DOI:10.11721/cqnuj20210405

冻融交替下高山土壤微生物和矿质氮库对外源氮输入的响应*

胡　霞[1,2]，尹　鹏[1]，彭言劼[1]，黄　娇[1]

(1. 乐山师范学院 生命科学学院，四川 乐山 614004；2. 中国科学院成都生物研究所
中国科学院山地生态恢复与生物资源利用重点实验室 生态恢复与生物多样性保育四川省重点实验室，成都 610041)

摘要:【目的】研究外源氮输入和冻融交替对高山土壤生态的影响。【方法】采集青藏高原东缘高山土壤，在室内模拟不同水平外源氮输入(CK:不添加外源氮，N1:添加 0.1 mg·g^{-1}外源氮，N2:添加 0.4 mg·g^{-1}外源氮)和不同变温幅度冻融(剧烈冻融:温度变化范围为－20～2 ℃，温和冻融:温度变化范围为－2～2 ℃，持续冻结:温度保持为－2 ℃)处理，分析它们对土壤微生物和矿质氮库的影响。【结果】外源氮输入水平对土壤真菌数量无明显的影响，但明显增加了细菌数量和提高了过氧化氢酶和纤维素酶的活性。N2 处理下过氧化氢酶和纤维素酶活性最高，分别为 20，4 mg·kg^{-1}·h^{-1}。不同变温幅度的冻融处理也对过氧化氢酶和纤维素酶的活性有明显的影响:剧烈冻融处理下两种酶活性分别高达 21，4.3 mg·kg^{-1}·h^{-1}，持续冻结处理下两种酶活性分别低至 16，3.1 mg·kg^{-1}·h^{-1}。随着冻融的加剧和外源氮输入水平的提高，土壤中微生物生物量碳无明显的变化，微生物生物量氮则明显增加。剧烈冻融和 N2 处理组合下土壤微生物生物量氮质量分数最高，达 516.69 mg·kg^{-1}。【结论】未来氮沉降和气候变化带来的冻融交替的改变均会对青藏高原东缘高山土壤微生物群落和活性以及矿质氮库产生影响，由此对当地植物生长和布局带来实质性改变。

关键词:外源氮输入；冻融交替；土壤矿质氮库；微生物数量和活性

中图分类号:Q945.78　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1672-6693(2021)04-0121-08

在季节性雪被形成和融化期间，冻融交替是高海拔地区土壤必然经历的过程[1]。例如在青藏高原中部那曲地区，表层土壤真正冻结的时间仅 30 d 左右，而冻融交替过程存在的时间则可以长达 180 d 左右，土壤冻融状态的变化相当频繁[2]。冻融事件发生频率、冻结速率、冻融变温幅度等诸多因素都会改变土壤结构、团聚体状况、水分分布等理化性质和土壤微生物状况，进而对土壤矿质氮库产生影响。魏丽红等人[3]认为，冻融使微生物组成和种类发生了较大变化，并间接影响了土壤酶的活性。土壤酶活性随着冻融的强度和频率上升而升高。Ivarson 等人[4]发现，冻融明显影响了高含量有机质土壤中的酶活性，这可能受冻融交替过程中土壤有效养分含量增加的影响。Björk 等人[5]发现，冻融决定了土壤微生物菌群的转化节奏，控制着微生物中可溶性碳氮的释放进程，从而对土壤中可利用碳氮含量产生影响。

作为世界“第三极”的青藏高原和喜马拉雅地区，是除极地区域外拥有世界上面积最大的终年积雪和季节性雪被的地区[6]，是对气候变化极为敏感的区域。已有研究表明，全球气候变化背景下高山地区积雪厚度增加，积雪周期会缩短，导致冻融强度和发生次数明显改变，这必然将会对土壤微生物和土壤可利用碳氮等产生实质性的影响[7]。当前，青藏高原地区在气候变化背景下冻融改变对土壤生态的研究报道极为少见。同样地，由于人类活动加剧，氮沉降等外源氮输入问题日趋严重，已明显改变了高山地区土壤养分水平和微生物活动，影响了土壤矿质循环和生态系统的生产力[8-10]。已有的氮沉降对土壤生态影响的研究结果差异较大。有研究者发现氮沉降增加了土壤铵态氮含量并抑制了土壤酶活性[11]。陈红等人[12]在长白山苔原地区的研究却发现:氮输入增加了土壤微生物活性，对土壤氮矿化有明显地促进作用，提高了土壤无机氮含量。此外，这些研究的时间多集中在生长季[12-14]，较少有研究涉及非生长季冻融过程中氮输入对土壤微生物和氮库的影响。

* **收稿日期**:2020-09-27　**修回日期**:2020-12-25　**网络出版时间**:2021-06-30　09:38

资助项目:国家自然科学基金(No. 31500346)；中国科学院山地生态恢复与生物资源利用重点实验室，生态恢复与生物多样性保育四川省重点实验室项目(No. KXYSWS2004)；乐山市科学技术局重点项目(No. 20ZDYJ0276)；四川省教育厅资助科研项目(No. 18ZA0245)；乐山师范学院科研项目(No. ZZ201821；No. LZDP008；No. XJR17006；No. DGZZ202019；No. DGZZ202010)

第一作者简介:胡霞，女，教授，博士，研究方向为土壤生态学；E-mail：huxia1007@sohu.com

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20210630.0852.006.html

基于上述研究背景,本研究选择青藏高原东部的高山土壤为研究对象,考察了模拟不同水平外源氮输入和不同变温幅度冻融处理对土壤微生物和矿质氮的影响,期望为预测未来氮沉降和气候变化在青藏高原东缘高山生态系统的影响提供一定的参考资料。

1 材料与方法

1.1 研究地概况

研究地位于四川省松潘县章腊乡卡卡山中国科学研究院成都生物研究所生态站,经纬度为北纬32°59′43″、东经103°40′37″,海拔3 520 m。研究地年平均气温为2.8 ℃,1月平均气温为−7.6 ℃,7月平均气温为9.7 ℃,无绝对无霜期,年平均太阳辐射时数为1 827.5 h,10 ℃以上的年平均积温为428.6 ℃,年平均降雨量达到718 mm,每年11月底或12月初出现持续的积雪覆盖。研究地氮沉降明显,达7.55～12.84 kg·hm^{-2}·a^{-1},且呈逐渐增加趋势[15];土壤为棕色草毡土(pH为5.4～5.8,土壤有机质质量分数为44.2～62.0 g·kg^{-1},总氮质量分数为3.5～5.1 g·kg^{-1}),平均土层厚度约为63 cm,植物根系主要分布于2～20 cm深的土层。研究地原始植被为岷江冷杉(*Abies faxoniana*)、窄叶鲜卑花(*Sibiraea angustata*)、鹧鸪杜鹃(*Rhododendron zheguense*)、黑褐穗苔草(*Carex atrofusca*)、斑唇马先蒿(*Pedicularis longiflora* var. *tubiformis*)等。

1.2 实验设计

在研究地随机选择3个5 m×10 m的样方,移去土壤表面的杂质和凋落物后,用直径和长度分别为7.5,23 cm的PVC管在样方内采用对角线法采集原位土,8管形成1个混合土样,上述操作重复3次。把混合土样放入大塑料盆中将土壤含水量调节为70%,在25 ℃恒温下稳定7 d后将混合土样分别装入27个17.2 cm×11.8 cm×6.2 cm的培养盒中(干土质量为250 g)。将27份土样平均分为3组,进行以下外源氮输入处理:1) CK:不添加外源氮;2) N1:添加0.1 mg·g^{-1}外源氮(每份土样中加入0.47 g硫酸铵);3) N2:添加0.4 mg·g^{-1}外源氮(每份土样中加入1.89 g硫酸铵)。然后再将上述3组土样每组随机平均划分为3个亚组,进行以下不同变温幅度的冻融处理:1) 剧烈冻融:温度变化范围为−20～2 ℃;2) 温和冻融:温度变化范围为−2～2 ℃;3) 持续冻结:温度保持为−2 ℃),按照Sulkava等人[16]的方法用超低温冰箱和培养箱进行土壤培养。

1.3 指标测定

培养结束后,测定土壤中铵态氮、硝态氮、微生物生物量碳(MBC)和微生物生物量氮(MBN)的质量分数,细菌和真菌的数量,以及蔗糖酶、过氧化氢酶和纤维素酶的活性。根据文献[17],用靛酚蓝比色法测定铵态氮质量分数;用紫外比色法测定硝态氮质量分数;用氯仿熏蒸-浸提法(用0.5 mol·L^{-1}硫酸钾溶液浸提)测定MBC和MBN;用稀释平板计数法统计细菌和真菌的数量;用3,5-二硝基水杨酸比色法测定蔗糖酶和纤维素酶活性;用高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶活性。

1.4 数据处理和分析

实验数据均以“平均值±标准误”表示。分别以外源氮输入水平和冻融变温幅度作为影响因素,对各指标数据进行双因素方差分析,并采用LSD法进行多重比较,当$p<0.05$时,统计结果具有统计学意义。所有数据的统计分析均使用SPSS 16.0软件完成。

2 结果和分析

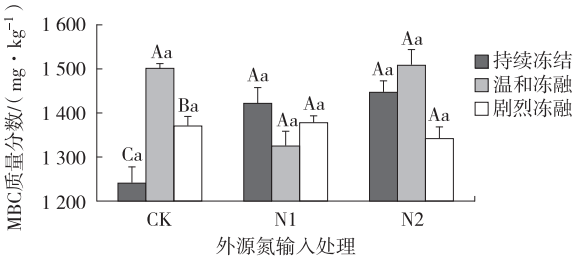
2.1 对土壤MBC和MBN的影响

冻融变温幅度和外源氮输入水平对土壤MBC质量分数的影响未表现出较有规律的变化趋势(图1),双因素方差分析结果显示两个影响因素及它们的交互作用对土壤MBC质量分数的影响均无统计学意义。但在CK处理下,温和冻融及剧烈冻融处理后的土壤MBC质量分数明显大于持续冻结处理后的土壤MBC质量分数,且差异具有统计学意义($p<0.05$)。

随着冻融变温幅度的增大和外源氮输入水平的提高,土壤MBN质量分数均呈现增加的趋势(图2)。在剧烈冻融和N2处理组合下土壤MBN质量分数最高,达516.69 mg·kg^{-1};在持续冻结和CK处理组合下该指标最低,为101.29 mg·kg^{-1}。双因素方差分析结果表明:外源氮输入水平对土壤MBN质量分数有统计学意义上的影响($p<0.01$),冻融变温幅度以及两个影响因素的交互作用对土壤MBN质量分数的影响不具有统计学

意义。

从图 3 可以看出，随着外源氮输入水平的提高，不同变温幅度冻融处理下土壤 MBC 与 MBN 的质量分数比值（MBC：MBN）均逐渐降低，双因素方差分析结果显示外源氮输入水平对土壤 MBC：MBN 有统计学意义上的影响（$p<0.05$）。随着冻融变温幅度的增加，同一外源氮输入水平下的土壤 MBC：MBN 整体上呈降低的趋势，然而双因素方差分析结果则显示冻融变温幅度以及两个影响因素的交互作用对土壤 MBC：MBN 的影响不具有统计学意义。此外，在温和冻融和 CK 两种处理共同作用下，土壤 MBC：MBN 最大，达 15.24；在剧烈冻融和 N2 处理组合下，土壤 MBC：MBN 最小，仅为 2.63。



注：CK 为不添加外源氮处理，N1 和 N2 分别为添加 0.1 和 0.4 mg·g^{-1}外源氮处理；剧烈冻融处理的温度变化范围为－20～2 ℃，温和冻融处理的温度变化范围为－2～2 ℃，持续冻结的温度保持为－2 ℃；不同大写字母代表同一水平外源氮添加处理下不同变温幅度的冻融处理的数据间差异具有统计学意义（$p<0.05$）；不同小写字母代表同一变温幅度冻融处理下不同水平外源氮添加处理的数据间差异具有统计学意义（$p<0.05$）；下同

图 1　冻融和外源氮输入对土壤 MBC 质量分数的影响

Fig. 1　Effects of freeze-thaw and external nitrogen input on soil MBC mass fraction

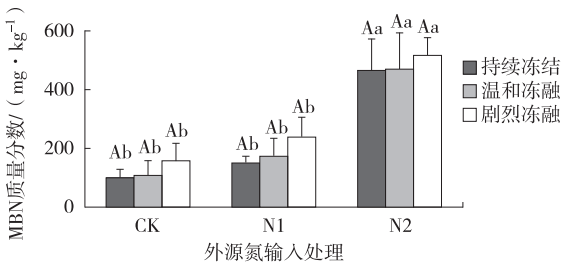


图 2　冻融和外源氮输入对土壤 MBN 质量分数的影响

Fig. 2　Effects of freeze-thaw and external nitrogen input on soil MBN mass fraction

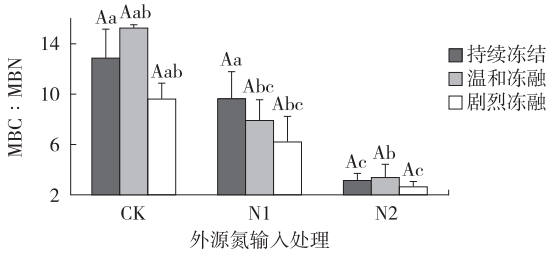


图 3　冻融和外源氮输入对土壤 MBC：MBN 的影响

Fig. 3　Effects of freeze-thaw and external nitrogen input on soil MBC：MBN

2.2 对土壤酶活性的影响

表 1 显示：随着外源氮输入水平的提高，土壤中过氧化氢酶和纤维素酶的活性总体上呈现上升趋势，在 N2 处理下两者的活性最高，分别为 20，4 mg·kg^{-1}·h^{-1}；过氧化氢酶和纤维素酶活性在 N2 处理下均大于在 CK 处理下，且差异均具有统计学意义（$p<0.05$）。冻融变温幅度对过氧化氢酶和纤维素酶活性有明显的影响：剧烈冻融处理下两种酶的活性最高，分别为 21，4.3 mg·kg^{-1}·h^{-1}；持续冻结处理下两者的活性最低，分别为 16，3.1 mg·kg^{-1}·h^{-1}。双因素方差分析结果显示，冻融变温幅度、外源氮输入水平以及两者的交互作用对过氧化氢酶和纤维素酶活性影响在 $p<0.01$ 水平上有统计学意义，特别是在持续冻结和 CK 处理组合下，过氧化氢酶和纤维素酶的活性要远低于在其他处理组合下，且差异具有统计学意义（$p<0.05$）。

表 1　冻融和外源氮输入对土壤酶活性的影响

Tab. 1　Effects of freeze-thaw and external nitrogen input on soil enzyme activities　　mg·kg^{-1}·h^{-1}

土壤酶	CK			N1			N2		
	持续冻结	温和冻融	剧烈冻融	持续冻结	温和冻融	剧烈冻融	持续冻结	温和冻融	剧烈冻融
过氧化氢酶	16 ± 1^{BCb}	19 ± 3^{ABb}	21 ± 1^{Aa}	20 ± 4^{Aa}	19 ± 1^{Bb}	21 ± 3^{Aa}	19 ± 2^{Ba}	21 ± 4^{Aa}	21 ± 5^{Aa}
纤维素酶	1.8 ± 0.2^{Bb}	3.8 ± 0.8^{Aa}	4.4 ± 0.3^{Aa}	3.8 ± 0.7^{Aa}	3.6 ± 0.4^{Aa}	3.8 ± 0.2^{Ab}	3.8 ± 0.4^{ABa}	3.6 ± 0.3^{BCa}	4.7 ± 0.2^{Aa}
蔗糖酶	36 ± 5^{Bb}	39 ± 10^{Aa}	8.9 ± 0.6^{Cb}	23 ± 4^{Ba}	27 ± 2^{Ab}	15 ± 2^{Ca}	21 ± 1^{Ba}	29 ± 1^{Ab}	14 ± 1^{Ca}

冻融变温幅度对土壤中蔗糖酶活性的影响与对过氧化氢酶、纤维素酶活性的影响有所差异。从表 1 可知：剧烈冻融处理下蔗糖酶活性最低，与温和冻融和持续冻结处理下的蔗糖酶活性的差异具有统计学意义（$p<$

0.05)。随着外源氮输入水平的提高,蔗糖酶活性也逐渐降低。双因素方差分析结果显示,冻融变温幅度、外源氮输入水平以及两者的交互作用对蔗糖酶活性影响在 $p<0.05$ 水平上有统计学意义,特别是在剧烈冻融和CK处理组合下,蔗糖酶活性低于在温和冻融和CK处理组合下,且差异具有统计学意义($p<0.05$)。

2.3 对土壤微生物数量的影响

本研究中,土壤细菌和真菌的数量对冻融变温幅度和外源氮输入水平的响应变化均未表现出明显规律性(图4和图5)。CK处理下细菌数量最少,1 g土壤中平均有 5.03×10^6 个菌落,与添加外源氮的处理下的细菌数量相比差异有统计学意义($p<0.05$)。同时,在无外源氮输入时,3种不同冻融变温幅度处理下的细菌数量无统计学意义上的差异。然而在N1处理下,温和冻融和剧烈冻融这两种处理比持续冻结处理更能提升细菌数量,且两两间比较差异均有统计学意义($p<0.05$)。在剧烈冻融和N1处理组合下,细菌数量最多,1 g土壤中平均有 5.05×10^7 个菌落。双因素方差分析结果显示:外源氮输入水平对细菌数量的影响在 $p<0.01$ 水平上有统计学意义,冻融变温幅度则对细菌数量的影响无统计学意义,但这两个因素的交互作用对细菌数量的影响仍有统计学意义($p<0.01$)。此外,在温和冻融处理下,真菌数量随着外源氮输入水平的的提高而增加,差异具有统计学意义($p<0.05$)。所有处理组合中,温和冻融和CK处理组合下真菌数量最少,1 g土壤中平均仅有 7.03×10^3 个菌落。双因素方差分析结果显示,冻融变温幅度、外源氮输入水平以及两者的交互作用对真菌数量的影响均无统计学意义。

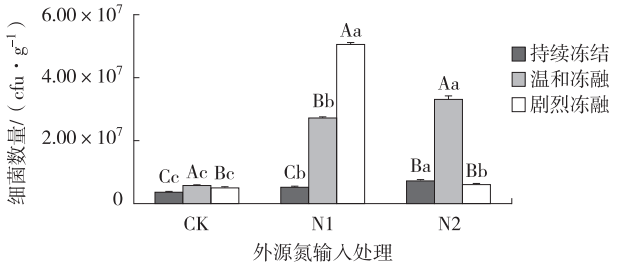


图4 冻融和外源氮输入对土壤细菌数量的影响

Fig. 4 Effects of freeze-thaw and external nitrogen input on the number of soil

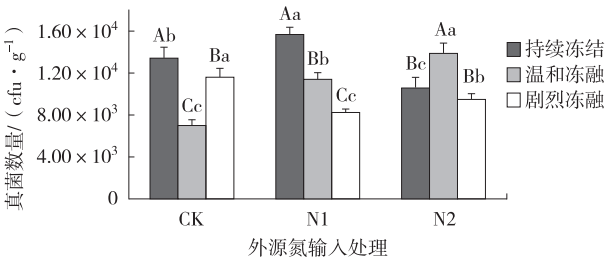


图5 冻融和外源氮输入对土壤真菌数量的影响

Fig. 5 Effects of freeze-thaw and external nitrogen input on bacteria the number of soil fungi

2.4 对土壤矿质氮库的影响

图6显示:在同一冻融变温幅度下,随着外源氮输入水平的提高,土壤铵态氮质量分数逐渐上升,且在N2处理下达到最高(3个冻融变温幅度与N2处理组合下的铵态氮质量分数平均值为 160.95 mg·kg^{-1}),与CK和N1处理下铵态氮质量分数相比差异具有统计学意义($p<0.05$)。此外,在CK或N1处理下,和持续冻结处理相比,剧烈冻融处理明显提高了铵态氮质量分数,且差异具有统计学意义($p<0.05$)。双因素方差分析结果显示,外源氮输入水平和冻融变温幅度对铵态氮质量分数的影响均有统计学意义($p<0.01$),但两者的交互作用则对该指标没有统计学意义上的影响。

外源氮输入水平对不同冻融变温幅度处理下土壤硝态氮质量分数的影响没有明显的规律性(图7)。双因素方差分析结果显示,外源氮输入水平、冻融变温幅度和两者的交互作用对硝态氮质量分数的影响均无统计学意义。

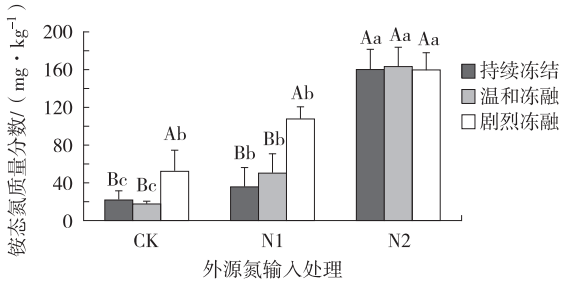


图6 冻融和外源氮输入对土壤铵态氮质量分数的影响

Fig. 6 Effects of freeze-thaw and external nitrogen input on soil ammonia-nitrogen mass fraction

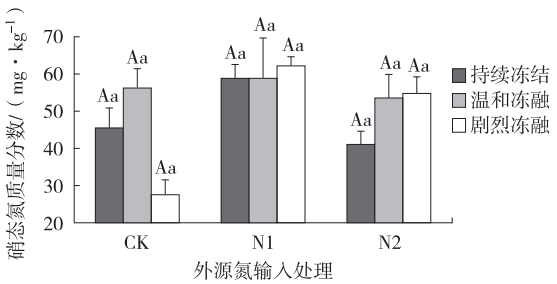


图7 冻融和外源氮输入对土壤硝态氮质量分数的影响

Fig. 7 Effects of freeze-thaw and external nitrogen input on soil nitrate mass fraction

3 讨论和结论

在高山地区，氮元素是植被生长和土壤养分循环的主要限制因子[10]。外源氮的输入缓解或消除了氮元素对生态系统的限制，对植被、土壤和土壤微生物产生了不同程度的影响[18-19]。已有的关于氮输入对微生物的生物量影响的研究结果并不一致[20-22]。本研究中，外源氮输入水平变化对土壤 MBC 质量分数无统计学意义上的影响，但可让土壤 MBN 质量分数有统计学意义上的提升（$p<0.05$），这与刘金山等人[23]的研究结果相同。土壤 MBC∶MBN 可以反映土壤中氮元素的供应能力，MBC∶MBN 较小时土壤氮元素有较高的生物有效性，氮元素利用率更高[24]。与之前的研究一致[25]，本研究中外源氮输入水平的提高使土壤 MBC∶MBN 出现了统计学意义上的下降（$p<0.05$），说明在氮供应水平充足的时候土壤微生物的丰度及活性明显较高[10]。本研究中关于土壤微生物数量和土壤酶活性的研究结果也正好证明了这一现象：外源氮输入水平的提高使土壤细菌数量明显上升，土壤过氧化氢酶和纤维素酶活性也有明显提高。这些指标的提升可以进一步改变矿化底物的组成、数量以及微生物的种类、活性，对土壤矿质氮库具有明显的促进作用[26-29]。因此，外源氮的输入减弱甚至消除了高山土壤的营养限制，提高了分解过程中氮的释放速度，从而促进了土壤的氮矿化作用[29-31]。然而，也有研究表明，外源氮输入导致了土壤微生物生物量和微生物活性的下降[32-33]。出现上述差异的原因可能是因为研究地土壤类型和土壤本底值存在差别：在土壤碳缺乏的地区，氮输入增加反而加剧了碳限制，导致土壤微生物数量和活性的降低；而在土壤碳丰富的地区，氮限制是养分循环和植物生长的关键因子，此时外源氮输入就成了微生物生长的驱动因子。

冻融事件发生频率、冻结速率冻融变温幅度等诸多因素都会对土壤微生物的状况发生强烈影响。一般认为，快速冻结和消融对微生物细胞活性的影响较小。但是冻结和消融速率的影响还必须结合土壤冻结的最终温度来加以考察：如果冻结后的最终温度依然高于细胞可耐受的临界温度，则融化时的升温速率不会明显影响细胞存活；如果最终温度低于细胞临界值，融化时的升温速率将成为决定细胞存活程度的主要因素[34]。土壤微生物数量对变温幅度较小的温和冻融（－3～4 ℃）不甚敏感，温度维持在 0 ℃左右对微生物数量的影响也很小，但是冻融变温幅度稍大时则可明显降低微生物数量[35]。有研究证明，从冻土中分离出来的天然菌株经受 48 次快速的冻融交替后，活菌数量是模拟环境温度恒温培养下的几万分之一，且物种多样性明显降低[36]。在本研究中，无外源氮输入时，不同变温幅度冻融处理下细菌的数量无统计学意义上的差异；然而当外源氮输入水平提高后，不论是温和冻融还是剧烈冻融处理都使细菌数量比在持续冻结下有统计学意义上的增加。这说明在青藏高原东部高山地区，温度的变化已经不是微生物生长和繁殖的第一限制因子，而土壤营养因子特别是氮元素的亏缺已经严重影响了菌群的数量和群落结构。当提高外源氮输入水平后，上述限制便有所减弱或者消失，这时温度就成为了影响细菌生长的主要因素。土壤在经历冻融交替时，冻结过程中被固定的有效底物及破碎的土壤团粒、凋落物和植物根系等所释放的大量养分又为细菌快速繁殖提供有利条件，所以导致细菌数量明显增加，这与前人的研究结果也是一致的[37-38]。

过去关于冻融交替对土壤酶活性的影响有着不同的研究结论。一部分研究认为变温幅度比较大的冻融过程会明显减低土壤酶的活性[39-40]，一部分研究则发现冻融过程使土壤中过氧化氢酶活性明显升高[38]，也有少部分研究发现土壤酶活性对冻融交替的响应不明显[41]。本研究发现剧烈冻融处理明显提高了土壤中过氧化氢酶和纤维素酶的活性，这可能是因为随着土壤冻结温度的降低，使大团聚体更容易被破坏，从而向中级团聚体转化，因此大量的养分物质被释放到土壤中，使得植物细根死亡和微生物体内的养分得以释放，提升了土壤铵态氮含质量分数，并促进了土壤微生物的活动[42]。

总之，本研究结果显示：青藏高原东缘高山地区外源氮输入增加了土壤微生物数量和提升了土壤酶活性，降低了 MBC∶MBN，使土壤矿质氮库明显增加，说明外源氮输入减弱或消除了高山土壤的氮限制作用，提高了土壤微生物的丰度和活性。总体上看，较大变温幅度的冻融交替明显增加了土壤铵态氮质量分数，提高了土壤中过氧化氢酶和纤维素酶活性，说明冻融交替可以通过影响微生物活性从而对土壤矿化过程产生影响，为植物生长提供更多的氮源。因此，未来氮沉降和气候变化带来的冻融交替的改变均会影响青藏高原东缘高山土壤微生物群落和活性以及矿质氮库，这可能对当地植物生长和布局带来实质性改变。

参考文献:

[1] 罗亚晨.冻融循环对寒温带针叶林土壤碳氮矿化的影响及氮素添加的调控效应[D].重庆:西南大学,2015.
LUO Y C. Effect of freeze-thaw cycles and simulated nitrogen deposition on soil carbon and nitrogen mineralization in a *Larix gmelinii* forest[D]. Chonqing:Southwest University,2015.

[2] 杨梅学,姚檀栋,Hirose Nozomu,等.青藏高原表层土壤的日冻融循环[J].科学通报,2006,51(16):1974-1976.
YANG M X, YAO T D, HIROSE N, et al. Diurnal freeze-thaw cycles of topsoil in the Tibetan plateau[J]. Chinese Science Bulletin,2006,51(16):1974-1976.

[3] 魏丽红.冻融交替对黑土土壤有机质及氮钾养分的影响[D].长春:吉林农业大学,2004.
WEI L H. The effect of alternative freezing and thawing on soil organic matter and nitrogen potassium nutrition of black soil [D]. Changchun:Jilin Agriculture University,2004.

[4] IVARSON K C,SOWDEN F J. Effects of soil action and storage of soil at freezing temperatures on the free amino acids,free sugar and respiratory activity of soil[J]. Canadian Journal of Soil Science,1970,50(2):191-198.

[5] BJÖRK R G, MOLAU U. Ecology of alpine snowbeds and the impact of global change[J]. Arctic, Antarctic and Alpine Research,2007,39(1):34-43.

[6] GURUNG D R, GIRIRAJ A, AUNG K S, et al. Snow-cover mapping and monitoring in the Hindu Kush-Himalayas[R]. Kathmandu:International Centre for Integrated Mountain Development,2011.

[7] CHAPIN F S,STURM M,SERREZE M C,et al. Role of landsurface changes in arctic summer warming[J]. Science,2005,310 (5748):657-660.

[8] LIU X J,ZHANG Y,HAN W X,et al. Enhanced nitrogen deposition over China[J]. Nature,2013,494(7438):459-462.

[9] LEVY-BOOTH D J,PRESCOTT C E,GRAYSTON S J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation,nitrification and denitrification in forest ecosystems[J]. Soil Biology & Biochemistry,2014,75:11-25.

[10] 王丽娜,罗久富,杨梅香,等.氮添加对退化高寒草地土壤微生物量碳氮的影响[J].草业学报,2019,28(7):38-48.
WANG L N,LUO J F,YANG M X,et al. Effects of nitrogen addition on the soil microbial biomass C and microbial biomass N in degraded alpine grassland in Zoigecounty[J]. Acta Prataculturae Sinica,2019,28(7):38-48.

[11] 张炜,莫江明,方运霆,等.氮沉降对森林土壤主要温室气体通量的影响[J].生态学报,2008,28(5):2309-2319.
ZHANG W,MO J M,FANG Y T,et al. Effects of nitrogen deposition on the greenhouse gas fluxes from forest soils[J]. Acta Ecologica Sinica,2008,28(5):2309-2319.

[12] 陈红,唐杨,童跃伟,等.长白山苔原带土壤碳、氮矿化对氮沉降的响应[J].应用生态学报,2019,30(5):117-123.
CHEN H,TANG Y,TONG Y W,et al. Responses of soil carbon and nitrogen mineralization to nitrogen deposition in tundra zone of the Changbai mountain,China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2019,30(5):117-123.

[13] 胡敏杰,仝川,邹芳芳.氮输入对土壤甲烷产生、氧化和传输过程的影响及其机制[J].草业学报,2015,24(6):204-212.
HU M J,TONG C,ZOU F F. Effects of nitrogen input on CH_4 production,oxidation and transport in soils,and mechanisms:a review[J]. Acta Prataculturae Sinica,2015,24(6):204-212.

[14] LIU L L,GREAVER T L. A review of nitrogen enrichment effects on three biogenic GHGs:the CO_2 sink may be largely offset by stimulated N_2O and CH_4 emission[J]. Ecology Letters,2010,12(10):1103-1117.

[15] ZHU J X,HE N P,WANG Q F,et al. The composition,spatial patterns,and influencing factors of atmospheric wet nitrogen deposition in Chinese terrestrial ecosystems[J]. Science of the Total Environment,2015,511:777-785.

[16] SULKAVA P,HUHTA V. Effects of hard frost and freeze-thaw cycles on decomposer communities and N mineralisation in boreal forest soil[J]. Applied Soil Ecology,2003,22(3):225-239.

[17] 鲁如坤.土壤农业化学分析手册[M].北京:中国农业科技出版社,2000.
LU R K. Soil agricultural chemical analysis method[M]. Beijing:China Agricultural Science and Technology Press,2000.

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

[19] LI K H,LIU X J,SONG L,et al. Response of alpine grassland to elevated nitrogen deposition and water supply in China[J]. Oecelogia,2015,177(1):65-72.

[20] 宗宁,石培礼,蒋婧,等.短期氮素添加和模拟放牧对青藏高原高寒草甸生态系统呼吸的影响[J].生态学报,2013,33(19): 6191-6201.
ZONG N,SHI P L,JIANG J,et al. Interactive effects of short-term nitrogen enrichment and simulated grazing on ecosystem

respiration in an alpine meadow on the Tibetan plateau[J]. Acta Ecologica Sinica，2013，33(19)：6191-6201.

[21] DIJKSTRA F A，HOBBIE S E，REICH P B，et al. Divergent effects of elevated CO_2，N fertilization，and plant diversity on soil C and N dynamics in a grassland field experiment[J]. Plant & Soil，2005，272(1)：41-52.

[22] LIU W X，XU W H，HAN Y，et al. Responses of microbial biomass and respiration of soil to topography，burning，and nitrogen fertilization in a temperate steppe[J]. Biology & Fertility of Soils，2007，44(2)：259-268.

[23] 刘金山，戴健，刘洋，等. 过量施氮对旱地土壤碳，氮及供氮能力的影响[J]. 植物营养与肥料学报，2015，21(1)：112-120.
LIU J S，DAI J，LIU Y，et al. Effects of excessive nitrogen fertilization on soil organic carbon andnitrogen and nitrogen supply capacity in dryland[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer，2015，21(1)：12-120.

[24] 吴金水，林启美，黄巧云，等. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京：气象出版社，2006.
WU J S，LIN Q M，HUANG Q Y，et al. Soil microbial biomass determination method and its application[M]. Beijing：Meteorological Press，2006.

[25] 蔡晓布，周进，钱成. 不同退化程度高寒草原土壤微生物活性变化特征研究[J]. 生态学报，2008，45(6)：1110-1118.
CAI X B，ZHOU J，QIAN C. Viriation of soil microbial activities in alpine steppes different in degradation intensity in the north Tibetplateau[J]. Acta Pedologica Sinica，2008，45(6)：1110-1118.

[26] 杨浩，胡中民，郭群，等. 增雨和氮添加对内蒙古草原土壤氮矿化潜力的影响[J]. 自然资源学报，2017，32(12)：2034-2042.
YANG H，HU Z M，GUO Q，et al. Influences of precipitation increase and N addition on soil potential N mineralization in Inner Mongolia grassland[J]. Journal of Natural Resources，2017，32(12)：2034-2042.

[27] 赵欣然，赵琼，王巍巍，等. 氮添加及凋落物管理对樟子松人工林土壤理化性质的影响[J]. 生态学杂志，2016，35(10)：2699-2706.
ZHAO X R，ZHAO Q，WANG W W，et al. Effect of nitrogen addition and litter manipulation on soil physicochemical properties of a *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation[J]. Chinese Journal of Ecology，2016，35(10)：2699-2706.

[28] 靳英华，许嘉巍，宗盛伟，等. 氮沉降对长白山苔原植被影响的试验研究[J]. 地理科学，2014，34(12)：1526-1532.
JIN Y H，XU J W，ZONG S W，et al. Experimental study on the effects of nitrogen deposition on the tundra vegetation of the Changbai mountains[J]. Scientia Geographica Sinica，2014，34(12)：1526-1532.

[29] 徐婷婷，郑俊强，韩士杰，等. 长白山阔叶红松林土壤氮转化过程对长期施氮和降水变化的响应[J]. 应用生态学报，2018，29(9)：2797-2807.
XU T T，ZHENG J Q，HAN S J，et al. Responses of soil nitrogen transformation to long-term nitrogen fertilization and precipitation changes in a broad-leaved Korean pine forest in Changbai mountains，China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology，2018，29(9)：2797-2807.

[30] 林贵刚，赵琼，赵蕾，等. 林下植被去除与氮添加对樟子松人工林土壤化学和生物学性质的影响[J]. 应用生态学报，2012(5)：1188-1194.
LIN G G，ZHAO Q，ZHAO L，et al. Effects of understory removal and nitrogen addition on the soil chemical and biological properties of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation in Keerqin sandy land[J]. Chinese Journal of Applied Ecology，2012，23(5)：1188-1194.

[31] 王斌，陈亚明，周志宇. 贺兰山西坡不同海拔梯度上土壤氮素矿化作用的研究[J]. 中国沙漠，2007，27(3)：483-490.
WANG B，CHEN Y M，ZHOU Z Y. Study of soil nitrogen mineralization at different altitudes on western slopes of Helan mountains，China[J]. Journal of Desert Research，2007，27(3)：483-490.

[32] DEMOLING F，NILSSON L O，BÅÅTH E. Bacterial and fungal response to nitrogen fertilization in three coniferous forest soils[J]. Soil Biology & Biochemistry，2008，40(2)：370-379.

[33] TRESEDER K K. Nitrogen additions and microbial biomass：a meta-analysis of ecosystem studies[J]. Ecology Letters，2008，11(10)：1111-1120.

[34] DUMONT F，MARECHAL P A，GERVAIS P. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to −196 ℃[J]. Applied and Environmental Microbiology，2006，72(2)：1330-1335.

[35] SOINA V S，MULYUKIN A L，DEMKINA E V，et al. The structure of resting bacterial population in soil and subsoil permafrost[J]. Astrobiology，2004，4(3)：345-358.

[36] LARSEN K S，JONASSON S，MICHELSEN A. Repeated freeze-thaw cycles and their effects on biological processes in two arctic ecosystem types[J]. Applied Soil Ecology，2002，21(3)：187-195.

[37] 陈泓硕，马大龙，姜雪薇，等. 季节性冻融对扎龙湿地土壤微生物群落结构和胞外酶活性的影响[J]. 环境科学学报，2020，40

(4):1443-1451.
CHEN H S, MA D L, JIANG X W, et al. Effects of seasonal freeze-thaw on soil microbial community structures and extracellular enzyme activities in Zhalong wetland[J]. Acta Scientiae Circumstantiae,2020,40(4):1443-1451.
[38] 吕欣欣,孙海岩,汪景宽,等.冻融交替对土壤氮素转化及相关微生物学特性的影响[J].土壤通报,2016,47(5):1265-1272.
LÜ X X, SUN H Y, WANG J K, et al. Effects of freeze-thaw events on nitrogen transformation and microbiological characteristics in soils[J]. Chinese Journal of Soil Science,2016,47(5):1265-1272.
[39] 李琳慧,李旭,许梦,等.冻融温度对东北黑土理化性质及土壤酶活性的影响[J].江苏农业科学,2015,43(4):318-320.
LI L H,LI X,XU M,et al. Effects of freeze-thaw temperature on physicochemical properties and soil enzyme activities of black soil in northeast China[J]. Jiangsu Agriculture Science,2015,43(4):318-320.
[40] SORENSEN P O,FINZI A C,GIASSON M A. Winter soil freeze-thaw cycles lead to reductions in soil microbial biomass and activity not compensated for by soil warming[J]. Soil Biology and Biochemistry,2018,116:39-47.
[41] 高珊,辛贵民,赵清竹,等.循环冻融过程对6种温带森林土壤酶活性的影响[J].土壤通报,2020,51(3):668-676.
GAO S,XIN G M,ZHAO Q Z,et al. Effects of cyclic freeze-thaw process on enzyme activities in six temperate forest soils[J]. Chinese Journal of Soil Science,2020,51(3):668-676.
[42] WITHINGTON C L, SANFORD R L. Decomposition rates of buried substrates increase with altitude in the forest-alpine tundra ecotone[J]. Soil Biology and Biochemistry,2007,39(1):68-75.

Response of Mineral Nitrogen Pool and Microorganism to External Nitrogen Input in Alpine Soil under Freeze-Thaw Alternation

HU Xia[1,2], YIN Peng[1], PENG Yanjie[1], HUANG Jiao[1]
(1. College of Life Science, Leshan Normal University, Leshan Sichuan, 614004;
2. Ecological Restoration and Biodiversity Conservation Key Laboratory of Sichuan Province, CAS Key Laboratory of Mountain Ecological Restoration and Bioresource Utilization, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: [**Purposes**]The effects of external nitrogen input and freeze-thaw alternation on alpine soil ecology were studied. [**Methods**] Alpine soil samples were collected from the eastern edge of Qinghai Tibet plateau. And then the effects of simulated external nitrogen input (CK: no exogenous nitrogen was added, N1: added 0.1 mg·g^{-1} external nitrogen, N2: added 0.4 mg·g^{-1} external nitrogen) and freeze-thaw alternation (severe freeze-thaw: temperature range −20～2 ℃, mild freeze-thaw: temperature range −2～2 ℃, continuous freezing: keep the temperature at −2 ℃) on soil microbes and mineral nitrogen pools were investigated. [**Findings**]The applying of exogenous nitrogen input did not affect the quantity of soil fungi significantly, but significantly increased the population of bacteria, as well as catalase and cellulase activities. The two enzymes were most active (20 and 4 mg·kg^{-1}·h^{-1}, respectively) under N2 treatment. Freeze-thaw alternation also had significant influence on catalase and cellulase activities. And they were most active (21 and 4.3 mg·kg^{-1}·h^{-1}, respectively) under severe freeze-thaw treatment. while under continuous freezing treatment, the lowest activities (16 and 3.1 mg·kg^{-1}·h^{-1}, respectively) of these two enzymes were observed. As the degree of freeze-thawaggravated and amount of exogenous nitrogenincreased, MBC did not change significantly, while MBN greatly increased. The content of MBN was 516.69 mg·kg^{-1} under severe freeze-thaw and N2 treatment, which was the highest among all treatment. [**Conclusions**] The changes of soil microbial community and activity, as well as mineral nitrogen pool will be influenced by nitrogen deposition and freeze-thaw cycle, which will cause substantial changes to plant growth and distribution.

Keywords: external nitrogen input; freeze-thaw alternation; soil mineral nitrogen pool; microbial quantity and activity

(责任编辑 方 兴)