

王帅,王洁,骆云中,等. 农业旅游活动对岩溶地区土壤微生物群落结构的影响:以重庆市铜梁区黄桷门奇彩梦园为例[J]. 中国岩溶, 2015, 34(6): 607-615.

DOI:10.11932/karst20150610

# 农业旅游活动对岩溶地区土壤微生物群落结构的影响

## ——以重庆市铜梁区黄桷门奇彩梦园为例

王帅<sup>1,2</sup>, 王洁<sup>1,3</sup>, 骆云中<sup>1</sup>, 谢德体<sup>1,2</sup>, 高明<sup>1,2</sup>, 赵振洋<sup>4</sup>, 程杨<sup>1</sup>, 蔡洋洋<sup>1</sup>

(1. 西南大学资源环境学院, 重庆 400716; 2. 三峡库区农业面源污染控制研究中心, 重庆 400716;

3. 中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008; 4. 西南大学地理科学学院, 重庆 400715)

**摘要:**开展农业旅游活动对土壤生态环境影响的专题研究,可为休闲农业旅游区的合理开发和有效保护提供理论基础,为评估未来农业旅游活动对环境的影响提供科学依据。本文以重庆市铜梁区黄桷门奇彩梦园为例,通过对游步道两侧的土壤进行调查采样,并运用磷脂脂肪酸(PLFAs)谱图分析法,研究了土壤微生物群落组成、受农业旅游活动影响的距离及其受冲击程度。结果显示:微生物群落结构受冲击范围在4 m以内( $p < 0.01$ ),微生物生物量在土壤中的分布随着离游径的距离变小而明显下降趋势;在受农业旅游活动冲击的范围内细菌、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性菌、真菌的生物量随着离游径的距离变小而明显下降,放线菌在部分样区表现出该规律,原生动物无此规律;对所测 PLFAs 数据进行多样性和冲击指数分析后得出假单胞菌(16:0)受影响程度最大,节杆菌(17:0)受影响程度最小,受冲击程度大小与该微生物在生物总量中所占的比重呈正相关;农业旅游活动对土壤微生物群落结构造成了破坏,土壤生态系统的稳定性已受到冲击。

**关键词:**岩溶地区;农业旅游活动;土壤微生物群落结构

中图分类号:S154.3

文献标识码:A

文章编号:1001-4810(2015)06-0607-09

## 0 引言

农业旅游活动对生态环境的影响日益凸显,开始为国内外学者所关注。土壤作为生态环境中最重要的一部分,对维持生态系统的稳定有极其重要的作用,土壤环境的好坏也直接影响着植物、动物、微生物等的生存环境。农业旅游活动带来的人为践踏、旅游垃圾、汽车尾气、建筑垃圾等对土壤的干扰除了造成土壤板结、地被植物减少、土壤的理化指标和重金属含量等隐性指标发生变化外,还会对微生物群落和结构等造成破坏,后者对土壤环境变化的响应十分敏锐。当前国内外关于旅游活动对土壤微生物的影响研究较少。在国内,谭周进等<sup>[1]</sup>研究了旅游践踏对张家界森林公园土壤微生物碳氮磷含量的影响,还有学者研究了海拔和季节变化对旅游景区土壤微生物

的影响<sup>[2-3]</sup>,以及作物种类、种植制度和农药施用对土壤微生物群落的影响<sup>[4]</sup>;国外的研究将土壤微生物群落的结构和功能多样性影响因子分为自然因子和人为因子两大类,微生物组成对很多环境因子如植被、土壤质地、土壤 pH 值和地理方位等十分敏感,在土壤质地和功能变化过程中可以起到良好的指示作用<sup>[5-8]</sup>。农业旅游活动对岩溶地区土壤生态环境影响的研究还鲜有报道。本文以重庆市铜梁区奇彩梦园农业旅游区为例,通过野外调查和室内实验对微生物的磷脂脂肪酸 PLFAs 的变化率进行分析,运用环境胁迫指数和冲击指数模型评价微生物对农业旅游活动胁迫的响应,以揭示农业旅游活动对岩溶地区土壤微生物群落结构的影响,为选择起主导作用的功能微生物进行环境修复及岩溶地区的土壤生态安全和环境保护工作提供依据。

基金项目:国家“乡村土地流转与资源整合关键技术与示范”课题(2013BAJ11B02);国家十二五科技支撑项目(2012BAD141318)

第一作者简介:王帅(1989-),男,主要从事土壤生态学、土地资源学研究。E-mail:soloist-ws@qq.com。

收稿日期:2015-05-04

## 1 研究区和研究方法

### 1.1 研究区概况

重庆市铜梁区黄桷门奇彩梦园(简称为“奇彩梦园”)位于重庆市铜梁区南城街道黄门村,海拔在 257~315 m,属亚热带季风湿润气候。园区结合周边巴岳山、玄天湖和温泉度假区等优势资源形成了个性独

特的农业旅游区。园区占地面积约 200 hm<sup>2</sup>,由文艺表演区、风情小镇、花海景区、四季果蔬采摘区以及森林旅游度假区等 5 大板块组成。2014 年 9 月开园首日即迎来 3 万游客。园区地处巴岳山背斜岩溶槽谷地段,浅丘宽谷地貌,成土母质主要为碳酸盐岩,以山地黄壤为主,其次还有山地黄棕壤,土壤 pH 平均值为 6.3,植被覆盖度较低,有水土流失现象(图 1)。



图 1 研究区所在位置示意图(图件来源《中国国家地理》2014 年 01 期)

Fig. 1 Schematic map showing the location of the study area

### 1.2 样品采集和分析方法

农业旅游活动以游览观光为主,游憩活动主要沿游道和景点展开。Andres 研究表明,旅游影响成核状扩散,人流量最集中的景点影响距离向外扩达 20 m<sup>[9]</sup>。游径的存在必然会对其边缘的环境造成影响,国内诸多学者把距离游径 5 m 以内作为研究旅游活动对土壤生态影响的范围<sup>[10-12]</sup>。奇彩梦园自开园至今游客量已超过 150 万人次,日流量 4 110 人,周末接待游客最高达 5 万余人次。以园区人流量和样点的代表性为依据,同时考虑可操作性问题,于 2015 年 1 月 12 日在奇彩梦园主要观赏路线旁选定 4 个样点(表 1)进行取样,每个样点设置 2 个平行采样区,每个样区在主要游道的垂直方向连续设置 5 个(1 m×1 m)小样区,同一个样区微环境基本一致,并选择距离游道约 10 m 的无游人践踏干扰且质地相同的地

段作为对照区(CK)。在每个小样区内用 5 点取样法采集 0~20 cm 表层土样带回实验室作分析(样区设计见图 2)。1、4 样点位于 2.0 m 宽石板游步道两侧,地表有杂草,2、3 样点处于 3.5 m 宽砼公路两侧,土壤裸露,仅有零星杂草生长。

### 1.3 PLFAs 分析法

测量土壤微生物的土样置于-80℃冰箱内,应用改进过的 PLFAs(磷脂脂肪酸)谱图分析法对土样进行分析。实验前土壤过 2 mm 筛,检出植物根系和碎石等杂物,称取相当于 8 g 干重的土壤,离心 3 h 后加入 5 mL 磷酸缓冲液,再加入 6 mL 三氯甲烷,12 mL 甲醇,振荡 2 h(285~320 R, 26℃),离心 10 min(3 500 rpm, 25℃)提取上层离心液,然后加入 12 mL CHCl<sub>3</sub>, 12 mL 缓冲液,振荡 2 min 静置过夜。吸取下层溶液 30~32℃水浴氮气浓缩吹干,用 2 份

500 微升 CHCl<sub>3</sub>, 转移浓缩磷脂到已加入 3 mL CHCl<sub>3</sub> 的萃取小柱, 然后依次加入 5 mL CHCl<sub>3</sub> 2 次 5 mL 丙酮, 再用 1 mL 甲醇清洗小柱底部, 向萃取小柱加 5 mL 甲醇收集淋洗液。32 °C 水浴氮气浓缩吹干, 加入 1 mL 1 : 1 的甲醇 : 甲苯, 1 mL 0.2 M KOH 溶液, 摇匀, 37 °C 水浴加热 15 min, 加入 0.3 mL 1M 醋酸, 2 mL 己烷, 2 mL 超纯水低速 (120~200 R) 振荡 10 min, 上层己烷溶液转移至试管, 氮气吹干, 用 200 uL 正己烷溶液多次清洗试管底部及壁部, 转移至专用内衬管, 上机检测。

检测条件: 用 Agilent 6850 气象色谱仪 (FID 检测器) 分析 PLFA 的成分。色谱条件为: HP-5 柱 (25.0 mL × 200 um × 0.33 um), 进样量 1 uL, 分流

比 10 : 1, 载气 (H<sub>2</sub>), 尾吹气高纯 N<sub>2</sub> 助燃气空气, 流速 0.8 mL/min。汽化室温度 250 °C, 检测器温度 300 °C, 柱前压 10.0 psi (1 psi = 6.895 kpa)。二阶程序升高柱温: 170 °C 起始, 5 °C/min 升至 260 °C, 然后 40 °C/min 升温至 310 °C, 维持 15 min。各成分脂肪酸通过 MIDI Sherlock 微生物鉴定系统 (Version 6.1, MIDI, Inc., Newark, DE) 进行, 标准品购于美国 MIDI 公司的 C9-C20 的脂肪酸甲酯, PLFA 用 C19:0 做内标换算 PLFA 的绝对含量。所有测定结果均为 2 次重复的平均值。

利用 Microsoft Excel 2007、SPSS 19.0、Sigma-plot 12.5 进行多重比较分析, 差异显著性分析和图表绘制。其中磷脂脂肪酸的代表生物见表 2。

表 1 土壤样点经纬度

Table 1 Latitude and longitude of soil sample

| 样点编号 | 样点经纬度                            | 样点编号 | 样点经纬度                            | 样点编号 | 样点经纬度                            | 样点编号 | 样点经纬度                            |
|------|----------------------------------|------|----------------------------------|------|----------------------------------|------|----------------------------------|
| 1    | N 29°47'52.96"<br>E106°02'38.45" | 2    | N 29°47'44.75"<br>E106°02'01.72" | 3    | N 29°47'44.84"<br>E106°02'24.66" | 4    | N 29°47'43.76"<br>E106°02'34.83" |

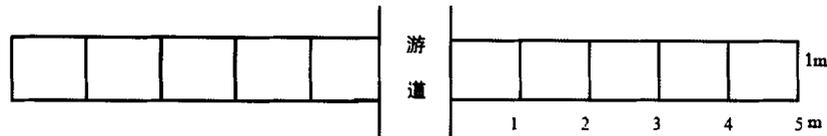


图 2 调查样区设计

Fig. 2 Design of the survey sample area

表 2 磷脂脂肪酸的代表生物

Table 2 Biomarkers of some microbial groups

| 微生物类型  | PLFAs  | 文献       |
|--------|--|----------|
| 细菌     | i14:0, i15:0, i16:0, a16:0, i16:1 G, 16:1 2OH, i17:0, a17:0, cy17:0, cy19:0w8c, 11:0, 12:0, 15:0, 20:0, 16:1w9c, 16:1w5c, 18:0 | [13-15]  |
| 革兰氏阴性菌 | a16:0, 16:1 2OH, 16:1w5c, 16:1w9c, cy17:0, 18:0, 18:1w9c, cy19:0w8c  | [16-18]  |
| 革兰氏阳性菌 | i17:0, a17:0, i16:0, i16:1G, 16:1 2OH, a16:0, a15:0, i15:0,  | [19, 16] |
| 真菌     | 18:1w9c, 18:3w6c(6, 9, 12)   | [9, 20]  |
| 放线菌    | 10Me17:0, 10Me18:0   | [13, 17] |
| 原生动物   | 18:3w6c(6, 9, 12), 20:4w6. 9, 12, 15c  | [21]     |

1.4 农业活动对土壤微生物群落的影响分析

通过以下公式和模型揭示农业旅游活动对土壤微生物群落结构的影响。

(1) 土壤微生物特异性脂肪酸的变化率用来表示各样点相对于对照区的变化情况:

$$R = \frac{P_i - P_o}{P_o} \times 100\%$$

式中, R 表示第 i 种微生物 PLFA 的变化率; P<sub>i</sub> 表示第 i 种微生物 PLFA 的测定值; P<sub>o</sub> 表示第 i 种微生物 PLFA 的对照值<sup>[22]</sup>。

(2)土壤微生物受环境胁迫程度计算公式为:

$$SRI = iso/anteiso$$

式中, SRI 为土壤微生物受环境胁迫指数; iso 表示样点 iso 特征性脂肪酸绝对含量总值; anteiso 表示样点 anteiso 特征性脂肪酸绝对含量总值。

(3)改进的生态学均匀度指数模型用来表征特异性脂肪酸受环境胁迫程度, 计算公式为<sup>[23]</sup>:

$$H = - \sum P_i \ln P_i / \ln S$$

式中, H 为特异性脂肪酸(PLFA)受冲击指数;  $P_i$  为种 i 的个体数与群落中所有物种个体总数之比; S 表示样点群落中的总物种数。冲击指数(H)值越大其特异性脂肪酸受农业游憩活动的影响程度就越大。

(4)土壤微生物受农业旅游影响距离

运用多重比较法确定微生物受农业旅游活动影响的距离。当小样区与前一个小样区相比差异显著, 与后一个小样区差异不明显时, 且之后的样方均无显著差异时, 该小样区所在的距离即为旅游活动影响的最大距离。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤微生物生物量及结构变化

#### 2.1.1 PLFAs 生物标记量变化

由表 3 可看出, PLFAs 生物量随着离游径的距离变小呈递减的趋势, 尤其在游径 2 m 左右 PLFAs 的生物量急剧下降, 生物标记种数也有同样的变化规律, 此现象表明农业旅游活动对土壤微生物生物量影

响明显。由表 4 可看出, 受农业旅游活动冲击明显的异性磷脂脂肪酸共 24 种, 其含量占总量的 94.62%, 表征细菌、革兰氏阴性细菌、革兰氏阳性细菌、真菌、放线菌以及原生动物的 PLFAs 绝对含量分别占脂肪酸总量的 45.05%, 30.10%, 30.81%, 7.50%, 4.67% 和 0.91%。受农业旅游活动影响显著的小样区与对照区(CK)相比细菌变化率在 18%~57%之间, 真菌变化率在 19%~100%, 放线菌变化率在 23%~100%。

#### 2.1.2 PLFAs 生物标记分布结构变化

从土壤中提取到的 PLFAs 生物标记指示着不同类群的微生物, 包括细菌、真菌、放线菌、原生生物(表 4)。受农业旅游影响的 PLFAs 生物标记在土壤的分布可分为 4 种类型: (1)生物标记数量小, 在各样区中分布不完全的物种, 如 17:0 节杆菌, 在 32 个小样区中总绝对含量为 13.632 nmol, 频次和生物量随着离游径的距离变小呈现减少趋势; (2)生物标记数量小, 在各处理中分布为完全分布的物种, 如 14:0 细菌, 但在 48 个小样区中皆有分布, 其绝对含量总和为 63.584 nmol, 生物量随着离游径的距离变小呈现减少趋势; (3)生物标记数量大, 在各处理中分布不完全的物种, 如 18:0 10Me 放线菌, 仅在 40 个小样区中分布, 其绝对含量总和为 131.600 nmol, 频次和生物量随离游径的变小而呈现减少趋势; (4)生物标记数量大, 在各处理中的分布为完全分布的物种, 如 16:0 细菌, 在 48 个小样区中皆有分布, 总绝对含量为 676.136 nmol, 生物量随着离游径的距离变小呈现减少趋势(表 3)。

表 3 代表性微生物出现频次情况

Table 3 Representative microorganism frequency of occurrence situation

| 微生物菌种         | 频次 / 生物量(nmol) |             |             |             |             |             |
|---------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|               | 小样区 1          | 小样区 2       | 小样区 3       | 小样区 4       | 小样区 5       | CK          |
| 节杆菌 17:0      | 2 / 0.813      | 6 / 0.924 2 | 6 / 2.622   | 6 / 2.958   | 8 / 3.062   | 8 / 3.254   |
| 细菌 14:0       | 8 / 4.012      | 8 / 4.970   | 8 / 7.918   | 8 / 7.614   | 8 / 18.586  | 8 / 20.485  |
| 放线菌 18:0 10Me | 2 / 3.479      | 6 / 21.156  | 8 / 24.072  | 8 / 24.893  | 8 / 28.013  | 8 / 29.989  |
| 假单胞菌 16:0     | 8 / 72.217     | 8 / 90.931  | 8 / 119.441 | 8 / 135.774 | 8 / 120.037 | 8 / 137.735 |

### 2.2 土壤微生物受冲击特征分析

由表 4 可看出受农业旅游冲击明显的特异性磷脂脂肪酸共 24 种, PLFAs 所指示的微生物的冲击指数存在显著差异, 针对农业旅游冲击较大的细菌而言, 如: 假单胞菌(16:0), 好氧细菌 G+(15:0 iso, 16:0 iso)以及伯克霍尔德细菌 G-(19:0 cyclo w8c)在检测的 48 个土样中均出现过, PLFAs 值总和以及所

占的百分比比较高; 假单胞杆菌(18:1 w7c), 蓝细菌(18:2 w6, 9c)在测试样品中出现频率、生物量所占比重较高, 受冲击程度中等; 对于受冲击较低的微生物真菌[18:3 w6c(6, 9, 12)], 原生动物(20:4 w6, 9, 12, 15c)等在测试的 48 个土样中出现频次、PLFAs 值总和以及所占的比重较低。

表 4 土壤微生物群落磷脂脂肪酸(PLFAs)受农业旅游冲击指数

Table 4 Agricultural tourism impact index of the PLFAs biomarkers of the microbial community in the soils

| 菌种 Species | 峰名 Peak Name         | 频次 Freq. | PLFAs 值总和/nmol | 百分比/% | H 冲击值数 |
|------------|----------------------|----------|----------------|-------|--------|
| 假单胞菌       | 16:0                 | 48       | 676.136        | 15.82 | 0.519  |
| 好氧细菌 G+    | 15:0 iso             | 48       | 438.448        | 10.26 | 0.418  |
| 伯克霍尔德细菌 G- | 19:0 cyclo w8c       | 48       | 356.448        | 8.34  | 0.378  |
| 微生物        | 17:1 iso w9c         | 48       | 282.144        | 6.60  | 0.321  |
| 真菌         | 18:1 w9c             | 48       | 303.48         | 7.10  | 0.311  |
| 好氧细菌 G+    | 16:0 iso             | 48       | 247.472        | 5.79  | 0.301  |
| 好氧细菌 G+    | 15:0 anteiso         | 48       | 175.904        | 4.12  | 0.247  |
| 雷尔氏细菌 G+   | 16:1 2OH             | 48       | 162.272        | 3.80  | 0.247  |
| 嗜热解氢杆菌 G-  | 18:0                 | 48       | 181.632        | 4.25  | 0.242  |
| 好氧细菌 G+    | 17:0 iso             | 48       | 162.128        | 3.79  | 0.240  |
| 假单胞杆菌      | 18:1 w7c             | 42       | 199.928        | 4.68  | 0.198  |
| 放线菌        | 18:0 10-methyl, TBSA | 40       | 131.600        | 3.08  | 0.153  |
| 细菌         | 16:1 w7c             | 39       | 129.056        | 3.02  | 0.149  |
| 蓝细菌        | 18:2 w6,9c           | 42       | 130.408        | 3.05  | 0.144  |
| 甲烷氧化细菌 G-  | 16:1 w5c             | 40       | 110.616        | 2.59  | 0.136  |
| 厌氧细菌 G-    | 17:0 cyclo           | 40       | 75.392         | 1.76  | 0.104  |
| 放线菌        | 17:0 10-methyl       | 42       | 57.392         | 1.34  | 0.086  |
| 好氧细菌 G+    | 17:0 anteiso         | 40       | 59.536         | 1.39  | 0.085  |
| 细菌         | 14:0                 | 48       | 63.584         | 1.49  | 0.080  |
| 好氧细菌 G+    | 14:0 iso             | 30       | 22.416         | 0.52  | 0.056  |
| 细菌         | 16:1 w9c             | 28       | 27.400         | 0.64  | 0.041  |
| 原生动动物      | 20:4 w6,9,12,15c     | 22       | 24.368         | 0.57  | 0.033  |
| 真菌         | 18:3 w6c (6,9,12)    | 24       | 12.344         | 0.29  | 0.027  |
| 节杆菌        | 17:0                 | 32       | 13.632         | 0.32  | 0.023  |
| 细菌         | 12:0                 | 7        | 9.104          | 0.21  | ?      |
| 细菌         | 13:0                 | 8        | 5.392          | 0.13  | ?      |
| 原生动动物      | 20:0                 | 5        | 4.824          | 0.11  | ?      |
| 微生物        | 11:0 2OH             | 8        | 41.224         | 0.96  | ?      |
| 微生物        | 11:0 3OH             | 7        | 7.560          | 0.18  | ?      |
| 微生物        | 11:0 anteiso         | 8        | 7.888          | 0.18  | ?      |
| 微生物        | 11:0 iso 3OH         | 6        | 10.680         | 0.25  | ?      |
| 细菌 G-      | 12:0 3OH             | 7        | 3.856          | 0.09  | ?      |
| 微生物        | 12:0 anteiso         | 8        | 8.984          | 0.21  | ?      |
| 微生物        | 12:0 iso             | 7        | 38.304         | 0.90  | ?      |
| 微生物        | 12:1 at 11-12        | 13       | 55.224         | 1.29  | ?      |
| 细菌         | 13:0 iso             | 7        | 3.160          | 0.07  | ?      |
| 微生物        | 14:1 w5c             | 13       | 13.008         | 0.30  | ?      |
| 雷尔氏菌细菌 G+  | 16:1 iso G           | 11       | 11.312         | 0.26  | ?      |
| 厌氧细菌       | 18:1 w7c 11-methyl   | 12       | 9.128          | 0.21  | ?      |

注:“?”表示其对应的特异性脂肪酸在样本中出现的频度过低在一个研究样点不超过 2 次,其中部分特异性脂肪酸在 CK 对照区为 0 值,不适用于计算冲击指数公式中,无法计算出其冲击指数。

综合表4可知,在所测土样中出现频次、绝对含量以及所占比重较高的微生物菌群受农业旅游冲击影响较大,当微生物生物量维持在较高水平时说明当前的土壤环境十分适合其生存繁殖,受农业旅游影响(如人为踩踏、外源垃圾的带入等会导致土壤通气性、含水率下降,土壤酸碱性改变,重金属含量增加等)其生存的土壤微环境发生改变导致其生物量骤减,致使先前的优势种群受影响反而较大。

### 2.3 土壤微生物群落受影响距离

通过表5可看出奇彩梦园内1,4样点的细菌、革

兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌受游憩影响的距离达到了4 m,且达到显著性差异,根据放线菌和原生动物的变化率未能判断出其受影响的距离。样点2土壤细菌、革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌受冲击响应影响距离达到2 m,真菌达到3 m,无法判断放线菌和原生动物具体受影响情况。样点3土壤中细菌、革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌受影响的距离均达到2 m,无法判断放线菌和原生动物具体受影响情况。

表5 奇彩梦园旅游冲击土壤微生物变化率(%)

Table 5 Tourism impact the rate of change in soil microbial properties in Qicaimengyuan

| 样点 | 微生物类型   | 小样区      |          |          |          |         |    | 单物种影响<br>距离/m | 综合影响<br>距离/m |
|----|---------|----------|----------|----------|----------|---------|----|---------------|--------------|
|    |         | 1        | 2        | 3        | 4        | 5       | CK |               |              |
| 1  | 细菌      | -46.17C  | -52.35C  | -57.61C  | -25.01B  | -2.45A  | 0A | 4             | 4            |
|    | 革兰氏阴性细菌 | -33.23B  | -57.12D  | -61.98E  | -47.22C  | -1.89A  | 0A | 4             |              |
|    | 革兰氏阳性细菌 | -47.23C  | -53.66CD | -60.61D  | -19.84B  | -4.47A  | 0A | 4             |              |
|    | 真菌      | -53.02B  | -100.00E | -73.38D  | -62.45C  | -6.99A  | 0A | 4             |              |
|    | 放线菌     | -47.66C  | -100.00D | -100.00D | -40.32C  | -10.78B | 0A | ?             |              |
|    | 原生动物    | -100.00E | -9.42D   | -100.00E | 127.34A  | 13.53B  | 0C | ?             |              |
| 2  | 细菌      | -23.23B  | -18.15B  | -5.16A   | -6.22A   | -1.23A  | 0A | 2             | 2            |
|    | 革兰氏阴性细菌 | -21.68B  | -15.33B  | -6.11A   | -4.25A   | -2.28A  | 0A | 2             |              |
|    | 革兰氏阳性细菌 | -19.15B  | -15.18B  | -2.33A   | -3.59A   | -1.11A  | 0A | 2             |              |
|    | 真菌      | -28.22C  | -18.37B  | -13.22B  | -4.11A   | -2.01A  | 0A | 3             |              |
|    | 放线菌     | -23.11B  | -90.24D  | -100.00E | -52.01C  | -90.00D | 0A | ?             |              |
|    | 原生动物    | -100.00C | 2.65A    | -100.00C | -25.36B  | -1.99A  | 0A | ?             |              |
| 3  | 细菌      | -43.23C  | -28.35B  | -5.24A   | -4.20A   | -1.48A  | 0A | 2             | 2            |
|    | 革兰氏阴性细菌 | -31.66C  | -19.30B  | -7.17A   | -5.00A   | -4.78A  | 0A | 2             |              |
|    | 革兰氏阳性细菌 | -29.45B  | -25.44B  | -4.30A   | -4.55A   | -1.69A  | 0A | 2             |              |
|    | 真菌      | -29.27C  | -19.38B  | -6.27A   | -4.87A   | -4.00A  | 0A | 2             |              |
|    | 放线菌     | -27.54B  | -99.20D  | -100.00D | -100.00D | -91.07C | 0A | ?             |              |
|    | 原生动物    | -20.00D  | 2.65AB   | -100.00C | 10.36A   | -4.56BC | 0B | ?             |              |
| 4  | 细菌      | -44.12D  | -33.35C  | -27.31BC | -23.01B  | -3.72A  | 0A | 4             | 4            |
|    | 革兰氏阴性细菌 | -37.28C  | -30.11C  | 21.94B   | -16.62B  | -1.19A  | 0A | 4             |              |
|    | 革兰氏阳性细菌 | -42.25D  | -36.64C  | -25.31B  | -18.82B  | -3.87A  | 0A | 4             |              |
|    | 真菌      | -33.02B  | -100.00D | -93.38D  | -52.46C  | -7.95A  | 0A | 4             |              |
|    | 放线菌     | -57.63D  | -100.00E | -100.00E | -30.30C  | -19.73B | 0A | ?             |              |
|    | 原生动物    | -100.00D | -4.47C   | 157.89A  | -100.00D | 16.58B  | 0C | ?             |              |

注:同一行不同字母表示差异显著( $p < 0.01$ );“?”表示无法判断出该种微生物的受影响距离。

总体上,距离游步道1 m处土壤微生物受影响最为显著,在游步道2 m处受影响较为显著。游客

的践踏活动导致土壤有机质减少、理化性质恶化、土壤板结、土壤含水量减少、容重增加,这些都影响到了

微生物的生存环境,进而导致土壤中微生物数量甚至物种变化。由于土壤微生物组成中放线菌和原生动物数量很少,放线菌在对照区平均含量也只有 0.25 nmol/g,原生动物照样区平均值仅有 0.12 nmol/g,甚至在某些小样区为 0,含量少导致样点放线菌和原生动物没能呈现规律变化,但其数量和物种减少与农业旅游活动的影响是分不开的<sup>[4]</sup>,随着与步道距离的加大,其他微生物受影响也呈减弱趋势。

由图 3 可以看出各样点土壤微生物群落结构受农业旅游冲击明显,距游道距离不同影响程度不同。样点 1 土壤微生物群落结构受影响距离已经达到 4 m,样区 1-4 和样区 5、CK 的环境胁迫指数存在极显著差异。样点 2 土壤微生物群落结构受影响距离

达到了 2 m,样区 1、2 和样区 3-5、CK 的环境胁迫指数差异明显。样点 3 土壤微生物群落结构受影响距离达到了 2 m,样区 1、2 和样区 3、4、5、CK 的环境胁迫指数均存在极显著差异。样点 4 土壤微生物群落结构受影响距离已经达到 4 m,样区 1-4 和样区 5、CK 的环境胁迫指数均存在极显著差异。在各样点土壤微生物受农业旅游影响综合距离确定方面图 3 所的结果与表 5 分析结果基本一致。分析土壤微生物群落结构在 1、4 样点比 2、3 样点受影响程度更大的原因主要为 1、4 样点游道较窄且,两侧空间较为开放,当人流量较大时易导致对两侧土壤进行踩踏,对微生物的生存环境影响范围会更大。

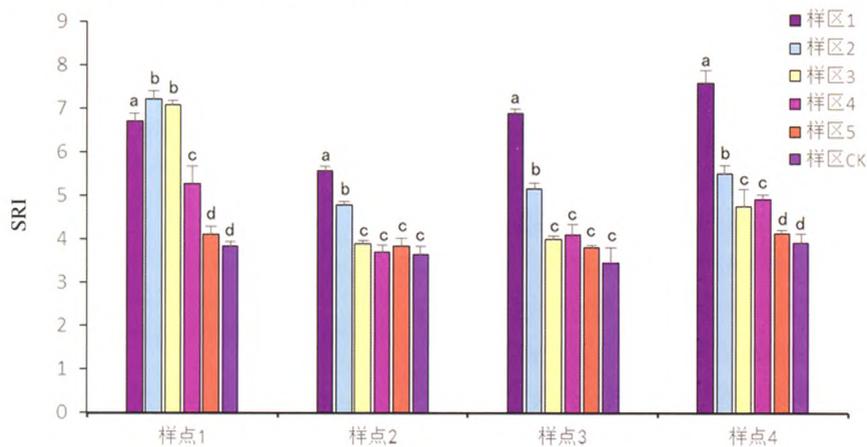


图 3 各样点土壤微生物受环境胁迫指数

Fig. 3 Every point of soil microbial environmental stress index

### 3 讨论

在岩溶生态系统中细菌约占土壤微生物总数的 80%,占绝对优势,放线菌次之约占总数的 10%,真菌约占 5%,原生动物最少<sup>[24]</sup>,本研究区表征细菌、真菌、放线菌以及原生动物的 PLFAs 绝对含量分别占脂肪酸总量的 51.74%,8.61%,5.10%和 0.68%,受农业旅游冲击后所占比例分别为 45.05%,7.50%,4.67%和 0.91%,土壤微生物受旅游活动影响后细菌百分比减少明显。沈利娜等研究所用的稀释平板法所测的微生物均为可培养菌种,而当前能确定的可培养微生物种类只占到土壤微生物种类的 5%左右<sup>[25]</sup>,在本研究中检测分析了土壤中所有的微生物种类,与其研究成果相比更贴近真实情况。

根据我们的研究,旅游过程中人为踩踏、生活垃圾污染、以及农药除草剂等的施用导致离游道 2 m 处的土壤含水量下降约 20%,容重增加约 20%,pH

值升高约 15%,有机质降低约 50%,全氮降低约 35%,碱解氮降低约 40%,重金属镉(Cd)、铅(Pb)在部分样点含量增加约 10%。容重增加土壤通气性减弱好氧细菌生物量会相应降低,土壤含水量、土壤有机质、全氮减少导致土壤肥力降低对微生物群落影响明显;pH 值是决定土壤微生物生存情况的另一至关重要因素;土壤重金属增加对土壤生物的群落结构与功能产生不利影响;人为踩踏导致植被减少,而植物群落类型初步决定了微生物群落的组成<sup>[26]</sup>。如前文所述,研究区受农业旅游活动影响较大的土壤微生物在群落结构组成中比重也较大、生物量较丰富,说明其十分适合在未受影响的环境下生存繁殖,但人为活动对其冲击较大。研究结果中还发现一些生物量较丰富,出现频次较高,受农业旅游冲击程度不是很高的微生物菌种,如蓝细菌(18:2 w6,9c),放线菌(18:0 10-methyl, TBSA)以及假单胞杆菌(18:1 w7c)等,可以考虑将其应用到环境修复中。

与传统基于培养基的微生物分离技术和生理学、分析生物学相比,本研究采用的 PLFAs 方法具有一定的优越性,在定量水平上更为精确,结果客观可靠<sup>[27-28]</sup>。针对土壤微生物不同的研究方法,所得结果的分析视角有所不同,目前在旅游活动对土壤微生物群落影响方面的研究成果中大多利用微生物量碳、氮、磷来反映微生物具体水平,谭周进<sup>[1]</sup>等利用旅游踩踏对土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响来反映旅游对土壤微生物的影响,该研究方法能够客观说明微生物受外界环境影响程度,但无法在更微观的视角说明具体是哪种微生物受到了影响以及受影响的规律,而本研究可以在菌种和菌株水平上进行定量分析。

#### 4 结 论

(1) 农业旅游活动对土壤微生物群落结构的综合影响距离在 4 m 以内,总体来说在 1 m 范围土壤微生物受影响程度最大,2~5 m 范围内受影响程度依次递减直至消失。在受冲击的土壤微生物群落当中细菌、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性菌、真菌的生物量随着离游径的距离变小呈递减的趋势,放线菌在部分样点内展现出了该规律,原生动物的无明显的规律。

(2) 经过对土样中测得的 PLFAs 进行多样性分析和冲击指数分析后得出,细菌受农业旅游冲击最为明显:PLFAs 标记物假单胞菌(16:0)、好氧细菌 G+(15:0 iso,16:0 iso)以及伯克霍尔德细菌 G-(19:0 cyclo w8c)受农业旅游影响程度较大;真菌[18:3 w6c(6,9,12)],原生动物(20:4 w6,9,12,15c)受农业旅游影响程度较小,受冲击程度大小与该微生物在生物总量中所占的比重呈正相关。可以考虑选取在检测样品中出现频率较高,生物量在群落结构中所占比重较大,受冲击不是很大的菌种应用到环境修复中,如蓝细菌(18:2 w6,9c),放线菌(18:0 10-methyl, TBSA)以及假单胞杆菌(18:1 w7c)等。由于本研究只检测了一个时间点的土壤样品微生物群落生物量情况,未进行时间演绎,下一步应该重点对比研究不同时段受农业旅游冲击的土壤微生物群落分布的变化情况。

**致 谢:**感谢西南大学资源环境学院李振轮教授和梁伟同学为本研究提供的帮助。

#### 参 考 文 献

- [1] 谭周进,肖启明,祖智波. 旅游踩踏对张家界国家森林公园土壤微生物区系及活性的影响[J]. 土壤学报, 2007, 1(44): 184-187.
- [2] 何荣,王国兵,杜家社,等. 武夷山不同海拔植被土壤微生物量的季节动态及主要影响因子[J]. 生态学杂志, 2009, 28(3): 394-399.
- [3] 刘纯,刘延坤,金光泽. 小兴安岭 6 种森林类型土壤微生物量的季节变化特征[J]. 生态学报, 2014, 34(2): 451-459.
- [4] 赵辉,赵铭钦,程玉渊,等. 土壤微生物影响因子研究综述[J]. 江西农业学报, 2009, 21(12): 52-56.
- [5] Yergeau E, Newsham K K, Pearce D A, et al. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats[J]. *Environmental microbiology*, 2007, 9(11): 2670-2682.
- [6] Lauber C L, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2009, 75(15): 5111-5120.
- [7] Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere[J]. *FEMS microbiology ecology*, 2009, 68(1): 1-13.
- [8] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(3): 626-631.
- [9] Andres-Abellan M, DEL ÁLAMO J B, Landete-Castillejos T, et al. Impacts of visitors on soil and vegetation of the recreational area "Nacimiento del Río Mundo" (Castilla-La Mancha, Spain) [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2005, 101(3): 55-67.
- [10] 刘德秀,秦远好,谢德体. 游憩活动对缙云山自然保护区土壤环境的影响[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2006, 28(5): 714-721.
- [11] 韦大方,方凤满,杨仲元. 黄山风景区步道土壤理化性质变化特征分析[J]. 水土保持研究, 2012, 19(2): 175-179.
- [12] 席建超,胡传东,武国柱,等. 六盘山生态旅游区旅游步道对人类践踏干扰的响应研究[J]. 自然资源学报, 2008, 23(2): 274-284.
- [13] Frostegård Å, Bååth E, Tunlio A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(6): 723-730.
- [14] Federle T W. Microbial distribution in the soil-new techniques. In *Perspective in Microbial ecology*. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, 1986: 493-498.
- [15] Frostegård Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22(1-2): 59-65.
- [16] O'leary W M, Wilkinson S G. Gram-positive bacteria[J]. *Microbial lipids*, 1988, 1: 117-201.
- [17] Zogg G P, Zak D R, Ringelberg D B, et al. Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming

- [J]. Soil science society of america journal, 1997, 61(2):475-481.
- [18] Steinberger Y, Zelles L, Bai Q Y, et al. Phospholipid fatty acid profiles as indicators for the microbial community structure in soils along a climatic transect in the Judean Desert[J]. Biology & Fertility of Soils, 1999, 28(3):292-300.
- [19] Ratledge C, Wilkinson S G. Microbial lipids[M]. London: Academic Press, 1988.
- [20] elles L . Identification of single cultured micro-organisms based on their whole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure[J]. Chemosphere, 1999, 39(4):665-682.
- [21] 杨文浩. 镉污染/镉-锌-铅复合污染土壤植物提取修复的根际微生态效应研究[D]. 杭州:浙江大学, 2014:44.
- [22] 石强, 雷相东, 谢红政. 旅游干扰对张家界森林公园土壤影响的研究[J]. 四川林业科技, 2010, 23(3):28-33.
- [23] 戈峰. 现代生态学[M]. 北京:科学出版社, 2002:252-254.
- [24] 沈利娜, 邓新辉, 蒋忠诚, 等. 不同植被演替阶段的岩溶土壤微生物特征:以广西马山弄拉峰丛洼地为例[J]. 中国岩溶, 2007, 26(4):310-314.
- [25] 彭伶俐, 王琴, 辛明秀. 自然界中不可培养微生物的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(2):75-79.
- [26] 谢龙莲, 陈秋波, 王真辉, 等. 环境变化对土壤微生物的影响[J]. 热带农业科学, 2004, 24(3):39-41.
- [27] 齐鸿雁, 薛凯, 张洪勋. 磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域的应用[J]. 生态学报, 2003, 23(8):1576-1582.
- [28] 张秋芳, 刘波, 林营志, 等. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸 PLFA 生物标记多样性[J]. 生态学报, 2009, 29(8):4127-4134.

## Impact of agricultural tourism activities on microbial community structure of soil in karst area: A case research of Tongliang district of Chongqing Huangjuemen Qicaimengyuan

WANG Shuai<sup>1,2</sup>, WANG Jie<sup>1,3</sup>, LUO Yun-zhong<sup>1</sup>, XIE De-ti<sup>1,2</sup>, GAO Ming<sup>1,2</sup>, ZHAO Zhen-yang<sup>4</sup>, CHENG Yang<sup>1</sup>, CAI Yang-yang<sup>1</sup>

(1. College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Agricultural Nonpoint Source Pollution Control Engineering Technology Research Center in the Three Gorges Reservoir, Chongqing 400716, China;

3. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210008, China;

4. School of Geographical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract** To conduct the matic studies on the impact of agricultural tourism on the ecological environment of soil can provide a theoretical basis for rational development of leisure agriculture tourism and provide a scientific basis for assessing the impact of future agri-tourism activities on the environment. For this study, soil samples were collected on both sides of tour trail in Qicaimengyuan of TongLiang Huangjuemen. Through field investigation, sampling and sample analysis by using phospholipid fatty acid spectrum graph method (PLFAs), the community & composition of soil microorganisms, impact range of agri-tourism and its degree of impact were investigated in this study. The results show that impact range on microbial community structure falls within 4 m ( $p < 0.01$ ), while the soil microbial biomass clearly declines in the direction to the tour trails. Within the scope of that impact of agricultural tourism, the similar tendency between the biomass and touring range commonly occurs in bacteria, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi with the distance from the smaller trails have a clear downward trend. This biomass decline also happens in actinomycetes in some areas, but not in protozoa. The analytical results of biodiversity and impact indexes, with data derived from PLFAs analysis, show that Burkholderia bacteria (19: 0 cyclo w8c) is most likely to be affected by the tourism activity, whereas arthrobacter [18: 3 w6c (6,9,12)] is the least affected. And the impact degree is closely related to the percentage of microorganism in the total biomass. The research indicates that agri-tourism activities have caused damage to soil microbial community structure and have affected soil ecological stability.

**Key words** karst region, agricultural tourism, soil microbial community structure

(编辑 吴华英)