



氮添加对青藏高原高寒沼泽草甸土壤细菌群落的影响

曾红丽,白 炜,房佳辰,徐 磊,商光烈

(兰州交通大学 环境与市政工程学院,兰州 730070)

摘 要 为了解氮添加对青藏高原高寒沼泽草甸土壤细菌群落的影响,进行原位氮添加试验。设置对照(CK, $0 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$)、低氮(N1, $5 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$)和高氮(N2, $10 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$)3种处理,采集0~10 cm、10~20 cm和20~30 cm土层的土壤样品,基于高通量测序技术,并结合土壤理化性质和微生物量碳氮的测定,探讨不同氮添加条件下土壤细菌群落的变化。结果显示:细菌优势类群为变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、芽单胞菌门和厚壁菌门,不同土壤细菌类群相对丰度对氮添加的响应趋势因土层而异。氮添加降低细菌 α 多样性指数,但整体差异不显著。相关性分析表明,铵态氮与Ace指数、Chao1指数和Shannon指数显著正相关,硝态氮、有机碳和含水量与特定细菌门显著相关。结果表明,青藏高原高寒沼泽草甸氮添加会影响土壤细菌群落组成,抑制细菌多样性,铵态氮、硝态氮、有机碳和含水量是驱动这种变化的主要土壤因子。

关键词 氮添加;高寒沼泽草甸;高通量测序;土壤细菌

中图分类号 S154.36

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)08-1035-11

由于工业生产、畜牧业发展及氮肥施用等,大气氮沉降量大幅提高^[1]。在过去的100多年间(1860—1995),全球氮沉降量增加近3倍,预计到2050年将达到 $2 \times 10^{11} \text{ kg} \cdot \text{a}^{-1}$ ^[2]。中国2010年氮沉降量高达 $21.1 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ ^[3],是全球高氮沉降区域之一。大气氮沉降水平的持续升高引发了诸多生态环境问题,如土壤酸化^[4]、改变土壤原有的氮磷平衡^[5]、降低生物多样性和凋落物分解^[6]等,驱动了生态系统结构和功能的改变。草地是中国面积最大的陆地生态系统^[7],具有碳氮循环、水土保持和气候调节等生态服务功能^[8-9],且大部分位于生态脆弱带上。在草地生态系统中,土壤养分相对贫乏,氮是主要的限制因素,即使是较低水平的长期氮沉降,也可能对该生态系统带来负面影响^[10],进而影响到土壤微生物特征及土壤氮转化,在对全球变化敏感的高寒地区更是如此。因此,有关氮沉降对高寒草地土壤微生物的影响引发了研究者的广泛关注,逐渐成为生态学领域的研究热点。

土壤微生物是土壤系统中的重要组成部分,在凋落物分解和氮素转化中起着极其重要的作

用^[11]。氮沉降增加会引起土壤pH、氮有效性、C/N和根系生物量等发生改变^[12-13],进一步影响土壤微生物数量、群落组成和土壤呼吸^[14]。王长庭等^[15]对海北高寒沼泽化草甸的氮添加处理发现,氮添加对细菌丰富度的影响存在土层梯度效应,氮添加增加了0~10 cm土层土壤细菌PL-FAs丰富度,在10~20 cm土层表现为降低。杨越^[16]通过对海北高寒草地生态系统的氮添加研究发现,氮添加没有明显改变土壤微生物群落结构。徐润宏等^[17]发现,在青藏高原高寒湿地进行氮添加试验,显著改变了细菌和真菌的相对丰度。氮添加对土壤微生物的影响由于受众多因子的影响,不同研究之间氮添加时间、土壤水热条件、海拔梯度以及植被类型等因素存在差异,并且生态系统功能和过程对氮沉降增加通常呈现非线性变化^[18],使得研究结果存在很大的不确定性。

青藏高原是世界上中低纬度地区海拔最高、面积最大的多年冻土分布区^[19],该地区草地面积约为 $1.65 \times 10^6 \text{ km}^2$ ^[20],是研究高寒草地生态系统格局与过程的天然实验室。高寒沼泽草甸作为高寒生态系统主要的草地类型之一,对氮添加极

收稿日期:2021-11-06 修回日期:2022-01-10

基金项目:国家自然科学基金(41877149,41563005);甘肃省自然科学基金(21JR7RA319);兰州交通大学青年科学基金(2015013)。

第一作者:曾红丽,女,硕士研究生,从事寒旱区气候变化研究。E-mail: 2602585734@qq.com

通信作者:白 炜,男,博士,副教授,主要从事寒旱区生态系统与气候变化的研究。E-mail: baiwei915@163.com

其敏感^[21]。土壤细菌作为土壤环境中大量存在的微生物,对氮沉降的响应更加明显^[22]。因此,本研究以青藏高原高寒沼泽草甸为研究对象,以外源氮素添加的方式模拟自然氮沉降,运用高通量测序技术,分析不同土壤深度(0~10 cm、10~20 cm、20~30 cm)细菌群落结构及多样性对氮添加的响应特征,并通过相关性分析阐明土壤理化指标对细菌群落的调控作用,以期为氮沉降增加背景下的土壤养分循环和高寒生态区保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于青藏高原风火山地区,海拔 4 610~5 323 m,属于北麓河流域,年均气温为 -5.3 °C,年平均地温为 -1.5~4.0 °C。地下埋藏着 50~120 m 多年冻土,冻土活动层为 0.8~2.5 m^[23]。年均降水量为 269.7 mm,年均蒸发量 1 477.9 mm。高寒沼泽草甸是该地区典型的草地类型之一,主要分布于山间盆地、蝶形洼地和平缓滩地等处。5 月至 9 月为植被生长季,优势物种为藏嵩草(*Kobresia tibetica*),伴生种有青藏苔草(*Carex atrofusca*)和矮火绒草(*Leontopodium nanum*)等^[24]。草群覆盖度达 85% 以上^[25]。

1.2 试验设计

2015 年 5 月在风火山高寒沼泽草甸围栏样地内(34° 43' 57.5" N, 92° 53' 22.5" E, 海拔 4 759 m)设置氮添加试验小区,采用完全随机区组设计,共设置 3 个氮添加水平:对照(CK, 0 g·m⁻²·a⁻¹)、低氮(N1, 5 g·m⁻²·a⁻¹)和高氮(N2, 10 g·m⁻²·a⁻¹)。每个处理 3 个重复,共计 9 个 1 m×1 m 的小区,小区间设 2 m 作为缓冲带。以 NH₄NO₃(分析纯)为氮源,每年的氮添加量平均分为 4 次施入,分别于每年的 6 月至 9 月(每月 1 次)添加。每次施氮时按照不同施氮水平,称取相应量的 NH₄NO₃,溶解于 200 mL 水中,用喷雾器均匀喷洒,在 CK 喷洒相同体积的水。

1.3 研究方法

1.3.1 土壤样品 采集于 2019 年 9 月采集土壤样品。每个小区取 5 个点作为重复,除去地表凋落物后,使用灭菌后的不锈钢土钻采集 0~10 cm、10~20 cm 和 20~30 cm 土层的土样,同一土层 5 个点的土样混合,组成 1 个混合土样。去

除石块、植物根系等杂物后,各土样均分为 3 份:一份自然风干后用来测定土壤理化性质;一份鲜样在 4 °C 的条件下储存,用于土壤微生物量碳、氮测定;一份鲜样于 -80 °C 的条件下储存,用于细菌测序分析。

样品以氮添加水平为前缀,土层为后缀进行标记(0~10 cm 用 a 表示,10~20 cm 用 b 表示,20~30 cm 用 c 表示,如 CK. a 代表对照 0~10 cm 土样)。

1.3.2 土壤理化性质及微生物量碳氮的测定

pH 用 PHS-3C 型酸度计测定;土壤含水量(SWC)采用恒重法测定;全氮(TN)采用半微量凯氏定氮法测定;有机碳(SOC)采用重铬酸钾容量法—外加热法测定;土壤铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)的测定均用氯化钾浸提后采用 Smart Chen 200(AMS-Systea, Rome, Italy)元素分析仪测定;微生物量碳(MBC)和微生物量氮(MBN)均采用氯仿熏蒸浸提法测定。

1.3.3 DNA 提取和高通量测序 采用 Magnetic Soil And Stool DNA Kit 试剂盒(TIANGEN BIOTECH, 北京)提取土样基因组 DNA,提取后用 10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

选用带有 Barcode 信息的引物 341F(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和 806R(5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') 对细菌 16S rDNA 的 V3~V4 区进行扩增。高保真酶 Phusion[®]High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer(New England Biolabs, 美国)用于 PCR 扩增。30 μL PCR 反应体系为:15 μL Phusion Master Mix(2×),引物 Primer(2 μmol·L⁻¹)各 1.5 μL, DNA 模板(1 ng·μL⁻¹)10 μL,超纯水 2 μL。PCR 反应条件为:98 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 30 个循环;72 °C 延伸 5 min。使用 20 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测回收,用 GeneJET 胶回收试剂盒(Thermo Scientific, 美国)进行纯化。使用 TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit 建库试剂盒构建文库,构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后,使用 NovaSeq6000 测序平台(诺禾致源生物信息科技有限公司, 北京)进行上机测序。

使用 FLASH(V1.2.7)对每个样本的 reads 进行拼接,过滤处理,进一步去除嵌合体序列后得到有效数据。利用 Uparse 软件(v7.0.1001)以

97%的相似性将序列聚类成为 OTUs。用 Mothur 方法对 OTUs 代表序列进行物种注释,与 SILVA132 的 SSUrRNA 数据库进行比对,获得各 OTU 的分类学信息。

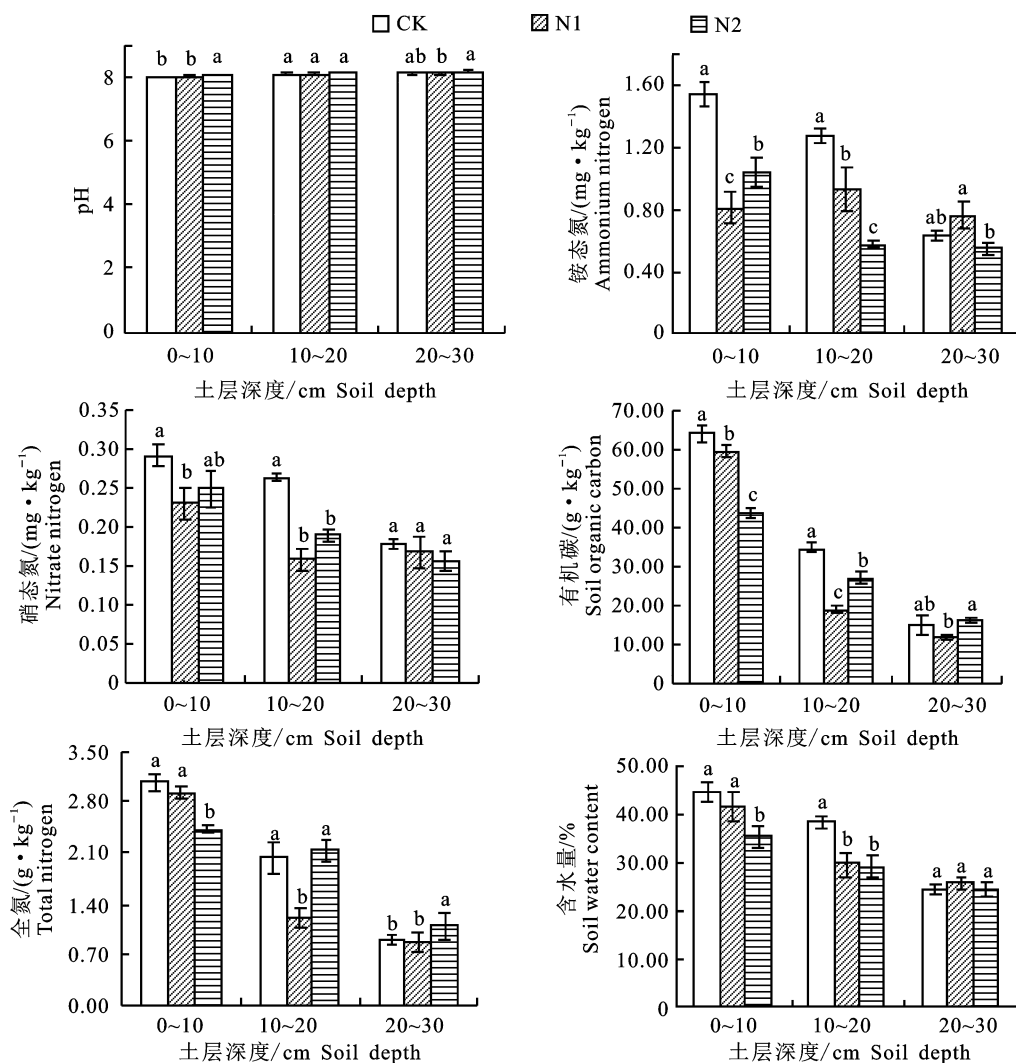
1.4 数据处理

用 Excel 2016 对数据进行初步整理,并绘图做进一步分析。使用 R(Version 2.15.3)软件的 vegan 软件包,基于 Bray-Curtis 距离算法,绘制 NMDS 图分析不同样本间的差异程度。使用 Qiime 软件(Version 1.9.1)计算 Shannon、Simpson 和 Chao1 等指数。运用 SPSS 21.0 软件进行方差分析(One-way ANOVA)和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 氮添加对土壤理化性质的影响

高寒沼泽草甸各处理土壤理化性质如图 1 所示。土壤 pH 为 8.05~8.20,在各处理中均表现为随着土壤深度的增加而增加,N2 处理与 CK 在 0~10 cm 土层存在显著差异($P<0.05$)。N1 和 N2 处理土壤 NH_4^+-N 相比对照,在 0~10 cm 和 10~20 cm 土层均显著降低($P<0.05$)。N1 处理土壤 NO_3^--N 相比对照,在 0~10 cm 和 10~20 cm 土层显著降低,N2 处理土壤 NO_3^--N 在 10~20 cm 土层相比对照显著降低($P<0.05$)。N1



不同小写字母表示相同土层不同处理间差异显著($P<0.05$),下同

Different lowercase letters show significant difference($P<0.05$) between different treatments of the same soil depth, the same below

图 1 不同处理下土壤理化性质

Fig. 1 Physicochemical characteristic of soil under different treatments

和 N2 处理均显著降低 0~10 cm 和 10~20 cm 土层 SOC ($P < 0.05$), 且 10~20 cm 和 20~30 cm 土层 N1 处理 SOC 含量最低。N1 处理 TN 相比对照, 在 10~20 cm 土层显著降低, N2 处理 TN 在 0~10 cm 土层相比对照显著降低 ($P < 0.05$)。N2 处理 SWC 相比对照, 在 0~10 cm 和 10~20 cm 土层均显著降低, N1 处理 SWC 相比对照, 在 10~20 cm 土层显著降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 氮添加对土壤理化性质影响明显。

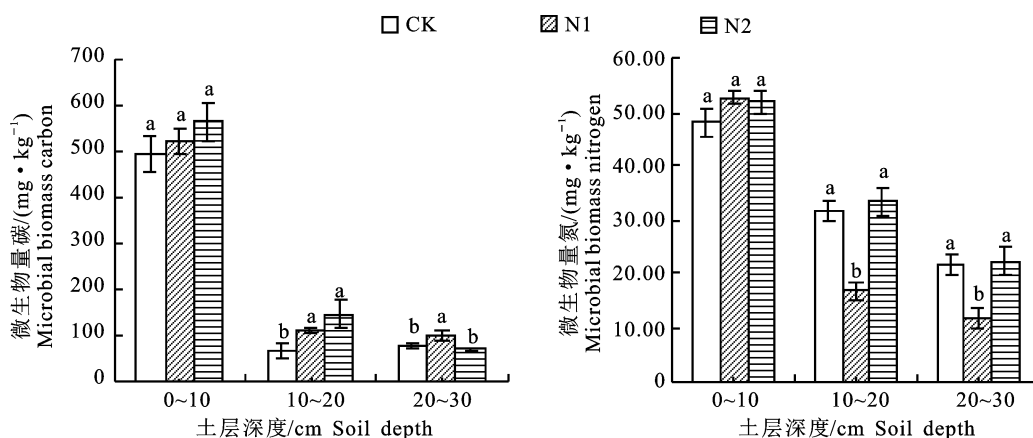


图 2 不同处理下土壤微生物量碳氮

Fig. 2 Soil microbial biomass carbon and nitrogen under different treatments

2.3 氮添加对土壤细菌物种组成的影响

通过高通量测序共得到 544 463 条优质序列, 序列长度为 414~421 bp, 对聚类后的 3 种氮添加处理土壤样品 OTU 依次进行不同等级信息分析, 共得到 54 个门、62 个纲、126 个目、225 个科、489 个属。

土壤细菌优势菌群为变形菌门 (Proteobacteria, 41.136%~51.099%)、酸杆菌门 (Acidobacteria, 14.606%~24.105%)、放线菌门 (Actinobacteria, 7.726%~13.603%)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes, 4.341%~9.868%) 和厚壁菌门 (Firmicutes, 1.811%~11.977%) (图 3)。变形菌门相对丰度在 CK 取得最大值 51.099, 氮添加处理下相对丰度相比对照, 呈先降低后升高趋势。N1 和 N2 处理酸杆菌门相对丰度相比 CK, 在 0~10 cm 和 10~20 cm 土层均增加, 在 20~30 cm 土层均减少。N1 和 N2 处理放线菌门相对丰度, 在 0~10 cm 和 10~20 cm 土层相比 CK 均减少。N1 和 N2 处理厚壁菌门, 相比对照, 其相对丰度在 0~10 cm 土层增加, 10~20 cm 土层减少。氮添加后各土层芽单胞菌门相对丰度表

2.2 氮添加对土壤微生物量碳氮的影响

由图 2 可知, MBC 在表层取得最大值, 相比对照, N1 处理显著增加 10~20 cm 和 20~30 cm 土层 MBC, N2 处理 MBC 相比对照, 在 10~20 cm 土层显著增加 ($P < 0.05$)。N1 处理 MBN 在 10~20 cm 和 20~30 cm 土层相比对照显著降低 ($P < 0.05$), N2 处理 MBN 相比对照, 在各土层均无显著性差异。表明随着氮添加量的增加, 微生物量碳呈增加趋势, 微生物量氮则表现为先降低后增加的趋势。

现为增加趋势。

科水平土壤细菌相对丰度对氮添加的响应分析结果表明 (图 4), 相比对照, N1 和 N2 处理芽单胞菌科相对丰度在 0~10 cm 和 10~20 cm 土层呈增加趋势, 在 20~30 cm 土层呈降低趋势。N1 和 N2 处理亚硝化单胞菌科相对丰度相比对照, 在 0~10 cm 土层均降低, 在 10~20 cm 和 20~30 cm 土层均增加。相比对照, 氮添加处理使各土层芽单胞菌科相对丰度均表现为增加趋势。20~30 cm 土层 Unidentified_Deltaproteobacteria 相对丰度在 N1 和 N2 处理下, 相比对照有明显的增加。氮添加条件下, Unidentified_Rhodospirillales 的相对丰度相比对照, 在 0~10 cm 土层均增加, 在 10~20 cm 土层和 20~30 cm 土层均减小。氮添加处理后, 鞘脂单胞菌科、Unidentified_Rhizobiales 和嗜氢菌科的相对丰度在各土层均降低。N1 和 N2 处理链球菌科相对丰度相比对照, 在 10~20 cm 土层和 20~30 cm 土层均明显减小。相比对照, N1 和 N2 处理葡萄球菌科相对丰度在 10~20 cm 土层均减少。表明氮添加对科水平优势细菌相对丰度影响较大。

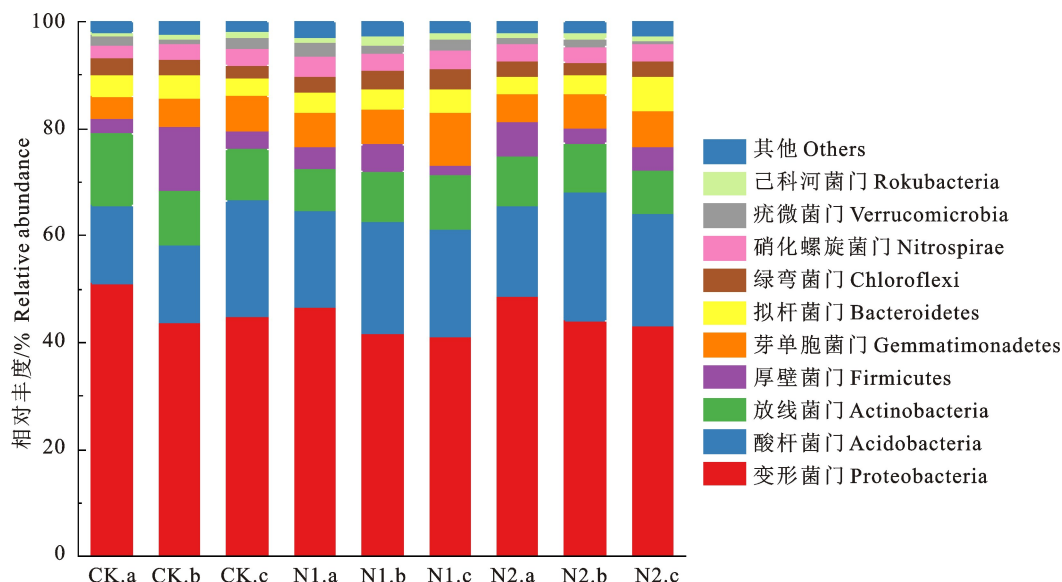


图 3 不同处理下土壤细菌门水平相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of soil bacterial phyla under different treatments

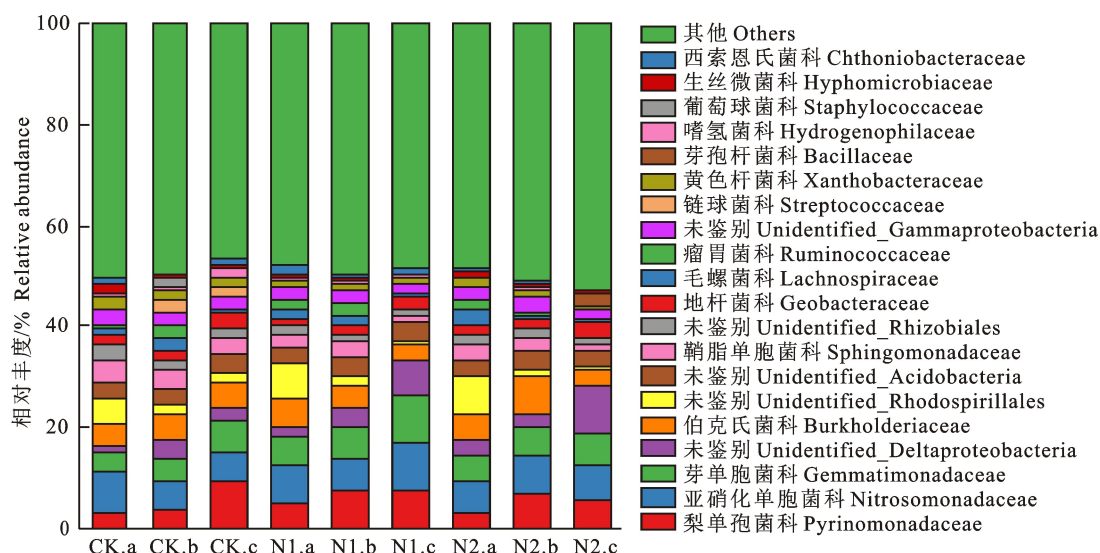


图 4 不同处理下土壤细菌科水平相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of soil bacterial family levels under different treatments

2.4 氮添加对土壤细菌群落结构的影响

由 NMDS 分析结果可以看出(图 5),低氮添加对土壤细菌群落结构的影响大于高氮添加,但 N1 和 N2 处理均没有显著影响土壤细菌群落结构。图中 N1. b 和 N2. b 距离较近,说明这两个样点的物种组成较为相似。

2.5 氮添加对土壤细菌 α 多样性的影响

不同氮添加处理测序样品 OTUs 数量为 2 018~2 378,测序覆盖率在 0.99 以上。对土壤细菌 α 多样性指数进行分析(表 1),各土层 N1 和

N2 处理 Shannon 指数相比对照,均表现为降低趋势,且在 N2. b 和 N2. c 处显著降低 ($P < 0.05$)。N1 和 N2 处理 Simpson 指数相比对照,整体也表现为降低趋势,且在 N1. c 和 N2. c 处显著降低 ($P < 0.05$)。Chao1 指数为 2 056.150~2 413.727,最大值在 N1. b 处取得,相比对照,N1 和 N2 处理土壤细菌丰富度指数(Chao1, Ace)整体呈降低趋势,其中,N2. b 处两种丰富度指数显著降低 ($P < 0.05$)。表明氮添加能抑制细菌群落多样性,但整体差异不显著。

表 1 不同处理下土壤细菌 α 多样性指数

Table 1 Alpha diversity indexes of soil bacterial under different treatments

土层深度 Soil depth	观测值指数 Observed value index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index	Ace 指数 Ace index	观测深度 Observational depth
0~10 cm	CK, a	2277±123.744 a	9.088±0.033 a	0.994±0.000 a	2 301.541±119.867 a	2 345.575±122.490 a
	N1, a	2238±134.350 a	8.806±0.036 a	0.991±0.000 a	2 268.019±126.268 a	2 318.489±133.929 a
	N2, a	2254±125.158 a	8.795±0.044 a	0.991±0.000 a	2 262.189±138.058 a	2 295.895±142.711 a
10~20 cm	CK, b	2366±165.463 a	9.095±0.005 a	0.994±0.000 a	2 402.349±71.282 a	2 460.446±81.226 a
	N1, b	2378±181.019 a	9.009±0.143 ab	0.993±0.002 a	2 413.727±103.031 a	2 468.911±106.365 a
	N2, b	2098±90.510 b	8.750±0.032 b	0.992±0.001 a	2 134.455±90.321 b	2 178.346±83.120 b
20~30 cm	CK, c	2144±128.693 a	8.764±0.036 a	0.993±0.000 a	2 170.345±131.145 a	2 218.477±136.537 a
	N1, c	2018±125.158 a	8.533±0.035 ab	0.988±0.000 b	2 056.150±133.740 a	2 104.472±141.211 a
	N2, c	2036±130.815 a	8.420±0.043 b	0.986±0.000 b	2 067.970±136.666 a	2 116.127±143.267 a

注:同列不同小写字母表示同一土层不同处理差异显著($P<0.05$),数值为“平均值±标准差”。

Note: Different lowercase letters within the same columns indicate significant differences($P<0.05$) among the same sampling depth under different treatments, The data within the table are mean ± standard deviation.

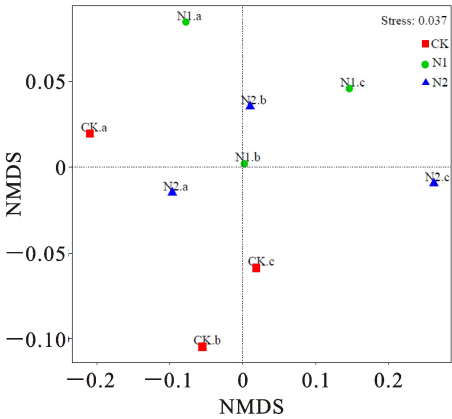


图 5 土壤细菌的 NMDS 分析

Fig. 5 Soil bacterial community structure under different treatments

2.6 土壤细菌与土壤理化性质及微生物量碳氮之间的关系

由相关性分析结果可知(表 2), Ace 指数和 Chao1 指数均与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 显著正相关($P<0.05$)。Shannon 指数与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 SWC 显著正相关($P<0.05$),与 pH 显著负相关($P<0.05$)。表明 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、pH 和 SWC 是影响细菌多样性的关键土壤因子。

进一步分析土壤因子对细菌优势菌门的影响(表 2),变形菌门与 pH 负相关($P<0.05$),与 MBC、MBN、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、SOC、TN 和 SWC 极显著正相关或显著正相关($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。酸杆菌门与 pH 呈正相关($P<0.05$),与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 SWC 极显著负相关($P<0.01$)。放线菌门与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 显著正相关($P<0.05$)。芽

表 2 土壤因子与细菌的相关性

Table 2 Correlation analysis between soil factors and bacterial community

因子 Factor	pH	微生物量碳 MBC	微生物量氮 MBN	铵态氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$	硝态氮 $\text{NO}_3^-\text{-N}$	有机碳 SOC	全氮 TN	含水量 SWC
Ace 指数 Ace index	-0.559	0.207	0.288	0.673 *	0.483	0.429	0.392	0.613
Chao1 指数 Chao1 index	-0.576	0.243	0.32	0.686 *	0.506	0.451	0.416	0.628
香农指数 Shannon index	-0.685 *	0.266	0.371	0.793 *	0.654	0.539	0.523	0.704 *
辛普森指数 Simpson index	-0.564	0.176	0.31	0.599	0.546	0.414	0.422	0.533
变形菌门 Proteobacteria	-0.767 *	0.854 **	0.876 **	0.597	0.819 **	0.861 **	0.818 **	0.736 *
酸杆菌门 Acidobacteria	0.738 *	-0.533	-0.559	-0.889 **	-0.865 **	-0.702 *	-0.603	-0.815 **
放线菌门 Actinobacteria	-0.552	0.209	0.135	0.783 *	0.568	0.362	0.306	0.443
厚壁菌门 Firmicutes	-0.031	-0.108	0.138	0.367	0.368	0.099	0.121	0.291
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	0.553	-0.493	-0.702 *	-0.612	-0.726 *	-0.682 *	-0.691 *	-0.669 *

注 Note: * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

单胞菌门与 MBN、 NO_3^- -N、SOC、TN 和 SWC 均显著负相关($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 氮添加对细菌群落结构的影响

本研究对青藏高原高寒沼泽草甸进行氮添加处理, NMDS 分析结果表明, 氮添加没有对土壤细菌群落结构产生显著性影响, 可能是因为本研究氮添加试验时间和氮添加量尚未达到明显改变细菌群落结构的阈值。变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、厚壁菌门和芽单胞菌门是该地区土壤细菌主要菌群。各优势菌群相对丰度对氮添加表现出不同的响应趋势。本研究样地变形菌门在土壤细菌当中占比最高, 其相对丰度在各土层随着施氮浓度的增加, 均表现为先降低后升高趋势, 表明氮添加对变形菌门的影响存在阈值限制, 与李成一等^[26]的研究结果相似。N1 和 N2 处理酸杆菌门相对丰度相比对照, 在 0~10 cm 土层和 10~20 cm 土层均增加, 可能是由于该细菌属于寡营养类群, 9 月为植物生长枯黄期, 氮添加使植物生长期延长, 植物对养分的需求增加^[21], 微生物的养分获取受到限制, 从而促进了该菌群的生长。研究认为放线菌属于富营养型细菌^[27], 能够降解纤维素和几丁质, 产生种类繁多的胞外酶和次生代谢产物^[28], 是土壤养分供给的来源之一。氮添加使各土层放线菌门相对丰度表现为降低趋势, 可能与本研究中氮添加条件下, 土壤铵态氮和硝态氮有效性降低有关。氮添加增加各土层芽单胞菌门相对丰度, 表明氮添加会促进芽单胞菌门的生长。氮添加后 0~10 cm 土层厚壁菌门相对丰度相比对照增加, 而在 10~20 cm 土层相比对照减少, 这可能与厚壁菌门属于固氮菌, 氮添加引起各土层土壤氮含量发生改变有关。

3.2 氮添加对细菌群落多样性的影响

土壤微生物多样性是土壤生物多样性的的重要组成部分, 可指示土壤生态功能变化。氮添加可通过改变土壤环境条件(如土壤氮有效性和酸化)影响细菌多样性^[29]。微生物多样性的降低会影响土壤氮循环^[30], 进一步影响生态环境稳定性。有研究表明施氮会直接影响土壤细菌丰富度^[27]。杨越^[16]以青藏高原高寒草地生态系统为研究对象, 发现氮添加对土壤细菌多样性未产生显著影响。李成一等^[26]以三江源区高寒草甸为研究对象, 发现随氮添加量的增大, 多样性指数呈先降低

后增高趋势。本研究发现, 氮添加处理下 Shannon 和 Simpson 指数均下降, N2 处理 Shannon 指数在 10~20 cm 和 20~30 cm 土层相比对照明显降低, N1 和 N2 处理 Simpson 指数相比对照, 在 20~30 cm 土层显著降低。氮添加后 Chao1 和 Ace 指数也呈降低趋势, 且 N2 处理两种丰富度指数在 10~20 cm 土层处显著降低。徐润宏等^[17]的研究也表明, 氮添加降低了高寒地区土壤细菌 Simpson 和 Chao1 指数, 与本研究结论相似。说明氮添加影响了土壤细菌群落组成, 降低了高寒沼泽草甸土壤细菌多样性。原因可能是高寒沼泽草甸土壤贫瘠, 氮素匮乏, 氮添加促进了地表植被生长^[25], 大部分土壤养分被植物所吸收, 细菌用于自身生长繁殖的养分受到限制, 抑制了细菌多样性。也可能是细菌类群竞争排斥的结果, 即一些细菌对氮诱导的环境胁迫具有高度的适应能力^[31], 氮添加促进了这类细菌的迅速生长, 改变了土壤原有细菌组成, 影响细菌多样性。

3.3 氮添加条件下土壤因子对细菌群落的影响

土壤理化性质是影响细菌群落的重要因素。细菌菌群由于自身结构和功能的差异, 对不同环境适应能力及养分需求有所不同, 土壤 pH、有机碳和含水量等升高或降低, 会引起细菌群落组成和多样性的改变, 土壤细菌群落结构的变化也会反过来影响土壤养分的有效性。本研究相关性分析表明, pH、 NH_4^+ -N 和 SWC 是影响细菌群落多样性的关键环境因子, NO_3^- -N、SOC、SWC 和 MBN 分别与特定细菌门显著相关。程亮等^[32]在青藏高原地区的研究表明, 土壤含水量和有机碳含量是影响细菌群落分布的主要环境因子, 与本研究结果相似。刘红梅等^[33]和杨山等^[34]的研究中也有类似发现。Rousk 等^[35]研究发现土壤 pH 是影响细菌生长的主要因素。土壤 pH 的变化会影响微生物酶活性和碳氮元素利用率, 改变微生物代谢功能^[36], 影响草地土壤细菌的多样性。但较高的土壤 pH 具有一定的酸缓冲能力, 对氮添加引起的土壤酸化具有较强的抵抗力, 使得土壤 pH 对氮输入的响应较小^[37], 对细菌的影响减弱。碳是微生物生长的必需元素, 土壤有机碳含量被认为是土壤细菌动态的主要决定因素^[38], 通常认为土壤有机碳含量与细菌存在显著相关性。有研究发现, 氮添加对土壤有机碳含量的影响存在阈值限制^[16], 与该研究结果类似, 本研究中 N1 处理有机碳含量最低。这可能是因为氮添加促进了地

表植被的生长,植物吸收土壤中的养分用于自身生长繁殖,低氮添加可能导致有机碳输出大于输入,使得土壤有机碳含量低于对照。当氮添加超过一定水平时,归还到土壤中的养分和凋落物量增加,有机碳含量较低,氮添加时升高。微生物量氮作为土壤有机质中最活跃的组分,对环境变化非常敏感,本研究发现微生物量氮随氮添加水平的升高表现为先降低后增加趋势,单文俊等^[39]对长白山白桦山杨天然次生林土壤微生物量对氮添加的响应研究中有类似发现。可能是因为低氮添加时,微生物在与植被竞争养分中处于劣势,微生物的生长受到抑制,微生物量氮降低,高氮添加增加了土壤中可利用氮含量,缓解了微生物与植被之间的养分竞争^[4],微生物量氮增加。土壤铵态氮和硝态氮有效性会导致细菌丰富度发生变化^[27]。土壤水分的变化则会导致土壤中的氧含量发生改变,进而影响细菌的分布^[40]。除土壤理化性质外,根系分泌物、土壤酶和土壤团聚体也会影响细菌群落,因此,开展植被、细菌和土壤环境间的耦合关系研究,可以更好地了解氮添加对细菌群落的影响机制。

4 结 论

通过对青藏高原高寒沼泽草甸土壤细菌群落对氮添加的响应研究,得出以下结论:氮添加对土壤优势菌群相对丰度均有不同程度的影响,但没有显著改变土壤细菌群落结构;氮添加抑制了土壤细菌多样性指数;土壤铵态氮、硝态氮、有机碳和含水量是影响细菌群落变化的关键土壤因子。长期氮添加可能会对青藏高原高寒沼泽草甸土壤细菌群落产生持续性影响,并对生态系统的稳定性构成严重威胁。因此,本研究区氮添加试验对土壤细菌的影响研究还需持续进行,以期为氮沉降增加影响下,高寒草地生态系统生物多样性维持机制提供理论依据。

参考文献 Reference:

- [1] 薛璟花,莫江明,李 炯,等. 氮沉降增加对土壤微生物的影响[J]. 生态环境,2005,14(5):777-782.
XUE J H, MO J M, LI J, *et al.* Effects of nitrogen deposition on soil microorganism[J]. *Ecology and Environment*, 2005, 14(5): 777-782.
- [2] GALLOWAY J N, TOWNSEND A R, ERISMAN J W, *et al.* Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions[J]. *Science*, 2008, 320(5878): 889-892.
- [3] LIU X J, ZHANG Y, HAN W X, *et al.* Enhanced nitrogen deposition over China[J]. *Nature*, 2013, 494(7438): 459-463.
- [4] 程 蕾,周嘉聪,林开森,等. 氮添加对亚热带毛竹林土壤微生物群落结构的影响[J]. 生态学报,2020,39(6):1929-1937.
CHENG L, ZHOU J C, LIN K M, *et al.* Effects of nitrogen addition on soil microbial community structure in a subtropical *Phyllostachy pubescens* forest[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2020, 39(6): 1929-1937.
- [5] PEÑUELAS J, POULTER B, SARDANS J, *et al.* Human-induced nitrogen-phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe[J]. *Nature Communications*, 2013, 4(1): 1-10.
- [6] 付 伟,武 慧,赵爱花,等. 陆地生态系统氮沉降的生态效应:研究进展与展望[J]. 植物生态学报,2020,44(5):475-493.
FU W, WU H, ZHAO A H, *et al.* Ecological impacts of nitrogen deposition on terrestrial ecosystems: research progresses and prospects[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2020, 44(5): 475-493.
- [7] 蒋 翔,马建霞. 我国草地生态恢复对不同因素响应的 Meta 分析[J]. 草业学报,2021,30(2):14-31.
JIANG X, MA J X. The impact of different factors on the outcomes of grassland ecological restoration in China: a meta-analysis[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(2): 14-31.
- [8] 沈海花,朱言坤,赵 霞,等. 中国草地资源的现状分析[J]. 科学通报,2016,61(2):139-154.
SHEN H H, ZHU Y K, ZHAO X, *et al.* Analysis of current grassland resources in China[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2016, 61(2): 139-154.
- [9] 孙 建,刘国华. 青藏高原高寒草地:格局与过程[J]. 植物生态学报,2021,45(5):429-433.
SUN J, LIU G H. Alpine grassland on the Qinghai-Tibet Plateau: pattern and process[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2021, 45(5): 429-433.
- [10] TIAN D S, NIU S L. A global analysis of soil acidification caused by nitrogen addition[J]. *Environmental Research Letters*, 2015, 10(2): 024019.
- [11] 邵 丽,谷 洁,高 华,等. 生物复混肥对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 西北农业学报,2012,21(7):185-189.
SHAO L, GU J, GAO H, *et al.* Effects of bio-compound fertilizer on soil microbial community functional diversity[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2012, 21(7): 185-189.
- [12] 李宗明,沈菊培,张丽梅,等. 模拟氮沉降对于旱半干旱温带草原土壤细菌群落结构的影响[J]. 环境科学,2018,39(12):5665-5671.
LI Z M, SHEN J P, ZHANG L M, *et al.* Effects of stimu-

- lated nitrogen deposition on the bacterial community structure of semiarid temperate grassland[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(12): 5665-5671.
- [13] 涂利华, 胡庭兴, 张 健, 等. 模拟氮沉降对华西雨屏区慈竹林土壤活性有机碳库和根生物量的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(9): 2286-2294.
- TU L H, HU T X, ZHANG J, *et al.* Effects of simulated nitrogen deposition on soil active carbon pool and root biomass in *Neosinocalamus affinis* plantation, rainy area of west China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(9): 2286-2294.
- [14] 褚海燕. 高寒生态系统微生物群落研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 123-136.
- CHU H Y. Microbial communities in high latitudes and high altitudes ecosystems[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 123-136.
- [15] 王长庭, 王根绪, 李香真, 等. 氮肥添加对高寒藏嵩草(*Kobresia tibetica*)沼泽化草甸和土壤微生物群落的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(2): 405-415.
- WANG CH T, WANG G X, LI X ZH, *et al.* Effects of N addition on the plant and soil microbial community in alpine *Kobresia tibetica* meadow of Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(2): 405-415.
- [16] 杨 越. 氮添加对草地生态系统土壤微生物群落的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.
- YANG Y. Effects of nitrogen addition on soil microbial community in grassland ecosystem [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2019.
- [17] 徐润宏, 谭 梅, 朱锦福, 等. 高寒湿地土壤微生物多样性对氮沉降浓度差异的响应[J]. 生物学杂志, 2021, 38(6): 75-81.
- XU R H, TAN M, ZHU J F, *et al.* The response of soil microbial diversity to the difference of N deposition concentration in alpine wetland [J]. *Journal of Biology*, 2021, 38(6): 75-81.
- [18] NIU D C, YUAN X B, CEASE A J, *et al.* The impact of nitrogen enrichment on grassland ecosystem stability depends on nitrogen addition level[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 618: 1529-1538.
- [19] 程国栋, 赵 林, 李 韧, 等. 青藏高原多年冻土特征、变化及影响[J]. 科学通报, 2019, 64(27): 2783-2795.
- CHENG G D, ZHAO L, LI R, *et al.* Characteristic, changes and impacts of permafrost on Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2019, 64(27): 2783-2795.
- [20] 张 利, 周广胜, 汲玉河, 等. 中国草地碳储量时空动态模拟研究[J]. 中国科学: 地球科学, 2016, 46(10): 1392-1405.
- ZHANG L, ZHOU G SH, JI Y H, *et al.* Spatiotemporal dynamic simulation of grassland carbon storage in China [J]. *Scientia Sinica(Terrae)*, 2016, 46(10): 1392-1405.
- [21] 刘永万, 白 炜, 尹鹏松, 等. 外源氮素添加对长江源区高寒沼泽草甸土壤养分及植物群落生物量的影响[J]. 草地学报, 2020, 28(2): 483-491.
- LIU Y W, BAI W, YIN P S, *et al.* Effects of exogenous nitrogen addition on soil nutrients and plant community biomass in alpine swamp meadow in the headwaters region of the Yangtze River[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(2): 483-491.
- [22] 刘桂要, 陈莉莉, 袁志友. 氮添加对黄土丘陵区油松人工林根际土壤微生物群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2019, 30(1): 117-126.
- LIU G Y, CHEN L L, YUAN ZH Y. Effects of nitrogen addition on the structure of rhizosphere microbial community in *Pinus tabulaeformis* plantations on Loess Plateau, China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(1): 117-126.
- [23] 张 涛, 王根绪, 杨 燕, 等. 青藏高原多年冻土区不同草地类型生态系统呼吸季节差异性[J]. 冰川冻土, 2018, 40(6): 1255-1264.
- ZHANG T, WANG G X, YANG Y, *et al.* The seasonal variation of ecosystem respiration in different vegetation types in the permafrost regions of Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2018, 40(6): 1255-1264.
- [24] 唐川川, 王根绪, 张 莉, 等. 青藏高原高寒沼泽化草甸群落生物量及地下CNP对积雪增加的响应[J]. 冰川冻土, 2021, 43(2): 618-627.
- TANG CH CH, WANG G X, ZHANG L, *et al.* Responses of plant community biomass and below-ground CNP stocks to snow addition in alpine swamp meadow on the Tibetan Plateau[J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2021, 43(2): 618-627.
- [25] 白 炜, 奚晶阳, 王根绪. 短期增温与施氮对青藏高原高寒沼泽草甸生态系统CO₂排放的影响[J]. 生态学杂志, 2019, 38(4): 927-936.
- BAI W, XI J Y, WANG G X. Effects of short-term warming and nitrogen addition on CO₂ emission during growing season in an alpine swamp meadow ecosystem of Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(4): 927-936.
- [26] 李成一, 李希来, 杨元武, 等. 氮添加对不同坡度退化高寒草甸土壤细菌多样性的影响[J]. 草业学报, 2020, 29(12): 161-170.
- LI CH Y, LI X L, YANG Y W, *et al.* Effect of nitrogen addition on soil bacterial diversity in alpine degraded grasslands of differing slope[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2020, 29(12): 161-170.
- [27] ZENG J, LIU X J, SONG L, *et al.* Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 92: 41-49.
- [28] 戴雅婷, 闫志坚, 解继红, 等. 基于高通量测序的两种植被恢复类型根际土壤细菌多样性研究[J]. 土壤学报, 2017, 54(3): 735-748.

- DAI Y T, YAN ZH J, XIE J H, *et al.* Soil bacteria diversity in rhizosphere under two types of vegetation restoration based on high throughput sequencing[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(3): 735-748.
- [29] ZHANG X M, HAN X G. Nitrogen deposition alters soil chemical properties and bacterial communities in the Inner Mongolia grassland[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(8): 1483-1491.
- [30] PHILIPPOT L, SPOR A, HÉNAULT C, *et al.* Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil[J]. *Isme Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2013, 7(8): 1609-1619.
- [31] WANG C, LU X K, MORI T, *et al.* Responses of soil microbial community to continuous experimental nitrogen additions for 13 years in a nitrogen-rich tropical forest[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 121: 103-112.
- [32] 程 亮, 王 信, 郭青云. 青藏高原不同生境土壤细菌群落结构特征及其与环境的关系[J]. 干旱地区农业研究, 2019, 37(1): 18-26.
- CHENG L, WANG X, GUO Q Y. Relationship of soil bacterial community composition from different ecosystems on Qinghai-Tibet Plateau with environment factors[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2019, 37(1): 18-26.
- [33] 刘红梅, 杨殿林, 张海芳, 等. 氮添加对贝加尔针茅草原土壤细菌群落结构的影响[J]. 草业学报, 2019, 28(9): 23-32.
- LIU H M, YANG D L, ZHANG H F, *et al.* Effects of nitrogen addition on the soil bacterial community structure of *Stipa baicalensis* steppe[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(9): 23-32.
- [34] 杨 山, 李小彬, 王汝振, 等. 氨水添加对中国北方草原土壤细菌多样性和群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2015, 26(3): 739-746.
- YANG SH, LI X B, WANG R ZH, *et al.* Effects of nitrogen and water addition on soil bacterial diversity and community structure in temperate grasslands in northern China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(3): 739-746.
- [35] ROUSK J, BROOKES P C, BÅÅTH E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(6): 1589-1596.
- [36] 赵轻舟, 王艳芬, 崔骁勇, 等. 草地土壤微生物多样性影响因素研究进展[J]. 生态科学, 2018, 37(3): 204-212.
- ZHAO Q ZH, WANG Y F, CUI X Y, *et al.* Research progress of the influence factors of soil microbial diversity in grassland[J]. *Ecological Science*, 2018, 37(3): 204-212.
- [37] 杨建强, 刁华杰, 胡姝娅, 等. 不同水平氮添加对盐渍化草地土壤微生物特征的影响[J]. 植物生态学报, 2021, 45(7): 780-789.
- YANG J Q, DIAO H J, HU SH Y, *et al.* Effects of nitrogen addition at different levels on soil microorganisms in saline-alkaline grassland of northern China [J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2021, 45(7): 780-789.
- [38] DRENOVSKY R E, VO D, GRAHAM K J, *et al.* Soil water content and organic carbon availability are major determinants of soil microbial community composition[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 48(3): 424-430.
- [39] 单文俊, 付 琦, 邢亚娟, 等. 氮沉降对长白山白桦山杨天然次生林土壤微生物量碳氮和可溶性有机碳氮的影响[J]. 生态环境学报, 2019, 28(8): 1522-1530.
- SHAN W J, FU Q, XING Y J, *et al.* Effects of nitrogen deposition on soil microbial biomass carbon/nitrogen and dissolved organic carbon/nitrogen in natural secondary forests of *Betula platyphylla* and *Populus davidiana* in Changbai Mountains [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2019, 28(8): 1522-1530.
- [40] ZHANG X F, ZHAO L, XU S J, *et al.* Soil moisture effect on bacterial and fungal community in Beilu River(Tibetan Plateau) permafrost soils with different vegetation types [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(4): 1054-1065.

Effect of Nitrogen Addition on Soil Bacterial Community in Alpine Swamp Meadow of Qinghai-Tibet Plateau

ZENG Hongli, BAI Wei, FANG Jiachen, XU Lei and SHANG Guanglie

(School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

Abstract In order to investigate the effect of nitrogen addition on soil bacterial community structure and diversity, an insitu nitrogen addition experiment was conducted in an alpine swamp meadow of Qinghai-Tibet Plateau. Three nitrogen treatments (CK, $0 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$; N1, $5 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$; N2, $10 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$) was set, the soil samples were collected from the 0–10 cm, 10–20 cm and 20–30 cm soil layers, based on high-throughput sequencing technology, combined with soil physicochemical properties and determination of the microbial biomass carbon and nitrogen, the change of soil bacterial community structure was studied under different treatments of nitrogen addition. The results showed that five dominant bacterial phyla were Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Gemmatimonadetes and Firmicutes, the effect of nitrogen addition on the relative abundance of different bacterial groups was different at different soil layers. With increasing nitrogen application, the bacterial diversity indexes had declining trend, but the overall difference was not significant. The correlation analysis showed that there were significant positive relations between ammonium nitrogen and Ace index, Chao1 index and Shannon index; nitrate nitrogen, soil organic carbon and soil water content were significantly correlated with specific bacteria at phylum level. The results showed that increasing nitrogen deposition in alpine swamp meadow on the Qinghai-Tibet Plateau can affect the composition of soil bacterial community and inhibit bacterial diversity. In addition, soil ammonium nitrogen, nitrate nitrogen, organic carbon and water content are key factors affecting soil bacterial community under different treatments of nitrogen addition.

Key words Nitrogen addition; Alpine swamp meadow; High-throughput sequencing; Soil bacteria

Received 2021-11-06

Returned 2022-01-10

Foundation item The National Natural Science Foundation of China (No. 41877149, No. 41563005); Natural Science Foundation of Gansu Province, China (No. 21JR7RA319); the Science Foundation for Young Scholars of Lanzhou Jiaotong University (No. 2015013).

First author ZENG Hongli, female, master student. Research area: climate change in cold and arid regions. E-mail: 2602585734@qq.com

Corresponding author BAI Wei, male, Ph. D, associate professor. Research area: cold and arid regions ecosystem and climate change. E-mail: baiwei915@163.com

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)