应用生态学报 2015年3月 第26卷 第3期
Chinese Journal of Applied Ecology, Mar. 2015, **26**(3): 739-746

氮水添加对中国北方草原土壤细菌多样性和群落结构的影响*

杨 山[1,2] 李小彬[2] 王汝振[2] 蔡江平[2] 徐柱文[2] 张玉革[1] 李 慧[2**] 姜 勇[2]
([1]沈阳大学环境学院, 沈阳 110044; [2]中国科学院沈阳应用生态研究所森林与土壤生态国家重点实验室, 沈阳 110016)

摘 要 研究了我国北方典型温带草原土壤细菌多样性和群落结构对氮水添加及环境因素的响应. 结果表明: 在常规降水条件下,土壤微生物生物量碳(MBC)和微生物生物量氮(MBN)均随氮(N)梯度增加而逐渐降低;在增加降水条件下,MBC 和 MBN 也随 N 梯度增加而降低,但降水增加削弱了 N 的抑制效应.在常规降水条件下,土壤细菌丰富度、Shannon 多样性和均匀度等 α-多样性指数随 N 梯度没有明显变化;增加降水条件下,各 N 梯度处理的土壤细菌 α-多样性指数都显著高于常规降水条件下相应的 N 处理梯度. 相关分析显示,土壤含水量、硝态氮(NO_3^--N)和铵态氮(NH_4^+-N)与土壤细菌均匀度指数呈显著负相关关系;MBC 和 MBN 与 Shannon 丰富度指数和均匀度指数呈显著正相关关系.土壤细菌群落非度量多维标度排序(NMDS)显示,在常规降水和增加降水处理下,土壤细菌群落结构均随 N 梯度增加发生明显改变.冗余分析(RDA)表明,MBC、MBN、pH 和 NH_4^+-N 是影响土壤细菌群落结构的重要环境因子.

关键词 温带草原; 细菌多样性; 细菌群落结构; 氮沉降; 降水
文章编号 1001-9332(2015)03-0739-08 **中图分类号** S154.1 **文献标识码** A

Effects of nitrogen and water addition on soil bacterial diversity and community structure in temperate grasslands in northern China. YANG Shan[1,2], LI Xiao-bing[2], WANG Ru-zhen[2], CAI Jiang-ping[2], XU Zhu-wen[2], ZHANG Yu-ge[1], LI Hui[2], JIANG Yong[2] ([1]*College of Environmental Science, Shenyang University, Shenyang* 110044, *China*; [2]*State Key Laboratory of Forest and Soil Ecology, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang* 110016, *China*). *-Chin. J. Appl. Ecol.*, 2015, **26**(3): 739-746.

Abstract: In this study, we measured the responses of soil bacterial diversity and community structure to nitrogen (N) and water addition in the typical temperate grassland in northern China. Results showed that N addition significantly reduced microbial biomass carbon (MBC) and microbial biomass nitrogen (MBN) under regular precipitation treatment. Similar declined trends of MBC and MBN caused by N addition were also found under increased precipitation condition. Nevertheless, water addition alleviated the inhibition by N addition. N addition exerted no significant effects on bacterial α-diversity indices, including richness, Shannon diversity and evenness index under regular precipitation condition. Precipitation increment tended to increase bacterial α-diversity, and the diversity indices of each N gradient under regular precipitation were much lower than that of the corresponding N addition rate under increased precipitation. Correlation analysis showed that soil moisture, nitrate (NO_3^--N) and ammonium (NH_4^+-N) were significantly negatively correlated with bacterial evenness index, and MBC and MBN had a significant positive correlation with bacterial richness and evenness. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination illustrated that the bacterial communities were significantly separated by N addition rates, under both water ambient and water addition treatments. Redundancy analysis (RDA) revealed that soil MBC, MBN, pH and NH_4^+-N were the key environmental factors for shaping bacterial communities.

Key words: temperate grassland; bacterial diversity; bacterial community structure; nitrogen deposition; precipitation.

* 中国科学院战略性先导科技专项(XDB15010000)和国家自然科学基金项目(41371251).
** 通讯作者. E-mail: huili@iae.ac.cn
2014-06-13 收稿,2015-01-01 接受.

温带草原是我国北方最重要的自然群落类型,在维持自然生态系统格局和功能方面有重要意义,对维持区域生态平衡和社会经济的可持续发展起着重要作用[1].由于全球气候变化导致大部分草地出现退化现象,大气 N 沉降和降水格局的改变[2]已严重破坏了草地生态系统.草地生态系统地上植被群落对气候变化和 N 沉降的响应已有较多的报道[3-6],研究表明,N 添加引起植物群落氮吸收量增加,并改变植物群落组成,同时使得土壤中来自于植物的碳源种类和数量发生改变.内蒙古多伦恢复生态学野外实验站 9 年野外试验结果显示,N 添加导致植被群落物种丰富度的变异显著增大;增加降水降低了植被群落盖度的变异系数,增加了植被群落的稳定性[7].尽管 N 和降水增加对草原生态系统地上植被的影响已有诸多报道,但其对土壤微生物生物群落结构和多样性影响方面尚缺乏系统研究.

土壤微生物是生态系统的重要组成部分,在陆地生态系统的物质循环和能量转化中占有重要地位[8].微生物对环境变化敏感,能很好地指示生态系统功能变化,是评价土壤环境质量的重要参数[9].土壤微生物生物量虽然只占土壤养分库的一小部分(其中以细菌含量最高,占 70%~90%[10]),但它既是养分的"库",又是养分的"源",具有较高的养分转化能力,是生态系统中物质循环和能量流动的重要推动者,也是影响土壤肥力和植物营养的重要参数[10-11].土壤微生物的进化与生态系统的进化具有协同性,能够指示生态系统功能的变化[11].N 添加或者增加降水能够对土壤微生物群落产生一定的影响,例如 Allison 等[12]研究显示,N 添加改变了土壤微生物群落多样性和结构组成;Treseder[13]发现,N 添加降低了土壤真菌丰度,尤其是丛枝菌根真菌的生物量,但会增加土壤细菌生物量;Evans 等[14]研究表明,增加降水显著改变草原土壤细菌群落结构.为深入研究我国北方温带草原生态系统氮水添加及其复合效应对土壤微生物群落结构的影响,本研究依托内蒙古多伦草原氮水添加实验平台,通过 16S rDNA-PCR-DGGE 技术,研究增加降水和不同浓度 N 添加对天然草原土壤细菌群落 α-多样性和群落结构的影响,以期为研究未来降水和 N 沉降变化对温带草原土壤生态系统的影响提供数据支撑.

1 研究区域与研究方法

1.1 研究地区概况

试验地位于内蒙古自治区锡林郭勒盟东南端的多伦县(41°46′—42°39′ N,115°55′—116°54′ E).该县的地形为四周高、中间低,南部高、北部低,浑善达克沙地环绕其北部,海拔 1150~1800 m.属于温带半干旱大陆性季风气候,年均气温 1.8 ℃,年均最高气温 9.1 ℃,年均最低气温-5 ℃.年均降水量 385.5 mm,其中 70% 集中在 6—8 月.土壤主要为栗钙土[15].

1.2 试验设计与采样

本试验样地为裂区设计,降水为主区因子,分为常规降水和增加降水 2 个主区域.在 2 个主区内进行不同的 N 添加处理,共计 4 个 N 添加水平(表 1),每个氮水平 7 个重复,每个主区共 28 个小区,随机排列,每个小区面积为 8 m×8 m,小区之间有 1 m 过道.N 添加处理施用尿素.增水从每年 6—8 月分 12 次进行,每周增水 1 次,每次 15 mm,每年共增水 180 mm,为全年降水量的 50 %.

本研究从各处理的 7 个重复中选取编号前 3 个重复进行微生物群落结构分析.2013 年 8 月上旬用直径 3 cm 土钻以 5 点混合法采集表层土壤(0~10 cm)样品.土样分为 2 份,一份用于理化性质测定,另一份于-20 ℃保存,用于土壤基因组 DNA 提取及其他指标的分析.

1.3 研究方法

1.3.1 DNA 提取与检测 称取 0.35 g 土壤样品,利用 MOBIO PowerSoil DNA 试剂盒(MOBIO,美国)提取土壤基因组 DNA.DNA 样品采用琼脂糖凝胶电泳(0.8%胶浓度)进行检测,并利用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计(Thermo,美国)对 DNA 的浓度和纯度进行测定.提取的基因组 DNA 置于 -20 ℃保存备用.

表 1 氮水处理小区编号列表
Table 1 List of plot code and corresponding treatments

处理 Treatment	增加降水 Increased precipitation				常规降水 Regular precipitation			
	对照 Control	低氮 Low N	中氮 Middle N	高氮 High N	对照 Control	低氮 Low N	中氮 Middle N	高氮 High N
施氮量 Nitrogen addition ($g\ N \cdot m^{-2} \cdot a^{-1}$)	0	5	10	15	0	5	10	15
编号 Plot code	WCK	WN_5	WN_{10}	WN_{15}	CK	N_5	N_{10}	N_{15}

1.3.2 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增　以土壤基因组 DNA 为模板，对 16S rRNA 基因 V3～V5 区进行 PCR 扩增.扩增引物为 GC-341F（5′-CGCCCGCCGCGC-CCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCCCTACGGG-AGGCAGCAG-3′）和 907R（5′-CCGTCAATTCMTTT-GAGTTT-3′），采用 50 μL 的 PCR 反应体系，其组成如下：5 μL 10×PCR 缓冲液（含 Mg^{2+}），4 μL dNTPs（各 2.5 mmol · L^{-1}），1 μL DNA 模板，上下游引物（10 μmol · L^{-1}）各 1 μL，0.4 μL rTaq 酶（Takara），最后用超纯水（ddH_2O）补足至 50 μL.设置不加模板的反应为阴性对照.PCR 反应程序为：94 ℃预变性 5 min，循环过程为：94 ℃ 1 min；72 ℃ 1 min（其中退火温度从 65 ℃ 开始，每个循环降低 1 ℃，共 20 个循环）；之后再进行 15 个循环（94 ℃ 1 min；45 ℃ 1 min；72 ℃ 1 min）；72 ℃ 10 min.

1.3.3 16S rDNA-PCR 产物 DGGE 分析　采用 Bio-Rad Dcode™突变检测系统（Bio-Rad Laboratories，美国）进行细菌 16S rDNA-PCR 产物的 DGGE 分析.聚丙烯酰胺凝胶（37.5∶1）浓度为 6%，变性剂梯度为 40%～70%［100%的变性剂含有 7 mol · L^{-1}尿素和 40%（V/V）的去离子甲酰胺］，电泳缓冲液为 1×TAE.电泳条件为：70 V 电压，60 ℃电泳 16 h.电泳结束后用 Genefinder 染色 30 min，然后用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统观察样品的电泳条带并拍照.

1.3.4 土壤理化指标测定　采用元素分析仪测定土壤全氮（TN）和全碳（TC）；采用氯仿熏蒸浸提法测定土壤微生物生物量碳（MBC）、氮（MBN），采用 0.5 mol · L^{-1}硫酸钾（土∶液＝1∶4）提取，利用 TOC 仪（High TOC，Elementar）测定；pH 采用酸度计（土∶水＝1∶2.5）测定；土壤全磷（TP）采用 $HClO_4$-H_2SO_4 法提取，钼锑抗比色法测定；含水量采用 105 ℃连续烘干 24 h 称量计算；土壤铵态氮（NH_4^+-N）和硝态氮（NO_3^--N）采用 2 mol · L^{-1}KCl 溶液（土∶液＝1∶5）提取，流动分析仪 AutoAnalyser III 测定.

1.4　数据处理

利用图像分析软件 Quantity One 分析 DGGE 图谱，手动添加被软件忽略的条带，条带的密度由软件自动算出.利用 DGGE 图谱的数字化输出结果计算土壤样品细菌 α-多样性指数.Shannon 多样性指数（H）计算公式为：$H=-\sum P_i \ln P_i$；Evenness 均匀度指数（J）计算公式为：$J=H/H_{max}$，$H_{max}=\ln S$.其中：P_i 为第 i 条带净光密度值与该群落所有条带的净光密度值总和的比率；S 为条带总数.条带数 N＝平均值±标准差（条带数和标准差均取整数）.利用 SPSS 16.0 统计分析软件中的双因素方差分析（two-way ANOVAs）检测水因子（W）、氮因子（N）和氮水交互作用（W×N）对微生物生物量和细菌 α-多样性的影响；运用 Spearman 相关分析检测环境因子与多样性指数的相互关系.利用 PRIMER 6.0 软件包中的多维尺度转换排序（non-metric multidimensional scaling，NMDS），基于群落 Jaccard 距离矩阵进行细菌群落结构排序，采用 Cluster 对细菌群落结构进行聚类分析.利用 Canoco 软件中 Biplot of redundancy analysis（RDA）数据包分析环境因素对细菌群落结构变异解释程度，数据采用细菌 DGGE 条带的相对丰度，数据分析前进行 lg（X+1）转换，然后通过蒙特卡罗置换检验（Monte Carlo permutation test）分析环境变量对土壤细菌群落变异解释度的显著性（$\alpha=0.05$）.

2　结果与分析

2.1　氮水添加对土壤微生物生物量的影响

在常规降水条件下，不同浓度 N 添加均显著降低了土壤微生物生物量碳（MBC）、氮（MBN）（表 3，图 1）.随着 N 浓度增加，低氮（N_5）、中氮（N_{10}）、高氮（N_{15}）处理的土壤 MBC 分别降低了 20%、34% 和 49%，MBN 分别降低了 38%、54% 和 62%.增加降水减缓了 N 对微生物生物量的抑制效应.与常规降水处理相比，增加降水使土壤 MBC 和 MBN 显著增

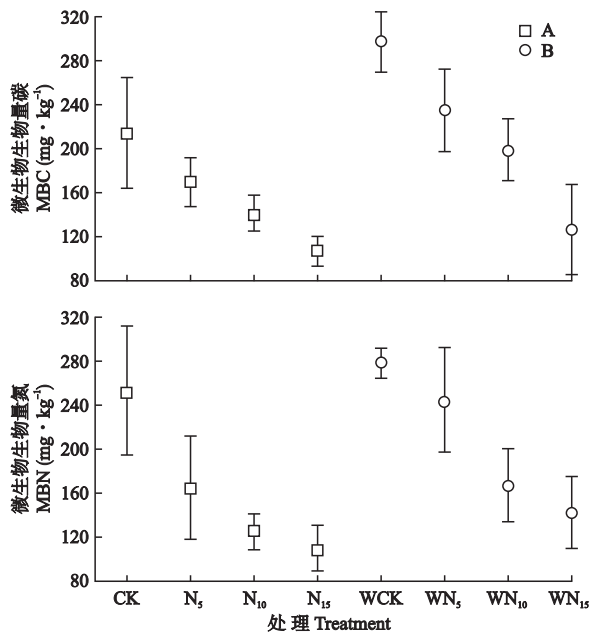

图 1　不同处理土壤微生物生物量

Fig.1　Soil microbial biomass under different treatments.

A：常规降水 Regular precipitation；B：增加降水 Increased precipitation. 下同 The same below.

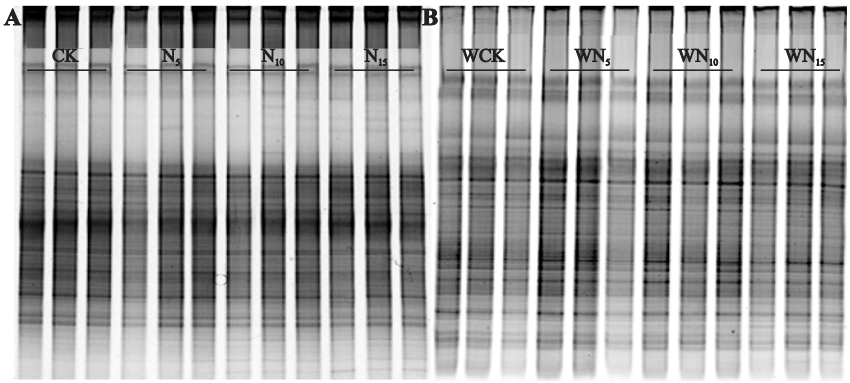

图 2 温带草原氮水添加处理土壤细菌 16S rRNA 基因 DGGE 指纹图谱

Fig.2 DGGE profile of soil bacterial 16S rRNA genes in temperate grassland treated with nitrogen and water addition.

加,分别增加了 18%~41%和 11%~56%.

2.2 氮水添加对土壤细菌 α-多样性的影响

16S rRNA 基因 PCR 产物条带明亮清晰,无非特异性扩增,阴性对照没有出现扩增条带,片段大小约为 600 bp.由 DGGE 图谱(图 2)可知,不同处理间条带数目和亮度存在差异.图 2A 中,CK、N_5、N_{10}和 N_{15}分别有 30、27、30 和 32 条条带(表 2);图 2B 中,WCK、WN_5、WN_{10}和 WN_{15}分别有 41、39、36 和 34 条条带(表 2).总体来说,增加降水显著提高了细菌群落的丰富度指数(条带数 *N*).根据条带数和条带相对亮度计算得到的细菌群落 α-多样性指数(表 2)表明,在常规降水处理下,土壤细菌丰富度指数和 Shannon 指数随 N 梯度呈现先降低后增加的趋势,N_5 与 N_{15}处理之间有显著差异($P<0.05$),Evenness 指数随着 N 添加量的增加而显著降低.增加降水条件下,各 N 梯度处理的土壤细菌 Shannon 和 Evenness 指数都显著高于常规降水条件下相应的 N 处理梯度.与自然降水处理相比,*H* 值增加了 0.27~0.41,*J* 值达到 0.99.

表 2 不同氮水添加处理细菌群落 α-多样性指数

Table 2 α-diversity indices of soil bacterial communities treated with nitrogen and water addition

处理 Treatment		条带数 *N*	Shannon 指数 *H*	均匀度指数 *J*
常规降水	CK	30±2	3.32±0.08	0.983±0.001
Regular	N_5	27±2	3.15±0.11	0.979±0.010
precipitation	N_{10}	30±3	3.30±0.11	0.965±0.025
	N_{15}	32±2	3.40±0.03	0.950±0.011
增加降水	WCK	41±3	3.62±0.06	0.997±0.001
Increased	WN_5	39±2	3.65±0.18	0.990±0.013
precipitation	WN_{10}	36±2	3.71±0.06	0.990±0.014
	WN_{15}	34±2	3.67±0.10	0.990±0.015

ANOVA 分析结果表明,N 添加对细菌多样性指数的影响不显著;而增加降水显著改变了土壤微生物生物量和细菌多样性指数(表 3).土壤环境变量与细菌多样性指数的相关分析表明(表 4),土壤含水量与条带数和 Shannon 指数均呈显著正相关;NO_3^--N和 NH_4^+-N 与均匀度指数呈显著负相关;MBC 和 MBN 与条带数和均匀度指数都呈显著正相关.

2.3 氮水添加对土壤细菌群落结构的影响

非度量多维标度(NMDS)排序结果显示,在常规降水处理下,图 3A 中细菌群落结构按 N 添加梯度分为 4 个组群,每个 N 处理浓度的土壤细菌群落分别聚为 1 个组群;而增加降水处理中,图 3C 中添加不同 N 浓度的细菌群落则明显聚为 2 个组群,其中 WCK 和低 WN_5 处理的细菌群落聚为一组,WN_{10}和 WN_{15}处理的细菌群落聚为另一组.从图 3 可以看出,常规降水和增加降水各 N 梯度处理的 Cluster 聚类分析树(图 3B、D)与 NMDS 排序(图 3A、C)结果一致.上述结果表明氮水添加改变了土壤细菌群落结构.

表 3 氮水添加对土壤微生物生物量和细菌 α-多样性指数影响的双因素方差分析

Table 3 Two-way ANOVA of the effects of nitrogen and water addition on microbial biomass and bacterial α-diversity indices

	微生物生物量碳 MBC	微生物生物量氮 MBN	条带数 *N*	Shannon 指数 *H*	均匀度指数 *J*
W	25.97***	12.55**	91.72***	77.06***	31.44***
N	27.84***	24.64***	2.685	2.015	2.443
W×N	1.461	0.933	7.433**	1.653	3.487*

*$P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

表 4　土壤理化性质和细菌 α-多样性指数的相关系数

Table 4　Correlation coefficients between soil properties and bacterial α-diversity indices

多样性指数 Diversity index	微生物生物量碳 MBC	微生物生物量氮 MBN	全碳 TC	全氮 TN	碳氮比 C/N	全磷 TP	pH	含水量 Moisture	铵态氮 NH_4^+-N	硝态氮 NO_3^--N
条带数 *N*	0.52**	0.48*	0.25	0.32	−0.2	0.27	0.13	0.46*	−0.23	−0.37
Shannon 指数 *H*	0.22	0.18	0.41*	0.44*	−0.04	0.46*	−0.24	0.56**	−0.06	−0.25
均匀度指数 *J*	0.49*	0.56**	0.35	0.44*	−0.29	0.46*	0.2	0.37	−0.68**	−0.48*

* $P<0.05$; * * $P<0.01$.

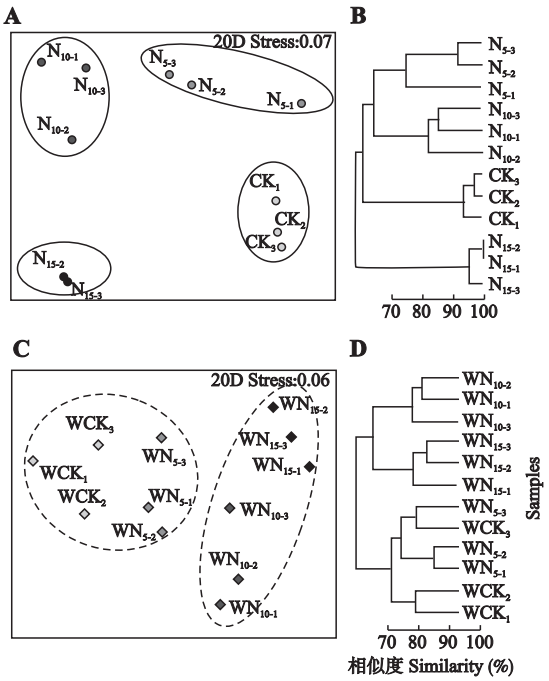

图 3　细菌群落相似性的非度量多维标度排序（A，C）和 Cluster 聚类分析（B，D）

Fig.3　NMDS plot of bacterial communities (A, C) and Cluster (B, D) analysis of the community composition of bacteria.

2.4　细菌群落结构的驱动因子

在常规降水条件下，环境因素对土壤细菌群落结构的 RDA 分析显示，两轴共解释了细菌群落结构变异的 57.5%（图 4A）. N_5、N_{10} 以及 N_{15} 处理的细菌群落结构较 CK 有明显改变，CK 和 N_5 处理分布在第一排序轴正方向，N_{10} 和 N_{15} 处理分布在第一排序轴负方向，表明 N 添加是第一轴分异的主要影响因素. MBC、MBN 和 pH 排序与第一排序轴呈正相关，NH_4^+-N 和 NO_3^--N 排序与图 4A 第一排序轴呈负相关. 蒙特卡罗检验显示 MBC、MBN、pH、NO_3^--N 和 NH_4^+-N 对细菌群落结构改变效应显著（表 5），而 TC、TN、TP、M 和 C/N 对细菌群落结构改变效应不显著.

增加降水条件下，土壤细菌群落结构随 N 梯度增加也表现出了明显的变异（图 4B），两轴共解释了细菌群落结构变异的 57.4%. WCK 和 WN_5 处理分布在第一排序轴正方向，WN_{10} 和 WN_{15} 处理分布在第一排序轴负方向，同样表明 N 添加是第一轴分异的主要影响因子. MBC、MBN 和 pH 排序与第一排序轴呈正相关；NH_4^+-N 和 NO_3^--N 排序与第一排序轴呈负相关，NH_4^+-N 与第二排序轴呈负相关，NO_3^--N 与第二排序轴呈正相关. 蒙特卡罗检验显示，MBC、MBN、pH、TP 和 NH_4^+-N 对细菌群落结构改变效应显著（$P<0.05$，表 5），TC、TN、NO_3^--N、M 和 C/N 对细菌群落结构改变效应不显著.

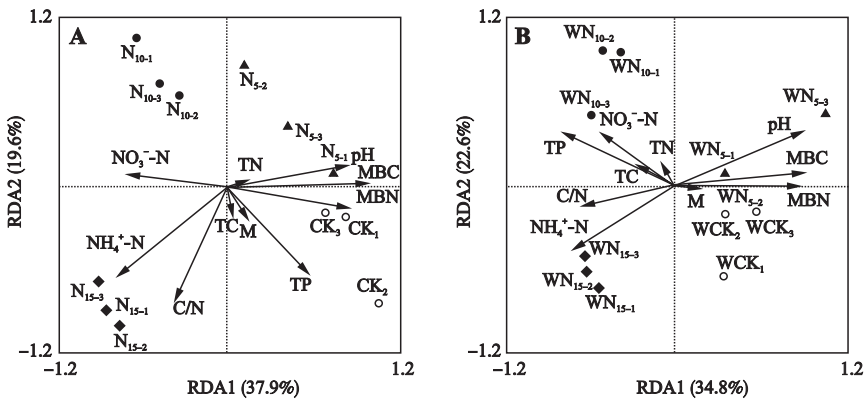

图 4　环境因素对土壤细菌群落结构特征影响的冗余分析

Fig.4　Redundancy analysis (RDA) of soil bacterial community structure and environmental factors.

M：含水量 Moisture.

表 5 RDA 分析中土壤环境因素对土壤细菌群落变异解释的百分比和蒙特卡罗置换检验结果

Table 5 Percentage of variation in soil bacterial community explained by soil environmental factors in redundancy analysis and Monte Carlo permutation test results

环境因子 Environmental factor	常规降水 Regular precipitation		增加降水 Increased precipitation	
	%	*P*	%	*P*
微生物生物量碳 MBC	31.8	0.002	26.9	0.002
微生物生物量氮 MBN	25.5	0.004	24.0	0.010
全碳 TC	4.9	0.942	4.9	0.861
全氮 TN	3.7	0.931	4.0	0.942
碳氮比 C/N	14.7	0.144	15.0	0.108
全磷 TP	16.9	0.066	21.4	0.010
pH	24.5	0.014	27.5	0.004
含水量 Moisture	4.0	0.889	5.0	0.850
铵态氮 NH_4^+-N	24.7	0.006	20.4	0.028
硝态氮 NO_3^--N	19.7	0.042	13.0	0.180

3 讨 论

3.1 土壤微生物生物量和细菌 α-多样性对氮水添加及环境因素的响应

有研究发现,N 添加显著降低了土壤 MBC 和 MBN (表 3,图 1).其原因可能是在 pH 值偏离中性时,土壤细菌生长受抑制,造成土壤 MBC 和 MBN 含量降低[16],从而改变土壤细菌多样性.此外,氮水添加促进了植物生长,植物吸 N 量增加,原有的植物-微生物竞争模式被打破,植物在与微生物竞争土壤养分和水分资源中占据优势,土壤微生物生长繁殖受到限制,从而导致 MBC 和 MBN 含量降低[17-18].在该氮水添加实验平台上开展的前期研究工作也表明,氮水添加使得地上植被的盖度、生物量和生产力都有不同程度增加[7],体现出植物对土壤微生物具有竞争优势,土壤微生物生长受到限制,导致土壤微生物生物量在 N 添加处理中进一步降低.此外,本研究还发现,增加降水显著增加了 MBC 和 MBN,与之前干旱-半干旱地区的研究结果一致.Dijkstra 等[19]在美国中部科罗拉多州矮草草原的研究发现,增加降水可以增加土壤 MBN,增强土壤呼吸.本研究[15]和 Dijkstra 等[19]研究的地域年降水量都低于 400 mm,由于受到水分限制,土壤微生物生长受到抑制,增水后土壤水分状况得到改善,土壤微生物大量增长繁殖,土壤微生物生物量增加[3,16].

本研究结果表明,在半干旱草原生态系统常规降水条件下,N 添加对土壤细菌丰富度指数、Shannon 指数和均匀度指数影响均不显著(表 3).而 Ramirez 等[20]研究显示,N 添加显著降低土壤细菌丰度,Freitag 等[21]研究草地土壤微生物对外源 N 输入的响应中,同样发现施 N 不利于提高草原土壤微生物 α-多样性.这些研究结果的差异可能是由于多种原因导致的:可能是由于草原类型和采样时间不同造成的,地理位置和气候类型不同也会导致地域生态系统对 N 和水的敏感性不同.此外,研究方法的差异也可能是导致研究结果不一致的原因,Ramirez 等[20]采用罗氏 454 测序的方法调查细菌群落结构,而 Freitag 等[21]和本研究采用 16S rDNA-PCR-DGGE 方法.相关分析表明,土壤微生物多样性对氮水添加的响应与土壤理化性质的变化是密切相关的.本研究发现,土壤细菌丰富度指数(条带数)和均匀度指数与土壤 NO_3^--N 和 NH_4^+-N 呈显著负相关关系(表 4),其原因可能为:N 添加后土壤 NO_3^--N 和 NH_4^+-N 浓度增加[16],土壤中游离 N 离子增多,土壤中 N 营养增多,导致土壤中参与 N 循环的细菌类群丰度显著增加[22],造成群落均匀度指数降低.其次,土壤中的 NO_3^--N 和 NH_4^+-N 增加导致土壤酸化[16,22],而通常认为土壤细菌群落在中性 pH 条件下更趋于均一,丰富度和多样性也越高[23].但本研究并未发现土壤微生物多样性与 pH 值之间的显著相关关系,可能是本研究中的 pH 值变化范围较窄.

增加降水能够显著增加土壤细菌多样性(表 2).Evans 等[14]研究表明,增加降水显著改变了土壤细菌丰富度.在半干旱地区,增加降水使水限制得到缓解,土壤细菌种类和数量均不同程度增加,导致土壤细菌 α-多样性指数增加[13-14].本研究相关分析也表明,含水量与土壤细菌 Shannon 指数和条带数呈显著正相关关系(表 4).

3.2 土壤细菌群落结构对氮水添加及环境因素的响应

土壤细菌群落结构对 N 添加的响应规律在常规降水和增加降水条件下不同.在常规降水条件下,N 添加更强烈地改变了土壤细菌群落结构.之前诸多研究也发现,在半干旱地区,N 添加可以显著影响土壤中大多数微生物的生长发育,从而有选择性地改变土壤微生物群落结构[17,20,24].而在降水增加条件下,氮水复合施用对草原土壤细菌群落结构的影响没有单独 N 添加剧烈 (图 3B、D).Zhang 等[25]的研究也表明,在氮水复合处理中,水与 N 对土壤细菌群落的影响存在相反的作用,N 添加通过改变土壤 pH 间接影响土壤细菌群落结构,而增加降水通过改变土壤 pH 和含水量来改变土壤细菌群落结构.在半干旱草原生态系统中,N 和水是生态系统两个

限制性因子[3,14].这两种因子对微生物群落影响的相反作用可能是直接原因和间接原因共同导致的.直接原因是增加降水增加了 N 的淋溶,从而降低了 N 对土壤微生物群落的影响;间接原因为增加降水促进了地上植被的生长,从而带走土壤中大量的速效氮,从而削弱了 N 对微生物群落的效应[25].此外,RDA 分析表明,在常规降水条件下,NH_4^+-N 和 NO_3^--N 是影响土壤细菌群落结构的重要环境变量(图 4A);而在增加降水条件下,NO_3^--N 对土壤细菌群落结构的影响消失了(图 4B),其原因可能是:NO_3^--N 在土壤中更易扩增并淋溶[26];另一方面,NO_3^--N 更利于植物吸收[19],因此,在增水条件下,NO_3^--N 对微生物群落的影响减弱.

气候模拟研究预示中国北方草原地区降水量和 N 沉降将会增加[27-28].在此背景下,研究草原土壤细菌多样性和群落结构对氮水添加的响应,对研究未来气候变化对草地生态系统多样性格局和功能稳定性的影响具有重要参考意义.目前的工作未涉及土壤微生物群落中另一个重要的组成部分——土壤真菌,其在土壤养分循环和维持生态系统功能过程中也发挥着不可忽视的作用.在以后的工作中,将进一步探讨真菌群落对氮水添加的响应.此外,近年来,高通量测序技术在微生物生态学研究中的应用越来越广泛,使得微生物群落结构的分析得以在广度和深度上进行.在未来的工作中,将考虑采用该技术对土壤微生物群落进行深度分析,并期望得到土壤微生物群落对气候变化响应更为细致和全面的信息.

参考文献

[1] Luo M (罗　明), Qiu W (邱　沃). The ecological distribution of soil microorganisms in desert saline grassland in Xinjiang. *Grassland of China* (中国草地), 1995(5): 29-30 (in Chinese)

[2] IPCC. Climatic Change 2007: The Physical Science Basis. Cambridge: Cambridge University Press, 2007

[3] Yang H, Wu M, Liu WX, *et al*. Community structure and composition in response to climate change in a temperate steppe. *Global Change Biology*, 2011, **17**: 452-465

[4] Yang H, Li Y, Wu M, *et al*. Plant community responses to nitrogen addition and increased precipitation: The importance of water availability and species traits. *Global Change Biology*, 2011, **17**: 2936-2944

[5] Clark CM, Tilman D. Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. *Nature*, 2008, **451**: 712-715

[6] Henriksen TM, Breland TA. Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**: 1121-1134

[7] Xu ZW, Wan S, Ren H, *et al*. Effects of water and nitrogen addition on species turnover in temperate grasslands in northern China. *PloS ONE*, 2012, **7**: e39762

[8] Yu S (俞　慎), Li Y (李　勇), Wang J-H (王俊华), *et al*. The discussion about soil microbial biomass as biological indicators of red soil quality. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 1999, **36**(3): 413-422 (in Chinese)

[9] Lejon DPH, Chaussod R, Ranger J, *et al*. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil. *Microbial Ecology*, 2005, **50**: 614-625

[10] Zhang W (张　薇), Wei H-L (魏海雷), Gao H-W (高洪文), *et al*. Advances o f studies on soil microbial diversity and environmental impact factors. *Chinese Journal of Ecology* (生态学杂志), 2005, **24**(1): 48-52 (in Chinese)

[11] Yang C-D (杨成德), Rong R-J (龙瑞军), Chen X-R (陈秀蓉), *et al*. Study on microbial biomass and its correlation with the soil physical properties under the alpine grassland of the east of Qilian Mountains. *Acta Prataculturae gica Sinica* (草业学报), 2007, **16**(4): 62-68 (in Chinese)

[12] Allison SD, Lu Y, Weihe C, *et al*. Microbial abundance and composition influence litter decomposition response to environmental change. *Ecology*, 2013, **94**: 714-725

[13] Treseder KK. Nitrogen additions and microbial biomass: A meta-analysis of ecosystem studies. *Ecology Letters*, 2008, **11**: 1111-1120

[14] Evans SE, Wallenstein MD. Climate change alters ecological strategies of soil bacteria. *Ecology Letters*, 2014, **17**: 155-164

[15] Bai W-M (白文明), Li L-H (李凌浩), Song S-H (宋世环). Analyses on the status quo of water resources utilization in Duolun County of Inner Mongolia. *Journal of Arid Land Resources and Environment* (干旱区资源与环境), 2001, **15**(4): 63-67 (in Chinese)

[16] Wang R, Filley TR, Xu Z, *et al*. Coupled response of soil carbon and nitrogen pools and enzyme activities to nitrogen and water addition in a semi-arid grassland of Inner Mongolia. *Plant and Soil*, 2014, **381**: 323-336

[17] Wei C, Yu Q, Bai E, *et al*. Nitrogen deposition weakens plant-microbe interactions in grassland ecosystems. *Global Change Biology*, 2013, **19**: 3688-3697

[18] Kaye JP, Hart SC. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 1997, **12**: 139-143

[19] Dijkstra FA, Augustine DJ, Brewer P, *et al*. Nitrogen cycling and water pulses in semiarid grasslands: Are microbial and plant processes temporally asynchronous. *Oecologia*, 2012, **170**: 799-808

[20] Ramirez KS, Craine JM, Fierer N, *et al*. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change*

Biology, 2012, **18**: 1918-1927

[21] Freitag TE, Chang L, Clegg CD, *et al*. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**: 8323-8334

[22] Chen D, Lan Z, Bai X, *et al*. Evidence that acidification-induced declines in plant diversity and productivity are mediated by changes in belowground communities and soil properties in a semi-arid steppe. *Journal of Ecology*, 2013, **101**: 1322-1334

[23] Lauber CL, Hamady M, Knight R, *et al*. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**: 5111-5120

[24] Barabasz W, Albińska D, Jaskowska M, *et al*. Biological effects of mineral nitrogen fertilization on soil microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2002, **11**: 193-198

[25] Zhang X, Wei H, Chen Q, *et al*. The counteractive effects of nitrogen addition and watering on soil bacterial communities in a steppe ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, **72**: 26-34

[26] Lambers H, Chapin FS, Pons TL, *et al*. Plant Physiological Ecology. New York: Springer, 2008

[27] Gao XJ, Zhao ZC, Ding YH, *et al*. Climate change due to greenhouse effects in China as simulated by a regional climate model. *Advances in Atmospheric Sciences*, 2001, **18**: 1224-1230

[28] Zhang Y, Zheng LX, Liu XJ, *et al*. Evidence for organic N deposition and its anthropogenic sources in China. *Atmospheric Environment*, 2008, **42**: 1035-1041

作者简介 杨 山,男,1987 年生,硕士研究生.主要从事土壤微生物生态研究. E-mail: ys210017@ 126.com

责任编辑 肖 红