

刘红梅, 张海芳, 皇甫超河, 等. 长期氮添加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(4): 709–717.

LIU Hong-mei, ZHANG Hai-fang, HUANGFU Chao-he, et al. Effects of different long-term nitrogen addition on soil microbial diversity of *Stipa baicalensis* steppe in Inner Mongolia, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(4): 709–717.

长期氮添加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落多样性的影响

刘红梅, 张海芳, 皇甫超河, 李 洁, 周广帆, 杨殿林*

(农业部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘 要:以贝加尔针茅草原不同土层土壤为研究对象,开展了连续 6 年的氮添加野外控制试验,8 个氮素添加处理分别为 N0(0 kg N·hm⁻²)、N15(15 kg N·hm⁻²)、N30(30 kg N·hm⁻²)、N50(50 kg N·hm⁻²)、N100(100 kg N·hm⁻²)、N150(150 kg N·hm⁻²)、N200(200 kg N·hm⁻²)、N300(300 kg N·hm⁻²),采用氯仿熏蒸提取法和 Biolog 生态板法,分析了不同氮添加量下草原土壤微生物生物量碳、氮及微生物群落功能多样性的变化规律。结果表明,长期添加无机氮素,土壤微生物生物量碳降低;高氮添加(N100、N150、N200、N300)提高了微生物生物量氮,显著降低了微生物熵。培养 96 h 时,生态板的平均颜色变化率(AWCD)在 0~10 cm 土层大小顺序依次为 N50>N30>N100>N15>N0>N200>N150>N300。相同氮添加量下,不同深度土层土壤微生物生物量碳、氮和 AWCD 值总体表现为 0~10 cm 土层高于 10~20 cm 土层。0~10 cm 土层,高氮添加(N100、N150、N200、N300)下,土壤微生物群落功能多样性指数 *H* 低于或显著低于对照(N0),均匀度指数 *E* 高于或显著高于对照,各处理间优势度指数 *D* 差异不明显。主成分分析结果表明,高氮处理、低氮处理及无氮添加下土壤微生物对碳源利用能力存在较大差异。土壤 pH、有机碳、全氮、全磷、微生物生物量氮、微生物熵、微生物量碳氮比、硝态氮与土壤微生物群落功能多样性密切相关,100 kg N·hm⁻² 氮添加量是土壤微生物活性从促进到抑制的一个阈值。

关键词:贝加尔针茅草原;氮添加;土壤微生物生物量;土壤微生物多样性

中图分类号:S154 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2017)04-0709-09 doi:10.11654/jaes.2016-1267

Effects of different long-term nitrogen addition on soil microbial diversity of *Stipa baicalensis* steppe in Inner Mongolia, China

LIU Hong-mei, ZHANG Hai-fang, HUANGFU Chao-he, LI Jie, ZHOU Guang-fan, YANG Dian-lin*

(Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China)

Abstract: To reveal the responses of soil microbial biomass carbon, soil microbial nitrogen and functional diversity of soil microbe to long term nitrogen additions in *Stipa baicalensis* steppe, chloroform fumigation extraction method and Biolog Ecoplate were used to study the changes in soil microbial diversity under different N treatments, including N0(0 kg N·hm⁻²), N15(15 kg N·hm⁻²), N30(30 kg N·hm⁻²), N50(50 kg N·hm⁻²), N100(100 kg N·hm⁻²), N150(150 kg N·hm⁻²), N200(200 kg N·hm⁻²), N300(300 kg N·hm⁻²). Soil samples were separately collected from the 0~10 cm and 10~20 cm soil layer. The results showed that long-term applications of inorganic nitrogen reduced the soil microbial biomass carbon, while higher nitrogen treatments enhanced the microbial biomass nitrogen, thus significantly reduced the microbial quotient. The AWCD values of the soil microbial communities in 0~10 cm soil layer varied as follows: N50>N30>N100>N15>N0>N200>N150>N300. Within same nitrogen treatment, soil microbial biomass carbon and microbial biomass nitrogen and the overall

收稿日期:2016-09-30

作者简介:刘红梅(1976—),女,河北沧州人,副研究员,从事生物多样性与生态农业研究。E-mail:liuhongmei@caas.cn

*通信作者:杨殿林 E-mail:yangdianlin@caas.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(31170435)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(31170435)

trend AWCD value in 0~10 cm soil layer was higher than those in 10~20 cm. At 0~10 cm soil layer, higher nitrogen treatments (N100, N150, N200, N300) reduced the Shannon index and increased the evenness index, but not for dominance index. Principal component analysis showed that there were very significant differences between higher nitrogen treatments and lower nitrogen treatments and the control in the carbon utilization ability of soil microbial community. Soil parameters, including pH, total nitrogen, total phosphorus, microbial biomass N, microbial quotient, microbial biomass C/N and nitrate nitrogen, had close relationships with microbial functional diversity. Moreover, 100 kg N·hm⁻² was the threshold with which the effect on microbial activity shift from stimulation to inhibition after long-term nitrogen addition in the study area.

Keywords: *Stipa baicalensis* steppe; nitrogen addition; soil microbial biomass; soil microbial diversity

土壤微生物作为草地土壤生态系统中极为重要的组成部分,参与土壤碳、氮的循环及土壤有机物的矿化过程,对有机物的分解和养分的转化、供应起着主导作用,是草地土壤质量变化的重要指标^[1-2]。一些研究者认为,土壤质量指标应当包括微生物生物量碳、氮以及矿化氮、土壤微生物熵等^[3-5]。土壤温度、含水量和化学性质等生态因子可能影响土壤微生物生物量的大小^[6],土壤微生物群落组成的变化会导致土壤物质循环和养分利用的改变。因此,研究草地土壤微生物及其功能多样性,对合理利用土壤、防止地力衰退和改善生态环境具有重要意义。

氮素是陆地生态系统植物生长的重要限制因子,氮的添加可能改变土壤底物养分,从而影响到微生物群落多样性和活性^[7],最终影响到养分循环过程。Treseder^[8]总结分析了82个野外实验,认为在陆地生态系统中氮添加抑制土壤微生物生物量,且施氮量越大,负面作用越大。氮添加可引起植物群落地上部氮吸收量增加,从而使植物群落组成发生变化,进而造成植物凋落物组成相应改变,使得土壤中来自于植物的碳源种类和数量发生改变^[9]。另外,氮添加会改变土壤微生物功能多样性和结构组成^[1,10]。为揭示氮添加对我国北方温带草原生态系统土壤微生物群落功能多样性的影响,本研究以贝加尔针茅草原为对象,运用Biolog生态板法研究了不同氮添加处理下贝加尔针茅草地土壤微生物群落功能多样性的变化规律及其与土壤理化性质的相关关系,以期为该区合理施肥和科学管理提供依据,从而促进天然草地的合理利用和退化草地的恢复。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

研究区域位于大兴安岭西麓,内蒙古自治区鄂温克自治旗伊敏苏木境内,地理位置为北纬48°27′~48°35′,东经119°35′~119°41′,海拔高度为760~770 m,

地势平坦,属于温带草甸草原区,为半干旱大陆性季风气候,年均气温-1.6℃,年降水量328.7 mm,年蒸发量1478.8 mm,≥0℃年积温2567.5℃,年均风速4 m·s⁻¹,无霜期113 d。土壤类型为暗栗钙土^[11]。试验开始时土壤基础理化性质:土壤pH 7.07,总有机碳27.92 g·kg⁻¹,全氮1.85 g·kg⁻¹,全磷0.45 g·kg⁻¹。

植被类型为贝加尔针茅(*Stipa baicalensis*)草甸草原,共有植物66种,分属21科49属。其中,贝加尔针茅为建群种,羊草(*Leymus chinensis*)为优势种,草地麻花头(*Serratula amatsutanna*)、线叶菊(*Filifolium sibiricum*)、扁蓿豆(*Melissitus ruthenica*)、羽茅(*Achnatherum sibiricum*)、日荫菅(*Carex pediformis*)、裂叶蒿(*Artemisia tanacetifolia*)、变蒿(*Artemisia commutata*)、多茎野豌豆(*Vicia multicaulis*)、祁州漏芦(*Rhaponticum uniflorum*)、寸草苔(*Carex duriuscula*)、肾叶唐松草(*Thaicttrum petaloideum*)、狭叶柴胡(*Bupleurum scorzoneri-folium*)、草地早熟禾(*Poa pratensis*)等为常见种或伴生种。

1.2 样地设置与样品采集

试验开始于2010年6月,在围栏样地内设置氮添加试验,氮素添加处理设8个水平,依次为0 kg N·hm⁻² (N0, 对照)、15 kg N·hm⁻² (N15)、30 kg N·hm⁻² (N30)、50 kg N·hm⁻² (N50)、100 kg N·hm⁻² (N100)、150 kg N·hm⁻² (N150)、200 kg N·hm⁻² (N200)、300 kg N·hm⁻² (N300),每年分2次施入。第1次6月15日施氮50%,第2次7月15日施氮50%,氮素为NH₄NO₃。根据各处理的氮添加量,将每个处理每次所需要施加的NH₄NO₃分别溶解在8 L水中(全年增加的水量相当于新增降水1.0 mm),水溶后均匀喷施到相应小区内。共8个小区,4次重复,小区面积8 m×8 m,小区间设2 m隔离带,重复间设5 m隔离带。

2015年8月10日在各个处理小区内按照S型取样法选取10个点,去除表面植被,取0~10 cm和10~20 cm土层土壤各自混匀,去除根系和土壤入侵

物,采用“四分法”选取 1 kg 土壤,将其分成两份:一份迅速装入无菌封口袋,放在冰盒中带回实验室,4℃低温保存,用于测定土壤微生物量碳、氮和土壤微生物群落功能多样性;另一份土样于室内自然风干,用于土壤理化性质测定。

1.3 测定方法

土壤总有机碳采用重铬酸钾外加热法,土壤全氮用凯氏定氮法,土壤全磷采用钼锑抗比色法,土壤 pH 采用玻璃电极法(土水比 1:2.5),土壤铵态氮和硝态氮含量采用氯化钾溶液提取-流动分析仪(QC8000)测定,土壤速效磷采用碳酸氢钠提取-钼锑抗比色法^[12]。

土壤微生物生物量碳、氮采用氯仿熏蒸-K₂SO₄提取法^[13],土壤微生物生物量碳换算系数为 2.64,土壤微生物生物量氮换算系数为 1.85。

土壤微生物群落功能多样性测定:采用刘红梅等^[14]Biolog 试验方法,称取相当于 10 g 烘干土壤的新鲜土壤样品,加入 90 mL 灭菌生理盐水(0.85%)稀释,用封口膜将瓶口封好,在摇床上振荡 30 min,转速为 250 r·min⁻¹。摇匀,静置 10 min 后,依次稀释至 1 000 倍。稀释液加入到 Biolog-Eco 板的 96 个孔中,将 Biolog-Eco 板在 28℃条件下培养,在 Biolog 微孔板读数仪(BIOLOG Inc.,美国)上连续读数 7 d,每 24 h 读数一次。

Biolog 数据采用 Garland 等^[15]提出的微平板平均颜色变化率(AWCD)来表示,计算方法如下:

$$AWCD = \sum (C_i - R) / n$$

式中: C_i 为每个有培养基孔的光密度值; R 为对照孔的光密度值; n 为 Biolog-Eco 微平板上供试碳源的种类数, n 值为 31,重复 3 次。

用 Shannon 指数 H 、Simpson 优势度指数 D 和 Shannon 均匀度指数 E 来表征土壤微生物群落代谢功能多样性。采用培养 96 h 时的 Biolog-Eco 平板孔中吸光值来计算土壤微生物群落功能多样性指数^[16],计算公式分别为:

$$\text{Shannon 指数 } H = -\sum p_i \times \log p_i$$

$$\text{Simpson 优势度指数 } D = 1 / \sum p_i^2$$

$$\text{Shannon 均匀度指数 } E = H / \ln S$$

式中: P_i 为第 i 孔相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率; S 为有颜色变化的孔的数目。

1.4 数据统计与分析

应用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)、相关性分析和主成分分析。

2 结果与分析

2.1 土壤化学性质和微生物生物量碳、氮变化

连续 6 年不同氮添加条件下土壤化学性质见表 1。0~10 cm 土层,7 个氮添加处理土壤 pH 值均低于对照,高氮处理(N100、N150、N200、N300)有机碳、硝态氮、铵态氮和速效磷含量高于或显著高于对照,各处理全氮含量没有显著差异。10~20 cm 土层,高氮处理(N100、N150、N200、N300) pH 值显著低于对照,有机碳、硝态氮、铵态氮和速效磷含量高于或显著高于对照。相同氮添加处理不同土层有机碳、全氮、全磷、硝态氮、铵态氮含量大致表现为 0~10 cm 土层>10~20 cm 土层。

连续 6 年不同氮添加条件下土壤微生物生物量碳、氮含量变幅很大(表 2)。0~10 cm 土层氮添加处理的土壤微生物生物量碳含量显著低于对照。10~20 cm 土层 N15、N30、N50、N150、N300 处理土壤微生物生物量碳显著低于对照,N100、N200 与对照间没有显著差异。高氮处理(N100、N150、N200、N300)0~10、10~20 cm 土层土壤微生物生物量氮含量均高于或显著高于对照。0~10、10~20 cm 土层氮添加处理的微生物熵均显著低于对照。0~10 cm 土层与 10~20 cm 高氮处理(N100、N150、N200、N300)微生物生物量碳氮比均显著低于对照。上述结果表明,高氮添加降低了土壤微生物生物量碳与土壤微生物生物量碳氮比,改变了贝加尔针茅草原土壤微生物群落结构。

2.2 Eco 板平均颜色变化率动态特征

AWCD 值反映土壤微生物利用单一碳源的能力,是土壤微生物活性及群落功能多样性的重要指标^[17]。从图 1 可知,随培养时间的延长,土壤微生物利用碳源的能力逐渐增加。同一土层不同氮添加下,AWCD 值增长速率各不相同,说明不同处理间微生物对碳源利用能力有较大差异。培养第 96 h 时,0~10 cm 土层 AWCD 值顺序为 N50>N30>N100>N15>N0>N200>N150>N300,方差分析表明,各处理间 AWCD 值差异显著,低氮添加(N15、N30、N50)显著高于高氮添加(N150、N200、N300);10~20 cm 土层,不同氮添加处理下 AWCD 值大小顺序与 0~10 cm 土层结果不同。相同氮添加处理下不同土层土壤的 AWCD 值差异也很明显。培养 168 h 时,N0、N15、N30、N50、N100、N150、N200、N300 处理 0~10 cm 土层的 AWCD 值分别是 10~20 cm 土层的 121.64%、126.09%、138.74%、194.01%、113.64%、104.74%、119.51%、116.58%。整体来看,培养期内 0~10 cm 土层土壤微生物的碳源利用

表1 不同氮添加下土壤化学性质

Table 1 Soil chemical properties in different nitrogen addition treatments

处理 Treatment		pH	有机碳 Total organic C/g·kg ⁻¹	全氮 Total N/g·kg ⁻¹	全磷 Total P/g·kg ⁻¹	硝态氮 NO ₃ -N/mg·kg ⁻¹	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N/mg·kg ⁻¹	速效磷 Available P/mg·kg ⁻¹
0~10 cm	N0	6.98±0.16a	39.43±0.47cd	2.31±0.21a	0.43±0.02a	1.82±0.04e	27.42±1.28c	4.58±0.14c
	N15	6.85±0.03a	38.79±0.22d	2.41±0.39a	0.42±0.01a	1.92±0.23e	21.11±0.43d	3.89±0.28d
	N30	6.54±0.01b	35.70±0.77d	2.26±0.22a	0.39±0.00b	2.93±0.24e	30.97±2.24c	4.03±0.14c
	N50	6.43±0.03b	39.75±0.58cd	2.27±0.20a	0.39±0.01b	2.82±0.07e	66.26±2.06a	3.89±0.28d
	N100	5.99±0.12c	40.04±0.41c	2.50±0.38a	0.43±0.02a	9.9±0.13d	61.16±3.88b	5.69±0.14b
	N150	5.77±0.09d	44.57±0.43b	2.56±0.09a	0.41±0.02ab	37.67±0.48c	27.60±0.85c	6.94±0.28a
	N200	5.70±0.06d	44.87±0.5b	2.33±0.13a	0.38±0.01b	48.09±1.46b	29.25±1.05c	5.28±0.56b
	N300	5.19±0.05e	61.42±0.50a	2.39±0.56a	0.39±0.01b	66.21±0.98a	30.32±0.80c	5.83±0.48b
10~20 cm	N0	6.80±0.05a	28.27±0.87f	2.46±0.10a	0.39±0.03a	1.78±0.09e	15.77±0.98e	2.36±0.42e
	N15	6.62±0.02a	34.54±0.65c	1.77±0.10b	0.37±0.02abc	1.50±0.24e	15.27±0.79e	4.99±0.27d
	N30	6.72±0.26a	30.69±0.48e	2.26±0.11ab	0.33±0.01d	1.91±0.07de	25.37±2.75bc	2.36±0.42e
	N50	6.64±0.08a	32.08±0.89d	2.47±0.16a	0.34±0.01cd	2.22±0.06de	23.54±1.37cd	1.67±0.22e
	N100	6.30±0.08b	29.29±0.53f	2.28±0.19ab	0.36±0.02abcd	3.08±0.09d	43.47±1.8a	5.46±0.64cd
	N150	6.38±0.04b	32.59±0.75d	1.97±0.38ab	0.38±0.02ab	15.33±0.16c	27.12±0.42b	7.47±0.23a
	N200	6.32±0.03b	38.34±0.30b	2.23±0.42ab	0.35±0.01bcd	24.26±0.38b	24.65±0.16cd	6.11±0.28bc
	N300	6.11±0.01c	39.47±0.25a	2.19±0.44ab	0.34±0.01cd	29.90±1.80a	22.50±0.34d	6.72±0.61b

注:同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different letters within the same column indicated significant difference among treatments ($P<0.05$). The same below.

表2 不同氮添加下土壤微生物量碳、氮

Table 2 Soil microbial biomass C, N in different nitrogen addition treatments

处理 Treatment	微生物生物量碳 Microbial biomass C/mg·kg ⁻¹		微生物生物量氮 Microbial biomass N/mg·kg ⁻¹		微生物商 Microbial quotient/%		微生物生物量碳氮比 Microbial biomass C/N	
	0~10 cm	10~20 cm	0~10 cm	10~20 cm	0~10 cm	10~20 cm	0~10 cm	10~20 cm
N0	641.32±0.93a	457.58±6.93a	37.25±3.57e	33.44±3.47c	1.63±0.02a	1.62±0.06a	17.32±1.69a	13.77±1.23b
N15	522.72±6.34d	425.19±16.52b	38.30±1.39e	37.20±1.62c	1.35±0.01c	1.23±0.04c	13.66±0.33c	11.46±0.94c
N30	434.02±10.30f	302.74±0.40e	33.77±2.05e	20.09±1.50d	1.22±0.03d	0.99±0.02e	12.90±1.09c	15.12±1.11b
N50	567.07±2.58b	343.13±11.48d	36.63±1.94e	16.03±0.35d	1.43±0.02b	1.07±0.03d	15.51±0.75b	21.41±0.25a
N100	421.94±5.55g	450.85±12.87a	56.19±3.43d	38.02±2.81c	1.05±0.01e	1.54±0.06b	7.52±0.36d	11.92±1.22c
N150	537.77±9.11c	388.28±6.23c	72.34±0.68c	47.80±6.17b	1.21±0.03d	1.19±0.02c	7.43±0.06d	8.20±0.94d
N200	463.91±2.18e	453.05±2.00a	86.93±4.23b	66.79±0.86a	1.03±0.02e	1.18±0.021c	5.35±0.29e	6.78±0.06d
N300	470.25±6.53e	358.58±8.21d	123.24±3.58a	68.23±3.02a	0.77±0.01f	0.91±0.02f	3.82±0.06f	5.25±0.11e

能力高于 10~20 cm 土层。

2.3 土壤微生物群落多样性指数的变化

不同氮添加下土壤微生物群落的功能多样性指数不同(表3)。高氮添加(N150、N200、N300)在 0~10 cm、10~20 cm 土层的 Shannon 指数 H 均显著低于对照($P<0.05$),优势度指数 D 也均低于对照,但不同处理间无显著差异($P>0.05$)。10~20 cm 土层除 N100 处理的 Shannon 指数 H 与对照无显著差异外,其余 6 个 N 处理的 Shannon 指数 H 均显著低于对照;优势度指数 D 和均匀度指数 E 与对照相比,均无显著差

异($P>0.05$)。相同氮添加处理不同土层 Shannon 指数 H 和优势度指数 D 大致表现为 0~10 cm 土层>10~20 cm 土层。

2.4 土壤微生物群落碳源利用的主成分分析

Biolog 微孔中的 31 种碳源根据官能团的不同分为 6 大类,分别为碳水类、氨基酸类、羧酸类、酚酸类、多聚物类、胺类^[18]。利用培养 96 h 的 AWCD 值,在不同土层内对 31 种碳源底物利用情况进行主成分分析。主成分提取的原则是提取特征值大于 1 的前 m 个主成分。根据此原则,在不同土层内提取 6 个主成

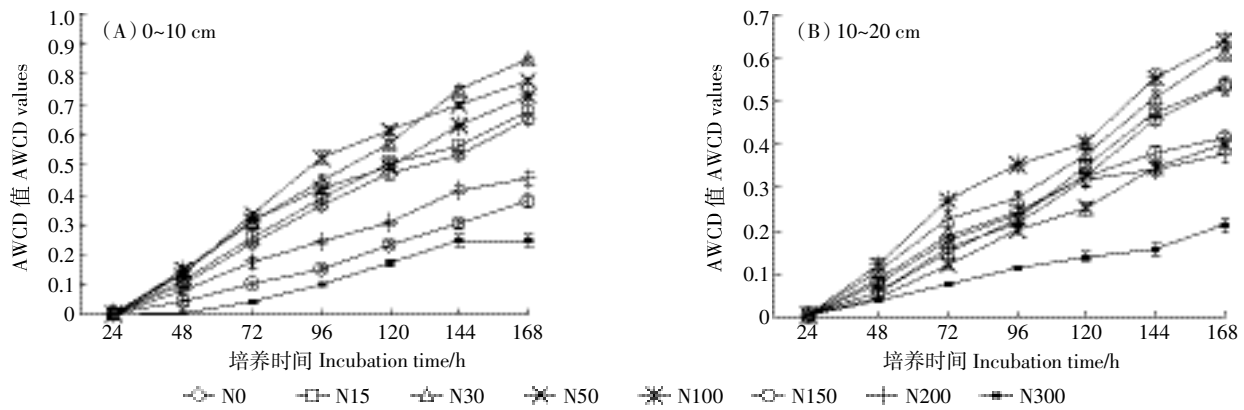


图 1 不同氮添加和土壤深度土壤微生物群落的平均颜色变化率随时间的变化
Figure 1 Changes of soil average well color development of soil microbe community with time under different nitrogen addition and soil depths

表 3 不同氮添加下土壤微生物群落多样性指数
Table 3 Diversity indices for soil microbial communities in different nitrogen addition

处理 Treatment	Shannon 指数 Shannon index(<i>H</i>)		优势度指数 Dominance index(<i>D</i>)		均匀度指数 Evenness index(<i>E</i>)	
	0~10 cm	10~20 cm	0~10 cm	10~20 cm	0~10 cm	10~20 cm
N0	3.971±0.109a	3.860±0.011ab	0.978±0.003a	0.976±0.010a	0.966±0.031b	0.977±0.030a
N15	4.010±0.039a	3.462±0.020d	0.978±0.009a	0.964±0.020a	0.972±0.020b	0.999±0.040a
N30	4.084±0.060a	3.740±0.040bc	0.980±0.050a	0.971±0.035a	0.971±0.030b	0.942±0.039a
N50	3.928±0.050a	3.649±0.051c	0.977±0.010a	0.967±0.042a	0.955±0.042b	0.964±0.021a
N100	3.911±0.120a	3.955±0.110a	0.976±0.112a	0.977±0.044a	0.980±0.041ab	0.970±0.058a
N150	3.380±0.122c	3.650±0.119c	0.948±0.112a	0.967±0.040a	0.994±0.029ab	0.965±0.061a
N200	3.675±0.151b	3.455±0.132d	0.970±0.002a	0.961±0.045a	0.989±0.040ab	0.980±0.023a
N300	3.634±0.040b	3.240±0.174e	0.963±0.030a	0.948±0.020a	1.039±0.011a	0.962±0.030a

分,0~10 cm 土层,PC1 轴贡献率为 44.89%,PC2 为 18.08%。10~20 cm 土层,PC1 轴贡献率为 32.49%,PC2 为 16.60%。图 2 结果表明,不同氮添加处理的 PC 值在 PC 轴上出现了明显的分布差异,说明氮添加量显著影响了土壤微生物群落对碳源的利用能力。碳源利用能力分布差异表明,0~10 cm 土层与 10~20 cm 土层 N150、N200、N300 处理中微生物群落对 PC1、PC2 相关碳源利用能力偏低。0~10 cm 土层,N30、N50 处理中微生物群落主要利用 PC1 相关碳源,N0、N15、N100 处理中主要利用 PC2 相关碳源;10~20 cm 土层,N0、N30 处理中微生物群落主要利用 PC1 相关碳源,N15、N50 处理中主要利用 PC2 相关碳源,N100 处理中对 PC1、PC2 碳源利用能力均较高。

2.5 土壤化学性质和微生物生物量碳、氮与土壤微生物功能多样性之间的相互关系

相关分析(表 4)表明,土壤 pH、微生物熵、微生物生物量碳氮比与土壤微生物 Shannon 指数 H (0~10 cm、10~20 cm)呈显著正相关,与均匀度指数 E (0~10

cm)之间呈显著负相关。土壤全氮与土壤微生物 Shannon 指数 H (10~20 cm)、优势度指数 D (0~10 cm)、均匀度指数 E (0~10 cm、10~20 cm)之间呈极显著正相关。土壤全磷与土壤微生物 Shannon 指数 H (10~20 cm)、优势度指数 D (0~10 cm)呈显著相关,与优势度指数 D (10~20 cm)、均匀度指数 E (10~20 cm)之间呈极显著正相关。土壤有机碳、微生物生物量氮、硝态氮与微生物 Shannon 指数 H (0~10 cm、10~20 cm)呈极显著负相关,与均匀度指数 E (0~10 cm)之间呈极显著正相关。土壤 pH、有机碳、全氮、全磷、微生物生物量氮、微生物熵、微生物生物量碳氮比、硝态氮是影响土壤微生物群落功能多样性的重要环境因子。这说明,长期的氮素添加使土壤的理化性质、微生物生物量发生了变化,从而影响微生物的功能多样性。

3 讨论

3.1 氮添加对土壤微生物生物量的影响

土壤微生物生物量是植物营养物质的源和库,与

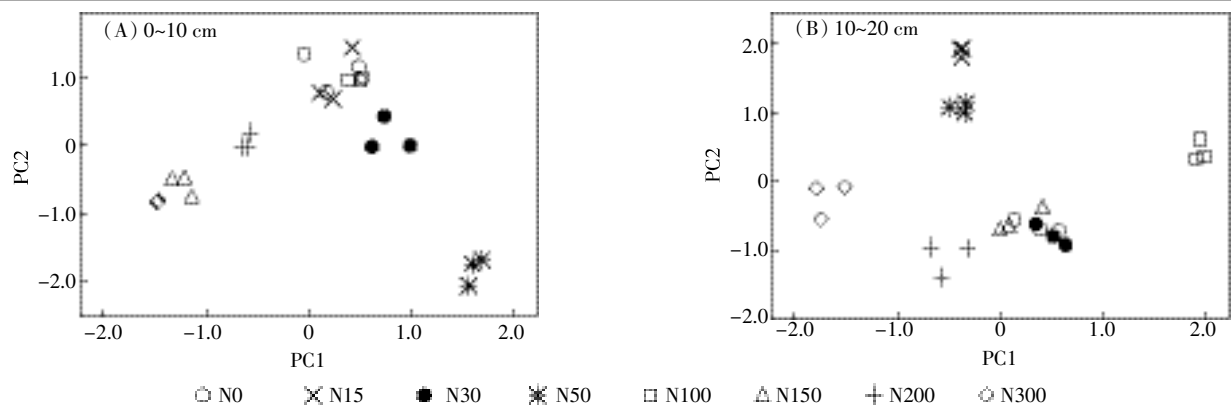


图 2 不同氮添加条件下土壤微生物碳源利用的主成分分析

Figure 2 Principal components analysis for carbon utilization of soil microbial communities in different nitrogen addition

表 4 土壤理化性质与微生物群落多样性指数之间的相关性

Table 4 Correlation analysis between soil chemical properties and soil microbial communities diversity indices

项目 Item	Shannon 指数 Shannon index(<i>H</i>)		优势度指数 Dominance index(<i>D</i>)		均匀度指数 Evenness index(<i>E</i>)	
	0~10 cm	10~20 cm	0~10 cm	10~20 cm	0~10 cm	10~20 cm
pH	0.748**	0.475*	0.216	0.223	-0.470*	0.371
总有机碳 Total organic C	-0.568**	-0.853**	-0.078	0.187	0.679**	-0.145
全氮 Total N	-0.025	0.517**	0.476*	0.342	0.592**	0.669**
全磷 Total P	0.386	0.405*	0.434*	0.690**	0.226	0.522**
微生物生物量碳 Microbial biomass C	0.017	0.204	0.003	0.350	-0.245	0.093
微生物生物量氮 Microbial biomass N	-0.678**	-0.571**	-0.118	0.140	0.655**	-0.150
微生物熵 Microbial quotient	0.432*	0.653**	0.059	0.134	-0.604**	0.146
微生物生物量碳氮比 Microbial biomass C/N	0.661*	0.482*	0.126	-0.093	-0.552**	0.150
硝态氮 NO ₃ -N	-0.747**	-0.674**	-0.135	-0.001	0.628**	-0.209
铵态氮 NH ₄ -N	0.218	0.453*	0.127	-0.051	-0.160	0.174
速效磷 Available P	-0.747**	-0.371	-0.058	0.250	0.574**	-0.021

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

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

养分循环密切相关^[19],常被用来评价土壤质量的生物学性状。在不同生态系统中,氮添加对土壤微生物多样性的影响不尽相同。Maaroufi 等^[20]研究表明,低浓度的氮添加可以提高微生物生物量。但另一些研究表明,氮添加降低了微生物生物量^[21-22]。本研究表明,高氮添加降低了微生物生物量碳,提高了土壤微生物生物量氮。这与洪丕征等^[23]在模拟氮沉降对红椎人工幼龄林和 Li 等^[24]在科尔沁沙质草地上开展的氮添加试验对土壤微生物生物量影响的研究结果一致。分析认为,高氮添加弥补了由于植物生长和氮素损失造成的氮素消耗,加大了土壤微生物生物量氮的固持,但另一方面,则因加速了土壤原有有机碳的分解而降低了土壤微生物生物量碳。

土壤微生物熵是指土壤微生物生物量碳占土壤有机碳含量的百分比^[25],反映土壤中活性有机碳所占的比例。一般土壤中微生物熵值为 1%~4%,由于土壤类型、采样时间、分析方法和措施等的不同,文献报道的微生物熵值扩大为 0.27%~7%。本研究中微生物熵的范围为 0.77%~2.29%,与文献的报道数值相符。高氮处理(N100、N150、N200、N300)的微生物熵值显著低于对照。表明长期单施化肥会降低土壤微生物熵,土壤活性有机碳的周转速率变慢。土壤微生物生物量碳氮比可反映微生物群落结构信息,其显著变化预示着微生物群落结构变化^[26]。本研究中高氮添加处理的土壤微生物生物量碳氮比与低氮添加、无氮添加有显著差异(表 2),说明长期高氮添加使以主要碳

源为代谢基质的微生物类群组成发生了明显变化。

3.2 氮添加对土壤微生物多样性的影响

AWCD 值高低反映了微生物群落代谢活性高低^[6]。N15、N30、N50 和 N100 的 AWCD 值高于对照, N150、N200 和 N300 的 AWCD 值则低于对照(图 1)。表明适量的氮添加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落代谢活性具有积极影响, 过量氮添加则抑制微生物群落代谢活性。不同氮处理下 0~10 cm 土层微生物的 AWCD 值高于 10~20 cm 土层, 与吴则焰等^[27]和蔡进军等^[28]的研究结果一致。贝加尔针茅草地大部分的根系存在于 0~10 cm 土层, 相较于 10~20 cm 土层有更多的植物根际分泌物, 而植物根际分泌物对其周围微生物群落生长和代谢的促进作用可能是导致这一结果的主要原因^[29-30]。主成分分析结果表明, 相同土层不同氮添加量下微生物群落对第一和第二主成分相关碳源利用能力不同, 各处理在 PC 轴上出现了明显的分异, N150、N200、N300 处理中微生物群落对第一和第二主成分相关碳源的利用能力偏低。分析认为, 过量氮素添加打破了土壤原有的养分平衡, 改变了土壤养分的循环转化过程, 加大了微生物群落的不稳定性。

氮添加引起贝加尔针茅草地土壤化学性质发生改变(表 1), 使土壤微生境发生改变, 从而影响了微生物多样性^[31]。氮添加所导致的土壤 pH 的降低是影响土壤微生物功能多样性发生变化的主要因素之一^[1]。本研究发现土壤硝态氮与土壤微生物 Shannon 指数 H (0~10 cm、10~20 cm) 呈极显著负相关, 说明土壤微生物群落的氮素供应状况影响其功能多样性。其原因可能在于氮添加后土壤硝态氮增加, 土壤中游离氮离子增多, 导致土壤酸化^[32], 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^[33]。本研究还发现, 土壤微生物 Shannon 指数 H 与 pH 之间呈显著正相关, 表明氮添加造成的 pH 值降低, 导致了土壤微生物功能多样性的降低。Freitag 等^[34]在研究草地土壤微生物对外源氮输入的响应中, 发现施氮不利于提高草原土壤微生物 α -多样性。高氮添加与低氮添加及无氮添加在碳源利用能力上有很大差异, 原因可能在于高氮添加引起土壤高渗环境, 对微生物群落造成胁迫, 也可能由于高氮添加使贝加尔针茅草地植物群落多样性发生改变^[35], 从而造成凋落物产量及生化性质改变^[36], 进而影响异养微生物底物可获得性。本研究中土壤 Shannon 指数 H 与土壤有机碳含量呈负相关, 可能是因为施用无机氮肥

提高了植物生产力, 增加了凋落物、植物根茬等的残留, 使土壤中积累的有机碳总量增加。氮添加对土壤微生物群落结构和功能的影响存在阈值效应, 如 Yao 等^[37]在对羊草草地生态系统研究中发现了氮添加的阈值效应。本研究也发现了阈值, 即 N100 处理是研究区贝加尔针茅草地氮添加的阈值, 添加氮超过 100 kg·hm⁻² 后土壤微生物活性降低。刘蔚秋等^[38]的研究表明, 草地生态系统未达到氮饱和时, 适量的氮素添加能够降低土壤微生物的营养压力, 但是过量的氮添加将增加土壤环境变化对微生物群落的胁迫程度, 使微生物的生长和活性受到抑制^[39]。

4 结论

(1) 连续高浓度氮添加降低贝加尔针茅草原土壤微生物生物量碳, 提高微生物生物量氮, 改变土壤微生物碳源利用能力, 不利于草地土壤微生物多样性的提高。在该试验条件下, 施氮量 100 kg N·hm⁻² 是研究区微生物活性从促进到抑制的一个阈值。因此选择合适的氮添加量对于促进贝加尔针茅草原土壤微生物碳源利用能力尤为重要。

(2) 土壤微生物功能多样性与土壤 pH、有机碳、全氮、全磷、微生物生物量氮、微生物熵、微生物生物量碳氮比、硝态氮密切相关, 说明土壤 pH、微生物生物量和土壤养分影响土壤微生物功能多样性。

参考文献:

- [1] 王 杰, 李 刚, 修伟明, 等. 贝加尔针茅草原土壤微生物功能多样性对氮素和水分添加的响应[J]. 草业学报, 2014, 23(4): 343-350.
WANG Jie, LI Gang, XIU Wei-ming, et al. Responses of soil microbial functional diversity to nitrogen and water input in *Stipa baicalensis* steppe, Inner Mongolia, Northern China[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(4): 343-350.
- [2] 刘飞渡, 韩 蕾. 亚热带红壤丘陵区不同人工林型对土壤理化性质、微生物类群和酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2015, 24(9): 1441-1446.
LIU Fei-du, HAN Lei. Effects of Different artificial forestry on soil physio-chemical properties, microbial groups and enzyme activities in subtropical red soil Hilly Region[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2015, 24(9): 1441-1446.
- [3] 赵 彤, 闫 浩, 蒋跃利, 等. 黄土丘陵区植被类型对土壤微生物量碳氮磷的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(18): 5615-5622.
ZHAO Tong, YAN Hao, JIANG Yue-li, et al. Effects of vegetation types on soil microbial biomass C, N, P on the Loess Hilly Area[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(18): 5615-5622.
- [4] 臧逸飞, 郝明德, 张丽琼, 等. 26 年长期施肥对土壤微生物量碳、氮及土壤呼吸的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(3): 1445-1451.

- ZANG Yi-fei, HAO Ming-de, ZHANG Li-qiong, et al. Effects of wheat cultivation and fertilization on soil microbial biomass carbon, soil microbial biomass nitrogen and soil basal respiration in 26 years[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(3):1445-1451.
- [5] 刘恩科, 梅旭荣, 赵秉强, 等. 长期不同施肥制度对土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(3):63-68.
- LIU En-ke, MEI Xu-rong, ZHAO Bing-qiang, et al. Long-term effects of different fertilizer management on microbial biomass C, N and P in a Fluvo-aquic soil[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2009, 14(3):63-68.
- [6] 沈菊培, 贺纪正. 微生物介导的碳氮循环过程对全球气候变化的响应[J]. 生态学报, 2011, 31(11):2957-2967.
- SHEN Ju-pei, HE Ji-zheng. Responses of microbes-mediated carbon and nitrogen cycles to global climate change[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(11):2957-2967.
- [7] Fierer N, Lauber C L, Ramirez K S, et al. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients[J]. *Isme Journal*, 2012, 6(5):1007-1017.
- [8] Treseder K K. Nitrogen additions and microbial biomass: A meta-analysis of ecosystem studies[J]. *Ecology letters*, 2008, 11(10):1111-1120.
- [9] Yang H, Wu M, Liu W X, et al. Community structure and composition in response to climate change in a temperate steppe[J]. *Global Change Biology*, 2011, 17(1):452-465.
- [10] Allison S D, Lu Y, Weihe C, et al. Microbial abundance and composition influence litter decomposition response to environmental change[J]. *Ecology*, 2013, 94(3):714-725.
- [11] Zhang N L, Wan S Q, Li L H, et al. Impacts of urea N addition on soil microbial community in a semi-arid temperate steppe in Northern China[J]. *Plant & Soil*, 2008, 311(1):19-28.
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 三版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO Shi-dan. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. Third Edition. Beijing: China Agricultural Press, 2000.
- [13] 吴金水, 林启美, 黄巧云, 等. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京: 气象出版社, 2006.
- WU Jin-shui, LIN Qi-mei, HUANG Qiao-yun, et al. Method for measuring soil microbial biomass and its application[M]. Beijing: China Meteorological Press, 2006.
- [14] 刘红梅, 赖欣, 宋晓龙, 等. 转双价基因(*Bt+CpTI*)棉种植对根际土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(36):231-236.
- LIU Hong-mei, LAI Xin, SONG Xiao-long, et al. Effects of transgenic *Bt+CpTI* cotton planting on functional diversity of rhizosphere soil microbial community[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(36):231-236.
- [15] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole carbon source utilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(18):2351-2359.
- [16] 赵晓琛, 刘红梅, 皇甫超河, 等. 贝加尔针茅草原土壤微生物功能多样性对养分添加的响应[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(10):1933-1939.
- ZHAO Xiao-chen, LIU Hong-mei, HUANGPU Chao-he, et al. Responses of functional diversity of soil microbial communities to nutrient additions in *Stipa baicalensis* steppe in Inner Mongolia, China[J]. *Journal of Agro-Environmental Science*, 2014, 33(10):1933-1939.
- [17] 袁颖红, 樊后保, 刘文飞, 等. 模拟氮沉降对杉木人工林 (*Cunninghamia lanceolata*) 土壤酶活性及微生物群落功能多样性的影响[J]. 土壤, 2013, 45(1):120-128.
- YUAN Ying-hong, FAN Hou-bao, LIU Wen-fei, et al. Effects of simulated nitrogen deposition on soil enzyme activities and microbial community functional diversities in a Chinese fir plantation[J]. *Soils*, 2013, 45(1):120-128.
- [18] 王楠楠, 韩冬雪, 孙雪, 等. 降水变化对红松阔叶林土壤微生物功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(3):1-9.
- WANG Nan-nan, HAN Dong-xue, SUN Xue, et al. Effects of precipitation change on soil microbial functional diversity in the primitive Korean pine and broadleaved forests[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(3):1-9.
- [19] 何亚婷, 董云社, 齐玉春, 等. 草地生态系统土壤微生物量及其影响因素研究进展[J]. 地理科学进展, 2010, 29(11):1350-1359.
- HE Ya-ting, DONG Yun-she, QI Yu-chun, et al. Advances in researches on soil microbial biomass of grassland ecosystems and its influencing factors[J]. *Progress in Geography*, 2010, 29(11):1350-1359.
- [20] Maaroufi N I, Nordin A, Hasselquist N J, et al. Anthropogenic nitrogen deposition enhances carbon sequestration in boreal soils[J]. *Global Change Biology*, 2015, 21(8):3169-3180.
- [21] Bradley K, Drijber R A, Knops J. Increased N availability in grassland soils modifies their microbial communities and decreases the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(7):1583-1595.
- [22] Chen D M, Lan Z C, Hu S J, et al. Effects of nitrogen enrichment on belowground communities in grassland: Relative role of soil nitrogen availability vs. soil acidification[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 89:99-108.
- [23] 洪丕征, 刘世荣, 于浩龙, 等. 模拟氮沉降对红椎人工幼龄林土壤微生物生物量和微生物群落结构的影响[J]. 山东大学学报, 2016, 51(5):18-28.
- HONG Pi-zheng, LIU Shi-rong, YU Hao-long, et al. Effects of simulated nitrogen deposition on soil microbial biomass and community structure in a young plantation of *Castanopsis hystrix*[J]. *Journal of Shandong University*, 2016, 51(5):18-28.
- [24] Li L J, Zeng D H, Yu Z Y, et al. Soil microbial properties under N and P additions in a semi-arid, sandy grassland[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, 46(6):653-658.
- [25] 刘满强, 胡锋, 何园球, 等. 退化红壤不同植被恢复下土壤微生物量季节动态及其指示意义[J]. 土壤学报, 2003, 40(6):937-944.
- LIU Man-qiang, HU Feng, HE Yuan-qiu, et al. Seasonal dynamics of soil microbial biomass and its significance to indicate soil quality under different vegetations restored on degraded red soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(6):937-944.
- [26] 孙瑞, 孙本华, 高明霞, 等. 长期不同土地利用方式下壤土土壤微生物特性的变化[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(3):655-663.

- SUN Rui, SUN Ben-hua, GAO Ming-xia, et al. Changes of soil microbial characteristics under long-term different land use patterns on an anthropogenic loess soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21(3):655-663.
- [27] 吴则焰, 林文雄, 陈志芳, 等. 中亚热带森林土壤微生物群落多样性随海拔梯度的变化[J]. *植物生态学报*, 2013, 37(5):397-406.
- WU Ze-yan, LIN Wen-xiong, CHEN Zhi-fang, et al. Variations of soil microbial community diversity along an elevational gradient in mid-subtropical forest[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2013, 37(5):397-406.
- [28] 蔡进军, 董立国, 李生宝, 等. 黄土丘陵区不同土地利用方式土壤微生物功能多样性特征[J]. *生态环境学报*, 2016, 25(4):555-562.
- CAI Jin-jun, DONG Li-guo, LI Sheng-bao, et al. The characteristics of soil microbe function diversity in semi-arid loess hilly region[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2016, 25(4):555-562.
- [29] Wang C T, Cao G M, Wang Q L, et al. Changes in plant biomass and species composition of *alpine Kobresia* meadows along altitudinal gradient on the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2008, 51(1):86-94.
- [30] Lovieno P, Alfani A, Bååth E. Soil microbial community structure and biomass as affected by *Pinus pinea* plantation in two mediterranean areas[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 45(1):56-63.
- [31] 齐 莎, 赵小蓉, 郑海霞, 等. 内蒙古典型草原连续 5 年施用氮磷肥土壤生物多样性的变化[J]. *生态学报*, 2010, 30(20):5518-5526.
- QI Sha, ZHAO Xiao-rong, ZHENG Hai-xia, et al. Changes of soil biodiversity in Inner Mongolia steppe after 5 years of N and P fertilizer applications[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(20):5518-5526.
- [32] Chen D M, Lan Z C, 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[J]. *Journal of Ecology*, 2013, 101(5):1322-1334.
- [33] Lauber C L, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15):5111-5120.
- [34] Freitag T E, Chang L, Clegg C D, et al. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12):8323-8334.
- [35] 李文娇, 刘红梅, 赵建宁, 等. 氮素和水分添加对贝加尔针茅草原植物多样性及生物量的影响[J]. *生态学报*, 2015, 35(19):6460-6469.
- LI Wen-jiao, LIU Hong-mei, ZHAO Jian-ning, et al. Effects of nitrogen and water addition on plant species diversity and biomass of common species in the *Stipa baicalensis* steppe, Inner Mongolia, China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(19):6460-6469.
- [36] 于雯超, 宋晓龙, 修伟明, 等. 氮素添加对贝加尔针茅草原凋落物分解的影响[J]. *草业学报*, 2014, 23(5):49-60.
- YU Wen-chao, SONG Xiao-long, XIU Wei-ming, et al. Effects of additional nitrogen on litter decomposition in *Stipa baicalensis* grassland[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(5):49-60.
- [37] Yao M J, Rui J P, Li J B, et al. Rate-specific responses of prokaryotic diversity and structure to nitrogen deposition in the *Leymus chinensis* steppe[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2014, 79:81-90.
- [38] 刘蔚秋, 刘滨扬, 王 江, 等. 不同环境条件下土壤微生物对模拟大气氮沉降的响应[J]. *生态学报*, 2010, 30(7):1691-1698.
- LIU Wei-qiu, LIU Bin-yang, WANG Jiang, et al. Responses of soil microbial communities to moss cover and nitrogen addition[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(7):1691-1698.
- [39] 张成霞, 南志标. 土壤微生物生物量的研究进展[J]. *草业科学*, 2010, 27(6):50-57.
- ZHANG Cheng-xia, NAN Zhi-biao. Research progress of soil microbial biomass in China[J]. *Pratacultural Science*, 2010, 27(6):50-57.