

短期氮添加对荒漠草原土壤微生物特征的影响

宋珂辰¹, 王星¹, 许冬梅^{1,2}, 李永康¹, 撒春宁¹, 马霜¹

(1.宁夏大学农学院, 银川 750021; 2.宁夏大学西北土地退化与生态恢复国家重点实验室培育基地, 银川 750021)

摘要: 为探究荒漠草原土壤微生物特征对短期氮添加的响应, 以宁夏荒漠草原为对象, 参照国内外同类研究和当地的氮沉降量, 设置 N0、N1、N2、N3、N4 的 5 个处理, 其纯氮添加量分别为 0、2.5、5、10、15 g/(m² · a), 以尿素为氮源进行为期 2 年的氮添加试验, 对不同氮添加处理下荒漠草原浅层土壤微生物特征进行了研究。结果表明: (1) 随氮添加量的增加, 荒漠草原 0—20 cm 土层土壤铵态氮含量呈升高的变化趋势, 硝态氮含量呈先升高后下降的变化趋势。在 0—10 cm 土层, N1、N2、N3、N4 处理草地铵态氮含量较 N0 处理分别增加了 109.61%、136.52%、197.19%、198.88%, 硝态氮含量以 N2 处理草地最高, 显著高于 N0、N3、N4 处理 ($P < 0.05$)。 (2) 与 N0 相比, 施氮后 0—10 cm 土层土壤微生物量氮含量显著下降, N1、N2、N3 和 N4 处理分别较 N0 处理降低了 37.54%、38.11%、28.56%、29.81%。 (3) 随氮添加量的增加, 荒漠草原 0—10 cm 土层土壤真菌数量呈逐渐减少的变化趋势, N0、N1 处理草地显著大于 N3、N4 处理草地 ($P < 0.05$)。PcoA 分析显示高氮添加处理 (N3、N4) 对荒漠草原土壤 amoA 区、nirK 区微生物的群落结构有显著改变。高氮添加 (N3、N4) 会对荒漠草原土壤微生物群落产生负面影响, 具体表现为真菌数量减少, 硝态氮含量降低, 氮转化微生物的 α 多样性和优势菌丰度降低, 群落结构发生显著改变。

关键词: 氮添加; 荒漠草原; 酶活性; 微生物特征; 氮转化微生物

中图分类号: S154.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-2242(2022)03-0303-08

DOI: 10.13870/j.cnki.stbcbx.2022.03.043

Effects of Short-term Nitrogen Addition on Soil Biological Properties in Desert Steppe

SONG Kechen¹, WANG Xing¹, XU Dongmei^{1,2}, LI Yongkang¹, SA Chunling¹, MA Shuang¹

(1. Agricultural School of Ningxia University, Yinchuan 750021; 2. State Key Laboratory

Breeding Base of Land Degradation and Ecological Restoration of Northwest China, Yinchuan 750021)

Abstract: Desert steppe belongs to the arid type of grassland, with low nutrient content, fragile ecological environment and sensitive response to disturbance. The gradual increase of global nitrogen deposition changed the process of carbon and nitrogen transformation in the ecosystem and affected soil properties. In order to explore the effects of nitrogen addition on biological properties of soil in desert steppe, we took the desert steppe in Yanchi County as the research object and set up 5 nitrogen treatments as N0, N1, N2, N3 and N4. These treatments were set based on the pure nitrogen addition levels of 0, 2.5, 5, 10 and 15 g/(m² · a), by applying with urea as nitrogen source. Results showed that: (1) The NH₄⁺ - N content in 0—20 cm soil layer of desert steppe increased with the increase of nitrogen application rate, while the NO₃⁻ - N content increased firstly and then decreased. In 0—10 cm soil layer, compared with N0, the NH₄⁺ - N contents under N1, N2, N3 and N4 treatments were increased by 109.61%, 136.52%, 197.19% and 198.88%, respectively. The NO₃⁻ - N content was the highest in N2 treatment, which was significantly higher than those in N0, N3 and N4 treatments ($P < 0.05$). (2) Compared with N0, the MBN contents in 0—10 cm soil layer were significantly decreased by N1, N2, N3 and N4 treatments, which were reduced by 37.54%, 38.11%, 28.56% and 29.81%, respectively. (3) With the increase of nitrogen addition, the number of fungi in 0—10 cm soil layer of desert steppe gradually decreased, among treatments, the N0 and N1 were significantly higher than N3 and N4 ($P < 0.05$). PCoA analysis showed that the microbial community structure in amoA and nirK zones of desert steppe soil were significantly changed by high nitrogen addition. Based on this

收稿日期: 2021-10-27

资助项目: 宁夏自治区重点研发计划一般项目(2018BEG03007); 宁夏高等学校一流学科建设(草学学科)项目(NXYLXK2017A01)

第一作者: 宋珂辰(1997—), 女, 硕士, 主要从事草地生态、资源与环境研究。E-mail: 457975218@qq.com

通信作者: 许冬梅(1970—), 女, 博士, 教授, 主要从事草地生态研究。E-mail: nxxudongmei@163.com

research, the high nitrogen addition (N3, N4) had negative effects on soil microbial community in desert steppe, which were as follows: the number of fungi decreased, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ content decreased, α diversity and dominant bacteria abundance of nitrogen-transforming microorganisms decreased, and the microbial community structure of nitrogen-transforming changed significantly.

Keywords: nitrogen addition; desert steppe; enzyme activity; microbial characteristics; nitrogen transforming microorganism

土壤是一切陆地植物赖以生存的基础,也是陆地生态系统中最大的氮沉降承受者。在过去的一个世纪里,由于工业和农业的快速发展,全球氮沉降量增加了 3~5 倍^[1]。已有研究^[2]表明,短期或少量 N 沉降在一定程度上可缓解植物生长所受的 N 限制,但持续的外源氮输入会造成土壤养分流失,微生物群落结构改变和多样性的丧失的严重后果。土壤微生物具有生命周期短,生存环境敏感的特点,它们驱动土壤养分循环,并对土壤环境变化迅速做出反应,最终发生结构组成上的改变^[3]。王志瑞等^[4]、Zhao 等^[5]认为,长期氮添加会降低土壤微生物生物量,但短期氮添加对土壤微生物生物量的影响至今仍没有一致的结论;Zhang 等^[6]综合分析了来自全球的 151 项研究结果认为,氮添加降低了总微生物生物量、细菌生物量、真菌生物量、生物量碳和微生物呼吸,且这些负面效应随着氮的施用速率和试验时间的延长而增加。

土壤微生物驱动的氮素转化过程主要包括生物固氮和氨化、硝化、反硝化作用,固氮菌相关基因 *nifH*、氨氧化古菌基因 *amoA*—AOA、氨氧化细菌基因 *amoA*—AOB 和反硝化相关基因 *nirK* 被广泛应用于氮转化微生物的研究^[7]。Shi 等^[8]研究发现,连续施氮 6 年后,中国亚热带森林土壤中 AOA 丰度显著增加,且施氮对 AOA 驱动的自养硝化存在潜在的促进作用。在内蒙古贝加尔针茅草原,低氮添加显著增加了 *nirK* 的相对丰度,高氮添加显著抑制了 *nirK* 的相对丰度^[9]。与以上研究结果不同,Zhang 等^[6]分析了大量氮添加对土壤微生物影响的资料认为,氮添加对陆地生态系统中所有土壤微生物的生长、组成和功能均具有一定程度的负面影响,且随着氮沉降速率和持续时间的增加,影响愈发显著,结构方程模型表明,施氮对土壤微生物数量和组成的负面影响可能导致土壤微生物呼吸的减弱。在相关机制的研究方面,薛璟花等^[10]认为,过量氮沉降会减少土壤微生物量、真菌生物量和真菌/细菌生物量比率,改变土壤 pH,进而导致微生物群落结构发生改变。土壤呼吸率、土壤酶活性的减少和微生物对底物的利用模式的改变也会导致微生物功能的改变。总体来说,氮添加对土壤微生物的影响和驱动因素存在很大不确定性,需要更多的研究验证和发现。

荒漠草原占宁夏天然草地面积半数以上,是典型的干旱生态系统,也是防风固沙、保持水土的重要生态屏障。目前,有关氮添加对荒漠草原土壤影响的研究主要集中在土壤结构及理化性质的方面^[11],有关土壤微生物特征的研究还相对较少。为探究荒漠草原土壤微生物特征对短期氮添加的响应,本研究对不同氮添加量下荒漠草原土壤氨硝态氮含量、微生物数量进行了测定,对 *amoA*—AOA、*nirK* 基因进行了测序分析,并结合土壤环境因子的变化,探讨荒漠草原土壤微生物特征对短期氮添加的响应,以期为荒漠草原生态系统的保护和科学管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于宁夏东部的盐池县四墩子行政村($37^{\circ}04' - 38^{\circ}10' \text{N}$, $106^{\circ}30' - 107^{\circ}41' \text{E}$),海拔 1 430 m,地势为缓坡丘陵,土壤类型为灰钙土、淡灰钙土,土壤质地以沙壤、粉沙壤为主,属中温带大陆性气候、干旱、少雨、多风,昼夜温差大。年平均气温 9.1°C ,最热月(7 月)平均气温 23.9°C ;当年降水量 205.2 mm,较历年平均雨量偏少 77.1 mm;年均无霜期 180 天,年均蒸发量 1 231.5 mm,年均日照时间 2 769 h。草地类型为荒漠草原,主要物种有草木樨状黄芪(*Astragalus melilotoides*)、华北白前(*Cynanchum komarovii*)、牛枝子(*Lespedeza potaninii*)等。

1.2 试验设计

选取较为平坦的荒漠草原为研究对象,于 2018 年 5 月开始进行氮添加处理,参照国内外同类研究^[12]和当地的氮沉降量设 5 个施氮梯度,即 N_0 、 N_1 、 N_2 、 N_3 、 N_4 ,其纯氮添加量分别为 0、2.5、5、10、15 $\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{a})$,使用尿素($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)作为 N 源,将每个小区每次所需喷施的尿素溶解于等量水中,每月 1 次,分 5 次均匀喷洒在各小区内。按照处理水平的要求,对照小区(N_0)喷洒相同量的水。试验采用随机区组设计,每个梯度重复 3 次,总计 15 个小区,每小区面积 $5 \text{ m} \times 4 \text{ m}$,氮添加后各处理的土壤理化性质见表 1。

1.3 植被调查与样品采集

2020 年 7 月,在每个小区内随机选取 3 个取样点,用灭过菌的铲子分 0—10、10—20 cm 采集土壤样品,去除杂物及植物残体等,将同层的 3 个样品混合均匀,迅

速装入灭菌袋中带回实验室。一部分用液氮冷冻后进行测序分析;另一部分置于 4 ℃ 冰箱中保存,用于土壤生物学指标的测定;部分风干后过 2 mm 筛,用于土壤 pH 及养分指标测定。同时,用环刀分层采集土壤样品,用于土壤容重和含水率的测定。

2020 年 8 月,在每个小区随机设置 1 个 1 m×1 m 的样方,调查植物群落物种组成,分种测定各个物种的生物量。其中,地上生物量以 1 m² 样方中各物种的风干重量计测,根系生物量采用根钻法测定。

1.4 测定指标与方法

土壤理化性质的测定参照《土壤农化分析》^[13],土壤容重(BD)采用环刀法测定;土壤 pH 采用酸度计测定(土水比为 1 : 5)。土壤有机碳(SOC)采用 Elemental rapid CS cube 元素分析仪(德国 Elementar 公司)测定;土壤全氮(STN)采用 KjeltecTM 8400 全自动凯氏定氮仪(瑞典 Foss 公司)测定。土

壤微生物量碳(MBC)和土壤微生物量氮(MBN)均采用氯仿熏蒸浸提法,MBC 采用 TOC—VCPH 总有机碳分析仪(日本岛津公司)测定,MBN 采用 Auto Analyzer 3—AA3 流动分析仪测定(德国 Seal 公司);土壤铵态氮(NH₄⁺—N)和硝态氮(NO₃⁻—N)均采用 1mol/L 的氯化钾浸提,Auto Analyzer 3—AA3 流动分析仪测定。

土壤微生物数量采用平板涂抹培养计数法测定,以牛肉膏蛋白胨培养基培养细菌,马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)培养真菌,改良的高氏一号放线菌培养基培养放线菌。土壤氮转化微生物采用 DNA 测序方法测定。由上海天昊生物科技有限公司对样本进行 DNA 提取和质量检测(Nanodrop+琼脂糖电泳)、PCR 扩增、文库构建和上机测序(Illumina 2×250 bp)。土壤固氮基因(nifH)、氨氧化古菌基因(amoA)和反硝化细菌基因(nirk)的定量扩增引物见表 2。

表 1 不同氮添加处理下的土壤理化性质

处理	地上生物量/ (g·m ⁻²)	根系生物量/ (g·m ⁻²)	pH	容重/ (g·m ⁻³)	有机碳/ (g·kg ⁻¹)	全氮/ (g·kg ⁻¹)
N0	54.77±4.96b	134.37±12.03b	8.38±0.13b	1.34±0.11a	9.28±0.39a	0.69±0.04a
N1	55.44±4.75b	148.30±4.42ab	8.46±0.04ab	1.31±0.09a	10.54±1.19a	0.65±0.03a
N2	68.21±4.02a	175.60±12.95a	8.48±0.03ab	1.27±0.13a	8.26±0.41a	0.66±0.07a
N3	67.03±8.95a	151.96±10.67ab	8.52±0.02a	1.35±0.07a	10.60±0.16a	0.75±0.06a
N4	53.42±6.82b	129.42±6.90b	8.56±0.04a	1.43±0.10a	9.15±0.54a	0.62±0.03a

注:表中数据均为平均值±标准差;同列不同小写字母表示不同施氮处理间差异显著(P<0.05)。下同。

表 2 定量 PCR 扩增引物

基因	引物	引物序列(5' to 3')	功能	质控
nifH	polyF	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	N ₂ —NH ₃	不符合
	polyR	ATSGCCATCATYTCRCCGGA		
nirk	nirKCopper583F	TCATGGTGCTGCCGCGYGANGG	NO ₂ —NO	符合
	nirKCopper909R	GAACCTTGCCGGTKGCCAGAC		
AOA—amoA	Arch—amoA26F	GACTACATMTTCTAYACWGAYTGGGC	NH ₃ —NH ₂ OH	符合
	Arch—amoA417R	GGKGTCA TRTATGGWGGYAA YGTTGG		

注:因荒漠草原土壤中 nifH 基因含量太少不足以建库测序,故放弃 nifH 基因相关的后续试验。

1.5 数据统计与分析

采用 Excel 2010 软件对数据进行基础处理,SPSS 23 软件进行数据的统计分析,Origin 2018 和 R 软件进行制图;采用 one—way ANOVA 和 Duncan 法进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 氮添加对土壤微生物量碳、氮的影响

0—10 cm 土层,MBC 含量以 N2 处理草地最高,为 180.17 mg/kg,N3 处理草地最低,为 142.01 mg/kg。氮添加显著降低了荒漠草原土壤 MBN 含量(P<0.05),与 N0 相比,N1、N2、N3 和 N4 处理草地土壤 MBN 含量分别降低了 37.54%,38.11%,28.56%,

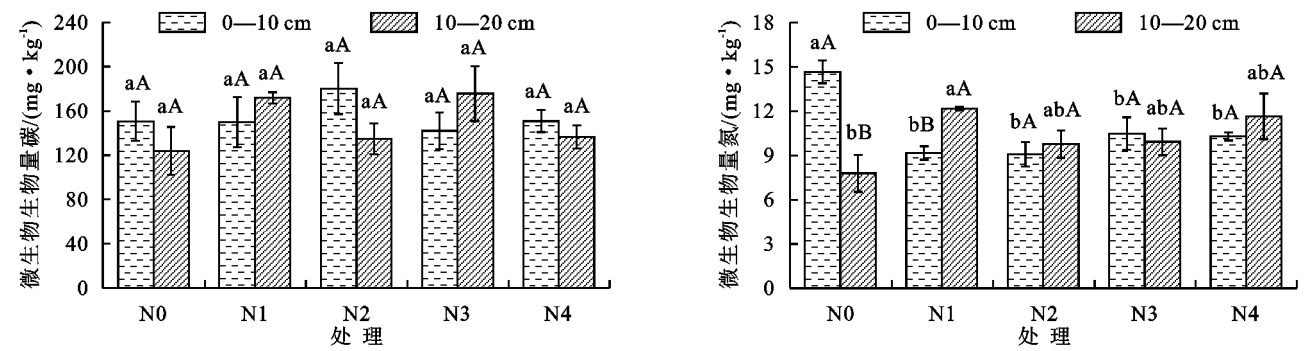
29.81%,但各处理草地间差异不显著(P>0.05)。10—20 cm 土层,MBC 含量以 N3 处理草地最高,为 175.59 mg/kg,N0 处理草地最低,为 124.00 mg/kg(图 1)。土壤 MBN 随氮添加量的增加呈波动性变化,N1 处理草地的 12.17 mg/kg 显著高于 N0 处理草地的 7.81 mg/kg(P<0.05)。这说明氮添加主要对 0—10 cm 土层土壤微生物生物量产生影响,且土壤 MBN 对氮添加的敏感程度高于 MBC。

2.2 氮添加对土壤微生物数量的影响

由表 3 可知,荒漠草原土壤微生物以细菌为主,约占微生物总量的 68.86%~81.59%;其次为放线菌,约占微生物总量的 17.42%~31.01%;真菌占微

生物总量的比例最小,仅为 0.05%~0.16%。氮添加显著抑制了荒漠草原 0—10 cm 土层土壤真菌、细菌的生长,但对放线菌的影响未达到差异显著性水平。0—10 cm 土层,随氮添加量的增加,荒漠草原土壤真菌数量的变化范围为 $17.70 \times 10^2 \sim 58.30 \times 10^2$ cfu/g,呈逐渐下降趋势,N0、N1 处理草地显著大于 N3、

N4 处理草地 ($P < 0.05$);细菌数量的变化范围为 $17.70 \times 10^2 \sim 35.70 \times 10^2$ cfu/g,N0 处理显著大于 N3 处理 ($P < 0.05$)。放线菌数量的变化范围为 $59.00 \times 10^4 \sim 94.00 \times 10^4$ cfu/g。10—20 cm 土层,不同氮添加处理对荒漠草原土壤真菌、细菌、放线菌数量均无显著影响 ($P > 0.05$)。



注:图柱上方不同小写字母表示相同土层不同施氮处理间差异显著 ($P < 0.05$);不同大写字母表示同处理不同土层间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图 1 氮添加对荒漠草原土壤微生物量碳、氮的影响

表 3 氮添加对荒漠草原土壤真菌、细菌、放线菌数量及其占微生物总量的影响

处理	土层 深度/cm	真菌数量/ ($\times 10^2$ cfu $\cdot$ g $^{-1}$)	细菌数量/ ($\times 10^5$ cfu $\cdot$ g $^{-1}$)	放线菌数量/ ($\times 10^4$ cf $\cdot$ g $^{-1}$)	真菌 占比/%	细菌 占比/%	放线菌 占比/%
N0	0—10	58.33 $\pm$ 10.87aA	35.67 $\pm$ 5.97aA	94.00 $\pm$ 15.33aA	0.14 $\pm$ 0.03aA	77.59 $\pm$ 3.91aA	22.26 $\pm$ 3.86aA
	10—20	38.00 $\pm$ 16.39aA	37.00 $\pm$ 5.35aA	70.33 $\pm$ 18.38aA	0.09 $\pm$ 0.02aA	82.49 $\pm$ 6.10aA	17.42 $\pm$ 6.10aA
N1	0—10	54.17 $\pm$ 15.29aA	30.67 $\pm$ 4.72abA	62.67 $\pm$ 12.44aA	0.14 $\pm$ 0.01aA	81.59 $\pm$ 5.14aA	18.27 $\pm$ 5.17aA
	10—20	23.33 $\pm$ 5.31aA	21.33 $\pm$ 7.37aA	82.00 $\pm$ 24.91aA	0.10 $\pm$ 0.03aA	68.86 $\pm$ 6.84aA	31.01 $\pm$ 6.82aA
N2	0—10	30.67 $\pm$ 18.73abA	20.00 $\pm$ 2.05abA	76.67 $\pm$ 9.89aA	0.11 $\pm$ 0.04aA	71.71 $\pm$ 4.40aA	28.17 $\pm$ 4.37aA
	10—20	27.00 $\pm$ 13.44aA	21.33 $\pm$ 3.03aA	67.17 $\pm$ 21.77aA	0.10 $\pm$ 0.02aA	77.12 $\pm$ 4.40aA	22.79 $\pm$ 4.23aA
N3	0—10	17.67 $\pm$ 1.25bA	17.67 $\pm$ 2.60bA	70.00 $\pm$ 19.22aA	0.08 $\pm$ 0.01aA	73.13 $\pm$ 5.61aA	26.80 $\pm$ 5.62aA
	10—20	17.33 $\pm$ 4.19aA	26.17 $\pm$ 2.45aA	69.33 $\pm$ 3.34aA	0.05 $\pm$ 0.01aA	78.83 $\pm$ 0.72aA	21.12 $\pm$ 0.72aA
N4	0—10	23.67 $\pm$ 7.59bA	23.67 $\pm$ 3.21abA	59.00 $\pm$ 6.02aA	0.08 $\pm$ 0.01aA	79.54 $\pm$ 1.73aA	20.38 $\pm$ 1.74aA
	10—20	22.00 $\pm$ 4.55aA	35.00 $\pm$ 4.32aA	72.67 $\pm$ 8.24aA	0.06 $\pm$ 0.01aA	82.23 $\pm$ 2.42aA	17.72 $\pm$ 2.41aA

注:同列不同小写字母表示相同土层不同施氮处理间差异显著 ($P < 0.05$);不同大写字母表示同处理不同土层间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

2.3 氮添加对土壤氮转化微生物的影响

2.3.1 氮添加对土壤铵态氮、硝态氮的影响 由表 4 可知,氮添加增加了荒漠草原土壤 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量,在 0—10 cm 土层,与 N0 相比,N1、N2、N3、N4 处理草地土壤的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量分别增加了 109.61%,136.52%,197.19%和 198.88%;10—20 cm 土层, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量增长较缓,N1、N2、N3、N4 处理草地分别增加了 4.71%,34.90%,96.47%和 92.55%。从剖面变化看,N0 处理草地 10—20 cm 土层 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量显著高于 0—10 cm 土层 ($P < 0.05$),其他氮添加处理草地均以 0—10 cm 土层最高,但与 10—20 cm 土层之间差异不显著。 $\text{NH}_4^+ - \text{N}/\text{STN}$ 的变化趋势与 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量的变化趋势基本一致,在 0—20 cm 土层土壤中均以 N4 处理草地最高,显著高于 N0 和 N1 处理草地,N3 处理草地显著高于 N0 处理草地 ($P < 0.05$)。各处理草地 0—10 cm 土层土壤 $\text{NH}_4^+ - \text{N}/\text{STN}$ 总体高于 10—20 cm 土

层,其间差异不显著 ($P > 0.05$)。

随氮添加量的增加,荒漠草原 0—10 cm 土层土壤 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量呈先上升后下降的变化趋势,变化范围为 7.15~13.61 mg/kg,以 N2 处理草地最高,显著高于 N0、N3、N4 处理草地; $\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{STN}$ 为 1.23%~2.22%,N1 处理草地显著高于 N0、N3 处理草地 ($P < 0.05$)。10—20 cm 土层土壤 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量为 3.59~7.47 mg/kg; $\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{STN}$ 变化范围为 0.43%~1.13%,N1 处理草地显著高于 N0 处理草地 ($P < 0.05$)。各氮添加处理草地中,土壤 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量和 $\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{STN}$ 均表现为 0—10 cm 土层高于 10—20 cm 土层。荒漠草原土壤 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 主要分布在 0—10 cm 土层,且在低氮添加条件(N1、N2)下含量最高。

2.3.2 氮添加对荒漠草原土壤氮转化微生物丰度的影响 对不同氮添加水平下荒漠草原 0—20 cm 土层土壤的 amoA 区微生物进行高通量测序,共获得 1 151 411

条高质量序列,每个样品的序列数为 39 653~108 247 条。供试土壤样品中共检测到 2 个古菌门,每个古菌门下均检测到 1 个古菌种,其中,泉古菌门的泉古菌(*Uncultured crenarchaeote*)为优势菌,相对丰度占监测基因总数的99.93%以上。奇古菌门的奇古菌(*Uncultured thaumarchaeote*)含量极低,占 0.05%左右(表 5)。

表 4 氮添加对荒漠草原土壤氨态氮、硝态氮的影响

处理	土层深度/cm	铵态氮含量/(mg·kg ⁻¹)	硝态氮含量/(mg·kg ⁻¹)	铵态氮占比/%	硝态氮占比/%
N0	0—10	0.59±0.03bB	7.15±1.76bA	0.11±0.01cA	1.30±0.18bA
	10—20	0.85±0.08bA	3.59±1.11aA	0.10±0.01cA	0.43±0.12bB
N1	0—10	1.24±0.22abA	11.67±1.45abA	0.19±0.03bcA	1.78±0.12abA
	10—20	0.89±0.14bA	7.47±2.19aA	0.13±0.01bcA	1.13±0.27aA
N2	0—10	1.40±0.24aA	13.61±1.55aA	0.22±0.01abA	2.22±0.13aA
	10—20	1.15±0.17abA	5.18±0.63aB	0.16±0.01abA	0.78±0.11abB
N3	0—10	1.76±0.15aA	8.12±0.98bA	0.27±0.04abA	1.23±0.16bA
	10—20	1.67±0.20aA	5.13±0.62aA	0.21±0.02abA	0.63±0.08abA
N4	0—10	1.77±0.22aA	8.70±1.12bA	0.32±0.01aA	1.63±0.28abA
	10—20	1.64±0.24aA	5.88±0.56aA	0.24±0.03aA	0.87±0.08abB

表 5 不同氮添加处理下荒漠草原土壤 amoA 基因丰度变化

分类单位		名称	N0	N1	N2	N3	N4
门		Crenarchaeota	99.93	99.95	99.95	99.96	99.95
		Thaumarchaeota	0.07	0.05	0.05	0.04	0.05
种		<i>Uncultured crenarchaeote</i>	99.93	99.95	99.95	99.96	99.95
		<i>Uncultured thaumarchaeote</i>	0.07	0.05	0.05	0.04	0.05

对不同氮添加水平下,荒漠草原 0—20 cm 土层土壤的 nirK 区微生物进行高通量测序,分别从科、属、种 3 个层次对其丰度进行分析发现,供试土壤中共检测出 8 个细菌科,11 个细菌属,25 个细菌种。在检测到的所有细菌中,不同氮添加处理下相对丰度均大于1%的细菌有 3 种(表 6),分别为根瘤菌科、大豆根瘤菌属中的中华根瘤菌(*Bradyrhizobium sinorhizobium* sp. NP1),相对丰度为 78.21%~93.01%,慢生根瘤菌科、大豆根瘤菌属中的大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium bradyrhizobium* sp. GSM 471),相对丰度为2.02%~16.39%,产碱杆菌科、无色杆菌属中的无色杆菌(*Achromobacter cycloclastes*),相对丰度为 2.35%~5.26%。对占优势的中华根瘤菌的相对丰度比较发现,随氮添加量的增加,中华根瘤菌的丰度总体呈下降趋势,但不同处理之间差异不显著($P>0.05$)。

表 6 科、属、种水平上的 nirK 区微生物丰度

分类单位	名称	相对丰度/%				
		N0	N1	N2	N3	N4
科	Rhizobiaceae	94.18	91.06	93.91	78.41	86.47
	Bradyrhizobiaceae	2.98	2.85	3.03	17.02	9.45
	Alcaligenaceae	2.35	5.26	2.64	4.11	3.48
属	<i>Sinorhizobium</i>	93.79	90.95	93.85	78.21	85.63
	<i>Bradyrhizobium</i>	2.98	2.85	3.03	17.02	9.45
	<i>Achromobacter</i>	2.35	5.26	2.64	4.11	3.48
	<i>Bradyrhizobium</i> sp. GSM 471	2.28	2.34	2.02	16.39	7.93
种	<i>Sinorhizobium</i> sp. NP1	92.95	89.87	93.01	78.21	85.48
	<i>Sinorhizobium</i> sp. R 31816	0.84	1.09	0.84	0	0.15
	<i>Achromobacter cycloclastes</i>	2.35	5.26	2.64	4.11	3.48

2.3.3 氮添加对荒漠草原土壤氮转化微生物 α 多样性的影响 Shannon、Simpson、Chao1、ACE 均为反映土壤微生物 α 多样性的指数。由图 2 可知,随氮添加量的增加,荒漠草原土壤 amoA 区基因微生物的 Shannon、Chao1 指数总体呈下降趋势;Simpson 指数和 ACE 指数波动性变化。由图 3 可知,nirK 区基因微生物的 Shannon、Chao1、ACE、指数总体呈上升趋势,Simpson 指数呈下降趋势。但 amoA 区和 nirK

区基因微生物的 α 多样性指数在不同处理草地之间均无显著差异($P>0.05$)。

2.3.4 氮添加对荒漠草原土壤氮转化微生物 β 多样性的影响 不同氮添加量处理下 amoA 区和 nirK 区(图 4)微生物 OTUs 相对丰度的 PCoA 分析结果显示,前 2 个主成分对 amoA 区微生物群落变异的贡献

率分别为 74.02%和 24.50%,累计贡献率 98.52%。高氮添加处理(N4)主要位于 PC1 右侧,而对照(N0)与低、中氮添加处理(N1、N2 和 N3)主要位于 PC1 左侧,并与高氮添加处理(N4)有显著差异,说明高氮添加下的荒漠草原土壤 amoA 区微生物群落组成发生了明显的变化。

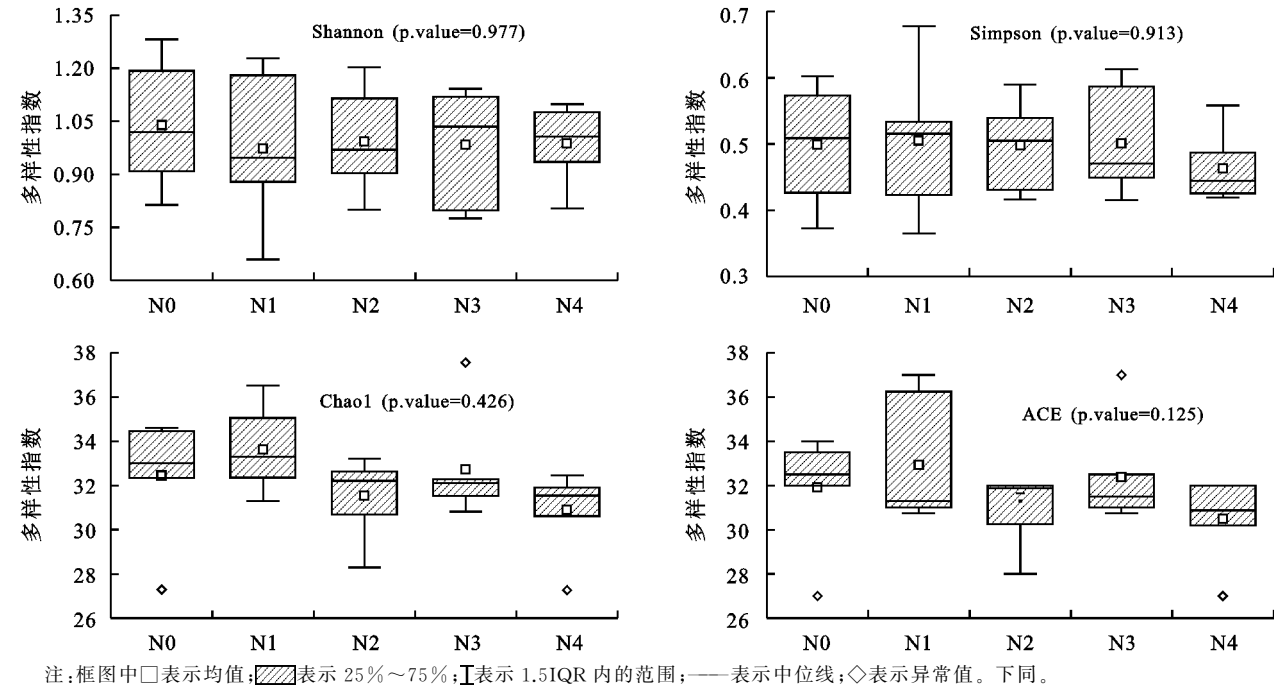


图 2 氮添加对荒漠草原土壤 amoA 区基因微生物多样性指数的影响

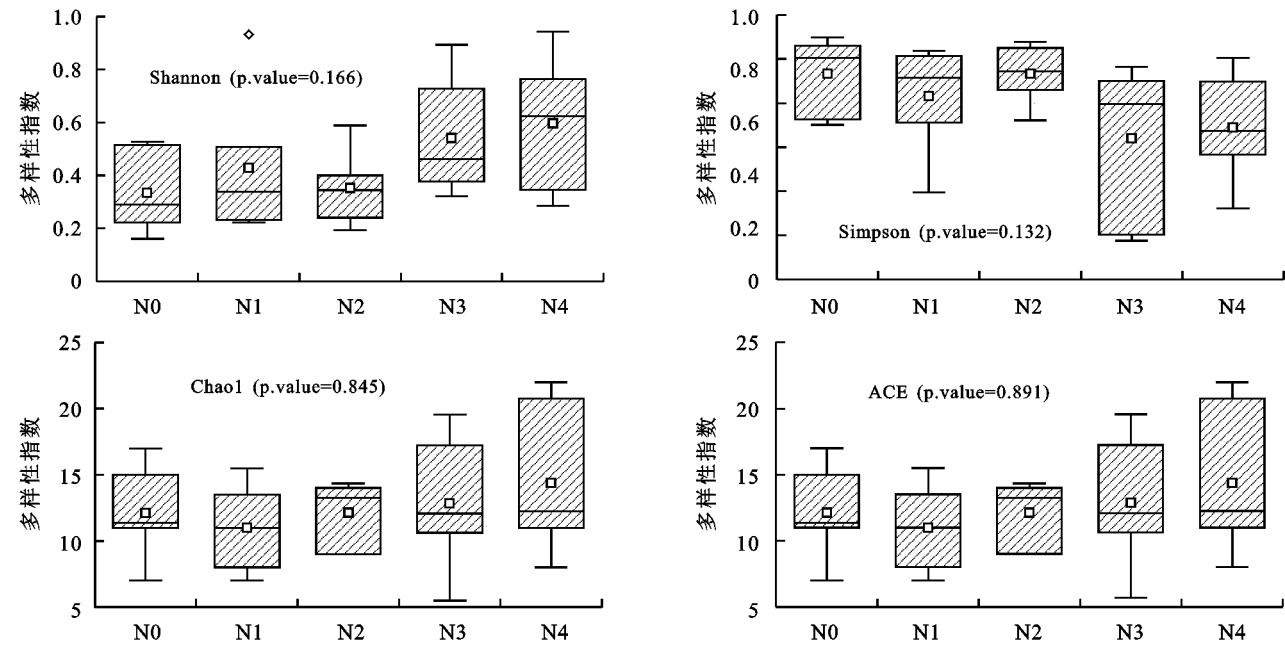


图 3 氮添加对荒漠草原土壤 nirK 区基因微生物多样性指数的影响

前 2 个主成分对 nirK 区微生物群落变异的贡献率分别为 76.89%和 14.27%(图 4)。其中,N3、N4 处理分布于 PC1 两侧,N0、N1、N2 处理全部位于 PC1 左侧,且重合区域较多,说明 N0、N1 和 N2 处理草地的丰度组成相似,高氮添加处理(N3、N4)对荒漠草原土壤 nirK 区微生物群落产生了较为显著的影响。

2.4 土壤微生物特征与土壤环境因子的相关关系 由表 7 可知,土壤 NH_4^+-N 含量与土壤 pH、amoA—AOA 优势菌丰度呈极显著正相关关系;与 nirK 优势菌丰度呈极显著负相关关系($P<0.01$),与真菌数量(FM)呈显著负相关关系($P<0.05$)。土壤 amoA—AOA 优势菌丰度与 nirK 优势菌丰度呈极

显著负相关关系($P<0.01$),与细菌数量(BM)呈显著负相关关系($P<0.05$)。土壤 pH 与 amoA—AOA 优势菌丰度呈极显著正相关关系($P<0.01$),与 nirK 优势菌丰度和 FM 呈显著负相关关系($P<0.05$)。

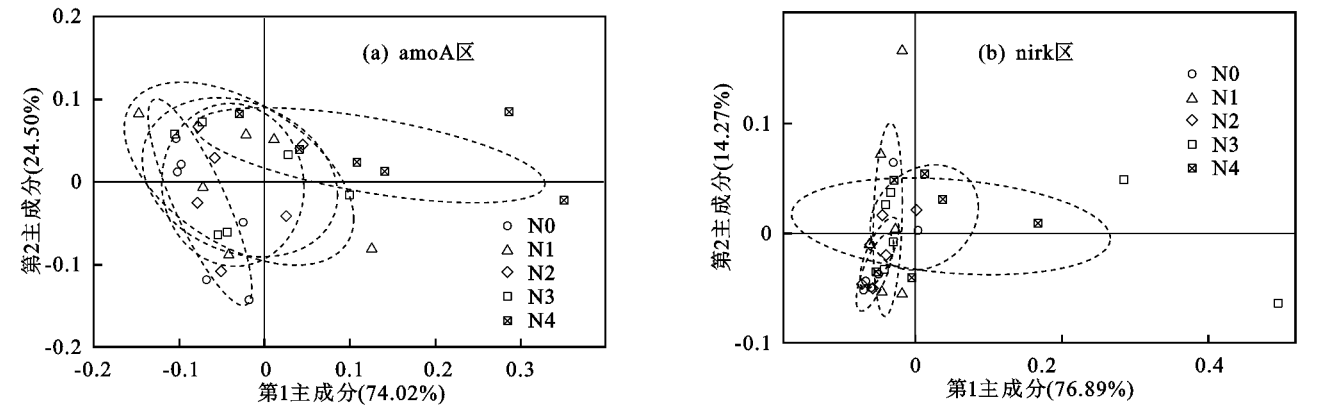


图 4 不同氮添处理荒漠草原 amoA 区和 nirK 区微生物丰度的 PCoA 图

表 7 土壤微生物特征与土壤环境因子的相关关系

指标	FM	BM	AM	MBC	MBN	AN	NN	SBD	pH	amoA	nirK
FM	1.00										
BM	0.28	1.00									
AM	-0.06	0.07	1.00								
MBC	-0.24	-0.25	0.02	1.00							
MBN	0.34	-0.05	0.07	0.09	1.00						
AN	-0.38 *	-0.20	-0.34	0.17	-0.24	1.00					
NN	0.05	-0.30	-0.20	0.36	-0.04	0.13	1.00				
SBD	0.17	0.06	-0.03	-0.25	0.20	0.16	0.08	1.00			
pH	-0.40 *	0.12	-0.09	-0.11	-0.15	0.50 **	-0.21	-0.03	1.00		
amoA	-0.43 *	-0.38 *	-0.16	0.16	-0.18	0.63 ***	0.19	0.09	0.49 **	1.00	
nirK	0.42 *	0.19	0.11	0.03	0.07	-0.62 ***	0.12	-0.24	-0.40 *	-0.75 ***	1.00

注:FM、BM、AM、MBC、MBN、AN、NN、BD、amoA、nirK 分别为土壤真菌数量、土壤细菌数量、土壤放线菌数量、土壤微生物量碳含量、土壤微生物量氮含量、土壤铵态氮含量、土壤硝态氮含量、土壤容重、amoA—AOA 优势菌丰度、nirK 优势菌丰度。

3 讨论

3.1 氮添加对荒漠草原土壤微生物量碳、氮及微生物数量的影响

土壤微生物生物量指土壤微生物体内的碳、氮总和,是评价土壤生物学性状和养分状况的常用指标。本研究中,氮添加显著降低了 0—10 cm 土层土壤真菌数量和 MBN 含量,此结果与 Zhou 等^[14]的研究结果基本一致,真菌群落的生物量 C : N 显著高于细菌群落,而氮添加可能减少真菌群落生物量,进而降低土壤微生物量。土壤真菌数量的下降可能与土壤性质的改变和养分的不均衡分配相关^[15],细菌比真菌更适宜碱性土壤环境,氮添加导致土壤 pH 的增加对真菌的发育更为不利,本研究相关分析中,土壤真菌数量与 pH、铵态氮的负相关关系也证实了这一结论。但氮素不是影响土壤微生物生物量的唯一因子,当氮添加量增加时,过量的氮输入可能造成土壤氮饱和,使土壤微生物受到 pH、水分、SOC 等因子的制

说明影响 amoA—AOA 和 nirK 优势菌丰度的主要因素有土壤真菌数量、细菌数量、pH 和 NH₄⁺—N 含量,且土壤 pH、NH₄⁺—N 含量对土壤真菌数量有显著影响。

约,造成 MBC 含量不显著变化^[16]。从剖面变化上看,本研究 0—10,10—20 cm 土层 MBC、MBN 含量没有显著差异,但多数研究^[17]认为,表层土壤中含有更多的植物凋落物和有机质,可用于促进土壤微生物的生长,故无论添加氮素与否,0—10 cm 土层 MBC、MBN 含量都应高于 10—20 cm 土层,原因可能是荒漠草原植被稀疏,表层土壤风蚀严重、蒸发强烈,植物凋落物等输入表层土壤的有机质较少,加之土壤结构松散,保水保肥能力差,养分流失和水分蒸发的双重限制降低了荒漠草原土壤表层的微生物量。

3.2 氮添加对荒漠草原土壤氮转化微生物的影响

氮添加增加了土壤无机态氮含量,有利于微生物的生长^[18],同时会使土壤微生物数量下降、活性降低。尿素能够分解释放铵根离子,增加土壤中铵态氮含量,在微生物群落的驱动下发生硝化反应,有研究^[19]认为,氮添加会增加土壤中 NH₄⁺—N 和 NO₃⁻—N 含量,并促进土壤氨化和硝化作用。本研

究中随氮添加量的增加,荒漠草原土壤 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量逐渐增加,但 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量先增加后减少,此结果与上述研究结果部分相同,但存在一定差异。一是适宜浓度的氮添加可以补充受氮素限制生态系统中的氮素,但添加量的增加可能会使植物群落对无机氮的需求达到饱和,若受氮素限制的生态系统能够有效地固定外源氮素,并且植物有较强的吸收利用能力,则多数进入土壤的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 会被植物吸收而退出土壤生态系统^[20];二是植物会优先吸收土壤中的 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 作为生长发育所需的养分,从而降低土壤中 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的净剩余量;三是相较于带正电荷的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$,带负电荷的 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 更容易通过淋溶作用而损失^[21]。

氮添加会改变土壤固氮菌、硝化菌、反硝化菌的群落结构,并在分子水平上影响土壤细菌种群^[22]。PCoA 分析显示高氮添加处理(N3、N4)对荒漠草原土壤 amoA 区、nirK 区微生物的群落结构均有显著改变。其原因因为荒漠草原气候干旱、土壤贫瘠,微生物活性较低,而氮添加增加了土壤中的有效氮含量及土壤碳氮比,改变了氨化、硝化作用的有机底物,促进了 amoA 丰度和 nirK 多样性的增加^[23];高氮添加具有的毒害作用对氮转化各环节及相关功能微生物产生了不同的影响,可能造成了 nirK 丰度和 amoA 物种多样性的降低,并改变了 amoA 和 nirK 的群落结构^[24]。

氮添加下土壤微生物特征的变化可能与土壤理化性状的变化相关。由氮添加下土壤 pH 与土壤 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量、amoA—AOA 优势菌丰度、nirK 优势菌丰度、真菌数量的显著相关关系推测,氮添加可以通过对土壤微生物群落的直接影响及土壤 pH 等环境因子的间接影响改变土壤氮转化过程,且氮添加导致的土壤 pH 变化可能是造成土壤微生物群落变化的主要因素之一^[25]。

4 结论

(1)氮添加显著增加了荒漠草原土壤的铵态氮含量,同时降低了 0—10 cm 土层土壤真菌数量和微生物量氮含量($P<0.05$)。

(2)与 N0 相比,低氮添加处理(N1、N2)的荒漠草原土壤含有较多的硝态氮和微生物量碳氮,氮转化微生物的优势菌丰度较高,且群落结构无明显改变,高氮添加处理(N3、N4)的荒漠草原土壤铵态氮含量较高,但氮转化微生物群落结构发生了显著改变。

参考文献:

[1] Lamarque J F. Assessing future nitrogen deposition and

carbon cycle feedback using a multimodel approach: Analysis of nitrogen deposition[J].Journal of Geophysical Research Atmospheres,2005,110(19):148-227.

[2] Vitousek P, Aber J, Howarth R, et al. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and Consequences[J].Ecological Applications,1997,7(3):737-750.

[3] Griffiths B S, Ritz K, Bardgett R D, et al. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation induced microbial diversity reductions: An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship[J].Oikos,2000,90(2):279-294.

[4] 王志瑞,杨山,马锐骛,等.内蒙古草甸草原土壤理化性质和微生物学特性对刈割与氮添加的响应[J].应用生态学报,2019,30(9):3010-3018.

[5] Zhao Q, Zeng D H. Nitrogen addition effects on tree growth and soil properties mediated by soil phosphorus availability and tree mediated by soil phosphorus availability and tree species identity[J].Forest Ecology and Management,2019,449:e117478.

[6] Zhang T A, Chen H Y H, Ruan H H. Global negative effects of nitrogen deposition on soil microbes[J].The ISME Journal,2018,12(7):1817-1825.

[7] Ke X B, Angel R, Lu Y H, et al. Niche differentiation of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers in rice paddy soil[J].Environmental Microbiology,2013,15(8):2275-2292.

[8] Shi X Z, Hu H W, Wang J Q, et al. Niche separation of comammox Nitrospira and canonical ammonia oxidizers in an acidic subtropical forest soil under long-term nitrogen deposition[J].Soil Biology and Biochemistry,2018,126:114-122.

[9] 刘红梅,张海芳,秦洁,等.模拟氮沉降对贝加尔针茅草原土壤氮转化微生物的影响[J].农业环境科学学报,2019,38(10):386-2394.

[10] 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.

[11] 贺佩,李悦,江明兢,等.连续氮添加 14 年对温带典型草原土壤碳氮组分及物理结构的影响[J].生态学报,2021,41(5):1808-1823.

[12] 顾峰雪,黄玫,张远东,等.1961—2010 年中国区域氮沉降时空格局模拟研究[J].生态学报,2016,36(12):3591-3600.

[13] 鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2000.

[14] Zhou Z H, Wang C K, Zheng M H, et al. Patterns and mechanisms of responses by soil microbial communities to nitrogen addition[J].Soil Biology and Biochemistry,2017,115:433-441.

[15] 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.

- trient availability and rhizosphere microbial modulation [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2018(3):517-532.
- [17] 张倩,刘冰洁,余璐,等.生物炭对滨海湿地盐碱土壤碳氮循环的影响[J].*自然资源学报*, 2019, 34(12):2529-2543.
- [18] Kim H S, Kim K R, Yang J E, et al. Effect of biochar on reclaimed tidal land soil properties and maize (*Zea mays* L.) response [J]. *Chemosphere*, 2016, 142:153-159.
- [19] Luo X X, Wang L Y, Liu G C, et al. Effects of biochar on carbon mineralization of coastal wetland soils in the Yellow River Delta, China [J]. *Ecological Engineering*, 2016, 94(1):329-336.
- [20] 田慎重,张玉凤,边文范,等.深松和秸秆还田对旋耕农田土壤有机碳活性组分的影响[J].*农业工程学报*, 2020, 36(2):185-192.
- [21] 王改玲,李立科,郝明德.长期施肥和秸秆覆盖土壤活性有机质及碳库管理指数变化[J].*植物营养与肥料学报*, 2017, 23(1):20-26.
- [22] 王朔林,杨艳菊,王改兰,等.长期施肥对栗褐土活性有机碳的影响[J].*生态学杂志*, 2015, 34(5):1223-1228.
- [23] 于建光,李辉信,陈小云,等.秸秆施用及蚯蚓活动对土壤活性有机碳的影响[J].*应用生态学报*, 2007, 18(4):818-824.
- [24] 于维水,王碧胜,王士超,等.长期不同施肥下我国 4 种典型土壤活性有机碳及碳库管理指数的变化特征[J].*中国土壤与肥料*, 2018(2):29-34.
- [25] Wu T Y, Schoenau J J, Li F M. Influence of cultivation and fertilization on total organic carbon and carbon fractions in soils from the Loess Plateau of China [J]. *Soil and Tillage Research*, 2003, 7(1):59-68.
- [26] Tedeschi A, Auila R D. Effects of irrigation with saline waters, at different concentrations, on soil physical and chemical characteristics [J]. *Agricultural Water Management*, 2004, 77(1):308-322.
- [27] Yu J B, Wang Z C, Meixner F X, et al. Biogeochemical characterizations and reclamation Strategies of saline sodic soil in northeastern China [J]. *Clean-Soil Air Water*, 2010, 38(11):1010-1016.
- [28] 田一良,刘艳升,张海兵.盐碱地改良与腐植酸应用技术探讨[J].*腐植酸*, 2018(3):42-46.
- [29] 史雅静,徐明,王振宇,等.蚯蚓对菇渣中纤维素和木质素生物转化的研究[J].*环境科学学报*, 2020, 40(5):1779-1785.
- [30] Yang L, Bian X G, Yang R P, et al. Assessment of organic amendments for improving coastal saline soil [J]. *Land Degradation and Development*, 2018, 29(9):3204-3211.
- [31] 丁阔,王雪梅,陈波浪,等.施用黑炭和羊粪对库尔勒香梨园土壤理化性质与产量的影响[J].*农业资源与环境学报*, 2015, 32(5):449-455.
- [32] 闵星星,马玉寿,李世雄,等.羊粪对青海草地早熟禾草地生产力和土壤养分的影响[J].*草业科学*, 2014, 31(6):1039-1044.
- [33] 刘威,耿明建,秦自果,等.种植绿肥与稻秸协同还田对单季稻田土壤有机碳库和酶活性的影响[J].*农业工程学报*, 2020, 36(7):125-133.
- [34] 邓欧平,李翰,熊雷,等.秸秆、猪粪混施对麦田根际土壤过氧化氢酶与蔗糖酶活性的影响[J].*土壤*, 2018, 50(1):93-99.
- [35] 高婧,杨劲松,姚荣江,等.不同改良剂对滨海重度盐渍土质量和肥料利用效率的影响[J].*土壤*, 2019, 51(3):524-529.

(上接第 310 页)

- [16] 王丽娜,罗久富,杨梅香,等.氮添加对退化高寒草地土壤微生物量碳氮的影响[J].*草业学报*, 2019, 28(7):38-48.
- [17] 李素新,覃志杰,刘泰瑞,等.模拟氮沉降对华北落叶松人工林土壤微生物碳和微生物氮的动态影响[J].*水土保持学报*, 2020, 34(1):268-274.
- [18] 刘红梅,张爱林,皇甫超河,等.氮沉降增加对贝加尔针茅草原土壤微生物群落结构的影响[J].*生态环境学报*, 2017, 26(7):1100-1106.
- [19] 陈向峰,刘娟,姜培坤,等.模拟氮沉降对毛竹林土壤生化特性和酶活性的影响[J].*水土保持学报*, 2020, 34(5):277-28.
- [20] Huang J Y, Xu Y X, Yu H L, et al. Soil prokaryotic community shows no response to two years of simulated nitrogen deposition in an arid ecosystem in northwestern China [J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 23(2):1222-1237.
- [21] 廖圣祥,任运涛,袁晓波,等.围封对黄土高原草地铵态氮和硝态氮的影响[J].*草业科学*, 2016, 33(6):1044-1053.
- [22] Jorquera M A, Martinez O A, Marileo L G, et al. Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on the composition of rhizobacterial communities of two *Chilean Andisol* pastures [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(1):99-107.
- [23] Cong J, Liu X D, Lu H, et al. Analyses of the influencing factors of soil microbial functional gene diversity in tropical rainforest based on GeoChip 5.0 [J]. *Genomics Data*, 2015(5):397-398.
- [24] Mirza B S, Potisap C, Nüsslein K, et al. Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the Amazon rainforest [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(1):281-288.
- [25] 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.