干燥对人工生物土壤结皮固氮酶活性恢复过程的影响

郑娇莉^{1,2}, 李双双^{1,2}, 彭成荣¹, 李敦海^{1*}

1. 中国科学院水生生物研究所, 中国科学院藻类生物学重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: lidh@ihb.ac.cn

收稿日期: 2017-04-19; 接受日期: 2017-05-16; 网络版发表日期: 2017-07-16

林业公益性行业科研专项(批准号: 201404204-02)资助

摘要 本文研究了不同演替阶段的人工生物土壤结皮其光合和固氮酶活性恢复过程对干燥时长的响应。生物土壤结皮通过人工接种丝状土壤蓝藻诱导形成, 并根据藻类和苔藓丰度的不同划分为蓝藻结皮、藻-藓结皮、藓-藻结皮和苔藓结皮等4个演替阶段。经不同时长干燥处理的结皮, 复水后测定其光合活性(F_v/F_m)和固氮酶活性(NA)的恢复过程。结果表明, 苔藓结皮 F_v/F_m 的恢复速率与干燥时长呈负相关, 但其他演替阶段结皮的 F_v/F_m 恢复速率几乎不受干燥时长的影响。早期演替阶段的结皮(藻结皮、藻-藓结皮和藓-藻结皮)显示出相同的NA活性恢复模式和不同的NA速率, 而苔藓结皮NA活性的恢复较慢。光照条件下, 干燥时长不超过8天时, 则干燥时间越长, 早期演替阶段结皮的NA活性越低, 但在此较短的干燥时长范围内, 苔藓结皮NA活性的恢复并不受干燥时长的影响; 黑暗条件下, 不同演替阶段结皮干燥两天后固氮酶活性均较低。相反, 较长时间的干燥后(4~6个月), 所有结皮均恢复了较高的NA活性。结果表明, 不同演替阶段的人工生物土壤结皮其生理活性对干燥有不同的耐受性。

关键词 生物土壤结皮, 干燥, 生物固氮, 固氮酶活性, 光合活性, 演替阶段

生物土壤结皮(biological soil crusts, BSCs, 以下简称“结皮”)是由土壤生物(藓类、苔类、真核藻类、地衣、真菌、细菌和蓝藻)和表层土壤颗粒胶结形成的层状结构, 在干旱和半干旱地区广泛分布, 在这些地区其生物覆盖度可达70%以上^[1]。BSCs具有重要的生态功能, 能够增加碳氮输入, 增强土壤的稳定性, 减少侵蚀, 促进周围植被的营养积累等^[2-4]。干燥是影响BSCs最重要的因子, 因为BSCs生物仅在湿润时表现出活性。由于降水的稀少和不确定性, 荒漠环境干燥状况

普遍存在而没有规律^[5,6]。除了降雨, 露水的凝结也会为BSCs带来一天之内的干湿循环^[7]。为了在干湿循环的环境条件下存活, BSCs一方面发展出一系列机制来应对干燥损伤及伴随而来的光抑制、高温、紫外辐射等胁迫^[8-10]。另一方面, BSCs能够在复水后快速地恢复生理活性, 从而高效地利用短暂的降水时间^[11,12]。例如, 结皮复水后几分钟内就开始表现出光系统II(PS II)活性和固氮酶活性^[11,13]。

BSCs的固氮作用是干旱和半干旱生态系统主要

引用格式: 郑娇莉, 李双双, 彭成荣, 等. 干燥对人工生物土壤结皮固氮酶活性恢复过程的影响. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 750-769, doi: [10.1360/N052017-00143](https://doi.org/10.1360/N052017-00143)

英文版见: Zheng J L, Li S S, Peng C R, et al. The influence of desiccation on the recovery process of nitrogenase activity in restored biological soil crusts. Sci China Life Sci, 2017, in press, doi: [10.1007/s11427-016-9077-1](https://doi.org/10.1007/s11427-016-9077-1)

的氮素来源, 年固氮量达1.4~52 kg N/ha^[14~16]. 不同的演替阶段具有不同的固氮酶活性, 据报道, 蓝藻结皮和地衣结皮比苔藓结皮具有更高的固氮酶活性^[14~16]. 环境因子例如湿度、光照、温度都是影响固氮的重要因素^[17,18]. 除此之外, BSCs过去经历的环境条件如气温和干燥时长等也是影响固氮作用的重要因素^[17,18].

干燥通过影响BSCs的碳水化合物、能量库、含氮化合物和固氮酶活性, 来影响结皮的固氮速率^[17,18]. 干燥时间长于3天, BSCs几乎不表现出固氮酶活性; 只有当干燥时间短于3天时, BSCs才表现出固氮酶活性, 此时固氮速率受温度的影响^[17]. Jones^[18]发现, 干燥1年后地木耳(*Nostoc commune*)的固氮酶活性比干燥1天更低. 然而, 很少有研究关注干燥对固氮酶活性恢复过程的影响. 另外, BSCs中生物种类组成是影响其对干燥响应的重要因素. 伪枝藻(*Scytonema*)占优势的BSCs干燥6个月比干燥几天表现出更快的固氮酶活性恢复速率, 而微鞘藻(*Microcoleus*)占优势的BSCs在这两个干燥条件下, 恢复速率基本相同^[19]. 因此, 有必要深入研究干燥对不同演替阶段的BSCs固氮酶活性恢复过程的影响.

BSCs的演替能够促进荒漠生态系统的恢复^[20,21]. 为了控制库布齐沙漠的荒漠化, 2002~2009年, 通过接种两种从自然BSCs分离的蓝藻具鞘微鞘藻(*Microcoleus vaginatus*)和爪哇伪枝藻(*Scytonema javanicum*)到流沙上, 诱导形成了人工生物土壤结皮^[22]. 这两种蓝藻在结皮当中广泛分布, 并且能够固定沙土和减少风蚀^[23,24]. 接种后, 很快形成蓝藻结皮, 两年后背风坡的人工结皮发育到苔藓结皮^[21,25]. 具有明显形态特征和理化特征差异的不同演替阶段的BSCs逐渐分布于不同的立地条件^[21,22,25], 这些处在不同演替阶段的人工生物土壤结皮为研究干燥后固氮酶活性的恢复过程提供了很好的材料. 在干旱和半干旱地区生物土壤结皮会遭受时长不等的干燥, 直到在下一一次降雨或者降雨过程中湿润. 因此, 调查了不同干燥时长(2天~6个月)和复水时不同光照条件下结皮固氮酶活性的恢复过程. 固氮作用是消耗能量的过程, 固定一个N₂分子需要有光合产物提供至少16个ATP和8个电子^[17,26,27]. 因此, 本课题组也研究了不同干燥时长对潜在光合效率(F_v/F_m)的影响. 本研究旨在了解不同演替阶段的BSCs其固氮酶活性的恢复过程, 以及干燥时长对不同演替阶段的BSCs固氮酶活性恢复过程的影响.

1 材料和方法

1.1 研究区域

研究区域位于库布齐沙漠东缘, 内蒙古达拉特旗试验站(40°21'N, 109°51'E). 库布齐沙漠海拔1040 m, 其中61%的区域是平均高度为5 m的移动沙丘^[22,28]. 属于温带半干旱大陆季风性气候, 年均温度6.1℃; 风速3.3 m/s; 年降雨293 mm; 年蒸发2448 mm^[7,21]. 大多数降雨集中在6~9月; 而12月到次年2月属于旱季, 降雨量稀少, 经常低于5 mm^[7]. 本区域分布的自然植被是以沙蓬(*Agriophyllum squarrosum*)、披碱草(*Elymus dahuricus*)、猪毛菜(*Salsola collina*)和蒙古冰草(*Agropyron mongolicum* Keng)为代表的耐旱种^[25].

1.2 接种蓝藻诱导形成人工生物土壤结皮

以从自然生物土壤结皮中分离的*M. vaginatus*和*S. javanicum*为藻种^[7], 分别用BG-11和BG-11₀(不含氮的BG11)培养基培养. 首先在三角瓶中培养, 然后逐级扩大到60 m³的跑道池. 随后收获蓝藻并于2002~2009年间接种到半固定的沙土表面^[22,29].

1.3 样品采集

采样时间为2013年9月21~27日. 根据苔藓的盖度(表1), 将人工生物土壤结皮分为4个演替阶段: 蓝藻结皮(Crust-C), 藻-藓结皮(Crust-CM), 藓-藻结皮(Crust-MC)和苔藓结皮(Crust-M). 苔藓(优势种为真藓)盖度的测定方法参考^[30]. 蓝藻结皮接种于2005年, 而其他3种结皮接种于2002年. 每种结皮选取3个面积1 m×1 m样方, 作为3个重复样地, 样方距维管束植物至少2 m. 每个样方取5个样, 取样时用直径7.5 cm的环刀采集高5 cm的完整土柱, 除去下方的松散沙土, 仅保留结皮层. 采集未接种蓝藻的流动沙丘表层土壤(距离接种区域1000 m左右)作为对照. 结皮干燥后, 分为两部分: 一部分保存在无菌培养皿中, 用于固氮和光合活性测定; 一部分保存于棕色信封中用于理化测定. 样品运回实验室后, 避光保存于室温环境中.

1.4 土壤理化性质测定

结皮厚度用游标卡尺测定. 碱解氮采用碱解扩散法测定^[31]. 用pH计测定1:2.5土壤悬浮液的pH^[31]. 叶绿素a(Chl a)含量的测定方法参考文献^[32]. 有机质的测

定采用灼烧法^[33].

1.5 干湿循环以恢复人工生物土壤结皮活性

在实施干燥处理之前, 保存的干结皮样品首先通过2~3个干湿循环恢复生理活性^[11,13,34]. 具体步骤是: 用无菌蒸馏水湿润结皮, 在光照 $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 温度 25°C 条件下培养4~5 h, 随后自然干燥; 一个干湿循环持续24 h, 随后进行下一个干湿循环.

1.6 叶绿素荧光的测定

由于苔藓和蓝藻的叶绿素荧光值存在较大差异, 藻-藓结皮和藓-藻结皮的叶绿素荧光很不稳定. 因此将藻-藓结皮的苔藓用镊子全部拔除后测定结皮的叶绿素荧光值, 没有测定藓-藻结皮的叶绿素荧光. 叶绿素荧光用Handy PEA(Hansatech, 英国)测定^[35]. 暗适应时间最少10 min, 激发光为 $1500 \mu\text{E mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 记录 F_0 , F_m , F_v/F_m 值. 通过干湿循环恢复结皮生理活性后, 测定其恢复后的 F_v/F_m . 随后结皮干燥处理2天、2个月和5个月, 每个处理3个重复, 然后用无氮的蒸馏水湿润, 在光照 $30 \mu\text{E mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、温度 25°C 条件下测定结皮复水后光合活性的恢复.

1.7 固氮酶活性的测定

固氮酶活性的测定采用修正后的乙炔还原法^[36-38]. 取 1.44 cm^2 的结皮样品放置于20 mL玻璃瓶并用无氮蒸馏水湿润, 盐水塞封住玻璃瓶, 用注射器抽取2 mL的空气, 并打入2 mL乙炔. 培养一定的时间后, 从玻璃瓶中取0.3 mL的气体样品, 打入岛津GC14C气相色谱仪(配填充柱和氢火焰离子检测器)检测乙烯生成量. 取样3次以后, 用气泵吹扫玻璃瓶, 重新打入10%的乙炔. 在样品测定的同时, 用乙烯标样测定标曲. 灭菌的结皮样品作为对照检测体系固有的乙烯含量. 结皮通过干湿循环恢复生理活性后, 在最后一个干湿循环测定其恢复后的固氮酶活性(培养3 h).

干湿循环后, 结皮在 25°C 干燥4~6个月(称为long-term desiccation), 每个演替阶段3个重复, 用无氮蒸馏水充分湿润, 测定复水后48 h固氮酶活性的恢复过程, 培养条件为光照 $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、温度 25°C . 培养2, 6, 12, 18, 24, 30, 36和48 h后取样测定.

干湿循环后, 结皮样品干燥2天、4天、8天和4~6个月, 每个处理3个重复, 随后测定其复水后固氮酶

活性的恢复过程, 培养条件为光照 $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、温度 25°C . 根据预实验的结果, 测定Crust-C, Crust-CM和Crust-MC在复水后14 h内的恢复过程, 取样时间为复水后的2, 4, 6, 10和14 h; 测定Crust-M在复水后48 h内的恢复过程, 取样时间为复水后的2, 6, 12, 18, 24, 30, 36和48 h. 干燥时长为2天和4~6个月的结皮均表现出很高的固氮酶活性, 因此比较了这两种条件下结皮乙烯生成总量的差异, 乙烯生成总量为各个时间段乙烯生成量(乙烯生成量=乙烯生成速率(固氮酶活性)×时间)之和.

干湿循环后, 结皮样品在 25°C 条件下干燥存放2天和4~6个月(分别记为2d-DR和L-DR), 每个处理3个重复, 然后用无氮蒸馏水充分湿润, 测定其在黑暗和 25°C 条件下固氮酶活性的恢复过程. 另一组样品(L-6h-DR)在干燥4~6个月, 光照培养6 h以恢复其光合活性, 随后测定其在黑暗条件下固氮酶活性的恢复过程. 取样时间均为黑暗条件下培养后的4, 8和14 h. 同样比较了干燥2天和4~6个月复水过程中乙烯生成总量的差异.

1.8 统计分析

采用单因素方差分析和LSD多重比较检验不同演替阶段人工生物土壤结皮理化性质差异和复水后固氮酶活性的差异的显著性. 采用Pearson相关分析来分析 F_v/F_m 和干燥时长的相关关系. 采用重复测量方差分析(RM-ANOVA)检验不同干燥时长处理后结皮在光照或者黑暗条件下固氮酶活性恢复过程的差异. RM-ANOVA交互作用显著时, 采用单因素方差分析和LSD多重比较检验不同处理条件下结皮固氮酶活性差异的显著性. 采用Wilcoxon双样本 T 检验分析乙烯生成总量的差异显著性. 采用SPSS16.0(SPSS Inc, 美国)进行统计分析.

2 结果

2.1 不同演替阶段人工生物土壤结皮的理化性质

不同演替阶段的人工生物土壤结皮表现出不同的理化性质. 随着演替的进行, 结皮厚度增加而pH逐渐降低. 沙丘中有机质和碱解氮含量均很低且几乎检测不到Chl a含量. 随着蓝藻结皮的形成, 有机质、碱解氮和Chl a均逐渐增加. 随着苔藓拓殖和盖度的增

加, 有机质、碱解氮和Chl a进一步增加, 除了藻-藓结皮和藓-藻结皮两个演替阶段, 其他演替阶段的这些指标间有显著差异(表1).

2.2 复水后 F_v/F_m 的恢复过程

干燥处理前Crust-C, Crust-CM和Crust-M的 F_v/F_m 分别为 0.40 ± 0.04 , 0.41 ± 0.06 和 0.72 ± 0.03 (表2). 不同干燥时长处理后, 不同演替阶段结皮的 F_v/F_m 在复水后2.33~3.5 h内恢复到干燥前水平, 随后保持相对稳定(图1). Crust-M的 F_v/F_m 恢复速率与干燥时长呈负相关($r=-0.514, P<0.00001$), 在干燥2天、2个月和5个月后, 苔藓结皮分别需要0.5, 2.33和3.5 h才能充分恢复光合活性. 但Crust-C和Crust-CM的 F_v/F_m 恢复速率与干燥时长没有显著的相关关系($r=0.127, P=0.073; r=-0.046, P=0.522$), 其光合活性均能在2.33 h内充分恢复(图1).

2.3 复水后固氮酶活性在持续光照条件下的恢复过程

人工生物土壤结皮表现出两种固氮酶活性的恢复模式. Crust-C, Crust-CM和Crust-MC表现出相同固氮酶活性的恢复模式, 即复水后固氮酶活性在6 h内恢复到了最高水平, 随后逐渐下降. 但是这3种结皮的固氮酶活性存在差异, Crust-CM的固氮酶活性高于Crust-MC, Crust-C的最低(图2). Crust-M表现出不同的固氮酶活性恢复模式, 即复水后24 h内均很低($0.26\sim0.37 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$), 随后逐渐升高. Crust-M的固氮酶活性在复水后18 h内显著低于其他3种结皮($P=0.008$), 在36 h时超过了其他3种结皮.

2.4 干燥时长对光照条件下的固氮酶活性恢复过程的影响

在干燥处理前, Crust-C, Crust-CM, Crust-MC和Crust-M的NA分别为 (0.09 ± 0.01) , (1.81 ± 1.39) , (1.78 ± 0.46) 和 $(0.06\pm0.01) \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (表2). 光

图1 干燥2天、2个月和5个月后, 不同演替阶段人工生物土壤结皮复水后 F_v/F_m 的恢复过程

表1 不同演替阶段人工生物土壤结皮和对照流沙土壤的理化性质^{a)}

演替阶段	结皮成分	厚度(mm)	pH	Chl a(mg/kg)	有机质(%)	碱解氮(mg/kg)
流沙	—	—	9.17±0.03a	0a	0.83±0.09a	7.76±0.82a
蓝藻结皮	蓝藻	2.68±0.77a	8.55±0.07b	1.50±0.53b	1.36±0.20b	26.02±2.92b
藻-藓结皮	0%~10% 苔藓, >90% 蓝藻	4.23±0.88b	8.15±0.03c	2.68±0.88c	1.78±0.42bc	51.28±1.73c
鲜-藻结皮	15%~50% 苔藓, 50%~85% 蓝藻	6.22±0.76c	8.05±0.13c	2.66±0.15c	2.21±0.20c	56.53±5.12c
苔藓结皮	苔藓	11.54±0.84d	7.50±0.09d	6.17±0.66d	3.67±0.65d	92.72±8.84d

a) 不同字母表示在 $P=0.05$ 水平差异显著

图 2 长时间干燥后不同演替阶段人工生物土壤结皮复水后在持续光照条件下固氮酶活性的恢复过程
不同字母表示在P=0.05水平差异显著

照条件下, 结皮固氮酶活性的恢复过程受到干燥时长、复水时间及两者交互作用的影响. 在经历不同的干燥时长处理后, Crust-C, Crust-CM和Crust-MC表

现出相同的固氮酶活性恢复过程, 即复水后固氮酶活性在6 h内恢复到了最高水平, 随后逐渐下降; 然而Crust-M在不同干燥时长处理后, 复水后其固氮酶活性在最初24 h很低, 随后逐渐升高(图3). 干燥处理2和4天的Crust-C, Crust-CM和Crust-MC结皮, 其在复水后固氮酶活性能恢复至或者高于干燥前水平, 然而在干燥处理8天后, 其复水后恢复的固氮酶活性显著地低于干燥前水平. 对Crust-M来说, 干燥处理2, 4和8天后, 其固氮酶活性在复水后30 h内显著地低于干燥处理前水平, 随后逐渐上升并高于干燥处理前水平. 单因素

表 2 干燥处理前不同演替阶段人工生物土壤结皮的固氮酶活性(NA)和F_v/F_m

演替阶段	NA (nmol C ₂ H ₄ cm ⁻² h ⁻¹)	F _v /F _m
Crust-C	0.09±0.01	0.40±0.04
Crust-CM	1.81±1.39	0.41±0.06
Crust-MC	1.78±0.46	—
Crust-M	0.06±0.01	0.72±0.03

图 3 不同干燥处理时长后, 人工生物土壤结皮各演替阶段复水后在光照条件下固氮酶活性的恢复过程
不同字母表示在P=0.05水平差异显著

方差分析表明, 在Crust-C, Crust-CM和Crust-MC的固氮酶活性恢复过程中, 其峰值随着干燥处理时长延长而逐渐降低, 干燥时长显著影响结皮的固氮酶活性恢复, 干燥时长为2和4天的Crust-MC除外。当干燥处理时间不高于8天时, Crust-M的固氮酶活性恢复似乎不受干燥时长的影响。然而, 当干燥处理时间长达4~6个月时, 所有的结皮在复水后均显示出较高的固氮酶活性, 等于或高于干燥2天后结皮的固氮酶活性(图3)。

2.5 干燥时长对黑暗条件下的固氮酶活性恢复过程的影响

人工生物土壤结皮固氮酶活性在黑暗条件下的恢复过程受到干燥时长、复水时间及两者交互作用的影响。长期干燥后, 无论是直接测定(L-DR)还是光照培养6 h后再测定(L-6 h-DR), 固氮酶活性均随着复水时间逐步下降(图4), 但经过长期干燥处理的苔藓结皮, 复水后在黑暗条件下其固氮酶活性先上升后下降。经过长期干燥处理的Crust-C, Crust-CM和Crust-MC结皮, 复水后光照培养6 h其固氮酶活性比复水后直接在黑暗条件下培养要高(Crust-C: $P=0.023$; Crust-CM: $P=0.001$; Crust-MC: $P=0.042$)。相反, Crust-M复水后直

接在黑暗条件下培养比在光照条件下培养固氮酶活性更高。干燥两天后, 所有演替阶段在黑暗条件下复水8 h几乎检测不到固氮酶活性, 8~14 h后固氮酶活性略有上升(图4)。除了Crust-C, 其他演替阶段长期干燥比干燥两天光照条件下乙烯生成总量更高(图5A); 类似地, 所有结皮长期干燥比干燥两天黑暗条件下乙烯生成总量更高(图5B)。

3 讨论

3.1 土壤理化性质随着人工生物土壤结皮发育的影响

随着蓝藻结皮的形成, 碱解氮和有机质的含量显著增加, 土壤条件得到初步改善, 从而有利用后来物种的拓殖。随着人工生物土壤结皮的进一步演替, 苔藓盖度逐渐增加, 土壤有机质和碱解氮进一步增加; 同时, 结皮厚度也随着苔藓盖度的增加而增加, 这主要是由于结皮发育的早期阶段, 其主要依靠分泌胞外多糖以及藻丝缠绕来黏结土壤颗粒^[39], 随着苔藓盖度的增加, 苔藓的假根在固定土壤方面发挥了重要作用^[40]。

图4 不同干燥时长处理后, 不同演替阶段人工生物土壤结皮复水后在黑暗条件下固氮酶活性的恢复过程

L-DR: 长时间干燥后在黑暗条件下复水测定固氮酶活性; L-6 h-DR: 长时间干燥后, 复水后先光照培养6 h再在黑暗条件下测定固氮酶活性; 2 d-DR: 干燥两天后在黑暗条件下复水测定固氮酶活性。不同字母表示在 $P=0.05$ 水平差异显著

图5 干燥2天和4~6个月后,不同演替阶段的人工生物土壤结皮复水后在光照条件(A)和黑暗条件(B)下的乙烯生成总量
**: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$

3.2 干燥时长对人工生物土壤结皮光系统II(PSII)恢复过程的影响

暗适应叶绿素荧光(F_v/F_m)被认为是测量PS II活性的一个指标^[41],因此能够用来表示潜在光合活性的恢复过程. 与前人的研究类似^[12,21],干燥的人工生物土壤结皮几乎检测不到 F_v/F_m 值,在复水后可逐渐恢复至稳定水平,苔藓结皮可恢复至0.7,蓝藻结皮和藻-藓结皮可恢复至0.4.

相对于早期的蓝藻结皮,苔藓结皮PS II对干燥更为敏感. 荒漠蓝藻的色素分子能够在较长的失水时期内保持稳定和完整^[42],且在复水后PS II的活化不需要光系统的电子转移和蛋白质的重新合成. 这就解释了蓝藻结皮和藻-藓结皮在长时间失水后为什么能够快速恢复 F_v/F_m . 相反,本研究发现在苔藓结皮中, F_v/F_m 的恢复过程受到干燥时长的影响,这与之前的研究结果一致^[12,43,44]. 当苔藓失水几天时,光系统仅需要物理性的激活,并不需要从头开始合成蛋白;然而长时间的失水会造成累积损伤,减缓了苔藓在复水后的恢复过程^[12]. 虽然苔藓结皮对干燥时长更为敏感,但在失水较长时间后(2~5个月)其 F_v/F_m 仍然高于早期结皮,这显示苔藓结皮比早期结皮具有更高的光合活性及固碳能力,也解释了Chl a和有机质随着苔藓的拓殖和增殖而快速增加.

3.3 人工生物土壤结皮固氮酶活性的恢复过程

本研究中人工生物土壤结皮固氮酶活性在 $0 \sim 7.7 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$,与其他结皮的固氮酶活性处于相同的范围^[13,14,16]. 本研究显示,不同演替阶段的人工生物土壤结皮出现两种模式的固氮酶活性的恢

复过程: 相对于早期3种演替阶段的结皮的快速恢复,苔藓结皮的固氮酶活性恢复过程有24 h的延迟. 有研究报道了复水后结皮固氮酶活性的恢复过程^[13,45,46]. 野外调查显示,蓝藻结皮和蓝藻-地衣混合结皮在日间复水后很快恢复到峰值,随后固氮酶活性逐渐下降^[46]. 也有研究显示,黑色结皮(蓝藻-地衣混合结皮)在复水后48 h才能充分恢复固氮酶活性^[45],而*Nostoc commune*能在复水后14 h充分恢复固氮酶活性^[13]. 羽藓的固氮酶活性恢复很慢,直到复水后48 h才显著增加,与本实验苔藓结皮的恢复模式类似^[47].

固氮蓝藻*Nostoc* spp.和*Scytonema* spp.是不同演替阶段生物土壤结皮中的主要固氮生物^[46,48,49]. 然而,奇怪的是本研究中早期结皮比晚期结皮固氮酶活性恢复更快. 其中可能的原因是早期结皮更适应极端干旱环境. 蓝藻结皮能够在复水后几分钟到一个小时内启动固氮功能^[17],如*Nostoc commune* HUN能在复水后5 min内检测到*nifH*基因的转录^[50],30 min内检测到*nifH*蛋白的合成^[51]. 另一方面,随着人工生物结皮的发育演替,固氮生物的栖息环境发生变化,这也有可能影响人工生物结皮的生物固氮^[49,52,53]. 蓝藻结皮中固氮蓝藻主要处于自由状态^[52],结皮或者环境中氮素的积累可能降低或者终止生物固氮作用^[17,46]. 本研究中蓝藻结皮和藻-藓混合结皮的固氮酶活性在达到峰值后很快下降可能反映了这一情况. 然而在苔藓结皮中,苔藓的生长可能增加了对环境氮素的需求,从而促进固氮作用. 而且,固氮蓝藻被认为与某些种类的苔藓联系紧密,固氮蓝藻能附生于某些苔藓叶片^[49,53]. 并且有研究推测蓝藻和苔藓可能存在共生关系: 蓝藻从苔藓获取光合产物以维持较高的固氮酶活性,为苔藓提供氮素

作为交换^[47,54]. 本研究也观察到*Scytonema* spp., *Nostoc* spp. 和其他丝状蓝藻附生于苔藓的叶片和假根上. 然而, 苔藓和蓝藻是否存在共生关系还未在苔藓结皮中得到确证, 还需要进一步的研究.

3.4 失水和光照条件对人工生物土壤结皮固氮酶活性恢复过程的影响

本文旨在研究干燥时长对人工生物土壤结皮固氮酶活性恢复过程的影响. 蓝藻结皮和蓝藻-苔藓混合结皮在短期内(不长于8天)干燥时间越长, 复水后其固氮酶活性越低, 这与其他研究的结果一致^[14,17]. 然而, 不同的干燥时长并没有影响到结皮固氮酶活性的恢复过程, 显示干燥条件下人工生物结皮的固氮系统几乎不受损伤. 因此, 失水时间延长导致固氮酶活性的降低, 主要是由于还原剂和能量的减少^[17]. 长期(4~6月)失水后, 无论是在光照还是黑暗条件下, 所有的结皮均表现出较高的固氮酶活性. 长时间失水可能造成细胞损伤, 因此需要较高的固氮酶活性以满足结皮生物对氮素的需求. Jeffries发现, *Scytonema*占优势的结皮在失水6个月也显示出比短时间失水更高的固氮酶活性. 而*Scytonema*(固氮蓝藻)是本研究中用以诱导形成人工生物土壤结皮的藻种, 是结皮中的优势蓝藻^[25]. 尽管有研究显示, 一些结皮失水几个月到几年后会比短时间失水恢复更慢, 但是最终长时间复水后结皮的固氮酶活性能够恢复到较高水平, 比短时间失水结皮的固氮酶活性高或相当^[19,55]. 本研究显示, 失水6个月的蓝藻结皮和蓝藻-苔藓混合结皮, 表现出与失水2天同样的固氮酶活性恢复速率, 因此长时间失水其固氮酶活性能够在几个小时内快速恢复至较高水平.

短期内(8天内)不同干燥时长对苔藓结皮的固氮酶活性恢复过程没有影响. 前面提到, 蓝藻和苔藓的关系可能是影响固氮作用的重要因子, 因此苔藓的生理状态可能影响苔藓结皮的固氮酶活性^[47,56,57]. 而苔藓在干燥几天后, 光系统仅需要物理性的激活, 并不需要从头开始合成蛋白质^[12], 这可能解释短期的干燥处理对结皮的固氮酶活性没有影响. 长期干燥后, 苔藓结皮表现出较高的固氮酶活性. 与早期的3种演替阶段类似, 苔藓结皮中的固氮蓝藻可能倾向于固定更多的氮来修复长时间干燥造成的损伤. 而苔藓结皮提供的有利栖息环境能促进固氮酶活性的恢复, 有报道显示, 苔藓不仅能够通过毛细吸湿作用保持水分, 从

而能够促进共栖固氮蓝藻的水分可利用性^[56], 还为共栖的蓝藻遮荫, 使其免受高光强和紫外辐射. 另一方面, 较长的失水时间(长于45天)能够对苔藓造成严重损伤, 如细胞代谢紊乱^[12], 从而产生更多的氮素需求以合成蛋白质进行损伤修复, 这可能通过某种途径反馈到相关的固氮蓝藻以刺激固氮酶活性的恢复.

黑暗条件下, 人工生物土壤结皮的固氮酶活性随着复水时间增加逐渐降低, 这与之前的研究一致^[13,58~60]. 这是由于内源性碳储量的减少, 又没有光合作用对还原剂进行补充^[13,59]. 本研究表明, 在固氮酶活性测量之前, 对复水的结皮进行6 h的光照培养比直接在黑暗条件下复水培养具有更高的固氮酶活性. 这是由于光合作用提供的光合产物促进了固氮, 进一步证实了固氮作用与光合作用的密切关系.

3.5 复水时间对PSII和固氮酶活性恢复的影响

除了干燥时长, 复水时长也是影响不同演替阶段的生物土壤结皮光合活性和固氮酶活性恢复过程的重要影响因子. 复水时间短于2 h, 则蓝藻结皮和藻-藓结皮的光合活性和固氮酶活性均不能完全恢复. 而复水时间达6 h则足够恢复这两种生理活性, 即使干燥时长达4~6个月. 不同干燥时长处理后, 苔藓结皮均能在几小时内恢复光合活性, 但是其至少需要复水达24 h才能完全恢复固氮酶活性. 通常来说, 一场较大的降雨会带来较长的湿润时间, 从而对苔藓结皮恢复固氮酶活性更为有利. 在科罗拉多高原进行为期两年的野外研究证实, 当单次降水事件的降雨量减少1/2而降雨频率增加1倍时, BSCs从苔藓结皮退化至蓝藻结皮^[61].

3.6 光合活性和固氮酶活性随着人工生物土壤结皮演替的变化

随着具有更高光合活性的苔藓的拓殖, 结皮的固碳能力相比蓝藻结皮上升, 而固氮能力也增高2~7倍, 与黄土高原自然恢复的结皮类似^[16]. 尽管苔藓的拓殖是否能够促进固氮还不明确, 显然在氮素限制的荒漠地区苔藓能够从结皮的高固氮作用获益. 随着演替过程中固碳和固氮能力的增加, Chl a、碱解氮和有机质含量快速累积, 而营养盐的累积反过来促进了苔藓的增殖.

有研究显示, 蓝藻和地衣结皮相比苔藓结皮具有更高的固氮能力^[15,62]. 然而, 大多数研究在测定固氮

酶活性时仅测了3~4 h, 长时间复水后固氮酶活性的变化经常被忽略. 本研究测定了复水后48 h固氮酶活性的恢复过程, 发现固氮酶活性随着结皮的演替而变化, 早期的3个演替阶段具有相同的固氮酶活性恢复模式, 但酶活性大小不同, 这可能是由于固氮蓝藻丰度的变化而不是种类的变化^[14,46,48]. 而苔藓结皮显示出完全不同的固氮酶活性恢复模式. 除了固氮蓝藻的变化, 共栖的苔藓或者其他结皮生物可能共同影响苔藓结皮的固氮酶活性恢复过程.

4 结论

干燥是干旱地区结皮面临的常见环境胁迫. 人工生物土壤结皮中的蓝藻相比于苔藓, 对长期干燥具有

更高的耐受性, 因为前者能够更快地恢复PS II活性. 人工生物土壤结皮固氮酶活性的恢复也受到干燥时长的影响. 早期结皮在短期内(8天)失水时间越长复水后固氮酶活性越低, 而苔藓结皮似乎不受干燥时长的影响. 然而, 长期的失水后, 所有结皮均在复水后表现出较高的固氮酶活性. 早期的3种演替阶段的结皮表现出同样的固氮酶活性恢复模式, 但是固氮速率不同; 而苔藓结皮表现出不同的固氮酶活性恢复模式, 恢复更慢. 总而言之, 本研究表明, 降雨格局导致失水/复水格局是影响结皮固氮作用的重要因素; 频繁降雨能够增加早期演替阶段结皮的固氮, 而长时间的湿润时间(较大的降雨或者长时间降雨)将有利于苔藓结皮的固氮.

致谢 感谢内蒙古自治区林业科学研究院刘新前院长和安晓亮高工在野外采样的帮助.

参考文献

- 1 Eldridge D, Greene R. Microbiotic soil crusts—a review of their roles in soil and ecological processes in the rangelands of Australia. *Aust J Soil Res*, 1994, 32: 389–415
- 2 Harper K T, Belnap J. The influence of biological soil crusts on mineral uptake by associated vascular plants. *J Arid Environ*, 2001, 47: 347–357
- 3 Maestre F T, Bowker M A, Cantón Y, et al. Ecology and functional roles of biological soil crusts in semi-arid ecosystems of Spain. *J Arid Environ*, 2011, 75: 1282–1291
- 4 Wang W B, Yang C Y, Tang D S, et al. Effects of sand burial on biomass, chlorophyll fluorescence and extracellular polysaccharides of man-made cyanobacterial crusts under experimental conditions. *Sci China C Life Sci*, 2007, 50: 530–534
- 5 Lázaro R, Rodrigo F S, Gutiérrez L, et al. Analysis of a 30-year rainfall record (1967–1997) in semi-arid SE Spain for implications on vegetation. *J Arid Environ*, 2001, 48: 373–395
- 6 Austin A T, Yahdjian L, Stark J M, et al. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*, 2004, 141: 221–235
- 7 Rao B, Liu Y, Wang W, et al. Influence of dew on biomass and photosystem II activity of cyanobacterial crusts in the Hopq Desert, northwest China. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41: 2387–2393
- 8 Lan S, Wu L, Zhang D, et al. Desiccation provides photosynthetic protection for crust cyanobacteria *Microcoleus vaginatus* from high temperature. *Physiol Plantarum*, 2014, 152: 345–354
- 9 Fukuda S, Yamakawa R, Hirai M, et al. Mechanisms to avoid photoinhibition in a desiccation-tolerant cyanobacterium, *Nostoc commune*. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 488–492
- 10 Potts M. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *Eur J Phycol*, 1999, 34: 319–328
- 11 Harel Y, Ohad I, Kaplan A. Activation of photosynthesis and resistance to photoinhibition in cyanobacteria within biological desert crust. *Plant Physiol*, 2004, 136: 3070–3079
- 12 Proctor M. Patterns of desiccation tolerance and recovery in bryophytes. *Plant Growth Regul*, 2001, 35: 147–156
- 13 Coxson D S, Kershaw K A. Rehydration response of nitrogenase activity and carbon fixation in terrestrial *Nostoc commune* from *Stipa-Bouteloua* grassland. *Can J Bot*, 1983, 61: 2658–2668
- 14 Belnap J. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *Biol Fertil Soils*, 2002, 35: 128–135
- 15 Su Y, Zhao X, Li A, et al. Nitrogen fixation in biological soil crusts from the Tengger desert, northern China. *Eur J Soil Biol*, 2011, 47: 182–187
- 16 Zhao Y, Xu M, Belnap J. Potential nitrogen fixation activity of different aged biological soil crusts from rehabilitated grasslands of the hilly Loess Plateau, China. *J Arid Environ*, 2010, 74: 1186–1191

- 17 Belnap J. Factors Influencing Nitrogen Fixation and Nitrogen Release in Biological Soil Crusts, in *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Berlin: Springer, 2003. 241–261
- 18 Jones K. Interactions between desiccation and dark nitrogen fixation in tropical *Nostoc commune*. *New Phytol*, 1989, 113: 1–6
- 19 Jeffries D L, Klopatek J M, Link S O, et al. Acetylene reduction by cryptogamic crusts from a blackbrush community as related to resaturation and dehydration. *Soil Biol Biochem*, 1992, 24: 1101–1105
- 20 Bowker M A. Biological soil crust rehabilitation in theory and practice: an underexploited opportunity. *Restor Ecol*, 2007, 15: 13–23
- 21 Lan S, Zhang Q, Wu L, et al. Artificially accelerating the reversal of desertification: cyanobacterial inoculation facilitates the succession of vegetation communities. *Environ Sci Technol*, 2013, 48: 307–315
- 22 Wu Y, Rao B, Wu P, et al. Development of artificially induced biological soil crusts in fields and their effects on top soil. *Plant Soil*, 2013, 370: 115–124
- 23 Hu C, Liu Y, Song L, et al. Effect of desert soil algae on the stabilization of fine sands. *J Appl Phycol*, 2002, 14: 281–292
- 24 Hu C, Zhang D, Huang Z, et al. The vertical microdistribution of cyanobacteria and green algae within desert crusts and the development of the algal crusts. *Plant Soil*, 2003, 257: 97–111
- 25 Wang W, Liu Y, Li D, et al. Feasibility of cyanobacterial inoculation for biological soil crusts formation in desert area. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41: 926–929
- 26 Scherer S, Almon H, Böger P. Interaction of photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in cyanobacteria. *Photosynth Res*, 1988, 15: 95–114
- 27 Burris R H, Roberts G P. Biological nitrogen fixation. *Annu Rev Nutr*, 1993, 13: 317–335
- 28 Li H, Rao B, Wang G, et al. Spatial heterogeneity of cyanobacteria-inoculated sand dunes significantly influences artificial biological soil crusts in the Hopq Desert (China). *Environ Earth Sci*, 2014, 71: 245–253
- 29 Lan S B, Hu C X, Rao B Q, et al. Non-rainfall water sources in the topsoil and their changes during formation of man-made algal crusts at the eastern edge of Qubqi Desert, Inner Mongolia. *Sci China Life Sci*, 2010, 53: 1135–1141
- 30 Li X R, He M Z, Zerbe S, et al. Micro-geomorphology determines community structure of biological soil crusts at small scales. *Earth Surf Process Landforms*, 2010, 35: 932–940
- 31 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000
- 32 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1
- 33 劳家桢. 土壤农化分析手册. 北京: 农业出版社, 1988
- 34 Proctor M C F, Ligrone R, Duckett J G. Desiccation tolerance in the moss *Polytrichum formosum*: physiological and fine-structural changes during desiccation and recovery. *Ann Bot*, 2007, 99: 75–93
- 35 Wu L, Lan S, Zhang D, et al. Recovery of chlorophyll fluorescence and CO₂ exchange in lichen soil crusts after rehydration. *Eur J Soil Biol*, 2013, 55: 77–82
- 36 Li Z, Yu J, Kim K R, et al. Nitrogen fixation by a marine non-heterocystous cyanobacterium requires a heterotrophic bacterial consort. *Environ Microbiol*, 2010, 12: 1185–1193
- 37 Cheng J, Hipkin C R, Gallon J R. Effects of inorganic nitrogen compounds on the activity and synthesis of nitrogenase in *Gloeotheca* (Nageli) sp. ATCC 27152. *New Phytol*, 1999, 141: 61–70
- 38 Stewart W D, Fitzgerald G P, Burris R H. *In situ* studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967, 58: 2071–2078
- 39 Issa O M, Le Bissonnais Y, Défarge C, et al. Role of a cyanobacterial cover on structural stability of sandy soils in the Sahelian part of western Niger. *Geoderma*, 2001, 101: 15–30
- 40 Schulten J A. Soil aggregation by cryptogams of a sand prairie. *Am J Bot*, 1985, 72: 1657–1661
- 41 Baker N R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 89–113
- 42 Abed R M M, Polerecky L, Al-Habsi A, et al. Rapid recovery of cyanobacterial pigments in desiccated biological soil crusts following addition of water. *PLoS ONE*, 2014, 9: e112372
- 43 Csintalan Z, Proctor M C, Tuba Z. Chlorophyll fluorescence during drying and rehydration in the mosses *Rhytidiadelphus loreus* (Hedw.) Warnst., *Anomodon viticulosus* (Hedw.) Hook. & Tayl. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Ann Bot*, 1999, 84: 235–244
- 44 Wagner D J, Titus J E. Comparative desiccation tolerance of two sphagnum mosses. *Oecologia*, 1984, 62: 182–187
- 45 Caputa K, Coxson D, Sanborn P. Seasonal patterns of nitrogen fixation in biological soil crusts from British Columbia's Chilcotin grasslands. *Botany*, 2013, 91: 631–641
- 46 Housman D C, Powers H H, Collins A D, et al. Carbon and nitrogen fixation differ between successional stages of biological soil crusts in the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *J Arid Environ*, 2006, 66: 620–634

- 47 Rousk K, Jones D L, DeLuca T H. The resilience of nitrogen fixation in feather moss (*Pleurozium schreberi*)-cyanobacteria associations after a drying and rewetting cycle. *Plant Soil*, 2014, 377: 159–167
- 48 Yeager C M, Kornosky J L, Housman D C, et al. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 973–983
- 49 Zackrisson O, DeLuca T H, Nilsson M C, et al. Nitrogen fixation increases with successional age in boreal forests. *Ecology*, 2004, 85: 3327–3334
- 50 Holzinger A, Karsten U. Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 327
- 51 Peat A, Powell N, Potts M. Ultrastructural analysis of the rehydration of desiccated *Nostoc commune* HUN (cyanobacteria) with particular reference to the immunolabelling of NifH. *Protoplasma*, 1988, 146: 72–80
- 52 Liengen T. Conversion factor between acetylene reduction and nitrogen fixation in free-living cyanobacteria from high arctic habitats. *Can J Microbiol*, 1999, 45: 223–229
- 53 Gentili F, Nilsson M C, Zackrisson O, et al. Physiological and molecular diversity of feather moss associative N₂-fixing cyanobacteria. *J Exp Bot*, 2005, 56: 3121–3127
- 54 Turetsky M R, Bond-Lamberty B, Euskirchen E, et al. The resilience and functional role of moss in boreal and arctic ecosystems. *New Phytol*, 2012, 196: 49–67
- 55 Scherer S, Ernst A, Chen T W, et al. Rewetting of drought-resistant blue-green algae: time course of water uptake and reappearance of respiration, photosynthesis, and nitrogen fixation. *Oecologia*, 1984, 62: 418–423
- 56 Turetsky M R. The role of bryophytes in carbon and nitrogen cycling. *Bryologist*, 2003, 106: 395–409
- 57 Rousk K, Jones D L, DeLuca T H. Moss-cyanobacteria associations as biogenic sources of nitrogen in boreal forest ecosystems. *Front Microbiol*, 2013, 4: 150
- 58 Solheim B, Endal A, Vigstad H. Nitrogen fixation in Arctic vegetation and soils from Svalbard, Norway. *Polar Biol*, 1996, 16: 35–40
- 59 Steinberg N A, Meeks J C. Physiological sources of reductant for nitrogen fixation activity in *Nostoc* sp. strain UCD 7801 in symbiotic association with *Anthoceros punctatus*. *J Bacteriol*, 1991, 173: 7324–7329
- 60 Liengen T. Environmental factors influencing the nitrogen fixation activity of free-living terrestrial cyanobacteria from a high arctic area, Spitsbergen. *Can J Microbiol*, 1999, 45: 573–581
- 61 Zelikova T J, Housman D C, Grote E E, et al. Warming and increased precipitation frequency on the Colorado Plateau: implications for biological soil crusts and soil processes. *Plant Soil*, 2012, 355: 265–282
- 62 Liu W, Song Y, Wang B, et al. Nitrogen fixation in biotic crusts and vascular plant communities on a copper mine tailings. *Eur J Soil Biol*, 2012, 50: 15–20