DOI: 10.5846/stxb201405110957
裴广廷,马红亮,林伟,高人,尹云锋,杨柳明.氨基酸添加对亚热带森林红壤氮素转化的影响.生态学报,2015,35(23): - .
Pei G T, Ma H L, Lin W, Gao R, Yin Y F, Yang L M.Effects of amino acid additions on nitrogen transformation in subtropical forest soil.Acta Ecologica Sinica,2015,35(23): - .

氨基酸添加对亚热带森林红壤氮素转化的影响

裴广廷[1,2],马红亮[1,2,*],林 伟[1,2],高 人[1,2],尹云锋[1,2],杨柳明[1,2]
1 湿润亚热带山地生态国家重点实验室培育基地,福州 350007
2 福建师范大学地理科学学院,福州 350007

摘要:为探究氨基酸氮形态对亚热带土壤氮素含量及转化的影响,选择建瓯市万木林保护区的山地红壤为对象,采用室内培养实验法,通过设计 60%和 90% WHC 两种土壤含水量并添加不同性质氨基酸,测定了土壤中铵态氮、硝态氮、可溶性有机氮的含量和氧化亚氮的释放量,分析了可溶性有机碳、土壤 pH 值的大小变化及其与氮素的相互关系。结果表明:与对照处理相比,氨基酸添加显著增加了土壤 NH_4^+-N 含量并使土壤 pH 值升高,且在一定程度上解除了高含水量(90% WHC)对 NH_4^+-N 产生的抑制,其中甲硫氨基酸的效果最为明显。酸性、碱性、中性氨基酸对土壤 NO_3^--N 含量和 N_2O 释放影响不显著,但甲硫氨基酸可显著抑制土壤硝化从而导致 NH_4^+-N 的积累,并在培养前期抑制土壤 N_2O 产生而在培养后期促进 N_2O 释放,总体上促进 N_2O 释放。60% WHC 的氨基酸添加处理较 90% WHC 条件下降低土壤可溶性有机氮的幅度更大。氨基酸对土壤氮素转化的影响与带电性关系较小,而可能与其分解产物密切相关。可见,不同性质氨基酸处理对森林土壤氮素含量及转化存在不同程度的影响,且甲硫氨基酸对土壤氮素转化的影响机理值得深入研究。

关键词:氨基酸;土壤水分;森林土壤;氮素转化

Effects of amino acid additions on nitrogen transformation in subtropical forest soil

PEI Guangting[1,2], MA Hongliang[1,2,*], LIN Wei[1,2], GAO Ren[1,2], YIN Yunfeng[1,2], YANG Liuming[1,2]
1 *Cultivation Base of State Key Laboratory of Humid Subtropical Mountain Ecology*, *Fuzhou* 350007, *China*
2 *School of Geographical Sciences*, *Fujian Normal University*, *Fuzhou* 350007, *China*

Abstract: Research on the nitrogen cycle of forest soils has traditionally focused on the mechanisms regulating the turnover of inorganic N. However, the key role of organic N in soil nitrogen transformation tends to be overlooked. Over recent decades, researchers have assessed the relative importance of organic N on the nutritional requirements of plants in forest ecosystems. Most studies have revealed that soil amino acids are important sources of organic N in forest ecosystems. Although the fluxes of organic N in forest ecosystems have been studied in detail, we have a poor understanding about the role of amino acids in soil nitrogen transformation in the subtropical region of China. In this study, subtropical broad-leaved forest soil was collected from Wan Mulin Natural Reserve located at Fujian Province, southeast China. We selected four types of amino acids, including *L*-Glutamic acid, *L*-Lysine, *L*-Alanine, and *L*-Methionine as the study materials, which represented acidic, basic, neutral, and sulfur amino acids, respectively. Soils were incubated for 0, 2, 8, 12, 16, and 36 days in the laboratory after adding 0 and 40 mg N /kg amino acid. Soil moisture was maintained at 60% WHC (water-holding capacity) or 90% WHC. Ammonium N, nitrate N, soluble organic N, nitrous oxide, soil pH, and soluble organic C content were determined. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) with the SPSS version 18.0, and

基金项目:国家自然科学基金项目(40901115, 41271282, 31070549, 31170578);教育部创新团队项目(IRT0960);福建省高校杰出青年科研人才培育计划(JA12058)和福建师范大学优秀青年骨干教师培养基金资助(fjsdjk2012069)
收稿日期:2014-05-11; **网络出版日期**:2015- -
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: mhl936@163.com

significant differences between treatments were compared by the LSD test at $P < 0.05$. The results showed that soil NH_4^+-N content significantly increased with the addition of amino acids, with the repression of NH_4^+-N production under high soil moisture content conditions (90% WHC) being relieved to some extent. Soil pH was increased by the addition of amino acids, and was closely correlated with soil NH_4^+-N and $NO_{3_}$N. These results support the finding that an increase in soil pH may promote N mineralization in acidic forest soils. Acidic, basic, and neutral amino acids increased NH_4^+-N production in soil, but had little or no influence on NO_3^--N production and nitrous oxide emission. Soil nitrification was significantly inhibited by the addition of methionine, resulting in the accumulation of NH_4^+-N. Nitrous oxide emission from soil as a whole increased with the addition of methionine. The decrease in SON under the amino acid treatments was more evident under 60% WHC than 90% WHC conditions. The turnover of amino acids in forest soil is very rapid, with NH_4^+-N being the major N form in soil. Nitrogen transformation in forest soil is probably related to the decomposed products of amino acid mineralization, rather than the charge of amino acids. These findings indicate that nitrogen transformation varies with amino acid type, and that the mechanism inhibiting methionine during nitrification needs further research. In conclusion, amino acids might represent the intermediate products between organic nitrogen and mineral nitrogen, regulating nitrogen transformation in forest soils.

Key Words: amino acid; soil moisture content; subtropical forest soil; nitrogen transformation

在森林生态系统中,氮是植物吸收最多的必需营养元素,土壤氮素转化在有机质的分解、土壤供氮能力及有效氮的维持中扮演着重要的角色,强烈影响着森林生产力[1]。除了温度和水分外,外源性 N 素输入也是影响森林土壤氮素转化的关键因子之一,在自然条件下,凋落物归还和氮沉降是森林土壤 N 最主要的来源[2]。已有研究表明,氨基酸是凋落物归还土壤过程中有机氮分解的重要产物,也是大气有机氮沉降的组成部分[3],氨基酸-N 不仅能在土壤中迅速矿化成无机氮,而且与无机氮存在着密切的动态转化关系,对土壤氮素保持和迁移转化过程起重要作用[4],因此在近年来引起了众多学者的关注。

国内外有关氨基酸的研究主要集中在植物对氨基酸的吸收[5-7],及土壤中氨基酸的组成与含量[8-10]等方面,而关于氨基酸对森林土壤氮素转化的影响研究较少。依据 Campbell 等[11]的研究通常把土壤中的氨基酸分为酸性、碱性、中性和含硫氨基酸四大类,由于不同性质氨基酸的 C/N 比、侧链结构、分解速率等存在差异,因此可能会对土壤氮素转化产生差异性的影响,如 Greenwood 等[12]研究发现氨基酸矿化速率与 C/N 存在负相关关系。也有研究发现,当富含 N 的精氨酸被添加到土壤中,能迅速分解产生大量的 NH_4^+-N[13],且 N_2O 的释放与氨基酸矿化直接相关[14]。另外,有研究显示土壤中一种常见的含硫氨基酸(甲硫氨基酸)可显著抑制土壤的硝化作用[15],影响土壤氮的有效性和转化。然而目前仍缺乏相关研究针对以上几大类氨基酸在土壤氮素转化中的差异性做出系统的报道。

基于已有的研究,为了探究常见的四大类氨基酸对酸性森林土壤氮素转化影响的差异性,本研究选取亚热带阔叶林的红壤,设计两种土壤含水量条件(60% WHC 和 90% WHC),并通过添加性质不同的氨基酸开展培养试验,分析土壤中 NH_4^+-N、NO_3^--N、可溶性有机氮(Soluble Organic Nitrogen, SON)含量和 N_2O 释放量的变化,及其与土壤 pH 值、可溶性有机碳(Soluble Organic Carbon, SOC)等可能存在的相互关系,探讨氨基酸-N 影响森林土壤氮素转化的可能机理,以期为定向调控土壤氮素转化过程,提高氮素利用效率并减少其负面效应,维持森林生态系统生产力提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

土壤采自福建省建瓯万木林自然保护区(118°02′—118°09′E, 27°02′—27°03′N),土壤为山地红壤。研究

区属中亚热带季风气候,样地海拔 390 m,坡向 330°,坡度 20°,郁闭度为 0.8,年平均降水量为 731.4 mm,年平均气温 19.4 ℃,相对湿度 81%,全年无霜期达 227 d,植物群落众多,植被以常绿阔叶林为主。乔木层中主要的树种有浙江桂(*Cinnamomum chekiangense*)、假蚊母树(*Distyliopsis dunnii*)、少叶黄杞(*Engelhardtia fenzelii*)、桂北木姜子(*Litsea subcoriace*)等,优势树种为浙江桂(*Cinnamomum chekiangense*)。灌木层比较稀疏,主要有杜茎山(*Maesa japonica*)、薄叶山矾(*Symplocos anomala*)、沿海紫金牛(*Ardisia punctata*)等。而草本层主要有草珊瑚(*Sarcandra glabra*)、飞扬草(*Euporbia hirta*)和狗脊蕨(*Woodwardia japonica*)类等。样地附近 1 km 内没有农业活动,无人为的氮输入[16]。在样地的上、中、下坡随机选取 10 个采样点,采集样地表层(0—15cm)土壤,挑除石块和凋落物,充分混匀土壤带回实验室,过 2 mm 筛,装自封袋保存于 4 ℃冰箱中待用。土壤基本理化性质为:pH 值(4.15 ± 0.01),土壤饱和持水量(673.59 ± 12.43) g/kg,全碳(39.56 ± 0.49) g/kg,全氮(2.80 ± 0.04) g/kg,C/N 比值(14.13 ± 0.27),铵态氮(32.73 ± 1.08) mg/kg,硝态氮(16.06 ± 0.14) mg/kg,亚硝态氮(0.11 ± 0.01) mg/kg,可溶性有机氮(40.76 ± 5.41) mg/kg,速效钾(72.15 ± 4.32) mg/kg,速效磷(2.01 ± 0.06) mg/kg。

1.2　实验处理

选择谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸和甲硫氨酸分别代表酸性、碱性、中性和含硫四类氨基酸,氨基酸的理化性质见表 1。A 组实验设计:实验设计 5 种处理,分别为 CK(对照)、Glu(谷氨酸)、Lys(赖氨酸)、Ala(丙氨酸)和 Met(甲硫氨酸),每种处理 18 个重复。称取相当于烘干土重 30 g 的供试鲜土,装入 300 mL 塑料培养瓶中。将不同种氨基酸配成溶液,取等量(40 mg N /kg)[17]加入土壤,并用蒸馏水调节至土壤饱和持水量(Water-holding Capacity,WHC)的 60%;对照处理为添加等量蒸馏水。密封瓶盖,置于 25 ℃恒温生物培养箱中培养。实验开始后,分别于第 0、2、8、12、16、36 天取样,每次取样随机选取每种处理的 3 个重复,用 50 mL 的注射器抽取土壤顶部空间的 20 mL 气体,推进铝膜气袋(50 mL,大连德霖)中保存,待测 N_2O。每次气体取样后,立即注入 150 mL 0.5 mol/L K_2SO_4溶液浸提土壤(土水比为 1∶5),置于摇床中振荡 1 h(250 r/min),取 40 mL 浸提液离心 10 min(4000 r/min),离心后经 0.45 μm 滤膜过滤,得到的滤液用于无机氮(NH_4^+-N、NO_3^--N)和总可溶性氮(Total Soluble Nitrogen,TSN)以及可溶性有机碳(SOC)的分析。剩余的浸提液用于测定 pH 值。B 组实验设计:将土壤含水量调节至 90% WHC,其他处理与 A 组相同。

表 1　氨基酸基本理化性质

Table 1　The physicochemical characteristics of amino acids

氨基酸名称 Amino acid name	总碳/(g/kg) Total carbon	总氮/(g/kg) Total nitrogen	C/N	分子量 Molecular weight	等电点 Iso-electric Point	侧链结构性质 Side-chain Chemistry
谷氨 *L*-Glutamic acid	408.16	95.24	4.29	147	3.22	含 1 个氨基和 2 个羧基(酸性)
赖氨酸 *L*-Lysine	493.15	191.78	2.57	146	9.74	含 2 个氨基和 1 个羧基(碱性)
丙氨酸 *L*-Alanine	404.49	157.30	2.57	89	6.00	含 1 个氨基和 1 个羧基(中性)
甲硫氨 *L*-Methionine	402.68	93.96	4.29	149	5.74	含 1 个氨基和 1 个羧基(含硫)

1.3　测定方法

土壤含水量用烘干法测定(105 ℃,24 h),土壤饱和持水量用环刀法测定,土壤 pH 值用玻璃电极法测定,土壤可溶性有机碳(SOC)使用重铬酸钾容量法测定[18]。土壤滤液中的 NH_4^+-N 、NO_3^--N 和 TSN,使用连续流动分析仪(SKALAR SAN^{++},荷兰)测定;气体中的 N_2O 浓度用气相色谱仪(GCv2014,日本)测定,载气为 95% Ar-CH_4,流速 30 mL/min,检测器为 ECD,检测器温度 320 ℃,柱温 70 ℃;土壤全碳、全氮用碳氮元素分析仪(Elemantar vario MAX CN,德国)测定。

1.4　计算方法和数据处理

土壤可溶性有机氮含量的计算[19]:

$$SON = TSN - (NH_4^+\text{-}N + NO_3^-\text{-}N)$$

式中 SON 为可溶性有机氮,TSN 为总可溶性氮,NH_4^+-N 为铵态氮,NO_3^--N 为硝态氮(mg/kg)。

土壤 N_2O-N 产生量的计算方法[16]:

$$F = k \cdot v/m \cdot c \cdot 273/(273+T)$$

式中 F 表示气体 N_2O-N 产生量(μg/kg);k 为常数,N_2O-N 取 1.248;v 为培养瓶容量体积(mL);m 为干土重(mg);c 为 N_2O 气体浓度(μl/L);T 为培养温度(℃)。

采用 Excel 2003 和 origin 7.5 对数据进行处理和作图,测定结果均以土壤干重计算。运用 SPSS 18.0 中单因素方差分析(One way ANOVA)中的最小显著差异法(LSD)分析不同处理之间的差异显著性,用曲线估计选择最优拟合方法分析土壤 pH 值和可溶性有机碳与氮素之间的相关性,并采用三因素重复测量方差(氨基酸、含水量与时间为主因素)进行影响因素分析。

2 结果与分析

2.1 不同氨基酸处理土壤铵态氮(NH_4^+-N)特征

由图 1 可知,与 CK 相比,添加氨基酸处理的土壤 NH_4^+-N 含量明显更高,而且不同氨基酸处理对 NH_4^+-N 影响不同并在土壤含水量大小上有所体现。60% WHC 条件下,除了 Ala 在 36 天降低至与 CK 无显著差异外,其他处理均在 36 天达到最大值,且第 2 天后 Glu、Lys、Ala 显著高于 CK($P < 0.05$),Met 显著高于 Lys 和 CK($P < 0.05$)。

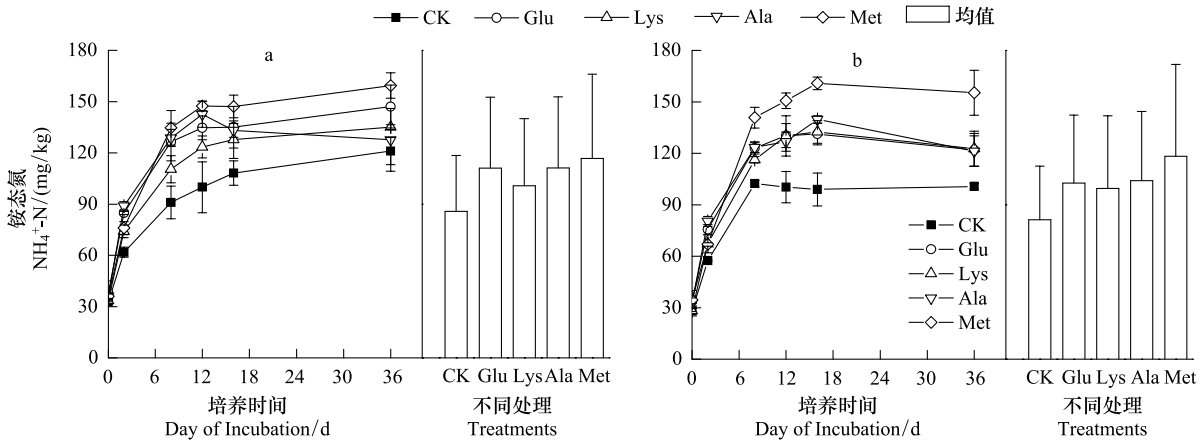


图 1 两种含水量条件下不同氨基酸处理土壤铵态氮的变化

Fig. 1 Dynamics of NH_4^+-N incubated with amino acids under two soil moisture conditions

图例中,CK:对照;Glu:添加谷氨酸处理;Lys:添加赖氨酸处理;Ala:添加丙氨酸处理;Met:添加甲硫氨酸处理;均值:36 天培养时间段内的平均值($n=6$)。a:60% WHC,b:90% WHC。折线图中所有数值均是平均值±标准偏差($n=3$)

当土壤含水量增至 90% WHC,CK 提前在第 8 天达最大值(102.31 mg/kg)且随后略有下降,说明 NH_4^+-N 产生受到一定抑制。与 CK 相比,氨基酸处理的 NH_4^+-N 最大值延长至 16 天。第 8 天后 Glu、Lys、Ala 显著高于 CK($P < 0.05$),而 Met 显著高于 Glu、Lys、Ala($P < 0.05$)并极显著高于 CK($P < 0.01$)。Glu、Lys、Ala 三者之间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 不同氨基酸处理土壤硝态氮(NO_3^--N)特征

从图 2 可知,土壤 NO_3^--N 含量随培养时间延长呈线性增长。60% WHC 条件下,除了第 36 天 Glu、Lys 显著高于 CK($P < 0.05$)外,Glu、Lys、Ala 三者与 CK 差异不显著,且三者之间无显著性差异。而 Met 表现与 Glu、Lys、Ala 截然不同,第 8 天后显著低于 CK($P < 0.05$),分别在第 8、12、16、36 天比 CK 下降了 45.08%、47.55%、47.47%、36.93%。

当土壤含水量增至 90% WHC,各处理的 NO_3^--N 最大值比 60% WHC 时均有所降低,说明 NO_3^--N 产生同

样受到高含水量的抑制。Glu、Lys、Ala 之间无显著差异且仅在第 16 天显著高于 CK。第 8 天后 Met 依然表现为显著低于 CK($P < 0.05$),在第 8、12、16、36 天分别比 CK 下降了 39.16%、69.40%、34.94%、36.79%。

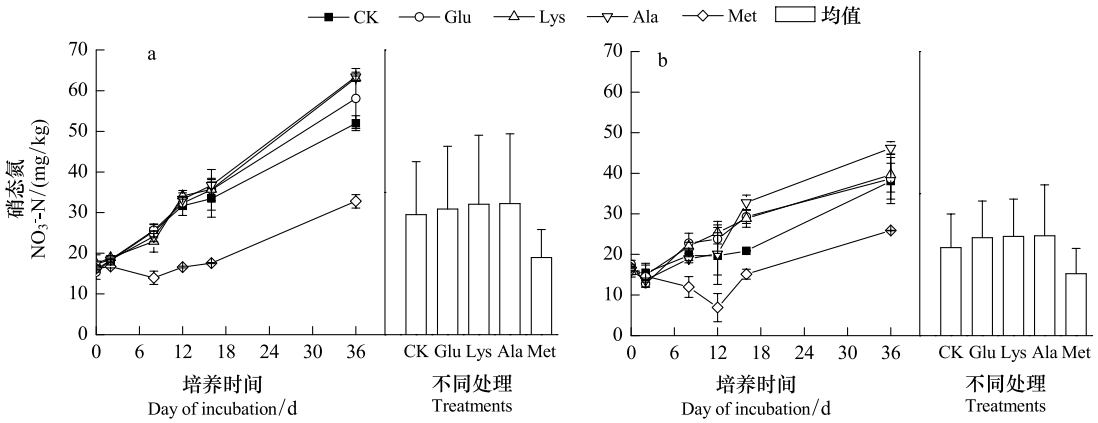


图 2　两种含水量条件下不同氨基酸处理土壤硝态氮的变化

Fig. 2　Dynamics of NO_3^--N incubated with amino acids under two soil moisture conditions

2.3　不同氨基酸处理土壤可溶性有机氮(SON)特征

如图 3 所示,氨基酸添加处理土壤 SON 含量呈先降低后升高趋势。60% WHC 条件下, Glu、Lys、Ala、Met 在第 2 天迅速降低至与 CK 差异不显著,并在第 8 天降至最低且分别比 CK 下降了 14.61%、16.24%、42.95%($P < 0.05$)、84.24%($P < 0.01$)。Glu、Lys、Ala 到 12 天(Met 到 16 天)回升至与 CK 含量相当。除了第 8 天 Ala 显著低于 Glu 和 Lys,Glu、Lys、Ala 三者之间无显著差异。

90% WHC 条件下,Glu、Lys、Ala、Met 同样在第 2 天迅速降低至与 CK 差异无显著,并在 12 天降至最低。除了第 16 天 Met、Ala 显著高于 CK 和 Glu($P < 0.05$),第 2 天后 Glu、Lys、Ala、Met 均与 CK 无显著差异,且 Glu、Lys、Ala 三者之间差异不显著。

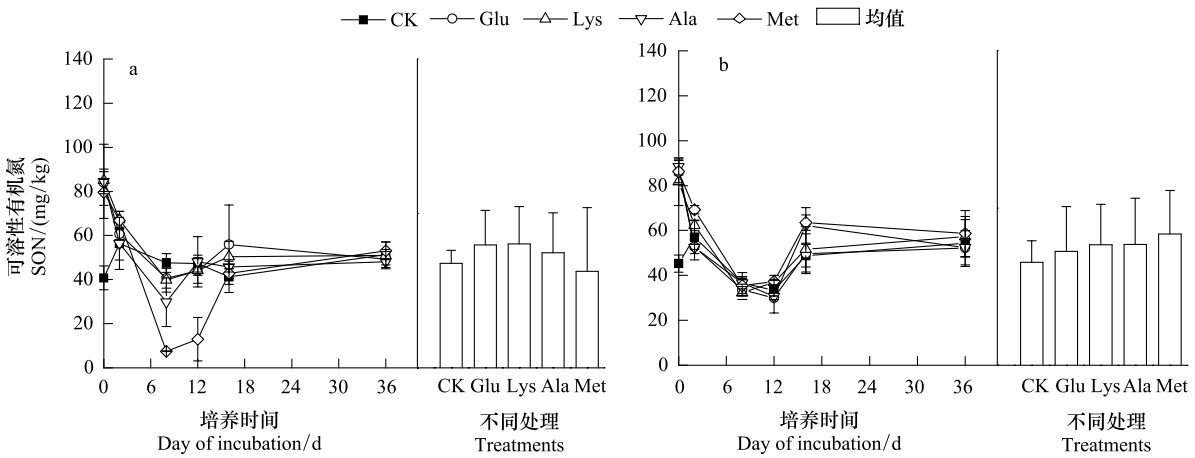


图 3　两种含水量条件下不同氨基酸处理土壤可溶性有机氮的变化

Fig. 3　Dynamics of SON incubated with amino acids under two soil moisture conditions

SON: Soluble Organic Nitrogen

2.4　不同氨基酸处理土壤氧化亚氮(N_2O)排放特征

从图 4 可看出,60% WHC 条件下,土壤 N_2O-N 释放量在第 8 天最大,随后迅速降低,CK、Glu、Lys、Ala、Met 最大值依次为 22.03、22.99、23.46、22.08、16.00 μg/kg。Glu、Lys、Ala 三者与 CK 差异不显著,且三者之间无显著差异。Met 在第 8 天显著低于 CK($P < 0.05$),随后又显著高于 CK($P < 0.05$),然而从 0 至 36 天平均

值看,Met(10.65 μg/kg)大于 CK(8.46 μg/kg),总体上增加了 N_2O 排放的可能性。

当土壤含水量增至 90% WHC,N_2O-N 释放量在第 2 天迅速增至最大值,CK、Glu、Lys、Ala、Met 最大值依次为 273.43、312.99、308.97、399.50、193.12 μg/kg,是 60% WHC 最大值的 100 多倍。Glu、Lys、Ala 三者与 CK 差异不显著,且三者之间无显著性差异。与 CK 相比,Met 表现与 60% WHC 时相似,并在第 36 天降低至与 CK 无显著差异,Met 的 36 天平均值(87.95 μg/kg)仍大于 CK(68.10 μg/kg)。

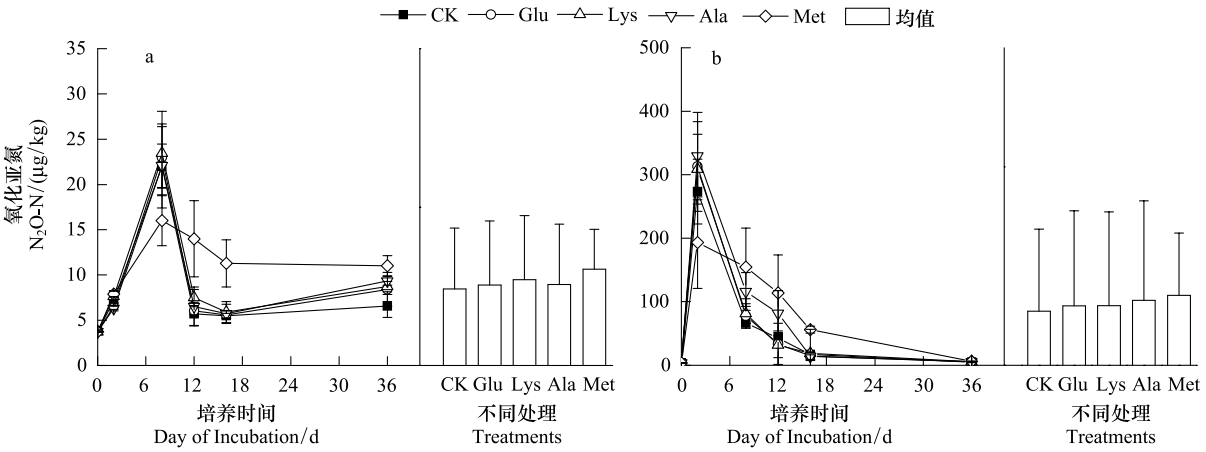


图 4 两种含水量条件下不同氨基酸处理土壤氧化亚氮的变化

Fig. 4 Dynamics of N_2O-N incubated with amino acids under two soil moisture conditions

2.5 土壤 pH 值的变化及其与土壤氮素相关关系

如图 5 结果所示,60% WHC 条件下,从 0 至 12 天土壤 pH 值迅速增大,随后变化平缓。氨基酸添加处理的土壤 pH 值均高于 CK 处理,在第 2 天、12 天、36 天 Glu、Lys、Ala、Met 均与 CK 达到显著差异($P < 0.05$),在各氨基酸处理中 Met 处理的土壤 pH 值较高。90% WHC 条件下,土壤 pH 值在短暂(2 天)的降低后又升高,与 60% WHC 相比变化幅度更大。除第 2 天的 Ala 和第 12 天的 Lys 略低于 CK 外,氨基酸处理的土壤 pH 值均大于 CK 处理,第 8 天后 Met 均显著高于 CK($P < 0.05$),Glu、Lys、Ala 处理之间差异不显著($P > 0.05$)。

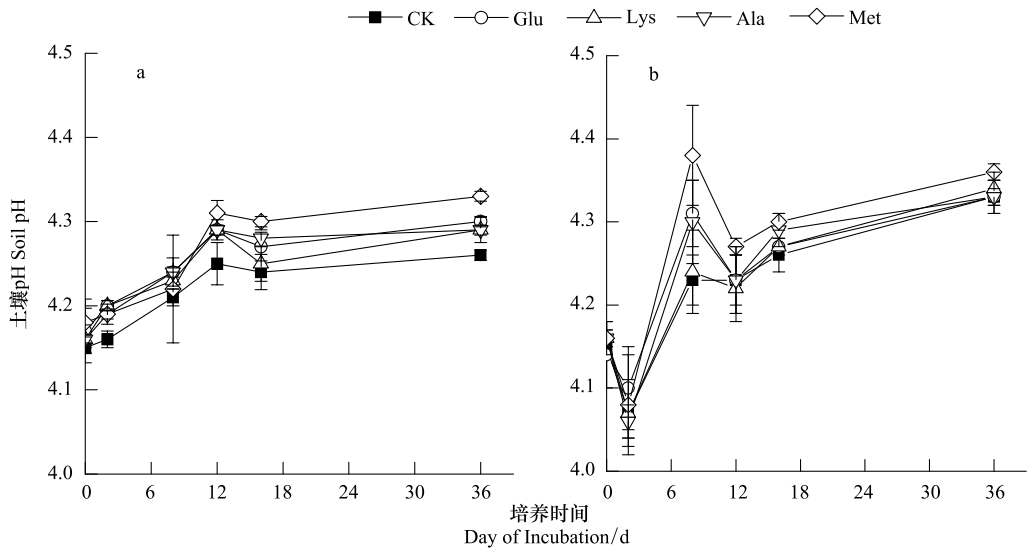


图 5 两种含水量条件下不同氨基酸处理土壤 pH 值的变化

Fig. 5 Dynamics of soil pH incubated with amino acids under two soil moisture conditions

土壤氮素含量和土壤 pH 值的关系采用曲线估计选出最优拟合方法。图 6 结果表明,土壤 pH 值与土壤

NH_4^+-N 含量呈正相关(R^2 = 0.86,60% WHC;R^2 = 0.52,90% WHC),与土壤 NO_3^--N 含量呈正相关(R^2 = 0.36,60% WHC;R^2 = 0.26,90% WHC),与土壤 SON 含量呈负相关(R^2 = 0.21,60% WHC;R^2 = 0.14,90% WHC),而与土壤 N_2O-N 释放量的相关性不明显。

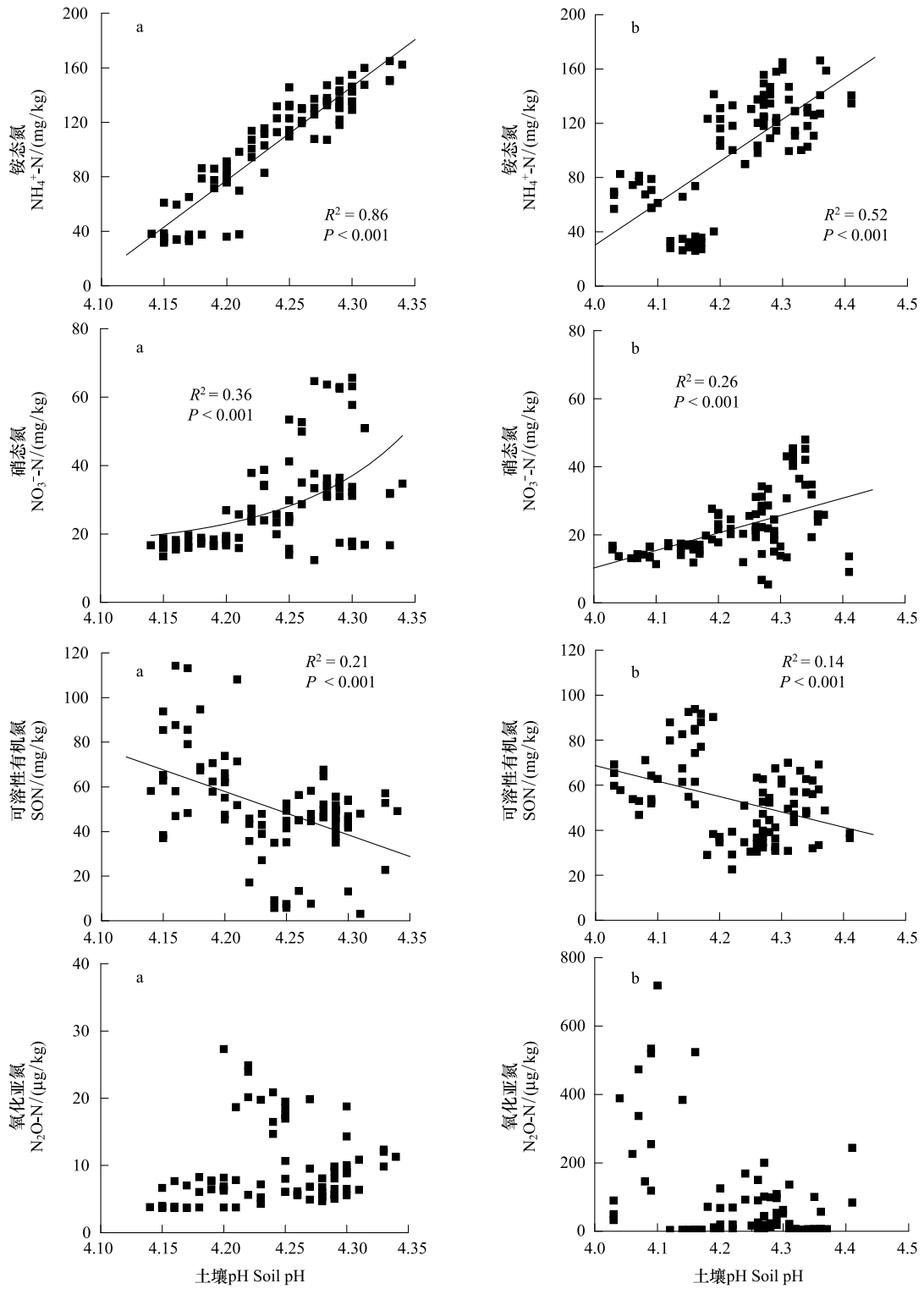


图 6　两种含水量条件下不同氨基酸处理土壤 pH 值与土壤氮素的相关关系

Fig. 6　Relationship between soil pH and soil nitrogen in different soil moisture conditions(a: 60% WHC, b: 90% WHC)

2.6 土壤可溶性有机碳(SOC)的变化

由于土壤 SOC 含量与土壤氮素无明显相关性,在此只对土壤 SOC 含量的变化特征进行分析。从图 7 中可知,在两种土壤含水量条件下,土壤 SOC 含量随时间的变化趋势均为先降低后升高再降低。60% WHC 条件下,Lys、Ala、Met 土壤 SOC 含量在第 8 天均显著大于 CK 处理($P < 0.05$);第 12、16 天氨基酸处理降低为低于 CK 处理。90% WHC 条件下,土壤 SOC 含量在第 12 天最大,在第 8、12 天氨基酸处理均大于 CK 处理且 Ala 与 CK 差异显著($P < 0.05$),第 16 天氨基酸处理均低于 CK 处理,于第 36 天各处理降至最低且无显著差异。

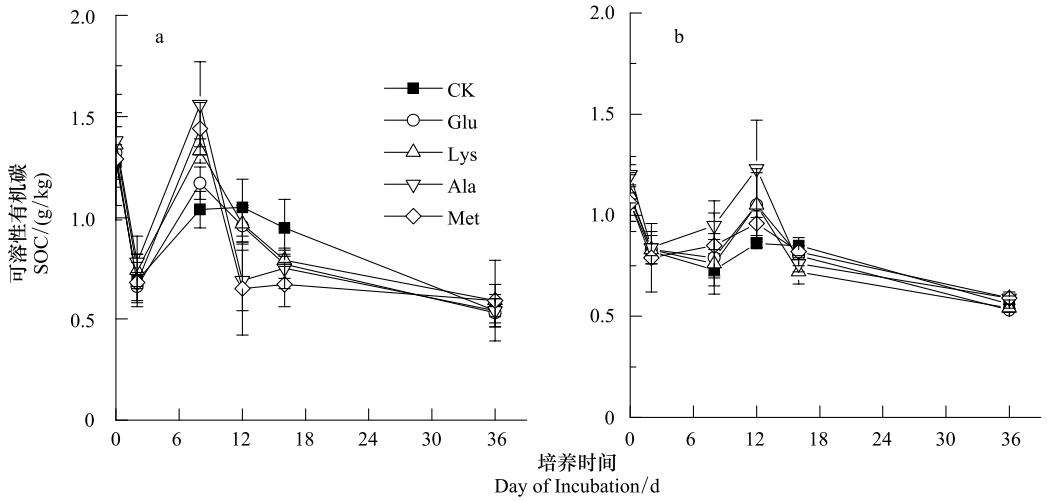


图 7 两种含水量条件下不同氨基酸处理土壤可溶性有机碳的变化

Fig. 7 Dynamics of SOC incubated with amino acids under two soil moisture conditions

SOC: Soluble Organic Carbon

2.7 多因素统计分析

方差分析的结果表明(表 2),土壤无机氮、可溶性有机氮和土壤 pH 值对添加氮的响应敏感。土壤 NH_4^+-N 含量、NO_3^--N 含量、SON 含量以及土壤 pH 值受不同性质氨基酸、培养时间、土壤含水量条件的影响显著,尽管他们都是氮素转化的关键影响因素,但是氨基酸单因素或与培养时间和含水量的交互作用对 N_2O 释放量的影响不显著($P = 0.86$, $P = 0.861$, $P = 0.623$)。此外,土壤 SOC 含量受氨基酸添加的影响也不显著($P = 0.441$)。

表 2 氨基酸、培养时间、土壤含水量对土壤氮素含量和 pH 值以及可溶性有机碳含量影响的重复测量方差分析

Table 2 Results of repeated measures ANOVA on the effects of amino acid N addition, incubation time, soil moisture content and their interactions on soils nitrogen, soil pH and soluble organic carbon

影响因素 Impact factor	铵态氮 NH_4^+-N	硝态氮 NO_3^--N	可溶性有机氮 SON	氧化亚氮 N_2O	土壤 pH 值 Soil pH	可溶性有机碳 SOC
	P	*P*	*P*	*P*	*P*	*P*
氨基酸 Amino acid	<0.001	<0.001	<0.001	0.860	<0.001	0.441
培养时间 Time	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
含水量 Soil moisture content	0.001	<0.001	0.013	<0.001	<0.001	0.003
氨基酸×培养时间 Amino acid×Time	<0.001	<0.001	<0.001	0.65	0.103	0.004
氨基酸×含水量 Amino acid×Soil moisture content	0.039	0.009	<0.001	0.861	0.234	0.354
含水量×培养时间 Soil moisture content×Time	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
氨基酸×培养时间×含水量 Amino acid×Time×Soil moisture content	0.230	0.010	<0.001	0.623	0.014	0.105

3　讨论

3.1　氨基酸添加对土壤氮素含量及转化的影响

氮输入是影响土壤氮素转化的关键因素,可通过改变土壤矿质氮含量、土壤 pH 值、微生物组成、C/N 比值等作用于土壤氮循环过程[20],并在不同氮形态上有不同体现。本研究结果显示,添加氨基酸显著增加了亚热带森林红壤 NH_4^+-N 含量(图 1),Jones 等[17]对加拿大温带针叶林的研究也得出了相似的结果。在 90% WHC 条件下氨基酸处理使土壤 NH_4^+-N 含量显著高于对照处理且其最大值延长至 16 天(图 1),说明氨基酸添加处理在一定程度上解除了高含水量对 NH_4^+-N 产生的抑制。结果还发现氨基酸添加处理增大了土壤 pH 值(图 5),陶运平等[21]在氮添加研究中发现土壤 pH 值上升是由于尿素和硫代硫酸铵水解时产生大量的铵所致,因此氨基酸在水解过程中产生大量的 NH_4^+-N 可能是土壤 pH 值升高的主要原因。通常认为酸性土壤 pH 值升高可增加土壤有机质的可溶性,为微生物活动提供了大量的碳、氮基质,从而促进了土壤氮矿化[22],产生更多的铵态氮,因此本研究中土壤 pH 值与 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 含量呈正相关关系($P < 0.001$)(图 6),且土壤 NH_4^+-N 含量较高的甲硫氨基酸处理的土壤 pH 值也高于其他处理(图 5)。还有研究表明,氨基酸甚至不需要经过微生物过程,可单纯通过土壤中 Mn 矿物的化学氧化作用矿化成 NH_4^+-N 并释放 CO_2[23],这可能是 90% WHC 条件下对照处理土壤 NH_4^+-N 于第 8 天不再增加而氨基酸处理仍然有较高 NH_4^+-N 含量的原因。

本文结果发现,从第 0 至 2 天氨基酸处理的土壤 SON 含量大幅度降低(图 3),土壤中氮素由 SON 转化成 NH_4^+-N 为主(图 1,图 3),表明氨基酸在土壤中迅速发生矿化,Hobbie 等[24]研究认为氨基酸在土壤中迅速转化主要与异养微生物通过吸收氨基酸分子增大活性有关。有研究表明氨基酸能经过特殊通道被吸收进入微生物细胞[25],可被土壤微生物直接吸收和同化[26]。本文中氨基酸的加入被土壤微生物直接吸收利用的同时,并在培养前期增加了土壤可利用性碳、氮含量(图 7,图 3),可能增大了微生物活性并作用于土壤氮素转化过程,从而表现为 60% WHC 条件下第 2 至 12 天氨基酸处理土壤 SON 含量低于对照处理(图 3),在一定程度上促进了土壤有机氮库向无机氮库转化。但在 90% WHC 条件下添加氨基酸对土壤 SON 含量影响并不显著(图 3),可能是因为高含水量限制了氧气传输导致土壤产生厌氧环境并不适合异养微生物的有氧活动[27],添加的氨基酸被矿化为无机氮后,其土壤 SON 含量与对照处理保持相对一致。有研究表明蛋白质转化为 NH_4^+-N 的速度大大低于氨基酸转化为 NH_4^+-N[17],可见氨基酸-N 相对于土壤中的大分子有机氮组分而言具有优先被矿化的特性,说明一些森林土壤氮矿化受限不是氨基酸转化为 NH_4^+-N 受限,而是因为蛋白质转化氨基酸在一定程度上受阻。因此,氨基酸-N 在土壤氮素转化中扮演着重要的角色。

虽然氨基酸处理显著增加了土壤铵态氮含量,但是酸性、碱性、中性氨基酸添加对土壤 NO_3^--N 影响并不显著(图 2),这可能与森林酸性土壤硝化作用较低而氨化作用占主导的特性有关,如 Kielland 等[28]研究发现氨基酸和多肽转化为 NH_4^+-N 迅速,随后的 NH_4^+-N 转化为 NO_3^--N 则很慢。但随培养时间延长,氨基酸处理土壤的 NO_3^--N 含量有逐渐高于对照处理的趋势,如 60% WHC 条件在第 36 天谷氨酸、赖氨酸处理开始显著高于对照处理,90% WHC 条件则在第 16 天谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸处理高于对照处理,说明 36 天或更长时间之后氨基酸处理土壤累积的 NH_4^+-N 可能会逐渐转化为 NO_3^--N 并将维持在一个相对平衡的状态。本研究还发现,与酸性、碱性和中性氨基酸处理不同的是甲硫氨基酸处理显著降低了土壤 NO_3^--N 含量(图 2),抑制了土壤硝化作用,Quastel 等[15]对中性和偏碱性土壤的研究也得出相同结果,说明甲硫氨基酸对酸性森林土壤也有类似的影响,可能的原因是甲硫氨基酸的分解产物在起作用,如二硫化碳、二甲基硫醚等均可对土壤氨单加氧酶(Ammonia monooxygenase, AMO)或羟胺氧化还原酶(Hydroxylamine oxidoreductase, HAO)产生毒性[29],阻碍了土壤 NH_4^+-N 向 NO_3^--N 转化,从而导致土壤 NH_4^+-N 累积,表现为第 8 天之后甲硫氨基酸处理的土壤 NH_4^+-N 含量最高(图 1)。本文结果还表明在土壤硝化作用较弱的条件下(90% WHC),甲硫氨基酸对土壤 NO_3^--N 的抑制程度也有所降低(图 2)。

有研究发现氨基酸在土壤中发生矿化及随后向土壤释放无机氮促进了土壤 N_2O 产生和排放[14]，Avrahami 等[30]的研究也发现土壤 N_2O 释放速率与 NH_4^+-N 浓度呈正相关关系，NH_4^+-N 的添加显著增大了 N_2O 的释放。但本研究结果显示，酸性、碱性、中性氨基酸处理虽然显著增加了土壤 NH_4^+-N 含量，却没有对土壤 N_2O 释放产生显著影响(图 4，表 2)，这可能与酸性、碱性、中性氨基酸处理未对土壤 NO_3^--N 产生显著性影响存在直接的因果联系。在森林酸性土壤中反硝化过程是 N_2O 产生和释放的主要途径[31]，且 NO_3^--N 是土壤反硝化的反应底物和电子受体，由于氨基酸处理土壤获得的 NO_3^--N 含量与对照处理无显著差异，因此其对 N_2O 的释放也未产生显著影响。本文结果还发现，甲硫氨基酸在培养前期抑制土壤 N_2O 产生而在培养后期促进 N_2O 释放，可能是由于甲硫氨基酸显著抑制了土壤 NO_3^--N 产生，减少了土壤反硝化的反应底物，因此在培养前期 N_2O 释放量低于其他处理 ，随后甲硫氨基酸可经微生物作用分解产生大量乙烯(C_2H_4)[32]，乙烯的形成需要消耗氧气使土壤形成厌氧环境更利于 N_2O 产生、释放，从而表现为培养后期 N_2O 释放量高于对照处理(图 4)。虽然甲硫氨基酸在前期有一定的抑制作用，但总体上对 N_2O 产生释放有一定的促进。90% WHC 条件下土壤 N_2O 释放量最大值是 60% WHC 时的 100 多倍(图 4)，说明高含水量条件下的相对厌氧环境更利于反硝化作用生成 N_2O。

3.2 氨基酸理化性质与土壤氮素转化的关系

有研究表明，小分子量和低 C/N 比的氨基酸更容易土壤固体吸附和矿化[33]，这可能是丙氨酸处理土壤的 NH_4^+-N 含量在第 12 天(60% WHC)之后开始出现下降的原因。由于侧链结构存在差异，酸性、碱性、中性氨基酸的不同带电性可能在影响氮素转化中有不同的表现，如 Vinolas 等[34]研究发现带正电性的氨基酸(如赖氨酸)可被土壤中阳离子交换位有力吸附，而带中性的甘氨酸和带负电性的谷氨酸则相反。然而本研究结果显示，侧链结构上氨基和羧基数不同且带电性不同(表 1)的氨基酸(Glu、Lys、Ala)处理之间对土壤 NH_4^+-N、NO_3^--N 和 N_2O 的影响差异很小(图 1，图 2，图 4)，说明氨基酸对酸性森林土壤氮素转化的影响可能与其带电性关系不大。Rothstein[35]的研究就发现氨基酸-N 被土壤固体颗粒吸附的特性与带电性显著相关，而氨基酸矿化则与电压极性(polar)相关。另一方面，丙氨酸和甲硫氨基酸在侧链结构上含氨基和羧基数相同且等电点相近(6.00 和 5.74，表 1)，而它们对土壤 NH_4^+-N、NO_3^--N、N_2O 的影响却表现出很大差异，基于甲硫氨基酸的分解产物对土壤硝化和反硝化过程产生的一系列影响，结果表明氨基酸对土壤氮素转化的影响很可能与氨基酸的分解产物密切相关，这为森林土壤氮素转化研究提供了有效的补充。

4 结论

性质不同的氨基酸对亚热带森林土壤氮素含量和转化造成不同程度的影响。氨基酸在土壤中矿化迅速，显著增加了土壤 NH_4^+-N 含量并使土壤 pH 值升高，即使在 90% WHC 条件下仍然具有较高的矿化能力，显著增大了土壤氮的有效性。酸性、中性、碱性氨基酸对土壤 NO_3^--N 含量和 N_2O 释放影响较小，更有利于土壤的氮固持，相对而言对生态环境较为友好。而甲硫氨基酸则显著抑制了土壤硝化作用，并在一定程度上促进了 N_2O 的排放。理化性质不同的酸性、中性、碱性氨基酸在土壤中表现相似，而与含硫氨基酸差异较大，氨基酸对酸性森林土壤氮素转化的影响可能与带电性无关，氨基酸的分解产物则可能成为调节土壤氮素转化的关键因子。目前，甲硫氨基酸抑制土壤硝化作用、促进土壤矿化的具体机理仍未得到清楚认识，仍需今后深入研究。

参考文献(References)：

[1] LeBauer D S, Treseder K K. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. Ecology, 2008, 89(2): 371-379.

[2] 陈伏生, 曾德慧, 何兴元. 森林土壤氮素的转化与循环. 生态学杂志, 2004, 23(5): 126-133.

[3] 郑利霞, 刘学军, 张福锁. 大气有机氮沉降研究进展. 生态学报, 2007, 27(9): 3828-3834.

[4] Rothstein D E. Soil amino-acid availability across a temperate-forest fertility gradient. Biogeochemistry, 2009, 92(3): 201-215.

[5] Kielland K. Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. Ecology, 1994, 75(8): 2373-2383.
[6] Finzi A C, Berthrrong S T. The uptake of amino acids by microbes and trees in three cold-temperate forests. Ecology, 2005, 86(12): 3345-3353.
[7] Miller A E, Bowman W D, Suding K N. Plant uptake of inorganic and organic nitrogen: neighbor identity matters. Ecology, 2007, 88(7): 1832-1840.
[8] Werdin-Pfisterer N R, Kielland K, Boone R D. Soil amino acid composition across a boreal forest successional sequence. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(6): 1210-1220.
[9] Senwo Z N, Tabatabai M A. Amino acid composition of soil organic matter. Biology and Fertility of Soils, 1998, 26(3): 235-242.
[10] 李世清, 李生秀, 杨正亮. 不同生态系统土壤氨基酸氮的组成及含量. 生态学报, 2002, 22(3): 379-386.
[11] Campbell C A, Zentner R P, Knipfel J E, Sohnitzer M, Lafond G P. Thirty-year crop rotations and management practices effects on soil and amino nitrogen. Soil Science Society of America Journal, 1991, 55(3): 739-745.
[12] Greenwood D J, Lees H. Studies on the decomposition of amino acids in soils. Plant and Soil, 1956, 7(3): 253-268.
[13] Jones D L, Kielland K. Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soils. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(2): 209-219.
[14] Mclain J E T, Martens D A. Nitrous oxide flux from soil amino acid mineralization. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(2): 289-299.
[15] Quastel J H, Scholefield P G. Influence of organic nitrogen compounds on nitrifications in soil. Nature, 1949, 164(4182): 1068-1072.
[16] 陈仕东, 马红亮, 高人, 闫聪微, 尹云锋, 杨玉盛. 高氮和 NO_2^- 对中亚热带森林土壤 N_2O 和 NO 产生的影响. 土壤学报, 2013, 50(1): 120-129.
[17] Jones D L, Kielland K. Amino acid, peptide and protein mineralization dynamics in a taiga forest soil. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 55: 60-69.
[18] 张万儒, 杨光澄, 屠星南. 森林土壤分析方法. LY/T 1210-1999. 北京: 中国标准出版社, 1999.
[19] Yang K, Zhu J J, Yan Q L, Zhang J X. Soil enzyme activities as potential indicators of soluble organic nitrogen pools in forest ecosystems of Northeast China. Annals of Forest Science, 2012, 69(7): 795-803.
[20] 李贵才, 韩兴国, 黄建辉, 唐建维. 森林生态系统土壤氮矿化影响因素研究进展. 生态学报, 2001, 21(7): 1187-1195.
[21] 陶运平, Adams W A. 硫代硫酸铵对土壤硝化作用的影响. 土壤学报, 1997, 34(4): 467-474.
[22] Curtin D, Campbell C A, Jalil A. Effects of acidity on mineralization: pH-dependence of organic matter mineralization in weakly acidic soils. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(1): 57-64.
[23] Sherigara B S, Bhat K I, Pinto I, Gowda N M M. Oxidation of L-aspartic acid and L-glutamic acid by manganese(III) ions in aqueous sulfuric acid, acetic acid, and pyrophosphate media: A kinetic study. International Journal of Chemical Kinetics, 1995, 27(7): 675-690.
[24] Hobbie J E, Hobbie E A. Amino acid cycling in plankton and soil microbes studied with radioisotopes measured amino acids in soil do not reflect bioavailability. Biogeochmistry, 2012, 107(1-3): 339-360.
[25] Anraku Y, Kin E, Tanaka Y. Transport of sugars and amino acids in bacteria XV. Comparative studies on the effects of various energy poisons on the oxidative and phosphorylating activities, and energy coupling reactions for the active transport systems for amino acids in *E. coli*.. The Journal of Biochemistry, 1975, 78(1): 165-179.
[26] Kay W W, Gronlund A F. Transport of aromatic amino acids by *pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 1971, 105(3): 1039-1046.
[27] Skopp J, Jawson M D, Doran J W. Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. Soil Science Society of America Journal, 1990, 54(6): 1619-1625.
[28] Kielland K, Olson K, Ruess R W, Boone R D. Contribution of winter processes to soil nitrogen flux in taiga forest ecosystems. Biogeochemistry, 2006, 81: 340-360.
[29] Juliette L Y, Hyman M R, Arp D J. Inhibition of ammonia oxidation in *nitrosomonas europaea* by Sulfur compounds: thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(11): 3718-3727.
[30] Avrahami S, Conrad R, Braker G. Effect of soil ammonium concentration on N_2O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5685-5692.
[31] Wolf I, Brumme R. Dinitrogen and nitrous oxide formation in beech forest floor and mineral soils. Soil Science Society of America Journal, 2003, 67(6): 1862-1868.
[32] Arshad M, Hussain A, Javed M, Frankenberger Jr W T. Effect of soil applied L-methionine on growth, nodulation and chemical composition of *Albizia lebbeck* L. Plant and Soil, 1993, 148(1): 129-135.
[33] Bonde T A, Nielsen T, Miller M, Sørensen J. Arginine ammonification assay as a rapid index of gross N mineralization in agricultural soils. Biology and Fertility of Soils, 2001, 34(3): 179-184.
[34] Vinolas L C, Healey J R, Jones D L. Kinetics of soil microbial uptake of free amino acids. Biology and Fertility of Soils, 2001, 33(1): 67-74.
[35] Rothstein D E. Effects of amino-acid chemistry and soil properties on the behavior of free amino acids in acidic forest soils. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(10): 1743-1750.