

DOI: 10.5846/stxb201608181684

周嘉聪, 刘小飞, 郑永, 纪宇旒, 李先锋, 徐鹏程, 陈岳民, 杨玉盛. 氮沉降对中亚热带米楮天然林微生物生物量及酶活性的影响. 生态学报, 2017, 37(1): - .

Zhou J C, Liu X F, Zheng Y, Ji Y H, Li X F, Xu P C, Chen Y M, Yang Y S. Effects of nitrogen deposition on soil microbial biomass and enzyme activities in *Castanopsis carlesii* natural forests in subtropical regions. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(1): - .

氮沉降对中亚热带米楮天然林微生物生物量及酶活性的影响

周嘉聪^{1,2}, 刘小飞^{1,2}, 郑永^{1,2}, 纪宇旒^{1,2}, 李先锋^{1,2}, 徐鹏程^{1,2}, 陈岳民^{1,2,*}, 杨玉盛^{1,2}

1 福建师范大学地理科学学院, 福州 350007

2 湿润亚热带山地生态国家重点实验室培育基地, 福州 350007

摘要: 氮沉降对土壤微生物的扰动可能会影响土壤的养分循环, 然而关于中亚热带天然林土壤微生物及酶活性对氮沉降的响应鲜有报道。通过 3 a 的氮沉降模拟实验, 研究中亚热带米楮天然林土壤的理化性质、土壤微生物量及土壤酶活性的响应。结果表明: 氮沉降并未引起土壤的有机碳和总氮显著性变化; 高氮 ($80 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$) 处理下, 土壤 pH 下降, 出现酸化现象; 低氮 ($40 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$) 处理促进淋溶层 (A 层) 中土壤纤维素分解酶 (β -葡萄糖苷酶和纤维素水解酶) 和木质素分解酶 (多酚氧化酶和过氧化物酶) 活性升高, 同时促进土壤微生物生物量碳、氮的积累。冗余分析 (RDA) 表示, 可溶性有机碳 (DOC) 是驱动 A 层土壤酶活性的重要环境因子; 而在淀积层 (B 层), 这 4 种酶活性并未发生显著性差异。施氮处理后, A、B 层中土壤的酸性磷酸酶活性增加 ($P < 0.05$)。研究表明: 低水平氮沉降增加了土壤微生物生物量碳氮含量以及土壤有机碳分解相关酶活性, 从而加速了土壤碳周转; 这为未来氮沉降增长情景下, 探索中亚热带天然林土壤碳源汇问题提供了依据。

关键词: 氮沉降; 微生物生物量; 酶活性; 米楮天然林

Effects of nitrogen deposition on soil microbial biomass and enzyme activities in *Castanopsis carlesii* natural forests in subtropical regions

ZHOU Jiacong^{1,2}, LIU Xiaofei^{1,2}, ZHENG Yong^{1,2}, JI Yuhuang^{1,2}, LI Xianfeng^{1,2}, XU Pengcheng^{1,2}, CHEN Yuehmin^{1,2,*}, YANG Yusheng^{1,2}

1 School of Geographical Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

2 Cultivation Base of State Key Laboratory of Humid Subtropical Mountain Ecology, Fuzhou 350007, China

Abstract: Anthropogenic nitrogen (N) enrichment is a concern worldwide, as it affects almost every aspect of ecosystem function and composition, particularly soil microbial communities that control soil organic matter (SOC) and nutrient turnover. Although many long-term nitrogen addition experiments have been conducted, there are still no conclusions about how microorganisms respond to nitrogen deposition, especially in mid-subtropical natural forests. Assays for soil microbial biomass and enzyme activity have become a common methodology for studying soil function in response to global environmental changes and disturbances. Between 2012 and 2015, we stimulated nitrogen deposition in a *Castanopsis carlesii* natural forest in Sanming Fujian Province in subtropical China. Soils were collected from four control plots (CT), four low-nitrogen addition plots (LN), and four high-nitrogen addition plots (HN). We studied the physicochemical properties of

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31130013) 和“973”计划 (2014CB954003)

收稿日期: 2016-08-18; 修订日期: 2016-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ymchen@fjnu.edu.cn

the soil; soil microbial C, N, and P biomasses; and potential activity of six enzymes in response to 3 years of nitrogen deposition. The results showed that nitrogen deposition had little impact on SOC and total nitrogen content. The HN treatment significantly decreased the pH and acidified the soil. Cellulose hydrolysis enzymes (β -glucosidase (β G) and cellobiohydrolase (CBH)) and lignin oxidases enzymes (phenol oxidase (PHO) and peroxidase (PEO)) showed a significant response to the LN treatment in the A horizon. Similarly, the LN treatment promoted microbial biomass carbon (MBC) and nitrogen (MBN) in the A horizon. Redundancy analysis (RDA) showed that dissolved organic carbon (DOC) greatly accounted for the variation in soil enzyme activities in the A horizon. However, it did not reveal any significant differences in cellulose hydrolysis and lignin oxidases in the B horizon. Moreover, nitrogen deposition promoted acid phosphatase activities in the two soil horizons. In summary, the LN treatment accelerated soil carbon turnover, promoting soil carbon mineralization. This may provide a theoretical basis for assessing whether mid-subtropical natural forest soil will become a carbon sink or source in an N-deposition background.

Key Words: nitrogen deposition; microbial biomass; enzyme activities; *Castanopsis carlesii* natural forest

由于化石燃料与农业化肥的使用,使得大量的活性 N 进入大气^[1],与工业革命初期相比,其氮沉降量增长了近 2 倍,预计到 2050 年,许多地区氮沉降量会再翻一番^[2]。当前,我国继欧洲,美国之后成为世界三大高氮区之一,尤其在工业化和农业集约化程度高的华北、东南和西南地区^[3]。土壤微生物是土壤有机质和养分转化和循环的动力,土壤酶直接参与土壤生态系统的 C、N、P 等许多重要的生态过程。因此,氮沉降背景下,可能首先影响土壤微生物的活性及其反馈方式,进而影响生态系统的结构和功能。

当前,氮沉降的研究主要开展于欧洲与北美的北方森林与温带森林,对于热带与亚热带的研究较少^[4],由于热带与亚热带的养分循环较快,对氮沉降的响应可能更加剧烈。当前温带森林关于酶活性的研究结果取得一定进展:施氮促进水解酶的活性,但是氧化酶则表现出促进、无影响或抑制多种结果^[5-8]。Treseder 和 Vitousek^[9]研究表明土壤养分有效性的不同可能是各地研究结果差异的主要原因。而对于氮限制的北方森林和温带森林,提高土壤氮的有效性将显得至关重要。许多研究表明,氮的有效性将会影响酶活性,进而改变凋落物及土壤有机质的分解速率^[10-11]。然而,相比于温带森林,亚热带森林土壤的有效氮相对富集^[12]。持续氮沉降,可能会造成土壤氮饱和现象而产生抑制土壤微生物活性的现象。并且,磷限制问题可能在亚热带地区更加突出,其限制作用可能随着氮的添加而加剧^[13]。因此,土壤微生物酶活性对氮沉降的响应结果及机制可能不同于温带。

我国中亚热带地区,由于其雨水充沛,森林群落种类丰富,是全球同纬度地带上的“绿洲”,有着旺盛的能量转化和物质循环的能力,以及极强的生物生产力与生态效应,是全球碳循环重要的组成部分^[14]。氮沉降对土壤微生物的扰动必将会影响中亚热带土壤的养分循环,然而关于中亚热带天然林土壤微生物对氮沉降的响应鲜有报道。因此,本试验以米楮天然林为样地,探究土壤微生物量和土壤酶活性对长期氮沉降的响应情况,为氮沉降背景下中亚热带天然林的土壤养分循环的响应提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究地位于福建省三明格氏栲自然保护区(26°11'N, 117°28'E)内,样地海拔为 315 m,年均气温 19.4℃,年均降雨量 1700 mm(主要集中在 3—8 月份),年均蒸发量 1585 mm,相对湿度 79%,属于中亚热带季风气候,土壤为黑云母花岗岩发育的红壤。群落植物种类丰富且分层明显。其中乔木主要有米楮(*Castanopsis carlesii*)、木荷(*Schima superba*)、马尾松(*Pinus massoniana*)、虎皮楠(*Daphniphyllum oldhami*)等,且优势种为米楮。

1.2 试验设计

2012年11月,在米楮天然林内选取坡面平坦且一致的地段设置氮沉降长期试验样地,包括对照(CT)、低氮(LN)和高氮(HN)3种施氮处理,每个处理4个重复,共设置了12块大小为10 m×10 m的样地,各样地间相隔在10 m左右。

氮沉降处理:在12块样地内,以三明地区年平均氮沉降量(36.2 kg ha⁻² a⁻¹)为参考值,设置CT(0 kg ha⁻² a⁻¹)、LN(40 kg ha⁻² a⁻¹)和HN(80 kg ha⁻² a⁻¹),施氮采用NH₄NO₃(分析纯),溶于20 L去离子水中,每月月初以溶液的形式在样方内均匀喷洒,全年分12次模拟氮沉降。对照处理喷洒等量去离子水以减少因外加水对生物地球化学循环的影响。

1.3 土壤样品采集

2016年1月,在12个样方内按照“S”型随机设置5个取样点,去除表面凋落物,按土壤的发生层划分为淋溶层(A层),取土深度约为8 cm;淀积层(B层),取土深度约为8—20 cm层,用土钻钻取。将采集的土壤迅速带回实验室,迅速用冰块冷藏带回实验室,去除可见根系等动植物残体,一部分样品置于4℃冰箱中保存,用于微生物生物量、土壤酶活性的测定;另一部分土壤室温风干保存,用于测定土壤有机碳等基本理化指标。

1.4 测定指标及方法

土壤有机碳、全氮用碳氮元素分析仪(Elementar Vario EL III, Elementar, 德国)测定,土壤pH通过玻璃电极pH计(STARTER 300, OHAUS, 美国)测定,水土比为2.5:1,土壤矿质氮测定,称取5g鲜土加入20 mL 2 mol/L KCl进行浸提,振荡离心后,上清液经定量滤纸过滤,用连续流动分析仪(Skalar san++, Skalar, 荷兰)测定滤液中的NH₄⁺-N、NO₃⁻-N^[15]。土壤DOC测定,用去离子水浸提5g鲜土,水土比为4:1,振荡离心后,经0.45 μm滤膜抽滤,用总有机碳分析仪(TOC-VCPH/CPN, Shimadzu, 日本)测定滤液中有机碳含量。土壤DON测定,取5g鲜土加入20 mL 0.5 mol/L K₂SO₄,振荡0.5 h后4000r/min离心10 min,经定量滤纸过滤,用连续流动分析仪(Skalar san++, Skalar, 荷兰)测定滤液中的TN、NH₄⁺-N和NO₃⁻-N,其计算公式为:DON = TN - NH₄⁺-N - NO₃⁻-N^[16]。

微生物量碳、氮采用氯仿熏蒸-硫酸钾浸提法^[17],用总有机碳分析仪(TOC-VCPH/CPN, Shimadzu, 日本)测定提取液中有机碳含量,用连续流动分析仪(Skalar san++, Skalar, 荷兰)测定总氮含量。土壤微生物磷采用氯仿熏蒸-NaHCO₃浸提法^[18],用连续流动分析仪测定磷酸根含量。土壤微生物量碳计算公式: $B_C = \Delta E_C / k_C$,式中: ΔE_C 为熏蒸与未熏蒸土壤有机碳含量的差值, k_C 为转换系数,取值0.38。土壤微生物量氮计算公式: $B_N = \Delta E_N / k_N$,式中: ΔE_N 为熏蒸与未熏蒸土壤有机氮含量的差值, k_N 为转换系数,取值0.45;土壤微生物量磷计算公式为: $B_P = \Delta E_P / k_P$, ΔE_P 为熏蒸与未熏蒸土壤磷含量的差值,转换系数 k_P 取值0.4。

微生物熵按照Anderson等^[19]的方法计算,即微生物量碳(MBC)与有机碳(SOC)的比值。

土壤酶活性参照Saiya-Cork和Sinsabaugh^[7]的方法提取和培养土壤中6种与碳、氮、磷循环相关的水解酶和氧化酶。方法如下:取1g新鲜土壤,用125 mL 50 mmol/L的醋酸盐缓冲液(pH=5)提取,用磁力搅拌器搅拌5 min使其均质化,用移液器取200 μL移于96孔微孔板。

用伞形酮(MUB)作为底物标示水解酶活性,用L-二羟苯丙氨酸(DOPA)为底物标示氧化酶活性。微平板置于暗环境下经过20℃恒温培养后,用多功能酶标仪(SpectraMax M5, Molecular Devices, 美国)测定其荧光度(水解酶)或吸光度(氧化酶)。6种土壤酶的名称、缩写、类型及所用标定底物见表1。各种酶都通过预实验确定获得最大酶活性所需要的底物浓度和培养时间。

1.5 数据分析

用Excel 2013和SPSS 19.0软件对数据进行处理。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和LSD进行显著性检验;采用Canoco Software 5.0软件,以6种酶活性为响应变量进行主成分分析(PCA);以6种酶活性为响应变量,同时以土壤基本理化性质及微生物生物量为解释变量做冗余分析(RDA);绘图由Origin 9.0软

件完成。

2 结果

2.1 土壤基本理化性质

经过3年的氮沉降模拟实验,处理间的土壤有机碳、总氮均无显著性差异(表2)。施氮后土壤pH均有变小的趋势,但只有在A层土壤达到差异显著性。高氮处理显著提高了B层土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度($P < 0.05$)。A层土壤中,低氮处理的可溶性有机碳(DOC)的浓度为66.80 mg/kg,显著高于其他两个处理。可溶性有机氮(DON)浓度则随着施氮量的增加而上升,HN与CT之间差异达到显著水平($P < 0.05$)。

表1 土壤酶活性的种类、缩写、类型和所用底物

Table 1 The abbreviations, type and substrates of soil enzyme

| 酶 Enzyme | 缩写 Abbreviation | 类型 Type | 底物 Substrate |
|------------------------------|-----------------|------------------------|--|
| β -葡萄糖苷酶 | βG | C-targeting hydrolytic | 4-MUB- β -D-glucoside |
| 纤维素水解酶 | CBH | C-targeting hydrolytic | 4-MUB- β -D-cellobioside |
| 多酚氧化酶 | PHO | C-targeting oxidase | L-DOPA |
| 过氧化物酶 | PEO | C-targeting oxidase | L-DOPA |
| β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(几丁质降解酶) | NAG | N-targeting hydrolytic | 4-MUB-N-acetyl- β -D-glucosaminide |
| 酸性磷酸酶 | ACP | P-targeting hydrolytic | 4-MUB-phosphate |

表2 氮沉降对土壤理化性质的影响

Table 2 Effects of nitrogen deposition on physicochemical properties of the soil

| 土层 Soil horizon | 处理 Treatments | 土壤有机碳 SOC/ (g/kg) | 总氮 Total N/ (g/kg) | 酸碱度 pH | 铵态氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}/$ (mg/kg) | 硝态氮 $\text{NO}_3^-\text{-N}/$ (mg/kg) | 可溶性有机碳 DOC/ (mg/kg) | 可溶性有机氮 DON/ (mg/kg) |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|---|---|---------------------------|---------------------------|
| A | 对照处理 Control (CT) | 36.6 \pm 7.5a | 2.7 \pm 0.3a | 4.1 \pm 0.1a | 10.8 \pm 2.5a | 1.4 \pm 0.3a | 41.9 \pm 12.4b | 50.0 \pm 5.3b |
| | 低氮处理 Low nitrogen (LN) | 39.2 \pm 13.0a | 2.7 \pm 0.5a | 4.0 \pm 0.1ab | 7.2 \pm 1.0a | 1.6 \pm 0.5a | 66.8 \pm 3.4a | 58.7 \pm 7.0b |
| | 高氮处理 High nitrogen (HN) | 33.3 \pm 8.0a | 2.5 \pm 0.3a | 4.0 \pm 0.09b | 9.6 \pm 4.2a | 1.6 \pm 0.6a | 39.9 \pm 8.0b | 132.3 \pm 12.9a |
| B | 对照处理 Control (CT) | 13.6 \pm 1.1a | 1.4 \pm 0.1a | 4.2 \pm 0.0a | 0.2 \pm 0.1b | 0.9 \pm 0.6b | 17.2 \pm 1.1a | 26.4 \pm 3.0c |
| | 低氮处理 Low nitrogen (LN) | 15.4 \pm 2.6a | 1.5 \pm 0.1a | 4.2 \pm 0.1a | 0.3 \pm 0.1ab | 1.8 \pm 0.4ab | 15.5 \pm 4.0a | 42.3 \pm 9.8b |
| | 高氮处理 High nitrogen (HN) | 14.8 \pm 1.7a | 1.5 \pm 0.1a | 4.2 \pm 0.1a | 0.4 \pm 0.1a | 2.0 \pm 0.7a | 17.6 \pm 4.15a | 89.0 \pm 10.2a |

表中数值为平均值 \pm 标准差,不同小写字母表示同一土层,不同处理间差异显著($P < 0.05$)

2.2 土壤微生物量

如表3,低量氮沉降(LN)提高了A层和B层土壤的MBC和MBN含量。然而,施氮后A层的土壤的MBP显著减少,其数量关系为CT > LN > HN($P < 0.05$)。

表3 氮沉降对土壤微生物量碳氮磷的影响

Table 3 Effects of nitrogen deposition on soil microbial biomass C, N and P

| 土层 Soil horizon | 处理 Treatments | 微生物量碳 Microbial biomass carbon (MBC)/(mg/kg) | 微生物量氮 Microbial biomass nitrogen (MBN)/(mg/kg) | 微生物量磷 Microbial biomass phosphorus (MBP)/(mg/kg) |
|--------------------|------------------|--|--|--|
| A | CT | 538.0 \pm 37.9ab | 43.2 \pm 7.8ab | 37.9 \pm 3.6a |
| | LN | 560.5 \pm 12.0a | 48.2 \pm 3.6a | 25.1 \pm 4.8b |
| | HN | 500.5 \pm 39.5b | 37.3 \pm 5.0b | 13.3 \pm 4.2c |
| B | CT | 203.45 \pm 51.1b | 20.8 \pm 2.4b | 25.5 \pm 12.6a |
| | LN | 362.1 \pm 59.7a | 25.7 \pm 2.0a | 17.4 \pm 3.6a |
| | HN | 285.3 \pm 53.7a | 20.2 \pm 2.5b | 6.1 \pm 3.2b |

表中数值为平均值 \pm 标准差,不同小写字母表示同一土层,不同处理间差异显著($P < 0.05$)

2.3 土壤微生物熵

如图 1, A 层的微生物熵对于施氮的响应均无显著性差异。LN 提高了 B 层土壤的微生物熵, 其微生物熵值显著大于 CT ($P < 0.05$)。

2.4 土壤酶活性

如表 4, LN 和 HN 处理均明显提高了 A 层土壤中 β -葡萄糖苷酶 (β G) 活性, 但对 B 层中 β G 无显著影响。LN 处理后, 纤维素水解酶 (CBH) 活性显著高于 HN 与 CT ($P < 0.05$), 分别是 HN 与 CT 的 2.26 倍与 2.84 倍。LN 和 HN 处理分别显著提高了 A 层土壤中多酚氧化酶 (PHO) 和过氧化物酶 (PEO) 的活性, 但两种酶在 B 层土壤中并未发生明显变化 ($P > 0.05$, 表 4)。在 A 层土壤中, LN 显著提高 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 活性 ($P < 0.05$), 而在 B 层土壤中则显著降低了 NAG 活性 ($P < 0.05$)。LN 和 HN 显著提高各土层酸性磷酸酶 (ACP) 活性 ($P < 0.05$)。

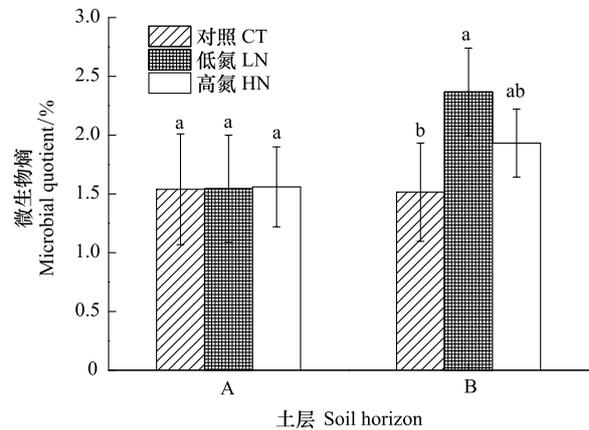


图 1 氮沉降对不同土层微生物熵的影响

Fig.1 Effects of nitrogen deposition on microbial quotient

CT: 对照处理 Control; LN: 低氮处理 Low nitrogen; HN: 高氮处理 High nitrogen; 图中误差线为重复间标准误, 不同小写字母表示同一土层, 不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)

表 4 氮沉降对土壤酶活性的影响

Table 4 Effects of nitrogen deposition on soil enzyme activity

| 土层 Soil horizon | 酶 Enzyme | 对照 CT | 低氮 LN | 高氮 HN | 土层 Soil horizon | 酶 Enzyme | 对照 CT | 低氮 LN | 高氮 HN |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| A | ACP | 123.8±24.5b | 295.6±83.3a | 187.5±60.9ab | B | ACP | 34.9±15.6c | 126.6±14.2a | 84.2±12.7b |
| | β G | 22.6±9.6b | 55.8±13.0a | 40.6±12.0ab | | β G | 36.0±11.2a | 41.5±3.8a | 45.5±7.0a |
| | CBH | 5.4±1.8b | 15.3±2.7a | 6.8±1.9b | | CBH | 7.86±1.9a | 7.9±1.3a | 5.8±0.5a |
| | NAG | 44.9±26.3b | 93.6±19.1ab | 116.6±44.3a | | NAG | 122.1±14.5a | 92.5±13.0b | 45.1±5.8c |
| | PEO | 9.6±1.8b | 18.8±3.9a | 14.9±1.0a | | PEO | 22.2±5.1a | 21.8±3.9a | 19.4±1.4a |
| | PHO | 0.9±0.2b | 7.9±4.9a | 2.9±0.8b | | PHO | 4.2±1.6a | 3.7±2.1a | 2.8±0.6a |

表中数值为平均值±标准差, 不同小写字母表示同一土层, 不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)

2.5 土壤酶活性变化的 PCA 和 RDA 结果

以土壤 A 层 6 种酶活性数据作为响应变量, 进行 PCA 分析, CT、LN、HN 都按照一定的规律进行了很好的聚类 (图 2a), 说明施氮处理后显著的影响了 A 层土壤的酶活性变化。以 A 层土壤酶活性为响应变量, 以 A 层土壤的理化性质为解释变量进行 RDA 分析 (图 2b), 其中选择了贡献值靠前的 4 个理化性质作为解释变量, 其第一轴解释了变量的 59.82%, 第二轴解释了 6.50%, 且 DOC 与 MBP 分别解释了土壤酶活性变异的 39.6% 和 20.0% ($P < 0.05$)。其中 MBP、pH 与第一轴呈正相关, DOC、DON 与第一轴呈负相关。

B 层土壤中的 HN 与 CT 表现出一定的差异, 而 LN 则处于 HN 和 CT 的过渡 (图 2c)。图 2d 表明, 两轴共同解释了土壤酶活性变异的 54.99%, 而 MBN、DON、DOC 是解释度最高的 3 个环境因子, 其中 MBN 解释了 B 层土壤酶活性变异的 28.9%, 且三个环境因子都与第一轴呈正相关。MBN、DON 与 NAG 均有很强负相关性。

3 讨论

3.1 土壤微生物生物量、微生物熵对氮沉降的响应

土壤微生物量是土壤活性有机质中最活跃与易变的部分, 反映着参与调控土壤中能量流动和养分循环以及有机物质转化的微生物数量^[20]。MBC 由于具有高的敏感性, 可以反映出土壤环境的细微变化^[21]。LN 处

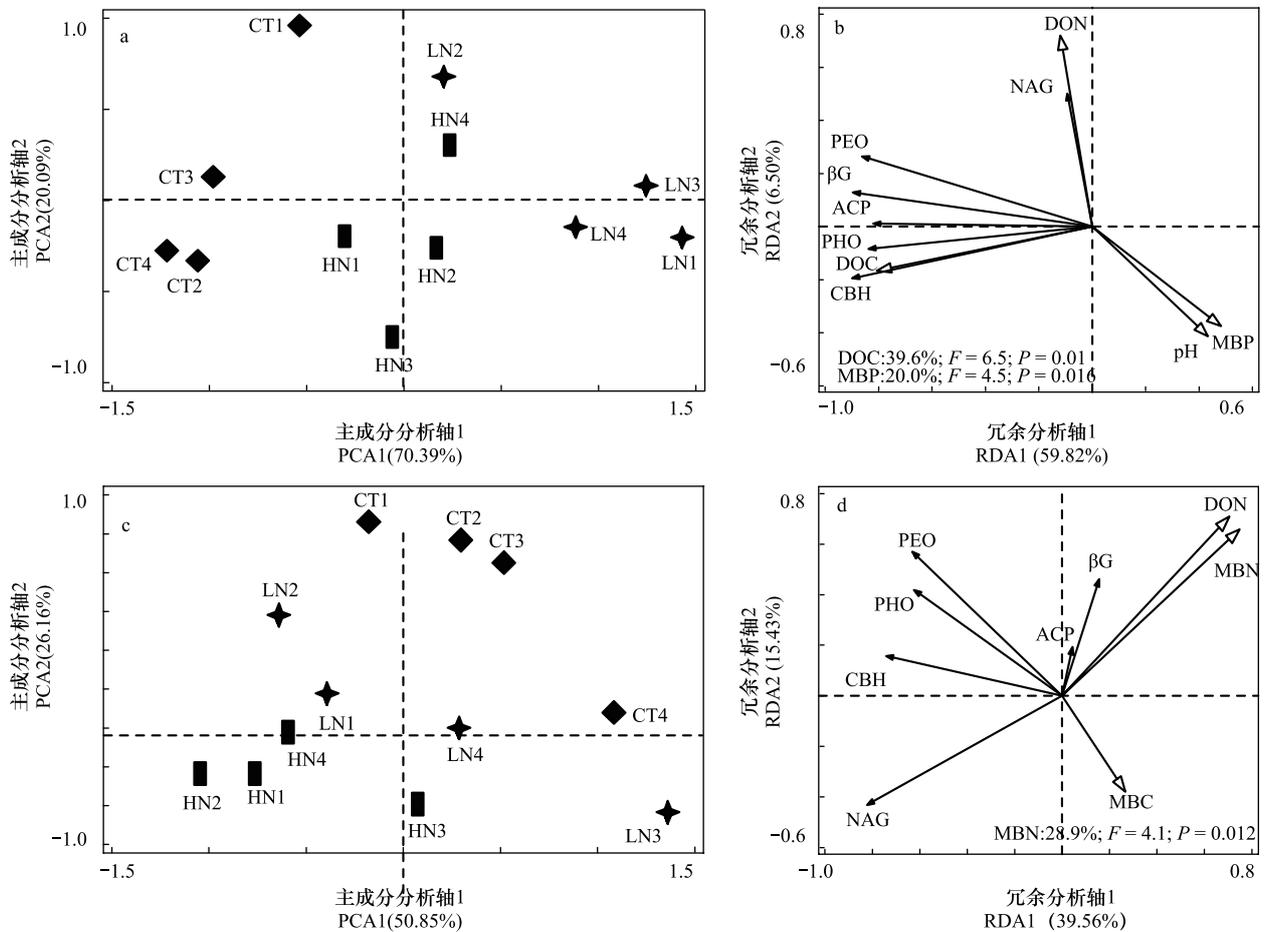


图2 氮沉降对土壤酶活性影响的主成分分析和冗余分析(A层:a和b;B层:c和d)

Fig.2 Correlations of soil enzyme activities to soil properties as determined by principle component analysis (PCA) and redundancy analysis (RDA) (A horizon:a and b;B horizon:c and d)

理后,提高了土壤中氮的有效性,土壤中的C/N比降低,有利于微生物对土壤有机质的分解与利用,从而增加土壤中MBC含量。但是,随着施氮量的增加,A层土壤的MBC含量受到抑制($P < 0.05$)。这与前人多数研究结果一致^[22],HN处理后,大量的 NH_4^+ 会取代土壤中与有机质结合的碱性阳离子(如: K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+),导致碱性阳离子容易被淋洗出土壤,降低了土壤的酸性缓冲能力。同时由于土壤酸化,土壤中的多价水解性阳离子(Fe^{3+} 、 Al^{3+})的溶解性提高,从而对土壤微生物群落产生一定的抑制作用^[23]。A层MBN对氮沉降的响应与A层MBC具有相同的趋势。然而毒害作用在B层并不明显,施氮提高了氮的有效性促进MBC积累。

MBP反映着土壤中有机-无机磷素的转化过程。本地区土壤属于酸性红壤,含有大量的铁和铝氧化物,对土壤中的P具有很强的固定能力^[24],造成P的有效性较低。而氮沉降加快了土壤的养分循环^[25],释放出一定的磷被植物吸收,进而减少了土壤中微生物可利用的磷。

土壤微生物量碳MBC与土壤总有机碳SOC的比值被称为微生物熵,是一个评价土壤有机碳增加或缺失的指标^[26]。然而施氮后,A层土壤各处理间并未产生显著性差异。张帆等^[27]认为,由于冬季的温度较低,微生物熵敏感性下降。因此,A层土壤中各处理间表现出的差异不显著,可能与微生物熵的季节性动态有关。而在B层土壤中,LN显著提高了微生物熵,LN处理下,微生物利用SOC的能力增强,与LN提高B层土壤MBC、MBN的结论一致。

3.2 土壤酶活性对氮沉降的响应

土壤酶是土壤生物化学过程的积极参与者,在生态系统物质循环和能量流动过程中扮演着重要的角色,

主要来源于土壤微生物、根系的分泌物及动植物残体分解释放的过程^[28]。

底物以碳为主的多糖(纤维素)、芳香族化合物(木质素)和脂肪族化合物^[29],其分解酶主要为纤维素水解酶类(β G 和 CBH)和木质素分解酶类(PHO 和 PEO)。

LN 处理显著提高了纤维素分解酶的活性。Fog^[30]研究中发现高水平的无机氮添加显著提高纤维素含量高的凋落物分解速率。而 Sinsabaugh 等^[31]在温带森林的研究中发现,纤维素酶的活性随着氮素可利用性的提高而增强。本研究中 HN 处理中纤维素酶活性虽然提高,但与 CT 相比并不显著,这可能是因为本试验中 HN 可能已经达到了土壤的氮饱和点,而过量的 N 对纤维素分解酶产生抑制作用,从而减弱了纤维素等有机质的分解,这与 HN 处理下 MBC 的含量较低的结论具有一致性。而在温带森林氮的有效性远低于亚热带森林,氮沉降氮促进纤维素酶活性的幅度高于本试验样地。

近年来的研究普遍认为,氮沉降会抑制木质素分解酶的活性,这主要是由于:(1)大多数真菌属于贫营养型,对氮源的需求量并不高,外加氮源条件下,其竞争力低于富营养型的细菌^[32];(2)NO₃ 影响了白腐担子菌对氧化酶基因的表达,而抑制了木质素分解酶^[33]。然而,本试验结果表明:LN 促进了两种木质素分解酶的活性。Carriero 等^[5]研究认为,氮沉降对木质素分解酶等氧化酶活性的影响主要取决于凋落物的性质,木质素含量较高的凋落物对木质素分解酶产生抑制作用,而易分解的凋落物则对其产生促进作用或者无影响。Hogervorst 等^[34]对松树凋落物分解的研究中发现:适量的有效性氮可以促进真菌生长达到最大值,这表明施氮并不一定抑制真菌活性。这与本试验中,LN 促进 A 层土壤微生物量积累的结果具有一致性。真菌作为善于分解木质素的一类,在 LN 处理下活性达到最高,提高了木质素分解酶活性。B 层土壤中,纤维素水解酶与木质素分解酶活性在各处理间差异并不显著,这可能与底层土壤有机质含量及养分有效性较低有关。

底物以氮为主的氨基化合物、缩氨酸和非缩氨基化合物^[29],分解酶 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, NAG。在 B 层土壤中,施氮处理抑制了土壤 NAG 的活性。当土壤中 N 的有效性低时,微生物需要以消耗自身生长及代谢为代价而生产 NAG,以便将土壤中的几丁质分解成可利用的无机氮^[35]。然而,施氮提高了土壤中的氮有效性,满足了微生物的生长需求,因此并不需要产生过多 NAG 而造成酶活性相对降低。

磷主要存在于单酯和多酯中^[36],分解酶主要有酸性磷酸酶, ACP。施氮促进土壤中 ACP 的活性。这与大多数的研究结果一致^[5,7,37]。孙翠玲等^[38]研究则表明,ACP 活性与土壤中全氮和碱解氮的含量呈正相关。土壤氮增加,增加了微生物对磷的需求,因此促进了 ACP 的活性,进而水解更多有机磷被吸收利用。

3.3 酶活性变化的关键驱动因子

DOC 是影响 A 层土壤酶活性变化的主要环境因子,并且与纤维素水解酶、木质素分解酶及酸性磷酸酶的活性具有正相关关系(图 2b)。LN 处理下,土壤 DOC 显著提高,这与 Pregitzer 等^[39]的研究结果一致。而 DOC 作为微生物最主要的能源^[40],反映着土壤中微生物的活性变化^[41]。微生物活性提高则需要从土壤中摄取更多的营养元素供其生长。因此,本研究表明,氮沉降背景下,DOC 驱动 A 层土壤纤维素水解酶类、木质素分解酶类及酸性磷酸酶活性,促进微生物更好地利用土壤中碳、磷元素。然而由于矿质土壤对 DOC 的吸附作用与土层的滞留性^[42],造成 B 层土壤的 DOC 含量相对较低,并且其含量不受施氮影响。与 A 层驱动因子不同,MBN 和 MBC 是驱动 B 层土壤酶活性的主要因子(图 2d),这与 Zhou 等^[43]的研究结果一致。Schimel 和 Weintraub^[33]建立的一个关于“微生物-酶活性”的模型中表明,土壤微生物量在土壤的 C、N 周转中起着关键的作用。Allison 等^[44]也强调气候变化下,土壤微生物生理及生物量在碳氮循环中的重要性。因此,在养分有效性较低的 B 层,微生物量是驱动酶活性的关键因子。

4 结论

经过 3 年的氮沉降模拟实验,LN 处理促进了 A 层土壤纤维素水解酶、木质素分解酶及酸性磷酸酶活性。RDA 表示 DOC 是驱动 A 层土壤酶活性的主要环境因子,LN 提高了 A 层土壤 DOC 含量,促进了土壤微生物生物量。同时提高纤维素水解酶和木质素分解酶活性。A 层土壤的碳含量占土壤碳库的比例较高,施氮处理

后促进了土壤的碳循环,因此在氮沉降背景下,中亚热带米槠天然林土壤作为碳源汇的问题值得注意。由于模拟氮沉降的时间长短对土壤微生物群落组成也有一定的影响,因此本试验样区氮沉降模拟试验还需持续进行,以便更好地探究土壤微生物量及酶活性对氮沉降的长期响应,为长期氮沉降对森林生态系统土壤微生物的影响以及探索中亚热带天然林土壤碳源汇问题提供科学依据。

参考文献 (References):

- [1] Pinder R W, Davidson E A, Goodale C L, Greaver T, Herrick J, Liu L L. Climate change impacts of US reactive nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2012, 109(20): 7671-7675.
- [2] Galloway J N, Townsend A R, Erisman J W, Bekunda M, Cai Z C, Freney J R, Martinelli L A, Seitzinger P, Sutton M A. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 2008, 320(5878): 889-892.
- [3] 钟晓兰, 李江涛, 李小嘉, 叶永昌, 刘颂颂, 徐国良, 倪杰. 模拟氮沉降增加条件下土壤团聚体对酶活性的影响. *生态学报*, 2015, 35(5): 1422-1433.
- [4] 莫江明, 薛璟花, 方运霆. 鼎湖山主要森林植物凋落物分解及其对 N 沉降的响应. *生态学报*, 2004, 24(7): 1413-1420.
- [5] Carreiro M M, Sinsabaugh R L, Repert D A, Parkhurst D F. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology*, 2000, 81(9): 2359-2365.
- [6] Deforest J L, Zak D R, Pregitzer K S, Burton A J. Atmospheric nitrate deposition, microbial community composition, and enzyme activity in northern hardwood forests. *Soil Science Society of America Journal*, 2004, 68(1): 132-138.
- [7] Saiya-Cork K R, Sinsabaugh R L, Zak D R. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(9): 1309-1315.
- [8] Keeler B L, Hobbie S E, Kellogg L E. Effects of long-term nitrogen addition on microbial enzyme activity in eight forested and grassland sites: implications for litter and soil organic matter decomposition. *Ecosystems*, 2009, 12(1): 1-15.
- [9] Treseder K K, Vitousek P M. Effects of soil nutrient availability on investment in acquisition of N and P in Hawaiian rain forests. *Ecology*, 2001, 82(4): 946-954.
- [10] Sinsabaugh R L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(3): 391-404.
- [11] Burns R G, Deforest J L, Marxsen J, Sinsabaugh R L, Stromberger M E, Wallenstein M D, Weintraub M N, Zoppini A. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions, *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 58: 216-234.
- [12] Lu X, Gilliam F S, Yu G, Li L, Mao Q, Chen H, Mo J. Long-term nitrogen addition decreases carbon leaching in nitrogen-rich forest ecosystem. *Biogeosciences*, 2013, 10(6): 3931-3941.
- [13] Griffiths B S, Spilles A, Bonkowski M. C: N: P stoichiometry and nutrient limitation of the soil microbial biomass in a grazed grassland site under experimental P limitation. *Ecological Processes*, 2012, 1: 1-11.
- [14] 吴波波, 郭剑芬, 吴君君, 任卫玲, 刘小飞, 杨玉盛. 采伐剩余物对林地表层土壤生化特性和酶活性的影响. *生态学报*, 2014, 34(7): 1645-1653.
- [15] Huang Z Q, Wan X H, He Z M, Yu Z P, Wang M H, Hu Z H, Yang Y S. Soil microbial biomass, community composition and soil nitrogen cycling in relation to tree species in subtropical China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 62: 68-75.
- [16] Jones D L, Willett V B. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(5): 991-999.
- [17] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*. 1987, 19(6): 703-707.
- [18] Brookes P C, Powlson D S, Jenkinson D S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1982, 14(4): 319-329.
- [19] Anderson J P E, Domsch K H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1978, 10(3): 215-221.
- [20] 王晖, 莫江明, 鲁显楷, 薛璟花, 李炯, 方运霆. 南亚热带森林土壤微生物量碳对氮沉降的响应. *生态学报*, 2008, 28(2): 470-478.
- [21] 李东坡, 武志杰, 陈利军, 朱平, 任军, 彭畅, 梁成华. 长期培肥黑土微生物量碳动态变化及影响因素. *应用生态学报*, 2004, 15(10): 1867-1902.
- [22] Wallenstein M D. Effects of nitrogen fertilization on soil microbial communities. *European Geophysical Society*, 2003, 5: 13087.
- [23] Tian D S, Niu S L. A global analysis of soil acidification caused by nitrogen addition. *Environmental Research Letters*, 2015, 10(2): 24019-24028.

- [24] 陈国潮, 何振立, 黄昌勇. 菜茶果园红壤微生物量磷与土壤磷以及磷植物有效性之间的关系研究. 土壤学报, 2001, 38(1): 75-80.
- [25] 徐阳春, 沈其荣, 冉炜. 长期免耕与施用有机肥对土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响. 土壤学报, 2002, 39(1): 89-96.
- [26] 杨宁, 邹冬生, 杨满元, 林仲桂, 宋光桃, 陈志阳, 赵林峰. 衡阳紫色土丘陵坡地植被恢复阶段土壤特性的演变. 生态学报, 2014, 34(10): 2693-2701.
- [27] 张帆, 黄凤球, 肖小平, 吴家梅. 冬季作物对稻田土壤微生物量碳、氮和微生物熵的短期影响. 生态学报, 2009, 29(2): 734-739.
- [28] Kiss S, Pasca D, Dragan-Bularca M. *Enzymology of Disturbed Soils*. Amsterdam: Elsevier, 1998: 1-34.
- [29] Knicker H, Lüdemann H D, Haider K. Incorporation studies of NH_4^+ during incubation of organic residues by ^{15}N -CPMAS-NMR-spectroscopy. *European Journal of Soil Science*, 1997, 48: 431-441.
- [30] Fog K. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biological Reviews*, 1988, 63(3): 433-462.
- [31] Sinsabaugh R L, Carreiro M M, Repert D A. Allocation of extracellular enzymatic activity in relation to litter composition, N deposition, and mass loss. *Biogeochemistry*, 2002, 60(1): 1-24.
- [32] Ågren G I, Bosatta E, Magill A H. Combining theory and experiment to understand effects of inorganic nitrogen on litter decomposition. *Oecologia*, 2001, 128(1): 94-98.
- [33] Schimel J P, Weintraub M N. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(4): 549-563.
- [34] Hogervorst R F, Dijkhuis M A J, Van Der Schaar M A, Berg M P, Verhoef H A. Indications for the tracking of elevated nitrogen levels through the fungal route in a soil food web. *Environmental Pollution*, 2003, 126(2): 257-266.
- [35] Ma Y C, Zhu B, Sun Z Z, Zhao C, Yang Y, Piao S L. The effects of simulated nitrogen deposition on extracellular enzyme activities of litter and soil among different-aged stands of larch. *Journal of Plant Ecology*, 2013, 7(3): 240-249.
- [36] Dalai R C. Soil organic phosphorus. *Advances in Agronomy*, 1977, 29: 83-117.
- [37] Johnson D, Leake J R, Lee J A, Campbell C D. Changes in soil microbial biomass and microbial activities in response to 7 years simulated pollutant nitrogen deposition on a heathland and two grasslands. *Environmental Pollution*, 1998, 103(2/3): 239-250.
- [38] 孙翠玲, 郭玉文, 佟超然, 徐兰成, 王珍. 杨树混交林地土壤微生物与酶活性的变异研究. 林业科学, 1997, 33(6): 488-496.
- [39] Pregitzer K S, Zak D R, Burton A J, Ashby J A, Macdonald N W. Chronic nitrate additions dramatically increase the export of carbon and nitrogen from northern hardwood ecosystems. *Biogeochemistry*, 2004, 68(2): 179-197.
- [40] Haynes R J. Labile organic matter as an indicator of organic matter quality in arable and pastoral soils in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(2): 211-219.
- [41] Flessa H, Ludwig B, Heil B, Merbach W. The origin of soil organic C, dissolved organic C and respiration in a long-term maize experiment in Halle, Germany, determined by ^{13}C natural abundance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2000, 163(2): 157-163.
- [42] Kaiser K, Zech W. Competitive sorption of dissolved organic matter fractions to soils and related mineral phases. *Soil Science Society of America Journal*, 1997, 61(1): 64-69.
- [43] Zhou X Q, Chen C R, Wang Y F, Xu Z H, Han H Y, Li L H, Wan S Q. Warming and increased precipitation have differential effects on soil extracellular enzyme activities in a temperate grassland. *Science of the Total Environment*, 2013, 444: 552-558.
- [44] Allison S D, Wallenstein M D, Bradford M A. Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *Nature Geoscience*, 2010, 3(5): 336-340.