DOI: 10. 11686/cyxb2025502 http://cyxb. magtech. com. cn
曹鑫鑫, 邓军, 陈梦菲, 等. 增温与氮沉降交互对黄土高原半干旱草地土壤氮转化过程及微生物的影响. 草业学报, 2026, 35(12): 16－29.
CAO Xin-xin, DENG Jun, CHEN Meng-fei, *et al*. An evaluation of interaction between warming and nitrogen deposition with respect to soil nitrogen transformation processes and microbial communities in a semi-arid grassland on the Loess Plateau. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(12): 16－29.

增温与氮沉降交互对黄土高原半干旱草地土壤氮转化过程及微生物的影响

曹鑫鑫[1,9], 邓军[2], 陈梦菲[1,3], 张康成[1], 何堂庆[1], 张艺[1], 冯文颜[4], 王益[5], 邱开阳[6], 杨德军[7], 张珮[8], 胡水金[9], 任成宝[2*], 仇云鹏[9*]

(1. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 宁夏云雾山国家级自然保护区管理局, 宁夏 固原 756099; 3. 安徽省林业局林木种苗总站, 安徽 合肥 230031; 4. 吴忠市兰亭中学, 宁夏 吴忠 751100; 5. 中国科学院地球环境研究所黄土科学全国重点实验室, 陕西 西安 710061; 6. 宁夏大学林业与草业学院, 宁夏 银川 750021; 7. 中国矿业大学环境与测绘学院, 江苏 徐州 221116; 8. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 610065; 9. 南京农业大学草业学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 全球变化显著影响陆地生态系统中植物生长与养分循环过程, 但增温与氮沉降交互作用如何调控半干旱草地土壤氮转化过程尚缺乏深入研究。依托宁夏云雾山黄土高原半干旱草地的野外控制试验(2015－2019 年), 设置增温、施氮、增温和施氮的交互处理以及空白对照, 系统探讨了全球变化因子交互作用下土壤氮循环的响应特征及其微生物调控机制。结果表明, 增温显著增加了土壤微生物生物量氮(MBN)含量和氨氧化细菌(AOB)丰度, 但降低了土壤反硝化潜势(PDA), 而对多数土壤理化性质、硝化潜势(PNR)、氧化亚氮(N_2O)排放潜势及反硝化功能基因丰度无显著影响。施氮显著增加了土壤可溶性无机氮(DIN)含量、PNR 和 PDA, 同时提高了 AOB-*amoA* 和 *nosZ* Ⅱ基因丰度, 改变了 AOB 及部分反硝化基因(*nirK* 和 *nirS*)群落结构。增温和施氮的交互作用进一步提高了 MBN 含量, 显著影响 *nirK* 群落结构及其优势片段的相对丰度, 并对部分 *nirK* 和 *nirS* 片段产生交互效应, 但对主要土壤性质、PNR、PDA、N_2O 排放潜势及 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 均无显著影响。综上, 研究结果揭示了未来气候变暖和氮沉降对半干旱草地土壤氮转化过程及其微生物驱动机制的复杂影响, 为干旱半干旱区生态系统氮素管理与全球变化背景下的气候响应评估提供了重要科学依据。

关键词: 增温; 氮沉降; 氧化亚氮; 硝化作用; 反硝化作用; 黄土高原; 半干旱草地

An evaluation of interaction between warming and nitrogen deposition with respect to soil nitrogen transformation processes and microbial communities in a semi-arid grassland on the Loess Plateau

CAO Xin-xin[1,9], DENG Jun[2], CHEN Meng-fei[1,3], ZHANG Kang-cheng[1], HE Tang-qing[1], ZHANG Yi[1], FENG Wen-yan[4], WANG Yi[5], QIU Kai-yang[6], YANG De-jun[7], ZHANG Pei[8], HU Shui-jin[9], REN Cheng-bao[2*], QIU Yun-peng[9*]

1. *College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*; 2. *Administration Bureau of Ningxia Yunwushan National Nature Reserve, Guyuan* 756099, *China*; 3. *General Station of Forest Seed and Seedling, Anhui Provincial Forestry Bureau, Hefei* 230031, *China*; 4. *Lanting Middle School, Wuzhong* 751100, *China*; 5. *State Key Laboratory of Loess Science, Institute of Earth Environment, Chinese Academy of Sciences, Xi' an* 710061, *China*; 6. *School of*

收稿日期: 2025-12-10; 改回日期: 2026-01-27
基金项目: 国家自然科学基金(32371626)和江苏省自然科学基金(BK20240193)资助。
作者简介: 曹鑫鑫(2002－), 女, 安徽安庆人, 在读硕士。E-mail: cxx0224@stu. njau. edu. cn
*通信作者 Corresponding author. E-mail: 472656942@qq. com, yunpeng_qiu@njau. edu. cn

Forestry and Grassland Science, *Ningxia University*, *Yinchuan* 750021, *China*; 7. *School of Environment and Spatial Informatics*, *China University of Mining and Technology*, *Xuzhou* 221116, *China*; 8. *College of Life Sciences*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610065, *China*; 9. *College of Grassland Science*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*

Abstract: Global change profoundly influences plant growth and nutrient cycling in terrestrial ecosystems. However, how warming and atmospheric nitrogen (N) deposition interact to regulate soil nitrogen transformations in semi-arid grasslands remains poorly understood. During a five-year (2015—2019) field manipulation experiment conducted in the Yunwu Mountain semi-arid grassland on the Loess Plateau in Ningxia, China, four treatments were implemented to systematically examine the responses of soil N cycling and its microbial regulatory mechanisms to the two global change factors, N deposition and warming. The four treatments were: a control, warming, N addition, and a combination of warming and N addition. Warming alone significantly increased soil microbial biomass nitrogen (MBN) content and the abundance of ammonia-oxidizing bacteria (AOB), but significantly reduced potential denitrification activity (PDA). In contrast, warming had no significant effects on most soil physicochemical properties, potential nitrification rate (PNR), potential N_2O emissions, or the abundance of denitrification functional genes. Nitrogen addition alone significantly increased soil dissolved inorganic nitrogen content, PNR, and PDA, and enhanced the abundance of AOB-*amoA* and *nosZ* Ⅱ genes. Furthermore, N addition substantially altered the community structure of AOB and denitrifying bacteria harboring *nirK* and *nirS* genes. The combined warming and N addition treatment further increased MBN content, significantly affected *nirK*-denitrifying bacterial community structures and the relative abundance of their dominant operational taxonomic units, and produced significant interactive effects on specific *nirK* and *nirS* phylotypes. However, no significant N-deposition×warming interaction effects were detected for major soil properties, PNR, PDA, potential N_2O emissions, or the N_2O:(N_2O+N_2). Overall, this study elucidates the complex and multifaceted impacts of future climate warming and enhanced nitrogen deposition on soil nitrogen transformation processes and their microbial drivers in semi-arid grasslands, providing important scientific evidence to assist nitrogen management in arid and semi-arid regions and for assessing ecosystem climate feedbacks under global change scenarios.

Key words: warming; nitrogen deposition; nitrous oxide; nitrification; denitrification; Loess Plateau; semi-arid grassland

草地生态系统约占除格陵兰岛和南极洲以外地球陆地面积的40.5%[1],在维系生态安全、调节区域气候、支撑畜牧业可持续发展和促进生物多样性保护等方面具有关键生态功能[2-4]。土壤氮循环是草地生态系统的核心生物地球化学过程[5],不仅直接决定植物养分供应能力[6],还深刻影响温室气体的排放,特别是氧化亚氮(nitrous oxide, N_2O)的产生和消耗[7]。N_2O是仅次于二氧化碳(carbon dioxide, CO_2)和甲烷(methane, CH_4)的第三大温室气体[8-9],其致使全球变暖的潜能为CO_2的273倍[10],同时也是消耗平流层臭氧的首要人为排放源[11-12]。最新研究发现,我国草地系统N_2O年排放量高达32万t[13]。因此,深入理解草地土壤中微生物调控的氮转化机制,特别是N_2O的产生与消耗过程,对于提升氮素利用效率、降低温室气体排放、支撑草地生态系统可持续发展和管理具有重要的理论与实践意义。

土壤是N_2O最大的自然来源,主要由微生物驱动的硝化过程和反硝化过程产生[7,14-15]。其中,氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)与氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)均携带编码氨单加氧酶(ammonia monooxygenase, AMO)的*amoA*基因,负责调节有氧条件下硝化的限速步骤[16]。与AOA相比,AOB产生N_2O的效率更高,尤其在温暖、潮湿、通气良好的土壤中[17-18]。反硝化过程则依赖*narG*、*nirK*、*nirS*、*norB*和*nosZ*等功能基因编码的还原酶将硝酸盐还原为N_2O或N_2[19]。其中,*nosZ*基因是反硝化过程中唯一能够将N_2O还原为N_2的功能基因,其活性直接决定土壤N_2O的最终排放潜力[20-21]。根据系统发育关系可将*nosZ*分为Ⅰ型(传

统型)和Ⅱ型(非传统型)[22-23]。相较于Ⅰ型,*nosZ*Ⅱ型基因分布更广,生态功能更多样,能够在多种自然环境中发挥N_2O汇的作用[24]。然而,现有研究多集中于*nosZ*Ⅰ型功能群,关于*nosZ*Ⅱ型的研究相对不足,在一定程度上限制了对反硝化潜势和N_2O净排放调控机制的系统性理解。

近年来,全球气候变化显著加剧了草地生态系统中养分循环的不稳定性,表现为植被退化、土壤养分流失及温室气体排放增加[25-26]。特别是半干旱地区,水分限制导致碳氮循环过程对增温和氮沉降等全球变化因子的响应更加敏感[27-29]。已有研究表明,增温通过提高蒸散作用、促进有机质分解与微生物代谢过程,可加速土壤氮矿化与N_2O排放[30-32];但也有研究发现增温可能引发干旱、降低土壤水分而限制反硝化过程,从而抑制N_2O排放[33-34]。相比之下,适量的氮输入可缓解植物氮限制、提高初级生产力[35-36]。但过量氮沉降通过引起土壤酸化,改变土壤反硝化微生物结构(*nirK*、*nirS*和*nosZ*Ⅰ),从而非线性地增强N_2O排放[37]。在半干旱草地生态系统中,水分、温度和氮输入之间存在复杂的非线性耦合反馈关系:如施氮可能增强增温对氮矿化的正效应[38],但水分压力又可能抑制这一促进作用[39],表现为协同或拮抗效应。然而,现有研究多为单因子设计,缺乏对多重全球变化因子交互作用下生态系统真实响应的系统评估[40-41]。

黄土高原半干旱区近几十年气温上升约1.9 ℃,大气氮沉降与农业施肥持续增加,使该区域土壤氮循环过程更易受环境扰动[42-43]。因此,为阐明全球变化背景下半干旱草地氮循环微生物过程的响应机制,本研究以宁夏云雾山典型黄土高原半干旱草地为对象,依托长期野外控制试验平台,系统评估这些因子如何影响土壤氮转化潜势、氨氧化与反硝化微生物群落结构及功能基因(*amoA*-AOB、*amoA*-AOA、*nirK*、*nirS*、*nosZ*),重点解析增温与施氮单因子及交互效应对微生物氮转化过程的调控机制及其对N_2O潜在排放的贡献,旨在揭示半干旱区草地氮循环的微生物调控机制及其对全球变化因子的响应模式,为区域尺度碳氮循环模型的优化构建,以及草地生态系统适应性管理策略的制定提供可靠的理论基础与数据支持。

1 材料与方法

1.1 研究区域与试验设计

研究区位于宁夏固原市云雾山草原国家级自然保护区(36°13′－36°19′ N,106°24′－106°28′ E;海拔1800～2100 m),属于典型的黄土高原半干旱草地生态系统[43]。年均温约6 ℃,年降水量425 mm,其中60%～75%集中在夏季,年蒸发量1330～1640 mm,干旱指数0.20～0.50,体现出显著的水分限制特征。研究区土壤主要由黄土母质发育而来,以淡黑垆土和黄绵土为主,初始pH 8.14。经过30余年的封育保护,草地植被已逐步演替为多年生草本群落。大针茅属(*Stipa* spp.)、甘青针茅(*Stipa przewalskyi*)和蒿属(*Artemisia* spp.)植物在其中占据明显优势,成为当前研究区的建群种和主导种[44-45]。

本试验始于2015年4月,采用随机区组设计,设置4种处理:对照(control,Con)、增温(warming,W)、施氮(nitrogen,N)及施氮与增温交互处理(nitrogen×warming,NW),每种处理设4个重复,共计16个小区(每小区4 m×4 m)。为减小边缘效应,小区之间留1.5 m间隔,区组间隔5 m,外围设2 m宽保护带。该设计以正交方式组合增温与施氮,系统评估其单独及交互作用,以克服传统单因子研究的不足。

自2015年起连续处理至2019年8月,以评估其长期生态效应。施氮采用尿素,每年4和6月分两次施入,每次施用量为6 g N·m^{-2},显著高于当地自然氮沉降水平[46-47]。增温处理采用透明开顶箱(open-top chambers,OTC),每个OTC底部直径1.5 m、顶部1.19 m、高度0.5 m,透光率约90%,平均增温幅度为1.5～2.0 ℃。对照组未进行增温或施氮,仅受自然条件影响[44]。为保持群落结构一致性,每年生长季末(8月底－9月初)统一割草至3～5 cm,并清除地表残体,以减少干扰。

1.2 土壤样品采集

2019年8月(植物生长末期)进行土壤采样。每个小区随机选取3个采样点,用直径5 cm的土钻采集0～10 cm深度土壤。将3份样品混合为一个复合样,密封于自封袋中。采样后立即置于带冰袋的冷藏箱内,48 h内送至实验室。样品经2 mm筛网过筛,手工去除石块及植物残体后分为两部分:一部分在4 ℃下保存,用于理化性质与微生物特性分析(所有测定在一周内完成);另一部分立即冷冻至－20 ℃,以用于分子生物学分析,包括氨氧化微

生物(*amoA*-AOB 和 *amoA*-AOA)及反硝化功能基因(*nirK*、*nirS*、*nosZ* Ⅰ 和 *nosZ* Ⅱ)的丰度、群落结构与多样性测定。

1.3　土壤理化性质和微生物生物量碳、氮的测定

采用电位法测定土壤 pH,用 5 g 鲜土与 25 mL 无 CO_2 水(土水比 1∶5)混合,振荡后离心,取上清液用 pH 计(PB-10, Sartorius,德国)测定。

采用 0.5 mol·L^{-1} K_2SO_4 浸提－连续流动分析法测定土壤铵态氮(NH_4^+-N)和硝态氮(NO_3^--N)含量[48]。称取相当于 10 g 干土的新鲜土样,加入 40 mL 0.5 mol·L^{-1} K_2SO_4 溶液,在 25 ℃下以 200 r·min^{-1} 振荡 30 min 后过滤,使用流动分析仪(AA3, Bran and Luebbe,德国)测定滤液 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 含量。

采用 0.5 mol·L^{-1} K_2SO_4 浸提法测定土壤可溶性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)含量[49]。称取相当于 12.5 g 干土的新鲜土样,加入 50 mL 0.5 mol·L^{-1} K_2SO_4 溶液,在 25 ℃下以 200 r·min^{-1} 振荡 30 min 后过滤,采用总有机碳/总氮分析仪(Elementar Vario Micro Cube, 德国)测定滤液 DOC 含量。

采用氯仿熏蒸－0.5 mol·L^{-1} K_2SO_4 浸提法测定土壤微生物生物量碳(microbial biomass carbon, MBC)和微生物生物量氮(microbial biomass nitrogen, MBN)含量[49]。取相当于 12.5 g 干土的两份鲜土样品,一份置于含氯仿的真空干燥器中 25 ℃黑暗熏蒸 48 h,另一份作未熏蒸对照;熏蒸结束后去除残余氯仿,两份土样均加入 50 mL 0.5 mol·L^{-1} K_2SO_4 溶液振荡浸提 30 min 并过滤;用总有机碳分析仪(Elementar Vario Micro Cube, 德国)测定滤液可溶性有机碳和总氮含量。MBC 和 MBN 的含量由以下公式计算得出:

$$MBC=\frac{C_f-C_u}{K_{EC}}$$

$$MBN=\frac{N_f-N_u}{K_{EN}}$$

式中:C_f 和 C_u 分别代表熏蒸与未熏蒸土壤浸提液中的可溶性有机碳含量(mg·kg^{-1});N_f 和 N_u 分别代表熏蒸与未熏蒸土壤浸提液中的总氮含量(mg·kg^{-1});K_{EC} 为碳的提取效率转换系数,取值为 0.45;K_{EN} 为氮的提取效率转换系数,取值为 0.54。

将 2.5 g 鲜土与 10 mL 的 10 mmol·L^{-1} 硫酸铵溶液及 500 μL 的 0.15 mol·L^{-1} 的氯酸钾溶液振荡培养 5 h 后,采用 Griess 试剂比色法测定土壤硝化潜势(potential nitrification rates, PNR),以亚硝酸盐含量表示[50]。

采用乙炔抑制法测定反硝化潜势(potential denitrification activities, PDA),将 2.9 g 干土当量鲜土加入硝酸钾－葡萄糖溶液用气相色谱仪(GC－2014, Shimadzu,日本)测定 N_2O 通量[37,51]。

1.4　实时荧光定量 PCR 分析

土壤总 DNA 采用 PowerSoil DNA Isolation Kit(MoBio Laboratories,美国)提取。称取 0.30 g 新鲜土壤,按试剂盒标准流程完成 DNA 提取,提取产物使用 NanoDroP ND-1000 核酸分析仪(Thermo Scientific,美国)测定浓度与纯度。AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因,以及反硝化功能基因 *nirK*、*nirS*、*nosZ* Ⅰ 和 *nosZ* Ⅱ 的丰度采用荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)技术测定。qPCR 反应采用 SYBR Premix Taq 试剂(Takara 公司),并在 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司,美国)上完成扩增。每块 96 孔反应板均设置标准曲线(3 个重复)、样品 DNA(3 个重复)以及无菌水作为阴性对照。荧光定量引物及 PCR 反应条件见表 1。数据采集与分析采用 7500 Software v2.3,依据标准曲线(R^2>0.99,扩增效率 90%～110%)计算各功能基因的拷贝数(copies·g^{-1}干土)。

1.5　群落测定

采用末端限制性片段长度多态性分析(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)方法测定土壤中氨氧化微生物(AOA 与 AOB 的 *amoA* 基因)及反硝化菌群(*nirK*、*nirS*、*nosZ* Ⅰ 和 *nosZ* Ⅱ)的群落组成[24,56]。PCR 扩增反应条件列于表 1,所用上游引物在其 5′端标记荧光染料 6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM)。PCR 扩增完成后,将产物进行纯化并通过电泳检测,随后按照表 2 所示的酶切体系进行酶切反应。

表1 荧光定量PCR引物及反应条件

Table 1 Primers and conditions used in the qPCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5′−3′)	目标基因 Target gene	反应条件 Thermal profile	文献 Reference
*amoA*1F	GGGGHTTYTACTGGTGGT	AOB *amoA*	95 ℃, 3 min; 95 ℃, 30 s, 56 ℃, 30 s, 35 cycles; 72 ℃, 10 min	[52]
*amoA*2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC			
*amo*19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	AOA *amoA*	95 ℃, 3 min;95 ℃, 30 s, 60 ℃, 30 s, 35 cycles; 72 ℃, 10 min	[53]
Cren*amoA*616r48x	GCCATCCABCKRTANGTCCA			
*nirK*876	ATYGGCGGVCAYGGCGA	*nirK*	95 ℃, 3 min;95 ℃, 30 s, 58 ℃, 30 s, 40 cycles; 72 ℃, 10 min	[54]
*nirK*1040	GCCTCGATCAGRTTRTGG			
*nirS*Cd3aF	GTSAACGTSAAGGADACSGG	*nirS*	95 ℃, 3 min;95 ℃, 30 s, 57 ℃, 30 s, 40 cycles; 72 ℃, 10 min	[54]
*nirS*R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA			
*nosZ*2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT	*nosZ* Ⅰ	95 ℃, 10 min; 95 ℃, 30 s, 60～65 ℃, 30 s, 72 ℃, 30 s, 6 cycles; 98 ℃, 15 s, 60 ℃, 15 s, 40 cycles; 72 ℃, 10 min	[55]
*nosZ*2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA			
nosZ-Ⅱ-F	CTIGGICCIYTKCAYAC	*nosZ*Ⅱ	95 ℃, 10 min; 95 ℃, 30 s, 54 ℃, 30 s; 72 ℃, 30 s, 80 ℃, 30 s, 40 cycles	[23]
nosZ-Ⅱ-R	GCIGARCARAAITCBGTRC			

酶切反应结束后,将所得产物送至上海生工生物工程有限公司,通过ABI 3730XL测序平台完成DNA片段的荧光片段扫描。随后利用Genemapper 4.0软件进行峰型识别与片段长度分析,获得各样品的T-RFLP指纹图谱。最终,酶切并纯化后的PCR产物由CEQ™ 8000遗传分析系统完成T-RFLP检测与信号分析。

表2 *Mbo* Ⅰ酶切体系与反应条件

Table 2 *Mbo* Ⅰ digestion reaction components and conditions

物质 Component	体积 Volume (μL)	反应条件 Reaction condition
缓冲液 Buffer	5	37 ℃反应6 h; 4 ℃保存 Incubate at 37 ℃ for 6 h; store at 4 ℃
胶纯化回收PCR产物 Gel-purified PCR product	10	
ddH_2O	4	
内切酶 Restriction enzyme	1	

1.6 统计分析

所有数据统计分析与图绘制均在R软件(版本4.5.1, R Core Team, 2025)中完成。为评估增温(W)、施氮(N)及其交互作用(NW)对各响应变量(如土壤理化性质、基因丰度等)的影响,本研究采用线性混合效应模型(linear mixed-effects model, LMM),该模型通过R软件的lme4包中的lmer函数进行拟合,模型中,将增温、施氮及其交互作用设为固定效应,将区组(block)设为随机效应,当模型显示出显著的处理效应时($\alpha=0.05$),采用emmeans包进行Tukey's HSD多重比较检验,以确定不同处理组间的具体差异。为评估处理对微生物群落结构的影响,本研究首先基于Bray-Curtis相异性矩阵,采用非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)进行降维与可视化,该分析通过vegan包中的MetaMDS函数完成。随后,使用vegan包中的adonis2函数执行置换多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA,置换999次),以定量检验增温、施氮及其交互作用对微生物群落结构影响差异的显著性。此外,为探究环境变量与微生物指标间的关系,采用Pearson相关性分析,并使用corrplot包进行可视化。

2 结果与分析

2.1 增温和氮添加对土壤理化性质和微生物量碳、氮的影响

增温、施氮及其交互作用均未显著影响土壤pH、NH_4^+-N、DOC含量(表3)。虽然单独施氮显著降低了MBN含量($P<0.05$),但增温与施氮的交互作用使其恢复至与对照无显著差异的水平。与对照相比,单独增温或单独施氮并未显著改变土壤DIN和NO_3^--N含量,但在增温与施氮的交互作用下(NW),DIN和NO_3^--N含量显著增加($P<0.05$,表3)。

表 3　增温(W)、施氮(N)及其交互作用对土壤理化性质与微生物生物量的影响

Table 3　Effects of warming (W), nitrogen addition (N), and their interaction (NW) on soil physicochemical properties and microbial biomass

项目 Item	对照 Control (Con)	增温 W	施氮 N	增温施氮交互 NW
pH	8.25±0.06a	8.27±0.05a	8.22±0.03a	8.25±0.02a
可溶性有机碳 DOC (mg·kg^{-1})	138.75±9.11a	139.05±17.32a	151.35±16.62a	151.50±20.61a
可溶性无机碳 DIN (mg·kg^{-1})	5.76±0.72b	7.00±0.88b	12.93±0.43ab	15.96±3.51a
硝态氮 NO_3^--N (mg·kg^{-1})	3.41±0.57b	4.82±0.97b	10.38±0.28ab	13.64±3.64a
铵态氮 NH_4^+-N (mg·kg^{-1})	2.35±0.24a	2.17±0.26a	2.55±0.28a	2.31±0.43a
微生物生物量碳 MBC (mg·kg^{-1})	481.54±18.26a	444.48±25.67a	454.85±17.85a	491.65±30.67a
微生物生物量氮 MBN (mg·kg^{-1})	92.64±2.33a	94.91±2.37a	77.84±2.50b	95.45±5.16a
MBC/MBN	5.20±0.16a	4.70±0.34a	5.85±0.23a	5.21±0.51a

注：数据为平均值±标准误(n=4)。同行不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05)。

Note: Values are means±standard error (n=4). Different lowercase letters within the same row indicate significant differences among treatments at P<0.05.

2.2　增温和氮添加对氨氧化微生物丰度和群落的影响

AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数分别为 6.34×10^9～8.04×10^{9}和 7.09×10^7～7.98×10^8 copies·g^{-1}干土(图 1)。增温、施氮及其交互作用对 AOA 的丰度均无显著影响。对于 AOB，施氮显著增加了其基因丰度，且增温与施氮的交互作用使其丰度进一步提升(P<0.05)，使得 NW 处理下的 AOB 丰度最高，显著高于单独施氮处理；然而，单独增温并未显著改变 AOB 的丰度。此外，施氮使 AOA/AOB 显著降低(P<0.001)。

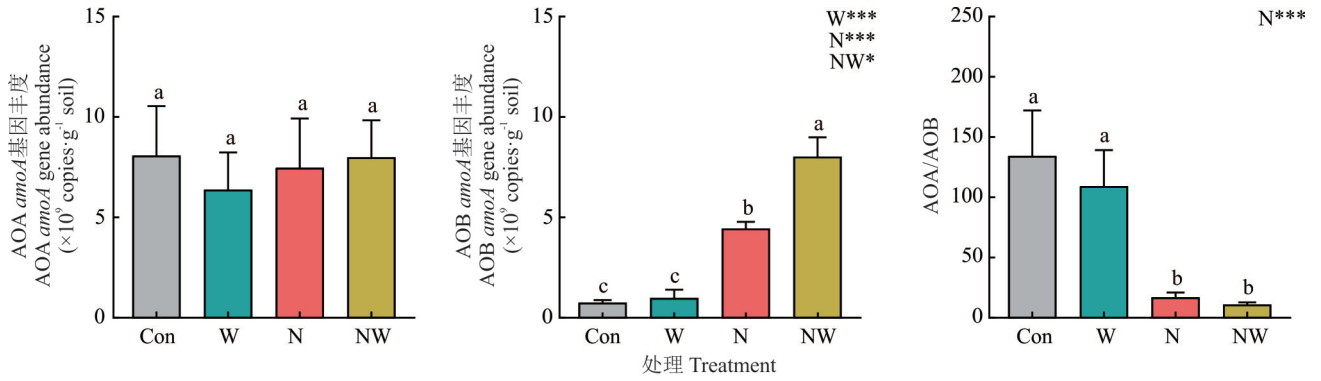


图 1　增温、施氮及其交互作用对氨氧化古菌(AOA)、氨氧化细菌(AOB)*amoA* 基因丰度以及 AOA/AOB 的影响

Fig. 1　Effects of warming, nitrogen addition, and their interaction on *amoA* gene abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA), ammonia-oxidizing bacteria (AOB), and the AOA/AOB

数据为平均值±标准误(n=4) Values are means±standard error (n=4)；不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05) Different lowercase letters indicate significant differences among treatments (P<0.05)；*：P<0.05；**：P<0.01；***：P<0.001；下同 The same below.

采用 T-RFLP 方法分析增温与施氮对硝化过程关键微生物 AOA 和 AOB 群落结构的影响(图 2)，结果显示，经 *Mbo* Ⅰ酶切后，AOA *amoA* 基因产生了 7 种不同长度的末端限制性片段(terminal restriction fragments，T-RFs)，而 AOB *amoA* 基因仅产生了 3 种。在所有处理条件下，AOA 群落的主要优势 T-RFs 为 442 bp，且增温和施氮均未显著改变其 T-RFs 组成。对于 AOB 群落，106 和 279 bp 为其主要优势 T-RFs。

PERMANOVA 分析表明，增温单一处理并未对 AOA 和 AOB 的群落组成产生显著影响(P>0.05)。对于 AOA，施氮的主效应未达到显著水平，但增温与施氮表现出极显著的交互作用(P<0.01)，对于 AOB，施氮处理显著改变了其群落组成(P<0.05)，且增温与施氮也表现出极显著的交互作用(P<0.01)。

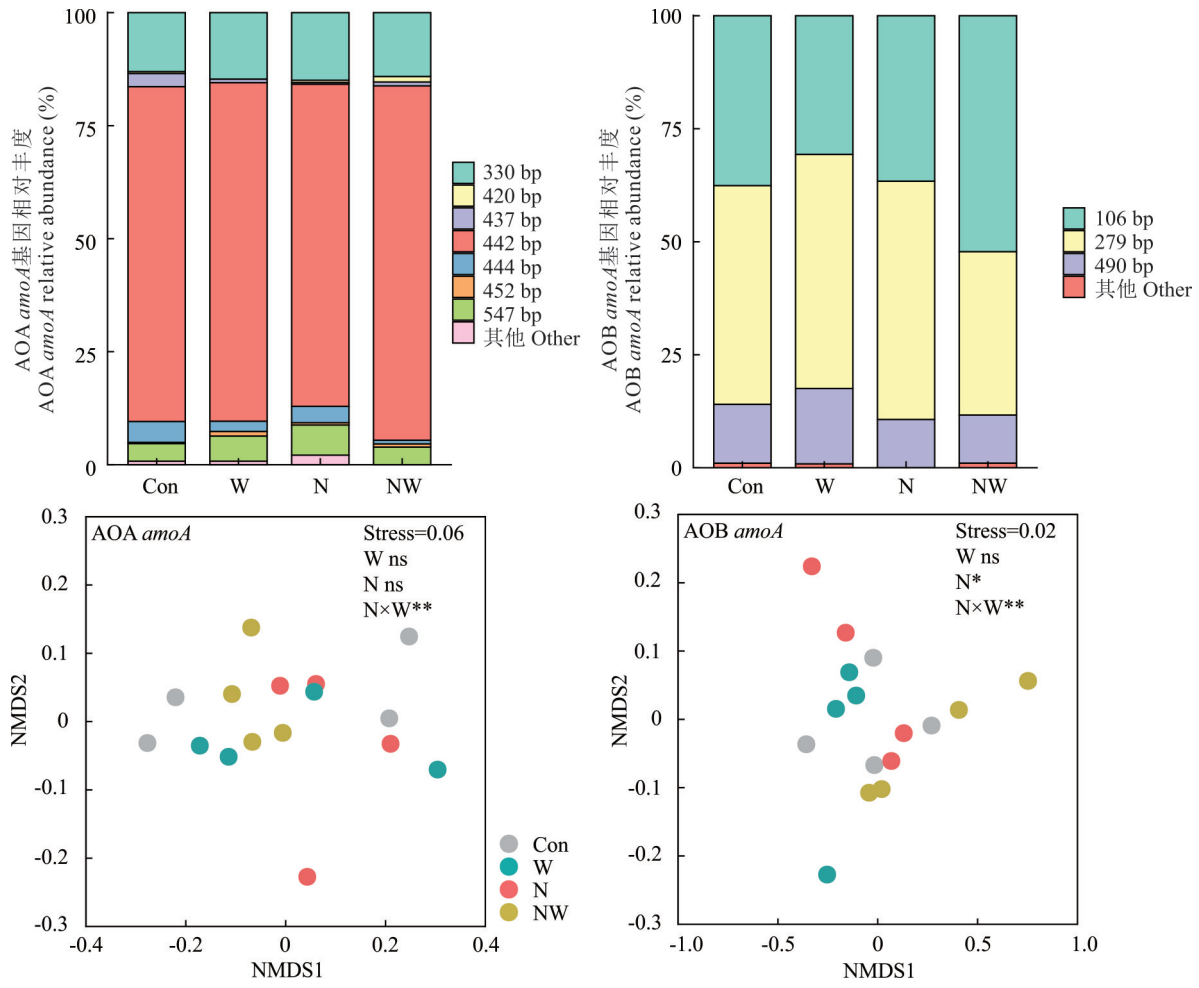


图2 增温、施氮及其交互作用对AOA和AOB相对丰度及群落结构的影响

Fig. 2 Effects of warming, nitrogen addition, and their interaction on relative abundance and community composition of AOA and AOB

2.3 增温和氮添加对反硝化微生物丰度和群落的影响

nirK、*nirS*、*nosZ* Ⅰ和*nosZ* Ⅱ基因拷贝数分别为2.48×10^7～3.39×10^7、3.01×10^7～4.32×10^7、3.20×10^7～4.05×10^7和2.00×10^5～3.44×10^5 copies·g^{-1}干土(图3)。

增温、施氮及其交互作用对*nirK*和*nosZ* Ⅰ的基因丰度均未产生显著影响。然而,施氮处理显著增加了*nirS*($P<0.01$)和*nosZ* Ⅱ($P<0.001$)基因丰度。(*nirK*+*nirS*)/(*nosZ* Ⅰ+*nosZ* Ⅱ)及(*nirK*+*nirS*)/*nosZ* Ⅰ在各处理间无显著差异;而(*nirK*+*nirS*)/*nosZ* Ⅱ受施氮($P<0.001$)和增温($P<0.05$)显著影响,且在NW处理下显著低于对照。

T-RFLP分析表明,增温和施氮处理显著改变了反硝化微生物群落结构。*Mbo* Ⅰ酶切后,*nirK*型反硝化菌共产生10个不同长度的末端限制性片段(T-RFs),而*nirS*和*nosZ* Ⅰ型反硝化菌均产生8个T-RFs(图4)。在*nirK*型反硝化菌中,320 bp为所有处理下的绝对优势T-RFs。增温和施氮的主效应对其相对丰度均无显著影响,但二者交互作用极显著提高了320 bp T-RFs的相对丰度($P<0.001$,图4)。施氮显著增加了101 bp T-RFs的相对丰度($P<0.01$),而增温与施氮对62和235 bp T-RFs的相对丰度表现出显著的交互效应($P<0.05$,图4)。对于*nirS*基因,100 bp是其优势T-RFs,增温显著降低了该片段的相对丰度。而施氮显著改变了115 bp T-RFs的相对丰度($P<0.05$,图4)。在*nosZ* Ⅰ基因中,265 bp是主要优势T-RFs,但增温、施氮及两者交互作用对其无显著影响。值得注意的是,84 bp T-RFs在施氮处理中的相对丰度显著升高,而在对照和增温×施氮处理下均未检出,双因素方差分析结果进一步显示,增温与施氮对该片段的相对丰度具有显著交互效应($P<0.05$,图4)。

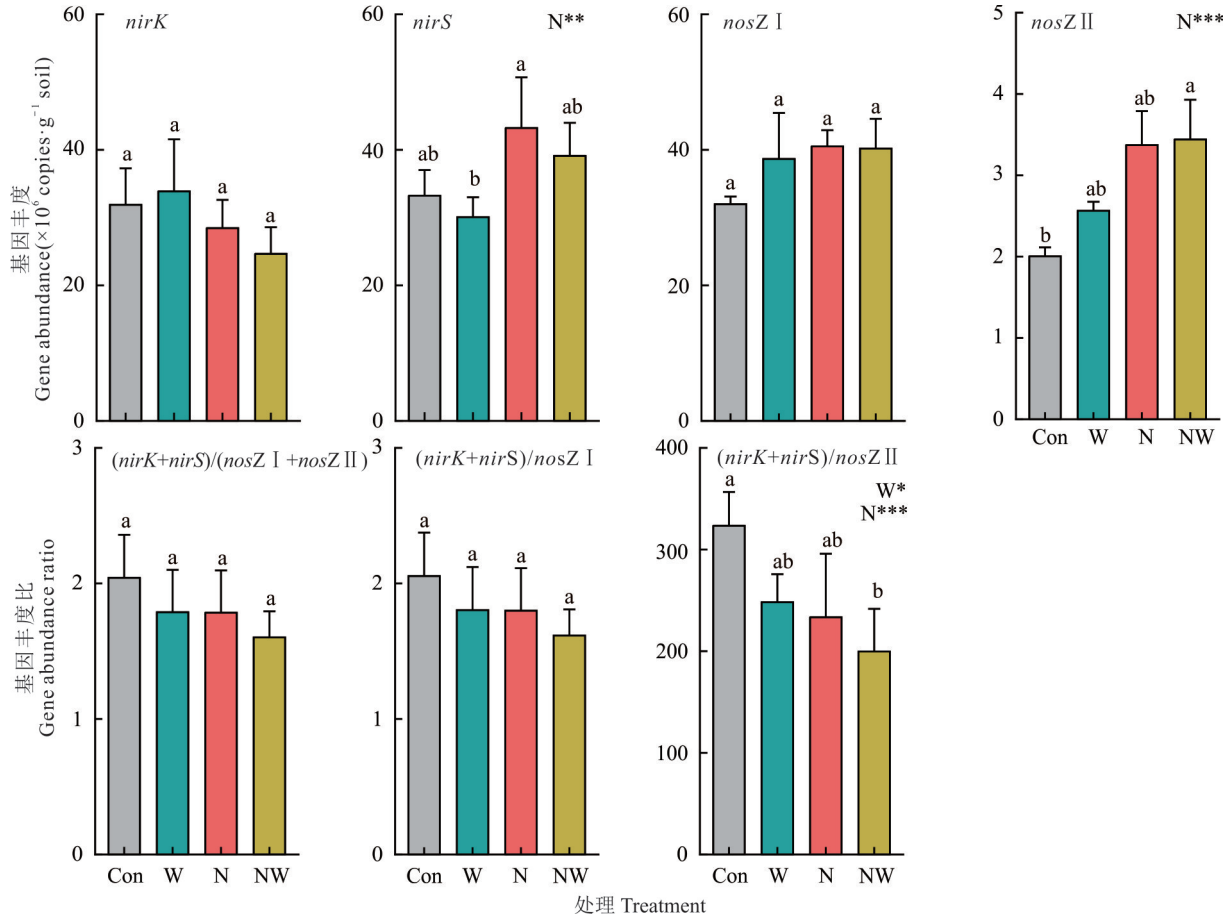


图 3　增温、施氮及其交互作用对反硝化功能基因丰度以及基因丰度比的影响

Fig. 3　Influence of warming, nitrogen fertilization, and their interaction on the abundance of four key denitrification genes and ratio of gene abundance

PERMANOVA 分析结果表明，施氮显著改变了 *nirK* 型反硝化菌的群落结构，且增温与施氮的交互作用也显著影响 *nirK* 群落结构。同时，施氮对 *nirS* 型反硝化菌群落结构具有显著影响。然而，增温、施氮及其交互效应均未对 *nosZ* Ⅰ型反硝化菌群落结构产生影响（图 4）。

2.4　增温和氮添加对土壤氮转化过程的影响

施氮显著增加了土壤硝化潜势（PNR，$P<0.001$），而增温对其无显著影响（图 5）。对于土壤反硝化潜势（PDA），施氮（$P<0.01$）和增温（$P<0.05$）均对其具有显著的主效应；具体趋势表现为施氮增加了 PDA，而增温则表现出一定的抑制作用。此外，增温和施氮的单独处理及其交互作用均未对 N_2O 排放潜势和 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 产生显著影响。说明施氮是驱动土壤硝化潜势变化的主要因素，而增温则对反硝化过程表现出一定的限制作用。

2.5　氮转化微生物基因丰度与土壤指标的相关性分析

Pearson 相关性分析揭示了影响土壤氮转化的关键生物与非生物因子（图 6），结果表明，PNR 与底物有效性及 AOB 丰度密切相关。PNR 与 DIN（$R^2=0.76$，$P<0.001$）及其主要组分 NO_3^--N（$R^2=0.75$，$P<0.001$）均极显著正相关。值得注意的是，AOB 基因丰度不仅与 DIN、NO_3^--N 及 PNR 呈极显著正相关（$P<0.01$），还与 PDA 呈显著正相关（$R^2=0.62$，$P<0.05$）。相比之下，AOA 的基因丰度仅与土壤 pH 呈显著正相关（$R^2=0.59$，$P<0.05$），而与 PNR 无显著关联。在反硝化微生物方面，两种亚硝酸盐还原酶基因 *nirK*（$R^2=0.50$，$P<0.05$）和 *nirS*（$R^2=0.69$，$P<0.01$）的丰度与 DOC 含量均呈显著正相关。此外，*nosZ* Ⅱ基因丰度与 AOB 基因丰度（$R^2=0.65$，$P<0.01$）及 PNR（$R^2=0.61$，$P<0.05$）均呈显著的正相关关系。

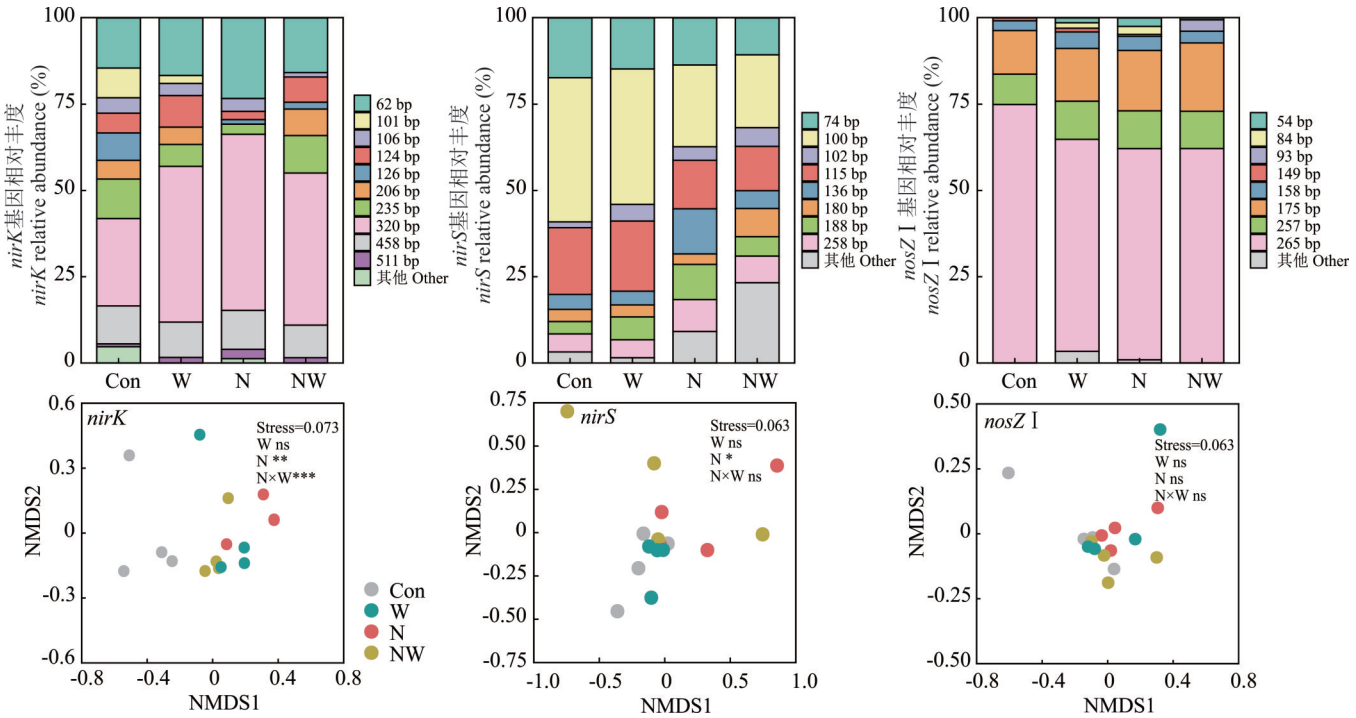


图4 增温、施氮及其交互作用对反硝化基因相对丰度及群落结构的影响

Fig. 4 Effects of warming, nitrogen addition, and their interaction on relative abundance and community composition of denitrification genes

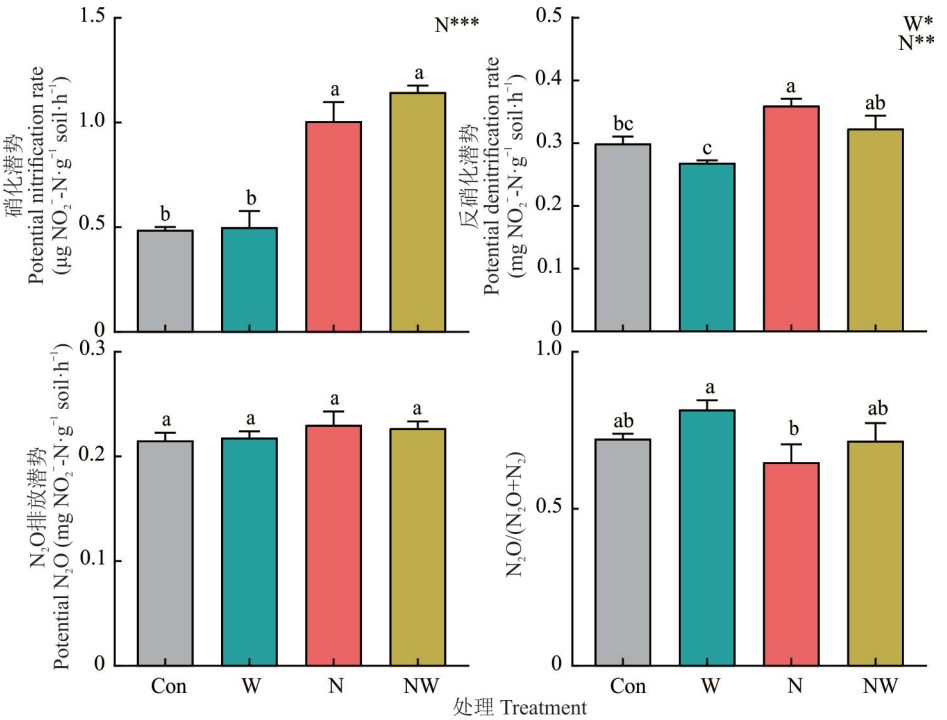


图5 土壤硝化潜势、反硝化潜势、N_2O 排放潜势和 N_2O 占总反硝化产物比例对增温、施氮及其交互作用的响应

Fig. 5 Soil potential nitrification rate, denitrification rate, potential N_2O, and the proportion of N_2O in total denitrification products as influenced by warming, nitrogen fertilization, and their interaction

3 讨论

3.1 增温对土壤氮转化过程和微生物的影响

本研究发现,增温显著提升了土壤MBN含量(表3),表明温度升高可能增强微生物代谢活性和氮同化能力,

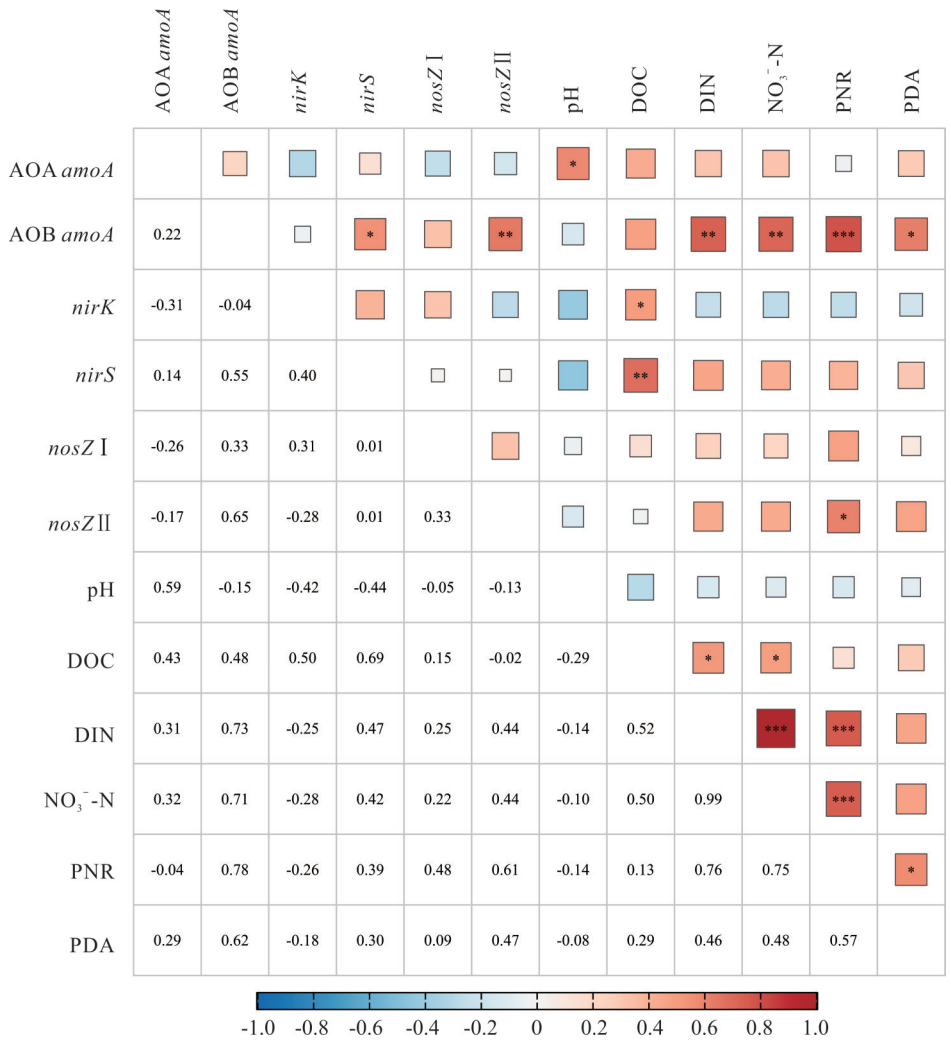


图 6　土壤理化性质与氮循环关键功能基因丰度的 Pearson 相关性分析

Fig. 6　Pearson correlation analysis between soil physicochemical properties and the abundance of key functional genes involved in nitrogen cycling

AOA *amoA*：氨氧化古菌 Ammonia-oxidizing archaea；AOB *amoA*：氨氧化细菌 Ammonia-oxidizing bacteria；*nirK*：亚硝酸还原酶基因（含铜）Nitrite reductase gene（copper-containing）；*nirS*：亚硝酸还原酶基因（细胞色素 cd1）Nitrite reductase gene（cytochrome cd1）；*nosZ* Ⅰ：N_2O 还原酶基因（Ⅰ型）Nitrous oxide reductase gene（Clade Ⅰ）；*nosZ* Ⅱ：N_2O 还原酶基因（Ⅱ型）Nitrous oxide reductase gene（Clade Ⅱ）；pH：土壤酸碱度 Soil pH；DOC：可溶性有机碳 Dissolved organic carbon；DIN：可溶性无机氮 Dissolved inorganic nitrogen；NO_3^--N：硝态氮 Nitrate nitrogen；PNR：潜在硝化速率 Potential nitrification rate；PDA：潜在反硝化速率 Potential denitrification rate.

使其更有效地吸收并固定土壤可利用氮。但 MBC 含量与 MBC/MBN 未产生显著变化，可能与温度升高使微生物碳利用效率（carbon use efficiency）降低且碳源受限有关[57]。

同时，增温显著增加了 AOB 的 *amoA* 基因丰度，而对 AOA 的 *amoA* 基因丰度没有影响（图 1），说明在增温条件下 AOB 是硝化过程的主要驱动者。另一方面，增温降低了 PDA（图 5B）并改变了 *nirK* 基因多个 T-RFs 的相对丰度（图 4），且 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度均与 DOC 含量呈显著正相关（图 6），说明增温通过加速有机碳分解与氮矿化，导致土壤可用 DOC 限制，从而抑制反硝化过程[58−59]。

3.2　施氮对土壤氮转化过程和微生物的影响

施氮显著增加了土壤 DIN 和 NO_3^--N 含量（表 3），说明外源氮输入促进了无机氮积累。施氮同时提高了 AOB 基因丰度，而对 AOA 无显著影响（图 1），且 AOA 基因丰度与 pH 显著正相关（图 6）。已有研究表明，AOA 更适应低氮、低温和酸性环境，而 AOB 在中性至碱性土壤中竞争优势更强[60]。这与本研究半干旱草地土壤条件较为吻合。在长期定位试验中也发现，AOB 是 N_2O 排放的主要驱动者[39]。此外，施氮还显著增加了 *nosZ* Ⅱ 基因

丰度，而对*nirK*、*nirS*和*nosZ*Ⅰ无显著作用(图4)，说明*nosZ*Ⅱ群落对外源氮更敏感。已有研究指出，*nosZ*Ⅱ广泛分布且不依赖完整反硝化途径，这可能增强其在N_2O还原过程中的作用[61]。

相关性分析进一步表明，AOB丰度与NO_3^--N、*nosZ*Ⅱ丰度及PNR显著正相关，且*nosZ*Ⅱ丰度与PNR亦显著正相关(图6)。这表明在施氮条件下，AOB活性增加不仅加速了NO_3^--N的积累，还可能选择性地支持携*nosZ*Ⅱ的功能群，进而强化硝化与N_2O末端还原的潜在耦合性。一方面，这加快了氮素循环并可能增加氮气损失风险；另一方面，*nosZ*Ⅱ丰度的提升也增强了土壤的N_2O还原潜力，部分缓解了氮输入带来的排放效应。T-RFLP结果表明，施氮显著改变了*nirK*群落组成(图4)，并提高了PNR和PDA(图5)，表明氮添加不仅直接增加了底物供给，还通过富集特定*nirK*功能类群加速了氮循环，从而增加了氮气损失风险，尤其是N_2O排放。已有研究也发现，与*nirS*相比，*nirK*对氮添加更敏感[62]，进一步说明*nirK*型反硝化菌在氮输入下可能发挥更关键作用。综上，氨氧化菌与反硝化菌的协同作用既揭示了氮循环功能群间的互作机制，也可能在一定程度上缓解因氮输入导致的N_2O排放风险。

3.3 增温和施氮交互对土壤氮转化过程和微生物的影响

进一步研究发现，增温与施氮的交互作用显著提高了硝化过程关键细菌AOB的丰度(图1)，同时改变了AOA、AOB和*nirK*型反硝化菌的群落结构(图2和图4)，其中*nirK*基因多个T-RFs的相对丰度也发生显著变化(图4)，这说明增温和施氮这两个环境因子并非独立的影响微生物群落，而是存在协同效应或交互作用。施氮提供了充足的氮底物，增温则改善了代谢环境，两者结合为AOB生长繁殖创造了更优条件，从而使其丰度显著增加。与此同时，复合扰动对*nirK*群落的影响表明增温与施氮可能共同影响了土壤的碳氮底物、通气性和水分等关键因素，使得一些对这些变化敏感的*nirK*携带者(如特定的T-RFs)获得了竞争优势，而另一些则受到抑制。

然而，增温和施氮的交互作用对PNR、PDA、N_2O排放和$N_2O/(N_2O+N_2)$均无影响(图5)，可能原因在于两种因子通过独立或部分抵消的机制调控氮循环：施氮直接增加氮底物，增温则主要通过改变土壤水分和微生物活性间接调节氮转化。当两者叠加时，其效应可能重叠或相互抵消，从而未产生显著的功能响应。此外，在半干旱草地，土壤水分是氮循环过程的关键限制因子[63-34]。长期的高温与氮输入可能已促使微生物群落形成适应性特征，使其在扰动下仍能维持一定的硝化与反硝化功能，表现出较强的功能缓冲能力。值得注意的是，全球整合分析显示，目前研究中仅有不足20%同时考虑两个及以上因子[65-66]，这提示未来气候变化情景下，若仅依赖单一因子预测半干旱草地氮循环与N_2O排放可能存在偏差，应加强对多因子协同与拮抗效应的关注。

4 结论

本研究发现增温主要通过加剧水分胁迫，并选择性调控微生物群落结构(如特定T-RFs)，从而对土壤反硝化潜势产生抑制效应；而氮添加则通过提升氮底物有效性，显著促进硝化与反硝化潜势，并提高AOB-*amoA*及*nosZ*Ⅱ基因的丰度。这表明，与温度的间接影响相比，氮有效性是驱动该半干旱草地土壤氮转化功能的主导因素。尽管增温与氮添加的交互作用显著改变了微生物群落的整体结构，但在水分限制条件下，增温会削弱氮添加的促进效应。值得注意的是，本研究发现*nosZ*Ⅱ型反硝化菌群对氮输入响应敏感，这凸显了该功能群在调控区域土壤N_2O源/汇功能中的关键潜力，从而为干旱半干旱区实现氮素可持续管理和温室气体减排提供了新的视角和科学依据。当然，本研究采用的T-RFLP技术在物种分辨率和功能信息深度上存在局限。因此，未来研究应结合宏基因组学、转录组学等高通量测序技术，深入解析关键功能基因(如*nosZ*Ⅰ型与Ⅱ型)的表达调控模式及其与环境因子的耦合机制。尤其需要关注在长期增温和氮沉降背景下，水分波动如何影响微生物群落的生态位分化与功能韧性，以期为该生态系统的适应性管理提供更精准的指导。

参考文献 References：

[1] White R P, Murray S, Rohweder M. Introduction//Pilot analysis of global ecosystems: Grassland ecosystems. Washington, D. C.: World Resources Institute, 2000: 13.

[2] Sala O E, Paruelo J M. Ecosystem services in grasslands//Daily G C, ed. Nature's services: Societal dependence on natural ecosystems. Washington, D.C.: Island Press, 1997: 237-254.

[3] Bai Y F, Huang J H, Zheng S X, *et al*. Drivers and regulating mechanisms of grassland and desert ecosystem services. Chinese Journal of Plant Ecology, 2014, 38(2): 93-102.
白永飞, 黄建辉, 郑淑霞, 等. 草地和荒漠生态系统服务功能的形成与调控机制. 植物生态学报, 2014, 38(2): 93-102.

[4] Gao L, Ding Y. Progress in research and practice of restoration of degraded grassland around the world. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(10): 189-205.
高丽, 丁勇. 世界退化草地恢复研究和实践进展. 草业学报, 2022, 31(10): 189-205.

[5] Lu J L. Plant nutrition (Volume 1) (2nd ed). Beijing: China Agricultural University Press, 2003: 23-34.
陆景陵. 植物营养学(上册)(第2版). 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 23-34.

[6] Henneron L, Kardol P, Wardle D A, *et al*. Rhizosphere control of soil nitrogen cycling: A key component of plant economic strategies. New Phytologist, 2020, 228(4): 1269-1282.

[7] Tian H Q, Xu R T, Canadell J G, *et al*. A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks. Nature, 2020, 586: 248-256.

[8] Montzka S A, Dlugokencky E J, Butler J H. Non-CO_2 greenhouse gases and climate change. Nature, 2011, 476(7358): 43-50.

[9] Weber J, Keeble J, Abraham N L, *et al*. Global agricultural N_2O emission reduction strategies deliver climate benefits with minimal impact on stratospheric O_3 recovery. npj Climate and Atmospheric Science, 2024, 7(1): 121.

[10] IPCC. Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, Ⅱ and Ⅲ to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland: IPCC, 2023.

[11] Ravishankara A R, Daniel J S, Portmann R W. Nitrous oxide (N_2O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. Science, 2009, 326(5949): 123-125.

[12] Prather M J, Hsu J, Deluca N M, *et al*. Measuring and modeling the lifetime of nitrous oxide including its variability. Journal of Geophysical Research: Atmospheres, 2015, 120(11): 5693-5705.

[13] Hong S B, Li Z M, Tang M S, *et al*. Magnitude, distribution and temporal trend of nitrous oxide emissions from China's natural soils over 1980-2022. Science China Earth Sciences, 2025, 34(1): 1-12.

[14] Barnard R L, Leadley P, Hungate B. Global change, nitrification, and denitrification: A review. Global Biogeochemical Cycles, 2005, 19(1): GB1007.

[15] Braker G, Conrad R. Diversity, structure, and size of N_2O-producing microbial communities in soils-what matters for their functioning? Advances in Applied Microbiology, 2011, 75: 33-70.

[16] Junier P, Molina V, Dorador C, *et al*. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 425-440.

[17] Taylor A E, Giguere A T, Zoebelein C M, *et al*. Modeling of soil nitrification responses to temperature reveals thermodynamic differences between ammonia-oxidizing activity of archaea and bacteria. The ISME Journal, 2017, 11(4): 896-908.

[18] Kits K D, Sedlacek C J, Lebedeva E V, *et al*. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle. Nature, 2017, 549: 269-272.

[19] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 533-616.

[20] Richardson D, Felgate H, Watmough N, *et al*. Mitigating release of the potent greenhouse gas N_2O from the nitrogen cycle-could enzymic regulation hold the key? Trends in Biotechnology, 2009, 27(7): 388-397.

[21] Domeignoz-Horta L A, Putz M, Spor A, *et al*. Non-denitrifying nitrous oxide-reducing bacteria-An effective N_2O sink in soil. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 103: 376-379.

[22] Sanford R A, Wagner D D, Wu Q, *et al*. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(48): 19709-19714.

[23] Jones C M, Graf D R H, Bru D, *et al*. The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: A potential nitrous oxide sink. The ISME Journal, 2013, 7(2): 417-426.

[24] Jones C M, Spor A, Brennan F P, *et al*. Recently identified microbial guild mediates soil N_2O sink capacity. Nature Climate Change, 2014, 4(9): 801-805.

[25] Delgado-Baquerizo M, Grinyer J, Reich P B, *et al*. Relative importance of soil properties and microbial community for soil

functionality: Insights from a microbial swap experiment. Functional Ecology, 2016, 30(11): 1862-1873.

[26] Liu L L, Sayer E J, Deng M F, *et al*. The grassland carbon cycle: Mechanisms, responses to global changes, and potential contribution to carbon neutrality. Fundamental Research, 2023, 3(2): 209-218.

[27] Ma X X, Gao Y Z. Impact of shrub encroachment on soil hydrological processes in grassland. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(4): 212-222.
马学喜, 高英志. 灌丛化对草地土壤水文过程影响的研究进展. 草业学报, 2025, 34(4): 212-222.

[28] Dijkstra F A, Blumenthal D, Morgan J A, *et al*. Contrasting effects of elevated CO_2 and warming on nitrogen cycling in a semiarid grassland. New Phytologist, 2010, 187(2): 426-437.

[29] Deng L, Peng C, Kim D G, *et al*. Drought effects on soil carbon and nitrogen dynamics in global natural ecosystems. Earth-Science Reviews, 2021, 214: 103501.

[30] Weedon J T, Kowalchuk G A, Aerts R, *et al*. Summer warming accelerates sub-arctic peatland nitrogen cycling without changing enzyme pools or microbial community structure. Global Change Biology, 2012, 18(1): 138-150.

[31] Qiu Y, Jiang Y, Guo L, *et al*. Shifts in the composition and activities of denitrifiers dominate CO_2 stimulation of N_2O emissions. Environmental Science & Technology, 2019, 53(19): 11204-11213.

[32] Dai Z, Yu M, Chen H, *et al*. Elevated temperature shifts soil N cycling from microbial immobilization to enhanced mineralization, nitrification and denitrification across global terrestrial ecosystems. Global Change Biology, 2020, 26(9): 5267-5276.

[33] Bai E, Li S, Xu W, *et al*. A Meta-analysis of experimental warming effects on terrestrial nitrogen pools and dynamics. New Phytologist, 2013, 199(2): 441-451.

[34] Zhang M, Yu D, Yu Y, *et al*. Drought reduces nitrogen supply and N_2O emission in coastal bays. Water Research, 2024, 266: 122362.

[35] Clark C M, Tilman D. Loss of plant species after chronic low-level nitrogen deposition to prairie grasslands. Nature, 2008, 451(7179): 712-715.

[36] Lan Z R, Bai Y F. Testing mechanisms of N-enrichment-induced species loss in a semiarid Inner Mongolia grassland: Critical thresholds and implications for long-term ecosystem responses. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2012, 367(1606): 3125-3134.

[37] Qiu Y, Zhang Y, Zhang K, *et al*. Intermediate soil acidification induces highest nitrous oxide emissions. Nature Communications, 2024, 15(1): 2695.

[38] Zong N, Shi P L. Effects of simulated warming on soil nitrogen supply potential in an alpine meadow on the Tibetan Plateau. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(12): 4356-4365.
宗宁, 石培礼. 模拟增温对青藏高原高寒草甸土壤供氮潜力的影响. 生态学报, 2019, 39(12): 4356-4365.

[39] Zhang K, Qiu Y, Zhao Y, *et al*. Moderate precipitation reduction enhances nitrogen cycling and soil nitrous oxide emissions in a semi-arid grassland. Global Change Biology, 2023, 29(11): 3114-3129.

[40] Leuzinger S, Luo Y Q, Beier C, *et al*. Do global change experiments overestimate impacts on terrestrial ecosystems? Trends in Ecology & Evolution, 2011, 26(5): 236-241.

[41] Dieleman W I J, Vicca S, Dijkstra F A, *et al*. Simple additive effects are rare: A quantitative review of plant biomass and soil process responses to combined manipulations of CO_2 and temperature. Global Change Biology, 2012, 18(9): 2681-2693.

[42] Sun W, Mu X, Song X, *et al*. Changes in extreme temperature and precipitation events in the Loess Plateau (China) during 1960-2013 under global warming. Atmospheric Research, 2016, 168: 33-48.

[43] Wang Q, Wang M, Fan X, *et al*. Trends of temperature and precipitation extremes in the Loess Plateau Region of China, 1961-2010. Theoretical and Applied Climatology, 2017, 129(3): 949-963.

[44] Chen M F. Effects of warming, nitrogen addition and precipitation reduction on nitrifiers and denitrifiers in a semi-arid grassland on the Loess Plateau. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021.
陈梦菲. 增温、施氮及减雨对黄土高原半干旱草地硝化及反硝化微生物的影响. 南京: 南京农业大学, 2021.

[45] Cheng J M, Jing G H, Wei L, *et al*. Long-term grazing exclusion effects on vegetation characteristics, soil properties and bacterial communities in the semi-arid grasslands of China. Ecological Engineering, 2016, 97: 170-178.

[46] Tao J J, Bai T S, Xiao R, *et al*. Vertical distribution of ammonia-oxidizing microorganisms across a soil profile of the Chinese Loess Plateau and their responses to nitrogen inputs. Science of the Total Environment, 2018, 635: 240-248.

[47] Bai T S, Wang P, Hall S J, *et al*. Interactive global change factors mitigate soil aggregation and carbon change in a semi-arid

grassland. Global Change Biology, 2020, 26(9): 5320－5332.

[48] Wang F W. Effects of warming, nitrogen addition and precipitation reduction on nitrifiers and denitrifiers in a semi-arid grassland on the Loess Plateau. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.
王伏伟. 黄土高原半干旱草地土壤微生物对全球变化因子的响应. 南京: 南京农业大学, 2019.

[49] 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.

[50] Belser L W, Mays E L. Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. Applied and Environmental Microbiology, 1980, 39(3): 505－510.

[51] Smith M S, Tiedje J M. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. Soil Biology and Biochemistry, 1979, 11(3): 261－267.

[52] 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.

[53] Leininger S, Urich T, Schloter M, *et al*. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature, 2006, 442(7104): 806－809.

[54] Bárta J, Melichová T, Vaněk D, *et al*. Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of *nirK* and *nirS* denitrifiers in spruce forest soil. Biogeochemistry, 2010, 101: 123－132.

[55] Henry S, Bru D, Stres B, *et al*. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5181－5189.

[56] Yao H, Gao Y, Nicol G W, *et al*. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4618－4625.

[57] Li J, Wang G, Mayes M A, *et al*. Reduced carbon use efficiency and increased microbial turnover with soil warming. Global Change Biology, 2019, 25(3): 900－910.

[58] Monson R K, Lipson D L, Burns S P, *et al*. Winter forest soil respiration controlled by climate and microbial community composition. Nature, 2006, 439: 711－714.

[59] Shi C, Urbina-Malo C, Tian Y, *et al*. Does long-term soil warming affect microbial element limitation? A test by short-term assays of microbial growth responses to labile C, N and P additions. Global Change Biology, 2023, 29(8): 2188－2202.

[60] Di H J, Cameron K C, Shen J P, *et al*. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(3): 386－394.

[61] Hallin S, Philippot L, Löffler F E, *et al*. Genomics and ecology of novel N_2O-reducing microorganisms. Trends in Microbiology, 2018, 26(1): 43－55.

[62] Yuan Q, Liu P, Lu Y. Differential responses of *nirK*- and *nirS*-carrying bacteria to denitrifying conditions in the anoxic rice field soil. Environmental Microbiology Reports, 2012, 4(1): 113－122.

[63] Firestone M K, Davidson E A. Microbiological basis of NO and N_2O production and consumption in soil//Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. New York: John Wiley, 1989: 7－21.

[64] Bateman E J, Baggs E M. Contributions of nitrification and denitrification to N_2O emissions from soils at different water-filled pore space. Biology and Fertility of Soils, 2005, 41(6): 379－388.

[65] Rillig M C, Ryo M, Lehmann A, *et al*. The role of multiple global change factors in driving soil functions and microbial biodiversity. Science, 2019, 366(6467): 886－890.

[66] Bi M H, Li H Y, Meidl P, *et al*. Number and dissimilarity of global change factors influences soil properties and functions. Nature Communications, 2024, 15(1): 8188.