

DOI: 10.5846/stxb202101210224

元晓春, 林惠瑛, 曾泉鑫, 陈文伟, 陈俊明, 许敬华, 陈岳民, 林开森. 武夷山不同海拔梯度黄山松土壤有机氮解聚酶活性及其影响因素. 生态学报, 2022, 42(4): 1560-1570.

Yuan X C, Lin H Y, Zeng Q X, Chen W W, Chen J M, Xu J H, Chen Y M, Lin K M. Soil organic nitrogen depolymerase activities and its influencing factors of *Pinus taiwanensis* at different altitude gradients in Wuyi Mountain. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(4): 1560-1570.

武夷山不同海拔梯度黄山松土壤有机氮解聚酶活性及其影响因素

元晓春^{1,2}, 林惠瑛¹, 曾泉鑫¹, 陈文伟³, 陈俊明¹, 许敬华¹, 陈岳民¹, 林开森^{1,2,*}

1 福建师范大学地理科学学院, 福州 350007

2 武夷学院旅游学院, 武夷山 354300

3 福建戴云山国家级自然保护区管理局, 德化 362500

摘要: 土壤有机氮(SON)解聚酶对土壤大分子有机氮的解聚是土壤氮循环的限速步骤,对土壤氮循环至关重要。然而,目前亚热带森林中、高海拔梯度下 SON 解聚酶活性的动态及其影响因素尚不明确。在武夷山自然保护区海拔 1200—2000 m 的黄山松林,通过测定 5 个海拔梯度的土壤环境因子、理化性质和 8 种 SON 解聚酶活性的变化,探究了不同海拔梯度下 SON 解聚酶活性的分布规律及其影响因素。结果表明,除土壤 DON 含量外,其他测量的土壤环境因子和理化性质在不同海拔梯度下均存在显著的差异。SON 解聚酶活性随海拔梯度呈现不同的分布规律:碱性蛋白酶(ALPT)、中性蛋白酶(NPT)、漆酶(Lac)和亮氨酸氨基肽酶(LAP)随海拔升高显著增加,酸性蛋白酶(ACPT)和几丁质酶(Chi)呈现先增后降的趋势,而锰过氧化物酶(Mnp)和谷氨酰胺酶(GLS)在海拔 1800 m 显著降低($P < 0.05$)。冗余分析表明,不同海拔梯度下 SON 解聚酶活性存在明显的聚类,土壤环境因子和理化性质对 SON 解聚酶活性的解释度高达 88.18%。土壤温度(ST),含水率(SM),微生物生物量碳(MBC)和矿质氮(NH_4^+ , NO_3^-)是不同海拔梯度下 SON 解聚酶活性变化的重要预测因子。相关分析表明,多数 SON 解聚酶活性与土壤 ST 呈显著负相关,与 pH, SM, TN, MBC, NH_4^+ 和 NO_3^- 呈显著正相关。 NH_4^+ 和 NO_3^- 含量动态随海拔梯度均呈现波浪式起伏变化,相比于上游的有机质底物,下游无机氮循环中的矿质氮对 SON 解聚酶活性产生更直接的影响。该研究有助于拓宽我们对亚热带森林中、高海拔土壤氮循环机理的认识,同时对土壤有效氮保持和生产力的维持具有重要意义。

关键词: 海拔梯度;有机氮解聚酶;解聚作用;蛋白酶活性;微生物生物量

Soil organic nitrogen depolymerase activities and its influencing factors of *Pinus taiwanensis* at different altitude gradients in Wuyi Mountain

YUAN Xiaochun^{1,2}, LIN Huiying¹, ZENG Quanxin¹, CHEN Wenwei³, CHEN Junming¹, XU Jinghua¹, CHEN Yuemin¹, LIN Kaimiao^{1,2,*}

1 College of Geographical Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

2 College of Tourism, Wuyi University, Wuyishan 354300, China

3 Daiyun Mountain National Nature Reserve Administration Bureau, Dehua 362500, China

Abstract: The depolymerization of soil organic nitrogen (SON) depolymerases on soil macromolecule organic nitrogen is the rate-limiting step of the soil nitrogen cycle, which plays a crucial role in the soil nitrogen cycle. However, the dynamics of SON depolymerase activities and their influencing factors in subtropical forests at middle and high altitudes are still unclear. In this study, the soil environmental factors, physicochemical properties and the activities of eight kinds of SON

基金项目:福建省自然科学基金项目(2019J05163,2020J01397,2020J01142)

收稿日期:2021-01-21; 网络出版日期:2021-11-04

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: linkaimiao@126.com

depolymerases were measured in the *Pinus taiwanensis* forest at the altitude of 1200—2000 m in Wuyishan Nature Reserve, and we investigated the distribution of SON depolymerase activities and their influencing factors at different altitude gradients. The results showed that the significant differences were found in all soil environmental factors and physicochemical properties measured at different altitudes except DON content. The activities of SON depolymerase displayed different distribution patterns with altitude gradient: alkaline protease (ALPT), neutral protease (NPT), laccase (Lac) and leucine aminopeptidase (LAP) increased significantly with altitude, and acid protease (ACPT), chitinase (Chi) exhibited a trend of increasing first and then decreasing, while manganese peroxidase (Mnp) and glutaminase (GLS) decreased significantly at altitude of 1800 m. Redundancy analysis showed that SON depolymerase activities were obviously clustered at different altitudes, and the explanation degree of soil environmental factors and physicochemical properties to them was as high as 88.18%. Soil temperature (ST), soil moisture (SM), microbial biomass carbon (MBC), and mineral nitrogen (NH_4^+ , NO_3^-) are important predictors of SON depolymerase activities at different altitudes. Correlation analysis showed that most of SON depolymerase activities were negatively correlated with soil ST, while positively correlated with pH, SM, TN, MBC, NH_4^+ and NO_3^- . The dynamics of NH_4^+ and NO_3^- showed a wave-like fluctuation with altitude gradient. Compared with the upstream organic substrate, the mineral nitrogen in the downstream inorganic nitrogen cycle had a more direct impact on SON depolymerase activities. This study is helpful to broaden our understanding of the mechanism of soil nitrogen cycle in subtropical forests at middle and high altitudes, and is of great significance to the protection of soil available nitrogen and the maintenance of soil productivity.

Key Words: altitude gradient; organic nitrogen depolymerase; depolymerization; protease activities; microbial biomass

氮是森林生态系统生产力和生态系统功能维持的最重要限制因子之一^[1],其主要来源于土壤有机氮(SON,占土壤总氮的90%以上)^[2]。最早的土壤氮有效性矿化-固持作用理论(Mineralization-immobilization theory, MIT)认为:“SON 矿化决定生态系统氮循环”^[3]。但后期的研究发现,SON 由于分子量太大不能被植物和微生物有效吸收,必须在酶的作用下将含氮聚合物水解为小分子单体,才可以被植物和微生物同化和利用,这一过程被称为“解聚作用”,并据此提出“解聚作用是控制生态系统氮循环的关键过程”^[4]。目前,全球范围内有关氮循环的研究更多关注土壤无机氮的转化(硝化作用、反硝化作用等)、含氮气体(N_2O 、 NO 等)排放、不同气候带矿质氮保持机制以及养分供应等内容^[5-6]。然而,作为直接控制无机氮来源的“瓶颈”^[7],SON 解聚作用的研究却长期严重滞后。

受限于 SON 的解聚作用目前无法直接观测,研究人员只能尝试寻找代用指标来间接表征。SON 的解聚作用本质上是在解聚酶的作用下将 SON 大分子聚合物进行水解,生成氨基酸、氨基糖、核酸等可以被微生物和植物直接或间接利用的小分子单体的过程^[4,7]。因此,SON 解聚酶是解聚作用强度和方向的关键控制因子,其活性的变化是目前用来表征解聚作用的有效指标^[8-9]。SON 解聚酶并不是某一种酶,而是能够将土壤含氮大分子聚合物逐步水解的一系列酶^[7]。参与 SON 解聚作用的酶主要是蛋白酶,其次是几丁质酶、木质素酶和肽聚糖酶^[7,9]。因为植物和微生物残体是 SON 的主要组分,其化学组成包括蛋白质、几丁质、木质素和肽聚糖,而蛋白质占植物和微生物细胞氮的 60%^[10]。即使有研究表明,微生物可以直接吸收、矿化部分小分子蛋白质^[11],但大多数蛋白质在跨膜运输之前必须经过蛋白酶参与的解聚作用^[9]。温带或北方森林的已有研究表明中、低海拔土壤总碳^[12],微生物^[13],土壤质地和土壤 pH^[14]是影响 SON 解聚酶活性的主要因素。然而,目前对亚热带森林中、高海拔 SON 解聚酶活性的分布规律及其影响因素尚不明确。

海拔梯度变化对地球化学和生物的元素循环起着重要的作用^[15],其调节温度和降水梯度,同时导致土壤养分以及土壤微生物群落等土壤特性发生自然变化^[16]。武夷山国家自然保护区拥有全球同纬度现存面积最广、保存最完整的亚热带森林生态系统^[17],是亚热带东南大陆海拔梯度最大的区域。与温带相比,虽然亚热带森林土壤相对氮饱和,但是该区域高温多雨,植被生产力旺盛,对氮养分的需求更高^[18],SON 解聚作用的变

化对亚热带森林生态系统生产力的影响可能比温带地区更大。研究区海拔高 350—2161 m, 该区海拔变化提供了一系列土壤特性以检验 SON 解聚酶活性是如何受海拔影响。为排除不同植被类型的影响, 我们选取海拔 1200—2000 m 的黄山松林作为研究对象, 探究武夷山不同海拔梯度下黄山松 SON 解聚酶活性变化, 并阐明不同海拔梯度下调节 SON 解聚酶活性的关键因素, 以期预测环境变化对亚热带中、高海拔区 SON 解聚作用的影响。该研究有助于提高我们对土壤氮循环机理的认识, 同时对预测环境变化对 SON 解聚的影响, 认知亚热带黄山松林土壤有效氮保持和生产力的维持机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验区位于江西省武夷山国家自然保护区(27°48′11″—28°00′35″ N, 117°39′30″—117°55′47″ E), 海拔高 350—2161 m, 属于亚热带季风气候。年平均气温约 14.2 °C, 年平均降水量约 2583 mm, 年平均湿度约 84%, 年平均蒸发量约 778 mm, 年平均无霜期为 231 d^[19]。

1.2 试验设计

采用典型样地调查法, 于 2014 年 10 月, 根据保护区内黄山松的实际生长及分布情况, 选取海拔 1200—2000 m 之间的黄山松林作为研究对象。每 200 m 设置 1 个间隔, 共设置了 5 个海拔梯度(包括 2000、1800、1600、1400、1200 m)。每个海拔梯度设置 3 个样方, 共设置 15 个 20 m×20 m 的样方, 样方之间设有 10 m 以上的隔离带, 用于防止样地之间相互干扰^[19]。

采用“S”型 5 点取样法采样, 于 2019 年 7 月, 在每个样方内的表层土壤(0—10 cm) 随机选取 5 个土芯。相同海拔梯度的土壤样品在去除石砾、碎屑以及植物根系后混合成一个均匀样, 将土壤样品装入塑料自封袋用冰袋保鲜带回实验室处理。将每个样品分成 2 组, 一组为鲜土, 过 2 mm 筛后测定土壤酶活性、微生物生物量和土壤可溶性有机质; 另一组为风干土用于测定其他土壤理化性质。

1.3 测定项目与方法

土壤环境因素和理化性质的测定: 土壤温度(ST) 用温度传感器(Model SK-250WP, Sato, 日本) 测定。土壤 pH 用玻璃电极 pH 计(STARTER 300, Ohaus, 美国) 测定, 土水比为 1:2.5。土壤含水率(SM) 用烘干法测定。总有机碳(SOC), 总氮(TN) 和碳氮比(C:2N) 用碳氮元素分析仪(Elementar Vario EL III, Elementar, 德国) 测定。矿质氮用 2 mol/L KCl 浸提, 采用连续流动分析仪(Skalar san⁺⁺, Skalar, 荷兰) 测定提取液中的铵态氮(NH₄⁺) 和硝态氮(NO₃⁻) 浓度。可溶性有机碳(DOC) 和可溶性有机氮(DON) 用去离子水浸提(土水比 1:4), 用总有机碳分析仪(TOC-VCPH/CPN, Shimadzu, 日本) 测定 DOC 浓度, 使用连续流动分析仪测定浸提液中的溶解性总氮和总溶解性无机氮(包括铵态氮和硝态氮), DON 浓度为溶解性总氮和总溶解性无机氮的差值^[20]。微生物生物量碳(MBC) 和微生物生物量氮(MBN) 采用氯仿熏蒸-硫酸钾浸提法^[21], 计算公式分别为: $MBC = \Delta E_C / K_C$; $MBN = \Delta E_N / K_N$, 式中: ΔE_C 、 ΔE_N 分别为熏蒸与未熏蒸土壤有机碳、土壤总氮含量的差值, K_C 和 K_N 为转换系数, 分别取值 0.45 和 0.54。

土壤酶活性的测定: 采用苏州科铭生物技术有限公司的试剂盒测定, 按照试剂盒说明书进行操作。在最佳反应条件下, 采用比色法对 SON 解聚酶活性进行测定。其中, 碱性蛋白酶(ALPT)、酸性蛋白酶(ACPT) 和中性蛋白酶(NPT) 分别取 0.02 g 风干土, 用 0.2 M Tris (pH=8.0) 提取, 磁力搅拌器搅拌均质化后, 混匀后在 40 °C 下水浴 30 min, 采用福林酚比色法测定^[22]; 几丁质酶(Chi) 通过取 0.10 g 风干土, 用 0.05 M 醋酸钠 (pH=5.0) 提取, 混匀后在 37 °C 下培养 24 h, 采用二甲氨基苯甲醛比色法测定^[23]; 漆酶(Lac) 通过取 0.02 g 风干土, 用 0.1 M 酒石酸钠 (pH=5) 提取, 在 37 °C 下震荡反应 10 min, 冰浴 5 min, 采用 ABTS 氧化法测定^[24]; 锰过氧化物酶(MnP) 通过取 0.20 g 风干土, 用 0.1 M 酒石酸钠 (pH=5) 提取, 混匀后在 25 °C 下培养 3 h, 采用愈创木酚比色法测定^[25]; 谷氨酰胺酶(GLS) 通过取 0.10 g 风干土, 用 0.05 M Tris (pH=8.6) 提取, 混匀后在 37 °C 下培养 2 h, 采用奈氏比色法测定^[26]; 亮氨酸氨基肽酶(LAP) 通过取 0.05 g 风干土, 用 0.2 M Tris (pH=8.0) 提取,

搅拌均匀后在 37 °C 下培养 1 h,采用对硝基苯胺比色法测定^[27]。所测定酶的底物及特征吸收峰如表 1 所示。

表 1 SON 解聚酶的种类、缩写、相应底物和特征吸收峰

Table 1 Types, abbreviations, corresponding substrates and characteristic absorption peak of SON depolymerase activities

酶 Enzyme	缩写 Abbreviation	底物 Substrate	特征吸收峰 Characteristic absorption peak
碱性蛋白酶 Alcalase Protease (mg d ⁻¹ g ⁻¹)	ALPT	酪蛋白 casein	680 nm
酸性蛋白酶 Acid Protease (mg d ⁻¹ g ⁻¹)	ACPT	酪蛋白 casein	680 nm
中性蛋白酶 Neutral Protease (mg d ⁻¹ g ⁻¹)	NPT	酪蛋白 casein	680 nm
几丁质酶 Chitinase (μg d ⁻¹ g ⁻¹)	Chi	N-乙酰氨基葡萄糖 N-acetylglucosamine	585 nm
漆酶 Laccase (nmol min ⁻¹ g ⁻¹)	Lac	2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate	420 nm
锰过氧化物酶 Manganese Peroxidase (nmol d ⁻¹ g ⁻¹)	Mnp	锰离子和愈创木酚 Mn ion and guaiacol	465 nm
谷氨酰胺酶 D-glutaminase (nmol min ⁻¹ g ⁻¹)	GLS	谷氨酰胺 glutamine	420 nm
亮氨酸氨基肽酶 D-Leucine Aminopeptidase (μmol d ⁻¹ g ⁻¹)	LAP	L-亮氨酸对硝基苯胺 L-leucine-p-nitroanilide	405 nm

SON: 土壤有机氮 soil organic nitrogen

1.4 数据处理

采用 Excel 2013 和 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析。采用单因素方差分析 (Tukey) 检验不同海拔梯度间土壤环境因子和土壤特性以及 SON 解聚酶活性的差异显著性 ($\alpha = 0.05$)。采用 R 软件 4.0.2 将 SON 解聚酶活性与土壤环境因子、理化性质进行 Pearson 相关系数计算并绘图。利用 Canaco 5.0 软件进行冗余分析,探究海拔梯度下环境因子和土壤特性对 SON 解聚酶活性的影响。其他绘图由 Origin 2018 软件完成,图表中数据为平均值(标准差), $n = 3$ 。

2 结果

2.1 不同海拔梯度下的土壤环境因子和理化性质

除土壤 DON 含量外,其他的土壤环境因子和理化性质在不同海拔梯度下均存在显著的差异 ($P < 0.05$)。从海拔 1200—2000 m, ST 随海拔升高显著降低,而 SM 显著增加 ($P < 0.05$)。SOC、TN、DOC 和 MBC 随海拔升高呈波浪式起伏,均在海拔 1600 m 显著增加 ($P < 0.05$),在海拔 1800 m 降低,到海拔 2000 m 再次增加(表 2)。此外,土壤 pH 在海拔 1800 m 显著升高,而 MBN 在海拔 2000 m 显著增加 ($P < 0.05$)。

2.2 不同海拔梯度下的 SON 解聚酶活性

SON 解聚酶活性在不同海拔梯度下均存在显著差异 ($P < 0.05$),并存在 3 种不同的变化趋势。从海拔 1200—2000 m, ALPT、NPT、Lac 和 LAP 活性随海拔升高显著增加 ($P < 0.05$); ACPT 和 Chi 活性随海拔升高先增后降,在海拔 1800 m 处达到最高值,到海拔 2000 m 显著降低 ($P < 0.05$)。相比于其他海拔, Mnp 和 GLS 在海拔 1800 m 显著降低 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.3 不同海拔梯度下的土壤矿质氮含量

不同海拔梯度下土壤矿质氮含量发生显著变化 ($P < 0.05$),从海拔 1200—2000 m, NH_4^+ 含量随海拔上升均呈现波浪式起伏,在海拔 1600 m 显著增加 ($P < 0.05$),在海拔 1800 m 降低,而到 2000 m 又有所回升(图 2)。与 NO_3^- 含量相比, NH_4^+ 在海拔 1800 m 显著降低,而在海拔 2000 m 显著增加 ($P < 0.05$)。

表 2 不同海拔梯度下土壤环境因子和理化性质

Table 2 Soil environmental factors and physicochemical properties at different altitude gradients

海拔 Elevation/m	1200	1400	1600	1800	2000	P
ST/°C	22.88(0.21) a	20.86(0.04) b	19.79(0.16) c	18.59(0.08) d	17.48(0.42) e	<0.001
SM/%	52(0.04) c	60(0.02) bc	72(0.09) b	59(0.09) bc	95(0.01) a	<0.001
pH	3.88(0.16) b	4.09(0.00) b	4.06(0.10) b	4.41(0.01) a	4.34(0.17) ab	0.001
SOC/(g/kg)	48.69(9.82) b	41.61(1.30) b	71.49(5.18) a	42.98(6.40) b	58.93(9.38) ab	0.002
TN/(g/kg)	3.52(0.71) ab	2.73(0.07) b	4.91(0.81) a	3.68(0.58) ab	4.94(0.74) a	0.007
C:N	13.83(0.52) a	15.24(0.09) a	14.70(1.36) a	11.69(0.27) b	11.92(0.13) b	<0.001
DOC/(mg/kg)	136.29(21.78) bc	178.58(13.94) b	239.85(9.83) a	115.02(27.87) c	131.14(13.37) bc	<0.001
DON/(mg/kg)	10.70(2.69) a	13.34(4.35) a	15.91(2.90) a	8.37(1.45) a	9.34(2.57) a	0.058
MBC/(mg/kg)	517.75(76.54) b	181.11(19.82) c	913.40(189.47) a	637.55(22.99) ab	834.11(82.84) a	<0.001
MBN/(mg/kg)	121(2.97) b	120(17.33) b	150(28.32) b	141(15.53) b	230(17.69) a	<0.001

ST: 土壤温度 Soil temperature; SM: 土壤含水率 Soil moisture; pH: 酸碱度 pH value; SOC: 土壤总有机碳 Soil organic carbon; TN: 总氮 Total nitrogen; C:N: 碳氮比 Carbon nitrogen ratio; DOC: 可溶性有机碳 Dissolved organic carbon; DON: 可溶性有机氮 Dissolved organic nitrogen; MBC: 微生物量碳 Microbial biomass carbon; MBN: 微生物量氮 Microbial biomass nitrogen; 表中数据为平均值(标准差), n=3, 同一行不同小写字母表示不同海拔梯度间差异显著(P<0.05)

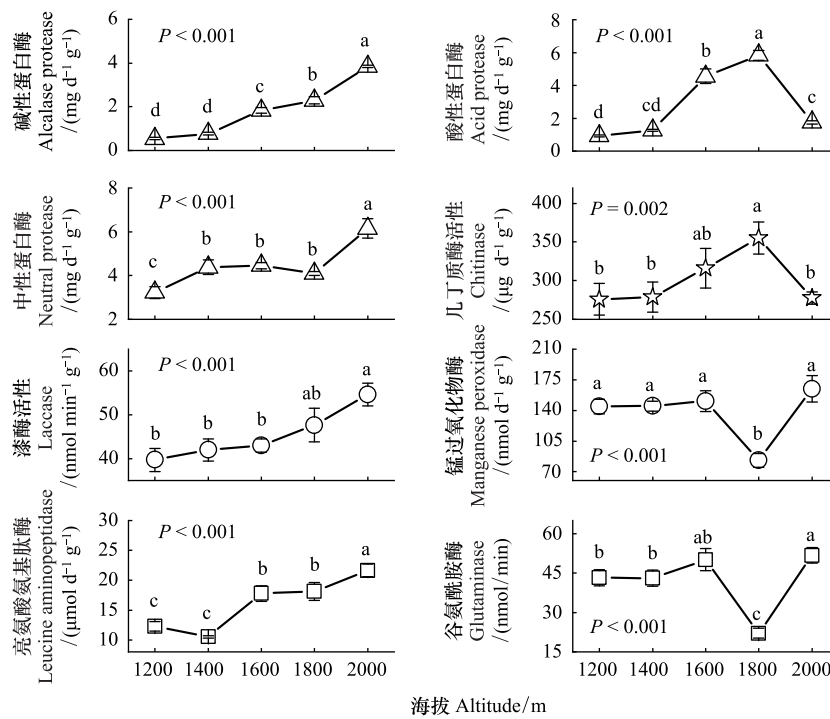


图 1 不同海拔梯度对黄山松 SON 解聚酶活性的影响

Fig.1 Effect of different altitude gradients on SON depolymerase activities of *Pinus taiwanensis*

SON: 土壤有机氮 soil organic nitrogen; ALPT: 碱性蛋白酶 Alcalase protease; ACPT: 酸性蛋白酶 Acid protease; NPT: 中性蛋白酶 Neutral protease; Chi: 几丁质酶活性 Chitinase; Lac: 漆酶活性 Laccase; MnP: 锰过氧化物酶 Manganese peroxidase; LAP: 亮氨酸氨基肽酶 Leucine aminopeptidase; GLS: 谷氨酰胺酶 Glutaminase

2.4 不同海拔梯度下 SON 解聚酶活性的影响因素

除了 Chi 活性与土壤环境因子和理化性质均无显著相关性外,大部分 SON 活性与土壤 ST、C:N 呈显著负相关,与 pH、SM、TN、矿质氮(NH₄⁺、NO₃⁻)和微生物生物量(MBC、MBN)呈显著正相关(图 3)。RDA 分析发现,不同海拔梯度下 SON 解聚酶活性存在明显的聚类。土壤环境因子和理化性质对 SON 解聚酶活性的解释度高

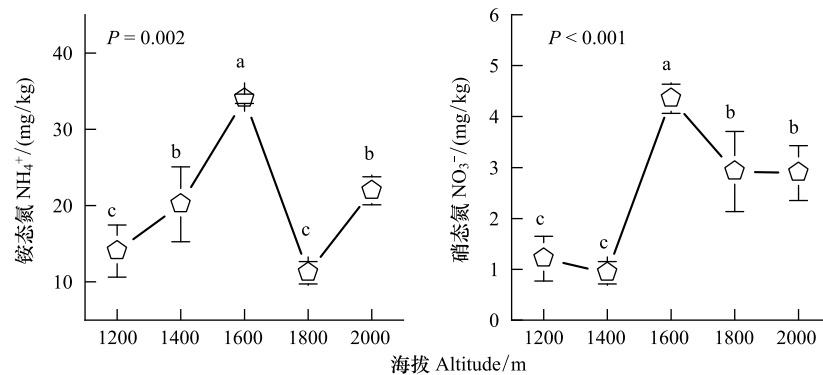


图2 不同海拔梯度对黄山松土壤矿质氮的影响

Fig.2 Effects of different altitude gradients on soil mineral nitrogen of *Pinus taiwanensis*

达 88.18%, 其中第一轴的解释度为 59.75%, 第二轴的解释度为 28.43% (图 4)。对 SON 解聚酶活性存在显著影响的影响因子包括: ST, SM, MBC, NH_4^+ 和 NO_3^- , 其中 ST 和 SM 解释度最高 (表 3)。ALPT、NPT、Lac 和 LAP 活性主要受到 ST 显著的负向影响, 受到 SM, NH_4^+ , NO_3^- 和 MBC 显著的正向影响。但 Mnp, GLS, Chi 和 ACPT 与 ST 和 SM 的夹角范围在 80° — 110° 之间, 说明这些解聚酶活性受 ST 和 SM 的影响较小 (图 4)。此外, Mnp、GLS 与 NH_4^+ 存在显著的正相关 (图 3), 并且受 NH_4^+ 的影响最大 (图 4)。

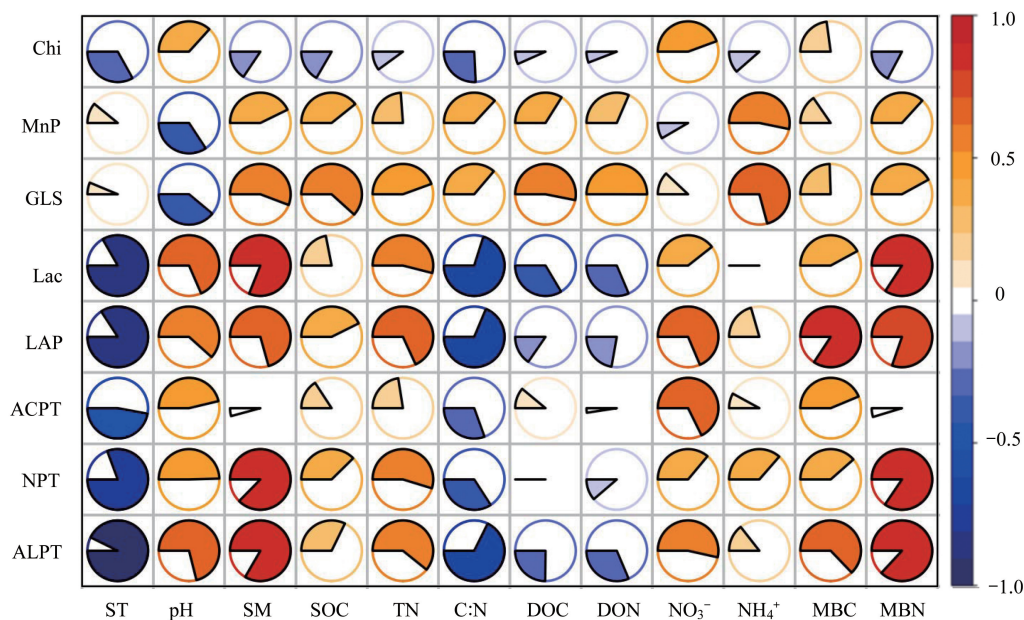


图3 不同海拔梯度黄山松 SON 解聚酶活性与土壤环境因子、理化性质的相关分析

Fig.3 Correlation analysis of SON depolymerase activities of *Pinus taiwanensis* with soil environmental factors and physicochemical properties at different altitude gradients

ST: 土壤温度 Soil temperature; SM: 土壤含水率 Soil moisture; pH: 酸碱度 pH value; SOC: 土壤总有机碳 Soil organic carbon; TN: 总氮 Total nitrogen; C:N: 碳氮比 Carbon nitrogen ratio; DOC: 可溶性有机碳 Dissolved organic carbon; DON: 可溶性有机氮 Dissolved organic nitrogen; MBC: 微生物生物量碳 Microbial biomass carbon; MBN: 微生物生物量氮 Microbial biomass nitrogen

3 讨论

3.1 不同海拔梯度下温度、水分和微生物等因素对黄山松 SON 解聚酶活性的影响

本研究中土壤温度和含水率是不同海拔梯度下 SON 解聚酶活性最大的两个影响因素 (表 3)。已有不少

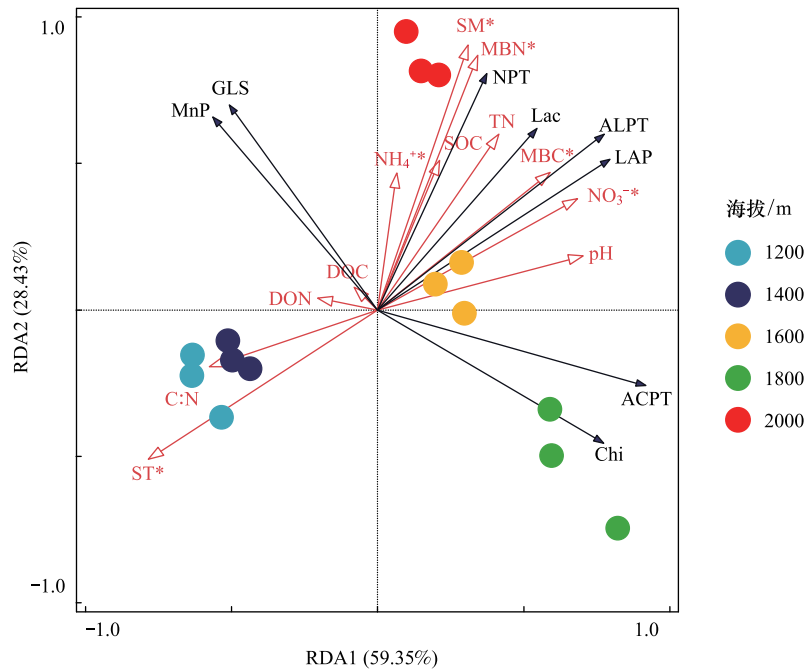


图 4 不同海拔梯度黄山松 SON 解聚酶活性的冗余分析

Fig.4 Redundancy analysis of SON depolymerase activities of *Pinus taiwanensis* at different altitude gradients

试验性增温实验发现,增温会抑制土壤酶活性^[28-29]。一般来说,温暖环境下的土壤微生物会分泌较少的酶^[28],由于酶的催化效率将随着温度的升高而增加^[30]。因此,在解聚等量 SON 的前提下,低温度的高海拔区可能需要分泌更多的 SON 解聚酶。同样,土壤蛋白酶活性对土壤水分具有强烈生物依赖性^[31]。近期一项 meta 分析也表明含水率增加可刺激氮循环酶活性^[32],原因在于含水率增加会降低酶的固定化并增加其扩散速率^[33]。反过来,干旱则抑制土壤酶活性^[33],同时降低土壤酶催化效率^[34]。相反,Chi 与 ST、SM 的夹角接近 90°,说明几丁质酶几乎不受温度和含水率的调节(图 4)。据研究报道,几丁质酶具有很强的热稳定性,温度通常在小于 60 °C 时均能保持很好的稳定性^[35]。此外,我们还发现 Chi 与所测的土壤环境因子和理化性质均无显著的相关性(图 3)。而本研究中几丁质酶随海拔升高而增加,但在海拔 2000 m 显著降低(图 1),推测其主要是由于几丁质酶需求的降低所致,由于高海拔区甲壳类动物或甲壳类物质分布较少。

表 3 冗余分析中影响因子的解释率

Table 3 Explains of impact factors in redundancy analysis

影响因子 Impact factors	解释率 Explains/%	pseudo-F	P	影响因子 Impact factors	解释率 Explains/%	pseudo-F	P
ST	44.2	10.3	0.002	DON	1.2	1.8	0.226
SM	25.2	9.9	0.002	MBN	1.7	3.5	0.056
NO ₃ ⁻	15	10.5	0.002	pH	0.4	0.7	0.504
NH ₄ ⁺	5.1	4.9	0.01	DOC	0.3	0.6	0.652
MBC	2.8	3.3	0.038	SOC	0.4	0.6	0.624
TN	1.9	2.7	—	C:N	0.8	1.4	0.318

除了温度和含水率,MBC 是影响 SON 解聚酶重要的因素之一(图 4)。众所周知,土壤中的解聚酶主要是由细菌、真菌等土壤微生物分泌,微生物生物量的变化必然会影响到土壤 SON 解聚酶的分泌量,进而影响到 SON 的解聚作用^[13]。土壤微生物对环境变化十分敏感^[36],近期一项全球尺度的 meta 分析表明,热带和亚热带地区土壤微生物生物量随海拔升高而增加,与土壤有机碳和全氮浓度呈显著正相关^[15]。本研究中 MBC 和 MBN

随海拔升高而增加, MBC 随海拔升高呈波浪式增长, 在海拔 1600 m 和 2000 m 达到波峰值, 并显著高于其他海拔 ($P < 0.05$, 表 2), 这将有利于 SON 解聚酶的分泌。由于 ALPT、NPT、Lac 和 LAP 与土壤 ST、SM 以及 MBC 最为密切, 与 ST 呈显著负相关, 与 SM、MBC 呈显著正相关(图 3, 图 4)。这直接导致了碱性蛋白酶、中性蛋白酶、漆酶和亮氨酸氨基肽酶 4 种解聚酶活性随海拔升高逐渐增加的分布规律, 并在海拔 2000 m 显著增加(图 1)。

此外, 多数研究表明土壤 pH 值会影响土壤酶活性^[14, 33, 37]。在本研究中尽管土壤 pH 在海拔 1800 m 显著升高(表 2), 并与部分 SON 解聚酶存在显著的相关性(图 3)。但相比于其他因素, 土壤 pH 值对 SON 解聚酶的解释率很低(表 3)。可能原因在于长期的环境塑造下, 酶产生了功能性适应^[37]。Puissant 等^[37]最近的一项研究表明, 亮氨酸氨基肽酶活性的最佳 pH 值接近天然土壤 pH 值, 酶的最适 pH 值会向源土壤 pH 值方向移动。本研究也发现, 亮氨酸氨基肽酶与 pH 没有显著的相关性(图 3)。Luo 等^[38]在北京缙云山 350—500 m 海拔梯度马尾松的研究同样发现, 土壤酶活性对温度和含水率更敏感, 与土壤 pH 无密切联系。

3.2 不同海拔梯度下有机底物和矿质氮对黄山松 SON 解聚酶活性的影响

土壤氮循环包括有机氮循环和无机氮循环两个过程(图 5)。其中上游的有机氮循环主要分为两个步骤: 第一个关键步骤是由 SON 解聚酶催化蛋白质、木质素, 几丁质, 肽聚糖等 SON 的水解, 该步骤被认为是土壤氮矿化的限速步骤^[39]。第二个步骤是微生物对氨基酸、氨基糖和核酸等单体的消耗。由于氨基酸 C:N 较低, 微生物摄取后约 30% 的碳通常被矿化为 CO_2 , 并导致 NH_4^+ 重回土壤^[40]。下游的无机氮循环过程包括, 部分 NH_4^+ 被硝化为硝酸盐(NO_3^-), 且土壤中 NH_4^+ 和 NO_3^- 可被微生物直接吸收利用^[4]。有研究表明土壤有机底物会影响 SON 解聚酶的释放^[8], 本研究中也发现 GLS 与 DOC、DON 呈显著的正相关(图 3), 但 DOC 和 DON 对 SON 解聚酶活性的影响并不显著(图 4, 表 3)。最可能的原因在于, 土壤有机底物以养分输送的形式通过微生物对 SON 解聚酶产生了更多的间接影响, 而非直接影响。由于微生物既参与了上游的有机氮循环, 又参与

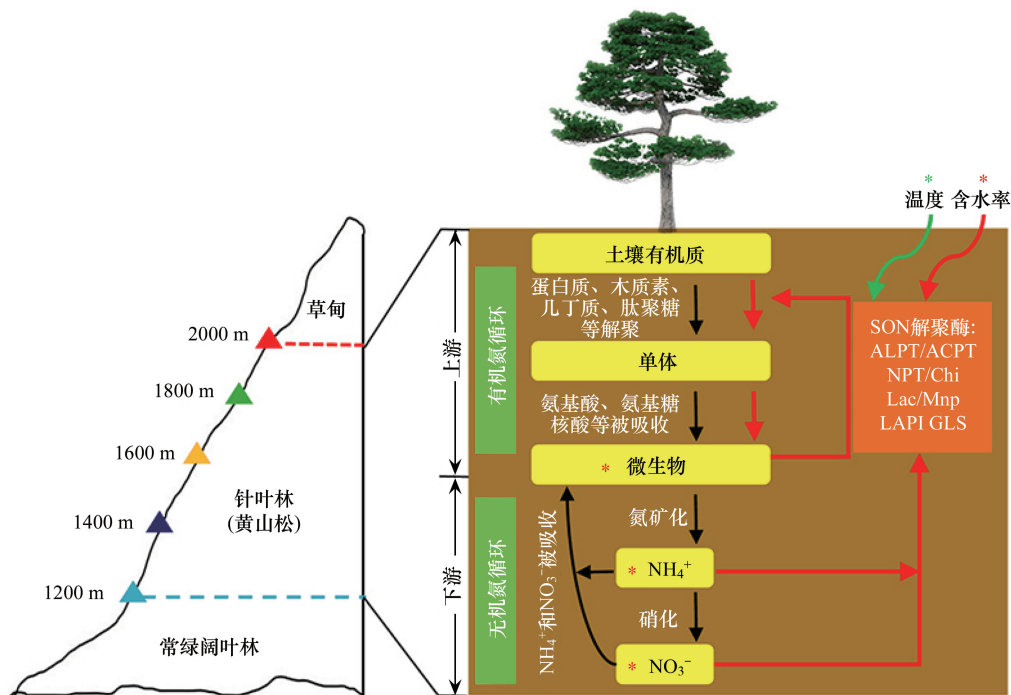


图 5 海拔梯度对黄山松 SON 解聚酶活性的影响示意图

Fig.5 A schematic diagram shows that the effect of altitude gradients on SON depolymerase activities of *Pinus taiwanensis*

带有 * 标注代表该因素对 SON 解聚酶有显著的影响, 粗箭头代表影响 SON 解聚酶活性的可能路径, 绿色代表负面影响因素或负向路径, 红色代表正面影响因素或正向路径

了下游的无机氮循环(图 5),是连接土壤养分和 SON 解聚酶的中间桥梁。已有研究表明土壤酶活性很大程度上依赖于土壤养分对微生物生长和群落组成的间接影响^[41]。本研究中土壤 MBC 与有机质底物(如 SOC、DOC)以及矿质氮(NH_4^+ 和 NO_3^-)在海拔梯度上的分布规律基本一致,均随海拔升高呈现波浪式增长趋势,同时在海拔 1600 m 和 2000 m 达到峰值(表 2,图 2,图 4),可以部分支持以上的观点。

相比于有机底物,SON 解聚酶活性显著受到下游无机氮循环中矿质氮的影响(图 5)。尽管微生物代谢经济学理论认为,当有效养分缺乏时,酶的产量会相应增加,因为胞外酶活性反映微生物代谢资源需求^[42]。然而,资源的限制也会限制酶的产量,酶的生产可能在很大程度上取决于微生物的需求和酶合成的碳、氮的可用性^[43]。本研究中矿质氮对 SON 解聚酶活性存在显著的正效应,其中 ACPT、LAP 与 NO_3^- 呈显著正相关,Mnp、GLS 与 NH_4^+ 呈显著正相关(图 3)。当有效氮资源无法继续供给用于酶合成,酶的产量将相应减少。因此,土壤 NO_3^- 在低、高海拔(1200—1400 m 和 2000 m)相对较低可能是 ACPT 活性在低、高海拔保持较低水平的主要原因。徐欣等的研究同样发现土壤蛋白酶活性与土壤 NH_4^+ 、 NO_3^- 均呈显著的正相关^[44]。相反,当氮资源增加时,则能保证氮循环酶的生产。例如,Wang 等^[45]在野外的氮添加实验已证实有效氮的增加会显著提高过土壤氮循环酶活性。Zhang 等^[46]的研究进一步表明,随着有效氮的增加谷氨酰胺合成基因的丰度明显增加。本研究中 NH_4^+ 是 GLS 最直接的影响因素(图 4),由于 NH_4^+ 在海拔 1800 m 的降低(图 2),很可能导致土壤谷氨酰胺的合成受阻,因此,海拔 1800 m 的谷氨酰胺酶分泌显著降低。

4 结论

SON 解聚酶活性在不同海拔梯度下受多种因素的综合影响,其中温度和含水率是影响 SON 解聚酶活性两大最重要的因素。尽管温度对 SON 解聚酶活性的负效应大于含水率对 SON 解聚酶活性的正效应,但是其他因素,如微生物生物量碳、矿质氮含量同样对 SON 解聚酶活性有很强的正效应,因此不同海拔梯度下环境因子累计的正效应大于负效应。相比于有机底物,下游无机氮循环中矿质氮对 SON 解聚酶活性产生了重要的影响。当矿质氮缺乏时,没有刺激酶的生产,反而降低了酶活性,尽管这不符合微生物代谢的经济学理论,但表明了亚热带中、高海拔区 SON 解聚酶合成容易受到有效氮资源的限制。

致谢:感谢曾嘉鸿对本文写作的帮助。

参考文献(References):

- [1] Huang W J, Spohn M. Effects of long-term litter manipulation on soil carbon, nitrogen, and phosphorus in a temperate deciduous forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 12-18.
- [2] Knicker H. How does fire affect the nature and stability of soil organic nitrogen and carbon? A review. *Biogeochemistry*, 2007, 85(1): 91-118.
- [3] Vitousek P M, Gosz J R, Grier C C, Melillo J M, Reiners W A, Todd R L. Nitrate losses from disturbed ecosystems. *Science*, 1979, 204(4392): 469-474.
- [4] Schimel J P, Bennett J. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology*, 2004, 85(3): 591-602.
- [5] Li X B, He H B, Zhang X D, Kazanci C, Li Z A, Necpalov M, Ma Q Q. Calculation of fungal and bacterial inorganic nitrogen immobilization rates in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 153: 108114.
- [6] Dai Z M, Yu M J, Chen H H, Zhao H C, Huang Y L, Su W Q, Xia F, Chang S X, Brookes P C, Dahlgren R A, Xu J M. Elevated temperature shifts soil N cycling from microbial immobilization to enhanced mineralization, nitrification and denitrification across global terrestrial ecosystems. *Global Change Biology*, 2020, 26(9): 5267-5276.
- [7] Geisseler D, Horwath W R, Joergensen R G, Ludwig B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms-a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(12): 2058-2067.
- [8] Brzostek E R, Finzi A C. Substrate supply, fine roots, and temperature control proteolytic enzyme activity in temperate forest soils. *Ecology Society of America*, 2011, 92(4): 892-902.
- [9] Simpson J, Warren C, Adams P. Potential protease activity and organic nitrogen concentration are rapid tests and accurate indicators of N-availability in Tasmanian *Eucalyptus nitens* plantations. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 152-160.

- [10] Vranova V, Rejsek K, Formanek P. Proteolytic activity in soil: a review. *Applied Soil Ecology*, 2013, 70: 23-32.
- [11] Hofmocker K S, Fierer N, Colman B P, Jackson R B. Amino acid abundance and proteolytic potential in North American soils. *Oecologia*, 2010, 163(4): 1069-1078.
- [12] Truong C, Gabbarini L A, Corrales A, Mujic A B, Escobar J M, Moretto A, Smith M E. Ectomycorrhizal fungi and soil enzymes exhibit contrasting patterns along elevation gradients in southern Patagonia. *New Phytologist*, 2019, 222(4): 1936-1950.
- [13] Nguyen T, Kleber M, Myrold D D. Contribution of different catalytic types of peptidases to soil proteolytic activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 138: 107578.
- [14] Hu Y T, Zheng Q, Zhang S S, Noll L, Wanek W. Significant release and microbial utilization of amino sugars and D-amino acid enantiomers from microbial cell wall decomposition in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 123: 115-125.
- [15] He X J, Hou E Q, Veen G F, Ellwood M D F, Dijkstra P, Sui X H, Zhang S, Wen D Z, Chu C J. Soil microbial biomass increases along elevational gradients in the tropics and subtropics but not elsewhere. *Global Ecology and Biogeography*, 2020, 29(2): 345-354.
- [16] Warren C R. Variation in small organic N compounds and amino acid enantiomers along an altitudinal gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 197-212.
- [17] 聂阳意, 王海华, 李晓杰, 任寅榜, 金昌善, 徐自坤, 吕茂奎, 谢锦升. 武夷山低海拔和高海拔森林土壤有机碳的矿化特征. *应用生态学报*, 2018, 29(3): 748-756.
- [18] 李晓杰, 刘小飞, 林成芳, 陈仕东, 熊德成, 林伟盛, 胥超, 谢锦升, 杨玉盛. 土壤增温调节中亚热带森林更新初期植物生物量分配格局. *生态学报*, 2017, 37(1): 25-34.
- [19] 周永姣, 程林, 王满堂, 朱国洁, 钟全林, 郭炳桥, 程栋梁. 武夷山不同海拔黄山松细根性状季节变化. *生态学报*, 2019, 39(12): 4530-4539.
- [20] Yuan X C, Si Y T, Li W S, Yang J Q, Wang Z, Zhang Q F, Qian W, Chen Y M, Yang Y S. Effects of short-term warming and nitrogen addition on the quantity and quality of dissolved organic matter in a subtropical *Cunninghamia lanceolata* plantation. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0191403.
- [21] 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.
- [22] Ladd J N, Butler J H A. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 1972, 4(1): 19-30.
- [23] Wirth S J, Wolf G A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *Journal of Microbiological Methods*, 1990, 12(3/4): 197-205.
- [24] Lončar N, Božić N, Lopez-Santin J, Vujčić Z. *Bacillus amyloliquefaciens* laccase-from soil bacteria to recombinant enzyme for wastewater decolorization. *Bioresource Technology*, 2013, 147: 177-183.
- [25] Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas F J, Martínez M J, Martínez A T. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(15): 10324-10330.
- [26] Shifrin S, Parrott C L, Luborsky S W. Substrate binding and intersubunit interactions in Γ -Asparaginase. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(5): 1335-1340.
- [27] Geng Y Q, Wang D M, Yang W B. Effects of different inundation periods on soil enzyme activity in riparian zones in Lijiang. *CATENA*, 2017, 149: 19-27.
- [28] 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.
- [29] Song Y Y, Song C C, Ren J S, Ma X Y, Tan W W, Wang X W, Gao J L, Hou A X. Short-term response of the soil microbial abundances and enzyme activities to experimental warming in a boreal peatland in Northeast China. *Sustainability*, 2019, 11(3): 590.
- [30] Koch O, Tschermo D, Kandeler E. Temperature sensitivity of microbial respiration, nitrogen mineralization, and potential soil enzyme activities in organic alpine soils. *Global Biogeochemical Cycles*, 2007, 21(4): GB4017.
- [31] Sardans J, Peñuelas J, Estiarte M. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology*, 2008, 39(2): 223-235.
- [32] Meng C, Tian D S, Zeng H, Li Z L, Chen H Y H, Niu S L. Global meta-analysis on the responses of soil extracellular enzyme activities to warming. *Science of the Total Environment*, 2020, 705: 135992.
- [33] Sardans J, Peñuelas J. Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(3): 455-461.
- [34] Alster C J, German D P, Lu Y, Allison S D. Microbial enzymatic responses to drought and to nitrogen addition in a southern California grassland.

- Soil Biology and Biochemistry, 2013, 64: 68-79.
- [35] 陈少波, 吴根福. 几丁质酶研究进展. 科技通报, 2004, 20(3): 258-262.
- [36] Shen C C, Gunina A, Luo Y, Wang J J, He J Z, Kuzyakov Y, Hemp A, Classen A T, Ge Y. Contrasting patterns and drivers of soil bacterial and fungal diversity across a mountain gradient. Environmental Microbiology, 2020, 22(8): 3287-3301.
- [37] Puissant J, Jones B, Goodall T, Mang D N, Blaud A, Gweon H S, Malik A, Jones D L, Clark L M, Hirsch P R, Griffiths R. The pH optimum of soil exoenzymes adapt to long term changes in soil pH. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 138: 107601.
- [38] Luo S P, He B H, Zeng Q P, Li N J, Yang L. Effects of seasonal variation on soil microbial community structure and enzyme activity in a Masson pine forest in Southwest China. Journal of Mountain Science, 2020, 17(6): 1398-1409.
- [39] Greenfield L M, Hill P W, Seaton F M, Paterson E, Baggs E M, Jones D L. Is soluble protein mineralisation and protease activity in soil regulated by supply or demand. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 150: 108007.
- [40] Hill P W, Jones D L. Plant-microbe competition: does injection of isotopes of C and N into the rhizosphere effectively characterise plant use of soil N? New Phytologist, 2019, 221(2): 796-806.
- [41] Mooshammer M, Hofhansl F, Frank A H, Wanek W, Hämmerle I, Leitner S, Schnecker J, Wild B, Watzka M, Keiblinger K M, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A. Decoupling of microbial carbon, nitrogen, and phosphorus cycling in response to extreme temperature events. Science Advances, 2017, 3(5): e1602781.
- [42] Sinsabaugh R L, Hill B H, Shah J J F. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. Nature, 2009, 462(7274): 795-798.
- [43] Allison S D, Vitousek P M. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(5): 937-944.
- [44] 徐欣, 郑利远, 周珂, 张锦源, 侯萌, 陈一民, 隋跃宇, 焦晓光. 长期施肥对不同有机质水平黑土蛋白酶活性及氮素的影响. 中国土壤与肥料, 2019, (1): 44-48.
- [45] Wang Q F, Ma M C, Jiang X, Guan D W, Wei D, Zhao B S, Chen S F, Cao F M, Li L, Yang X H, Li J. Impact of 36 years of nitrogen fertilization on microbial community composition and soil carbon cycling-related enzyme activities in rhizospheres and bulk soils in northeast China. Applied Soil Ecology, 2019, 136: 148-157.
- [46] Zhang C, Song Z L, Zhuang D H, Wang J, Xie S S, Liu G B. Urea fertilization decreases soil bacterial diversity, but improves microbial biomass, respiration, and N-cycling potential in a semiarid grassland. Biology and Fertility of Soils, 2019, 55(3): 229-242.