DOI: 10. 11686/cyxb2025457
http://cyxb. magtech. com. cn
韩奥, 刘阳, 倪蕴菡, 等. 东祁连山高寒草甸灌丛化对土壤酶活性和微生物代谢限制的影响. 草业学报, 2026, 35(11): 38－51.
HAN Ao, LIU Yang, NI Yun-han, *et al*. Effects of shrub encroachment on soil enzyme activities and microbial metabolic limitations in alpine meadows of the Eastern Qilian Mountains. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(11): 38－51.

东祁连山高寒草甸灌丛化对土壤酶活性和微生物代谢限制的影响

韩奥，刘阳，倪蕴菡，肖红*，徐长林，马凯，王昀
（甘肃农业大学草业学院，草业生态系统教育部重点实验室，甘肃 兰州 730070）

摘要：为探究东祁连山高寒草甸灌丛化过程中土壤酶活性以及微生物代谢限制的变化特征，本研究以东祁连山不同灌丛化程度（轻度、中度、重度）的高寒草甸为对象，通过土壤酶化学计量与矢量分析，揭示了灌丛化进程中微生物养分限制的响应规律。结果表明，随灌丛化加剧，灌丛斑块0～15 cm土层土壤有机碳、全氮含量及氮磷比显著降低，而15～30 cm土层土壤含水量显著上升（$P<0.05$）。土壤β-葡萄糖苷酶、纤维素二糖苷酶和N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性在0～15 cm土层土壤中随灌丛化加剧而显著下降（$P<0.05$），而磷酸酶活性无显著变化（$P>0.05$）。酶化学计量特征显示，灌丛斑块各土层土壤酶碳氮比均随灌丛化程度加剧而显著降低（$P<0.05$）。矢量分析表明，灌丛扩张缓解了表层土壤微生物的碳限制，但加剧了其氮限制。冗余分析与Mantel检验进一步证实，灌丛斑块中各土层的全磷、硝态氮含量和氮磷比是驱动微生物代谢限制变化的关键环境因子。本研究从微生物代谢角度揭示了高寒草甸灌木扩张通过重塑土壤养分格局和调控微生物代谢策略驱动地下生态过程转型的关键过程，为高寒草甸生态评估与恢复管理提供了重要的理论依据。

关键词：灌丛化；高寒草甸；土壤酶活性；微生物代谢限制

Effects of shrub encroachment on soil enzyme activities and microbial metabolic limitations in alpine meadows of the Eastern Qilian Mountains

HAN Ao, LIU Yang, NI Yun-han, XIAO Hong*, XU Chang-lin, MA Kai, WANG Yun
College of Prataculture Science, Gansu Agricultural University, Ministry of Education Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Lanzhou 730070, *China*

Abstract: The aim of this study was to investigate changes in soil enzyme activities and microbial metabolic limitations during shrub encroachment in alpine meadows of the eastern Qilian Mountains. To this end, we conducted a field study to examine alpine meadows under different intensities of shrub encroachment (light, moderate, and heavy). Using soil enzymatic stoichiometry and vector analysis, we identified response patterns of microbial nutrient limitations to different levels of shrub encroachment. The results show that with increasing shrub encroachment, the soil organic carbon content, total nitrogen content, and nitrogen: phosphorus decreased significantly in the 0－15 cm soil layer of shrub patches, whereas the soil water content increased significantly in the 15－30 cm layer ($P<0.05$). The activities of β-1, 4-glucosidase, cellobiase, and β-1, 4-N-acetylglucosaminidase significantly decreased in the 0－15 cm soil layer with increasing shrub encroachment intensity ($P<0.05$), whereas

收稿日期：2025-11-10；改回日期：2025-12-16
基金项目：国家自然科学基金项目（32301509）和对口支援科研联合基金项目（GSAU-DKZY-2025-004）资助。
作者简介：韩奥（2001－），男，安徽宿州人，在读硕士。E-mail: 15551100949@163. com
*通信作者 Corresponding author. E-mail: xiaoh@gsau. edu. cn

phosphatase activity showed no significant change ($P>0.05$). Enzymatic stoichiometry revealed that the carbon: nitrogen of soil enzymes in all soil layers of shrub patches significantly decreased with increasing shrub encroachment intensity ($P<0.05$). Vector analysis indicated that shrub expansion alleviated microbial carbon limitation in surface soil but intensified nitrogen limitation. Redundancy analysis and the Mantel test further confirmed that total phosphorus, nitrate nitrogen, and the nitrogen: phosphorus in shrub patch soils were key environmental factors driving changes in microbial metabolic limitations. From a microbial metabolism perspective, the results of this study demonstrate that shrub expansion in alpine meadows drives the transformation of belowground ecological processes by reshaping soil nutrient patterns and regulating microbial metabolic strategies. These findings provide an important theoretical basis for ecological assessment and restoration management in alpine meadows.

Key words: shrub encroachment; alpine meadow; soil enzyme activity; microbial metabolic limitation

草地占据了我国国土面积的27.6%,在水源涵养、碳氮固存、生物多样性维持和畜牧业发展等方面发挥着重要作用[1-2]。然而,由于气候变化(如干旱化和大气二氧化碳浓度升高)和人类活动(如过度放牧)的影响,我国草地广泛发生灌丛化(shrub encroachment)现象,即原生草本群落被木本灌木逐渐入侵和替代的过程,且这一过程有进一步加剧的趋势[3]。灌木通过凋落物输入、根系分布及微环境调控等作用,重塑了地下生物地球化学循环的关键过程[4-6]。这些途径驱动了土壤微生物群落结构与功能的重组,进而显著改变了土壤养分循环过程与生态系统功能。

土壤胞外酶是由微生物和植物根系分泌、主导有机质降解与养分转化的关键驱动因子,其活性高低反映了微生物对资源的需求状态,是连接植物、微生物与土壤养分循环的核心环节[7-8]。草地灌丛化对土壤酶活性的影响具有复杂性和多样性,其可能通过改变灌丛斑块内的土壤微生物活性,升高或降低土壤胞外酶的分泌以调节养分循环[9]。丁颖等[10]在黄土高原对未灌丛化和灌丛化草地的土壤酶活性进行比较,发现灌丛化显著提高了草地中土壤葡萄糖苷酶、水解酶、磷酸酶等5种胞外酶的活性;而马文明等[11]在青藏高原东缘的研究则认为,灌丛化草地土壤葡萄糖苷酶、蛋白酶、磷酸酶等5种胞外酶活性均低于未灌丛化草地。上述研究结果的差异性表明,灌丛化对土壤酶活性的影响并非遵循单一模式,而是依赖于其所处的特定生态系统环境[9]。

土壤酶化学计量特征常被用来评估土壤微生物养分利用能力和表征微生物的相对资源限制,反映了土壤微生物生物量与养分吸收和生长效率之间的平衡[12]。Sinsabaugh等[13]的研究表明,在全球尺度上,土壤胞外酶C[lnβ-葡萄糖苷酶(β-glucosidase, BG)]:N[ln亮氨酸氨基肽酶(leucine aminopeptidase, LAP)+N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(β-1,4-N-acetylglucosaminidase, NAG)]:P[ln磷酸酶(phosphatase,AP)]的比值约为1:1:1,该比值可作为评估微生物代谢受能量或养分限制的重要指标。在此基础上,Moorhead等[14]对原有简单酶计量模型进行了改进,提出了矢量分析模型,通过计算土壤酶化学计量比的矢量长度与角度,能够量化土壤微生物对能量(C)和养分(N或P)的相对限制程度,因此在相关研究中得到了广泛应用。有研究得出,在青藏高原东部高寒草甸的灌丛化过程中,灌木扩张显著提升了土壤C:P和N:P,且伴随有机质的不断积累,微生物群落面临的P限制(相对于C和N)将进一步加剧[15]。Zhang等[9]对青藏高原高寒草原灌丛化的研究发现,灌丛化会降低灌丛凋落物质量,提高土壤C:N并减少根际C输入,显著降低土壤微生物C和N含量,进而加剧土壤微生物C和N限制。然而,现有研究大多聚焦于未灌丛化与灌丛化草地的二者对比,关于灌丛化程度加剧这一连续动态过程对土壤微生物代谢策略的影响,尚缺乏清晰的认识。

高寒草甸是我国重要的草地类型,其灌丛化现象虽已广受关注,但该过程所驱动的土壤关键酶活性与微生物代谢限制之间的响应关系,仍缺乏系统性认知。因此,本研究采用空间演替代替时间演替的方法,以东祁连山不同灌丛化程度下的高寒草甸为对象,分析灌丛斑块和草地斑块土壤理化性质、酶活性和微生物代谢限制的差异,探究土壤酶活性对灌丛化程度加剧的响应,为深入解析灌丛化对高寒草甸土壤生态系统功能的影响提供数据支撑,也为东祁连山地区灌丛化草甸的健康管理与可持续发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于甘肃省武威市天祝藏族自治县抓喜秀龙镇(102°32′ E,37°40′ N),地处金强河河谷区域。地势西北高东南低,海拔为3067～3130 m,仅分冷热两季。年平均降水量446 mm,多集中于7—9月。本研究区土壤类型为亚高山灌丛草甸土。植被资源丰富,优势灌木为山生柳(*Salix oritrepha*),伴生灌木有杯腺柳(*Salix cupularis*)和高山绣线菊(*Spiraea alpina*)等。优势草本有珠芽蓼(*Polygonum viviparum*)、藏异燕麦(*Helictotrichon tibeticum*)、垂穗披碱草(*Elymus nutans*)、高山唐松草(*Thalictrum alpinum*)、问荆(*Equisetum arvense*)等。研究区是典型的冬季牧场,其主要利用时段为每年12月初至翌年3月底。

1.2 试验设计

样地面积约为1 km^2,位于海拔3067～3130 m的河谷阶地,该样地是以山生柳灌木为主要优势灌木的高寒灌丛化草甸。试验开始前根据样区内山生柳灌丛化程度的实际情况,选取3种不同灌木覆盖度的样地[16]:轻度灌丛化(10%＜灌木覆盖度≤20%)、中度灌丛化(30%＜灌木覆盖度≤40%)和重度灌丛化(50%＜灌木覆盖度≤60%)依次开展试验(图1),在同一灌丛化样地内设置3个10 m×10 m样方,每个处理设置3次重复。在每个样方中测量并记录所有灌木的数量、高度及冠幅,通过统计样方中所有山生柳灌丛的冠幅和高度确定其均值,根据均值在样方内选择大小合适且具有代表性的山生柳灌丛作为标准株,在其冠层下方设置1个0.5 m×0.5 m的草本样方,同时在距离标准株约2 m处的草地上设置同样规格(0.25 m^2)的草本样方(图1)。本研究在3种灌丛化程度样地内共选取9株代表灌木,最终获得灌丛斑块与草地斑块样方各9个,共计18个样方。

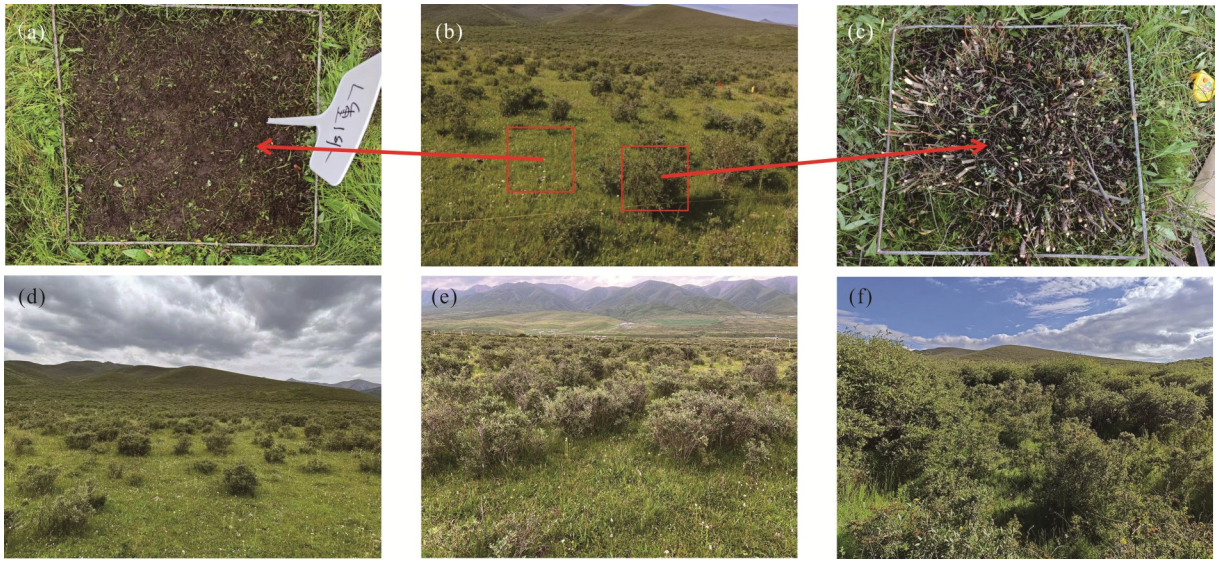

图1 取样位置和山生柳灌木扩张的景观图

Fig. 1 Sampling locations and landscape view of *S. oritrepha* shrub encroachment

a: 草地斑块 Grass patch; b: 取土位置 Soil sampling plots; c: 灌丛斑块 Shrub patch; d: 轻度灌丛化 Light shrub encroachment; e: 中度灌丛化 Moderate shrub encroachment; f: 重度灌丛化 Heavy shrub encroachment.

1.3 土壤样品采集与分析

2024年8月中旬,灌丛斑块和草地斑块内草本样方群落调查结束后,清理样方土壤表面的凋落物,用内径5 cm的土钻分别在灌丛斑块和草地斑块的草本样方内,采用5点取样法[17]钻取0～15 cm、15～30 cm土层土样,同一层土壤混合成1个土壤样品,共计36个土壤样品。混合后的土壤样品过2 mm筛后分为3份,一份当天测定土壤含水量(soil water content, SWC);另一份于－80 ℃冰箱储存用于测定铵态氮(ammonium nitrogen, NH_4^+-N)、硝态氮(nitrate nitrogen, NO_3^--N)、可溶性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)含量和土壤酶活性;剩余土壤自

然风干后过 0.149 mm 筛，用于土壤 pH、有机碳（soil organic carbon，SOC）、全氮（total nitrogen，TN）和全磷（total phosphorus，TP）含量的测定。

1.3.1　土壤理化性质　土壤含水量采用烘干法（105 ℃）[17]测定；土壤 pH 利用酸度计（PB-10，赛多利斯，德国）测定；土壤 TN 采用碳氮自动分析仪（SNC100-IC-E，斯卡拉普利玛克斯，荷兰）测定；参考鲍士旦[17]的《土壤农化分析》测定 4 种土壤理化指标：土壤 TP 通过高氯酸－硫酸消煮后钼锑抗比色法测定；土壤 SOC 和 DOC 含量采用重铬酸钾容量法－外加热法测定；土壤速效磷（available phosphorus，AP）含量采用钼锑抗比色法测定；土壤 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 含量采用全自动间断化学分析仪（Smart Chem 450，AMS 联盟，意大利）测定。

1.3.2　土壤酶活性　利用微孔板荧光法测定土壤碳氮磷循环过程中重要的 5 种酶[18]活性（表 1），其中 β-1，4-葡糖苷酶（β-1，4-glucosidase，BG）和纤维素二糖苷酶（cellobiase，CB）为 C 循环水解酶；β-1，4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶（β-1，4-N-acetylglucosaminidase，NAG）和亮氨酸氨基肽酶（leucine aminopeptidase，LAP）为 N 循环水解酶；磷酸酶（phosphatase，PHOS）为 P 获得酶。水解酶活性测定采用 4-甲基伞形酮（4-methylumbelliferyl，MUB）为底物标示。测试方法：称取 2.75 g 土壤加入 91 mL 乙酸钠缓冲液，向 96 孔板中加入 50 μL 200 μmol·L^{-1}的底物溶液，同时用磁力搅拌器（RH basic，IKA，中国）对土壤悬液进行连续不断地搅拌，吸取 200 μL 加入 96 孔板，然后向另外的 96 孔板中分别加入 50 μL 的 MUB 标准溶液，再加入 200 μL 乙酸钠缓冲液。同时做空白对照（200 μL 缓冲液＋50 μL 底物）。将 96 孔板放到 25 ℃的培养箱中 4 h 后，使用多功能酶标仪（Multi-Mode，伯腾，中国），在 365 nm 的激发波长，450 nm 的检测波长下对不同孔进行荧光强度检测。根据标准曲线换算为 MUB 的浓度，再通过土壤干重和反应时间计算酶活性。

表 1　酶的名称、底物、简称

Table 1　Name，substrate，and abbreviation of enzymes

胞外酶 Extracellular enzyme	底物 Substrate	简称 Abbreviation
β-1，4-葡糖苷酶 β-1，4-glucosidase	4-甲基伞形酮-β-D-吡喃葡萄糖苷 4-methylumbelliferyl-β-D-glucopyranoside	BG
纤维素二糖苷酶 Cellobiaosidase	4-甲基伞形酮-β-D-纤维素二糖苷 4-methylumbelliferyl-β-D-cellobioside	CB
β-1，4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 β-1，4-N-acetyl-glucosaminidase	4-甲基伞形酮-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucos-aminide	NAG
亮氨酸氨基肽酶 Leucine aminopeptidase	L-亮氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素盐酸盐 L-leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride	LAP
磷酸酶 Phosphatase	4-甲基伞形酮-磷酸盐 4-methylumbelliferyl-phosphate	PHOS

1.4　数据处理

酶活性及化学计量特征公式如下[5]：

$$\text{酶活性}=\frac{FV}{\mathrm{e}V_1tm}$$

$$\text{酶 C:N}=\frac{\ln(\mathrm{BG}+\mathrm{CB})}{\ln(\mathrm{NAG}+\mathrm{LAP})}$$

$$\text{酶 C:P}=\frac{\ln(\mathrm{BG}+\mathrm{CB})}{\ln\mathrm{PHOS}}$$

$$\text{酶 N:P}=\frac{\ln(\mathrm{NAG}+\mathrm{LAP})}{\ln\mathrm{PHOS}}$$

通过矢量分析进一步评估土壤微生物养分的相对限制情况，其中向量长度代表相对微生物 C 限制，向量角度代表相对 N/P 限制[14,19]。向量长度和角度按以下公式计算：

$$\text{向量长度（vector length）}=\sqrt{x^2+y^2}$$

$$\text{向量角度（vector angle）}=\mathrm{DEGREES}\left[\mathrm{ATAN2}(x,y)\right]$$

式中：F 为校正后的荧光值，V 为土壤缓冲液的体积，e 为荧光释放系数，V_1 为微孔板每孔中加入悬浊液的体积，t 为培养时间，m 为土壤干质量。x 为 C 与 P 获取酶的相对活性，即 ln（BG＋CB）/ln（BG＋CB＋PHOS），y 为 C 与 N 获取酶的相对活性，即 ln（BG＋CB）/ln（BG＋CB＋NAG＋LAP）。向量长度越长表明相对 C 限制程度越大；向量

角<45°表示相对N限制,角度越小表明相对N限制程度越大,而向量角>45°表示相对P限制,角度越大表明相对P限制程度越大[14,19]。

采用Excel 2021对数据进行初步整理并计算,使用SPSS(version 27.0;IBM,美国)进行单因素方差分析(one-way ANOVA),比较不同灌丛化程度下土壤含水量、pH、全氮、全磷、有机碳、可溶性有机碳、速效磷、铵态氮、硝态氮、土壤酶活性、化学计量比和微生物代谢限制的差异。运用独立样本*T*检验(*T*-test)分析同一灌丛化程度下灌丛斑块与草地斑块间各土壤指标的差异显著性。采用GraphPad(version 8.0.2, GraphPad Software Inc,美国)进行数据作图。使用Canoco 5.0软件对土壤酶活性和酶化学计量比与土壤理化指标进行冗余分析(redundancy analysis),最后在R 4.5.0中使用"vegan"包的Mantel检验方法,评估土壤理化指标与微生物代谢限制之间的相关性。

2 结果与分析

2.1 不同灌丛化程度对土壤理化性质的影响

灌丛化程度加剧改变了土壤理化性质的空间格局,且对草地斑块的整体影响更为突出(表2)。具体而言,随着灌丛化程度加剧,在草地斑块0~15 cm土层中,TN、DOC、NH_4^+-N含量和N:P均呈降低趋势,而轻度灌丛化程度下TP和NO_3^--N含量显著低于重度灌丛化($P<0.05$),土壤SWC、pH、SOC和AP含量在各灌丛化程度间均无

表2 不同灌丛化程度对土壤理化性质的影响

Table 2 Effects of different intensities of shrub encroachment on the soil physicochemical properties

指标 Indicators	土层 Soil layer (cm)	轻度灌丛化 Light shrub encroachment		中度灌丛化 Moderate shrub encroachment		重度灌丛化 Heavy shrub encroachment	
		灌丛斑块 Shrub patch	草地斑块 Grass patch	灌丛斑块 Shrub patch	草地斑块 Grass patch	灌丛斑块 Shrub patch	草地斑块 Grass patch
SWC	0~15	0.75±0.02Aa	0.72±0.02Aa	0.72±0.01Aa	0.75±0.06Aa	0.78±0.08Aa	0.70±0.02Aa
	15~30	0.52±0.09Ab	0.57±0.01Ab	0.61±0.01Aa	0.62±0.02Aab	0.67±0.03Aa	0.67±0.03Aa
pH	0~15	7.12±0.14Aa	7.25±0.13Aa	7.40±0.01Aa	7.25±0.09Aa	6.99±0.04Aa	6.96±0.07Aa
	15~30	7.60±0.06Aa	7.80±0.11Aa	7.63±0.03Aa	7.74±0.02Aa	7.28±0.09Ab	7.22±0.13Ab
SOC (g·kg^{-1})	0~15	108.86±3.18Aa	97.52±4.94Aa	96.89±1.58Ab	97.53±8.10Aa	97.20±2.45Ab	98.03±4.11Aa
	15~30	80.36±2.61Aa	72.95±4.11Aa	70.30±1.01Ab	68.39±1.97Aa	79.22±3.74Aab	84.35±7.98Aa
TN (g·kg^{-1})	0~15	9.28±0.30Aa	9.43±0.13Aa	8.14±0.29Ab	8.60±0.48Aab	7.71±0.34Ab	7.73±0.29Ab
	15~30	7.28±0.41Aa	6.70±0.19Aa	6.61±0.23Aa	6.48±0.39Ba	6.34±0.37Aa	6.60±0.39Aa
TP (g·kg^{-1})	0~15	0.85±0.04Aa	0.77±0.01Bb	0.88±0.02Aa	0.79±0.04Bab	0.93±0.06Aa	0.96±0.08Aa
	15~30	0.69±0.01Ab	0.84±0.06Aa	0.73±0.01Ab	0.86±0.04Aa	0.88±0.03Aa	0.83±0.05Aa
DOC (mg·kg^{-1})	0~15	765.18±9.91Aa	766.70±17.96Aa	704.38±36.80Ba	717.05±71.93Aa	589.67±79.59Aa	520.62±24.87Ab
	15~30	615.34±64.25Aa	572.46±48.89Aa	607.07±16.54Aa	370.59±33.39Ab	516.03±42.94Aa	475.70±28.81Aab
NH_4^+-N (mg·kg^{-1})	0~15	42.10±4.76Aa	67.56±3.54Aa	53.51±5.71Aa	50.32±8.17Aab	42.16±9.48Aa	35.60±6.03Ab
	15~30	22.12±2.49Aa	23.21±3.41Aa	22.34±1.15Aa	21.33±1.81Aa	19.10±1.38Aa	19.08±2.47Aa
NO_3^--N (mg·kg^{-1})	0~15	7.87±2.44Ab	16.24±0.80Ab	12.44±1.57Ab	19.85±2.15Aab	19.08±0.79Aa	21.71±1.08Aa
	15~30	13.58±0.88Ab	11.46±0.53Ac	13.38±0.29Ab	14.78±0.24Ab	18.97±0.85Aa	20.33±0.81Aa
AP (mg·kg^{-1})	0~15	24.43±1.29Aa	26.70±2.24Aa	26.54±1.01Aa	24.19±1.88Aa	24.38±2.58Aa	21.57±1.59Aa
	15~30	15.03±2.15Aa	15.15±1.01Aa	16.74±1.32Aa	12.16±1.35Aa	19.30±2.34Aa	16.49±1.38Aa
C:N	0~15	11.69±1.59Aa	10.35±0.64Ab	11.93±0.72Aa	11.33±0.69Aab	13.69±0.66Aa	12.69±0.26Aa
	15~30	11.11±0.69Ab	10.86±0.32Aa	16.45±2.42Aa	10.67±0.98Aa	12.51±0.35Aab	12.72±0.48Aa
N:P	0~15	10.96±0.92Ba	12.32±0.36Aa	9.27±0.45Aab	10.95±0.48Aa	8.22±0.47Ab	8.11±0.54Ab
	15~30	10.60±0.63Aa	8.12±0.80Aa	9.02±0.36Ab	7.57±0.58Aa	7.23±0.26Ac	8.02±0.46Aa

表中数据均为平均值±标准误差,不同小写字母代表同一斑块内不同灌丛化程度间存在显著差异($P<0.05$),不同大写字母代表同一灌丛化程度下灌丛斑块和草地斑块间存在显著差异($P<0.05$)。All data in the table are presented as mean±standard error. Different lowercase letters indicate significant differences among the intensity of shrub encroachment within the same patches ($P<0.05$). Different uppercase letters indicate significant difference between shrub patches and grass patches under the same shrub encroachment intensity ($P<0.05$).

显著变化($P>0.05$);在草地斑块的15～30 cm土层中,土壤SWC和NO_3^--N含量呈上升趋势,且轻度和中度灌丛化程度下土壤的pH显著高于重度($P<0.05$),而SOC、TN、TP、NH_4^+-N和AP含量在不同灌丛化程度间均无显著变化($P>0.05$)。随着灌丛化程度加剧,在灌丛斑块的0～15 cm土层中,SOC和TN含量呈降低趋势,且在中度和重度灌丛化程度下显著低于轻度($P<0.05$),而SWC、pH、TP、DOC、NH_4^+-N和C∶N均无显著变化($P>0.05$);在灌丛斑块的15～30 cm土层中,轻度和中度灌丛化程度下土壤pH和N∶P显著高于重度灌丛化程度($P<0.05$),但TN、DOC、NH_4^+-N和AP含量在不同灌丛化程度间均无显著变化($P>0.05$)。就灌丛斑块和草地斑块间相比而言,轻度灌丛化程度下灌丛斑块0～15 cm土层土壤TP含量显著高于草地斑块($P<0.05$),而土壤N∶P显著低于草地斑块($P<0.05$);中度灌丛化程度下,灌丛斑块0～15 cm土层土壤TP含量显著高于草地斑块($P<0.05$),而在15～30 cm土层土壤TN含量显著高于草地斑块($P<0.05$)。

2.2　不同灌丛化程度对土壤酶活性的影响

土壤胞外酶活性对灌丛化的响应因斑块类型和土层深度而异(图2)。随着灌丛化程度加剧,在灌丛斑块的0～15 cm土层中,BG、CB、NAG和LAP活性在轻度灌丛化程度下显著高于重度($P<0.05$);在灌丛斑块的15～30 cm土层中,仅BG活性在轻度和中度灌丛化程度下显著低于重度($P<0.05$),而CB、NAG、LAP和PHOS活性

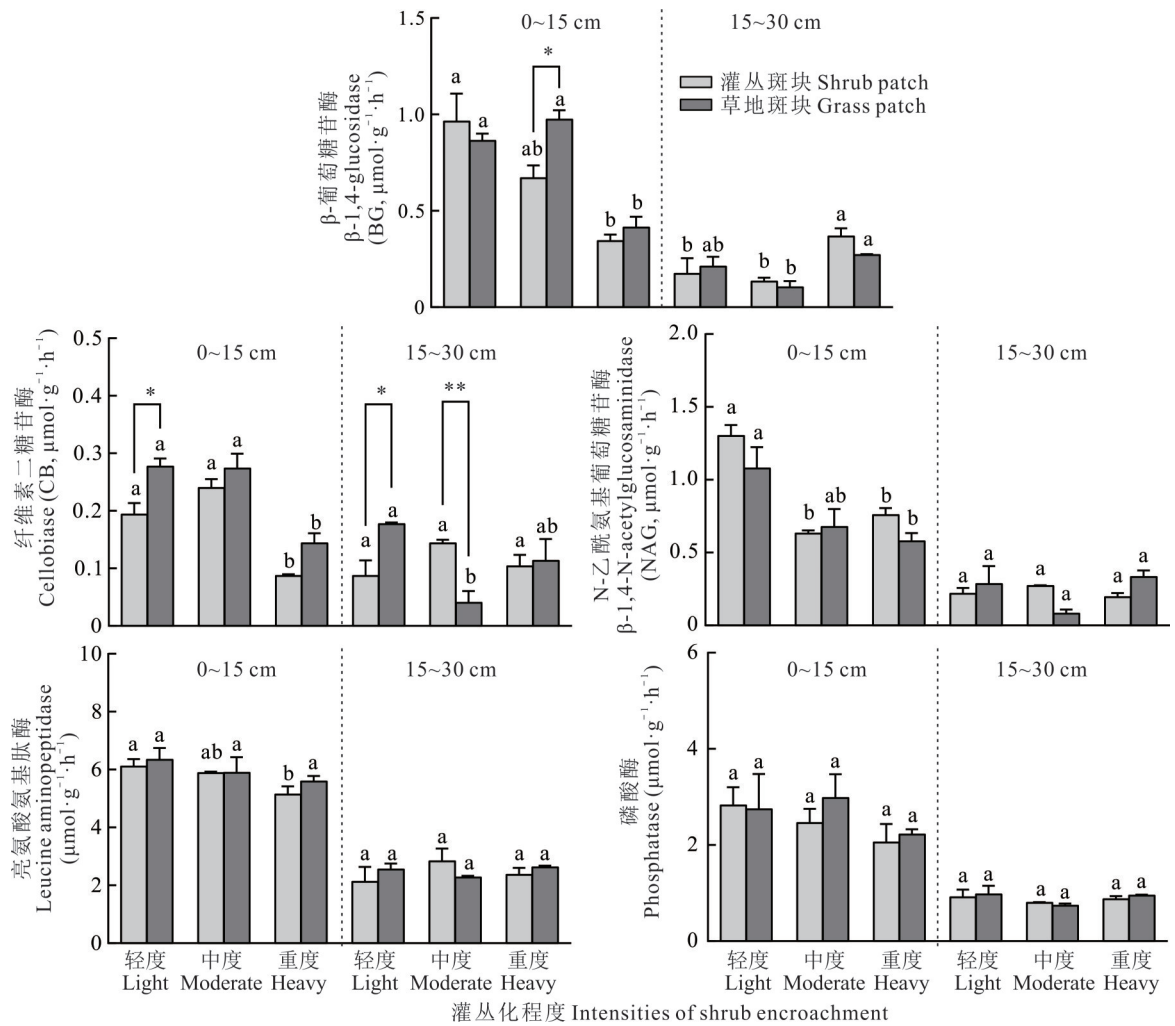

图 2　不同灌丛化程度对土壤酶活性的影响

Fig. 2　Effects of different intensities of shrub encroachment on soil enzyme activities

图中数据均为平均值±标准误差。不同小写字母代表同一斑块内不同灌丛化程度间存在显著差异($P<0.05$),*代表同一灌丛化程度下灌丛斑块和草地斑块间存在显著差异,*: $P<0.05$, **: $P<0.01$,下同。All data in the figure are presented as mean±standard error. Different lowercase letters indicate significant differences among the intensity of shrub encroachment within the same patches ($P<0.05$). * indicate significant difference between shrub patches and grass patches at the same shrub encroachment level, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, the same below.

在不同灌丛化程度间均无显著变化($P>0.05$)。随着灌丛化程度加剧,在草地斑块的0～15 cm土层中,BG、CB和NAG活性在轻度灌丛化程度下显著高于重度($P<0.05$);在草地斑块的15～30 cm土层中,BG活性在重度灌丛化程度下显著高于中度($P<0.05$)。PHOS活性在各处理间均无显著变化($P>0.05$)。就灌丛斑块和草地斑块间相比而言,在轻度灌丛化程度下,灌丛斑块各土层土壤CB活性显著低于草地斑块($P<0.05$);在中度灌丛化程度下,灌丛斑块0～15 cm土层土壤的BG活性显著低于草地斑块($P<0.05$),灌丛斑块15～30 cm土层土壤的CB活性显著高于草地斑块($P<0.05$)。

2.3 不同灌丛化程度对土壤酶化学计量比的影响

土壤酶化学计量比的变化表明,灌丛化进程中微生物的养分需求模式发生了转变(图3)。随着灌丛化程度加剧,灌丛斑块各土层土壤酶C:N在重度灌丛化显著低于轻度和中度($P<0.05$)。草地斑块各土层土壤酶C:N则呈先降后升趋势,其中中度灌丛化显著低于重度($P<0.05$)。在土壤酶C:P方面,灌丛斑块在0～15 cm土层中无显著差异($P>0.05$),而15～30 cm土层土壤酶C:P在轻度和中度灌丛化显著高于重度($P<0.05$);草地斑块0～15 cm土层亦无显著差异,仅在中度灌丛化15～30 cm土层中显著低于重度和轻度($P<0.05$)。草地斑块0～15 cm土层的土壤酶N:P随灌丛化加剧呈先升后降趋势,中度灌丛化显著高于轻度和重度($P<0.05$),而15～30 cm土层中无显著差异($P>0.05$)。对比灌丛斑块与草地斑块发现,在轻度和中度灌丛化下,草地斑块0～15 cm土层土壤酶C:N显著低于灌丛斑块($P<0.05$),但至重度灌丛化时则显著高于灌丛斑块($P<0.05$);在中度灌丛化程度下,草地斑块15～30 cm土层土壤酶C:N显著低于灌丛斑块($P<0.05$)。此外,中度灌丛化程度下,草地斑块0～15 cm土层的土壤酶C:P和N:P均显著高于灌丛斑块($P<0.05$)。

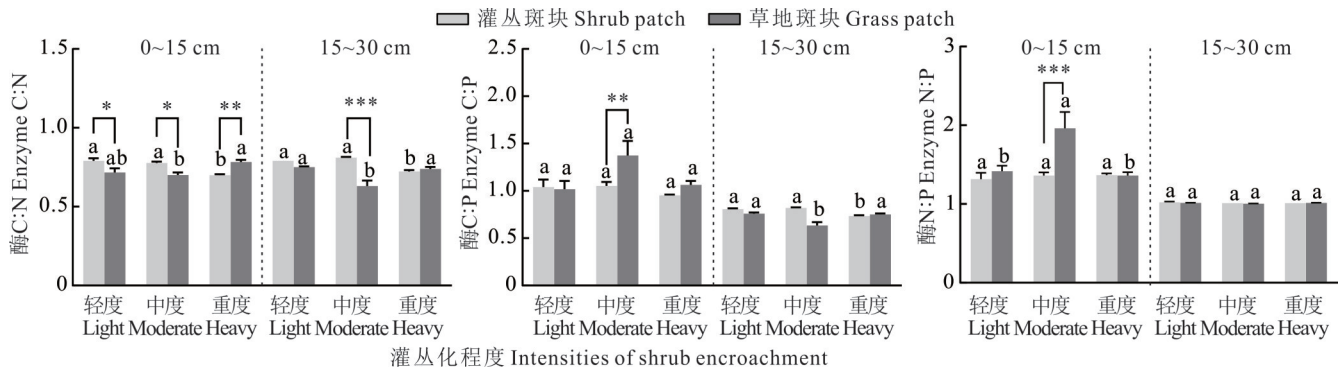

图3 不同灌丛化程度对土壤碳、氮、磷获得酶化学计量比的影响

Fig. 3 Effects of different intensities of shrub encroachment on the stoichiometric ratio of soil C, N and P extracellular enzymes

***: $P<0.001$. 下同 The same below.

2.4 不同灌丛化程度对土壤微生物代谢限制的影响

采用矢量分析评估了不同灌丛化程度下土壤微生物的C与养分(N/P)限制状况(图4),结果显示,所有处理的向量角度(vector angle, VA)均小于45°,表明微生物普遍受氮限制,但其碳限制强度在不同斑块和土层中呈现差异。具体而言,随着灌丛化程度加剧,灌丛斑块0～15 cm土层的VA呈下降趋势,且重度灌丛化程度显著低于轻度和中度($P<0.05$);草地斑块0～15 cm土层的VA仅在中度灌丛化程度下显著低于轻度和重度($P<0.05$)。灌丛斑块15～30 cm土层的VA无显著差异,而草地斑块在该土层的VA呈先升后降趋势,中度灌丛化显著高于重度($P<0.05$)。在表征碳限制的向量长度(vector length, VL)方面,灌丛斑块0～15 cm土层VL随灌丛化加剧而降低,15～30 cm土层土壤VL呈先升后降趋势,重度灌丛化程度均显著低于轻度和中度($P<0.05$);草地斑块15～30 cm土层的VL则呈先降后升趋势,中度灌丛化显著低于轻度和重度($P<0.05$)。斑块间比较显示,在轻度和中度灌丛化下,灌丛斑块0～15 cm土层的VA显著高于草地斑块($P<0.05$),而在重度灌丛化下则显著低于草地斑块($P<0.05$);中度灌丛化程度下灌丛斑块15～30 cm土层土壤的VL显著高于草地斑块($P<0.05$)。

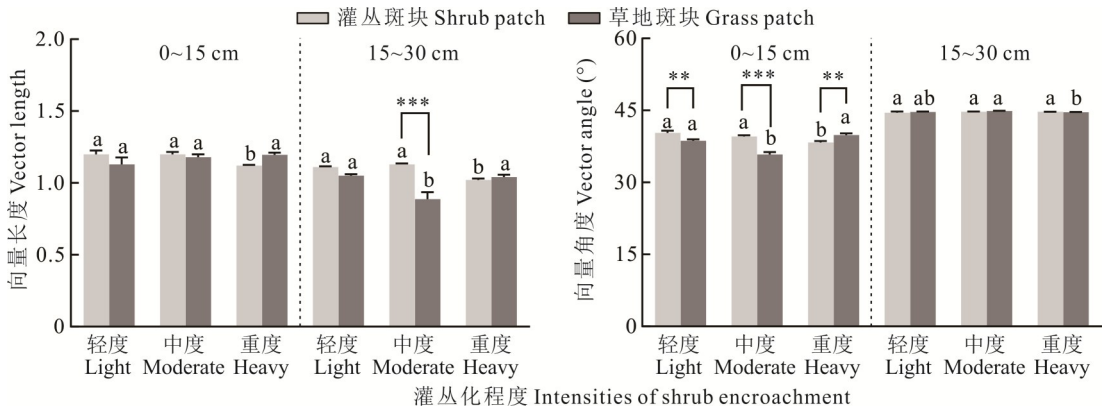

图 4　矢量分析不同灌丛化程度对土壤微生物代谢限制的影响

Fig. 4　Vector analysis of the effects of soil microbial metabolic limitation under different intensities of shrub encroachment

2.5　土壤理化性质与酶活性及其化学计量比、微生物代谢限制间的关系

冗余分析(RDA)结果表明(图 5 和表 3),土壤理化性质对酶活性及化学计量比的解释度因斑块类型和土层而异。在灌丛斑块中,0～15 cm 土层的解释度为 83.38%,其中 TN 的相对解释度最高,为 28.3%;该土层 TN、SOC 含量与 BG、NAG 和 LAP 活性呈显著正相关关系,且 SOC 与 TN 亦显著正相关。在灌丛斑块 15～30 cm 土层,解释度为 72.06%,SWC 为主要解释因子(解释度为 29.1%)。在草地斑块中,0～15 cm 土层的解释度为 72.44%,TP 为关键因子(解释度为 19.6%),且土壤 C∶N 与酶 C∶N 呈显著正相关关系;15～30 cm 土层的解释度为 93.96%,其中土壤 AP 的解释度达 33.9%,且 AP 与 NAG、LAP、PHOS 活性及酶 N∶P 均呈显著正相关关系。

为明确土壤理化性质与微生物代谢限制之间的关系,进一步对两者进行 Mantel 检验(图 6)。结果显示,在灌丛斑块 0～15 cm 土层中,VL 与土壤 TN、TP、NO_3^--N 含量及土壤 N∶P 显著相关($P<0.05$);而在 15～30 cm 土层,VL 与土壤 pH、TP、NO_3^--N 含量及土壤 C∶N 显著相关($P<0.05$)。在草地斑块中,0～15 cm 土层的 VL 和 VA 与所测土壤理化指标均无显著相关性($P>0.05$);15～30 cm 土层的 VA 则与土壤 TP 含量及土壤 N∶P 显著相关($P<0.05$)。

3　讨论

3.1　土壤理化性质对不同灌丛化程度的响应

灌木通过冠层遮阴、凋落物输入和根系活动等过程,调控微环境、重塑土壤结构并改变养分分布,从而深刻改变了土壤理化性质的时空格局[20-22]。但灌丛化对土壤养分库的影响尚未形成统一结论。例如,Knapp 等[23]在北美干旱草原的研究中发现,灌丛化可促使土壤 SOC 含量显著上升。包段红等[24]在高寒草甸地区的研究表明,以金露梅(*Potentilla fruticosa*)为优势灌木的灌丛化并没有对土壤 SOC 和 TN 含量产生显著影响。Liu 等[25]在高寒草甸地区的研究发现,以锦鸡儿(*Caragana sinica*)为优势灌木的灌丛化显著增加了土壤 SOC 和 TN 的含量。本研究观察到,随着山生柳灌木的不断扩张,灌丛斑块 0～15 cm 土层的土壤 SOC 和 TN 含量呈下降趋势,且在中度和重度灌丛化下显著低于轻度灌丛化,而草地斑块中 SOC 含量没有发生显著变化(表 2)。这可能是因为山生柳灌木扩张强烈抑制了冠层下草本生长,导致其高碳氮输入锐减,且灌木凋落物不足以弥补此缺口,最终导致 SOC 和 TN 含量下降[26-27],草地斑块受灌木影响较小,故 SOC 含量保持稳定。此外,本研究还发现,灌丛化程度加剧导致草地斑块 0～15 cm 土层中 NO_3^--N 含量显著上升($P<0.05$),土壤 NO_3^--N 含量的积累可能意味着灌丛化程度加剧改变了土壤氮素转化与可利用性,进而影响植被竞争和群落组成以及土壤 N 循环速率。这与舒向阳等[28]在高寒草甸灌丛化中的研究结果一致,可能是由于山生柳灌木根系发达,根系生长改善了土壤通气条件,为硝化细菌提供了充足的氧气和适宜的微环境[29],在此条件下,土壤有机氮经矿化作用转化为 NH_4^+-N,再通过硝化作用形成 NO_3^--N,最终促使 NO_3^--N 含量显著积累[30]。SWC 是草地调节水分和涵养水源的重要指标,其对灌丛化程度加剧的动态响应揭示了斑块间水分利用的竞争关系[24,31]。本研究中,在 0～15 cm 土层,灌丛斑块和草地斑块的

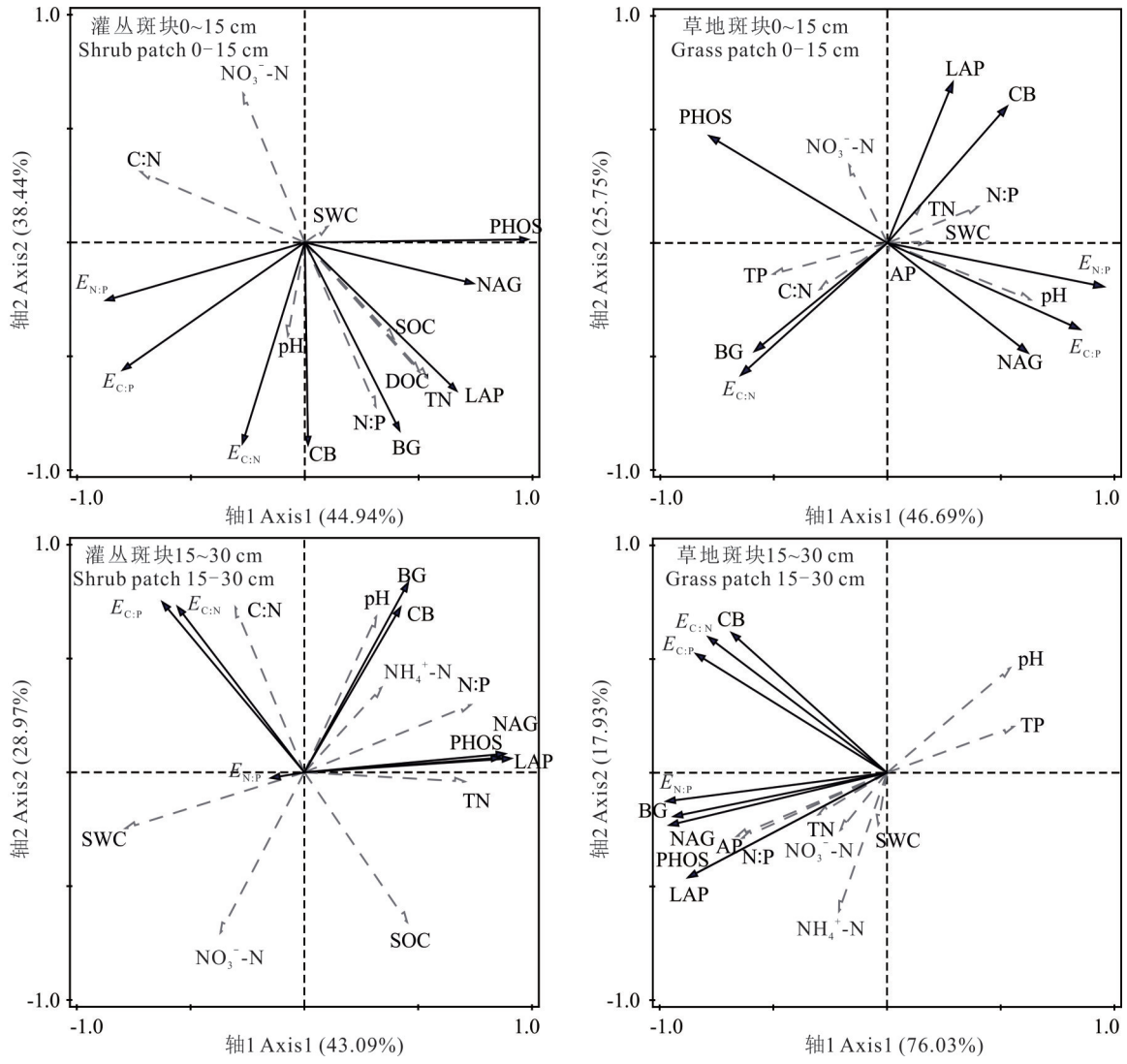

图 5 土壤理化性质与酶活性及计量比之间的关系

Fig. 5 Relationships between soil physicochemical properties and enzyme activities and stoichiometric ratios

$E_{C:N}$: 酶碳氮比 Enzyme C:N; $E_{C:P}$: 酶碳磷比 Enzyme C:P; $E_{N:P}$: 酶氮磷比 Enzyme N:P.

表 3 土壤酶活性及计量比和土壤理化因子冗余分析排序相关系数

Table 3 Correlation coefficients between soil enzyme activities and stoichiometric ratios and redundancy analysis ordering of soil physicochemical factors

取样位置 Sampling plot	土层 Soil layer (cm)	变量 Variable	贡献度 Contribution (%)	*F*值 *F*-value	*P*值 *P*-value	取样位置 Sampling plot	土层 Soil layer (cm)	变量 Variable	贡献度 Contribution (%)	*F*值 *F*-value	*P*值 *P*-value
灌丛斑块 Shrub patch	0～15	TN	28.3	2.8	0.038	草地斑块 Grass patch	0～15	TP	19.6	1.7	0.154
		N:P	22.6	2.8	0.064			NO_3^--N	13.2	1.2	0.356
		C:N	10.4	1.7	0.146			pH	14.9	1.4	0.268
		NO_3^--N	5.6	0.9	0.260			C:N	13.7	1.4	0.278
	15～30	SWC	29.1	2.9	0.038		15～30	AP	33.9	3.6	0.074
		NO_3^--N	20.5	2.4	0.056			TP	31.3	5.4	0.018
		C:N	17.3	2.6	0.074			NH_4^+-N	10.1	2.1	0.174
		TN	9.8	1.3	0.152			NO_3^--N	14.8	6.0	0.058

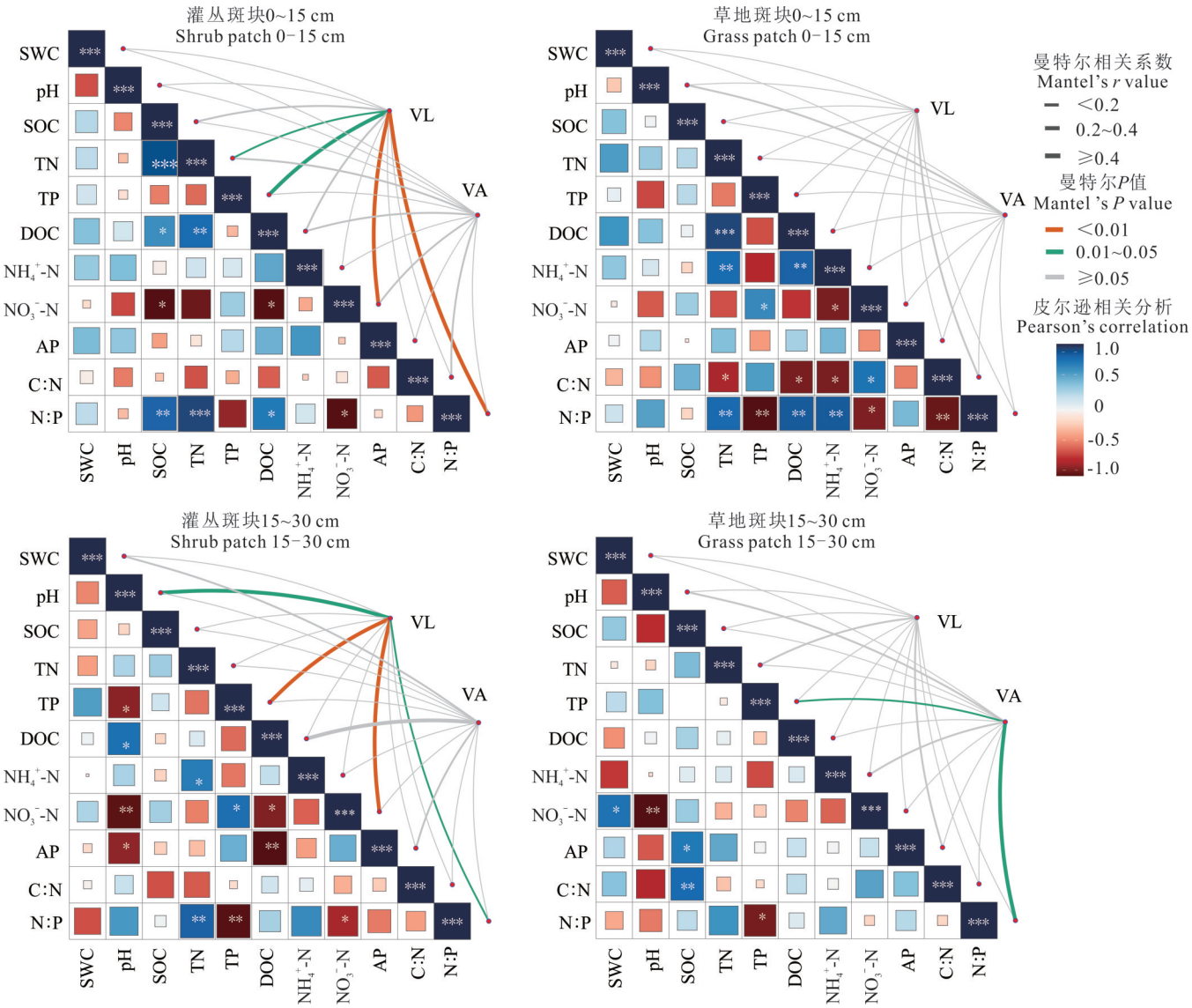

图 6　土壤理化性质与微生物代谢限制之间的关系

Fig. 6　Relationship between soil physico-chemical properties and microbial metabolism limitations

VL：向量长度 Vector length；VA：向量角度 Vector angle.

SWC 均无显著变化，这与 Liu 等[31]在高寒草甸灌木扩张中的研究结果一致。而在 15～30 cm 土层，两种斑块的 SWC 均随灌丛化程度加剧而呈上升趋势，且在重度灌丛化程度下显著高于轻度（表 2，$P<0.05$），这反映了灌木对土壤水分垂直分布的重新分配[24,31]，可能是因为随着灌丛化程度加剧，灌木的深根系增加了对深层土壤水分的截留并配合冠层抑制蒸发，共同导致中层土壤水分的相对富集[24]。同时，草地斑块 15～30 cm 土层水分的上升可能与整体植被盖度变化和地表蒸发减弱有关[31]。

3.2　土壤微生物碳氮代谢限制对不同灌丛化程度的响应

土壤胞外酶活性及其计量比是揭示微生物养分代谢限制的关键指标[30-33]。本研究发现，与轻度灌丛化相比，重度灌丛化灌丛斑块 0～15 cm 土层的 BG、CB、NAG 和 LAP 活性均显著降低，且草地斑块 0～15 cm 土层的 NAG 和 LAP 活性亦随灌丛化加剧而显著降低（$P<0.05$，图 2）。这些结果与张东等[27]、包段红等[24]的研究结果类似，均表明灌木扩张普遍抑制了浅土层的土壤 C 和 N 获取酶活性。Liao 等[34]对灌木扩张的研究为这一结果提供了有力支撑，其研究发现草甸和灌木都会有凋落物形成，但草甸凋落物更适合做微生物基质和土壤酶催化底物，随着灌丛化加剧，植被根系密集度降低，可供给土壤的腐殖质和凋落物减少，最终影响了微生物数量，降低了酶活

性[25,30]。本研究还发现,在15～30 cm土层,灌丛斑块的BG活性随灌丛化加剧呈上升趋势。这与张东等[35]的研究结果一致。这可能是因为灌木的深根系策略驱动了深层土壤的碳循环,其根系分泌物与细根周转为微生物提供了易利用碳源,从而特异性地提升了BG活性[36]。相比之下,CB活性未发生显著变化,这可能是因为CB主要参与凋落物中纤维素的分解[37],而深层土壤中凋落物输入极少,其活性主要受限于底物而非微生物本身的缘故[30,34]。

本研究结果显示灌丛斑块0～15 cm土层土壤酶C:N从轻度的0.79、中度的0.78降至重度的0.70,这说明N获取酶活性随灌丛化程度加剧而呈相对升高趋势,且0～15 cm土层的VA均小于45°(图4),表明微生物在整个灌丛化梯度上主要受到氮限制。这与Ding等[21]的研究结果一致,可能是因为灌丛化加剧导致微生物将代谢资源优先分配给氮获取酶,使得碳获取酶投资相对减少。这一资源重分配过程直接降低了微生物对C的表观需求强度,标志着其代谢策略从C限制向N限制的系统性转型[37]。本研究中灌丛斑块土壤TN含量和N:P的显著下降均支持了这一结论。然而,Ren等[38]的研究表明,高寒草甸土壤微生物主要受P制约。这可能是因为灌木的存在使得土壤表面聚集了大量凋落物,而N元素的主要来源是植被凋落物中被微生物腐化和分解的产物[39],这使得未发生灌丛化与灌丛化的高寒草甸之间土壤有机质含量产生了一定的差异。另一方面,本研究矢量分析还发现,重度灌丛化程度下灌丛斑块0～15 cm土层土壤VL显著低于轻度和中度灌丛化,表明灌丛化程度加剧在一定程度上缓解了土壤微生物的C限制。这可能是因为在N成为首要限制因子的背景下,微生物根据资源分配理论减少了对C获取酶(如BG和CB)的合成,以优化资源利用[40],同时,土壤有机质矿化速率减弱,降低了对易分解低分子C的需求,表现为C限制程度减弱[41-42]。

土壤有效养分可调控胞外酶分泌,是影响微生物代谢限制的重要因素[43-44]。本研究中RDA结果显示,在0～15 cm土层,土壤TN不仅是解释酶活性与化学计量比变异的最强因子(解释度28.3%,图5和表3),还通过Mantel检验发现,它与表征C限制强度的VL显著相关($P<0.05$,图6)。这可能是因为灌丛化加剧导致土壤TN与SOC同步下降,使微生物在面临N限制时,无法支持其分泌N获取酶(如NAG和LAP)的能量消耗,最终导致整体代谢活性受抑,表现为VA值降低[45-46]。随着土层加深,灌丛斑块中15～30 cm土层的SWC成为解释酶活性与化学计量比变异最高的因子(29.1%,图5和表3),这表明在深层土壤中,SWC成为影响酶活性扩散、底物可利用性和微生物群落活性的首要限制因子[40]。同时,灌丛斑块15～30 cm土层VL与土壤pH、NO_3^--N和TP的显著关联(图6),表明了土壤环境酸碱度和底物质量对微生物代谢的深层调控作用[46]。然而,在草地斑块15～30 cm土层中,土壤AP成为解释酶活性与化学计量比变异的主导因子(解释度35.1%,图5和表3),并且与NAG、LAP、PHOS活性及酶N:P均呈显著正相关关系($P<0.05$,图6)。这表明在草地斑块的15～30 cm土层中,P有效性成为该土层N循环转化的核心驱动因子[46-47]。Wu等[48]在黄土高原的研究同样指出,土壤AP含量是调控微生物C、P限制的关键变量,且速效养分可作为指示微生物养分限制演变规律的关键指标。这可能是因为植物根系和微生物在表层竞争N素,导致养分向深层迁移或重新分布,从而增强了深层土壤微生物对磷的敏感性[49]。

4 结论

本研究评估了东祁连山高寒草甸灌丛化进程对土壤酶活性和微生物代谢限制的影响。结果表明,高寒草甸灌丛化通过改变土壤养分库与理化环境,影响了土壤微生物的代谢平衡。具体而言,随着灌丛化程度加剧,在灌丛斑块中,微生物代谢限制由碳限制逐渐转向强烈的氮限制;而在草地斑块中,该变化趋势则更为复杂,且中度灌丛化常表现出明显的过渡或转折特征。这种差异主要源于不同斑块类型下土壤有机碳、全氮、硝态氮等关键因子对微生物酶合成与代谢的差异化调控。研究结果从微生物代谢限制的视角揭示了灌丛化对高寒草甸地下生态过程的深层影响,为评估灌丛化生态效应及高寒草甸的可持续管理提供了重要的理论依据。

参考文献 References:

[1] Wu W H. Strengthen the basic research of grassland sciences to promote the construction of ecological civilization and the

sustainable development. Bulletin of National Natural Science Foundation of China, 2023, 37(4): 527.
武维华. 加强草学基础理论研究服务国家生态文明建设. 中国科学基金, 2023, 37(4): 527.

[2] Orwin K H, Ostle N, Wilby A, *et al*. Effects of species evenness and dominant species identity on multiple ecosystem functions in model grassland communities. Oecologia, 2014, 174(3): 979-992.

[3] Eldridge D J, Bowker M A, Maestre F T, *et al*. Impacts of shrub encroachment on ecosystem structure and functioning: towards a global synthesis. Ecology Letters, 2011, 14(7): 709-722.

[4] Yang W, Qu G P, Kelly A R, *et al*. Positive effects of leguminous shrub encroachment on multiple ecosystem functions of alpine meadows and steppes greatly depended on increasing soil nutrient. Catena, 2023, 236: 107745.

[5] Zhao J X, Yang W, Ji S A , *et al*. Shrub encroachment increases soil carbon and nitrogen stocks in alpine grassland ecosystems of the central Tibetan Plateau. Geoderma, 2023, 433: 116468.

[6] Hou H Y, Zhou J W, Liu H J, *et al*. Advances in the study of shrub-herbs interaction of shrub encroachment in grassland. Chinese Journal of Grassland, 2024, 46(5): 132-141.
侯慧扬, 周建伟, 刘慧娟, 等. 草原灌丛化过程灌木-草本植物相互作用研究进展. 中国草地学报, 2024, 46(5): 132-141.

[7] Cameron W, Franz S B, Franco W, *et al*. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(14): 5266-5270.

[8] Zuo Y P, Zhang X Y, Zeng H, *et al*. Spatiotemporal dynamics of soil extracellular enzyme activity and its influence on potential mineralization rate of soil organic carbon in forests of Daxing'an Mountain range. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 2018, 54(6): 1311-1324.
左宜平, 张馨月, 曾辉, 等. 大兴安岭森林土壤胞外酶活力的时空动态及其对潜在碳矿化的影响. 北京大学学报(自然科学版), 2018, 54(6): 1311-1324.

[9] Zhang T, Ma W M, Tian Y, *et al*. The mitigation of microbial carbon and nitrogen limitations by shrub encroachment: extracellular enzyme stoichiometry of the alpine grassland on the Qinghai-Tibetan Plateau. Biogeochemistry, 2023, 165(2): 205-225.

[10] Ding Y, Liu X W, Guo L, *et al*. Effects of shrub encroachment on soil organic carbon, nitrogen and phosphorus nutrients, and enzyme activity in Loess Plateau. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2024, 44(5): 243-250, 261.
丁颖, 刘小伟, 郭梁, 等. 黄土高原草地灌丛化对土壤有机碳、氮磷养分及酶活性的影响. 水土保持通报, 2024, 44(5): 243-250, 261.

[11] Ma W M, Liu C W, Zhou Q P, *et al*. Effects of shrub encroachment on soil aggregate ecological stoichiometry and enzyme activity in alpine grassland. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(1): 57-68.
马文明, 刘超文, 周青平, 等. 高寒草地灌丛化对土壤团聚体生态化学计量学及酶活性的影响. 草业学报, 2022, 31(1): 57-68.

[12] Sinsabaugh R L, Hill B H, Shah J J F. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. Nature, 2009, 462(7274): 795-798.

[13] Sinsabaugh R L, Lauber C, Weintraub M N, *et al*. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. Ecology Letters, 2008, 11(11): 1252-1264.

[14] Moorhead D L, Sinsabaugh R L, Hill B H, *et al*. Vector analysis of ecoenzyme activities reveal constraints on coupled C, N and P dynamics. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 93: 1-7.

[15] Jia B, Jia L, Mou X M, *et al*. Shrubification decreases soil organic carbon mineralization and its temperature sensitivity in alpine meadow soils. Soil Biology and Biochemistry, 2022, 168: 108651.

[16] Zhang Q, Feng K, Chang Z H, *et al*. Effects of shrub encroachment on plant and soil microbial in the forest-grassland ecotone. Chinese Journal of Plant Ecology, 2023, 47(6): 770-781.
张琦, 冯可, 常智慧, 等. 灌丛化对林草交错带植物和土壤微生物的影响. 植物生态学报, 2023, 47(6): 770-781.

[17] Bao S D. Soil agrochemical analysis (The Third Edition). Beijing: China Agriculture Press, 2000.
鲍士旦. 土壤农化分析(第3版). 北京: 中国农业出版社, 2000.

[18] 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.

[19] Moorhead D L, Rinkes Z L, Sinsabaugh R L, *et al*. Dynamic relationships between microbial biomass, respiration, inorganic nutrients and enzyme activities: informing enzyme-based decomposition models. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 223.

[20] Liu X, Zhuang Q L, Lai L M, *et al*. Soil water use sources and patterns in shrub encroachment in semiarid grasslands of Inner Mongolia. Agricultural and Forest Meteorology, 2021, 308: 108579.

[21] Ding L L, Wang P C, Zhang W, *et al*. Shrub encroachment shapes soil nutrient concentration, stoichiometry and carbon storage in an abandoned subalpine grassland. Sustainability, 2019, 11(6): 1732.

[22] Long J X, Chen L, Pang D B, *et al*. Effects of shrub encroachment on grassland vegetation communities in desert grasslands of eastern Ningxia. Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(11): 5568-5581.
龙进潇, 陈林, 庞丹波, 等. 灌丛化对宁夏东部荒漠草原草地植被群落的影响. 生态学报, 2025, 45(11): 5568-5581.

[23] Knapp A K, Briggs J M, Collins S L, *et al*. Shrub encroachment in North American grasslands: shifts in growth form dominance rapidly alters control of ecosystem carbon inputs. Global Change Biology, 2008, 14(3): 615-623.

[24] Bao D H, Sun X M, Zhang Z M, *et al*. Effects of shrub encroachment of alpine meadows on vegetation community structure and soil physicochemical properties. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(14): 6208-6218.
包段红, 孙小妹, 张志明, 等. 祁连山东缘高寒草甸灌丛化对植被群落与土壤理化特性的影响. 生态学报, 2024, 44(14): 6208-6218.

[25] Liu L, Zhao G, Yao D J, *et al*. Precipitation regulates soil organic carbon affected by shrub encroachment along the altitude gradient. Catena, 2025, 249: 108616.

[26] Hungate B A, Dukes J S, Shaw M R, *et al*. Nitrogen and climate change. Atmospheric Science, 2003, 302(5650): 1512-1513.

[27] Zhang D, Liu J Q, Ma W M, *et al*. Effects of shrub encroachment on soil organic carbon components in Qinghai-Xizang alpine grassland. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(6): 1810-1821.
张东, 刘金秋, 马文明, 等. 灌丛化对高寒草地土壤有机碳组分的分异研究. 土壤学报, 2023, 60(6): 1810-1821.

[28] Shu X Y, Hu Y F, He J, *et al*. Effect of *Salix cupularis* shrubs on soil nitrogen in the alpine sandy land of Northwest Sichuan. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(7): 55-61.
舒向阳, 胡玉福, 何佳, 等. 川西北高寒沙地不同大小高山柳对土壤氮素的影响. 草业学报, 2017, 26(7): 55-61.

[29] Cao L Y, Zhang L, Jiang X J, *et al*. Distribution of soil nitrification within soil aggregates and the effects of tillage on it. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2009, 31(5): 141-147.
曹良元, 张磊, 蒋先军, 等. 土壤硝化作用在团聚体中的分布以及耕作的影响. 西南大学学报(自然科学版), 2009, 31(5): 141-147.

[30] Bagyaraj D J. Soil microbiology and biochemistry. Applied Biological Research, 2010, 12(2): 81-82.

[31] Liu Y F, Fang H, Shi J J, *et al*. Climate change-induced shrub encroachment changes soil hydraulic properties and inhibits herbaceous growth in alpine meadows. Agricultural and Forest Meteorology, 2023, 340: 109629.

[32] Xu W W, Zhao Y Q, Wang N, *et al*. Effects of artificial cyanobacterial crusts on enzyme activities and recovery rate of surface soil in sandy areas. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(7): 2856-2864.
许文文, 赵燕翘, 王楠, 等. 人工蓝藻结皮对沙区表层土壤酶活性及其恢复速率的影响. 生态学报, 2023, 43(7): 2856-2864.

[33] Chen H, Ma W M, Wang C T, *et al*. Effects of shrub-encroached grassland on the stability of soil aggregates and cementing materials in alpine grassland of Qinghai-Tibet plateau. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(1): 151-163.
陈红, 马文明, 王长庭, 等. 高寒草地灌丛化对土壤团聚体稳定性及其胶结物质的影响. 土壤学报, 2023, 60(1): 151-163.

[34] Liao J D, Boutton T W. Soil microbial biomass response to woody plant invasion of grassland. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 40(5): 1207-1216.

[35] Zhang D, Hou C, Ma W M, *et al*. Study on soil enzyme activities under shrub encroachment gradients in alpine grassland. Acta Prataculturae Sinica, 2023, 32(9): 79-92.
张东, 侯晨, 马文明, 等. 高寒草地不同灌丛化梯度下土壤酶活性研究. 草业学报, 2023, 32(9): 79-92.

[36] Gu J X, Guo T D, Wang H M, *et al*. Responses of soil microbes across an anthropogenic transition from desert steppe grassland to shrubland in eastern Ningxia. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(4): 46-57.
顾继雄, 郭天斗, 王红梅, 等. 宁夏东部荒漠草原向灌丛地转变过程土壤微生物响应. 草业学报, 2021, 30(4): 46-57.

[37] Li Y, Niu S L, Yu G R. Aggravated phosphorus limitation on biomass production under increasing nitrogen loading: a meta-analysis. Global Change Biology, 2016, 22(2): 934-943.

[38] Ren Z W, Li Q, Chu C J, *et al*. Effects of resource additions on species richness and ANPP in an alpine meadow community.

Journal of Plant Ecology, 2010, 3(1): 25－31.

[39] Pekin B K, Boer M M, Wittkuhn R S, *et al*. Plant diversity is linked to nutrient limitation of dominant species in a world biodiversity hotspot. Journal of Vegetation Science, 2012, 23(4): 745－754.

[40] Olander L P, Vitousek P M. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. Biogeochemistry, 2000, 49(2): 175－190.

[41] Zhu L, Zhang M Y, Gao Y H. Response of soil organic carbon mineralization to water and nitrogen addition in alpine steppe. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2020, 40(1): 30－37.
朱灵, 张梦瑶, 高永恒. 高寒草原土壤有机碳矿化对水氮添加的响应. 水土保持通报, 2020, 40(1): 30－37.

[42] Jiang L, Kou L, Li S G. Decomposition of leaf mixtures and absorptive-root mixtures synchronously changes with deposition of nitrogen and phosphorus. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 138: 107602.

[43] Bowles T M, Acosta-Martínez V, Calderón F, *et al*. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 68: 252－262.

[44] Xiao H, Jing Y Y, Xu C L, *et al*. The effects of spring rest-grazing on soil extracellular enzyme activities and microbial metabolic limitation in alpine meadows of the Eastern Qilian Mountains. Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(17): 8614－8626.
肖红, 景媛媛, 徐长林, 等. 春季休牧对东祁连山高寒草甸土壤胞外酶活性和微生物代谢限制的影响. 生态学报, 2025, 45(17): 8614－8626.

[45] Brandt J S, Haynes M A, Kuemmerle T, *et al*. Regime shift on the roof of the world: Alpine meadows converting to shrublands in the southern Himalayas. Biological Conservation, 2013, 158: 116－127.

[46] Jiao F, Xia X, Wu J J, *et al*. Inhibited enzyme activities in soil macroaggregates contribute to enhanced soil carbon sequestration under afforestation in central China. Science of the Total Environment, 2018, 640(1): 653－661.

[47] Wang R, Chen S Y, Chen Z Q, *et al*. Effects of root exudates on key processes of soil nitrogen cycling: A review. Crops, 2021(6): 1－8.
王锐, 陈士勇, 陈志青, 等. 根系分泌物对根际土壤关键氮转化过程的影响. 作物杂志, 2021(6): 1－8.

[48] Wu Y, Chen W J, Li Q, *et al*. Ecoenzymatic stoichiometry and nutrient limitation under a natural secondary succession of vegetation on the Loess Plateau, China. Land Degradation & Development, 2021, 32(1): 399－409.

[49] Yvonne U, Judith N, Jiang Y F, *et al*. Soil C, N and P bioavailability and cycling following amendment with shrub willow chips. Canadian Journal of Soil Science, 2023, 103(3): 428－445.