

DOI: 10.20103/j.stxb.202303310626

张昊,姜娜,樊林染,张思宇,王慧,刘红梅,朱晓昱,张海芳,杨殿林.长期养分添加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落的影响.生态学报,2024,44(3):1130-1139.

Zhang H, Jiang N, Fan L R, Zhang S Y, Wang H, Liu H M, Zhu X Y, Zhang H F, Yang D L. Effects of long-term nutrient addition on microbial community in soil of *Stipa baicalensis* steppe in the Inner Mongolia, China. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(3): 1130-1139.

长期养分添加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落的影响

张 昊,姜 娜,樊林染,张思宇,王 慧,刘红梅,朱晓昱,张海芳*,杨殿林

农业农村部环境保护科研监测所,天津 300191

摘要:土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,是土壤生态系统物质循环和能量流动的主要参与者,在维持土壤生态系统过程和功能方面发挥着关键作用。以内蒙古贝加尔针茅草原为研究对象,采用磷脂脂肪酸(PLFA)技术,探讨连续 12 年氮(N)、磷(P)、钾(K)养分单一添加和复合添加条件下草地土壤理化性质、微生物群落结构特征的变化及其主要影响因素。结果表明,长期养分添加条件下,土壤有机碳和全氮均无显著变化,但磷(P、NP、PK、NPK)和钾(K、NK、PK、NPK)添加处理分别显著提高了土壤速效磷和速效钾含量($P<0.05$)。单一氮添加显著增加了土壤硝态氮和铵态氮含量,并显著降低了土壤 pH 值($P<0.05$)。单一磷和钾添加均提高了土壤细菌、真菌、放线菌和总 PLFA 含量,而单一氮添加和复合养分添加(NP、NK、PK、NPK)均显著降低了以上指标的含氮量($P<0.05$)。此外,各养分添加处理均未显著改变革兰氏阳性细菌与革兰氏阴性细菌比(G^+/G^-),但含氮的复合添加处理(NP、NK、NPK)均显著降低了真菌与细菌比(F/B) ($P<0.05$)。相关性分析结果表明,多种微生物 PLFA 含量与速效磷和铵态氮显著负相关,与土壤 pH 值显著正相关。基于冗余分析和随机森林模型分析发现土壤 pH 值和土壤磷含量是影响土壤微生物群落特征的主要驱动因素。综上,长期养分添加显著改变了土壤速效养分含量和土壤 pH 值,并显著影响了土壤微生物群落结构。

关键词:养分添加;土壤微生物群落结构;磷脂脂肪酸;土壤理化性质;贝加尔针茅草原

Effects of long-term nutrient addition on microbial community in soil of *Stipa baicalensis* steppe in the Inner Mongolia, China

ZHANG Hao, JIANG Na, FAN Linran, ZHANG Siyu, WANG Hui, LIU Hongmei, ZHU Xiaoyu, ZHANG Haifang*, YANG Dianlin

Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China

Abstract: Soil microbes are an important component of terrestrial ecosystems connecting energy flows and matter cycles between the atmosphere and the soil. They play crucial roles in maintaining ecosystem function by driving a variety of complex ecological processes in soil. Here we report a field experiment on *Stipa baicalensis* steppe in the Inner Mongolia. The phospholipid fatty acids (PLFA) method was used to explore the effects of long-term different nutrient treatments (i.e. N, P, K in isolation and NP, NK, PK, and NPK in combination) on soil physical and chemical properties and microbial community structure. The results showed that the long-term nutrient addition did not significantly alter soil organic carbon and total nitrogen content, while P addition (P, NP, PK, NPK) and K addition (K, NK, PK, and NPK) significantly increased soil available phosphorus and available potassium content, respectively ($P<0.05$). Single-N addition significantly

基金项目:国家自然科学基金(42007046,41877343,32101446)

收稿日期:2023-03-31; 网络出版日期:2023-11-08

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhanghaifang01@caas.cn

increased soil ammonium nitrogen and nitrate nitrogen contents, but soil pH value decreased significantly. To a certain extent, Single-P and Single-K addition enhanced the total PLFA contents, the PLFA contents of bacteria, fungi, and actinomycetes. The Single-N and Multiple nutrient (NP, NK, PK, and NPK) addition significantly decreased the total PLFA contents, the PLFA contents of bacteria, fungi and actinomycetes. There were no significant differences under different nutrient addition treatments for the PLFA ratio of Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria (G^+/G^-), while multiple nutrient (NP, NK and NPK) significantly decreased the PLFA ratio of fungi and bacteria (F/B). Correlation analysis indicated that soil microbial groups were positively correlated with soil available phosphorus and ammonium nitrogen content, and soil pH were negatively correlated with soil microbial groups. Redundancy analysis (RDA) and Random Forest (RF) analysis showed that soil pH and phosphorus content were found to be significant driving factor affecting soil microbial community structure. In summary, the long-term nutrient addition significantly changed soil available nutrients and soil pH, and then affected the microbial community structure.

Key Words: nutrient addition; microbial community structure; PLFA; soil physical and chemical properties; *Stipa baicalensis* steppe

我国天然草原总面积 392.8 万 km^2 , 占国土面积的 40.9%^[1]。天然草原不仅是我国重要的绿色生态安全屏障,也是牧区各族群众赖以生存的生产资料和生活家园,在维护国家和区域生态安全、边疆稳定、民族团结和促进经济社会可持续发展等方面具有基础性、战略性作用。长期以来,由于对草原重利用、轻保护,重索取、轻投入,超载过牧加上气候变化影响,90%草原出现不同程度的退化^[2]。草地退化降低了净初级生产力,进而降低了土壤肥力和土壤有机碳储量^[3]。养分添加是维持草原生产可持续性的常见管理活动,增加了草地生态系统中限制养分的投入^[4],通过补充土壤所需养分,改善土壤肥力,进而通过促进光合器官的形成、能量传递以及光合产物的运输影响植物的光合作用,导致更快的养分循环速度和更高的植物生产力^[5]。此外,养分添加还可以影响生态系统植物-土壤的相互作用,对陆地生态系统结构和功能的调节有重要作用^[6]。

微生物群落对生态系统功能的维持起着关键作用,能快速对各种全球变化因素(大气 CO_2 浓度增加、氮沉降、地面增温和外来物种入侵)导致的环境变化做出响应。相比与基于 DNA 的(qPCR,测序)方法,尽管磷脂脂肪酸(PLFA)分析缺乏分类学的分辨率,但因为 PLFA 在细胞死亡后迅速降解,反而能更准确的反应微生物群落的变化^[6-7],是微生物丰度在空间和时间变化趋势上最可靠的变化量^[8]。此外,土壤 PLFA 会对营养物质的添加迅速做出反应^[9]。同时,快速生长(富营养细菌)的微生物(R 策略者,例如革兰氏阴性细菌)可能比生长较慢的微生物(K 策略者,例如真菌和革兰氏阳性细菌)对不稳定营养物质添加反应更快^[10-11]。

氮添加对土壤微生物活性以及土壤微生物群落结构的研究较多。有研究表明,草地生态系统土壤微生物群落结构对氮添加有着正效应^[12]、负效应^[13]和无变化^[14-15]的响应情况。此外,持续的氮沉降往往会造成植物生长由氮限制转变为磷限制或氮磷共限制^[16],因此目前开展了大量试验探讨了微生物群落结构和功能对氮磷添加的响应。Li 等研究表明,氮和磷添加均不显著影响土壤 PLFA 总含量和细菌 PLFA 含量,但磷添加可以显著增加真菌 PLFA 含量^[14]。有研究认为磷添加引起的土壤速效磷浓度变化是改变土壤微生物群落多样性和组成的关键参数^[17-18]。目前关于钾限制条件下土壤微生物群落特征的研究还相对较少,且研究结果差异性较大^[19]。开展不同养分添加条件下土壤微生物群落结构变化规律的研究,对分析草地生态系统土壤养分循环和生态系统功能具有重要意义。

贝加尔针茅(*Stipa baicalensis*)草原是亚洲中部草原区所特有的草原群系,是草甸草原的典型代表,在我国畜牧业生产中有重要的地位。因此,本研究在内蒙古呼伦贝尔地区贝加尔针茅草原开展长期养分添加试验,分析不同养分添加条件下土壤养分和微生物群落结构特征的变化规律,旨在探究土壤微生物对长期养分添加的响应及其存在的影响机制,为草地合理利用管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

研究地点位于内蒙古呼伦贝尔地区贝加尔针茅草原(48°27′—48°35′N, 119°35′—119°41′E)的一个典型区域,地势平坦,海拔约 765m。该区域属典型的温带大陆性季风气候,年降水量 330mm,年平均气温为-2.4—2.2℃。该地区的自然植被由贝加尔针茅(*Stipa baicalensis*)和羊草(*Leymus chinensis*)等物种为主的草本植物组成,土壤类型为暗栗钙土。该地区在 2010 年之前从未施肥。

1.2 试验设计

2010 年 6 月,在研究地点进行了全因子氮、磷、钾添加试验,采用随机区组试验设计,共八种处理组合,每个处理重复 4 次,小区面积 8m×8m=64m²。处理包括 8 个不同养分添加处理(N、P、K、NP、NK、PK、NPK 和对照 Control)。年添加总量经折算后为尿素 100kg hm⁻² a⁻¹、重过磷酸钙 100kg hm⁻² a⁻¹、硫酸钾 100kg hm⁻² a⁻¹,于每年牧草生长季的 6 月和 7 月中旬均匀撒施,每次添加量为总量的 50%。各处理间设 2m 隔离带,重复区间分别设 5m 隔离带。

1.3 样品采集

于 2021 年 8 月上旬进行样品采集,土壤取样按照“随机”、“等量”和“多点混合”的原则,按照 S 型取样法在小区内选取 10 个点,去除表面植被,用直径为 5cm 的土钻,取土壤表层 0—15cm 土壤混匀过筛,去除根系和石块等杂物。采用“四分法”选取 1kg 土样,迅速装入无菌封口袋,冰盒冷藏并迅速运至实验室。样品前处理后分成两部分,一部分土样于室内自然风干后研磨过筛进行土壤理化性质的测定,剩余的鲜样置于-80℃保存后进行微生物测定。

1.4 指标测定

1.4.1 土壤理化性质的测定

土壤 pH 值采用玻璃电极法(水土质量比 2.5:1)测定;土壤有机碳使用元素分析仪测定(Elementar vario MACRO cube);土壤铵态氮、硝态氮、全氮和全磷采用全自动连续流动分析仪(AA3 Bran+Luebbe Corp)测定;速效磷采用碳酸氢钠浸提—钼锑抗比色法测定;土壤全钾采用硫酸—过氧化氢消煮的火焰光度法测定;速效钾采用乙酸铵提取—火焰光度法测定。

1.4.2 土壤微生物群落磷脂脂肪酸(PLFA)的测定

称取 1.5g 冻干土壤样品用体积比为 0.8:1:2 的柠檬酸缓冲溶液:氯仿:甲醇震荡提取土壤样品两次。然后经 SPE 硅胶柱分离得到脂肪酸,将得到的磷脂脂肪酸进行碱性甲醇化,内标为正十九烷酸甲酯(19:0),气相色谱仪(GC-FID, Agilent 7890B USA)进行 PLFA 检测,使用脂肪酸标准品和微生物鉴定系统(MIDI, Inc., Newark, DE)进行定量分析,用 nmol/g 表示^[20]。

根据不同土壤微生物类群 PLFA 特征图谱,利用 PLFA 标记法将其分为 5 类^[21]:非特异性细菌(14:0, 15:0, 15:0DMA, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0),革兰氏阳性(G⁺)细菌(15:0iso, 15:0anteiso, 15:1isoω6c, 16:0iso, 17:0iso, 17:0anteiso),革兰氏阴性(G⁻)细菌(16:1ω7c, 16:1ω9c, 17:1ω8c, 18:1ω5c, 18:1ω7c, 21:1ω3c, 17:0cycloω7c, 19:0cycloω7c),真菌(18:1ω9c, 18:2ω6c)和放线菌(16:0 10-methyl, 17:0 10-methyl, 17:1 ω7c 10-methyl, 18:0 10-methyl, 18:1 ω7c 10-methyl)。

1.4.3 微生物多样性指数计算

本研究通过计算 Shannon 多样性指数(H)、Simpson 优势度指数(D)、Pielou 均匀度指数(J)和 Margalef 物种丰富度指数(M)对微生物丰度和多样性进行分析^[22-23]:

$$\text{Shannon-Wiener 多样性指数}(H): H = - \sum_{i=1}^S (P_i \ln P_i)$$

$$\text{Simpson 优势度指数}(D): D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$$

$$\text{Pielou 均匀度指数}(J): J = \frac{H}{\ln S}$$

$$\text{Margalef 物种丰富度指数}(M): M = \frac{(S - 1)}{\ln N}$$

式中: P_i 为 i 种特征 PLFA 占总的特征脂肪酸个数比例, S 为群落中 PLFA 总种类数, N 为 PLFAs 总含量。

1.5 数据统计与分析

除非另有说明, 否则所有统计分析和作图均使用 RStudio (R 语言版本 v4.2.1) 进行。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验不同养分添加条件下土壤理化因子和微生物群落结构与多样性的差异显著性 (选择 Turkey 法检验)。所有数据均使用 Shapiro-Wilk 和 Levene 进行残差正态性检验和方差齐性检验。采用基于欧式距离的主成分分析法 (PCA) 及 Bray-Curtis 距离的置换多因素方差分析 (Adonis) 对不同养分添加条件下土壤微生物群落结构变异进行分析及显著性检验。采用“pheatmap”包计算土壤微生物群落结构与土壤理化因子的相关系数。使用检测到的所有脂肪酸进行 dbRDA 分析, 以 Hellinger 变换后的微生物群落矩阵作为响应变量, 采用方差膨胀因子 (variance inflation factor) 检验去除共线性强的环境因子^[24]。使用“rdacca.hp”包进行了方差分解分析 (VPA) 以量化变量的相对贡献^[25]。此外, 通过构建随机森林回归模型来探索驱动微生物群落变化的主要预测因子, 微生物的群落组成使用 PCA 的第一轴来表示, 使用“frPermute”包计算每个预测变量重要性和统计显著性, 通过使用“A3”包, 使用响应变量的 1000 个排列来评估模型和交叉验证的 R^2 值的重要性。

2 结果

2.1 长期养分添加对草地土壤理化性质的影响

长期不同养分添加处理对土壤养分含量和土壤 pH 值均产生了较大的影响 (表 1)。与不施肥对照 (Control) 相比, 长期养分添加并没有显著改变土壤有机碳 (SOC) 和全氮 (TN) 含量, 含磷添加处理 (P、NP、PK 和 NPK) 显著提升了土壤全磷 (TP) 和速效磷 (AP) 含量 ($P < 0.05$), 含钾添加处理 (K、NK、PK、NPK) 显著提高了土壤速效钾 (AK) 含量 ($P < 0.05$), 但只有单一钾添加处理显著提升了土壤全钾 (TK) 含量, 土壤硝态氮和铵态氮含量均在含氮添加处理下明显提高, 其中单一氮添加处理分别显著提高了 91.75% 和 180.19% ($P < 0.05$); 此外, 含氮添加处理均降低了土壤 pH 值, 其中单一氮添加处理土壤 pH 值显著下降 ($P < 0.05$)。

表 1 不同养分添加处理土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of soil under different nutrient addition treatments

分析指标 Analysis index	Control	N	P	K	NP	NK	PK	NPK
有机碳 SOC/(g/kg)	38.30±2.18a	39.05±3.77a	38.08±2.66a	36.90±1.72a	37.83±1.55a	37.58±1.37a	34.73±1.69a	36.95±1.38a
pH	6.48±0.10a	5.76±0.33b	6.38±0.08ab	6.51±0.26a	5.97±0.26ab	6.02±0.48ab	6.17±0.14ab	5.97±0.43ab
全钾 TK/(g/kg)	6.06±0.01bc	6.06±0.03bc	6.08±0.01bc	6.92±0.75a	5.83±0.27c	6.42±0.27abc	6.56±0.05ab	5.95±0.25bc
速效钾 AK/(g/kg)	0.21±0.03c	0.2±0.03c	0.22±0.02c	0.99±0.12a	0.15±0.03c	0.74±0.10b	0.77±0.06b	0.58±0.14b
全氮 TN/(g/kg)	3.49±0.18a	3.58±0.24a	3.35±0.14a	3.46±0.11a	3.40±0.14a	3.42±0.16a	3.14±0.36a	3.36±0.18a
全磷 TP/(g/kg)	0.40±0.02b	0.37±0.02b	0.91±0.07a	0.39±0.01b	1.02±0.11a	0.37±0.01b	1.13±0.19a	1.00±0.14a
速效磷 AP/(mg/kg)	6.23±1.30c	6.73±0.25c	147.28±22.51b	6.97±0.87c	193.5±37.96a	6.73±0.71c	190.83±20.28ab	167.33±26.55ab
铵态氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ /(mg/kg)	5.25±0.60b	14.71±5.19a	6.96±0.70ab	5.97±2.15b	10.92±7.51ab	9.67±4.03ab	7.70±0.90ab	6.94±1.45ab
硝态氮 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ /(mg/kg)	20.86±2.14abc	40.00±17.58a	13.39±4.13bc	17.61±1.39bc	26.64±8.2abc	28.94±13.71ab	7.08±0.88c	27.92±9.71abc

同行不同小写字母表示不同养分添加处理之间差异显著 ($P < 0.05$); SOC: 有机碳 Soil organic carbon; TK: 全钾 Total potassium; AK: 速效钾 Available potassium; TN: 全氮 Total nitrogen; TP: 全磷 Total phosphorus; AP: 速效磷 Available phosphorus; $\text{NH}_4^+\text{-N}$: 铵态氮 Ammonium nitrogen; $\text{NO}_3^-\text{-N}$: 硝态氮 Nitrate nitrogen; Control: 对照处理; N: 单一氮添加处理; P: 单一磷添加处理; K: 单一钾添加处理; NP: 氮和磷复合添加处理; NK: 氮和钾复合添加处理; PK: 磷和钾复合添加处理; NPK: 氮、磷和钾复合添加处理

2.2 长期养分添加对草地土壤 PLFA 含量的影响

长期不同养分添加处理下土壤总 PLFA 和各类群 PLFA 含量如表 2 所示。不同处理下土壤总 PLFA、总细菌 PLFA、革兰氏阳性细菌 PLFA、革兰氏阴性细菌 PLFA、真菌 PLFA 和放线菌 PLFA 含量范围分别为 76.11—160.54, 54.63—114.01, 15.97—37.01, 24.37—49.83, 8.48—18.03 和 11.69—31.01 nmol/g。各处理间土壤细菌、真菌、放线菌和总 PLFA 含量均表现为 K、P>Control>NP、NK、NPK、N、PK。与 Control 处理相比, PK 添加处理显著降低了土壤总细菌 PLFA 含量 ($P<0.05$), 并且磷和钾添加处理显著高于含氮添加处理 (N、NP、NK 和 NPK) 和 PK 添加处理 ($P<0.05$)。真菌和放线菌 PLFA 含量为 Control 处理显著高于含氮添加处理 (N、NP、NK 和 NPK) 和 PK 添加处理 ($P<0.05$), 而 PK 和 NPK 处理显著降低了土壤总 PLFA 含量 ($P<0.05$)。养分添加均未改变土壤革兰氏阳性细菌/革兰氏阴性细菌 (G^+/G^-) 的比值, 但 NP、NK 和 NPK 处理显著降低了土壤真菌/细菌 (F/B) 的比值 ($P<0.05$), 与 Control 处理相比分别降低了 15.53%、18.08% 和 15.66%。

表 2 不同养分添加处理土壤微生物的 PLFA 类型和含量/(nmol/g)

Table 2 Types and contents of PLFA in soils under different nutrient addition treatments

处理 Treatment	革兰氏阳性细菌 Gram-positive bacteria	革兰氏阴性细菌 Gram-negative bacteria	革兰氏阳性细菌/ 革兰氏阴性细菌 G^+/G^-	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	放线菌 Actinomycetes	总磷脂脂肪酸 Total PLFAs	真菌/细菌 F/B
Control	24.49±3.72abc	42.73±3.22ab	0.57±0.05a	87.56±8.59ab	14.37±0.85a	24.26±2.64ab	126.19±11.70ab	0.165±0.013a
N	19.56±4.48c	32.22±6.83c	0.61±0.03a	68.95±15.33bc	10.79±2.02b	17.58±4.29bc	97.32±21.43bc	0.158±0.011abc
P	29.69±4.84ab	46.30±4.16a	0.64±0.06a	101.38±11.51a	16.40±1.63a	24.70±3.67a	142.49±16.51a	0.162±0.010ab
K	31.14±4.02a	47.18±2.03a	0.66±0.06a	103.53±7.53a	16.15±1.11a	26.53±3.09a	146.20±10.62a	0.157±0.015abc
NP	20.55±3.2c	33.96±5.10bc	0.61±0.03a	74.73±9.90bc	10.38±1.61b	16.99±2.41c	102.10±13.18bc	0.139±0.016bc
NK	21.84±1.39bc	33.23±4.87bc	0.66±0.06a	74.98±7.75bc	10.13±1.17b	17.33±2.39c	102.43±11.24bc	0.135±0.003c
PK	18.01±2.01c	27.81±3.79c	0.65±0.02a	64.61±7.40c	10.28±1.55b	13.32±2.01c	88.21±10.92c	0.159±0.007abc
NPK	20.31±1.77c	32.10±3.63c	0.64±0.06a	72.74±6.42bc	10.11±0.93b	15.33±2.03c	98.19±9.12bc	0.139±0.004bc

同列不同小写字母表示不同养分添加处理之间差异显著 ($P<0.05$); G^+/G^- : 革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌 Gram-positive bacteria/Gram-negative bacteria; F/B: 真菌/细菌 Fungi/Bacteria

2.3 长期养分添加对草地土壤 PLFA 多样性的影响

长期不同养分添加处理下土壤微生物多样性如表 3 所示。不同养分添加处理下土壤磷脂脂肪酸 Shannon 多样性指数、Pielou 均匀度指数和 Simpson 优势度指数均未有显著性差异。与 Control 处理相比, 氮和 PK 添加处理略微提高了微生物 Margalef 丰度指数, 但单一氮添加与单一磷、钾添加处理相比显著提高了 Margalef 丰度指数 ($P<0.05$)。

表 3 不同养分添加处理土壤微生物多样性指数

Table 3 Soil microbial communities' diversity indices in soils under different nutrient addition treatments

处理 Treatment	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	均匀度指数 Pielou index	丰富度指数 Margalef index	Simpson 优势度指数 Simpson index
Control	2.918±0.009a	0.883±0.004a	5.432±0.172ab	0.934±0.001a
N	2.931±0.006a	0.882±0.004a	5.876±0.315a	0.934±0.001a
P	2.939±0.014a	0.884±0.003a	5.400±0.055b	0.935±0.002a
K	2.933±0.009a	0.883±0.007a	5.370±0.171b	0.934±0.002a
NP	2.926±0.014a	0.888±0.008a	5.628±0.071ab	0.933±0.001a
NK	2.914±0.027a	0.892±0.008a	5.462±0.16ab	0.934±0.001a
PK	2.921±0.027a	0.887±0.004a	5.814±0.287ab	0.932±0.002a
NPK	2.91±0.015a	0.891±0.007a	5.509±0.176ab	0.931±0.001a

同列不同小写字母表示不同养分添加处理之间差异显著 ($P<0.05$)

2.4 长期养分添加对土壤微生物群落结构的影响

不同养分添加处理土壤微生物类群主成分分析表明 (图 1), 第一主成分 (PC1) 解释了变异的 43.8%, 第

二主成分(PC2)解释了变异的 14.7%,PC1 和 PC2 共解释了总变异的 58.5%。PC1 可以将 Control、磷和钾添加处理与氮添加以及复合添加处理(NP、NK、PK 和 NPK)区分开,而 PC2 可以将单一添加处理(Control、N、P 和 K)与复合添加处理(NP、NK、PK 和 NPK)区分开。进一步通过基于 Bray-Curtis 距离的置换多因素方差分析(Adonis)表明,土壤微生物群落结构在不同养分添加处理下有较为显著的改变($F = 3.076, R^2 = 0.473, P = 0.001$)。

2.5 影响土壤微生物群落结构的主要因素

对不同养分添加处理下土壤不同类群 PLFA 含量与土壤理化因子进行相关性分析(图 2),整体来看,土壤微生物 PLFA 含量与土壤速效磷、pH 值和铵态氮有很强的相关性。其中,大部分土壤微生物 PLFA 与速效磷和铵态氮显著负相关($P < 0.05$),与土壤 pH 值显著正相关($P < 0.05$)。此外,土壤革兰氏阴性细菌 16:1 ω 9c 还与全钾和速效钾有显著正相关关系($P < 0.05$),土壤放线菌 17:1 ω 7c 10-methyl 与全磷有显著负相关关系($P < 0.05$),土壤非特异性细菌 20:00 与土壤全磷有极显著正相关关系($P < 0.01$)。

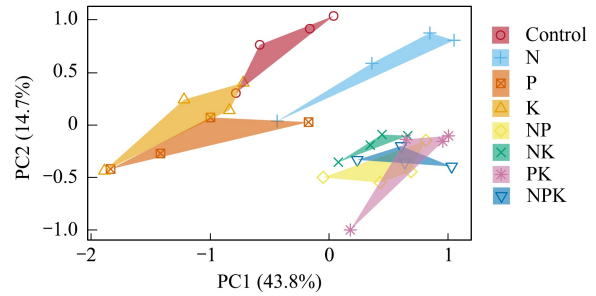


图 1 土壤微生物群落 PLFA 主成分分析(PCA)

Fig.1 Principal Component Analysis (PCA) of soil microbial community PLFA

Control:对照处理;N:单一氮添加处理;P:单一磷添加处理;K:单一钾添加处理;NP:氮和磷复合添加处理;NK:氮和钾复合添加处理;PK:磷和钾复合添加处理;NPK:氮、磷和钾复合添加处理

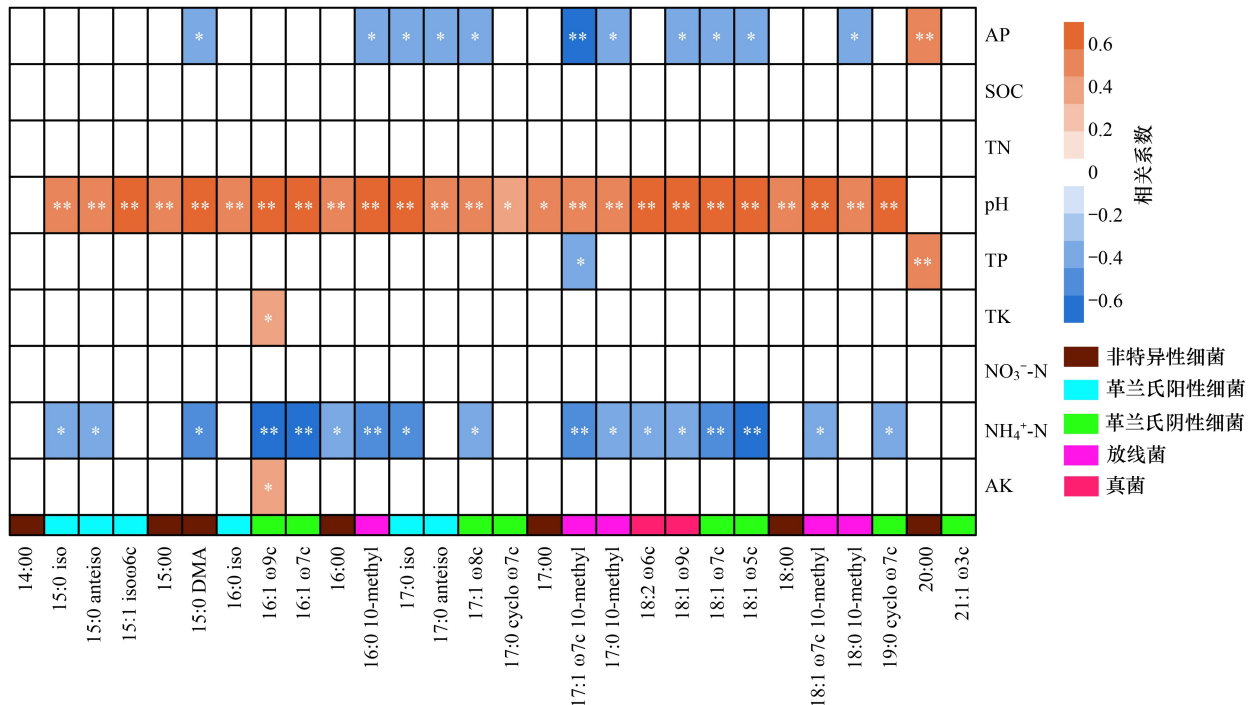


图 2 土壤不同微生物类群 PLFA 含量与土壤理化性质的 Spearman 相关性分析

Fig.2 Spearman correlation analysis between PLFA content of different microbial groups and soil physical and chemical properties

AP:速效磷 Available phosphorus;SOC:有机碳 Soil organic carbon;TN:全氮 Total nitrogen;TP:全磷 Total phosphorus;TK:全钾 Total potassium;
 NO_3^- -N:硝态氮 Nitrate nitrogen; NH_4^+ -N:铵态氮 Ammonium nitrogen;AK:速效钾 Available potassium

冗余分析(RDA)结果表明(图 3),土壤理化因子对土壤微生物群落解释量达 32.57%,第一轴(RDA1)和第二轴(RDA2)分别解释不同养分添加处理下土壤微生物 PLFAs 组成变异的 26.63%和 5.94%。土壤 pH 值、速效磷和全磷是与第一轴关系最密切的因素,土壤硝态氮是与第二轴关系最密切的因素。方差分解分析

(VPA)表明,所有环境变量解释了 32.9%的细菌群落组成总变异,其中,土壤 pH 值、全磷和铵态氮分别解释了总变异的 55.56%、15.53%和 11.95%。随机森林模型使用基于均方误差百分比增长率(% IncMSE)分析参数的重要性,结果表明土壤 pH 值和速效磷是影响土壤微生物群落结构最主要的因素(图 4)。

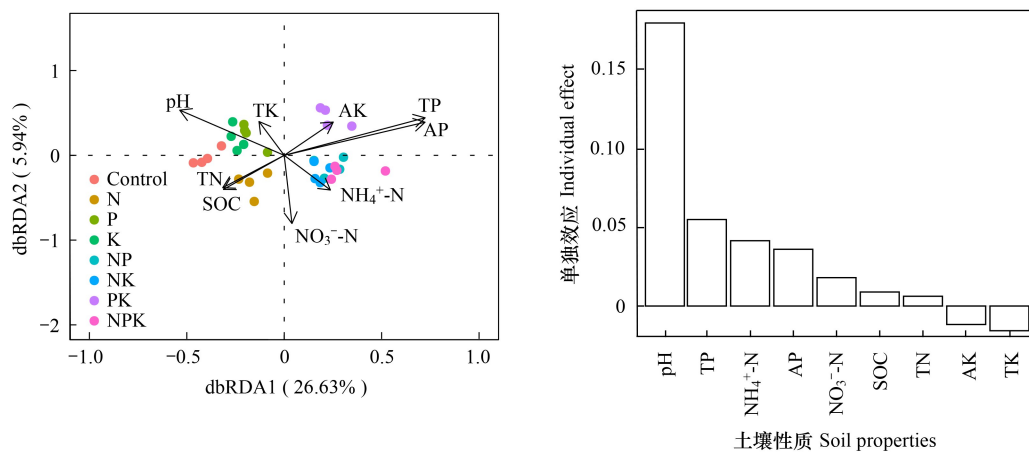


图 3 不同养分添加处理土壤微生物群落结构与土壤理化性质的冗余分析(RDA)和方差分解分析(VPA)

Fig.3 Redundancy analysis (RDA) and variation partitioning analysis (VPA) of soil microbial community structure and soil physical and chemical properties under different nutrient addition treatments

3 讨论

3.1 长期养分添加对土壤理化性质的影响

养分添加已被证明会影响草地生态系统中土壤养分含量和 pH 值。在本研究中,各养分添加处理均未显著改变土壤有机碳和全氮含量,这与大部分的研究结果不同,之前的研究认为氮和磷添加通常会减轻植物生长的养分限制,增加初级生产力,并且可以降低土壤微生物呼吸和土壤有机质的分解速度,而初级生产力的增加以及有限的分解条件会增加土壤有机质和养分保留^[26–27]。虽然养分添加通常倾向于增加草原土壤养分含量,但养分对生态系统影响的理解可能会有偏差,因为大多数生态学实验都是相对短期的(<5a)^[28],同时,长期的养分添加会减少草原生态系统的植物多样性,从长远来看,这种多样性丧失可能会降低营养元素添加对生产力和土壤碳氮含量的积极影响^[29]。与其他研究结果一致,磷和钾的添加会增加土壤全磷和全钾含量,此外,养分添加(N、P、K)显著增加了相应的速效养分含量(硝态氮,铵态氮,速效磷和速效钾),单一氮添加显著降低了土壤 pH 值。氮添加降低了土壤对酸化的缓冲能力并加速土壤酸化,本研究发现当氮与磷和/或钾同时添加时并不会显著降低土壤 pH 值,Seabloom 等^[27]也指出,添加非氮营养元素会抵消长期单独添加氮导致的土壤酸化效应。

3.2 长期养分添加对微生物群落结构的影响

越来越多的研究表明,微生物群落通过介导几乎所有的土壤生化过程,在生态系统功能和维持土壤肥力

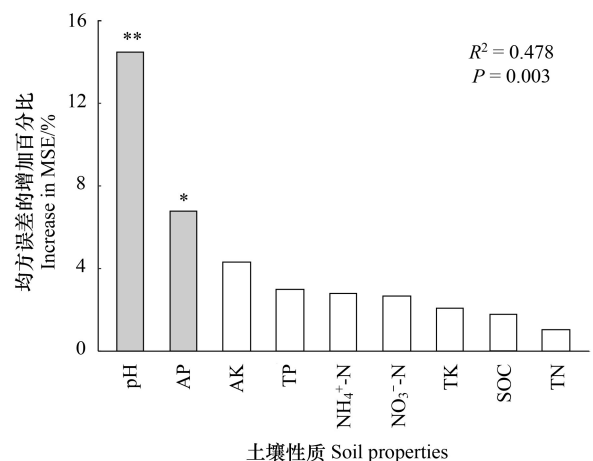


图 4 随机森林回归模型揭示了微生物群落结构的主要驱动因素
Fig.4 A random forest regression model revealing the main drivers of microbial community structure

变量均方误差(MSE)的增加百分比用于估计这些非生物和生物预测因子的重要性,并且更高的 MSE(%)值意味着更重要的预测因子;显著性水平,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$

方面发挥着关键作用。然而,养分添加对草原土壤微生物群落的影响在很大程度上仍然未知。本研究结果表明,不同养分添加处理对土壤微生物群落的影响有所差异,而不同微生物群落对同一养分添加处理的响应基本相似。此外,长期养分添加并没有改变土壤微生物多样性。通过对不同养分添加处理的土壤微生物 PLFAs 相对含量进行主成分分析后发现,与 Control 处理相比,其他养分添加处理土壤微生物群落结构都发生了变化。含氮添加处理(N、NP、NK 和 NPK)均显著降低了土壤细菌,真菌,放线菌和总 PLFA 含量。这与之前的研究结果一致^[30],这主要是氮添加诱导的土壤酸化和土壤盐基阳离子的变化导致的。首先,氮添加提高了土壤 H^+ 的浓度极大的影响了微生物群落组成;其次,碱性矿物阳离子的损失,尤其是 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的损失,与微生物对各种胁迫的易感性增加和土壤微生物生物量的下降有关;第三,土壤酸化改变了微生物的生理能力,降低了胞外酶活性^[30]。此外,本研究表明,单一磷添加和钾添加可以略微提高土壤细菌,真菌和总 PLFA 浓度,这与之前的一项荟萃分析研究结果一致^[31],一般情况下,土壤速效磷含量普遍较低,在磷添加的条件下土壤微生物可以通过释放有机阴离子来溶解无机磷或释放酶矿化有机磷来获得更多磷素以维持自身生长和代谢。而之前的研究表明钾添加可以提高全球草地的初级生产力^[32],从而促进光合产物向地下运输,增加植物净同化率进而影响土壤微生物^[19],这可能是本研究中单一钾添加提高微生物 PLFA 含量的原因。与单一氮添加相比,含氮复合添加处理(NP、NK 和 NPK)可以略微提高土壤细菌和总 PLFA 含量,这可能是因为与真菌相比,土壤细菌对 pH 值的变化更敏感^[33],而添加非氮营养元素缓解了长期单独添加氮导致的土壤酸化效应^[27],与单独氮添加相比,pH 值的升高促进了土壤细菌 PLFA 含量的提高。此外,本研究发现 PK 添加可以显著降低土壤细菌,真菌,放线菌和总 PLFA 含量。Zhang 等^[34]研究表明,PK 添加会降低土壤放线菌的 PLFA 浓度,这可能是土壤中营养元素缺乏或者施肥不均衡对土壤微生物群落结构产生了负效应。在本研究中,PK 添加处理的有机碳和全氮含量均略低于其他处理,并且全磷含量均高于其他处理,此外,土壤硝态氮含量显著低于其他处理,未施肥的 Control 处理和平衡施肥的 NPK 处理的土壤硝态氮含量分别是 PK 处理的 1.95 倍和 2.94 倍。PK 复合添加导致的土壤养分含量降低和土壤硝态氮的快速损耗是土壤微生物群落结构产生负效应的主要原因。

土壤中微生物的 F/B 能够反映土壤肥力与健康状况,可以用来表征微生物对周围环境的响应,以及生态系统的稳定程度^[35]。本研究表明,含氮复合养分添加处理(NP、NK 和 NPK)降低了土壤中微生物的 F/B,氮添加对真菌的这种负面影响可能是由于两种机制造成的。首先,与细菌相比,真菌对氮的需求较低,因此添加氮后较高的土壤氮有效性将有利于细菌而非真菌^[36],其次氮与磷和/或钾同时添加缓解了单独氮添加导致的土壤的酸化^[27],从而与单独氮添加相比提高了细菌的 PLFA 含量,降低了土壤中微生物的 F/B。土壤 G^+/G^- 指示土壤营养状况和土壤底物质量的变化^[15, 37]。通常,革兰氏阴性细菌优先使用新鲜的有机输入物作为碳源,而革兰氏阳性细菌被认为有利于分解低质量或顽固性的有机物。研究表明各养分添加处理均提高了土壤 G^+/G^- 比值,这反映了土壤有机质质量的变化,例如,难分解有机质数量的增加^[22, 37]。

3.3 长期养分添加条件下土壤微生物群落与土壤理化性质的关系

微生物对环境变化极为敏感,土壤理化性质的改变会影响土壤微生物群落结构组成。土壤理化因子与土壤微生物 PLFA 含量的相关性分析结果表明,土壤各类微生物类群 PLFA 含量与速效磷和铵态氮显著负相关,与土壤 pH 值显著正相关,其中土壤 pH 值的变化是影响土壤微生物 PLFA 含量最主要的因素,这与之前的研究相似^[13, 38],本研究冗余分析和随机森林结果也支持这一点。此外,研究还发现土壤铵态氮和磷含量也是影响土壤微生物群落组成的重要因素。Zechmeister-Boltenstern 等^[39]研究发现,氮添加导致土壤中 NH_4^+ 离子含量增加,渗透压升高,速效性养分淋失加剧,微生物生长受到抑制。因此,氮添加可能会改变微生物养分需求,进而影响微生物群落结构^[39-40]。此外,土壤微生物可以通过释放有机阴离子来溶解无机磷或酶来矿化有机磷来获得更多的磷养分来维持自身的生长和代谢^[41],土壤全磷含量的变化会影响土壤细菌及真菌群落的多样性和组成^[42]。由此可见,土壤微生物群落结构受多因素综合影响。

4 结论

采用磷脂脂肪酸(PLFA)技术分析了长期养分添加条件下草地土壤养分含量的变化以及影响微生物群落结构特征的主要因素。研究表明,长期养分添加显著改变了土壤速效养分含量和土壤 pH 值。单一磷和钾添加均提高了土壤细菌、真菌、放线菌和总 PLFA 含量,而单一氮添加和复合养分添加(NP、NK、PK、NPK)均显著降低了以上指标的含量,此外,含氮的复合添加处理(NP、NK、NPK)均显著降低了真菌与细菌比。土壤 pH 值和土壤磷含量是影响土壤微生物群落特征的主要驱动因素。综上所述,长期养分添加条件下土壤理化性质存在差异,养分变化对微生物群落的影响是长期且复杂的,长期养分添加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落的长期影响及其机制有待深入研究。

参考文献(References):

- [1] 潘庆民, 孙佳美, 杨元合, 刘伟, 李昂, 彭云峰, 薛建国, 夏昊, 黄建辉. 我国草原恢复与保护的问题与对策. 中国科学院院刊, 2021, 36(6): 666-674.
- [2] 张志国, 符超. 国家林草局:到 2025 年草原退化趋势得到根本遏制. 绿色中国, 2021(8): 76-77.
- [3] Zhang Z W, Li Q, Gao B, Hu Y Y, Wei H W, Hou S L, Yin J X, Lü X T. Immediate responses of soil nematode community to addition of multiple nutrients in a degraded grassland. *Plant and Soil*, 2022, 473(1): 123-136.
- [4] Mayel S, Jarrah M, Kuka K. How does grassland management affect physical and biochemical properties of temperate grassland soils? A review study. *Grass and Forage Science*, 2021, 76(2): 215-244.
- [5] Jílková V, Sim A, Thornton B, Paterson E. Grass rather than legume species decreases soil organic matter decomposition with nutrient addition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2023, 177: 108936.
- [6] Peñuelas J, Poulter B, Sardans J, Ciais P, van der Velde M, Bopp L, Boucher O, Godderis Y, Hinsinger P, Llusia J, Nardin E, Vicca S, Obersteiner M, Janssens I A. Human-induced nitrogen-phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. *Nature Communications*, 2013, 4: 2934.
- [7] Osburn E D, McBride S G, Kupper J V, Nelson J A, McNear D H, McCulley R L, Barrett J E. Accurate detection of soil microbial community responses to environmental change requires the use of multiple methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 169: 108685.
- [8] Lekberg Y, Rosendahl S, Michelsen A, Olsson P A. Seasonal carbon allocation to arbuscular mycorrhizal fungi assessed by microscopic examination, stable isotope probing and fatty acid analysis. *Plant and Soil*, 2013, 368(1): 547-555.
- [9] Fanin N, Kardol P, Farrell M, Nilsson M C, Gundale M J, Wardle D A. The ratio of Gram-positive to Gram-negative bacterial PLFA markers as an indicator of carbon availability in organic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 128: 111-114.
- [10] Brown R W, Chadwick D R, Bending G D, Collins C D, Whelton H L, Daulton E, Covington J A, Bull I D, Jones D L. Nutrient (C, N and P) enrichment induces significant changes in the soil metabolite profile and microbial carbon partitioning. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 172: 108779.
- [11] Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364.
- [12] 张晓晴, 曾泉鑫, 元晓春, 万晓华, 崔璐琰, 李文周, 林惠瑛, 谢欢, 陈文伟, 吴君梅, 陈岳民. 氮添加诱导的磷限制改变了亚热带黄山松林土壤微生物群落结构. *应用生态学报*, 2023, 34(1): 203-212.
- [13] Sun S, Zhao H, Xing F, Bai Z, Gao Y, Dong Y, Zhou J, Wu Y, Yang Y. Response of soil microbial community structure to increased precipitation and nitrogen addition in a semiarid meadow steppe. *European Journal of Soil Science*, 2017, 68(4): 524-536.
- [14] Li H, Chen Y, Lu Z, Wang F M, Lambers H, Zhang J F, Qin G M, Zhou J G, Wu J T, Zhang L L, Thapa P, Lu X K, Mo J M. Nitrogen deposition in low-phosphorus tropical forests benefits soil C sequestration but not stabilization. *Ecological Indicators*, 2023, 146: 109761.
- [15] Wang C, Lu X K, Mori T, Mao Q G, Zhou K J, Zhou G Y, Nie Y X, Mo J M. Responses of soil microbial community to continuous experimental nitrogen additions for 13 years in a nitrogen-rich tropical forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 121: 103-112.
- [16] Jiang J, Wang Y P, Yang Y H, Yu M X, Wang C, Yan J H. Interactive effects of nitrogen and phosphorus additions on plant growth vary with ecosystem type. *Plant and Soil*, 2019, 440(1): 523-537.
- [17] He D, Xiang X J, He J S, Wang C, Cao G M, Adams J, Chu H Y. Composition of the soil fungal community is more sensitive to phosphorus than nitrogen addition in the alpine meadow on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52(8): 1059-1072.
- [18] Ling N, Chen D M, Guo H, Wei J X, Bai Y F, Shen Q R, Hu S J. Differential responses of soil bacterial communities to long-term N and P inputs in a semi-arid steppe. *Geoderma*, 2017, 292: 25-33.
- [19] 杜艺. 养分添加对晋北赖草地土壤微生物群落特征的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2021.
- [20] Zhang Y Y, Zheng N G, Wang J, Yao H Y, Qiu Q F, Chapman S J. High turnover rate of free phospholipids in soil confirms the classic hypothesis of PLFA methodology. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 135: 323-330.
- [21] Yang Y L, Xie H T, Mao Z, Bao X L, He H B, Zhang X D, Liang C. Fungi determine increased soil organic carbon more than bacteria through their necromass inputs in conservation tillage croplands. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 167: 108587.

- [22] 马进鹏, 庞丹波, 陈林, 万红云, 陈高路, 李学斌. 贺兰山东坡不同海拔典型植被带土壤微生物磷酸脂脂肪酸分析. 生态学报, 2022, 42(12): 5045-5058.
- [23] 向君, 樊利华, 张楠楠, 吴淑兰, 郭敏, 周星梅, 王彦杰. 施磷对干旱胁迫下箭竹根际土壤养分及微生物群落的影响. 生态学报, 2021, 41(23): 9422-9431.
- [24] Blanchet F G, Legendre P, Borcard D. Forward selection of explanatory variables. Ecology, 2008, 89(9): 2623-2632.
- [25] Lai J S, Zou Y, Zhang J L, Peres-Neto P R. Generalizing hierarchical and variation partitioning in multiple regression and canonical analyses using the rda.hp R package. Methods in Ecology and Evolution, 2022, 13(4): 782-788.
- [26] Seabloom E W, Adler P B, Alberti J, Biederman L, Buckley Y M, Cadotte M W, Collins S L, Dee L, Fay P A, Firn J, Hagenah N, Harpole W S, Hautier Y, Hector A, Hobbie S E, Isbell F, Knops J M H, Komatsu K J, Laungani R, MacDougall A, McCulley R L, Moore J L, Morgan J W, Ohlert T, Prober S M, Risch A C, Schuetz M, Stevens C J, Borer E T. Increasing effects of chronic nutrient enrichment on plant diversity loss and ecosystem productivity over time. Ecology, 2021, 102(2): e03218.
- [27] Seabloom E W, Borer E T, Hobbie S E, MacDougall A S. Soil nutrients increase long-term soil carbon gains threefold on retired farmland. Global Change Biology, 2021, 27(19): 4909-4920.
- [28] Hughes B B, Beas-Luna R, Barner A K, Brewitt K, Brumbaugh D R, Cerny-Chipman E B, Close S L, Coblenz K E, de Nesnera K L, Drobnitch S T, Figurski J D, Focht B, Friedman M, Freiwald J, Heady K K, Heady W N, Hettinger A, Johnson A, Karr K A, Mahoney B, Moritsch M M, Osterback A M K, Reimer J, Robinson J, Rohrer T, Rose J M, Sabal M, Segui L M, Shen C C, Sullivan J, Zuercher R, Raimondi P T, Menge B A, Grorud-Colvert K, Novak M, Carr M H. Long-term studies contribute disproportionately to ecology and policy. BioScience, 2017, 67(3): 271-281.
- [29] Yang Y, Tilman D, Furey G, Lehman C. Soil carbon sequestration accelerated by restoration of grassland biodiversity. Nature Communications, 2019, 10: 718.
- [30] Chen D M, Lan Z C, Hu S J, Bai Y F. Effects of nitrogen enrichment on belowground communities in grassland: relative role of soil nitrogen availability *vs.* soil acidification. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 89: 99-108.
- [31] Wu W C, Wang F, Xia A Q, Zhang Z J, Wang Z S, Wang K, Dong J F, Li T, Wu Y B, Che R X, Li L F, Niu S L, Hao Y B, Wang Y F, Cui X Y. Meta-analysis of the impacts of phosphorus addition on soil microbes. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2022, 340: 108180.
- [32] Fay P A, Prober S M, Harpole W S, Knops J M H, Bakker J D, Borer E T, Lind E M, MacDougall A S, Seabloom E W, Wragg P D, Adler P B, Blumenthal D M, Buckley Y M, Chu C J, Cleland E E, Collins S L, Davies K F, Du G Z, Feng X H, Firn J, Gruner D S, Hagenah N, Hautier Y, Heckman R W, Jin V L, Kirkman K P, Klein J, Ladwig L M, Li Q, McCulley R L, Melbourne B A, Mitchell C E, Moore J L, Morgan J W, Risch A C, Schütz M, Stevens C J, Wedin D A, Yang L H. Grassland productivity limited by multiple nutrients. Nature Plants, 2015, 1: 15080.
- [33] Qin C, Zhu K, Chiariello N R, Field C B, Peay K G. Fire history and plant community composition outweigh decadal multi-factor global change as drivers of microbial composition in an annual grassland. Journal of Ecology, 2020, 108(2): 611-625.
- [34] Zhang Q C, Wang G H, Yao H Y. Phospholipid fatty acid patterns of microbial communities in paddy soil under different fertilizer treatments. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19(1): 55-59.
- [35] Strickland M S, Rousk J. Considering fungal: bacterial dominance in soils-Methods, controls, and ecosystem implications. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(9): 1385-1395.
- [36] Chen X, Hao B H, Jing X, He J S, Ma W H, Zhu B. Minor responses of soil microbial biomass, community structure and enzyme activities to nitrogen and phosphorus addition in three grassland ecosystems. Plant and Soil, 2019, 444(1): 21-37.
- [37] 李明, 赵建宁, 秦洁, 祁小旭, 红雨, 杨殿林, 洪杰. 氮素添加对贝加尔针茅草原土壤团聚体微生物群落的影响. 生态学报, 2021, 41(3): 1127-1137.
- [38] Zhang X M, Wei H W, Chen Q S, Han X G. The counteractive effects of nitrogen addition and watering on soil bacterial communities in a steppe ecosystem. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 72: 26-34.
- [39] Zechmeister-Boltenstern S, Michel K, Pfeffer M. Soil microbial community structure in European forests in relation to forest type and atmospheric nitrogen deposition. Plant and Soil, 2011, 343(1): 37-50.
- [40] 程蕾, 周嘉聪, 林开森, 张秋芳, 周锦容, 林巧玉, 郑蔚, 王涛, 陈岳民. 氮添加对亚热带毛竹林土壤微生物群落结构的影响. 生态学杂志, 2020, 39(6): 1929-1937.
- [41] Dai Z M, Liu G F, Chen H H, Chen C R, Wang J K, Ai S Y, Wei D, Li D M, Ma B, Tang C X, Brookes P C, Xu J M. Long-term nutrient inputs shift soil microbial functional profiles of phosphorus cycling in diverse agroecosystems. The ISME Journal, 2020, 14(3): 757-770.
- [42] Tan H, Barret M, Mooij M J, Rice O, Morrissey J P, Dobson A, Griffiths B, O'Gara F. Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the *phoD* phosphorus mineraliser group in pasture soils. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49(6): 661-672.