



基于分子生态学网络分析松嫩退化草地土壤微生物群落 对施氮的响应

朱瑞芬¹, 刘杰淋¹, 王建丽¹, 韩微波¹, 申忠宝¹, 辛晓平²

(¹黑龙江省农业科学院草业研究所, 哈尔滨 150086; ²中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】氮素输入影响着全球草地生态系统的可持续性, 关注施氮对土壤微生物群落的影响及其分子生态网络, 为草地退化修复提供理论依据。【方法】以松嫩退化羊草草地为研究对象, 通过施氮和未施氮处理, 利用高通量测序和随机矩阵网络构建理论构建土壤微生物群落分子生态网络。探讨氮素管理对退化羊草草地土壤微生物群落结构及网络的影响, 氮添加条件下微生物网络结构中的关键微生物变化规律, 以及该过程中微生物之间的互作关系, 解析外源氮素添加条件下土壤细菌动态变化的关键结点和规律。【结果】在门分类水平上施氮处理草地有细菌门 22 个, 未施氮处理 23 个。7 个菌门是施氮和未施氮处理草地的优势菌门, 其中变形菌门(Proteobacteria)是含有 OTU 数量最多的门类, 约占总序列的 30.46%, 酸杆菌门(Acidobacteria)是含有 OTU 数量次之的门类, 约占总序列的 30.15%, 芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)是含有 OTU 数量第 3 的门类, 约占总序列的 8.14%, 放线菌(Actinomycete)约占总序列的 6.15%, 绿弯菌门(Chloroflexi)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和硝化螺旋菌门(Nitrospirae)三者约占总序列的 17.16%。施氮处理草地土壤微生物中的变形菌门、放线菌门、拟杆菌门的相对丰度均显著高于未施氮处理草地土壤($P < 0.01$); 未施氮草地土壤中绿弯菌门、酸杆菌门、芽单胞菌门相对丰度显著高于施氮草地土壤($P < 0.01$), 其他各门细菌施氮与未施氮处理间未呈现出显著差异。表征网络的正向连接比、平均路径长度、平均聚类系数和模块性均为施氮处理显著低于未施氮处理($P < 0.001$)。在土壤的分子生态网络中, 未施氮处理有 16 个模块枢纽($Z_i > 2.5$, $P_i \leq 0.62$), 施氮处理有 6 个模块枢纽, 均属于酸杆菌门、芽单胞菌门和放线菌门。施氮导致土壤微生物种间关系改变, 进而改变土壤整体生态网络。【结论】施氮降低了退化草地土壤网络结构的复杂程度和紧密性; 降低了退化草地土壤中的酸杆菌门和绿弯菌门相对丰度, 提高了变形菌门、放线菌门和芽单胞菌门相对丰度。土壤中微生物关键物种(OTU)由 16 个(未施氮)减少为 6 个, 且二者土壤中均没有重叠 OTU, 这表明施氮调控微生物群落网络的关键物种, 进而改变其分子生态网络结构。

关键词: 施氮; 退化草地; 土壤微生物; 分子生态学网络

Molecular Ecological Network Analyses Revealing the Effects of Nitrogen Application on Soil Microbial Community in the Degraded Grasslands

ZHU RuiFen¹, LIU JieLin¹, WANG JianLi¹, HAN WeiBo¹, SHEN ZhongBao¹, XIN XiaoPing²

(¹Institute of Pratacultural Science, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; ²Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: 【Objective】Nitrogen input affects the sustainability of the global grassland ecosystem. Paying attention to the soil

收稿日期: 2019-09-10; 接受日期: 2020-02-19

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC0500607-2)、黑龙江省自然科学基金(YQ2019C019)

联系方式: 朱瑞芬, E-mail: zhuruifen1983@aliyun.com. 通信作者辛晓平, E-mail: cyszps@163.com

microbial community and its molecular ecological network can provide a theoretical basis for grassland degradation restoration.

【Method】 Taking Songnen degraded *Leymus chinensis* grassland as the research object, the molecular ecological network of soil microbial community was constructed by applying high-throughput sequencing and random matrix network construction with and without nitrogen treatment. To explore the effects of nitrogen management on the soil microbial community structure and network in degraded *Leymus chinensis* grassland, the key microbial changes in the microbial network structure under the condition of nitrogen addition was studied, and the interaction between microorganisms during the process were investigated, and the conditions for external nitrogen addition key points and regularity of soil bacterial dynamic change were analyzed. 【Result】 At the level of phylum classification, there were 22 bacterial phylum in nitrogen-applied grassland and 23 without nitrogen. The 7 phylum were the dominant phylum of the nitrogen-applied and non-nitrogen-applied grasslands. Among them, Proteobacteria was the phyla containing the largest number of OTUs, accounting for about 30.46% of the total sequence. The next largest genus was about 30.15% of the total sequence. The genus Gemmatimonadetes was the third genus containing OTUs, accounting for 8.14% of the total sequence. Actinomycete accounted for about the total 6.15% of the sequence, while Chloroflexi, Bacteroidetes and Nitrospirae accounted for 17.16% of the total sequence. The relative abundances of Proteobacteria, Actinomycota and Bacteroides in soil microorganisms in nitrogen-applied grassland were significantly higher than those in non-nitrogen applied grassland soil; The relative abundances of Proteobacteria, Actinomycete and Bacteroidetes were significantly higher than the soils of nitrogen-applied grassland ($P < 0.01$), and no significant difference was found between the nitrogen application and non-nitrogen treatment of other bacteria. The forward connection ratio, the average path length, the average clustering coefficient, and the modularity of the characterizing network were all significantly lower than the nitrogen-free treatment ($P < 0.001$). In the molecular ecological network of soil, there were 16 modular hubs without nitrogen treatment ($Z_i > 2.5$, $P_i \leq 0.62$), and there were 6 modular hubs under nitrogen treatment, all of which belong to Acidobacteria, Gemmatimonadetes and Actinomycete. Nitrogen application led to changes in soil microbial species relationships, which in turn changed the overall soil ecological network. 【Conclusion】 Nitrogen application reduced the complexity and tightness of soil network structure of degraded grassland, and reduced the relative abundance of Acidobacteria and Chloroflexi in degraded grassland, while which improved the relative abundance of Proteobacteria, Actinomycete and Gemmatimonadetes. The number of microbial key species (OTU) in soil decreased from 16 (no nitrogen application) to 6 and there was no overlapping OTU in both soils, indicating that nitrogen application regulated key species of its community network and thus changes its molecular ecological network.

Key words: nitrogen application; degraded grassland; soil microbe; molecular ecology network

0 引言

【研究意义】氮素是植物生长必需的营养元素,也是天然草地生态系统生产力的限制因子。氮素的大量输入(自然氮沉降和人为施氮)会对草地生态系统可利用氮素状况造成影响,也会改变土壤生化过程,造成土壤富营养化,还会引起土壤结构与功能的改变,进而导致一系列环境问题^[1]。近年来,地下生态过程受到越来越多生态学家的关注。土壤微生物是非常敏感的生命组分,也是草地生态系统的重要组成部分。草地土壤微生物种类和数量,是草地土壤生态的重要特征组成^[2]。微生物间的互作是微生物多样性的重要组成部分,也是影响其群落功能执行的重要因素;分子生态网络分析(molecular ecological network analysis)是以数学模型为手段分析生态系统中内在相互关系的方法,分子生态网络分析手段可以很好地体现出生物群落内物种间的互做关系^[3-4]。因此,利用分

子生态网络研究施氮土壤微生物种类组成变化以及相互关系,可为深入揭示退化草地土壤的修复机制奠定理论基础。【前人研究进展】土壤微生物群落作为评估草地生态系统稳定和土壤质量的重要指标^[5],能够以改变群落结构和功能等方式对环境变化作出响应,而这种响应及其产生的正面或负面的反馈效应可能会对生态系统产生深远影响。长期以来由于理论和技术的限制,土壤中微生物可培养率只有 0.1%—1%^[6],用平板培养法很难得到准确反映微生物变化动态趋势的数据;研究土壤微生物的非培养方法如磷脂脂肪酸分析、DNA 指纹图谱技术等因工作量大等问题限制其推广。进入 21 世纪后,新一代测序技术有了很大发展,基因测序技术具有通量高、测序时间短的优点,且近几年其成本不断下降,高通量测序技术已成为科研中探讨土壤微生物群落结构和微生物多样性的重要工具^[7]。土壤微生物在养分循环、土壤肥力维持和土壤固碳等关键生态过程方面扮演重要角色^[8-10],对

草地生态系统稳定性与可持续性有着直接和间接的影响。相关研究结果表明, 土壤微生物对氮沉降和土壤理化性质的变化响应十分敏感^[11], 氮添加可能通过影响土壤中养分输入的数量和质量来改变土壤微生物的群落结构^[12-13]; 氮添加对细菌数量的增加有一定的促进作用, 但对真菌数量的影响较小, 也有观点认为氮添加可能会降低真菌的数量^[13]。长期施氮降低土壤微生物量, 但短期施氮的影响效应具有不确定性。施氮改变了土壤微生物的群落结构组成, 对土壤微生物多样性的影响表现出负效应, 但相关研究结果之间差异较大^[14]。近年来, 有些研究以随机矩阵原理的生态网络构建方法 (random matrix theory, RMT) 为基础, 从相互作用的微生物之间描述和构建出了符合生态网络的模型^[6], 弥补了基于微分方程的网络方法、贝叶斯网络方法以及关联网络方法^[7]对阈值判断缺乏定量指标的缺陷^[15-17], 且利用高通量测序对土壤微生物进行生态网络分析^[18-19]的研究方法为理解复杂的微生物群落的潜在相互作用提供了一种可靠的描绘和认识途径。【本研究切入点】在草原生态修复和生产力提升过程中, 施氮是管理和恢复草原的重要途径之一。施氮可以增加草原净初级生产力, 增加植被的盖度和土壤中的有机碳^[20]。目前有大量文献报道了氮添加过程中草地土壤微生物的动态, 但这些研究关注点主要是施氮后土壤微生物群落多样性水平变化、各门类微生物分布特征变化以及微生物与环境因素的互作这几方面^[1,12-14], 而对施氮后土壤中微生物群落分子生态网络的影响研究较少; 但微生物之间的互作是微生物多样性的一个重要方面, 也极大程度影响着其在生态系统中的作用。因此, 从微生物互作网络的角度解析微生物对施氮的响应是很有必要的。【拟解决的关键问题】本研究以松嫩退化羊草草地土壤为研究对象, 通过构建氮添加和不添加土壤中的微生物群落分子生态网络, 探讨氮素管理对退化羊草草地土壤微生物群落结构及网络的影响, 氮添加条件下微生物网络结构中的关键微生物变化规律, 以及过程中微生物之间的互作关系, 以期获得外源氮素添加条件下土壤细菌动态变化的关键节点和规律, 为退化草原改良提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区自然概况

试验点位于黑龙江松嫩草原南缘兰西科学试验基

地 (E125°28'24", N46°32'17"), 该区域年平均降雨量 469.7 mm, 年均气温 2.9℃。草原土壤以草甸土为主, 偏碱性。植被以羊草为优势种, 五脉山黧豆 (*Lathyrus quinquenervius*)、碱茅 (*Puccinellia distans*)、牛鞭草 (*Hemarthria sibirica*)、寸草苔 (*Carex duriuscula*)、芦苇 (*Phragmites communis*) 等植物为伴生种, 详细描述见文献^[21]。

1.2 试验设计

试验利用长期施氮肥试验平台 (2013 年开启), 分别在未施氮肥 (F0), 施氮肥 (F1, 3.26 g·m⁻²·a⁻¹; F2, 6.51 g·m⁻²·a⁻¹; F3, 13.032 g·m⁻²·a⁻¹) 处理上调查研究。施氮量、施氮时间、施氮方式、植物性状和生产率等详细描述见文献^[21]。由于 2015 年和 2016 年的数据分析结果显示, F3 处理对草地产量显著高于 F0 处理。因此, 本研究仅利用施氮肥 (F3) 和未施氮肥 (F0) 处理的试验数据, 构建和分析施氮 (F) 与未施氮 (NF) 处理的土壤微生物分子生态网络。

1.3 样品采集与测定

采集的土壤经过去除植物残体和石块等杂质均分后, 一份用于土壤高通量测序, 另一份用于土壤化学性质测定^[21], 包括全氮 (soil total nitrogen content, STN)、全磷 (soil total phosphorus content, STP)、速效氮 (soil available nitrogen, SAN)、速效磷 (soil available phosphorus, SAP) 含量。STN、STP 用 H₂SO₄-K₂SO₄-Cu₂SO₄ 催化法消解, 消煮后的样品经过滤、稀释、定容后用 AutoAnalyzer3 (AA3) 连续流动分析仪测定。土壤速效氮含量是指硝态氮 (soil nitrate nitrogen, SNO₃) 和铵态氮 (soil ammonium nitrogen, SNH₄) 的总和, 因此对 SNO₃ 和 SNH₄ 进行分别测定, 土壤经过 2 mol·L⁻¹ KCl 浸提、过滤、定容后, 用 AA3 连续流动分析仪测定。SAP 采用硫酸钼梯抗比色法测定。土壤样品的理化性质见表 1。土壤高通量测序由百迈客公司完成, 通过统计数据处理各阶段样品序列数目, 评估数据质量。

1.4 网络构建与分析

以土壤细菌高通量测序的结果为基础, 利用美国俄克拉荷马大学环境基因组学研究所网站 (<http://ieg2.ou.edu/MENA>)^[22], 构建施氮和未施氮处理土壤的微生物分子生态网络并计算其特征参数。网络拓扑结构由模块内连通度 (Z_i)、模块间连通度 (P_i) 来进行表述。 Z_i 衡量一个点在所有模块中的作用, 值越高表明在模块中的作用越大。 P_i 衡量一个节点参与

表 1 施氮和未施氮处理草地土壤的化学性质

Table 1 Chemical characteristic of no fertilized (NF) and fertilized (F) soils of grassland

处理 Treatment	pH	土壤全氮 STN (g·kg ⁻¹)	土壤全磷 STP (g·kg ⁻¹)	土壤铵态氮 SNH ₄ (mg·kg ⁻¹)	土壤硝态氮 SNO ₃ (mg·kg ⁻¹)	土壤速效磷 SAP (mg·kg ⁻¹)
F	7.95a	1.71a	0.53b	17.80a	21.62a	10.45a
NF	8.09a	1.31b	0.60b	12.61b	14.75b	10.49a

不同小写字母表示施氮土壤和未施氮处理在 $P<0.05$ 水平上差异显著。下同
Different small letters represent significant difference between nitrogenous and non-nitrogenous treatments at $P<0.05$. The same as below

其他模块的程度，值越高表明和其他模块关系越密切。利用 Cytoscape 软件绘制网络图，比较草地施氮和未施氮条件下土壤微生物网络的差异，通过对两者差异的比较来筛选生态网络中的关键微生物物种并分析其在网络中的主要作用，旨在阐明施氮对退化草地土壤微生物分子生态网络的影响。

2 结果

2.1 土壤微生物群落结构的比较

表 2 对各参数进行统计，利用 16SrDNA 测序技术测定施氮和未施氮处理草地土壤原核生物序列，在 97%相似性水平上分别获得 39 757 和 43 105 个 OTUs。在系统分类的门水平上，分别测得的 22 个和 23 个细菌门，7 个菌门是施氮和未施氮处理草地的优势菌门（表 3）。其中，变形菌门（Proteobacteria）是含有 OTU 数量最多的门类，约占总序列的 30.46%，酸杆菌门（Acidobacteria）是含有 OTU 数量次之的门类，约占总序列的 30.15%，芽单胞菌门（Gemmatimonadetes）

是含有 OTU 数量第 3 的门类，约占总序列的 8.14%，放线菌（Actinomycete）是含有 OTU 数量第 4 的门类，约占总序列的 6.15%，绿弯菌门（Chloroflexi）、拟杆菌门（Bacteroidetes）和硝化螺旋菌门（Nitrospirae）约占总序列的 17.16%。通过比较施氮和未施氮处理草地土壤微生物菌群丰度，施氮处理草地土壤微生物中的变形菌门、放线菌门、拟杆菌门的相对丰度均显著高于未施氮处理草地土壤（ $P<0.01$ ）；未施氮处理草地土壤中绿弯菌门、酸杆菌门、芽单胞菌门相对丰度显著高于施氮处理草地土壤（ $P<0.01$ ），其他各门细菌施氮与未施氮处理间未呈现出显著差异。整体水平来说，施氮处理草地土壤细菌群落相对丰度显著高于未施氮处理草地土壤细菌群落（ $P<0.01$ ）。

2.2 土壤微生物分子生态网络拓扑性质的比较

微生物分子生态网络分析结果表明，以相同相关性阈值（0.90）建立的退化草地土壤的微生物分子生态网络参数在施氮和未施氮处理下不同（表 4），

表 2 各样品测序数据评估结果

Table 2 Results of sample sequencing data evaluation

样品名称 Sample ID	双端序列 PE reads	原始序列 Raw tags	优化序列 Clean tags	有效序列 Effective tags	平均序列长度 Average length (bp)	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	Effective (%)
NF	47023	44654	39465	38754	421	57.14	97.15	94.39	82.41
F	66659	63320	56208	55106	420	56.61	97.26	94.61	82.67

GC 为样品 G 和 C 类型的碱基占总碱基的百分比；Q20 为质量值≥20 的碱基占总碱基数的百分比；Q30 为质量值≥30 的碱基占总碱基数的百分比；Effective 为有效序列占双端序列的百分比
GC is the percentage of bases of type G and C in the total bases; Q20 is the percentage of bases with a mass value greater than or equal to 20 in the total bases; Q30 is the mass value bases greater than or equal to 30 accounting for the percentage of total bases; Effective is the percentage of effective tags in double-ended sequences (PE reads)

表 3 主要细菌门的 OTUs 分布

Table 3 OTUs distribution of main bacterial Phylum

样品名称 Sample ID	变形菌门 Proteobacteria	酸杆菌门 Acidobacteria	芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	放线菌 Actinomycete	绿弯菌门 Chloroflexi	拟杆菌门 Bacteroidetes	硝化螺旋菌门 Nitrospirae
NF	282b	280a	76a	57b	37b	26b	14b
F	316a	258b	52b	89a	31a	30a	22a

表 4 施氮和未施氮退化草地土壤微生物群落的分子生态网络拓扑性质

Table 4 Topological properties of the empirical molecular ecological networks (MENs) of microbial communities in the no fertilized (NF) and fertilized (F) soils

处理	阈值	节点数	连接数	正向连接比	平均连通度	平均路径长度	平均聚集系数	模块性
Treatment	Threshold	Total node	Total links	Positive link percentage (%)	Connectivity	Average path distance	Clustering coefficient	Modularity
F	0.9	1872	19873	53.2*	23.6*	2.33*	0.435*	0.46*
NF	0.9	1913	20389	69.4*	28.7*	2.89*	0.462*	0.41*

*表示 $P<0.001$ ，代表施氮土壤和未施氮土壤的显著性差异
*Represents a significant difference between nitrogenous and non-nitrogenous soils at $P<0.001$

可以看到，未施氮处理下的微生物群落表征网络平均连通度、平均路径长度、正向连接比以及平均聚类系数和模块性显著高于施氮处理 ($P<0.001$)，这些指标间的差异在一定程度说明未施氮处理退化草地的土壤微生物网络结构较施氮处理具有更高的复杂性和更强的紧密性。

2.3 土壤微生物分子生态网络拓扑结构

计算未施氮和施氮处理草地土壤的微生物分子生态网络的模块间连通度 (P_i) 和模块内连通度 (Z_i) (图 1)，结果表明，4 类网络节点中，施氮和未施氮处理土壤微生物的大部分节点属于外围节点 (peripherals) ($Z_i\leq 2.5, P_i\leq 0.62$)，节点分布在模块内部的连接数居多。施氮和未施氮处理土壤微

生物的物种节点分布之间均没有连接器 (connectors) ($Z_i\leq 2.5, P_i>0.62$) 和网络枢纽 (network hubs) ($Z_i>2.5, P_i>0.62$)，表明物种节点分布之间没有与一些模块高度相连，也没有既是模块枢纽又是连接器的物种节点，该结果在本研究中的解释为未施氮处理退化草地土壤微生物和施氮处理草地土壤微生物中几乎没有模块枢纽节点与连接器节点重叠。施氮和未施氮处理土壤微生物节点分布在模块枢纽 (module hubs) ($Z_i>2.5, P_i\leq 0.62$) 上表现出其模块内部与许多节点高度连接，未施氮处理土壤的分子生态网络中有 16 个模块枢纽，属于酸杆菌门、芽单胞菌门和放线菌门。施氮处理土壤分子生态网络结构中有 6 个模块枢纽，属于酸杆菌门、芽单胞菌门和放线菌门 (表 5)。

2.4 土壤微生物主要菌的相关性

本研究基于 python 绘制共表达分析表明，图 2—3 展示的相关性最高的前 50 个属不同。在施氮处理土壤微生物主要菌属的相互作用网络中，相对丰度高的有鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、RB41 和 uncultured_bacterium_c_Subgroup_6，在未施氮处理土壤微生物主要菌属的相互作用网络中，相对丰度高的是 *Blastocatellaceae*_[Subgroup_4]、*f_Alcaligenaceae*、*Ferruginibacter* 和 *c_S0134_terrestrial-group*。图 2—3 可知，未施氮处理的土壤微生物主要菌属的相互关系显著强于施氮处理，且正相关 (橙色) 数量在未施氮土壤中显著多于施氮土壤。同时，施氮处理土壤的关键微生物与未施氮土壤中不同。

3 讨论

3.1 微生物网络结构的改变

通过比较施氮和未施氮处理草地土壤微生物菌群丰度，施氮处理草地土壤微生物中的变形菌门、放线菌门、拟杆菌门的相对丰度均显著高于未施氮处理

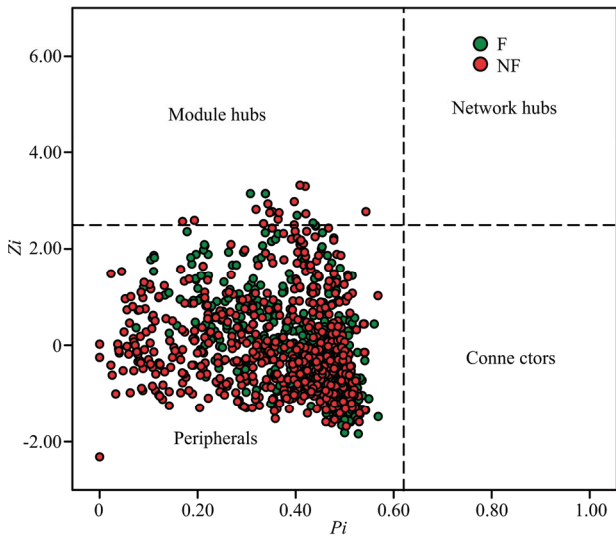
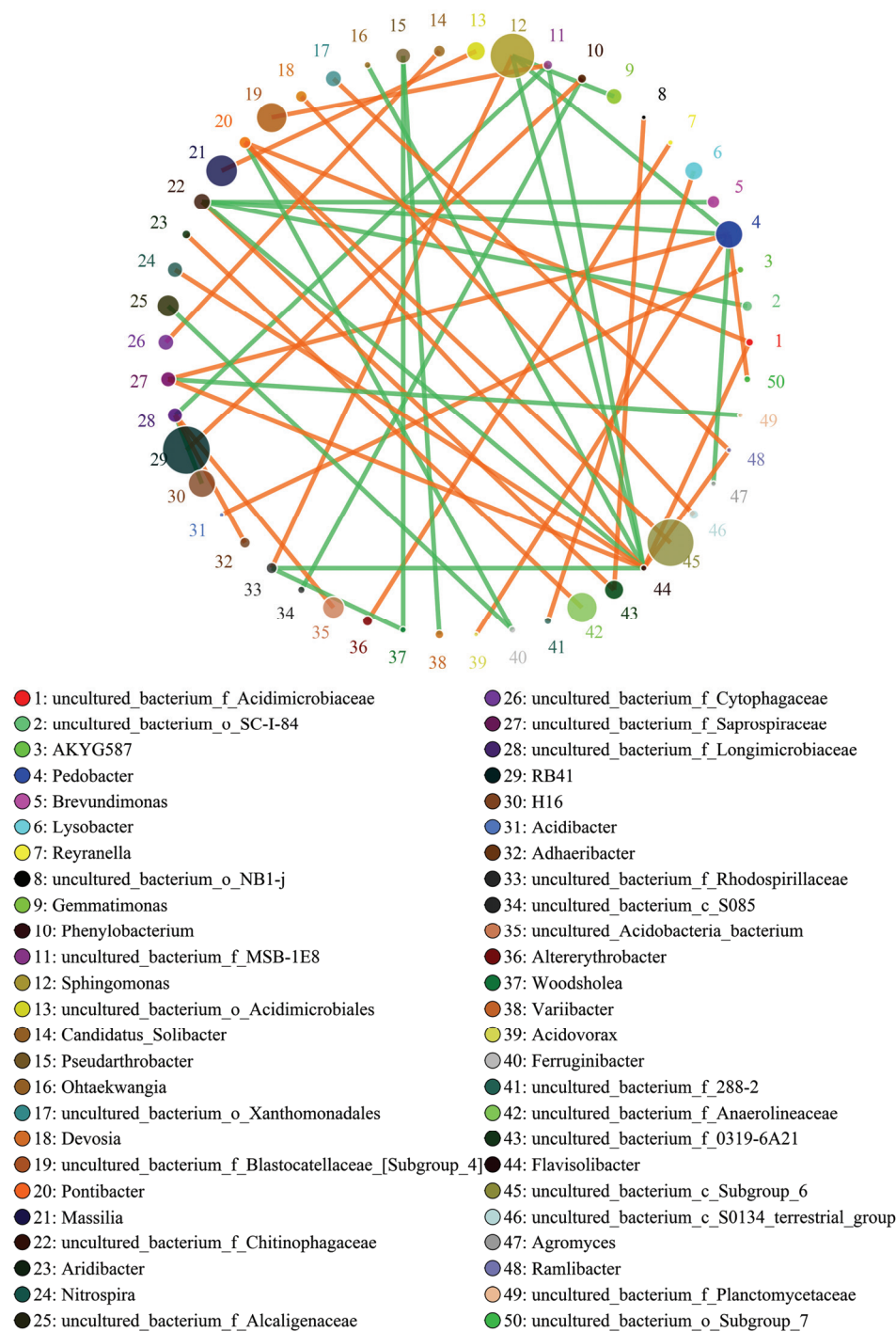


图 1 基于拓扑结构的施氮和未施氮退化草地土壤微生物分布
Fig. 1 The Z-P plot showing the distribution of OTUs in the fertilized (F) and no fertilized (NF) soils based on their topological roles

($P<0.01$)；未施氮处理草地土壤中酸杆菌门、绿弯菌门、芽单胞菌门相对丰度显著高于施氮处理($P<0.01$)。整体水平上综合分析，施氮处理较未施氮处理而言，显著提高了草地土壤微生物群落相对丰度($P<0.01$)。



圆圈代表物种，圆圈大小代表丰度；线条代表两物种间相关，线的粗细代表相关性的强弱。橙色代表正相关，绿色代表负相关。下同
The circle represents species, circle size represents abundance; The lines represent the correlation between the two species, the thickness of the lines represents the strength of the correlation. Orange represents positive correlation, and green represents negative correlation. The same as below

图 2 施氮土壤微生物主要菌属的相互作用网络
Fig. 2 Network of interactions of the main microbial genus of nitrogen-applied soil

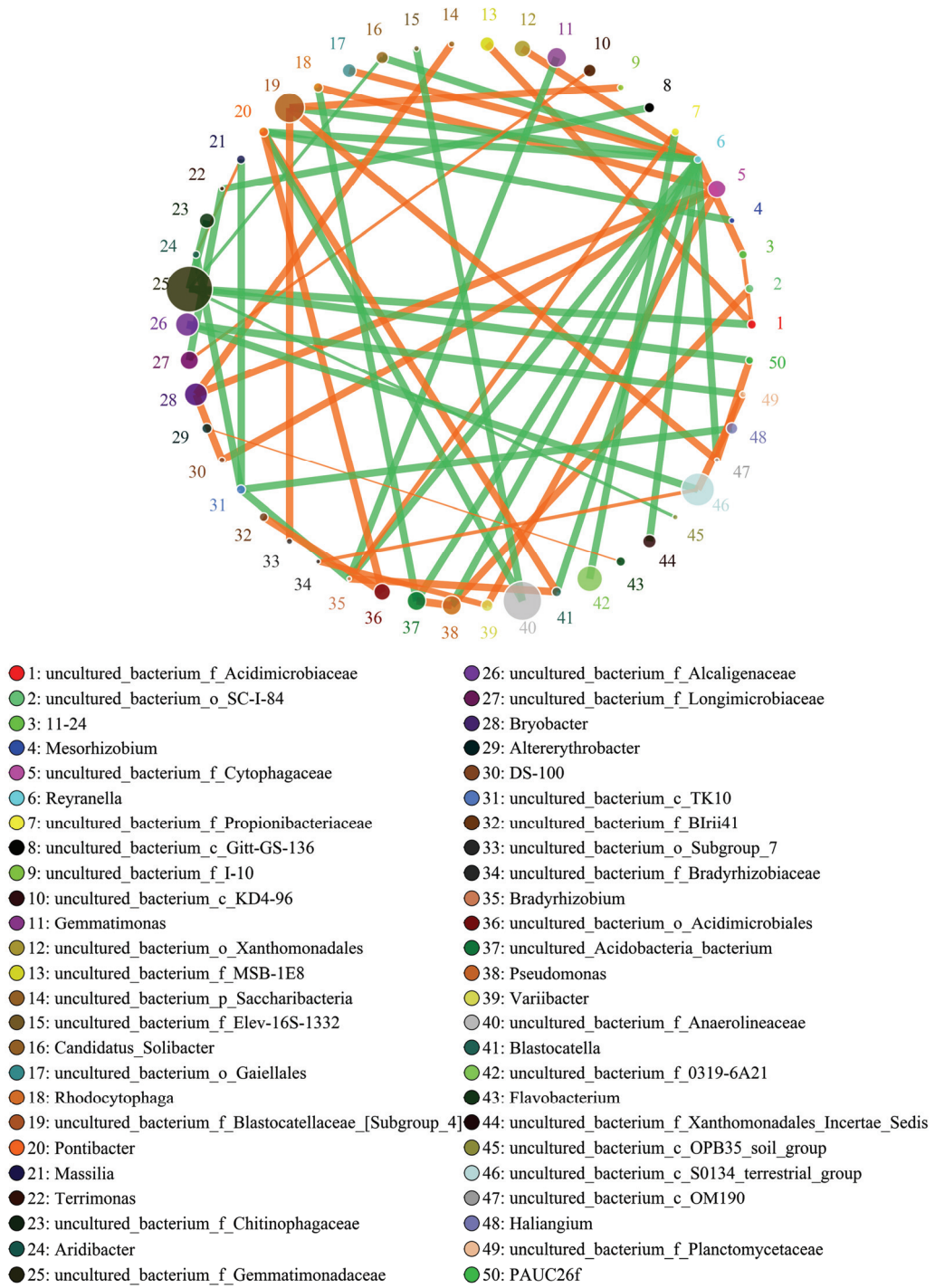


图 3 未施氮土壤微生物主要菌属的相互作用网络

Fig. 3 Network of interactions of the main microbial genus of unnitrogenized soil

这与之之前研究中施加不同含量的氮和氮、磷肥均显著提高细菌的丰度和多样性，并显著改变了细菌群落结构的结论一致^[23]。

退化草地土壤微生物群落的网络表明，施氮处理

土壤微生物的网络属性的正向连接比、平均路径长度、平均聚类系数和模块性显著低于未施氮处理（ $P < 0.001$ ），表明未施氮处理退化草地的土壤微生物网络结构更加复杂和紧密。施氮处理使微生物之间的互作

表 5 不同处理中关键 OTUs

Table 5 The key role of OTUs in different treatments

No.	OTUs	关键 OTUs	Key OTUs	样品名称 Sample ID
1	OTU76	c_Subgroup_6;Unclassified; Unclassified; Unclassified		NF
2	OTU545	c_Chloroflexia;o_Chloroflexales; f_Roseiflexaceae; g_Roseiflexus		NF
3	OTU1682	g_Chthoniobacter; s_uncultured_Verrucomicrobia_bacterium		NF
4	OTU1975	g_Bryobacter; s_uncultured_bacterium_g_Bryobacter		NF
5	OTU3589	g_Roseomonas		NF
6	OTU1174	g_Haliangium		NF
7	OTU300	g_uncultured_bacterium_f_0319-6A21; s_uncultured_bacterium_f_0319-6A21)		NF
8	OTU2179	g_uncultured_bacterium_f_Acidobacteriaceae_[Subgroup_1]		NF
9	OTU688	g_uncultured_bacterium_c_Gitt-GS-136; s_uncultured_bacterium_c_Gitt-GS-136		NF
10	OTU5024	c_Subgroup_6; Unclassified; Unclassified; Unclassified; Unclassified		NF
11	OTU1827	f_Geobacteraceae; Unclassified; Unclassified		NF
12	OTU6317	g_uncultured_bacterium_f_Caldilineaceae; s_uncultured_bacterium_f_Caldilineaceae		NF
13	OTU828	c_Subgroup_6		NF
14	OTU1069	g_uncultured_bacterium_f_Acidimicrobiaceae		NF
15	OTU3349	c_OM190; Unclassified; Unclassified; Unclassified; Unclassified		NF
16	OTU1830	s_uncultured_bacterium_c_BD2-11_terrestrial_group		NF
17	OTU1179	s_uncultured_bacterium_f_Chitinophagaceae		F
18	OTU1954	c_Betaproteobacteria; o_SC-I-84; Unclassified; Unclassified; Unclassified		F
19	OTU2194	g_Gemmatirosa; s_uncultured_bacterium_g_Gemmatirosa		F
20	OTU532	g_uncultured_bacterium_f_MWH-CFBk5;s_uncultured_bacterium_f_MWH- CFBk5		F
21	OTU3703	c_MB-A2-108; Unclassified; Unclassified; Unclassified; Unclassified		F
22	OTU630	c_Nitrospira; o_Nitrospirales; f_Nitrospiraceae; g_Nitrospira		F

水平降低，进而可能会影响网络结构的复杂程度；这表明施氮不仅会改变微生物的群落结构，也可能会改变整体的微生物间的相互作用^[24]。

3.2 关键物种的确定及其相关性

网络分析方法已经被广泛应用于各种环境中微生物群落的研究，分子生态网络分析是通过确定整个网络中的具有高连接度的物种或物种在模块内所处的位置，得到整个网络中的关键物种以及一些较为重要的物种。这一类物种可能对微生物群落的结构和功能有着一定的决定作用。土壤微生物物种数极多且数量巨大，其中可培养微生物只占极少部分。影响土壤微生物的因素极其复杂，常规的研究方法很难确定一个群落的关键物种，但高通量测序与分子生态网络分析为我们的探索提供了一种新的思路和科学依据^[21]。本研究以网络拓扑结构和它们的模块组成关系为基础，探讨草地土壤中对整体微生物网络中起关键作用的 OTU。未施氮处理土壤中出现 16 个模块枢纽 OTU，

施氮处理土壤分子生态网络结构中出现 6 个模块枢纽，施氮处理土壤微生物中的模块枢纽 OTU 比未施氮处理土壤中的少，但施氮与未施氮处理土壤中的关键物种对退化草地的微生物群落网络结构和功能都起着重要的作用。相关性分析表明（图 2—3），施氮处理与未施氮处理土壤中的关键微生物不同，说明施氮选择性地影响了土壤微生物的繁殖和生长，研究结果与塞拉多生态区（热带稀树大草原）土壤微生物多样性研究结果一致^[22]。也有一些研究认为短期施氮不会对土壤细菌群落产生显著影响^[23]。LING 等^[24]对内蒙古温带草原的长期氮添加试验研究发现，细菌丰富度和多样性指数与氮添加水平呈负相关；YANG^[25]研究发现植物功能性状、非生物土壤特性（土壤 pH、无机氮等）共同驱动了土壤细菌多样性的改变。通过对刘红梅^[26]不同研究结论的梳理以及与笔者研究结果的对比，笔者认为随着氮素添加量、添加时间以及研究材料的差异，土壤细菌群落组成、

群落多样性、微生物之间的互做作用等响应会有较大差别。

构建分子生态网络为研究草地退化过程中微生物群落变化动态和极其复杂的互作关系提供了一种新的思路, 但研究过程中的环境特性、土壤类型、微生物组成等方面的差异会较大程度影响试验结果^[27], 目前以统计学为基础的生态网络推理方法, 不能反映真实状态下微生物生态功能和相互作用, 因此该研究方法有一定的局限性。建议构建微宇宙试验模拟可控条件下物种多样性-生态系统功能关系, 揭示与验证外界干扰对微生物群落间互作和功能变化更有依据^[28-30]。本研究下一步工作将从施氮梯度和产量的角度对土壤微生物网络深入研究, 以期获得最佳施肥效果下的最优微生物种群结构, 并且对优势菌群与土壤化学因子结合进行深入分析。

4 结论

本研究利用高通量测序和随机矩阵网络构建理论以退化草地施氮土壤为对象, 解析了外源氮添加对退化草地土壤微生物群落结构和不同物种间互作网络关系的影响。施氮降低了退化草地土壤网络结构的复杂程度和紧密性; 降低了退化草地土壤中的酸杆菌门和绿弯菌门相对丰度, 提高了变形菌门、放线菌门和芽单胞菌门相对丰度。土壤中微生物关键物种 (OTU) 由 16 个 (未施氮) 减少为 6 个, 且二者土壤中均没有重叠 OTU, 表明施氮对草地土壤微生物群落网络的关键物种产生影响, 进而进一步改变微生物分子生态网络结构。施氮会降低土壤主要菌属之间的正负依存关系, 因此施氮量的合理控制是修复退化草地土壤微生物群落结构、微生物群落多样性及微生物间互作关系的关键措施。

References

- [1] 张乃莉, 郭继勋, 王晓宇, 马克平. 土壤微生物对气候变暖和大气 N 沉降的响应. *植物生态学报*, 2007, 31(2): 252-261.
ZHANG N L, GUO J X, WANG X Y, MA K P. Soil microbial feedbacks to climate warming and atmospheric N deposition. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2007, 31(2): 252-261. (in Chinese)
- [2] 文都日乐, 李刚, 杨殿林, 张静妮, 易津. 呼伦贝尔草原土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性与群落结构. *生态学杂志*, 2007, 30(4): 790-797.
WENDU R L, LI G, YANG D L, ZHANG J N, YI J. *nifH* gene diversity and community structure of soil nitrogen fixing bacteria in Hulunbeier grassland, Inner Mongolia. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 30(4): 790-797. (in Chinese)
- [3] FAUST K, RAES J. Microbial interactions: From networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10: 538-550.
- [4] 郑远, 李玉英, 丁传雨, 任学敏, 陈兆进. 能源植物修复镉污染土壤对根际细菌网络结构的影响. *环境科学学报*, 2016, 36(7): 2605-2612.
ZHENG Y, LI Y Y, DING C Y, REN X M, CHEN Z J. Effects of bioenergy cropping on rhizosphere bacteria networks structure in Cd contaminated soil. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(7): 2605-2612. (in Chinese)
- [5] SCHLOTTER M, NANNIPIERI P, SORESENSEN S J. Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54: 1-10.
- [6] PACE N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276(5313): 734-740.
- [7] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, BERG-LYONS D, HUNTLEY J, FIERER N, OWENS S M, BETLEY J, FRASER L, BAUER M, GORMLEY N, GILBERT J A, SMITH G, KNIGHT R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 2012, 6(8): 1621-1624.
- [8] MARTINY J B H, EISEN J A, PENN K, ALLISON SD, HORNER-DEVINE M C. Drivers of bacterial beta-diversity depend on spatial scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2011, 108(19): 7850-7854.
- [9] 刘洋荧, 王尚, 厉舒祯, 邓晔. 基于功能基因的微生物碳循环分子生态学研究进展. *微生物学通报*, 2017, 44(7): 1676-1689.
LIU Y Y, WANG S, LI S Z, DENG Y. Advances in molecular ecology on microbial functional genes of carbon cycle. *Microbiology China*, 2017, 44(7): 1676-1689. (in Chinese)
- [10] 王朱琨, 王尚, 刘洋荧, 冯凯, 邓晔. 宏基因组技术在氮循环功能微生物分子检测研究中的应用. *生物技术通报*, 2018, 34(1): 1-14.
WANG Z H, WANG S, LIU Y Y, FENG K, DENG Y. The applications of metagenomics in the detection of environmental microbes involving in nitrogen cycle. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(1): 1-14. (in Chinese)
- [11] ALLISON S D, MARTINY J B H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2008, 105(1): 11512-11519.
- [12] WALLENSTEIN M D, MC NULTY S, FERNANDEZ I J. Nitrogen fertilization decreases forest soil fungal and bacterial biomass in three long-term experiments. *Forest Ecology and Management*, 2006, 222(1/3): 459-468.
- [13] LUPWAYI N Z, CLAYTON G W, O'DONOVAN J T. Soil microbial

- response to nitrogen rate and placement and barley seeding rate under no till. *Agronomy Journal*, 2011, 103(4): 1064-1071.
- [14] GEISSELER D, LAZICKI P A, SCOW K M. Mineral nitrogen input decreases microbial biomass in soils under grasslands but not annual crops. *Applied Soil Ecology*, 2016, 106: 1-10.
- [15] PACE N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276(5313): 734-740.
- [16] RINKE C, SCHWIENIEK P, SCZYRBA A. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 2013, 499(7459): 431-437.
- [17] PEURA S, BERTILSSON S, JONES R I. Resistant microbial co-occurrence patterns inferred by network topology. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(6): 2090.
- [18] ZHANG B, HORVATH S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 2005, 4(1): 1-43.
- [19] MUEGGE B D, KUCZYNSKI J, KNIGHTS D. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*, 2011, 332(6032): 970-974.
- [20] 陈佐忠, 汪诗平. 中国典型草原生态系统. 北京: 科学出版社, 2000: 380-391.
- CHEN Z Z, WANG S P. *Typical Grassland Ecosystem in China*. Beijing: Science Press, 2000: 380-391. (in Chinese)
- [21] 陈积山, 朱瑞芬, 张强, 单立文, 王玉雪. 刈割施氮对羊草草甸土壤—植物化学计量特征的影响. 中国草地学报, 2019, 41(1): 25-30.
- CHEN J S, ZHU R F, ZHANG Q, SHAN L W, WANG Y X. Effects of clipping frequency and nitrogen fertilizer on the stoichiometric characteristics of N, P for soil and plant in *Leymus chinensis* meadow. *Chinese Journal of Grassland*, 2019, 41(1): 25-30. (in Chinese)
- [22] ZHOU J, DENG Y, LUO F. Functional molecular ecological networks. *Mbio*, 2010, 1(14): 1592-1601.
- [23] 郝亚群, 谢麟, 陈岳民. 中亚热带地区氮沉降对杉木幼林土壤细菌群落多样性及组成的影响. 应用生态学报, 2018, 29(1): 53-58.
- HAO Y Q, XIE L, CHEN Y M. Effects of nitrogen deposition on diversity and composition of soil bacterial community in a subtropical *Cunninghamia lanceolata* plantation. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(1): 53-58. (in Chinese)
- [24] LING N, CHEN D M, GUO H. Differential responses of soil bacterial communities to long-term N and P inputs in a semi-arid steppe. *Geoderma*, 2017, 292: 25-33.
- [25] YANG F, WU J W, ZHANG D D. Soil bacterial community composition and diversity in relation to edaphic properties and plant traits in grasslands of southern China. *Applied Soil Ecology*, 2018, 128: 43-53.
- [26] 刘红梅. 氮沉降对贝加尔针茅草原土壤碳氮转化及微生物学特性的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- LIU H M. Effects of nitrogen deposition on soil carbon and nitrogen transformation and microbial characteristics in *Stipa baicalensis* steppe[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019. (in Chinese)
- [27] LUO F, YANG Y, ZHONG J. Constructing gene co-expression networks and predicting functions of unknown genes by random matrix theory. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8(1): 1-17.
- [28] SUN X, GAO Y, YANG Y F. Recent advancement in environmental research with metagenomics tools. *Biodiversity Science*, 2013, 21(3): 393-400.
- [29] CORNWELL W K, SCHWILK L D W, ACKERLY D D. A trait-based test for habitat filtering: convex hull volume. *Ecology*, 2006, 87(6): 1465-1471.
- [30] DENG Y, HE Z L, XIONG J B, YU H, XU M Y, HOBBIE S E, REICH P B, SCHADT C W, KENT A, PENDALL E, WALLENSTEIN M, ZHOU J Z. Elevated carbon dioxide accelerates the spatial turnover of soil microbial communities. *Global Change Biology*, 2016, 22(2): 957-964.

(责任编辑 林鉴非, 杨鑫浩)