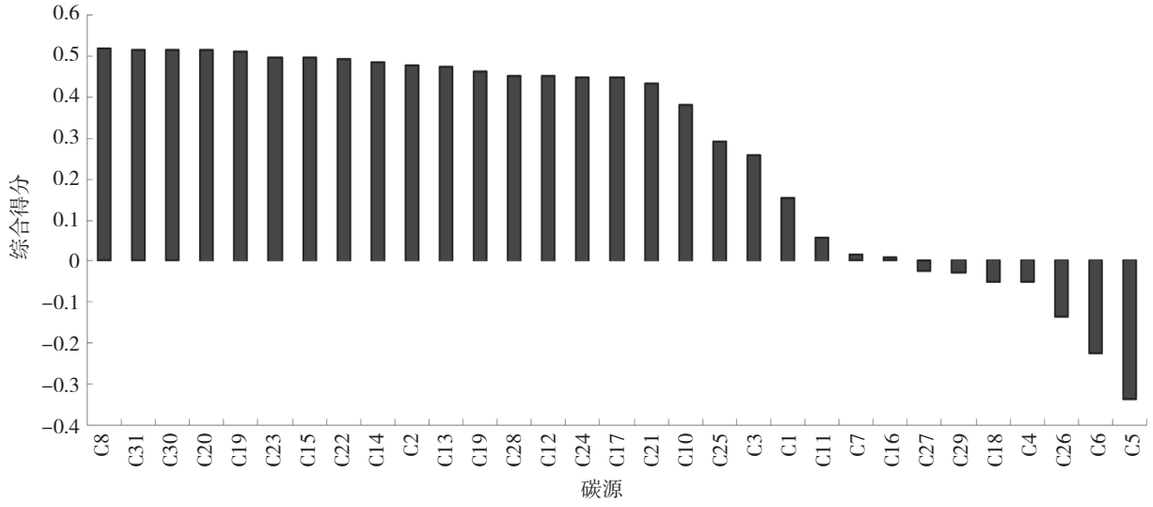
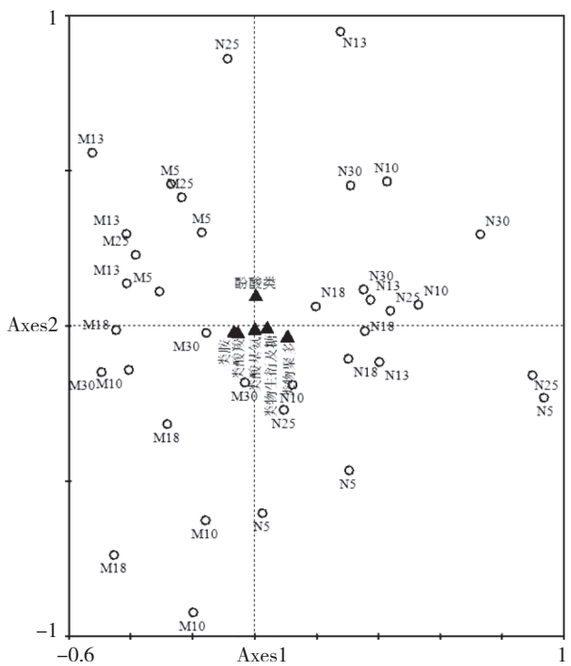



**图 6　橡胶林土壤微生物利用 31 种碳源的综合得分**

土壤微生物对不同类型碳源的利用能力程度，有助于更全面地了解土壤微生物群落功能特性[11-12]。将 Biolog-ECO 微平板上的 31 种碳分为糖及衍生物类（Carbohydrates）、氨基酸类（Amino acids）、羧酸类（Carboxylic acids）、酚酸类（Phenolic acids）、多聚物类（Polymers）和胺类（Amines）六大类型[13]。CCA 分析表明，橡胶人工林土壤微生物群落对胺类、羧酸类、氨基酸类和糖及衍生物类碳源利用能力较强，而对酚酸类和多聚物类碳源的利用能力较差（图 7）。

**2.3.2**　*橡胶林土壤微生物利用碳源变化*　通过主成分分析，计算橡胶林土壤微生物群落利用碳能力的综合得分，可以看出割胶前橡胶林土壤微生物群落利用碳的能力要高于割胶后。不同林龄橡胶林土壤微生物群落在割胶前后利用碳源的变化也不同，割胶前为林龄 30 年＞ 10 年＞ 25 年＞ 13 年＞ 18 年＞ 5 年，而割胶后为林龄 5 年＞ 18 年＞ 25 年＞ 30 年＞ 13 年＞ 10 年（图 8）。




M：割胶前（5 月）；N：割胶后（11 月）。图 8 同

**图 7　橡胶林土壤微生物利用碳源类型 CCA 排序**

## 3　结论与讨论

### 3.1　橡胶林土壤微生物活性及利用碳源类型

在培养 0 ~ 168 h 内，橡胶林土壤微生物 AWCD 值随着培养时间延长而逐渐升高。这与其他学者的研究结果一致，即 AWCD 值随着培养时间的延续呈现出微生物常规生长曲线[14-15]。

橡胶林土壤微生物群落利用 D- 甘露醇、腐胺、苯乙胺、R- 羟丁酸及衣康酸的能力较强，而利用环式糊精、吐温 80、甘氨酰 -L- 谷氨酸、α -D 乳糖、肝糖、D- 木糖和赤藓糖醇的能力较差。总的来看，橡胶林土壤微生物群落对羧酸类、氨基酸类、胺类和糖及衍生物类利用能力较强，而对酚酸类和多聚物类的利用能力较差。这

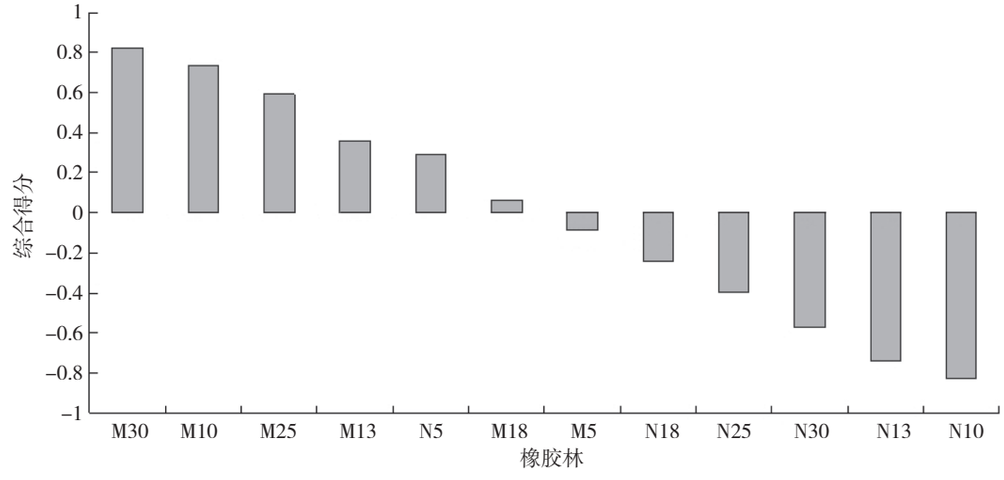



**图 8　橡胶林土壤微生物利用碳源的综合得分**

与其他天然次生林和人工林利用碳的类型基本一致，以往研究即得出土壤微生物利用率最高的是糖类、氨基酸类和羧酸[16-17]，并认为糖类、氨基酸类和羧酸类是区分土壤微生物群落功能多样性最主要和最敏感的碳源[18]。

### 3.2　割胶对橡胶林土壤微生物碳代谢功能多样性的影响

除林龄 5 年橡胶林外，林龄 10、13、18、25、30 年橡胶林割胶前的 AWCD 值均高于割胶后；割胶前 Shannon-Wiener 指数和 McIntosh 指数均以林龄 30 年橡胶林最高；割胶后 Shannon-Wiener 指数和 McIntosh 指数均以林龄 5 年橡胶林最高；不同林龄橡胶林土壤微生物群落利用碳能力割胶前为林龄 30 年＞ 10 年＞ 25 年＞ 13 年＞ 18 年＞ 5 年，而割胶后为林龄 5 年＞ 18 年＞ 25 年＞ 30 年＞ 13 年＞ 10 年。说明割胶前橡胶林土壤微生物 AWCD 值、多样性指数和碳源利用能力要高于割胶后，割胶导致处于胶乳生产期的林龄 10、13、18、25、30 年橡胶林土壤微生物碳代谢功能多样性下降，而林龄 5 年橡胶林由于尚未割胶，其土壤微生物功能多样性未受到割胶的影响，因此在割胶后林龄 5 年橡胶林的土壤微生物功能多样性要高于其他林龄橡胶林。割胶降低了土壤微生物群落的活性和碳代谢功能多样性，其可能与割胶致使土壤养分大量流失有关，以往研究即认为土壤微生物群落功能多样性与土壤养分密切相关[19-21]。

土壤微生物的活性和功能多样性降低是反映土壤生态系统质量和人类活动胁迫效应的重要生态指标[22]。健康土壤是橡胶树正常生长的保证，而土壤微生物多样性则是维持土壤健康和土壤质量的关键。因此，提高土壤微生物群落的活性和功能多样性，可以提高土壤肥力和结构，从而提高橡胶林的经济效益。建议根据不同林龄橡胶林的特点进行胶林土壤培肥改良，为土壤微生物创造良好的生长环境，以改善橡胶林土壤微生物群落的结构和功能，增强橡胶林的可持续生产能力；同时重视橡胶林土壤微生物功能多样性的研究，揭示橡胶人工林土壤生态系统“植物—土壤—微生物”三者之间的关系，为橡胶林生态系统健康以及土壤生态系统碳循环机制研究提供理论支撑。

**参考文献：**

[1]　张其水，俞新妥. 杉木连栽林地营造混交林后土壤微生物的季节性动态研究[J]. 生态学报，1990，10(2)：121-126.

[2]　郑华，欧阳志云，方志国，等. Biolog-ECO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.

[3]　宋风雅，梁鹏，何其光，等. 应用PCR-RFLP技术分析橡胶林土壤真菌种群动态变化[J]. 西南农业学报，2014，27(6)：2469-2477.

[4]　谭宏伟，杨尚东，吴俊，等. 红壤区桉树人工林与不同林分土壤微生物活性及细菌多样性的

比较[J]. 土壤学报, 2015, 51(3): 575–584.

[5] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community–level sole–carbon source utilization [J]. Applied and environmental microbiology, 1991, 57(8): 2351–2359.

[6] Zak J C, Willing M R, Moorhead D L, et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26(9): 1101–1108.

[7] 胡可, 王利宾. BIOLOG微平板技术在土壤微生态研究中的应用[J]. 土壤通报, 2007, 38(4): 819–821.

[8] 董立国, 蒋齐, 蔡进军, 等. 基于Biolog–ECO技术不同退耕年限苜蓿地土壤微生物功能多样性分析[J]. 干旱区研究, 2011, 28(4): 630–637.

[9] 邓晓, 李勤奋, 侯宪文, 等. 香蕉枯萎病患病与健康蕉园土壤微生物群落功能多样性的比较研究[J]. 土壤通报, 2013, 44 (2): 355–362.

[10] 贾夏, 董岁明, 周春娟. 微生物生态研究中Biolog Eco微平板培养时间对分析结果的影响[J]. 应用基础与工程科学学报, 2013, 21(1): 10–19.

[11] Choi K H.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.

[12] Preston–Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole–carbon–source utilization profiles–a critique[J]. Fems Microbiology Ecology, 2002, 42(1): 1–14.

[13] 孔滨, 杨秀娟. Biolog生态板的应用原理及碳源构成[J]. 绿色科技, 2011(7): 231–234.

[14] 王洪媛, 管华诗, 江晓路. 微生物生态学中分子生物学方法及T–RFLP技术研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(8): 42–47.

[15] 范瑞英, 杨小燕, 王恩姮, 等. 黑土区不同林龄落叶松人工林土壤微生物群落功能多样性的对比研究[J]. 北京林业大学学报, 2013, 35(2): 63–68.

[16] 胡婵娟, 傅伯杰, 刘国华, 等. 黄土丘陵沟壑区典型人工林下土壤微生物功能多样性[J]. 生态学报, 2009, 29(2): 727–733.

[17] 李小容, 韦金玉, 陈云, 等. 海南岛不同林龄的木麻黄林地土壤微生物的功能多样性[J]. 植物生态学报, 2014, 38(6): 608–618.

[18] 郑华, 陈法霖, 欧阳志云, 等. 不同森林土壤微生物群落对Biolog–GN板碳源的利用[J]. 环境科学, 2007, 28(5): 1126–1130.

[19] 韩世忠, 高人, 李爱萍, 等. 中亚热带地区两种森林植被类型土壤微生物群落结构[J]. 应用生态学报, 2015, 26(7): 2151–2158.

[20] 徐文娴, 赵从举, 朱敏捷, 等. 海南岛桉树人工林土壤微生物功能多样性特征[J]. 广东农业科学, 2016, 43(7): 65–72.

[21] 字洪标, 刘敏, 阿的鲁骥, 等. 三江源区不同建植年限对人工草地土壤微生物功能多样性的影响. 生态学杂志, 2017, 36( 4) : 978–987.

[22] 李智卫, 王超, 陈伟, 等. 不同树龄苹果园土壤微生物生态特征研究[J]. 土壤通报, 2011, 42(2): 302–306.

(责任编辑　杨贤智)