DOI: 10.5846/stxb201610182116

潘晓悦,王晓,郭光霞,孔维栋.增温与降水变化对青藏高原高寒草甸土壤 nirS 反硝化菌群落丰度和群落结构的影响.生态学报,2017,37(23): 7938-7946.

Pan X Y, Wang X, Guo G X, Kong W D. Effects of increased temperature and precipitation change on *nirS* gene abundance and community structure in alpine meadow soils on the Qinghai-Tibet Plateau. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(23):7938-7946.

增温与降水变化对青藏高原高寒草甸土壤 nirS 反硝化 菌群落丰度和群落结构的影响

潘晓悦^{1,2},王 晓¹,郭光霞^{2,3},孔维栋^{2,*}

1 中国矿业大学环境与测绘学院,徐州 221116

2 中国科学院青藏高原研究所,高寒生态学与生物多样性重点实验室,北京 100101

3 中国科学院南京地理与湖泊研究所,湖泊与环境国家重点实验室,南京 210008

摘要:全球变化已成为国际研究热点。青藏高原属典型生态脆弱带,该地区升温幅度更加明显,已导致大量冰川融化和明显降水变化,进而使该地区水循环和土壤水分发生巨大变化。温度和降水的变化可能会引起土壤微生物丰度和群落结构的改变,进而影响生物地球化学循环。但青藏高原地区土壤微生物群落结构和功能对全球变化响应的研究较少。研究了模拟增温和降水变化对青藏高原高寒草甸土壤 nirS 反硝化菌群落丰度和群落结构的影响。研究表明,增温1、2、4℃对 nirS 基因丰度影响不显著;增加降水 100%时,增温4℃处理显著增加 nirS 基因丰度(P<0.05)。在未升温与升温 2℃背景下增加和减少降水对 nirS 基因丰度的影响不显著。增温和增减降水均显著影响 nirS 反硝化菌群落结构变化的影响达极显著(P<0.01),解释了其中的54.2%,降水变化解释了 45.5%(P<0.05)。

关键词:nirS;基因丰度;群落结构;气候变化;青藏高原

Effects of increased temperature and precipitation change on *nirS* gene abundance and community structure in alpine meadow soils on the Qinghai-Tibet Plateau

PAN Xiaoyue^{1,2}, WANG Xiao¹, GUO Guangxia^{2,3}, KONG Weidong^{2,*}

1 School of Environment Science and Spatial Informatics, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, China

2 Key Laboratory of Alpine Ecology and Biodiversity, Institute of Tibetan Plateau Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

Abstract: Globally, climate change has become one of the most studied research topics. The Qinghai-Tibet Plateau covers an area of 2.5×10^6 km², with grassland being the dominant landscape. The plateau represents a typical ecologically fragile zone and has been experiencing rapid warming and precipitation change. Climate change has resulted in massive glacier melting and hydrology cycling change on the plateau. The warming and altered precipitation could profoundly alter soil microbial abundances and community structure, and subsequently influence ecosystem functions and biogeochemical cycling of carbon and nitrogen. In particular, this could influence microbe-driven greenhouse gas emissions in soils, e.g., N₂O. However, responses of soil microbial community structure and functions to the warming and altered precipitation remain largely unexplored on the plateau, especially for the soil microorganisms involved in nitrogen cycling. The present study

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(41401287);湖泊与环境国家重点实验室开放基金项目(2014SKL010)

收稿日期:2016-10-18; 网络出版日期:2017-08-14

^{*} 通讯作者 Corresponding author.E-mail: wdkong@itpcas.ac.cn

explored the effects of warming and altered precipitation on the denitrifying bacterial community in alpine meadow soils at Naqu research station on the Qinghai-Tibet Plateau. The effects of short-term (three months) warming $(+1^{\circ}C, +2^{\circ}C, and +$ 4~%) and precipitation change (50% precipitation decrease and 100% precipitation increase) on denitrifying bacteria (nirS) abundance and community structure were characterized using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). The qPCR results showed that temperature increase in all treatments did not significantly affect nirS gene abundances, and both precipitation treatments did not significantly influence nirS gene abundances in the control and 2°C warming treatments. In contrast, the 4°C warming coupled with 100% precipitation increase treatments significantly elevated nirS gene abundances, suggesting that the interaction of warming and precipitation increase influenced the gene abundance at higher temperatures. Principal component analysis based on T-RFLP data demonstrated that temperature increase substantially altered the nirS community structure under conditions of no precipitation change and precipitation increase. The nirS community structure of the control and 100% precipitation increase treatments showed similar patterns, while the 50% precipitation decrease treatment demonstrated different community patterns from the above two treatments, suggesting that the nirS community structure was sensitive to precipitation decrease. Canonical correspondence analysis further revealed that the nirS community structure was jointly driven by temperature increase and precipitation change, indicating that the interaction of temperature increase and precipitation contributed to the shift of the nirS community structure. The temperature increase explained the nirS community structure variation by 54.2% (P<0.01), precipitation change was explained by 45.5% (P<0.05), and the two jointly explained by 19.9%. Our results indicate that short-term warming and precipitation change do not influence nirS gene abundance; however, they do substantially shift the *nirS* community structure.

Key Words: nirS; gene abundance; community structure; climate change; Qinghai-Tibet Plateau

气候变化已成为典型的全球尺度的环境问题。根据政府间气候变化专门委员会(IPCC)第5次评估报告,1901—2012年间,全球平均表面温度上升0.89℃,报告预测到2100年全球气温将升高2—4.8℃,海平面上升26—81cm,冰川和冰原也以更快的速度融化,到2050年北极地区将成为几近无冰区^[1]。青藏高原地区平均气温在1961—2007年间每10年上升0.36℃^[2],约为全球气温增幅的3倍(每10年上升温度0.12℃,约为1951—2012年间)^[1]。气候变暖已经导致青藏高原地区冰川融化速度加快,且该地区降水具有增加的趋势^[3],这些导致该地区水循环和土壤水分显著变化^[45]。

土壤微生物是地球生物化学循环、特别是碳氮循环过程的主要驱动者,是生物圈与非生物圈物质与能量 交换的重要枢纽^[6],在调节土壤养分循环、有机质分解、环境污染物净化等的土壤生态系统功能过程中起着 重要的作用^[7]。高寒草甸是青藏高原地区典型地带性植被类型和优良牧场,对温室气体增加和全球变暖的 贡献量较大^[8]。气候变化会导致参与氮循环土壤微生物的群落结构发生变化^[9],从而影响 N₂O 等温室气体 的排放。N₂O 是导致全球变暖的重要温室气体之一,其在 100 年时间尺度上的全球增温潜势(global warming potential,GWP)是 CO₂的 298 倍^[10],对温室气体的贡献率约为 5%^[11]。同时 N₂O 对平流层臭氧层还具有破坏 作用^[12]。有研究表明全球大部分 N₂O 排放来自于土壤^[13],反硝化和硝化作用是 N₂O 产生的最主要途 径^[14-15]。土壤反硝化过程:NO₃→NO₂→NO→N₂O→N₂,其中 *nirS*、*nirK* 基因编码的亚硝酸还原酶,可催化亚硝 酸盐转化为气体形式的 NO,这一过程是反硝化过程的关键步骤,所以 *nirS*、*nirK* 被认为是反硝化微生物最重 要的功能基因^[16]。

目前,青藏高原地区功能微生物群落的研究还处于初步阶段,对升温和降水变化的响应研究还比较少。 本文以青藏高原那曲地区高寒草甸土壤为研究对象,采用微生物分子生态学研究方法研究了土壤增温和降水 变化下,青藏高原高寒草甸土壤中 nirS 反硝化菌群落丰度和群落结构的变化,为研究高寒生态系统反硝化微 生物对全球变暖的响应以及全球变暖情况下 N₂O 排放提供理论依据。

1 材料与研究方法

1.1 试验地点

增温试验平台选择在青藏高原那曲地区现代化草地畜牧业科技示范园区内的典型高山嵩草草甸。那曲地区位于西藏自治区北部(29°55′—36°30′N,83°55′—95°05′E)。平均海拔4500m左右,多雪峰和高山,东部 是高山峡谷,中西部为高原湖盆。该地区属于青藏高寒气候区,干燥寒冷,年平均气温-2.9—3.4℃,最冷月为 1月,月平均气温-14.9—7.4℃;最热月为7月,月平均气温8.7—12.2℃,年平均降水量在298.6—708.4mm,年 内降雨量的80%以上都集中在5—9月^[17]。那曲地区植被类型从东南向西北依次为高山疏林灌丛草甸、高寒 草甸、高寒草原、高寒荒漠草原四大基带及相邻的过度亚带,分布与生物气候带相适应^[18],该地区主要草地土 壤类型有高山草甸土、亚高山草甸土、高山草原土、高山荒漠草原土等^[19]。

1.2 试验设计

实验平台于 2014 年 7 月份开始运行。利用红外照射的自动控制系统准确控制增温,设置 4 个增温梯度: 0(对照)、1.0、2.0、4.0℃,每个增温实验小区为 3m 直径的圆形,利用"巢式"设计,在每一种增温幅度下,利用 PVC 板(33cm 深)将该小区隔成 2 个分区,一个分区不增加降水(对照),另一个分区增加降水 100%,共 8 个 处理。针对学者提出的"2℃阈值",在增温 0、2℃条件下,设置减水 50%的试验,减水小区占整个直径为 3m 的圆形。每个减水小区,10 个透明的聚碳酸树脂通道(投影面积占整个小区面积的 50%)以 15°角倾斜固定 在距地面 160cm 处,截留的雨水通过管道流入白色聚乙烯塑料雨水采集器。每次降雨,将减水小区采集器的 雨水均匀添加到增水小区,达到增水 100%。每个处理 4 个重复。在另外地方单独放置白色聚乙烯塑料雨水 采集器,采集降水,用于增水小区的增水。设有温度探针,监控温度变化。

1.3 土壤采集

为研究 nirS 反硝化菌对短期增温和降水变化的响应。采样时间为 2014 年 10 月份。在每个实验小区内,随机选择采样点,使用土钻采集 5cm 深的土壤样品,采集后去除植物根系等杂质,过筛(2mm)混匀,用于分子 生物学分析的样品放入干冰盒中保存,运回拉萨实验室后转入-80℃冰箱保存,之后放于冰盒中空运至北京 实验室。

1.4 土壤 DNA 的提取

DNA 提取采用 Powersoil[®] DNA Isolation Kit(MOBIO, USA),使用 0.5g 土壤,方法完全参照制造商说明 书。提取结束后取 1 µL 的 DNA 溶液于 NanoDrop2000 核酸定量仪(Thermo Scientific)中测定其 DNA 含量,使 用前贮存于-20℃。

1.5 qPCR

nirS 基因丰度采用 LightCycler 480 (Roche)实时荧光定量 PCR 仪进行定量试验,扩增引物^[20]为*nirS*-cd3aF(5'-GTSAACGTSAAGGARACSGG),*nirS*-R3cd(5'-GASTTCGGRTGSGTCTTGA)(由生工生物工程(上海) 股份有限公司合成),酶使用 SYBR green kit(TaKaRa),反应体系 10 μ L,包括:3 μ L 缓冲液,5 μ L 的酶,引物各 0.5 μ L,1 μ L DNA 模板。反应程序为:94℃预变性 2min,94℃变性 30s,58℃复性 1min,72℃延伸 30s,进行 10 个循环,从第二次循环开始复性温度依次降 0.5℃,94℃变性 30s,53℃复性 1min,72℃延伸 30s,进行 25 个循 环,最后 72℃延伸 10min。本次定量实验结果扩增效率>99%,标准曲线斜率约为-3.3。

1.6 末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)

nirS 基因 PCR 扩增引物序列与定量 PCR 相同,引物 nirS-cd3aF5'端用 FAM 标记。扩增仪器使用 ABI Veriti-96 梯度 PCR 仪(Applied Biosystems)。PCR 反应体系 25µL,包括:9.5µL 缓冲液,12.5µL 的 2×EasyTaq PCR SuperMix(全式金),引物各 1µL,1 µL DNA 模板。反应程序与定量 PCR 相同。由于末端限制性片段多态性分析要求 PCR 纯化产物浓度较高,因此采用切胶纯化的方法去除非特异性带的影响,胶回收使用 AxyPrep[™]DNA Gel Extraction Kit(Axygen),然后,采用内切酶 *Hha I*(TaKaRa)对纯化产物进行酶切,PCR 纯化

产物及酶混匀离心后在 37℃条件下消化 3h,而后 65℃变性 20min。纯化后的酶切产物送至中国农业科学院 进行基因扫描。不加水背景下增温 0、1℃的样品,有一重复没有收集到足量的 nirS 基因,只有 3 个重复。 1.7 数据分析

定量 PCR 数据分析采用 SPSS Statistics 23 软件中的 one-way ANOVA 及 LSD 方法比较不同处理间的差异性,并用 Excel 2010 作图。群落结构采用 T-RFLP 和 Canoco 5 软件中的主成分(principal component analysis, PCA)、典型相关分析(canonical correlation analysis, CCA)方法,采用 PCA 分析群落结构受短期增温或降水变化单一因素影响的分布规律,采用 CCA 分析短期增温和降水变化对群落结构综合影响的显著性和贡献率。

2 结果与分析

2.1 短期增温对 nirS 基因丰度的影响

从图 1 可以看出,在不加水情况下,与不升温对照处理相比,增温 1、2、4℃对 nirS 基因丰度影响不大。增加降水 100%情况下,增温 4℃显著提高 nirS 基因丰度(P<0.05),其基因拷贝数约为其他 3 个升温处理的 2 倍,增温 1、2℃与对照相比差异不显著。这说明增加降水在一定程度上改变了 nirS 基因丰度对升温的响应。 不同温度梯度下,增加降水 100%与不加水处理相比,基因丰度进行显著性差异检验结果都没有显著差异。 2.2 短期降水变化对 nirS 基因丰度的影响

由图 2 可知,不增温时,nirS 基因丰度随降水的增加有逐渐上升的趋势,增水 100%处理的基因丰度显著 高于减水 50%处理(P<0.05)。增温 2℃情况下,减水 50%、对照、加水 100%3 个处理的基因丰度差别不大。 土壤在不同的降水量情况下,增温 2℃与不增温处理之间,差异不明显。



2.3 短期增温对 nirS 反硝化菌群落结构的影响

增温对 nirS 反硝化菌群落结构的影响如图 3,在土壤不加水背景下,群落结构随温度的变化和在土壤增加降水 100%背景下,群落结构随温度的变化。

由图 3 的 PCA 结果可知,主成分 1 和主成分 2(PCA1、PCA2)可解释 nirS 反硝化菌群落结构总变异的 43.67%。增温 1、2、4℃的 3 种处理均改变了 nirS 反硝化菌的群落结构;增温 1℃处理的群落结构变化与增温 2℃和增温 4℃有差异,增温 4℃与增温 2℃相比,在图中的位置区分并不明显。

从图 3 可以看出, PCA1、PCA2 共解释了 nirS 反硝化菌群落结构总变异的 63.81%。土壤增加降水 100% 背景下,增温对 nirS 反硝化菌群的影响与降水不变背景不同。增水背景下,随着增温程度的增加,群落结构 持续发生变化。其中增温 1℃到增温 2℃之间差异最明显;与对照位置相比,增温 2℃与增温 4℃的距离比增

温 1℃更加明显,而增温 2℃与增温 4℃之间差异较小。降水变化,改变了 nirS 反硝化菌群落结构随温度变化的规律。





increased 0℃ and double precipitation; T1+W, 增温 1℃加水 100% increased 1℃ and double precipitation; T2+W, 增温 2℃加水 100% increased 2℃ and double precipitation; T4+W, 增温 4℃加水 100% increased 4℃ and double precipitation

2.4 短期降水变化对 nirS 反硝化菌群落结构的影响

降水变化对 nirS 反硝化菌群落结构的影响如图 4, 土壤不增温背景下, 群落结构随土壤增减水的变化, 土壤增温 2℃背景下, 群落结构随土壤增减水的变化。

结果表明,土壤不增温背景下,PCA1和PCA2共解释 nirS 反硝化菌群落结构总变异的 65.04%。其中土 壤减水 50%在第一主轴的右侧和第二主轴的下端,而不加水和增加降水 100%在第一主轴的左侧和第二主轴 的上端。与对照相比,土壤减水 50%时的群落结构比增加降水 100%变化更明显,增加降水 100%与对照相比 群落结构基本无差异。

结果说明,土壤增温2℃背景下,PCA1和PCA2共解释了nirS反硝化菌群落结构总变异的58.32%。减水50%时的群落结构与对照相比产生了较明显的变异,而增加降水100%与对照相比群落结构基本无差异。减水50%分布在第一主轴的左侧和第二主轴的上端,增加降水100%与不加水分布在第一主轴的右侧和第二主轴的下端。

由图 4 可得, 土壤增温 2℃和不增温相比, 降水变化时, nirS 反硝化菌群落结构的在图中的位置和变化方向发生改变, 说明土壤温度增加影响了降水变化对群落结构影响的规律。

2.5 短期增温和降水变化对 nirS 反硝化菌群落结构的综合影响

由图 5, PCA 和 CCA 结果可得, nirS 反硝化菌群落结构的变化是由土壤温度和降水联合影响产生。CCA 分析结果显示增温和降水变化对整个群落结构的变化共解释了 19.9%, 温度解释了其中的 54.2%, 对 nirS 反 硝化菌群落结构的变化有极显著影响(P<0.01); 水分贡献了其中的 45.5%, 对 nirS 反硝化菌群落结构的变化 有显著影响(P<0.05)。增温和降水两个环境因子交互作用对群落结构的影响的显著性检验结果显示, 对 nirS 反硝化菌影响不显著。

3 讨论

本研究结果表明 nirS 基因丰度对短期增温的响应不敏感,只在增加降水 100%背景下,增温 4℃, nirS 基



7943



Fig.4 Principal component analysis of T-RFLP profiles for *nirS* community structure in response to precipitation change T0, 增温 0℃ increased 0℃; T0-W, 增温 0℃减水 50% increased 0℃ and half of the precipitation; T0+W, 增温 0℃加水 100% increased 0℃ and double precipitation; T2, 增温 2℃ increased 2℃; T2-W, 增温 2℃减水 50% increased 2℃ and half of the precipitation; T2+W, 增温 2℃加水

100% increased 2°C and double precipitation



Fig.5 Canonical correspondence analysis of T-RFLP profiles for *nirS* community structure in response to precipitation change and temperature increase

T0, 增温 0℃ increased 0℃; T0-W, 增温 0℃减水 50% increased 0℃ and half of the precipitation; T0+W, 增温 0℃加水 100% increased 0℃ and double precipitation; T2, 增温 2℃ increased 2℃; T2-W, 增温 2℃ 减水 50% increased 2℃ and half of the precipitation; T2+W, 增温 2℃加水 100% increased 2℃ and double precipitation

因丰度才显著增加。nirS 基因丰度对增温响应不敏感已有研究证明,如 Jung 等^[21]研究表明,南极土壤增温 30d 处理,nirS 基因丰度变化不明显,Zheng 等^[22]研究的青藏高原高寒草甸土壤结果也表明温度的变化对 nirS 反硝化菌群落丰度的影响不显著。也有可能的原因是,增温处理时间较短,如 Penton 等^[23]的研究结果显示,

在永久冻土增温(1.5℃)1年后 nirS 基因丰度没有明显的改变,而高原土壤增温(1.8—2.7℃)10年后,nirS 丰度有明显的增加。本研究出现的在增加降水 100%和增温 4℃时,nirS 丰度有明显的增加,其中的原因可能为:nirS 基因微生物对于增温 2℃以内有一定的适应能力,如 Zhang 等^[24]的研究,在增温约 1.79℃,持续 5 年后 nirS 基因丰度变化不明显,而主要受到 N 的增加量和水分增加的影响,同时,在降水减少或不变情况下,增温后土壤湿度降低^[25],不适宜 nirS 反硝化菌生存。

短期降水变化对 nirS 基因丰度的影响规律不明显,只有在不增温背景下,减水 50% 和加水 100% 之间 nirS 基因丰度有明显的区别。这与之前的一些研究结果不同,Ding 等^[26]的研究结果表明,在不同降水区域,nirS 基因丰度随区域降水量的增加而明显增加,Zhang 等^[24]的研究结果也显示,经过 5a 的增水处理,nirS 基因丰度有明显的增加。出现不同结果的原因可能是:本次实验降水变化处理的时间较短,短期内 nirS 反硝化菌有一定的适应能力;研究区域土壤性质和环境的不同,反硝化菌还受到空间位置、有机碳、N 的化合物的影响^[27-29],进而导致 nirS 微生物响应的结果不同,上述两个研究土壤样品均采于内蒙古草原地区。本研究结果显示不同增温幅度下,nirS 基因丰度随降水变化规律的不同,Szukics 等^[30]的研究,nirK 基因丰度在不同的温度处理下,随水分变化规律也不一致,可能因为增温使土壤湿度有一定程度的降低^[25],导致增温后变化规律受到影响。

与基因丰度不同,土壤短期增温显著影响青藏高原高寒草甸地区 nirS 反硝化菌的群落结构。这与之前的研究结果相同,加拿大农业土壤在-4℃,-1℃,+2℃,+5℃温度梯度下,经过 120d 后,不同的温度处理之间 nirS 反硝化菌的群落结构有明显的区别^[31]。Braker 等^[32]对 nirS 反硝化菌增温培养 3 周后,群落多样性和群落结构都发生了明显的变化。增温对参与 N 循环的土壤微生物的群落结构产生影响已经被很多研究证实。Szukics 等^[30]研究结果显示,参与 N 循环的基因(nirK、amoA)群落结构在增温培养 1 周之后,产生了明显的改变。Yergeau 等^[33]利用 16S rRNA 基因研究南极地区微生物对增温的响应,增温约 3 年结果显示,增温对功能菌尤其是参与 N 循环微生物有明显的影响。

短期降水变化对青藏高原高寒草甸地区 nirS 反硝化菌的群落结构产生了显著的影响。这一结果与 Jha 等^[34] 对牧场土壤的研究结果相同,nirS 反硝化菌与土壤含水量有显著相关性,Hamonts 等^[35] 对根际土壤的研究结果也表明,土壤水分明显增加时,nirS 反硝化菌群落结构也发生明显的改变。但是本研究从 PCA 结果 看,不增温和增温 2℃的结果相似,均是增加降水 100%和对照相比群落结构差异不明显,减水 50%分布与前 两者有较大的区别。可能原因有:1)土壤增水造成了土壤的厌氧环境^[32],反硝化菌更适应此环境^[36-37],所以 经过 3 个月增水 100%处理没有发现较明显的改变,而减水后的环境更不利于反硝化菌的生存,进而导致明显 的变化;2)降水变化改变了土壤中 N 的无机化合物的数量和存在形式^[24,29],本研究此假设还需进一步研究 考证。

短期增温和降水变化对 nirS 反硝化菌群落结构有显著影响,并且两因子之间具有一定的相互作用。其 原因可能为温度和降水的变化引起植物和土壤生物化学性质的改变,进而引起土壤微生物群落结构的变 异^[38-39],所以不同的环境和试验地条件下,实验结果和结论会有一定的不同,与不同地点的植物、土壤特性、 土壤营养元素和微生物特征等都有很大的关系。但是两个因素对 nirS 基因丰度影响并不明显,只有在降水 和温度适宜的条件下基因丰度才会有明显的增加,这可能说明受到短期的增温和降水变化的影响,nirS 反硝 化菌的优势菌种发生了改变^[23],但所含 nirS 基因的量没有明显的变化。反硝化过程由 narG 或 napA、nirK 或 nirS、norB 或 norZ 和 nosZ 等多种基因编码的酶共同完成,所以为研究温度和降水变化对反硝化过程的影响, 还需研究环境因子对其他反硝化基因的作用,以及进一步研究长期增温和降水变化对反硝化功能微生物的影 响,进而研究全球变暖对整个反硝化过程及 N₂O 的排放的影响。

4 结论

本研究结果表明,土壤短期增温和降水变化显著影响青藏高原高寒草甸土壤 nirS 反硝化菌群落结构,降

7945

水变化调控增温对微生物群落结构的影响。短期增温和降水变化对青藏高原高寒草甸土壤 nirS 反硝化菌群 落丰度的影响较小,仅在增水 100%背景下增温 4℃丰度显著增加。

参考文献(References):

- [1] IPCC. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.
- [2] Wang B, Bao Q, Hoskins B, Wu G X, Liu Y M. Tibetan plateau warming and precipitation changes in East Asia. Geophysical Research Letters, 2008,35(14): L14702.
- [3] Lutz A F, Immerzeel W W, Shrestha A B, Bierkens M F P. Consistent increase in High Asia's runoff due to increasing glacier melt and precipitation. Nature Climate Change, 2014, 4(7): 587-592.
- [4] Yang W, Guo X F, Yao T D, Zhu M L, Wang Y J. Recent accelerating mass loss of southeast Tibetan glaciers and the relationship with changes in macroscale atmospheric circulations. Climate Dynamics, 2016, 47(3-4): 805-815.
- [5] Yang W, YaoT D, Xu B Q, Ma L L, Wang Z H, Wan M. Characteristics of recent temperate glacier fluctuations in the Parlung Zangbo River basin, southeast Tibetan Plateau. Chinese Science Bulletin, 2010, 55(20): 2097-2102.
- [6] 单文俊, 王庆贵, 闫国永, 邢亚娟. 基于土壤微生物的碳氮互作效应综述. 中国农学通报, 2016, 32(23): 65-71.
- [7] 沈菊培, 贺纪正. 微生物介导的碳氮循环过程对全球气候变化的响应. 生态学报, 2011, 31(11): 2957: 2967.
- [8] 吴建国,吕佳佳. 气候变化对青藏高原高寒草甸适宜气候分布范围的潜在影响. 草地学报, 2009, 17(6): 699-705.
- [9] 芦晓飞. 西藏米拉山高寒草甸土壤微生物多样性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [10] IPCC. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. IPCC WGI Fourth Assessment Report, Geneva: Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007.
- [11] 付晓青,李勇. 土壤氧化亚氮排放时空变异性及其方法研究进展. 生态学杂志, 2012, 31(3): 724-730.
- [12] Cicerone R J. Analysis of sources and sinks of atmospheric nitrous oxide (N₂O). Journal of Geophysical Research Atmospheres, 1989, 941(D15): 18265-18271.
- [13] 张玉铭, 胡春胜, 张佳宝, 董文旭, 王玉英, 宋利娜.农田土壤主要温室气体(CO₂、CH₄、N₂O)的源/汇强度及其温室效应研究进展. 中国 生态农业学报, 2011, 19(4): 966-975.
- [14] 朱永官, 王晓辉, 杨小茹, 徐会娟, 贾炎. 农田土壤 N.O.产生的关键微生物过程及减排措施. 环境科学, 2014, 35(2): 792-800.
- [15] Zhu X, Burger M, Doane T A, Horwath W R. Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N₂O and NO under low oxygen availability. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(16): 6328-6333.
- [16] 王海涛,郑天凌,杨小茹.土壤反硝化的分子生态学研究进展及其影响因素.农业环境科学学报,2013,32(10):1915-1924.
- [17] 张佳华. 中国藏北地区生态环境与气象灾害遥感. 北京: 气象出版社, 2007: 17-17.
- [18] 西藏自治区土地管理局、畜牧局、西藏自治区草地资源.北京:科学出版社,1994:371-372.
- [19] 西藏自治区土地管理局. 西藏自治区土壤资源. 北京:科学出版社, 1994: 683-697.
- [20] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49(3): 401-417.
- [21] Jung J, Yeom J, Kim J, Han J, Lim H S, Park H, Hyun S, Park W. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. Research in Microbiology, 2011, 162(10): 1018-1026.
- [22] Zheng Y, Yang W, Hu H W, Kim Y C, Duan J C, Luo C Y, Wang S P, Guo L D. Ammonia oxidizers and denitrifiers in response to reciprocal elevation translocation in an alpine meadow on the Tibetan Plateau. Journal of Soils and Sediments, 2014, 14(6): 1189-1199.
- [23] Penton C R, Louis D S, Pham A, Cole J R, Wu L Y, Luo Y Q, Schuur E A G, Zhou J Z, Tiedje J M. Denitrifying and diazotrophic community responses to artificial warming in permafrost and tallgrass prairie soils. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 746.
- [24] Zhang X M, Liu W, Schloter M, Zhang G M, Chen Q S, Huang J H, Li L H, Elser J J, Han X G. Response of the abundance of key soil microbial nitrogen-cycling genes to multi-factorial global changes. PLoS One, 2013, 8(10): e76500.
- [25] 武丹丹, 井新, 林笠, 杨新宇, 张振华, 贺金生. 青藏高原高寒草甸土壤无机氮对增温和降水改变的响应. 北京大学学报: 自然科学版, 2016, 52(5): 959-966.
- [26] Ding K, Zhong L, Xin X P, Xu Z H, Kang X M, Liu W J, Rui Y C, Jiang L L, Tang L, Wang Y F. 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(3): 683-693.
- [27] Dandie C E, Burton D L, Zebarth B J, Henderson S L, Trevors J T, Goyer C. Changes in bacterial denitrifier community abundance over time in an agricultural field and their relationship with denitrification activity. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(19): 5997-6005.
- [28] Clark I M, Buchkina N, Jhurreea D, Goulding K W T, Hirsch P R. Impacts of nitrogen application rates on the activity and diversity of denitrifying

bacteria in the Broadbalk Wheat Experiment. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2012, 367 (1593): 1235-1244.

- [29] Pajares S, Bohannan B J M. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1045.
- [30] Szukics U, Abell G C, Hödl V, Mitter B, Sessitsch A, Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S. Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(3): 395-406.
- [31] Wertz S, Goyer C, Zebarth B J, Burton D L, Tatti E, Chantigny M H, Filion M. Effects of temperatures near the freezing point on N₂O emissions, denitrification and on the abundance and structure of nitrifying and denitrifying soil communities. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 83(1): 242-254.
- [32] Braker G, Schwarz J, Conrad R. Influence of temperature on the composition and activity of denitrifying soil communities. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 73(1): 134-148.
- [33] Yergeau E, Bokhorst S, Kang S, Zhou J Z, Greer C W, Aerts R, Kowalchuk G A. Shifts in soil microorganisms in response to warming are consistent across a range of Antarctic environments. The ISME Journal, 2012, 6(3): 692-702.
- [34] Jha N, SaggarS, Giltrap D, Tillman R, Deslippe J R. Soil properties impacting denitrifier community size, structure, and activity in New Zealand dairy-grazed pasture. Biogeosciences Discuss, 2016, doi:10.5194/bg-2016-390.
- [35] Hamonts K, Clough T J, Stewart A, Clinton P W, Richardson A E, Wakelin S A, O'Callaghan M, Condron L M. Effect of nitrogen and waterlogging on denitrifier gene abundance, community structure and activity in the rhizosphere of wheat. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 83 (3): 568-584.
- [36] Bateman E J, Baggs E M. Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. Biology and Fertility of Soils, 2005, 41(6): 379-388.
- [37] Diba F, Shimizu M, Hatano R. Effects of soil aggregate size, moisture content and fertilizer management on nitrous oxide production in a volcanic ash soil. Soil Science and Plant Nutrition, 2011, 57(5); 733-747.
- [38] Wang Z, Luo T X, Li R C, Tang Y H, Du M Y. Causes for the unimodal pattern of biomass and productivity in alpine grasslands along a large altitudinal gradient in semi-arid regions. Journal of Vegetation Science, 2013, 24(1): 189-201.
- [39] Guo G X, Kong W D, Liu J B, Zhao J X, Du H D, Zhang X Z, Xia P H. Diversity and distribution of autotrophic microbial community along environmental gradients in grassland soils on the Tibetan Plateau. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(20): 8765-8776.