

放牧强度对环青海湖地区高寒草原土壤微生物群落碳代谢特征的影响*

翟文婷^{1,2} 陈懂懂¹ 李奇¹ 赵亮^{1**} 刘哲^{1,2} 徐世晓¹ 董全民³ 赵新全¹

中国科学院西北高原生物研究所高原生物适应与进化重点实验室 西宁 810008

²中国科学院大学 北京 100049

³青海省畜牧兽医科学院 西宁 810016

摘要 为了解青藏高原环青海湖地区放牧对土壤微生物群落碳代谢特征的影响,于2010年在青海省刚察县(N37°21'10", E100°4'49")高寒草原,设置围栏封育的禁牧对照组(CK)和牧草利用率分别为30%(G3)、40%(G4)、50%(G5)、60%(G6)和70%(G7)的5个放牧强度控制处理实验,于2014年7月采集土壤样品,运用Biolog-ECO微平板技术分析环湖地区土壤微生物群落碳源代谢特征的分布特征和变化规律。结果显示:(1)研究区域的土壤微生物主要利用碳源类型为氨基酸类和碳水化合物类;(2)放牧处理下土壤微生物群落主要碳源利用类型与利用率相似,与禁牧组显著不同;(3)禁牧和G4处理下土壤微生物的 Shannon-Wiener指数、Simpson指数和McIntosh指数显著高于G3和G6、G7草原,与土壤有机碳和全氮含量变化规律相似。以上研究结果表明,放牧活动能显著影响环青海湖地区高寒草原土壤微生物群落代谢特征,禁牧和适度放牧(G4)有利于维持较高的土壤微生物群落多样性。(图4表3参46)

关键词 环青海湖地区;高寒草原;碳源代谢特征;放牧强度;土壤微生物;Biolog-ECO

CLC S154.36

Effect of grazing intensity on carbon metabolic characteristics of soil microbial communities in an alpine steppe in the regions around Qinghai Lake*

ZHAI Wenting^{1,2}, CHEN Dongdong¹, LI Qi¹, ZHAO Liang^{1**}, LIU Zhe^{1,2}, XU Shixiao¹, DONG Quanmin³ & ZHAO Xinquan¹

¹Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³Qinghai Academy of Animal and Veterinary Sciences, Xining 810016, China

Abstract A grazing intensity management experiment was set up in Gangcha County, Qinghai Province, on the Qinghai-Tibetan Plateau to explore the effects of grazing intensity on carbon metabolic characteristics of soil microbial communities in an alpine grassland in the surrounding area of Qinghai Lake. The treatments, that included grazing exclusion (CK) and other five grazing intensities from 30% to 70%, with increments of 10%, were started in 2010. Soil microbial carbon metabolic and distributional features along a grazing intensity gradient were analyzed using the Biolog-ECO microplate technique using soil samples collected in July 2014. The results showed that: 1) Amino acids and carbohydrates were the main soil microbial carbon sources in the study area. 2) The types of carbon sources and their utilization in grazed grasslands were similar, but they were significantly different from those of the grazing exclusion grassland. 3) The Shannon-Wiener, Simpson, and McIntosh indices of the grazing exclusion and medium grazed (G4) grasslands were significantly higher than those of the lightly and heavily grazed grasslands, and their patterns were similar to those of soil organic carbon and total nitrogen. These results indicate that grazing can significantly influence carbon metabolic characteristics of soil microbial communities of the alpine grassland in the area surrounding Qinghai Lake, and that grazing exclusion and medium grazed (G4) grasslands can maintain higher soil microbial community diversity.

Keywords surrounding area of Qinghai Lake; alpine grassland; carbon metabolic diversity; grazing intensity; soil microbes; Biolog-ECO

收稿日期 Received: 2016-07-07 接受日期 Accepted: 2016-09-03

*国家科技支撑项目(2012BAD13B01, 2014BAC05B04)和青海省科技项目(2014-NS-112)资助 Supported by the National Science and Technology Pillar Project of China (2012BAD13B01, 2014BAC05B04) and the Qinghai Science and Technology Project (2014-NS-112)

**通信作者 Corresponding author (E-mail: lzhaol@nwipb.ac.cn)

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,在土壤生态系统众多过程中发挥着关键作用,如土壤结构形成、矿化、腐殖化、养分循环和利用、污染物分解等^[1-3]。它们对于干扰和环境变化很敏感,被认为是土壤质量的指示因子^[4-6]。自20世纪90年代以来,微生物物种多样性和功能多样性在农业生态系统和自然生态系统研究中均被广泛认为是评价土壤质量的重要指标^[7-8]。其中,土壤微生物物种多样性的评估需要高度专业化的操作技术或者复杂的设备,而土壤微生物功能多样性的评价则相对更容易操作进行,并且直接与土壤的功能息息相关^[9-11]。以底物碳源代谢为基础的Biolog-ECO微平板技术为研究土壤微生物功能多样性提供了一项更为简便快捷的方式,现在被广泛应用于比较评价不同类型、不同植被类型、不同土地利用方式下土壤微生物的群落结构^[12-14]。

环青海湖地区作为青藏高原特殊的地理单元,其草地生态系统的脆弱性以及全球气候变化的敏感性使该区域内草地生态系统的研究具有重要意义^[15-16]。近年来,该地区高寒草地退化、鸟类栖息地遭到破坏等问题相继出现,对当地生态环境造成严重影响,而由过度放牧为主导因子的人为干扰活动被认为是造成的高寒草地退化的重要因素^[15, 17-18]。大量研究表明,放牧能直接改变草地的群落结构和植被物种的性状特征,进而影响草地的生产力以及碳(C)、氮(N)、磷(P)等养分的循环,除此之外,放牧对土壤微生物的活动、种类和数量等也产生了重要影响,不合理的放牧制度对草地健康造成了严重威胁^[19-21]。环湖地区的放牧控制实验已证实放牧能显著改变地表植被盖度和植物群落结构,但不同放牧强度对该地区高寒草原土壤微生物功能多样性的影响尚不明确^[22]。

因此,本研究在青藏高原东北部环青海湖地区的刚察县设立样地,设置放牧梯度控制实验,以0-5 cm、5-10 cm、10-20 cm土层土壤为研究对象,采用Biolog-ECO微平板法,探讨放牧强度对环湖地区高原草原土壤微生物群落碳源代谢特征的影响,为认识放牧条件下高寒草原的地下微生物活动提供科学的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 研究区概况

实验样地位于青藏高原东北部,青海湖北岸的青海省海北藏族自治州刚察县,研究区域中心地理坐标为N37°21'10"、E100°44'49",海拔3 343 m^[23]。整个研究区域周长2 356 m,面积9.42 hm²。该地为典型的高原大陆性气候,日照时间较长,昼夜温差较大,1月平均气温为-17.5℃,7月平均气温为11℃,多年均温为-0.5℃,多年年平均降水量为370.3 mm,年均蒸发量为607.4 mm^[24]。该地区土壤为亚高山高寒草原土,发育于洪冲积性黄土母质,土壤发育年轻,土层较薄。样地主要草地类型为高寒草原天然草场,建群种为紫花针茅(*Stipa purpurea*),主要优势种还包括早熟禾(*Poa* sp.)、矮嵩草(*Kobresia humilis*)、线叶嵩草(*Kobresia capillifolia*)、落草(*Koeleria cristata*)、猪毛蒿(*Artemisia scoparia*)等^[27]。

1.2 实验设计及样品采集

本研究平台于2010年6月初开始,选择健康、阉割过的同岁且体重相近(平均体重经方差检验无显著性差异, $P > 0.05$)的公羊作为放牧家畜,根据草场地上生物量、放牧家畜理论采食量以及草场面积,设置了5个放牧强度,即围栏封育的禁牧对照组(CK)和牧草利用率分别为30%(G3,轻度)、40%(G4,中度)、50%(G5,中度)、60%(G6,重度)和70%(G7,重度),放牧时间为早8:00至晚19:00,出牧前与归牧后分别补水一次,夜间不补饲,四季连续放牧^[23]。于2014年7月采集土壤样品,每一放牧强度区域内按照“S”型取样方式选取6个大样点,以每个大样点为中心,在其附近5 m × 5 m的面积范围内再随机选取5个小样点,用土钻分别采集直径3 cm,深度为0-5 cm、5-10 cm、10-20 cm的3层土壤,将5个小样点的相同土层的土壤放入同一保鲜袋中混合均匀组成一个混合样,6个处理共108个混合样品。带回实验室后,过2 mm土筛后,一部分自然晾干后再过0.15 mm筛,用于部分理化性质的测定,一部分4℃冰箱保鲜保存至第3天,用于微生物群落碳源代谢指标测定。

1.3 分析方法

将土壤鲜样采用Biolog-ECO微平板法进行土壤微生物代谢特征分析,实验所用的Biolog-ECO培养板共96孔,有3次重复,每个重复的第一个孔为没有碳源的空白对照,其余31孔为31种底物碳源。具体实验操作如下:称取10 g鲜土,置于100 mL 0.9%的灭菌生理盐水中,放在摇床上200 r/min震荡30 min后,在超净台上静置1 h,然后吸取1 mL稀释液加入有9 mL 0.9%无菌生理盐水的试管中,制成10⁻²的稀释液,并将稀释液倒入灭菌的“V”型槽中,用8通道加样器向Biolog-ECO 96孔板各孔中分别添加150 μL稀释后的悬液。每个土壤样品做3个重复。25℃恒温培养,从培养时间24 h开始每隔24 h使用Biolog Emax读板读取各孔在750 nm和590 nm波长下的平均吸光值,持续8 d(192 h)。最后将读取的平均吸光度导出,进行后续数据分析^[25-26]。

除此之外,采用环刀法测定土壤容重,采用烘干法测定土壤自然含水率,土壤有机碳、无机碳和全氮分别采用重铬酸钾法、气量法和凯式定氮法^[2-3, 27]进行测定。

1.4 数据分析

平均吸光值(AWCD)是表征微生物群落碳源利用率的一个重要指标,AWCD越大,表示土壤微生物利用碳源的能力越强,可以用来评判微生物群落对碳源利用的总能力^[28]:

$$AWCD = \sum (C_i - R) / 31$$

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,31为培养基碳源总数。

Shannon-Wiener指数(H')用于评估丰富度^[29]:

$$H' = -\sum P_i \ln(P_i)$$

式中, P_i 为第*i*孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

Simpson指数用于评估优势度的指数,常用其变型Gini指数(D)来评价多样性^[28]:

$$D = 1 - \sum (P_i)^2$$

式中, P_i 为第*i*孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

Mcintosh指数 (U) 基于群落物种多维空间距离的多样性指数, 实际上是一致性 (均匀度) 的度量:

$$U = \sqrt{\frac{1}{\sum n_i^2}}$$

式中, n_i 是第 i 孔的相对吸光值, N 是相对吸光值总和。

数据分析运用MATLAB R2012a进行多样性指数计算, 并对31种底物碳源进行主成分分析. 利用SPSS 22.0对AWCD、各种指数和土壤理化性质进行单因素方差分析 (ANOVA) 和Tukey差异显著性检验 ($P < 0.05$).

2 结果与分析

2.1 不同放牧强度土壤理化性质

从表1可以看出, 在0-5 cm 土层, G5的全氮含量显著高于G3、G6和G7处理组, G3和G4之间也存在显著性差异. 在5-10 cm土层中, G7土壤无机碳含量和碳氮比显著高于CK对照组. 在10-20 cm深层土壤中, G4的土壤有机碳含量显著高于G3、G6和G7处理组, 与CK对照组无显著性差异; 除此之外, G3、G5、G6、G7处理组的无机碳含量和碳氮比值均高于CK对照组, 差异显著.

整体来看, 轻度放牧 (G3) 和重度放牧 (G6、G7) 的有机碳和全氮含量较低, 无机碳含量较高, CK的碳氮比比其他处理组最低.

2.2 不同放牧强度土壤微生物利用全部碳源的代谢活性变化

本研究根据培养过程中每隔24 h读取的AWCD作图1. 从图中可以看出, 3个土层的土壤微生物AWCD从24 h开始, 随着培养时间的增加均逐步增加, 并在168 h后增长趋势趋于平缓, 这与众多研究结果^[25, 30-31]类似. 不同放牧强度的AWCD变化在10-20 cm土层表现出较为明显的差异, 禁牧 (CK) 和中度放牧 (G4、G5) 下G4的AWCD高于其他放牧处理组 (表

2). 根据培养过程中的生长变化趋势, 选择AWCD增长趋势趋于平缓时的192 h的AWCD进行多样性指数的计算和方差分析^[32].

2.3 不同放牧强度土壤微生物利用的碳源种类及多样性指数分析

将培养192 h的六类碳源的AWCD进行归纳分析 (图2). 结果表明, 土壤微生物对碳水化合物类、氨基酸类、羧酸类和酚类化合物等碳源的利用能力在不同土层间表现出了显著性差异. 其中, 在10-20 cm土层, 禁牧 (CK) 组土壤微生物对酚类化合物碳源的利用率显著高于其他组. 所以, 不同放牧强度下土壤微生物的碳源利用类型与利用率相似, 但与CK存在显著差异.

多样性指数的分析结果 (表2) 表明: 0-5 cm土层, G7的 D 值显著小于CK、G3和G5. 5-10 cm土层深度上, CK、G3的 D 值显著大于G5、G6和G7, G6的 H' 值显著高于G3. 10-20 cm土层中, CK和G4的AWCD值显著高于其他组. CK的 D 值显著高于除G4以外的其他组, G4的 D 值与G5、G6、G7之间也存在显著性差异. CK的 H' 值显著高于G3和G5. CK和G4组的 U 值显著高于G3、G5、G6、G7等其他几组 (表2).

整体来看, 禁牧 (CK) 和中度放牧 (G4、G5) 下G4的AWCD和 D 、 H' 、 U 等多样性指数高于其他处理组, 在10-20 cm土层尤为明显.

2.4 土壤理化性质与土壤微生物群落多样性指数相关性分析

将土壤全氮、有机碳和无机碳含量分别与土壤微生物群落的AWCD、 D 、 H' 和 U 值进行相关性分析, 得到图3. 从图中可以看出, 土壤微生物群落AWCD、 D 、 H' 和 U 值与土壤全氮、有机碳含量均呈现极显著正相关关系 ($P < 0.001$), 与土壤无机碳含量则都呈现出极显著负相关关系 ($P < 0.001$).

表1 土壤理化性质

Table 1 Physicochemical parameters of soils in the study site

土层深度 Soil depth (δ /cm)	放牧强度 Grazing intensity	全氮 Total N (w/g kg ⁻¹)	有机碳 Soil organic carbon (w/g kg ⁻¹)	无机碳 Soil inorganic carbon (w/g kg ⁻¹)	碳氮比 C/N	pH	土壤水分含量 Soil water content (w/w%)	土壤容重 Soil bulk density (ρ /g cm ⁻³)
0-5	CK	6.24 ± 0.19abc	62.09 ± 1.59a	2.05 ± 0.86a	9.97 ± 0.20a	6.60 ± 0.16a	44.57 ± 2.40a	0.51 ± 0.05a
	G3	5.69 ± 0.12c	59.49 ± 1.33a	3.72 ± 1.03a	10.45 ± 0.13a	6.80 ± 0.11a	40.9 ± 3.01a	0.49 ± 0.03a
	G4	6.49 ± 0.06ab	64.76 ± 3.92a	13.98 ± 11.79a	9.98 ± 0.59a	6.39 ± 0.22a	35.31 ± 1.77a	0.62 ± 0.04a
	G5	6.86 ± 0.12a	62.53 ± 2.86a	7.83 ± 1.98a	9.11 ± 0.32a	6.87 ± 0.10a	36.57 ± 3.06a	0.67 ± 0.05a
	G6	5.96 ± 0.25bc	55.76 ± 1.56a	4.23 ± 1.76a	9.46 ± 0.56a	6.75 ± 0.10a	33.40 ± 4.96a	0.55 ± 0.08a
	G7	6.03 ± 0.12bc	55.85 ± 1.34a	6.27 ± 1.65a	9.28 ± 0.32a	6.89 ± 0.09a	35.86 ± 2.67a	0.67 ± 0.03a
5-10	CK	5.95 ± 0.46a	49.77 ± 3.73a	4.46 ± 2.85b	8.40 ± 0.18a	6.87 ± 0.15a	41.13 ± 1.93a	0.71 ± 0.03a
	G3	6.07 ± 0.29a	52.05 ± 2.67a	17.46 ± 6.54ab	8.57 ± 0.05ab	7.08 ± 0.10a	41.65 ± 2.09a	0.76 ± 0.06a
	G4	5.81 ± 0.23a	57.01 ± 3.16a	6.20 ± 2.18ab	9.96 ± 0.82a	7.06 ± 0.08a	36.12 ± 1.50a	0.75 ± 0.03a
	G5	6.48 ± 0.26a	53.91 ± 2.01a	23.68 ± 7.46ab	8.32 ± 0.06ab	7.25 ± 0.03a	38.70 ± 2.22a	0.65 ± 0.08a
	G6	5.88 ± 0.25a	47.02 ± 2.57a	11.73 ± 3.34ab	8.15 ± 0.79ab	7.17 ± 0.10a	37.59 ± 1.34a	0.81 ± 0.02a
	G7	5.72 ± 0.27a	48.36 ± 2.68a	35.27 ± 12.85a	8.52 ± 0.52b	7.16 ± 0.12a	34.88 ± 1.49a	0.85 ± 0.04a
10-20	CK	5.16 ± 0.32a	41.46 ± 2.35ab	22.39 ± 6.51b	8.05 ± 0.06a	7.35 ± 0.04a	37.29 ± 1.42a	0.81 ± 0.02a
	G3	4.66 ± 0.10a	39.07 ± 0.80a	84.37 ± 19.08a	8.40 ± 0.92b	7.45 ± 0.03a	38.20 ± 1.70a	0.83 ± 0.03a
	G4	5.23 ± 0.26a	46.57 ± 1.47b	69.96 ± 14.37ab	9.01 ± 0.48ab	7.45 ± 0.03a	35.76 ± 1.75a	0.80 ± 0.02a
	G5	5.19 ± 0.16a	40.52 ± 1.03ab	102.88 ± 19.60a	7.82 ± 0.13b	7.47 ± 0.03a	39.73 ± 2.05a	0.77 ± 0.03a
	G6	4.81 ± 0.09a	38.14 ± 1.77a	90.74 ± 7.65a	7.91 ± 0.29b	7.45 ± 0.03a	37.32 ± 1.84a	0.87 ± 0.01a
	G7	4.48 ± 0.16a	35.29 ± 0.80a	86.18 ± 11.99a	7.93 ± 0.39b	7.47 ± 0.03a	35.41 ± 0.59a	0.80 ± 0.03a

表中数据表示为平均值 ± 标准误. 同一土层同一列字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$).

The values are mean ± standard error. Different letters in the same column and soil depth indicate significant difference ($P < 0.05$).

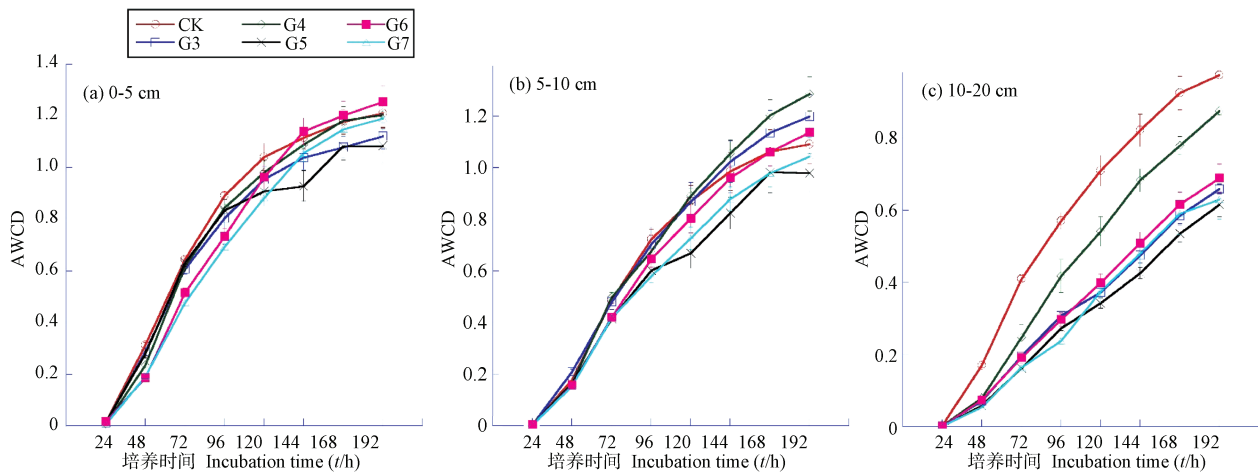


图1 土壤微生物平均吸光值 (AWCD) 变化.
Fig. 1 Average well color development (AWCD) of soil microorganisms.

表2 土壤微生物AWCD及群落多样性指数
Table 2 AWCD and diversity index of soil microbial communities

土层深度 Soil depth (δ/cm)	放牧强度 Grazing intensity	AWCD	Simpson 指数 Simpson index (D)	Shannon-Wiener指数 Shannon-Wiener index (H')	Mcintosh指数 Mcintosh index (U)
0-5	CK	1.21 ± 0.055a	0.954 ± 0.0002a	3.33 ± 0.009a	7.35 ± 0.283a
	G3	1.12 ± 0.050a	0.954 ± 0.0005a	3.31 ± 0.013a	6.92 ± 0.245a
	G4	1.20 ± 0.066a	0.949 ± 0.0013ab	3.32 ± 0.017a	7.42 ± 0.342a
	G5	1.08 ± 0.068a	0.952 ± 0.0014a	3.29 ± 0.016a	6.70 ± 0.355a
	G6	1.25 ± 0.063a	0.949 ± 0.0012ab	3.29 ± 0.011a	7.55 ± 0.302a
	G7	1.19 ± 0.041a	0.941 ± 0.0053b	3.30 ± 0.015a	7.27 ± 0.188a
5-10	CK	1.09 ± 0.078a	0.945 ± 0.0006a	3.27 ± 0.024ab	6.84 ± 0.375a
	G3	1.20 ± 0.084a	0.944 ± 0.0021a	3.22 ± 0.027b	7.46 ± 0.347a
	G4	1.29 ± 0.066a	0.941 ± 0.0023ab	3.28 ± 0.019ab	7.80 ± 0.337a
	G5	0.98 ± 0.077a	0.933 ± 0.0027bc	3.25 ± 0.027ab	6.23 ± 0.395a
	G6	1.14 ± 0.049a	0.931 ± 0.0018c	3.32 ± 0.014a	7.06 ± 0.252a
	G7	1.04 ± 0.073a	0.933 ± 0.00152bc	3.28 ± 0.032ab	6.72 ± 0.374a
10-20	CK	0.97 ± 0.051a	0.937 ± 0.0019a	3.22 ± 0.023a	6.32 ± 0.247a
	G3	0.66 ± 0.014b	0.919 ± 0.0022bc	3.07 ± 0.026b	4.44 ± 0.069b
	G4	0.87 ± 0.012a	0.926 ± 0.0049ab	3.21 ± 0.094a	5.68 ± 0.059a
	G5	0.61 ± 0.035b	0.910 ± 0.0035c	3.04 ± 0.031b	4.47 ± 0.182b
	G6	0.69 ± 0.039b	0.921 ± 0.0009bc	3.22 ± 0.025a	4.53 ± 0.264b
	G7	0.63 ± 0.054b	0.918 ± 0.0042bc	3.16 ± 0.036a	4.47 ± 0.335b

表中数据表示为平均值 ± 标准误. 同一土层同一列字母不同表示差异显著 (P < 0.05).
The values are mean ± standard error. Different letters in the same column and soil depth indicate significant difference (P < 0.05).

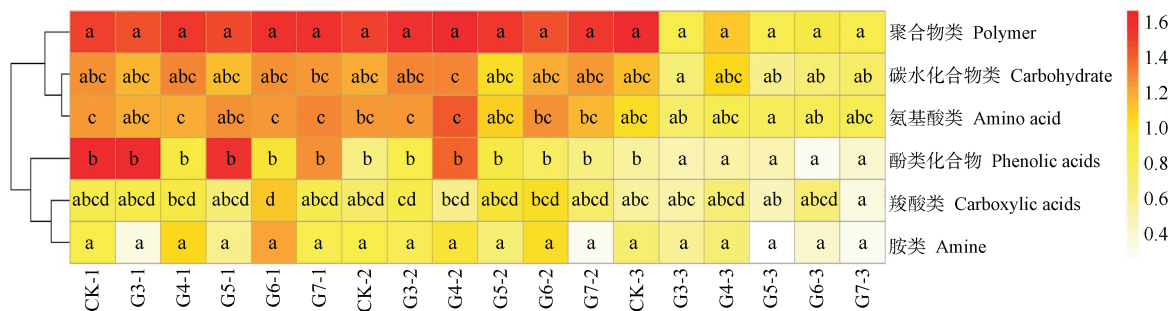


图2 土壤微生物群落对不同碳源的利用率. 各处理后的数字1-3 (如CK-1) 表示土层深度 (1: 0-5 cm; 2: 5-10 cm; 3: 10-20 cm). 同一行字母不同代表差异显著 (P < 0.05). 颜色代表土壤微生物群落对碳源的利用率.

Fig. 2 Utilization efficiency of different carbon sources by soil microbial communities. 1-3 after every treatment (set CK-1 as an example) indicate soil depth (1: 0-5 cm; 2: 5-10 cm; 3: 10-20 cm). Different letters in the same line indicate significant difference (P < 0.05). The colors represent the utilization efficiency of different carbon sources by soil microbial communities.

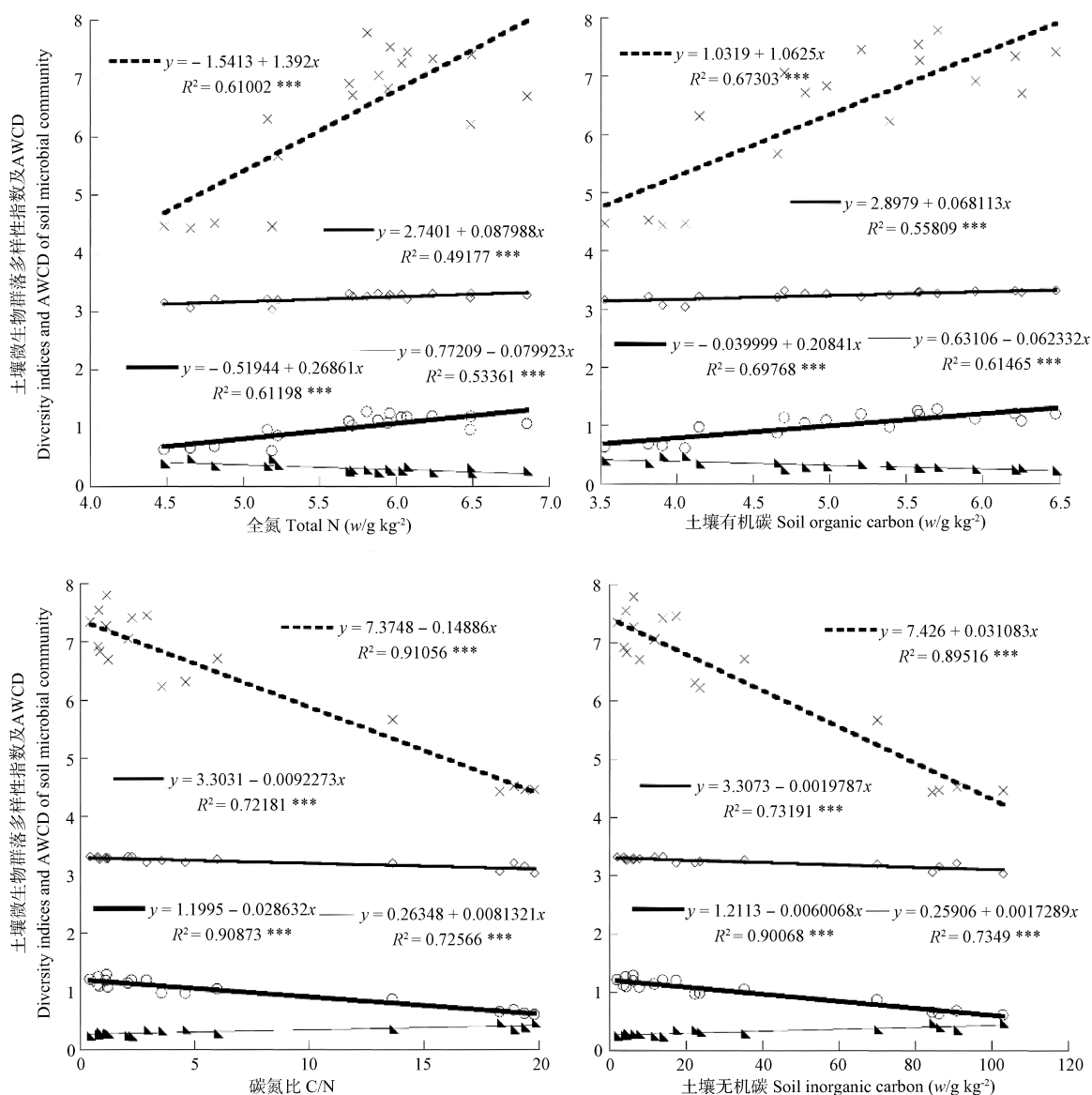


图3 土壤理化性质与土壤微生物群落多样性指数及AWCD相关性分析。

Fig. 3 Correlation analysis between soil physicochemical parameters and indices and AWCD of soil microbial community.

*** $P < 0.001$.

2.5 不同放牧强度下土壤微生物碳源利用的主成分分析

ECO板上的碳源可分为六大类^[31]: 碳水化合物类(10种)、羧酸类(7种)、聚合物类(4种)、胺类(2种)、酚类化合物(2种)和氨基酸类(6种)。对192 h的土壤微生物AWCD进行微生物功能主成分分析,提取相对应特征值大于1的前6个主成分,累积贡献率达到85.99%。其中第一主成分(Prin1)的贡献率为52.122%,第二主成分(Prin2)的贡献率为9.073%,第3-6主成分贡献率分别为8.353%、7.270%、4.989%、4.184%。第一和第二主成分的累计方差贡献率为61.1951%,所以选取31种碳源在第一、第二主成分上的载荷

值进行分析,载荷因子越高表示碳源对主成分的影响越大。从表3可以看出,第一主成分的碳源主要为聚合物类、氨基酸类、羧酸类和碳水化合物类。第二主成分的主要碳源有酚类化合物,氨基酸类和碳水化合物类。综合考虑第一主成分和第二主成分主要碳源类型,与实验地区土壤微生物群落代谢功能密切相关的碳源主要有氨基酸类和碳水化合物类。

根据两个主成分的分作图4,样方间距离远近表示相似程度,越近表示相似程度越高。结果发现,同一土层不同放牧程度的土壤微生物具有相似的碳源利用模式,但10-20 cm层的CK和G4则表现出了与其他处理不同的碳源利用方式。CK几乎不利用第一、第二主成分的碳源。0-5 cm土层 G6

表3 31种碳源主成分载荷因子

类别 Category	碳源类型 Carbon source types	主成分1 Prin1	主成分2 Prin2
碳水化合物类 Carbohydrate	β -甲基-D-葡萄糖苷 β -methyl-D-glucoside	0.1858	-0.1789
	D-半乳糖酸- γ -内脂 D-galactonic acid- γ -lactone	0.0834	-0.2004
	D-木糖 D-xylose	0.1921	0.2393
	i-赤藓糖醇 i-erythritol	0.1974	0.0059
	D-甘露醇 D-mannitol	0.1952	-0.1890
	N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-acetyl-D-glucosamine	0.2137	-0.1412
	D-纤维二糖 D-cellobiose	0.1936	-0.1355
	α -D-葡萄糖-1-磷酸 α -D-glucose-1-phosphate	0.1835	-0.1381
	α -D-乳糖 α -D-lactose	0.1863	0.1739
	D,L- α -磷酸甘油 D,L- α -glycerol phosphate	0.1357	-0.1431
氨基酸类 Amino acid	L-精氨酸 L-arginine	0.2005	-0.2189
	L-天门冬酰胺 L-asparagine	0.2135	-0.1046
	L-苯基丙氨酸 L-phenylalanine	0.2024	0.2319
	L-丝氨酸 L-serine	0.2179	-0.1087
	L-苏氨酸 L-threonine	0.193	0.1691
	甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-glutamic acid	0.136	0.2837
羧酸类 Carboxylic acids	丙酮酸甲酯 Pyruvic acid methyl ester	0.1288	-0.2142
	D-半乳糖醛酸 D-galacturonic acid	0.126	-0.2594
	γ -羟丁酸 γ -hydroxybutyric acid	0.1881	0.0957
	D-葡萄糖胺酸 D-glucosaminic acid	0.2172	0.1465
	衣康酸 Itaconic acid	0.1769	0.1443
	α -丁酮酸 α -ketobutyric acid	0.057	0.0433
	D-苹果酸 D-malic acid	0.1701	-0.0216
聚合物类 Polymer	吐温40 Tween 40	0.1782	0.0971
	吐温80 Tween 80	0.1444	-0.1352
	α -环糊精 α -cyclodextrin	0.2207	0.1171
酚类化合物 Phenolic acids	肝糖 Glycogen	0.2294	0.0356
	2-羟基苯甲酸 2-hydroxy benzoic acid	0.1293	0.4317
胺类 Amine	4-羟基苯甲酸 4-hydroxy benzoic acid	0.2133	-0.0011
	苯乙胺 Phenylethyl-amine	0.2076	0.0228
	腐胺 Putrescine	0.0828	-0.3109

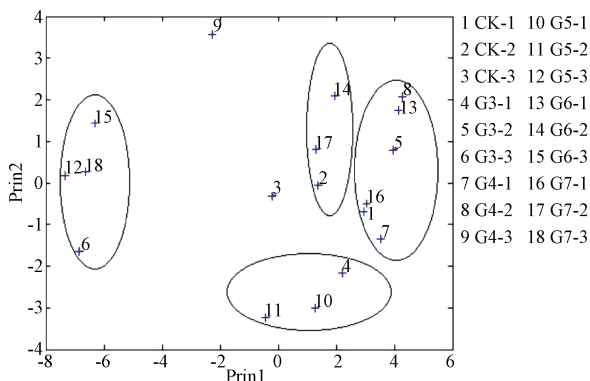


图4 不同放牧梯度土壤微生物群落功能主成分分析. 各处理后的数字1-3 (如CK-1) 分别表示土层深度 (1: 0-5 cm; 2: 5-10 cm; 3: 10-20 cm).

Fig. 4 Principal component analysis of soil microbial community function at different grazing intensity. 1-3 after every treatment (set CK-1 as an example) indicate soil depth (1: 0-5 cm; 2: 5-10 cm; 3: 10-20 cm).

土壤微生物主要利用第一、第二主成分的碳源, 其他放牧梯度则主要利用第一主成分碳源; 5-10 cm土层中, CK和G5土壤微生物主要利用第一主成分的碳源, G3、G4、G6、G7的土壤微生物则主要利用第一、二主成分的碳源; 10-20 cm土层CK几乎不利用第一、第二主成分碳源, 其他处理土壤微生物主要利用第二主成分的碳源.

3 讨论

3.1 不同放牧强度对土壤理化性质的影响

本研究轻度放牧 (G3) 与重度放牧 (G6、G7) 下的土壤有机碳和土壤全氮含量较禁牧 (CK) 和中度放牧 (G4、G5) 低, 因为土壤有机碳的主要来源为植物残体^[33], 轻度放牧条件下, 家畜通过采食、踩踏等活动影响地上植被生长, 从而减少了植物残体向土壤输入, 而中度放牧干扰下, 家畜的活动对植被造成了较大的破坏, 植物残体相应增加, 但随着放牧强度增加, 植被采食率增高, 植被地上生物量随之降低, 输入地下的植物残体也越少, 从而土壤有机碳含量也越低. 研究表明, 土壤中95%的全氮来源于土壤有机质, 故土壤有机碳和全氮含量变化规律基本一致^[34]. 由此可见, 本研究中重度放牧条件下全氮含量较低的原因可能是由土壤有机碳含量较低导致的.

土壤无机碳主要存在形式是CaCO₃和MgCO₃, 所以影响无机碳沉积的主要因素之一是Ca²⁺和Mg²⁺的有效性, 而只有来源于非碳酸盐矿物的Ca²⁺、Mg²⁺才会最终导致无机碳的净增加, 影响Ca²⁺释放的主要因素为矿物的特性以及土壤溶液的酸碱度^[35]. 本研究区域内的不同处理间土壤酸碱度无显著差异, 故由这个因素引起的土壤无机碳含量差异可能性不大. 影响土壤无机碳含量的另一个因素是土壤中CO₂的含量^[36-37]. 在本研究中, 放牧处理下的土壤无机碳含量较禁牧高, 可能的原因是长期放牧导致了植被地下生物量增加, 导致较高的土壤CO₂含量^[38], 并最终导致无机碳的含量的升高.

3.2 放牧条件下土壤微生物碳源利用特征

研究结果表明, 放牧处理下的不同碳源类型利用率与禁牧处理存在显著差异, 说明在ECO微平板上培养出来的主要微生物功能类群不同. 分析原因认为这主要与土壤中根系分泌物不同有关. 土壤微生物利用碳源的主要来源是根系分泌物, 而Biolog-ECO板上至少有9种物质为根系分泌物^[39-40]. 长期放牧导致地上植被种类与盖度改变, 从而影响了植物根系的生长, 并影响了根系分泌物的成分变化^[41-42], 并最终导致了土壤中主要微生物功能群的变化. 除此之外, 放牧条件下, 家畜踩踏和排泄物的输入也会对土壤环境造成一定影响^[33, 43], 这可能是造成禁牧与放牧条件下土壤微生物碳源利用特征不同的另一个重要原因.

3.3 不同放牧强度下土壤微生物群落功能多样性变化

土壤微生物多样性的3个指数D、H'和U分别用来表征土壤微生物的优势度、丰富度和均匀度, 将3个指数结合起来可以反映土壤微生物群落的功能多样性^[33]. 本研究中, 禁牧跟中度放牧的G4处理下土壤微生物群落的3个多样性指数整体高于重度放牧和轻度放牧, 这与土壤有机碳、全氮以及碳氮比的分布规律相似, 与土壤无机碳分布规律相反. 另外, 土壤理化性质与土壤微生物多样性指标的相关性分析也表明, D、H'、U与土壤有机碳、土壤全氮和土壤碳氮比均呈现极显著正相关关系, 与土壤无机碳存在极显著负相关关系. 所以, 分析认为土壤养分是造成不同放牧强度下土壤微生物群落功能多样性差异的主要原因. 凋落物分解是土壤养分的主要来源, 放牧家畜一方面通过采食作用降低植被地上生物量, 减少了植被凋落物地输入^[44], 另一方面适度的放牧

干扰植物更多地将光合产物运输到根部,根分泌物随之增加^[43],从而影响了土壤养分的变化。

但若放牧强度过高,放牧家畜选择性啃食地上植被,一方面降低了地上植物生物量,使得输入土壤的凋落物质量减少,另一方面则改变了地上植物群落的优势物种,使得营养成分高、粗纤维成分低的适口性植物逐步退出群落,而粗纤维成分含量较高、难以分解、适口性差的植物种类存活下来,优势度逐步增加,从而导致凋落物分解和系统养分循环速度降低,土壤微生物养分供应减少,活性降低^[45-46]。郑伟在相同的研究区域进行的植物群落调查^[23]也证实了这点。

总之,通过本文研究发现,环青海湖地区放牧条件下土壤微生物群落利用的主要碳源类型为氨基酸类和碳水化合物类,不同放牧强度下土壤微生物群落利用碳源类型相似,禁牧和中度放牧(G4)条件下土壤微生物群落的功能多样性指数较轻度和重度放牧高。

参考文献 [References]

- 1 Yu J, Adrian U, Zhang XK, Yosef S. Responses of the soil microbial catabolic profile and diversity to vegetation rehabilitation in degraded semiarid grassland [J]. *Appl Soil Ecol*, 2016, **101** (1): 24-31
- 2 Garcia-Palacios P, Bowker MA, Chapman CSJ, Maestre FT, Soliveres S, Gallardó A, Valladares F, Guerrero C, Escudero A. Early-successional vegetation changes after roadside prairie restoration modify processes related with soil functioning by changing microbial functional diversity [J]. *Soil Biol Biochem*, 2011, **43** (6): 1245-1253
- 3 Liu ZF, Fu BJ, Zheng XX, Liu GH. Plant biomass, soil water content and soil N: P ratio regulating soil microbial functional diversity in a temperate steppe: a regional scale study [J]. *Soil Biol Biochem*, 2010, **42** (3): 445-450
- 4 Bastida F, Zsolnai A, Hernández T, García C. Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective [J]. *Geoderma*, 2008, **147** (3): 159-171
- 5 Anderson TH. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality [J]. *Agric Ecosyst Environ*, 2003, **98** (1): 285-293
- 6 Avidano L, Gamalero E, Cossa GP, Elisabetta C. Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators [J]. *Appl Soil Ecol*, 2005, **30** (1): 21-33
- 7 Harris J. Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration [J]. *Eur J Soil Sci*, 2003, **54** (4): 801-808
- 8 Lewis DE, White JR, Wafula D, Athar R, Dickerson T, Williams HN, Chauhan A. Soil functional diversity analysis of a bauxite-mined restoration chronosequence [J]. *Microb Ecol*, 2010, **59** (4): 710-723
- 9 Chapman SJ, Campbell CD, Artz RR. Assessing CLPPs using MicroResp™ [J]. *J Soils Sedim*, 2007, **7** (6): 406-410
- 10 Graham M, Haynes R. Organic matter status and the size, activity and metabolic diversity of the soil microbial community in the row and inter-row of sugarcane under burning and trash retention [J]. *Soil Biol Biochem*, 2006, **38** (1): 21-31
- 11 林先贵, 胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能[J]. *土壤学报*, 2008, **45** (5): 892-900 [Lin XG, Hu JL. Scientific connotation and ecological service function of soil microbial diversity [J]. *Acta Pedol Sin*, 2008, **45** (5): 892-900]
- 12 郑华, 欧阳志云, 方治国, 赵同谦. BIOLOG在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J]. *土壤学报*, 2004, **41** (3): 456-461 [Zheng H, Ouyang ZY, Fang ZG, Zhao TQ. Application of BIOLOG to study on soil microbial community functional diversity [J]. *Acta Pedol Sin*, 2004, **41** (3): 456-461]
- 13 胡可, 王利宾. BIOLOG微平板技术在土壤微生态研究中的应用[J]. *土壤通报*, 2007, **38** (4): 819-821 [Hu K, Wang LB. Application of BIOLOG microplate technique to the study of soil microbial ecology [J]. *Chin J Soil Sci*, 2007, **38** (4): 819-821]
- 14 De Fede KL, Panaccione DG, Sextstone AJ. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOG® community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rRNA genes [J]. *Soil Biol Biochem*, 2001, **33** (11): 1555-1562
- 15 李凤霞, 伏洋, 杨琼, 严亮东, 肖建设. 环青海湖地区气候变化及其环境效应[J]. *资源科学*, 2008, **30** (3): 348-353 [Li FX, Fu Y, Yang Q, Yan LD, Xiao JS. Climate change and its environmental effects in the surrounding area of Qinghai Lake [J]. *Resour Sci*, 2008, **30** (3): 348-353]
- 16 马延东, 赵景波, 邵天杰, 荆闪. 青海环湖地区草原土壤含水量及富集规律[J]. *中国农业科学*, 2015, **48** (10): 1982-1995 [Ma YD, Zhao JB, Shao TJ, Xing S. Soil moisture and enrichment regularity of steppe soil in Qinghai Lake area [J]. *Sci Agric Sin*, 2015, **48** (10): 1982-1995]
- 17 崔树娟, 布仁巴音, 朱小雪, 白玲, 汪诗平. 不同季节适度放牧对高寒草甸植物群落特征的影响[J]. *西北植物学报*, 2014, **34** (2): 349-357 [Cui SJ, Burenbayin, Zhu XX, Bai L, Wang SP. Effects of seasonal moderate grazing on plant community of alpine meadow [J]. *Acta Bot Boreali-Occid Sin*, 2014, **34** (2): 349-357]
- 18 付伟, 赵俊权, 杜国祯. 青藏高原高寒草地放牧生态系统可持续发展研究[J]. *草原与草坪*, 2013, **33** (1): 84-88 [Fu W, Zhao JQ, Du GZ. Study on sustainable development of alpine grazing ecosystem on Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Grassl Turf*, 2013, **33** (1): 84-88]
- 19 Zhao J, Luo T, Li R, Li X, Tian LH. Grazing effect on growing season ecosystem respiration and its temperature sensitivity in alpine grasslands along a large altitudinal gradient on the central Tibetan Plateau [J]. *Agric For Meteorol*, 2016, **218-219**: 114-121
- 20 Ren H, Han G, Ohm M, Schönbach P, Gierus M, Taube F. Do sheep grazing patterns affect ecosystem functioning in steppe grassland ecosystems in Inner Mongolia [J]. *Agric Ecosyst Environ*, 2015, **213**: 1-10
- 21 李冰, 葛世栋, 徐田伟, 徐世晓, 李善龙. 放牧强度对青藏高原高寒草甸净生态系统交换量的影响[J]. *草业科学*, 2014, **31** (7): 1203-1210 [Li B, Ge SD, Xu TW, Xu SX, Li SL. Effects of grazing intensity on net ecosystem exchange of alpine meadow [J]. *Prat Sin*, 2014, **31** (7): 1203-1210]
- 22 郑伟, 董全民, 李世雄, 李红涛, 刘玉, 杨时海. 放牧强度对环青海湖高寒草原群落物种多样性和生产力的影响[J]. *草地学报*, 2012, **20** (6): 1033-1038 [Zheng W, Dong QM, Li SX, Li HT, Liu Y, Yang SH. Impact of grazing intensities on community biodiversity and productivity of alpine grassland in Qinghai Lake region [J]. *Acta Agrest Sin*, 2012, **20** (6): 1033-1038]
- 23 郑伟. 环青海湖高寒草原植被和家畜增重对放牧的响应[D]. 西宁: 青海大学, 2014 [Zheng W. The response of vegetation and livestock increasing to grazing in the alpine steppe around the Qinghai Lake [D]. Xining: Qinghai University, 2014]
- 24 李璠, 周国英, 杨路存, 徐文华, 钟泽兵, 宋文珠. 生长末期施肥对青藏高原高寒草原地上生物量的影响[J]. *草地学报*, 2014, **22** (5): 998-1006 [Li B, Zhou GY, Yang LC, Xu WH, Zhong ZB, Song WZ. Effects

- of fertilizer at later growth stage on above-ground Biomass in the alpine steppe of Tibetan Plateau [J]. *Acta Agrest Sin*, 2014, **22** (5): 998-1006
- 25 李小容, 韦金玉, 陈云, 曹婷婷, 冯莉, 顾美子, 李蕾. 海南岛不同林龄的木麻黄林地土壤微生物的功能多样性[J]. 植物生态学报, 2014, **38** (6): 608-618 [Li XR, Wei JY, Chen Y, Cao TT, Feng L, Gu MZ, Li L. Functional diversity of microorganisms in *Casuarina equisetifolia* woodlands of different stand ages in Hainan Island [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2014, **38** (6): 608-618]
- 26 韩冬雪, 王宁, 王楠楠, 孙雪, 冯富娟. 不同海拔红松林土壤微生物功能多样性[J]. 应用生态学报, 2015, **12** (3): 649-656 [Han DX, Wang N, Wang NN, Sun X, Feng FJ. Soil microbial functional diversity altitude *Pinus koraiensis* forests [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2015, **12** (3): 649-656]
- 27 贺有龙, 周华坤, 赵新全, 来德珍, 赵建龙. 青藏高原高寒草地的退化及其恢复[J]. 草业与畜牧, 2008 (11): 1-9 [He YL, Zhou HK, Zhao XQ, Lai DZ, Zhao JL. Alpine grassland degradation and its restoration on Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Pratacult Anim Husb*, 2008 (11): 1-9]
- 28 Huang HY, Zhou P, Shi WW, Liu QL, Wang N, Feng HW, Zhi YE. Microbial functional diversity in facilities cultivation soils of nitrate accumulation [J]. *Proc Environ Sci*, 2012, **13** (10): 37-44
- 29 Sun YH, Yang ZH, Zhao JJ, Li Q. Functional diversity of microbial communities in sludge-amended soils [J]. *Phys Proc*, 2012, **33** (7): 26-31
- 30 范瑞英, 杨小燕, 王恩姮, 邹莉, 陈祥伟. 黑土区不同林龄落叶松人工林土壤微生物群落功能多样性的对比研究[J]. 北京林业大学学报, 2013, **35** (2): 63-68 [Fan RY, Yang XY, Wang EH, Zou L, Chen XW. Comparative study on the black soil region of different larch plantation soil microbial community functional diversity [J]. *J Beijing For Univ*, 2013, **35** (2): 63-68]
- 31 董立国, 蒋齐, 蔡进军, 张源润, 许浩, 李生宝. 基于Biolog-ECO技术不同退耕年限苜蓿地土壤微生物功能多样性分析[J]. 干旱区研究, 2011, **28** (4): 630-637 [Dong LG, Jiang Q, Cai JJ, Zhang YR, Xu H, Li SB. Analysis of functional diversity of edaphon communities in medicago sativa fields of different growth years based on BIOLOG-ECO plates [J]. *Arid Zone Res*, 2011, **28** (4): 630-637]
- 32 贾夏, 董岁明, 周春娟. 微生物生态研究中Biolog Eco微平板培养时间对分析结果的影响[J]. 应用基础与工程科学学报, 2013, **21** (1): 10-19 [Jia X, Dong SM, Zhou CJ. Effects of BIOLOG-ECO plates incubation time on analysis results in microbial ecology researches [J]. *J Basic Sci Eng*, 2013, **21** (1): 10-19]
- 33 Stark S, Stammer R, Tuomi J. Reindeer grazing and soil microbial processes in two suboceanic and two subcontinental tundra heaths [J]. *Oikos*, 2002, **97** (1): 69-78
- 34 顾振宽, 杜国祯, 朱炜歆, 索南吉, 张世虎. 青藏高原东部不同草地类型土壤养分的分布规律[J]. 草业科学, 2012, **29** (4): 507-512 [Gu ZK, Du GZ, Zhu WX, Suo NJ, Zhang SH. Distribution of soil nutrients in different grassland types in the eastern part of the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Pratl Sci*, 2012, **29** (4): 507-512]
- 35 Monger H, Martinez-Rios J. Inorganic carbon sequestration in grazing lands [M]. The Potential of US Grazing Lands to Sequester Carbon and Mitigate the Greenhouse Effect. Boca Raton: CRC/Lewis Publisher, 2000: 87-118
- 36 Berg A, Banwart SA. Carbon dioxide mediated dissolution of Ca-feldspar: implications for silicate weathering [J]. *Chem Geol*, 2000, **163** (1): 25-42
- 37 Van Hees H, Knoll J. Renormalization of self-consistent approximation schemes at finite temperature. II. applications to the sunset diagram [J]. *Phys Rev D*, 2002, **65** (10): 767-771
- 38 李旭东. 黄土高原草地与农田系统土壤呼吸及碳平衡[D]. 兰州: 兰州大学, 2011 [LI XD. Soil respiration and carbon balance in grassland and farmland system on the Loess Plateau [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2011]
- 39 ChoiKH, Dobbs FC. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities [J]. *J Microbiol Methods*, 1999, **36** (3): 203-213
- 40 罗倩, 黄宝灵, 黄治喜, 来利明, 魏伟, 郑元润. 新疆盐渍土3种植被类型土壤微生物碳源利用[J]. 应用与环境生物学报, 2013, **19** (1): 96-104 [Luo Q, Huang BL, Tang ZX, Lai LM, Wei W, Zheng YR. Carbon source utilization of microbes in saline soil of three vegetation types in Xinjiang, China [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, **19** (1): 96-104]
- 41 Pierson EA, Mack RN, Black RA. The effect of shading on photosynthesis, growth, and regrowth following defoliation for *Bromus tectorum* [J]. *Oecologia*, 1990, **84** (4): 534-543
- 42 高永恒, 陈槐, 罗鹏, 吴宁, 王根绪. 放牧强度对川西北高寒草甸植物生物量及其分配的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2008, **24** (3): 26-32 [Gao YH, Chen H, Luo Peng, Wu N, Wang GX. Effects of grazing intensity on biomass and its distribution of alpine meadow in Northwest of Sichuan [J]. *J Ecol Rural Environ*, 2008, **24** (3): 26-32]
- 43 孙大帅. 不同放牧强度对青藏高原东部高寒草甸植被和土壤影响的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2012 [Sun DS. Studies on the effects of grazing intensity on vegetation and soil in alpine meadow on the eastern Qinghai-Tibetan Plateau [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2012]
- 44 Stark S, Vis Nen M. Insensitivity of soil microbial activity to temporal variation in soil N in subarctic tundra: evidence from responses to large migratory grazers [J]. *Ecosystems*, 2014, **17** (5): 906-917
- 45 Bardgett RD, Wardle DA. Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities [J]. *Ecology*, 2003, **84** (9): 2258-2268
- 46 Bardgett RD, WardleDA, Yeates GW. Linking above-ground and below-ground interactions: how plant responses to foliar herbivory influence soil organisms [J]. *Soil Biol Biochem*, 1998, **30** (14): 1867-1878