

DOI: 10.20103/j.stxb.202303190519

孙雪琦, 戴辉, 曾泉鑫, 周嘉聪, 彭园珍, 陈文伟, 张秋芳, 陈岳民. 氮添加土壤微生物群落结构影响微生物碳利用效率. 生态学报, 2024, 44(4): 1737-1746.

Sun X Q, Dai H, Zeng Q X, Zhou J C, Peng Y Z, Chen W W, Zhang Q F, Chen Y M. The influence of soil microbial community structure on microbial carbon use efficiency under nitrogen addition. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(4): 1737-1746.

氮添加土壤微生物群落结构影响微生物碳利用效率

孙雪琦^{1,2,3}, 戴辉^{1,2,3}, 曾泉鑫^{1,2,3}, 周嘉聪^{1,2,3}, 彭园珍^{1,2,3}, 陈文伟⁴, 张秋芳^{1,2,3,*}, 陈岳民^{1,2,3}

1 福建师范大学地理科学学院, 福州 350007

2 福建师范大学湿润亚热带山地生态国家重点实验室培育基地, 福州 350007

3 福建师范大学福建省亚热带资源与环境重点实验室, 福州 350007

4 福建戴云山国家级自然保护区管理局, 泉州 362500

摘要: 尽管近年来中国氮(N)沉降水平逐渐趋于稳定, 但中国东南地区 N 沉降相比于其他地区仍处于较高水平。N 沉降对陆地生态系统碳循环过程的影响不容忽视。微生物碳利用效率(CUE)是指微生物将吸收的碳转化为生物量碳的效率, 高微生物 CUE 意味着高土壤有机碳存储潜力。因此, 探究 N 沉降背景下微生物 CUE 的变化将有助于进一步认识陆地生态系统土壤碳存储的变化。然而, 目前关于 N 沉降下微生物群落结构的变化如何影响微生物 CUE 鲜有报道。在福建省泉州市戴云山国家级自然保护区的罗浮栲林通过 N 添加模拟 N 沉降。实验共包括三个 N 添加处理: 对照(CT, +0 kg hm⁻² a⁻¹)、低氮(LN, +40 kg hm⁻² a⁻¹)和高氮(HN, +80 kg hm⁻² a⁻¹)。测定不同处理土壤基本理化性质、微生物生物量、酶活性和 CUE, 并使用高通量测序对微生物群落结构和多样性进行测定。结果表明, N 添加显著影响微生物 CUE, 随着 N 添加水平的增加, CUE 逐渐增加; 相反, 土壤 pH、可提取有机碳(EOC)和微生物生物量碳(MBC)均呈现下降趋势。N 添加对土壤微生物群落 α 多样性总体上无显著影响。非度量多维尺度(NMDS)分析表明, N 添加显著改变了微生物的群落结构。尤其对于真菌而言, 不同 N 添加处理的真菌群落明显分开为三簇。微生物 CUE 分别与土壤 pH、EOC 和真菌 NMDS1 呈显著的负相关关系, 与矿质氮含量呈现显著正相关关系。随机森林分析表明, N 添加下影响微生物 CUE 的类群主要是富营养菌(如变形菌门和子囊菌门)。研究表明 N 添加下, 微生物 CUE 不仅受土壤养分有效性和 pH 的调控, 同时还受土壤微生物群落结构的影响。未来进一步探究 N 添加下土壤微生物关键类群的变化可能有助于揭示森林生态系统碳存储过程。

关键词: 氮添加; 微生物碳利用效率; 微生物群落结构; 森林

The influence of soil microbial community structure on microbial carbon use efficiency under nitrogen addition

SUN Xueqi^{1,2,3}, DAI Hui^{1,2,3}, ZENG Quanxin^{1,2,3}, ZHOU Jiacong^{1,2,3}, PENG Yuanzhen^{1,2,3}, CHEN Wenwei⁴, ZHANG Qiufang^{1,2,3,*}, CHEN Yuehmin^{1,2,3}

1 School of Geographical Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

2 State Key Laboratory for Subtropical Mountain Ecology of the Ministry of Science and Technology and Fujian Province, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

3 Fujian Provincial Key Laboratory for Subtropical Resources and Environment, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

4 Daiyun Mountain National Nature Reserve Administration Bureau, Quanzhou 362500, China

Abstract: Although the level of nitrogen (N) deposition in China has gradually stabilized in recent years, N deposition in

基金项目: 国家自然科学基金(32101330); 福建省自然科学基金项目(2020J01397, 2020J01142)

收稿日期: 2023-03-19; **网络出版日期:** 2023-11-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: qiufangzh@fjnu.edu.cn

Southeast China is still at a high level compared to other regions. The effect of N deposition on the carbon cycle of terrestrial ecosystems cannot be ignored. Microbial carbon utilization efficiency (CUE) refers to the efficiency of microorganisms in converting absorbed carbon into biomass carbon; high microbial CUE implies high soil organic carbon storage potential, while low microbial CUE implies high carbon loss from the soil. High microbial CUE means high soil organic carbon storage potential. Therefore, exploring the changes of microbial CUE under the N deposition will help to further understand the changes of soil carbon storage in terrestrial ecosystems. However, there are few reports about how the change of microbial community structure affects microbial CUE under N deposition. In this study, N deposition was simulated by N addition in *Castanopsis fabri* forest in Daiyunshan National Nature Reserve, Quanzhou City, Fujian Province. The experiment included three N addition treatments: control (CT, $+0 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$), low nitrogen (LN, $+40 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$), and high nitrogen (HN, $+80 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$). The soil physical and chemical properties, microbial biomass, enzyme activity, and CUE of different treatments were determined. The microbial community structure and diversity were determined using high-throughput sequencing. The results showed that the N addition significantly affected microbial CUE, which gradually increased with the increase of N addition. On the contrary, soil pH, extractable organic carbon (EOC), and microbial biomass carbon (MBC) showed a downward trend. There was no significant effect of N addition on soil microbial community α -diversity. Non-metric multidimensional scale (NMDS) analysis showed that N addition significantly changed the microbial community structure. Especially for fungi, the fungal communities with different N addition treatments were obviously divided into three clusters. Microbial CUE was negatively correlated with soil pH, EOC, and fungal NMDS1, and positively correlated with mineral nitrogen. Random forest analyses showed that the taxa affecting microbial CUE under N addition were predominantly eutrophic (e.g., Ascomycetes and Ascomycetes) and were able to devote more carbon to growth than respiration compared to nutrient-poor taxa. To sum up, this study shows that microbial CUE is not only regulated by soil nutrient availability and pH, but also affected by soil microbial community structure under N addition. Therefore, further exploration of changes in key soil microbial taxa under N addition in the future may help to reveal the carbon storage process in forest ecosystems.

Key Words: nitrogen addition; microbial carbon use efficiency; microbial community structure; forest

中国作为最大的发展中国家,在过去几十年经历了氮(N)沉降的快速增长^[1]。近年来,中国 N 沉降水平总体上趋于稳定。但我国东南地区受经济、工业和农业活动的影响,N 沉降相比于中国其他地区仍处于较高水平。N 是植物和土壤微生物生长的必需元素^[2],适量 N 沉降可以提高植物生产力。然而,过量 N 输入会产生一些不利的生态影响,如造成土壤酸化^[3]、微生物生物量减少^[4]、群落丰度和多样性变化等^[5–6],从而影响陆地生态系统碳循环过程^[7]。微生物碳利用效率(CUE)是调节土壤碳存储的关键生理参数^[8],其定义为土壤微生物生长和呼吸之间碳的分配^[9]。较高的微生物 CUE 通常表示微生物将更多的碳转化为微生物生物量,从而增加土壤中碳的存储^[10]。因此,探究 N 沉降背景下微生物 CUE 的变化将有助于进一步认识陆地生态系统土壤碳存储的变化。

当前关于 N 添加对微生物 CUE 的影响的报道已有许多,但是土壤微生物 CUE 对 N 添加的响应结果存在广泛的差异,包括增加、降低和无响应^[11–16]。土壤微生物(细菌、真菌等)在土壤碳循环过程发挥着重要的作用^[17–18]。越来越多的研究证实微生物群落结构和多样性对 N 添加敏感。如 Morrison 等^[19]在哈佛森林进行 N 添加实验结果表明,N 添加下土壤真菌丰富度和 Shannon 指数均有所增加。Wang 等^[20]通过 meta 分析表明 N 添加改变了土壤微生物群落结构,但对土壤微生物多样性和丰富度无影响。Yuan 等^[21]发现 N 添加对土壤细菌丰度无显著影响。近期,Pold 等^[22]发现微生物 CUE 与细菌多样性呈正相关关系。综上,土壤微生物群落属性对 N 添加的响应可能是导致当前 N 添加对 CUE 影响不一致的重要原因。

然而,目前关于 N 添加下微生物群落变化如何影响微生物 CUE 鲜有报道。N 添加通常会改变土壤养分

有效性,这可能会迫使微生物调整群落结构和多样性以适应环境,进而改变微生物 CUE^[23-24]。还有研究表明,N 添加会改变一些富营养(如变形菌 *Proteobacteria*)和寡营养类群(如子囊菌 *Ascomycota*)的相对丰度^[25]。Leff 等^[26]发现,N 添加会优先支持细菌的生长,增加其对碳的获取能力,导致微生物 CUE 增加。综上,N 添加下影响微生物 CUE 的关键类群还有待进一步研究。

罗浮栲(*Castanopsis faberi*)生长快、适应性强,广泛分布在我国东南地区,是优良的用材树种。本研究以福建省戴云山国家级自然保护区的罗浮栲林土壤为研究对象,在野外进行 N 添加模拟 N 沉降,测定不同处理土壤基本理化性质、微生物生物量和酶活性,分析微生物 CUE,并利用高通量测序的方法测定微生物群落结构和多样性。通过探究 N 添加下土壤微生物 CUE 的变化及其影响因素,以期阐明 N 添加下微生物群落对 CUE 的影响,为 N 沉降加剧背景下亚热带森林生态系统碳循环模型提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

本研究区位于福建省泉州市德化县戴云山国家森林公园保护区(25°38'—25°43' N, 118°05' E),属亚热带海洋性季风气候,年平均气温在 15.6—19.5℃,年降水量为 1700—2000 mm^[27],降水主要集中在 3—9 月^[28]。本研究实验样地以罗浮栲(*Castanopsis faberi*)为优势树种,主要林下植被包括深山含笑(*Michelia maudiae*)、乌药(*Lindera aggregata*)、木荷(*Schima superba*)、毛冬青(*Ilex pubescens*)等。

1.2 实验设计

参考亚热带地区 N 沉降的背景值^[29],在罗浮栲林设置了 12 块大小为 10 m × 10 m 的样方,按照随机区组设置了 3 个 N 添加水平:对照(CT, +0 kg N hm⁻² a⁻¹)、低氮添加(LN, +40 kg N hm⁻² a⁻¹)和高氮添加(HN, +80 kg N hm⁻² a⁻¹),每个 N 添加水平设置 4 个重复。各样方间隔 10 m 以上作为缓冲带。从 2020 年 5 月开始,在每年 3—9 月进行 N 添加,根据 N 添加水平将一定质量的尿素[CO(NH₂)₂]溶于 20 L 去离子水中,使用背式喷雾器均匀喷洒在 LN 和 HN 样地,模拟 N 沉降。在对照样地喷洒等量去离子水。

1.3 样品采集

于 2021 年 7 月进行土壤样品采集。去除土壤表面凋落物后,采用五点取样法取矿质层 0—10 cm 土壤。采集土壤样品后立刻带回实验室。于室内去除土壤样品中的石块、植物根系后,取适量土壤过 2 mm 筛并分成三份。一份土壤自然风干后测定土壤理化性质;一份新鲜土壤置于 4℃ 冰箱中,用于测定土壤酶活性、微生物生物量、微生物碳利用效率、可提取有机碳和矿质氮等;一份新鲜土壤放入 -80℃ 冰箱中用于微生物高通量测序。

1.4 土壤理化性质的测定

土壤酸碱度(pH)使用玻璃电极 pH 计(STARTER 300,美国)测定,其土水比为 1:2.5。取部分风干后的土壤,加入 1 mol/L HCl 去除碳酸盐,随后使用碳氮元素分析仪(Elementar Vario EL III,德国)测定土壤有机碳(SOC)和总氮(TN)含量。可提取有机碳(EOC)用土水比 1:4 浸提,用总有机碳分析仪(TOC-VCPH/CPN,日本)测定 EOC 含量。土壤矿质氮用 2 mol/L KCl 溶液浸提,然后通过连续流动分析仪(Skalar san++,荷兰)测定滤液中的 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量。有效磷利用 M3(乙酸、浓硝酸、硝酸铵、氟化铵和 EDTA 混合溶液)浸提法提取,随后使用连续流动分析仪测定。

1.5 微生物生物量的测定

微生物生物量碳(MBC)和微生物生物量氮(MBN)的提取使用氯仿熏蒸-硫酸钾浸提法^[30],通过总有机碳分析仪测定浸提液中的总有机碳含量,用连续流动分析仪测定浸提液中的总氮含量。MBC 的计算公式为: $MBC = \Delta E_c / K_c$,其中, ΔE_c 是熏蒸与未熏蒸土壤有机碳含量的差值; $K_c = 0.45$,是 MBC 的浸提系数。MBN 的计算公式为: $MBN = \Delta E_N / K_N$,其中, ΔE_N 是熏蒸与未熏蒸土壤有机碳含量的差值; $K_N = 0.54$,是 MBN 的浸提系数。用氯仿熏蒸-碳酸氢钠浸提法提取微生物生物量磷(MBP),用连续流动分析仪测定浸提液中的磷酸盐含量。

1.6 酶活性的测定和 CUE 的计算

按照 Saiya-Cork 等^[31]的方法测定与碳、氮、磷获取相关的酶。本研究中,碳获取酶为 β -葡萄糖苷酶 (β G),底物为 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷;氮获取酶为 β -N-乙酰氨基酸葡萄糖苷酶 (NAG),底物为 4-甲基伞形基-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷;磷获取酶为酸性磷酸单酯酶 (AcP),底物为 4-甲基伞形基-磷酸盐。具体方法为:取 1 g 新鲜土壤,用 125 mL 50 mol/L 醋酸盐缓冲溶液 (pH=5) 提取,使用磁力搅拌器使其匀质,静置后取上清液待用。将上清液与相应底物注入 96 孔微孔板中,培养后用多功能酶标仪 (SpectraMax M5, 美国) 测定,测定波长为 360 nm 和 450 nm。单位微生物产酶能力用酶活性与 MBC 的比值表示。微生物碳利用效率 (CUE) 计算如下:

$$CUE = CUE_{\max} \times \{ (S_{C:N} \times S_{C:P}) / [(K_{C:N} + S_{C:N}) \times (K_{C:P} + S_{C:P})] \}^{0.5} \quad (1)$$

$$S_{C:N} = \frac{B_{C:N}}{L_{C:N}} \times \frac{1}{EEA_{C:N}} \quad (2)$$

$$S_{C:P} = \frac{B_{C:P}}{L_{C:P}} \times \frac{1}{EEA_{C:P}} \quad (3)$$

式中, $CUE_{\max}$ 为 0.6。 $B_{C:N}$ 和 $B_{C:P}$ 分别为 MBC:MBN 比和 MBC:MBP 比; $L_{C:N}$ 和 $L_{C:P}$ 分别为可提取有机碳:矿质氮比和可提取有机碳:有效磷比。 $K_{C:N}$ 和 $K_{C:P}$ 为半饱和常数,均为 0.5; $EEA_{C:N}$ 和 $EEA_{C:P}$ 分别为 β G:NAG 比和 β G:AcP 比。

1.7 微生物 DNA 的提取与高通量测序

使用 Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, 美国) 提取土壤中总 DNA。DNA 提取完毕后,使用引物 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGG) 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对细菌 16S rRNA 基因的 V3-4 区进行 PCR 扩增测序。使用引物 ITS1F (5'-CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 对真菌的 ITS 基因片段进行 PCR 扩增和测序。对 PCR 扩增产物进行处理后,使用 Illumina[®] MiSeq 测序仪 (Illumina, San Diego, USA) 进行测序分析。处理后得到相似水平为 97% 的可操作分类单元 (OTU) 再进行进一步分析。

1.8 数据分析

采用单因素方差分析检验 N 添加对土壤理化性质、微生物生物量、酶活性和 CUE 的影响,使用最小显著性差异法比较不同处理间的差异显著性 ($\alpha = 0.05$)。微生物群落 α 多样性利用均匀度指数 (Shannon 和 Simpson 指数) 和丰富度指数 (Chao1 和 Ace 指数) 指示。使用基于 Bray-Curtis 距离矩阵的非度量多维分析 (NMDS) 表示不同处理下微生物群落结构的变化 (基于 OTU 水平)。使用线性回归分析探究土壤理化性质、微生物群落结构与 CUE 之间的关系。采用随机森林模型确定 N 添加下影响微生物 CUE 的关键微生物 OTU (纲/目/科/属/种水平)。使用 Pearson 相关分析探究关键微生物 OTU 与微生物 CUE 的相关关系。所有的统计分析通过 SPSS 22.0 和 R 4.1.0 软件完成,使用软件 Origin 9.1 绘制柱状图,图表中的数据为平均值 $\pm$ 标准差。

2 结果与分析

2.1 氮添加对土壤理化性质的影响

本研究发现,N 添加影响土壤基本理化性质。随着 N 添加水平的增加,土壤 pH、EOC 和 MBC 呈现下降趋势 (表 1)。与 CT 相比, LN 处理下土壤 EOC 和 MBC 含量无显著变化 ($P > 0.05$),但在 HN 处理中 EOC 和 MBC 含量分别显著降低约 50% 和 32% ($P < 0.05$)。相反,N 添加显著影响矿质氮含量 ($P < 0.01$),土壤矿质氮随着 N 添加水平的增加而显著增加。与 CT 相比, LN 和 HN 处理中矿质氮含量分别显著增加了 36% 和 49% ($P < 0.05$)。

表 1 氮添加对土壤基本理化性质和酶活性的影响

Table 1 Effects of nitrogen addition on soil physical and chemical properties and enzyme activities

项目 Item	对照 CT	低氮 LN	高氮 HN	显著性 <i>P</i>
pH	5.12±0.11a	4.75±0.01b	4.50±0.02b	0.09
SOC/(g/kg)	54.64±3.42b	60.80±0.28a	61.78±0.71a	<0.01
EOC/(mg/kg)	210.25±36.36a	149.43±47.03ab	105.94±35.14b	0.02
MN/(mg/kg)	55.43±0.17c	65.06±0.14b	76.13±0.03a	<0.01
TN/(mg/kg)	3.06±0.01b	3.36±0.04ab	3.62±0.04a	<0.01
MBC/(mg/kg)	2006.95±131.99a	1742.11±153.57a	1371.47±225.10b	<0.01
MBN/(mg/kg)	79.84±21.73a	93.95±9.06a	89.79±14.15a	0.47
酶活性 Enzyme activity/(nmol g ⁻¹ h ⁻¹)				
βG	10.57±0.20a	6.82±0.14b	5.70±0.26c	<0.01
NAG	30.18±0.32a	20.86±0.63b	20.46±0.39b	<0.01
AcP	1381.43±172.14a	1265.91±341.45a	811.99±202.36b	0.02
单位产酶能力 Unit enzyme production capacity/(nmol g ⁻¹ MBC ⁻¹ h ⁻¹)				
βG	0.0053±0.0004a	0.0040±0.0003b	0.0042±0.0006b	<0.01
NAG	0.0151±0.0009a	0.0120±0.0011b	0.0132±0.0015b	0.04
AcP	0.69±0.08b	0.86±0.07a	0.97±0.32a	0.71

P 值表示 N 添加影响的显著性; 同一行不同字母表示不同氮添加处理差异显著 ($P<0.05$); CT: 对照, control; LN: 低氮, low nitrogen; HN: 高氮, high nitrogen; pH: 土壤酸碱度; SOC: 土壤有机碳, soil organic carbon; EOC: 可提取有机碳, extractable organic carbon; MN: 矿质氮, mineral nitrogen; TN: 总氮, total nitrogen; MBC: 微生物生物量碳, microbial biomass carbon; MBN: 微生物生物量氮, microbial biomass nitrogen; βG: β-葡萄糖苷酶, β-glucosidase; NAG: β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, β-N-acetylglucosaminidase; AcP: 酸性磷酸酶, Acid phosphatase

2.2 氮添加对土壤微生物碳利用效率的影响

N 添加显著影响 βG ($P<0.01$)、NAG ($P<0.01$) 和 AcP ($P=0.02$) 活性。与 CT 相比, LN 和 HN 处理的 βG 活性分别显著下降 35% 和 46% ($P<0.05$); NAG 活性在 LN 和 HN 中分别显著下降 31% 和 32%; LN 和 HN 处理下 AcP 活性分别降低 8% 和 41%。类似地, 随着 N 添加水平的增加, 土壤 βG ($P<0.01$) 和 NAG ($P<0.05$) 的单位产酶能力显著降低。在不同 N 添加处理中, CT 处理的 CUE 显著最低, HN 处理的 CUE 显著最高。总体上, 随着 N 添加水平的增加, 微生物 CUE 呈现增加趋势 (图 1)。与对照相比, LN 和 HN 处理的微生物 CUE 分别增加 4% ($P>0.05$) 和 9% ($P<0.05$)。

2.3 氮添加对土壤微生物 α 多样性和群落结构的影响

本研究发现, N 添加对土壤微生物群落 α 多样性 (如 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数和 Ace 指数) 总体上无显著影响 (表 2)。相反, NMDS 分析表明,

N 添加显著改变了微生物群落结构 (图 2)。尤其对于真菌而言, 不同 N 添加处理的真菌群落明显分开为三簇 (图 2, $P<0.001$)。

2.4 土壤微生物 CUE 影响因子的相关性分析

回归分析表明, 微生物 CUE 分别与土壤 pH ($P=0.06$, $R^2=0.31$, 图 3) 和 EOC ($P<0.01$, $R^2=0.86$, 图 3) 呈显著的负相关关系, 与矿质氮含量呈现显著正相关关系 ($P=0.03$, $R^2=0.41$, 图 3)。此外, 我们还发现土壤微生物 CUE 与 NMDS1 呈显著的负相关关系 ($P=0.08$, $R^2=0.28$, 图 3)。随机森林分析表明, N 添加下影响微生物 CUE 的类群主要是变形菌门 ($P<0.01$, 例如 OTU2978 和 OTU2937)、子囊菌门 ($P<0.05$, 例如 OTU4265、

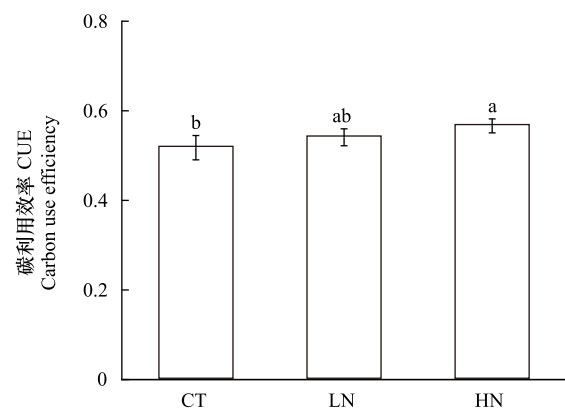


图 1 氮添加对土壤微生物碳利用效率 (CUE) 的影响

Fig.1 Effect of nitrogen addition on soil microbial carbon use efficiency

不同字母表示不同氮添加处理差异显著 ($P<0.05$); CT: 对照, control; LN: 低氮, low nitrogen; HN: 高氮, high nitrogen

OTU4528、OTU3837、OTU2130、OTU4630、OTU5236 和 OTU2027) 和罗兹菌门 ($P<0.05$, 例如 OTU4550), 其中, 子囊菌门和罗兹菌门属于真菌(表 3)。

表 2 氮添加对土壤微生物群落 α 多样性的影响

Table 2 Effect of nitrogen addition on soil microbial community α-diversity

项目 Item	处理 Control	Shannon 指数 Shannon Index	Simpson 指数 Simpson Index	Chao1 指数 Chao1 Index	Ace 指数 Ace Index
细菌 Bacteria	CT	5.53±0.12ab	0.012±0.002	1994.36±68.44	2172.33±250.01
	LN	5.62±0.05a	0.011±0.001	2034.99±69.76	2049.11±56.74
	HN	5.36±0.17b	0.015±0.003	1966.16±104.04	2131.39±189.12
	<i>P</i>	<0.05	0.09	0.52	0.64
真菌 Fungi	CT	4.68±0.21	0.03±0.01	2179.76±158.89	2200.74±168.76
	LN	4.62±0.61	0.04±0.02	2229.69±140.06	2245.50±138.69
	HN	4.29±0.28	0.06±0.02	2019.61±93.55	2054.35±84.99
	<i>P</i>	0.38	0.15	0.12	0.17

P 值表示 N 添加对同一种微生物群落多样性影响的显著性; 同一列不同字母表示同一种微生物群落不同氮添加处理差异显著 ($P<0.05$)

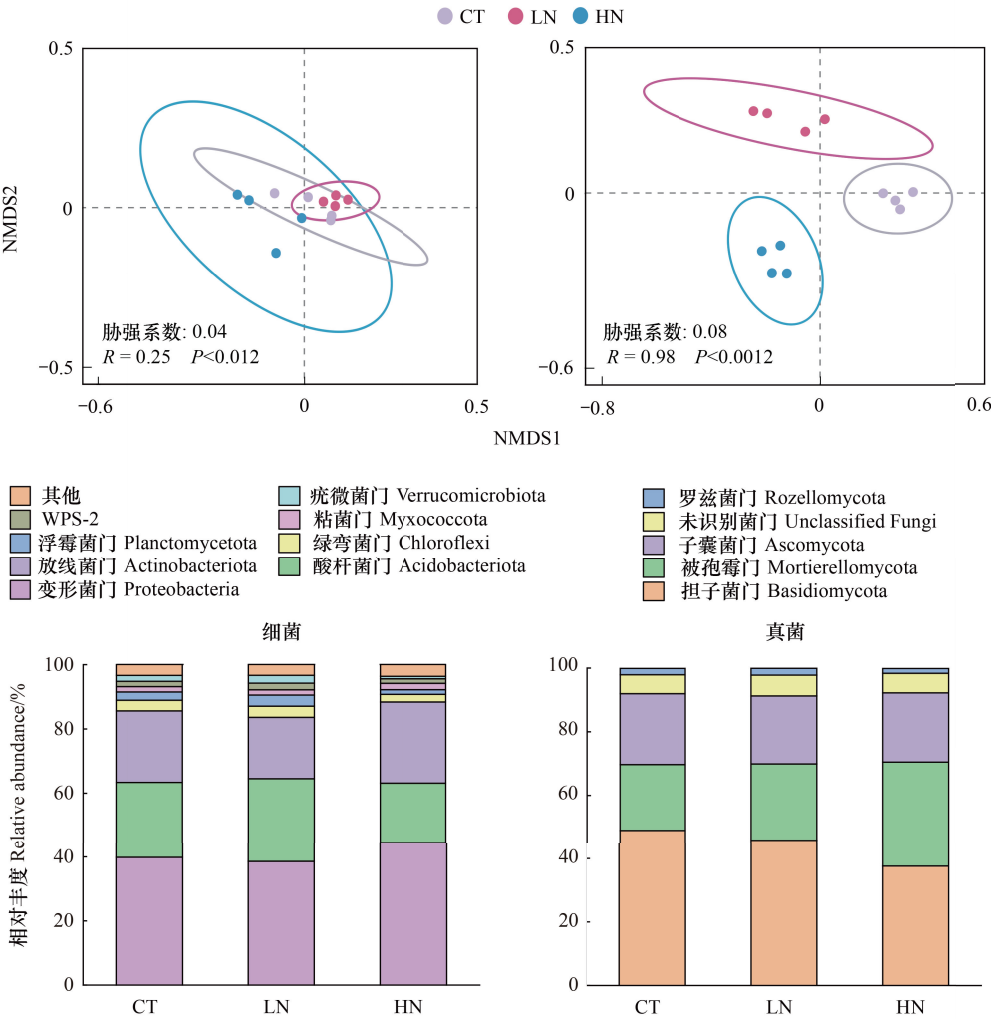


图 2 氮添加下土壤细菌和真菌群落结构(基于 OTU 水平)的非度量多维度尺度(NMDS)分析与细菌和真菌群落相对丰度

Fig.2 Non metric multidimensional scale (NMDS) analysis of soil bacterial and fungal community structure (based on OTU level) under nitrogen addition and relative abundance map of bacterial and fungal communities

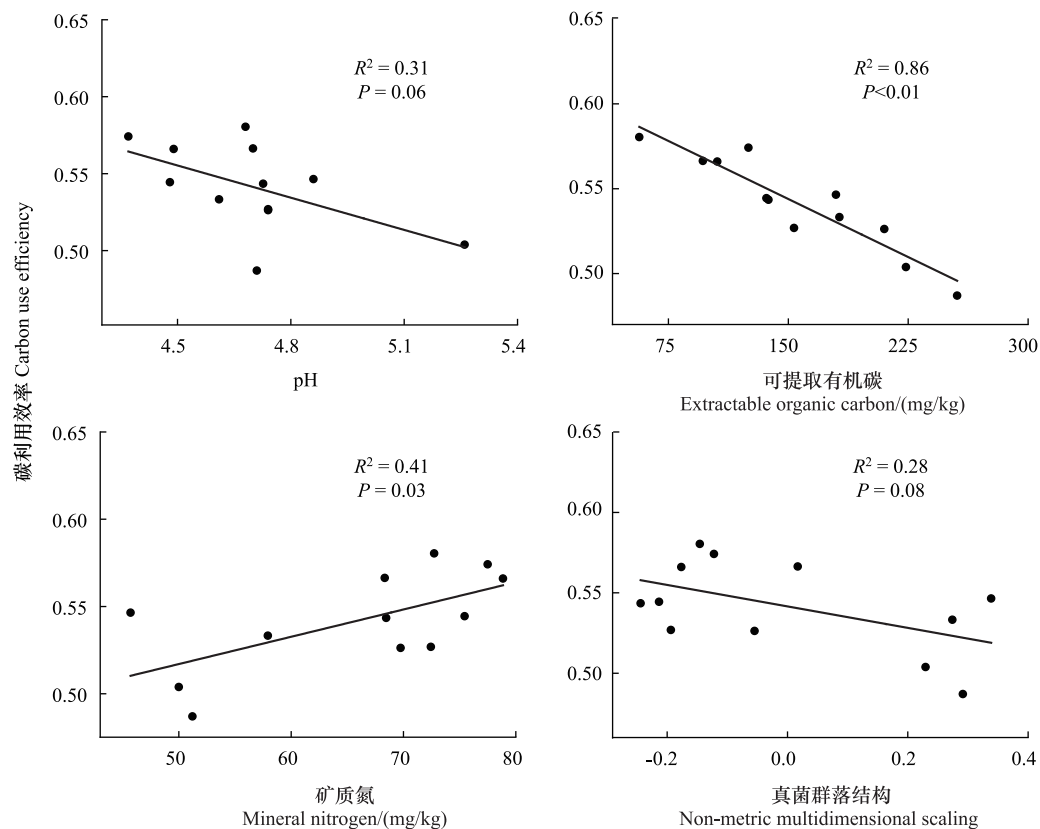


图 3 氮添加下土壤理化性质酸碱度、可提取有机碳、矿质氮和真菌群落结构与微生物碳利用效率 (CUE) 的相关分析

Fig.3 Correlation analysis of soil physicochemical properties acidity and alkalinity, extractable organic carbon, mineral nitrogen and fungal community structure with microbial carbon use efficiency (CUE) under nitrogen addition

表 3 氮添加下显著影响影响微生物碳利用效率的重要预测因子与微生物碳利用效率之间的 Pearson 相关性

Table 3 Pearson correlation between important predictive factors that significantly affect microbial carbon use efficiency and microbial carbon use efficiency under nitrogen addition

可操作分 类单元 OTU	显著性 <i>P</i>	门 Phylum	纲/目/科/属/种 Class/Order/Family/ Genus/Species	可操作分 类单元 OTU	显著性 <i>P</i>	门 Phylum	纲/目/科/属/种 Class/Order/Family/ Genus/Species
OTU2978	0.91 **	变形菌门	JG36-TzT-191	OTU4630	-0.73 **	子囊菌门	Amplstroma_erinaceum
OTU2937	0.76 **	变形菌门	KF-JG30-C25	OTU5236	-0.84 **	子囊菌门	Orbiliaceae
OTU4528	-0.84 **	子囊菌门	Ascomycota	OTU2027	-0.84 **	子囊菌门	Sordariomycetes
OTU3837	-0.69 *	子囊菌门	Sordariomycetes	OTU4265	-0.60 *	子囊菌门	Helotiales
OTU2130	0.58 *	子囊菌门	Ascomycota	OTU4550	-0.77 *	罗兹菌门	Rozellomycota_sp

* *P*<0.05; ** *P*<0.01; OTU: 可操作分类单元 Operational taxonomic units

3 讨论

3.1 氮添加下微生物 CUE 变化的原因

本研究发现 N 添加显著影响微生物 CUE,尤其是 HN 添加显著提高微生物 CUE,这与 Soares 和 Rousk^[31]和 Spohn 等^[32]的研究结果类似。N 添加促进微生物 CUE,这一结果可能与以下三个原因相关:第一,与前期结果一致^[33],本研究结果发现 N 添加增加土壤矿质氮,降低土壤 pH (表 1),同时,微生物 CUE 与 pH 呈显著的负相关关系,表明微生物 CUE 受 pH 的影响。N 添加导致的土壤酸化降低微生物生物量(如 MBC),抑制微生物呼吸,进而促进微生物 CUE^[34]。第二,根据生态学代谢理论和生态化学计量学理论,当微生物群落受碳限制时,CUE 增加^[35]。一致地,本研究发现微生物 CUE 与 EOC 呈显著的负相关关系,进一步表明本研究区 N

添加下微生物 CUE 受土壤碳有效性的调控。第三,本研究发现 N 添加对细菌或真菌群落的 α 多样性均无显著影响。相反,NMDS 分析结果表明 N 添加显著影响土壤微生物群落结构,尤其是真菌的群落结构在不同 N 添加处理下明显分开为三簇(图 2),表明土壤真菌群落结构对 N 添加更加敏感。此外,本研究发现微生物 CUE 与真菌 NMDS1 呈显著的负相关关系,表明 N 添加下微生物 CUE 的变化可能受真菌群落结构的影响。综上,微生物 CUE 在 N 添加下增加不仅受土壤 pH 和碳有效性的调控,同时还受微生物属性的影响。更进一步的,CUE 在 N 添加下增加可能是微生物群落结构转变的结果。

3.2 影响 CUE 变化的关键微生物类群

为了寻找影响微生物 CUE 变化的关键微生物类群,进一步通过随机森林分析发现(图 4),N 添加下影响微生物 CUE 的主要微生物类群是变形菌门(*Proteobacteria*)和子囊菌门(*Ascomycota*)。其中,变形菌是土壤细菌中最丰富的类群之一^[36]。Wang 等^[37]研究发现,在细菌群落中,隶属于富营养类群的变形菌门和放线菌门对活性底物的利用能力显著高于寡营养类群的酸杆菌门和绿弯菌门。本研究中,与对照相比,变形菌门的相对丰度在高 N 添加下增加。相反,高 N 添加降低土壤 EOC,这可能是富营养菌类群(如变形菌门)优先利用的结果。此外,本研究发现 N 添加下影响微生物 CUE 的微生物类群大多属于真菌,表明真菌是 N 添加下微生物 CUE 升高的主要贡献者之一^[38],进一步支持土壤真菌在碳储存方面发挥着至关重要的作用^[25]。据报道,土壤养分的变化会使真菌的优势类群发生改变以促进微生物对土壤养分的获取并满足自身的生长需求^[40]。一致地,本研究发现,N 添加显著影响真菌群落组成。随机森林结果显示,隶属于子囊菌门的 OTU 对微生物 CUE 对 N 添加的响应具有显著影响。子囊菌门是真菌中富营养类群的典型代表^[41]。相比于贫营养类群的微生物,富营养类群能投入更多的碳用于生长,进而提高微生物 CUE。综上,本研究表明,富营养类群是影响微生物 CUE 对 N 添加响应的重要微生物。

4 结论

(1) N 添加显著影响微生物 CUE,随着 N 添加水平的增加,CUE 逐渐增加。微生物 CUE 与 pH、EOC 和真菌 NMDS1 呈显著负相关,表明 N 添加下微生物 CUE 不仅受土壤养分有效性和 pH 的调控,同时还受土壤真菌微生物群落结构的影响。

(2) N 添加下主要影响微生物 CUE 的类群是富营养类群。

(3) 未来进一步探究 N 添加下土壤微生物关键类群的变化可能有助于揭示森林生态系统碳存储过程。

参考文献(References):

- [1] Wang C, Liu D W, Bai E. Decreasing soil microbial diversity is associated with decreasing microbial biomass under nitrogen addition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 120: 126-133.
- [2] Du E Z, Terrer C, Pellegrini A F A, Ahlström A, van Lissa C J, Zhao X, Xia N, Wu X H, Jackson R B. Global patterns of terrestrial nitrogen and phosphorus limitation. *Nature Geoscience*, 2020, 13(3): 221-226.

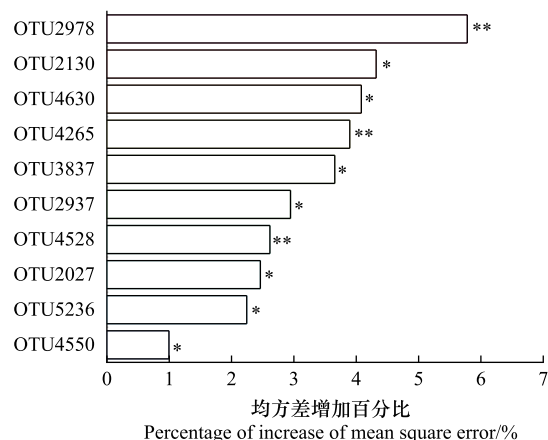


图 4 基于随机森林分析筛选氮添加下影响微生物碳利用效率的微生物 OTU 的相对重要性(MSE 增加的百分比)

Fig.4 Based on random forest analysis, the relative importance of microbial OTU affecting microbial carbon use efficiency under nitrogen addition was screened (percentage of MSE increase)

通过随机森林模型和 Pearson 相关分析,确定重要的微生物类群 OTU(纲/目/科/属/种水平)作为 N 添加下微生物碳利用效率的重要预测因子(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$); MSE: 均方误差, Mean squared error; OTU: 可操作分类单元, Operational taxonomic units

- [3] Tian D S, Niu S L. A global analysis of soil acidification caused by nitrogen addition. *Environmental Research Letters*, 2015, 10(2): 024019.
- [4] Treseder K K. Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. *Ecology Letters*, 2008, 11(10): 1111-1120.
- [5] Xia Z W, Yang J Y, Sang C P, Wang X, Sun L F, Jiang P, Wang C, Bai E. Phosphorus reduces negative effects of nitrogen addition on soil microbial communities and functions. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1828.
- [6] Zhou Z H, Wang C K, Luo Y Q. Meta-analysis of the impacts of global change factors on soil microbial diversity and functionality. *Nature Communications*, 2020, 11: 3072.
- [7] Crowther T W, van den Hoogen J, Wan J, Mayes M A, Keiser A D, Mo L, Averill C, Maynard D S. The global soil community and its influence on biogeochemistry. *Science*, 2019, 365(6455): eaav0550.
- [8] Spohn M, Klaus K, Wanek W, Richter A. Microbial carbon use efficiency and biomass turnover times depending on soil depth-Implications for carbon cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96: 74-81.
- [9] Manzoni S, Taylor P, Richter A, Porporato A, Ågren G I. Environmental and stoichiometric controls on microbial carbon-use efficiency in soils. *New Phytologist*, 2012, 196(1): 79-91.
- [10] Prommer J, Walker T W N, Wanek W, Braun J, Zezula D, Hu Y T, Hofhansl F, Richter A. Increased microbial growth, biomass, and turnover drive soil organic carbon accumulation at higher plant diversity. *Global Change Biology*, 2020, 26(2): 669-681.
- [11] 戴辉, 曾泉鑫, 周嘉聪, 彭园珍, 孙雪琦, 陈静琪, 陈文伟, 陈岳民. 罗浮栲林土壤微生物碳利用效率对短期氮添加的响应. *应用生态学报*, 2022, 33(10): 2611-2618.
- [12] Li J, Sang C P, Yang J Y, Qu L R, Xia Z W, Sun H, Jiang P, Wang X G, He H B, Wang C. Stoichiometric imbalance and microbial community regulate microbial elements use efficiencies under nitrogen addition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 156: 108207.
- [13] Silva-Sánchez A, Soares M, Rousk J. Testing the dependence of microbial growth and carbon use efficiency on nitrogen availability, pH, and organic matter quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 134: 25-35.
- [14] Ma T, Gao W J, Shi B W, Yang Z Y, Li Y F, Zhu J X, He J S. Effects of short- and long-term nutrient addition on microbial carbon use efficiency and carbon accumulation efficiency in the Tibetan alpine grassland. *Soil and Tillage Research*, 2023, 229: 105657.
- [15] Widdig M, Schleuss P M, Biederman L A, Borer E T, Crawley M J, Kirkman K P, Seabloom E W, Wrapp P D, Spohn M. Microbial carbon use efficiency in grassland soils subjected to nitrogen and phosphorus additions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 146: 107815.
- [16] Feng X H, Qin S Q, Zhang D Y, Chen P D, Hu J E, Wang G Q, Liu Y, Wei B, Li Q L, Yang Y H, Chen L Y. Nitrogen input enhances microbial carbon use efficiency by altering plant-microbe-mineral interactions. *Global Change Biology*, 2022, 28(16): 4845-4860.
- [17] Kuypers M M M, Marchant H K, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263-276.
- [18] Sokol N W, Whalen E D, Jilling A, Kallenbach C, Pett-Ridge J, Georgiou K. Global distribution, formation and fate of mineral-associated soil organic matter under a changing climate: a trait-based perspective. *Functional Ecology*, 2022, 36(6): 1411-1429.
- [19] Morrison E W, Frey S D, Sadowsky J J, van Diepen L T A, Thomas W K, Pringle A. Chronic nitrogen additions fundamentally restructure the soil fungal community in a temperate forest. *Fungal Ecology*, 2016, 23: 48-57.
- [20] Wang X D, Feng J G, Ao G, Qin W K, Han M G, Shen Y W, Liu M L, Chen Y, Zhu B. Globally nitrogen addition alters soil microbial community structure, but has minor effects on soil microbial diversity and richness. *Soil Biology and Biochemistry*, 2023, 179: 108982.
- [21] Yuan X B, Niu D C, Weber-Grullon L, Fu H. Nitrogen deposition enhances plant-microbe interactions in a semiarid grassland: the role of soil physicochemical properties. *Geoderma*, 2020, 373: 114446.
- [22] Pold G, Domeignoz-Horta L A, Morrison E W, Frey S D, Sistla S A, DeAngelis K M. Carbon use efficiency and its temperature sensitivity covary in soil bacteria. *mBio*, 2020, 11(1): e02293-e02219.
- [23] Sinsabaugh R, Manzoni S, Moorhead D, Richter A. Carbon use efficiency of microbial communities: stoichiometry, methodology and modelling. *Ecology Letters*, 2013, 16(7): 930-939.
- [24] Fuchslueger L, Wild B, Mooshammer M, Takriti M, Kienzl S, Knoltsch A, Hofhansl F, Bahn M, Richter A. Microbial carbon and nitrogen cycling responses to drought and temperature in differently managed mountain grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 135: 144-153.
- [25] Ramirez K S, Lauber C L, Knight R, Bradford M A, Fierer N. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology*, 2010, 91(12): 3463-3470; discussion 3503-3514.
- [26] Leff J W, Jones S E, Prober S M, Barberán A, Borer E T, Firn J L, Harpole W S, Hobbie S E, Hofmockel K S, Knops J M H, McCulley R L, La Pierre K, Risch A C, Seabloom E W, Schütz M, Steenbock C, Stevens C J, Fierer N. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(35): 10967-10972.
- [27] 李梦佳, 何中声, 江蓝, 谷新光, 晋梦然, 陈博, 刘金福. 戴云山物种多样性与系统发育多样性海拔梯度分布格局及驱动因子. *生态学报*, 2021, 41(3): 1148-1157.

- [28] 袁磊, 李文周, 陈文伟, 张金波, 蔡祖聪. 戴云山国家级自然保护区大气氮沉降特点. 环境科学, 2016, 37(11): 4142-4146.
- [29] 周国逸, 闫俊华. 鼎湖山区域大气降水特征和物质元素输入对森林生态系统存在和发育的影响. 生态学报, 2001, 21(12): 2002-2012.
- [30] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry, 1987, 19(6): 703-707.
- [31] Saiya-Cork K R, Sinsabaugh R L, Zak D R. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(9): 1309-1315.
- [32] Soares M, Rousk J. Microbial growth and carbon use efficiency in soil: links to fungal-bacterial dominance, SOC-quality and stoichiometry. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 131: 195-205.
- [33] Spohn M, Pötsch E M, Eichorst S A, Wobken D, Wanek W, Richter A. Soil microbial carbon use efficiency and biomass turnover in a long-term fertilization experiment in a temperate grassland. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 97: 168-175.
- [34] 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.
- [35] Keiblinger K M, Hall E K, Wanek W, Szukics U, Hämmerle I, Ellersdorfer G, Böck S, Strauss J, Sterflinger K, Richter A, Zechmeister-Boltenstern S. The effect of resource quantity and resource stoichiometry on microbial carbon-use-efficiency. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 73(3): 430-440.
- [36] Deng J J, Yin Y, Zhu W X, Zhou Y B. Variations in soil bacterial community diversity and structures among different revegetation types in the Baishilazi nature reserve. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2874.
- [37] Wang X X, Zhang W, Liu Y, Jia Z J, Li H, Yang Y F, Wang D M, He H B, Zhang X D. Identification of microbial strategies for labile substrate utilization at phylogenetic classification using a microcosm approach. Soil Biology and Biochemistry, 2021, 153: 107970.
- [38] Nemergut D R, Costello E K, Hamady M, Lozupone C, Jiang L, Schmidt S K, Fierer N, Townsend A R, Cleveland C C, Stanish L, Knight R. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. Environmental Microbiology, 2011, 13(1): 135-144.
- [39] Liang C, Amelung W, Lehmann J, Kästner M. Quantitative assessment of microbial necromass contribution to soil organic matter. Global Change Biology, 2019, 25(11): 3578-3590.
- [40] Ma S L, Zhu W Z, Wang W W, Li X, Sheng Z L. Microbial assemblies with distinct trophic strategies drive changes in soil microbial carbon use efficiency along vegetation primary succession in a glacier retreat area of the southeastern Tibetan Plateau. Science of the Total Environment, 2023, 867: 161587.