2015-04-25 DOI: 10.3724/SP.J.1145.2014.10033 http://www.cibj.com/
应用与环境生物学报 *Chin J Appl Environ Biol* 2015, **21** (2): 341-349

三江源区不同建植年限人工草地土壤微生物群落结构特征*

杨希智 王长庭** 宇洪标 刘 敏
西南民族大学生命科学与技术学院 成都 610041

摘 要 近年来，对退化生态系统恢复的研究逐渐由地上向地下部分转移，地下部分特别是土壤微生物群落对土壤的恢复机理和过程已倍受关注. 运用常规实验室分析法和磷脂脂肪酸法，研究三江源区不同建植年限人工草地土壤养分和微生物群落结构及其分布特征. 结果显示：土壤总磷脂脂肪酸（总PLFAs）、真菌PLFAs（F PLFAs）、细菌PLFAs（B PLFAs）、革兰氏阳性菌PLFAs（G^+ PLFAs）、革兰氏阴性菌PLFAs（G^- PLFAs）含量与PLFA类型随建植年限的增加呈先降低后升高的变化趋势，随土层深度的增加而降低. 土壤全量、速效养分含量均随建植年限的增加呈现同样的变化规律. 主成分分析表明，在0-10 cm、10-20 cm土层中，4年和16年人工草地土壤微生物群落PLFA类型丰富多样，群落结构更加复杂稳定，而7年和9年的土壤微生物群落结构较为单一. 相关分析表明，总PLFAs、B PLFAs、F PLFAs、G^+ PLFAs和G^- PLFAs含量与土壤全量和速效养分含量（除速效氮、速效磷）均呈极显著或显著正相关（$P < 0.01$；$P < 0.05$）. 综上，在合理放牧条件下，人工草地的建植有利于土壤微生物生物量的提高和群落结构的改变. 利用微生物PLFA含量和类型的多样性作为监测土壤环境的指标，能及时有效地判别土壤养分的变化情况，有利于及时管理人工草地. 图3 表4 参44

关键词 三江源区；人工草地；PLFA；土壤微生物群落；土壤养分
CLC S812.2

Soil microbial community structure characteristics in artificial grassland with different cultivation years in the headwater region of Three Rivers, China*

YANG Xizhi, WANG Changting**, ZI Hongbiao & LIU Min
College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Abstract Recent studies of restoration mechanisms and processes are concentrated more and more on belowground systems, especially the soil microbial community. In this study, soil microbial community structure and distribution characteristics were evaluated in artificial grassland with different cultivation years in the headwater region of Three Rivers, China. Soil nutrients were investigated by conventional laboratory analysis; the soil microbial composition was analyzed by phospholipid fatty acid (PLFA) method. The results showed that the PLFAs decreased with soil depth, with PLFA abundance and contents of total PLFAs, including fungal PLFAs (F PLFAs), bacterial PLFAs (B PLFAs), Gram-positive PLFAs (G^+ PLFAs) as well as Gram-negative PLFAs (G^- PLFAs) initially decreasing but subsequently increasing with the cultivation year. Contents of soil organic matter (SOM), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), available nitrogen (AN) and available phosphorus (AP) followed the same trend as the contents of PLFAs. Soil microbial communities at 0-20 cm soil were abundant and diverse in 4-year and 16-year artificial grasslands, but less so in 7-year and 9-year cultivations. Correlation analysis showed that the contents of total PLFAs, B PLFAs, F PLFAs G^+ PLFAs and G^- PLFAs were significantly and positively correlated to the concentrations of SOM, TN, TP, AN and AP ($P < 0.01$); fungal contents were significantly and positively correlated with TN and TP ($P < 0.01$) besides with organic matter ($P < 0.05$), and also positively, though not significantly, related to AN and AP. Therefore, under reasonable grazing conditions, artificial grasslands can be planted to increase soil microbial biomass and change microbial community structure. Soil microbial biomass and types as monitoring indicators of soil environment can help to timely identify changes of soil nutrients, which is beneficial for efficient management of artificial grasslands.

Keywords headwater region of Three Rivers; artificial grassland; PLFA; soil microbial community; soil nutrient

收稿日期Received: 2014-10-22 接受日期 Accepted: 2015-01-07
*国家自然科学基金项目（31370542）、国家重点基础研究发展计划（973计划）（2013CBA01807）、四川省教育厅创新团队项目（14TD0049）和西南民族大学研究生创新型科研项目（CX2014SZ113）资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370542), the National Basic Research Program of China (2013CBA01807), the Innovation Team Project of Education Office of Sichuan Province (14TD0049), and the Graduate Innovative Research Project of Southwest University for Nationalities (CX2014SZ113)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wangct@swun.edu.cn)

“三江源区”（又称“江河源区”）地处青藏高原腹地，是长江、黄河和澜沧江的发源地，素有“江河之源”、“中华水塔”的美誉，它是青藏高原最重要的生态功能区，具有重要的战略地位，是中华大地的生态屏障[1-3]. 近年来，受人为因素和自然因素干扰的影响，尤其是长期过度放牧导致天然草地的植被盖度和初级生产力急剧降低、生物物种多样性减少、优质牧草的比例降低、土壤水分涵养和养分固持能力下降、对气候变化的响应更敏感、生态系统平衡受到损伤、环境日趋恶化等问题逐渐显现[4-6]. 草地退化已引起各方面的高度关注，并成为草地生态学的研究热点[7]. 据调查，三江源区的草地已呈现全面退化的趋势，出现了大面积“黑土滩”，其中中度以上退化草场面积达1.2 × 10^7 hm^2，占源区可利用草场面积的58% [8]. 草地退化直接影响到江河源区畜牧业的发展，严重影响源区自然生态系统的健康状况，草地生态服务功能遭到破坏，使我国乃至东南亚诸国的生态安全面临严峻挑战[3, 9].

鉴于草地退化对全球生态安全、环境质量等的负面影响日趋严重，以恢复生态学和可持续发展理论为基础，采用定位研究和生态建设工程相结合的方法研究退化草地生态系统的恢复与重建，尤其是人工修复草地的建设已成为青藏高原三江源区生态问题的最重要组成部分. 三江源区退化草地恢复过程中，常采用老芒麦（*Elymus sibiricus*）、垂穗披碱草（*E. nutans*）、冷地早熟禾（*Poa cryrnophila*）、中华羊茅（*Festuca sinensis*）等多年生牧草建植人工草地. 至2006年以来，国家和青海省投入大量的人力、物力，在三江源区建植人工草地约1.6 × 10^5 hm^2，部分缓解了该地区天然草地压力及草畜矛盾问题，也在一定程度上遏制了局部生态环境的进一步恶化[10]. 然而，采用多年生禾本科植物建植人工草地，特别是建植后5-8年间，由于放牧压力过大导致草地群落向逆向演替发展（包括土壤的逆向演替）[11]. 为了解决这一难题，众多学者围绕草地植被和土壤恢复做了大量研究[9, 12-13]，为三江源区退化生态系统的恢复提供了丰富的理论指导. 土壤微生物作为土壤的重要组成部分，不仅是土壤养分重要的源和汇，也是土壤养分转化的重要调控者，群落结构受土壤环境和地上生物多样性的影响[14]，对土壤生态机制变化和环境胁迫反应灵敏，是土壤生态系统变化的预警和敏感指标[15]. 因此，研究土壤微生物群落组成和土壤养分，及时判定生态系统各个组分的变化，对于退化生态系统的恢复与重建具有重要作用.

磷脂脂肪酸是活体微生物细胞膜的重要组分，具有结构和生物种、属特异性，微生物死后，PLFA迅速降解，因此，土壤中PLFA数量变化可反映出原位土壤微生物活体生物量与群落结构变化[16]. 利用磷脂脂肪酸法分析土壤微生物群落结构是一种快速、可靠并可重现的分析方法，可用于表征在数量上占优势的土壤微生物群落[17]，近年来广泛应用于微生物生态学研究中. 因此，本研究应用PLFA法研究三江源区不同建植年限人工草地土壤微生物群落组成及其分布特征，旨在探讨退化生态系统恢复重建过程中，不同建植年限高寒草甸土壤微生物群落PLFAs含量变化特征及其与土壤养分间的相关性，为合理开发利用人工草地提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验样地自然概况

研究区域位于青海省果洛州达日县和玛沁县（32°3l′-35°38′N，96°54′ -10l°59′E），平均海拔4 200 m，属典型的高原大陆性气候，无四季之分，仅有冷暖季之别. 冷季较长、干燥而寒冷，持续时间达7-8个月，暖季短暂而凉爽，长4-5个月. 温度年差较小而日差较大，太阳辐射强烈. 年均气温–1.3 ℃，最高气温24.6 ℃，最低气温–34.5 ℃. 年均降水量420-560 mm，多集中在5-9月，年蒸发量1 119.07 mm，无绝对无霜期，土壤为高山草甸土和高山灌丛土[18].

1.2 样方设置与取样

分别选择青海省果洛州玛沁县军牧场、达日县窝赛乡的4个研究区域，建植期分别为4年、7年、9年、16年的人工草地为试验样地，样地面积均为50 m × 50 m，4块人工草地均为垂穗披碱草＋冷地早熟禾＋星星草（*Puccinellia tenuiflora*）混播地，土壤均为高山草甸土. 人工草地在建植初期主要优势种以禾本科植物为主，随着建植年限的增加，大量的杂类草植物入侵，代替禾本科植物成为优势种，人工草地在建植到16年后，禾本科植物大量生长，再次成为优势种，同时莎草科植物的生物量也明显增加，而杂类草植物生物量大量减少，人工草地植被群落结构趋于稳定（表1）. 在4块样地内分别随机选取10个50 cm × 50 cm样方，每个样方内选取5个样点进行取样，样点呈“V”字型排列[18]. 用土钻（直径3 cm）按0-10 cm、10-20 cm分层取样，每块样地内50个样点的土样按土层混合成土壤样品，过2 mm筛，将样品分成两份，一份混合成500 g的土壤样品，风干后用于土壤养分的测定. 另一份放入4 ℃移动冷藏箱中带回实验室，做好标记，放入超低温冰箱（–80 ℃）冷冻保存，用于土壤微生物群落结构PLFA的测定.

1.3 土壤养分的测定

土壤养分分析主要包括土壤有机质、全氮、速效氮、全

表1 不同建植年限人工草地群落的数量特征 (mean ± SD, *N* = 5)

Table 1 Quantitative characteristics of community in artificial grassland of different cultivation years (mean ± SD, *N* = 5)

建植年限 Cultivation year (*t*/a)	物种数 Species No.	Shannon- Wiener index	地上生物量 Aboveground biomass (*m*/g m^{-2})	禾本科生物量 Grasses biomass (*m*/g m^{-2})	莎草科生物量 Sedges biomass (*m*/g m^{-2})	杂类草生物量 Forbs biomass (*m*/g m^{-2})
4	6.83 ± 1.47c	2.20 ± 0.11b	443.81 ± 24.67a	369.99 ± 28.03a		13.82 ± 4.45d
7	5.83 ± 0.98c	2.21 ± 0.09b	181.57 ± 6.60c			181.57 ± 7.24b
9	8.17 ± 1.17b	2.19 ± 0.13b	218.89 ± 5.83c	9.29 ± 0.60c		209.61 ± 6.73a
16	19.83 ± 1.47a	2.75 ± 0.17a	255.06 ± 12.89b	122.98 ± 5.76b	69.31 ± 8.40a	62.78 ± 6.33c

同列中字母不同表示各处理间差异显著（$P < 0.05$）.

Different letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

磷和速效磷含量分析. 全磷采用硫酸–高氯酸消化法、速效磷采用碳酸氢钠–浸提钼锑抗比色法、全氮和速效氮分别采用凯氏定氮法和碱解扩散法、有机质用重铬酸钾外加热法测定[19].

1.4 土壤PLFA的测定

土壤微生物群落结构采用磷脂脂肪酸法[20], 土壤微生物磷脂脂肪酸提取参照修正的Bligh-Dyer方法[21]. 具体操作步骤如下: 称取6 g冷冻干燥的土壤样品, 利用Blight-Dyer法通过氯仿、甲醇和柠檬酸缓冲液按体积比(氯仿:甲醇:柠檬酸缓冲液=1:2:0.8)振荡提取总脂, 经硅胶柱层析分离得到磷脂脂肪酸, 将得到的磷脂脂肪酸甲脂化, 然后采用HP7890-HP5975型气相色谱质谱联用仪(GC-MS)分析磷脂脂肪酸的组成[22-24], 检测中升温程序如下: 进样后在50 ℃保持1 min, 之后以12 ℃ min^{-1}的速率升到180 ℃, 保持2 min 后以6 ℃ min^{-1}的速率升到220 ℃, 停留2 min 后以15 ℃ min^{-1} 的速率升到240 ℃, 保持1 min 后以15 ℃ min^{-1}的速率达到最终温度260 ℃, 并保持15 min.

气相色谱与质谱之间的连接温度为280 ℃, 用高纯氦气(1 mL min^{-1})作载气. 质谱仪采用电子电离(EI)方式, 电子能量为70 eV. PLFA的定性根据质谱标准图谱和已有的相关报道[23], 以正十九烷脂肪酸甲酯内标物进行定量计算.

脂肪酸含量(nmol g^{-1})的计算公式如下:

$$PLFA = 1000 \times (PPLFA \times \rho \times V)/(POSTD \times b \times m)$$

式中, PPLFA和POSTD分别为样品和标准物质的峰面积, ρ为标准物质的浓度(μg mL^{-1}), V为样品的测定体积(mL), b为相应磷脂脂肪酸的摩尔质量(g mol^{-1}), m为干土的质量(g). PLFA采用脂肪酸的常用命名方法[20]. PLFA可以作为微生物生物量和群落结构变化的生物标记分子. 根据已有的研究结果, 指示特定微生物的PLFA生物标记物如表2.

表2 不同建植年限人工草地土壤PLFA生物标记物

Table 2 PLFA biomarkers indicating microbe types in artificial grassland of different cultivation years

微生物类型 Microbial group	磷脂脂肪酸标记 Phospholipids fatty acids signatures	文献 Reference
一般性细菌PLFAs General Bacteria PLFAs (B PLFAs)	14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0	23, 25
革兰氏阳性菌PLFAs Gram-positive bacteria PLFAs (G^+ PLFAs)	i14:0, i16:0, i18:0, a15:0, a17:0, br15:0, br17:0, br18:0, br19:0	26-27
革兰氏阴性菌PLFAs Gram-negative bacteria PLFAs (G^- PLFAs)	cy12:0, cy17:0, 16:1ω7c, 16:1ω7t, 18:1ω7, 18:1ω8, 18:1ω11, 18:1ω12, 18:1ω5t, 18:1ω7t	23, 26-29
真菌PLFAs Fungi PLFAs (F PLFAs)	16:1ω11, 18:1ω9, 18:1ω10, 18:1ω6t, 18:1ω9t, 18:1ω10c	30-34

1.5 数据分析

磷脂脂肪酸定量测定用峰面积和内标曲线法. PLFA含量用nmol g^{-1}表示. 本文数据运用Microsoft Excel 2010处理数据, SPSS(19.0)用于土壤微生物PLFAs含量方差分析(ANOVA)Duncan($P=0.05$)、相关性分析(Correlation analysis)Pearson($P=0.05$), Canoco for Windows(4.5)用于土壤微生物PLFA含量的主成分分析(Principal components analysis, PCA).

2 结果与分析

2.1 不同建植年限土壤微生物类群的变化

高寒草甸不同建植年限人工草地各菌群微生物量和微生物总量存在很大差异. 在0-10 cm和10-20 cm土层中, 土壤总PLFAs含量随建植年限的增加呈先降低后升高的变化趋势, 其中4年和16年微生物生物总量高于7年和9年人工草地, 且16年人工草地PLFAs含量最高. 不同建植年限人工草地0-10 cm土层中总PLFAs含量均高于10-20 cm土层(图1a); B PLFAs含量在0-10 cm、10-20 cm土层中, 均呈高—低—高的变化趋势(图1b). 在0-10 cm土层中, 与16年人工草地的B PLFAs含量相比, 4年、7年、9年分别降低了17%、54%和46%; 在10-20 cm土层中, 分别降低了68%、86%和87%. 说明随人工草地建植年限的增加, 土壤细菌生物量发生明显变化, 16年人工草地更有利于细菌生长. G^+ PLFAs与G^- PLFAs的含量在不同土层变化差异较大, 但总体与总PLFAs含量变化趋势相同(图1c、d). 在0-10 cm土层中, G^+ PLFAs含量大小顺序为4年>16年>7年>9年, G^- PLFAs含量大小顺序为16年>4年>9年>7年; 在10-20 cm土层中G^+ PLFAs与G^- PLFAs的含量变化大小顺序相同, 为16年>4年>7年>9年. 说明4年人工草地以G^+ PLFAs居多, 而16年人工草地则相反, 以G^- PLFAs的含量居多. 在0-10 cm土层中, 16年人工草地G^+ PLFAs/G^- PLFAs和一般饱和脂肪酸/单烯不饱和脂肪酸(SAT/MONO)的比值最低, 说明随人工草地建植年限的增加土壤细菌组成比例、受环境胁迫情况发生明显变化. F PLFAs与B PLFAs(F PLFAs/B PLFAs)的比值在0-10 cm土层中介于1%-7%之间, 4年和16年人工草地明显低于7年和9年人工草地, 分别为1%和2%; 在10-20 cm土层中, 4年人工草地F PLFAs/B PLFAs均高于其他建植年限人工草地(图1e、f), 说明F PLFAs含量随建植年限的增加而降低.

2.2 不同建植年限人工草地PLFA种类的变化

用PLFA法测定出土壤中含量大于0.1 nmol g^{-1}的PLFA总计31种(C12-C19), 4年、7年、9年、16 年人工草地土壤中分别共计23种、17种、15种、22种. 各PLFA在不同建植年限不同土层(0-10 cm和10-20 cm)的变化如图2所示. 在0-10 cm土层中(图2a): 不同建植年限(4年, 7年, 9年和16年)人工草地土壤PLFA的种类分别为21、16、15和19种, 其中微生物14:0、16:0、18:0、16:1ω7t、a15:0、a17:0、br15:0、br17:0、i16:0均出现在4个人工草地土壤中, 14:0、16:0、18:0为B PLFAs, 16:1ω7t为G^- PLFAs, a15:0、a17:0、br15:0、br17:0、i16:0为G^+ PLFAs; 9种PLFA的含量之和分别占不同建植年限人工草地(4 年, 7年, 9年和16年)总PLFAs含量的75.1%、83.1%、88.2% 和81.7%. 在10-20 cm土层中(图2b): 不同建植年限人工草地土壤PLFA的种类分别为19、6、4和18种. 其中, 在4年人工草地土壤中, 含量比例大于10% 的 PLFA为16:0、br15:0和a17:0, 是该样地主要土壤微生物种类, 为B PLFAs和G^+ PLFAs, 三者占总PLFAs含量的57.6%; 在7年人工草地土壤中, 16:0、a15:0和br15:0脂肪酸含量最高, 三者占PLFAs总量的85.2%; 在9年人工草地土壤中, 16:0和a15:0分别占总PLFAs含量的74.4% 和15.7%, 共计90.1%; 16年人工草地土壤中的15:0(11.2%)、16:0(27.4%)和16:1ω7t(14.0%)含量之和占总PLFAs总含量的52.5%, 为B

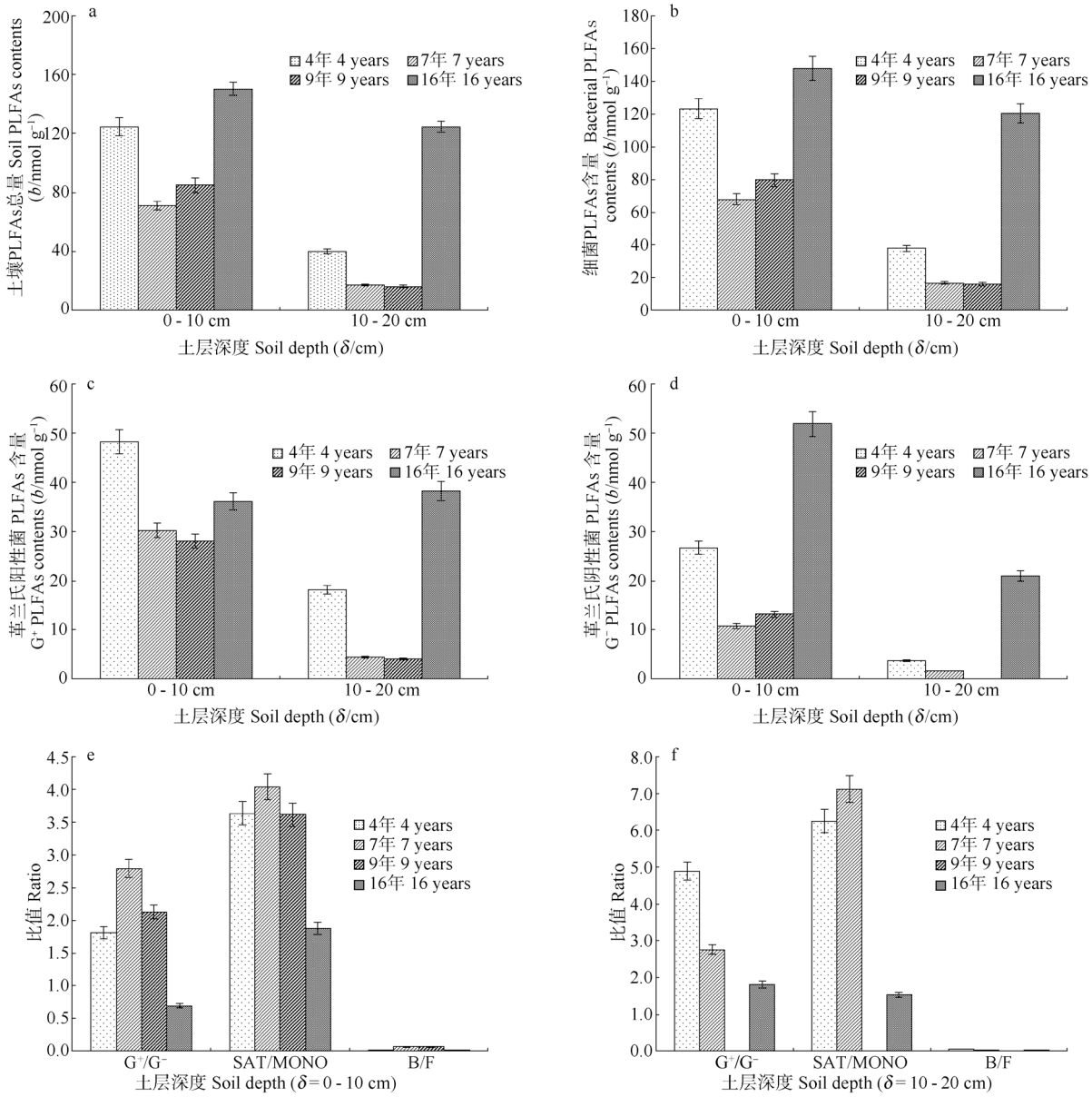


图1　不同建值年限人工草地各菌群含量的变化. B PLFAs：细菌；F PLFAs：真菌；G^+ PLFAs：革兰氏阳性菌；G^- PLFAs:革兰氏阳性菌；SAT：一般饱和脂肪酸；MONO：单烯不饱和脂肪酸.

Fig. 1　Changes of microbial group content in artificial grassland of different cultivation years. B PLFAs: bacterial PLFAs; F PLFAs: fungal PLFAs; G^+ PLFAs: Gram-positive bacterial PLFAs; G^- PLFAs: Gram-negative bacterial PLFAs; SAT: normal saturated fatty acid; MONO: monounsaturated fatty acid.

PLFAs和G^- PLFAs. 分析表明4年和16年人工草地土壤中微生物群落PLFA种类和含量丰富，且4年人工草地以G^+ PLFAs较多，而16年人工草地则以G^- PLFAs的含量较多.

2.3　PLFAs主成分分析（PCA）

对不同建植年限人工草地不同土层土壤微生物群落PLFA进行主成分分析. 结果发现：不同建植年限人工草地在PC轴上的分布存在明显差异. 在0-10 cm 土层中，第一主成分（PC1）和第二主成分（PC2）的贡献率分别为75.4%和19.6%，累计贡献率为95%. 在10-20 cm土层中，第一主成分（PC1）的贡献率为96.1%，第二主成分（PC2）的贡献率为3.6%，累计贡献率为99.7%.

在0-10 cm土层中，通过对主成分的因子载荷分析（图3a），16:0、17:0、18:0、i16:0、a15:0、cy12:0、18:2ω11、18:1ω12、18:1ω7、16:1ω7t共10种PLFA与PC1呈正相关，其中包括B PLFAs、G^+ PLFAs、G^- PLFAs；i18:0、16:1ω11、18:1ω7t、18:1ω10、18:1ω11、br17:0共6种PLFA与PC1呈负相关，其中包括G^+ PLFAs、G^- PLFAs、F PLFAs；14:0、15:0、i14:0、a17:0、br18:0、br19:0、18:1ω8、16:1ω7c共8种PLFA与PC2呈正相关，由B PLFAs、G^+ PLFAs、G^- PLFAs组成. 16年人工草地与PC1呈正相关，7年人工草地与PC1呈负相关，4年人工草地与 PC2呈正相关，7年、9年、16年人工草地靠近PC2轴，因此与PC2相关性不大. 说明4年与16年人工草地土壤微生物群落结构相似，

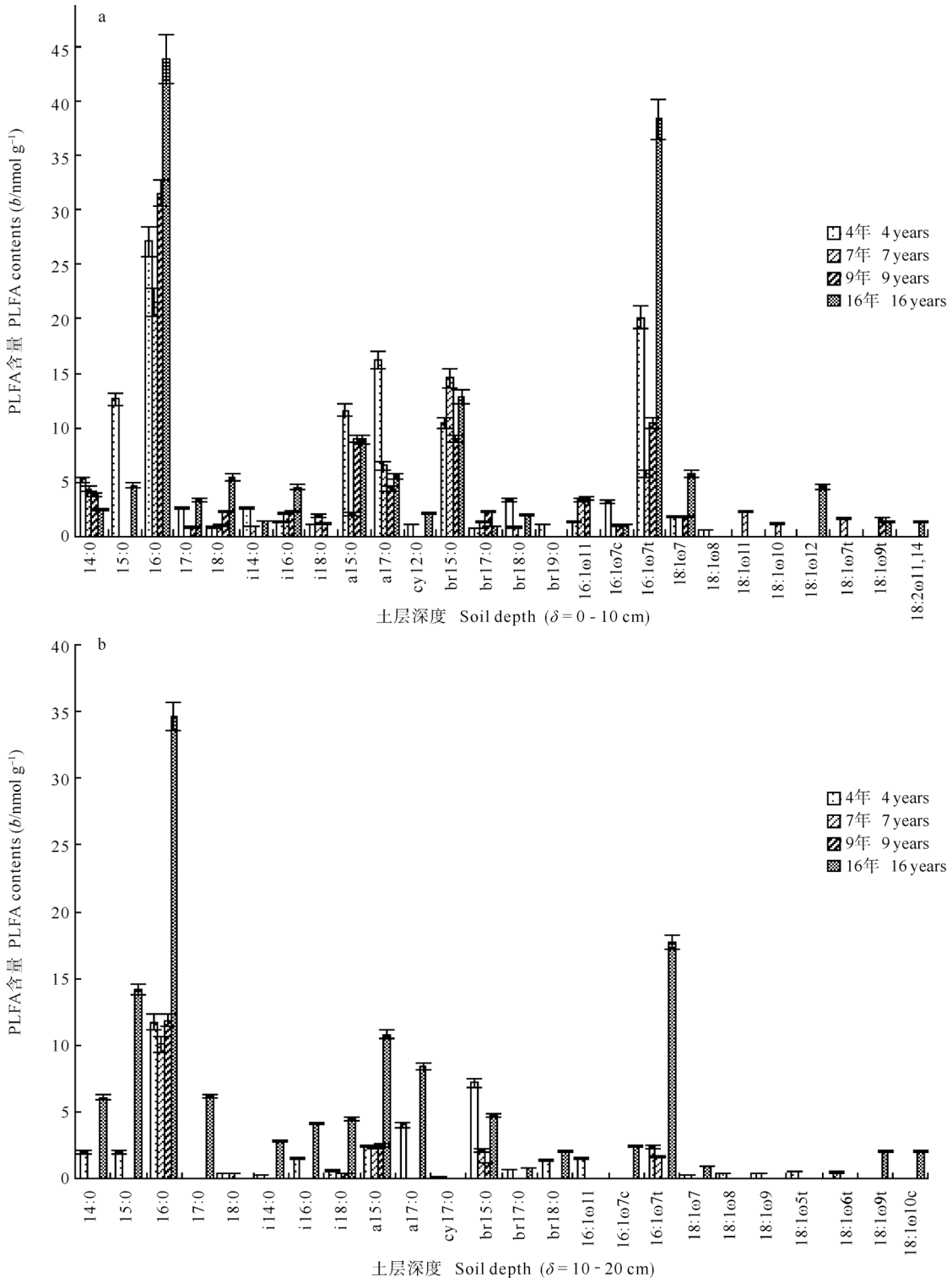


图2 不同建值年限人工草地PLFA种类变化.
Fig. 2 Changes of PLFA types in artificial grassland of different cultivation years.

种类更加丰富, 群落结构趋于稳定.

在10-20 cm土层中, 通过对主成分的因子载荷分析(图3b), 24种PLFA中, 与PC1呈正相关(载荷值>0.5)的PLFA共计16种, 其中包括B PLFAs、G^+ PLFAs、G^- PLFAs、F PLFAs; 18:0的载荷值<0.5, 因此与PC1呈负相关. 与PC2呈正相关(载荷值>0.5)的PLFA共计7种, 其中18:0为B PLFAs, br15:0为G^+ PLFAs, cy17:0、18:1ω8、18:1ω5t为G^- PLFAs, 16:1ω11、18:1ω8为F PLFAs. 在PC2轴上, 没有载荷值<0.5的PLFA, 因此各PLFA与PC2无负相关关系. 16年人工草地与PC1呈正相关, 4年、7年、9年人工草地位于PC1的左侧, 但靠近PC1轴,

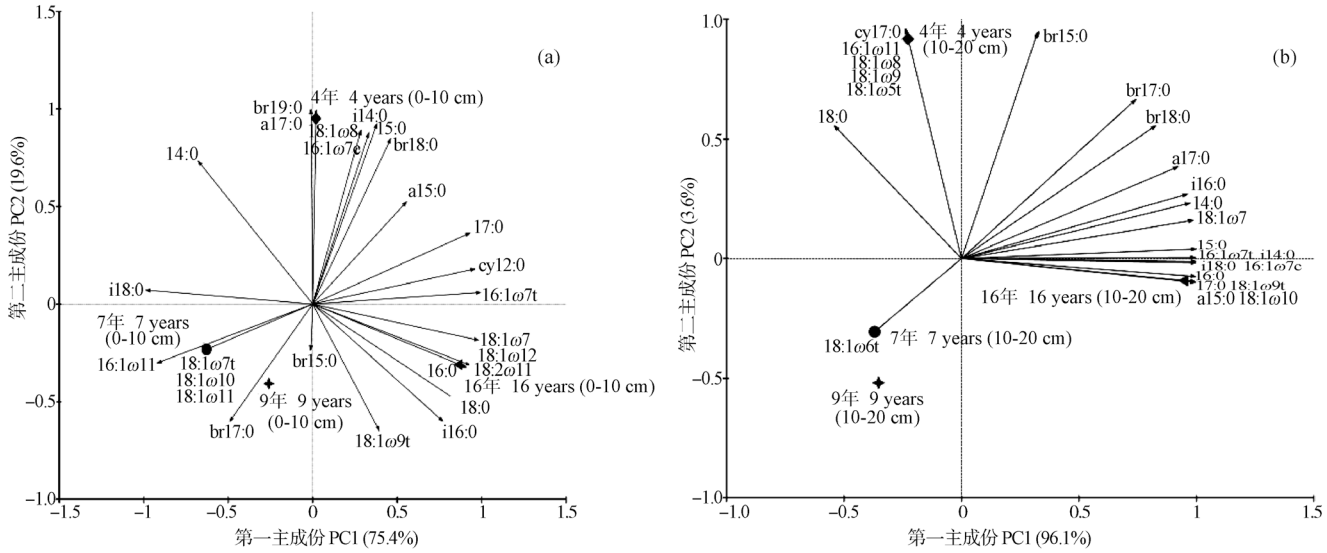


图3 不同建植年限人工草地土壤微生物PLFA主成分分析.

Fig. 3 PCA of soil microbial PLFA of artificial grassland of different cultivation years.

表3 不同建植年限人工草地土壤理化特征 (mean ± SD, *N* = 6)

Table 3 Soil physical-chemical properties of artificial grassland of different cultivation years (mean ± SD, *N* = 6)

土壤深度 Soil depth (δ/cm)	建植年限 Cultivated period (*t*/a)	有机质 Organic matter (*w*/g kg^{-1})	全氮 Total N (*w*/g kg^{-1})	速效氮 Available N (*w*/mg kg^{-1})	全磷 Total P (*w*/g kg^{-1})	速效磷 Available P (*w*/mg kg^{-1})
0-10	4	157.55 ± 2.14a	3.93 ± 0.54a	35.87 ± 5.13a	1.49 ± 0.14a	8.10 ± 1.05a
	7	126.99 ± 10.57b	2.78 ± 0.21b	19.88 ± 4.15b	1.19 ± 0.10b	4.65 ± 0.47b
	9	121.41 ± 5.25b	2.45 ± 0.49b	21.06 ± 3.93b	1.15 ± 0.11b	4.64 ± 0.61b
	16	150.35 ± 5.68a	3.57 ± 0.53a	40.58 ± 7.37a	1.20 ± 0.10b	8.61 ± 0.56a
10-20	4	104.30 ± 4.19a	1.82 ± 0.44a	15.51 ± 1.49a	0.61 ± 0.05a	4.71 ± 0.77a
	7	72.99 ± 6.95c	0.97 ± 0.11b	7.07 ± 1.21c	0.37 ± 0.07b	3.02 ± 0.44b
	9	55.40 ± 5.95d	0.85 ± 0.24b	5.16 ± 0.62d	0.25 ± 0.06c	3.14 ± 0.47b
	16	82.28 ± 10.43b	1.77 ± 0.56a	9.85 ± 0.97b	0.42 ± 0.10b	4.00 ± 0.88a

同列中字母不同表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$).

Lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level.

因此与PC1的相关性不大; 4年人工草地与 PC2呈正相关, 9年人工草地与PC2呈负相关, 7年与16年人工草地靠近PC2轴, 因此与PC2相关性不大. 由此说明, 4年与16年人工草地土壤微生物群落结构多样性更加复杂合理, 7年与9年人工草地土壤微生物群落结构较为单一, 且以一般性细菌为主要群落.

2.4 人工草地土壤理化性状

由表3可知, 在0-10 cm土层中, 土壤养分含量总体呈高—低—高的趋势. 土壤有机质、全氮、全磷、速效氮、速效磷含量在4年和16年人工草地中均明显高于7年和9年 ($P < 0.05$), 且4年人工草地的土壤养分含量最高. 10-20 cm土层土壤养分含量与0-10 cm土层相似, 但土壤有机质、速效氮、全磷含量在4年明显高于16年 ($P < 0.05$).

2.5 各菌群PLFA与土壤养分相关性分析

通过对土壤微生物各菌群PLFA与土壤养分含量进行相关性分析 (表4). 结果表明: 总PLFAs、B PLFAs、G$^+$ PLFAs、G$^-$ PLFAs含量与土壤有机质、全氮、速效氮、全磷和速效磷含量呈极显著的正相关 ($P < 0.01$), F PLFAs含量与土壤全氮和全磷含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 与土壤有机质含量呈显著相关 ($P < 0.05$), 与土壤速效氮和速效磷含量呈正相关, 但均不显著.

表4 PLFAs与土壤养分的相关性分析

Table 4 Correlation between soil PLFAs contents and nutrients

土壤养分 Soil nutrient	有机质 Organic matter	全氮 Total N	速效氮 Available N	全磷 Total P	速效磷 Available P
总PLFAs Total PLFAs	0.72**	0.76**	0.74**	0.63**	0.76**
细菌PLFAs Bacteria PLFAs	0.72**	0.76**	0.75**	0.63**	0.77**
真菌PLFAs Fungal PLFAs	0.35*	0.31**	0.21	0.38**	0.10
革兰氏阳性细菌PLFAs G$^+$ PLFAs	0.78**	0.82**	0.71**	0.74**	0.72**
革兰氏阴性细菌PLFAs G$^-$ PLFAs	0.70**	0.73**	0.82**	0.59**	0.83**

*表示显著相关 ($P < 0.05$), **表示极显著相关 ($P < 0.01$).

* indicates significant correlation ($P < 0.05$); ** indicates highly significant correlation ($P < 0.01$).

3 讨论与结论

微生物是土壤有机质的主要分解者, 是土壤养分的重要源和汇, 在陆地生态系统养分循环中扮演重要角色, 其数量和种类的变化受多种因子的影响, 在同一气候条件下, 自然和人为的扰动导致植被演替, 凋落物反作用于土壤, 直接

影响土壤微生物的数量和类群[34]. 而土壤微生物数量和多样性的大小是表征土壤肥力状况的重要生物学指标, 通常情况下, 土壤养分与微生物生物量呈正相关[35]. 研究发现, 三江源区人工草地微生物类群以细菌为主, 这与刘世贵[36]、韩玉竹[37]、胡雷[38]等研究高寒草地的研究报道一致, 其总量与种类在垂直分布上表现出0-10 cm土层高于10-20 cm土层的趋势; 在水平分布上, 4年和16年明显高于7年和9年人工草地, 除4年人工草地0-10 cm土层G^+ PLFAs含量最高外, 其他各菌群PLFAs含量均低于16年人工草地, 且PLFA种类在0-10 cm土层差异较小. 4年、7年和9年人工草地G^+ PLFAs/G^- PLFAs和SAT/MONO的比值明显高于16年. 微生物PLFA用以指示原位土壤微生物活体生物量和微生物群落结构, 其数量和种类的变化映射土壤微生物群落特征. 在微生物类群中, G^+ PLFAs含有厚的细胞壁, 特征磷脂脂肪酸为饱和支链PLFA, 对环境变化抗性较好, 类群较稳定[39], 而G^- PLFAs细胞壁薄, 特征磷脂脂肪酸为单不饱和PLFA, 环境耐受差, 但是其容易利用新的碳源, 当环境改变时, 变化敏感[40]; 当土壤条件得到改善, G^- PLFAs含量增高[41]. 在人工草地建植初期, 草地群落处于物种组成单一, 生产力高而且比较稳定的阶段, 加之实施施肥、灭除杂草等管理措施, 群落结构简单、土壤养分含量相对较高[6]. 当建植年限增长到7-9年时, 由于放牧压力大, 缺少人工管理, 大量杂类草物种入侵, 致使人工草地植被与土壤质量降低, 草地逆向演替, 这与王启兰[42]和王长庭[18]等研究结果相一致, 同时, 微生物总量降低, G^+ PLFAs相对含量最高; 当建植16 年时, G^- PLFAs数量超过G^+ PLFAs, 成为优势类群, 表明16年人工草地经过多年演替, 其群落结构已趋于稳定, 物种多样性丰富, 土壤条件得到改善, 处于正向演替阶段; 16年人工草地10-20 cm土层, 由于植物群落多样性丰富, 地下生物量增多, 其微生物生物总量与4年人工草地0-10 cm土层相近, 这在主成分分析中也得到了验证(如图3), 16年人工草地0-10 cm与PC1正相关程度最大, 4年人工草地0-10 cm与16年人工草地10-20 cm与PC1和PC2均正相关, 而且载荷值接近. 因此, G^+ PLFAs/G^- PLFAs或者STA/MONO可以作为指示土壤环境变化的指标. 在0-10 cm土层中, 4年和16年人工草地B PLFAs/F PLFAs比值低于7年和9年人工草地, 而B PLFAs/F PLFAs比值越低, 土壤生态系统越趋于稳定[43], 表明4年和16年人工草地稳定性高于7年和9年, 可以作为指示土壤环境变化的辅助指标.

土壤总PLFAs、F PLFAs、B PLFAs、G^+ PLFAs、G^- PLFAs的含量以及土壤有机质、全氮、全磷、速效氮、速效磷含量与PLFA种类随建植年限的增加呈先降低后升高的变化趋势; 随土层深度的增加呈降低趋势. 与土壤养分的相关分析表明, 各菌群PLFAs含量与土壤养分含量呈极显著正相关($P < 0.01$). 总PLFAs、B PLFAs、G^+ PLFAs和G^- PLFAs含量与土壤有机质、全氮、速效氮、全磷和速效磷含量均呈极显著正相关关系($P < 0.01$). 这与于树[15]和赵帅[44]等人的研究结果相似, 于树等通过研究长期不同施肥处理玉米地微生物群落和土壤养分发现, 微生物总PLFAs含量与土壤有机质和速效磷含量极显著正相关[15]; 赵帅等研究发现, 内蒙古针茅草原土壤总PLFAs、B PLFAs和G^+ PLFAs与土壤有机质、全磷含量均显著正相关[44]. 人工草地在建植初期合理的管理措施, 土壤养分含量和微生物PLFA含量相对稳定, 到中期人工草地出现退化现象, 但经过十几年的恢复演替, 地上和地下生物量增加, 腐殖质含量增大, 使土壤肥力和土壤质量得以改善, 有利于植被生长和有机质的积累, 从而使土壤微生物种类和含量增加, 土壤微生物群落结构趋于稳定. PLFA生物标记的多样性代表着微生物群落的多样性. 因此, 可以利用土壤微生物群落PLFA的组成和分布特征表征土壤质量和肥力的变化. 另外, 本研究由于选取的建植年限人工草地序列距离较远, 未能做建植前各样地的土壤养分本底调查, 这可能是本研究的不足之处.

参考文献 [References]

1 丁忠兵. 论三江源地区的生态地位与可持续发展[J]. 青海社会科学, 2006 (2): 45-50 [Ding ZB. On the ecological status and sustainable development in the Headwater Region of Three Rivers [J]. *Soc Sci Qinghai*, 2006 (2): 45-50]

2 冯瑞章, 周万海, 龙瑞军, 马玉寿, 齐文娟. 江河源区不同建植期人工草地土壤养分及微生物量磷和磷酸酶活性研究[J]. 草业学报, 2007, **16** (6): 1-6 [Feng RZ, Zhou WH, Long RJ, Ma YS, Qi WJ. Study on the changes of soil nutrient, microbial biomass P and neutral phosphatase activity of artificial grassland sown in different years in the headwaters of the Yangtze and Yellow Rivers [J]. *Acta Pratac Sin*, 2007, **16** (6): 1-6]

3 曹广民, 龙瑞军. 三江源区“黑土滩”型退化草地自然恢复的瓶颈及解决途径[J]. 草地学报, 2009, **17** (1): 4-9 [Cao GM, Long RJ. The bottleneck and its resolutions to the natural recovery of black soil type degraded grassland in the three river source [J]. *Acta Agrestia Sin*, 2009, **17** (1): 4-9]

4 王斌, 李洁, 姜微微, 赵亮, 古松. 草地退化对三江源区高寒草甸生态系统CO_2能量的影响及其原因[J]. 中国环境科学, 2012, **32** (10): 1764-1771 [Wang B, Li J, Jiang WW, Zhao L, Gu S. Impacts of the rangeland degradation on CO_2 flux and the underlying mechanisms in the Three-River Source Region on the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *China Environ Sci*, 2012, **32** (10): 1764-1771]

5 温璐, 董世魁, 朱磊, 施建军, 刘德梅, 王彦龙, 马玉寿. 环境因子和干扰强度对高寒草甸植物多样性空间分异的影响[J]. 生态学报, 2011, **31** (7): 1844-1854 [Wen L, Dong SK, Zhu L, Shi JJ, Liu DM, Wang YL, Ma YS. The effect of natural factors and disturbance intensity on spacial heterogeneity of plant diversity in alpine meadow [J]. *Acta Ecol Sci,* 2011, **31** (7): 1844-1854]

6 王长庭, 龙瑞军, 王启兰, 景增春, 施建军, 杜岩功, 曹广民. 三江源区高寒草甸不同退化演替阶段土壤有机碳和微生物量碳的变化[J]. 应用与环境生物学报, 2008, **14** (2): 225-230 [Wang CT, Long RJ, Wang QL, Jing ZC, Shi JJ, Du YG, Cao GM. Changes in soil organic carbon and microbial biomass carbon at different degradation successional stages of alpine meadows in the Headwater Region of Three Rivers in China[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14** (2): 225-230]

7 刘纪远, 徐新良, 邵全琴. 近30年来青海三江源地区草地退化的时空特征[J]. 地理学报, 2008, **63** (4): 364-376 [Liu JY, Xu XL, Shao QQ. The spatial and temporal characteristics of grassland degradation in the Three-River Headwaters Region in Qinghai province [J]. *Acta Geogr Sin*, 2008, **63** (4): 364-376]

8 赵新全, 周华坤. 三江源区生态环境退化, 恢复治理及其可持续发展[J]. 中国科学院院刊, 2006, **20** (6): 471-476 [Zhao XQ, Zhou HK.

Eco-environmental degradation vegetation regeneration and sustainable development in the head-waters of three rivers on Tibetan plateau [J]. *China Acad J Electr Publ House*, 2006, **20** (6): 471-476]

9 王学霞, 董世魁, 李媛媛, 李小艳, 温璐, 吴娱. 三江源区草地退化与人工恢复对土壤理化性状的影响[J]. 水土保持学报, 2012, **26** (4): 113-117 [Wang XX, Dong SK, Li YY, Li XY, Wen L, Wu Y. Effects of grassland degradation and artificial restoration on soil physicochemical properties in three-river headwater [J]. *J Soil Water Conserv*, 2012, **26** (4): 113-117]

10 董全民, 赵新全, 马玉寿, 代勇, 王启基, 施建军, 王柳英. 放牧强度对江河源区垂穗披碱草(*Elymus natans*)/星星草(*Puccinellia tenuflora*)混播草地群落和高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*)的影响[J]. 西北农业学报, 2006, **15** (2): 28-33 [Dong QM, Zhao XQ, Ma YS, Dai Y, Wang QL, Shi JJ, Wang LY. Effects of grazing intensity on mixed-sown community of *Elymus natans* and *Puccinellia tenuflora* and *Ochotona curzoniae* in Yangtze and Yellow River Headwater Region [J]. *Acta Agric Bor-occid Sin*, 2006, **15** (2): 28-33]

11 王长庭, 曹广民, 王启兰, 施建军, 杜岩功, 龙瑞军. 三江源地区不同建植期人工草地植被特征及其与土壤特征的关系[J]. 应用生态学报, 2007, **18** (11): 2426-2431 [Wang CT, Cao GM, Wang QL, Shi JJ, Du YG, Long RJ. Characteristics of artificial grassland plant communities with different establishment duration and their relationships with soil properties in the source region of Three Rivers in China [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2007, **18** (11): 2426-2431]

12 温军, 周华坤, 姚步青, 李以康, 赵新全, 陈哲, 连利叶, 郭凯先. 三江源区不同退化程度高寒草原土壤呼吸特征[J]. 植物生态学报, 2014, **38** (2): 209-218 [Wen J, Zhou HK, Yao BQ, Li YK, Zhao XQ, Chen Z, Lian LY, Guo KX. Characteristics of soil respiration in different degraded alpine grassland in the source region of Three-River [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2014, **38** (2): 209-218]

13 刘艳书, 樊江文, 李愈哲, 张良侠. 三江源地区不同剥蚀退化高寒草甸群落生物量与多样性特征[J]. 草业学报, 2014, **23** (3): 1-7 [Liu YS, Fan JW, Li YZ, Zhang LX. Plant community productivity and diversity on alpine meadow steppe in the Three River Headwater Region, Qinghai Province under different denudation levels [J]. *Acta Pratac Sin*, 2014, **23** (3): 1-7]

14 张莉, 党军, 刘伟, 王启兰, 向泽宇, 王长庭. 高寒草甸连续围封与施肥对土壤微生物群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2012, **23** (11): 3072-3078 [Zhang L, Dang J, Wang QL, Xiang ZY, Wang CT. Effects of continuous enclosure and fertilization on soil microbial community structure in alpine meadow [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2012, **23** (11): 3072-3078]

15 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): 4221-4227 [Yu S, Wang JK, Li SY. Effect of long-term fertilization on soil microbial community structure in corn field with the method of PLFA [J]. *Acta Ecol Sin*, 2008, **28** (9): 4221-4227]

16 颜慧, 蔡祖聪, 钟文辉. 磷脂脂肪酸分析方法及其在土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 土壤学报, 2006, **43** (5): 851-859 [Yan H, Cai ZC, Zhong WH. PLFA analysis and its applications in the study of soil microbial diversity [J]. *Acta Pedol Sin*, 2006, **43** (5): 851-859]

17 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法[J]. 应用生态学报, 2004, **15** (5): 899-904 [Zhong WH, Cai ZC. Methods for studying soil microbial diversity [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2004, **15** (5): 899-904]

18 王长庭, 龙瑞军, 王启兰, 刘伟, 景增春, 张莉. 三江源区不同建植年代人工草地群落演替与土壤养分变化[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15** (6): 737-744 [Wang CT, Long RJ, Wang QL, Liu W, Jing ZC, Zhang L. Community succession of differently aged artificial grasslands and their soil nutrient changes in three rivers' source regions in Qinghai, China [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, **15** (6): 737-744]

19 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 25-82 [Bao SD. Analysis of Agricultural Chemistry [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 25-82]

20 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 Biol Biochem*, 1993, **25** (6): 723-730

21 Bligh E, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canad J Biochem Phys*, 1959, **37** (8): 911-917

22 FrostegårdÅ, Tunlid A, Bååth, E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content [J]. *J Microb Meth*, 1991, **14** (3): 151-163

23 Frostegård Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil [J]. *Biol Fertil Soils*, 1996, **22** (1-2): 59-65

24 文倩, 林启美, 赵小蓉, 李贵桐, 赵沛一. 北方农牧交错带林地、耕地和草地土壤微生物群落结构特征的PLFA分析[J]. 土壤学报, 2008, **45** (2): 321-327 [Wen Q, Lin QM, Zhao XR, Li GT, Zhao PY. Application of PLFA analysis in determination of soil microbial community structure in woodland, cropland and grassland in farmland-pasture interleaving zone of north China [J]. *Acta Pedol Sin*, 2008, **45** (2): 321-327]

25 Zelles L. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities [J]. *Chemosphere*, 1997, **35** (1): 275-294

26 Zogg GP, Zak DR, Ringelberg DB, White DC, Macdonald NW, Pregitzer KS. Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming [J]. *Soil Sci Soc Am J*, 1997, **61** (2): 475-481

27 Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review [J]. *Biol Fertil Soils*, 1999, **29** (2): 111-129

28 Knoblauch C, Zimmermann U, Blumenberg M, Michaelis W, Pfeiffer EM. Methane turnover and temperature response of methane-oxidizing bacteria in permafrost-affected soils of northeast Siberia [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, **40** (12): 3004-3013

29 Myers RT, Zak DR, White DC, Peacock A. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems [J]. *Soil Sci Soc Am J*, 2001, **65** (2): 359-367

30 Zechmeister-Boltenstern S, Michel K, Pfeffer M. Soil microbial community structure in European forests in relation to forest type and atmospheric nitrogen deposition [J]. *Plant Soil*, 2011, **343** (1-2): 37-50

31 Yu M, Zeng G, Chen Y, Yu H, Huang D, Tang L. Influence of Phanerochaete chrysosporium on microbial communities and lignocellulose degradation during solid-state fermentation of rice straw [J]. *Proc Biochem*, 2009, **44** (1): 17-22

32 张焕军, 郁红艳, 丁维新. 长期施用有机无机肥对潮土微生物群落的影响[J]. 生态学报, 2011, **31** (12): 3308-3314 [Zhang HJ, Yu HY, Ding WX. The influence of the long-term application of organic manure and mineral fertilizer on microbial community in calcareous fluvo-aquic soil [J]. *Acta Ecol Sin*, 2011, **31** (12): 3308-3314]

33 王蓓, 孙庚, 罗鹏, 王志远, 张艳博, 吴宁, 罗光荣. 模拟升温和放牧对高寒草甸土壤微生物群落的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2011,

17 (2): 151-157 [Wang B, Sun G, Luo P, Wang ZY, Zhang YB, Wu N, Luo GR. Microbial communities of alpine meadow soil in the eastern Qinghai-Tibetan plateau subjected to experimental warming and grazing [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2011, **17** (2): 151-157]

34 Nüsslein K, Tiedje JM. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (8): 3622-3626

35 章家恩, 刘文高, 胡刚. 不同土地利用方式下土壤微生物数量与土壤肥力的关系[J]. 土壤与环境, 2002, **11** (2): 140-143 [Zhang JE, Liu WG, Hu G. The relationship between quantity index of soil microorganisms and soil fertility of different land use systems [J]. *Soil Environ Sci*, 2002, **11** (2): 140-143]

36 刘世贵, 葛绍荣, 龙章富. 川西北退化草地土壤微生物数量与区系研究[J]. 草业学报, 1994, **3** (4): 70-76 [Liu SG, Ge SR, Long ZF. Studies on soil microorganism numbers and microbiota of degenerated rangelands in Northwest Region of Sichuan. P. R. China [J]. *Acta Pratac Sin*, 1994, **3** (4): 70-76]

37 韩玉竹, 陈秀蓉, 王国荣, 杨成德, 徐长林. 东祁连山高寒草地土壤微生物分布特征初探[J]. 草业科学, 2007, **24** (4): 14-18 [Han YZ, Chen XR, Wang GR, Yang CD, Xu CL. Distribution characteristics of soil micro-organism in alpine grassland of Eastern Qilian Mountains [J]. *Pratac Sci*, 2007, **24** (4): 14-18]

38 胡雷, 王长庭, 王根绪, 马力, 刘伟, 向泽宇. 三江源区不同退化演替阶段高寒草甸土壤酶活性和微生物群落结构的变化[J]. 草业学报, 2014, **23** (3): 8-19 [Hu L, Wang CT, Wang GX, Ma L, Liu W, Xiang ZY. Changes in the activities of soil enzymes and microbial community structure at different degradation successional stages of alpine meadow in the headwater region of Three Rivers, China [J]. *Acta Pratac Sin*, 2014, **23** (3): 8-19]

39 Byss M, Elhottová D, Tříska J, Baldrian M. Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotusostreatus* and *Irpexlacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study [J]. *Chemosphere*, 2008, **73** (9): 1518-1523

40 Huang H, Zhang S, Wu N, Luo L. Influence of Glomusetunicatum/Zea mays mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure [J]. *Soil Biol Biochem*, 2009, **41** (4): 726-734

41 时鹏, 王淑平, 贾书刚, 高强, 孙晓强. 三种种植方式对土壤微生物群落组成的影响[J]. 植物生态学报, 2011, **35** (9): 965-972 [Shi P, Wang SP, Jia SG, Gao Q, Sun XQ. Effects of three planting patterns on soil microbial community composition [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2011, **35** (9): 965-972]

42 王启兰, 王长庭, 刘伟, 曹广民, 龙瑞军. 三江源区不同建植年限人工草地植物群落与土壤微生物生理类群的变化[J]. 应用生态学报, 2009, **20** (11): 2646-2651 [Wang QL, Wang CT, Liu W, Cao GM, Long RJ. Changes in plant communities and soil microbial physiological groups of artificial grasslands established for different years in headwater region of Yangtze River and Yellow River [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2009, **20** (11): 2646-2651]

43 蔡晓布, 钱成, 张元, 普琼. 西藏中部地区退化土壤秸秆还田的微生物变化特征及其影响[J]. 应用生态学报, 2004, **15** (3): 463-468 [Cai XB, Qian C, Zhang Y, Pu Q. Microbial characteristics of straw amended degraded soils in central Tibet and its effect on soil fertility [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2004, **15** (3): 463-468]

44 赵帅, 张静妮, 赖欣, 杨殿林, 赵建宁, 李刚, 邹雨坤. 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤微生物生物量碳、氮变化及微生物群落结构PLFA分析[J]. 农业环境科学学报, 2011, **30** (6): 1126-1134 [Zhao S, Zhang JN, Lai X, Yang DL, Zhao JN, Li G, Zou YK. Analysis of microbial biomass C, N and soil microbial community structure of stipe steppes using PLFA at grazing and fenced in Inner Mongolia, China [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2011, **30** (6): 1126-1134]