

DOI:10.13870/j.cnki.stbxb.2025.05.28

CSTR:32310.14.stbxb.2025.05.28

黄伟, 杨小艺, 李浩乐, 等. 青藏高原草甸土微生物活性对不同冻融循环次数的非线性响应[J]. 水土保持学报, 2025, 39(5)

HUANG Wei, YANG Xiaoyi, LI HaoLe, et al. Nonlinear response of microbial activity in meadow soils on Qinghai-Xizang Plateau to different numbers of freeze-thaw cycles[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2025, 39(5)

青藏高原草甸土微生物活性对不同 冻融循环次数的非线性响应

黄伟^{1,2,3}, 杨小艺⁴, 李浩乐⁴, 胡亚鲜^{1,2,3,4}

(1. 中国科学院教育部水土保持与生态环境研究中心, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国科学院水利部水土保持研究所, 陕西 杨凌 712100; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 西北农林科技大学水土保持科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: [目的] 青藏高原草甸土对气候变化引起的季节性冻融频次改变尤为敏感, 亟需揭示草甸土微生物活性对不同冻融循环次数的响应规律。[方法] 选取青藏高原地区季节性冻融作用频繁的高寒草甸土为研究对象, 通过非冻融与 1、3、5、7、9 次冻融循环模拟, 对比分析典型土壤可溶性碳氮、微生物碳氮及气体碳氮的响应特征。[结果] 1) 与未冻融土壤相比, 9 次冻融循环后土壤微生物生物量碳显著降低 23.64%, 可溶性有机碳质量分数显著提升 7.37%, CO₂ 和 N₂O 累积释放量分别增加 71.09% 和 321.40%。2) 随着冻融循环次数增加, 可溶性有机碳、β-葡萄糖苷酶和亮氨酸氨基肽酶等活性呈先减小后增大的非线性变化特征, 均于第 5 次冻融循环后达到最低值; 同时 CO₂ 释放速率在前 2 次冻融循环后最高 (为非冻融土壤的 1.83 倍), 而 N₂O 释放速率则在第 5 次冻融循环后激增, 达非冻融土壤的 5.83~24.82 倍。3) 多次冻融循环后, 土壤微生物生物量氮变化不显著, 但 NO₃-N 质量分数和乙酰氨基葡萄糖苷酶活性稳步增多, 而 NH₄-N 则稳步下降。[结论] 多次冻融循环对土壤微生物的影响并非单次冻融作用的简单重复。高寒草甸土 5 次冻融循环后, 土壤水冻胀作用带来的孔隙结构变化和微生物死亡已基本趋于稳定, 而存活微生物群落则逐渐适应新的温度条件, 在进一步的冻融循环中恢复活性, 研究结果为深入理解高寒草甸土微生物越冬机理提供新理论和新数据。

关键词: 冻融交替; 碳氮循环; 土壤微生物; 高寒草甸土

中图分类号: S153; S154

文献标识码: A

Nonlinear Response of Microbial Activity in Meadow Soils on Qinghai-Xizang Plateau to Different Numbers of Freeze-Thaw Cycles

HUANG Wei^{1,2,3}, YANG Xiaoyi⁴, LI HaoLe⁴, HU Yaxian^{1,2,3,4}

(1. Research Centre of Soil and Water Conservation and Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Education, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Water Resources, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. College of Soil and Water Conservation Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: [Objective] Meadow soils on the Qinghai-Xizang Plateau are highly sensitive to changes in the frequency of seasonal freeze-thaw cycles caused by climate change, and it is therefore urgent to understand how microbial activity in these soils responds to different numbers of freeze-thaw cycles. [Methods] Typical alpine meadow soil from a region of the Qinghai-Xizang Plateau with frequent seasonal freeze-thaw activity was selected as the study subject. Simulations with 1, 3, 5, 7, and 9 freeze-thaw (FT) cycles (termed C1, C3, C5, C7, and C9) and a non-freeze-thaw control (N9) were conducted to compare the response characteristics of typical soil

收稿日期: 2025-03-03

修回日期: 2025-04-02

录用日期: 2025-04-11

资助项目: 国家自然科学基金项目 (52279049, 42477373)

第一作者: 黄伟 (2000—), 男, 硕士研究生, 主要从事土壤冻融研究。E-mail: huangwei221@mailsucas.ac.cn

通信作者: 胡亚鲜 (1986—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事土壤侵蚀与碳循环研究。E-mail: huyaxian@nwfau.edu.cn

<http://stbxb.alljournal.com.cn>

parameters: dissolved organic carbon (DOC), microbial biomass carbon and nitrogen, and gaseous carbon and nitrogen. [Results] 1) Compared with the non-FT treatment (N9), soil microbial biomass carbon (SMBC) decreased significantly by 23.64% after C9, while DOC increased significantly by 7.37%, and the cumulative emissions of CO₂ and N₂O increased by 71.09% and 321.40%, respectively. 2) With increasing FT cycles, DOC content and activities such as β -glucosidase and leucine aminopeptidase showed a nonlinear trend: they first declined and reached minimum levels at C5. The CO₂ emissions rates peaked after the first two freeze-thaw cycles (1.83 times that of the non-FT soil), while N₂O emission rates sharply increased after the fifth cycle, reaching 5.83 to 24.82 times that of the non-FT soil. 3) Soil microbial biomass nitrogen (SMBN) did not vary significantly, but the concentrations of NO₃-N and the activity of N-acetylglucosaminidase (NAG) increased steadily, while NH₄-N decreased steadily, as the number of FT cycles increased. [Conclusion] The effects of multiple freeze-thaw cycles on soil microorganisms are not merely repetitions of a single freeze-thaw event. After five cycles, changes in pore structure and microbial mortality caused by soil water freezing and swelling have largely stabilized, and the surviving microbial communities gradually adapt to the new temperature conditions, restoring their activity during subsequent cycles. These findings could provide new theoretical insights and data for understanding the overwintering mechanisms of microorganisms in alpine meadow soils affected by seasonal freeze-thaw cycles.

Keywords: freeze-thaw cycles; carbon and nitrogen cycles; soil microorganisms; alpine meadow soils

Received: 2025-03-03

Revised: 2025-04-02

Accepted: 2025-04-11

北半球>50%陆地生态系统受季节性冻融的影响,而冻融期农田土壤CO₂和N₂O排放量占其年排放量的30%~90%^[1]。已有研究^[2]发现,单次冻融过程水冰相变和低温冻胀可对土壤团聚体和微生物产生严重机械性破坏,显著改变孔隙结构^[3],并导致大量土壤微生物死亡^[4],而不同温度耐受程度微生物群落结构也发生重组^[5]。同时,因冻融损伤或死亡的微生物代谢产物或残体不仅增加土壤溶液可溶性物质^[4,6],激发存活微生物呼吸和有机氮矿化^[7],且重组后的微生物群落为适应低温和液态水有效性变化,改变其酶活性和碳氮利用策略^[8],影响冻融期CO₂和N₂O等温室气体排放^[9]。然而,不同类型冻融土壤的相关研究^[10]发现,初次或低次冻融循环对土壤孔隙结构影响最为剧烈,而随着冻融循环次数增加,土壤孔隙结构和连通性趋于稳定,不同孔径孔隙水冻结过程随之改变。冻融季频繁冻融交替结束后,土壤微生物并未完全灭亡,甚至在融化初期出现CO₂和N₂O等温室气体激增等现象^[11]。说明多次冻融循环对土壤微生物的影响并非单次冻融作用的简单重复。然而,土壤微生物群落如何在季节性冻融期频繁水冰相变过程中存活与恢复,存活微生物群落丰度与碳氮循环相关酶活性如何调控其CO₂和N₂O排放过程,仍然缺乏系统认识。

青海三江源地区处于青藏高原腹地,地势高亢,气候严寒,植被覆盖度欠佳,是我国典型的生态脆弱

区和重要生态安全屏障。近地表冻融状况对未来气候变化尤为敏感,常见寒冻风化剥蚀和热融滑塌等冻融侵蚀现象。气候增温条件下,青藏高原地区土壤冻结起始时间推迟,解冻起始时间提前,不仅影响土壤冻结持续时间和最大冻结深度,而且显著改变近地表冻融交替频次,加剧热熔滑塌等冻融侵蚀,并降低近地表土壤微生物群落稳定性和微生物残体碳积累,甚至激发CO₂、N₂O等温室气体排放,加速土壤有机碳氮流失^[11]。聂婷等^[12]通过长期原位监测表明,青藏高原季节性冻融期不同阶段温度、水分变化可显著影响CO₂等温室气体的产生与释放,且昼夜尺度和单次冻融过程的土壤呼吸通量均呈单峰变化;赵姗姗^[13]通过控制性模拟冻融试验发现,不同冻融方式均可显著提高高寒草甸土N₂O排放,且N₂O排放量与NH₄-N呈负相关,与NO₃-N呈正相关;李尚宏等^[14]进一步发现,随着冻融交替循环次数从1次增加到12次,再到24次,高寒草甸土N₂O排放速率先迅速增加,后显著下降。充分说明频繁冻融交替条件下,高寒草甸土微生物碳氮利用响应存在非线性特征,亟需理清不同冻融循环次数下土壤微生物碳氮和可溶性碳氮转化,以及气体碳氮排放之间的联动关系。

1 材料与方法

1.1 研究区概况与土样采集

选取青海省果洛藏族自治州玛沁县(34°48'N, 100°21'E)为研究区。该区域位于青藏高原东部,属

季节性冻土区,平均海拔3 660 m,年平均气温为 -0.6°C ,最高气温 26.6°C ,最低气温 -34.9°C 。冻结期开始于9—10月,至翌年4—6月结束,平均最大冻土深度 $>100\text{ cm}$ ^[15]。初春季节昼融夜冻频繁,表层土壤通常经历6~11次日冻融循环,其中白天平均气温可升至 9.5°C ,晚间平均气温可降至 -11.6°C 。

研究区植被类型主要为高寒草甸,形成以沙壤质地为主的高寒草甸土,平均pH为8.3,平均有机碳为 56.13 g/kg ,平均全氮为 6.07 g/kg 。在研究区典型草甸采集表土(0~20 cm),自然风干后,用镊子去除可见的杂质(残留根系、碎石、石块等),过2 mm筛,避免过大土壤颗粒对孔隙结构、水分分布及冻融过程的影响。

1.2 多次冻融循环模拟试验

为模拟研究区野外随昼夜交替而发生的冻融循环过程,本试验分别设置1、3、5、7、9次冻融循环(简称C1、C3、C5、C7、C9),对比分析草甸土微生物活性对不同冻融循环次数的异质性响应。每次冻融循环为 -10°C 冻结12 h,后于 10°C 解冻12 h。具体而言,

称取120 g过筛干土,分层润湿回填至250 mL丁基锂瓶中。为避免土壤回填过程中润湿不均匀而导致的水分迁移,每层土填入后用纯净水湿润至田间持水量(即重量含水率57%)的80%。分层回填完成后,将土壤样品置入 10°C 恒温培养箱(HWS-150,普朗特,中国),预培养7 d,使润湿土壤微生物恢复活性,且水分分布均匀。预培养结束后,分别开展C1~C9冻融循环模拟。同时,设置对照组(N9),即不经历冻融扰动而保持 10°C 恒温培养9 d,直至C9冻融循环处理结束。在预培养与冻融循环模拟过程中,每日称取丁基锂瓶土壤湿重,并补水,保证土壤含水率差异 $<2\%$ 。每个处理重复5次。

在模拟试验过程中,分别在第1、2、3、5、7、9 d测定土壤样品 CO_2 和 N_2O 释放速率,并分别在第1、3、5、7、9 d测定土壤微生物生物量碳(SMBC)、微生物生物量氮(SMBN)、可溶性有机碳(DOC)、铵态氮(NH_4^+-N)和硝态氮(NO_3^--N)等,以及5种与碳氮循环相关的胞外酶活性(图1)。

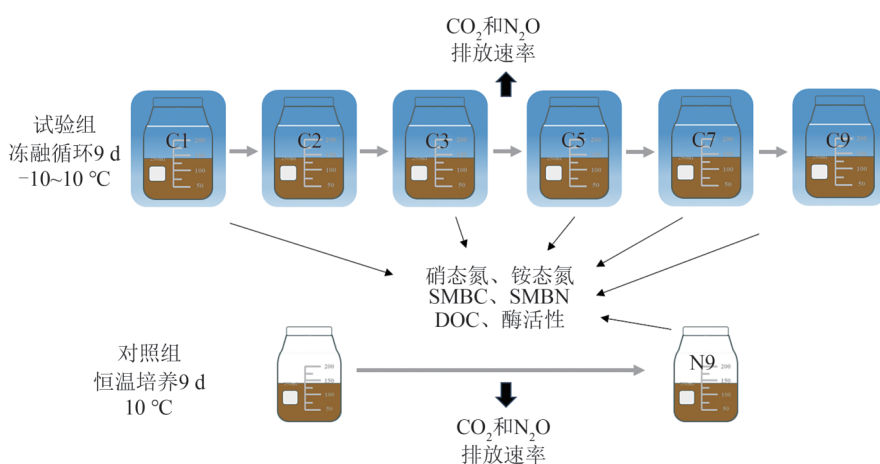


图1 试验设计示意

Fig. 1 Schematic diagram of experimental design

1.3 土壤微生物生物量碳氮测定

土壤SMBC和SMBN的测定参考《土壤农业化学分析方法》^[16],采用氯仿熏蒸法浸提土壤溶液,后通过总有机碳分析仪(TOC-VCPH,岛津,日本京都)分别测定熏蒸和未熏蒸样品DOC质量分数,并通过流动分析仪(Auto Analyzer 3-AA3,德国)分别测定熏蒸和未熏蒸样品 NH_4^+-N 质量分数。计算出熏蒸土壤与未熏蒸土壤DOC和 NH_4^+-N 差值,并分别依据转化系数0.45和0.25,估算土壤样品SMBC和SMBN质量分数。

1.4 土壤酶活性测定

为对比不同冻融循环处理前后,碳氮循环相关酶活性变化规律,主要测定 β -葡萄糖苷酶(BG)、 β -木

糖苷酶(BXYL)、纤维二糖水解酶(CBH)、乙酰氨基葡萄糖苷(NAG)、亮氨酸氨基肽酶(LAP)5种酶活性。具体而言,称取 $1.18\sim 1.22\text{ g}$ 鲜土,加入150 mL Tris-HCl缓冲液(pH约8.3)于培养皿中,通过磁力搅拌器搅拌1 min制取土壤悬浊液。采用96孔黑色微孔板荧光光度法,设置样品微孔(150 μL 样品悬浊液+50 μL 相应底物)、空白微孔(150 μL 样品悬浊液+50 μL 缓冲液)、淬灭微孔(150 μL 样品悬浊液+50 μL 相应标准物质)、阴性对照微孔(150 μL 缓冲液+50 μL 相应底物)和参考标准微孔(150 μL 缓冲液+50 μL 相应标准物质)。所有样品在 25°C 黑暗条件下培养4 h,而后每个微孔上机前加入10 μL 0.5 mol/L NaOH终止反应,振荡1 min后,使用多功能酶标仪

(SpectraMax M, Molecular Devices, 中国上海), 在激发波长 365 nm、发射波长 450 nm 的条件下测定土壤胞外酶活性。每个样品设置 4 个重复。土壤酶活性计算公式为:

$$A_b = FV / (eV_1tm) \quad (1)$$

$$F = (f - f_b) / q - f_s \quad (2)$$

$$e = f_r / (C_s V_2) \quad (3)$$

$$q = (f_q - f_b) / f_r \quad (4)$$

式中: A_b 为土壤样品的酶活性, $\text{nmol}/(\text{g} \cdot \text{h})$; F 为校正后的样品荧光值; V 为土壤悬浊液的总体积; V_1 为微孔板每孔中加入的样品悬浊液的体积, mL ; t 为暗培养时间, h ; m 为干土样的质量, g ; f 为酶标仪读取样品微孔的荧光值; f_b 为空白微孔的荧光值; q 为淬灭系数; f_s 为阴性对照微孔的荧光值; e 为荧光释放系数; f_r 为参考标准微孔的荧光值; C_s 为参考标准微孔的浓度, $10 \mu\text{mol}/\text{L}$; V_2 为加入参考标准物的体积, $50 \mu\text{L}$; f_q 为淬灭标准微孔的荧光值。

1.5 土壤 CO_2 和 N_2O 释放速率日变化测定

温室气体测定日当天上午 9:00 将丁基锂瓶顶盖闭合, 采集瓶内顶空气体, 并于 10:00 再次采集瓶内顶空气体。使用气相色谱仪 (7890B, 安捷伦, 美国) 分别测定丁基锂瓶密闭 1 h 前后 CO_2 和 N_2O 浓度, 并根据各丁基锂瓶容器内土壤干重和密闭时间, 计算各气体每小时释放速率。各冻融循环处理后, CO_2 和 N_2O 日释放速率则由小时释放速率乘以 24 进行估算。

1.6 其他理化生指标测定及数据分析

各土壤样品 pH 通过 pH 计 (PHS-3E, 雷磁, 中国上海) 测定; 土壤铵态氮 (NH_4^+-N) 和硝态氮 (NO_3^--N) 质量分数采用 $1 \text{ mol}/\text{L}$ KCl 以 1:5 的土水比浸提, $180 \text{ r}/\text{min}$ 室温振荡 1 h, 并用中速定性滤纸过滤得到浸提液, 浸提液使用连续流动分析仪 (Auto Analyzer 3-AA3, 德国) 测定。

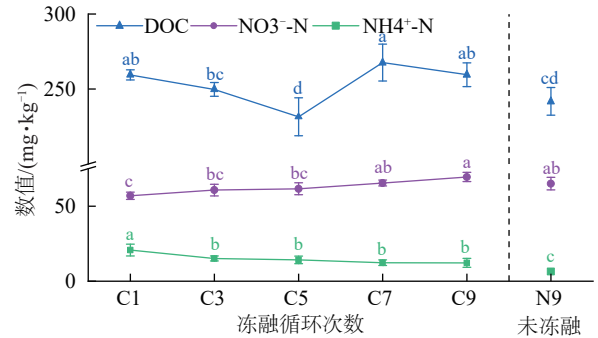
采用 Microsoft Office Excel 进行数据整理, SPSS 27.0 软件进行统计分析, 用单因素法 (One-way ANOVA) 进行方差分析。不同处理间的差异性检验通过 Duncan 法进行多重比较 ($p < 0.05$), 并使用 Origin 2022 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 不同冻融循环次数下土壤可溶性有机碳、硝态氮和铵态氮差异

随着冻融循环次数增加, 土壤 DOC 先降低后增高, 于 C5 时降至最低值 $231.51 \text{ mg}/\text{kg}$, 但在 C7 和 C9 后恢复至 $259.56 \sim 267.60 \text{ mg}/\text{kg}$ 。与未冻融组 N9 相比, C9 的 DOC 显著增高 7.37% (图 2)。不同冻融循

环次数下, 土壤 NO_3^--N 和 NH_4^+-N 趋势相反: 一方面, NO_3^--N 随冻融循环次数增加呈递增趋势, C1 时为最低值 $56.92 \text{ mg}/\text{kg}$, 而在 C9 后显著升高至最大值 $69.48 \text{ mg}/\text{kg}$ (图 2)。另一方面, 土壤 NH_4^+-N 呈递减趋势, C1 时最高为 $20.76 \text{ mg}/\text{kg}$, 但 C9 后显著降低至最小值 $12.23 \text{ mg}/\text{kg}$ (图 2)。与未冻融土壤 N9 相比, C9 的 NH_4^+-N 显著增高, 但 NO_3^--N 增高不显著 (图 2)。



注: 图中不同小写字母表示同一指标在不同冻融循环次数处理之间存在显著差异 ($p < 0.05$)。下同。

图 2 不同冻融循环次数后土壤可溶性有机碳 (DOC)、硝态氮 (NO_3^--N) 和铵态氮 (NH_4^+-N)

Fig. 2 Soil dissolved organic carbon (DOC), nitrate nitrogen (NO_3^--N), and ammonium nitrogen (NH_4^+-N) after different numbers of freeze-thaw cycles

2.2 不同冻融循环次数下土壤微生物生物量碳、氮的差异

随着冻融循环次数增加, SMBC 先降低后增加, 于 C7 达到最小值 $320.60 \text{ mg}/\text{kg}$, 在 C9 回升至 $336.91 \text{ mg}/\text{kg}$ 。与未冻融 N9 相比, C9 时 SMBC 显著减少 23.64% (图 3)。不同冻融循环次数下, SMBN 差异不显著, 且 C9 与 N9 的 SMBN 也不存在显著差异 (图 3)。

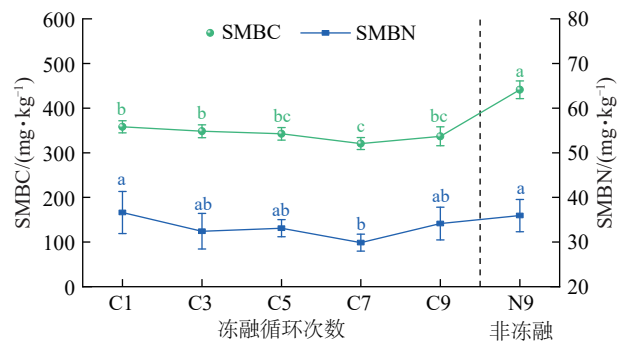


图 3 不同冻融循环次数后土壤微生物生物量碳 (SMBC) 和微生物生物量氮 (SMBN)

Fig. 3 Soil microbial biomass carbon (SMBC) and microbial biomass nitrogen (SMBN) after different numbers of freeze-thaw cycles

2.3 不同冻融循环次数下土壤胞外酶活性的差异

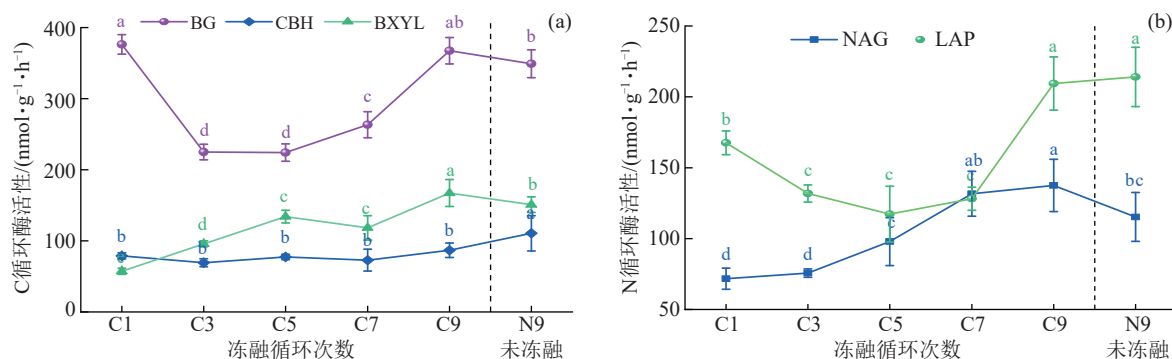
随着冻融循环次数增加, BG 和 LAP 酶活性呈先降低后增加趋势, 均在 C5 后达到最小值 224.11 、 $117.29 \text{ nmol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ (图 4)。同时, BXYL 和 NAG 酶

活性随着冻融循环次数增加显著上升,C1时均为最低值57.25、71.76 nmol/(g·h),而C9后显著增加至最大值167.24、137.47 nmol/(g·h)(图4)。CBH酶活性在不同冻融循环次数后变化不显著,主要为69.16~86.68 nmol/(g·h)(图4)。与非冻融N9处理相比,C9扰动后BXYL和NAG显著上升,但CBH却显著下降,而BG和LAP则变化不显著(图4)。

2.4 不同冻融循环次数下土壤温室气体排放的差异

与非冻融N9相比,冻融循环处理后土壤CO₂和

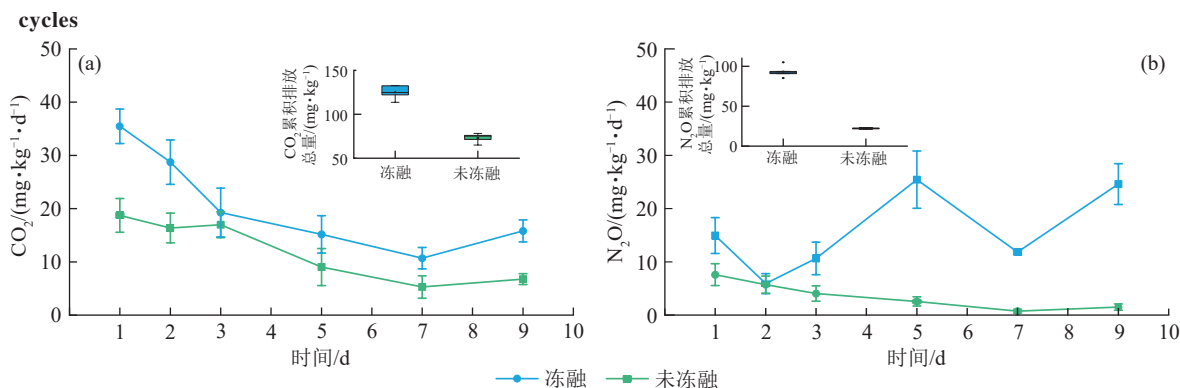
N₂O释放速率均显著提升(图5)。具体而言,在C1和C2冻融扰动后土壤CO₂释放速率显著高于未冻融土壤,平均增幅达82.53%;而N₂O释放速率则随着冻融循环次数增多而逐渐升高,尤其在C5之后,N₂O释放速率是未冻融土壤的5.83~24.82倍。总体而言,9 d培养期间,每单位千克冻融扰动后土壤CO₂累积释放总量为125.17 mg,是未冻融土壤的1.71倍,而N₂O累积释放总量为93.34 mg,是未冻融土壤的4.21倍(图5)。



注:BG为β-葡萄糖苷酶;BXYL为β-木糖苷酶;CBH为纤维二糖水解酶;NAG为乙酰氨基葡萄糖苷;LAP为亮氨酸氨基肽酶。

图4 不同冻融循环次数后土壤碳循环相关酶活性和氮循环相关酶活性变化

Fig. 4 Changes in soil enzyme activities related to carbon cycle and nitrogen cycle after different numbers of freeze-thaw cycles



注:图内箱式小图为冻融与未冻融土壤2种气体累积释放总量差异。

图5 不同冻融循环次数后土壤CO₂和N₂O排放速率变化

Fig. 5 Changes in soil CO₂ and N₂O emission rates after different numbers of freeze-thaw cycles

3 讨论

与未冻融土壤N9相比,9次冻融扰动(C9)显著降低SMBC(图3),提升DOC(图2)。主要是因为土壤冻结过程中的低温冻胀对微生物产生剧烈的机械性破坏,致使大量微生物死亡^[17],存活微生物丰度显著降低,而残破或死亡微生物残体多为小分子可溶性有机物^[1],可有效补给土壤中DOC^[18]。冻融循环初期CO₂释放速率显著高于非冻融土壤(图5),可能的影响因素为:1)冻融过程剧烈冻胀导致团聚体破碎,释放出原来包裹的CO₂^[19]。2)存活微生物为应对低温和液态水有效性限制,一方面提高内源呼吸来维持生命^[20];另一方面,也集中分泌大量抗冻蛋白或

胞外酶,在此过程中需消耗有机碳,释放CO₂。3)真菌群落比细菌群落有更好的渗透调节和低温耐受性^[5],因此在冻胀剧烈的冻融循环初期更容易存活,且易保持较高的呼吸速率(图5)。冻融作用下土壤SMBC和DOC的剧烈变化与前期大量室内外土壤冻融研究相一致,如ROSINGER等^[6]和LIU等^[21]分别对德国和中国黄土高原土壤的研究中发现,冻融作用可显著降低土壤微生物群落丰度,从而补给可溶性有机物质,且有机碳高的土壤SMBC损失更严重,而表层土壤对冻融作用也更敏感。LIU等^[20]对中国东北黑土的研究也进一步明确,冻融作用所导致的SMBC降低和DOC补给程度,与冻融温度、初始含水率及颗粒粒径(孔隙)等因素密切相关。与其他土壤

相比,本研究对象高寒草甸土质地偏砂壤,虽然有机碳偏低,但孔隙结构松散,持水性较差,存于大孔隙中的重力水和自由水偏多,冰点低,易受冻融作用影响^[10],而存在与小孔隙中的未冻水稀少^[22],致使微生物群落对冻融交替中冰晶冻胀响应更为敏感^[23]。因此,冻融处理下 SMBC 的降低尤为显著(图 3)。

在不同次数冻融循环扰动后,DOC、SMBC 及 BG 等碳循环相关酶活性均呈非线性变化规律(图 2、图 3 和图 4a),可能与冻融过程中土壤物理结构重组和微生物自适应等过程有关。具体而言,随着冻融循环次数增加,冰晶膨胀作用愈加剧烈,不仅可杀灭微生物^[17],还可破坏土壤团聚体,改变孔隙结构^[24]。这种因冻融导致的土壤理化生特性改变大约在 C5 后达到极值。此时,土壤孔隙结构基本趋于稳定,而土壤孔隙水中可被冰晶冻胀杀死的敏感微生物已基本死亡,存活的微生物丰度也接近最低值即 SMBC(图 3)。在此过程中,虽然微生物死亡或破损残体释放出的有机物质多为糖类或脂肪酸^[25],但存活微生物群落在极端温度条件下可能优先合成抗冻蛋白或非饱和磷脂脂肪酸,辅助其保持流动性,抵御低温冻结^[8],从而一定程度抑制微生物分解代谢过程,致使 BG 和 LAP 等水解酶活性也随着冻融循环次数增加而显著降低,至 C5 降至最低值(图 4)。此后,进一步的冻融循环作用下(C7 和 C9),存活微生物群落逐渐适应新的温度条件,且 DOC 等养分充裕(图 2),显著激发 BG、NAG 和 BXYL 等酶活性,提高土壤溶液可溶性有机物质利用效率,有效维持存活微生物 SMBC(图 3)。与 LI 等^[26]研究结果一致,增加冻融循环频率可促进融化后初期存活微生物的呼吸速率。

与碳循环相关要素响应规律不同, $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 及 NAG 等氮循环相关物质对冻融次数增加并没有表现出明显的非线性趋势,而是稳步上升或下降(图 2、图 4b)。可能是多个过程共同作用的结果。一方面,冻融循环初期(如 C1 和 C3)土壤 LAP 酶活性水平显著高于 NAG 酶活性水平(图 4b),可促进土壤中蛋白质分解,释放 $\text{NH}_4\text{-N}$ ^[27],而冻融对土壤颗粒机械性破坏也可释放土壤晶格和无机胶体中的 $\text{NH}_4\text{-N}$,促进氮的氨化^[4]。另一方面,随着冻融循环次数的增多,微生物死亡与残体释放有利于土壤可溶性养分积累,进而抑制土壤净氮矿化速率^[4],反过来又促使 $\text{NH}_4\text{-N}$ 转化为 $\text{NO}_3\text{-N}$ ^[28],最终导致多次冻融循环后 $\text{NH}_4\text{-N}$ 逐渐降低(图 2)。本研究所观察到随冻融循环次数增加, $\text{NH}_4\text{-N}$ 减小而 $\text{NO}_3\text{-N}$ 增加的趋势与郭冬楠等^[28]研究结果一致,且 $\text{NH}_4\text{-N}$ 与 N_2O 释放速率

的负相关趋势也与赵姗姗等^[13]高寒草甸土冻融模拟报道一致。一般认为,冻融环境下,反硝化细菌比硝化细菌有更好的耐受性,且冻融作用可破坏团聚体,降低土壤孔隙度和 O_2 可利用性,进而形成厌氧环境,促进反硝化过程,产生大量 N_2O ^[1]。本研究所观察到 N_2O 随着冻融循环次数增加而急剧增加的趋势(图 5),与李尚宏等^[14]报道相似。然而,本研究中多次冻融循环后(如 C9)反硝化过程产物 $\text{NH}_4\text{-N}$ 逐渐减少(图 2),而 N_2O 释放速率却呈现激增(图 5),说明多次冻融循环后 N_2O 的排放可能不仅与 N_2O 的产生速率有关,而且可能因为新的孔隙结构和传输通道条件下,原本积累于土壤孔隙中的 N_2O 得以有效释放^[1]。本文未量化冻融过程中另一个反硝化过程产物 N_2 气体的释放速率^[29]。同时,本研究中不同冻融循环次数下 SMBN 变化却不显著,与崔乔等^[4]等荟萃分析结果一致。可能是因为冻融循环初期,微生物群落总丰度虽然较低,但低温耐受性较好的真菌群落相比于细菌群落更易存活,且真菌碳氮较高^[23],可较好地维持 SMBN;随着冻融循环次数增加,小分子可溶性有机物质充裕的情况下,微生物群落总丰度有效扩充,逐渐转换为以善于利用小分子可溶性有机物质且碳氮比较低的细菌群落快速恢复并占据优势^[7]。因此,SMBN 总量随冻融循环次数增加变化不敏感。

4 结 论

1)与未经历模拟冻融处理的高寒草甸土相比,9 次冻融循环低温冻胀对微生物产生剧烈的机械性破坏,致使大量微生物死亡,显著降低 SMBC,但同时残破或死亡微生物残体又有效补给土壤 DOC。

2)随着冻融循环次数增加,冰晶膨胀作用先增强,但至 5~7 次冻融循环达到极值,致使 SMBC 降至最低;而后土壤孔隙结构和微生物群落趋于稳定,存活微生物逐渐适应新的温度条件,且 DOC 等养分充裕,SMBC 逐渐恢复,且显著激发 BG、NAG 和 BXYL 等酶活性,持续释放 CO_2 。

3)与碳循环相关要素响应规律不同,SMBN 随着冻融循环次数增加变化不显著,而 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 NAG 酶活性显著增加,而 $\text{NH}_4\text{-N}$ 则稳步下降, N_2O 释放速率在 5 次冻融循环后激增。

4)多次冻融循环对土壤微生物的影响并非单次冻融作用的简单重复。未来研究还需结合碳氮循环相关功能基因丰度变化来系统量化不同初始含水率、粒径组成和冻融温度梯度条件下,高寒草甸土的微生物存亡和活性恢复机制对碳氮循环的影响。

参考文献:

- [1] CONGREVES K A, WAGNER-RIDDLE C, SI B C, et al. Nitrous oxide emissions and biogeochemical responses to soil freezing-thawing and drying-wetting[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 117:5-15.
- [2] 王恩姮, 赵雨森, 夏祥友, 等. 冻融交替后不同尺度黑土结构变化特征[J]. *生态学报*, 2014, 34(21):6287-6296.
WANG E H, ZHAO Y S, XIA X Y, et al. Effects of freeze-thaw cycles on black soil structure at different size scales[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(21):6287-6296.
- [3] LIU B, FAN H M, JIANG Y Z, et al. Linking pore structure characteristics to soil strength and their relationships with detachment rate of disturbed Mollisol by concentrated flow under freeze-thaw effects [J]. *Journal of Hydrology*, 2023, 617:e129052.
- [4] 崔乔, 李宗省, 张百娟, 等. 冻融作用对土壤可溶性碳氮和微生物量碳氮含量影响的荟萃分析[J]. *生态环境学报*, 2022, 31(8):1700-1712.
CUI Q, LI Z X, ZHANG B J, et al. A meta-analysis of the effects of freezing and thawing on soil dissolved carbon and nitrogen and microbial biomass carbon and nitrogen contents [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2022, 31(8):1700-1712.
- [5] FENG X J, NIELSEN L L, SIMPSON M J. Responses of soil organic matter and microorganisms to freeze-thaw cycles [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(8):2027-2037.
- [6] ROSINGER C, BONKOWSKI M. Soil age and soil organic carbon content shape biochemical responses to multiple freeze-thaw events in soils along a postmining agricultural chronosequence [J]. *Biogeochemistry*, 2021, 155(1):113-125.
- [7] SONG Y, ZOU Y C, WANG G P, et al. Altered soil carbon and nitrogen cycles due to the freeze-thaw effect: A meta-analysis [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 109:35-49.
- [8] BORE E K, APOSTEL C, HALICKI S, et al. Microbial metabolism in soil at subzero temperatures: Adaptation mechanisms revealed by position-specific ^{13}C labeling [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:e946.
- [9] PRIEMÉ A, CHRISTENSEN S. Natural perturbations, drying-wetting and freezing-thawing cycles, and the emission of nitrous oxide, carbon dioxide and methane from farmed organic soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(15):2083-2091.
- [10] ZHANG L H, YANG C S, WANG D Y, et al. Freezing point depression of soil water depending on its non-uniform nature in pore water pressure [J]. *Geoderma*, 2022, 412:e115724.
- [11] MU C C, ZHANG T J, ZHANG X K, et al. Carbon loss and chemical changes from permafrost collapse in the northern Tibetan Plateau [J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2016, 121(7):1781-1791.
- [12] 聂婷, 余钟波, 江鹏, 等. 青藏高原季节冻土冻融过程对土壤呼吸的影响[J]. *水文*, 2025, 45(2):1-8.
NIE T, YU Z B, JIANG P, et al. Effects of freeze-thaw process on soil respiration in seasonally frozen soil on the Tibetan Plateau [J]. *Journal of China Hydrology*, 2025, 45(2):1-8.
- [13] 赵姗姗. 冻融与草地利用方式对高寒草甸土壤氮素的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024.
ZHAO S S. Effects of freeze-thaw and grassland utilization on nitrogen transformation in alpine meadow soil[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024.
- [14] 李尚宏, 周赓, 杜岩功. 冻融交替对高寒草甸 N_2O 排放速率的影响[J]. *草原与草坪*, 2018, 38(3):85-89.
LI S H, ZHOU G, DU Y G. Effect of alternative freezing and thawing on nitrous oxide rates in alpine meadow [J]. *Grassland and Turf*, 2018, 38(3):85-89.
- [15] 冯晓莉, 李红梅, 罗斯琼, 等. 1961—2020年三江源地区季节性冻土冻融特征分析[J]. *高原气象*, 2022, 41(2):295-305.
FENG X L, LI H M, LUO S Q, et al. Freeze-thaw characteristics of seasonally frozen ground in the three river source region from 1961 to 2020 [J]. *Plateau Meteorology*, 2022, 41(2):295-305.
- [16] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000.
LU R K. Methods of Soil Agrochemical Analysis [M]. China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [17] 孙嘉鸿, 郭彤, 董彦民, 等. 冻融循环对金川泥炭沼泽土壤微生物量及群落结构的影响[J]. *生态学报*, 2022, 42(7):2763-2773.
SUN J H, GUO T, DONG Y M, et al. Effect of freezing and thawing on soil microbial biomass and community structure in Jinchuan peatlands [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, 42(7):2763-2773.
- [18] GAO D C, LIU Z P, BAI E. Effects of *in situ* freeze-thaw cycles on winter soil respiration in mid-temperate plantation forests [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 793:e148567.
- [19] MALJANEN M, KOHONEN A R, VIRKAJA A R, et al. Fluxes and production of N_2O , CO_2 and CH_4 in boreal agricultural soil during winter as affected by snow cover [J]. *Tellus Series B: Chemical and Physical Meteorology*, 2007, 59(5):853-859.
- [20] LIU H M, HU Y X, HAO Y L, et al. Progressive freeze-thaw redistributes water, solute and CO_2 emissions across soil layers: The role of soil particle size [J]. *Catena*, 2022, 219:e106614.

- [21] LIU S N, WU J Q, LI G, et al. Seasonal freeze-thaw characteristics of soil carbon pools under different vegetation restoration types on the Longzhong Loess Plateau[J]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2022, 10: e1019627.
- [22] CHEN Y Q, ZHOU Z F, WANG J G, et al. Quantification and division of unfrozen water content during the freezing process and the influence of soil properties by low-field nuclear magnetic resonance [J]. *Journal of Hydrology*, 2021, 602: e126719.
- [23] JI X M, LIU M H, YANG J L, et al. Meta-analysis of the impact of freeze-thaw cycles on soil microbial diversity and C and N dynamics[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 168: e108608.
- [24] JOSEPH G, HENRY H A L. Soil nitrogen leaching losses in response to freeze-thaw cycles and pulsed warming in a temperate old field[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(7): 1947-1953.
- [25] MIURA M, JONES T G, HILL P W, et al. Freeze-thaw and dry-wet events reduce microbial extracellular enzyme activity, but not organic matter turnover in an agricultural grassland soil [J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 144: 196-199.
- [26] LI J T, XU H M, HICKS L C, et al. Comparing soil microbial responses to drying-rewetting and freezing-thawing events[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2023, 178: e108966.
- [27] 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.
- [28] 郭冬楠, 臧淑英, 赵光影, 等. 冻融作用对小兴安岭湿地土壤溶解性有机碳和氮素矿化的影响[J]. *水土保持学报*, 2015, 29(5): 260-265.
- GUO D N, ZANG S Y, ZHAO G Y, et al. Effect of freeze-thaw action on dissolved organic carbon and nitrogen mineralization of wetland soil in xiaoxing'an mountains [J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2015, 29(5): 260-265.
- [29] WU X, CHEN Z, KIESE R, et al. Dinitrogen (N_2) pulse emissions during freeze-thaw cycles from montane grassland soil [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2020, 56(7): 959-972.