

DOI: 10.5846/stxb202111093142

陈旭黎, 吴福佳, 孙博, 杨天宇, 宋会兴. 氮添加对乐山大佛裸露岩石与地衣覆盖岩石表面细菌群落结构的影响. 生态学报, 2022, 42(21): 8762-8772.

Chen X L, Wu F J, Sun B, Yang T Y, Song H X. Effects of nitrogen addition on bacterial community structure on bare rock and lichen covered rock surface of Leshan Giant Buddha. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(21): 8762-8772.

氮添加对乐山大佛裸露岩石与地衣覆盖岩石表面细菌群落结构的影响

陈旭黎¹, 吴福佳¹, 孙博², 杨天宇³, 宋会兴^{1,*}

¹ 四川农业大学风景园林学院, 成都 611130

² 中铁西北科学研究院有限公司, 兰州 730000

³ 乐山大佛景区管理委员会石窟研究中心, 乐山 614003

摘要: 大气氮沉降可能通过直接和间接途径影响石质文物风化过程, 但相关研究明显不足。因此, 以乐山大佛周围相似的裸岩和地衣覆盖的岩石为研究对象, 对比研究了不同浓度 ($N_0: 0 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$; $N_1: 9 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$; $N_2: 18 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$; $N_3: 36 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$; $N_4: 72 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$) 的氮添加试验对乐山大佛裸露岩石与地衣覆盖岩石表面细菌群落结构的影响, 探讨大气氮沉降对乐山大佛岩石风化的潜在影响。结果表明: (1) 裸岩和地衣覆盖岩石表面细菌群落 α -多样性对氮沉降的响应不同。氮添加处理对裸岩表面细菌 α -多样性指数 (Sobs、Shannon 指数) 影响不显著, 但在不同程度影响到地衣覆盖岩石表面的细菌多样性。其中, N_4 处理显著降低了细菌 α -多样性指数 (Sobs、Shannon 指数), N_2 和 N_3 处理也显著降低了细菌 Sobs 指数; (2) 主坐标 PCoA 分析结果证实, 不同氮添加处理间的裸岩和地衣覆盖岩石表面的细菌群落物种组成均发生变化。与对照相比, 低氮处理 (N_1 — N_3) 显著改变了裸露岩石表面细菌群落组成, 且高氮 (N_4) 处理与低氮处理对细菌群落组成的影响不同 ($R = 0.464$; $P = 0.002$); 在地衣覆盖的岩石表面, 细菌群落在不同氮添加 (N_0 — N_4) 处理下均发生了明显变化 ($R = 0.822$; $P = 0.001$); (3) 变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、WPS-2、Patescibacteria 和浮霉菌门 (Planctomycetes) 均是裸岩与地衣覆盖岩石表面在门水平上的优势菌群, 但它们在裸岩与地衣覆盖岩石表面随氮添加后的动态并不一致; (4) 线性判别和效应量分析分别发现了裸岩和地衣覆盖岩石表面 7 个和 21 个在氮添加后的细菌指示类群。由此可见, 未来大气氮沉降会对乐山大佛佛体表面细菌群落产生显著影响, 地衣覆盖岩石较裸岩表面的细菌群落对未来大气氮沉降更为敏感。研究为未来气候变化条件下的乐山大佛保护提供了数据支持, 也为大气氮沉降对亚热带地区红砂岩的原生演替过程研究积累了基础资料。

关键词: 大气氮沉降; 细菌多样性; 乐山大佛; 生物风化

Effects of nitrogen addition on bacterial community structure on bare rock and lichen covered rock surface of Leshan Giant Buddha

CHEN Xuli¹, WU Fujia¹, SUN Bo², YANG Tianyu³, SONG Huixing^{1,*}

¹ College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

² Northwest Research Institute Co., Ltd., of China Railway Engineering Corporation, Lanzhou 730000, China

³ Grottoes Research Center, Management Committee of Leshan Grand Buddha Scenic Spot, Leshan 614003, China

Abstract: Atmospheric nitrogen (N) deposition may directly and indirectly affect the weathering process of stone cultural relics, but the relevant research is obviously insufficient. Therefore, this study took bare rock and lichen covered rock as the research object, and compared the effects of N addition treatments with different concentrations ($N_0 = 0 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$, $N_1 = 9 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$, $N_2 = 18 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$, $N_3 = 36 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$, and $N_4 = 72 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$) on the bacterial community

收稿日期: 2021-11-09; 网络出版日期: 2022-06-21

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: Huixingsong@aliyun.com

structure on the bare rock and lichen_covered rock surface of Leshan Giant Buddha, so as to explore the potential impact of atmospheric N deposition on rock weathering of Leshan Giant Buddha. The results showed that, the α -diversity of bacterial communities on bare rock and lichen_covered rock was different in response to N deposition. N addition treatment had no significant effect on the bacterial α -diversity indices (Sobs and Shannon indices) of bare rock surface, but affected the bacterial diversity on lichen_covered rock to varying degrees: N4 treatment significantly decreased bacterial α -diversity indices (Sobs and Shannon indices), N2 and N3 treatments also significantly decreased bacterial Sobs index. PCoA analysis demonstrated that different N addition treatments had significant effects on the bacterial community composition of both bare rock ($R=0.464$; $P=0.002$) and lichen_covered rock ($R=0.822$; $P=0.001$). Compared with the control, low N treatment (N1, N2 and N3) significantly changed the composition of bacterial community, and the composition of bacterial community under high N (N4) treatment was different from that under low N on bare rock. However, the bacterial communities changed obviously under different N addition treatments (N0—N4) on lichen-covered rock. In addition, Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, WPS-2, Patescibacteria, and Planctomycetes were the dominant bacteria on the surface of both bare rock and lichen_covered rock at the phylum level. However, their dynamics on bare rock and lichen_covered rock are not consistent with N addition. For example, more bacterial taxa of their relative abundance changed significantly on lichen_covered rock than on bare rock. Multiple linear discriminant and effect size (LEfSe) analysis (from phylum to genus) found 7 and 21 indicator taxa after N addition of bare rock and lichen_covered rock, respectively. These bacterial species may be important microorganisms in the biological weathering process of Leshan Giant Buddha under the background of atmospheric N deposition in the future. These results indicate that the biodeterioration of Leshan Giant Buddha will be affected by future atmospheric N deposition and soil bacterial communities on lichen_covered rock are more sensitive to atmospheric N deposition than that on bare rock. This study provides basic information for the conservation of Leshan Giant Buddha under changing climate conditions in the future and also accumulates basic data for the study of the effect of atmospheric N deposition on the primary succession process of red sandstone in subtropical region.

Key Words: atmospheric nitrogen deposition; bacterial diversity; Leshan Giant Buddha; biodeterioration

氮是陆地生态系统最重要的营养元素之一,与碳、硫、磷等元素循环密切相关^[1],氮缺乏/氮制约是岩石风化成土过程的普遍现象^[2]。与森林生态系统氮元素的主要来源是动植物遗体的分解与腐烂不同^[3],大气氮沉降^[4]与生物固氮^[5]是岩石表面微生物氮元素的主要来源。当前,大气氮沉降对陆地生态系统土壤细菌群落的影响已有许多报道^[6-7],发现氮沉降增加可造成变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度增加的同时,降低酸菌门(Acidobacteria)和 Verrucomicrobia 的相对丰度,引起细菌群落结构及功能的转变;土壤细菌群落对氮沉降的响应动态随着地上植被的变化而变化^[8]。现有研究多是以草原、森林等植被演替后期系统为对象,氮沉降对植被演替初期——岩石风化成土过程影响的信息较少。

岩石风化成土过程包括物理、化学和生物风化过程,而细菌群落在岩石风化初期可能发挥了主导作用^[9]。细菌引起的岩石生物风化速率可达非生物风化速率的 14 倍以上^[10]。研究认为,光合细菌(Photosynthetic Bacteria)利用光能将无机碳(CO_2)同化为有机碳,在岩石表面沉积并富集,为裸露岩石表面包括需氧微生物、厌氧微生物在内的微生物群落的形成创造了养分条件^[11]。微生物在生长代谢过程中产生的有机酸如甲酸、乳酸、葡萄糖酸、琥珀酸、柠檬酸等可以通过羟基和羧基产生不平衡的阳离子和阴离子加速岩石矿物的溶解速率^[12],也可以通过羧基、羟基以及其它官能团整合岩石析出的金属离子,影响岩石的稳定性^[13]。近年来,有直接证据显示,细菌还能够以富含还原态铁的黄铁矿、黑云母、角闪石等为食物,通过亚铁离子的氧化还原过程获取能量,加速岩石的风化分解^[14]。因此,研究不同风化阶段的岩石表面细菌群落变化对于理解岩石风化过程和机制具有重要意义。

乐山大佛是世界上最大的古代石刻弥勒佛坐像,始凿于唐开元初年(公元713年),历时90年建成,是唐代石刻艺术创作的代表作品,具有极高的历史价值、艺术价值与科学价值,于1996年12月与峨眉山自然保护区一起被联合国教科文组织列为“世界文化与自然遗产”。历经千余年的日晒雨淋,乐山大佛风化严重^[15],藻菌共生体对乐山大佛砂岩风化的影响受到关注^[16]。前期研究表明,藻菌共生体(地衣)覆盖的乐山大佛佛体表面与裸岩表面的土壤细菌群落明显不同^[17]。石生地衣通过物理、化学以及生物化学等多种方式显著影响岩石基质,是岩石成土过程的重要环节,亦是石质文物保护面临的普遍问题^[12]。中国亚热带地区是受氮沉降影响严重的区域^[18]。因此,大气氮沉降是否影响乐山大佛佛体风化?过程与机制是什么?亟待深入研究。

1 研究区域概况

乐山大佛位于四川省乐山市,凿造在大渡河与岷江交汇处的凌云山栖鸾峰红砂岩上(29°32′47″N, 103°45′48″E),海拔354—435 m。地处亚热带湿润季风气候区,降水充沛,年均降水量约为1291.6 mm。降水主要集中于夏季,占全年降水的58%。年均蒸发量1057 mm,相对湿度达81%。大佛周围植被类型为亚热带常绿阔叶林,以栲属(*Castanopsis* spp.)、青冈属(*Cyclobalanopsis* spp.)和木荷属(*Schima superba*)为主。

2 研究方法

2.1 试验设计与大气氮沉降模拟处理

选择与乐山大佛佛体岩性、风化现状一致的红砂岩裸露的岩石(NR)和地衣覆盖的岩石(LR)为处理对象进行氮沉降模拟。基于四川盆地氮沉降特征^[19],以全年实际氮湿沉降量的2倍值为最大预测值,按照成倍递减的方式设置氮添加量,以 NH_4NO_3 为氮源,设置5个处理梯度,依次为 $0 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ (N0,对照)、 $9 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ (N1)、 $18 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ (N2)、 $36 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ (N3,实际值)、 $72 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ (N4),每一个氮处理浓度下均设置3个重复样方,共计30个处理样方,每个样方面积 $2 \times 2 \text{ m}^2$ 。

依据区域年降水量、月降水量分布分别计算各个样地需要喷洒的硝酸铵溶液浓度与喷施量。自2018年10月起,每月上旬选择晴朗天气使用手持式电动喷雾器完成对每个试验样地的喷洒处理。为避免样地间的相互影响,各样地间保留1.0 m以上的缓冲带。持续处理12个月。

2.2 样品采集

于2019年10月上旬完成采样。采用无菌刀从各样方多点采集40 g左右表土,均匀混合后装于无菌塑封袋内,每个处理样方采集1份样本,共计30个样本,均放入装有冰袋的采样箱当天运回实验室。每个样本均平均分为两份,一份自然风干,以供化学性质的测定,另一份在4℃环境中去除动植物残体、石砾等杂质,大块的样品捣碎,过2 mm筛,做好标记,保存于-80℃冰箱以供后续测序分析。

2.3 土壤化学性质测定

土壤样品经风干、研磨、去杂、过筛后,采用电位法(水土比2.5:1)测定pH(PHS-3C, LEICI, Shanghai, China);采用 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$ 氧化、 FeSO_4 滴定法测定土壤总有机碳(TOC)含量;采用浓硫酸消煮、凯氏定氮法测定全氮(TN)含量(KND, Top Ltd., Hangzhou, Zhejiang, China);全磷(TP)含量采用 $\text{HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$ 氧化、钼锑抗比色法测定^[20]。

2.4 DNA提取和PCR扩增

根据E.Z.N.A.® soil DNA kit(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行样本总DNA抽提,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取质量,使用NanoDrop2000测定DNA浓度和纯度。使用338F^[21](5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R^[22](5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对16S rRNA基因V3-V4可变区进行PCR扩增。

2.5 Illumina MiSeq测序和生物信息学分析

将同一样本的聚合酶链反应(PCR)产物混合后使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物,利用AxyPrep DNA

Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行回收产物纯化, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 Quantus™ Fluorometer (Promega, USA) 对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 进行建库。利用 Illumina Miseq PE300 (Illumina, CA, USA) 平台进行测序 (上海美吉生物医药科技有限公司)。

原始数据经过质控过滤以及序列校正后得到优化序列。在 NR 和 LR 风化阶段, 分别共得到 863654 和 925088 条高质量细菌 Illumina 测序序列; 每个样本分别平均获得 57577 和 61673 条序列。使用 UPARSE^[23] 软件 (<http://drive5.com/uparse/>, version 7.1) 对每个操作分类单元 (OTU) 进行去重、聚类 and 嵌合体检测并按照 97% 相似性^[23-24] 对非重复序列进行 OTU 聚类, 从而得到 OTU 的代表序列。利用 RDP classifier^[25] (<http://rdp.cme.msu.edu/>, version 2.2) 对每条序列进行物种分类注释, 并根据 Silva 16S rRNA 数据库进行比对, 设置比对置信度阈值为 70%。

2.6 数据处理与分析

采用 mothur (Version v.1.30.1) 计算细菌 α -多样性 Sobs 和 Shannon 指数。采用 SPSS (Version 20.0, IBM, New York, NY, USA) 软件, 利用单因素方差分析和 student's t-检验比较不同施氮处理间的差异显著性 ($P < 0.05$); 采用双因素方差分析研究了风化阶段和氮添加及其相互作用对土壤化学性质和细菌多样性指数的影响; 使用 Origin 2019 软件进行图形绘制。采用 QIIME 和 Bray-Curtis 距离矩阵对细菌 β -多样性进行主坐标分析 (PCoA), 并通过相似性分析 (ANOSIM) 检验不同组间细菌群落的差异, 利用 R 语言 (Version 3.2.3) 绘制 PCoA 图。利用 LEfSe^[26] 软件进行线性判别和效应量分析。

3 研究结果

3.1 氮添加对裸岩和地衣覆盖岩石表面土壤化学性质的影响

研究表明, 风化阶段对土壤 TOC 含量有显著影响 ($P < 0.001$), 地衣覆盖的岩石表面土壤 TOC 含量在不同施氮水平下均高于裸岩, 但氮添加对土壤 TOC 含量影响不显著 (表 1, 图 1)。风化阶段和氮添加均对土壤 TN 和 TP 含量有显著影响 ($P < 0.01$), 地衣覆盖的岩石表面土壤 TN 和 TP 含量均高于裸岩, 且氮添加增加了裸岩和地衣覆盖的岩石表面土壤 TN 和 TP 含量 (表 1, 图 1)。风化阶段对土壤 pH 值无显著影响, 但氮添加对土壤 pH 值影响显著 ($P < 0.001$), 且裸岩和地衣覆盖的岩石表面土壤 pH 值均随着施氮浓度的增加呈降低趋势 (表 1, 图 1)。

表 1 不同风化阶段和氮添加处理及其交互作用对土壤化学性质和细菌 α -多样性指数影响的双因素方差分析

Table 1 Results of two-way analysis of variance for the effects of different weathering stages, nitrogen addition and their interaction on soil chemistry properties and alpha diversity of bacteria

因子 Factor	F					
	总有机碳 TOC/ (g/kg)	全氮 TN/ (g/kg)	全磷 TP/ (g/kg)	pH 值 pH value	Sobs 指数 Sobs index	Shannon 指数 Shannon index
风化阶段 Weathering stage	90.75 ***	116.28 ***	106.62 ***	1.69	3.56	16.79 **
氮添加 N addition	2.65	49.93 ***	5.83 **	333.69 ***	3.44 *	3.86 *
风化阶段×氮添加 Weathering stage × N addition	0.997	2.85	1.11	36.72 ***	1.59	0.60

* 表示处理影响差异显著; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. TOC: 总有机碳 Total organic carbon; TN: 全氮 Total nitrogen; TP: 全磷 Total phosphorus; N: 氮 Nitrogen

3.2 氮添加对岩石表面细菌群落 α -多样性的影响

在裸露的岩石表面, 氮添加对细菌的丰富度指数和多样性指数均无显著性影响 (图 2)。在地衣覆盖的岩石表面, N4、N3 和 N2 处理均显著降低了 Sobs 指数值 (图 2)。

3.3 氮添加对细菌群落 β -多样性的影响

对裸岩和地衣覆盖岩石表面细菌群落的 β -多样性分析结果表明, 氮沉降对裸岩和地衣覆盖的岩石细菌

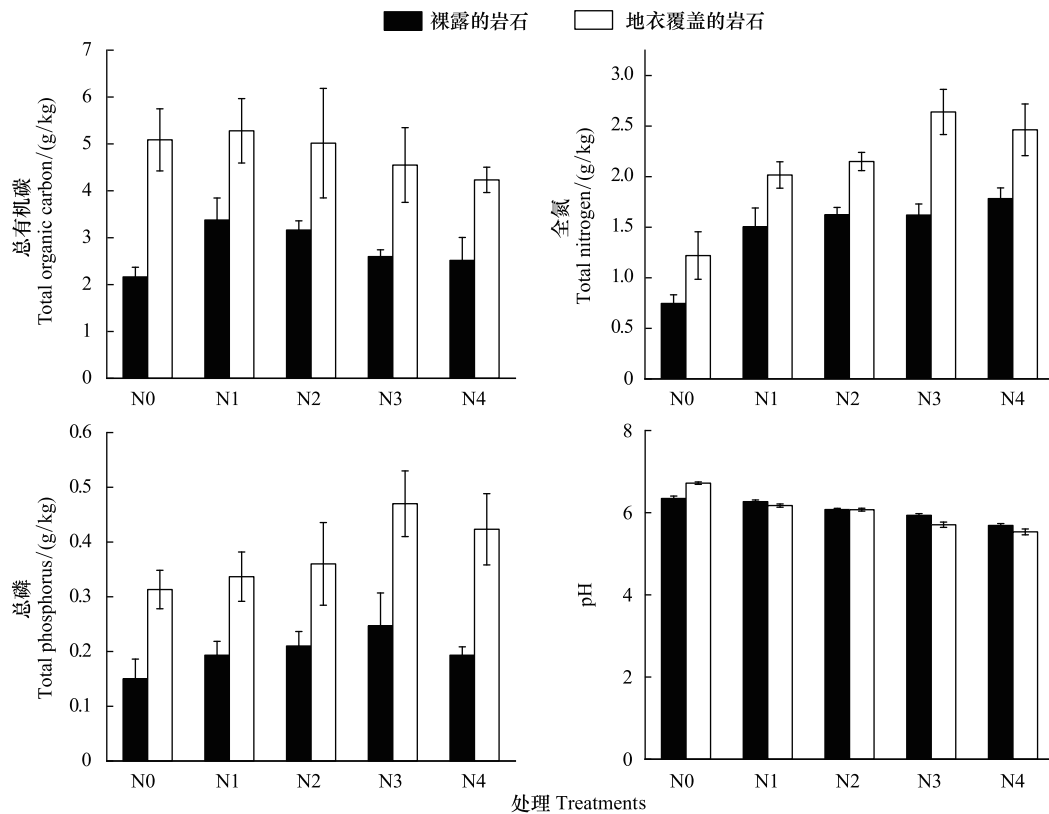


图1 不同氮添加处理对 NR 和 LR 土壤化学性质的影响

Fig.1 Effects of different nitrogen application levels on soil chemistry properties of NR and LR

NR, 裸露的岩石 Naked rock; LR, 地衣覆盖的岩石 Lichen-covered rock; N0: 对照 Control; N1: 低氮 Low nitrogen addition; N2: 中氮 Medium nitrogen addition; N3: 中高氮 Medium and high nitrogen addition; N4: 高氮 High nitrogen addition

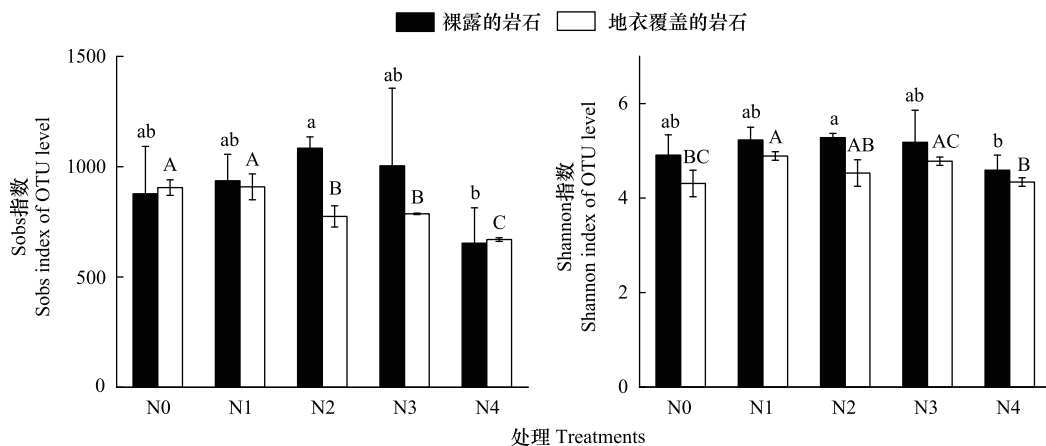


图2 不同氮添加处理对 NR 和 LR 细菌 α -多样性的影响

Fig.2 Effects of different nitrogen application levels on bacterial alpha diversity of NR and LR

不同小写字母表示 NR 阶段各施氮水平下细菌 α -多样性指数具有显著性差异 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示 LR 阶段各施氮水平下细菌 α -多样性指数具有显著性差异 ($P < 0.05$)

物种组成均有显著影响 (NR: $P = 0.002$; LR: $P = 0.001$) (图 3), 且对地衣覆盖的岩石细菌群落组成差异的影响大于裸岩 (LR: $R = 0.822$; NR: $R = 0.464$)。基于 Bray-curtis 距离算法的 PCoA 分析结果显示, 在裸岩表

面,PC1 和 PC2 轴共解释了细菌群落 OTU 信息的 44.60%;与对照相比,低氮处理(N1—N3)显著改变了裸岩表面细菌群落组成,且高氮(N4)处理与低氮处理对细菌群落组成的影响不同($R=0.464$; $P=0.002$)(图 3)。在地衣覆盖的岩石表面,PC1 和 PC2 轴共解释了细菌群落 OTU 信息的 68.12%;细菌群落在不同氮添加(N0—N4)处理下均发生了明显变化($R=0.822$; $P=0.001$)(图 3)。

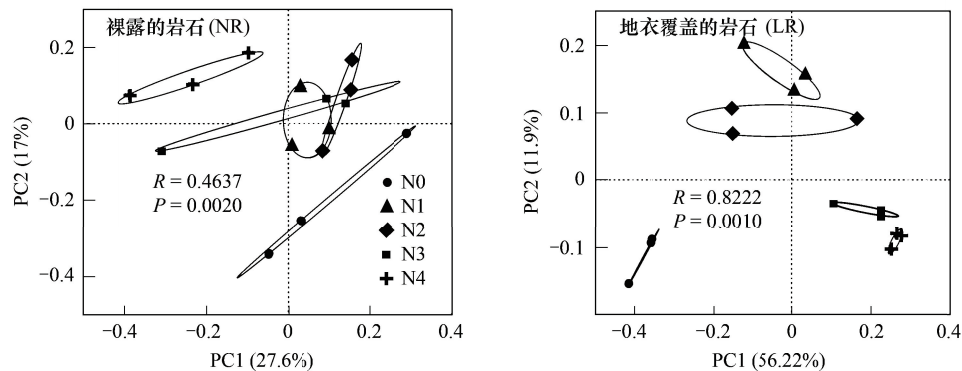


图 3 基于 NR 和 LR 细菌物种组成的主坐标 (PCoA) 分析

Fig.3 Principal coordinate analysis (PCoA) based on bacteria species composition at NR and LR

X 轴和 Y 轴代表两个选定的主轴,百分比代表主轴对不同样品细菌物种组成的解释程度;不同形状表示不同的氮处理水平

3.4 氮添加对细菌群落物种组成的影响

裸岩表面的优势菌群以变形菌门 (Proteobacteria) (36.75%) 和放线菌门 (Actinobacteria) (18.55%) 为主,其次为绿弯菌门 (Chloroflexi) (11.44%)、厚壁菌门 (Firmicutes) (10.75%)、酸杆菌门 (Acidobacteria) (6.13%)、WPS-2 (4.54%)、Patescibacteria (3.76%)、浮霉菌门 (Planctomycetes) (3.53%) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) (1.42%)。地衣覆盖的岩石表面是优势菌群为放线菌门 (32.07%) 和变形菌门 (29.66%),其次是绿弯菌门 (14.98%)、WPS-2 (7.46%)、酸杆菌门 (7.33%)、浮霉菌门 (2.95%)、Patescibacteria (2.70%)、厚壁菌门 (1.16%) 和拟杆菌门 (0.38%) (表 2)。

在裸岩表面,变形菌门、放线菌门和 Patescibacteria 的相对丰度在氮添加处理后发生显著变化:与对照相比,变形菌门的相对丰度在 N4 处理下显著下降;放线菌门和 Patescibacteria 的相对丰度分别在 N2 和 N3 处理下显著增加 (表 2)。

在地衣覆盖的岩石表面,除了绿弯菌门,主要细菌类群在各氮添加处理中均与对照产生显著性差异。放线菌门与拟杆菌门相对丰度随氮添加量的增大而下降;N2 处理时放线菌门相对丰度显著低于对照;拟杆菌门相对丰度在 N1 处理时与对照有着显著差异。变形菌门、WPS-2、酸杆菌门、浮霉菌门、Patescibacteria 和厚壁菌门在氮添加后均呈增加趋势;变形菌门和 WPS-2 相对丰度趋势一致,在氮添加后呈上升趋势,N4 处理显著高于对照;酸杆菌门和浮霉菌门的相对丰度则在 N3 处理时显著高于对照;Patescibacteria 的相对丰度则在 N1、N3 和 N4 处理中均显著高于对照;厚壁菌门在 N2、N3 和 N4 处理中显著高于对照 (表 2)。

线性判别效应量分析 (LEfSe) 分析可识别不同氮添加处理下具有统计学差异不同分类水平的细菌类群,并通过张性判别分析 (LDA) 估算差异类群对组间响应的大小,从而筛选出不同分组间的生物标记物 (Biomarker)。分析结果表明,不同氮添加处理组间的微生物类群存在显著差异 ($LDA>4$; $P<0.05$)。通过进化分支图 (Cladogram) 分析 (图 4) 发现,在裸岩表面,N2 和 N4 处理下出现了指示细菌类群:N2 处理的指示类群来自同一个分支,包括 o_Rhizobiales、f_Rhizobiaceae 和 g_unclassified_f_Rhizobiaceae;N4 处理的指示类群来自两个分支:一个分支包括 o_IMCC26256、f_norank_o_IMCC26256、g_norank_f_norank_o_IMCC26256,另一个分支的指示细菌为 g_Chujaibacter。

在地衣覆盖岩石表面,对照组与氮添加处理组均出现了相应的细菌指示类群 (图 4)。N0 处理的指示类

群来自两个分支:一个分支包括 p_Actinobacteria、c_Actinobacteria、o_Pseudonocardiales、f_Pseudonocardiaceae 和 g_Crossiella,另一个分支为 o_Frankiales;N1 处理的指示细菌为 g_Endobacter;N2 处理的指示类群来自同一个分支,分别为 o_Corynebacteriales、f_Mycobacteriaceae 和 g_Mycobacterium;N3 处理下的指示类群来自 5 个分支,第一分支的主要指示细菌为 o_IMCC26256,第二分支为 c_Gammaproteobacteria,第三分支为 g_norank_f_Acidobacteriaceae_Subgroup_1,第四分支主要包括 p_Patescibacteria、c_Saccharimonadia 和 o_Saccharimonadales,第五分支主要包括 o_Gemmatales 和 f_Gemmataceae;N4 处理的指示类群主要来自两个分支,其中一个分支主要包括 o_Acetobacterales 和 f_Acetobacteraceae,另一分支包括 o_Xanthomonadales、f_Rhodanobacteraceae 和 g_Chujaiibacter。

表 2 不同氮添加处理下门分类水平上各物种的相对丰度(平均值±标准差)

Table 2 The relative abundance of bacteria on phylum level at different simulated nitrogen deposition levels (means ± SD)

风化阶段 Weathering stage	门分类水平上的细菌物种 Bacteria phyla	N0 相对丰度/%	N1 相对丰度/%	N2 相对丰度/%	N3 相对丰度/%	N4 相对丰度/%
裸岩 NR	变形菌门 Proteobacteria	44.65±9.60a	34.90±1.58ab	38.81±7.75ab	38.69±3.24ab	26.68±1.32b
	放线菌门 Actinobacteria	13.88±2.80c	16.95±2.98bc	22.56±3.18a	21.79±1.79ab	17.55±2.44abc
	绿弯菌门 Chloroflexi	8.15±4.02a	14.52±4.88a	11.88a±6.78a	8.12±2.55a	14.55±3.84a
	厚壁菌门 Firmicutes	11.63±6.49ab	8.57±6.33ab	3.30±1.81b	11.700±6.91ab	18.53±11.46a
	酸杆菌门 Acidobacteria	6.37±2.66a	6.42±0.45a	7.36±2.08a	6.06±3.78a	4.42±1.41a
	WPS-2	2.19±1.48a	6.40±0.11a	3.47±2.49a	2.15±0.76a	8.50±6.73a
	Patescibacteria	2.76±0.55b	3.12±0.56ab	4.41±0.98a	4.43±0.93a	4.06±0.30ab
	浮霉菌门 Planctomycetes	2.53±1.06a	3.15±0.32a	3.94±2.81a	3.47±1.76a	4.55±2.60a
	拟杆菌门 Bacteroidetes	3.65±4.15a	1.02±0.57a	1.28±0.70a	0.90±0.71a	0.26±0.21a
	放线菌门 Actinobacteria	53.39±4.49a	26.79±4.02bc	36.80±11.12b	25.27±4.21c	18.08±1.46c
地衣覆盖的岩石 LR	变形菌门 Proteobacteria	16.67±3.81b	29.05±9.12ab	24.48±8.20ab	36.10±9.82ab	42.01±5.04a
	绿弯菌门 Chloroflexi	13.86±1.95ab	21.59±7.79a	17.59±2.12ab	9.42±4.85b	12.42±1.81b
	WPS-2	4.06±0.53b	6.68±2.16ab	7.26±1.46ab	7.84±3.86ab	11.45±3.44a
	酸杆菌门 Acidobacteria	6.05±1.31b	7.70±0.17ab	6.67±1.74ab	9.75±3.27a	6.49±0.54ab
	浮霉菌门 Planctomycetes	1.85±0.87c	2.05±0.39bc	2.40±1.24abc	4.38±1.76a	4.08±0.55ab
	Patescibacteria	1.81±0.16c	2.74±0.35b	2.31±0.24bc	3.83±0.17a	2.81±0.61b
	厚壁菌门 Firmicutes	0.27±0.14b	0.88±0.13ab	1.20±0.57a	1.74±0.47a	1.72±0.72a
	拟杆菌门 Bacteroidetes	0.80±0.23a	0.52±0.17b	0.21±0.08c	0.21±0.04c	0.15±0.05c

不同字母表示不同氮添加处理间存在显著性差异($P<0.05$);NR, 裸露的岩石 Naked rock;LR,地衣覆盖的岩石 Lichen_covered rock;N0:对照 Control;N1:低氮 Low nitrogen addition;N2:中氮 Medium nitrogen addition;N3:中高氮 Medium and high nitrogen addition;N4:高氮 High nitrogen addition

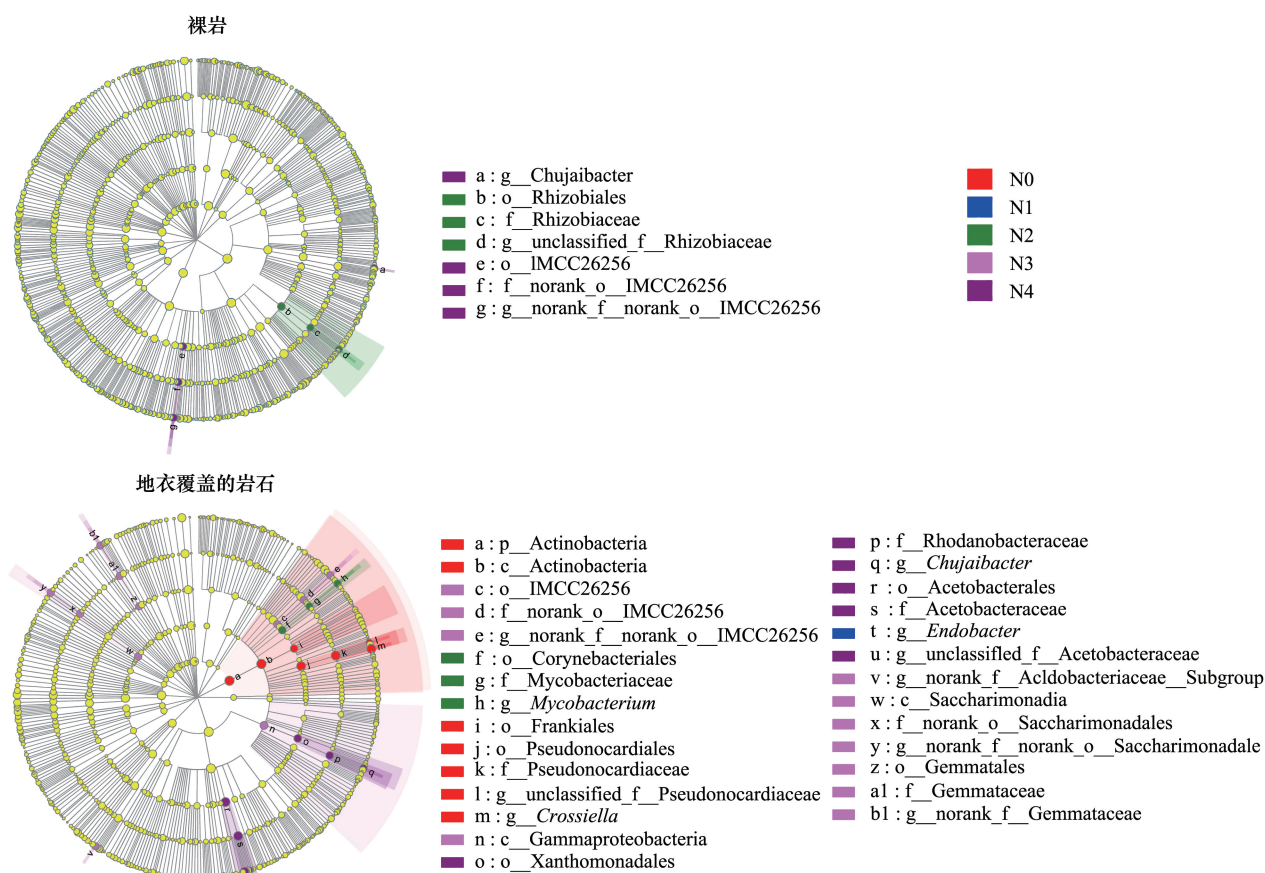


图 4 不同氮添加水平下细菌各分类水平物种的线性判别效应量分析 (LEfSe) 分析

Fig.4 LEfSe analysis of bacterial species at various classification levels under different nitrogen addition

分枝图显示了 N0、N1、N2、N3 和 N4 处理在张性判别分析 (LDA) 值 >4 水平上的统计差异性。来自不同分类学层次的圆圈代表该层次的分类型群;由内到外的圆圈代表从门到属的分类等级;小圆的直径与相应类群的相对丰度成正比;不同的氮模拟水平对应不同的颜色,代表在各组中起重要作用的微生物类群;该分类群的名称在相应的图片底部展示

4 讨论

化石燃料的消费,交通、工业与生活垃圾排放的增加,均加剧了空气污染,尤其是含氮化合物的增多(例如 NH_3 、 NO_2 和 NO)^[27]。含氮化合物与水蒸气相互作用,沉积于岩石表面,影响岩石表面的生态过程^[28]。本研究发现,大气氮沉降对乐山大佛裸露岩石与地衣覆盖岩石表面土壤细菌群落产生了不同的影响。

4.1 氮添加对细菌群落多样性的影响

氮添加影响了地衣覆盖岩石表面土壤细菌群落的 α -多样性(图 2)。通常认为,低浓度的氮添加增加土壤有效氮含量,提升植物的净初级生产力^[29],导致进入土壤的凋落物与根系沉积物增多,促进微生物群落的丰度和多样性^[30]。土壤细菌群落 Shannon 指数在低氮(N1)添加时的增加可能是增加了岩石表面附生细菌养分来源的原因^[31]。在高氮添加(N4)时,细菌群落 α -多样性低于对照,这一方面可能是由于氮添加改变了表层土壤氮的有效性,促进地上植物对养分的需求,导致地下微生物养分的获取受到限制,从而抑制微生物生长^[32]。另一方面,细菌群落丰度的降低还与高氮输入造成的土壤 pH 降低有关(图 1)。土壤 pH 降低可诱发土壤微生物的铝毒性^[33],从而降低土壤细菌群落的丰富度^[34]。

然而,氮添加对裸露岩石表面细菌群落的多样性和丰富度均没有产生显著性影响(图 2)。在裸露的岩石表面,植被缺乏使得碳输入增加的可能性极小,这使得地衣覆盖的岩石表面土壤 TOC 含量高于裸露(图 1)。这

进一步证实了氮添加对土壤微生物的影响与土壤中碳含量有关^[35];当土壤碳充足时,添加氮会显著促进土壤微生物的生长。相较于地衣覆盖的岩石,裸岩缺少有机碳输入途径,即使氮沉降增加,也难以形成或促进系统内部生态循环,从而不会对微生物的多样性产生显著性影响。此外,裸岩缺乏生物体的覆盖,基质对额外输入的氮保留能力弱,绝大部分氮淋失,这也是导致裸岩表面细菌多样性对氮添加响应不显著的原因之一。

4.2 氮沉降对细菌群落组成的影响

岩石的风化成土过程(原生演替)受到立地生物条件(基质、气候和地形)和生物因素(植物物种、到达顺序以及种间相互作用等)的影响^[36]。在佛体表面,即使开凿时间一致,也因为微地形等因素造成乐山大佛不同部位岩石风化程度不同。尽管缺乏维管植物发达的根系和根系介导的微生物群落效应,但地衣的存在会影响岩石/基质温度、湿度以及碳氮有效性^[37],对微生物群落产生有利或不利的影 响,地衣覆盖的乐山大佛岩石表面土壤细菌群落与裸岩表面有着显著的不同^[17]。此外,裸岩生境中细菌养分来源更多依赖于风吹、远古或者微生物固定来源的碳和氮^[38]。这种养分供给的偶然性和不确定性,也是裸岩与地衣覆盖岩石表面细菌群落对大气氮添加不同响应的原因(图 3)。

变形菌门、放线菌门、绿弯菌门、厚壁菌门、酸杆菌门、WPS-2、Patescibacteria、浮霉菌门和拟杆菌门是门分类水平上乐山大佛裸岩和地衣覆盖岩石表面的优势菌群。在裸岩中,变形菌门、放线菌门和 Patescibacteria 均对氮添加作出了显著性变化响应。以往的研究表明,隶属于变形菌门的根瘤菌目(Rhizobiales)是潜在的生物固氮菌^[39],并与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 呈负相关关系^[40],高氮添加会抑制这类微生物的生长,这可能是变形菌门在高氮处理下显著下降的原因。此外,根瘤菌作为一类有益的共生细菌,能产生生长素和维生素,促进宿主生物(如真菌)的生长^[41]。研究结果显示,根瘤菌目是裸岩表面 N2 处理下的指示类群(图 4),这预示着低氮添加可能通过增加根瘤菌的生长效益促进系统发展。放线菌门和 Patescibacteria 在中等水平氮处理下显著增加,这与共营养类群通常会随着氮的可利用性增加有关^[42]。相比之下,地衣覆盖岩石表面的菌群对氮添加表现出的响应更为明显。在寡养环境中,变形菌门的相对丰度较低^[43]。该研究中,氮添加显著增加了变形菌门的相对丰度(表 2),这缘于施氮增加了环境的养分可利用性。酸杆菌是一种存在于营养匮乏和强酸性环境中的寡营养细菌,能够降解难降解和复杂的碳化合物^[44],WPS-2 被认为是能够利用大气中 H_2 和 CO 能源的自养生物。过饱和的氮沉降导致土壤酸化的同时,也可能降低土壤微生物的有效有机质含量^[45],这可能激发了酸杆菌和 WPS-2 菌群在氮添加后的显著增加。

4.3 氮沉降对岩石风化过程的潜在影响

石质文物风化过程与石质文物表面微生物群落结构、丰度和多样性直接相关^[46-47]。尽管氮添加对乐山大佛裸岩表面细菌群落的 α -多样性没有产生显著性影响,但放线菌相对丰度在氮添加后显著增加(表 2)。放线菌是石质文物生物腐蚀研究中经常提及的类群,它们在岩石表面形成白色生物膜,产生水溶性深色染料,对文物色彩及结构造成损伤^[48-49]。大气氮沉降对放线菌的影响预示着乐山大佛裸露岩石在未来气候条件下面临更严重的生物风化影响。在地衣覆盖岩石表面,细菌群落 α -多样性指数在氮添加后呈降低趋势,但变形菌门、WPS-2、酸杆菌门、浮霉菌门、Patescibacteria 和厚壁菌门的相对丰度在氮添加后显著增加(表 2)。厚壁菌门是影响砖石风化的重要微生物类群^[46];隶属厚壁菌门的芽孢杆菌属(*Bacillus*)通过产生自乳化活性酸和表面活性剂,具有加速岩石降解的能力^[49]。微生物对文化遗产的降解能力除了与遗传多样性相关外,还取决于它们形成生物膜的能力^[47]。变形菌门物种通过合成有机化合物促进岩石表面生物膜的形成与发展,造成文化遗产材料的微生物退化^[50]。此外,真菌是地衣的组成部分,细菌与真菌在氮添加后通过建立相互联系的动态群落和生物膜系统以适应和抵抗外界恶劣环境,促进群落的生存和演替,从而进一步增加石质文物的风化风险。

5 结论

通过氮添加模拟实验,对乐山大佛裸岩与地衣覆盖岩石表面土壤细菌群落响应未来大气氮沉降特征进行

了研究。大气氮沉降对乐山大佛裸岩和地衣覆盖的岩石表面细菌群落组成均产生了显著影响。相较于裸岩,地衣覆盖的乐山大佛岩石细菌群落受氮沉降的影响更显著;在不同的岩石表面,即使是同一类群对氮添加的响应趋势也并非完全相同;线性判别和效应量分析分别发现了裸岩和地衣覆盖岩石表面 7 个和 21 个在氮添加后的细菌指示类群。研究结果暗示,地衣覆盖的岩石在未来气候变化中受到环境的影响较裸岩更大。由于菌群功能信息的不足,未来氮沉降对乐山大佛文物风化的影响趋势尚需进一步的研究。

参考文献 (References):

- [1] Song X Z, Gu H H, Wang M, Zhou G M, Li Q. Management practices regulate the response of Moso bamboo foliar stoichiometry to nitrogen deposition. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24107.
- [2] Walker T W, Syers J K. The fate of phosphorus during pedogenesis. *Geoderma*, 1976, 15(1): 1-19.
- [3] Zhang J B, Lv J H, Li Q, Ying Y Q, Peng C H, Song X Z. Effects of nitrogen deposition and management practices on leaf litterfall and N and P return in a Moso bamboo forest. *Biogeochemistry*, 2017, 134(1/2): 115-124.
- [4] Zhang T A, Chen H Y H, Ruan H. Global negative effects of nitrogen deposition on soil microbes. *The ISME Journal*, 2018, 12(7): 1817-1825.
- [5] Sainju U M, Singh H P, Singh B P. Soil carbon and nitrogen in response to perennial bioenergy grass, cover crop and nitrogen fertilization. *Pedosphere*, 2017, 27(2): 223-235.
- [6] Yan G Y, Xing Y J, Han S J, Zhang J H, Wang Q G, Mu C C. Long-time precipitation reduction and nitrogen deposition increase alter soil nitrogen dynamic by influencing soil bacterial communities and functional groups. *Pedosphere*, 2020, 30(3): 363-377.
- [7] Zeng J, Liu X J, Song L, Lin X G, Zhang H Y, Shen C C, Chu H Y. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 92: 41-49.
- [8] 刘蔚秋, 刘滨扬, 王江, 雷纯义. 不同环境条件下土壤微生物对模拟大气氮沉降的响应. *生态学报*, 2010, 30(7): 1691-1698.
- [9] Harris J. Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers? *Science*, 2009, 325(5940): 573-574.
- [10] Potysz A, Bartz W, Zbońska K, Schmidt F, Lenz M. Deterioration of sandstones: insights from experimental weathering in acidic, neutral and biotic solutions with *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Construction and Building Materials*, 2020, 246: 118474.
- [11] Strauss S L, Garcia-Pichel F, Day T A. Soil microbial carbon and nitrogen transformations at a glacial foreland on Anvers Island, Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, 2012, 35(10): 1459-1471.
- [12] 宋金凤, 汝佳鑫, 张红光, 曹楷, 崔晓阳. 地衣和地衣酸与岩石矿物风化及其机制研究进展. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2019, 43(4): 169-177.
- [13] Lovley D R, Coates J D, Blunt-Harris E L, Phillips E J P, Woodward J C. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 1996, 382(6590): 445-448.
- [14] Napieralski S A, Buss H L, Brantley S L, Lee S, Xu H F, Roden E E. Microbial chemolithotrophy mediates oxidative weathering of granitic bedrock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(52): 26394-26401.
- [15] 吴福佳, 孙博, 陈旭黎, 杨天宇, 宋会兴. 乐山大佛佛体表面植被被空间异质性. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(4): 979-984.
- [16] 黄继忠, 宋绍雷, 董海燕, 陈学萍, 彭学义. 藻菌共生体对乐山大佛红砂岩风化影响初探. *文物世界*, 2018, (3): 72-76.
- [17] Chen X L, Wang M F, Wu F J, Sun B, Yang T Y, Song H X. Soil bacteria and fungi respond differently to organisms covering on Leshan Giant Buddha body. *Sustainability*, 2021, 13(7): 3897.
- [18] 刁婵, 鲁显楷, 田静, 张永清, 莫江明, 于贵瑞. 长期氮添加对亚热带森林土壤微生物碳源代谢多样性的影响. *生态学报*, 2019, 39(18): 6622-6630.
- [19] 杨开军, 杨万勤, 庄丽燕, 李志杰, 贺若阳, 谭波, 张丽, 肖玖金, 徐振锋. 四川盆地西缘都江堰大气氮素湿沉降特征. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(1): 107-111.
- [20] 何高迅, 王越, 彭淑娴, 郭兆来, 刘嫦娥, 付登高, 段昌群. 滇中退化山地不同植被恢复下土壤碳氮磷储量与生态化学计量特征. *生态学报*, 2020, 40(13): 4425-4435.
- [21] Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Fujiyama A, Tsuda M, Kurokawa K. Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. *DNA Research*, 2014, 21(2): 217-227.
- [22] Apprill A, McNally S, Parsons R, Weber L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 2015, 75(2): 129-137.
- [23] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [24] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, 44(4): 846-849.
- [25] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, Cole J R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [26] Li W C, Sheng H Y, Ekawati D, Jiang Y P, Yang H M. Variations in the compositions of soil bacterial and fungal communities due to microhabitat

- effects induced by simulated nitrogen deposition of a bamboo forest in wetland. *Forests*, 2019, 10(12): 1098.
- [27] Warscheid T, Oelting M, Krumbein W E. Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. *International Biodeterioration*, 1991, 28(1/4): 37-48.
- [28] Leysen L, Roekens E, Van Grieken R. Air-pollution-induced chemical decay of a sandy-limestone cathedral in Belgium. *Science of the Total Environment*, 1989, 78: 263-287.
- [29] Zhou H, Zhang D G, Jiang Z H, Sun P, Xiao H L, Wu Y X, Chen J G. Changes in the soil microbial communities of alpine steppe at Qinghai-Tibetan plateau under different degradation levels. *Science of the Total Environment*, 2019, 651: 2281-2291.
- [30] Knelman J E, Nemergut D R. Changes in community assembly may shift the relationship between biodiversity and ecosystem function. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 424.
- [31] Gaylarde C, Baptista-Neto J A, Ogawa A, Kowalski M, Celikkol-Aydin S, Beech I. Epilithic and endolithic microorganisms and deterioration on stone church facades subject to urban pollution in a sub-tropical climate. *Biofouling*, 2017, 33(2): 113-127.
- [32] Zhong L P, Cao Y, Li W Y, Pan W P, Xie K C. Effect of the existing air pollutant control devices on mercury emission in coal-fired power plants. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 2010, 38(6): 641-646.
- [33] Tian D, Jiang L, Ma S H, Fang W J, Schmid B, Xu L C, Zhu J X, Li P, Losapio G, Jing X, Zheng C Y, Shen H H, Xu X N, Zhu B, Fang J Y. Effects of nitrogen deposition on soil microbial communities in temperate and subtropical forests in China. *Science of the Total Environment*, 2017, 607-608: 1367-1375.
- [34] Chen D M, Lan Z C, Bai X, Grace J B, Bai Y F. Evidence that acidification-induced declines in plant diversity and productivity are mediated by changes in below-ground communities and soil properties in a semi-arid steppe. *Journal of Ecology*, 2013, 101(5): 1322-1334.
- [35] Vance E D, Chapin III F S. Substrate limitations to microbial activity in taiga forest floors. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(2): 173-188.
- [36] Finks S S, Weihe C, Kimball S, Allison S D, Martiny A C, Treseder K K, Martiny J B H. Microbial community response to a decade of simulated global changes depends on the plant community. *Elementa: Science of the Anthropocene*, 2021, 9(1): 00124.
- [37] Cornelissen J H C, Lang S I, Soudzilovskaia N A, During H J. Comparative cryptogam ecology: a review of bryophyte and lichen traits that drive biogeochemistry. *Annals of Botany*, 2007, 99(5): 987-1001.
- [38] 周汉昌, 马安周, 刘国华, 庄国强. 冰川消退带微生物群落演替及生物地球化学循环. *生态学报*, 2018, 38(24): 9021-9033.
- [39] Che R X, Deng Y C, Wang W J, Rui Y C, Zhang J, Tahmasbian I, Tang L, Wang S P, Wang Y F, Xu Z H, Cui X Y. Long-term warming rather than grazing significantly changed total and active soil procaryotic community structures. *Geoderma*, 2018, 316: 1-10.
- [40] Wang J Q, Shi X Z, Zheng C Y, Suter H, Huang Z Q. Different responses of soil bacterial and fungal communities to nitrogen deposition in a subtropical forest. *Science of the Total Environment*, 2021, 755: 142449.
- [41] Erlacher A, Cernava T, Cardinale M, Soh J, Sensen C W, Grube M, Berg G. *Rhizobiales* as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 53.
- [42] Fierer N, Strickland M S, Liptzin D, Bradford M A, Cleveland C C. Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters*, 2009, 12(11): 1238-1249.
- [43] Rughöft S, Herrmann M, Lazar C S, Cesarz S, Levick S R, Trumbore S E, Küsel K. Corrigendum: community composition and abundance of bacterial, archaeal, and nitrifying populations in savanna soils on contrasting bedrock material in Kruger National Park, South Africa. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1954.
- [44] Ai C, Liang G Q, Sun J W, Wang X B, He P, Zhou W, He X H. Reduced dependence of rhizosphere microbiome on plant-derived carbon in 32-year long-term inorganic and organic fertilized soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 80: 70-78.
- [45] Lu G R, Xie B H, Cagle G A, Wang X H, Han G X, Wang X J, Hou A X, Guan B. Effects of simulated nitrogen deposition on soil microbial community diversity in coastal wetland of the Yellow River Delta. *Science of the Total Environment*, 2021, 757: 143825.
- [46] Wang Q, Ma G Y, He L Y, Sheng X F. Characterization of bacterial community inhabiting the surfaces of weathered bricks of Nanjing Ming city walls. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(4): 756-762.
- [47] McNamara C J, Mitchell R. Microbial deterioration of historic stone. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2005, 3(8): 445-451.
- [48] Duan Y L, Wu F S, He D P, Gu J D, Feng H Y, Chen T, Liu G X, Wang W F. Bacterial and fungal communities in the sandstone biofilms of two famous Buddhist grottoes in China. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2021, 163: 105267.
- [49] Scheerer S, Ortega-Morales O, Gaylarde C. Microbial deterioration of stone monuments--an updated overview. *Advances in Applied Microbiology*, 2009, 66: 97-139.
- [50] Kemmling A, Kämper M, Flies C, Schieweck O, Hoppert M. Biofilms and extracellular matrices on geomaterials. *Environmental Geology*, 2004, 46(3/4): 429-435.