DOI: 10.5846/stxb202205091291

林开森,元晓春,曾泉鑫,徐建国,陈文伟,陈岳民.氮添加对戴云山黄山松林土壤有机氮解聚酶活性的影响及其调控因素.生态学报,2023,43 (16):6550-6559.

Lin K M, Yuan X C, Zeng Q X, Xu J G, Chen W W, Chen Y M.Effects of nitrogen addition and associated regulatory factors of the organic nitrogen depolymerizing enzyme activity of Pinus taiwanensis forest soils in Daiyun Mountain. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(16):6550-6559.

氮添加对戴云山黄山松林土壤有机氮解聚酶活性的影 响及其调控因素

林开森^{1,2,*},元晓春^{1,2},曾泉鑫¹,徐建国³,陈文伟³,陈岳民¹

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;解聚作用是控制土壤有机氮矿化和氮素有效性供应的关键,然而氮沉降对亚热带森林土壤有机氮解聚作用的影响机制尚 不明确。以福建戴云山黄山松林为研究对象,设置对照(CT)、低氮(LN)和高氮(HN)3个氮添加水平,进行为期2年的氮沉降 模拟试验。通过分析土壤化学性质、微生物生物量和土壤8种有机氮解聚酶活性的变化,探究土壤有机氮解聚作用响应氮沉降 的机理过程。结果表明:短期氮添加显著增加 0—10 cm 和 10—20 cm 土层矿质氮含量,并显著增加了 10—20 cm 土层微生物生 物量碳(MBC)的含量。同时,0—10 cm 土壤锰过氧化物酶活性随氮添加量增加而显著提高,HN 处理下土壤漆酶活性显著高于 LN 和 CT;10—20 cm 土壤的酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶和漆酶活性均随氮添加量增加而显著提高,但是谷氨酰胺酶 活性变化相反。冗余分析表明两个土层有机氮解聚酶活性影响因素不同,土壤硝态氮(NO3-N)是0-10 cm 土层有机氮解聚酶 活性的主要影响因素,而10-20 cm 土层有机氮解聚酶活性由 NO 5-N 和 MBC 共同影响。综上所述,亚热带黄山松林土壤不同 有机氮解聚酶对氮添加的响应不一致,主要受土壤 NO3-N 和 MBC 调节。该研究有助于拓宽土壤氮循环对氮沉降的响应机理, 同时对维持土壤有效氮含量和提高黄山松生态系统生产力具有重要意义。

关键词:森林土壤;有机氮解聚;蛋白酶活性;微生物生物量

Effects of nitrogen addition and associated regulatory factors of the organic nitrogen depolymerizing enzyme activity of Pinus taiwanensis forest soils in **Daiyun Mountain**

LIN Kaimiao^{1,2,*}, YUAN Xiaochun^{1,2}, ZENG Quanxin¹, XU Jianguo³, CHEN Wenwei³, CHEN Yuemin¹

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: Depolymerization is a key process to control soil organic nitrogen mineralization and nitrogen availability supply. However, it is unclear that the affecting mechanism of nitrogen deposition on soil organic nitrogen depolymerization in subtropical forest. In this study, taking Pinus taiwanensis forest as the research object, a two-year nitrogen addition simulation experiment was set up by three levels including control (CT), low nitrogen (LN) and high nitrogen (HN) in Daiyun Mountain, Fujian Province. The mechanism of soil organic nitrogen depolymerization in response to nitrogen

基金项目:国家自然科学青年科学基金项目(32201532);福建省自然科学基金项目(2020J01397);武夷学院高级引进人才科研启动项目 (YJ201812);武夷学院师生共创科研团队(2020-SSTD-013)

收稿日期:2022-05-09; 网络出版日期:2023-04-14

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: 303790102@ qq.com

http://www.ecologica.cn

deposition was explored by analyzing the changes of soil chemical properties, microbial biomass and eight soil organic nitrogen depolymerizing enzyme activities. The results showed that short-term nitrogen addition significantly increased the content of mineral nitrogen in 0-10 cm and 10-20 cm soil layers, and significantly increased the content of microbial biomass carbon (MBC) in 10-20 cm soil layers. Simultaneously, the activity of Manganese Peroxidase in 0-10 cm soil layer increased significantly with nitrogen addition, and Laccase in HN was significantly higher than that of CT and LN. The activities of Acid Protease, Alkaline protease, Neutral protease and Laccase in 10-20 cm soil layer were increased significantly with the nitrogen addition, but the D-glutaminase activity was the opposite. Redundancy analysis showed that different influencing factors dominated the activities of organic nitrogen depolymerase in the two soil layers. Soil nitrate nitrogen (NO₃-N) was the main influence factor of organic nitrogen depolymerase activities of 0-10 cm soil layer, while the organic nitrogen depolymerase activities of 10-20 cm soil layer was jointly affected by NO₃⁻-N and microbial biomass carbon (MBC) content. In conclusion, the responses of soil organic nitrogen depolymerization enzymes to nitrogen addition were inconsistent in subtropical Pinus taiwanensis forest soil, which were mainly regulated by soil NO₃⁻-N and MBC content. The mechanism of soil organic nitrogen depolymerization under nitrogen addition is very complex, and it will be an important direction in the future to study the process and mechanism of organic nitrogen depolymerization from the perspective of their polymerization effect. This study is helpful to broaden the response mechanism of soil nitrogen cycle to nitrogen deposition, and it has important implications for maintaining soil available nitrogen content and improving ecosystem productivity in Pinus taiwanensis forest.

Key Words: forest soil; organic N depolymerization; protease activity; microbial biomass

由于化石燃料与农业化肥的大量使用,大气中活性氮的沉降量快速增加,预计到 2050 年亚热带地区氮沉 降量会再翻一番^[1]。快速增加的氮沉降提高了土壤氮循环通量和各种含氮化合物间的转化速率,破坏土壤 养分元素的平衡^[2],成为影响森林土壤有机氮循环及其氮有效性的重要环境因素。土壤有机氮占土壤总氮 的 90%以上,但大部分有机氮不能被植物和微生物直接吸收,需要通过微生物的矿化作用转化为小分子态有 机氮和无机氮成分,才能被植物利用,因此有机氮矿化速率是决定土壤氮供应能力的关键因子^[3]。由于有机 氮库组成十分复杂,有机氮来源和分子的类型多样^[4],土壤有机氮解聚作用成为限制土壤有机氮矿化的关键 过程,直接控制有效性氮来源的"瓶颈"^[5]。然而,相对于无机氮循环过程,有机氮解聚作用仍然是一个"黑 箱",有机氮解聚酶对氮沉降如何响应仍有待探明^[6]。因此,关注氮沉降对森林生态系统土壤有机氮解聚作 用的影响,有助于理解氮沉降背景下土壤有机氮矿化和氮素有效性供给的关键过程,进而为森林土壤氮素养 分的管理和调控提供一定的实践指导。

土壤有机氮的解聚作用本质上是解聚酶将有机氮大分子聚合物水解,生成能够被植物吸收的低聚物^[7] 或者小分子单体,如氨基酸、氨基糖、核酸等^[8]。因此,解聚酶是解聚作用强度和方向的关键控制因子,其活 性的大小常被用来表征解聚作用的强度^[9]。然而解聚酶并不是某一种酶,是能够将土壤含氮大分子聚合物 逐步水解的一系列酶^[8],所以解聚作用的研究首先需要明确解聚酶的类型。例如,有研究发现,蛋白酶、几丁 质酶和肽聚糖酶是主要参与有机氮解聚作用的酶^[6]。因此,研究氮沉降下土壤有机氮解聚酶的活性及其反 应方向是理解有机氮解聚作用调控机理的关键^[5]。温带森林土壤的氮添加试验进一步证实了蛋白酶活性可 以作为表征解聚作用的有效指标^[3]。与温带相比,虽然亚热带森林土壤相对富氮,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^[10],氮沉降控制亚热带森林土壤有机氮解聚作用的变化可能比温带地区 更为复杂。氮沉降增加了土壤无机氮,微生物和植物对土壤有机氮释放有效性养分需求降低,但是对土壤有 机氮解聚酶活性影响并不一致^[5]。目前亚热带地区大多数研究都集中在土壤氮循环的无机部分,仅有少数 研究中报告了有机氮解聚(蛋白质)的总速率^[11]。因此,亚热带森林土壤有机氮解聚作用如何响应及驱动解 聚酶活性变化的关键因素仍需要开展更多研究来明确。 黄山松(Pinus taiwanensis)是我国特有树种,主要分布在纬度25°—35°,海拔800—1600 m 范围内,为我国 东部亚热带中山地区森林演替的先锋树种。戴云山自然保护区内分布着我国东南沿海山地分布最南端、面积 最大、保护最完好的黄山松原生性群落^[12]。该区属于典型的亚热带海洋性季风气候,夏季高温多雨,土壤风 化强烈^[13]。此外,一般认为高海拔地区土壤氮库和有效氮含量比低海拔低,植物生长对氮素需求较高^[14]。 随着全球气候变化和森林演替,戴云山南北坡黄山松出现枯损、被毛竹林和以壳斗科为代表的山地常绿阔叶 林替代等现象,并有持续扩大趋势。这可能加大植被对土壤氮素的需求,甚至造成缺氮的状况^[15],所以在亚 热带中山较高海拔地区,黄山松土壤有机氮解聚提供的小分子有机氮对维持土壤氮矿化供应至关重要。本研 究以福建戴云山自然保护区内的黄山松林为研究对象,通过野外模拟大气氮沉降,分析不同氮添加量对土壤 有机氮解聚酶活性的影响及其调控因素,研究结果有助于揭示土壤有机氮解聚酶对氮沉降的响应机理,在维 持土壤有效氮含量和提高黄山松生态系统生产力发挥作用。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验样地位于福建戴云山国家级自然保护区的黄山松林内(25°38′26″N,118°8′26″E),该区属于亚热带 季风气候,年平均气温 17℃,每年有雾期达 140 d 左右,有霜期达 165 d 左右。雨量充沛,降雨集中在每年生 长季的 3—9月,湿度较大,年相对湿度平均在 80%以上,常年阴雨较多,日照较少,地貌以低山丘陵为主,地带 性土壤为黑云母花岗岩发育的红壤,该地区总氮沉降量为约 38 kg N hm⁻² a^{-1[16]}。样地优势树种为黄山松,林 下植被优势种为箬竹(Indocalamus),伴生植物有山茶花(Camellia flower)、毛稔(Melastoma sanguineum)等。

1.2 试验设计

于 2017 年在黄山松林样地内设置 12 个 10 m×10 m 的模拟氮沉降小区,所有试验小区朝向东方向,坡度 25°—35°,海拔 1480 m。黄山松林平均胸径范围 32.93—36.23 cm,平均树高 16.29—19.21 m,密度 720—723 株/hm²,郁闭度 0.80—0.83^[17]。通过随机区组设计设置对照(CT,0 kg N hm⁻² a⁻¹)、低氮(LN,40 kg N hm⁻² a⁻¹)和高氮(HN,80 kg N hm⁻² a⁻¹)3种处理,每种处理 4 个重复,每个试验 d 小区周围都有大于 5 m 宽的缓冲 区。试验区从 2018 年 5 月开始氮添加,氮添加时间为生长季(3—9 月),每月进行一次,氮添加形式为分析纯 尿素[CO(NH₂)₂]。每次将尿素(LN,24.49 g;HN,48.98 g)溶解于 20 L 去离子水中,用背式喷雾器对各样区 进行均匀的林下喷洒,对照样区则用等量的去离子水代替尿素溶液进行喷洒。

1.3 样品采集与处理

经过2年的氮沉降模拟实验,于2020年4月份在每个样区利用五点混合取样,去除表面植被后分别钻取 0—10 cm 和10—20 cm 土层的土壤样品,带回实验室,剔除细根、碎石等杂质后,过2 mm 筛后置于4℃冰箱储 存,一部分样品用于土壤有机氮解聚酶活性、微生物生物量碳(MBC)和微生物生物量氮(MBN)测定;另一部 分经过自然风干并过0.125 mm 筛,用于测定土壤基本理化性质指标。

1.4 土壤分析方法

土壤性质的测定: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。总碳(TC)、总氮(TN)和碳氮比(C:N)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,用连续流动分析仪(Skalar san⁺⁺,Skalar,荷兰)测定滤液 中的铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)含量^[18]。可溶性有机碳(DOC)和可溶性有机氮(DON)采用水浸提 法^[19],分别采用有机碳分析仪(TOC-VCPH/CPN,Shimadzu,日本)和连续流动分析仪测定。MBC 和 MBN 采 用氯仿熏蒸-硫酸钾浸提法^[20],计算公式分别为:MBC= $\Delta E_c/K_c$;MBN= $\Delta E_N/K_N$,式中的 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,采用比色法进行酶活性的测定。蛋白酶包括酸性蛋白酶(ACPT,EC 3.4.23.18)、中性蛋白酶 (NPT,EC 3.4.21.14)和碱性蛋白酶(ALPT,EC 3.4.21.14)。参照 Ladd 和 Butler(1972)^[21]的方法,采用福林酚 比色法测定;几丁质酶(Chi,EC 3.2.1.14)依据 Wirth 和 Wolf 等(1990)^[22]的方法,通过二甲氨基苯甲醛比色法 测定;漆酶(Lac,EC 1.10.3.2)参照 Loncar 等(2013)的方法,用 ABTS 氧化法测定^[23];锰过氧化物酶(MnP,EC 1.11.1.13)依照 Camarero 等(1999)的方法^[24],通过愈创木酚比色法测定;谷氨酰胺酶(GLS,EC 3.5.1.2)参考 Shirfrin 等(1974)的方法,用奈氏比色法测定^[25];土壤芳基硫酸酯酶(ASF,EC 3.1.6.1)根据 Tabatabai 等 (1970)的方法,采用对硝基苯胺比色法测定^[26]。所测定酶的底物及特征吸收峰如表1所示。

表 1	土壤有机氮解聚酶的种类。	、缩写、相应底物和特征吸收峰
-----	--------------	----------------

Table 1	Types.	abbreviations.	corresponding	substrates and	characteristic	absorption	peak of soi	l organic	Nitrogen o	depolymerase	activities
		,	1 0				1			1 1	

酶 Enzyme	缩写 Abbreviation	底物 Substrate	特征吸收峰 Characteristic absorption peak/nm
酸性蛋白酶 Acid Protease/(mg d ⁻¹ g ⁻¹)	ACPT	酪蛋白	680
中性蛋白酶 Neutral Protease/(mg d ⁻¹ g ⁻¹)	NPT	酪蛋白	680
碱性蛋白酶 Alcalase Protease/(mg d ⁻¹ g ⁻¹)	ALPT	酪蛋白	680
几丁质酶 Chitinase/(μg d ⁻¹ g ⁻¹)	Chi	N-乙酰氨基葡萄糖	585
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	420
锰过氧化物酶 Manganese Peroxidase/(nmol d ⁻¹ g ⁻¹)	Mnp	Mn 离子和愈创木酚	465
谷氨酰胺酶 D-glutaminase/(nmol min ⁻¹ g ⁻¹)	GLS	谷氨酰胺	420
芳基硫酸酯酶 Arylsulfatase/(μmol d ⁻¹ g ⁻¹)	ASF	硝基苯硫酸钾	410

1.5 土壤分析方法

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)检验不同氮添加 处理土壤性质、有机氮解聚酶活性的差异显著性(α=0.05)。利用 Canaco 5.0 软件进行冗余分析,通过前向选 择的方法探究氮添加处理下影响土壤有机氮解聚酶活性的关键因子。为消除不同量纲的影响,在进行冗余分 析前,将环境因子(土壤性质和微生物生物量)的数据进行 z-score 标准化;同时,通过方差膨胀系数(VIF)检 验了这些变量的多重共线性,发现各因子不存在显著的关联(VIF<15),符合分析要求^[27]。绘图由 Origin 2018 软件完成,图表中数据为平均值±标准差(n=4)。

2 结果与分析

2.1 氮添加对土壤性质的影响

短期氮添加显著降低 0—10 cm 土层 DOC 含量(P<0.05),并显著增加 0—10 cm 和 10—20 cm 土层矿质 氮含量(P<0.05),但对 DON 含量无显著影响。此外,氮添加显著增加了 10—20 cm 土层 MBC 的含量(P< 0.05),但对土壤 pH,TC,TN,TC/TN 均无显著影响(表 2)。

2.2 氮添加对土壤有机氮解聚酶活性影响

氮添加显著降低了 0—10 cm 和 10—20 cm 土层 Lac 的含量,对 Chi 和 ASF 均无显著影响(图 1)。同时, 氮添加显著增加了 0—10 cm 土层 MnP 含量(P<0.05),但 10—20 cm 土层低氮处理下 MnP 含量显著增加(P<0.05)。此外,氮添加对表层部分土壤有机氮解聚活性的影响低于亚表层,其中氮添加对 0—10 cm 土层 ACPT、ALPT、NPT 和 GLS 均无显著影响,但 10—20 cm 土层高氮处理下的 ACPT、ALPT、NPT 显著降低,而 GLS 显著增加(P<0.05)。

2.3 土壤解聚酶活性的驱动因素

冗余分析显示,不同氮添加下土壤有机氮解聚酶存在明显的分区(图2,P≤0.01)。在0—10 cm 土层,主 坐标一轴和二轴总共解释了有机氮解聚酶活性变化的 38.48%,NO₃N 含量对土壤有机氮解聚酶有显著的正向 影响,且与 ACPT、LAC、GLS 夹角范围较小,说明这些解聚酶活性受到 NO₃-N 含量的正向影响较大(图2)。在 10—20 cm 土层,主坐标一轴和二轴总共解释了有机氮解聚酶活性变化的 46.20%。MBC 含量对土壤有机氮 解聚酶活性影响最大,且与氮添加量呈显著相关。NO₃-N 含量对土壤有机氮解聚酶有显著的正向影响,且与 NPT、ALPT、ACPT 和 LAC 的夹角范围较小,说明这些解聚酶活性受到 NO₃-N 的正向影响较大(图 2)。

	1	able 2 Effects of	i simulated nitro	gen addition o	n chemical prope	rties of the soli		
指标	0—10 cm			D		D		
Indicator	СТ	LN	HN	P	СТ	LN	HN	P
pН	3.94(0.15)	3.96(0.11)	3.96(0.05)	0.96	4.14(0.03)	4.17(0.05)	4.12(0.02)	0.67
TC	61.05(10.65)	56.99(3.13)	55.50(4.25)	0.52	27.91(3.67)	26.04(5.79)	25.36(6.64)	0.80
TN	3.95(0.63)	3.71(0.31)	3.74(0.36)	0.73	1.90(0.18)	1.90(0.41)	1.83(0.39)	0.94
TC/TN	16.39(1.35)	15.37(0.51)	15.50(0.83)	0.31	14.62(0.74)	13.73(0.53)	13.74(0.98)	0.23
DOC	123.40(11.57)a	107.27(21.42)ab	85.01(9.19)b	0.017	46.97(5.58)	48.04(10.31)	44.33(8.72)	0.818
DON	5.22(1.48)	5.16(1.45)	4.63(0.91)	0.785	2.31(1.00)	2.38(0.84)	3.69(2.11)	0.237
NH_4^+-N	14.17(3.11)	16.36(2.24)	14.20(0.37)	0.33	$7.97(1.67)\mathrm{b}$	14.97(1.33) a	13.82(1.01) a	< 0.01
NO_3^N	4.43(0.52)c	$8.64(1.85)\mathrm{b}$	13.17(0.84) a	< 0.01	$3.04(0.38)\mathrm{b}$	$4.80(0.39){\rm b}$	8.17(2.48)a	< 0.01
MBC	699.60(77.72)	611.98(56.39)	582.91(77.23)	0.41	213.48(1.31)b	416.87(74.16)a	294.11(78.69)b	0.03
MBN	61.67(8.34)	57.85(11.88)	48.84(9.93)	0.24	$29.95(8.08){\rm b}$	52.81(12.81)a	$29.94(8.46)\mathrm{b}$	0.01

表 2 氮添加对土壤性质的影响

* CT: 对照 control;LN: 低氮 low nitrogen; HN: 高氮 high nitrogen; pH: 酸碱度 pH value; TC: 总碳 Total 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; NH₄⁺-N: 铵态氮 Ammonium; NO₃⁻-N: 硝态氮 Nitrate; MBC: 微生物生物量碳 Microbial biomass carbon; MBN: 微生物生物量氮 Microbial biomass nitrogen; 表中数 据为平均值(标准差), n=4, 同一行不同小写字母表示不同氮添加量间差异显著(P<0.05)



🔲 高氮 🔼 低氮 🗀 对照



Fig.1 Effect of nitrogen addition on soil organic Nitrogen depolymerase activities of 0—10 cm and 10—20 cm soil layer of *Pinus taiwanensis* CT: 对照 control; LN: 低氮 low nitrogen; HN: 高氮 high 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; GLS: 谷氨酰胺酶 Glutaminase; ASF 芳基硫酸酯酶 arylsulfatase; MnP: 锰过 氧化物酶 Manganese peroxidase; Lac: 漆酶活性 Laccase. 其中, Lac 酶活性单位为 nmol/min /g, MnP 为 nmol/d/g, 其余酶活性单位为 µg/h/g. 图中星号表示氮处理对酶活性的影响显著(*: P<0.05, **: P<0.05), 不同小写字母表示不同氮添加量间差异显著(P<0.05)





Fig.2 Redundancy analysis of soil organic Nitrogen depolymerase activities of Pinus taiwanensis by simulated nitrogen addition

ACPT: 酸性蛋白酶 Acid Protease; NPT: 中性蛋白酶 Neutral Protease; ALPT: 酪蛋白 Alcalase Protease; Chi: 几丁质酶 Chitinase; Lac: 漆酶 Laccase; Mnp: 锰过氧化物酶 Manganese Peroxidase; GLS: 谷氨酰胺酶 D-glutaminase; ASF: 芳基硫酸酯酶 Arylsulfatase

3 讨论

3.1 氮添加对土壤有机氮解聚酶活性的影响

土壤有机氮循环主要分为两个步骤;第一个关键步骤是由有机氮解聚酶催化蛋白质、木质素,几丁质,肽 聚糖等大分子有机氮的水解形成氨基酸、氨基糖和核酸等小分子有机氮,该步骤被认为是土壤氮矿化的限速 步骤^[5]。第二个步骤是微生物对小分子有机氮单体的分解,这一步骤被认为是无机氮循环过程,其产物 NH₄-N 和 NO3-N 可被微生物直接吸收利用^[8]。由于氨基酸的 C/N 比值较低,微生物摄取后约 30%的 C 通常被矿 化为 CO,,并导致 NH[‡]-N 重回土壤^[28]。氮添加对森林生态系统中氮水解酶的活性具有正向、中性或负向影 响,这主要取决于氮沉降下解聚酶的生化反应强度和方向^[29]。本研究发现,氮添加对土壤 ASF 和 CHI 活性 的影响不显著(图1),这与亚高山草原生态系统研究结果一致^[30],但是与一些研究结果存在差异,如 Allison 等[31]在阿拉斯加中部北方森林试验发现氮添加抑制了几丁质降解酶的活性。几丁质降解酶通常是由放线菌 产生,主要用以获取土壤有机质中的碳和氮,而亚热带中高海拔区动物相对较少,甲壳类物质相应较少,导致 几丁质酶的需求较低[11],这也是氮沉降下几丁质降解酶变化不显著的主要原因。另外也有研究认为几丁质 分解的功能多样性和冗余性低于蛋白水解酶^[32],氮添加下几丁质解聚酶的响应度是低于蛋白水解酶。因此, 在亚热带黄山松森林生态系统中,几丁质降解酶对氮添加的响应显然没有蛋白质解聚酶明显。几丁质的解聚 过程需要 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(β -1,4-N-acetylglucosaminidase,NAG)等几丁质酶的参与形成葡萄糖胺等 化合物^[33]。但是, Chen 等^[34]对 64 项研究的 Meta 分析发现氮添加提高了土壤 NAG 活性 5.5%, 在热带森林 氮添加试验也发现了 NAG 活性显著增加^[35],几丁质解聚过程中涉及的降解酶对氮添加的响应并不是完全一 致,未来可以从编码几丁质降解酶的放线菌基因的变化来进一步研究几丁质降解酶对氮沉降的适应机制。

根据资源分配理论^[2],土壤微生物分泌酶是为了满足自身生长对养分的需要,大气氮沉降下土壤无机氮 (NH₄⁺-N)增加,会导致微生物和植物对土壤自身有机氮释放有效氮养分需求降低^[2],进而土壤有机氮解聚酶 活性随之下降[36]。目前大部分研究支持资源分配理论,认为土壤蛋白质的解聚由多种因素介导,氮添加对蛋 白质解聚酶活性没有或存在消极影响, Meta 分析发现蛋白水解酶对氮沉降响应较小^[37]。这与本研究的结论 不一致,本研究发现氮添加显著提高 10-20 cm 土壤蛋白质水解酶(酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶) 的活性(图1), Wang 等^[38]在野外的氮添加实验也发现土壤有效氮增加有利于提高土壤氮获取酶活性,这可 能是氮添加下微生物调整与多聚体相关解聚酶的合成,如肽聚糖酶。肽聚糖酶主要负责水解肽聚糖为氨基酸 单体,主要包括 GLS、甘氨酸氨基肽酶(Glycine aminopeptidase, GAP)和亮氨酸氨基肽酶(Leucine arylamidase, LAP)。目前,大部分研究认为氮添加抑制了肽聚糖酶活性或没有显著影响,如亚热带和温带六个森林的试验 发现,氮添加对土壤 LAP 和 GAP 没有影响^[2], Meta 分析也发现 LAP 对氮沉降的响应较小^[39]。本研究发现氮 添加对 10-20 cm 土层 GLS 活性存在显著抑制作用(图 1)。但是也有研究认为氮添加提高了土壤肽聚糖解 聚酶的活性^[40], Zhang 等^[41]认为氮添加增加了 GLS 合成基因的丰度, 对氮周转存在积极影响。另外, 本研究 发现氮添加提高亚热带黄山松林 0—10 cm 土壤漆酶和锰过氧化物酶。金属肽酶贡献了 30%—50% 的土壤蛋 白水解活性,其中,漆酶和锰过氧化物酶是金属肽酶的主要组成。在酸性较弱的土壤中发现金属肽酶活性的 相对贡献较高,氮添加下漆酶和锰过氧化物酶活性显著提高,这与大部分研究结论一致,证实了其在土壤有机 氮解聚过程的关键作用。显然,氮添加下土壤有机氮解聚酶也不一定完全遵循资源分配理论。因此,单独或 组合的蛋白质解聚酶(蛋白酶、氨肽酶、NAG、脲酶、酰胺酶等)对氮添加的响应不一致,表明单个蛋白质水解 酶并不能代表土壤总有机氮解聚活性对氮沉降的响应。将某些蛋白质水解酶的活性与氮矿化或底物可用性 联系起来是片面的,因为森林土壤中的有机氮底物构成是多样化的,包括酰胺、胺、杂环-氮分子以及土壤有机 质中存在的植物和微生物来源的多酚、多糖、木质素残留物、脂质和其他降解产物等[42]。然而目前仍然缺乏 氮添加下哪种有机氮解聚酶积极参与有机氮转换的定量信息。尽管有机氮分子的大小、组成和结构会影响到 解聚作用的差异,但是大分子蛋白质和小分子有机氮相比降解差异性如何还要进一步研究。未来从有机氮解

聚酶聚合效应开展有机氮解聚过程和机制研究将是一个重要方向。

3.2 氮添加下土壤有机氮解聚酶活性的调控因素

尽管已有研究表明土壤底物会影响有机氮解聚酶的释放^[9],但在本研究中氮添加对土壤 TC、TN、DOC 和 DON 并没有显著影响(表1)。显然,这些因素对有机氮解聚酶的直接影响不显著,这与武夷山黄山松林研究 结论一致^[11]。过去研究认为土壤 pH 控制蛋白水解酶的合成,如 LAP 氨肽酶、金属蛋白酶等在土壤 pH 值为 7.2 时活性最大,微生物群落组成受土壤 pH 值驱动并对肽酶活性有显著影响^[43]。但是本研究发现氮添加并 未显著影响土壤 pH 值。显然,底物限制和 pH 值并不是有机氮解聚活性影响的关键机制。

土壤微生物生物量是调控有机氮解聚酶活性变化的主要因素之一,本研究发现 MBC 对 0—10 cm 和 10— 20 cm 土层土壤有机氮解聚酶活性影响最大(图 2)。王丽君等^[44]认为土壤酶活性和微生物生物量碳氮磷均 存在显著的相关性,支持了本结论。郭银花等^[45]发现氮添加加剧了土壤微生物碳限制,这可能是微生物生物 量调控有机氮解聚酶活性对氮添加的响应的主要原因。本研究发现随着氮添加量增加,土壤 MBC 和 MBN 含 量先升高后下降(表 2),但是大多数解聚酶活性并没有呈现降低趋势。因此,MBC 并不能完全解释高氮处理 土壤有机氮解聚酶活性仍然保持较高原因。袁颖红等^[46]研究表明氮添加处理不仅会增加土壤微生物生物量 碳含量,还能提高微生物生物活性和微生物多样性指数。因此,微生物多因子的综合效应可能更有助于解释 有机氮解聚酶活性的变化^[44],这是未来进一步需要探索的一个方向。

过去研究认为蛋白质解聚产物氨基酸含量增加会降低解聚酶活性[47],但是本研究进一步发现土壤氮矿 化产物 NO3-N 与 10—20 cm 土层 5 种有机氮解聚酶活性(酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、漆酶和锰过 氧化物酶)均存在显著正效应(图2)。通常参与蛋白质解聚过程与氮矿化过程的微生物种类是相对独立^[8], 土壤 NO₃-N 含量难以直接控制土壤有机氮解聚酶活性。而且,土壤 NO₃-N 主要来源于微生物对铵的硝化作 用,因此本研究将尿素作为氮源添加处理后提高了土壤的硝化作用,促进土壤 NO3-N 积累¹⁴³,显然本研究土 壤 NO₃-N 含量增加主要来源于外源添加氮,而来源于有机氮解聚产物可能较少。土壤 NO₃-N 含量增加改变 了土壤 C/N 比例的平衡,土壤有机氮解聚过程是微生物的一种碳获取策略^[49],这间接调控了土壤有机氮解 聚酶活性。周嘉聪等^[50]研究发现可溶性有机碳是驱动土壤酶活性的重要环境因子,支持了这一推测。因此, 本研究认为土壤 NO₄-N 含量增加使代谢土壤解聚酶的微生物结构从氮获取策略向碳获取策略转变,从而间 接调节了土壤解聚酶活性。另外,本研究区黄山松林土壤氮有效性可能较低,短期氮输入可能并未满足微生 物对氮的需求[15],为了在最小的能量损耗之下,最大限制地获取所需的资源,微生物可能只生产最需要的蛋 白质解聚酶。这可能也是本研究中酸性蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶活性始终保持较高水平的原因之 一。总之,本研究高氮处理下 MBC 和 MBN 均有所降低情况下,土壤蛋白质解聚酶活性仍然能够保持较高值, 可能是土壤微生物生物量与 NO₄-N 共同调控与解聚过程有关的土壤酶合成能力。氮添加下土壤有机氮解聚 作用机制非常复杂,微生物选择自身生长以及生产解聚酶种类偏好是多种因素交互作用下的有机氮解聚作用 机理,未来还有待进一步研究。

4 结论

亚热带高海拔地区黄山松林土壤有机氮解聚酶活性对氮添加响应差异较大,并不完全遵循资源分配理 论,同时也表明单个蛋白质水解酶并不能代表土壤总有机氮解聚活性响应氮沉降的方向。底物限制和土壤酸 碱性变化并不是影响本研究土壤有机氮解聚作用的关键机制,相比之下,土壤 NO₃-N 和 MBC 对有机氮解聚 酶活性更为重要。微生物是连接土壤养分和有机氮解聚酶的中间桥梁,与土壤 NO₃-N 含量共同调节了黄山 松林土壤有机氮解聚作用。微生物选择自身生长以及生产解聚酶种类偏好是解释了本研究的土壤有机氮解 聚酶活性影响的关键。总之,氮添加下土壤有机氮解聚作用机制非常复杂,从有机氮解聚酶聚合效应开展有 机氮解聚过程和机制研究是未来重要方向。 参考文献(References):

6558

- [1] Galloway J N, Townsend A R, Erisman J W, Bekunda M, Cai Z C, Freney J R, Martinelli L A, Seitzinger S P, Sutton M A. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. Science, 2008, 320(5878): 889-892.
- [2] Jing X, Chen X, Tang M, Ding Z J, Jiang L, Li P, Ma S H, Tian D, Xu L C, Zhu J X, Ji C J, Shen H H, Zheng C Y, Fang J Y, Zhu B. Nitrogen deposition has minor effect on soil extracellular enzyme activities in six Chinese forests. The Science of the Total Environment, 2017, 607/ 608: 806-815.
- [3] Tian J H, Wei K, Condron L M, Chen Z H, Xu Z W, Feng J, Chen L J. Effects of elevated nitrogen and precipitation on soil organic nitrogen fractions and nitrogen-mineralizing enzymes in semi-arid steppe and abandoned cropland. Plant and Soil, 2017, 417(1): 217-229.
- [4] Schulten H, Schnitzer M. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. Biology and Fertility of Soils, 1997, 26(1): 1-15.
- [5] 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.
- [6] Simpson J, Warren C, Adams P. Potential protease activity and organic nitrogen concentration are rapid tests and accurate indicators of Navailability in Tasmanian Eucalyptus nitens plantations. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 115: 152-160.
- [7] Farrell M, Hill P W, Farrar J, DeLuca T H, Roberts P, Kielland K, Dahlgren R, Murphy D V, Hobbs P J, Bardgett R D, Jones D L. Oligopeptides represent a preferred source of organic N uptake: a global phenomenon? Ecosystems, 2013, 16(1): 133-145.
- [8] Schimel J P, Bennett J. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. Ecology, 2004, 85(3): 591-602.
- [9] Brzostek E R, Finzi A C. Substrate supply, fine roots, and temperature control proteolytic enzyme activity in temperate forest soils. Ecology, 2011, 92(4): 892-902.
- [10] Fang Y T, Zhu W X, Gundersen P, Mo J M, Zhou G Y, Yoh M. Large loss of dissolved organic nitrogen from nitrogen-saturated forests in subtropical China. Ecosystems, 2009, 12(1): 33-45.
- [11] 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.
- [12] 赵盼盼,周嘉聪,林开淼,林伟盛,袁萍,曾晓敏,苏莹,徐建国,陈岳民,杨玉盛.不同海拔对福建戴云山黄山松林土壤微生物生物量 和土壤酶活性的影响.生态学报,2019,39(8):2676-2686.
- [13] 林惠瑛, 元晓春, 周嘉聪, 曾泉鑫, 孙俊, 程蕾, 林开森, 徐建国, 程栋梁, 陈岳民. 海拔梯度变化对武夷山黄山松林土壤磷组分和有效 性的影响. 生态学报, 2021, 41(14): 5611-5621.
- [14] 袁磊,李文周,陈文伟,张金波,蔡祖聪.戴云山自然保护区森林土壤氮转化特点研究.土壤,2017,49(2):240-247.
- [15] Abuzinadah R A, Read D J. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. iii. protein utilization by betula, picea and pinus in mycorrhizal association with Hebeloma crustuliniforme. New Phytologist, 1986, 103(3): 507-514.
- [16] Cui J Y, Yuan X C, Zhang Q F, Zhou J C, Lin K M, Xu J G, Zeng Y Z, Wu Y, Cheng L, Zeng Q X, Mei K C, Chen Y. Nutrient availability is a dominant predictor of soil bacterial and fungal community composition after nitrogen addition in subtropical acidic forests. PLoS One, 2021, 16 (2): e0246263.
- [17] 戴辉,周嘉聪,曾泉鑫,元晓春,崔琚琰,孙雪琦,苏先楚,李伟鹏,陈岳民.短期氮添加对黄山松林土壤碳组分的影响及其微生物机制. 环境科学学报,2022,42(9):291-300.
- [18] 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.
- [19] Bu X, Wang L M, Ma W B, Yu X N, McDowell W, Ruan H. Spectroscopic characterization of hot-water extractable organic matter from soils under four different vegetation types along an elevation gradient in the Wuyi Mountains. Geoderma, 2010, 159: 139-146.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(15): 10324-10330.
- [25] Shifrin S, Parrott C L. In vitro assembly of L-asparaginase subunits. The Journal of Biological Chemistry, 1974, 249(13): 4175-4180.
- [26] Tabatabai M A, Bremner J M. Arylsulfatase activity of soils. Soil Science Society of America Journal, 1970, 34(2): 225-229.
- [27] Patterson H D, Belsley D A, Kuh E, Welsch, R E. Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. Biometrics, 1981, 37(4): 862-871.

- [28] 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.
- [29] Hu Y T, Zheng Q, Noll L, Zhang S S, Wanek W. Direct measurement of the in situ decomposition of microbial-derived soil organic matter. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 141: 107660.
- [30] Jing X, Yang X X, Ren F, Zhou H K, Zhu B, He J S. Neutral effect of nitrogen addition and negative effect of phosphorus addition on topsoil extracellular enzymatic activities in an alpine grassland ecosystem. Applied Soil Ecology, 2016, 107: 205-213.
- [31] Allison S D, Czimczik C I, Treseder K K. Microbial activity and soil respiration under nitrogen addition in Alaskan boreal forest. Global Change Biology, 2008, 14(5): 1156-1168.
- [32] Balume I, Agumas B, Musyoki M, Marhan S, Cadisch G, Rasche F. Potential proteolytic enzyme activities modulate archaeal and bacterial nitrifier abundance in soils differing in acidity and organic residue treatment. Applied Soil Ecology, 2022, 169: 104188.
- [33] Fuchslueger L, Wild B, Mooshammer M, Takriti M, Kienzl S, Knoltsch A, Hofhansl F, Bahn M, Richter A. Microbial carbon and nitrogen cycling responses to drought and temperature in differently managed mountain grasslands. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 135: 144-153.
- [34] Chen H, Li D J, Zhao J, Xiao K C, Wang K L. Effects of nitrogen addition on activities of soil nitrogen acquisition enzymes: a meta-analysis. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2018, 252: 126-131.
- [35] Cusack D F, Silver W L, Torn M S, Burton S D, Firestone M K. Changes in microbial community characteristics and soil organic matter with nitrogen additions in two tropical forests. Ecology, 2011, 92(3): 621-632.
- [36] Allison S D, Czimczik C I, Treseder K K. Microbial activity and soil respiration under nitrogen addition in Alaskan boreal forest. Global Change Biology, 2008, 14(5): 1156-1168.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] Lu X K, Mao Q G, Gilliam F S, Luo Y Q, Mo J M. Nitrogen deposition contributes to soil acidification in tropical ecosystems. Global Change Biology, 2014, 20(12): 3790-3801.
- [40] Stursova M, Crenshaw C L, Sinsabaugh R L. Microbial responses to long-term N deposition in a semiarid grassland. Microbial Ecology, 2006, 51 (1): 90-98.
- [41] 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.
- [42] Noll L, Zhang S S, Wanek W. Novel high-throughput approach to determine key processes of soil organic nitrogen cycling: gross protein depolymerization and microbial amino acid uptake. Soil Biology & Biochemistry, 2019, 130: 73-81.
- [43] Nicolás C, Martin-Bertelsen T, Floudas D, Bentzer J, Smits M, Johansson T, Troein C, Persson P, Tunlid A. The soil organic matter decomposition mechanisms in ectomycorrhizal fungi are tuned for liberating soil organic nitrogen. The ISME Journal, 2019, 13(4): 977-988.
- [44] 王丽君,程瑞梅,肖文发,沈雅飞,曾立雄,杨邵,孙鹏飞,陈天.三峡库区马尾松人工林土壤酶活性和微生物生物量对氮添加的季节性 响应. 生态学报, 2021, 41(24): 9857-9868.
- [45] 郭银花,赵洪涛,高雨,沈颖,周志勇.山西太岳山油松林无机氮添加对土壤微生物养分限制类型的影响.应用与环境生物学报,2022, 28(1):137-144.
- [46] 袁颖红,樊后保,李辉信,刘文飞,沈芳芳,郭虎波.模拟氮沉降对杉木人工林土壤微生物的影响.林业科学,2012,48(9):8-14.
- [47] Wild B, Schnecker J, Bárta J, Capek P, Guggenberger G, Hofhansl F, Kaiser C, Lashchinsky N, Mikutta R, Mooshammer M, Santrůčková H, Shibistova O, Urich T, Zimov S A, Richter A. Nitrogen dynamics in turbic cryosols from Siberia and Greenland. Soil Biology & Biochemistry, 2013, 67(100): 85-93.
- [48] 宋思意,吕思扬,邱岭军,等.华西雨屏区常绿阔叶林不同深度土壤氮矿化及相关土壤酶活性对模拟氮沉降的响应.生态学报,2022(22): 1-12.
- [49] Noll L, Zhang S S, Zheng Q, Hu Y T, Wanek W. Wide-spread limitation of soil organic nitrogen transformations by substrate availability and not by extracellular enzyme content. Soil Biology & Biochemistry, 2019, 133: 37-49.
- [50] 周嘉聪,刘小飞,郑永,纪宇皝,李先锋,徐鹏程,陈岳民,杨玉盛.氮沉降对中亚热带米槠天然林微生物生物量及酶活性的影响.生态 学报,2017,37(1):127-135.