

DOI: 10.20103/j.stxb.202208162349

张馨月, 白家韶, 韩雪, 许吟隆. 华北平原冬小麦田土壤胞外/内酶活性对长期 CO₂ 浓度升高的响应. 生态学报, 2023, 43(20): 8504-8515.

Zhang X Y, Bai J S, Han X, Xu Y L. Response of soil extracellular/intracellular enzyme activity to long-term elevated CO₂ in a winter wheat field of North China Plain. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(20): 8504-8515.

华北平原冬小麦田土壤胞外/内酶活性对长期 CO₂ 浓度升高的响应

张馨月*, 白家韶, 韩雪, 许吟隆

中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081

摘要: 针对农田胞外和胞内酶活性响应 CO₂ 浓度升高认识不足的现状, 依托华北平原冬小麦种植区北京昌平试验站长期开放式 CO₂ 富集平台, 设置常规和升高两组 CO₂ 浓度处理, 研究冬小麦田土壤胞外和胞内酶活性的变化及影响因素。结果表明: CO₂ 浓度升高促进胞外碳获取酶活性, 不影响胞外氮获取酶活性以及全部胞内酶活性。通过量化碳、氮获取酶的胞外胞内比发现, CO₂ 浓度升高在冬小麦成熟期增强了碳获取酶胞外胞内比, 但降低了氮获取酶胞外胞内比。胞外碳、氮获取酶活性都与土壤 pH 值呈负相关; 而胞内碳获取酶活性与土壤含水量正相关, 胞内氮获取酶活性与微生物生物量负相关。CO₂ 浓度升高导致上述大部分酶活性变化驱动因素的作用消失, 仅存在土壤全氮与胞内碳获取酶活性负相关。研究结果强调了对胞内酶开展研究的重要性, 为理解土壤过程对全球变化因素的响应提供了新见解。

关键词: CO₂ 浓度上升; 华北平原; 冬小麦田; 胞外酶; 胞内酶

Response of soil extracellular/intracellular enzyme activity to long-term elevated CO₂ in a winter wheat field of North China Plain

ZHANG Xinyue*, BAI Jiashao, HAN Xue, XU Yinlong

Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Currently, there is still a lack of sufficient studies on the responses of soil enzymes to climate change in the agroecosystem. In an attempt to address this research gap, we investigated the variation of soil extracellular and intracellular enzyme activities and its driving factors under long-term elevated CO₂ treatment in a winter wheat farmland from North China Plain. Our study was conducted at the free air CO₂ enrichment experiment of Changping, Beijing. The planted winter wheat was exposed to ambient and elevated levels of CO₂ (400 μmol/mol vs 550 μmol/mol), respectively. We collected the surface soil samples from four different growth stages during the winter wheat growing season. Our results showed that the elevated CO₂ treatment significantly improved activities of extracellular carbon acquiring enzyme. However, activities of extracellular nitrogen acquiring enzyme and both intracellular carbon and nitrogen acquiring enzyme were not affected by the elevated CO₂ treatment. In addition, we also quantified the ratio of extracellular to intracellular enzyme activity which previous studies did not pay enough attention to this before. Based on the statistical results, the elevated CO₂ treatment increased the ratio of extracellular to intracellular carbon acquiring enzyme activity but decreased the ratio of extracellular to intracellular nitrogen acquiring enzyme activity at the maturity stage of winter wheat. According to Pearson correlation analysis, both extracellular carbon and nitrogen acquiring enzyme activities negatively correlated with soil pH value. The

基金项目: 国家重点研发计划课题项目(2019YFA0607403); 国家自然科学基金青年基金项目(31901174)

收稿日期: 2022-08-16; **网络出版日期:** 2023-02-03

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangxinyue@caas.cn

influencing factors of intracellular enzyme activity were different from that of extracellular enzyme activity. To be specific, the intracellular carbon acquiring enzyme activity positively correlated with soil water content while intracellular nitrogen acquiring enzyme activity negatively correlated with microbial biomass carbon. Nevertheless, the effect of above influencing factors was unable to be detected under the elevated CO₂ treatment. Only intracellular carbon acquiring enzyme activity showed a negative relationship with soil total nitrogen. These results highlighted the importance of studying intracellular enzymes, which could provide new insights into the response of soil processes to global change factors.

Key Words: elevated CO₂; North China Plain; winter wheat fields; extracellular enzyme; intracellular enzyme

人类活动引起温室气体排放不断增加^[1]。升高的 CO₂ 可以促进植物光合作用,增加地下碳(C)输入^[2],同时增强植物对土壤氮(N)素的吸收^[3],改变土壤微生物对能量和养分的需求,进而影响有机质分解^[4]。微生物驱动有机质分解的主要方式是合成并分泌胞外酶,针对特定的能量和营养需求发挥分解作用^[5-6]。目前关于 CO₂ 浓度升高对胞外酶活性影响的研究,相较于其他全球变化因子(如增温、降水变化和氮沉降等)还比较有限^[7],亟待开展这方面的研究补充欠缺。

模拟 N 沉降试验发现添加无机 N 后胞外 N 获取酶活性受抑制而 C 获取酶活性受促进^[8],符合资源分配假说,即当资源获取容易时减少相应酶的生产^[9]。但是,资源分配假说并不完全适用于 CO₂ 浓度升高引起的酶活性变化。CO₂ 浓度升高可以促进胞外 C 获取酶活性与微生物普遍面临能量限制,产生了正激发效应有关^[10-11]。但这种现象随着试验条件变化也会产生改变,例如有研究发现胞外 C 获取酶活性不响应 CO₂ 浓度升高^[12]。生产胞外酶需要消耗微生物自身的 N,因此微生物需要权衡对 N 的分配^[13-14],微生物生物量 N 与胞外酶活性之间存在显著负相关^[15]。升高的 CO₂ 导致 N 成为环境中的限制性资源^[16],微生物倾向于将 N 保留在生物量中,因此观测到酶活性不受影响^[12],甚至受到抑制的情况^[17]。还有研究观察到 CO₂ 浓度升高后受土壤养分供应能力调控 N 获取酶活性增强^[18]。然而上述研究集中在自然生态系统中,来自农田的报道还十分有限,近几年才逐渐受到关注^[2,19-20]。考虑到农田普遍存在的高 N 输入,这可能改变微生物在 CO₂ 浓度升高背景下的资源限制和养分分配,因此需要进一步展开探索。

另外,目前普遍关注胞外酶,而胞内酶并未得到足够重视。测定胞内酶的方法一直到在 1999 年才被确定,主要应用于测定脲酶^[21-22],后续才逐渐被应用于测定其他类型的酶,研究数量有限。胞内酶是胞外酶的前续存在形式,即存在于微生物细胞内未被分泌到土壤环境中的酶,因此二者关系密切^[23]。一些初步的研究表明,在微生物生产的主要 C 获取酶 β-葡萄糖苷酶中,胞外酶活性远低于胞内酶活性,仅占总酶(胞外与胞内之和)活性的 11%—24%^[24]。对于这一比例是否相对固定,尚缺少来自不同研究地点和不同 C、N 获取酶的验证结果。除此之外,胞内酶活性与微生物的关联可能比胞外酶与微生物的关联更明显^[24],忽略对胞内酶的研究会低估其在地下养分循环中发挥的作用。例如在内蒙古额尔古纳林草过渡带开展的 C 添加试验发现,胞内酶活性受显著促进,而胞外酶活性则不受影响^[25]。这一结果表明胞内酶活性可能对环境条件改变更敏感,但少有研究开展这方面探索,尚未见全球变化要素对胞内酶影响的研究报道。

综上所述,本研究针对农田胞外和胞内酶活性响应 CO₂ 浓度升高认识不足的现状,围绕以下两个科学问题开展研究。科学问题一:农田土壤胞外和胞内酶活性如何响应 CO₂ 浓度升高? 科学问题二:驱动胞外和胞内酶活性变化的关键因素是什么? 为回答上述两个科学问题,依托位于华北平原的北京昌平试验站,在冬小麦季进行开放式 CO₂ 富集试验(FACE)。华北平原是冬小麦的主要种植区,生产了全国 76%的小麦^[26]。近年开展的研究发现,土壤微生物及其酶活性与冬小麦产量之间存在较强的正相关^[27-28]。这意味着 CO₂ 浓度升高对冬小麦的影响不仅包括直接影响其光合作用,还会间接影响土壤酶活性进而反馈到籽粒产量。因此研究麦田土壤酶活性对 CO₂ 浓度升高的响应,不仅为深入理解全球变化背景下农田土壤过程的响应机制提供科学证据,而且对保障粮食安全也有积极意义。

influencing factors of intracellular enzyme activity were different from that of extracellular enzyme activity. To be specific, the intracellular carbon acquiring enzyme activity positively correlated with soil water content while intracellular nitrogen acquiring enzyme activity negatively correlated with microbial biomass carbon. Nevertheless, the effect of above influencing factors was unable to be detected under the elevated CO₂ treatment. Only intracellular carbon acquiring enzyme activity showed a negative relationship with soil total nitrogen. These results highlighted the importance of studying intracellular enzymes, which could provide new insights into the response of soil processes to global change factors.

Key Words: elevated CO₂; North China Plain; winter wheat fields; extracellular enzyme; intracellular enzyme

人类活动引起温室气体排放不断增加^[1]。升高的 CO₂ 可以促进植物光合作用,增加地下碳(C)输入^[2],同时增强植物对土壤氮(N)素的吸收^[3],改变土壤微生物对能量和养分的需求,进而影响有机质分解^[4]。微生物驱动有机质分解的主要方式是合成并分泌胞外酶,针对特定的能量和营养需求发挥分解作用^[5-6]。目前关于 CO₂ 浓度升高对胞外酶活性影响的研究,相较于其他全球变化因子(如增温、降水变化和氮沉降等)还比较有限^[7],亟待开展这方面的研究补充欠缺。

模拟 N 沉降试验发现添加无机 N 后胞外 N 获取酶活性受抑制而 C 获取酶活性受促进^[8],符合资源分配假说,即当资源获取容易时减少相应酶的生产^[9]。但是,资源分配假说并不完全适用于 CO₂ 浓度升高引起的酶活性变化。CO₂ 浓度升高可以促进胞外 C 获取酶活性与微生物普遍面临能量限制,产生了正激发效应有关^[10-11]。但这种现象随着试验条件变化也会产生改变,例如有研究发现胞外 C 获取酶活性不响应 CO₂ 浓度升高^[12]。生产胞外酶需要消耗微生物自身的 N,因此微生物需要权衡对 N 的分配^[13-14],微生物生物量 N 与胞外酶活性之间存在显著负相关^[15]。升高的 CO₂ 导致 N 成为环境中的限制性资源^[16],微生物倾向于将 N 保留在生物量中,因此观测到酶活性不受影响^[12],甚至受到抑制的情况^[17]。还有研究观察到 CO₂ 浓度升高后受土壤养分供应能力调控 N 获取酶活性增强^[18]。然而上述研究集中在自然生态系统中,来自农田的报道还十分有限,近几年才逐渐受到关注^[2,19-20]。考虑到农田普遍存在的高 N 输入,这可能改变微生物在 CO₂ 浓度升高背景下的资源限制和养分分配,因此需要进一步展开探索。

另外,目前普遍关注胞外酶,而胞内酶并未得到足够重视。测定胞内酶的方法一直到在 1999 年才被确定,主要应用于测定脲酶^[21-22],后续才逐渐被应用于测定其他类型的酶,研究数量有限。胞内酶是胞外酶的前续存在形式,即存在于微生物细胞内未被分泌到土壤环境中的酶,因此二者关系密切^[23]。一些初步的研究表明,在微生物生产的主要 C 获取酶 β-葡萄糖苷酶中,胞外酶活性远低于胞内酶活性,仅占总酶(胞外与胞内之和)活性的 11%—24%^[24]。对于这一比例是否相对固定,尚缺少来自不同研究地点和不同 C、N 获取酶的验证结果。除此之外,胞内酶活性与微生物的关联可能比胞外酶与微生物的关联更明显^[24],忽略对胞内酶的研究会低估其在地下养分循环中发挥的作用。例如在内蒙古额尔古纳林草过渡带开展的 C 添加试验发现,胞内酶活性受显著促进,而胞外酶活性则不受影响^[25]。这一结果表明胞内酶活性可能对环境条件改变更敏感,但少有研究开展这方面探索,尚未见全球变化要素对胞内酶影响的研究报道。

综上所述,本研究针对农田胞外和胞内酶活性响应 CO₂ 浓度升高认识不足的现状,围绕以下两个科学问题开展研究。科学问题一:农田土壤胞外和胞内酶活性如何响应 CO₂ 浓度升高? 科学问题二:驱动胞外和胞内酶活性变化的关键因素是什么? 为回答上述两个科学问题,依托位于华北平原的北京昌平试验站,在冬小麦季进行开放式 CO₂ 富集试验(FACE)。华北平原是冬小麦的主要种植区,生产了全国 76%的小麦^[26]。近年开展的研究发现,土壤微生物及其酶活性与冬小麦产量之间存在较强的正相关^[27-28]。这意味着 CO₂ 浓度升高对冬小麦的影响不仅包括直接影响其光合作用,还会间接影响土壤酶活性进而反馈到籽粒产量。因此研究麦田土壤酶活性对 CO₂ 浓度升高的响应,不仅为深入理解全球变化背景下农田土壤过程的响应机制提供科学证据,而且对保障粮食安全也有积极意义。

1 材料与方法

1.1 试验设计

本研究的试验地点位于北京市昌平区(116.14°E, 40.13°N), 属于华北平原冬小麦种植区, 种植制度以冬小麦/夏玉米一年两熟制为主。年平均气温 12 °C, 年平均降水量 600 mm, 土壤类型为褐潮土, 有机质含量 21.9 g/kg。本研究依托 FACE 平台开展, 该平台自 2007 年建立稳定运行至今, 持续进行小麦-玉米或小麦-大豆轮作, 历年地上作物受 CO₂ 浓度升高的影响, 将通过作物-土壤连续体传递至地下, 这种影响迭代至今已长达十余年(2007—2021)。田间试验重复 3 次, 共设置 3 个对照圈和 3 个 FACE 试验圈, 圈的直径为 4 m, 各圈之间的间隔均在 16 m(直径的 4 倍)以上。设置 FACE 圈为高浓度 CO₂(简称 eCO₂, (550±15) μmol/mol), 对照圈为常规浓度 CO₂(简称 aCO₂, (400±15) μmol/mol)。试验所用冬小麦品种为中麦 175, 2020 年 10 月 6 日播种, 2021 年 6 月 11 日收获。小麦生育期累计降雨量 97.1 mm, 平均气温 8.6 °C。全生育期施 N 量 226.5 kg N/hm², 施磷(P)量 138 kg P₂O₅/hm², 施钾(K)量 90 kg K₂O/hm²。N 肥按照底肥与追肥 0.56:0.54 的比例施用。底肥施 N 量 123 kg N/hm², 包括单质肥尿素(含 N 46%)和复合肥磷酸氢二铵(含 N 18%)。追肥仅施加尿素, 施 N 量为 103.5 kg N/hm²。P 肥和 K 肥仅作底肥, 分别使用磷酸氢二铵(含 P₂O₅ 46%)和氯化钾(含 K₂O 60%)一次性施入。底肥于播种前一天施用, 追肥于小麦拔节期施用。在越冬期和拔节期各进行一次喷灌, 灌溉量分别为 30 mm 和 60 mm。整个小麦生育期期间, 田间耕作、灌溉、施肥量、除虫及杂草控制等均与当地农民的管理措施保持一致。

1.2 研究方法

1.2.1 样品采集

为比较不同采样时期的动态特征, 本研究分别于冬小麦四个关键生育期采集表层 0—10 cm 土壤。按照小麦国际生育时期标准描述小麦生育时期^[29]。分别在 2021 年 4 月 1 日拔节期(Z31)、2021 年 5 月 7 日开花期(Z65)、2021 年 5 月 21 日灌浆期(Z75)和 2021 年 6 月 11 日成熟期(Z92)采集样品。鲜土从田间取回后立即转移至实验室过 2 mm 孔径的网筛, 并除去石头、根系等肉眼可见的杂物, 混合均匀后取一部分鲜土测定土壤含水量; 另取一部分鲜土进行风干用于测定土壤 pH 值。剩余土壤参考国内外同行普遍采用的样品储存标准, 一部分保存在 4°C 冰箱中并于一周内完成土壤酶活性测定和微生物生物量浸提^[30—31]。另一部分直接冻存于 -20°C 冰柜中备用。已有研究表明, 土壤样品采集后立即存储在 4°C 或者 -20°C, 对本研究关键参数土壤酶活性的测定结果无影响, 并且随着存储时间延长至 21 d, 大部分水解酶活性不受影响, 仅有个别水解酶的变异程度增加^[32]。本研究每次采集土样后均按照统一的标准进行样品的存储和测定, 因此假定样品存储时间和温度不会对微生物和酶活性的测定结果产生明显影响。最终测定得到的土壤酶活性与微生物生物量的数值与同样在麦田中开展的研究结果相当^[33—34]。

1.2.2 土壤胞外酶及胞内酶活性测定

本研究检测了两种参与 C 获取的酶: β-葡萄糖苷酶(β-1, 4-glucosidase, BG)、纤维二糖水解酶(β-D-cellobiohydrolase, CBH)和两种参与 N 获取的酶: N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-glucosaminidase, NAG)、亮氨酸氨基肽酶(Leucine aminopeptidase, LAP)。BG、CBH、NAG 和 LAP 这四种酶是当前研究中最常被用来表征参与 C、N 获取酶的指标^[35—36]。测定方法参考 Allison 等^[37]的试验方法, 称取约 2.5 g 鲜土后立即加入 91 mL 缓冲液并放置于磁力搅拌器上中速搅拌 1 min, 然后转为低速搅拌, 并在搅拌状态下用微量移液枪将 200 μL 土壤悬浊液转移至 96 孔黑色不透光微孔板, 然后加入 50 μL 底物。将微孔板放入 25°C 恒温培养箱中遮光培养 3 h, 然后立即用多功能酶标仪(Synergy LX, BioTek, 美国)测定。胞内酶活性的测定方法与胞外酶活性测定方法一致, 唯一不同的是测定胞内酶活性前预先将鲜土样品在真空状态下氯仿熏蒸 24 h^[38]。酶活性以每小时每克干物质产生底物的摩尔数(nmol g⁻¹ h⁻¹)来表示。

1.2.3 土壤理化性质测定

土壤含水量(SWC)的测定采用 105°C 烘干称重法。土壤 pH 值通过 pH 计(ST3100, 奥豪斯, 中国)测定,

使用的风干土和去 CO₂ 超纯水的水土比为 1:2.5。土壤全碳(TC)、全氮(TN)含量使用风干土,将土壤样品磨碎过 200 目筛后采用元素分析仪测定(Vario PYRO cube, Elementar, 德国)。微生物生物量碳(MBC)、氮(MBN)含量采用氯仿熏蒸-硫酸钾浸提法^[39]得到鲜土浸提液后,由 TOC/TN 分析仪(Langenselbold, Elementar, 德国)测定浸提液中的可溶性有机碳(DOC)与可溶性氮(DN)含量^[40],并使用修正系数计算微生物生物量碳氮含量。其中 MBC 的修正系数为 0.45^[41],MBN 的修正系数为 0.54^[42]。

1.3 数据处理及统计分析

本研究采用 Microsoft Excel 2010 软件进行数据整理和预处理,采用 R 软件(R 4.2.1)进行统计分析。由于样本的重复只有 3 个,参考同类研究将显著性水平 $P < 0.1$ 定义为边缘显著^[43]。其中 CO₂ 处理、生育期和二者交互作用对土壤理化性质、微生物生物量及酶活性的影响采用方差分析进行检验,分别在不同 CO₂ 处理下通过邓肯多重比较法检验土壤理化性质、微生物生物量和酶活性在不同生育期的时间动态,运用 Pearson 相关性分析检验不同 CO₂ 处理下胞外、胞内酶活性与土壤物理性质和微生物指标之间的作用关系。所有统计图均由 GraphPad Prism 9 绘制。

2 结果与分析

2.1 土壤含水量及 pH 值

SWC 不受 eCO₂ 的影响(图 1)。土壤 pH 由 aCO₂ 处理下的 7.88 显著降低到 eCO₂ 处理下的 7.81,这主要是由于 pH 在拔节期 eCO₂ 处理下显著偏低引起的(图 1)。土壤 SWC 和 pH 都存在显著的时间动态(图 1)。SWC 在灌浆期达到最大值的变化规律在不同 CO₂ 处理下保持一致,但 eCO₂ 处理下 SWC 增加略低于 aCO₂ 处理(图 1)。土壤 pH 受 CO₂ 处理与生育期之间交互作用的影响,aCO₂ 处理下 pH 在拔节期较高,随生育期有所降低,eCO₂ 处理下 pH 在拔节期较低,随生育期逐渐升高(图 1)。

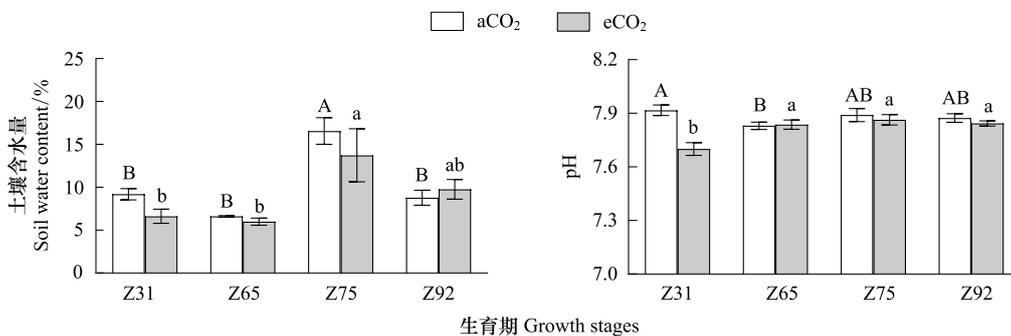


图 1 两种 CO₂ 处理下土壤含水量及 pH 值随不同生育期的变化

Fig.1 Changes of soil water content and pH value among different growth stages under two CO₂ treatments

方差分析结果以字母标记法展示,其中大、小写字母分别代表在 aCO₂ 和 eCO₂ 处理下,不同字母表示在不同生育期之间差异显著; Z31: 拔节期 Jointing stage; Z65: 开花期 Flowering stage; Z75: 灌浆期 Filling stage; Z92: 成熟期 Maturity stage; aCO₂: 常规 CO₂ 浓度 Ambient CO₂; eCO₂: 升高 CO₂ 浓度 Elevated CO₂

2.2 土壤碳氮养分含量

TC、TN 在不同 CO₂ 浓度处理下差异不显著,其中 TC 在 aCO₂ 处理下为 16.6 g/kg,在 eCO₂ 处理为 17.0 g/kg(图 2);TN 在不同 CO₂ 处理下都为 1.3 g/kg(图 2)。随生育期变化,未观察到 TC 存在时间动态(图 2),而 TN 在成熟期显著增加,但在 eCO₂ 处理下的增加幅度略低于 aCO₂ 处理(图 2)。

eCO₂ 处理下 DOC 达到 120.9 g/kg,较 aCO₂ 处理下的 105.2 g/kg 显著增加了 14.8%(图 2)。DN 不受 eCO₂ 影响,约为 53.4 g/kg(图 2)。DOC 在拔节期最高,随后呈降低趋势,直到成熟期降至最低,而 DN 在不同生育期保持稳定(图 2)。

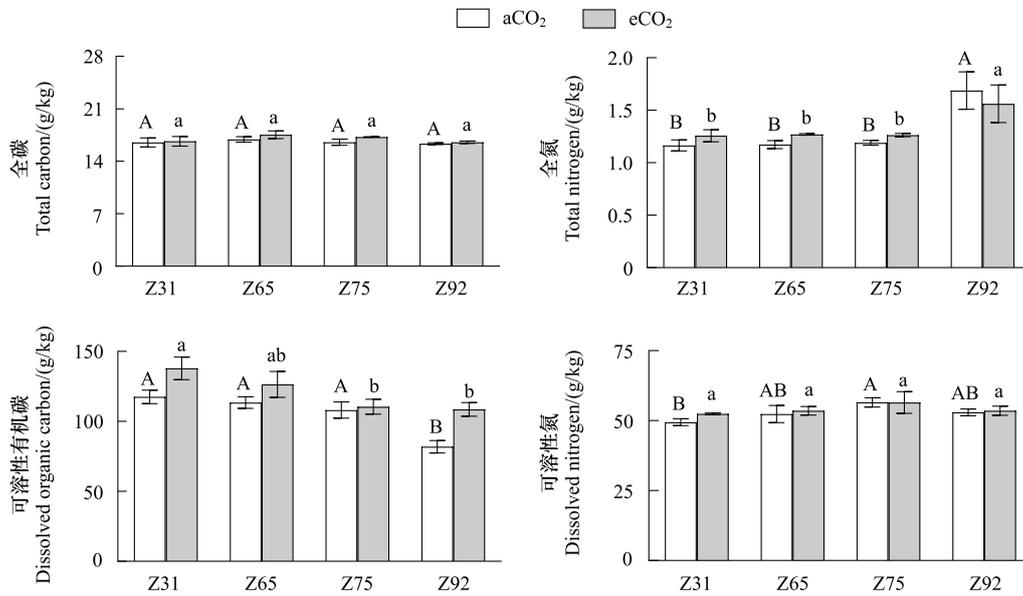


图2 两种 CO₂ 处理下土壤碳氮养分含量随不同生育期的变化

Fig.2 Changes of soil carbon and nitrogen content among different growth stages under two CO₂ treatments

2.3 微生物生物量碳氮

MBC 和 MBN 都不响应 eCO₂ 处理(图3)。MBC 在 aCO₂ 和 eCO₂ 处理下分别为 350.9 mg/kg 和 355.0 mg/kg。CO₂ 浓度处理改变了 MBC 在生育期的变化规律,其中 aCO₂ 处理下 MBC 从拔节到成熟不断积累,并在成熟期达到峰值,存在明显的时间动态;而 eCO₂ 处理下未观察到 MBC 存在时间动态(图3)。MBN 在 aCO₂ 和 eCO₂ 处理下分别为 70.6 mg/kg 和 75.4 mg/kg。MBN 存在显著的时间动态,在开花期降至最低,且这一变化规律不受 CO₂ 处理影响(图3)。

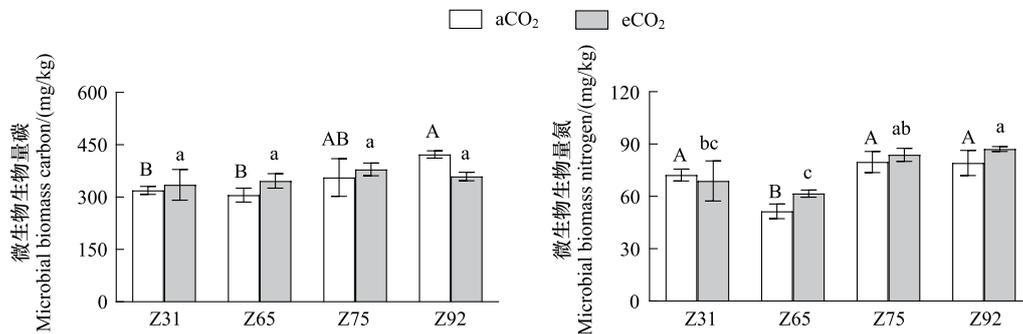


图3 两种 CO₂ 处理下微生物生物量碳氮随不同生育期的变化

Fig.3 Changes of microbial biomass carbon and nitrogen concentration among different growth stages under two CO₂ treatments

2.4 胞外与胞内酶活性

2.4.1 胞外酶

胞外 BG 酶活性在 aCO₂ 和 eCO₂ 处理下分别为 141.3 nmol g⁻¹ h⁻¹ 和 146.8 nmol g⁻¹ h⁻¹, 未响应 CO₂ 浓度升高(图4)。胞外 CBH 酶活性响应 eCO₂ 处理升高到 70.7 nmol g⁻¹ h⁻¹, 显著高于 aCO₂ 处理的结果 54.3 nmol g⁻¹ h⁻¹(图4)。胞外 BG 和 CBH 酶活性都存在显著的时间动态,并都表现为在开花和成熟期高于拔节和灌浆期,且 CO₂ 浓度处理不影响这种变化规律(图4)。

胞外 NAG 与 LAP 酶活性都不受 eCO₂ 的影响(图 4)。其中,NAG 酶活性在 aCO₂ 和 eCO₂ 处理下分别为 109.7 nmol g⁻¹ h⁻¹和 108.8 nmol g⁻¹ h⁻¹(图 4)。LAP 酶活性在 aCO₂ 处理下为 1327.2 nmol g⁻¹ h⁻¹略低于 eCO₂ 处理下的 1341.7 nmol g⁻¹ h⁻¹(图 4)。两种 N 获取酶活性都存在明显的时间动态,但变化规律不一致。其中,NAG 酶的时间动态与 C 获取酶一致(图 4)。LAP 酶的时间动态受 CO₂ 浓度处理影响,表现为 aCO₂ 处理下不存在显著的时间动态,而在 eCO₂ 处理下 LAP 酶在拔节期明显升高,而在开花期迅速降低(图 4)。

胞外 BG 酶活性高于胞外 CBH 酶活性,占胞外 C 获取酶(BG + CBH)的 69.7%。胞外 C 获取酶对 CO₂ 处理的响应和在生育期内呈现的时间动态与胞外 BG 酶活性的结果十分相似(图 4)。同样,胞外 LAP 酶主导胞外 N 获取酶(NAG + LAP),占比高达 92.4%,故胞外 N 获取酶活性对 eCO₂ 的响应以及在生育期的时间动态与 LAP 酶活性几乎一致(图 4)。

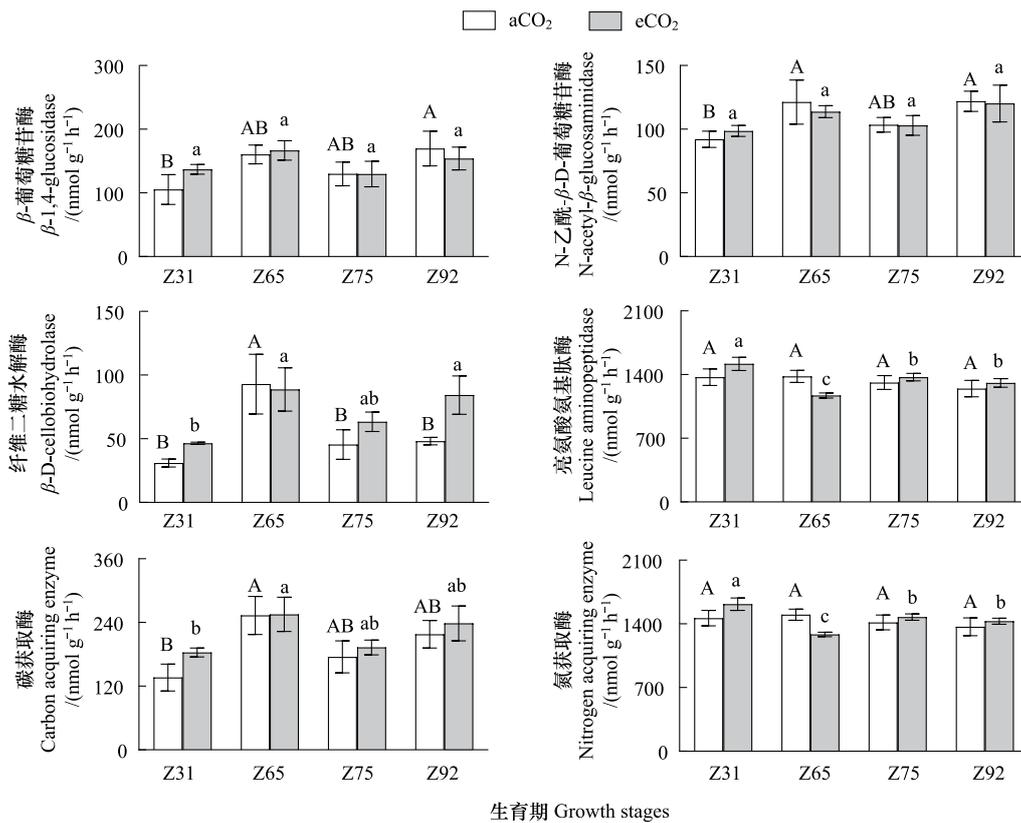


图 4 两种 CO₂ 处理下土壤胞外酶活性随不同生育期的变化

Fig.4 Changes of soil extracellular enzyme activities among growth stages under two CO₂ treatments

2.4.2 胞内酶

胞内 BG 和 CBH 酶活性都不响应 CO₂ 浓度升高(图 5)。BG 酶活性在 aCO₂ 和 eCO₂ 处理下分别为 105.4 nmol g⁻¹ h⁻¹和 105.8 nmol g⁻¹ h⁻¹;而 CBH 酶活性在 eCO₂ 处理下为 61.2 nmol g⁻¹ h⁻¹,相较于 aCO₂ 处理下的 56.9 nmol g⁻¹ h⁻¹略有增加(图 5)。胞内 BG 和 CBH 酶活性呈一致的时间动态,都在灌浆期达到最大值并在成熟期迅速降低(图 5)。

胞内 NAG 和 LAP 酶活性也都不受 CO₂ 浓度升高的显著影响(图 5)。胞内 NAG 酶活性在 eCO₂ 处理下有增加趋势,从 aCO₂ 处理下的 34.5 nmol g⁻¹ h⁻¹增加为 41.0 nmol g⁻¹ h⁻¹(图 5)。相反,胞内 LAP 酶活性则有减少趋势,从 aCO₂ 处理下的 406.4 nmol g⁻¹ h⁻¹减少至 eCO₂ 处理下的 342.9 nmol g⁻¹ h⁻¹(图 5)。胞内 NAG 和 LAP 酶活性随生育期呈明显的时间动态,但各自的变化规律不同,并且受 CO₂ 浓度处理的影响也不同。其中胞内 NAG 酶活性在 aCO₂ 处理下从拔节到灌浆期明显增加,然后在成熟期降至最低,但在 eCO₂ 处理下胞内

NAG 酶活性在拔节期较高,随后在开花期明显降低,而后又在灌浆成熟期回升至较高水平(图 5)。胞内 LAP 酶活性的时间动态同样受 CO_2 浓度处理影响,但与胞外 LAP 酶活性受 CO_2 处理的影响相反,胞内 LAP 酶活性在 eCO_2 处理下不存在时间动态,而在 aCO_2 处理下从拔节到开花期明显增加,随后在成熟期降至最低(图 5)

同胞外酶一致,胞内 C、N 获取酶仍然是 BG 和 LAP 酶占比更高,分别为 64.1%和 90.8%。因此,胞内 C、N 获取酶对 CO_2 浓度处理的响应,以及在不同生育期展现的时间动态,分别与胞内 BG 和 LAP 酶类似(图 5)。

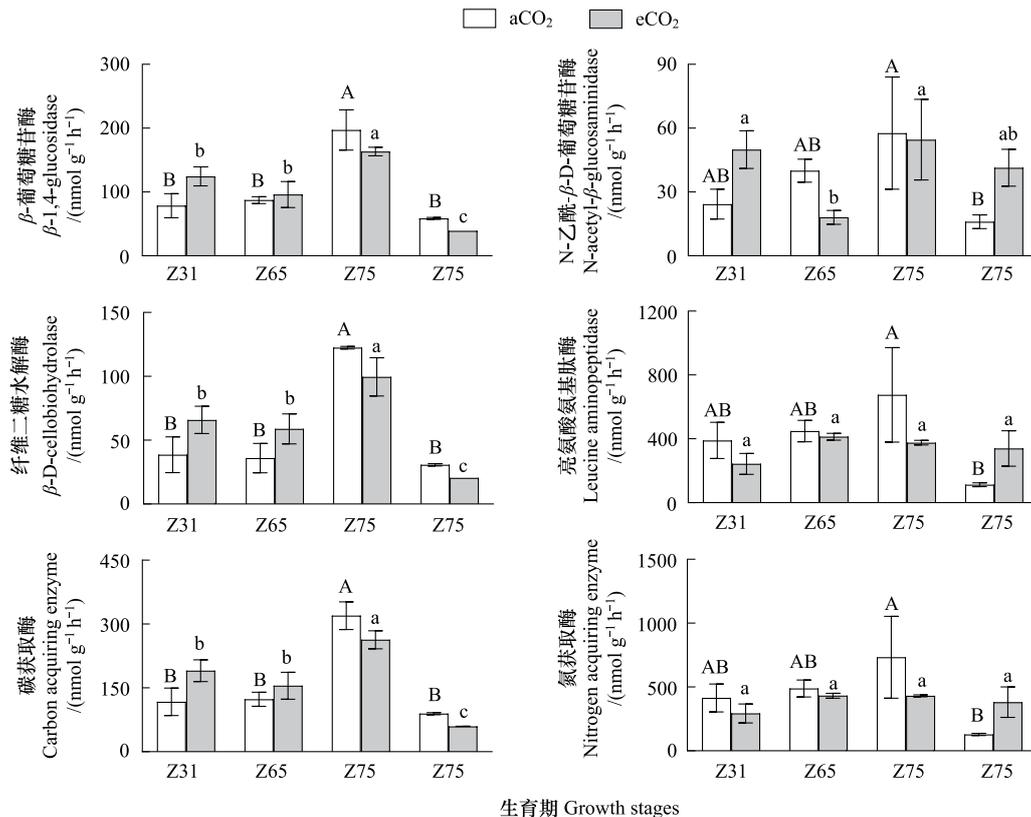


图 5 两种 CO_2 处理下土壤胞内酶活性随不同生育期的变化

Fig.5 Changes of soil intracellular enzyme activities among different growth stages under two CO_2 treatments

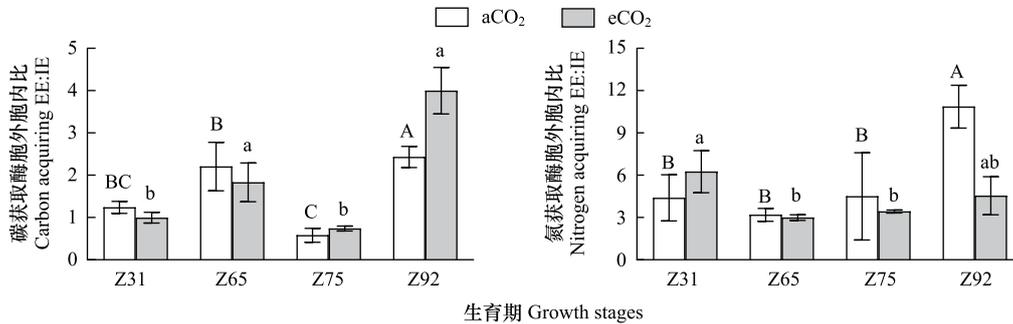
2.4.3 胞外与胞内酶活性的比值及相互关系

C、N 获取酶活性的胞外胞内比 (EE:IE) 不响应 CO_2 浓度升高(图 6)。C 获取酶 EE:IE 在 aCO_2 处理下为 1.6,在 eCO_2 处理下增加了 18.8%,达到 1.9(图 6)。与 C 获取酶的 EE:IE 相反,N 获取酶的 EE:IE 在 eCO_2 处理下有减少趋势,从 aCO_2 处理下的 5.7 减少至 eCO_2 处理下的 4.3,降低了 24.6%(图 6)。C、N 获取酶的 EE:IE 都存在显著的时间动态,并且在成熟期一致达到最大值(图 6)。不一致的是,成熟期 C 获取酶的 EE:IE 在 eCO_2 处理下更高,而 N 获取酶的 EE:IE 在 aCO_2 处理下更高(图 6)。

为了明确 C、N 获取胞外酶、胞内酶之间的关系以及进一步了解微生物对胞内酶和胞外酶的分配策略,本研究对土壤胞外酶、胞内酶之间进行了 Pearson 相关性分析,结果显示:在 aCO_2 处理下,胞内 C 获取酶活性与胞内的 N 获取酶活性呈显著的正相关关系(表 1)。在 eCO_2 处理下,胞外 C 获取酶活性与胞外 N 获取酶活性呈显著的负相关关系(表 2)。

2.5 影响胞外和胞内酶活性的因素

为分析 CO_2 浓度升高对驱动酶活性变化因素的影响,分开比较了两种 CO_2 浓度处理下,土壤理化性质以及微生物指标与酶活性之间的关系。在 aCO_2 处理下,胞外 C、N 获取酶活性都与土壤 pH 显著负相关,并且胞

图 6 两种 CO₂ 处理下土壤酶活性胞外胞内比值随不同生育期的变化Fig.6 Changes of soil extracellular to intracellular enzyme activity ratio among different growth stages under two CO₂ treatments

EE: 胞外酶 Extracellular enzyme; IE: 胞内酶 Intracellular enzyme

外 N 获取酶还与 TN 显著负相关(表 3)。但在 eCO₂ 处理下,胞外 C、N 获取酶活性不受土壤理化性质和微生物生物量的显著影响(表 3)。影响胞内酶的因素不同于胞外酶,在 aCO₂ 处理下胞内 C 获取酶与 SWC 显著正相关,胞内 N 获取酶与 MBC 显著负相关(表 3)。eCO₂ 处理同样削弱了环境因素对胞内酶活性的影响,仅观察到胞内 C 获取酶与 TN 存在显著负相关(表 3)。

表 1 aCO₂ 处理下土壤胞外和胞内酶活性之间的 Pearson 相关性系数Table 1 Pearson correlation coefficient among soil extracellular and intracellular enzyme activities under aCO₂ treatment

常规 CO ₂ 浓度 Ambient CO ₂		碳获取酶 Carbon acquiring enzyme		氮获取酶 Nitrogen acquiring enzyme	
		胞外 Extracellular	胞内 Intracellular	胞外 Extracellular	胞内 Intracellular
		碳获取酶 Carbon acquiring enzyme	胞外	1	-0.23
	胞内		1	-0.25	0.76**
氮获取酶 Nitrogen acquiring enzyme	胞外			1	-0.26
	胞内				1

** 表示在 $P < 0.01$ 水平显著表 2 eCO₂ 处理下土壤胞外和胞内酶活性之间的 Pearson 相关性系数Table 2 Pearson correlation coefficient among soil extracellular and intracellular enzyme activities under eCO₂ treatment

升高 CO ₂ 浓度 Elevated CO ₂		碳获取酶 Carbon acquiring enzyme		氮获取酶 Nitrogen acquiring enzyme	
		胞外 Extracellular	胞内 Intracellular	胞外 Extracellular	胞内 Intracellular
		碳获取酶 Carbon acquiring enzyme	胞外	1	-0.45
	胞内		1	0.13	0.17
氮获取酶 Nitrogen acquiring enzyme	胞外			1	-0.46
	胞内				1

* 表示在 $P < 0.05$ 水平显著

3 讨论

3.1 CO₂ 浓度升高对土壤胞外和胞内酶活性的影响

本研究在冬小麦田中观察到,参与 C 获取的胞外 CBH 酶活性响应 CO₂ 浓度升高增加了 30.1%(图 4)。在本植物下开展的研究则分别发现 CO₂ 浓度升高促进同样参与 C 获取的 α-葡萄糖苷酶(AG)和 BG 酶活性增强^[44-45]。参与 C 获取的酶活性增强意味着,CO₂ 浓度升高会对土壤有机质分解产生正激发效应^[46],导

致增加的地下 C 输入被返还到大气中,形成对 CO₂ 浓度升高的正反馈^[47-48]。本研究提供了基于农田的观测证据,表明长期 CO₂ 浓度升高处理后仍存在正激发效应。而不同研究观察到不同的 C 获取酶活性提高,与该研究地微生物类群对底物的偏好不同有关^[7]。CO₂ 浓度升高还会增强植物和微生物对 N 素的竞争关系,根据资源分配假说,这会促进微生物产生更多 N 获取酶活性,来缓解资源限制^[13]。来自高山草地的研究支持上述推论,观察到 CO₂ 浓度升高促进 NAG 酶活性^[49]。而另一项在水稻田的研究则发现 CO₂ 浓度升高不影响 NAG 酶活性、抑制 LAP 酶活性^[17]。本研究同样不支持上述假说,并且发现参与 N 获取的两种酶 NAG 和 LAP 的活性都不响应 eCO₂ 处理(图 4,5)。农田 N 获取酶活性不响应 CO₂ 浓度升高与施肥管理有关。N 肥为农田土壤微生物提供了额外的 N 获取途径,微生物不必仅依靠生产酶来获取受限制元素。

表 3 土壤胞外和胞内酶活性与土壤环境因素之间的 Pearson 相关系数

Table 3 Pearson correlation coefficient between soil extracellular and intracellular enzyme activities and soil environmental factors

驱动因素 Driving factors	常规 CO ₂ 浓度 Ambient CO ₂				升高 CO ₂ 浓度 Elevated CO ₂			
	碳获取酶 Carbon acquiring enzyme		氮获取酶 Nitrogen acquiring enzyme		碳获取酶 Carbon acquiring enzyme		氮获取酶 Nitrogen acquiring enzyme	
	胞外	胞内	胞外	胞内	胞外	胞内	胞外	胞内
土壤含水量 Soil water content	-0.30	0.82 **	-0.28	0.40	-0.03	0.35	0.06	-0.01
pH 值 pH value	-0.61 *	0.29	-0.59 *	0.34	0.32	-0.04	-0.45	0.40
全碳 Total carbon	-0.25	0.07	-0.31	0.24	-0.22	0.22	-0.19	0.07
全氮 Total nitrogen	0.09	-0.34	-0.57 *	-0.44	0.48	-0.59 *	-0.15	-0.08
可溶性有机碳 Dissolved organic carbon	-0.17	0.21	0.41	0.45	0.05	0.09	0.15	-0.43
可溶性氮 Dissolved nitrogen	0.31	0.40	0.19	-0.04	0.27	0.21	-0.17	-0.10
微生物生物量碳 Microbial biomass carbon	0.30	-0.23	0.11	-0.68 *	-0.24	-0.08	0.28	-0.23
微生物生物量氮 Microbial biomass nitrogen	-0.24	0.15	-0.28	-0.29	-0.11	-0.18	0.38	-0.21

·、* 和 ** 分别表示在 $P < 0.1$, $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$ 水平显著

胞内 C、N 获取酶活性未对 CO₂ 浓度升高产生响应,但是 C、N 获取酶活性的 EE:IE 在成熟期受 CO₂ 浓度升高的显著影响(图 6)。本研究中,从拔节到成熟期 C 获取酶活性 EE:IE 约为 0.6—4.0, N 获取酶活性 EE:IE 约为 3.0—10.9,表明微生物倾向于将更多酶分泌到胞外,尤其是 N 获取酶。当地上冬小麦进入成熟期,地下微生物对酶在胞外还是胞内的分配比例受 eCO₂ 处理影响,并且这种影响在 C、N 获取酶之间不一致,表现为 CO₂ 浓度升高促使更多 C 获取酶分配到胞外,而更多 N 获取酶保留在胞内(图 6)。这意味着激发效应不仅可以来自微生物改变酶生产,还可以通过调节酶在细胞内外的分配实现。本研究结果指明,微生物响应 CO₂ 浓度升高的一项重要机制是调节参与能量和养分获取的酶在胞外和胞内的分配。

CO₂ 浓度升高还引起了 C、N 获取酶活性之间的相互关系的变化。eCO₂ 处理下原本胞内 C、N 获取酶之间显著的正相关消失,转而在胞外 C、N 获取酶之间出现显著负相关(表 1、表 2)。微生物作为有机体其体内元素组成具有一定内稳态^[35],在没有外部干扰时(如 CO₂ 浓度升高)胞内 C、N 获取酶的高度正相关恰好反映出微生物对资源的特定需求,符合前人认为胞内酶与微生物联系更密切的研究结论^[24],进一步强调了研究胞内酶的重要性。CO₂ 浓度升高消除了胞内酶之间的关系,转而观察到胞外酶之间显著相关,与微生物为适应外部资源变化调整酶在胞内与胞外的分配有关,此时微生物对外部资源的特定需求是引起胞外酶活性相互关联的主要原因。

3.2 影响胞外和胞内酶活性的关键因素

在 aCO₂ 处理下,随土壤 pH 值升高,胞外 C、N 获取酶活性都显著降低(表 3)。有研究指出,胞外 C、N 获取酶的最适 pH 值分别为 4.3 和 7.2,当土壤 pH 超过上述最适值时将导致酶活性随土壤 pH 升高而降低^[50]。

本研究的平均土壤 pH 值约为 7.8,支持上述结论。此外,胞外 N 获取酶还与 TN 存在显著负相关,符合胞外酶生产的资源分配假说^[13]。影响胞内酶活性的因素不同于影响胞外酶活性的因素。SWC 是促进胞内 C 获取酶活性的最重要因素(表 3),随着 SWC 在灌浆期达到峰值,胞内 C 获取酶活性也达到最大值(图 1,5)。较低的 SWC 可能限制微生物的扩散活动,导致资源受限引起的土壤酶活性随 SWC 降低而降低^[51]。本研究发现这种扩散限制对胞内酶有更直接的影响。但对于仅胞内 C 获取酶受影响而胞内 N 获取酶不受影响的机制,还需要进一步研究探索。胞内 N 获取酶活性与 MBC 呈显著负相关(表 3)。MBC 在 aCO₂ 处理下随着冬小麦生育进程不断积累并在成熟期达到峰值(图 3)。此时作物进入收获阶段生理活动减弱,与微生物之间的养分竞争关系缓和,TN 在环境中积累(图 2)。土壤养分供应增加导致胞内 N 获取酶活性受抑制,符合资源分配假说^[7,35]。而胞外 N 获取酶不受 MBC 变化的影响,同样可能与胞内酶活性较胞外酶活性和土壤微生物的关联性更强有关^[24]。CO₂ 浓度升高虽然导致上述影响酶活性变化的因素不起作用,但土壤养分状况(TN)仍然与土壤酶活性的变化存在关联(表 3),表明 CO₂ 浓度升高可能凸显土壤养分对酶活性的影响^[52],并且这种影响在胞内更显著。本部分结果强调了对胞内酶开展研究的重要性,为深入理解土壤过程对全球变化因素的响应提供了新的角度。

4 结论

本研究在位于北京昌平的冬小麦田中发现,eCO₂ 促进胞外 C 获取酶活性,不影响胞外 N 获取酶活性及胞内 C、N 获取酶活性。通过量化酶活性胞外胞内比发现,在冬小麦成熟期 eCO₂ 增强了 C 获取酶胞外胞内比,但降低了 N 获取酶胞外胞内比。这一研究结果表明,CO₂ 浓度升高对土壤有机质的激发效应存在两种机制:一是 C 获取酶的生产提高,二是不改变生产但将更多 C 获取酶从胞内转移到胞外。胞内和胞外 N 获取酶活性都不响应 eCO₂ 可能与施肥管理有关。胞外 C、N 获取酶活性都与土壤 pH 值负相关;而胞内 C 获取酶活性与土壤含水量正相关,胞内 N 获取酶活性与微生物生物量负相关。CO₂ 浓度升高导致上述影响酶活性变化的因素不再起作用,仅存在胞内 C 获取酶与土壤全 N 负相关。研究结果强调对胞内酶开展研究十分必要,可以拓展对全球变化下土壤过程响应的认识。

致谢:感谢黄宏胜、王成达、董李冰和马芬在冬小麦播种、田间管理和土壤样品采集工作中提供的帮助。

参考文献(References):

- [1] Solomon S. The physical science basis: Contribution of working group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press. 2022. 8-12.
- [2] Liu C, Wu Z R, Hu Z H, Yin N, Islam A R M T, Wei Z W. Characteristics and influencing factors of carbon fluxes in winter wheat fields under elevated CO₂ concentration. Environmental Pollution, 2022, 307: 119480.
- [3] Kuzyakov Y, Horwath W R, Dorodnikov M, Blagodatskaya E. Review and synthesis of the effects of elevated atmospheric CO₂ on soil processes: No changes in pools, but increased fluxes and accelerated cycles. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 128: 66-78.
- [4] Chen Z, Maltz M R, Russell R, Ye S Y, Cao J X, Shang H. Highly elevated CO₂ and fertilization with nitrogen stimulates significant *schima superba* growth and mediates soil microbial community composition along an oligotroph-copiotroph spectrum. Journal of Soils and Sediments, 2022, 22(5): 1555-1571.
- [5] Chen H, Li D J, Xiao K C, Wang K L. Soil microbial processes and resource limitation in karst and non-karst forests. Functional Ecology, 2018, 32: 1400-1409.
- [6] Dick R P. Methods of soil enzymology. Madison, Wisconsin, USA: Soil Science Society of America. 2011. 35-55.
- [7] Xiao W, Chen X, Jing X, Zhu B. A meta-analysis of soil extracellular enzyme activities in response to global change. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 123: 21-32.
- [8] 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.
- [9] Ananbeh H, Stojanović M, Pompeiano A, Voběrková S, Trasar-Cepeda C. Use of soil enzyme activities to assess the recovery of soil functions in

- abandoned coppice forest systems. *Science of the Total Environment*, 2019, 694: 133692.
- [10] 李奕霏, 肖谋良, 袁红朝, 祝贞科, 王久荣, 李科林, 葛体达, 吴金水. CO₂ 倍增对稻田土壤碳氮水解酶活性的影响. *中国环境科学*, 2018, 38(9): 3474-3480.
- [11] Vestergård M, Reinsch S, Bengtson P, Ambus P, Christensen S. Enhanced priming of old, not new soil carbon at elevated atmospheric CO₂. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 100: 140-148.
- [12] 魏晗梅, 郑粉莉, 赵苗苗, 王婧, 焦健宇, 王雪松. CO₂ 浓度升高、增温和冬小麦种植对土壤酶活性的影响. *应用生态学报*, 2022, 33(11): 2971-2978.
- [13] Allison S D, Weintraub M N, Gartner T B, Waldrop M P. Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. *Soil Enzymology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 229-243.
- [14] Bai X J, Dippold M A, An S S, Wang B R, Zhang H X, Loepmann S. Extracellular enzyme activity and stoichiometry: the effect of soil microbial element limitation during leaf litter decomposition. *Ecological Indicators*, 2021, 121: 107200.
- [15] Zhang X Y, Zeng H, Wang W. Two contrasting seasonal patterns in microbial nitrogen immobilization from temperate ecosystems. *Ecological Indicators*, 2018, 93: 164-172.
- [16] Manal A, Brian W, Catherine P. The effect of long-term CO₂ enrichment on carbon and nitrogen content of roots and soil of natural pastureland. *Folia Oecologica*, 2021, 48(2): 180-190.
- [17] Maity P P, Chakrabarti B, Purakayastha T J, Bhatia A, Das Saha N, Jatav R S, Sharma A, Bhowmik A, Kumar V, Chakraborty D. Do elevated CO₂ and temperature affect organic nitrogen fractions and enzyme activities in soil under rice crop? *Soil Research*, 2020, 58(4): 400.
- [18] Kelley A M, Fay P A, Polley H W, Gill R A, Jackson R B. Atmospheric CO₂ and soil extracellular enzyme activity: a meta-analysis and CO₂ gradient experiment. *Ecosphere*, 2011, 2(8): art96.
- [19] Waqas M A, Li Y E, Ashraf M N, Ahmed W, Wang B, Sardar M F, Ma P, Li R N, Wan Y F, Kuzyakov Y. Long-term warming and elevated CO₂ increase ammonia-oxidizing microbial communities and accelerate nitrification in paddy soil. *Applied Soil Ecology*, 2021, 166: 104063.
- [20] Chourasiya D, Gupta M M, Sahni S, Oehl F, Agnihotri R, Buade R, Maheshwari H S, Prakash A, Sharma M P. Unraveling the AM fungal community for understanding its ecosystem resilience to changed climate in agroecosystems. *Symbiosis*, 2021, 84(3): 295-310.
- [21] Klose S, Tabatabai M A. Urease activity of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(2): 205-211.
- [22] Klose S, Tabatabai M A. Urease activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, 31(3): 191-199.
- [23] Qin S P, Hu C S, Oenema O. Differentiating intracellular from extracellular alkaline phosphatase activity in soil by sonication. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58691.
- [24] 李华勇. 土壤胞内/胞外 β-葡萄糖苷酶对 As(V) 的响应研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [25] 于春甲, 姜东奇, 田沐雨, 陈振华, 张玉兰, 王俭, 蒋晖, 陈利军. 碳添加下黑钙土胞内、胞外脲酶活性变化及其机制. *应用生态学报*, 2020, 31(6): 1957-1962.
- [26] 吴泽新. 气候变化对黄淮海平原主要粮食作物的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [27] 戴伊莎, 成欣, 刘帮艳, 何鲜, 胡梦阳, 杨武魁, 王龙昌, 武海燕, 李茜, 吴进红. 秸秆和紫云英协同覆盖对西南旱地土壤养分、酶活性及小麦产量的影响. *土壤通报*, 2021, 52(6): 1339-1347.
- [28] 韩宝, 于跃跃, 朱文, 徐凯, 郭宁. 有机肥不同量级对小麦产量和土壤培肥的影响. *中国农学通报*, 2021, 37(24): 73-78.
- [29] Zadoks J C, Chang T T, Konzak C F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 1974, 14(6): 415-421.
- [30] Feng J, Wu J J, Zhang Q, Zhang D D, Li Q X, Long C Y, Yang F, Chen Q, Cheng X L. Stimulation of nitrogen-hydrolyzing enzymes in soil aggregates mitigates nitrogen constraint for carbon sequestration following afforestation in subtropical China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 123: 136-144.
- [31] Souza R C, Solly E F, Dawes M A, Graf F, Hagedorn F, Egli S, Clement C R, Nagy L, Rixen C, Peter M. Responses of soil extracellular enzyme activities to experimental warming and CO₂ enrichment at the alpine treeline. *Plant and Soil*, 2017, 416(1): 527-537.
- [32] DeForest J L. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and L. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(6): 1180-1186.
- [33] Hamer U, Meyer M U T, Meyer U N, Radermacher A, Götze P, Koch H J, Scherber C. Soil microbial biomass and enzyme kinetics for the assessment of temporal diversification in agroecosystems. *Basic and Applied Ecology*, 2021, 53: 143-153.
- [34] 杨淑莉, 朱安宁, 张佳宝, 陈效民, 朱强根. 免耕对小麦-玉米轮作下玉米季土壤微生物生物量碳、氮的影响. *土壤通报*, 2010, 41(4): 802-806.
- [35] Sinsabaugh R L, Lauber C L, Weintraub M N, Ahmed B, Allison S D, Crenshaw C, Contosta A R, Cusack D, Frey S, Gallo M E, Gartner T B, Hobbie S E, Holland K, Keeler B L, Powers J S, Stursova M, Takacs-Vesbach C, Waldrop M P, Wallenstein M D, Zak D R, Zeglin L H.

- Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters*, 2008, 11(11): 1252-1264.
- [36] Lasota J, Babiak T, Błońska E. C: N: P stoichiometry associated with biochar in forest soils at historical charcoal production sites in Poland. *Geoderma Regional*, 2022, 28: e00482.
- [37] Allison V J, Condon L M, Peltzer D A, Richardson S J, Turner B L. Changes in enzyme activities and soil microbial community composition along carbon and nutrient gradients at the Franz Josef chronosequence, New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(7): 1770-1781.
- [38] Klose S, Ali Tabatabai M. Response of phosphomonoesterases in soils to chloroform fumigation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2002, 165(4): 429.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] Joergensen R G. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k_{EC} value. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(1): 25-31.
- [42] Joergensen R G, Mueller T. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k_{EN} value. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(1): 33-37.
- [43] Hofmockel K S, Zak D R, Moran K K, Jastrow J D. Changes in forest soil organic matter pools after a decade of elevated CO₂ and O₃. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(7): 1518-1527.
- [44] Kim S, Kang H. Effects of elevated CO₂ and Pb on phytoextraction and enzyme activity. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2011, 219(1): 365-375.
- [45] Larson J L, Zak D R, Sinsabaugh R L. Extracellular enzyme activity beneath temperate trees growing under elevated carbon dioxide and ozone. *Soil Science Society of America Journal*, 2002, 66(6): 1848-1856.
- [46] Zhao G, Liang C, Feng X J, Liu L L, Zhu J T, Chen N, Chen Y, Wang L, Zhang Y J. Elevated CO₂ decreases soil carbon stability in Tibetan Plateau. *Environmental Research Letters*, 2020, 15(11): 114002.
- [47] Mayr C, Miller M, Insam H. Elevated CO₂ alters community-level physiological profiles and enzyme activities in alpine grassland. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(1/2): 35-43.
- [48] Liu S W, Ji C, Wang C, Chen J, Jin Y G, Zou Z H, Li S Q, Niu S L, Zou J W. Climatic role of terrestrial ecosystem under elevated CO₂: a bottom-up greenhouse gases budget. *Ecology Letters*, 2018, 21(7): 1108-1118.
- [49] van Groenigen K J, Qi X, Osenberg C W, Luo Y Q, Hungate B A. Faster decomposition under increased atmospheric CO₂ limits soil carbon storage. *Science*, 2014, 344(6183): 508-509.
- [50] Puissant J, Jones B, Goodall T, Mang D N, Bland A, Gweon H S, Malik A, Jones D L, Clark I 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.
- [51] Brito de Oliveira T, de Lucas R C, de Almeida Scarcella A S, Contato A G, Machado Pasin T, Alberto Martinez C, de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli M. Effects of multiple climate change factors on exoenzyme activities and CO₂ efflux in a tropical grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 148: 107877.
- [52] Ma W J, Li J, Gao Y, Xing F, Sun S N, Zhang T, Zhu X Z, Chen C, Li Z. Responses of soil extracellular enzyme activities and microbial community properties to interaction between nitrogen addition and increased precipitation in a semi-arid grassland ecosystem. *Science of the Total Environment*, 2020, 703: 134691.