

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.06.013

引用格式:祝文知,罗珠珠,李亮亮,等.氮磷添加缓解了紫花苜蓿土壤微生物养分限制[J].草地学报,2026,34(6):2099—2108

ZHU Wen-zhi, LUO Zhu-zhu, LI Liang-liang, et al. Nitrogen and Phosphorus Addition Alleviated Soil Microbial Nutrient Limitation in Alfalfa Fields[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(6):2099—2108

氮磷添加缓解了紫花苜蓿土壤微生物养分限制

祝文知¹, 罗珠珠^{1,2*}, 李亮亮³, 何仁元⁴, 刘家鹤¹

(1. 甘肃农业大学资源与环境学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 省部共建干旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730070;

3. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070; 4. 甘肃农业大学林学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:本研究以黄土丘陵区紫花苜蓿地为研究对象,设置不施肥(CK)、单施氮肥(T1)、单施磷肥(T2)和氮磷肥配施(T3)4个处理,通过分析氮磷添加下紫花苜蓿土壤-微生物-胞外酶生态化学计量特征,探讨土壤养分限制特征及微生物对代谢限制的反馈机制。结果表明,施肥降低了土壤碳磷比、微生物量碳磷比(MBC:MBP)、微生物量氮磷比(MBN:MBP)和酶化学计量碳氮比($EEA_{C:N}$),但增加了土壤养分含量、微生物量、胞外酶活性和酶化学计量氮磷比($EEA_{N:P}$)。酶向量模型和矢量分析结果表明,长期种植苜蓿土壤微生物受到不同程度的碳限制和磷限制,氮磷添加缓解了土壤微生物磷限制,提高了微生物碳利用效率(CUE)。综上,黄土丘陵区长期种植苜蓿土壤应适当补施氮磷肥,以缓解土壤微生物的养分限制。

关键词:黄土丘陵;胞外酶;微生物养分限制;碳利用效率

中图分类号:S151.9+4

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)06-2099-10

Nitrogen and Phosphorus Addition Alleviated Soil Microbial Nutrient Limitation in Alfalfa Fields

ZHU Wen-zhi¹, LUO Zhu-zhu^{1,2*}, LI Liang-liang³, HE Ren-yuan⁴, LIU Jia-he¹

(1. College of Resources and Environment, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu Province 730070, China; 2. State Key Laboratory of Arid Habitat Crop Science, Lanzhou, Gansu Province 730070, China; 3. College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu Province 730070, China; 4. College of Forestry, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu Province 730070, China)

Abstract: This study focused on alfalfa fields in the Loess hilly region as research objects, with four experimental treatments were established: no fertilization (CK), nitrogen fertilizer alone (T1), phosphorus fertilizer alone (T2), and combined nitrogen-phosphorus fertilization (T3). By examining the ecological stoichiometry of soil-microbe-extracellular enzyme systems under nitrogen and phosphorus addition, this research explored the characteristics of soil nutrient limitations and the feedback mechanisms of microbial communities to metabolic constraints. The results showed that fertilization significantly decreased soil carbon to phosphorus ratio, microbial biomass carbon to phosphorus ratio (MBC:MBP), microbial biomass nitrogen to phosphorus ratio (MBN:MBP), and enzymatic stoichiometric carbon to nitrogen ratio ($EEA_{C:N}$). In contrast, soil nutrient content, microbial biomass, extracellular enzyme activities, and enzymatic stoichiometric nitrogen to phosphorus ratio ($EEA_{N:P}$) were significantly increased. Enzyme vector modeling and vector analysis indicated that long-term alfalfa cultivation led to varying degrees of carbon and phosphorus limitation in soil microorganisms. Nitrogen and phosphorus addition alleviated the microbial phosphorus limitation and increased microbial carbon use efficiency (CUE). In conclusion, appropriate supplementation of nitrogen and phosphorus fertilizers is recommended for soils under long-term alfalfa cultivation in the Loess hill region, to mitigate nutrient limitations on soil microorganisms.

Key words: Loess hills; Extracellular enzymes; Microbial nutrient limitation; Carbon utilization efficiency

收稿日期:2025-11-20;修回日期:2026-01-19

基金项目:国家自然科学基金项目(32560778,31860364);甘肃省优秀研究生“创新之星”项目(2025CXZX-814)资助

作者简介:祝文知(2000-),女,汉族,甘肃金昌人,硕士研究生,主要从事土壤生态方面的研究,E-mail:2403924052@qq.com;*通信作者
Author for correspondence, E-mail:luozz@gsau.edu.cn

人类活动的加剧显著干扰了土壤中碳(C)、氮(N)和磷(P)等元素的生物地球化学循环过程,改变了土壤养分化学计量比,进而引发了土壤供给与微生物需求之间的化学计量失衡^[1]。微生物代谢活性对环境变化的响应比土壤养分含量和微生物群落结构更为敏感,故土壤胞外酶的化学计量比成为指示微生物养分限制状态的指标^[2]。Sinsabaugh等^[3]发现全球表层土壤中碳、氮和磷获取酶活性的比值(即酶化学计量比)通常趋近于1:1:1,偏离该比例表示微生物对某一元素的需求增加,即微生物可能受到了该养分的相对限制。Yang等^[4]发现酶化学计量比为1:1.08:1.28时,土壤微生物存在氮和磷的共同限制,这说明微生物养分限制状态主要取决于其生长需求与环境供给间的相对差距,而非土壤养分的绝对含量^[5]。农田生态系统中,土壤微生物活动常受到碳、氮、磷等多种元素的共同限制,这主要源于碳源的持续耗竭、氮素的大量损失和磷素的强烈固定^[6-8]。合理施肥是调控土壤养分平衡、缓解微生物养分限制的关键农艺措施。氮添加可直接缓解微生物氮限制^[7],但由于刺激微生物生长和代谢使得碳消耗量激增,从而加剧微生物碳限制^[6],也可能会促进植物生长,增加植物残体或凋落物对土壤碳库的贡献,从而减轻微生物碳限制^[2];磷添加可能通过直接降低微生物获取养分的代谢成本缓解微生物碳限制^[9]。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)作为优质的多年生豆科牧草,在水土流失严重的黄土丘陵区被视为生态与生产兼顾的首选草种^[10]。紫花苜蓿根系具有很强的根瘤固氮作用,且其根瘤菌和大量的须根给土壤留下的腐殖质可增加土壤有机质,长期种植会使土壤有机碳含量增加,但其旺盛生长也常导致土壤磷素的持续耗竭,生产中常需施磷肥以维持其生产力^[11]。苜蓿虽具固氮能力,但长期种植下是否需要施氮仍存争议。更重要的是,氮、磷添加如何通过调控土壤胞外酶活性及其化学计量来影响微生物养分限制特征,目前仍缺乏系统认知。

因此,本研究通过设置在黄土丘陵半干旱区的长期定位试验,分析氮磷添加下紫花苜蓿土壤-微生物-胞外酶生态化学计量特征,探讨土壤养分限制特征及微生物对代谢限制的反馈机制,可为黄土丘陵区紫花苜蓿可持续生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试区位于甘肃省定西市安定区李家堡镇麻子川村(35°28'N,104°44'E)。试区平均海拔2000 m,无霜期140 d,年均日照时数2476.6 h,年均太阳辐射594.7 kJ·cm⁻²,年均气温6.4℃,≥0℃积温2933.5℃,≥10℃积温2239.1℃,年均降雨量390.9 mm,年均蒸发量1531 mm,是典型的半干旱雨养农业区。

1.2 试验设计

本研究基于2014年在甘肃省定西市安定区设置的紫花苜蓿长期施肥定位试验。供试品种为当地传统品种陇东紫花苜蓿,播种量为22.5 kg·hm⁻²,每年于6月和9月各刈割一次。试验采用随机区组设计,共设置4个处理:不施肥处理(CK)、施氮肥处理(T1)、施磷肥处理(T2)、氮磷肥配施处理(T3)。每个处理设3次重复,共计12个小区,小区面积为12 m²(3 m×4 m),每小区种植10行。氮肥每年施用,于每年4月20日至25日苜蓿返青前,作为基肥一次性条施,施纯N量为100 kg·hm⁻²。磷肥每三年施用一次,在2014,2017,2020,2023年的同期(4月20日至25日返青前),作为基肥一次性施入,每次施纯P₂O₅量为180 kg·hm⁻²。施肥方案如下:氮肥为尿素(N含量46%),磷肥为过磷酸钙(P₂O₅含量12%)。T3处理为氮磷肥按上述方案配施。

1.3 土壤样品采集

土壤样品于2024年6月20日(紫花苜蓿第一茬收获期)采集,每个小区按5点取样法从苜蓿根周围0~20 cm深度采集土壤样品,去除土样中掺杂的石砾和植物残渣等杂物,混匀为1个土样。用四分法将土样分成两部分:一部分于阴凉干燥条件下风干20 d,以供土壤理化性质的测定;另一部分于4℃条件下冷藏保存,以供酶活性和微生物生物量的测定。

1.4 土壤理化性质和酶的测定

土壤pH用酸度计(Mettler Toledo,瑞士)测定(土水比1:2.5);土壤有机碳(SOC)和全氮(TN)分别采用重铬酸钾氧化-浓硫酸外加热法和凯氏定氮法测定;硝态氮(NN)采用氯化钾溶液浸提,全自动

间断化学分析仪(Smart Chem 450, 意大利)测定;全磷(TP)经浓硫酸-高氯酸消煮后,采用钼锑抗比色法测定;速效磷(AP)采用碳酸氢钠浸提,钼锑抗比色法测定^[12];微生物量碳、氮、磷(MBC, MBN, MBP)采用氯仿熏蒸-硫酸钾浸提法测定^[13];β-1,4-葡萄糖苷酶(BG)、亮氨酸氨基肽酶(LAP)、β-1,4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)和碱性磷酸酶(ALP)活性由北京索莱宝科技有限公司提供的试剂盒(BC0165, BC4025, BC4005, BC0145)进行测定,具体测定方法为:称取0.10 g或0.03 g过30~50目筛的风干土,放至2 mL离心管内,加入15 μL或50 μL甲苯,震荡混匀后静置15 min,同时设置对照管,按要求加入试剂盒提供的试剂,于37℃恒温水浴1 h后立即煮沸5 min,取出冷却后,10 000 g常温离心10 min,取200 μL上清液使用酶标仪(KHBST-360, Kehua, China)测定, BG, LAP, NAG, ALP的测定波长分别为400 nm, 405 nm, 400 nm, 660 nm。

1.5 数据计算

土壤胞外酶化学计量比计算公式如下^[4]:

$$EEA_{C:N} = \ln BG / \ln (NAG + LAP) \quad (1)$$

$$EEA_{C:P} = \ln BG / \ln ALP \quad (2)$$

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

其中, $EEA_{C:N}$, $EEA_{C:P}$, $EEA_{N:P}$ 分别代表酶化学计量碳氮比、碳磷比和氮磷比。

采用胞外酶活性比例计算矢量长度(Vector length)和矢量角度(Vector angle),以量化土壤微生物的营养限制状况^[2]:

$$\text{矢量长度 Vector length} = \text{SQRT}(X^2 + Y^2) \quad (4)$$

$$\text{矢量角度 Vector angle} = \text{Degrees}[\text{ATAN2}(X, Y)] \quad (5)$$

其中, X 代表 $\ln(BG)/\ln(ALP)$, Y 代表 $\ln(BG)/\ln(NAG + LAP)$ 。矢量长度越长时微生物受碳限制的程度越高;矢量角度 $>45^\circ$ 时土壤微生物受磷限制,矢量角度 $<45^\circ$ 时土壤微生物受氮限制。

微生物碳利用效率(carbon use efficiency, CUE)计算公式如下^[14]:

$$CUE_{C:X} = CUE_{\max} \times \left(\frac{S_{C:X}}{S_{C:X} + K_X} \right) \quad (6)$$

$$S_{C:X} = B_{C:X} / L_{C:X} \times 1 / EEA_{C:X} \quad (7)$$

其中, $C:X$ 表示 $C:N$ 或 $C:P$ 比率, $CUE_{\max}$ (0.6) 为微生物碳利用效率的上限, K_X (0.5) 为半饱和常

数, $B_{C:X}$ 为微生物量碳氮比或碳磷比, $L_{C:X}$ 为土壤碳氮比或碳磷比, $S_{C:X}$ 表示胞外酶活性的分配在多大程度上抵消了可用资源的元素组成与微生物生物量组成之间的差异, 本研究中 $CUE_{C:X}$ 是 $CUE_{C:N}$ 与 $CUE_{C:P}$ 的平均值。

1.6 数据统计分析

所有数据经 Microsoft Excel 2016 处理整合后, 采用 SPSS 27.0 对土壤理化性质及养分化学计量比、微生物量及其化学计量比、胞外酶活性及其化学计量比、矢量长度、矢量角度和微生物碳利用效率进行正态分布、单因素方差分析(one-way ANOVA)和双因素方差分析(two-way ANOVA), 用最小显著极差法(LSD法)基于 $P < 0.05$ 进行多重比较; 采用 Person 相关系数进行土壤理化性质、微生物量和胞外酶活性的相关性分析; 使用随机森林模型, 对土壤理化性质、微生物生物量和胞外酶活性进行分析, 确定土壤微生物碳限制、磷限制和微生物碳利用效率的主要预测因子, 由 R 4.5.1 软件“random Forest”包完成; Origin 2021 为绘图软件, Adobe Illustrator 2022 为图表修改工具, 图表中数据结果均为平均值±标准误。

2 结果与分析

2.1 氮磷添加对苜蓿地土壤养分化学计量比的影响

氮磷添加对土壤养分含量及化学计量比均有一定影响(表1, 图1)。与CK相比, 氮添加显著提高土壤硝态氮和速效磷含量($P < 0.05$), 磷添加显著增加土壤全磷和速效磷含量($P < 0.05$), 氮磷添加显著增加土壤全氮、全磷、硝态氮和速效磷含量($P < 0.05$), 并显著降低土壤碳磷比($P < 0.05$), 施肥(T1, T2, T3)显著降低土壤pH值($P < 0.05$)。氮磷添加的交互作用显著影响土壤pH值和全磷含量($P < 0.05$)。

2.2 氮磷添加对苜蓿地土壤微生物量和胞外酶化学计量特征的影响

氮磷添加对土壤微生物生物量和胞外酶化学计量比均有一定影响(图2, 图3)。与CK相比, 氮添加显著提高微生物量碳、碳获取酶活性和氮获取酶活性($P < 0.05$), 磷添加显著增加微生物量碳、微生物量氮、微生物量磷、碳获取酶活性、氮获取酶活

表 1 氮磷添加下苜蓿地土壤理化性质的变化

Table 1 Changes in the soil physicochemical properties of alfalfa fields under nitrogen and phosphorus addition

指标 Index	pH	有机碳 SOC/(g·kg ⁻¹)	全氮 TN/(g·kg ⁻¹)	全磷 TP/(g·kg ⁻¹)	硝态氮 NN/(mg·kg ⁻¹)	速效磷 AP/(mg·kg ⁻¹)
CK	8.46±0.01 ^a	9.43±0.17 ^{ab}	0.88±0.04 ^b	0.93±0.02 ^c	2.21±0.11 ^b	4.97±0.07 ^d
T1	8.30±0.01 ^b	9.23±0.20 ^b	0.95±0.03 ^{ab}	0.91±0.03 ^c	2.94±0.05 ^a	5.85±0.07 ^c
T2	8.25±0.02 ^b	9.52±0.01 ^{ab}	0.91±0.01 ^b	1.00±0.01 ^b	2.23±0.07 ^b	8.08±0.05 ^b
T3	8.20±0.01 ^b	9.96±0.25 ^a	1.01±0.03 ^a	1.10±0.01 ^a	3.12±0.23 ^a	9.18±0.08 ^a
N	**	ns	*	*	**	**
P	**	*	ns	**	ns	**
N×P	**	ns	ns	*	ns	ns

注:CK表示不施肥,T1表示施氮肥,T2表示施磷肥,T3表示氮磷肥配施。表中数值为平均值±标准误($n=3$),同一列中不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。N表示氮添加的效应,P表示磷添加的效应,N×P表示氮磷添加的交互作用;**表示 $P<0.01$,*表示 $P<0.05$,ns表示 $P\geq 0.05$ 。下同

Note: CK indicates no fertilization, T1 indicates nitrogen fertilizer application, T2 indicates phosphorus fertilizer application, T3 indicates combined nitrogen and phosphorus fertilizer application. The values in the table represent the mean±standard error ($n=3$), different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments at 0.05 level. N indicates the effect of nitrogen application, P indicates the effect of phosphorus application, and N×P indicates the interaction between nitrogen and phosphorus applications. ** indicates $P<0.01$, * indicates $P<0.05$, ns indicates $P\geq 0.05$. The same as below

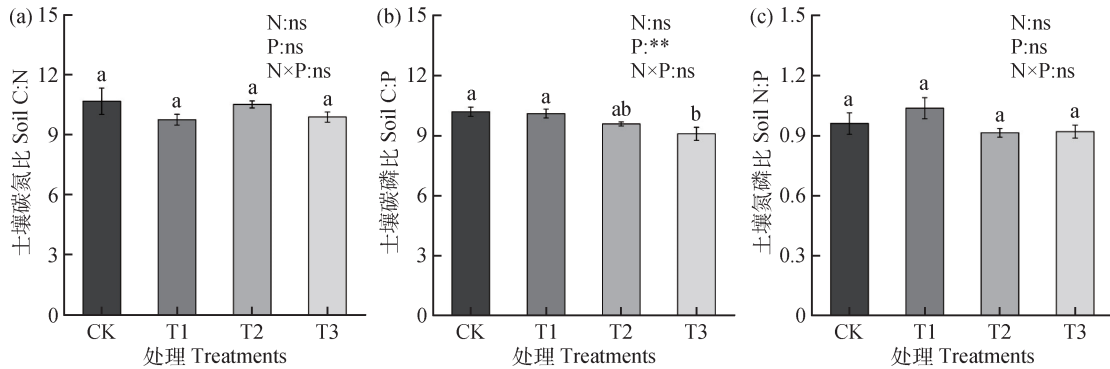


图 1 氮磷添加下苜蓿地土壤养分化学计量比

Fig. 1 Soil nutrients stoichiometric ratios in alfalfa fields under nitrogen and phosphorus addition

注:不同小写字母表示该指标在不同处理下差异显著($P<0.05$)。下同

Note: Different lowercase letters indicate statistically significant differences in the indicator across treatments at 0.05 level. The same as below

性、磷获取酶活性和 $EEA_{N:P}$ ($P<0.05$),而显著降低微生物量碳磷比和微生物量氮磷比($P<0.05$),氮磷添加显著增加微生物量碳、氮、磷与碳获取酶活性、氮获取酶活性、磷获取酶活性和 $EEA_{N:P}$ ($P<0.05$),而显著降低微生物量碳磷比、微生物量氮磷比和 $EEA_{C:N}$ ($P<0.05$)。氮磷添加的交互作用显著影响微生物量磷、微生物量碳磷比和氮获取酶活性($P<0.05$)。

2.3 氮磷添加对土壤微生物养分限制特征的影响

氮磷添加改变了土壤微生物养分限制状态和碳利用效率。象限散点图结果显示,所有处理的数据点均分布于土壤微生物C和P共同限制区域(图4a);酶向量模型和矢量分析结果表明数据点位于虚线(1:1)上方且矢量角度大于45°(图4b),表明长期种植紫花苜蓿后土壤微生物受到不同程度的C和P限制。

与CK相比,氮添加和磷添加后矢量长度无明显差异(图4c),但矢量角度显著降低($P<0.05$)(图4d),表明氮添加和磷添加能缓解土壤微生物磷限制,但对土壤微生物碳限制无影响。线性回归分析表明,土壤微生物碳限制和磷限制存在显著正相关关系(图4e)。与CK相比,施肥(T1,T2,T3)显著提高了土壤微生物碳利用效率($P<0.05$)(图4f)。

2.4 土壤理化性质与微生物养分限制特征关系

相关性分析发现,微生物碳限制、磷限制与土壤pH呈显著正相关,而CUE与之呈显著负相关;微生物碳限制与全磷、氮获取酶活性、磷获取酶活性、微生物量碳、微生物量氮和微生物量磷呈显著负相关;微生物磷限制与有机碳、全氮、全磷、速效磷、碳获取酶活性、氮获取酶活性、磷获取酶活性、微生物量碳、微生物量氮和微生物量磷呈显著负相关;

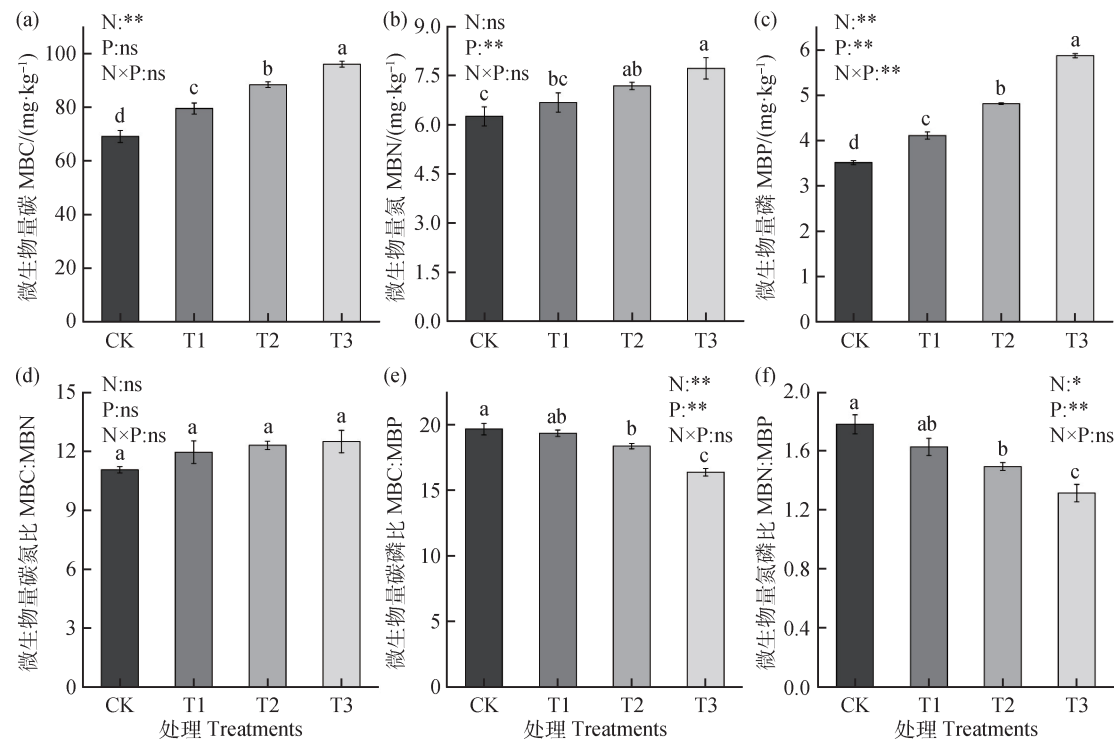


图 2 氮磷添加下苜蓿地土壤微生物量及化学计量比

Fig. 2 Soil microbial biomass and stoichiometric ratios in alfalfa fields under nitrogen and phosphorus addition

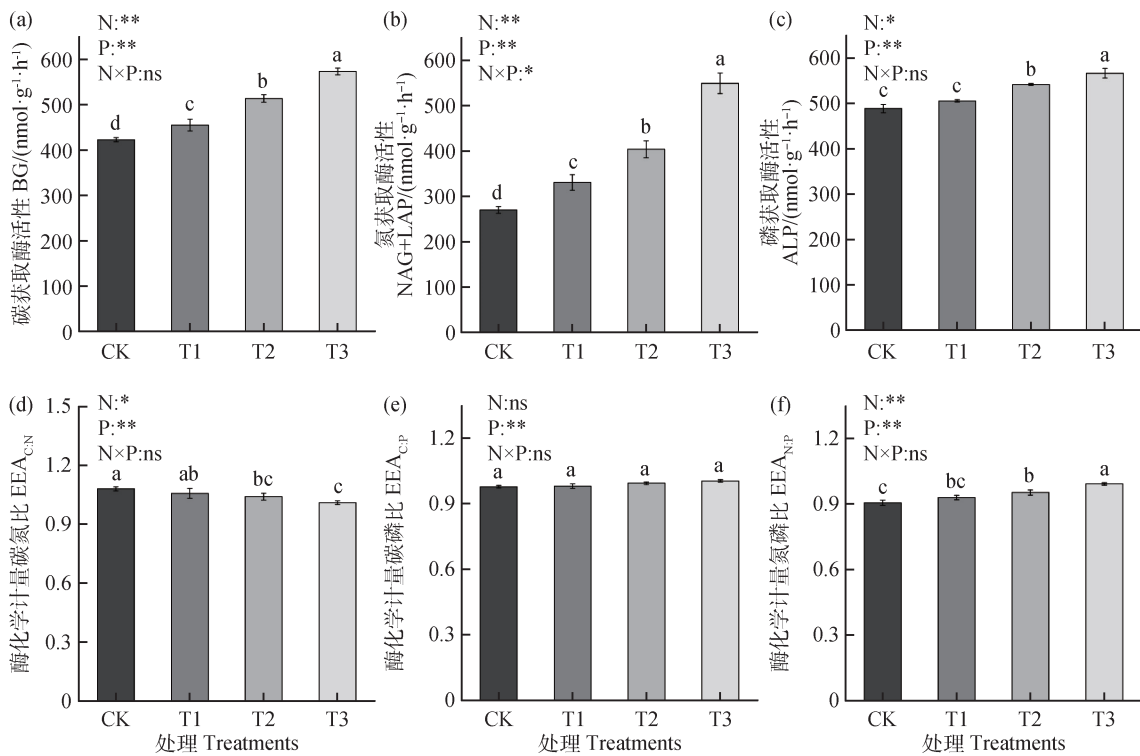


图 3 氮磷添加下苜蓿地土壤胞外酶活性及其化学计量比

Fig. 3 Soil extracellular enzyme activity and stoichiometric ratios in alfalfa fields under nitrogen and phosphorus addition

CUE与全氮、硝态氮、速效磷、氮获取酶、微生物量碳、微生物量磷呈显著正相关(图5a)。随机森林模型结果表明,氮获取酶(亮氨酸氨基肽酶)活性是土

壤微生物碳限制的最强预测因子(图5b),速效磷是微生物磷限制的最强预测因子(图5c),微生物生物量碳是CUE的最强预测因子(图5d)。

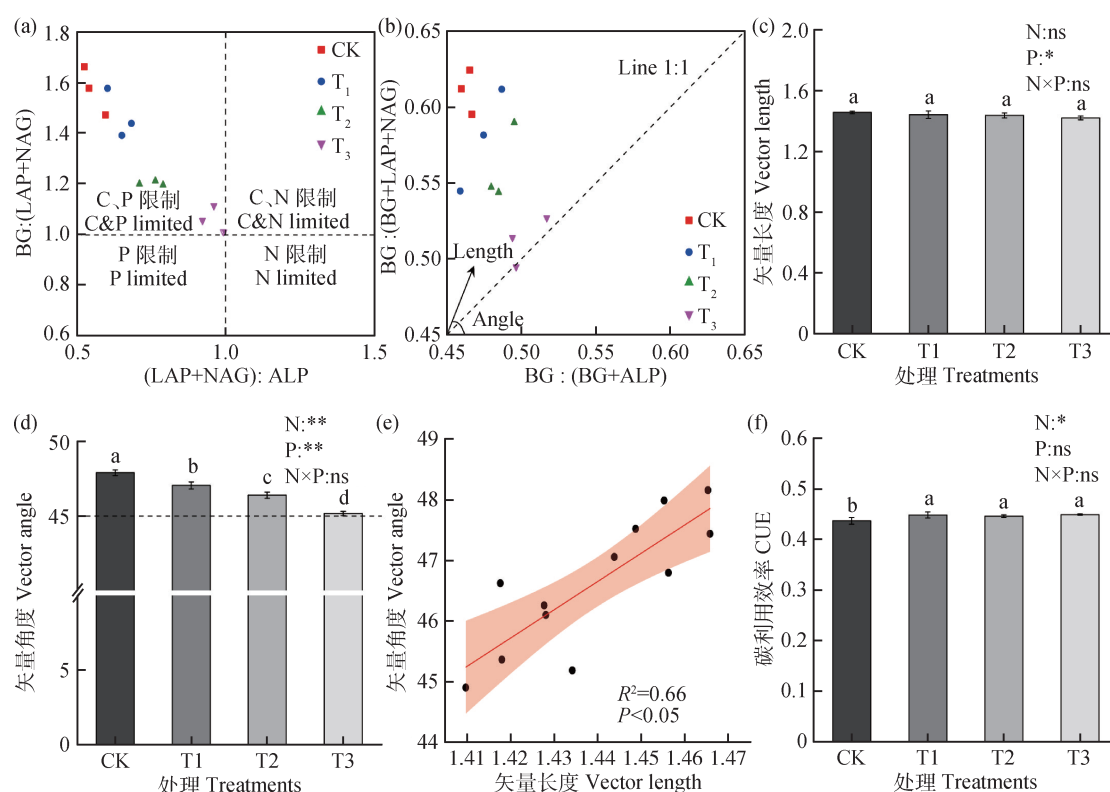


图 4 氮磷添加下土壤微生物养分限制特征与碳利用效率

Fig. 4 Soil microbial nutrient limitation and carbon use efficiency under nitrogen and phosphorus addition

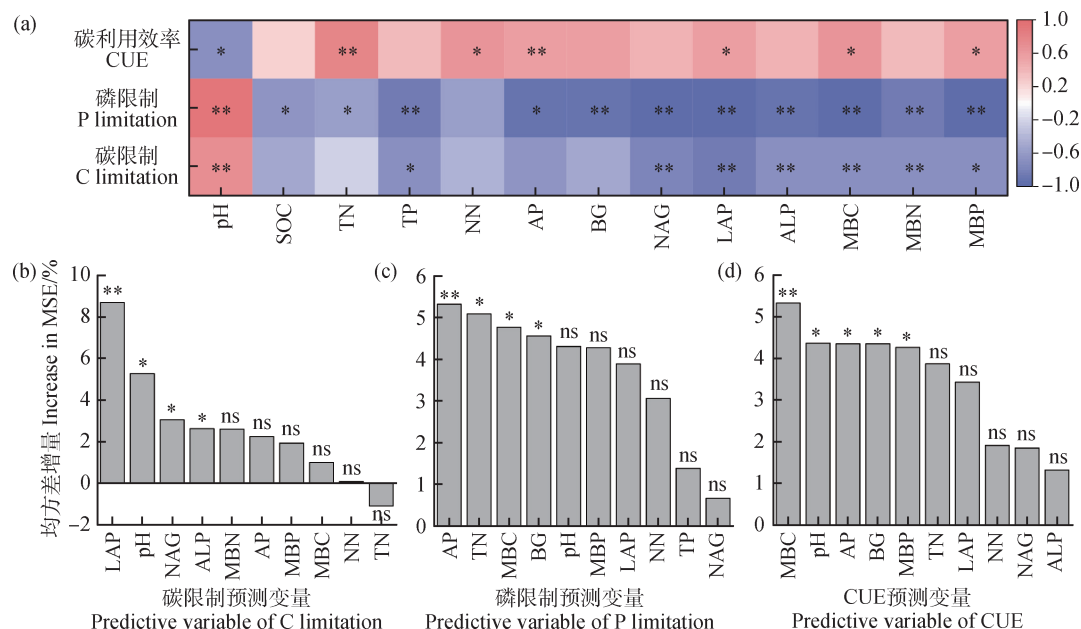


图 5 土壤微生物养分限制和碳利用效率的关联分析

Fig. 5 Correlation analysis of soil microbial nutrient limitation and carbon utilization efficiency

注:红色和蓝色分别表示两个变量之间的正相关和负相关。**: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, ns: $P \geq 0.05$ Note: Red and blue represent positive and negative correlations between two variables, respectively. **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, ns: $P \geq 0.05$

3 讨论

3.1 氮磷添加对苜蓿地土壤胞外酶活性与化学计量特征的影响

土壤胞外酶活性是表征微生物养分需求与土壤养分供应状况的重要指标,对维持生态系统生物地球化学循环的平衡具有重要作用^[15]。全球土壤酶活性数据库中参与碳(BG)、氮(NAG+LAP)和磷(ALP)循环的酶活性范围分别为0~861.29 nmol·g⁻¹·h⁻¹, 0~1162.40 nmol·g⁻¹·h⁻¹, 0~1564.36 nmol·g⁻¹·h⁻¹,而本试验所研究的4种胞外酶活性在0~584.35 nmol·g⁻¹·h⁻¹范围内,在全球土壤酶库中处于较低水平^[16],表明黄土丘陵区紫花苜蓿地土壤养分供给相对匮乏。

土壤微生物通过分泌胞外酶获取限制性养分,而环境中养分的有效性是这一过程的关键驱动因子,养分有效性通过改变底物和能量供应对胞外酶分泌产生直接的影响^[17]。微生物量与碳、氮、磷获取酶活性主要受土壤pH和理化性质的调控,氮和磷添加通过直接作用或改变土壤性质(如pH、理化性质和养分循环)等间接途径共同调控土壤生态过程,尤其是与碳转化相关的过程深刻影响土壤微生物的组成和活性进而调节胞外酶的分泌,因为微生物对氮和磷的利用要通过吸收碳作为能量来源来驱动^[18]。另外,本研究中CK处理的土壤养分含量最低(表1),黄土丘陵区土壤固有养分匮乏限制了植物根系分泌物和根系周转过程中的碳有效性,在这样资源受限的环境下土壤微生物合成胞外酶的能力较弱,从而制约了土壤胞外酶的总体活性^[4]。相比之下,肥料的施入能促进植物根系生长与生物量的积累,通过凋落物和植物残体等形式为土壤胞外酶的合成提供更丰富的微生物可利用养分,从而显著提升碳、氮、磷获取酶的活性^[5]。

诸多研究针对氮添加对土壤胞外酶活性的影响展开探讨,研究结果存在显著差异^[2,4,6]。有研究表明,土壤碳、氮、磷获取酶活性在低浓度氮添加处理下不变或略微降低,而在高浓度氮添加处理下显著增加^[2]。也有研究指出氮添加背景下,碳、磷获取酶活性增加,氮获取酶活性无显著变化^[19]。本研究发现,氮添加后土壤碳获取酶和氮获取酶活性显著增加(图3a, 3b),可能是因为施氮直接刺激微生物生长,从而增加对碳的需求,使碳获取酶活性升高^[4],且本研究氮添加剂为尿素,尿素无法被微生物

直接吸收利用,需要通过分泌氮获取酶来进行分解^[20]。酶活性增强是对环境中养分有效性较低的一种响应,黄土丘陵区磷素含量很低,微生物应分泌更多的磷获取酶,以获取养分^[11,21]。但在本研究中氮添加下土壤磷获取酶活性无显著变化(图3c),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^[22-23]。

有研究表明,外源添加的氮在调控磷的矿化方面有促进作用,磷的添加对氮素的释放也有一定的作用^[24]。本研究中,磷添加后土壤碳、氮、磷获取酶活性均显著增加(图3),因为磷肥的施入可能改变土壤微生物群落组成,一些对磷敏感的微生物类群优势度增加,这些微生物在代谢过程中会产生更多与碳、氮、磷获取的酶^[9]。范珍珍等^[25]整合分析氮磷添加对土壤胞外酶活性的影响发现在氮磷肥同时添加下,碳、氮、磷获取酶的活性提升幅度显著加大,增幅分别达到13.4%, 37.4%, 13.3%。张进霞等^[26]的研究也发现氮磷肥配施对胞外酶活性产生的促进作用更显著,本研究结果与其一致,与单施氮肥和单施磷肥相比,氮磷配施时土壤碳、氮、磷获取酶活性显著增加(图3),因为单施氮肥或磷肥时,土壤中碳、氮、磷的化学计量比可能失衡,限制微生物的生长和代谢,而氮磷配施更能接近微生物生长所需的理想营养比例,解除因单一养分限制导致的酶活性抑制^[27]。

3.2 氮磷添加对苜蓿地土壤微生物养分限制特征的影响

微生物养分限制特征内在驱动存在普遍规律,即主要受底物化学计量比与微生物需求之间的平衡所控制,并通过微生物胞外酶活性特征变化得以反映^[1],但在不同区域和生态系统中具有显著差异。李雅男等^[28]的研究发现荒漠草原生态系统中土壤微生物受碳氮共同限制;Wang等^[29]研究发现在中国西北沙漠微生物代谢同时受到氮磷的共同限制;而Rosinger等^[30]的研究发现亚热带草原土壤微生物活动受到碳氮磷的共同限制。

本研究结果表明,长期种植紫花苜蓿后土壤微生物受到不同程度的碳限制和磷限制(图4a、b),氮添加缓解了微生物磷限制(图4d),与阴红彬等^[31]的研究结果一致,可能是因为氮肥的施入直接补充了

限制性养分且优化了微生物代谢资源的分配,两种元素同时限制生长时,增加任何一种养分都会增加植物生长速率,因为更多的资源可以分配给限制元素^[32]。理论上,氮添加能促进植物生长和增加凋落物输入,有利于土壤中含碳化合物的生成和矿化,从而缓解微生物碳限制^[33],贾蕴欢等^[2]的研究也发现氮添加缓解了黄土丘陵区草地土壤微生物碳限制。而在本研究中,氮添加对微生物碳限制无影响(图4c),可能是因为碳限制主要与SOC的可利用性有关,氮添加间接影响碳循环,但并未直接改变SOC的总量或可利用性^[34],且本研究也发现氮添加后SOC含量未显著增加(表1)。

本研究中,磷添加也缓解了微生物磷限制(图4d),因为磷肥的施入能直接增加土壤中可利用的磷含量,缓解养分限制,促进微生物的生长^[25]。而磷添加对碳限制无显著影响(图4c),是由于微生物具有一定的代谢调节能力,能够在不同碳磷比的环境中调整自身的生理状态,施磷后微生物可能会通过改变代谢途径、酶活性或细胞组成等方式,更高效地利用现有碳源,不会因施入磷加剧碳限制^[9]。氮磷配施通过调整微生物的化学计量平衡、改变土壤环境以及激发微生物的协同代谢途径,能最有效地将潜在的磷资源转化为微生物可利用的有效磷,从而最大化地满足微生物对磷的需求^[35]。本研究中,与单施氮或单施磷相比,氮磷肥配施对微生物磷限制的缓解程度最大(图4d),与Marten等^[36]的研究结果一致。此外,研究还发现,长期种植苜蓿土壤微生物不受氮限制(图4a,4b,4d),因为豆科植物与根瘤菌形成共生关系,根瘤菌能将空气中的氮气(N_2)转化为氨(NH_3)或铵态氮(NH_4^+-N),这是植物可直接吸收利用的氮源,这一过程为土壤微生物提供了丰富的氮素来源,微生物无需依赖土壤中有限的氮素资源^[37],从而使豆科植物存在下微生物不会受到氮限制,Zhang等^[38-39]的研究结果证明了这一点。

CUE是土壤微生物在特定资源环境下对碳的分配策略,CUE值越高,代表微生物用于自身生长的碳比例越大,而因呼吸作用损耗的碳比例越小^[13]。Xie等^[40]的研究表明,氮和磷的供应能提高CUE。本研究结果与其一致,施肥后CUE显著增加,且在氮磷配施时最高(图4f),可能是由于黄土丘陵区土壤养分含量低限制了微生物生长,外源养分的输入缓解了微生物生长发育所面临的养分限制,

改变了微生物的碳分配策略,使微生物从将更多的碳用于“呼吸消耗以获取所需养分”调整为将更多的碳用于“同化合成以促进自身生长”,最终表现为土壤CUE的增加^[41]。相关性分析进一步证实土壤养分、微生物量和胞外酶活性与微生物碳限制和磷限制呈负相关关系,与CUE呈正相关关系(图5a)。根据随机森林模型,亮氨酸氨基肽酶活性是微生物碳限制的最强预测因子(图5b),可能是因为氮素供应相对充足的豆科植物根区环境可以满足微生物生长和代谢的需求,微生物无需为获取氮而进行低效的碳矿化,能将代谢能量更高效地用于碳同化和生长,从而减少微生物对碳的竞争和依赖,缓解整体的碳限制状态。速效磷是磷限制的最强预测因子(图5c),这是由于土壤中可直接利用的无机磷(如 PO_4^{3-})浓度可以表征磷的供应,当AP含量低时微生物易受磷限制^[42]。微生物量碳是CUE的最强预测因子(图5d),可能是因为微生物量碳反映了微生物群体的生物量大小,较高的微生物量碳通常意味着更多的微生物细胞参与代谢活动,从而直接影响CUE^[43]。

4 结论

氮磷添加显著提高了苜蓿地土壤养分含量、微生物生物量、胞外酶活性和 $EEA_{N:P}$,降低了土壤碳磷比、MBC:MBP、MBN:MBP和 $EEA_{C:N}$ 。长期种植苜蓿土壤微生物受到不同程度的碳限制和磷限制,且二者存在正相关关系,速效磷、亮氨酸氨基肽酶活性和微生物量碳分别是土壤微生物磷限制、碳限制和碳利用效率的最强预测因子。氮磷添加缓解了土壤微生物磷限制,但对碳限制无影响。综上,黄土丘陵区长期种植苜蓿土壤应适当增加氮磷肥,以缓解土壤微生物和植物对养分需求的竞争。

参考文献

- [1] 肖向前,张海阔,冯娅斯,等. 植物残体对青藏高原高寒草甸土壤、微生物和胞外酶C:N:P化学计量特征的影响[J]. 应用生态学报,2023,34(1):58-66
XIAO X Q,ZHANG H K,FENG Y S,et al. Effects of plant residues on C: N: P of soil, microbial biomass, and extracellular enzyme in an Alpine Meadow on the Qinghai-Tibetan Plateau, China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2023,34(1):58-66
- [2] 贾蕴欢,胡雯颖,邓健,等. 氮添加对黄土丘陵区草地土壤微生物养分限制特征的影响[J]. 草业学报,2025,34(2): 221-232

- JIA Y H, HU W Y, DENG J, et al. Effects of nitrogen addition on soil microbial nutrient limitation characteristics in grassland in the Loess Hilly Region[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(2):221-232
- [3] SINSABAUGH R L, HILL B H, FOLLSTAD SHAH J J. Eoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment[J]. *Nature*, 2009, 462(7274):795-798
- [4] YANG R Z, YANG Z, YANG S L, et al. Nitrogen inhibitors improve soil ecosystem multifunctionality by enhancing soil quality and alleviating microbial nitrogen limitation[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 880:163238
- [5] 殷启杰, 姜建武, 殷汉琴, 等. 有机物料投入对新垦耕地土壤养分和微生物代谢的影响[J]. *应用生态学报*, 2025, 36(4):969-983
- YIN Q J, JIANG J W, YIN H Q, et al. Effects of organic inputs on soil nutrients and microbial metabolism in newly reclaimed farmlands[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2025, 36(4):969-983
- [6] ZHU X M, LIU M, KOU Y P, et al. Differential effects of N addition on the stoichiometry of microbes and extracellular enzymes in the rhizosphere and bulk soils of an Alpine shrubland[J]. *Plant and Soil*, 2020, 449(1):285-301
- [7] TIAN L X, ZHANG Y C, GAO X L, et al. Microbial carbon and nitrogen limitations with mulching of proso millet fields on the Loess Plateau: evidence from soil ecoenzymatic stoichiometry[J]. *Land Degradation & Development*, 2023, 34(17):5224-5237
- [8] SONG J S, ZHANG H Y, CHANG F D, et al. Humic acid plus manure increases the soil carbon pool by inhibiting salinity and alleviating the microbial resource limitation in saline soils[J]. *Catena*, 2023, 233:107527
- [9] WIDDIG M, SCHLEUSS P M, BIEDERMAN L A, et al. Microbial carbon use efficiency in grassland soils subjected to nitrogen and phosphorus additions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 146:107815
- [10] 于宗恺, 景煜都, 刘励, 等. 苜蓿地撂荒过程中土壤-微生物-胞外酶及化学计量的变化[J]. *草地学报*, 2023, 31(4):1115-1124
- YU Z K, JING Y D, LIU L, et al. Changes of soil, microorganisms, enzymes and stoichiometry during the uncultivation of alfalfa farmland[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(4):1115-1124
- [11] 王淑琴, 罗珠珠, 牛伊宁, 等. 基于最小数据集的黄土高原半干旱区苜蓿地土壤质量评价[J]. *中国草地学报*, 2023, 45(7):81-90
- WANG S Q, LUO Z Z, NIU Y N, et al. Soil quality evaluation of alfalfa fields in semi-arid areas of the Loess Plateau based on minimum data set[J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2023, 45(7):81-90
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 2000:25-97
- BAO S D. *Soil Agricultural Chemistry Analysis* [M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2000:25-97
- [13] 孙英杰, 张德楠, 沈育伊, 等. 模拟氮沉降对中亚热带桉树人工林土壤微生物群落结构及酶活性的影响[J]. *林业科学*, 2025, 61(5):46-60
- SUN Y J, ZHANG D N, SHEN Y Y, et al. Effects of simulated nitrogen deposition on soil microbial community structure and enzyme activities in *Eucalyptus* plantations in mid-subtropical region[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2025, 61(5):46-60
- [14] SINSABAUGH R L, TURNER B L, TALBOT J M, et al. Stoichiometry of microbial carbon use efficiency in soils[J]. *Ecological Monographs*, 2016, 86(2):172-189
- [15] YANG Y, LIU H, YANG X, et al. Plant and soil elemental C:N:P ratios are linked to soil microbial diversity during grassland restoration on the Loess Plateau, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 806(Pt 1):150557
- [16] SINSABAUGH R L, LAUBER C L, WEINTRAUB M N, et al. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale[J]. *Ecology Letters*, 2008, 11(11):1252-1264
- [17] MEN X X, BAO Y, ZHAI D P, et al. Soil microbial metabolic limitations under subalpine coniferous and broad-leaved forests responding to litter input and removal treatments[J]. *Functional Ecology*, 2025, 39(10):2803-2816
- [18] LIU S, ZHANG X Y, WANG H M, et al. Phosphorus-transforming microbes enhance phosphatase catalytic efficiency to alleviate phosphorus limitation under nitrogen and phosphorus additions in subtropical forest soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2025, 209:109915
- [19] 勒佳佳, 苏原, 彭庆文, 等. 氮添加对天山高寒草原土壤酶活性和酶化学计量特征的影响[J]. *干旱区研究*, 2020, 37(2):382-389
- LE J J, SU Y, PENG Q W, et al. Effects of nitrogen addition on soil enzyme activities and ecoenzymatic stoichiometry in Alpine grassland of the Tianshan Mountains[J]. *Arid Zone Research*, 2020, 37(2):382-389
- [20] BOOT C M, HALL E K, DENEFF K, et al. Long-term reactive nitrogen loading alters soil carbon and microbial community properties in a subalpine forest ecosystem[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 92:211-220
- [21] LIAN J L, CHEN J, CUI H, et al. Soil extracellular enzyme stoichiometry reveals the nutrient limitations of soil microbial metabolism under precipitation changes in Ningxia desert steppe of China[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2025, 127:103774
- [22] MA W J, LI J, GAO Y, et al. Responses of soil extracellular enzyme activities and microbial community properties to interaction between nitrogen addition and increased precipitation in a semi-arid grassland ecosystem[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 703:134691
- [23] A'BEAR A D, JONES T H, KANDELER E, et al. Interactive effects of temperature and soil moisture on fungal-mediated wood decomposition and extracellular enzyme activity[J]. *Soil*

- Biology and Biochemistry, 2014, 70:151-158
- [24] YU Q S, NI X F, HAGEDORN F, et al. Field experiments and a meta-analysis reveal a minor influence of nitrogen addition on phosphorus fractions in forests[J]. Global Change Biology, 2025, 31(4):e70156
- [25] 范珍珍, 王鑫, 王超, 等. 整合分析氮磷添加对土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2018, 29(4):1266-1272
FAN Z Z, WANG X, WANG C, et al. Effect of nitrogen and phosphorus addition on soil enzyme activities: A meta-analysis[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2018, 29(4):1266-1272
- [26] 张进霞, 刘晓静, 郝凤, 等. 氮磷调控对紫花苜蓿氮积累与土壤氮磷营养的影响[J]. 草地学报, 2016, 24(1):61-68
ZHANG J X, LIU X J, HAO F, et al. Effects of nitrogen and phosphorus regulation on alfalfa nitrogen accumulation and the nitrogen and phosphorus nutrients of soil[J]. Acta Agrestia Sinica, 2016, 24(1):61-68
- [27] QIN W K, FENG J G, ZHANG Q F, et al. Nitrogen and phosphorus addition mediate soil priming effects *via* affecting microbial stoichiometric balance in an Alpine meadow[J]. Science of the Total Environment, 2024, 908:168350
- [28] 李雅男, 李邵宇, 史世斌, 等. 荒漠草原不同放牧强度下土壤酶化学计量特征的研究[J]. 草地学报, 2022, 30(9):2239-2248
LI Y N, LI S Y, SHI S B, et al. Study on soil enzyme stoichiometric characteristics of different grazing intensities in desert steppe[J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(9):2239-2248
- [29] WANG C, YANG Q N, ZHANG C, et al. Vegetation restoration of abandoned cropland improves soil ecosystem multifunctionality through alleviating nitrogen-limitation in the China Danxia[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14:1116179
- [30] 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[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 128:115-126
- [31] 阴红彬, 黄庆阳, 沙刚, 等. 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[J]. 生态学报, 2025, 45(13):6292-6303
YIN H B, HUANG Q Y, SHA G, et al. Response of soil extracellular enzyme activity and stoichiometric characteristics to nitrogen deposition in new volcanic lava platform[J]. Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(13):6292-6303
- [32] ÅGREN G I, WETTERSTEDT J A M, BILLBERGER M F K. Nutrient limitation on terrestrial plant growth-modeling the interaction between nitrogen and phosphorus[J]. New Phytologist, 2012, 194(4):953-960
- [33] PANG C L, ZHANG Z H, ZHU X M, et al. Divergent microbial metabolic limitations across soil depths after two decades of high nitrogen inputs in a primary tropical forest[J]. Global Change Biology, 2025, 31(8):e70440
- [34] WU M Y, CHEN L, CHEN S G, et al. Soil microbial carbon and nitrogen limitation constraints soil organic carbon stability in arid and semi-arid grasslands[J]. Journal of Environmental Management, 2025, 373:123675
- [35] 孙亚男, 李茜, 李以康, 等. 氮、磷养分添加对高寒草甸土壤酶活性的影响[J]. 草业学报, 2016, 25(2):18-26
SUN Y N, LI Q, LI Y K, et al. The effect of nitrogen and phosphorus applications on soil enzyme activities in Qinghai-Tibetan Alpine meadows[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(2):18-26
- [36] SCHLEUSS P M, WIDDIG M, HEINTZ-USCHART A, et al. Interactions of nitrogen and phosphorus cycling promote P acquisition and explain synergistic plant-growth responses[J]. Ecology, 2020, 101(5):e03003
- [37] YU X C, ZHU H Y. Enacting partner specificity in legume - rhizobia symbioses[J]. aBIOTECH, 2025, 6(2):311-327
- [38] ZHANG J Y, YANG X M, SONG Y H, et al. Revealing the nutrient limitation and cycling for microbes under forest management practices in the Loess Plateau-Ecological stoichiometry[J]. Geoderma, 2020, 361:114108
- [39] XU M P, LI W J, WANG J Y, et al. Soil ecoenzymatic stoichiometry reveals microbial phosphorus limitation after vegetation restoration on the Loess Plateau, China[J]. Science of the Total Environment, 2022, 815:152918
- [40] XIE W J, ZHANG Y P, LI J Y, et al. Straw application coupled with N and P supply enhanced microbial biomass, enzymatic activity, and carbon use efficiency in saline soil[J]. Applied Soil Ecology, 2021, 168:104128
- [41] GU Y J, HAN C L, FAN J W, et al. Alfalfa forage yield, soil water and P availability in response to plastic film mulch and P fertilization in a semiarid environment[J]. Field Crops Research, 2018, 215:94-103
- [42] AN R, YU R P, XING Y, et al. Intercropping efficiently utilizes phosphorus resource in soil via different strategies mediated by crop traits and species combination[J]. Plant and Soil, 2023, 497(1-2):705-725
- [43] YANG L Y, CANARINI A, ZHANG W S, et al. Microbial life-history strategies mediate microbial carbon pump efficacy in response to N management depending on stoichiometry of microbial demand[J]. Global Change Biology, 2024, 30(5):e17311

(责任编辑 彭露茜)