DOI: 10.20103/j.stxb.202411292929

阴红彬,黄庆阳,沙刚,谢立红,杨帆,张超,姜明月,曹宏杰.新期火山熔岩台地土壤胞外酶活性及化学计量特征对氮沉降的响应.生态学报,2025, 45(13): - .

Yin H B, Huang Q Y, Sha G, Xie L H, Yang F, Zhang C, Jiang M Y, Cao H J. Response of soil extracellular enzyme activity and stoichiometric characteristics to nitrogen deposition in new volcanic lava platform. Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(13): - .

新期火山熔岩台地土壤胞外酶活性及化学计量特征对 氮沉降的响应

阴红彬¹,黄庆阳^{1,2},沙 刚¹,谢立红^{1,2},杨 帆¹,张 超¹,姜明月¹,曹宏杰^{1,2,*} 1 黑龙江省科学院自然与生态研究所,哈尔滨 150040 2 湿地与生态保育国家地方联合工程实验室,哈尔滨 150040

摘要:氮沉降改变森林生态系统养分平衡,影响土壤中营养元素循环和微生物养分代谢过程。五大连池火山熔岩台地由于自身 养分匮乏,植被恢复受到养分条件的制约,但土壤微生物与植物养分限制的协同响应机制仍缺乏深入研究。本研究以香杨 (*Populus koreana*)矮曲林为研究对象,模拟5个氮添加梯度,分别为CK(0gNm⁻²a⁻¹)、N1(2gNm⁻²a⁻¹)、N2(4gNm⁻²a⁻¹)、 N3(8gNm⁻²a⁻¹)和N4(16gNm⁻²a⁻¹),施肥两年后测定土壤养分和微生物C、N、P含量及胞外酶活性,采用生态酶化学计量 学方法,揭示微生物代谢对碳、氮、磷的限制模式,旨在探究外源氮添加对土壤微生物代谢限制产生的影响。结果表明,(1)添 加氮后土壤中 C-获取酶和 P-获取酶的活性均显著升高,随着氮添加量的递增,三种酶的活性变化趋势表现为呈先上 升后下降,N3处理 C-获取酶和 P-获取酶活性最高,而 N2处理 N-获取酶活性最高;(2)土壤胞外酶的 EEA_{cP}和 EEA_{xP}呈先升高 后降低的趋势,N2处理达到最高,而 EEA_{cN}呈先降低后增加再降低的趋势,N3处理最高;(3)矢量模型分析发现所有氮处理土 壤矢量角度均大于 45°,随着氮添加量的增多呈先减少后增加的趋势;(4)冗余分析发现土壤养分是影响胞外酶活性和胞外酶 化学计量比的关键因子,TP 与矢量长度和矢量角度均呈显著正相关关系(P<0.05)。结果表明,氮沉降可以提高土壤胞外酶活 性,影响土壤微生物的养分限制,促进土壤生物化学循环,研究结果为气候变化下森林生态系统的适应性管理提供重要科学 依据。

关键词:微生物养分限制;土壤酶活性; 酶化学计量比;氮沉降;火山熔岩台地

Response of soil extracellular enzyme activity and stoichiometric characteristics to nitrogen deposition in new volcanic lava platform

YIN Hongbin¹, HUANG Qingyang^{1,2}, SHA Gang¹, XIE Lihong^{1,2}, YANG Fan¹, ZHANG Chao¹, JIANG Mingyue¹, CAO Hongjie^{1,2,*}

1 Institute of Natural Resources and Ecology, Science Academy of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China

2 National and Provincial Joint Engineering Laboratory of Wetlands and Ecological Conservation, Harbin 150040, China

Abstract: Nitrogen (N) deposition may trigger soil nutrient imbalances, exerting a profound impact on nutrient cycling and microbial metabolism in forest ecosystems. Due to nutrient deficiencies in the Wudalianchi volcanic lava platform, vegetation restoration in this area is constrained by nutrient conditions. Little is known about whether soil microorganisms in this region exhibit a synergistic response to plant nutrient limitations. To explore the impact of exogenous N addition on microbial metabolic limitations in the soil of the *Populus koreana* elfin forest—an important pioneer tree community in this region—

基金项目:黑龙江省重点研发计划(GA21C030);黑龙江省科学院重点研发计划(ZDYF2024ZR03);黑龙江省省属科研院所科研业务费 (ZNBZ2022ZR07);黑龙江省科学院院所能力提升专项(YSTS2025ZR01)

收稿日期:2024-11-29; 网络出版日期:2025-00-00

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: hjcao781228@163.com

http://www.ecologica.cn

in-situ simulated N deposition experiments and enzymatic stoichiometry methods were employed to reveal the limitation patterns of carbon, nitrogen, and phosphorus in microbial metabolism. Our results showed that N addition significantly increased the activities of Carbon(C)-, Nitrogen(N)-, and Phosphorus(P)-acquiring enzymes. With the increase of N addition, the activities of the three enzymes first increased and then decreased. The activities of C-acquiring and P-acquiring enzymes were highest under the N3 treatment, while the activity of N-acquiring enzymes was highest under the N2 treatment. (2) The EEA_{CP} and EEA_{NP} of soil extracellular enzymes first increased and then decreased again, reaching the highest under the N3 treatment, while EEA_{CN} first decreased, then increased, and then decreased again, reaching the highest under the N3 treatment. (3) The enzyme vector analysis revealed that the vector angles of the soil in all treatments were greater than 45°, and they first decreased and then increase of the nitrogen addition. (4) Redundancy analysis showed that soil nutrients were the key factors affecting the activities of extracellular enzymes and the stoichiometric ratios of extracellular enzymes. Total phosphorus (TP) had a significant positive correlation with vector length and vector angle (P<0.05). These findings demonstrate that nitrogen deposition enhances soil extracellular enzyme activity, modulates microbial nutrient limitations, and accelerates soil biogeochemical cycling, providing critical scientific evidence for adaptive management of forest ecosystems under climate change.

Key Words: microbial nutrient limitation; soil enzyme activity; enzymatic stoichiometry; nitrogen deposition; volcanic lava platform

近几十年,由于氮肥施用量的增加和化石燃料的消耗使大气氮沉降成为全球性的生态环境问题,我国是 全球氮沉降热点区域之一^[1-2]。氮是陆地生态系统初级生产力最重要的限制因素,氮沉降可能会显著改变生 态系统功能,例如,通过影响土壤养分含量而影响土壤 C,N、P 循环^[3-4]。土壤胞外酶将土壤有机物质(SOM) 等高分子量有机化合物分解和矿化^[5-6]成可被微生物同化利用的分子^[7],促进陆地生态系统生物地球化学循 环^[8]。土壤胞外酶通常对应特定的酶促过程,其中 β-1,4-葡萄糖苷酶 (BG)、β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG)、L-亮氨酸氨肽酶(LAP)和酸性磷酸酶(AP)被认为与微生物获取代谢所需的碳、氮和磷密切相关。 Bai 等^[9]研究发现,添加氮会提高 BG 的活性,并且随着氮添加量的增加,这种影响愈发显著。其它研究表明, 添加氮不仅提高 C-获取酶活性,还会提高参与磷循环的胞外酶 AP 活性^[10-11]。这与资源分配理论机符,在养 分缺乏的情况下,微生物可通过消耗自身的 C 源和能量来合成胞外酶以满足自身的养分需求,这是微生物 维持养分平衡的重要机制^[12-13]。Jing 等^[14]研究发现,添加氮对土壤 C-、N-、P-获取酶活性没有显著的影响, 甚至可能提高温带森林中 NAG 的活性^[15]。因此,添加氮对土壤胞外酶活性的影响并不总是符合资源分配理 论,土壤酶活性对氮添加的响应仍需更多的研究。土壤胞外酶介导微生物对养分的获取,土壤胞外酶化学计 量学则反应了微生物的养分需求^[16-18],结合二者的结果能够更好的理解养分循环及微生物代谢过程中的养 分限制情况^[19-20]。Moorhead 等^[21]提出的酶化学计量的矢量分析方法(矢量长度和矢量角度),评估微生物 的资源分配策略,分析微生物代谢过程中碳和氮(或磷)获取情况。

五大连池新期火山熔岩台地土壤处于发育的初始阶段,养分贫瘠,植被恢复缓慢,微生物体养分维持着相 对脆弱的平衡。探讨该区域土壤-微生物-胞外酶的生态化学计量特征,对理解特殊生态系统的物质循环和生 态功能具有重要意义。本研究以该区域重要的先锋乔木群落-香杨(*Populus koreana*)矮曲林土壤为对象,分析 土壤养分和微生物生物量以及胞外酶的活性特征对外源氮添加的响应,探讨微生物养分获取策略的变化规律 及微生物相对养分限制特征,以期为研究区植被恢复提供参考,并为深入理解大气氮沉降背景下森林生态系 统的土壤碳循环过程提供科学依据。

1 研究区域与研究方法

1.1 研究区概况

研究区位于黑龙江省黑河市西南部,地处小兴安岭西南山麓与松嫩平原的过渡地带。地理位置东经

126°00′—126°45′,北纬 48°30′—48°50′,总面积 988.66 km²。气候类型为温带大陆性季风气候。研究区年均 温-0.5℃,年均降雨量为 476.33 mm。试验地主要植被类型为香杨矮曲林群落。由于五大连池老黑山喷发时 间距今只有 300 年,地表以大面积块状火山熔岩、火山砾、火山渣和火山灰为主,熔岩风化速度缓慢,尚未形成 明显的土壤层次,养分含量低^[22-23]。土壤全碳和全氮含量分别为(6.24±0.18) g/kg 和(0.41±0.05) g/kg,土 壤铵态氮、硝态氮含量和速效磷含量分别为(1.97±0.20)、(0.77±0.08) mg/kg 和(1.56±0.15) mg/kg,土壤 pH 值约为 6.67±0.05。

1.2 样地设置及样品采集

在台地上选择环境条件相对一致的矮曲化香杨群落样地 15个,每块样地面积为 100 m²(10 m×10 m),设 5个处理,分别为 CK(0)、N1(2 g N m⁻² a⁻¹)、N2(4 g N m⁻² a⁻¹)、N3(8 g N m⁻² a⁻¹)、N4(16 g N m⁻² a⁻¹),每个 氮添加水平设置 3 个重复,各样方间隔 10 m 作为缓冲带。氮肥种类为氯化铵,其中 2g N m⁻² a⁻¹为该区域年 均氮沉降量。试验从 2022 年 5 月开始,每年的 5 月—8 月分 4 次进行将氯化铵溶于去离子水中,充分混匀后 均匀喷施到各样地,每次氮肥施用量相同,连续进行 2 年。

1.3 样品采集

2023 年 8 月施肥结束 7 天后,在每个实验处理小区内选取 2 株香杨,在每株植物周围距树干 1 米的距离 均匀设置 4 个采样点,采集 0—20 cm 土壤样品,4 个采样点样品混合后去除大颗粒和残余有机物后过 2 mm 筛,由于该区域土壤发育程度弱,大颗粒比例较高,过筛后对大颗粒进行称重,以便换算土壤基质的实际养分 等的含量。每个实验处理小区采集 2 个样品,共采集土壤样品 30 个,样品充分混合后分为 2 份,其中一份装 入无菌袋中,放入带冰袋的保温箱内,转移到实验室,无菌袋在 4℃保存用于土壤微生物量和酶活性等测定, 实验在 1 周之内完成,第二份样品自然风干用于土壤性质分析。

1.4 土壤性质、微生物量及酶活性测定

参照鲁如坤主编的《土壤农业化学分析方法》进行土壤 pH、含水量及养分因子测定^[24]。采用氯仿熏蒸提 取方法测量微生物量碳(MBC)、微生物生物量氮(MBN)和微生物生物量磷(MBP)^[25-26]。采用标准荧光技 术测定各样地土壤样品中 C、N 和 P 获取酶的活性^[27]。C-获取酶为 β-1,4-葡萄糖苷酶(β-1,4-glucosidase, BG),N 获取酶包括 β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(β-1,4-N-acetylglucosaminidase, NAG)和亮氨酸氨肽酶(Lleucine aminopeptidase, LAP);磷获取酶是酸性磷酸酶(acid phosphatase, AP)。

1.5 数据处理

C-获取酶(BG)、N-获取酶(NAG+LAP)和P-获取酶(AP)的活性比值反映了酶的化学计量比。使用比值 模型判断微生物的养分需求,EEA_{CN}、EEA_{CP}和EEA_{NP}分别表示土壤胞外酶C:N、C:P和N:P比率,计算公式 如下:

$$EEA_{CN} = \ln(BG) / \ln(NAG + LAP)$$
(1)

$$EEA_{CP} = \ln(BG) / \ln(AP)$$
⁽²⁾

$$EEA_{N:P} = \ln(NAG + LAP) / \ln(AP)$$
(3)

在以前的研究中,这些酶(BG、NAG+LAP、AP)已分别用作全球^[28]和区域规模^[20, 29] C-、N-和 P-获取的指 示剂。

使用酶活性的矢量分析模型(Vector analysis,包括矢量长度和矢量角度)^[16, 29-30]判断营养物限制。矢量 分析模型利用对数转换比率计算矢量长度(无单位)和矢量角度(°)。

Vector Length =
$$\sqrt{\left[\ln BG/\ln(\text{NAG}+\text{LAP})\right]^2 + \left(\ln BG/\ln AP\right)^2}$$
 (4)

Vector Angle = Degrees { ATAN2[(
$$\ln BG/\ln AP$$
), ($\ln BG/\ln(NAG+LAP$))] } (5)

相对长的矢量长度表明更大的 C 限制;矢量角是<45°或>45°,分别表明相对程度的 N-限制或 P-限制^[16,29]。该方法的原理是基于化学计量和代谢生态系统理论^[31-33],即微生物通过胞外酶的作用从环境中获取的必须的资源相对受到他们的元素组成和代谢需求的限制^[5]。

1.6 数据统计

所有数据利用 Excel 2019 进行录入、整理,利用 SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)进行统 计分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和邓肯T检验进行不同氮添加水平土壤理化性质、微生物 生物量、土壤胞外酶活性、酶化学计量比、矢量长度和矢量角度变化的差异性分析。利用冗余分析区分不同理 化因子对土壤胞外酶活性和酶化学计量比的相对贡献。土壤胞外酶活性、土壤胞外酶比活性、酶化学计量比、 矢量长度和矢量角度等变化采用 Origin pro 2021 (OriginLab, USA)作图,冗余分析(RDA)采用 Vegan 包和 rdacca.ph 包进行,利用 ggplot2 作图(4.2.2 R Core Team 2022)。

2 结果与分析

2.1 氮添加对土壤性质的影响

不同氮添加处理对土壤 pH、含水量及养分因子均有显著影响(P<0.05)。从表 1 中可以看出,氮添加能 够显著增加土壤 TC、TN、DOC、DON、NH⁺₄-N、NO⁻₃-N 和 SAP 含量, 而 pH 值显著下降。N3 处理 TC、TN 和 DOC 含量最高,与CK相比,TC、TN、DOC含量分别增加了142.9%、96.73%和146.38%。N4处理DON、NH4-N、 NO₃⁻N 和 SAP 含量最高,与 CK 相比, DON、NH₄⁺-N、NO₃⁻N 和 SAP 含量分别增加了 285.50%、1280.45%、217. 03%和1265.38%。pH 值随着氮添加量的增加呈降低的趋势, N4 处理最低, 与其它处理差异显著。MBC、 MBN 和 MBP 含量在 N3 处理达到最大值,显著高于其它处理。MBC 和 MBN 含量随氮添加量的增加呈先升 高后降低的趋势,MBP含量没有规律性的变化。

Table 1 Soli factors and microbial biomass of sample from different nitrogen additional treatments					
土壤变量	氮添加处理 Nitrogen addition treatment				
Soil variables	СК	N1	N2	N3	N4
pH	6.69±0.078a	6.79±0.079a	6.71±0.080a	$6.20{\pm}0.073\mathrm{b}$	$5.83 \pm 0.087 \mathrm{c}$
SM	$0.182{\pm}0.004{\rm c}$	$0.185{\pm}0.004{\rm c}$	$0.186{\pm}0.003{\rm c}$	$0.245 \pm 0.004a$	$0.211 \pm 0.005 \mathrm{b}$
TC/(g/kg)	$9.922{\pm}0.024\mathrm{d}$	$11.420{\pm}0.301\rm{cd}$	$12.223 \pm 0.595 c$	24.102±0.485a	$14.065{\pm}0.898\mathrm{b}$
TN/(g/kg)	$0.672 \pm 0.021 c$	$0.748{\pm}0.033{\rm c}$	$0.670{\pm}0.016{\rm c}$	1.322±0.030a	$0.972 \pm 0.056 \mathrm{b}$
TP/(g/kg)	$2.105 \pm 0.026a$	2.035±0.029a	$1.793 \pm 0.022 c$	$1.862 \pm 0.022 c$	$1.955{\pm}0.031\mathrm{b}$
DOC/(mg/kg)	$38.70 \pm 3.08 \mathrm{c}$	$42.16{\pm}1.42{\rm c}$	$53.43 \pm 3.06 \mathrm{b}$	95.35±1.89a	$52.47{\pm}1.38\mathrm{b}$
DON/(mg/kg)	$15.03{\pm}0.45{\rm d}$	18.31±0.23c	$12.79 \pm 0.49 e$	$29.90{\pm}0.15{\rm b}$	57.94±0.74a
NH_4 -N/(mg/kg)	$3.53 \pm 0.09 \mathrm{e}$	$4.42{\pm}0.05{\rm d}$	$7.83 \pm 0.13 c$	$15.92 \pm 0.22 \mathrm{b}$	48.73±0.61a
$NO_3 - N/(mg/kg)$	$6.40{\pm}0.08{\rm d}$	$8.65{\pm}0.08{\rm c}$	$2.76 \pm 0.21 e$	$13.91 \pm 0.23 \mathrm{b}$	20.29±0.50a
SAP/(mg/kg)	$0.78{\pm}0.01{\rm d}$	$1.25 \pm 0.02 \mathrm{c}$	$1.72\pm0.03c$	$7.20{\pm}0.16{\rm b}$	10.65±0.07a
AK/(mg/kg)	$207.29{\pm}4.76\mathrm{d}$	304.94±8.11c	$302.39 \pm 10.85 c$	$361.22{\pm}15.92\mathrm{b}$	407.85±9.42a
MBC/(mg/kg)	$234.21 \pm 13.76c$	$290.86{\pm}7.83{\rm b}$	$315.65{\pm}3.29\mathrm{b}$	485.01±12.20a	$155.78 {\pm} 4.67 {\rm d}$
MBN/(mg/kg)	$25.18 \pm 0.25 c$	$32.51 \pm 1.12b$	$32.81 \pm 1.49 \mathrm{b}$	56.55±1.52a	$35.14 \pm 1.85 \mathrm{b}$
MBP/(mg/kg)	$4.27{\pm}0.44{\rm cd}$	$4.54{\pm}0.07{\rm c}$	$3.63{\pm}0.10{\rm d}$	15.44±0.33a	5.64 ± 0.13 b

表1 不同氮添加处理土壤因子和微生物量

CK:0 g N m⁻² a⁻¹; N1:2 g N m⁻² a⁻¹; N2:4 g N m⁻² a⁻¹; N3:8 g N m⁻² a⁻¹; N4:16 g N m⁻² a⁻¹; pH:土壤 pH 值 soil pH value; SM:土壤含水量 soil moisture; TC:土壤总碳 total carbon; TN:土壤总氮 total nitrogen; TP:土壤总磷 total phosphorus; DOC: 溶解性碳 dissolved organic carbon; DON: 溶 解性氮 dissolved organic nitrogen;NH4-N:铵态氮 ammonium nitrogen;NO3-N:硝态氮 nitrate nitrogen;SAP:速效磷 available phosphorus;AK:速效钾 available potassium; MBC:微生物量碳 microbial biomass carbon; MBN:微生物量氮 microbial biomass nitrogen; MBP:微生物量磷 microbial biomass phosphorus:不同小写字母表示不同氮添加处理差异显著(P<0.05)

2.2 氮添加对土壤胞外酶活性及酶化学计量特征的影响

不同氮添加处理土壤 C-、N-、P-获取酶活性均存在显著差异(P < 0.05, 图 1),三类酶活性随着氮添加量 的增加呈先上升后下降的趋势。N3处理 C-获取酶活性和 P-获取酶活性最高,显著高于 CK 和 N1处理。与 CK相比,N3处理 C-获取酶活性和 P-获取酶活性增加了 108.56%和 76.71%。N2处理 N-获取酶活性显著高

于其它处理,与CK相比,N2处理N-获取酶活性增加了103.62%。

不同氮添加处理土壤胞外酶化学计量比存在显著差异(图1)。随着氮添加量的增加, EEA_{CP}和EEA_{NP}呈 先上升后下降的趋势,均在 N2 达到最高;且 EEA_{CP}和 EEA_{NP}均<1,说明相比 N-获取酶和 C-获取酶,土壤微 生物倾向于投资更高的 P-获取酶。随着氮添加量的增加, EEA_{CN}呈先降低后增加再降低的趋势,在 N3 达到 最大,且只有 CK 和 N3 处理 EEA_{CN}>1,说明低浓度的氮添加使微生物倾向于投资 N-获取酶,达到一定阈值 后,投资到 N-获取酶的能量减少。





Fig.1 Soil extracellular enzyme activity and enzymatic stoichiometric ratios among nitrogen addition treatments

CK:0gNm⁻²a⁻¹;N1:2gNm⁻²a⁻¹;N2:4gNm⁻²a⁻¹;N3:8gNm⁻²a⁻¹;N4:16gNm⁻²a⁻¹;BG:β-1,4-葡萄糖苷酶β-1,4-glucosidase;NAG: β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶β-1,4-N-acetylglucosaminidase;LAP:亮氨酸氨肽酶L-leucine aminopeptidase;AP:酸性磷酸酶 acid phosphatase; EEA_{CN}:碳获取酶活性的自然对数与氮获取酶活性的自然对数的比值ln(BG)/ln(NAG+LAP);EEA_{CP}:碳获取酶活性的自然对数与磷获取 酶活性的自然对数的比值ln(BG)/ln(AP);EEA_{NP}:氮获取酶活性的自然对数与/磷获取酶活性的自然对数的比值ln(NAG+LAP)/ln(AP)

2.2 氮添加对微生物养分限制特征的影响

通过 SMA 回归分析不同氮添加处理下土壤胞外酶化学计量比,结果表明,C-、N-和 P-获取酶化学计量比 之间存在显著的线性相关关系(图 2)。C-获取酶和 N-获取酶活性回归的斜率为 0.788,C-获取酶和 P-磷获取 酶活性回归的斜率为 1.068,N-获取酶和 P-获取酶活性回归的斜率为 0.847。

通过土壤酶化学计量的矢量特征分析微生物代谢的养分限制(图3),结果发现,所有的数据点均分布在 1:1 对角线的上方,表明本研究区域微生物群落处于磷限制。氮添加对矢量长度和矢量角度均有显著影响 (P<0.05),N3处理矢量长度显著大于其它氮添加处理,说明N3处理提高了微生物C限制的程度,而其它处 理间差异不显著;所有处理的矢量角度均大于45°,表明不同氮添加处理土壤微生物原生环境中的微生物代 谢受到P的限制,且矢量角度呈现先减小后增大的趋势,N2处理最小(47.2°),说明适当的氮添加可以缓解微 生物代谢的磷限制,而过量的氮添加会再次增加微生物代谢的磷限制。

2.3 影响土壤胞外酶活性和酶化学计量比的主要因子

将土壤胞外酶活性和酶化学计量比作为响应变量,土壤理化性质作为解释变量进行冗余分析(图4)。前 2个排序轴共解释了93.13%的土壤酶活性总变异,除 MBC 以外的所有土壤因子均显著影响土壤胞外酶活性





Fig.2 Standardized major axis regressions three soil extracellular enzymatic stoichiometric ratios



图 3 不同氮添加处理土壤的 C、N、P 胞外酶活性的相对计量关系、矢量角度和矢量长度

Fig.3 Extracellular enzyme stoichiometry of the relative proportions of C to N acquisition versus C to P acquisition, the variation of vector angle and length

(P<0.05)。对于酶化学计量比来说,前两轴分别解释总变异的 95.93% 和 3.72%, SM、TC、TN、DOC、AP 和 MBP 是影响土壤胞外酶化学计量比的关键因子。

SM、TC、TN、TP和DOC与C-获取酶、P-获取酶和矢量长度呈显著正相关关系(P<0.01)。TP与N-获取酶和矢量角度呈显著正相关(P<0.01),NO₃-N与矢量角度也存在一定的相关性(P<0.05)(图5)。



图 4 土壤酶活性(左)、酶化学计量(右)与土壤环境因子的冗余分析

Fig.4 Results of redundancy analysis (RDA) explained by factors for extracellular enzyme activities and (left) enzymatic stoichiometric ratios (right)

pH:土壤 pH 值 soil pH value; SM:土壤含水量 soil moisture; TC:土壤总碳 total carbon; TN:土壤总氮 total nitrogen; TP:土壤总磷 total phosphorus; DOC:溶解性碳 dissolved organic carbon; DON:溶解性氮 dissolved organic nitrogen; NH₄-N:铵态氮 ammonium nitrogen; NO₃-N:硝态 氮 nitrate nitrogen; SAP:速效磷 available phosphorus; AK:速效钾 available potassium; MBC:微生物量碳 microbial biomass carbon; MBN:微生物 量氮 microbial biomass nitrogen; MBP:微生物量磷 microbial biomass phosphorus



图 5 土壤胞外酶活性和微生物养分限制与土壤环境因子的 Mantel 检验分析

Fig.5 Extracellular enzyme activities and microbial nutrient limitation were related to each environmental factor by partial Mantel tests

3 讨论

3.1 氮添加对土壤胞外酶活性的影响

外源氮输入对土壤微生物的代谢活动具有显著的影响^[34-35]。土壤微生物通过分泌胞外酶以获取所需要的资源,而这一过程高度依赖环境中营养物质的可利用程度^[36-37],并且当某种易获取资源充足时减少相应获

取酶的产生^[31]。C-和 P-获取酶的活性对于氮添加具有正反馈,因为外源氮输入消除了微生物对氮的需求抑制同时可能增加了对碳和磷的相对需求^[12],打破原有碳、氮和磷等土壤有效养分的均衡,使植物养分吸收和微生物代谢过程养分限制程度发生变化,从而影响生态系统养分循环过程^[38]。诸多研究针对氮添加土壤胞外酶活性的响应展开探讨,研究结果存在显著的差异^[39,40-42]。例如,在氮肥作用下,有的研究表明 BG 活性呈上升趋势^[43-45],也有研究指出其活性无显著变化^[46],还有研究显示 BG 活性降低^[47]。氮添加对 NAG 活性因研究地点而异,变化幅度从提升 14%到降低 24%不等^[43,48]。氮添加普遍认为会刺激 AP 活性^[49]。一项基于农业采样点的 meta 分析表明,氮肥显著提高了 BG 活性,但对蛋白酶、AP 和脲酶无显著影响^[41]。也有研究认为添加氮对 C-获取酶(BG)和 P-获取酶(AP)具有积极影响^[50-53]是由于添加氮微生物生长加速,对磷的需求相应增加,促使其分泌更多的磷酸酶以获取磷。在本研究中,CK 处理的土壤养分含量显著低于氮添加处理(表1)。五大连池新期火山熔岩台地土壤本身的养分匮乏,可能是导致根系分泌物以及根系周转过程中碳有效性受限的根本原因。在这样的资源受限环境下,微生物合成胞外酶的能力显著下降,进而对土壤胞外酶活性产生了明显的制约作用^[17,54]。相比之下,氮添加处理有力地促进了植物根系的发育以及生物量的积累。植物通过地上凋落物和地下根系残体等形式,为土壤胞外酶的合成提供了更为丰富的微生物可利用资源^[55]。这一资源供给的增加,显著提升了 C-获取酶、N-获取酶和 P-获取酶的活性(图 1)。

本研究中,土壤因子是 C-、N-、P-获取酶活性的主要驱动因素(图 4),这与 Kivlin 和 Treseder^[56]的研究结 论相似,表明在全球尺度和区域尺度上,土壤的物理化学性质,如含水量、碳、氮、磷总量和有效养分可能通过 改变土壤微生物的组成和活性,影响胞外酶的分泌。大多数情况下,微生物对碳、氮、磷的利用取决于土壤中 碳和养分元素的总量。养分的有效性则通过改变底物和能量供应,对胞外酶分泌产生更为直接的影响[35]。 酶活性增强是对环境中养分有效性较低的一种响应,例如,在低磷土壤中,土壤微生物可通过增加磷获取酶的 分泌满足自身对磷的需求。本研究中,相对于 CK 处理,N4 处理胞外酶活性增加幅度有限,甚至在部分情况 下出现了酶活性被抑制的情况(图1)。这一现象可能源于过量的氮素添加对土壤理化性质的改变,尤其是土 壤 pH 显著降低。土壤酸碱度的急剧变化,会干扰酶的活性位点与底物的结合能力,进而对胞外酶活性产生 负面影响^[57-58]。但本研究中, pH 与土壤 C-获取酶、N-获取酶和 P-获取酶活性并未出现显著的相关性(图 5),这可能是外源氮添加显著增加土壤中养分的可利用性,在一定程度上缓解了 pH 值降低对酶活性的抑制 影响,使得 pH 值与土壤胞外酶活性之间的相关性减弱。作为关键的土壤物理性质之一,土壤湿度对胞外酶 活性有着显著作用。适宜的土壤湿度为土壤微生物提供了良好的生存环境,促进微生物的生长与繁殖,进而 影响胞外酶的合成与分泌。例如,在湿润的土壤条件下,微生物活动更为活跃,能够分泌更多的胞外酶用于分 解土壤中的有机物质,以获取生长所需的养分。研究表明,土壤湿度的增加有助于提高参与碳、氮、磷循环的 胞外酶活性,如 BG、NAG 和 AP 等^[57-58]。这是因为适宜的水分条件有利于底物和酶之间的接触,增强了酶促 反应的效率。同时,土壤湿度还可能影响酶的稳定性和扩散速率,间接影响胞外酶活性。

3.2 氮添加对土壤酶化学计量学指示的微生物养分限制的影响

微生物胞外酶作为细胞代谢活动的直接产物,其产生与分泌过程与环境中的营养物质可获取性密切相关。微生物胞外酶活性是连接生态代谢理论与生态化学计量理论的关键桥梁,成为理解生态系统物质循环与能量流动的核心纽带^[19]。基于微生物胞外酶活性比率和化学计量稳态原理,即生物体为维持正常代谢,各元素需保持相对稳定的比例关系,土壤胞外酶活性化学计量学已逐渐发展为预测环境中养分可利用性及微生物代谢动态变化的重要工具^[21,59]。

在不同生态系统中,微生物代谢所面临的养分限制存在显著差异,但也遵循一定的规律。例如,在高度风化的热带生态系统和温带森林生态系统中,土壤微生物的代谢活动通常受磷限制^[57,60]。Cui 等人^[61]在荒漠草原的研究以及 Wang 等人^[62]对中国西北沙漠(该地区水土流失严重,养分极度匮乏)的研究均表明,这些特殊生态环境下,微生物代谢同时受到氮和磷的共同限制。而 Rosinger 等人^[6]的研究则发现,亚热带草原土壤微生物的生长与代谢受到磷、碳和氮的协同限制。此外,在草地恢复过程中,微生物的养分限制模式呈现出从

磷限制向氮限制转变的动态过程^[63]。由此可见,微生物代谢的养分限制不仅在同一生态系统内因环境条件 不同而有所差异,在不同生态系统之间也可能面临相同的养分限制。

尽管目前在区域和生态系统尺度上,关于微生物代谢限制的研究逐渐增多^[6,57,60,62],但对于同一生态系统中,不同程度的外源氮添加如何影响微生物代谢限制特征,以及这些变化背后的驱动因素,相关研究仍显不足,亟待进一步探索。已有研究表明,氮添加会显著改变土壤胞外酶的化学计量特征^[64]。在本研究中,低氮处理(N1和N2)降低了 EEA_{cN},而高氮处理(N3和N4)则使其增加,EEA_{cP}和 EEA_{NP}的变化趋势则相反(图1)。这表明,在低氮添加条件下,微生物对 N-获取酶的投入高于 C-获取酶,微生物代谢的氮限制并未得到根本缓解。同时,微生物对 P-获取酶的投入相对较低。尽管氮添加提升了土壤中 C-、N-和 P-获取酶的活性,但在外源氮添加有限的情况下,土壤养分状况的改善首先缓解了微生物对碳和氮的限制。在 N3 处理中,N-获取酶的投入低于 C-和 P-获取酶,表明此氮添加量下,微生物代谢的氮限制显著改善,但磷限制开始显现。而在 N4 处理中,微生物对 P-获取酶的投入显著增加,可能是由于过量氮输入打破了土壤中氮和磷的平衡,微生物为维持化学计量稳定性,增加了对磷的需求^[32]。由于土壤中磷的可用性有限,最终导致微生物的磷限制加剧。这一结果与以往研究^[16,29,64]一致,即微生物代谢受磷限制时,其分泌的磷获取酶增加,促进有机质中磷的释放,从而缓解磷限制^[65]。

根据已有研究,较长的矢量长度表明碳限制较强,而矢量角度小于 45°或大于 45°分别表示氮限制或磷限 制^[16,29]。本研究中,N-获取酶和 P-获取酶的回归方程斜率小于 1(图 2),且所有处理的矢量角均大于 45°(图 3),表明香杨矮曲林原生环境中的土壤微生物代谢受磷限制。低氮添加缓解了微生物代谢的磷限制,而高氮 添加则加剧了磷的相对缺乏(图 3)。通常认为,温带森林生态系统受氮限制,热带森林生态系统受磷限 制^[58]。Shen 等人^[66]的研究表明,东北地区森林土壤微生物代谢普遍受磷限制,本研究结果支持了这一观 点^[58-59],表明磷限制是森林生态系统土壤微生物代谢的普遍现象。本研究中土壤氮磷含量均较低,矢量模型 分析表明香杨矮曲林土壤微生物受磷限制,但结合香杨的生长状况及土壤有效氮和磷含量(表 1),我们认为 其可能同时受氮和磷的共同限制,且磷的限制作用更强。

氮添加处理增加了土壤中养分的可利用性,同时植物根系和地上部分生物量的增加进一步改善了土壤养 分环境。因此,低氮添加缓解了磷限制。然而,高氮添加(N4)使磷限制恢复到试验初期水平甚至加剧。氮添 加导致的磷限制加剧可能由氮磷需求与输入之间的不平衡驱动。氮添加引发的磷需求增加可能与植物^[38,67] 和土壤微生物^[61,68]的化学计量稳态有关。然而,土壤中的磷主要以长期或缓释状态存在,如大分子有机物或 被土壤吸附的螯合物,需通过微生物胞外酶的作用转化为可被吸收的矿质离子或小分子^[69–70],这一过程受土 壤中碳和氮累积的影响^[71]。大量氮输入增加了植物凋落物和分泌物,与对照(CK)相比,不同氮添加处理下 土壤溶解性有机碳(DOC)含量显著增加(表1),微生物大量繁殖,土壤胞外酶活性增强(图1),表明土壤微生 物代谢仍处于养分限制状态^[72]。更大的群落生物量可能为土壤输入更多可利用资源,增加土壤碳和氮含量, 但土壤有效磷的增加量相对较少。同时,磷的输入途径单一且具有滞后性^[73],加剧了养分需求与输入的不平 衡^[74]。植物和微生物为维持体内化学计量平衡,加剧了对磷的竞争,进一步增加了土壤微生物对磷的需求。 因此,过量氮添加会重新加剧磷限制。Heuck 等人^[75]的研究也表明,氮沉降可能导致全球森林生态系统的磷 限制,原因在于氮素持续输入打破了土壤有效化学元素的计量平衡,进而改变微生物代谢的养分获取策略和 化学计量关系^[19,61]。

本研究揭示了同一生态系统中外源氮添加对微生物代谢限制特征的影响,发现森林生态系统对持续氮输 入的响应可能是非线性的。这一结果不仅为深入理解生态系统中植物、微生物和土壤的协同变化提供了关键 依据^[65],也为应对氮沉降增加的趋势提供了重要参考,有助于推动生态系统的可持续管理和科学发展。

4 结论

(1)短期氮添加显著提升了土壤 C-、N-、P-获取酶的活性,随着氮添加量的增多,酶活性呈先升高后降低

的趋势,8gNm⁻²a⁻¹处理C-获取酶活性和P-获取酶活性最高,4gNm⁻²a⁻¹处理N-获取酶活性最高。

(2)通过酶化学计量比发现,EEA_{CP}和 EEA_{NP}均<1,土壤微生物倾向于投资更高的 P-获取酶;EEA_{CN}>1,则说明低浓度的氮添加使微生物倾向于投资 N-获取酶,达到一定阈值后,投资到 N-获取酶的能量减少。

(3) 矢量分析结果表明,五大连池新期火山台地土壤微生物群落处于磷限制(矢量角度均大于45°),适当的氮添加可以缓解微生物代谢的磷限制,而过量的氮添加会再次增加微生物代谢的磷限制。

(4) TC 和 TN 等土壤养分是影响不同氮添加处理胞外酶活性和酶化学计量比变化的主要调控因子。

参考文献(References):

- [1] Vet R, Artz R S, Carou S, Shaw M, Ro C U, Aas W, Baker A, Bowersox V C, Dentener F, Galy-Lacaux C, Hou A, Pienaar J J, Gillett R, Forti M C, Gromov S, Hara H, Khodzher T, Mahowald N M, Nickovic S, Rao P S P, Reid N W. A global assessment of precipitation chemistry and deposition of sulfur, nitrogen, sea salt, base cations, organic acids, acidity and pH, and phosphorus. Atmospheric Environment, 2014, 93: 3-100.
- [2] Wang R, Goll D, Balkanski Y, Hauglustaine D, Boucher O, Ciais P, Janssens I, Penuelas J, Guenet B, Sardans J, Bopp L, Vuichard N, Zhou F, Li B G, Piao S L, Peng S S, Huang Y, Tao S. Global forest carbon uptake due to nitrogen and phosphorus deposition from 1850 to 2100. Global Change Biology, 2017, 23(11): 4854-4872.
- [3] Lu X K, Vitousek P M, Mao Q G, Gilliam F S, Luo Y Q, Turner B L, Zhou G Y, Mo J M. Nitrogen deposition accelerates soil carbon sequestration in tropical forests. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(16): e2020790118.
- [4] Lu X K, Mao Q G, Mo J M, Gilliam F S, Zhou G Y, Luo Y Q, Zhang W, Huang J. Divergent responses of soil buffering capacity to long-term N deposition in three typical tropical forests with different land-use history. Environmental Science & Technology, 2015, 49(7): 4072-4080.
- [5] Liu Q Y, Xu X L, Wang H M, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. Dominant extracellular enzymes in priming of SOM decomposition depend on temperature. Geoderma, 2019, 343: 187-195.
- [6] Rosinger C, Rousk J, Sandén H. Can enzymatic stoichiometry be used to determine growth-limiting nutrients for microorganisms? -A critical assessment in two subtropical soils. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 128: 115-126.
- [7] Lalanne J B, Taggart J C, Guo M S, Herzel L, Schieler A, Li G W. Evolutionary convergence of pathway-specific enzyme expression stoichiometry. Cell, 2018, 173(3): 749-761.e38.
- [8] López-Aizpún M, Arango-Mora C, Santamaría C, Lasheras E, Santamaría J M, Ciganda V S, Cúrdenas L M, Elustondo D. Atmospheric ammonia concentration modulates soil enzyme and microbial activity in an oak forest affecting soil microbial biomass. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 116: 378-387.
- [9] Bai Y F, Wu J G, Clark C M, Naeem S, Pan Q M, Huang J H, Zhang L X, Han X G. Tradeoffs and thresholds in the effects of nitrogen addition on biodiversity and ecosystem functioning: evidence from Inner Mongolia Grasslands. Global Change Biology, 2010, 16(1): 358-372.
- [10] Fan Y X, Yang L M, Zhong X J, Yang Z J, Lin Y Y, Guo J F, Chen G S, Yang Y S. N addition increased microbial residual carbon by altering soil P availability and microbial composition in a subtropical *Castanopsis* forest. Geoderma, 2020, 375: 114470.
- [11] Wang C L, Shi B K, Sun W, Guan Q C. Different forms and rates of nitrogen addition show variable effects on the soil hydrolytic enzyme activities in a meadow steppe. Soil Research, 2020, 58(3): 258.
- [12] Sinsabaugh R L, Follstad Shah J J. Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2012, 43: 313-343.
- [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] 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. Science of the Total Environment, 2017, 607: 806-815.
- [15] Zuccarini P, Asensio D, Ogaya R, Sardans J, Peñuelas J. Effects of seasonal and decadal warming on soil enzymatic activity in a P-deficient Mediterranean shrubland. Global Change Biology, 2020, 26(6): 3698-3714.
- [16] Cui Y X, Bing H J, Fang L C, Jiang M, Shen G T, Yu J L, Wang X, Zhu H, Wu Y H, Zhang X C. Extracellular enzyme stoichiometry reveals the carbon and phosphorus limitations of microbial metabolisms in the rhizosphere and bulk soils in alpine ecosystems. Plant and Soil, 2021, 458 (1): 7-20.
- [17] Li J W, Shangguan Z P, Deng L. Dynamics of soil microbial metabolic activity during grassland succession after farmland abandonment. Geoderma, 2020, 363; 114167.
- [18] Zhou L H, Liu S S, Shen H H, Zhao M Y, Xu L C, Xing A J, Fang J Y. Soil extracellular enzyme activity and stoichiometry in China's forests. Functional Ecology, 2020, 34(7): 1461-1471.
- [19] Sinsabaugh R L, Hill B H, Follstad Shah J J. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. Nature, 2009, 462(7274): 795-798.
- [20] Peng X Q, Wang W. Stoichiometry of soil extracellular enzyme activity along a climatic transect in temperate grasslands of northern China. Soil

Biology and Biochemistry, 2016, 98: 74-84.

- [21] Moorhead D L, Sinsabaugh R L, Hill B H, Weintraub M N. Vector analysis of ecoenzyme activities reveal constraints on coupled C, N and P dynamics. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 93: 1-7.
- [22] 曹宏杰,王立民,徐明怡,黄庆阳,罗春雨,谢立红,倪红伟.五大连池新期火山熔岩台地不同植被类型土壤微生物量及酶活性变化特征.中南林业科技大学学报,2019,39(11):88-97.
- [23] 黄庆阳,曹宏杰,谢立红,罗春雨,杨帆,王立民,倪红伟.五大连池火山熔岩台地草本层物种多样性及环境解释.生物多样性,2020, 28(6):658-667.
- [24] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000.
- [25] Hedley M J, Stewart J W B. Method to measure microbial phosphate in soils. Soil Biology and Biochemistry, 1982, 14(4): 377-385.
- [26] 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.
- [27] Megan Steinweg J, Dukes J S, Paul E A, Wallenstein M D. Microbial responses to multi-factor climate change: effects on soil enzymes. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 146.
- [28] 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.
- [29] 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(5): 1400-1409.
- [30] Moorhead D L, Rinkes Z L, Sinsabaugh R L, Weintraub M N. Dynamic relationships between microbial biomass, respiration, inorganic nutrients and enzyme activities; informing enzyme-based decomposition models. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 223.
- [31] Allison S D, Wallenstein M D, Bradford M A. Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. Nature Geoscience, 2010, 3: 336-340.
- [32] Sterner R W, Elser J J. Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere. Princeton, NJ: Princeton University Press, 2003.
- [33] Gillooly J F, Allen A P, Brown J H, Elser J J, del Rio C M, Savage V M, West G B, Woodruff W H, Woods H A. The metabolic basis of wholeorganism RNA and phosphorus content. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (33): 11923-11927.
- [34] Carrara J E, Walter C A, Hawkins J S, Peterjohn W T, Averill C, Brzostek E R. Interactions among plants, bacteria, and fungi reduce extracellular enzyme activities under long-term N fertilization. Global Change Biology, 2018, 24(6): 2721-2734.
- [35] Riggs C E, Hobbie S E. Mechanisms driving the soil organic matter decomposition response to nitrogen enrichment in grassland soils. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 99: 54-65.
- [36] Caldwell B A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. Pedobiologia, 2005, 49(6): 637-644.
- [37] Cenini V L, Fornara D A, McMullan G, Ternan N, Carolan R, Crawley M J, Clément J C, Lavorel S. Linkages between extracellular enzyme activities and the carbon and nitrogen content of grassland soils. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 96: 198-206.
- [38] Peñuelas J, Poulter B, Sardans J, Ciais P, van der Velde M, Bopp L, Boucher O, Godderis Y, Hinsinger P, Llusia J, Nardin E, Vicca S, Obersteiner M, Janssens I A. Human-induced nitrogen-phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. Nature Communications, 2013, 4: 2934.
- [39] Burns R G, DeForest J L, Marxsen J, Sinsabaugh R L, Stromberger M E, Wallenstein M D, Weintraub M N, Zoppini A. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 58: 216-234.
- [40] Henry H A L. Reprint of "Soil extracellular enzyme dynamics in a changing climate". Soil Biology and Biochemistry, 2013, 56: 53-59.
- [41] Geisseler D, Scow K M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms: A review. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 75: 54-63.
 [42] Sinsabaugh R L, Belnap J, Findlay S G, Shah J J F, Hill B H, Kuehn K A, Kuske C R, Litvak M E, Martinez N G, Moorhead D L, Warnock D
- D. Extracellular enzyme kinetics scale with resource availability. Biogeochemistry, 2014, 121(2): 287-304.
- [43] Saiya-Cork K R, Sinsabaugh R L, Zak D R. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an Acer saccharum forest soil. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(9): 1309-1315.
- [44] Waldrop M P, Firestone M K. Altered utilization patterns of young and old soil C by microorganisms caused by temperature shifts and N additions. Biogeochemistry, 2004, 67(2): 235-248.
- [45] Sinsabaugh R L, Gallo M E, Lauber C, Waldrop M P, Zak D R. Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. Biogeochemistry, 2005, 75(2): 201-215.
- [46] Zeglin L H, Stursova M, Sinsabaugh R L, Collins S L. Microbial responses to nitrogen addition in three contrasting grassland ecosystems. Oecologia, 2007, 154(2): 349-359.
- [47] Ramirez K S, Craine J M, Fierer N. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. Global Change Biology, 2012, 18(6): 1918-1927.
- [48] Billings S A, Ziegler S E. Altered patterns of soil carbon substrate usage and heterotrophic respiration in a pine forest with elevated CO₂ and N fertilization. Global Change Biology, 2008, 14(5): 1025-1036.
- [49] Marklein A R, Houlton B Z. Nitrogen inputs accelerate phosphorus cycling rates across a wide variety of terrestrial ecosystems. New Phytologist,

2012, 193(3): 696-704.

- [50] Yang Y, Fang H J, Cheng S L, Xu L J, Lu M Z, Guo Y F, Li Y N, Zhou Y. Soil enzyme activity regulates the response of soil C fluxes to N fertilization in a temperate cultivated grassland. Atmosphere, 2022, 13(5): 777.
- [51] 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.
- [52] Eivazi F, Tabatabai M A. Phosphatases in soils. Soil Biology and Biochemistry, 1977, 9(3): 167-172.
- [53] Cheng S L, Wang L, Fang H J, Yu G R, Yang X M, Li X Y, Si G Y, Geng J, He S, Yu G X. Nonlinear responses of soil nitrous oxide emission to multi-level nitrogen enrichment in a temperate needle-broadleaved mixed forest in NorthEast China. Catena, 2016, 147: 556-563.
- [54] Liu H Y, Mi Z R, Lin L, Wang Y H, Zhang Z H, Zhang F W, Wang H, Liu L L, Zhu B, Cao G M, Zhao X Q, Sanders N J, Classen A T, Reich P B, He J S. Shifting plant species composition in response to climate change stabilizes grassland primary production. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(16): 4051-4056.
- [55] Zhang W, Xu Y D, Gao D X, Wang X, Liu W C, Deng J, Han X H, Yang G H, Feng Y Z, Ren G X. Ecoenzymatic stoichiometry and nutrient dynamics along a revegetation chronosequence in the soils of abandoned land and *Robinia pseudoacacia* plantation on the Loess Plateau, China. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 134: 1-14.
- [56] Kivlin S N, Treseder K K. Soil extracellular enzyme activities correspond with abiotic factors more than fungal community composition. Biogeochemistry, 2014, 117(1): 23-37.
- [57] 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.
- [58] A'Bear A D, Jones T H, Kandeler E, Boddy L. Interactive effects of temperature and soil moisture on fungal-mediated wood decomposition and extracellular enzyme activity. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 70: 151-158.
- [59] Liu J B, Chen J, Chen G S, Guo J F, Li Y Q. Enzyme stoichiometry indicates the variation of microbial nutrient requirements at different soil depths in subtropical forests. PLoS One, 2020, 15(2): e0220599.
- [60] Cui H, Ou Y, Lv D A, Wang L X, Liang A Z, Yan B X, Li Y X. Aggregate-related microbial communities and nutrient stoichiometry under different croplands. Ecological Processes, 2020, 9(1): 33.
- [61] Cui Y X, Fang L C, Guo X B, Wang X, Zhang Y J, Li P F, Zhang X C. Ecoenzymatic stoichiometry and microbial nutrient limitation in rhizosphere soil in the arid area of the northern Loess Plateau, China. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 116: 11-21.
- [62] Wang C, Yang Q N, Zhang C, Zhang X L, Chen J, Liu K X. Vegetation restoration of abandoned cropland improves soil ecosystem multifunctionality through alleviating nitrogen-limitation in the China Danxia. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1116179.
- [63] Yang Y, Liang C, Wang Y Q, Cheng H, An S S, Chang S X. Soil extracellular enzyme stoichiometry reflects the shift from P- to N-limitation of microorganisms with grassland restoration. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 149: 107928.
- [64] Liu X J, Zhang Y, Han W X, Tang A H, Shen J L, Cui Z L, Vitousek P, Erisman J W, Goulding K, Christie P, Fangmeier A, Zhang F S. Enhanced nitrogen deposition over China. Nature, 2013, 494(7438): 459-462.
- [65] 张英,张常洪,汪其同,朱晓敏,尹华军. 氮沉降下西南山地针叶林根际和非根际土壤微生物养分限制特征差异. 植物生态学报, 2022, 46(4):473-483.
- [66] Shen F Y, Liu N, Shan C F, Ji L, Wang M W, Wang Y J, Yang L X. Soil extracellular enzyme stoichiometry reveals the increased P limitation of microbial metabolism after the mixed cultivation of Korean pine and Manchurian walnut in NorthEast China. European Journal of Soil Biology, 2023, 118: 103539.
- [67] Elser J J, Fagan W F, Kerkhoff A J, Swenson N G, Enquist B J. Biological stoichiometry of plant production: metabolism, scaling and ecological response to global change. New Phytologist, 2010, 186(3): 593-608.
- [68] Cleveland C C, Liptzin D. C: N: P stoichiometry in soil: is there a "redfield ratio" for the microbial biomass? Biogeochemistry, 2007, 85(3): 235-252.
- [69] Richardson A E, Barea J M, McNeill A M, Prigent-Combaret C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant and Soil, 2009, 321(1): 305-339.
- [70] Bell C, Carrillo Y, Boot C M, Rocca J D, Pendall E, Wallenstein M D. Rhizosphere stoichiometry: are C: N: P ratios of plants, soils, and enzymes conserved at the plant species-level? New Phytologist, 2014, 201(2): 505-517.
- [71] Zhu J, Li M, Whelan M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: a review. Science of the Total Environment, 2018, 612: 522-537.
- [72] Kuzyakov Y. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2002, 165(4): 382-396.
- [73] Mahowald N, Jickells T D, Baker A R, Artaxo P, Benitez-Nelson C R, Bergametti G, Bond T C, Chen Y, Cohen D D, Herut B, Kubilay N, Losno R, Luo C, Maenhaut W, McGee K A, Okin G S, Siefert R L, Tsukuda S. Global distribution of atmospheric phosphorus sources, concentrations and deposition rates, and anthropogenic impacts. Global Biogeochemical Cycles, 2008, 22(4): 2008GB003240.
- [74] Dong C C, Wang W, Liu H Y, Xu X T, Zeng H. Temperate grassland shifted from nitrogen to phosphorus limitation induced by degradation and nitrogen deposition: Evidence from soil extracellular enzyme stoichiometry. Ecological Indicators, 2019, 101: 453-464.
- [75] Heuck C, Smolka G, Whalen E D, Frey S, Gundersen P, Moldan F, Fernandez I J, Spohn M. Effects of long-term nitrogen addition on phosphorus cycling in organic soil horizons of temperate forests. Biogeochemistry, 2018, 141(2): 167-181.