

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

赵 帅¹, 张静妮¹, 赖 欣¹, 杨殿林^{1*}, 赵建宁¹, 李 刚¹, 邹雨坤^{1,2}

(1.农业部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2.甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 兰州 730070)

摘 要:以内蒙古贝加尔针茅草原、大针茅草原和克氏针茅草原为研究对象,采用氯仿熏蒸法和磷脂脂肪酸(PLFA)分析方法研究了放牧与围栏条件下内蒙古针茅草原土壤微生物生物量和群落结构特征的变化情况。研究表明放牧与围栏草地土壤微生物生物量和群落结构差异显著。氯仿熏蒸法分析结果表明内蒙古针茅草原土壤微生物生物量碳的含量介于 166.6~703.5 mg·kg⁻¹ 之间,微生物生物量氮含量介于 30.34~92.15 mg·kg⁻¹ 之间,其中贝加尔针茅草原土壤微生物生物量碳、氮最高,大针茅草原次之,克氏针茅草原最低。放牧条件下,贝加尔针茅草原、大针茅草原土壤微生物生物量碳、氮显著低于围栏草地,克氏针茅草原则无显著变化。PLFA 分析结果显示,内蒙古针茅草原土壤微生物群落 PLFAs 种类、含量丰富,共检测出 28 种 PLFA 生物标记磷脂脂肪酸,并且以直链饱和脂肪酸和支链饱和脂肪酸为主,相对含量占总量的 2/3 左右,其中贝加尔针茅草原土壤微生物含量最丰富,其围栏样地土壤的 PLFA 含量达到 27.3 nmol·g⁻¹,大针茅草原和克氏针茅草原依次降低。围栏条件下,各类型草原土壤细菌脂肪酸与总 PLFA 含量均显著高于放牧草地,真菌脂肪酸含量则因草原类型不同各有差异;放牧导致各类型草原革兰氏阳性细菌 PLFAs/革兰氏阴性细菌 PLFAs(GP PLFAs/GN PLFAs)比值显著降低,而除了克氏针茅草原,细菌 PLFAs/真菌 PLFAs 比值则显著升高。PLFAs 主成分分析表明,放牧和围栏处理对内蒙古针茅草原土壤微生物群落结构产生影响,且围栏处理的影响程度大于放牧处理。经相关分析表明,氯仿熏蒸法和 PLFA 分析方法之间有很好的—致性,且土壤微生物 PLFAs 与土壤有机质、全磷、硝态氮显著相关。

关键词:内蒙古针茅草原;放牧与围栏;土壤微生物;群落结构;磷脂脂肪酸

中图分类号:S154.36 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2011)06-1126-09

Analysis of Microbial Biomass C, N and Soil Microbial Community Structure of *Stipa* Steppes Using PLFA at Grazing and Fenced in Inner Mongolia, China

ZHAO Shuai¹, ZHANG Jing-ni¹, LAI Xin¹, YANG Dian-lin^{1*}, ZHAO Jian-ning¹, LI Gang¹, ZOU Yu-kun^{1,2}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 2. Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem Ministry of Education, Sino-U.S. Centers for Grazing land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Soil microbial biomass and community structure were analyzed by using chloroform-fumigation extraction and phospholipid fatty acid (PLFA) methods, based on 3 different *Stipa* types (*Stipa baicalensis* meadow steppe, *Stipa grandis* typical steppe, and *Stipa krylovii* typical steppe) in Hulunbeier in Inner Mongolia. The results showed that there were significant differences in soil microbial biomass and community structure at grazing and fenced steppes inside and outside fence. Soil microbial biomass carbon, nitrogen content ranged from 166.6 mg·kg⁻¹ to 703.5 mg·kg⁻¹, 30.34 mg·kg⁻¹ to 92.15 mg·kg⁻¹, respectively. The analysis of Chloroform-fumigation extraction showed that the microbial biomass at *Stipa baicalensis* meadow steppe was largest, followed by *Stipa grandis* typical steppe, and the lowest was at *Stipa krylovii* typical steppe. The microbial biomass at the fenced plots in *Stipa baicalensis* meadow steppe and *Stipa grandis* typical steppe was significantly lower than that at the grazing plots, and there was no difference in *Stipa krylovii* typical steppe. The results of PLFAs displayed that *Stipa* communities in Inner Mongolia showed abundant species and quantity in soil microbial communities. Total 28 PLFAs biomarkers were detect-

收稿日期:2010-12-26

基金项目:国家自然科学基金(30770367, 31000242);中国农业科学院院长基金(200750)

作者简介:赵 帅(1984—),女,河北辛集人,硕士研究生,主要从事生物多样性与生态系统功能研究。E-mail:zhaoshuai690@126.com

* 通讯作者:杨殿林 E-mail:dlyang@caas.net.cn

ed in the soil samples, with saturated fatty acids and branched fatty acids accounting for 2/3, *Stipa baicalensis* meadow steppe had the highest content of fatty acid, being $27.3 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$. The bacteria PLFAs and total PLFAs in the fenced plots were much higher than those at the grazing plots. The changes of fungi PLFAs varied with different grassland types. Grazing decreased significantly the ratio of gram-positive bacteria PLFAs/gram-negative bacterium PLFAs (GP PLFAs /GN PLFAs) and remarkably increased the ratio of bacterial PLFAs/fungi PLFAs except at *Stipa krylovii* typical steppe. Principal component analysis (PCA) indicated that soil microbial community structure was influenced by different regimes of grassland utilization, grazing > exclosure. Correlation analysis of soil PLFAs content and soil nutrients showed that there existed highly agreement between chloroform-fumigation extraction and phospholipid fatty acid (PLFA) methods, and soil microbial biomass had significant correlation with soil organic matter, total phospholipids and ammonium nitrogen.

Keywords: *Stipa* Steppes in Inner Mongolia; grazing and fenced; soil microbe; community structure; PLFAs

贝加尔针茅(*Stipa baicalensis*)草原、大针茅(*Stipa grandis*)草原和克氏针茅(*Stipa krylovii*)草原是欧亚大陆草原区亚洲中部亚区的地带性植物群落,是内蒙古草原的主要草地类型,在畜牧业生产中占有重要的地位,同时具有十分重要的生态地位。由于受人为活动的干扰和长期不合理的利用,导致其生态脆弱,特别是在过度放牧等因素的综合影响下,已呈现出严重的退化态势^[1-2]。草地退化不仅是草原的退化,更重要的是草地土壤环境的退化。土壤微生物作为土壤的重要组成部分,受土壤环境和地上生物多样性的影响,其生物多样性,既代表着土壤的生物活性,也反映了土壤生态胁迫机制对其微生物群落的影响。并可用以较早地预测土壤有机质乃至土壤环境的变化过程,是土壤质量和土壤恢复性能评价的一项重要指标^[3-4]。

近年来,有关放牧对草地土壤微生物多样性影响的研究较多,主要集中于放牧对土壤微生物区系组成、遗传多样性、功能多样性及土壤微生物的时空分布变化研究,且研究方法多采用传统的平板培养、PCR-DGGE及Biolog法^[5-7],但不能定量分析不同微生物类群的生物量信息^[8-9]。磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acids, PLFAs)是活体微生物细胞膜恒定组分,对环境因素敏感、在生物体外迅速降解,因此特定菌群PLFA数量变化可反映出原位土壤真菌、细菌活体生物量与菌群结构^[10-11]。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,近年来广泛应用于微生物生态学研究。而且放牧对土壤质量造成的影响一直存在争议,通过研究土壤微生物生物量来间接反映土壤质量情况也是近年来研究的热点之一^[12-13]。因此,研究放牧与围栏条件下内蒙古针茅草原土壤微生物生物量及微生物群落结构的变化情况,进一步揭示草原生态系统对人类干扰的响应机制,为内蒙古针茅草原的合理利用提供理论依据具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 研究区概况与样地设置

研究地区内蒙古呼伦贝尔草原地处 $N 47^{\circ}20'00'' \sim 50^{\circ}50'30''$, $E 115^{\circ}31'00'' \sim 121^{\circ}34'30''$, 位于内蒙古高原东北部,海拔在 650~750 m 之间,属温带大陆季风气候,年降水 250~400 mm,自东南向西北递减,年均温 $-3 \sim 1^{\circ}\text{C}$,年蒸发量为降水的 2~7 倍。光、热、风能资源丰富,年均风速 $3.0 \sim 4.6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$;无霜期 80~120 d,地带性土壤为黑钙土和栗钙土。

试验设在地带性植物群落贝加尔针茅草原、大针茅草原和克氏针茅草原的典型地段。分别选择地势平坦、开阔的区域,将围栏草地及围栏外自由放牧草地设置为监测样地。贝加尔针茅草原、大针茅草原和克氏针茅草原的围栏样地均于 2001 年 6 月设立的围栏区,每个围栏样地面积约 380 hm^2 ,围栏内禁牧,围栏外自由放牧,放牧家畜为呼伦贝尔肉用羊,贝加尔针茅草原放牧压力为 $4.4 \text{ 只羊} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、大针茅草原放牧压力为 $2.9 \text{ 只羊} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、克氏针茅草原放牧压力为 $2.1 \text{ 只羊} \cdot \text{hm}^{-2}$,均属中度利用。各样地基本情况如表 1 所示,其中贝加尔针茅群落有植物 58 种,主要有贝加尔针茅、羊草(*Leymus chinensis*)、线叶菊(*Filifolium sibiricum*)、日荫菅(*Carex pediformis*)等;大针茅群落有植物 43 种,主要有大针茅、羊草、冰草(*Agropyron cristatum*)、糙隐子草(*Cleistogenes squarrosa*)、洽草(*Koeleria cristata*)等;克氏针茅群落有植物 38 种,主要有克氏针茅、糙隐子草、冰草、草地麻花头(*Serratula komarovii*)、冷蒿(*Artemisia frigida*)等。

1.2 样品采集

2009 年 7 月中旬在植物生长旺季进行采样。在每一个样地内,沿等高线垂直方向设置三条样线,每条样线按照 S 型曲线选择 40 个点,去除表面植被,用直径为 5 cm 的土钻,取 0~20 cm 土壤,最后将 40 份土样混匀过筛,去除根系和土壤入侵物,采用“四分

法”选取 1 kg 土样冷藏带回实验室保存于-70 ℃超低温冰箱。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤基本养分因子测定

土壤硝态氮采用紫外分光光度法^[14],其他土壤基本理化性状采用常规分析法测定^[15]。土壤有机质、全氮、全磷分别采用重铬酸钾-外加热法、半微量凯氏法和硫酸、高氯酸熔融-钼锑抗比色法;土壤速效磷测定用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法;土壤铵态氮含量采用氯化钾浸提-靛蓝吸光度法。测定结果见表 2。

1.3.2 土壤微生物生物量碳、氮测定

土壤微生物生物量碳、氮测定采用氯仿熏蒸 0.5 mol·L⁻¹ K₂SO₄ 提取法^[16];采用 Multi N/C3100TOC/TN (Jena, German) 分析仪 Multi N/ C 3100 自动分析仪 (Jena, German)测定提取液中的碳、氮。

1.3.3 土壤 PLFA 测定

取相当于 8.0 g 干土的新鲜土样,利用 Bligh/Dyer 法通过氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲液振荡提取总脂,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 HP6890-HP5973 型气相色谱质谱联用仪 (GC-MS)分析磷脂脂肪酸的组成^[17-19],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 ℃,用高纯氮气 (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^[20-22],以正十九烷脂肪酸甲酯内标物进行定量计算。

1.4 数据处理

本文试验数据采用配对数据 T 检验法、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、相关分析等数学统计方法,分析软件为 Microsoft Excel 2003 及 SPSS16.0 统计软件。

2 结果与分析

2.1 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤微生物生物量碳、氮变化

内蒙古针茅草原土壤微生物生物量碳的含量介于 166.6~703.5 mg·kg⁻¹ 之间(表 3),微生物生物量氮含量介于 30.3~92.2 mg·kg⁻¹ 之间。中度放牧条件下,不同类型草地土壤微生物生物量碳、氮的变化不同,与围栏样地相比,贝加尔针茅草原土壤微生物生物量碳、氮分别降低了 47.0%、22.8%;大针茅草原土壤微生物生物量碳、氮分别降低了 25.6%、19.6%,而克氏针茅草原则微生物生物量碳无显著变化,而且微生物生物量氮升高了 13.9%。可能是由于土壤微生物以异养型种群为主,其生命活动过程需要消耗一定的能

表 1 观测样地基本情况

Table 1 General conditions of sample plots

项目	贝加尔针茅草原 <i>S. baicalensis</i> steppe	大针茅草原 <i>S. grandis</i> steppe	克氏针茅草原 <i>S. krylovii</i> steppe
经度 Longitude	E 119°40'15"	E 119°17'45"	E 117°58'53"
纬度 Latitude	N 48°29'35"	N 48°25'30"	N 48°11'29"
海拔 Elevation(m)	732	723	595
年降水量 Precipitation(mm)	318.5±47.5	293.9±73.1	272.6±85.9
年平均气温 Annual temperature(℃)	-2.3±0.8	-1.7±0.8	-0.5±0.8

表 2 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤基本理化性状

Table 2 Basic properties in *Stipa* steppes soils at grazing and fenced in Inner Mongolia

项目 Item	贝加尔针茅草原 <i>S. baicalensis</i> steppe		大针茅草原 <i>S. grandis</i> steppe		克氏针茅草原 <i>S. krylovii</i> steppe	
	围栏 fenced	放牧 grazing	围栏 fenced	放牧 grazing	围栏 fenced	放牧 grazing
有机质 Organic matter/g·kg ⁻¹	35.79±0.79	33.17±1.35	21.57±0.18	18.16±0.44	17.81±0.21	15.47±0.15
全氮 Total-N/g·kg ⁻¹	1.88±0.02	2.12±0.01	1.16±0.01	0.88±0.01	1.57±0.01	1.30±0.01
全磷 Total P/g·kg ⁻¹	0.30±0.00	0.29±0.00	0.21±0.01	0.15±0.00	0.23±0.00	0.21±0.00
铵态氮 NH ₄ /mg·kg ⁻¹	14.11±0.25	13.61±0.09	15.84±0.22	10.19±0.20	8.99±0.29	15.27±0.25
硝态氮 NO ₃ /mg·kg ⁻¹	5.49±0.25	2.36±0.04	1.95±0.02	3.67±0.19	2.98±0.16	3.65±0.14
速效磷 Available P/mg·kg ⁻¹	4.46±0.05	3.99±0.03	3.42±0.07	2.46±0.07	4.38±0.06	4.29±0.13

量,放牧扰动土层,降低地下生物量,相对来说可供微生物维持生命活动的能量不足,从而导致该贝加尔针茅草原、大针茅草原 0~20 cm 土层中土壤微生物生物量 C、N 含量显著降低。而克氏针茅草原地下生物量没有显著变化,所以微生物生物量 C、N 变化亦不显著(数据未列出)。

贝加尔针茅和大针茅草原放牧样地土壤微生物生物量碳和土壤全碳含量均减少(土壤有机碳减少 7.3%、15.8%,微生物生物量碳减少 47.0%、22.8%),而微生物熵(SMB-C/SOC)比围栏样地分别下降 42.8%、11.7%,由此得出土壤微生物生物量碳库下降速率比土壤有机质的下降速率快,导致贝加尔针茅和大针茅草原的微生物熵也随之降低。克氏针茅草原放牧样地则比围栏样地升高了 7.0%,产生这种差异的原因可能是克氏针茅草原放牧后土壤有机碳降低,而微生物生物量碳没有显著变化,所以放牧后微生物熵升高。

2.2 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤微生物群落结构 PLFA 分析

在放牧与围栏条件下,内蒙古针茅草原土壤中共检测出 28 种 PLFA 生物标记磷脂脂肪酸(图 1)。分析表明针茅草原土壤中微生物群落 PLFA 种类、含量丰富,含有各种饱和的、不饱和的、分支的和环状的磷脂

脂肪酸生物标记。主要以直链饱和脂肪酸和支链饱和脂肪酸为主,相对含量占总量的 2/3 左右,其次是单烯脂肪酸。而不同样地均检测到双烯脂肪酸 18:2 ω (6,9)t,相对含量均不到总量的 5%。含量最高的脂肪酸为 a15:0、16:0、i16:0,占脂肪酸总量的 6%以上,15:0、16:1 ω 7c、i17:0、17:0、18:1 ω 9t、10Me18:0 等脂肪酸含量也较高,超过 2%,其余脂肪酸含量则多低于 1.5%(表 4,图 1)。

研究表明,贝加尔针茅草原土壤微生物含量最丰富,围栏样地土壤的 PLFA 含量达到了 27.27 nmol·g⁻¹,大针茅和克氏针茅草原依次降低。放牧干扰下,不同草原类型土壤微生物的 PLFA 种类发生改变,且土壤总的 PLFA 量均显著降低。比较不同草原类型土壤微生物细菌和真菌的 PLFA 含量,主要真菌 PLFA 含量要低于细菌 PLFA 含量,而且围栏内外的土壤微生物细菌 PLFA 和真菌 PLFA 含量差异显著。放牧样地与围栏样地相比,贝加尔针茅草原分别降低了 48.7%、72.7%,大针茅草原分别降低了 26.8%、44.0%,克氏针茅草原则是细菌显著降低 21.3%,真菌无显著变化(表 5)。

分析可知,不同类型草原放牧样地和围栏样地土壤中革兰氏阳性和阴性菌 PLFA 含量比(GP/GN)各不相同,各类型草原围栏区土壤中革兰氏阳性菌含量

表 3 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤微生物生物量碳、氮含量
Table 3 Microbial soil biomass C and N on *Stipa* steppes soils at grazing and fenced in Inner Mongolia

项目 Item	贝加尔针茅草原 <i>S. baicalensis</i> steppe		大针茅草原 <i>S. grandis</i> steppe		克氏针茅草原 <i>S. krylovii</i> steppe	
	围栏 fenced	放牧 grazing	围栏 fenced	放牧 grazing	围栏 fenced	放牧 grazing
微生物生物量碳 SMB-C/mg·kg ⁻¹	703.5±38.8 a	373.1±25.5 b	224.0±7.2 a	166.6±5.2 b	186.0±14.1 a	185.0±10.9 a
微生物生物量氮 SMB-N/mg·kg ⁻¹	92.2±6.0 a	71.1±5.5 b	38.2±1.7 a	30.7±3.9 b	30.3±1.3 a	34.6±2.0 b
(SMB-C/SOC)/%	3.4 ±0.2 a	1.9±0.1 b	1.79±0.1 a	1.6±0.05 b	1.8±0.1 b	2.06±0.1 a

注:同一草原类型不同处理间字母不同表示差异显著($P<0.01$)。下同。
Note: Different letters above settlements of the same grassland mean significant difference at 0. 01 level. The same below.

表 4 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤磷脂脂肪酸类型及其比例
Table 4 PLFAs and their proportions(%) of *Stipa* steppes soils at grazing and fenced in Inner Mongolia

磷脂脂肪酸 PLFAs		贝加尔针茅草原 <i>S. baicalensis</i> steppe		大针茅草原 <i>S. grandis</i> steppe		克氏针茅草原 <i>S. krylovii</i> steppe	
		围栏 fenced	放牧 grazing	围栏 fenced	放牧 grazing	围栏 fenced	放牧 grazing
直链饱和脂肪酸	个数	6	4	4	4	3	4
Saturated fatty acids	(%)	21.48±2.16	38.03±10.30	19.36±2.62	46.97±7.51	23.65±5.69	34.45±3.13
单烯脂肪酸	个数	5	6	4	4	5	3
Monounsaturated fatty acids	(%)	26.85±2.46	24.66±10.28	18.47±3.67	21.35±3.99	5.07±1.38	8.29±4.31
多烯脂肪酸	个数	1	1	1	1	1	1
Polyunsaturated fatty acids	(%)	2.58±0.47	0.53±0.30	3.12±0.62	1.56±0.47	3.84±2.01	4.77±2.17
支链饱和脂肪酸	个数	9	8	9	10	8	8
Branched fatty acids	(%)	45.15±9.86	33.02±8.80	59.03±2.78	28.71±6.09	67.51±12.04	52.52±12.02
环丙烷脂肪酸	个数	1	2	0	1	1	0
Cyclo fatty acids	(%)	3.95±1.17	3.74±1.62	0.00±0.00	1.40±0.29	0.36±0.09	0.00±0.00

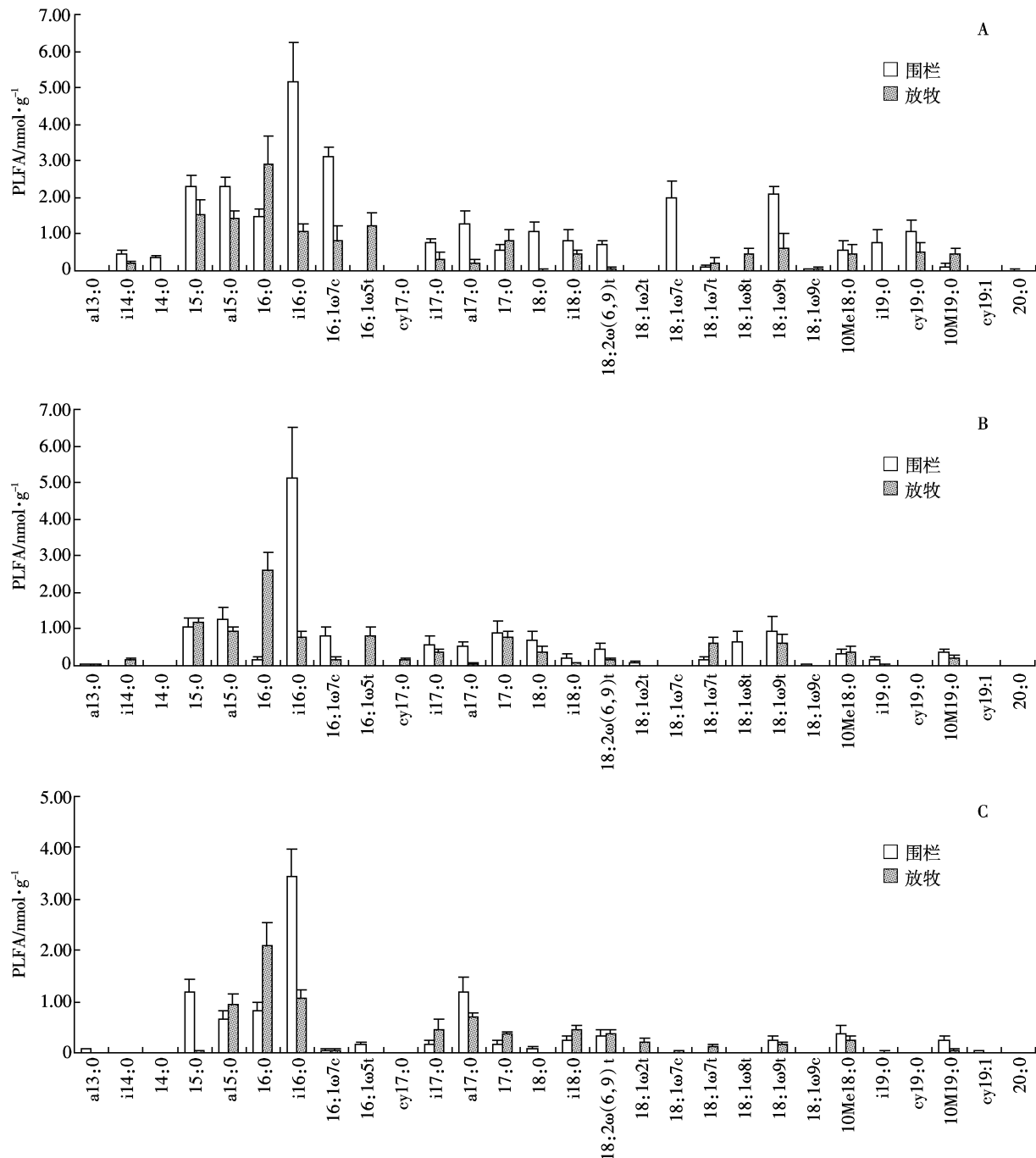


图 1 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤微生物 PLFA 图谱(A:贝加尔针茅草原 B:大针茅草原 C:克氏针茅草原)

Figure 1 Soil microbial PLFA profiles of *Stipa* steppes at grazing and fenced in Inner Mongolia

(A: *Stipa baicalensis* B: *Stipa grandis* C: *Stipa krylovii*)

均高于革兰氏阴性菌含量,而且放牧干扰下 3 种针茅草原土壤 GP/GN 比值均显著下降。表明不同类型草原土壤微生物围栏内外差异显著,放牧与围栏相比,土壤革兰氏阳性细菌显著降低。细菌与真菌的 PLFA 比值介于 8.46~17.76 之间,贝加尔针茅草原、大针茅草原均是放牧样地显著高于围栏样地,克氏针茅样地则与之相反(如表 5 所示)。

2.3 总 PLFA 主成分分析

为进一步分析不同草原类型土壤微生物群落结构差异,对放牧和围栏条件下内蒙古针茅草原土壤微生物磷脂脂肪酸结构进行主成分分析(图 2)。结果表明,不同的处理在 PC 轴上出现了明显的分布差异。第一主成分(PC1)对 PLFA 数据变异的贡献率为 63.8%,权重最大,第二主成分(PC2)对总 PLFA 数据变异

表 5 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤磷脂脂肪酸类型分析(nmol·g⁻¹)
Table 5 Analyse of PLFAs in *Stipa* steppes soils at grazing and fenced in Inner Mongolia(nmol·g⁻¹)

PLFA	贝加尔针茅草原 <i>S. baicalensis</i> steppe		大针茅草原 <i>S. grandis</i> steppe		克氏针茅草原 <i>S. krylovii</i> steppe	
	围栏 fenced	放牧 grazing	围栏 fenced	放牧 grazing	围栏 fenced	放牧 grazing
细菌 Bacteria	23.77±3.74 a	12.20±3.54 b	12.45±0.95 a	9.11±1.21 b	8.27±0.31 a	6.51±0.80 b
革兰氏阳性细菌 GP	13.56±2.39 a	5.19±1.29 b	8.80±1.83 a	3.59±0.28 b	6.99±0.52 a	3.58±0.70 b
革兰氏阴性细菌 GN	8.33±1.13 a	5.25±1.71 a	3.49±0.42 a	4.67±1.08 a	1.11±0.18 b	2.91±0.24 a
真菌 Fungi	2.82±0.28 a	0.77±0.47 b	1.41±0.50 a	0.79±0.26 b	0.59±0.15 a	0.54±0.22 a
放线菌 Actinomycete	0.68±0.34 a	0.94±0.34 a	0.67±0.13 a	0.56±0.36 a	0.58±0.34	0.29±0.19 a
GP/GN	1.63±0.27	1.01±0.14	2.53±0.14	0.79±0.15	6.43±1.41	1.23±0.23
细菌/真菌 Bacteria/Fungi	8.46±1.37	17.76±4.76	9.37±2.36	12.06±2.19	14.70±3.79	12.85±2.99
微生物总 PLFA	27.27±4.12 a	13.91±4.32 b	14.53±1.43 a	10.46±1.80 b	9.44±0.72 a	7.34±1.03 b

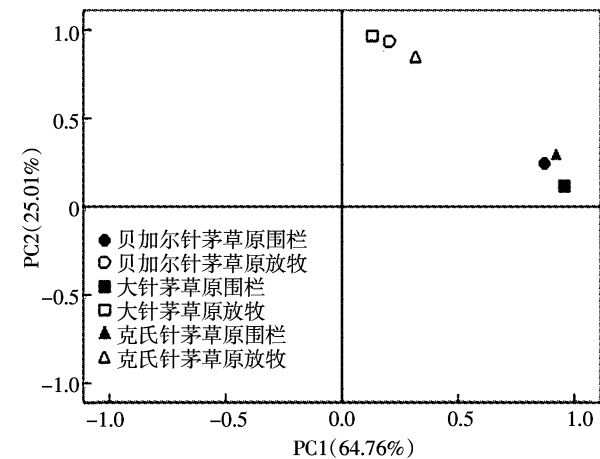


图 2 放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤磷脂脂肪酸结构的主成分分析
Figure 2 Principal component analysis of PLFAs structure in *Stipa* steppes soils at grazing and fenced in Inner Mongolia

的贡献率是 25.0%，累积贡献率达到了 88.8%。根据主成分因子得分矩阵可以将两个主成分分别表示为 $Z_{PC1}=0.355X_1-0.097X_2+0.422X_3-0.135X_4+0.361X_5+0.044X_6$; $Z_{PC2}=-0.063X_1+0.396X_2-0.143X_3+0.422X_4-0.051X_5+0.325X_6$ 。由此可以看出，PC1 代表围栏，PC2 代表放牧。不同的利用方式(放牧和围栏)对针茅草原土壤微生物群落结构的影响程度是围栏处理大于放牧处理。其中 15:0、a15:0、i16:0 等的第一、第二主成分得分均较高，主要代表细菌。第 1(PC1)主成分正方向中，16:1ω7c、a17:0、18:1ω9t 得分较高，它们代表围栏样地的优势类群；而 16:0、16:1ω5t、17:0 的第二主成分得分较高，说明 16:0、16:1ω5t、17:0 是放牧样地的优势类群。

2.4 各菌群 PLFA 与土壤养分相关性分析

对氯仿熏蒸法测定的微生物生物量与 PLFA 测

定结果进行比较，发现两种方法测定结果在不同处理中变化规律较为相似，但也有不一致的地方：氯仿熏蒸法结果表明放牧干扰导致贝加尔针茅草原和大针茅草原土壤微生物生物量积累能力降低，而有利于克氏针茅草原土壤微生物生物量的保持。PLFA 法分析表明，放牧导致各草原类型土壤 PLFA 量降低。研究还表明，脂肪酸标识的细菌、真菌、GP、GN 及整体土壤微生物生物量与微生物生物量碳均呈极显著相关，说明 PLFA 分析方法和氯仿熏蒸法之间有很好的—致性，内蒙古针茅草原可用微生物生物量碳估量细菌、真菌及整体土壤微生物生物量。

通过对各菌群 PLFA 与土壤养分进行相关性分析表明(表 4)，土壤总 PLFA 量、细菌、真菌和 GP 的 PLFA 与土壤有机质、全 P 均显著正相关，尤其是总 PLFAs、细菌、革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌的 PLFAs 与其相关水平更达到了极显著程度($P<0.01$)，可用其来表征土壤这两项重要的肥力属性，也说明它们可用作评价土壤肥力与健康的生物指标，同时在这一地区土壤碳、磷含量也是影响土壤微生物数量和种类的最重要养分因素。相关分析结果还显示，各菌群 PLFA 与铵态氮显著正相关。

3 讨论

微生物生物量表征着土壤的生物状态、能量循环和土壤养分的生物有效性。在本研究中，不同类型草原因其地上部分生物量的差异使输入到土壤中的有机碳含量明显不同，草原的种类不同其枯落物的质量也不同，以上两个方面均会影响不同草原类型土壤微生物生物量碳、氮的活动。而放牧干扰下，牲畜践踏破坏了土壤稳定结构，使土壤微生物生物量降低。这是由于牲畜践踏改变了土壤的紧实度，使土壤孔隙度和

表 4 PLFA 与土壤养分相关性分析

Table 4 Correlation between soil PLFAs content and soil nutrients

项目	有机质 Organic matter	全氮 Total N	全磷 Total P	铵态氮 NH ₄ -N	硝态氮 NO ₃ -N	速效磷 Available P	微生物生物量碳 SMB-C	微生物生物量氮 SMB-N
总 PLFAs Total PLFAs	0.81**	0.46	0.65**	0.28	0.55*	0.26	0.90**	0.83**
细菌 PLFA Bacteria PLFAs	0.82**	0.47	0.66**	0.28	0.56*	0.27	0.91**	0.84**
真菌 PLFAs Fungi PLFAs	0.67**	0.28	0.51*	0.31	0.61**	0.23	0.84**	0.72**
革兰氏阳性细菌 PLFAs GP PLFAs	0.62**	0.37	0.62**	0.24	0.45	0.41	0.78**	0.65**
革兰氏阴性菌 PLFAs GN PLFAs	0.80**	0.35	0.47*	0.32	0.58*	0.01	0.82**	0.81**

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

Note: * indicated significant correlation($P<0.05$), ** indicates highly significant correlation($P<0.01$).

水稳性团聚体减少,引起透水性、透气性和水导率下降,土壤微环境改变,土壤微生物的繁殖代谢受到强烈的干扰,造成放牧样地的微生物生物量显著低于围栏样地(表 3),而克氏针茅草原之所以围栏内外微生物生物量没有显著变化,可能是由于放牧样地土壤的铵态氮、硝态氮升高,土壤的矿化作用加强,0~20 cm 土壤微生物生物量在特定阶段内可以维持在原有水平或更高水平,这与以往很多研究^[23-24]达成共识。

微生物群落直接而敏感地反映土壤生物活性和土壤环境的质量变化。本研究表明,不同类型草原土壤微生物 PLFAs 差异显著,围栏区土壤的总 PLFAs 含量明显高于放牧区。地上部分植物的生长情况不同会导致其根系分泌物和凋落物也不同,这些因素对土壤中微生物的生长和代谢有重要影响,从而影响土壤微生物数量和种类。Bardgett 等^[25]使用 PLFA 技术对不同放牧管理程度的草原土壤以及不同草原类型土壤微生物群落结构开展研究,结果显示放牧显著降低了土壤微生物 PLFAs 生物量,这与本文的研究结果一致。草原土壤微生物受到多方面因素的影响,各因素的影响强度也不同。这是不同历史原因、水热梯度、土壤肥力、土壤环境状况与土壤微生物协同发展的结果,健康良好的土壤环境促进土壤微生物的繁殖和生长,同时,土壤微生物又反过来会对土壤结构进行改善,以及养分积累、转化和维持起促进作用^[26]。

细菌/真菌比可反映细菌和真菌相对含量的变化和两个种群的相对丰富程度。此外,土壤细菌与真菌脂肪酸比值越低,土壤生态系统越持续稳定^[27-28]。对于细菌与真菌的脂肪酸比值,贝加尔针茅草原和大针茅草原的围栏处理明显低于放牧处理。因此由本研究结果可以得出,对草地生态系统而言,围栏处理的土壤环境稳定性高于放牧处理,这主要是因为围栏处理没有牲畜的践踏,保留了真菌菌丝体结构完整性,使其生物量持续稳定增长,从而降低了细菌与真菌的脂肪

酸比值。克氏针茅草原的放牧和围栏处理没有显著差异,可能是由于克氏针茅草原放牧区含有比较高的速效养分,为土壤微生物提供了较为充足养分和能量物质。研究还表明在草地自然生态系统中(围栏),GP 在细菌结构中占优势,放牧干扰则降低了这种优势,围栏外 GP PLFA/GN PLFA 比值显著降低,可见放牧干扰引起细菌群落结构明显变化。而且虽然草原类型显著影响了 PLFA 总量,但是并未引起微生物群落结构明显变化,通过对放牧和围栏样地的土壤磷脂脂肪酸结构进行主成分分析(图 2)即可知,不同的利用方式(放牧和围栏)对内蒙古针茅草原土壤微生物群落结构产生影响,且围栏处理的影响程度大于放牧处理。说明利用方式对于微生物群落的影响不仅在于微生物生物量的变化,也明显影响微生物群落结构。

土壤微生物群落组成复杂,熏蒸法可测定土壤中整体微生物生物量,而磷脂脂肪酸法是利用不同菌源脂肪酸来代表的特定菌群生物量,二者之间存在微生物学意义上的差异,但都与土壤健康及肥力状况密切相关,因此在说明土壤微生物生物量时,两种方法相结合进行比较会更全面^[29]。通过对磷脂脂肪酸与微生物生物量间进行相关分析,二者是显著的正相关关系,该研究结果与 Zelles 等^[30]及 Yoshitake 等^[31]的结果一致。因此,围栏处理是有效提高草原土壤肥力状况的有效措施。相关性分析还表明,有机质和全磷可能是内蒙古草原土壤微生物生长的主要影响因素,本试验中除了硝态氮其他养分对土壤微生物无显著影响。但也有研究发现,土壤微生物类群与其他某些速效养分间存在显著的相关关系^[26,32],这可能是试验地点自然条件与试验设置及管理等因素共同作用的结果。本研究草原生态系统中磷养分相对匮乏,致使微生物表现出对磷等养分的依赖,但围栏措施对于提高土壤微生物生物量方面作用明显。放牧对土壤微生物影响较为复杂,且研究结果也不尽相同,其往往受土壤类

型、气候条件及放牧强度的影响,一般认为适度放牧可促进土壤中真菌或放线菌的增殖^[33],进而提高土壤微生物生物量^[34]。但也有研究表明长期放牧,可降低土壤微生物生物量,而过度放牧也会使土壤微生物生物量碳、氮的含量下降^[35]。

4 结论

放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤微生物群落结构差异显著,围栏草地土壤总磷脂脂肪酸含量增加,表明围栏有利于土壤微生物的生长与维持,而放牧则降低了 PLFA 所指示的土壤总微生物、细菌和真菌生物量;微生物生物量碳、氮可估计内蒙古针茅草原土壤细菌、真菌及整体土壤微生物生物量;土壤微生物生物量与土壤有机质、全磷、铵态氮含量相关。

参考文献:

- [1] 杨殿林, 安胜利, 胡其图. 呼伦贝尔草原的合理利用与开发 [J]. 蒙古草业, 1999(1): 15-19.
YANG Dian-lin, AN Sheng-li, HU Qi-tu. Research on rational exploitation and utilization of grassland in Hulunbeier [J]. *Inner Mongolia Prataculture*, 1999(1): 15-19.
- [2] 杨殿林, 贾树杰, 张延荣, 等. 呼伦贝尔草原畜牧业发展前景与对策 [J]. 中国草地, 2003, 25(4): 72-75.
YANG Dian-lin, JIA Shu-jie, ZHANG Yan-rong, et al. Strategies of grassland development in Hulunbeier in Inner Mongolia [J]. *Grassland of China*, 2003, 25(4): 72-75.
- [3] Garcia C, Hernander T. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, 29(2): 171-177.
- [4] 孙波, 赵其国, 张桃林, 等. 土壤质量与持续环境Ⅲ. 土壤质量评价的生物学指标 [J]. 土壤, 1997, 29(5): 225-234.
SUN Bo, ZHAO Qi-guo, ZHANG Tao-lin, et al. Soil quality and sustainable environment Ⅲ. The biological indicators for assessing soil quality [J]. *Soils*, 1997, 29(5): 225-234.
- [5] 高雪峰, 武春燕, 韩国栋. 放牧对典型草原土壤中几种生态因子影响的研究 [J]. 干旱区资源与环境, 2010, 24(4): 130-133.
GAO Xue-feng, WU Chun-yan, HAN Guo-dong. Effect of grazing on several ecological factors of the soil in typical Steppe [J]. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2010, 24(4): 130-133.
- [6] Wakelina S A, Gregga A L, Simpson R J, et al. Pasture management clearly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria [J]. *Pedobiologia*, 2009, 52: 237-251.
- [7] Farris E, Filigheddu R, Deiana P, et al. Short-term effects on sheep pastureland due to grazing abandonment in a Western Mediterranean island ecosystem: A multidisciplinary approach [J]. *Journal for Nature Conservation*, 2010, 18: 258-267.
- [8] Boon N, De Windt W, Verstraete W, et al. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39: 101-112.
- [9] Favier C F, Vaughan E E, De Vos W M, et al. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 219-226.
- [10] Liu B R, Jia G M, Chen J, et al. A Review of methods for studying microbial diversity in soils [J]. *Pedosphere*, 2006, 16(1): 18-24.
- [11] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(2): 111-129.
- [12] Anderson J D, Ingram L J, Stahl P D. Influence of reclamation management practices on microbial biomass carbon and soil organic carbon accumulation in semiarid mined lands of Wyoming [J]. *Applied Soil Ecology*, 2008, 40: 387-397.
- [13] 赵吉, 杨劼, 邵玉琴. 退化草原土壤健康的微生物学量化评价 [J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(6): 2090-2094.
ZHAO Ji, YANG Jie, SHAO Yu-qin. Microbiological quantitative assessment on soil health in a degraded grassland [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(6): 2090-2094.
- [14] 宋歌, 孙波, 教剑英. 测定土壤硝态氮的紫外分光光度法与其他方法的比较 [J]. 土壤学报, 2007, 44(2): 288-293.
SONG Ge, SUN Bo, JIAO Jian-ying. Comparison between ultraviolet spectrophotometry and other methods in determination of soil nitrate-N [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(2): 288-293.
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 31-165.
BAO Shi-dan. Soil chemical analysis [M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 31-165.
- [16] 林启美, 吴玉光, 刘焕龙. 熏蒸法测定土壤微生物量碳的改进 [J]. 生态学杂志, 1999, 18(2): 63-66.
LIN Qi-mei, WU Yu-guang, LIU Huan-long. Modification of fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 1999, 18(2): 63-66.
- [17] White D C, Flemming C A, Leung K T, et al. In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, 32(2): 93-105.
- [18] Froberg A, Tunlid A, Bååth E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, 14(3): 151-163.
- [19] 王新新, 张颖, 韩斯琴, 等. 1, 3-二氯苯污染底泥的零价铁修复对微生物群落结构的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 173-178.
WANG Xin-xin, ZHANG Ying, HAN Si-qin, et al. Impact of the remediation of 1, 3-dichlorobenzene contaminated sediments on microbial communities structure using zero-valent iron [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(1): 173-178.
- [20] Vestal J R, White D C. Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities [J]. *BioScience*, 1989, 39: 535-541.

- [21] Frotegard Å, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59:3605–3617.
- [22] Frotegard Å, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 22:59–65.
- [23] Jian Chen, John M Stark. Plant species effects and carbon and nitrogen cycling in a sagebrush–crested wheatgrass soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32:47–57.
- [24] McLatchey G P, Reddy K R. Regulation of organic matter decomposition and nutrient release in a wetland soil[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1998, 27:1268–1274.
- [25] Bardgett R D, Jones A C, Jones D L, et al. Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33:1653–1664.
- [26] 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 Jia-en, LIU Wen-gao, HU Gang, The relationship between quantity index of soil microorganisms and soil fertility of different land use systems[J]. *Soil and Environmental Sciences*, 2002, 11(2):140–143.
- [27] Thiet R K, Frey S D, Six J. Do growth yield efficiencies differ between soil microbial communities differing in fungal:bacterial ratios? Reality check and methodological issues[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38:837–844.
- [28] Vries F T, Hoffland E, Eekeren N V, et al. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38:2092–2103.
- [29] 毕明丽, 宇万太, 姜子绍, 等. 利用 PLFA 方法研究不同土地利用方式对潮棕壤微生物群落结构的影响 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(9):1834–1842.
- BI Ming-li, YU Wan-tai, JIANG Zi-shao, et al. Study on the effects of different land use patterns on microbial community structure in aquatic brown soil by utilizing PLFA method[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(9):1834–1842.
- [30] Zelles L, Bai Q Y, Rackwitz R, et al. Determination of phospholipids– and lipopolysaccharide–derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structures in soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 19:115–123.
- [31] Yoshitake S, Uchida M, Nakatsubo T, et al. Characterization of soil microflora on a successional glacier foreland in the high Arctic on Ellesmere Island, Nunavut, Canada using phospholipid fatty acid analysis[J]. *Polar Bioscience*, 2006, 19:73–84.
- [32] 孙瑞莲, 朱鲁生, 赵秉强, 等. 长期施肥对土壤微生物的影响及其在养分调控中的作用[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10):1907–1910.
- SUN Ri-lian, ZHU Lu-sheng, ZHAO Bing-qiang, et al. Effects of long-term fertilization on soil microorganism and its role in adjusting and controlling soil fertility [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(10):1907–1910.
- [33] 赵 吉, 廖仰南, 张桂枝, 等. 草原生态系统的土壤微生物生态[J]. 中国草地, 1999, 3:57–67.
- ZHAO Ji, LIAO Yang-nan, ZHANG Gui-zhi, et al. Soil microbial ecology on the grassland ecosystem[J]. *Grassland of China*, 1999, 3:57–67.
- [34] Bekku Y, Kume A, Nakatsubo T, et al. Microbial biomass in relation to primary succession on arctic deglaciated moraines[J]. *Polar Bioscience*, 1999, 12:47–53.
- [35] 谷雪景, 赵 吉, 王 娟. 内蒙古典型草原土壤微生物生物量研究 [J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(4):1444–1448.
- GU Xue-jing, ZHAO Ji, WANG Juan. Soil microbial biomass of typical grassland in Inner Mongolia[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(4):1444–1448.