

宏基因组方法揭示草地土壤微生物群落响应全球变化

杜雄峰^{1,2} 于皓^{1,3} 王尚¹ 邓晔^{1,2*}

(¹中国科学院生态环境研究中心中国科学院环境生物技术重点实验室, 北京 100085; ²中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049; ³辽宁工程技术大学环境科学与工程学院, 辽宁阜新 123000)

摘要 草地在生物圈中发挥着重要的生态服务功能, 而草地土壤微生物又是维持生态系统功能和稳定的关键要素之一。过去十几年间, 宏基因组方法的进步为微生物群落分析提供了有力的工具。本文综述了宏基因组方法应用于草地土壤微生物群落响应全球变化的最新研究进展, 特别是针对气候变化、大气组成变化、土地利用方式改变和外来物种入侵等条件下微生物群落的响应规律和反馈机制的研究。这些研究对于我们认识和了解微生物群落的生态功能十分重要, 同时也对维持地球生态系统平衡具有积极的意义。最后, 我们对未来应用宏基因组方法研究草地微生物群落进行了展望。

关键词 草地生态系统; 微生物多样性; 宏基因组学; 反馈

Metagenomics reveal responses of soil microbial community in grassland to global changes.

DU Xiong-feng^{1,2}, YU Hao^{1,3}, WANG Shang¹, DENG Ye^{1,2*} (¹CAS Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; ²College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³School of Environmental Science and Engineering, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, Liaoning, China).

Abstract: Grasslands play significant ecological roles in the biosphere. Soil microorganisms are a key factor in maintaining the function and stability of grasslands. Over the past decade, metagenomic technologies have provided new tools for analyzing microbial communities in various ecosystems. Here, we summarized the applications of metagenomics in grasslands. The latest progresses in the responses of soil microbial community to global change, especially climate change, atmospheric composition change, land use change, and exotic species invasion, are included. These studies are of great importance for fully improving our understanding of the ecological functions of soil microbial community in grasslands, and their significance in maintaining the balance of biosphere. Finally, we provide some prospective on the application of metagenomic tools in studying soil microbial communities in grasslands.

Key words: grassland ecosystem; microbial diversity; metagenomics; feedback.

草地广泛分布于各大洲, 覆盖约超过 40% 的陆地面积, 是地球上主要的陆地生态系统之一 (Monson, 2014), 为植物、动物和微生物提供了重要的栖息地。作为草地生态系统的重要组成部分, 草地土

壤承担了保存生物多样性和调节气候等重要的生态系统服务功能, 而这些功能是人类社会和生态系统和谐发展的关键枢纽 (Díaz *et al.*, 2015), 因此维持这种稳定的生态功能对人类社会的可持续发展具有重要的意义 (Kohler *et al.*, 2017)。然而, 由于持续的人类活动加强和剧烈的全球环境变化, 草地生态系统的各种功能正在和即将受到严重的威胁。全球环境变化主要指世界范围内的外界环境因素的大规

国家重点研发计划项目 (2016YFC0500702)、中国科学院前沿科学重点研究项目 (QYZDB-SSW-DQC026) 和中国科学院“百人计划”项目资助。

收稿日期: 2019-01-29 接受日期: 2019-06-25

* 通讯作者 E-mail: yedeng@rcees.ac.cn

模变化 (Steffen *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2016)。这种变化不仅包括大气 CO₂ 浓度的持续升高, 也包括由其引发的全球温度升高, 进而造成的降水格局发生改变; 同时, 还涵盖了土地利用方式和强度的改变, 如草地转变为耕地等; 此外, 外来物种入侵 (如: 木本植物侵入) 以及其他环境因子的剧烈变化也都对生态系统构成了新的威胁。全球环境的变化对草地生态系统最显著的影响, 是改变了地上植物群落的覆盖度、丰度和物种组成等。由于草地生态系统一直面临着持续的环境压力, 所造成的变化将同样对地下微生物群落产生直接或间接的影响。土壤微生物群落作为评估草地生态系统稳定和土壤质量的重要指标 (Schloter *et al.*, 2018), 能够以改变群落结构和功能等方式对环境变化作出响应, 而这种响应及其产生的正面或负面的反馈效应可能会对生态系统产生深远的影响。考虑到土壤微生物群落在维持生态系统服务方面的关键作用, 近年来, 人们日益对全球变化对地下微生物的影响产生了浓厚的兴趣 (Bardgett *et al.*, 2014)。然而, 鉴于研究方法手段的局限, 评估这些环境压力如何影响草地土壤微生物群落也是一项重大的科学挑战。宏基因组方法的进步提高了研究复杂微生物群落组成和动态变化的能力, 为微生物群落研究提供了有力的工具和方法。

1 草地土壤微生物群落

1.1 草地土壤微生物群落

土壤微生物群落中的微生物物种繁多, 主要包含细菌、古菌、真菌、原生动物等 (Torsvik *et al.*, 2002; Paul, 2014)。据估计, 1 g 土壤中所包含的微生物数量达几十亿到几百亿个, 被称作看不见的大多数 (Tringe *et al.*, 2005; van der Heijden *et al.*, 2008; Bardgett *et al.*, 2014)。由于土壤微生物群落往往庞大而复杂, 因此被认为是地球上微生物群落研究的热区。土壤微生物在生态系统功能中的作用早已被认识, 在养分循环、土壤肥力维持和土壤固碳等关键生态过程方面扮演重要的角色 (Richardson *et al.*, 2009; Martiny *et al.*, 2011; 刘洋荧等, 2017; 王朱珺等, 2018), 对草地生态系统的稳定性与可持续性有着直接和间接的影响。例如, 菌根群落是植物和土壤系统的重要组成部分, 其与植物的共生关系为植物提供营养, 促进生长, 增加植物耐受性从而恢复生态系统功能维持系统稳定 (Barea *et al.*, 2005)。土壤微生物对环境扰动十分敏感, 由于环境剧烈变

化造成了土壤微生物群落的波动, 改变了微生物的多样性和功能, 进而使草地的生态系统功能产生了变化。因此, 确定微生物群落对环境变化的响应是确定草地生态系统功能结构的重要步骤 (McGuire *et al.*, 2010; Zak *et al.*, 2011; Wallenstein *et al.*, 2012), 而理解全球变化环境因子对微生物群落多样性的扰动才能进而优化生态系统的管理 (Wang *et al.*, 2018b)。此外, 只有将栖息地内不同微生物的特性与它们在该环境中承载的生态功能联系起来 (Zhou *et al.*, 2015), 才能了解微生物群落对环境变化的响应, 进而推导这些响应所产生的生态效应, 最终为预测、恢复和维持草地生态系统功能提供科学的依据。

1.2 宏基因组方法

环境宏基因组方法 (Meta-genomics) 是指对环境中的总 DNA 进行提取、检测和分析来反映特定环境中微生物群落的组成、结构和 (或) 代谢状况 (Handelsman *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2012), 其优点是可以跨过微生物分离和纯培养阶段, 以基因组为基础的物种遗传物质为研究对象, 进而揭示环境中存在的全部微生物的遗传组成和群落功能, 建立这些微生物物种与其他生物或与环境之间的关系 (Gupta *et al.*, 2011; 邓晔等, 2016)。在多种宏基因组检测方法中, 基于测序检测的高通量测序技术和基于 DNA 杂交检测的基因芯片技术, 是当前应用最为广泛的技术手段 (表 1)。目前使用的高通量测序技术包含针对扩增子的二代测序技术 (Amplicon sequencing) 和针对整体宏基因组的鸟枪测序技术 (Shotgun) (Eisen, 2007; Schuster, 2007)。第二代扩增子测序技术针对的是基因组中分子标记片段 (例如 16S 核糖体 RNA 基因、真核核糖体 RNA 间隔区 ITS 等), 它能够以较低的测序成本集中地检测微生物的物种信息, 具有较高的准确性, 是目前应用最多的测序技术 (Liu *et al.*, 2012); 而鸟枪法宏基因组测序能够检测包含物种信息在内的所有遗传信息, 具有更好的识别和鉴定物种遗传功能的能力 (Sharp-ton, 2014)。基因芯片是针对功能基因和系统发育标记而开发的一种高通量的 DNA 检测技术, 能够快速、准确地检测微生物群落的组成和功能, 具有目标集中、识别度高的特点。而根据基因芯片上包含的信息主要包括两种, 系统发育芯片 (PhyloChip) 和功能基因芯片 (GeoChip) (He *et al.*, 2007)。此外, 其他非基于测序的宏基因组方法在草地微生物研究中也具有普遍的应用 (表 1)。

表 1 环境微生物分子检测技术比较

Table 1 Comparison of molecular techniques in environmental microbiome study

分子检测技术	代表技术	时间	原理	应用范围	PCR 高通量扩增	优点	缺点	参考文献
PCR 扩增	定量 PCR (qPCR)	2000	添加染料或染料标记探针,重复加热和冷却循环 DNA 模板、特定的寡核苷酸、DNA 聚合酶和 dNTPs,实时监测 PCR 产物的扩增和定量	用于快速检测和量化微生物基因拷贝数	是 否	灵敏度高、准确高效	仅可以检测简单样本	Chandler <i>et al.</i> , 2000; Abdulmir <i>et al.</i> , 2010
DNA 指纹图谱	变性浓度梯度凝胶电泳 (DGGE)	1993	长度相同但序列不同的双链 DNA 片段,在具有线性梯度变性剂的凝胶中迁移率降低,从而可以被分离	描述环境样品中微生物群落结构和多样性	是 否	多态性高、无需标记	只能分离小片段 DNA < 500 bp,且只能区分差异,无法直接进行鉴定	Muyzer <i>et al.</i> , 1993,1998
稳定同位素探测技术	DNA 稳定同位素探针 (DNA-SIP)	2000	通过测量和分析微生物细胞、产物或生物标记物的同位素富集来鉴定活性微生物	用来确定自然微生物群落环境基因组中的种群或从同位素标记的细胞体中观察未培养微生物的功能	是 否	灵敏度高,孵育时间短,底物浓度特异性强	存在信息交叉的风险	Radajewski <i>et al.</i> , 2000; Dumon <i>et al.</i> , 2005
分子杂交技术	基因芯片	2001	将 DNA 探针与标记的样品杂交,通过计算机对杂交信号检测分析,得出样品的信息	适用于多个样品之间功能和系统发育基因的比较	是 是	针对性强、定量、能排除 PCR 扩增和随机取样带来的偏差等	探针不稳定,基因序列少	Wu <i>et al.</i> , 2001; He <i>et al.</i> , 2007
测序技术	高通量测序	2006	对在同一样本中的多个个体 DNA 序列进行平行测序	基因组测序/重测序、转录组测序和表观基因组鉴定	是 是	具有较高的准确性,可鉴别新的基因和物种	测序噪音的存在不可避免	Edwards <i>et al.</i> , 2006; Poinar <i>et al.</i> , 2006

宏基因组方法的大量使用和推广使我们能够更加全面地评价微生物在复杂生态系统中的作用,极大地推动了微生物生态学的研究进程 (Myrold *et al.*, 2014)。由于宏基因组方法简便和高效,现已被广泛应用于人工生态系统、自然生态系统以及与宿主相关的微生物生态研究之中 (邓晔等, 2016; 叶雷等, 2016; 刘洋荧等, 2017; 冯晓远等, 2018; 王朱珺等, 2018)。在这里,我们主要对使用宏基因组方法来解读草地微生物群落响应全球变化的研究进行综述。

2 草地土壤微生物群落对全球变化的响应与反馈

2.1 全球气候变化

2.1.1 全球温度升高 温度是影响草地生态系统多样性和功能的重要影响环境因子。由于大气中 CO₂ 和其他温室气体的积累,在过去 30 年里,全球地表温度每 10 年上升了 0.2 °C,预计到 21 世纪末,全球平均气温将上升 1.8~4 °C (Hansen *et al.*, 2006; IPCC, 2014)。持续的全球变暖正导致生态群落迅速变化,影响了生态系统的功能和服务。陆地碳和气候变暖之间的反馈是预测未来气候变暖的主要不

确定因素之一,大多数研究认为气候变暖导致了生态系统碳储量减少,这是由于土壤通过呼吸释放的碳增加 (Friedlingstein *et al.*, 2006; Luo, 2007; Heimann *et al.*, 2008)。然而,后来许多关于碳储存的研究结果与之存在差异,这种差异来自于地下微生物的反馈 (表 2)。Zhang 等 (2017) 利用 shotgun 宏基因组测序技术发现了微生物的反馈效应,结果显示气候变暖刺激了大量降解稳定土壤有机质的微生物基因,并且土壤有机质含量降低了 13%,可能是增温强化了更多具有降解稳定碳能力的微生物物种,加速了土壤有机质分解的速率。Cheng 等 (2017) 应用 16S rRNA 基因测序和功能基因芯片 (GeoChip 4.0) 等技术结果揭示了变暖显著增加了下层土壤有机质的分解,并且这种效应与微生物群落功能基因结构的变化有关。在此研究中,与对照土壤相比,增温后的土壤微生物群落具有更丰富的参与降解稳定有机物质的关键功能基因。气候变暖促进了微生物更多的降解稳定碳的基因表达,降低了土壤碳的长期稳定性。综合基因芯片 (GeoChip 4.2) 与高通量测序技术 (Illumina MiSeq), Xue 等 (2016) 发现,处于冻土层上层的微生物功能群落结

表 2 全球气候变化对草地土壤微生物群落的影响

Table 2 Influence of global climate changes on grassland soil microbiome

全球气候变化	采用的宏基因组方法	主要结论	参考文献
全球温度升高	Shotgun 测序	升温强化了更多具有降解稳定碳能力的微生物物种,加速了土壤有机质分解的速率	Zhang <i>et al.</i> , 2017
	16S rRNA 基因测序和功能基因芯片	促进了微生物更多的可以降解稳定碳基因的表达,降低了土壤碳的长期稳定性	Cheng <i>et al.</i> , 2017
	基因芯片和 Illumina MiSeq 测序	碳降解、氨化和硝化许多过程的基因丰度升高,系统净碳损失显著增加	Xue <i>et al.</i> , 2016
	基因芯片	微生物对温度升高有负反馈机制,草地生态系统长期的碳流失得到了改善	Yue <i>et al.</i> , 2015
降水格局改变	基因芯片	促进了大部分碳和氮循环基因丰度的增加,加速了生物地化循环进程	Li <i>et al.</i> , 2017
	Illumina Miseq 测序	微生物间的联系将越紧密增近互相合作,对于改善干旱区域草地系统功能有积极作用	Wang <i>et al.</i> , 2018a
	qPCR	改变草地生态系统的结构和功能;减少草地土壤的反硝化群落及其作用	Hartmann <i>et al.</i> , 2013; Keil <i>et al.</i> , 2015
氮沉降	Illumina Miseq 高通量测序	显著改变土壤微生物群落组成,使群落发生优势转移	Ling <i>et al.</i> , 2017; Xiang <i>et al.</i> , 2017
	16S rDNA 基因高通量测序	增加了氮和磷养分吸收及降解稳定碳的潜力	Li <i>et al.</i> , 2019
	Shotgun 测序	改变了微生物群落组成而对功能特性没有影响	Pan <i>et al.</i> , 2014

构仅在升温 1.5 年后就发生了显著变化,这种短期升温显著增加了参与好氧和厌氧微生物功能基因的丰度,其中碳降解、氨化和硝化许多过程的基因丰度最高,系统净碳损失显著增加。

青藏高原是受温度变化影响最大的地区,其生态系统对升温的敏感性更高。同时,此类生态系统的微生物群落可以表现出更高的碳固定能力(表 2)。Yue 等(2015)用基因芯片对高山草甸土壤微生物的研究描述了与碳氮循环相关的分解代谢基因的相对丰度随着温度的升高而降低,最明显的是与稳定碳相关的基因。结果表明,在该地微生物对温度升高有负反馈机制,草地生态系统长期的碳流失得到了改善。总之,目前对于草地碳动态没有统一的结论,但以上研究结果均证明了草地生态系统中土壤碳与气候变暖的相关性,以及微生物群落在调节这种相关性方面的重要作用。

2.1.2 降水格局改变 在许多陆地生态系统中,降水是一种有限的资源。预计未来的降水格局将发生极大的改变,可以通过多种途径改变生态系统的功能,从而土壤微生物群落对水资源变化的响应引起人们极大的关注(Trenberth *et al.*, 2007; de Vries *et al.*, 2012; Bouskill *et al.*, 2013)。微生物群落对降水条件的变化十分敏感,纵然轻微的降水事件可以引起微生物的快速反应(Nielsen *et al.*, 2015)。Li 等(2017)基于基因芯片技术(GeoChip 5.0)研究表明,降水的增强促进了大部分碳和氮循环基因丰度的增加,加速了生物地化循环进程。利用 Illumina Miseq

测序和分子生态网络,Wang 等(2018a)阐明了半干旱草地土壤微生物相互作用的变化,并且证实降水在区域尺度上是重要的限制因素。随着降水的增加,微生物间的联系将越紧密增近互相合作,对于改善干旱区域草地系统功能有积极作用。降水的增加对促进草地生态系统微生物活动和加速养分循环起着重要作用(表 2)。此外,全球范围内许多国家和地区正经历着频繁持久的干旱,并且这种极端气候在未来将不断加强持续出现(IPCC, 2014),这将极大地改变草地生态系统的结构和功能。然而,目前人们对干旱如何影响草地生态系统中微生物机制及过程知之甚少。最近,Keil 等(2015)利用 qPCR 针对微生物群落进行研究,结果显示,草地土壤细菌基因的整体丰度对干旱处理没有反应,表明微生物群落对轻微或短期的干旱有一定的耐受性;其中 *nirK*、*nirS*、*nosZ* 丰度均发生改变,而 *nosZ* 反硝化基因丰度降低了 3.1% 受干旱影响较大。干旱可能减少草地土壤的反硝化群落并且在长期内对其作用产生影响。Hartmann 等(2013)通过 qPCR 研究了土壤氮循环微生物对模拟干旱的响应,干旱使氮矿化速率增加了 14%,并且使反硝化基因 *nirS* 的相对丰度降低了 7%。这些研究通过宏基因组方法进一步加深了我们对干旱如何影响草地土壤生态系统中氮循环相关微生物群落的理解,这将有助于我们在未来更好地管理干旱条件下的草地生态系统。

2.1.3 氮沉降 近几十年来,通过农业施肥或大气沉降向陆地生态系统增加的活性氮显著增加,今天

被认为是全球变化最广泛的驱动力之一 (Vitousek *et al.*, 1991; Galloway *et al.*, 2008)。氮素输入将会对土壤微生物的生长、群落的组成和功能产生多种影响。了解氮增加如何影响土壤微生物群落,对于预测其对地下生态系统的相关影响至关重要。氮添加能显著改变土壤微生物群落组成(表 2)。采用高通量 Illumina Miseq 测序平台, Ling 等(2017)发现,氮输入显著增加了富营养群(如变形杆菌、厚壁菌),却减少了寡营养群(如酸杆菌、硝化螺旋菌等)的相对丰度,使细菌群落由寡营养群为主转变为富营养群为主。Xiang 等(2017)在青藏高原高山草原上研究了氨氧化微生物群落对短期(3 年)氮磷添加的反应,对 *amoA* 基因的 qPCR 分析表明,短期尿素添加显著增加了 AOB 的丰度,而 AOA 的丰度保持不变,导致了 AOA 向 AOB 的优势转移,氮添加将会改变土壤微生物群落功能。针对 16S rDNA 基因的高通量测序结果进行分析, Li 等(2019)发现,施氮增加了共生菌和腐生真菌的比例,同时增加了氮和磷养分吸收及降解稳定碳的潜力。然而, Pan 等(2014)应用 shotgun 测序技术研究了无机肥料对草地土壤细菌群落组成和潜在功能的影响,发现施肥改变了微生物群落组成而对功能特性没有影响,证明了功能冗余作为在微生物组成变化过程中支撑功能稳定的机制,说明在草原生态系统中,功能特性比群落组成更能抵抗环境变化。此外,地上植物群落对氮的反应与微生物对氮的反应相关。Dean 等(2014)利用 454 焦磷酸测序技术将地下微生物动态与地上植被变化联系起来,发现氮沉积改变了植物与真菌的关系,特别是根相关的真菌,而不仅仅是植物之间的竞争,突出了地下微生物动力学在植物对氮沉降反应中的潜在重要性,更好地了解土壤微生物对氮肥的反应,对于预测人为增加氮肥对陆地生态系统的影响至关重要。

2.2 大气组成变化

2.2.1 大气 CO₂ 浓度升高 自从工业革命以来随着化石燃料的不断排放,到 2018 年大气中的 CO₂ 浓度已经从 280 上升到超过 400 ppm (IPCC, 2014) (<https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>)。由于大气 CO₂ 浓度升高 (eCO₂) 可能在将来持续下去,因此评估其对草地生物地球化学循环和生态系统功能的影响至关重要。eCO₂ 在很大程度上塑造了土壤微生物群落的分类组成和功能基因,进而改变了生态系统的功能(表 3)。Deng 等

(2012) 通过高通量测序技术研究证明了 eCO₂ 在门(如泉古菌、变形菌等)、纲(如柄杆菌、粘球菌等)、目等不同分类水平上可能对某些特定微生物种群产生不同的影响,其相对丰度降低或升高,这种差别可能是由于特定微生物种群对 eCO₂ 具有不同的反应造成。He 等(2011)采用系统发育芯片 [PhyloChip (G2)] 证明了土壤微生物群落的系统发育组成和结构随着 CO₂ 浓度的升高而发生同样的变化。在半干旱草地上, Yang 等(2019)利用 Illumina Miseq 测序和功能基因杂交技术 (GeoChip 4.6) 研究了 14 年 eCO₂ 对土壤微生物的影响,结果表明,氮固定基因 *nifH* 和氨氧化基因 *amoA* 在 eCO₂ 情况下显著降低,分别下降了 12.6% 和 6.1%,最终抑制了微生物氮的分解,将会减缓微生物群落的生长速率。采用高通量功能基因芯片 (GeoChip 3.0), Xu 等(2013)针对长期(10 年)暴露于 eCO₂ 的草地研究发现,微生物 3 个关键的碳固定功能基因丰度显著增加,包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶 (RubisCO)、一氧化碳脱氢酶 (CODH) 和丙酰辅酶 A/乙酰辅酶 A 羧化酶 (Pcc/Acc),并且部分碳降解基因和参与氮循环的 *nifH*、*nirS* 基因受到 eCO₂ 显著刺激。He 等(2010)利用基因芯片和高通量测序技术,揭示了在 eCO₂ 条件下,参与稳定碳降解的基因丰度保持不变,而参与不稳定碳降解和碳、氮固定的基因丰度显著增加。这些变化同时增强了 CO₂ 固定、碳降解、氮固定等过程。

群落中不同微生物种群之间的相互作用在决定生态系统功能方面起着至关重要的作用。草地生态系统中微生物之间将会通过改变相互联系对 eCO₂ 作出响应(表 3)。Zhou 等(2011)基于高通量测序技术揭示了 eCO₂ 对不同系统发育群落之间的网络交互作用的影响,发现群落间的关系发生了显著改变(加强或减弱),首次记录了不同微生物群落对 eCO₂ 反应的网络相互作用的变化。Tu 等(2016)结合高通量测序技术和生态网络分析方法综合分析了 eCO₂ 草地生态系统中的固氮微生物群落,发现固氮生物类群与其他微生物种之间共存状况(如固氮螺菌/放线菌、中间根瘤菌/束縛菌、慢生根瘤菌/酸杆菌)。说明在该生态系统中,固氮微生物对非固氮微生物具有潜在的吸引力,加强了相互之间的联系。这些结果为我们提供了固氮微生物与环境其他物种相互作用的线索,并有助于我们进一步理解地下微生物如何促进植物生长。

表 3 大气组成变化对草地土壤微生物群落的影响

Table 3 Influence of atmospheric composition changes on grassland soil microbiome

大气组成变化	采用的宏基因组方法	主要结论	参考文献
CO ₂ 浓度升高	高通量测序和系统发育芯片	土壤微生物群落的系统发育组成和结构发生变化	He <i>et al.</i> , 2011; Deng <i>et al.</i> , 2012
	Illumina Miseq 测序和功能基因芯片	抑制了微生物氮的分解,增强了 CO ₂ 固定、碳降解、氮固定等过程	He <i>et al.</i> , 2010; Xu <i>et al.</i> , 2013; Yang <i>et al.</i> , 2019
	高通量测序	群落之间存在网络交互作用,加强了相互之间的联系	Zhou <i>et al.</i> , 2011; Tu <i>et al.</i> , 2016
臭氧耗竭 UV 辐射加强	RFLP	紫外辐射增强造成了土壤微生物组成和总活性的显著变化	Niu <i>et al.</i> , 2014

2.2.2 紫外辐射 其他大气组分变化如臭氧耗竭导致的紫外(UV)辐射加强,由于对自然生态系统造成大面积的长期非生物胁迫而日益受到关注(Reboredo *et al.*, 2012)。到目前为止,对 UV 辐射的大多数研究都是关注于光合作用和生物量生产等地上过程,而我们对长期增强的 UV 辐射强度对地下土壤微生物群落的变化了解甚少。最近, Niu 等(2014)利用限制性片段长度多态性(RFLP)研究了 UV-B 辐射增强对青藏高原高寒草甸生态系统土壤细菌的影响,发现随着 UV-B 强度的增加,细菌多样性明显下降,并且总体微生物的活性有了明显下降;紫外辐射增强造成了土壤微生物组成和总活性的显著变化。综合以上内容,基于宏基因组方法技术对 UV 辐射与草地土壤微生物的研究还比较缺乏,影响效应还不明确。所以,未来的研究还需要加强对此类研究较少的环境因素的关注。

2.3 外来物种入侵

生物入侵是影响草地生态系统的一种广泛存在的现象,对生态系统生物多样性和功能服务有重大威胁而越来越受到人们的关注(Dukes *et al.*, 1999)。有研究表明,气候变化可能使越来越多的入侵物种先于本土物种开始生长,而且入侵优先效应可能变得越来越普遍(Dickson *et al.*, 2012)。由于入侵植物与本地物种对生态系统的影响有本质上的不同(McLeod *et al.*, 2016),所以在探索生物入侵问题时,同时考虑地下过程是至关重要的。

草地土壤微生物群落由于外来植物介入而发生显著变化,这些变化对土壤微生物群落的影响在生态系统内具有重要的反馈作用(表 4)。由于植物入侵会选择性地抑制优势微生物种类(Carey *et al.*, 2017),入侵植物可直接通过根区附近的生长促进或抑制作用改变土壤微生物群落,称之为正反馈。正反馈可能快速导致微生物群落转化,促进了植物入侵的成功。Piper 等(2015)利用 16S rRNA 高通量测序证明了无芒雀麦草(*Smooth brome*)入侵使细菌多样性下降,但是增加了稀有种土壤细菌的丰富度和均匀度,同时 AOB 相对丰度降低,进而影响氮循环。基于 454 高通量测序, Lekberg 等(2013)发现,与原生植物群落相比,入侵植物矢车菊(*knawweed*)等降低了本地植物的共生丛枝菌根真菌(AMF)丰度而丰富了自身 AMF 的丰度和多样性,以此促成它们的成功入侵。生物入侵可以显著改变土壤微生物群落硝化或反硝化的能力,进而增强土壤氮素有效性和转化速率,提高自身获取营养的能力。McLeod 等(2016)通过 qPCR 技术测定了与氮循环有关的土壤微生物群落的变化,结果显示,土壤中所有与入侵物种相关的 AOB 丰度的大幅增加,然而 AOA 丰度在入侵区域中没有增加。4 种观测入侵物种中有 3 种的生产力和潜在硝化率都高于附近原生群落,而这些变化与 AOB 丰度的增加有关。其结果强调了氮循环土壤微生物群落在外来入侵植物如何改变草地生态系统功能方面的重要性,并表明功能的变化

表 4 外来物种入侵对草地土壤微生物群落的影响

Table 4 Influence of exotic species invasion on grassland soil microbiome

外来物种入侵	采用的宏基因组方法	主要结论	参考文献
外来物种入侵	16S rRNA 和 454 高通量测序	抑制优势微生物种类,改变土壤微生物群,促进植物入侵	Lekberg <i>et al.</i> , 2013; Piper <i>et al.</i> , 2015
	qPCR	显著改变土壤微生物群落硝化或反硝化的能力,进而增强土壤氮素有效性和转化速率,提高自身获取营养的能力	McLeod <i>et al.</i> , 2016
	Shotgun 宏基因组测序	驱动了特定微生物类群的丰度变化,而地下群落的总体结构和功能潜力却相当稳定	Gibbons <i>et al.</i> , 2017

可以迅速发生,最终促进了外来入侵生物的生长。然而,在对待植物入侵如何改变草地土壤环境时,我们不能一概而论,不仅仅要关注这种影响效应的正反馈,也应该考虑潜在的植物与微生物之间的积极作用。Gibbons 等(2017)使用 shotgun 宏基因组测序对土壤微生物的转变进行分析,发现生物入侵驱动了特定微生物类群(有机质、氮代谢等)的丰度变化,而地下群落的总体结构和功能潜力却相当稳定。这种负反馈维持了生态系统稳定性,表明植物入侵对草地微生物的影响不是绝对的。

2.4 土地利用方式变化

虽然草地是陆地表面面积最大的生态系统,但是在许多地区,草地生态系统是属于濒危脆弱的生态系统(Monson, 2014)。许多草地已经被其他人类活动和管理方式所改变。这种变化主要体现在把草地转变为以耕种为主的农业用地和过度放牧等方面。草地向耕地的转变将可以影响土壤微生物的多样性和功能,导致了微生物的功能和物种的损失,是生物多样性丧失的最重要原因之一(表 5)。Lienhard 等(2014)通过使用高通量测序技术,研究了农业生产对老挝东北部热带草原生态系统土壤细菌和真菌多样性的影响,结果表明,与天然草地相比,耕作减少了真菌的丰富度和多样性,而真菌的减少将会减弱微生物的共生作用,导致植被生产力下降。利用高通量测序技术,French 等(2017)分析了英格兰牛津郡 36 个草原的土壤宏基因组群落发现了类似的结论:草地向农田的转变并不影响细菌多样性或特殊的有益分类群(固氮细菌和菌根),但是真菌多样性会下降,另外植物病原体(如 *Olpidium*)在经过农业改良的草地中会明显更加丰富,说明土地利用变化方式的变化所造成的改变不可逆。另外,放牧在许多地区是主要的土地利用方式,是草地植被多样性和环境条件的关键调控因子,将直接或间接影响土壤微生物群落多样性和组成(Yang *et al.*, 2013)(表 5)。Pan 等(2018)综合 DNA-SIP、qPCR

和高通量测序对典型草地的硝化微生物群落进行研究,结果显示,过度放牧显著降低了活性 AOB 的丰度,导致土壤硝化活性下降。Yang 等(2013)以功能基因为重点,利用基因芯片(GeoChip 4.0)对碳、氮循环基因的检测结果表明,放牧降低了参与甲烷循环、碳固定和降解的基因丰度,而氮矿化和硝化基因丰度增加,并且减少了反硝化和还原基因,表明放牧改变了微生物介导的碳、氮循环过程,对草地土壤微生物群落和生态系统功能有显著影响。

2.5 多因素耦合

全球变化环境问题是影响生态系统的重要因素,但很多环境变化交织在一起不可能完全分割,因此多种全球变化的驱动因素的共同作用对微生物群落的效果尚不清楚。考虑到这些因素之间相互作用对土壤微生物具有协同或拮抗作用的巨大潜力(Hayden *et al.*, 2012),现在大多数研究会综合多种环境因子对微生物进行研究(Monson, 2014; Keil *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Daebeler *et al.*, 2017)。多种因素相互作用的影响将可能重塑土壤微生物群落,可以据此识别在决定未来微生物群落响应方面发挥重要作用的驱动因子。Castro 等(2010)基于高通量测序结果分析得出,大气 CO₂ 浓度升高、温度增加和降水改变的相互作用导致微生物结构的不同变化,其中降水变化对群落组成产生的影响往往更大。同时改变多个因素的情况下,微生物可能发生复杂的群落变化,交互影响生态系统属性和过程。Yu 等(2018)利用功能基因芯片(GeoChip 3.0)对干旱草地微生物进行研究,揭示了土壤微生物群落对气候变暖和 eCO₂ 的可能反馈,发现在变暖条件下氮循环过程会被抑制,而 CO₂ 升高或与变暖共同作用增强了碳和氮循环过程。然而,Carey 等(2015)基于 Illumina 测序平台研究了微生物的结构和功能如何对多重干扰作出反应,发现植物入侵、植被刈割和氮肥使用均未改变干旱草地土壤微生物群落结构。这些发现可能有助于我们认识草地生态系统对全球环境

表 5 土地利用方式变化对草地土壤微生物群落的影响

Table 5 Influence of land use change on grassland soil microbiome

土地利用方式变化	采用的宏基因组方法	主要结论	参考文献
草地转变为耕地	高通量测序	减弱微生物的共生作用,导致植被生产力下降	Lienhard <i>et al.</i> , 2014
	高通量测序	转变并不影响细菌多样性或特殊的有益分类群,土地利用变化方式的变化所造成的改变不可逆	French <i>et al.</i> , 2017
过度放牧	DNA-SIP、qPCR 和高通量测序	显著降低了土壤硝化活性,改变了群落的分布	Pan <i>et al.</i> , 2018
	基因芯片	改变了土壤微生物群落在调控土壤氮、碳循环方面的功能潜力	Yang <i>et al.</i> , 2013

变化综合因素的响应,但是耦合的全球变化影响仍未得到充分的研究(De Kort *et al.*, 2018)。如果预测的环境变化不断持续下去,未来的生态系统过程将会更加复杂(Chen *et al.*, 2013),也将是我们必须面对的一个长久挑战。

3 总结与展望

微生物在草地生态系统中扮演着重要的角色,明确它们在全球环境变化的背景下的响应和反馈机制对维持和修复草地生态系统有着深远的意义。近年来的大量研究已经提供了草地土壤微生物群落与全球变化关系的初步认识,为我们进一步的深入研究奠定了基础。但目前这类研究还主要集中于局部地区,所以要全面预测草地与微生物群落在未来环境变化下的关联,还需要进行更加复杂和大尺度的研究(Lladó *et al.*, 2017)。虽然草地作为复杂的自然生态系统,距离建立完整的知识体系还有很长时间(Baldrian, 2017),但随着相关技术和学科快速发展,未来几年我们将在更大的深度、广度和时间序列上对草地微生物群落的多样性和生态功能拥有更为全面的认识。而针对它们在环境变化压力下的生态效应,以下的几个方面将是研究者关注的焦点:

首先,草地生态系统中生物圈的整体关联以及它们对环境变化的协调响应。草地生态系统具有完整的物种层级,从细菌、古菌、真菌、原生动物、地下动物构成的地下生物圈,到地表植物、动物和人类构成的地上生物圈,它们息息相关,共同构建起完善的草地生态系统。近年来草地微生物的研究引发了草地生态学家的极大关注,但这些研究多集中在细菌、古菌、真菌多样性,对原生动物和地下动物的关注明显不足;地下多样性和地上多样性的内在关联也没有得到充分的认识。因此,我们还不能从整体上来理解生物圈中的各物种在应对环境变化压力下的协调响应机制。随着分子检测技术和传统生态调查的深入融合,草地生态学研究必然会走向地上和地下结合,达到宏观与微观相一致的新认识。

其次,草地微生物的生态效应和预测它们对未来全球变化产生的贡献。草地土壤中的微生物群落是地球元素循环的重要参与者,协调着生物圈中碳、氮、磷等元素的平衡和周转。在全球环境急剧变化的时刻,它们所承载生态功能的变化和可持续性必然受到密切的关注。然而,目前针对大量样本所采用的16S高通量测序还不能准确反映微生物所承载

的生态功能,因而对群落变化的认识无法转化为对它们所承载功能变化的预测。同时,宏基因组方法是针对环境DNA的检测,其数据与宏观生态效应(例如土壤呼吸、碳降解速率、固氮潜势等)关联也存在一定的疑问,因此仍需大量的草地土壤的基础调查和针对性的功能微生物类群研究相结合,对微生物在环境变化下的生态效应作出明确的结论。同时,目前的全球变化生态模型中针对微生物的参数还很少,这也是全球变化生态学和微生物生态学研究热点内容。

最后,草地微生物群落的检测方法、分析方法和理论创新。由于微生物多样性极为庞大,而大部分物种的生态功能也不清楚(Rinke *et al.*, 2013),因此针对特定功能微生物类群的检测方法还需要极大的提升。另外,随着宏基因组方法的发展,尤其是测序技术,使草地微生物群落的研究进入了“大数据”时代,这对我们的分析方法提出了新的要求(魏子艳等, 2015)。为此,我们需要对多元数据进行多元分析(Meta-analyses),并对统计和建模方法做出创新。同时,微生物群落生态学也面临着基础理论匮乏、机制认识不足的缺陷,这也要求未来的微生物生态学更注重理论知识的更新和积累。

从传统研究方法到宏基因组方法的出现,使我们对草地生物的研究范围不断扩大,对生物群落的多样性、复杂性和动态变化的认识不断提高。宏基因组方法还在继续快速发展,新的技术也将不断革新,最终都将促进我们对微生物群落的深入理解,并且给未来人们利用自然生态系统中的微生物打开大门。

参考文献

- 邓 晔, 冯 凯, 魏子艳, 等. 2016. 宏基因组学在环境工程领域的应用及研究进展. 环境工程学报, 10(7): 3373-3382.
- 冯晓远, 王风平. 2018. 宏基因组学分析揭示深古菌 *Bathyrchaecota* B242 的代谢特征. 微生物学通报, 45(1): 11-18.
- 刘洋荧, 王 尚, 厉舒祯, 等. 2017. 基于功能基因的微生物碳循环分子生态学研究进展. 微生物学通报, 44(7): 1676-1689.
- 王朱琨, 王 尚, 刘洋荧, 等. 2018. 宏基因组技术在氮循环功能微生物分子检测研究中的应用. 生物技术通报, 34(1): 1-6.
- 魏子艳, 金德才, 邓 晔. 2015. 环境微生物宏基因组学研究中的生物信息学方法. 微生物学通报, 42(5): 890-901.
- 叶 雷, 闫亚丽, 陈庆森, 等. 2016. 高通量测序技术在肠道

- 微生物宏基因组学研究中的应用. *中国食品学报*, (7): 216–223.
- Abdulmir AS, Yoke TS, Nordin N, *et al.* 2010. Detection and quantification of probiotic bacteria using optimized DNA extraction, traditional and real-time PCR methods in complex microbial communities. *African Journal of Biotechnology*, **9**: 1481–1492.
- Baldrian P. 2017. Forest microbiome: Diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*, **41**: 109–130.
- Bardgett RD, van der Putten WH. 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, **515**: 505–511.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcon R, *et al.* 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 1761–1778.
- Bouskill NJ, Lim HC, Borglin S, *et al.* 2013. Pre-exposure to drought increases the resistance of tropical forest soil bacterial communities to extended drought. *The ISME Journal*, **7**: 384–394.
- Carey CJ, Beman JM, Eviner VT, *et al.* 2015. Soil microbial community structure is unaltered by plant invasion, vegetation clipping, and nitrogen fertilization in experimental semi-arid grasslands. *Frontiers in Microbiology*, **6**: 466.
- Carey CJ, Blankinship JC, Eviner VT, *et al.* 2017. Invasive plants decrease microbial capacity to nitrify and denitrify compared to native California grassland communities. *Biological Invasions*, **19**: 2941–2957.
- Castro HF, Classen AT, Austin EE, *et al.* 2010. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 999–1007.
- Chandler DP, Stults JR, Cebula S, *et al.* 2000. Affinity purification of DNA and RNA from environmental samples with peptide nucleic acid clamps. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 3438–3445.
- Chen H, Zhu Q, Peng CH, *et al.* 2013. The impacts of climate change and human activities on biogeochemical cycles on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Global Change Biology*, **19**: 2940–2955.
- Cheng L, Zhang NF, Yuan MT, *et al.* 2017. Warming enhances old organic carbon decomposition through altering functional microbial communities. *The ISME Journal*, **11**: 1825–1835.
- Daebeler A, Bodelier PLE, Hefting MM, *et al.* 2017. Soil warming and fertilization altered rates of nitrogen transformation processes and selected for adapted ammonia-oxidizing archaea in sub-arctic grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **107**: 114–124.
- De Kort H, Prunier JG, Tessier M, *et al.* 2018. Interacting grassland species under threat of multiple global change drivers. *Journal of Biogeography*, **45**: 2133–2145.
- de Vries FT, Liiri ME, Björnlund L, *et al.* 2012. Legacy effects of drought on plant growth and the soil food web. *Oecologia*, **170**: 821–833.
- Dean SL, Farrer EC, Taylor DL, *et al.* 2014. Nitrogen deposition alters plant-fungal relationships: Linking belowground dynamics to aboveground vegetation change. *Molecular Ecology*, **23**: 1364–1378.
- Deng Y, He ZL, Xu MY, *et al.* 2012. Elevated carbon dioxide alters the structure of soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 2991–2995.
- Díaz S, Demissew S, Carabias J, *et al.* 2015. The IPBES Conceptual Framework-connecting nature and people. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, **14**: 1–16.
- Dickson TL, Hopwood JL, Wilsey BJ. 2012. Do priority effects benefit invasive plants more than native plants? An experiment with six grassland species. *Biological Invasions*, **14**: 2617–2624.
- Dukes JS, Mooney HA. 1999. Does global change increase the success of biological invaders? *Trends in Ecology & Evolution*, **14**: 135–139.
- Dumont MG, Murrell JC. 2005. Stable isotope probing: Linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, **3**: 499–504.
- Edwards RA, Rodriguez-Brito B, Wegley L, *et al.* 2006. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics*, **7**: 57.
- Eisen JA. 2007. Environmental shotgun sequencing: Its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *PLoS Biology*, **5**: 384–388.
- French KE, Tkacz A, Turnbull LA. 2017. Conversion of grassland to arable decreases microbial diversity and alters community composition. *Applied Soil Ecology*, **110**: 43–52.
- Friedlingstein P, Cox P, Betts R, *et al.* 2006. Climate-carbon cycle feedback analysis: Results from the C4MIP model intercomparison. *Journal of Climate*, **19**: 3337–3353.
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, *et al.* 2008. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, **320**: 889–892.
- Gibbons SM, Lekberg Y, Mummey DL, *et al.* 2017. Invasive plants rapidly reshape soil properties in a grassland ecosystem. *mSystems*, **2**: 178.
- Gupta RD, Sharma R. 2011. Metagenomics for environmental and industrial microbiology. *Science and Culture*, **77**: 27–31.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, *et al.* 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, **5**: 245–249.
- Hansen J, Sato M, Ruedy R, *et al.* 2006. Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 14288–14293.
- Hartmann AA, Barnard RL, Marhan S, *et al.* 2013. Effects of drought and N-fertilization on N cycling in two grassland soils. *Oecologia*, **171**: 705–717.
- Hayden HL, Mele PM, Bougoure DS, *et al.* 2012. Changes in the microbial community structure of bacteria, archaea and fungi in response to elevated CO₂ and warming in an Australian native grassland soil. *Environmental Microbiology*, **14**: 3081–3096.
- He ZL, Gentry TJ, Schadt CW, *et al.* 2007. GeoChip: A comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *The ISME Journal*, **1**: 66–67.
- He ZL, Piceno Y, Deng Y, *et al.* 2011. The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. *The ISME Journal*, **6**: 259–272.
- He ZL, Xu MY, Deng Y, *et al.* 2010. Metagenomic analysis

- reveals a marked divergence in the structure of belowground microbial communities at elevated CO₂. *Ecology Letters*, **13**: 564–575.
- Heimann M, Reichstein M. 2008. Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks. *Nature*, **451**: 289–292.
- IPCC. 2014. Climate change 2013: The physical science basis; Working Group I contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. London: Cambridge University Press.
- Keil D, Niklaus PA, von Riedmatten LR, et al. 2015. Effects of warming and drought on potential N₂O emissions and denitrifying bacteria abundance in grasslands with different land-use. *FEMS Microbiology Ecology*, **91**: fiv066.
- Kohler M, Devaux C, Grigulis K, et al. 2017. Plant functional assemblages as indicators of the resilience of grassland ecosystem service provision. *Ecological Indicators*, **73**: 118–127.
- Lekberg Y, Gibbons SM, Rosendahl S, et al. 2013. Severe plant invasions can increase mycorrhizal fungal abundance and diversity. *The ISME Journal*, **7**: 1424–1433.
- Li H, Yang S, Xu Z, et al. 2017. Responses of soil microbial functional genes to global changes are indirectly influenced by aboveground plant biomass variation. *Soil Biology and Biochemistry*, **104**: 18–29.
- Li Y, Nie C, Liu Y, et al. 2019. Soil microbial community composition closely associates with specific enzyme activities and soil carbon chemistry in a long-term nitrogen fertilized grassland. *Science of the Total Environment*, **654**: 264–274.
- Lienhard P, Terrat S, Prévost-Bouré NC, et al. 2014. Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. *Agronomy for Sustainable Development*, **34**: 525–533.
- Ling N, Chen D, Guo H, et al. 2017. Differential responses of soil bacterial communities to long-term N and P inputs in a semi-arid steppe. *Geoderma*, **292**: 25–33.
- Liu L, Li YH, Li SL, et al. 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International*, **2012**: 251364.
- Lladó S, López-Mondéjar R, Baldrian P. 2017. Forest soil bacteria: Diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **81**: e00063–00016.
- Luo YQ. 2007. Terrestrial carbon-cycle feedback to climate warming. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **38**: 683–712.
- Martiny JBH, Eisen JA, Penn K, et al. 2011. Drivers of bacterial β-diversity depend on spatial scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: 7850–7854.
- McGuire KL, Treseder KK. 2010. Microbial communities and their relevance for ecosystem models: Decomposition as a case study. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**: 529–535.
- McLeod ML, Cleveland CC, Lekberg Y, et al. 2016. Exotic invasive plants increase productivity, abundance of ammonia-oxidizing bacteria and nitrogen availability in intermountain grasslands. *Journal of Ecology*, **104**: 994–1002.
- Monson RK. 2014. Ecology and the Environment. New York: Springer.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 695–700.
- Muyzer G, Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**: 127–141.
- Myrold DD, Zeglin LH, Jansson JK. 2014. The potential of metagenomic approaches for understanding soil microbial processes. *Soil Science Society of America Journal*, **78**: 3–10.
- Nielsen UN, Ball BA. 2015. Impacts of altered precipitation regimes on soil communities and biogeochemistry in arid and semi-arid ecosystems. *Global Change Biology*, **21**: 1407–1421.
- Niu FJ, He JX, Zhang GS, et al. 2014. Effects of enhanced UV-B radiation on the diversity and activity of soil microorganism of alpine meadow ecosystem in Qinghai-Tibet Plateau. *Ecotoxicology*, **23**: 1833–1841.
- Pan H, Xie KX, Zhang QC, et al. 2018. Archaea and bacteria respectively dominate nitrification in lightly and heavily grazed soil in a grassland system. *Biology and Fertility of Soils*, **54**: 41–54.
- Pan Y, Cassman N, de Hollander M, et al. 2014. Impact of long-term N, P, K, and NPK fertilization on the composition and potential functions of the bacterial community in grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **90**: 195–205.
- Paul EA. 2014. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Oxford: Academic Press.
- Piper CL, Siciliano SD, Winsley T, et al. 2015. Smooth brome invasion increases rare soil bacterial species prevalence, bacterial species richness and evenness. *Journal of Ecology*, **103**: 386–396.
- Poinar HN, Schwarz C, Qi J, et al. 2006. Metagenomics to paleogenomics: Large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*, **311**: 392–394.
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, et al. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, **403**: 646–649.
- Reboredo F, Lidon FJC. 2012. UV-B radiation effects on terrestrial plants: A perspective. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, **24**: 502–510.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, et al. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, **321**: 305–339.
- Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, et al. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, **499**: 431–437.
- Schlöter M, Nannipieri P, Sørensen SJ, et al. 2018. Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, **54**: 1–10.
- Schuster SC. 2007. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*, **5**: 16–18.
- Sharpton TJ. 2014. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science*, **5**: 209.
- Steffen W, Crutzen PJ, McNeill JR. 2007. The Anthropocene:

- Are humans now overwhelming the great forces of nature. *Ambio*, **36**: 614–621.
- Thomas T, Gilbert J, Meyer F. 2012. Metagenomics: A guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, **2**: 3.
- Torsvik V, Øvreås L, Thingstad TF. 2002. Prokaryotic diversity: Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, **296**: 1064–1066.
- Trenberth KE, Smith L, Qian TT, *et al.* 2007. Estimates of the global water budget and its annual cycle using observational and model data. *Journal of Hydrometeorology*, **8**: 758–769.
- Tringe SG, Von Mering C, Kobayashi A, *et al.* 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, **308**: 554–557.
- Tu QC, Zhou XS, He ZL, *et al.* 2016. The diversity and co-occurrence patterns of N₂-fixing communities in a CO₂-enriched grassland ecosystem. *Microbial Ecology*, **71**: 604–615.
- van der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. 2008. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, **11**: 296–310.
- Vitousek PM, Howarth RW. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*, **13**: 87–115.
- Wallenstein MD, Hall EK. 2012. A trait-based framework for predicting when and where microbial adaptation to climate change will affect ecosystem functioning. *Biogeochemistry*, **109**: 35–47.
- Wang S, Wang XB, Han XG, *et al.* 2018a. Higher precipitation strengthens the microbial interactions in semi-arid grassland soils. *Global Ecology and Biogeography*, **27**: 570–580.
- Wang XZ, Sui XL, Liu YY, *et al.* 2018b. NP fertilization did not reduce AMF abundance or diversity but alter AMF composition in an alpine grassland infested by a root hemiparasitic plant. *Plant Diversity*, **40**: 117–126.
- Wu LY, Thompson DK, Li GS, *et al.* 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 5780–5790.
- Xiang XJ, He D, He JS, *et al.* 2017. Ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea respond to short-term urea amendment in an alpine grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, **107**: 218–225.
- Xu MY, He ZL, Deng Y, *et al.* 2013. Elevated CO₂ influences microbial carbon and nitrogen cycling. *BMC Microbiology*, **13**: 124.
- Xue K, Yuan MT, Shi Z, *et al.* 2016. Tundra soil carbon is vulnerable to rapid microbial decomposition under climate warming. *Nature Climate Change*, **6**: 595–600.
- Yang SH, Zheng QS, Yuan MT, *et al.* 2019. Long-term elevated CO₂ shifts composition of soil microbial communities in a Californian annual grassland, reducing growth and N utilization potentials. *Science of the Total Environment*, **652**: 1474–1481.
- Yang YF, Wu LW, Lin QY, *et al.* 2013. Responses of the functional structure of soil microbial community to livestock grazing in the Tibetan alpine grassland. *Global Change Biology*, **19**: 637–648.
- Yu H, Deng Y, He ZL, *et al.* 2018. Elevated CO₂ and warming altered grassland microbial communities in soil top-layers. *Frontiers in Microbiology*, **9**: 1790.
- Yue HW, Wang MM, Wang SP, *et al.* 2015. The microbe-mediated mechanisms affecting topsoil carbon stock in Tibetan grasslands. *The ISME Journal*, **9**: 2012–2020.
- Zak DR, Pregitzer KS, Burton AJ, *et al.* 2011. Microbial responses to a changing environment: Implications for the future functioning of terrestrial ecosystems. *Fungal Ecology*, **4**: 386–395.
- Zhang XM, Johnston ER, Li LH, *et al.* 2017. Experimental warming reveals positive feedbacks to climate change in the Eurasian Steppe. *The ISME Journal*, **11**: 885–895.
- Zhang Y, Dong SK, Gao QZ, *et al.* 2016. Climate change and human activities altered the diversity and composition of soil microbial community in alpine grasslands of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Science of the Total Environment*, **562**: 353–363.
- Zhou JZ, Deng Y, Luo F, *et al.* 2011. Phylogenetic molecular ecological network of soil microbial communities in response to elevated CO₂. *MBio*, **2**: e00122–11.
- Zhou JZ, He ZL, Yang YF, *et al.* 2015. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: Open and closed formats. *MBio*, **6**: e02288–14.
- Zhu K, Chiariello NR, Tobeck T, *et al.* 2016. Nonlinear, interacting responses to climate limit grassland production under global change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**: 10589–10594.

作者简介 杜雄峰,男,1993年生,硕士,研究方向为环境微生物宏基因组学。E-mail: 1335283338@qq.com
责任编辑 魏中青
