

冻融循环对农田黑土微生物量氮及酶活性的影响

赵颖¹, 田路路², 刘艳¹, 隽英华^{1*}

(1. 辽宁省农业科学院植物营养与环境资源研究所, 沈阳 110161; 2. 常德市农业委员会, 湖南 常德 415000)

摘要:为了深入了解非生长季农田黑土氮素转化过程及酶学响应行为, 采用室内冻融模拟培养试验研究了不同冻融因子(冻融温度、冻融循环次数、水分含量)对农田黑土微生物量氮(MBN)及蛋白酶、硝酸还原酶活性的影响。结果表明, 较大的冻融温差(-15~-12℃/2~-5℃)、适宜的冻融循环次数(6~15)和水分含量(20%~30%)是影响农田黑土MBN含量及蛋白酶、硝酸还原酶活性的主要驱动因子。随着冻结温度降低, 冻融土壤蛋白酶活性先升高后降低, MBN含量显著降低, 这与硝酸还原酶活性的变化行为正好相反。随着融化温度升高, 冻融土壤MBN含量、蛋白酶及硝酸还原酶活性均无显著性变化。随着循环次数增加, 冻融土壤MBN含量和硝酸还原酶活性均先升高后降低, 而蛋白酶活性则显著升高。随着水分含量增加, 冻融土壤MBN含量先升高后降低, 蛋白酶活性显著升高, 这与硝酸还原酶活性的变化行为正好相反。可见, 冻融循环对农田黑土氮素转化及土壤酶活性具有重要影响。

关键词:农田黑土; 冻融循环; 微生物量氮; 蛋白酶; 硝酸还原酶

中图分类号: S153.6; S154

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)06-0043-06

Effects of Freezing-thawing Cycles on Microbial Biomass Nitrogen and Enzyme Activities in the Farmland Black Soil

ZHAO Ying¹, TIAN Lulu², LIU Yan¹, JUAN Yinghua^{1*}

(1. Institute of Plant Nutrition and Environmental Resources, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161; 2. Changde City Agriculture Committee, Changde 415000, China)

Abstract: In order to deeply understand nitrogen(N) transformation process and enzymatic response behaviors in the farmland black soil during non-growing season, the effects of different freezing-thawing factors (freezing and thawing temperatures, freezing-thawing cycles(FTCs) number, moisture regime) on microbial biomass N (MBN) content and protease and nitrate reductase activities were investigated in the farmland black soil with a laboratory simulation experiment. The results showed that the larger freezing-thawing temperature range from (-15~-12℃/2~-5℃) and the reasonable FTCs number (6-15) and moisture regime (20%-30%) were the major driving factors affecting MBN content and protease and nitrate reductase activities of farmland black soil. With freezing temperature decreasing, protease activity first increased then decreased, MBN content significantly decreased being contrary to the changes of nitrate reductase activity in the FTCs-treated soils. With thawing temperature increasing, the MBN content and protease and nitrate reductase activities all had no significant changes in the FTCs-treated soils. With FTCs number increasing, MBN content and nitrate reductase activity both first increased then decreased, and protease activity significantly increased in the FTCs-treated soils. With moisture regime increasing, MBN content first increased then decreased, and protease activity significantly increased being contrary to the changes of nitrate reductase activity in the FTCs-treated soils. Therefore, it is preliminarily concluded that soil N transformation process and enzyme activities were significantly influenced by FTCs in the farmland black soil.

Key words: Farmland black soil; Freezing-thawing cycles; Microbial biomass nitrogen; Protease; Nitrate reductase

收稿日期: 2019-03-13

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201503118-08); 辽宁省‘兴辽英才计划’项目(XLYC1807221); 国家自然科学基金(41301253); 国家重点研发计划(2017YFD0300702、2018YFD0300303)

作者简介: 赵颖(1967-), 女, 副研究员, 从事土壤肥料方面的研究。

通讯作者: 隽英华, 男, 博士, 研究员, E-mail: juanyong_001@sohu.com

冻融作用是由于季节性或昼夜温度的变化使得土壤出现的反复冻结-融化过程,是中高纬度和高海拔地区普遍存在的一种自然现象^[1],其通过改变土壤结构和水热状况对微生物群落结构、活性及相关微生物特性产生影响,进而影响土壤氮的生物地球化学循环过程^[2]。土壤微生物量氮是土壤有机氮的重要组成部分,是土壤中微生物分解矿化氮元素和有机物的关键指标之一,其变化趋势可以表现出土壤肥力的大小^[3]。多数研究表明,冻融循环对土壤微生物量氮影响显著,初次冻融后,微生物量氮显著降低,随着冻融频次增加,呈现先增加后下降趋势^[4-6],并且较大的冻融温差使微生物量氮减少^[7]。但这些研究多集中在作物生长季,而非生长季的冻融循环对土壤微生物固持方面的研究还相对较少。土壤酶是控制碳氮转化过程的重要驱动因子之一,它是土壤碳氮生物化学反应的催化剂,对土壤有机质的分解和植物营养元素的循环起着重要作用^[8]。早期研究表明,冬季极寒的温度条件能够降低土壤酶活性甚至使酶失活^[9],但近期研究认为,冻融循环能够增加土壤中嗜冷微生物的底物有效性^[10-11],为冬季维持相对较高的土壤酶活性提供有利条件。

黑土是东北地区特有气候和植被相互作用而形成的土壤类型^[12],在长达半年的冬春季节里,土壤处于冻结-解冻状态,存在明显的季节性冻融现象。目前,关于冻融循环对土壤物理性质和营养元素有效性的影响研究国内外已有了大量报道,但这些研究主要集中在高山草甸、森林、苔原、湿地等生态系统^[5, 13-14],而有关冻融循环对非生长季农田黑土氮素转化和酶活性的影响研究鲜有报道。鉴于此,本研究以农田黑土为研究对象,采用室内冻融模拟培养试验探讨了不同冻融因子(冻融温度、冻融循环次数、水分含量)对土壤微生物量氮及氮代谢关键酶活性的影响行为,以期对深入理解非生长季农田黑土氮素转化过程和减少氮素损失具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤采样地点为吉林省公主岭市国家黑土土壤肥力和肥料效益长期定位监测站(始建于1977年;43°30'N、124°48'E),该区属于中温带半

湿润大陆性季风气候,年均温度4~5℃,年均降雨量450~650 mm,年均无霜期125~140 d,有效积温2 600~3 000℃,年蒸发量1 200~1 600 mm,年均日照时间2 500~2 700 h。土壤类型为典型黑土。采样时间为2013年10月。采样时,先除去表层杂物,多点混合法采集0~20 cm耕层土壤,将新鲜样品装入塑料袋后迅速带回实验室,挑取肉眼可见的细根、石块等杂物后分成两份,一份过2 mm筛后4℃保存备用,另一份风干后,测定基础化学性质^[15]:pH(5.80±0.07)、有机质(29.97±0.84)g/kg、全氮(1.77±0.07)g/kg、全磷(1.65±0.08)g/kg、全钾(25.30±1.42)g/kg、碱解氮(180.45±4.12)mg/kg、有效磷(112.96±7.17)mg/kg、速效钾(330.06±8.3)mg/kg。

1.2 冻融试验设计

取定量过筛后鲜土,用蒸馏水调节含水量至10%(质量含水量),放入10℃(模拟采样地区10月末~11月初田间原位土壤冻融作用初次发生时的平均气温)恒温培养箱中恒温预培养15 d,使其恢复生物学活性。预培养期间每天透气并补充损失的水分。

1.2.1 冻融温度模拟试验

称取相当于200 g风干土的预培养土壤于100 mL培养瓶中平铺于瓶底,用蒸馏水调节含水量至15%(质量含水量),用带孔的保鲜膜封口,在某一冻结温度下冻结6 d,然后在某一融化温度下融化1 d,取样进行微生物量氮测定。冻结温度设定为:-3℃、-6℃、-9℃、-12℃、-15℃;融化温度设定为2℃、5℃。同时,冻结温度为-3℃、-9℃和-15℃的冻融处理还进行蛋白酶和硝酸还原酶活性测定。每个处理3次重复,并设置恒温2℃处理作为对照。试验期间每隔2 d称重补充水分。

1.2.2 冻融循环次数模拟试验

称取相当于200 g风干土的预培养土壤于100 mL培养瓶中平铺于瓶底,用蒸馏水调节含水量至15%(质量含水量),用带孔的保鲜膜封口,经过一定循环次数的冻融后,取样进行微生物量氮测定。冻融循环次数设定为:1、3、6、10、15。其中,在-3℃冻结6 d、在2℃融化1 d设定为1个冻融循环。同时,冻融循环次数1、6和15的处理还进行蛋白酶和硝酸还原酶活性测定。每个处理3次重复,并设置恒温2℃处理作为对照。试验期间每隔2 d称重补充水分。

1.2.3 水分含量冻融模拟试验

称取相当于 200 g 风干土的预培养土壤于 100 mL 培养瓶中平铺于瓶底,通过注射器均匀加蒸馏水调节含水量至 10%、20% 和 30% (质量含水量),分别相当于田间持水量的 40%、80% 和 120%,用带孔的保鲜膜封口,经过 1 个循环的冻融后(冻融循环设定同 1.2.2),取样进行微生物量氮测定。同时,水分含量 10% 和 30% 的处理还进行蛋白酶和硝酸还原酶活性测定。每个处理 3 次重复,并设置恒温 2℃ 处理作为对照。试验期间每隔 2 d 称重补充水分。

1.3 测定方法

土壤微生物量氮(microbial biomass nitrogen, MBN)采用氯仿熏蒸-K₂SO₄浸提法测定^[15],土壤蛋白酶活性采用改良 Folin 法测定^[16],土壤硝酸还原酶活性采用 KNO₃培养-KCl 浸提比色法测定^[17]。

1.4 数据处理

数据采用 Excel 2007 和 SPSS 19.0 进行统计分析,采用 Duncan's 法进行多重比较;数值采用平均值±标准差的形式表示。

2 结果与分析

2.1 冻融循环作用下农田黑土微生物量氮变化特征

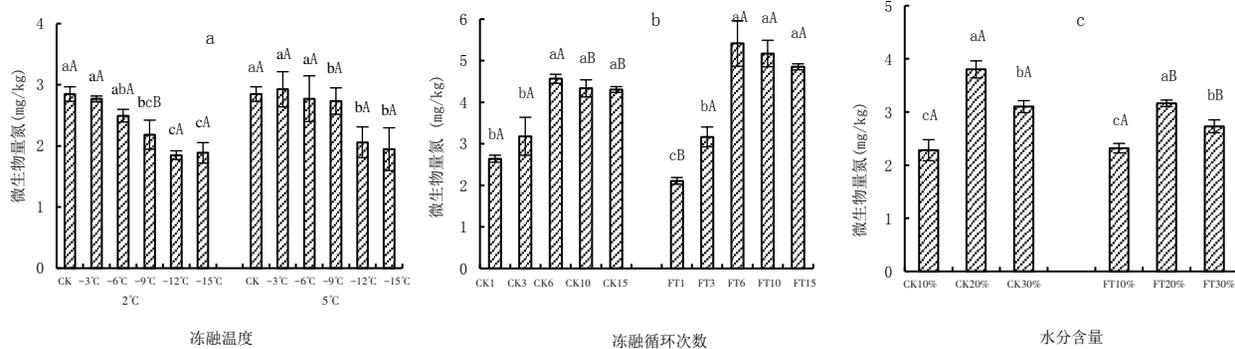


图 1 冻融循环对农田黑土微生物量氮含量的影响

注:柱图上方不同小写字母表示冻结温度、冻融循环次数和水分含量处理间差异达显著水平($P < 0.05$),不同大写字母表示融化温度处理间、冻融与对照处理间差异达显著水平($P < 0.05$);a:冻融温度影响;b:冻融循环次数影响;c:水分含量影响;CKn:循环次数n的对照处理;FTn:循环次数n的冻融处理;CKn%:水分含量n%的对照处理;FTn%:水分含量n%的冻融处理,下同

性变化特征

冻融农田黑土蛋白酶活性变化行为受冻融温度、冻融循环次数和水分含量的协同影响。与对照相比,除水分含量 30% 显著降低外,其它冻融

冻融循环对农田黑土 MBN 含量显著影响 ($P < 0.05$),且影响程度因冻融温度、冻融循环次数和水分含量而异(图 1)。与对照相比,较低冻结温度($\leq -9^\circ\text{C}$)的冻融土壤 MBN 含量显著降低,而较高冻结温度($\geq -6^\circ\text{C}$)的 MBN 含量则无显著性变化。随着冻结温度降低,冻融土壤 MBN 含量显著降低,且降低幅度逐渐增大,以 -12°C 和 -15°C 冻结时降幅最大,分别为 31.43% 和 27.07% (平均值)。随着融化温度升高,除 -9°C 冻结显著增加外,其它冻融土壤 MBN 含量均无显著性变化(图 1a)。说明较低的冻结温度($-15^\circ\text{C} \sim -12^\circ\text{C}$)对冻融土壤 MBN 含量影响程度较大,而融化温度则影响不大。与对照相比,循环次数 1 的冻融土壤 MBN 含量显著降低(-20.15%),而循环次数 10 和 15 的 MBN 含量显著增加,增加幅度在 12.67%~19.36% 之间。随着冻融循环次数增加,冻融土壤 MBN 含量先增加后降低,以循环次数 6 的含量最高(5.41 mg/kg)(图 1b)。与对照相比,低水分含量(10%)的冻融土壤 MBN 含量无显著性变化,而高水分含量(20%、30%)的 MBN 含量则显著降低,降低幅度在 11.94%~16.76% 之间。随着水分含量增加,冻融土壤 MBN 含量均先增加后降低,以水分含量 20% 时达到最大值(3.16 mg/kg)(图 1c)。

2.2 冻融循环作用下农田黑土氮代谢关键酶活

土壤蛋白酶活性无显著性变化(图 2)。随着冻结温度降低,冻融土壤蛋白酶活性先升高后降低,以 -9°C 冻结时最大(平均值 $393.49 \mu\text{g}$ 酪氨酸/(g 干土·2h))。随着融化温度升高,冻融土壤蛋白酶

活性无显著性变化(图 2a)。随着冻融循环次数增加,冻融土壤蛋白酶活性增加显著,以循环次数 15 时最大,较循环次数 1 时增加 30.74% (图 2b)。随着水分含量增加,冻融土壤蛋白酶活性显著增加,以水分含量 30% 时最大(359.90 μg 酪氨酸/(g 干土 \cdot 2h)),较水分含量 10% 时增加 75.54% (图 2c)。说明在一定水分含量范围内,高水分含量对冻融土壤蛋白酶活性的影响程度较大。

冻融循环对农田黑土硝酸还原酶活性显著影响($P<0.05$),且影响程度因冻融温度、冻融循环次数和水分含量而异。与对照相比,除循环次数 1 和 15 显著降低外,其它冻融土壤硝酸还原酶活性无显著性变化(图 3)。随着冻结温度降低,冻融

土壤硝酸还原酶活性显著升高,以 -15°C 冻结时最大(平均值 $1.29\mu\text{g NO}_2^-/\text{N}/(\text{g 干土}\cdot 24\text{ h})$)。随着融化温度升高,除 -15°C 冻结显著降低外,其它冻融土壤硝酸还原酶活性无显著性变化(图 3a)。说明冻融土壤硝酸还原酶活性的变化行为受冻结温度和融化温度的协同影响,且冻结温度的作用程度大于融化温度。随着循环次数增加,冻融土壤硝酸还原酶活性先升高后降低,以循环次数 6 时最高($1.19\mu\text{g NO}_2^-/\text{N}/(\text{g 干土}\cdot 24\text{ h})$)。随着水分含量增加,冻融土壤硝酸还原酶活性显著降低,以水分含量 30% 时最小($1.08\mu\text{g NO}_2^-/\text{N}/(\text{g 干土}\cdot 24\text{ h})$),较水分含量 10% 时降低 18.34% (图 3c)。

3 讨论

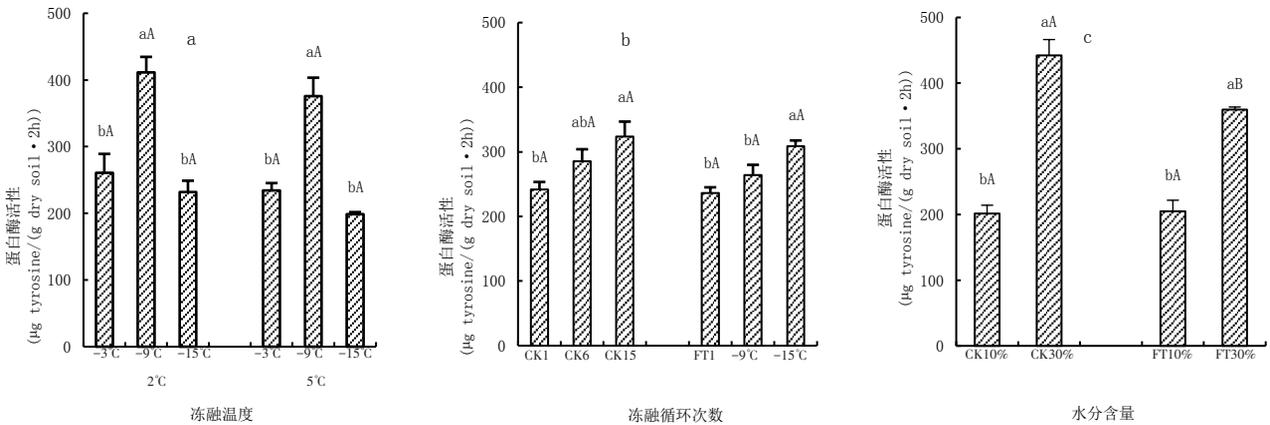


图 2 冻融循环对农田黑土蛋白酶活性的影响

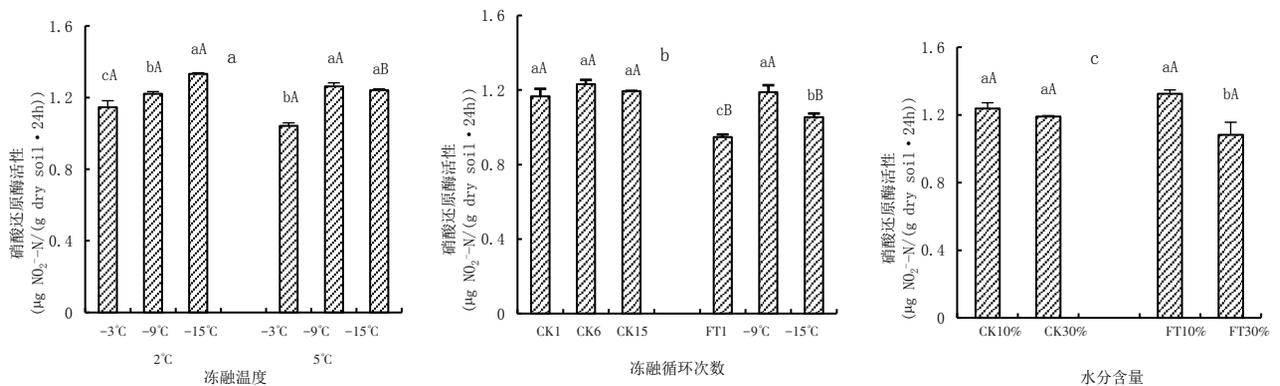


图 3 冻融循环对农田黑土硝酸还原酶活性的影响

土壤 MBN 主要依赖于土壤微生物的种类及数量,受土壤水分、温度、营养状况、通气性等多因子的综合影响^[18],因而在不同条件下可能存在较大差异。Koponen 等^[19]和 Grogan 等^[20]研究认为,室内模拟冻融条件下少次冻融循环对土壤 MBN

无明显影响。但本研究表明,冻融循环显著影响农田土壤 MBN 含量,这也佐证了隗英华等^[7]、朱国君等^[21]和单博等^[22]的研究结果。持续的冻融循环会导致土壤细菌和放线菌数量下降,特别是对不耐低温的微生物种类和数量的影响更加明显,而

冻融循环有利于真菌和放线菌的增加,导致微生物种群结构与活性发生明显变化^[20, 23-24]。本研究发现,随着冻结温度降低,冻融土壤 MBN 含量显著降低。说明较大冻融温差对冻融期土壤微生物产生了明显影响。这是因为,冻结过程中土壤温度明显降低,土壤中的部分微生物受到冻结胁迫而死亡,直接降低了土壤微生物数量^[25],且作用程度随着冻结温度降低而增强。

随着循环次数增加,冻融土壤 MBN 含量先增加后降低,以循环次数 6 时含量最高。说明冻融过程中土壤水分周期性的凝结与融化和土壤温度的周期性波动对土壤微生物产生了明显影响,进而导致土壤 MBN 含量产生明显时间波动特征。随着冻融循环次数增加,死亡的部分微生物在分解过程中释放出大量活性营养物质,为残留微生物提供了更多的可利用底物,刺激了其活性,进一步固持利用了土壤中的活性营养物质^[5]。随着水分含量增加,冻融土壤 MBN 含量先增加后降低,以水分含量 20% 时达到最大值。这是因为,在田间持水量范围内,冻融过程中土壤水与微生物细胞内水分之间的水势随着水分含量增加渐近平衡,提高了微生物活性;当超过田间持水量时,两者之间逐渐失衡导致更多微生物死亡^[26]。可见,本试验条件下,造成土壤 MBN 变化的主要因子是冻融温差、冻融循环次数和水分含量。为深入揭示冻融循环对土壤微生物群落结构的影响机理,需要结合田间原位冻融试验来进一步验证。

本研究发现,随着冻结温度降低,冻融土壤蛋白酶活性先升高后降低,而硝酸还原酶活性显著升高。说明不同种类酶活性对冻融作用的响应行为不同,总体表现为中强度冻融 > 高强度冻融,这与李源等^[8]的研究结果相似。随着循环次数增加,冻融土壤蛋白酶活性显著增加,而硝酸还原酶活性先升高后降低。这是因为,一方面,冻融初期低温使土壤酶活性暂时失活或处于较低水平,逐渐增加的冻融循环使土壤释放了更多可溶性碳氮,增加了酶底物有效性,提高了酶活性;另一方面,随着冻融循环次数增加,土壤中残留微生物逐渐适应了环境温度的周期性变化,且有效碳源被逐渐消耗使得酶活性底物逐渐减少,降低了酶活性^[27];这两种作用的协同效应直接决定了不同类型酶活性响应行为的差异性。随着水分含量增加,冻融土壤蛋白酶活性显著升高,而硝酸

还原酶活性显著降低。这可能是由于在高水分含量条件下,冻结冰层及其下活动层的局部更容易形成厌氧环境;冰融化后,活动层底部饱水排氧明显又造成厌氧和还原状态^[28],使得硝酸还原酶活性降低;另外,冻融过程中土壤氮素转化影响了 C/N 比,引起了微生物群落结构及活性变化^[29],进而导致土壤酶活性变化。从本试验结果可以看出,冻融过程中不同类型酶活性的响应行为不同,但具体的作用机理还需要进一步研究。

4 结 论

冻融循环对非生长季农田黑土微生物量氮和氮代谢关键酶活性影响显著。冻融农田黑土 MBN、蛋白酶和硝酸还原酶活性的变化行为受冻融温度、冻融循环次数和水分含量的协同影响;其中,较大的冻融温差、适宜的冻融循环次数和水分含量是影响农田黑土 MBN、蛋白酶和硝酸还原酶活性的主要驱动因子。土壤硝酸还原酶活性与供氮潜力密切相关,蛋白酶活性则通过温度、水分等因素影响土壤有机氮的循环过程;可见,两种代谢酶对评价冻融作用下土壤微生物在氮素转化过程中的持续调控作用及其对土壤氮库积累的贡献具有重要指示意义。

参考文献:

- [1] 伍星,沈珍瑶.冻融作用对土壤温室气体产生与排放的影响[J].生态学报,2010,29(7):1432-1439.
- [2] Matzner E, Borken W. Do freeze-thaw events enhance C and N losses from soils of different ecosystems? A review[J]. European Journal of Soil Science, 2008, 59: 274-284.
- [3] 陈怀满.环境土壤学[M].北京:科学出版社,2010:1-103.
- [4] 任伊滨,任南琪,李志强.冻融对小兴安岭湿地土壤微生物碳、氮和氮转换的影响[J].哈尔滨工程大学学报,2013,34(4):530-535.
- [5] 徐俊俊,吴彦,张新全,等.冻融交替对高寒草甸土壤微生物量氮和有机氮组分的影响[J].应用与环境生物学报,2011,17(1):57-62.
- [6] 范志平,李胜男,李法云,等.冻融交替对河岸缓冲带土壤无机氮和土壤微生物量氮的影响[J].气象与环境学报,2013,29(4):106-111.
- [7] 隗英华,刘艳,田路路,等.冻融交替对农田棕壤氮素转化过程的调控效应[J].土壤,2015,47(4):647-652.
- [8] 李源,祝惠,袁星.冻融交替对黑土氮素转化及酶活性的影响[J].土壤学报,2014,51(5):1103-1109.
- [9] Mikan C J, Schimel J P, Doyle A P. Temperature controls of microbial respiration in arctic tundra soils above and below freezing[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(11): 1785-1795.

- [10] Hentschel K, Borken W, Matzner E. Repeated freeze-thaw events affect leaching losses of nitrogen and dissolved organic matter in a forest soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2008, 171(5): 699-706.
- [11] Freppaz M, Williams B L, Edwards A C, et al. Simulating soil freeze/thaw cycles typical of winter alpine conditions: Implications for N and P availability[J]. *Applied Soil Ecology*, 2007, 35(1): 247-255.
- [12] 栾英颖, 郑德春, 张国君. 吉林省黑土资源现状及治理对策[J]. *东北农业科学*, 2018, 43(5): 41-42.
- [13] 刘金玲, 吴福忠, 杨万勤, 等. 季节性冻融期间川西亚高山/高山森林土壤净氮矿化特征[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(3): 610-616.
- [14] 周旺明, 秦胜金, 刘景双, 等. 沼泽湿地土壤氮矿化对温度变化及冻融的响应[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(4): 806-811.
- [15] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 12-196.
- [16] Ladd J N. Properties of proteolytic enzymes extracted from soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1972, 4(4): 227-237.
- [17] Kandeler E, Eder G, Sobotik M. Microbial biomass, N mineralization and the activities of various enzymes in relation to nitrate leaching and root distribution in a slurry-amended grassland[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1994, 18(18): 7-12.
- [18] 林允伟, 金光泽. 冻融期去根处理对小兴安岭6种林型土壤微生物量的影响[J]. *生态学报*, 2016, 36(19): 6159-6169.
- [19] Koponen H T, Jaakkola T, Keinnen-Toivola M M, et al. Microbial communities, biomass, and activities in soils as affected by freeze thaw cycles[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(7): 1861-1871.
- [20] Grogan P, Michelsen A, Ambus P, et al. Freeze-thaw regime effects on carbon and nitrogen dynamics in sub-arctic heath tundra mesocosms[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(4): 641-654.
- [21] 朱国君, 尹航, 梁运江, 等. 春季解冻期3种温带森林土壤氮素形态变化[J]. *土壤通报*, 2017, 48(6): 1392-1397.
- [22] 单博, 庄海艳, 陈祥伟. 冻融时黑土耕层土壤氮素形态[J]. *东北林业大学学报*, 2018, 46(6): 73-76.
- [23] Lipson D A, Schmidt S K. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the colorado rocky mountains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2867-2879.
- [24] Six J, Bossuy H, Degryze S, et al. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota and soil organic matter dynamics[J]. *Soil and Tillage Research*, 2004, 79(1): 7-31.
- [25] 韩瑛. 典型黑土区土壤温室气体排放特征研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
- [26] Robeyt L, Jefferies N, Alan W, et al. Is the decline of soil microbial biomass in late winter coupled to changes in the physical state of cold soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(2): 129-135.
- [27] Wu F Z, Yang W Q, Zhang J, et al. Litter decomposition in two subalpine forests during the freeze-thaw season[J]. *Acta Oecologica*, 2010, 36: 135-140.
- [28] 李述训, 南卓铜, 赵林. 冻融作用对系统与环境间能量交换的影响[J]. *冰川冻土*, 2002, 24(2): 109-115.
- [29] 许泉, 芮雯奕, 刘家龙, 等. 我国农田土壤碳氮耦合特征的区域差异[J]. *生态与农村环境学报*, 2006, 22(3): 57-60.