

DOI: 10.5846/stxb201901200157

陈梨, 郑荣波, 郭雪莲, 侯亚文. 不同放牧对滇西北高原泥炭沼泽土壤氨氧化微生物群落的影响. 生态学报, 2020, 40(7): 2321-2332.

Chen L, Zheng R B, Guo X L, Hou Y W. Effects of different grazing forms on ammonia-oxidizing microorganism communities in peat swamp soils of Northwest Yunnan. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(7): 2321-2332.

## 不同放牧对滇西北高原泥炭沼泽土壤氨氧化微生物群落的影响

陈 梨<sup>1,2</sup>, 郑荣波<sup>3</sup>, 郭雪莲<sup>1,2,\*</sup>, 侯亚文<sup>1,2</sup>

1 西南林业大学国家高原湿地研究中心, 昆明 650224

2 西南林业大学国家高原湿地学院, 昆明 650224

3 西南林业大学化学工程学院, 昆明 650224

**摘要:** 氨氧化由氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)共同执行, 是土壤硝化过程的第一步和限速步骤。放牧过程中, 动物啃食、排泄和践踏等行为将影响土壤氨氧化微生物群落, 但目前关于不同类型放牧对湿地氨氧化微生物群落结构及其多样性的影响尚不清楚。利用 Illumina Miseq 高通量测序技术, 对比研究牦牛放牧和藏香猪放养两种放牧类型对泥炭沼泽土壤氨氧化微生物群落结构及其多样性的影响。结果表明, 牦牛放牧显著增加土壤容重, 显著降低土壤 pH、TN、TOC、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量; 藏香猪放养显著增加土壤 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量和硝化潜势(PNR)。牦牛放牧显著降低土壤 AOA 的丰富度和 AOB 的  $\alpha$  多样性, 藏香猪放养降低土壤 AOA 的  $\alpha$  多样性和 AOB 的丰富度。放牧显著降低泉古菌门(Crenarchaeota)的相对丰度。AOA 的  $\alpha$  多样性与土壤 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量和 PNR 呈显著负相关。AOB 的  $\alpha$  多样性与 pH、TOC、TN 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量呈显著正相关。放牧影响下土壤 pH、TN 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量的变化是影响 AOA 群落结构的主要因素。藏香猪放养对 AOA 和 AOB 群落的影响更显著, 由放牧引起的土壤环境条件的变化是导致氨氧化微生物群落发生改变的重要因素。

**关键词:** 氨氧化古菌; 氨氧化细菌; 不同放牧; 泥炭沼泽土壤; 硝化潜势

## Effects of different grazing forms on ammonia-oxidizing microorganism communities in peat swamp soils of Northwest Yunnan

CHEN Li<sup>1,2</sup>, ZHENG Rongbo<sup>3</sup>, GUO Xuelian<sup>1,2,\*</sup>, HOU Yawen<sup>1,2</sup>

1 National Plateau Wetland Research Center, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

2 Wetland College, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

3 Faculty of Chemical Engineering, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

**Abstract:** Ammonia-oxidation, performed by both ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA), is the first and rate-limiting step for soil nitrification process. In the process of grazing, the animal feeding, excretion and trampling will affect the ammonia-oxidizing microorganism communities, while it is unclear whether the different grazing forms will affect the community structure and diversity of ammonia-oxidizing microorganism in wetlands. We investigated the diversity and community structure of the AOA and AOB with different grazing forms in peat swamp soils by Illumina Miseq high-throughput sequencing technology. The results showed that yak grazing significantly increased the bulk density, reduced soil pH, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, TN, TOC and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N content. The stocking of Tibetan spiced pig significantly increased soil NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N content and potential nitrification rate (PNR). Yak grazing significantly reduced the richness of AOA and the  $\alpha$

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(41563008); 云南省高原湿地科学创新团队项目(2012HC007)

**收稿日期:** 2019-01-20; **网络出版日期:** 2019-12-26

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: guoxuelian2009@hotmail.com

diversity of AOB. The stocking of Tibetan pigs reduced the  $\alpha$  diversity of AOA and the richness of AOB. The grazing significantly reduced the relative abundance of *Crenarchaeota*. The  $\alpha$  diversity of AOA was significantly negative correlated with soil  $\text{NO}_3^-$ -N content and PNR. The  $\alpha$  diversity of AOB was significantly positive correlated with pH, TOC, TN and  $\text{NH}_4^+$ -N content. The change of the pH, TN and  $\text{NO}_3^-$ -N content in soil was the main factor affecting the community structure of AOA with the different grazing forms. The stocking of Tibetan spiced pig had more significant effect on the AOA and AOB community. The change of soil environmental conditions caused by grazing was an important factor leading to the change of ammonia-oxidizing microorganism communities.

**Key Words:** ammonia-oxidizing bacteria; ammonia-oxidizing archaea; different grazing; peat swamp soils; potential nitrification rate

氮素是生态系统中最重要营养元素之一<sup>[1]</sup>,硝化作用是氮循环的关键步骤,其导致氨( $\text{NH}_4^+$ )氧化为亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-$ ),再氧化为硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ ),释放副产物  $\text{N}_2\text{O}$ <sup>[2]</sup>。 $\text{N}_2\text{O}$  是主要的温室气体之一,其在大气中对全球增温的潜势值是  $\text{CO}_2$  的 298 倍<sup>[3]</sup>。氨氧化是土壤硝化作用的第一和限速步骤<sup>[4]</sup>,主要由携带单加氧酶的氨氧化古菌(ammonia oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB)在有氧的条件下将氨氧化为亚硝酸盐<sup>[5-7]</sup>。研究表明, AOA 和 AOB 在各种湿地中广泛分布<sup>[8-10]</sup>。氨氧化微生物群落结构及其多样性的变化受到 pH、有机碳(TOC)、氨浓度、湿度及水分等环境因子的影响<sup>[11-13]</sup>。另外,土壤的硝化潜势(Potential nitrification rate, PNR)也影响 AOB 和 AOA 功能基因的变化<sup>[1,14]</sup>。AOA 和 AOB 对复杂的土壤环境有不同的反应<sup>[15]</sup>。在酸性土壤环境中, AOA 在硝化作用过程中占主导地位<sup>[16]</sup>,而在富含氮或碱性环境中, AOB 主导硝化作用<sup>[17]</sup>。

放牧过程伴随着植物的啃食,牲畜践踏及排泄物的输入<sup>[18]</sup>,使土壤的环境因子发生改变<sup>[6,19]</sup>,势必影响 AOA 和 AOB 群落结构和多样性,进而影响土壤氮循环过程。大量研究表明,放牧影响土壤微生物多样性和群落组成<sup>[6, 20-22]</sup>, Olivera 等<sup>[23]</sup>的研究发现不同放牧强度对不同植被覆盖的区域土壤细菌多样性的影响不同。Suleima 等<sup>[24]</sup>的研究发现猪粪肥(多种动物的排泄物和水混合)的施用降低土壤 AOB 的多样性,改变其群落结构, Orwin 等<sup>[25]</sup>研究发现在草原生态系统中,牛尿液的施用改变土壤 AOB 的群落结构。但目前关于不同放牧类型对泥炭沼泽土壤氨氧化微生物群落组成及其多样性的影响鲜见报道。

滇西北是云南高原湿地的集中分布区,地处少数民族聚集的农牧交错带,放牧是当地湿地资源利用的主要途径。滇西北高原纳帕海湿地是受放牧干扰最严重最典型的区域,主要的放牧类型是牦牛放牧和藏香猪放养。牦牛放牧主要是践踏土壤、取食植物地上部分,藏香猪放养主要是对原位土壤进行剧烈翻拱扰动,破坏地表植物,使表层土壤裸露,破坏地下草根层造成土壤结构发生改变<sup>[26]</sup>。目前,纳帕海藏猪的载畜量达到 115 头/ $\text{km}^2$ ,已远超过当地的承载率是 40 头/ $\text{km}^2$ ,藏香猪放养破坏纳帕海湿地面积约总面积的 5%<sup>[27]</sup>。放牧干扰会影响湿地土壤理化性质和 PNR,影响土壤 AOA 和 AOB 群落,进而导致高原湿地氮循环的过程发生改变。因此,研究放牧活动对 AOA 和 AOB 群落结构及其多样性的影响对于预测放牧对湿地氮循环的影响至关重要。本研究选取滇西北高原泥炭沼泽湿地围栏禁牧区和长期放牧区为研究区,研究放牧干扰(牦牛放牧和藏香猪放养)对泥炭沼泽土壤理化性质,PNR, AOA 和 AOB 群落结构及其多样性的影响,并通过分析土壤理化性质、PNR 和 AOA 和 AOB 群落结构及其多样性之间的关系,阐明放牧对泥炭沼泽土壤氨氧化功能影响的内在机制,为湿地土壤微生物对放牧干扰的响应机制研究提供理论基础,为滇西北高原湿地放牧管理提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究区的概况

研究区位于滇西北高原的纳帕海国际重要湿地(99°35'—99°43' E, 27°47'—27°55' N)内的泥炭沼泽湿

地。纳帕海湿地属于青藏高原与亚热带季风气候区和中南半岛热带季风区的结合部,行政上隶属云南省迪庆藏族自治州香格里拉市,平均海拔 3260m。纳帕海发育于石灰岩母质的中甸高原上,受喀斯特作用的强烈影响,湖盆底部被蚀穿而形成落水洞,湖水在地下汇集后从北部穿过小背斜出露形成支流汇入金沙江。湖盆四周山岭环绕,从湖盆中心至湖岸生长着大量的水生和陆生植被,湖滨有较大面积的沼泽和沼泽化草甸,周围山上生长硬叶常绿阔叶林和云杉(*Picea likiangensis*)冷杉(*Abies georgei*)针叶林以及灌丛。具有高寒、年均温低、霜期长、气温年较差和日较差大、干湿季节分明等特点。年均温为 5.4℃,年降水量为 619.9mm,主要集中在 6—8 月<sup>[28]</sup>。土壤类型以草甸土、沼泽化草甸土、沼泽土和泥炭土为主。

## 1.2 实验样地设计

实验地选择在纳帕海国际重要湿地哈木谷村神湖附近的泥炭沼泽地(图 1)。该区域土壤类型为典型泥炭沼泽土,地表无积水,土壤饱和,植被主要有水葱(*Schoenoplectus tabernaemontani*)、苔草(*Carex*)、杉叶藻(*Hippuris vulgaris*)、矮地榆(*Sanguisorba filiformis*)等。本研究选取土壤类型、水文和地貌特征相对一致的区域设置样地。选择地表植被未受啃食,土壤未受到干扰,禁止放牧的区域设置为对照区(CK)。在受牦牛放牧干扰,地表植被被啃食,土壤被牦牛践踏压实,且地上部分植物群落结构遭受到严重破坏的区域设置牦牛放牧区(YT);在地表植物和土壤草根层受到藏香猪翻拱扰动破坏,表层土壤裸露,具有典型猪拱斑块的区域藏香猪放养区(PA)。在对照区、牦牛放牧区和藏香猪放养区分别设置 10m×10m 的样地,沿样地的对角线分别选取 3 个 1m×1m 的小样方。每个小样方以“s”形采样,用直径 5cm 的土壤钻取土柱 0—10cm 的土壤,每 5 个小样方混合为一个样品,每个处理有 3 个重复样品。剔除土壤中可见的石块和动植物残体后,土样用无菌自封袋保存于液氮中,带回实验室过 2mm 筛后一部分保存于-80℃超低温冰箱,用于分子生物学分析;另一部分土样自然风干,用于测定土壤基本化学性质。

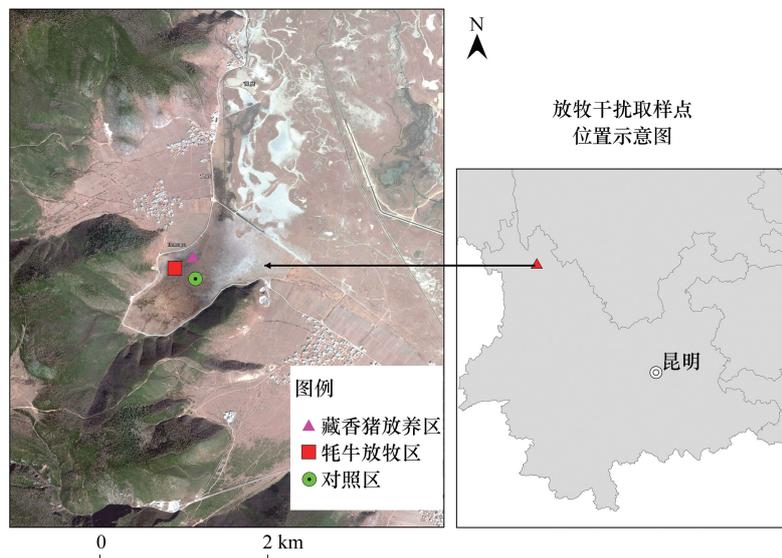


图 1 实验样地

Fig.1 Experimental plots

## 1.3 土壤基本理化性质和潜在硝化势的测定

土壤容重(Bulk density)的测定采用环刀法,土壤含水量(Moisture content)的测定采用烘干法,土壤 pH 用复合电极(MP551,中国)以土水比 1:5 中测定,土壤总氮(TN)、总磷(TP)、硝态氮( $\text{NO}_3^-$ -N)、铵态氮( $\text{NH}_4^+$ -N)含量采用连续流动分析仪(Skalar San++)测定,TOC 采用总有机碳分析仪测定。PNR 的测定采用 Kurola 等<sup>[29]</sup>的氯酸钾抑制法,以  $\text{mg NO}_2^-$ -N  $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  干土表示土壤硝化潜势。

#### 1.4 土壤 DNA 提取

土壤样品的总 DNA 提取采用 Power Soil DNA Isolation Kit 试剂盒(MOBIO 公司,美国)试剂盒,用 0.5g 新鲜土壤完成基因组 DNA 抽提后,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。进一步进行 AOA 和 AOB 的 PCR 扩增。

#### 1.5 氨氧化微生物的测定

AOA 的扩增引物设计为 *Arch-amoA-F* (5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3')/*Arch-amoA-R* (5'-GCGCCATCCATCTGTATGT-3')<sup>[30]</sup> 和 AOB 的扩增引物为 *amoA-1F* (5'-GGGGTTTCTACTGCTGGT-3')/*amoA-2R* (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3')<sup>[31]</sup>。所有 PCR 反应均采用 TransStart FastPfu DNA Polymerase, 20 $\mu$ L 反应体系:4 $\mu$ L 5 \* FastPfu 缓冲液,2 $\mu$ L 2.5mmol/L dNTPs,0.8 $\mu$ L 引物(5 $\mu$ mol/L),0.4 $\mu$ L FastPfu 聚合酶;10ng DNA 模板以及约 10ng DNA 模板,其余的用灭菌水补足。AOB 和 AOA-*amoA* 基因 PCR 反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 变性 5min,然后 27 个循环(95 $^{\circ}$ C 变性 30s,在 55 $^{\circ}$ C 30s,在 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min)。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10s。全部样本按照正式实验条件进行,每个样本 3 个重复,将同一样本的 PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳回收产物,采用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司)进行纯化。并使用 QuantiFluor<sup>TM</sup>-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司)进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。纯化的 PCR 产物使用 NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>TM</sup> DNA 文库制备试剂盒 (Illumina, NEB, USA) 生成测序文库,最后在 Illumina MiSeq 平台上进行高通量测序(凌恩,中国上海)。

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控,使用 FLASH 软件进行拼接;使用 UPARSE 软件 (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>),根据 97%的相似度对序列进行操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTU) 聚类,并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。利用 RDPclassifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对每条序列进行物种分类注释,比对 Silva 数据库 (SSU123),设置比对阈值为 70%。应用软件 Mothur (version v.1.30.1),计算 Chao1 和 ACE 指数,用来估计微生物丰富度,并使用 Shannon 和 Simpson 指数来估计微生物多样性。所有这些指数均使用 QIIME 计算。使用 Weighted unifracs 主坐标分析 (PCoA) 以分析微生物群落  $\beta$  多样性的差异 (R.3.3.2)。

#### 1.6 统计分析

使用 SPSS 软件进行统计分析,以  $P < 0.05$  为统计差异。用单因素方差分析 (ANOVA) 方法,检验处理之间土壤理化性质和氨氧化微生物功能基因多样性的差异显著性。Spearman 等级相关分析用来评估土壤理化性质,PNR 与土壤功能微生物的  $\alpha$  多样性 (Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson) 的相关性。采用 R.3.3.2 软件对 AOA 和 AOB *amoA* 基因序列 OTU 进行维恩 (Venn) 分析。利用 Canoco (4.5) 多元统计模型分析样本空间差异特征,利用蒙特卡罗置换检验分析环境因子对氨氧化微生物群落影响显著水平,用典型对应分析 (Canonical correspondence analysis, CCA),找出对环境变化的敏感微生物。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同放牧对土壤理化性质和硝化潜势的影响

不同放牧对土壤理化性质的影响如表 1 所示,土壤容重表现为  $YT > CK > PA$ ,牦牛放牧增加了土壤容重,而藏香猪放养降低了土壤容重。牦牛放牧显著降低土壤 pH、TN 和 TOC 含量 ( $P < 0.05$ ),但藏香猪放养与对照差异不显著 ( $P > 0.05$ )。牦牛放牧对  $NO_3^-$ -N 含量的影响不显著,藏香猪放养显著增加土壤  $NO_3^-$ -N 含量 ( $P < 0.01$ )。牦牛放牧和藏香猪放养均降低土壤含水量,对土壤 C/N、TP 和  $NH_4^+$ -N 含量的影响不显著 ( $P > 0.05$ )。此外,不同放牧影响下土壤 PNR 表现为  $PA > YT > CK$ ,牦牛放牧和藏香猪放养均增加土壤的 PNR,藏香猪放养对 PNR 的影响更显著 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

表 1 不同放牧对泥炭沼泽土壤理化性质的影响

Table 1 The influence of different grazing on physicochemical properties of peatland

样地 Plots	容重 Bulk density/ (g/cm <sup>3</sup> )	含水量 Moisture content/%	总氮 TN/ (g/kg)	总磷 TP/ (g/kg)	总有机碳 TOC/ (g/kg)	氨态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/ (mg/kg)	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/ (mg/kg)	碳氮比 C/N/ (g/kg)	pH
CK	0.41±0.02b	0.7±0.02a	6.66±1.24a	3.28±1.9b	300.19±25.6a	9.8±2.62a	6.7±3.61b	45.08±9.37a	6.45±0.14a
YT	0.77±0.23a	0.53±0.1a	4.09±0.65b	4.27±2.01a	176.75±35.36b	5.3±1.67a	2.84±3.18b	43.05±1.85a	5.63±0.1b
PA	0.3±0.07b	0.63±0.16a	6.58±0.44a	4.72±0.67a	294.41±34.55a	10.39±1.97a	41.34±8.82a	44.74±4.03a	6.19±0.17a

列内不同的小写字母表示显著性水平  $P < 0.05$ ; 表中数据为平均值±标准差 ( $n = 3$ ); CK: 对照样地 Control; YT: 牦牛放牧区 Yak-grazing; PA: 藏香猪放牧区 Pig-grazing; TN: Total nitrogen; TP: Total phosphorous; TOC: Total organic carbon

## 2.2 不同放牧对土壤氨氧化微生物多样性的影响

### 2.2.1 $\alpha$ 多样性

总体上,平均每一个样本的 AOA 和 AOB 的测序深度分别为 34306、39180 条序列。AOA 及 AOB 的稀释曲线都趋向于平坦的状态,说明测序是合理的(图 3)。

对照区、牦牛放牧区和藏香猪放牧区的土壤均基于 97% 的相似度下,每个样本的 AOA 和 AOB 文库覆盖度都达到 99% (表 2)。AOA 的 OTU 数目、Chao1 和 ACE 指数均表现为 CK>YT>PA, PA 与 CK 和 YT 差异均显著,而 CK 和 YT 差异不显著。AOA 的 Shannon 指数表现为 YT>CK>PA, 而 AOA 的 Simpson 指数表现为 PA>YT>CK ( $P > 0.05$ )。AOB 的 OTU 数目、Chao1 和 ACE 指数均表现为 CK>PA>YT ( $P < 0.05$ ), AOB 的 Shannon 指数表现为 CK>PA>YT, AOB 的 Simpson 指数表现为 YT 高于 PA 和 CK ( $P > 0.05$ )。表明牦牛放牧和藏香猪放牧降低土壤 AOA 和 AOB 的丰富度,藏香猪放牧对 AOA 丰富度的影响更显著,牦牛放牧对 AOB 丰富度的影响更显著。牦牛放牧降低了 AOB 的多样性。藏香猪放牧降低了 AOA 和 AOB 的多样性。

表 2 不同放牧对沼泽湿地土壤 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因多样性指数的影响Table 2 The  $\alpha$ -diversity indices of AOA *amoA* and AOB *amoA* of peat swamp soil with influence of different grazing

微生物 Microbial	样地 Plots	覆盖度 Coverage	OTU 数目 OTU numbers	Chao1 指数 ACE 指数		Shannon 指数 Simpson 指数	
				Chao1 index	ACE index	Shannon index	Simpson index
AOA	CK	0.99	102.00±40.47a	110.00±46.01a	107.00±43.18a	2.13±2.19a	0.17±0.03a
	YT	0.99	84.00±3.56a	84.00±4.32a	84.00±3.56a	2.34±2.12a	0.28±0.07a
	PA	0.99	28.00±9.63b	27.33±10.5b	28.00±9.63b	1.69±1.13b	0.49±0.23a
AOB	CK	0.99	158.00±7.26a	165.33±8.38a	163.67±6.85a	3.27±3.31a	0.08±0a
	YT	0.99	85.67±4.64c	95.33±8.58c	92.00±5.35c	2.70±2.68b	0.35±0.33a
	PA	0.99	119.00±12.36b	126.00±14.51b	124.33±12.5b	3.15±3.06a	0.08±0.01a

同一列内不同的小写字母表示显著性水平  $P < 0.05$ ; 表中数据为平均值±标准差 ( $n = 3$ ); AOA: 氨氧化古菌, ammonia-oxidizing archaea; AOB: 氨氧化细菌, ammonia-oxidizing bacteria; OTU: 操作分类单元, Operational Taxonomic Units; ACE: 基于盖度的估计量, abundance-based coverage estimator

### 2.2.2 $\beta$ 多样性指数

基于 weighted unifrac PCoA 的分析, AOA 的 PC1 和 PC2 分别为 53.01% 和 32.19% (图 4)。CK 和 YT 组间的样本在 PC1 的方向上区分开, 而 CK 与 PA 土壤组间的样本在 PC1 和 PC2 方向上都区分开。排序结果较好

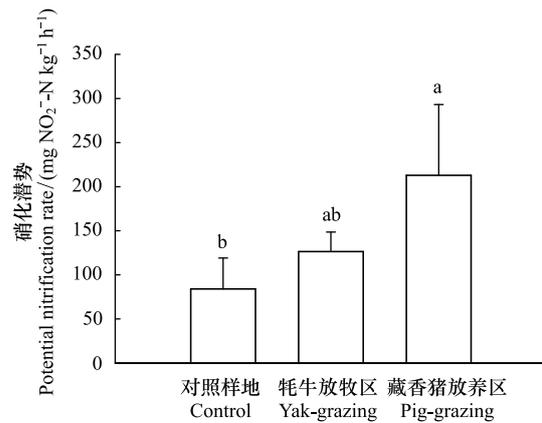


图 2 不同放牧对沼泽湿地土壤硝化潜力的影响

Fig. 2 The influence of different grazing on soil potential nitrification rates of peatland

CK: 对照样地 Control; YT: 牦牛放牧区 Yak-grazing; PA: 藏香猪放牧区 Pig-grazing

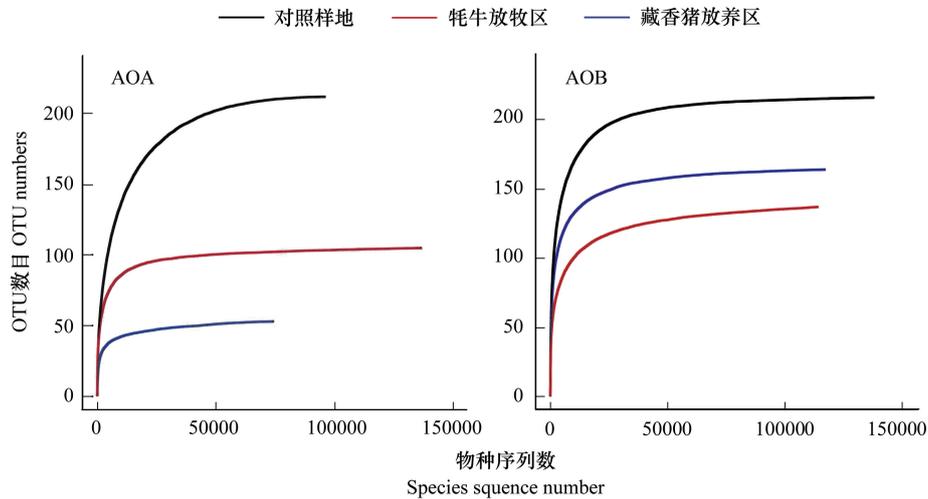


图3 基于 OTU 数目 97%相似度的 AOA 和 AOB 的稀释曲线

Fig.3 Rarefaction curve of the OTU number at 97% similarity for AOA (a) and AOB

OTU:操作分类单元,Operational Taxonomic Units;AOA: 氨氧化古菌,ammonia-oxidizing archaea;AOB: 氨氧化细菌, ammonia-oxidizing bacteria

的反映了土壤微生物群落在对照区、牦牛放牧区和藏香猪放养区的整体状况,且区分度高,表明牦牛放牧和藏香猪放养均对土壤的 AOA 的  $\beta$  多样性的影响比较显著。AOB 的 PC1 和 PC2 分别为 62.40%和 19.82%。CK 在 PC1 的方向与 YT 组间的样本区分开,但与 PA 没有区分开(图 4)。表明牦牛放牧对土壤的 AOB 的  $\beta$  多样性的影响比较显著,而藏香猪放养对 AOB 的  $\beta$  多样性的影响相对比较小。

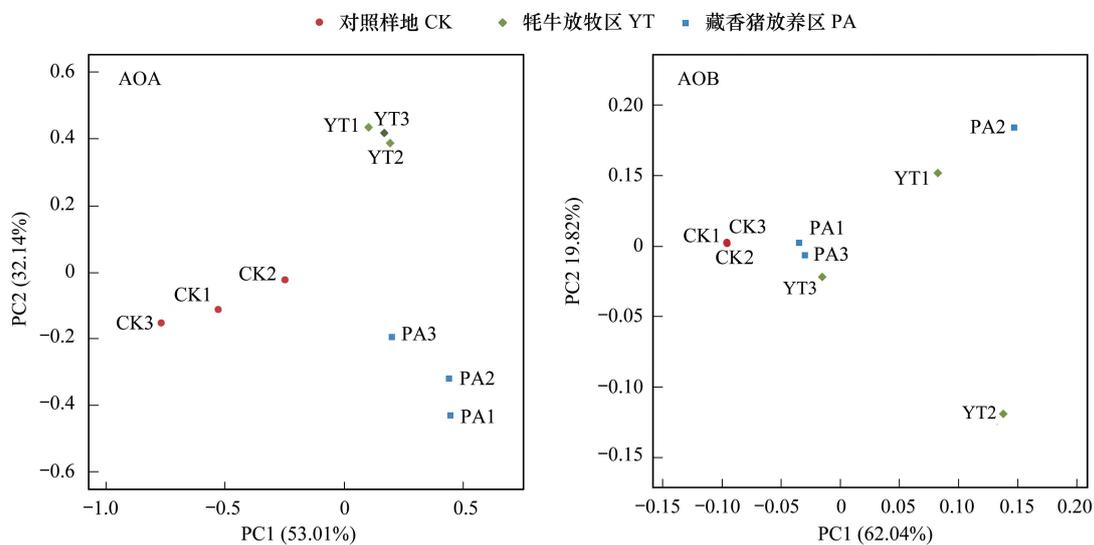


图4 不同放牧对泥炭沼泽土壤 AOA 及 AOB 的  $\beta$  多样性分析

Fig.4 The  $\beta$  diversities of AOA and AOB of peat swamp soil with influence of different grazing

### 2.3 不同放牧对土壤氨氧化微生物群落结构的影响

在 AOA-*amoA* 基因的門分类水平上,泉古菌門(Crenarchaeota)在对照区土壤中相对比重最高,约占 62.8%,在牦牛放牧区和藏香猪放养区土壤中分别占 6.5%和 2.7% (图 5)。在 AOA-*amoA* 基因的属分类水平上,对照区土壤中泉古菌門(Crenarchaeota\_norank)的属占 62.8%,但在牦牛放牧和藏香猪放养区土壤中分别为 6.5%和 2.7%。在 AOB-*amoA* 基因的門分类水平上,变形菌門(Proteobacteria)在对照区土壤中约占 99.9%,

在牦牛放牧区和藏香猪放养区土壤中分别占 97.6% 和 99.0%。在 AOB-*amoA* 基因的属分类水平上,亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*) 在对照区土壤中约占 99.9%,在牦牛放牧区土壤中和藏香猪放养区占 96.1% 和 98.0%。可见,牦牛放牧和藏香猪放养均对土壤 AOA 群落组成影响比较显著,对土壤 AOB 群落组成的影响比较小。

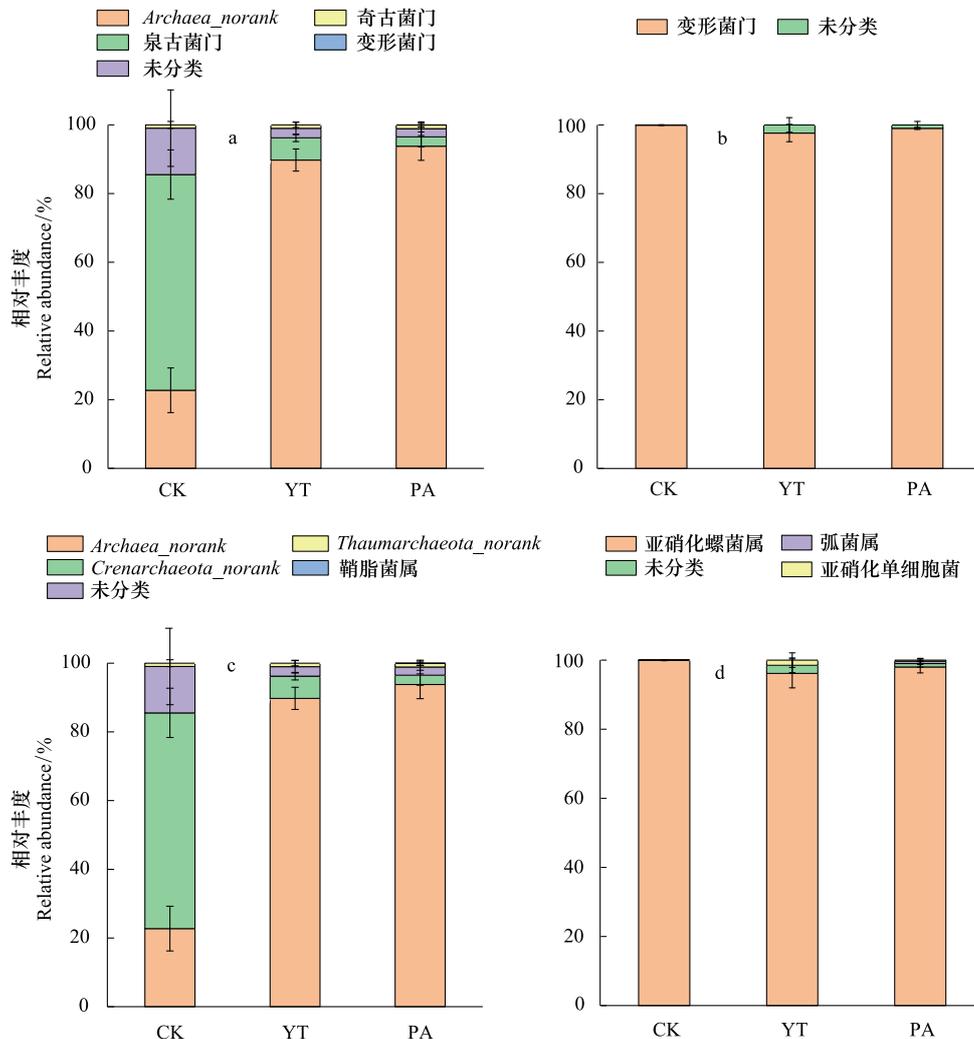


图 5 不同放牧对沼泽湿地土壤 AOA 门(a), AOB 门(b), AOA 属(c)及 AOB 属(d)的相对丰度

Fig.5 Relative abundance of AOA phyla (a), AOB phyla (b), AOA genera (c) and AOB genera (d) of peat swamp soil with influence of different grazing

不同放牧处理中 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因序列 OTU 的 Venn 分析(图 6)。不同放牧影响下 AOA-*amoA* 基因共获得 259 个 AOA-*amoA* 基因序列 OTU,不同放牧共有 OTU 数目为 10 个,占总 OTU 数目的 3.8%。特有的 OTU 数目表现为 CK>YT>PA,不同放牧影响下 AOB-*amoA* 基因序列 OTU 共获得 287 个,不同放牧共有 OTU 为 82 个,占总 OTU 的 28.5%。其中,特有的 OTU 表现为 CK>YT>PA。总体上,不同放牧对 AOA-*amoA* 基因的 OTU 数量和分布影响比 AOB-*amoA* 基因更显著,藏猪放养比牦牛放牧区的特有的 OTU 数目更少。

#### 2.4 土壤理化性质、PNR 与氨氧化微生物群落的关系

由表 3 可知, Pearson 相关分析表明, AOA-*amoA* 基因的丰富度和 Shannon 多样性指数与土壤的  $\text{NO}_3^-$ -N 含量和 PNR 呈显著负相关( $P<0.05$ ), Simpson 多样性指数与 PNR 呈显著正相关( $P<0.05$ )。AOB-*amoA* 基因的丰富度和 Shannon 多样性指数均与 pH ( $P<0.01$ )、TOC、TN 和  $\text{NH}_4^+$ -N 含量显著正相关( $P<0.05$ )。

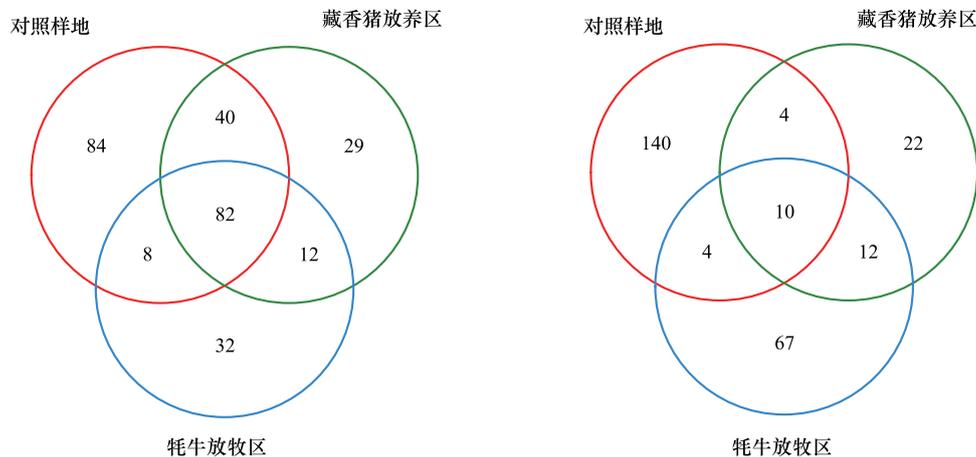


图6 不同放牧 AOA 和 AOB amoA 基因序列 OTU 的 Venn 图

Fig.6 Venn diagram of AOA and AOB amoA genes based on OTU in different grazing

表3 土壤理化性质,PNR 及 AOA 与 AOB 多样性的关系

Table 3 Pearson correlation coefficients between soil properties, PNR, AOA and AOB  $\alpha$ -diversity

微生物 Microbial	项目 Items	容重 Bulk density	pH	总氮 TN	总磷 TP	总有机碳 TOC	氨态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	碳氮比 C/N	硝化潜势 Potential Nitrification rate
	PNR	-0.376	0.002	0.285	0.389	0.290	0.440	0.503	-0.042	1
AOA	Chao1 指数	0.326	0.105	-0.240	-0.187	-0.245	-0.169	-0.720 *	0.086	-0.713 *
	ACE 指数	0.341	-0.085	-0.256	-0.187	-0.262	-0.183	-0.734 *	-0.081	-0.715 *
	Shannon 指数	0.540	-0.145	-0.236	-0.242	-0.366	-0.409	-0.735 *	-0.199	-0.679 *
	Simpson 指数	-0.366	-0.03	-0.044	0.339	0.153	0.331	0.529	0.142	0.699 *
AOB	Chao1 指数	-0.501	0.900 *	0.733 *	-0.055	0.742 *	0.682 *	-0.039	0.155	-0.069
	ACE 指数	-0.551	0.907 **	0.757 *	-0.121	0.778 *	0.688 *	-0.012	0.182	-0.091
	Shannon 指数	-0.621	0.915 **	0.747 *	0.009	0.805 *	0.765 *	0.121	0.235	0.043
	Simpson 指数	0.408	-0.597	-0.534	0.308	-0.594	-0.285	-0.233	-0.220	-0.198

\* 相关系数的显著水平  $P < 0.05$  \*\* 相关系数显著性  $P < 0.01$ . ACE: 基于盖度的估计量, abundance-based coverage estimator

CCA 反应了基于属分类水平上,环境因子对 AOA 和 AOB 群落结构的影响(图7)。AOA-amoA 基因群落的 CCA1 和 CCA2 轴分别为 86.6% 和 12.2%。Monte Carlo 检验显示,土壤 pH、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 TN 含量对 AOA 的群落结构有显著的影响( $P < 0.05$ ),但土壤容重、TN、TP、TOC、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 C:N 等对 AOA 的群落结构没有显著影响( $P > 0.05$ )。AOB-amoA 基因群落的 CCA1 和 CCA2 轴分别是 71.9% 和 26.1%,解释了 AOB 群落结构变异程度 98.0%。Monte Carlo 检验显示,土壤理化性质对 AOB 群落结构变化没有显著的影响( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 放牧对土壤理化性质和 PNR 的影响

牦牛放牧显著增加土壤容重,藏香猪放养降低土壤容重;两者均使土壤含水量降低,原因是牦牛的践踏活动使得土壤紧实度增加,导致容重增加<sup>[6,23,32]</sup>,而藏香猪的翻拱扰动作用使得表层土壤疏松、土壤孔隙度增大,导致土壤容重下降<sup>[32]</sup>;放牧过程中牲畜啃食地表植被,降低植被覆盖率,增加表层土壤水分的蒸发<sup>[23,33]</sup>。藏香猪放养使土壤 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量显著增加,牦牛放牧使土壤 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量略有降低。原因是放牧伴随着牲畜排泄物的输入<sup>[22,34]</sup>;导致 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量的增加,但牦牛的践踏使得土壤紧实度增加,容重上升,通气性变差,土壤有机质矿化作用减弱,导致其 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量降低<sup>[35]</sup>,藏香猪的翻拱使得土壤疏松透气,氮矿化作用加强,增加

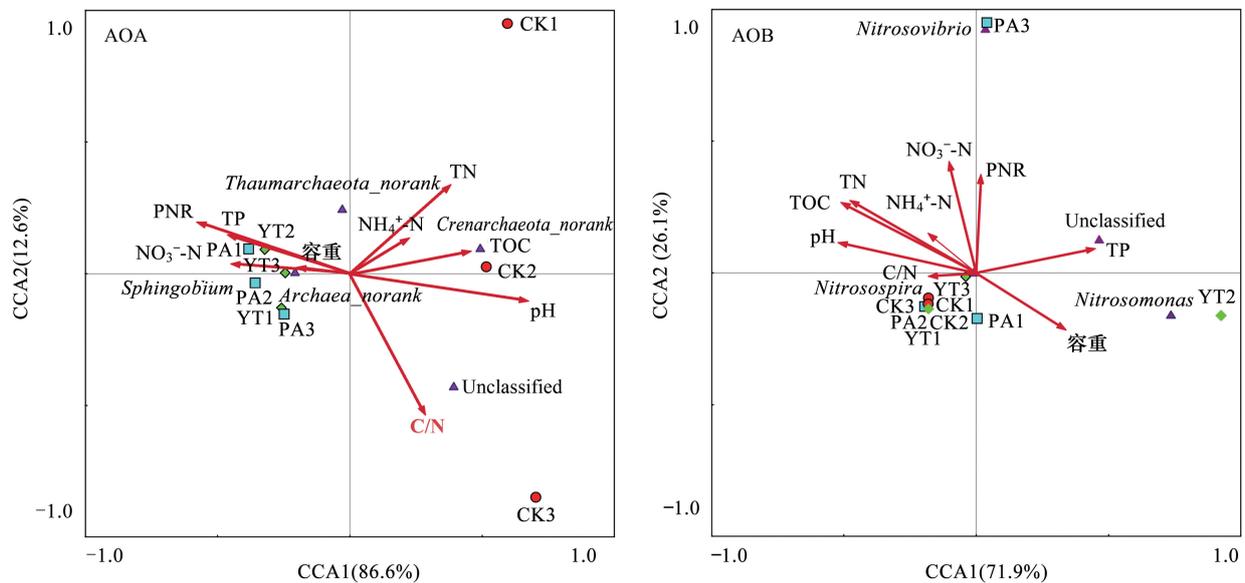


图7 土壤 AOA-amoA 和 AOB-amoA 基因群落组成和环境因子的典型对应分析

Fig.7 Canonical correspondence analysis of relationship between the environmental factors and community structures of AOA-amoA gene and AOB-amoA gene

Archae\_norank; 属于古菌门; Crenarchaeota\_norank; 属于泉古菌门; unclassified; 未分类的菌; Thaumarchaeota\_norank; 属于奇古菌门; sphingobium; 鞘脂菌属; Nitrosospira; 亚硝化螺菌属; Nitrosomonas; 亚硝化单细胞菌; Nitrosovibrio; 弧菌属; pH; 土壤 pH; TN; 总氮 Total nitrogen content; TP; 总磷 Total phosphorus; TOC; 总有机碳 Total organic carbon;  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ; 铵态氮 Ammonium nitrogen;  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ; 硝态氮 Nitrate content; PNR; 硝化潜势 Potential nitrification rate

土壤的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  含量。牦牛放牧显著降低土壤 pH 和 TN 和 TOC 含量,藏香猪放养对土壤 pH、TN 和 TOC 含量的降低不明显。放牧过程中虽伴随着动物排泄物的返还,由于使地表植被大量啃食,减少土壤有机物质的返还。研究表明,长期放牧通过减少植被的覆盖率和压实和侵蚀土壤,导致土壤的理化性质退化<sup>[19]</sup>;藏香猪的翻拱扰动使地表植物根系裸露死亡,短期内有机质返还增加,但长期作用会加剧土壤 TN 和 TOC 含量的降低<sup>[36]</sup>。牦牛放牧和藏香猪放养均增加了土壤 PNR,原因是放牧过程中牲畜排泄物输入导致土壤 PNR 增加<sup>[37]</sup>。此外,放牧过程中土壤个体微生物硝化生物体或群落结构的生理活性的变化也会影响土壤 PNR 的变化<sup>[38]</sup>。

### 3.2 放牧对土壤氨氧化微生物多样性的影响

放牧对微生物多样性的影响依赖于环境条件、土壤特性、植凋落物质量和数量、放牧强度和动物类型的综合作用<sup>[39]</sup>。藏香猪放养和牦牛放牧均降低土壤 AOA 的多样性,但牦牛放牧对 AOA 的多样性的影响不显著。研究表明,在放牧最严重的地区, AOA 的多样性最低<sup>[40]</sup>;适量的尿素可增加 AOA 的多样性,而长期施加尿素降低 AOA 的多样性<sup>[41]</sup>,动物尿液中含有 90% 的尿素<sup>[42]</sup>。牦牛放牧和藏香猪放养过程中由于干扰强度和排泄物的输入不同会对土壤 AOA 多样性产生不同的影响。牦牛放牧显著降低土壤 AOB 的多样性 ( $P < 0.05$ ),但藏香猪放养对土壤 AOB 的多样性的影响不显著。这与研究发现在放牧强度最严重地区, AOB 的多样性最高不一致<sup>[40]</sup>,原因是在本研究中受放牧影响的土壤 pH、TOC 和总氮含量没有出现向高水平转化,而是比未受干扰的对照区的土壤更低。也有研究表明,放牧降低了土壤微生物的多样性<sup>[33]</sup>。牦牛放牧和藏香猪放养均降低土壤 AOA 和 AOB 的丰富度,藏香猪放养和牦牛放牧分别对 AOA 和 AOB 丰富度的影响更显著。这主要是不同的放牧方式对土壤养分的影响不同,微生物多样性的变化还会受到其他综合环境因素的影响。

AOA-amoA 基因的丰富度和多样性 Shannon 指数与土壤的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  含量呈显著负相关 ( $P < 0.05$ )。已有研究发现,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  含量的变化会影响 AOA-amoA 基因的多样性<sup>[43-44]</sup>。本研究发现, AOB-amoA 基因的丰富度和

多样性与 pH、TOC 和 TN 显著正相关。Dai 等<sup>[14]</sup>研究表明,土壤 TN 和 TOC 是影响 AOB 多样性的重要因素,土壤有机质含量越高,微生物群落多样性越高。此外,AOB 的多样性与 pH 和 TN 呈正相关关系<sup>[44]</sup>。牦牛放牧区的 pH、TOC 和 TN 含量最低,导致其 AOB 多样性显著降低( $P < 0.05$ ),而藏香猪放养区的 pH、TOC 和 TN 相对较高,AOB 多样性降低不明显( $P > 0.05$ )。此外,PNR 与 AOA 多样性呈显著负相关,表明在泥炭沼泽土壤中 AOA 群落对硝化作用的影响比较大。较高的细菌多样性可表明其在氨氧化过程具有更高的生态系统功能<sup>[45]</sup>,放牧活动使氨氧化微生物多样性降低,影响其生态系统功能。

AOA 与 AOB 的群落组成随环境因素变化而发生改变<sup>[43]</sup>。牦牛放牧和藏香猪放养活动改变了氨氧化微生物的群落组成,原因是这两种放牧活动导致土壤环境因子发生了改变。

### 3.3 放牧对氨氧化微生物群落结构的影响

大量的研究发现放牧影响 AOA 和 AOB 群落结构<sup>[6,33]</sup>。CCA 结果显示,土壤 pH、TN 和  $\text{NO}_3^-$ -N 含量对 AOA 群落具有显著影响( $P < 0.05$ )。这与 Gubry-Rangin 等<sup>[46]</sup>的研究发现土壤 pH 的变化是导致 AOA 群落结构发生显著变化的主要因素一致。也有研究表明土壤 pH、TN 和  $\text{NO}_3^-$ -N 含量的变化会影响硝化细菌群落结构的变化<sup>[15]</sup>。本研究发现土壤环境因子对 AOB 群落结构变异程度的解释为 98.0%,但 Monte Carlo 检验并没有显示单一的土壤理化性质和 PNR 对 AOB 的群落结构产生显著的影响( $P > 0.05$ ),表明在泥炭沼泽湿地中 AOB 群落结构并不受单一的土壤环境因子的影响,而是受各种环境因子的综合作用。因此,牦牛放牧和藏香猪放养导致环境因子发生改变是改变 AOA-*amoA* 群落结构的重要因素。在门的分类水平上,牦牛放牧和藏香猪放养均对 AOB 群落的相对丰度影响不显著,但对 AOA 群落的相对丰度的影响比较显著。AOB-*amoA* 基因门和属分类水平中的 *Proteobacteria* 和 *Nitrosospira* 的相对丰度占的比重比较大,达到 99.9%。这与展鹏飞等<sup>[47]</sup>研究表明高寒草甸泥炭土的主要优势菌为 *Proteobacteria* 的结果十分相近,主要原因是 *Proteobacteria* 具有共营养特性,在土壤有机碳浓度较高的条件下旺盛生长;此外,土壤生态系统中 AOB 群落的组成主要由 *Nitrosospira* 为主<sup>[16,48]</sup>。牦牛放牧和藏香猪放养活动均显著降低了 AOA 基因 *Crenarchaeote* 的相对丰度,且在藏香猪放养区更明显降低。这与放牧后的草地土壤中微生物群落的整体功能基因发生了显著变化一致<sup>[21]</sup>。土壤 AOA 的主要物种是 *Crenarchaeote* 是环境中分布最广的物种之一<sup>[49]</sup>,*Crenarchaeote* 在氨氧化过程中发挥着重要的作用<sup>[50]</sup>。AOA-*amoA* 基因相对丰度的改变势必会影响土壤中氨氧化功能,导致其土壤的硝化作用发生改变。本研究表明在泥炭沼泽土壤中,AOA 的群落结构更易受放牧干扰的影响,藏香猪放养比牦牛放牧对 AOA 群落结构的影响更强烈。

## 4 结论

(1) 牦牛放牧增加土壤容重和 PNR,降低土壤自然含水量、pH、 $\text{NH}_4^+$ -N、TN、TOC 和  $\text{NO}_3^-$ -N 含量;藏香猪放养降低土壤容重和含水量,增加土壤  $\text{NO}_3^-$ -N 含量和 PNR。

(2) 牦牛放牧降低土壤 AOA 的丰富度和 AOB 的  $\alpha$  多样性,改变土壤 AOA 和 AOB 的  $\beta$  多样性;藏香猪放养降低土壤 AOB 的丰富度和 AOA 的  $\alpha$  多样性,二者均降低 *Crenarchaeota* 的相对丰度。藏香猪放养对土壤  $\alpha$  多样性和群落结构的影响比牦牛放牧更显著。

(3) 由放牧所引起的 pH、 $\text{NO}_3^-$ -N 和 TP 含量的改变是导致 AOA 群落结构显著变化的主要因素。牦牛放牧和藏香猪放养明显改变了土壤 AOA 和 AOB 的群落,藏香猪放养对其影响更显著。表明放牧影响湿地生态系统的氮循环过程和土壤的生态系统功能,长期的过度藏香猪放养更不利于维持湿地生态系统的稳定。

### 参考文献 (References):

- [ 1 ] 高俊琴, 欧阳华, 张锋, 王春梅. 若尔盖高寒湿地土壤氮矿化对温度和湿度的响应. 湿地科学, 2008, 6(2): 229-234.
- [ 2 ] Cai Y J, Chang S X, Cheng Y. Greenhouse gas emissions from excreta patches of grazing animals and their mitigation strategies. Earth-Science Reviews, 2017, 171: 44-57.
- [ 3 ] IPCC. Climate Change 2007: The Physical Science Basis: Report of Working Group I of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

- Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007.
- [ 4 ] Li C Y, DiH J, Cameron K C, Podolyan, A, Zhu B C. Effect of different land use and land use change on ammonia oxidiser abundance and N<sub>2</sub>O emissions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96:169-175.
- [ 5 ] Che J, Zhao X Q, Zhou X, Jia Z.J, Shen R F. High pH-enhanced soil nitrification was associated with ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea in acidic soils. *Applied Soil Ecology*, 2015, 85:21-29.
- [ 6 ] Pan H, Liu H Y, Liu Y W, Zhang Q C, Luo Y, Liu X M, Liu Y M, Xu J M, Di H J, Li Y. Understanding the relationships between grazing intensity and the distribution of nitrifying communities in grassland soils. *Science of the Total Environment*, 2018, 634: 1157-1164.
- [ 7 ] Xu X Y, Liu X R, Li Y, Ran Y, Liu Y P, Zhang Q C, Li Z, He Y, Xu J M, Di H J. High temperatures inhibited the growth of soil bacteria and archaea but not that of fungi and altered nitrous oxide production mechanisms from different nitrogen sources in an acidic soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 107: 168-179.
- [ 8 ] Lee K H, Wang Y F, Li H, Gu J D. Niche specificity of ammonia-oxidizing archaeal and bacterial communities in a freshwater wetland receiving municipal wastewater in Daqing, Northeast China. *Ecotoxicology*, 2014, 23 (10): 2081-2091.
- [ 9 ] Chen J, Gu J D. Faunal Burrows Alter the Diversity, Abundance, and Structure of AOA, AOB, Anammox and n-Damo Communities in Coastal Mangrove Sediments. *Microbial Ecology*, 2017, 74 (1): 140-156.
- [ 10 ] 郑有坤, 王宪斌, 辜运富, 张小平. 若尔盖高原湿地土壤氨氧化古菌的多样性. *微生物学报*, 2014, 54 (9): 1090-1096.
- [ 11 ] Bernhard A E, Bollmann A. Estuarine nitrifiers: New players, patterns and processes. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2010, 88(1):1-11.
- [ 12 ] Erguder T H, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *Fems Microbiology Reviews*, 2009, 33(5):855-869.
- [ 13 ] Yan L, Li Z G, Wang G X, Gao Y M, Wang Y J, Gu J D, Wang W D. Diversity of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in response to different aeration rates during cattle manure composting. *Ecological Engineering*, 2016, 93: 46-54.
- [ 14 ] Dai Y, Wu Z, Zhou Q H, Zhao Q, Li N N, Xie S G, Liu Y. Activity, abundance and structure of ammonia-oxidizing microorganisms in plateau soils. *Research in Microbiology*, 2015, 166(8): 655-663.
- [ 15 ] Liu H Y, Li J, Zhao Y, Xie K X, Tang X J, Wang S X, Li Z P, Liao Y L, Xu J M, Di H J, Li Y. Ammonia oxidizers and nitrite-oxidizing bacteria respond differently to long-term manure application in four paddy soils of south of China. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 641-648.
- [ 16 ] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, He J Z. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The Isme Journal*, 2012, 6(5):1032-1045.
- [ 17 ] Ouyang Y, Norton J M, Stark J M, Reeve J R, Habteselassie M Y. Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96:4-15.
- [ 18 ] Le Roux X, Bardy M, Loiseau P, Louault F. Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: do changes in plant species composition matter?. *Oecologia*, 2003, 137(3):417-425.
- [ 19 ] Cubillos A M, Vallejo V E, Arbeli Z, Terán W, Dick R P, Molina C H, Molina E, Roldan F. Effect of the conversion of conventional pasture to intensive silvopastoral systems on edaphic bacterial and ammonia oxidizer communities in Colombia. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 72:42-50.
- [ 20 ] Xie Z, Le Roux X, Wang C P, Gu Z K, An M, Nan H Y, Chen B Z, Li F, Liu Y G, Du G Z, Feng H Y, Ma X J. Identifying response groups of soil nitrifiers and denitrifiers to grazing and associated soil environmental drivers in Tibetan alpine meadows. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 77: 89-99.
- [ 21 ] Wang M M, Wang S P, Wu L W, Xu D P, Liu Q Y, Hu Y G, Li X Z, Zhou J Z, Yang Y F. Evaluating the lingering effect of livestock grazing on functional potentials of microbial communities in Tibetan grassland soils. *Plant and Soil*, 2016, 407(1/2): 385-399.
- [ 22 ] 孙翼飞, 沈菊培, 张翠景, 韩国栋, 红梅, 赵巴音那木拉, 贺纪正. 不同放牧强度下土壤氨氧化和反硝化微生物的变化特征. *生态学报*, 2018, 38(8): 2874-2883.
- [ 23 ] Olivera N L, Prieto L, Bertiller M B, Ferrero MA. Sheep grazing and soil bacterial diversity in shrublands of the Patagonian Monte, Argentina. *Journal of Arid Environments*, 2016, 125:16-20.
- [ 24 ] Suleiman A K A, Gonzatto R, Aita C, Lupatini M, Jacques R J S, Kuramae E E, Antoniolli Z I, Roesch L FW. Temporal variability of soil microbial communities after application of dicyandiamide-treated swine slurry and mineral fertilizers. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 97: 71-82.
- [ 25 ] Orwin K H, Bertram J E, Clough T J, Condon L M, Sherlock R R, O'Callaghan M., Ray J, Baird D B. Impact of bovine urine deposition on soil microbial activity, biomass, and community structure. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44(1): 89-100.
- [ 26 ] 陈广磊, 田昆, 王行, 张贇, 孙梅, 刘振亚, 张晓宁, 肖德荣. 高原湿地纳帕海土壤持水力对不同放牧的响应. *水土保持学报*, 2016, 30(4): 123-129, 141-141.
- [ 27 ] 唐明艳, 杨永兴. 不同人为干扰下纳帕海湖滨湿地植被及土壤退化特征. *生态学报*, 2013, 33(20):6681-6693.
- [ 28 ] 张昆, 田昆, 吕宪国, 佟守正. 纳帕海湖滨草甸湿地土壤氮动态对水文周期变化的响应. *环境科学*, 2009, 30(8): 2216-2220.

- [29] Kurolo J, Salkinoja-Salonen M, Aarnio T, Hultman J, Romantschuk M. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil. *Fems Microbiology Letters*, 2005, 250(1):33-38.
- [30] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, Santoro AE, Oakley B B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(41): 14683-14688.
- [31] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [32] 范桥发, 肖德荣, 田昆, 姚茜, 安素帮, 余红忠. 不同放牧对滇西北高原典型湿地土壤碳、氮空间分布的差异影响. *土壤通报*, 2014, 45(5): 1151-1156.
- [33] Yang Y F, Wu L W, Lin Q Y, Yuan M T, Xu D P, Yu H, Hu Y G, Duan J C, Li X Z, He Z L, Xue K, Van Nostrand J, Wang S P, Zhou J Z. Responses of the functional structure of soil microbial community to livestock grazing in the Tibetan alpine grassland. *Global Change Biology*, 2013, 19(2): 637-648.
- [34] 王山峰, 郭雪莲, 余磊朝, 刘双圆, 王雪, 唐寿岚, 田伟. 放牧影响下碧塔海泥炭沼泽土壤养分和 N<sub>2</sub>O 排放通量. *湿地科学*, 2017, 15(2): 244 - 249.
- [35] 刘楠, 张英俊. 放牧对典型草原土壤有机碳及全氮的影响. *草业科学*, 2010, 27(4): 11-14.
- [36] 王雪, 郭雪莲, 郑荣波, 王山峰, 刘双圆, 田伟. 牦牛放牧对滇西北高原纳帕海沼泽化草甸湿地土壤氮转化的影响. *生态学报*, 2018, 38(7): 2308-2314.
- [37] Fan F L, Yang Q B, Li Z J, Wei D, Cui X, Liang Y C. Impacts of Organic and Inorganic Fertilizers on Nitrification in a Cold Climate Soil are Linked to the Bacterial Ammonia Oxidizer Community. *Microbial Ecology*, 2011, 62(4):982-990.
- [38] Liu T Z, Nan Z B, Hou F J. Culturable autotrophic ammonia-oxidizing bacteria population and nitrification potential in a sheep grazing intensity gradient in a grassland on the Loess Plateau of Northwest China. *Canadian Journal of Soil Science*, 2011, 91(6): 925-934.
- [39] Bardgett RD, Jones A C, Jones D L, Kemmitt S J, Cook R, Hobbs P J. Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(12/13): 1653-1664.
- [40] Radl V, Chroňáková A, Čuhel J, Šimek M, Elhottová D, Welzl G, Schloter M. Bacteria dominate ammonia oxidation in soils used for outdoor cattle overwintering. *Applied Soil Ecology*, 2014, 77: 68-71.
- [41] 周晶, 姜昕, 周宝库, 马鸣超, 关大伟, 赵百锁, 陈三凤, 李俊. 长期施用尿素对东北黑土中氨氧化古菌群落的影响. *中国农业科学*, 2016, 49(2): 294-304.
- [42] Cui P Y, Fan F L, Yin C, Li Z J, Song A L, Wan Y F, Liang Y C. Urea-and nitrapyrin-affected N<sub>2</sub>O emission is coupled mainly with ammonia oxidizing bacteria growth in microcosms of three typical Chinese arable soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 66: 214-221.
- [43] Chen Y L, Xu Z W, Hu H W, Hu Y J, Hao Z P, Jiang Y, Chen B D. Responses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen fertilization and precipitation increment in a typical temperate steppe in Inner Mongolia. *Applied Soil Ecology*, 2013, 68: 36-45.
- [44] Wang X Y, Wang C L, Bao L, Xie S G. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing microorganisms in reservoir sediment and adjacent soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(4): 1883-1892.
- [45] Jia Z J, Conrad R. *Bacteria* rather than *Archaea* dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658-1671.
- [46] Gubry-Rangin C, Hai B, Quince C, Engel M, Thomson BC, James P, Schloter M, Griffiths RI, Prosser JI, Nicol GW. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(52): 21206-21211.
- [47] 展鹏飞, 肖德荣, 闫鹏飞, 刘振亚, 马金成, 陈志明, 格茸, 田伟, 王行. 藏猪扰动作用下的高寒草甸土壤退化特征及微生物群落结构变化. *环境科学*, 2018, 39(4): 1840-1850.
- [48] Li B X, Yang Y Y, Chen J F, Wu Z, Liu Y, Xie S G. Nitrifying activity and ammonia-oxidizing microorganisms in a constructed wetland treating polluted surface water. *Science of the Total Environment*, 2018, 628-629:310-318.
- [49] Wang J, Li G, Lai X, Song X L, Zhao J N, Yang D L. Differential responses of ammonia-oxidizers communities to nitrogen and water addition in *Stipa baicalensis* steppe, Inner Mongolia, Northern China. *Journal of Resources and Ecology*, 2015, 6(1): 1-11.
- [50] Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(12): 1985-1995.