模拟氮沉降对杉木人工林(*Cunninghamia lanceolata*)土壤酶活性及微生物群落功能多样性的影响①

袁颖红[1,2]，樊后保[2]，刘文飞[2]，黄荣珍[2]，沈芳芳[2]，胡 锋[1]，李辉信[1*]

(1 南京农业大学资源与环境科学学院，南京 210095；2 南昌工程学院生态与环境科学研究所，南昌 330099)

摘 要：在杉木人工林中开展模拟氮沉降试验，设计 N0(对照)、N1(N 60 kg/(hm^2·a))、N2(N 120 kg/(hm^2·a))和 N3(N 240 kg/(hm^2·a))等 4 个氮沉降水平。通过连续 7 年的处理后，研究了外加氮源对土壤酶活性及群落功能多样性的影响。相同氮沉降处理下，参与土壤碳循环的 6 种主要酶(蔗糖酶、纤维素酶、淀粉酶、β-葡糖苷酶、多酚氧化酶、过氧化物酶)活性、土壤微生物群落碳源利用能力和多样性指数与均匀度指数均随土层加深而降低。氮沉降对纤维素酶和多酚氧化酶具有促进作用，而对淀粉酶和过氧化物酶表现出一定的抑制作用；中–低氮沉降(N1、N2)对蔗糖酶无影响，而对 β-葡糖苷酶具有促进作用，高氮沉降(N3)促进了蔗糖酶活性，但抑制了 β-葡糖苷酶活性。各土层中，低氮处理(N1)促进了微生物群落碳源利用能力和多样性指数与均匀度指数的增加，而中–高氮处理(N2、N3)则呈抑制作用。主成分分析表明，土壤微生物群落利用的主要碳源为碳水化合物和羧酸，不同氮沉降处理碳源利用类型存在差异。因此，氮沉降促进了表层土壤纤维素酶、多酚氧化酶和蔗糖酶的活性，但在一定程度上抑制了淀粉酶、过氧化物酶和 β-葡糖苷酶活性；氮沉降增加改变了杉木人工林土壤微生物群落的功能多样性。

关键词： 氮沉降；杉木人工林；土壤酶；微生物群落功能多样性

中图分类号：S714.3；S718.8

森林土壤酶和土壤微生物是森林生态系统的重要组成成分。土壤中的一切生物化学过程都是在土壤酶系统的作用下进行的，土壤酶在森林生态系统中扮演着重要的角色，是生态系统的物质循环和能量流动等生态系统过程中最为活跃的生物活性物质[1]。由于土壤酶活性与土壤的理化性质、土壤类型等密切相关，所以土壤酶活性一直以来被作为评价土壤生产力及土壤质量的指标之一[2]。土壤酶主要来自微生物，它与微生物的丰富程度和活性密切相关[3]。土壤微生物是土壤的重要组成部分，是构成土壤肥力的重要因素之一[4]，在土壤的物质转化和能量流动中发挥着重要的作用。微生物既是土壤养分循环过程的动力和进入土壤有机质的“转化者”，又是土壤能量和养分循环的“源”和“库”[5]。更重要的是，土壤微生物对环境变化非常敏感，是土壤环境质量的重要指标[6]。土壤微生物群落功能多样性是土壤微生物群落状态与功能的指标，反映土壤中微生物的生态特征。微生物群落功能为评价微生物多样性提供了一个可行的、生态相关的测量方法[7]。而 BIOLOG 代谢多样性类型与微生物群落组成相关[8]，使得其对功能微生物群落变化较为敏感，因此广泛应用于评价土壤微生物群落的功能多样性[9]。

近年来，大气氮沉降升高成为全球变化的重要现象之一，并导致了土壤酸化等一系列生态问题。我国由于经济的快速发展，化肥及石化燃料使用量大幅增加，导致氮沉降量大幅上升，我国氮沉降的现状和发展趋势已引起国际上的关注[10-11]。因此了解氮沉降对森林土壤酶和土壤微生物区系特征和动态变化的影响及其机理对于森林和环境管理等方面均具有重要的理论和实践意义。长期增加的氮沉降在许多森林类型里改变了生物地球化学循环已是事实，然而，有关氮沉降如何影响土壤酶和土壤微生物群落的变化方面仍知之甚少。事实上，国外关于土壤酶和土壤微生物对氮沉降的响应的研究亦是近几年才起步，这些研究的大部分结果表明，长期氮沉降的增加能给土壤微生物带来负面影响：如土壤酶活性的降低[12]，改变

①基金项目：国家自然科学基金项目(31060109、30771714)和江西省自然科学基金项目(0630101)资助。

* 通讯作者(huixinli@njau.edu.cn)

作者简介：袁颖红(1974—)，男，江西宜春人，副教授，博士研究生，主要从事土壤生态学和污染生态学研究。E-mail: yhyuan@nit.edu.cn

其群落结构和功能[13-15]，减少土壤呼吸率，改变微生物对底物的利用模式[16-17]，等等。而有关氮沉降对亚热带杉木林土壤酶和土壤微生物群落功能多样性的影响的研究还鲜见报道。本研究通过野外模拟试验，选择杉木人工林地为对象，探讨氮沉降增加对林地土壤酶和土壤微生物群落功能多样性的影响，为研究氮沉降对亚热带森林生态系统中生物过程和碳循环的影响提供实地观测数据和理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验地概况与样地设置

试验地设在福建省三明市沙县官庄国有林场，位于 117º43′29″ E，26º30′47″ N。属中亚热带季风气候，四季气温温暖适中，日照充足，年平均气温 18.8℃ ~ 19.6℃，年平均降水量 1 606 ~ 1 650 mm，无霜期 271 天。试验林设置在该林场的白溪工区 21 林班 8 小班南坡上，平均海拔 200 m 左右，土壤为山地红壤。试验林为 1992 年营造的杉木人工林，面积 6 hm^2。林下植被稀疏，以五节芒(*Miscanthus floridulus*)、芒萁(*Dicranopteris olichotoma*)、蕨(*Pteridium aquilinum var. latiusculum*)等为主，盖度在 3% ~ 5%之间。选择立地和林分条件相似的杉木人工林建立 12 块固定试验样地，样地面积均为 20 m × 20 m，内设 15 m× 15 m 中心区域，以便破坏性试验在中心区外围的处理区进行。2010 年 3 月进行了本底值调查，结果见表 1。

1.2 研究方法

1.2.1 模拟氮沉降方法 模拟氮沉降试验即以人工喷氮的方式对未来的氮沉降趋势进行模拟。本研究参照 NITREX(nitrogen saturation experiments)项目[18-19]和北美 Harvard Forest[20-21]等类似研究设计，按氮施用量的高低，分 4 个处理，从低到高分别标记为 N0(N 0 kg/(hm^2·a)，对照)，N1(N 60 kg/(hm^2·a))，N2(N 120 kg/(hm^2·a))，N3(N 240 kg/(hm^2·a))，每个处理重复 3 次。2003 年 12 月建立样地后，于 2004 年 1 月开始进行模拟氮沉降处理，每月月初以溶液的形式给样地地面喷洒。按照处理水平的要求，将 $CO(NH_2)_2$ 溶解在 20 L 水中，以背式喷雾器在林地人工来回均匀喷洒。对照样地喷施同样量的水，以减少因外加的水而造成对林木生物地球化学循环的影响。

1.2.2 取样与处理 2010 年 3 月用土壤采样器进行多点混合采集土壤原状样品，根据剖面，分表层(0 ~ 20 cm)、中层(20 ~ 40 cm)、底层(40 ~ 60 cm)进行采样，把土样密封后带回实验室，剔除植物残根、>2 mm 的石子等杂物，置于 0℃ ~4℃冰箱待处理。

1.2.3 土壤酶活性的测定[22] 蔗糖酶、纤维素酶和淀粉酶活性采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定，多酚氧化酶和过氧化物酶活性采用碘量滴定法测定，β-葡糖苷酶采用硝基酚比色法测定。各种土壤酶活性测定的主要方法、基质、培养条件和测定产物见表 2。各种酶都通过预备试验确定获得最大酶活性所需要的基质浓度和培养时间。

1.2.4 土壤微生物群落功能多样性分析 使用 BIOLOG^{TM} 生态测试板(Eco micro plate，美国 Matrix Technologies Corporation 生产)对微生物群落功能多

表 1 各处理样地的主要林分和立地特征本底值

Table 1 Backgrounds of stand and site characteristics in nitrogen-loaded plots

处理	林分特征				立地特征				
	林龄 (年)	密度 (棵/hm^2)	平均胸径 (cm)	平均树高 (m)	平均坡度 (°)	土壤体积质量 (g/cm^3)	土壤全氮 (g/kg)	土壤有机质 (g/kg)	土壤 pH
N0	19	1 717	19.5	16.73	32.5	1.06	0.68	17.31	3.99
N1	19	1 633	19.5	19.34	31.5	1.06	0.80	19.23	3.92
N2	19	1 683	20.2	19.32	29.8	1.05	0.81	18.88	3.88
N3	19	1 625	20.1	18.17	30.8	1.05	0.86	18.14	3.78

表 2 土壤酶活性测定所用基质、培养条件和测定产物

Table 2 Substrates and incubated conditions and the products measured

土壤酶	基质	培养温度(℃)	培养时间(h)	测定产物
蔗糖酶	蔗糖	37	24	葡萄糖
纤维素酶	CM-纤维素	37	72	葡萄糖
淀粉酶	淀粉	37	24	葡萄糖
β-葡糖苷酶	对硝基苯-β-D-葡糖苷	37	1	对硝基酚
多酚氧化酶	L-DOPA	30	2	DOPA 转化
过氧化物酶	L-DOPA+ H_2O_2	30	2	DOPA 转化

样性进行测定，具体步骤为：称取相当于 5.00 g 烘干土重的鲜土，放在 45 ml 0.85% 氯化钠溶液中，振荡 30 min 后，静置，倒出上清液在加样槽中；摇匀后加入 Biolog ECO 板中(Ecoplate 微平板上被划分为 3 个区，每个区 32 个孔。每个区除了 1 个孔不含碳源(空白)以外，其余 31 个孔分别含有 31 种不同的碳源)，每个孔中加样 125 μl，25℃ 恒温培养，吸光值测定间隔为 0、1、2、3、4、5、6、7 天。BIOLOG 碳源总体反应采用 AWCD 来表示，其计算表达式为：AWCD = [∑(*C*-*R*)]/31，其中 *C* 是所测得 31 个反应孔的吸光值，*R* 是对照孔的吸光值。Shannon 多样性指数 $H = -\sum Pi\ (\ln Pi)$，$Pi = (C-R)/\sum(C-R)$，$E = H/\ln R$ [7]。微生物多样性指数与均匀度指数均选用 144 h 的 OD 相对值进行计算。BIOLOG 微生物群落碳源利用差异采用主成分分析法(PCA)，选用各孔全培养期相对吸光值曲线对时间的面积值提取主成分，并依据所得各处理主成分得分进行分析。

1.2.5 统计分析 主成分分析、相关指标的差异性显著检验采用 SPSS13.0 统计软件进行。不同字母表示差异显著($P<0.05$)，大写字母表示相同氮沉降处理不同土层之间差异性比较，小写字母表示相同土层不同氮沉降处理之间差异性比较。

2 结果与分析

2.1 模拟氮沉降对土壤酶活性的影响

参与土壤碳循环的蔗糖酶、纤维素酶、淀粉酶、β-葡糖苷酶、多酚氧化酶和过氧化物酶对土壤中不同稳定性碳的分解、转化和土壤的生物呼吸强度起重要作用[23]。由图 1 可以看出，各氮沉降处理下，不同土层各土壤酶活性均随土壤深度增加而降低，即：0 ~ 20 cm>20 ~ 40 cm>40 ~ 60 cm，氮沉降处理对不同土层土壤酶的影响有差异，其中对 0 ~ 20 cm 土层的影响更大。除多酚氧化酶和过氧化物酶外，其他酶各处理均以 0 ~ 20 cm 土层与 20 ~ 40 cm、40 ~ 60 cm 土层差异显著($P<0.05$)。

氮沉降处理对杉木人工林土壤碳代谢相关酶的影响各异(图 1)。在 0 ~ 20 cm 土层，氮沉降对土壤纤维素酶和多酚氧化酶活性有促进作用，N3 处理的多酚氧化酶活性与 N0 处理之间差异显著($P<0.05$)；对淀粉酶和过氧化物酶具有一定的抑制作用，N2、N3 处理的淀粉酶与 N0 处理之间差异显著， N3 处理的过氧化物酶活性与 N1、N2 处理之间差异显著($P<0.05$)；N1 和 N2 处理对蔗糖酶无影响，N3 处理明显促进其活性，N3 处理蔗糖酶活性与 N1、N2 处理之间差异显著($P<0.05$)；β-葡糖苷酶活性随着氮处理量的增加表现为 N1 和 N2 处理促进其活性，而 N3 抑制其活性，N3 处理 β-葡糖苷酶活性与 N2 处理之间差异显著($P<0.05$)。在 20 ~ 40 cm 和 40 ~ 60 cm 土层，氮处理对酶活性的影响因酶的类型各异，且影响幅度不大。总体来讲，随着氮沉降量的增加，除淀粉酶和纤维素酶活性增加外，其他各酶活性降低变化幅度在中底土层差异不大。

2.2 B IOLOG 测试中平均吸光值动态变化

平均颜色变化率(average well color development，AWCD)表征微生物群落碳源利用率，是土壤微生物群落利用单一碳源能力的一个重要指标，反映了土壤微生物活性、微生物群落生理功能多样性[24]。连续 7 天每隔 24 h 测得的 AWCD 见图 2，从图中可以看出，AWCD 随培养时间的延长而提高，不同处理都表现出在开始的 48 h 变化不大，表明在 48 h 之内各碳源未被利用或利用很小；而在第 48 h 之后快速升高，反映出此期间各碳源被大幅度利用；随后持续缓慢地升高至 168 h 趋于稳定。在各处理中，AWCD 随着土壤深度的增加呈下降趋势，即：0 ~ 20 cm>20 ~ 40 cm> 40 ~ 60 cm。在所有层次土壤中，随着氮沉降量的增加，各处理 AWCD 先增加后下降，即：N3<N2<N0< N1；换言之，在全部培养期间，N1 处理的微生物群落对碳源的总体利用最高，N3 处理的微生物群落对碳源的总体利用最低，而 N0 与 N1 处理的微生物群落对碳源的总体利用介于上述之间(图 2)。

2.3 31 孔碳源主成分分析

将单一碳源各天的相对吸光值曲线(OD)对培养时间求面积，其值可作为在培养期间土壤微生物群落对单一碳源利用的总体反映指标，可弥补以某一天的绝对吸光值或相对吸光值为分析数值的缺陷[25]。通过该法经 PCA 分析提取的两个主成分代表了 31 种碳源(变量)的大部分指标，0 ~ 20 cm 土壤的主成分 1 (PC1) 代表了 41.66% 的信息，主成分 2 (PC2) 代表了 23.45% 的信息；20 ~ 40 cm 土壤的主成分 1 (PC1) 代表了 36.31% 的信息，主成分 2 (PC2) 代表了 26.06% 的信息；40 ~ 60 cm 土壤的主成分 1 (PC1) 代表了 37.64% 的信息，主成分 2 (PC2) 代表了 27.68% 的信息。与 PC1 和 PC2 相关性较大的碳源如表 3 所示，其中在 0 ~ 20 cm 土壤中与 PC1 相关性较大的碳源有 14 种，对碳水化合物和氨基酸等碳源利用程度较高；而与 PC2 相关性较大的碳源有 6 种，对羧酸等碳源利用程度较高。在 20 ~ 40cm 土壤中与 PC1 相关性较大的碳源有 11 种，对碳水化合物和羧酸等

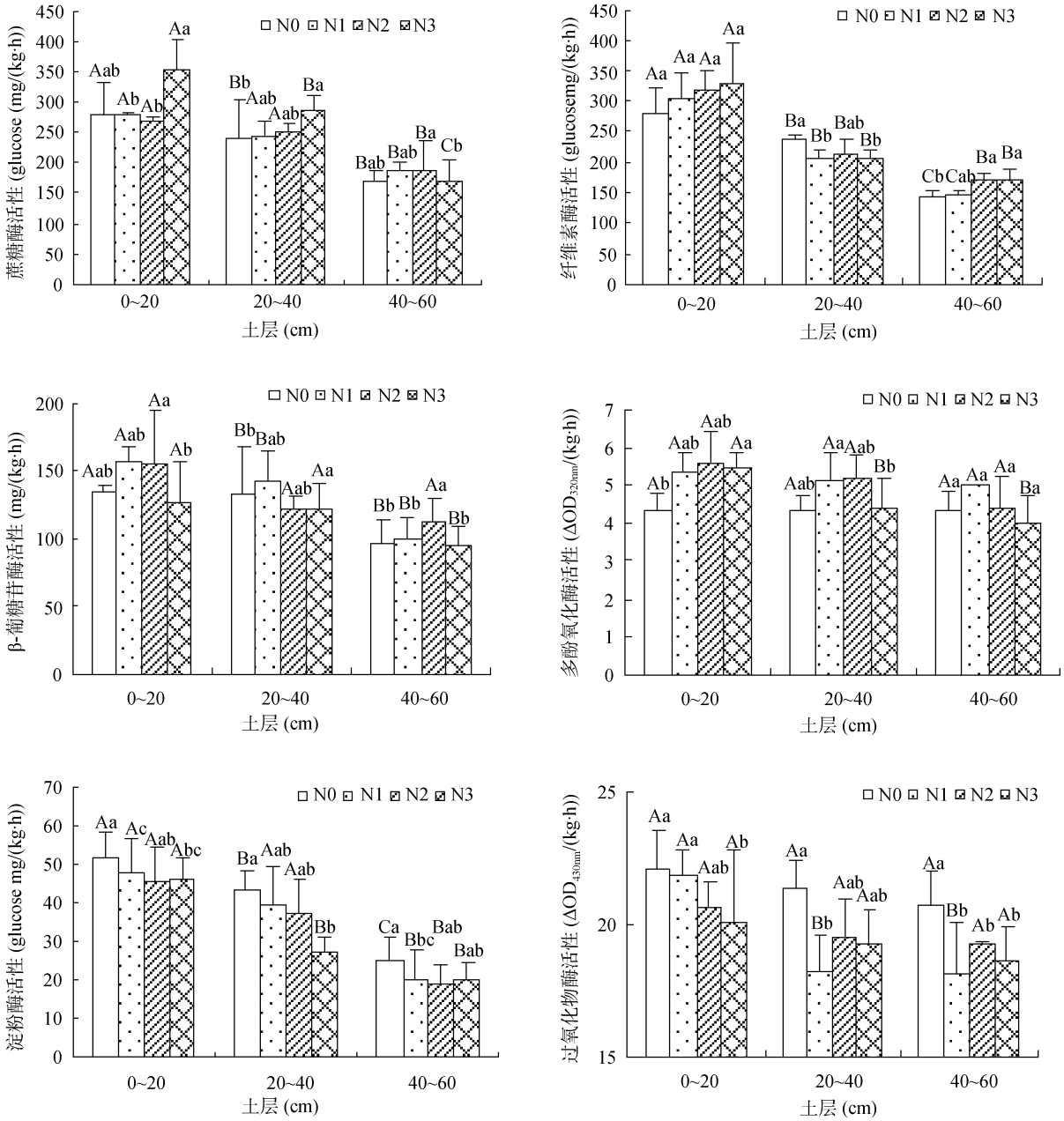

图 1　不同氮处理水平下参与碳循环的土壤酶活性变化

Fig. 1　Soil enzyme activities involving in carbon cycling under different nitrogen treatments

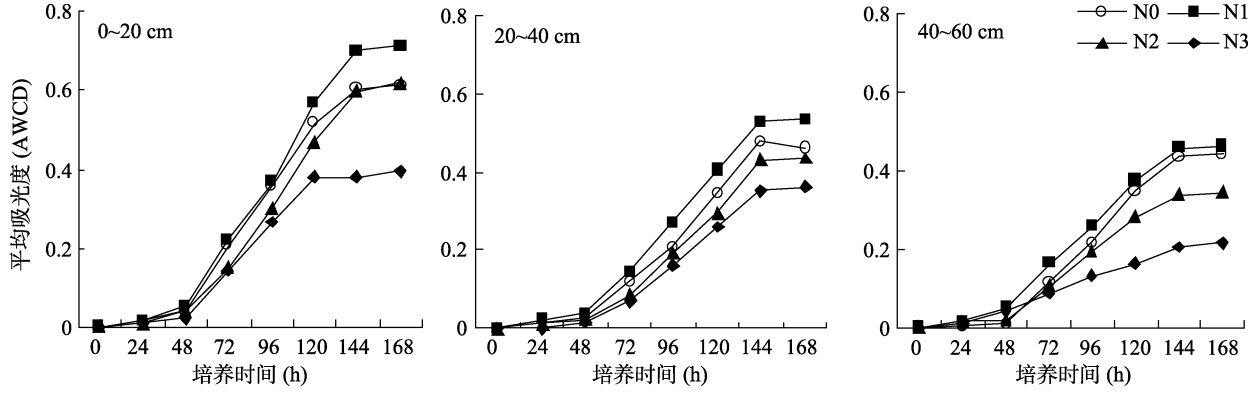

图 2　不同处理下 BIOLOG 平均吸光值日动态

Fig. 2　Changes of AWCD of soil microbial community in different depths

碳源利用程度较高；而与 PC2 相关性较大的碳源有 5 种，对羧酸和酚类化合物等碳源利用程度较高。在 40 ~ 60 cm 土壤中与 PC1 相关性较大的碳源有 11 种，对碳水化合物、羧酸和氨基酸等碳源利用程度较高；而与 PC2 相关性较大的碳源有 9 种，对酚类化合物和多聚物等碳源利用程度较高(表 3)。

各处理依主成分分析所得两个主成分得分作图可得其载荷图(图 3)，不同处理土壤微生物群落对碳源利用上表现出明显分异，在 PC1 上，N1 处理的得分最高，其次为 N0 和 N2 处理，N3 处理最低；在 PC2 上，各层次土壤表现各异。BIOLOG 法通过微生物群落对单一碳源利用程度上的差异，反映微生物群落组成及结构的差异，在本研究中不同处理微生物群落的组成明显不同。

2.4 微生物群落碳源利用多样性指数与均匀度指数

BIOLOG 测试盘中反应孔的颜色变化数目在一定程度上可以间接反映土壤微生物群落结构组成上的差异，通常用颜色变化孔数作为土壤微生物群落功能多样性的丰富度，Shannon 多样性指数同时包含碳源利用丰富度和均匀度信息(表 4)。随着土壤深度的增加，各处理微生物多样性指数与均匀度指数均下降。随着氮沉降量的增加，微生物多样性指数与均匀度指数均先增加后下降，即：N1>N0>N2>N3(表 4)，但各处理之间没显著差异(P<0.05)。

表 3 主成分分析中与因子 1 和因子 2 相关性较大的碳源种类

Table 3 Substrates with high correlation coefficients for PC1 and PC2 in PCA of metabolic diversity patterns for four treatments soils from all sites

碳源		相关系数					
		0 ~ 20 cm		20 ~ 40 cm		40 ~ 60 cm	
		PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
碳水化合物	D-木糖					0.891	
	β-甲基 D-葡萄糖苷	0.736		0.863			
	I-赤藻糖醇		0.793	–0.92			
	D-甘露醇				0.887	0.873	
	N-乙酰基-D-葡萄胺	0.918		0.901			0.746
	D-纤维二糖	0.904		0.705			
	a-D-乳糖	0.779					
羧酸	D-半乳糖内酯	0.721		–0.763			
	D-半乳糖醛酸	0.777		0.899		–0.940	
	2-羟苯甲酸		–0.918				0.834
	D-葡萄胺酸		–0.764			0.787	
	衣康酸		0.766		0.898	0.840	
	a-丁酮酸			–0.733			
	D-苹果酸				0.965		0.840
	4-羟基苯甲酸					0.906	
胺类	苯乙基胺	0.756		0.972		0.763	
	腐胺		–0.799				
氨基酸	L-天冬酰胺酸		0.790			0.800	
	L-苯基丙氨酸	0.897					0.841
	L-丝氨酸	–0.760		0.792		0.935	
	L-苏氨酸	0.920					0.799
	甘氨酰-L-谷氨酸	–0.742				0.863	
酚类化合物	丙酮酸甲脂				–0.744		
	葡萄糖-1-磷酸盐	0.893			0.921		–0.835
	D,L-a-甘油	0.779		0.914		0.963	
	a-环式糊精						0.722
多聚物	吐温 40			0.966			0.841
	肝糖	0.770					0.917

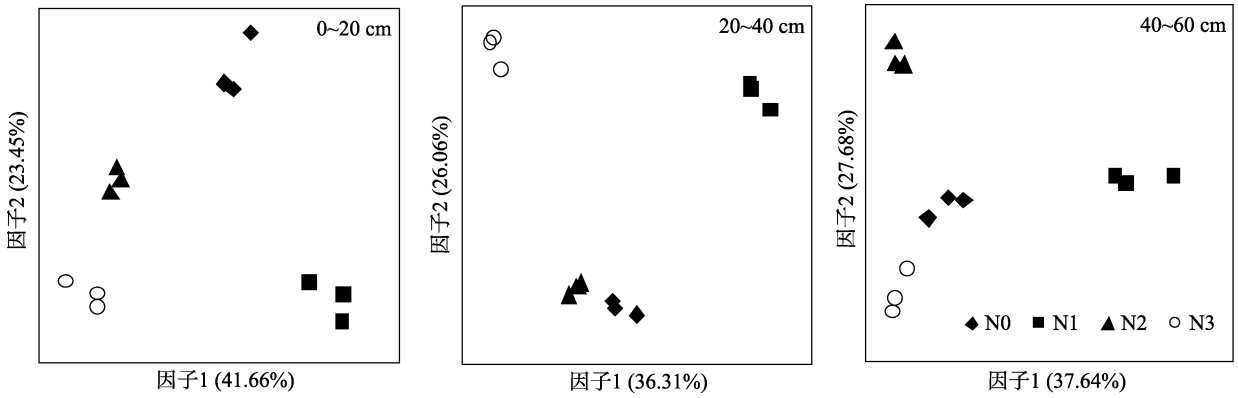

图 3 各处理在 31 种碳源利用主成分分析所提取公因子上的载荷图
Fig. 3 Ordination of principal component analysis on 31 substrate utilizations by soil microbial communities

表 4 氮沉降条件下土壤微生物多样性指数和均匀度指数(n = 6)
Table 4 Soil microbial functional diversity and evenness under nitrogen deposition

土壤深度 (cm)	Shannon 多样性指数 (H)				碳源利用均匀度指数 (E)			
	N0	N1	N2	N3	N0	N1	N2	N3
0 ~ 20	2.87 ± 0.14	2.97 ± 0.27	2.85 ± 0.16	2.80 ± 0.17	0.96 ± 0.03	0.98 ± 0.01	0.95 ± 0.06	0.94 ± 0.09
20 ~ 40	2.73 ± 0.14	2.83 ± 0.14	2.71 ± 0.16	2.70 ± 0.04	0.92 ± 0.03	0.93 ± 0.01	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.13
40 ~ 60	2.54 ± 0.08	2.60 ± 0.05	2.50 ± 0.11	2.36 ± 0.07	0.91 ± 0.02	0.92 ± 0.03	0.89 ± 0.05	0.88 ± 0.06

3 讨论

3.1 模拟氮沉降对杉木人工林土壤酶活性的影响

在常温、常压和适宜的 pH 值条件下，土壤酶对土壤养分溶解、各种生物化学过程反应速率、微生物代谢过程等都具有显著促进作用[1]。本研究表明，在氮沉降影响下，杉木人工林土壤参与碳循环的 6 种酶，蔗糖酶、纤维素酶、淀粉酶、β-葡糖苷酶、多酚氧化酶和过氧化物酶的活性均随土层加深而降低，其中前 4 种酶活性显著降低，后 2 种酶活性降幅较小；不同氮沉降处理土壤酶的差异主要在 0 ~ 20 cm 土层，且这些差异随土层加深而递减。这种土壤酶活性的剖面分布特征可能反映了土壤受干扰的程度[26]。这与国内外绝大多数研究者关于未受扰动的生态系统中，随着土层加深，土壤酶活性降低的研究结果一致[26-28]。其原因是表层土壤(0 ~ 20 cm)受凋落物分解的影响明显，且野外采样时发现根系分布较多，这也有利于该层次微生物的活动[26]，加之其具有良好的理化性质(表 1)，上述作用均随土壤深度的增加而逐渐减弱。土壤有机质是土壤中酶促底物的主要供源，是土壤固相中最复杂的系统，也是土壤肥力的主要物质基础[29]。这说明表层土(0 ~ 20 cm)相对中底层土(20 ~ 40 cm、40 ~ 60 cm)有更高含量的有机质。本研究结果与此一致，不同土层，氮沉降处理对表层土壤酶活性的影响更大。

在大多数温带森林中，氮素是营养限制因子。施氮或者某些低 C/N 的底物能减轻氮素限制[30]，为植物和微生物生长提供丰富的营养来源。由于土壤酶主要来源于植物根系分泌物和土壤微生物及动物残体的分解释放过程，施氮会影响土壤酶活性[31]。增加氮除对氮、磷相关酶活性有影响外，也对碳相关酶活性有影响。本研究氮沉降对杉木人工林土壤蔗糖酶活性有促进作用，表明氮沉降增加了土壤生物学活性强度和土壤肥力[26]。近年的研究表明，氮沉降增加可以使纤维素酶活性升高，而抑制木质素降解酶活性[31]。过氧化物酶和多酚氧化酶为土壤中主要的木质素降解酶[32]，过氧化物酶参与腐殖质的合成过程[33]，多酚氧化酶的活性与土壤腐殖化程度密切相关[32]。Carreiro 等[34]和 Gallo 等[35]发现，北方温带森林中氮沉降增加使土壤多酚氧化酶活性降低、纤维素酶活性升高。Deforest 等[12]报道，多酚氧化酶活性随氮的可利用性提高而降低。Zeglin 等[36]发现，氮沉降对氧化酶(多酚氧化酶、过氧化物酶等)活性无影响，这说明氧化酶对氮沉降的负响应并不是一个普遍现象。本研究也发现，高氮沉降(N3)条件下多酚氧化酶活性降低，本试验以尿素作为氮源，在土壤中发生溶解、氨化、硝化三大过程，尿素水解后积累大量 NH_4^+，尤其是高浓度的氮沉降，使土壤中 NH_4^+ 浓度升高，抑制了分泌多酚氧化酶的真菌活性[12]，降低了微生物

的生物量碳含量。Debosz 等[37]研究了有机物输入对纤维素酶变化的影响，在作物生长期间，无论是低量输入还是高量输入，土壤酶活性均增强，其中，β-葡糖苷酶和纤维素酶增加 30%。研究期间，不同浓度氮处理之间对几种酶活性的促进或抑制作用未表现出较强的规律性，这可能与取样频率、氮处理时间长短以及不同季节环境因子的变化等有关，有待进一步开展深入研究。

3.2 模拟氮沉降对土壤微生物群落功能多样性的影响

BIOLOG 碳源利用平均值 AWCD 可反映微生物群落对 31 类碳源的整体利用能力，它提供了在相同碳源下不同微生物群落对碳源利用相比较的可能性，即反映土壤微生物活性对碳源利用能力或利用强度的一个重要指标[24]。由图 1 可知，低氮处理(N1)的土壤微生物群落对 BIOLOG 碳源的整体利用平均值 AWCD 均大于其他处理土壤，N0 处理也大于高氮处理(N2、N3)，表明低氮处理的土壤微生物群落对碳源的利用能力较强，而不施氮处理次之，高氮处理最低。刘蔚秋等[38]的研究表明，AWCD 在林内生境随加氮浓度的增加而下降，而在林缘生境则呈现先升高后下降的趋势，且在氮浓度水平为 20 kg/hm^2 时达到最高。这表明土壤微生物活性在过量氮沉降的作用下会逐渐降低，对土壤酶活性的研究亦显示过量氮沉降会造成土壤酶活性的降低[12, 15, 34]。BIOLOG 碳源利用的主成分分析表明各处理的微生物群落已发生明显分异，体现在对单一碳源或某类碳源利用的分异上。

由于氮增加改变了土壤中营养物质的有效性，也改变了微生物对底物(碳源)的利用模式，最终将带来微生物群落组成发生变化[39]。目前研究表明氮沉降增加对森林土壤微生物对底物的利用模式还没有统一定论。有的研究发现氮沉降增加降低了微生物对底物的利用率，如 Deforest 等[12]在北方硬叶阔叶林的氮沉降样地中研究发现，长期高氮沉降可以影响异养型微生物群落对底物利用的有效性，降低土壤微生物生产力。Compton 等[14]在哈佛森林的长期氮输入的实验中发现，试验样地氮增加降低了土壤微生物对底物利用率。Carreiro 等[34]在对橡树林的研究中发现，过量氮沉降会导致土壤木质素酶和多酚氧化酶活性降低。但也有的研究发现氮沉降对土壤微生物底物利用模式并非全是负面影响。Johnson[40]在欧石南丛生的荒地中发现，氮增加造成了微生物对底物碳和氮的利用率提高了 3 倍。还有如 Frey 等[15]在哈佛森林研究里发现，阔叶林和混交林土壤微生物对底物的利用率与氮增加并没有明显的关系。Grayston 等[41]的研究发现，在温带草原生态系统土壤不同碳源的增加导致土壤微生物碳源利用的增加，在 0 ~ 20 cm 层碳水化合物和氨基酸大量被利用；而在 20 ~ 40 cm 主要是碳水化合物和羧酸，可能原因是大量树的根系分泌液包含一些羧酸[42]。这些结果的出现可能与森林类型、施氮时间、研究时期等有关，因此氮沉降对微生物底物利用率的影响还需要进一步的深入研究。

不同多样性指数可反映土壤微生物群落功能多样性的不同侧面。Shannon 指数是研究群落物种及其个体数和分布均匀程度的综合指标，是目前应用最广的群落多样性指数之一。Shannon 多样性指数与均匀度指数分析结果表明，不同氮沉降处理对土壤微生物群落多样性的影响有显著差异，即不同氮沉降处理下，微生物多样性指数与均匀度指数均不相同。本研究中低氮处理(N1)最有利于提高微生物群落 Shannon 多样性指数与均匀度指数，高氮处理(N2、N3)则表现出抑制作用(表 4)，与土壤 MBC\BR 的变化趋势一致。这可能是由于适量的氮肥有利于土壤微生物的生长，而高氮促进了某些微生物种群(如：偏于利用植物残体的种群)生长代谢，而抑制了其他种微生物种群的生长代谢，致使群落多样性指数与均匀度指数下降。在计算土壤微生物多样性指数时，本研究利用的是培养 144 h 时的光密度值，不同研究人员在不同的研究报道中所采用的时间和方法并不统一，如王纪杰等[43]采用 120 h 的值进行比较，张逸飞等[44]采用的是 72 h 的值，Grove 等[45]采用的则是 19 h 的值。本研究中，土壤微生物在 144 h 处于对数期，之后生长减缓步入稳定期，即处于“拐点处”，采用 144 h 的光密度值进行分析更真实地反映了实际情况。

参考文献：

[1] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京: 科学出版社, 1989

[2] 孟立君, 吴凤芝. 土壤酶研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(5): 622–626

[3] Insam H. Development in soil microbiology since the Mid 1960s[J]. Geoderma, 2001, 100(4): 389–402

[4] Atlas RM. Diversity of microbial community[J]. Advanced Microbiology Ecology, 1984, 7: 1–47

[5] 李阜棣. 当代土壤微生物学的活跃研究领域[J]. 土壤学报, 1993, 30(3): 229–236

[6] Insam H, Hutchinson TC, Reber HH. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28: 691–694

[7] Zak JC, Willig MR, Moorhead DL. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26: 1 101–1 108

[8] Haack SK, Garchow HM, Klug J, Forney LJ. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 1 458–1 468

[9] Rogers BF, Tate RL. Temporal analysis of the soil microbial community along a top sequence in Pineland soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33: 1 389–1 401

[10] 孙崇基. 酸雨[M]. 北京：中国环境科学出版社, 2001

[11] Galloway JN, Cowling EB. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change[J]. AMBIO: A Journal of the Human Environment, 2002, 31: 64–71

[12] Deforest JL, Zaka DR, Pregitzerc KS, Burton AJ. Atmospheric nitrate deposition and the microbial degradation of cellobiose and vanillinin a northern hardwood forest[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36: 965–971

[13] Waldrop MP, Zaka DR, Sinsabaugh RL. Microbial community response to nitrogen deposition in northern forest ecosystems[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36: 1 443–1 451

[14] Compton JE, Watruda LS, Porteousa LA, DeGrood S. Response of soil microbial biomass and community composition to chronic nitrogen additions at Harvard forest[J]. Forest Ecology and Management, 2004, 196: 143–158

[15] Frey SD, Knoor M, Parrent JL, Simpson RT. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests[J]. Forest Ecology and Management, 2004, 196: 159–171

[16] Lilleskov EA, Fahey TJ, Lovett GM. Ectomycorrhizal fungal aboveground community change over an atmospheric nitrogen deposition gradient[J]. Ecological Applications, 2001, 11(2): 397–410

[17] Lilleskov EA, Hobbie EA, Fahey TJ. Ectomycorrhizal fungal taxa differing in response to nitrogen deposition also differ in pure culture organic nitrogen use and natural abundance of nitrogen isotopes[J]. New Phytologist, 2002, 154: 219–231

[18] Fenn ME, Poth MA, Aber JD, Baron JS, Bormann BT, Johnson DW, Lemly AD, Mcnulty SG, Ryan DF, Stottlemyer R. Nitrogen excess in north American ecosystems: Predisposing factors, ecosystem response, and management strategies[J]. Ecological Applications, 1998, 8(3): 706–733

[19] Wright RF, Rasmussen L. Introduction to the NITREX and EXMAN projects[J]. Forest Ecology and Management, 1998, 101(1/3): 1–7

[20] Gundersen P, Emmett BA, Kjønass OJ, Koopmans CJ, Tietema A. Impact of nitrogen deposition on nitrogen cycling in forest: A synthesis of NITREX data[J]. Forest Ecology and Management, 1998, 101(1/3): 37–55

[21] Aber J，McDowell W, Nadelhoffer K, Magill A, Berntson G, Kamakea M, Mcnulty S, Currie W, Rustad L, Fernandez L. Nitrogen saturation in temperate forest ecosystems: Hypotheses revisited[J]. Biosciense, 1998, 48(11): 921–934

[22] 关松萌. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1986

[23] Schimel JP, Weintraub MN. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: A theoretical model[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(4): 549–563

[24] Zabinski CA, Gannon JE. Effects of recreational impacts on soil microbial communities[J]. Environmental Management, 1997, 21(2): 233–238

[25] Guckert JB, Carr GJ, Johnson TD, Hamm BG, Davidson DH, Kumagai Y. Community analysis by Biolog: Curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats[J]. Journal of Microbiological Methods, 1996, 27: 183–197

[26] 杨万勤, 王开运. 土壤酶研究动态与展望[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 564–570

[27] Taylor JP, Wilson B, Mills MS, Burns RG. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(3): 387–401

[28] 宋学贵, 胡庭兴, 鲜骏仁, 肖春莲. 川南天然常绿阔叶林土壤酶活性特征及其对模拟 N 沉降的响应[J]. 生态学报, 2009, 29(3): 1 234–1 240

[29] 吕国红, 周广胜, 赵先丽, 周莉. 土壤碳氮与土壤酶相关性研究进展[J]. 辽宁气象, 2005(2): 6–8

[30] Berg B, Matzner E. Effect of N deposition on decomposition of plant litter and soil organic matter in forest systems[J]. Environmental Review, 1997, 5: 1–25

[31] 赵玉涛, 李雪峰, 韩士杰, 胡艳玲. 不同氮沉降水平下两种林型的主要土壤酶活性[J]. 应用生态学报, 2008, 19(12): 2 769–2 773

[32] 涂利华, 胡庭兴, 张健, 李仁洪, 戴洪忠, 雒守华, 向元彬, 黄立华. 华西雨屏区苦竹林土壤酶活性对模拟氮沉降的响应[J]. 应用生态学报, 2009, 20(12): 2 943–2 948

[33] 刘建国, 张伟, 李彦斌, 孙艳艳, 卞新民. 新疆绿洲棉花长期连作对土壤理化性状与土壤酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 725–733

[34] Carreiro MM, Sinsabaugh RL, Repert DA, Parkhurst DF. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition[J]. Ecology, 2000, 81(9): 2 359–2 365

[35] Gallo M, Amonette R, Lauber C, Sinsabaugh RL, Zak DR. Microbial community structure and oxidative enzyme activity in nitrogen-amended north temperate forest soils[J]. Microbial Ecology, 2004, 8(2): 218–229

[36] Zeglin LH, Stursova M, Sinsabaugh RL, Collins SL. Microbial responses to nitrogen addition in three contrasting grassland ecosystems[J]. Oecologia, 2007, 154(2): 349–359

[37] Debosz K, Rasmussen PH, Pedersen AR. Temporal

variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: Effects of organic matter input[J]. Applied Soil Ecology, 1999, 13(3): 209–218

[38] 刘蔚秋, 刘滨扬, 王江, 雷纯义. 不同环境条件下土壤微生物对模拟大气氮沉降的响应[J]. 生态学报, 2010, 30(7): 1 691–1 698

[39] Biederbeck VO, Campbell CA, Ukrainetz H, Curtin D, Bouman OT. Soil microbial and biochemical properties after ten years of fertilization with urea and anhydrous ammonia[J]. Canadian Journal of Soil Science, 1996, 76: 7–14

[40] Johnson DW. Nitrogen retention in forest soils[J]. Journal of Environmental Quality, 1992, 21: 1–12

[41] Grayston SJ, Griffith GS, Mawdsley JL, Campbell CD, Bardgett RD. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33: 533–551

[42] Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition[J]. New Phytologist, 2004, 163: 459–480

[43] 王纪杰, 徐秋芳, 姜培坤. 毛竹凋落物对阔叶林土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 林业科学, 2008, 44(9): 146–151

[44] 张逸飞, 钟文辉, 李忠佩, 蔡祖聪. 长期不同施肥处理对红壤水稻土酶活性及微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2006, 22(4): 39–44

[45] Grove JA, Kautola H, Javadpour S, Moo-Young M, Anderson WA. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter[J]. Biochemecal Engineering Journal, 2004, 18: 111–114

Effects of Simulated Nitrogen Deposition on Soil Enzyme Activities and Microbial Community Functional Diversities in a Chinese Fir Plantation

YUAN Ying-hong[1,2], FAN Hou-bao[2], LIU Wen-fei[2], HUANG Rong-zhen[2], SHEN Fang-fang[2], HU Feng[1], LI Hui-xin[1*]

(1 *College of Resources and Environmental Science*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*; 2 *Research Institute of Ecology & Environmental Sciences*, *Nanchang Institute of Technology*, *Nanchang* 330099, *China*)

Abstract: This study evaluated the effects of nitrogen deposition on soil enzyme activities and microbial community functional diversities (sole-source carbon utilization, SCU) in a Chinese fir plantation subject to simulated nitrogen deposition for seven years at Shaxian State Forest Farm of Fujian Province, China. Nitrogen loadings were designed at 4 levels as N0 (CK), N1, N2 and N3 at the doses of 0, 60, 120 and 240 kg/(hm^2·a) N, respectively. Each treatment comprised 3 replicate plots of 20 m×20 m which were sprayed with $CO(NH_2)_2$ solutions on the forest floor at the beginning of each month, lasting from January 2004 to the sampling time, March 2010. At the same level of nitrogen deposition, the activities of 6 soil enzymes involving carbon cycle (invertase, cellulose, amylase, β-glucosidase, polyphenol oxidase and peroxidase), the ability of carbon source utilization by microbe, biodiversity and evenness all decreased with the increase of soil depth. At soil depth of 0-20 cm, nitrogen additions promoted cellulose and polyphenol oxidase activities, but inhibited amylase and peroxidase to some extents. High level of nitrogen loading (N3) showed significant positive impact on invertase, but negative on β-glucosidase. Low nitrogen deposition (N1) accelerated the ability of carbon source utilization by microbe, biodiversity and evenness, but moderate-to-high nitrogen deposition (N2, N3) gave the opposite effect. Principal component analysis (PCA) in substrates indicated that the main carbon sources for soil microbes were carbohydrates and carboxylic acid in all treatments and there were significant differences of carbon substrate utilization patterns between treatments. Hence, nitrogen deposition in this experiment accelerated the activities of surface soil cellulose, polyphenol oxidase and invertase, but inhibited amylase, peroxide and β-glucosidase to some extents. Nitrogen deposition produced significant impacts on the functional diversity of soil microbial community in the Chinese fir plantation.

Key words: Nitrogen deposition, *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook, Soil enzymes activities, Functional diversity