

# 禁牧对半干旱草地土壤氮循环功能基因丰度和氮储量的影响

廖李容<sup>1,2</sup> 王杰<sup>3</sup> 张超<sup>1,3\*</sup> 刘国彬<sup>1</sup> 宋籽霖<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院教育部水土保持与生态环境研究中心, 陕西杨凌 712100; <sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049; <sup>3</sup>西北农林科技大学水土保持研究所, 陕西杨凌 712100; <sup>4</sup>西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要** 以黄土高原云雾山不同禁牧(0、7、18、27和35年)草地为对象,研究禁牧对不同土层(0~10、10~20、20~40和40~60 cm)土壤氮循环微生物功能基因(*nifH*、*amoA*-AOA、*amoA*-AOB、*narG*、*nirK*、*nirS*和*nosZ*)丰度的影响,并分析了土壤氮循环微生物功能基因与土壤氮储量之间的关系。结果表明:与放牧相比,禁牧35年提高了*nifH*和*amoA*-AOB的基因丰度,分别增加了67.8%和17.6%;禁牧降低了*nirK*基因丰度。表层土壤(0~10 cm)*nifH*、*narG*和*nirS*基因丰度显著高于深层土壤(20~40和40~60 cm),表明*nifH*、*narG*和*nirS*基因具有表聚效应。禁牧提高了土壤氮储量,在27年时0~60 cm土层土壤氮储量最高(20.96 mg·hm<sup>-2</sup>),说明27年可能为最适禁牧年限。*nifH*、*amoA*-AOA和*amoA*-AOB基因丰度与氮储量具有显著线性关系,表明含有这些基因的微生物对于提高土壤氮储量具有重要作用。土壤全氮、容重以及速效磷含量是影响土壤氮循环基因的主要因素。本研究结果为深入理解土壤氮循环过程及退化草地的恢复提供了科学参考。

**关键词** 禁牧; 氮循环; 功能基因; 氮储量; 半干旱草地

**Effects of grazing exclusion on the abundance of functional genes involved in soil nitrogen cycling and nitrogen storage in semiarid grassland.** LIAO Li-rong<sup>1,2</sup>, WANG Jie<sup>3</sup>, ZHANG Chao<sup>1,3\*</sup>, LIU Guo-bin<sup>1</sup>, SONG Zi-lin<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Research Center of Soil and Water Conservation and Ecological Environment, Chinese Academy of Sciences and Ministry Education, Yangling 712100, Shaanxi, China; <sup>2</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; <sup>3</sup>Institute of Soil and Water Conservation, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; <sup>4</sup>College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China).

**Abstract:** We investigated the effects of grazing exclusion on the abundance of functional genes (*nifH*, *amoA*-AOA, *amoA*-AOB, *narG*, *nirK*, *nirS*, and *nosZ*) involved in soil nitrogen cycling in soil profiles (0-10, 10-20, 20-40 and 40-60 cm) from a chronosequence of grazing exclusion (0, 7, 18, 27 and 35 years) in the semiarid grasslands of the Loess Plateau. The relationship between abundance of functional genes and soil nitrogen storage was evaluated. The results showed that 35 years exclusion increased the abundance of *nifH* and *amoA*-AOB genes by 67.8% and 17.6% compared with the grazed grassland, respectively, and decreased that of *nirK* genes. The abundance of *nifH*, *narG*, and *nirS* genes in surface soil (0-10 cm) were significantly higher than that in deep soil (20-40 and 40-60 cm), indicating that those genes had surface accumulation effects. Grazing exclusion increased soil nitrogen storage. Soil nitrogen storage in 0-60 cm layer was the highest at 27 years (20.96 mg·hm<sup>-2</sup>), indicating that 27 years might be the optimum for grazing exclusion. The abundance of *nifH*, *amoA*-AOA and *amoA*-AOB had a significant linear relationship with nitrogen storage, suggesting that microbes harboring these genes played an important role in soil nitrogen accumulation. Total nitrogen, bulk density, and available phosphorus content were the dominant

本文由国家重点研发计划项目(2016YFC0501707)、国家自然科学基金项目(41771554)和陕西省创新人才推进计划-青年科技新星项目(2019KJXX-081)资助 This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFC0501707), the National Natural Science Foundation of China (41771554) and the Innovation Promotion Plan of Shaanxi Province-Young Project (2019KJXX-081).

2019-05-08 Received, 2019-07-26 Accepted.

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangchaolynn@163.com

factors affecting the abundance of functional genes involved in soil nitrogen cycling. Our results provided a scientific reference for understanding soil nitrogen cycling and restoration of degraded grassland.

**Key words:** grazing exclusion; nitrogen cycling; functional genes; nitrogen storage; semiarid grassland.

近年来,草原退化成为全世界共同关注的环境问题.在我国,天然草原退化面积达总天然草原面积的90%<sup>[1]</sup>.在一定范围内,适当放牧可以加速土壤的养分循环过程,但长期超载放牧将导致土壤的输入和输出失衡,最终导致草原退化.这种情况在生态脆弱的干旱半干旱地区尤为突出<sup>[2]</sup>.围封禁牧是目前常用的恢复退化草地的主要措施之一,禁牧之后草地状态得到明显改善<sup>[3]</sup>.目前,对于禁牧措施的研究主要集中在土壤<sup>[4-5]</sup>及植物群落<sup>[6-7]</sup>,但并没有得出一致的结论<sup>[8-10]</sup>.

土壤氮循环是整个氮循环过程中的重要环节,参与其过程的微生物在一定程度上能够反映生态环境状况,对于退化草地的修复具有生物指示作用.在编码固氮还原酶的基因中,通常用 *nifH* 基因来研究固氮微生物<sup>[11]</sup>.在硝化作用中,氨单加氧酶将  $\text{NH}_4^+$  氧化成  $\text{NO}_3^-$ ,可用编码氨单加氧酶的 *amoA-AOA* 和 *amoA-AOB* 基因丰度表征硝化过程<sup>[12]</sup>.*nirK* 和 *nirS* 基因是编码催化 NO 产生过程中亚硝酸盐还原酶的基因片段,通常用 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度反映亚硝酸盐还原酶的活性,进而研究亚硝酸盐的氧化作用.此外, *narG* 基因和 *norZ* 基因是反硝化过程中硝酸盐还原酶和氧化亚氮还原酶的编码基因<sup>[11]</sup>,二者的基因丰度能反映反硝化过程中硝酸盐和氧化亚氮的还原作用.*nifH*、*amoA-AOA*、*amoA-AOB*、*narG*、*nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因丰度分别表征固氮酶、氨单加氧酶 AOA、氨单加氧酶 AOB、膜靠硝酸盐还原酶、含铜离子亚硝酸盐还原酶、含细胞色素 cd1 亚硝酸盐还原酶和  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶的活性,而这些酶分别催化着固氮、硝化和反硝化过程,因此,通常采用以上功能基因来评价土壤微生物参与的氮循环过程.

土壤有着陆地生态系统中最大的氮储量,其含量超过植被<sup>[13]</sup>,是评价土壤质量和土壤生产力的指标.研究发现,在土地退化地区进行保护性耕作和制备管理措施,能够增加土壤氮储量,而过度利用土地则会减少土壤氮含量和储量<sup>[14]</sup>.因此,对土壤氮含量和储量进行评估对于更加全面了解禁牧恢复过程中土壤状况有重要意义.目前,就土壤氮循环微生物特性有大量的研究<sup>[15-16]</sup>,但是对于与禁牧草原相关

的氮循环微生物的研究相对较少.本研究以黄土高原云雾山不同禁牧(0、7、18、27和35年)草地为对象,分析氮循环微生物功能基因丰度的变化及其与土壤氮储量的关系,探讨禁牧对半干旱草原氮循环微生物的影响机理,为全面了解土壤氮循环过程以及半干旱草原恢复的评价和管理提供依据.

## 1 研究地区与研究方法

### 1.1 研究区概况

研究地点位于黄土高原宁夏云雾山国家天然草原保护区(36°10′—36°17′ N, 106°21′—106°27′ E),该区属于典型中温带半干旱气候区,为典型大陆性季风气候.海拔 1800~2100 m,年平均降水量 425 mm,蒸发量 1330~1640 mm,年均温 7 °C,最高气温 25.2 °C,最低气温 -14 °C,年平均无霜期 137 d.该区土壤类型主要为山地灰褐土和黑坊土.保护区植被以本氏针茅(*Stipa capillata*)、百里香(*Thymus mongolicus*)、铁杆蒿(*Artemisia gmelinii*)为主,伴生种主要有星毛委陵菜(*Potentilla acaulis*)、芨蒿(*Artemisia giraldii*)、香茅草(*Cymbopogon citratus*).

### 1.2 试验材料

试验于 2017 年 8 月,在宁夏云雾山国家天然草原保护区选取禁牧 7、18、27 和 35 年的草地,在临近设置对照,放牧强度为 4 羊·hm<sup>-2</sup>·a<sup>-1</sup>.研究样地地理特征见表 1.在每种类型的草地设置 3 个 50 m×100 m 的样方,按“S”形线路,除去枯枝落叶等杂质后,分 0~10、10~20、20~40 和 40~60 cm 4 层进行

表 1 研究样地的地理特征

Table 1 Geographical features of the sampling sites

处理 Treat- ment	海拔 Altitude (m)	纬度 Latitude	经度 Longitude	坡度 Slope (°)	坡向 Slope direction
CK	2017	106°23′28″ N	36°17′06″ E	18	东偏北 26°NE26°
T <sub>7</sub>	2034	106°23′28″ N	36°16′57″ E	20	东偏北 38°NE38°
T <sub>18</sub>	2025	106°23′15″ N	36°16′21″ E	20	东偏北 32°NE32°
T <sub>27</sub>	2070	106°23′27″ N	36°16′30″ E	18	西偏北 21°NW21°
T <sub>35</sub>	2071	106°23′10″ N	36°15′05″ E	21	东偏北 29°NE29°

CK: 放牧 Grazing; T<sub>7</sub>: 禁牧 7 年 Grazing exclusion for 7 years; T<sub>18</sub>: 禁牧 18 年 Grazing exclusion for 18 years; T<sub>27</sub>: 禁牧 27 年 Grazing exclusion for 27 years; T<sub>35</sub>: 禁牧 35 年 Grazing exclusion for 35 years. 下同 The same below.

取样,在每个样方中随机建立 5 个 1 m×1 m 小样方,测量植被地下根系生物量。除去根、石块和碎片后,充分混匀土样。每个样品分成 2 个子样品,装入无菌样品袋中。将 1 个子样品立即储存在-80 °C 冰箱,用于进行 DNA 的提取,另 1 个样品风干过筛后用于测定土壤理化性质。植物根系用蒸馏水冲洗,在 60 °C 下干燥 36 h 测定地下生物量。

### 1.3 土壤理化性质的测定

土壤有机碳(SOC)含量用重铬酸盐氧化-外加热法测定;全氮(TN)含量用凯氏定氮法测定;速效磷(AP)含量用 Olsen 方法测定;铵态氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)和硝态氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)含量采用 2 mol·L<sup>-1</sup> KCl 以 1:5 的比例提取新鲜土样,浸提液使用连续流动自动分析仪测定;使用烘箱干燥方法测定土壤含水量。具体方法详见《土壤与农业化学分析》<sup>[17]</sup>。

### 1.4 土壤微生物功能基因丰度测定

采用定量 PCR 测定参与土壤氮循环过程的主要功能基因(*nifH*、*amoA*-AOA、*amoA*-AOB、*narG*、*nirK*、*nirS*、*nosZ*)丰度。取 0.25 g 冻干土壤样品,按照 UltraClean soil DNA Extraction Kit 试剂盒的说明书提取土壤总 DNA。目的基因引物序列见表 2,扩增程序为 98 °C 持续 60 s;30 个循环 98 °C 10 s;50 °C,30 s;72 °C 30 s;在 72 °C 下保持 5 min,每个样品重复 3 次。定量 PCR 的 3 个副本使用 ABI 7500 实时 PCR 系统对每种浓度进行测定。使用 qPCR 测定来自不同微生物组的基因 *nifH*、*amoA*-AOA、*amoA*-AOB、*narG*、*nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因。

表 2 氮循环微生物功能基因 PCR 扩增引物及对应功能  
Table 2 Nitrogen cycle microbial functional gene PCR amplification primers and functions

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	功能 Function <sup>[18-19]</sup>
<i>nifH</i>	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC TTGTTSGCSCGRTACATSGCCATCAT	N <sub>2</sub> →NH <sub>3</sub>
<i>amoA</i> -AOA	CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC GCCATCCATCTGTATGTCCA	NH <sub>3</sub> →NH <sub>2</sub> OH
<i>amoA</i> -AOB	GGGTTTCTACTGGTGCT CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC	NH <sub>3</sub> →NH <sub>2</sub> OH
<i>narG</i>	TAYGTSGGGCAGGARAACCTG CCTAGAAGAAGCTGGTGCTGTT	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> →NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<i>nirK</i>	ATYGGCGVCAYGCCGA GCCTCGATCAGRITRTGGTT	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> →NO
<i>nirS</i>	GTSAAACGYSAAGGARACSGG GASTTCGRTGCTCTTSAYGAA	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> →NO
<i>nosZ</i>	AGAACCAGCAGCTGATCGACA TCCATGGTGACGCCGTGGTTG	N <sub>2</sub> O→N <sub>2</sub>

### 1.5 数据处理

由于取样土壤中不含粗粒(>2 mm),因此土壤氮储量可根据一定土层全氮含量和土壤容重计算,计算公式<sup>[13]</sup>为:

$$N_s = BD \times TN \times D \times 0.1$$

式中: $N_s$ 为土壤氮储量(mg·hm<sup>-2</sup>); $BD$ 为土壤容重(g·cm<sup>-3</sup>); $TN$ 为土壤全氮含量(g·kg<sup>-1</sup>); $D$ 为土层厚度(cm)。总体土壤氮储量将各层氮储量累加。

采用 R 的 vegan 包对数据进行统计分析。采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)和最小差异显著法 LSD 进行方差分析和多重比较( $\alpha = 0.05$ ),用 Pearson 法和冗余分析(RDA)研究氮循环基因与土壤性质之间的关系。用线性回归分析氮循环基因与氮储量之间的关系。利用 SigmaPlot 12.0 作图。图表中数据为平均值±标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤理化性质

从图 1 可以看出,除土壤含水量外,其他指标在不同禁牧年限和土层间均存在显著差异。土壤有机碳含量随禁牧年限增加而增加,土壤容重随禁牧年限增加而显著降低,土壤含水量变化趋势则相反。与放牧相比,禁牧 7、18、27 和 35 年土壤全氮含量显著增加,增幅为 34.8%、54.0%、75.2%和 84.8%。禁牧 27 年 0~10 cm 土层土壤全氮含量为 3.36 g·kg<sup>-1</sup>,显著高于其他土层。禁牧显著提高了土壤硝态氮含量,禁牧 27 年的土壤铵态氮含量最高。禁牧 27 年 0~10 cm 土壤有机碳含量和根系生物量均显著高于其他土层,分别为 34.67 g·kg<sup>-1</sup>和 24.49 g。除土壤容重外,其他指标均随土层增加而减少,各土层土壤含水量无显著差异。在 0~40 cm 土层,禁牧 27 和 35 年土壤有机碳显著高于其他禁牧年限。

### 2.2 土壤氮循环功能基因的丰度

由图 2 可以看出,氮循环功能基因在不同禁牧年限间差异显著,土层对 *nifH*、*narG*、*nirS* 和 *norZ* 基因丰度存在显著影响。*nifH* 基因随禁牧年限的变幅(每 g 干土 7.94×10<sup>3</sup>~2.51×10<sup>9</sup> 个拷贝数)最大。禁牧 35 年 0~10 cm 土层每 g 土壤 *nifH* 和 *nirK* 基因分别为 2.69×10<sup>9</sup> 和 3.31×10<sup>9</sup> 个拷贝数,而禁牧 35 年 0~10 cm 土层每 g 土壤 *norZ* 基因仅为 2.69×10<sup>3</sup> 个拷贝数。*amoA*-AOA 基因拷贝数随禁牧年限显著增加,但禁牧 27 年和禁牧 35 年土壤 *amoA*-AOA 基因拷贝数差异不大,*amoA*-AOB 随禁牧年限的变化趋势与 *amoA*-AOA 类似。氮循环微生物在 20~40 cm 土层数

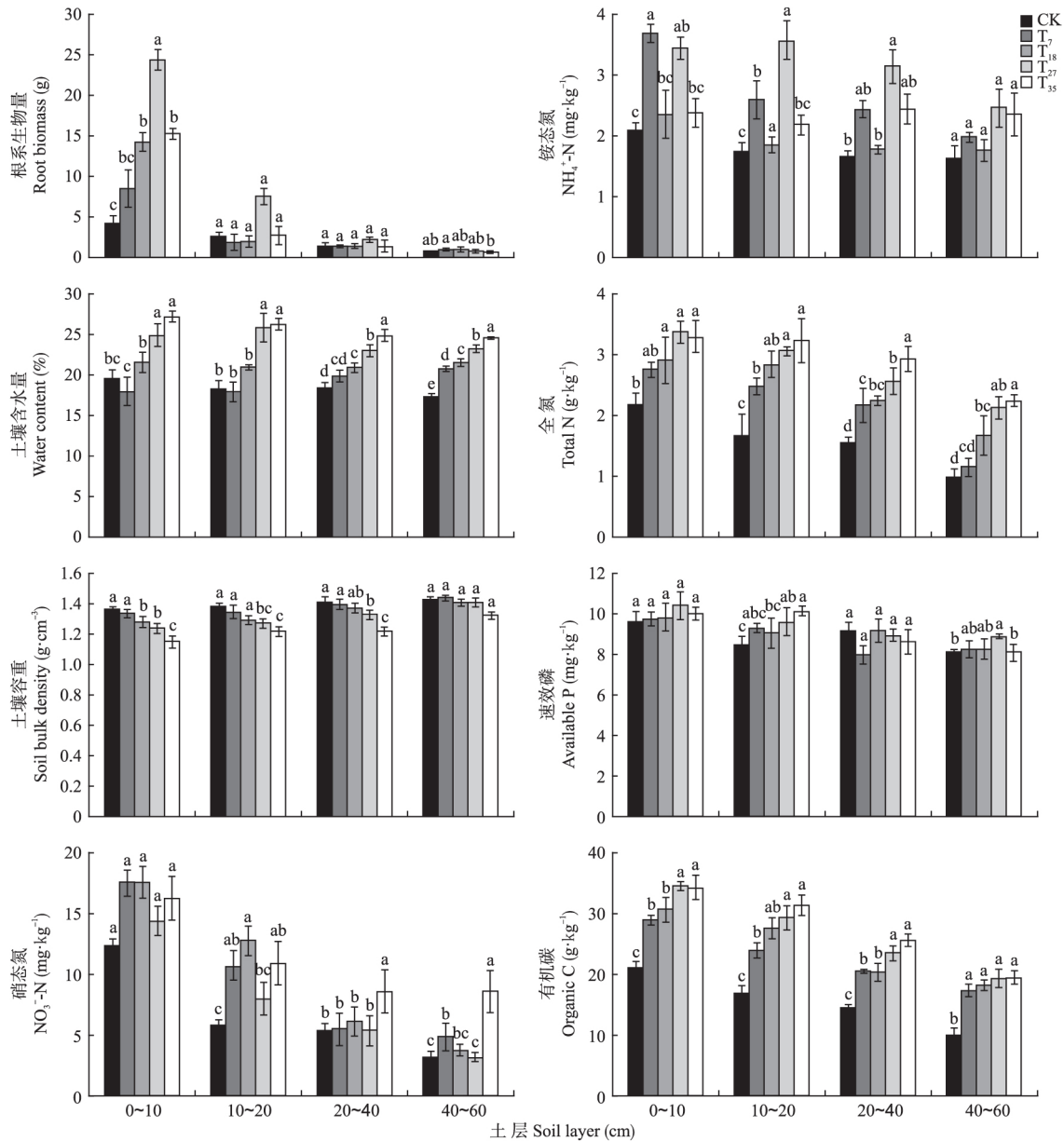


图 1 不同禁牧年限和土层根系生物量及土壤理化性质

Fig.1 Root biomass and soil physical and chemical properties in different grazing exclusion years and soil layers.

不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different lowercase letters indicated significant difference among treatments at the 0.05 level. CK: 放牧 Grazing; T<sub>7</sub>: 禁牧 7 年 Grazing exclusion for 7 years; T<sub>18</sub>: 禁牧 18 年 Grazing exclusion for 18 years; T<sub>27</sub>: 禁牧 27 年 Grazing exclusion for 27 years; T<sub>35</sub>: 禁牧 35 年 Grazing exclusion for 35 years. 下同 The same below.

量最多,除 *nifH* 基因拷贝数随土层深度而减小外,其他功能基因 (*amoA-AOA*、*amoA-AOB*、*narG*、*nirS*、*nirK*、*norZ*) 丰度均增加.不同氮循环基因丰度变化趋势不同.与 0~10 cm 土层相比,放牧处理 10~20 cm 土层反硝化作用功能基因 (*narG*、*nirS*、*nirK*、*norZ*) 的变异程度最大,分别增加了 20.6%、28.8%、7.0%、67.1%.

### 2.3 土壤氮储量与氮循环功能基因的关系

从图 3 可以看出,土壤氮储量随禁牧年限增加而增加,禁牧 27 年 0~60 cm 土层土壤氮储量最大,

为  $20.96 \text{ mg} \cdot \text{hm}^{-2}$ ,是放牧处理的 1.7 倍.土壤氮储量随土层增加而增加,在 20~40 cm 土层达到峰值,随后略有下降;各土层中,仅 20~40 和 40~60 cm 土层土壤氮储量存在显著差异,在其他 2 个土层不显著.由表 3 可以看出, *nifH* 基因丰度与土壤氮储量呈显著正相关;土壤氮储量与 *amoA-AOA* 和 *amoA-AOB* 基因丰度呈显著正相关,而 *nirK*、*nirS*、*nosZ* 基因丰度与土壤氮储量的关系均不显著.

### 2.4 土壤氮循环功能基因与土壤理化特性的相关性

由表 4 可以看出, *nifH* 基因丰度与容重呈显著

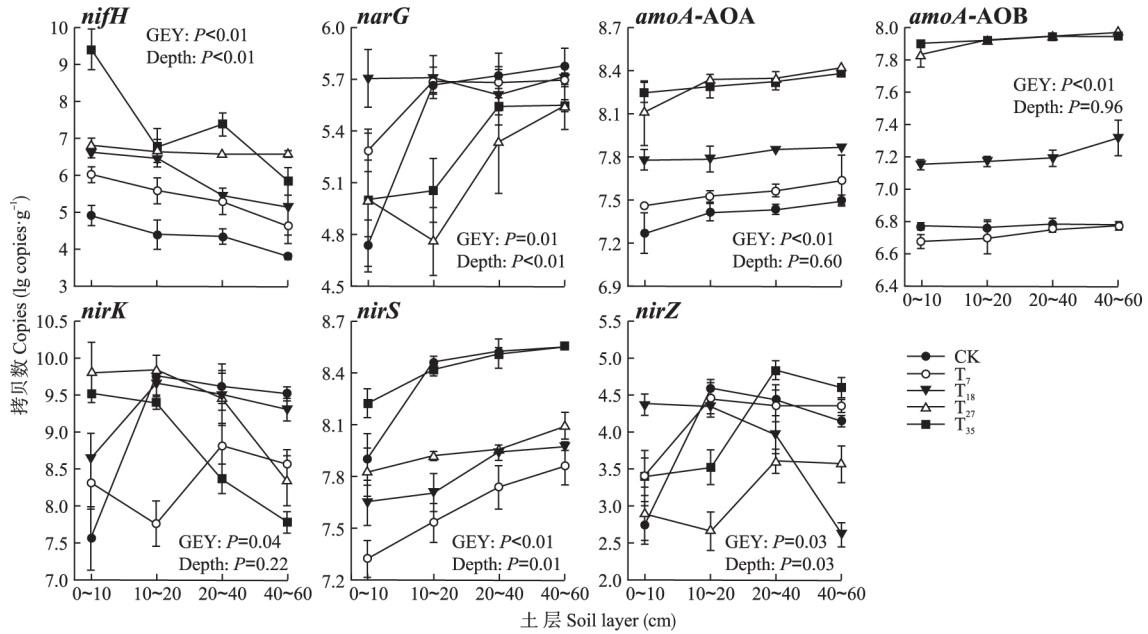


图 2 不同禁牧年限不同土层土壤氮循环功能基因丰度

Fig.2 Nitrogen cycle functional gene abundance in different soil layers under different grazing exclusion years.

GEY: 禁牧年限 Grazing exclusion years; Depth: 土壤深度 Soil depth.

负相关,与其他指标均呈显著正相关.*amoA*-AOA 和 *amoA*-AOB 基因丰度与土壤含水量的相关性最大,

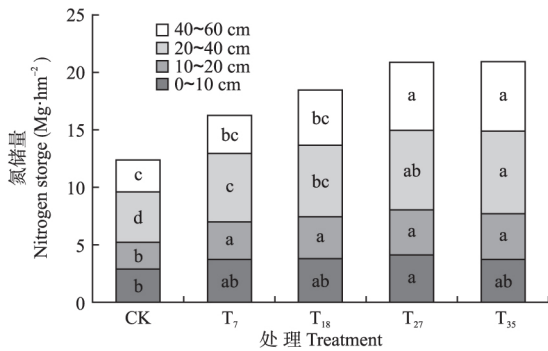


图 3 不同禁牧年限土壤氮储量分布

Fig.3 Distribution of soil nitrogen storage under different grazing years.

表 3 土壤氮储量( $N_s$ )与氮循环功能基因丰度的线性回归模型

Table 3 Linear regression model of soil nitrogen storage ( $N_s$ ) with nitrogen cycle functional gene abundance

回归模型 Regression model	df	$R^2$	P
$N_s = 0.317nifH + 2.567$	58	0.076	0.033
$N_s = 2.124AOA - 12.264$	58	0.306	<0.001
$N_s = 1.389AOB - 5.697$	58	0.265	<0.001
$N_s = 0.373narG + 2.422$	58	0.011	0.428
$N_s = -0.070nirK + 5.089$	58	0.002	0.745
$N_s = 0.492nirS + 0.506$	58	0.017	0.325
$N_s = 0.205nosZ + 3.664$	58	0.013	0.388

相关系数分别为 0.832 和 0.880.土壤理化因子对 *nosZ* 和 *narG* 基因丰度的影响相似,除与土壤容重呈正相关外,与其他指标均呈负相关.从图 4 可以看出,土壤理化特性解释 46.8% 不同禁牧年限氮循环功能基因丰度的变异,其中第 1 轴的解释率为 41.5%、

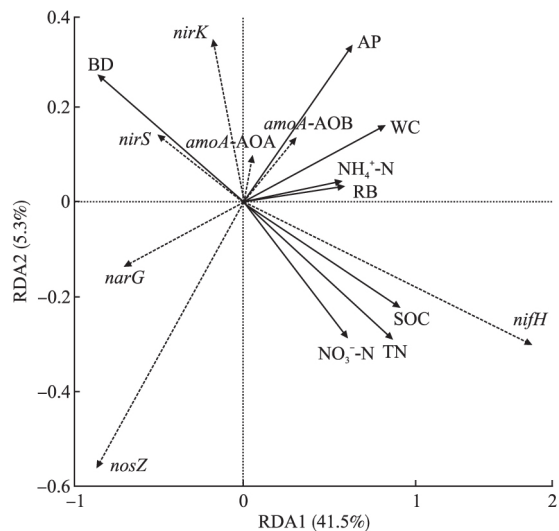


图 4 土壤氮循环功能基因丰度与土壤理化特性的冗余分析(RDA)

Fig.4 Redundancy analysis (RDA) of soil nitrogen cycling functional gene abundance and soil physical and chemical properties.

BD: 土壤容重 Bulk density; AP: 速效磷 Available P;  $NH_4^+-N$ : 铵态氮 Ammonium nitrogen;  $NO_3^- -N$ : 硝态氮 Nitrate nitrogen; SOC: 有机碳 Organic C; TN: 全氮 Total N; RB: 根系生物量 Root biomass; WC: 含水量 Water content.

表 4 土壤理化性质与氮循环功能基因丰度的相关系数

Table 4 Correlation coefficients between soil physical and chemical properties and nitrogen cycle functional gene abundance

基因 Gene	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	速效磷 Available P	土壤含水量 Water content	土壤容重 Soil bulk density	根系生物量 Root biomass	有机碳 Organic C	全氮 Total N
<i>nifH</i>	0.505**	0.364**	0.466**	0.752**	-0.819**	0.467**	0.797**	0.780**
<i>amoA</i> -AOA	-0.057	0.306*	0.170	0.832**	-0.538**	0.117	0.411**	0.482**
<i>amoA</i> -AOB	0.006	0.303*	0.234	0.880**	-0.608**	0.213	0.472**	0.556**
<i>narG</i>	-0.393**	-0.384**	-0.526**	-0.385**	0.451**	-0.324*	-0.481**	-0.462**
<i>nirK</i>	-0.039	-0.011	0.142	0.208	-0.126	0.133	0.111	0.107
<i>nirS</i>	-0.376**	-0.326*	-0.230	0.256*	-0.062	-0.276*	-0.339**	-0.232
<i>nosZ</i>	-0.215	-0.292*	-0.346**	-0.258*	0.152	-0.280*	-0.303*	-0.243

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

第 2 轴的解释率为 5.3%。土壤全氮、速效磷以及土壤容重对 *nifH*、*nirK* 和 *nosZ* 基因丰度的解释率较大,其中,土壤容重对 *nirK* 基因丰度影响最大,其次是速效磷,全氮对 *nifH* 基因丰度影响最大。

### 3 讨 论

#### 3.1 禁牧对土壤理化性质的影响

土壤有机质对土壤肥力的维持具有积极作用,有研究认为,禁牧能增加土壤有机质,从而降低土壤容重,增加土壤养分含量<sup>[3,20]</sup>。本研究发现,0~10 cm 土层土壤有机碳含量显著高于其他土层,表明长期禁牧土壤有机碳具有很强的表层积聚性,这与李金芬等<sup>[21]</sup>在云雾山的研究结果一致。本研究中,禁牧显著降低了土壤容重,可能与禁牧后植物恢复、凋落物和根系增加以及牲畜踩踏减少有关,这与 Su 等<sup>[22]</sup>在内蒙古奈曼对半干旱草地的研究结果一致。有研究认为,禁牧通过改变地上植被的盖度、地下根系生物量以及凋落物,改变土壤微环境,从而有效提高土壤有机碳含量<sup>[23]</sup>。禁牧 27 年土壤硝态氮、速效磷、根系生物量达到最大值(图 1),结合前人研究推测,禁牧存在最适年限,禁牧时间过长,导致杂草生长过于旺盛,抑制植物的发育和生长,从而影响土壤养分<sup>[24]</sup>。土壤全磷含量随禁牧年限的变化无明显规律,可能与磷元素形态变化少、在土壤中移动速度小有关<sup>[25]</sup>。本研究中,土壤有机质和养分含量随土层深度增加而降低,植物根系可吸收的营养物质随之减少,因此,土壤根系生物量随土层深度而减少。

#### 3.2 禁牧对氮循环功能基因丰度的影响

氮有效性是生态系统生产力的主要限制因素,土壤氮循环对调节生态系统氮有效性有着深远的影响。土壤微生物在氮循环过程中发挥着重要的作用。本研究中,禁牧 35 年土壤表层 *nifH* 基因拷贝数显著高于其他处理,这与前人对温带和亚热带森林土

壤氮循环微生物群落的研究结果一致<sup>[19]</sup>。本研究发现,禁牧 35 年提高了土壤 *nifH* 和 *amoA*-AOB 的基因丰度,降低了 *nirK* 基因丰度。对内蒙古 3 种不同类型草地进行的研究发现,禁牧增加土壤 *nifH* 基因丰度<sup>[26]</sup>;但该研究发现,禁牧也增加了土壤 *nirK* 基因丰度,与本研究结果相反。这可能与两研究中禁牧年限以及放牧强度不同有关,这表明禁牧对固氮过程和反硝化作用的影响不同。本研究发现,深层土壤指示反硝化作用的功能基因减少,这可能与长期禁牧条件下深层土壤中有机碳、全氮与硝态氮含量减少有关,土壤中可利用碳和氮含量减少,进而抑制了反硝化作用的进行<sup>[25]</sup>。本研究中,与放牧相比, *nirK* 和 *nirS* 基因丰度在各土层的变化趋势一致,表层土壤(0~10 cm) *nifH*、*narG* 和 *nirS* 基因丰度显著高于深层土壤(20~40 和 40~60 cm),表明 *nifH*、*narG* 和 *nirS* 基因具有表聚效应。Li 等<sup>[27]</sup>研究发现类似的结果。*nifH*、*amoA*-AOA 和 *amoA*-AOB 基因丰度在不同土层间差异显著,表明禁牧对不同土层土壤固氮过程及硝化过程具有显著影响。在表层土壤中,放牧处理的土壤反硝化作用功能基因(*narG*、*nirS*、*nirK*、*norZ*)变异程度最大。但有研究发现,长期放牧降低了反硝化作用速率,并抑制了 N<sub>2</sub>O 的产生<sup>[28-29]</sup>,这与本研究结果不一致,原因可能是对照的放牧强度较小,牲畜的作用不足以对土壤硝酸盐浓度和有机氮含量造成影响<sup>[27]</sup>。但草地的恢复效果应综合考虑立地条件、恢复情况等因素<sup>[24]</sup>。因此,为了对土壤氮循环微生物随禁牧年限的变化有更深入了解,可通过合理安排禁牧时间并收集更多年限的土壤加以分析。

#### 3.3 禁牧对土壤氮储量的影响及与氮循环基因的关系

土壤全氮是林地生态系统植被恢复过程中重要的土壤质量评价指标。本研究中,禁牧显著增加植被

覆盖度、多样性、地上和地下生物量<sup>[30]</sup>、植物地上生物量、枯枝落叶以及根系使得土壤表层有机质积累<sup>[31]</sup>,而土壤全氮与土壤有机质密切相关<sup>[32]</sup>,因此禁牧显著增加了0~10 cm 土层土壤全氮含量(图1)。而对青藏高原高寒草地研究表明,围封禁牧降低了0~15 cm 土层土壤全氮含量<sup>[33]</sup>。这与本研究结果相反。不同禁牧年限土壤环境存在较大差异,导致了土壤氮储量的差异。对青藏高原高寒草甸土壤氮储量的研究表明,短期(4年)禁牧增加了土壤氮储量,并且其随土层深度增加而降低<sup>[34]</sup>,该结果与本研究禁牧7年的结果一致,但二者不同土层深度土壤氮储量对禁牧的响应存在差异,这可能是土壤含水量的差异所致,高寒草甸土壤含水量随土层深度增加而减少<sup>[35]</sup>,而本研究中不同土层土壤含水量无显著差异。

土壤氮储量随禁牧年限的增加而增加,禁牧27年0~60 cm 土层土壤氮储量是放牧处理的1.7倍,表明禁牧具有一定恢复土地生产力的能力,禁牧27年土壤氮储量最大,结合前人研究结果<sup>[3]</sup>推测,禁牧27年可能是半干旱草原较为合适的禁牧年限。*nifH*、*amoA*-AOA 和 *amoA*-AOB 基因丰度与土壤氮储量的线性回归关系显著,而 *nirK*、*nirS*、*nosZ* 基因丰度与土壤氮含量和氮储量均无显著关系(表3),表明 *nifH*、*amoA*-AOA 和 *amoA*-AOB 基因对固氮具有积极作用。生物固氮作用在土壤氮输入过程中发挥着重要作用<sup>[36]</sup>,长期禁牧增加了植物根系生物量,增加了土壤氮素的输入。另外,本研究发现,禁牧增加了 *nifH* 基因丰度,表明禁牧促进了氮固定过程,进而增加了土壤氮储量。土壤含水量是草地土壤反硝化过程中最主要的限制因素<sup>[37]</sup>。本研究中表征反硝化作用的 *nirK* 基因与土壤含水量相关关系不显著,而土壤含水量直接影响着土壤氮储量,表明 *nirK* 基因丰度对土壤中氮的积累作用不大。

### 3.4 土壤氮循环功能基因丰度与土壤理化性质的关系

土壤理化性质是土壤微生物生态特征的重要控制因素之一<sup>[38]</sup>。有研究表明,土壤全氮和速效磷对 *nirK* 基因丰度影响较大<sup>[39]</sup>。本研究发现,土壤全氮和速效磷含量显著影响 *nifH* 和 *nirK* 基因丰度,这与在西藏高山草地土壤<sup>[29]</sup>和长白山温带森林土壤<sup>[19]</sup>中得到的研究结果一致。有研究表明,土壤有机碳和含水量是影响反硝化作用的重要因素<sup>[12]</sup>。本研究中,土壤容重和有机碳含量显著影响 *nirK* 基因丰度,表明土壤容重和有机碳是影响云雾山草地土壤

反硝化过程的主要因素。土壤容重对 *nirK* 基因丰度影响最大,其次是速效磷,全氮对 *nifH* 基因丰度影响最大,表明全氮、土壤容重以及速效磷含量是影响氮循环过程的主要因素。氮循环功能基因与土壤理化性质相关性分析表明, *nifH* 基因丰度与各土壤理化因子均显著相关,推测禁牧通过影响土壤理化性质间接影响氮循环功能基因。本研究中, *nirK* 基因丰度与土壤理化因子无显著相关性,而 *nirS* 与土壤有机碳、全氮、硝态氮、铵态氮和速效磷相关,由此推测长期禁牧土壤中  $\text{NO}_2^-$  转化为  $\text{NO}$  过程主要由含 *nirS* 基因的酶催化进行。有研究发现,反硝化作用功能基因丰度与土壤容重呈负相关<sup>[28]</sup>,这与本研究结果一致。但是,也有研究得出相反的结论。杨丹等<sup>[39]</sup>研究发现,全氮、硝态氮、铵态氮和速效磷含量显著影响 *nirK* 基因丰度,原因可能是研究样地植物多样性差异,与放牧相比,禁牧处理下植被数量与种类均有所增加,但与天然草地仍存在较大差距。

### 参考文献

- [1] Fang K (方 楷), Song N-P (宋乃平), Wei L (魏 乐), *et al.* The effect of different grazing systems on aboveground biomass and interspecific relationships in desert steppe. *Acta Particulae Sinica* (草业学报), 2012, **21**(5): 12-22 (in Chinese)
- [2] Gao Y-Z (高英志), Han X-G (韩兴国), Wang S-P (汪诗平). The effects of grazing on grassland soils. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2004, **24**(4): 790-797 (in Chinese)
- [3] Yin Y-L (尹亚丽), Wang Y-Q (王玉琴), Li S-X (李世雄), *et al.* Effects of enclosing on soil microbial community diversity and soil stoichiometric characteristics in a degraded alpine meadow. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2019, **30**(1): 127-136 (in Chinese)
- [4] Bird SB, Herrick JE, Wander MM, *et al.* Multi-scale variability in soil aggregate stability: Implications for understanding and predicting semi-arid grassland degradation. *Geoderma*, 2007, **140**: 106-118
- [5] Fang Y (方 瑛), An S-S (安韶山), Ma R-T (马任甜). Ecological stoichiometric characteristics of plants and soil in grassland under different restoration types in Yunwu Mountain, China. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2017, **28**(1): 80-88 (in Chinese)
- [6] Zhang P-L (张鹏莉), Chen J (陈 俊), Cui S-J (崔树娟), *et al.* The community characteristics of different types of grassland under grazing prohibition condition. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2013, **33**(2): 425-434 (in Chinese)
- [7] Yan Y-C (闫玉春), Tang H-P (唐海萍). Effects of enclosure on typical steppe community properties in

- Inner Mongolia. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), 2007, **27**(6): 1225–1232 (in Chinese)
- [8] Wang Q-L (王启兰), Wang C-T (王长庭), Du Y-G (杜岩功). Grazing impact on soil microbial biomass carbon and relationships with soil environment in alpine Kobresia meadow. *Acta Partaculturae Sinica* (草业学报), 2008, **17**(2): 39–46 (in Chinese)
- [9] Hu B (胡斌), Duan C-Q (段昌群), Wang Z-H (王震洪). Effect of vegetation rehabilitation measures on soil fertility and soil enzymatic activity in degraded ecosystem. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2002, **39**(4): 604–608 (in Chinese)
- [10] Srikanthasamy T, Leloup J, N' Dri AB, et al. Contrasting effects of grasses and trees on microbial N-cycling in an African humid savanna. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, **117**: 153–163
- [11] Che RX, Qin JL, Tahmasbian I, et al. Litter amendment rather than phosphorus can dramatically change inorganic nitrogen pools in a degraded grassland soil by affecting nitrogen-cycling microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, **120**: 145–152
- [12] Levy-Booth DJ, Prescott CE, Grayston SJ. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, **75**: 11–25
- [13] Deng L, Wang KB, Shangguan ZP. Long-term natural succession improves nitrogen storage capacity of soil on the Loess Plateau, China. *Soil Research*, 2014, **52**: 262–270
- [14] Dong Y-Z (董云中), Wang Y-L (王永亮), Zhang J-J (张建杰), et al. Soil carbon and nitrogen storage of different land use types in northwestern Shanxi Loess Plateau. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2014, **25**(4): 955–960 (in Chinese)
- [15] Hassett JE, Zak DR. Aspen harvest intensity decreases microbial biomass, extracellular enzyme activity, and soil nitrogen cycling. *Soil Science Society of America Journal*, 2005, **69**: 227–235
- [16] Evans RD, Rimer R, Sperry L, et al. Exotic plant invasion alters nitrogen dynamics in an arid grassland. *Ecological Applications*, 2001, **11**: 1301–1310
- [17] Lu R-K (鲁如坤). Soil and Agrochemistry Analysis. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999 (in Chinese)
- [18] Liu J-G (刘建国), Liu W-G (刘卫国). Advances in microbial-mediated nitrogen cycling. *Acta Agrestia Sinica* (草地学报), 2018, **26**(2): 277–283 (in Chinese)
- [19] Tang YQ, Yu GR, Zhang XY, et al. Changes in nitrogen-cycling microbial communities with depth in temperate and subtropical forest soils. *Applied Soil Ecology*, 2018, **124**: 218–228
- [20] Zhao Y-G (赵勇钢), Zhao S-W (赵世伟), Hua J (华娟), et al. Soil structural properties of enclosed steppe in the semiarid area. *Acta Agrestia Sinica* (草地学报), 2009, **17**(1): 106–112 (in Chinese)
- [21] Li J-F (李金芬), Cheng J-M (程积民), Liu W (刘伟), et al. Distribution of soil organic carbon and total nitrogen of grassland in Yunwu Mountain of Loess Plateau. *Acta Agrestia Sinica* (草地学报), 2010, **18**(5): 661–668 (in Chinese)
- [22] Su YZ, Zhao HL, Zhang TH, et al. Soil properties following cultivation and non-grazing of a semi-arid sandy grassland in northern China. *Soil and Tillage Research*, 2004, **75**: 27–36
- [23] Zheng C-L (郑翠玲), Cao Z-L (曹子龙), Wang X (王贤), et al. Effects of enclosure on vegetations recovery in desertified grassland in Hulunbeir. *Science of Soil and Water Conservation* (中国水土保持科学), 2005, **3**(3): 78–81 (in Chinese)
- [24] Zhang D-J (张东杰), Du Y-T (都耀庭). Effect of enclosure and grazing prohibition on the improvement of deteriorated grassland. *Grassland and Turf* (草原与草坪), 2006(4): 52–54 (in Chinese)
- [25] Wang Y-N (王亚男), Zeng X-B (曾希柏), Wang Y-Z (王玉忠), et al. Effects of vegetable cultivation years on microbial biodiversity and abundance of nitrogen cycling in greenhouse soils. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2014, **25**(4): 1115–1124 (in Chinese)
- [26] Ding K, Zhong L, Xin XP, et al. Effect of grazing on the abundance of functional genes associated with N cycling in three types of grassland in Inner Mongolia. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, **15**: 683–693
- [27] Li DD, Zhang XY, Green SM, et al. Nitrogen functional gene activity in soil profiles under progressive vegetative recovery after abandonment of agriculture at the Puding Karst Critical Zone Observatory, SW China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, **125**: 93–102
- [28] Xu YQ, Wang SQ, Cheng WX, et al. Impacts of grazing intensity on denitrification and N<sub>2</sub>O production in a semi-arid grassland ecosystem. *Biogeochemistry*, 2008, **88**: 103–115
- [29] Yang YF, Wu LW, Lin QY, et al. Responses of the functional structure of soil microbial community to livestock grazing in the Tibetan alpine grassland. *Global Change Biology*, 2013, **19**: 637–648
- [30] Zhang C, Liu GB, Song ZL, et al. Interactions of soil bacteria and fungi with plants during long-term grazing exclusion in semiarid grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, **124**: 47–58
- [31] Cheng JM, Jing GH, Wei L, et al. Long-term grazing exclusion effects on vegetation characteristics, soil properties and bacterial communities in the semi-arid grasslands of China. *Ecological Engineering*, 2016, **97**: 170–178
- [32] Wang Q-K (王清奎), Wang S-L (汪思龙), Feng Z-W (冯宗炜), et al. Active soil organic matter and its relationship with soil quality. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2005, **25**(3): 513–519 (in Chinese)
- [33] Shi XM, Li XG, Li CT, et al. Grazing exclusion decreases soil organic C storage at an alpine grassland of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Ecological Engineering*, 2013, **57**: 183–187



- [34] Li W (李 文), Cao W-X (曹文侠), Shi S-L (师尚礼), *et al.* Changes in organic carbon and nitrogen storage in alpine meadows under different grazing management regimes. *Acta Partaculturae Sinica* (草业学报), 2016, **25**(11): 25–33 (in Chinese)
- [35] Li Y-S (李元寿), Wang G-X (王根绪), Ding Y-J (丁永建), *et al.* Spatial heterogeneity of soil moisture in alpine meadow area of the Qinghai-Xizang Plateau. *Advances in Water Science* (水科学进展), 2008, **19**(1): 61–67 (in Chinese)
- [36] Zhu Z-L (朱兆良). Research on soil nitrogen in China. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2008, **25**(5): 778–783 (in Chinese)
- [37] Zhong L, Du R, Ding K, *et al.* Effects of grazing on N<sub>2</sub>O production potential and abundance of nitrifying and denitrifying microbial communities in meadow steppe grassland in northern China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, **69**: 1–10
- [38] Li N (黎 宁), Li H-X (李华兴), Zhu F-J (朱凤娇), *et al.* Relationships between soil microbial ecological characteristics and physical-chemical properties of vegetable garden soil. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(2): 285–290 (in Chinese)
- [39] Yang D (杨 丹), Yu X (余 旋), Liu X (刘旭), *et al.* Effect of afforestation modes on soil microbial community and nitrogen functional genes in *Hippophae rhamnoides* plantation. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2015, **26**(12): 3634–3640 (in Chinese)

---

作者简介 廖李容,女,1996年生,硕士研究生.主要从事氮沉降对土壤微生物结构和功能的影响研究. E-mail: 13718183753@163.com

责任编辑 孙 菊

---

---

廖李容,王杰,张超,等. 禁牧对半干旱草地土壤氮循环功能基因丰度和氮储量的影响. 应用生态学报, 2019, **30**(10): 3473–3481

Liao L-R, Wang J, Zhang C, *et al.* Effects of grazing exclusion on the abundance of functional genes involved in soil nitrogen cycling and nitrogen storage in semiarid grassland. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, **30**(10): 3473–3481 (in Chinese)