

DOI: 10.5846/stxb202011273042

王永宏, 田黎明, 艾鹭, 陈仕勇, 泽让东科. 短期牦牛放牧强度对川西北高原高寒草甸土壤细菌群落的影响. 生态学报, 2022, 42(4): 1549-1559.

Wang Y H, Tian L M, Ai Y, Chen S Y, Mipam Tserang Donko. Effects of short-term yak grazing intensity on soil bacterial communities in an alpine meadow of the Northwest Sichuan Plateau. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(4): 1549-1559.

# 短期牦牛放牧强度对川西北高原高寒草甸土壤细菌群落的影响

王永宏<sup>1</sup>, 田黎明<sup>2</sup>, 艾鹭<sup>1</sup>, 陈仕勇<sup>3</sup>, 泽让东科<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 西南民族大学青藏高原研究院, 成都 610041

<sup>2</sup> 四川大学生命科学学院, 成都 610065

<sup>3</sup> 西南民族大学畜牧兽医学院, 成都 610041

**摘要:** 气候变化和人类干扰使青藏高原的草地退化日趋严重, 特别是过度放牧导致的草地退化现象尤为突出; 然而, 牦牛作为青藏高原分布广且数量多的重要家畜, 其不同放牧强度对高寒草甸土壤理化性质与细菌群落的影响仍不明晰。在川西北高原典型高寒草甸开展牦牛放牧强度试验, 设置了对照组(禁牧)、轻度放牧(1头牦牛/hm<sup>2</sup>)、中度放牧(2头牦牛/hm<sup>2</sup>)和重度放牧(3头牦牛/hm<sup>2</sup>)4个放牧强度, 每个强度设置3个重复。两年放牧实验后的结果表明: 短期的重度放牧导致土壤有效磷显著增加, 而其它土壤性质在各放牧强度变化不显著; 随着放牧强度的增加, 土壤细菌 $\alpha$ 多样性呈先增加后减少的趋势, 其主要原因是牦牛活动为细菌的生长繁殖提供了有利的营养条件, 但由于放牧的持续时间较短, 变化不显著; 就优势菌而言, 土壤绿弯菌门中存在光合自养细菌, 在重度放牧下显著高于对照组, 其它各菌门在不同放牧强度下无显著差异; 土壤氮与硝化螺旋菌门呈正相关, 速效磷与酸杆菌门也呈显著正相关, 均说明放牧强度对土壤细菌类群的影响是通过土壤性质间接实现的。本实验通过研究不同牦牛放牧强度下的土壤细菌群落结构, 为放牧策略的制定提供了基础数据支持, 为草地退化的防治提供理论依据。

**关键词:** 高寒草甸; 牦牛放牧; 放牧强度; 土壤理化性质; 土壤细菌群落

## Effects of short-term yak grazing intensity on soil bacterial communities in an alpine meadow of the Northwest Sichuan Plateau

WANG Yonghong<sup>1</sup>, TIAN Liming<sup>2</sup>, AI Yi<sup>1</sup>, CHEN Shiyong<sup>3</sup>, MIPAM Tserang Donko<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

<sup>2</sup> Key Laboratory for Bio-resource and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China

<sup>3</sup> College of Animal and Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

**Abstract:** As an important part of China, the Qinghai-Tibetan Plateau plays a vital role in the balance of global ecosystems. Climate change and human activities have led to grassland degradation on the Qinghai-Tibetan Plateau, especially overgrazing-induced grassland degradation. However, as one of the most dominated livestock on the Qinghai-Tibetan Plateau, the effects of different yak grazing intensities on soil physicochemical properties and microbial communities and structures still remain unclear. To address yak grazing effect on soil bacterial communities, we conducted a yak grazing intensity experiment in a typical alpine meadow of the Northwest Sichuan Plateau. According to local investigations and previous experiment, we set four grazing intensities, including control group (no grazing), light grazing (1 yak/hm<sup>2</sup>), moderate grazing (2 yak/hm<sup>2</sup>), and heavy grazing (3 yak/hm<sup>2</sup>). After two years of grazing experiments, we found that

**基金项目:** 国家自然科学基金(42001055); 中央引导地方-自由探索项目(20ZYZYTS0020); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项(2020NQ27)和研究生创新型科研项目(CX2020SZ22)

收稿日期: 2020-01-12; 网络出版日期: 2021-11-04

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

heavy grazing significantly increased soil available phosphorus and short term grazing reduced the bulk density in the 0—10cm soils, while other soil properties showed no responses to different grazing intensities. The possible reason may be that the effect of grazing on soil physicochemical properties was long-term, and the short-term grazing intensity of yak was difficult to change soil properties. The  $\alpha$  diversity of soil bacteria increased firstly and then decreased with the increasing grazing intensity, but the changes were not statistically significant due to the short duration of grazing experiment. On the one hand, yak grazing could provide available nutrients for the growth of bacteria through dung and urine. On the other hand, high grazing intensity changed the root distribution and root exudates of plants, and increased ultraviolet radiation reduced the diversity of bacteria. In terms of the dominant bacteria, the Chloroflexi was significantly higher under no-grazing than that under heavy grazing, which has photosynthetic autotrophic bacteria. In contrast, other phylum had no significant differences among grazing intensities. With the increase of grazing intensity, the relative abundance of Actinobacteri and Firmicutes increased firstly and then decreased, while Acidobacteria and Gemmatimonadetes showed reverse trends. The  $\beta$  diversity of soil bacteria showed that grazing intensity had no significant effect on bacterial community structure. Soil total nitrogen is positively correlated with Nitrospira. There was a significantly negative correlation between soil total phosphorus and Acidobacteria, but soil available phosphorus was also significantly positive related to Acidobacteria, indicating that grazing intensity indirectly affect soil bacteria may be through changing soil properties. This study provides basic data to grazing managements and a theoretical basis to the restoration of degraded grasslands.

**Key Words:** alpine meadow; yak grazing; grazing intensity; soil physicochemical properties; soil bacterial community

草地是陆地生态系统的重要组成部分之一,全球草地覆盖面积约为  $3.42 \times 10^9 \text{ hm}^2$ , 约占陆地总面积的 40%<sup>[1-2]</sup>,对区域乃至全球生态系统平衡有着至关重要的作用。在过度放牧与气候变化的共同作用下,草地出现了不同程度的退化。据报道,20 世纪初我国退化草地面积已达草地总面积的 90% 以上<sup>[3]</sup>。青藏高原作为我国主要牧区之一,近几十年来超过 50% 草地出现不同程度的退化<sup>[4]</sup>。天然草地的大面积退化不仅影响生态平衡与稳定,给环境问题带来巨大的威胁,还影响我国畜牧业发展和广大牧民的生活水平。青藏高原及其周边地区牦牛保有量约占世界总量的 92% (2009 年统计数据)<sup>[5]</sup>,但前期基于牦牛放牧同草地生态系统构件耦合关系的分析研究相对薄弱,成为探究青藏高原牦牛放牧强度对于高寒草地影响的瓶颈因子。

放牧主要通过践踏、采食和排泄等途径影响草地地上生物群落、土壤养分及地下微生物群落的组成和结构。大型食草动物的践踏行为对土壤物理特性具有直接影响,研究表明冬季牛群 2—3 天的高强度践踏后,土壤大孔隙减少导致水分入渗率下降,这些指标的恢复需要 6 个月<sup>[6]</sup>。放牧家畜对牧草的选择性采食会改变植物群落结构,采食后通过对牧草营养成分的吸收与转化再通过排泄的方式回归土壤,虽然家畜的尿液和粪便仅覆盖 4%—20% 和 1%—5% 的放牧地<sup>[7]</sup>,但促进了营养物质的快速循环,从而进一步影响土壤化学性质。已发表的许多研究通过草地退化程度或与定居点和饮水点的距离来定义放牧强度大小,导致放牧强度的确定存在很大主观性和差异,不能反映真实的放牧强度状况,牦牛放牧强度的控制实验结果十分缺乏。

微生物的繁殖速率快,对土壤理化性质变化的反应迅速,放牧会改变土壤 pH、水分和土壤有机质等要素,进而影响土壤微生物群落的组成、结构及功能<sup>[8-9]</sup>。已有研究表明放牧可以通过增加氮矿化、反硝化、碳固定、碳降解等基因的丰度,改变微生物群落功能,增加微生物功能基因的  $\alpha$  多样性<sup>[10]</sup>。放牧通过家畜对营养物质的利用与转化,改变土壤碳输入形式,使得微生物由以真菌为主的群落结构向以细菌为主的群落转变<sup>[11]</sup>。尽管部分研究表明放牧对细菌的  $\alpha$  多样性没有显著影响,但会影响特定细菌群落的相对丰度,从而影响细菌的群落结构<sup>[12]</sup>。全球范围的整合分析发现,放牧通过影响地下与地上生物量使细菌生物量减少 8.85%;重度放牧影响更显著,降低幅度达 16.48%<sup>[13]</sup>。现阶段的研究多集中于禁牧与放牧对微生物群落的影响<sup>[10,14]</sup>,土壤性质与微生物群落的相互关系则集中于土壤水分、土壤碳和土壤氮等土壤性质<sup>[12,15]</sup>,而牦牛放牧强度对细菌群落结构及其调控因素的影响却鲜见报道。

本文以青藏高原东缘典型高寒草甸为研究对象,分析不同牦牛放牧强度在短期放牧条件下(2年)对土壤理化性质和细菌群落结构的影响,并探讨了二者关系,为青藏高原高寒草甸的放牧强度控制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

本试验研究区位于青藏高原东缘的四川省阿坝藏族羌族自治州红原县西南民族大学青藏高原基地(32°48'N,102°33'E),海拔3504 m,年均降水量为747 mm,暖季降水可达全年降水量的80%,年均气温为1.5℃。试验区的优势植物种类为高山嵩草(*Kobresia pygmaea*)、垂穗披碱草(*Elymus nutans*)和矮生嵩草(*Kobresia humilis*),土壤类型为高山草甸土。

### 1.2 试验设计与样品采集

通过对当地牧区的载畜量和退化情况进行实地调查,并对牧民进行走访,结合相关文献,将试验地划分为4个放牧处理:对照组(禁牧)、轻度放牧(1头牦牛/hm<sup>2</sup>)、中度放牧(2头牦牛/hm<sup>2</sup>)和重度放牧(3头牦牛/hm<sup>2</sup>)。每个处理随机设置3个重复,其中放牧样地面积均为1 hm<sup>2</sup>,非放牧样地面积均为0.33 hm<sup>2</sup>,样地总面积为10 hm<sup>2</sup>[16]。试验地从2008年至2014年均为当地牦牛夏季牧场,草场利用状况较为均一,属于中等放牧强度。为确保试验地初始状况较为均一,2014年将试验地用围栏围封一年。放牧试验于2015年5月下旬开始。放牧时间为每年的5月下旬到9月下旬,期间牦牛可以在样地里自由活动、采食和饮水。2016年8月底,在各样地中随机选取6个50 cm×50 cm样方,在收集地上生物量后每个样方用土钻采集5个0—10 cm土样,混合成一个土壤样品;然后将其分为两部分,一部分带回实验室后在-80℃冷冻保存用于土壤细菌群落测定,另一部分自然风干后用于土壤理化性质测定。

### 1.3 土壤理化性质测定

将自然风干土样去除石块、草根等杂质后碾磨、过筛后测定土壤理化性质。各指标的测定方法分别为:土壤含水率用烘干法测定,容重用环刀法测定;土壤全氮、全磷和全钾均使用过0.15 mm筛网的风干土样测定,其中全氮用凯氏定氮法测定,全磷用NaOH熔融—钼锑抗比色法测定,全钾用火焰分光光度计法测定;土壤速效养分为过2 mm筛网后的风干土样测定,其中有效氮用碱解扩散法测定,有效磷用NaHCO<sub>3</sub>浸提—钼锑抗比色法测定,速效钾用乙酸铵浸提—火焰光度计法测定,pH用电位法测定,土壤有机质采用重铬酸钾氧化外加热法测定[17]。

### 1.4 土壤细菌DNA提取与PCR扩增

土壤总DNA用QIAamp® DNA Stool Mini Kit(QIAGEN,德国)试剂盒进行提取,并用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,用核酸检测仪对DNA进行定量。用引物515F(5'-GTGCCAGCCGCGTAA-3')和907R(5'-GTGCCAGCCGCGTAA-3')对细菌16rRNA基因的V4—V5区进行PCR扩增,聚合酶为NEB公司的Q5高保真DNA聚合酶。反应条件为98℃预变性2 min、98℃变性15 s、55℃退火30 s、72℃延伸30 s,共循环25次,最后一次循环72℃延伸5 min。将PCR扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测后,用AXYGEN公司的凝胶回收试剂盒进行切胶回收。用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库,采用Illumina MiSeq测序平台测序。

### 1.5 统计分析

利用Quantitative Insights Into Microbial Ecology(QIIME, v1.8.0)对测序数据进行处理,识别、检查并剔除疑问序列和嵌合体序列[18],将剩余序列以97%的同一性聚类为可操作分类单位(OTU)[19]。使用QIIME的OTU表计算出OTU的 $\alpha$ 多样性指数,并用SPSS对 $\alpha$ 多样性指数进行单因素方差分析,对OTU丰度矩阵在不同深度随机抽样绘制稀释曲线;用UniFrac距离度量法对细菌群落结构进行 $\beta$ 多样性分析[20],对非加权和加权的UniFrac距离矩阵分别进行非度量多维尺度分析(NMDS)[21];用韦恩图确定土壤中的主要细菌群落,用Excel绘制门分类水平下的细菌组成丰度图。使用SPSS对土壤理化性质进行单因素方差分析,使用

Canoco 5.0 分析环境因子对细菌的影响,用主成分分析(PCA)表明两者间的相互关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同放牧强度下的土壤理化性质

在短期放牧条件下,除土壤容重、pH、有效磷外,其它各土壤指标对不同放牧强度的响应均没有显著性差异( $P>0.05$ ;表1)。与对照组相比,不同放牧强度的土壤容重与土壤 pH 均有所降低,轻度放牧和重度放牧的土壤容重显著小于对照组( $P<0.05$ ),土壤 pH 随放牧强度的增加而减小。其它指标在不同放牧强度处理下有不同程度的增加,土壤含水率和碱解氮在各放牧强度的增加幅度相似,平均增加幅度分别为 16.20% 和 20.37%。

表 1 不同放牧强度对土壤理化性质的影响

Table 1 Effect of different grazing intensities on soil physicochemical properties

土壤指标 Soil indicator	对照组 Control	轻度放牧 Light	中度放牧 Moderate	重度放牧 Heavy
含水率 SM/%	21.26±3.03a	24.70±2.29a	24.96±1.36a	24.45±3.65a
土壤容重 BD/(g/cm <sup>3</sup> )	1.32±0.02a	1.19±0.02b	1.25±0.02ab	1.18±0.08b
全氮 TN/(g/kg)	2.97±0.24a	3.21±0.22a	3.18±0.26a	3.62±0.53a
全磷 TP/(g/kg)	0.77±0.03a	0.89±0.07a	0.82±0.06a	0.81±0.13a
全钾 TK/(g/kg)	16.97±1.04a	17.00±1.09a	16.42±0.83a	15.75±0.36a
有效氮 AN/(mg/kg)	225.44±34.75a	272.34±30.98a	268.34±21.74a	273.44±34.00a
有效磷 AP/(mg/kg)	3.96±0.53b	4.50±0.38ab	5.08±1.00ab	5.53±0.35a
速效钾 AK/(mg/kg)	134.68±67.78a	161.61±55.06a	192.38±15.37a	165.06±38.52a
pH	5.92±0.09a	5.83±0.06ab	5.68±0.05c	5.74±0.05bc
有机质 SOM/(g/kg)	66.88±6.10a	74.28±0.91a	64.86±8.22a	68.81±9.46a

同行不同字母表示差异显著( $P<0.05$ );SM:土壤含水率 Soil moisture;BD:土壤容重 Bulk density;TN:全氮 Total nitrogen;TP:全磷 Total phosphorus;TK:全钾 Total potassium;AN:有效氮 Available nitrogen;AP:有效磷 Available phosphorus;AK:速效钾 Available potassium;SOM:有机质 Soil organic matter

### 2.2 不同放牧强度下的细菌群落多样性

#### 2.2.1 土壤细菌 OTU 分布特征

通过 Illumina MiSeq 平台对不同放牧强度 0—10 cm 土壤进行细菌群落 DNA 片段双端(Paired-end)测序,样本共测得有效序列 663764 条。对土壤细菌群落有效序列按 97% 的序列相似度进行归并和 OTU 划分,将细菌大致分类至分类学的种水平。对照组、轻度放牧、中度放牧、重度放牧的 OTU 种类分别为 5671、5958、6231、5647,通过韦恩图呈现出各放牧强度细菌群落共有或独有的 OTU 数量(图 1)。试验区不同种类 OTU 共 8492 个,4 个放牧强度共享的 OTU 占总量的 37.15%;对照组独有的 OTU 数占总量的 4.19%;轻度放牧独有 OTU 占总量的 4.09%;中度放牧独有 OTU 占总量的 5.16%;重度放牧独有 OTU 占总量的 3.98%。

#### 2.2.2 土壤细菌 $\alpha$ 多样性

稀释曲线能够反映样本的测序深度对群落微生物多样性的说明程度(图 2),平台期出现的测序深度顺序

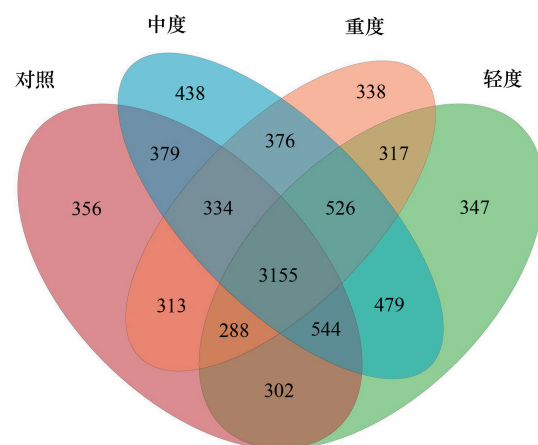


图 1 不同放牧强度土壤细菌 OTU 维恩图

Fig.1 OTU Venn of soil bacteria under different grazing intensities

OTU,可操作分类单元 Operational taxonomic unit



依次为:中度放牧>轻度放牧>重度放牧>对照组,表明中度放牧处理的土壤细菌种类更多,对照组土壤细菌多样性更低,但是各放牧强度之间的土壤细菌  $\alpha$  多样性指数均无显著性差异(表 2)。放牧处理的 Simpson 指数大于对照组,但各组间的差异很小,可见短期牦牛放牧对土壤细菌群落的均匀度和优势 OTU 影响小;Chao 1 与 ACE 指数呈现相同的规律,均为中度放牧>轻度放牧>对照>重度放牧,Shannon 指数则为中度放牧>重度放牧>轻度放牧>对照组。各放牧处理间的  $\alpha$  多样性不存在显著差异( $P>0.05$ );但结果表明中度放牧处理会增加细菌群落的丰富度与多样性。

表 2 不同放牧强度的土壤细菌  $\alpha$  多样性指数Table 2 The  $\alpha$  diversity index of soil bacteria in different grazing intensity

指数 Index	对照组 Control	轻度放牧 Light	中度放牧 Moderate	重度放牧 Heavy
辛普森多样性指数 The Simpson index	0.9963 $\pm$ 0.0003a	0.9967 $\pm$ 0.0003a	0.9966 $\pm$ 0.0003a	0.9968 $\pm$ 0.0001a
Chao 1 丰富度估计指数 The Chao1 estimator	3635.1400 $\pm$ 820.42a	3944.9000 $\pm$ 876.61a	4174.1400 $\pm$ 973.53a	3419.2300 $\pm$ 190.14a
ACE 丰富度估计指数 The ACE estimator	3649.8200 $\pm$ 845.53a	4008.5100 $\pm$ 855.43a	4305.1400 $\pm$ 1099.95a	3457.6500 $\pm$ 256.45a
香农多样性指数 Shannon diversity index	9.9200 $\pm$ 0.0436a	10.0267 $\pm$ 0.1387a	10.0467 $\pm$ 0.1358a	10.0433 $\pm$ 0.0493a

## 2.3 不同放牧强度下的细菌群落组成结构

### 2.3.1 门分类水平下的细菌群落相对丰度

在门分类水平下(图 3),土壤中相对丰度>2%的细菌分别为:变形菌门(Proteobacteria, 24.7%)、酸杆菌门(Acidobacteria, 21.0%)、放线菌(Actinobacteria, 13.7%)、绿弯菌门(Chloroflexi, 13.7%)、疣微菌门(Verrucomicrobia, 6.6%)、厚壁菌门(Firmicutes, 4.2%)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes, 4.2%)、硝化螺旋菌门(Nitrospira, 4.0%)及浮霉菌门(Planctomycetes, 2.8%)。除重度放牧的土壤绿弯菌门显著高于对照组外,其它各菌门在不同放牧强度下没有显著差异。随放牧强度的增加,放线菌、厚壁菌门、浮霉菌门的相对丰度呈先增加后减少的趋势,酸杆菌门、芽单胞菌门则呈现先减少后增加的趋势;疣微菌门呈现递减趋势,硝化螺旋菌门呈现递增趋势。

### 2.3.2 $\beta$ 多样性分析

Unweighted UniFrac 距离用来描述群落的组成成分差异导致的群落差异,同一放牧强度的样本间距离较大,各样本的群落组成成分差异明显;不同放牧强度样本的群落组成重合度高,表明放牧强度对土壤细菌群落组成成分变化影响不明显(图 4)。Weighted UniFrac 距离既描述了群落组成成分间的系统发育关系,又描述了各成分在群落中的丰度高,相同放牧强度下,对照组和轻度放牧的样本间土壤细菌群落成员丰度相近;但不同放牧强度间的 UniFrac 距离并没有明显差别,表明各放牧强度间细菌群落结构差异相似(图 4)。

## 2.4 不同放牧强度下细菌群落与土壤因子间的相关性分析

PCA 分析(图 5)描述了门分类水平下的优势细菌类群与土壤条件的相互关系。以土壤因子为解释变量,第一、第二主成分的解析率分别为 53.03%和 40.36%,可以很好地解释各环境因子与细菌种群的关系。土壤全磷与酸杆菌门两者极显著负相关( $P<0.01$ ),与绿弯菌门为显著正相关( $P<0.05$ );全钾与浮霉菌门、厚壁菌

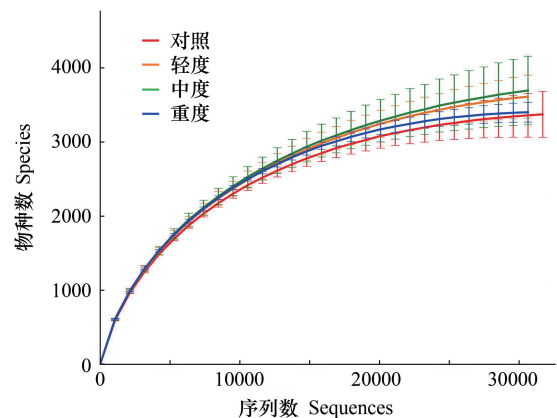


图 2 不同放牧强度的细菌样品稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curves for bacterial samples with different grazing intensities

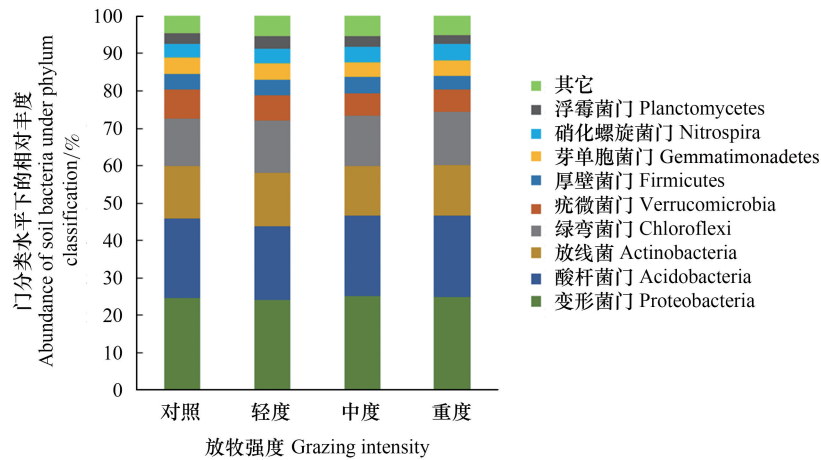


图3 门分类下细菌相对丰度

Fig.3 Abundance of soil bacteria under phylum classification

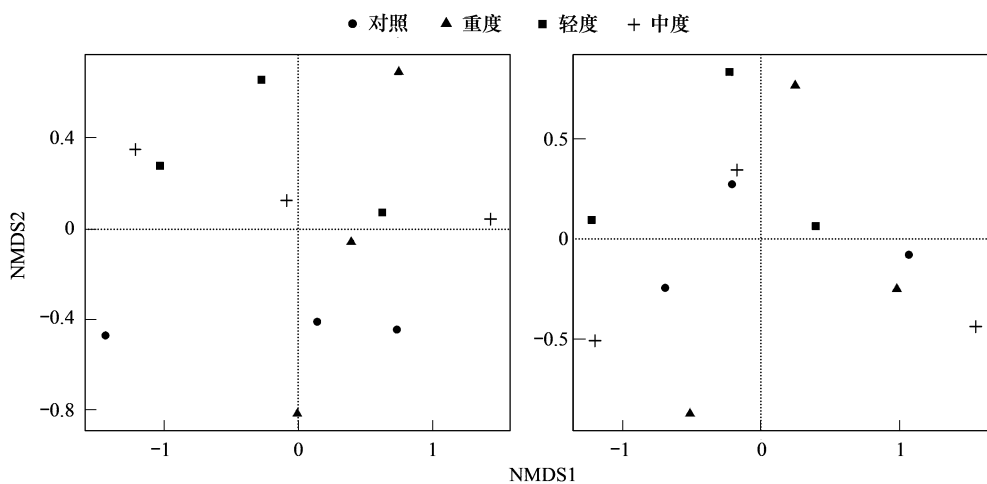


图4 不同放牧强度土壤细菌群落非加权与加权 UniFrac 距离 NMDS 分析

Fig.4 Analysis of unweighted UniFrac NMDS and weighted UniFrac NMDS in soil bacterial communities under different grazing intensities

NMDS, 非度量多维尺度分析 Nonmetric multidimensional scaling

门显著正相关,与芽单胞菌门极显著正相关,与硝化螺旋菌门极显著负相关;有效磷与酸杆菌门正相关,与硝化螺旋菌门显著正相关;而速效钾与疣微菌门,容重与绿弯菌门呈现显著负相关。

### 3 讨论

#### 3.1 短期牦牛放牧对土壤理化性质的影响

土壤-植被-家畜三个界面共同组成放牧系统,三者间相互影响。大量研究表明,随放牧强度的增加,家畜的践踏效应增强,土壤团聚体更加稳定且土壤透水性更差<sup>[22]</sup>,土壤孔隙度减小,通气性变弱,土壤持水性降低<sup>[23]</sup>。表层土壤容重随放牧强度的增加呈现上升趋势,土壤含水量和孔隙度则呈现递减趋势<sup>[24-25]</sup>。但本研究发现,不同放牧强度的含水率均高于对照组;而各放牧处理土壤容重均小于对照组,并且轻度放牧和重度放牧显著小于对照组。这可能与试验区的植被覆盖情况和地下根系情况有关,本试验为短期放牧,根据“中度干扰理论”,放牧对植被的采食行为促进植物的生长<sup>[16]</sup>,地下根系更加发达,形成更稳定的草皮,有效保持了土壤含水率,降低土壤容重<sup>[26]</sup>。也可能是本试验样地面积较大导致土壤质地存在一定差异,从而影响土壤含

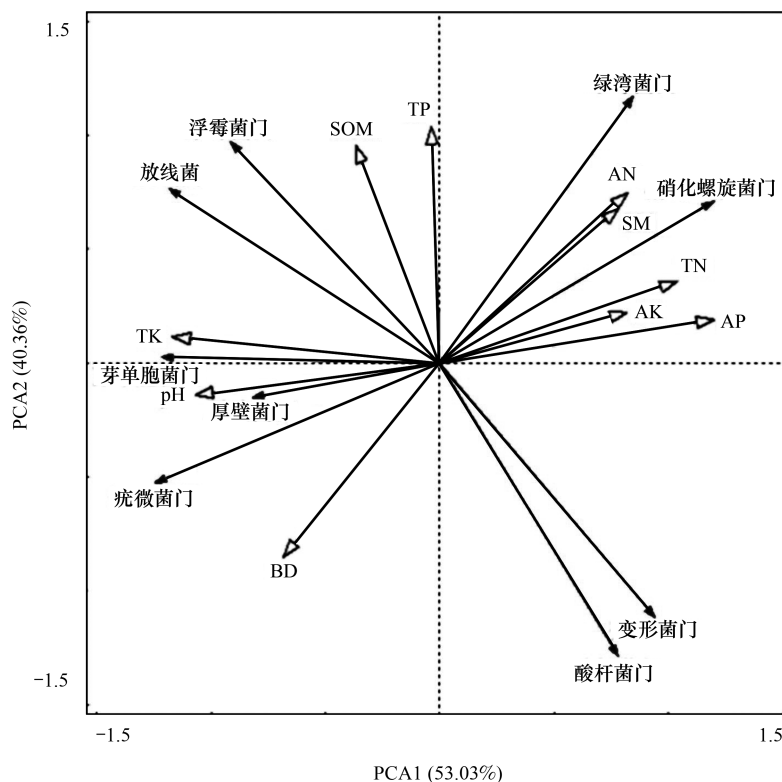


图5 细菌类群与土壤因子的PCA分析

Fig.5 PCA analysis of bacterial community and soil factors

PCA:主成分分析 Principal component analysis; SM:土壤含水率 Soil moisture; BD:土壤容重 Bulk density; TN:全氮 Total nitrogen; TP:全磷 Total phosphorus; TK:全钾 Total potassium; AN:有效氮 Available nitrogen; AP:有效磷 Available phosphorus; AK:速效钾 Available potassium; SOM:有机质 Soil organic matter

水量与容重<sup>[27]</sup>。Teague 等发现土壤物理性质变化是放牧长期作用的结果<sup>[28]</sup>,本研究是短期放牧的结果,试验长期进行可能会使土壤含水量降低、容重增加。

放牧活动除了影响土壤物理特性外,还能通过排泄物归还等影响土壤化学性质。研究发现氮是决定草地初级生产力的主要因子,随放牧强度增加土壤氮呈现增加、降低或不变的结果<sup>[29]</sup>。本研究的结果表明,全氮含量随放牧强度增加呈上升趋势,放牧处理的碱解氮含量也均高于对照组,但是不同放牧强度间的差异没有达到显著水平。这可能是由于放牧降低植物根茎的碳氮比,土壤中的分泌物减少,可利用碳不足,氮的固定减少,向氮矿化方向进行,土壤中的氮含量升高<sup>[30]</sup>。而且全氮、碱解氮与变形菌呈正相关,这与 Thomson 等<sup>[31]</sup>发现的高土壤碳氮含量更适合变形菌门生长的结果一致。已有研究显示,自由放牧与围栏封育相比全磷下降了16%,下降的主要原因是家畜的放牧活动向系统外输出磷<sup>[32]</sup>。而本研究为短期放牧,并且排泄物完全保留于该系统内,向系统外输出的元素含量较少;放牧使植物根系向土壤深层延伸,植物可以吸收土壤中更深层的营养元素,而牦牛采食后通过排泄物将这些营养元素回归到土壤表层,使得放牧处理的土壤全磷含量大于对照组;粪便中的磷含量更高,放牧强度越高牦牛的排泄量越多,所以有效磷含量随放牧强度递增<sup>[33]</sup>。蒋建生等<sup>[34]</sup>发现家畜返还草地的钾元素中,70%—90%通过排尿的方式,10%—30%通过排便的方式。本研究发现随放牧强度的增加全钾和速效钾含量均呈先增加后减少趋势,且放牧处理的速效钾含量均高于对照组,这与苏振声等<sup>[35]</sup>的研究结果一致。牦牛从植物中采食的钾通过排泄物,大部分以速效钾形式回归到土壤中,使得放牧处理的速效钾含量高于对照组<sup>[36]</sup>;但当放牧强度增加到一定程度时,植物的补偿性生长吸收了大量的钾元素,并且由于结合在土壤胶体中的钾很容易代换出来,使得土壤中的全钾与速效钾含量有所减小<sup>[35]</sup>。

### 3.2 短期牦牛放牧对表层土壤细菌群落组成与结构的影响

土壤微生物是生态系统中的分解者,是有机质分解与养分循环等过程中的驱动者,而细菌是这一功能群中的最大类群<sup>[37]</sup>。本研究中不同放牧强度下土壤细菌  $\alpha$  多样性指数差异不显著,但整体上随放牧强度增加呈现先增加后减少的趋势,并且在中度放牧达到最高水平,说明适度放牧会小幅度提高土壤细菌群落的多样性和丰富度。植物生长将土壤深层的营养物质带到地上,再经过牦牛的采食与排泄行为将植物组织转化为微生物容易利用的粪便与残渣,以及牦牛践踏作用将凋落物踏入土壤的行为<sup>[7]</sup>,土壤中易分解碳增加为细菌的生长繁殖提供了有利条件。但重度放牧使地上植被大面积减少,少部分光透过表层 2 mm 土壤<sup>[38]</sup>,增强的地表紫外线辐射直接抑制<sup>[39]</sup>或改变土壤水分条件以及通过改变植物及其根分泌物间接抑制细菌的生长<sup>[40]</sup>,导致细菌多样性下降。杨阳等<sup>[41]</sup>发现放牧显著降低了细菌的 Simpson 指数,对其它指数的影响不显著;Li 等<sup>[42]</sup>发现重度退化与不退化草地的微生物多样性没有显著差异,这与本研究结果相似。但是,草地植被组成<sup>[43-44]</sup>、利用方式<sup>[14,45]</sup>、地理环境<sup>[46]</sup>、土壤类型<sup>[47]</sup>、气候类型<sup>[10]</sup>以及家畜类型<sup>[48]</sup>等都影响土壤微生物群落的组成,可见放牧强度对土壤微生物多样性的影响应结合环境因素进行综合考虑。

本研究结果表明,在门分类水平下,优势菌群为变形菌门(24.7%)、酸杆菌门(21.0%)、放线菌(13.7%)、绿弯菌门(13.7%),与本区域伍文宪等<sup>[49]</sup>对天然和人工草地的土壤微生物群落的调查结果一致。杨阳等<sup>[41]</sup>发现放牧使荒漠草原的变形菌门丰度降低;高凤等<sup>[50]</sup>和尹亚丽等<sup>[51]</sup>均发现在门水平下放牧均降低了优势细菌的丰度,但没有达到显著水平;李海云等<sup>[52]</sup>对祁连山退化的高寒草地研究发现,优势菌门随草地退化程度加剧呈现不同趋势的变化。本研究发现在相对丰度>2%的 9 个细菌门中,除重度放牧土壤的绿弯菌门显著高于对照组外,其它各菌门在不同放牧强度下没有显著差异;不同放牧强度的特有 OTU 占总量的 3.98%—5.16%,放牧强度间的 OTU 相似度高;对样本进行的  $\beta$  多样性分析也表明各放牧强度样本的重合度高,说明短期放牧对细菌群落结构的影响不显著。绿弯菌门包含了不同生活类型的细菌,其中有一部分是自养生物,具有绿色的色素,可以进行光合作用产生能量<sup>[53]</sup>,重度放牧土壤绿弯菌门显著升高的原因可能是重度放牧改变了植被的覆盖度,土壤裸露在阳光中,为绿弯菌门的繁殖提供了有利条件。

### 3.3 土壤属性与土壤细菌群落的关系

放牧通过改变输入土壤中的有机碳形式影响微生物的群落结构,使以真菌为主、生长速度较慢的群落向以细菌为主、生长迅速的群落结构转变;另一方面,放牧强度增加使植物生长需要更多的有效养分,迫使细菌形成能够更快周转养分的细菌群落<sup>[11]</sup>。土壤中的有机碳含量以及碳磷比、氮磷比均与细菌群落结构显著正相关<sup>[50]</sup>,使得细菌群落结构能够反映土壤的情况。本试验的有机质与放线菌门呈正相关,这是因为放线菌门与调控麦芽糖酶和淀粉酶表达的易分解有机碳降解基因显著正相关<sup>[54]</sup>;而酸杆菌门与土壤有机质呈负相关,Fierer 等<sup>[55]</sup>通过实验与整合分析结合,证实了酸杆菌门在低碳含量土壤中丰度较高,碳矿化能力低,其原因是酸杆菌门与难降解有机碳降解基因(调控纤维素酶和木聚糖酶等)呈正相关<sup>[54]</sup>,不利于土壤有机质的快速循环,降低了碳矿化能力。

氮是陆地生态系统循环的重要限制因子,微生物参与其固氮、氨化、硝化以及反硝化等过程<sup>[56]</sup>。变形菌门与酸杆菌门作为本研究区土壤中丰度最高的两种细菌群落,通过冗余分析发现,其比例越高土壤的氮含量越高,Thomson 和 Smit 等人的研究也发现了同样的结果<sup>[31,57]</sup>。主要因为变形菌门中的部分细菌中检测到 *nifH* 基因的存在,对于固氮有重要作用<sup>[58]</sup>。硝化是氮循环的核心部分,氨氧化作为硝化的限速步骤,在高氮水平下其优势类群之一的硝化螺旋菌生长更加旺盛<sup>[59]</sup>,本试验全氮和有效氮均与硝化螺旋菌门呈正相关,但由于短期放牧,各放牧强度间的土壤氮含量差异不显著,土壤氮与硝化螺旋菌门的相关关系并不显著。*nirS* 和 *nirK* 作为氮循环反硝化过程的标记基因,广泛存在于变形菌门、酸杆菌门和厚壁菌门中,并且这些反硝化功能基因丰度与土壤的总碳、有机质、速效钾以及有效磷显著相关<sup>[58]</sup>。这些结果表明,放牧对土壤细菌群落的影响可能是通过改变土壤性质间接实现。

近年来由于人为的氮输入,部分生态系统的氮限制得到缓解,磷限制现象增加<sup>[60]</sup>。土壤磷对氮有矿化作



用<sup>[61]</sup>,可以提高土壤有效氮从而改变微生物群落结构,本研究发现有效磷与酸杆菌门正相关,与硝化螺旋菌门显著正相关,这与上文提到的氮对细菌群落结构影响结果一致。Zheng 等<sup>[62]</sup>通过氮、磷、钾等施肥处理发现,施肥平衡能够显著增加细菌的数量,而导致细菌活性降低缺乏的主要营养物质是有效磷。但本研究短期放牧各强度的主要细菌群落差异不显著,无法确定缺乏有效磷主要通过影响何种细菌种群进而影响细菌群落整体活性的。因此,需要通过长期放牧实验来探究细菌群落结构变化的阈值,从而揭示细菌群落对放牧强度更加明显的响应规律,为生产实践提供更加有效的理论依据。

#### 4 结论

短期的牦牛放牧行为会降低土壤表层的容重,可能是由植物的补偿性生长导致地下生物量增加或土壤异质性引起的;家畜加快物质循环的作用导致短期内有效磷在地表的聚集,使有效磷随放牧强度的增加呈上升趋势。放牧对土壤理化性质的影响是长期的,因此短期牦牛放牧强度变化不容易改变相对数量。牦牛的活动为细菌提供了更有利的营养条件,虽然短期的放牧强度对细菌群落组成的影响不显著,但放牧强度过高改变了植物根系和分泌物以及增加紫外线辐射使细菌的多样性降低。不同细菌类群对土壤碳氮磷的响应通过其功能基因实现,可以由细菌群落结构指示土壤营养成分组成。由于本试验为短期放牧(2年),土壤属性以及细菌群落响应并不显著。由此可见,开展长期牦牛放牧强度控制实验对揭示土壤性质与微生物的影响及其机理以及探究土壤-植物-微生物间的相互关系至关重要。

#### 参考文献(References):

- [ 1 ] LeCain D R, Morgan J A, Schuman G E, Reeder J D, Hart R H. Carbon exchange and species composition of grazed pastures and exclosures in the shortgrass steppe of Colorado. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2002, 93(1/3): 421-435.
- [ 2 ] Conant R T, Paustian K. Potential soil carbon sequestration in overgrazed grassland ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 2002, 16(4): 1143.
- [ 3 ] 陈佐忠. 草地退化的治理. *中国减灾*, 2003, (3): 45-46.
- [ 4 ] 陈槐, 鞠佩君, 张江, 王元云, 朱求安, 颜亮, 康晓明, 何奕忻, 曾源, 郝彦宾, 王艳芬. 青藏高原高寒草地生态系统变化的归因分析. *科学通报*, 2020, 65(22): 2406-2418.
- [ 5 ] 王虎成, 龙瑞军. 青藏高原牦牛生产现状与展望//2009 中国草原发展论坛论文集. 合肥: 中国草学会, 2009: 4-4.
- [ 6 ] Nguyen M L, Sheath G W, Smith C M, Cooper A B. Impact of cattle treading on hill land: 2. Soil physical properties and contaminant runoff. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1998, 41(2): 279-290.
- [ 7 ] 侯扶江, 常生华, 于应文, 林慧龙. 放牧家畜的践踏作用研究评述. *生态学报*, 2004, 24(4): 784-789.
- [ 8 ] Huhe, Chen X J, Hou F J, Wu Y P, Cheng Y X. Bacterial and fungal community structures in Loess Plateau grasslands with different grazing intensities. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 606.
- [ 9 ] Li Y M, Lin Q Y, Wang S P, Li X Z, Liu W, Luo C Y, Zhang Z H, Zhu X X, Jiang L L, Li X N. Soil bacterial community responses to warming and grazing in a Tibetan alpine meadow. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(1): fiv152.
- [ 10 ] Tang L, Zhong L, Xue K, Wang S P, Xu Z H, Lin Q Y, Luo C Y, Rui Y C, Li X Z, Li M, Liu W T, Yang Y F, Zhou J Z, Wang Y F. Warming counteracts grazing effects on the functional structure of the soil microbial community in a Tibetan grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 134: 113-121.
- [ 11 ] Xun W B, Yan R R, Ren Y, Jin D Y, Xiong W, Zhang G S, Cui Z L, Xin X P, Zhang R F. Grazing-induced microbiome alterations drive soil organic carbon turnover and productivity in meadow steppe. *Microbiome*, 2018, 6(1): 170.
- [ 12 ] Yang F, Niu K C, Collins C G, Yan X B, Ji Y G, Ling N, Zhou X H, Du G Z, Guo H, Hu S J. Grazing practices affect the soil microbial community composition in a Tibetan alpine meadow. *Land Degradation & Development*, 2019, 30(1): 49-59.
- [ 13 ] Zhao F Z, Ren C J, Shelton S, Wang Z T, Pang G W, Chen J, Wang J. Grazing intensity influence soil microbial communities and their implications for soil respiration. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, 249: 50-56.
- [ 14 ] Wang Z, Zhang Q, Staley C, Gao H L, Ishii S, Wei X R, Liu J, Cheng J M, Hao M D, Sadowsky M J. Impact of long-term grazing exclusion on soil microbial community composition and nutrient availability. *Biology and Fertility of Soils*, 2019, 55(2): 121-134.
- [ 15 ] Wu X, Li Z S, Fu B J, Zhou W M, Liu H F, Liu G H. Restoration of ecosystem carbon and nitrogen storage and microbial biomass after grazing

- exclusion in semi-arid grasslands of Inner Mongolia. *Ecological Engineering*, 2014, 73: 395-403.
- [16] Mipam T D, Zhong L L, Liu J Q, Mieke G, Tian L M. Productive overcompensation of alpine meadows in response to yak grazing in the Eastern Qinghai-Tibet Plateau. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 925.
- [17] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [18] Chen H, Jiang W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 508.
- [19] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [20] Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8228-8235.
- [21] Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(2): 142-160.
- [22] 高英志, 韩兴国, 汪诗平. 放牧对草原土壤的影响. *生态学报*, 2004, 24(4): 790-797.
- [23] 杨思维, 张德罡, 牛钰杰, 花立民. 高寒草甸表层土壤物理性状对短期放牧的响应. *草原与草坪*, 2017, 37(6): 1-8.
- [24] 柴锦隆, 徐长林, 张建文, 杨海磊, 肖红, 潘涛涛, 王艳, 鱼小军. 高寒草甸土壤物理特性和微生物数量对模拟践踏的响应. *草地学报*, 2016, 24(6): 1234-1240.
- [25] 杨红善, 常根柱, 周学辉, 路远, 那·巴特尔. 肃北高寒草原不同放牧强度土壤养分变化特征. *土壤*, 2011, 43(2): 174-178.
- [26] 刘龙, 姚云峰, 郭月峰, 祁伟, 高玉寒, 韩兆敏, 尉迟文思. 农牧交错带柠条锦鸡儿根系与土壤水分空间关系研究. *中国农业科技导报*, 2017, 19(7): 101-107.
- [27] Jackson R B, Caldwell M M. Geostatistical patterns of soil heterogeneity around individual perennial plants. *Journal of Ecology*, 1993, 81(4): 683-692.
- [28] Teague W R, Dowhower S L, Baker S A, Haile N, DeLaune P B, Conover D M. Grazing management impacts on vegetation, soil biota and soil chemical, physical and hydrological properties in tall grass prairie. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2011, 141(3/4): 310-322.
- [29] 张成霞, 南志标. 放牧对草地土壤理化特性影响的研究进展. *草业学报*, 2010, 19(4): 204-211.
- [30] Holland E A, Parton W J, Detling J K, Coppock D L. Physiological responses of plant populations to herbivory and their consequences for ecosystem nutrient flow. *The American Naturalist*, 1992, 140(4): 685-706.
- [31] Thomson B C, Ostle N, McNamara N, Bailey M J, Whiteley A S, Griffiths R I. Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. *Microbial Ecology*, 2010, 59(2): 335-343.
- [32] Pei S F, Fu H, Wan C G. Changes in soil properties and vegetation following exclosure and grazing in degraded Alxa desert steppe of Inner Mongolia, China. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2008, 124(1/2): 33-39.
- [33] 乌力吉, 李响, 赵萌莉, 白永飞. 放牧对草地生态系统磷循环调控机制的研究进展与展望. *科学通报*, 2020, 65(23): 2469-2482.
- [34] 蒋建生, 蒋文兰, 任继周. 南方人工草地放牧系统元素循环与培肥技术研究. *四川草原*, 2002, (2): 1-10.
- [35] 苏振声, 孙永芳, 付娟娟, 褚希彤, 许岳飞, 呼天明. 不同放牧强度下西藏高山嵩草草甸土壤养分的变化. *草业科学*, 2015, 32(3): 322-328.
- [36] 姜子绍, 宇万太. 农田生态系统中钾循环研究进展. *应用生态学报*, 2006, 17(3): 545-550.
- [37] 厉桂香, 马克明. 土壤微生物多样性海拔格局研究进展. *生态学报*, 2018, 38(5): 1521-1529.
- [38] Jeffery S, Harris J A, Rickson R J, Ritz K. The spectral quality of light influences the temporal development of the microbial phenotype at the arable soil surface. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(3): 553-560.
- [39] Niu F J, He J X, Zhang G S, Liu X M, Liu W, Dong M X, Wu F S, Liu Y J, Ma X J, An L Z, Feng H Y. Effects of enhanced UV-B radiation on the diversity and activity of soil microorganism of alpine meadow ecosystem in Qinghai - Tibet Plateau. *Ecotoxicology*, 2014, 23(10): 1833-1841.
- [40] Piccini C, Conde D, Pernthaler J, Sommaruga R. Alteration of chromophoric dissolved organic matter by solar UV radiation causes rapid changes in bacterial community composition. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2009, 8(9): 1321-1328.
- [41] 杨阳, 贾丽欣, 乔莽璐, 李梦然, 张峰, 陈大岭, 张昊, 赵萌莉. 重度放牧对荒漠草原土壤养分及微生物多样性的影响. *中国草地学报*, 2019, 41(4): 72-79.
- [42] Li Y M, Wang S P, Jiang L L, Zhang L R, Cui S J, Meng F D, Wang Q, Li X N, Zhou Y. Changes of soil microbial community under different degraded gradients of alpine meadow. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2016, 222: 213-222.
- [43] 马建国, 侯扶江, Bowatte S. 青藏高原高寒草甸有毒植物对土壤理化性质和土壤微生物丰度的影响. *草业科学*, 2019, 36(12): 3033-3040.
- [44] Liu N, Zhang Y J, Chang S J, Kan H M, Lin L J. Impact of grazing on soil carbon and microbial biomass in typical steppe and desert steppe of Inner Mongolia. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36434.

- [45] Xu S T, Silveira M L, Inglett K S, Sollenberger L E, Gerber S. Soil microbial community responses to long-term land use intensification in subtropical grazing lands. *Geoderma*, 2017, 293: 73-81.
- [46] Wang M M, Wang S P, Wu L W, Xu D P, Lin 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.
- [47] 吴俐莎, 唐杰, 罗强, 汤博, 聂远洋, 王晓彤, 杨志荣, 孙群, 冯甦, 张杰. 若尔盖湿地土壤酶活性和理化性质与微生物关系的研究. *土壤通报*, 2012, 43(1): 52-59.
- [48] 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.
- [49] 伍文宪, 张蕾, 黄小琴, 杨潇湘, 薛龙海, 刘勇. 川西北高寒牧区不同人工草地对土壤微生物多样性影响. *草业学报*, 2019, 28(3): 29-41.
- [50] 高凤, 王斌, 石玉祥, 张更新, 王建, 斯贵才, 韩丛海, 袁艳丽, 胡鑫. 藏北古露高寒草地生态系统对短期围封的响应. *生态学报*, 2017, 37(13): 4366-4374.
- [51] 尹亚丽, 王玉琴, 李世雄, 刘燕, 赵文, 马玉寿, 鲍根生. 围封对退化高寒草甸土壤微生物群落多样性及土壤化学计量特征的影响. *应用生态学报*, 2019, 30(1): 127-136.
- [52] 李海云, 姚拓, 马亚春, 张慧荣, 路晓雯, 杨晓蕾, 夏东慧, 张建贵, 高亚敏. 祁连山中段退化高寒草地土壤细菌群落分布特征. *草业学报*, 2019, 28(8): 170-179.
- [53] Hug L A, Castelle C J, Wrighton K C, Thomas B C, Sharon I, Frischkorn K R, Williams K H, Tringe S G, Banfield J F. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome*, 2013, 1(1): 22.
- [54] Xun W B, Zhao J, Xue C, Zhang G S, Ran W, Wang B R, Shen Q R, Zhang R F. Significant alteration of soil bacterial communities and organic carbon decomposition by different long-term fertilization management conditions of extremely low-productivity arable soil in South China. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(6): 1907-1917.
- [55] Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364.
- [56] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263-276.
- [57] Smit E, Leeftang P, Gommans S, van den Broek J, van Mil S, Wernars K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2284-2291.
- [58] Luo Z M, Liu J X, Jia T, Chai B F, Wu T H. Soil bacterial community response and nitrogen cycling variations associated with subalpine meadow degradation on the Loess Plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(9): e00180-20.
- [59] Yang K N, Luo S W, Hu L G, Chen B B, Xie Z, Ma B B, Ma W B, Du G Z, Ma X J, Le R X. Responses of soil ammonia-oxidizing bacteria and archaea diversity to N, P and NP fertilization: relationships with soil environmental variables and plant community diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 145: 107795.
- [60] Ford H, Roberts A, Jones L. Nitrogen and phosphorus co-limitation and grazing moderate nitrogen impacts on plant growth and nutrient cycling in sand dune grassland. *Science of the Total Environment*, 2016, 542: 203-209.
- [61] Bauhus J, Khanna P K. Carbon and nitrogen turnover in two acid forest soils of southeast Australia as affected by phosphorus addition and drying and rewetting cycles. *Biology and Fertility of Soils*, 1994, 17(3): 212-218.
- [62] Zheng S X, Hu J L, Chen K, Yao J, Yu Z N, Lin X G. Soil microbial activity measured by microcalorimetry in response to long-term fertilization regimes and available phosphorous on heat evolution. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(10): 2094-2099.