

铜污染胁迫条件下农田土壤酶活性及微生物多样性对大气 CO₂ 浓度升高的响应

王 静¹, 田 然¹, 周 辉¹, 朱建国², 尹 颖¹, 王晓蓉¹, 郭红岩^{1,2}

(1.污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210093; 2.中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008)

摘 要:在开放式大气 CO₂ 浓度升高平台上(Free-Air CO₂ Enrichment, 简称 FACE), 采用盆栽实验, 研究了不同浓度 Cu 污染胁迫条件下, 稻麦轮作土壤中土壤酶活性及土壤微生物多样性对大气 CO₂ 浓度升高的响应。结果表明, 大气 CO₂ 浓度升高显著诱导了清洁土壤中蛋白酶、脲酶、尿酸酶活性以及微生物多样性; 正常大气和大气 CO₂ 浓度升高条件下, 3 种酶活性都随着土壤 Cu 污染胁迫的增加而逐渐降低; 低浓度 Cu 污染胁迫条件下(50 mg·kg⁻¹), FACE 圈中的土壤脲酶和蛋白酶活性显著高于正常大气(Ambience)圈, 尿酸酶活性无显著变化; 高浓度 Cu 污染胁迫条件下(400 mg·kg⁻¹), 土壤脲酶与蛋白酶活性无显著变化, 尿酸酶活性则显著降低, 其原因可能与不同酶系对铜污染胁迫的敏感差异性以及大气 CO₂ 浓度升高对土壤中铜的活化作用有关。与清洁土壤相比, 低浓度 Cu 污染(50 mg·kg⁻¹)对微生物生长具有一定的刺激作用, Ambience 圈和 FACE 圈土壤微生物多样性都有所增加, FACE 圈中这种现象更为明显; 高浓度 Cu 污染胁迫(400 mg·kg⁻¹)对土壤微生物表现出了明显的毒害作用, 微生物多样性有所降低, 但在 FACE 圈中土壤微生物多样性的降低程度要低于 Ambience 圈, 其影响机制有待进一步研究。

关键词:CO₂ 浓度升高; 铜; 土壤酶; 土壤微生物

中图分类号:X171.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)09-1706-06

Response of Soil Enzymes and Microbial Communities to Elevated Concentration of Atmospheric CO₂ Under Stress of Cu Pollution

WANG Jing¹, TIAN Ran¹, ZHOU Hui¹, ZHU Jian-guo², YIN Ying¹, WANG Xiao-rong¹, GUO Hong-yan^{1,2}

(1.State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Science, Nanjing 210008, China)

Abstract: The effects of elevated CO₂ on soil enzyme activity and microbial diversity under Cu pollution stress were studied in soil with rice-wheat rotation cropping in China FACE(Free-Air CO₂ Enrichment) platform. Enzyme activities(protease, urease, and uricase) and microbial diversity were stimulated by elevated CO₂ in soil without Cu contamination. At low Cu concentration(50 mg·kg⁻¹), soil urease and protease activities were significantly stimulated by elevated CO₂, however, no significant effect on uricase activity. At high Cu concentration(400 mg·kg⁻¹), soil uricase activity significantly decreased under the FACE conditions while urease and protease activities showed no significant change. We hypothesized that soil enzymes might have different sensitivities to Cu contamination and Cu species under different CO₂ concentrations. Low Cu contamination had certain stimulations on microbial growth under normal atmospheric CO₂ concentration; however, the stimulation significantly increased under the FACE conditions. Soil microbial diversity was inhibited by high Cu contamination under both normal and elevated atmospheric CO₂ concentrations, with much higher inhibition in the ambience rings. The results indicated that the stress of Cu pollution on soil enzymes and microbial community might be alleviated under elevated atmospheric CO₂ concentration; however, the mechanism needed to be further studied.

Keywords: elevated CO₂ concentration; Cu contamination; soil enzyme; soil microorganism

收稿日期:2010-04-19

基金项目:国家自然科学基金面上项目(20777034)

作者简介:王 静(1980—),女,硕士研究生,主要从事环境化学研究。E-mail:jing18101@yahoo.com.cn

通讯作者:郭红岩 E-mail:hyguo@nju.edu.cn

当前,大气 CO₂ 浓度升高和农田土壤重金属污染问题已引起极大的关注^[1-3]。政府间气候变化专门委员会(IPCC)预测到 21 世纪末大气 CO₂ 浓度将达到 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。大量研究表明大气 CO₂ 浓度升高显著增加植物根系生物量和根际沉积物,改变根系分泌物的化学组成^[4-5],进而影响到土壤微生物^[6]及土壤酶活性^[7]。同时近年来农田土壤重金属污染日益严重^[2],农业上含 Cu 杀菌剂以及微量营养肥料的施用,工业上 Cu 矿的过度开采及含 Cu 污染物的大量排放,导致农田土壤 Cu 污染加剧。

土壤酶是评价土壤环境质量的重要生物学指标,可用于监测土壤污染和土壤肥力^[8]。微生物群落结构和多样性的变化能敏感地反映出土壤质量状况,是土壤环境质量评价不可缺少的重要生物学指标^[9]。大量的研究表明,大气 CO₂ 浓度升高可通过植物-土壤这一复合系统影响土壤微生物群落结构、微生物数量、活性、呼吸作用等^[10-12],进而间接地影响土壤酶的活性。Drissner 等通过 9 a 的研究发现,大气 CO₂ 浓度升高增加了土壤微生物多样性并使得土壤酶活性增强^[13]。Korner 等的研究中也发现了类似的现象^[14-16]。虽然目前很多学者研究报道了大气 CO₂ 升高对土壤酶及土壤微生物群落的影响,但是这些研究关注的重点都是清洁土壤,均未考虑重金属污染土壤中土壤酶和微生物在未来气候条件下的变化。土壤重金属污染会影响土壤微生物群落结构、生物量和活性^[17-18]。Cu 作为典型土壤重金属污染元素之一,已有学者研究了低浓度 Cu 污染对水稻的氧化胁迫作用对大气 CO₂ 浓度升高的响应^[19]。但对土壤生态系统中极为重要的土壤微生物、土壤酶等指标,在土壤 Cu 污染和大气 CO₂ 浓度升高共同作用下,其多样性或活性将发生怎样的变化,目前尚无相关研究报道。

本文利用开放式大气 CO₂ 浓度升高平台 (Free-Air CO₂ Enrichment, 以下简称 FACE), 研究 Cu 污染胁迫条件下, 稻麦轮作土壤中, 土壤酶活性和微生物多样性对大气 CO₂ 浓度升高的响应, 以期科学评估未来气候条件下土壤 Cu 污染的生态风险提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验平台

中国 FACE 系统位于江苏省江都市小纪镇(32°35'5"N, 119°42'0"E)。供试土壤类型为姜砾土, 其基本性质为: 有机碳 18.4 g·kg⁻¹, 全 N 1.45 g·kg⁻¹, 全 P 0.63 g·kg⁻¹, 全 K 14.02 g·kg⁻¹, 速效 P 10.1 g·kg⁻¹, 速效 K

70.5 mg·kg⁻¹, 砂粒(2~0.02 mm)578.4 g·kg⁻¹, 粉砂粒(0.02~0.002 mm)285.1 g·kg⁻¹, 粘粒(<0.002 mm)136.5 g·kg⁻¹, 容重 1.16 g·cm⁻³, pH 7.2。土壤 Cu 背景值为 21.8 mg·kg⁻¹。

FACE 平台共有 3 个大气 CO₂ 浓度升高圈(FACE 圈)和 3 个正常大气圈(Ambience 圈, 无 FACE 管道, 环境条件与自然状态完全一致)。FACE 圈之间, FACE 圈和 Ambience 圈之间的间隔均大于 90 m, 以减少 CO₂ 释放对其他圈的影响。FACE 圈为正八角形, 直径 12.5 m, 通过周围的管道向中心喷射纯 CO₂ 气体, FACE 圈内的 CO₂ 浓度采用电脑控制, 保持 FACE 圈内大气 CO₂ 平均浓度比正常大气高 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, 控制误差为 10%。

1.2 实验设计

取当地农田土壤进行 Cu 污染处理, 采用稻麦轮作盆栽的方式进行栽种。在 FACE 圈和 Ambience 圈各设空白对照组、低浓度 Cu 污染组(50 mg·kg⁻¹)和高浓度 Cu 污染组(400 mg·kg⁻¹), 每个处理组设 3 个平行。从 2005 年 6 月至 2008 年 5 月, 共种植了 3 季水稻和 3 季小麦。作物生长各个时期的田间管理均与大田保持一致。

1.3 土样的采集

土壤样品于 3 a 稻麦轮作结束后的收获阶段进行采集。采集后, 将一部分土样冷冻保存用于微生物的分析, 另外一部分土样于自然通风处风干用于土壤酶活性的测定。

1.4 土壤酶的测定

参照关松荫编写的《土壤酶及其研究法》^[20], 土壤脲酶采用比色法进行测定, 其活性以 24 h 后 1 g 土壤中 NH₄⁺-N 的质量进行表示; 土壤蛋白酶采用茆三铜比色法进行测定, 其活性以 24 h 后每 1 g 土壤中 NH₄⁺-N 的质量进行表示; 尿酸酶采用比色法进行测定, 其活性以反应前后溶液光密度值之差表示。

1.5 微生物群落的 PCR-DGGE 分析

1.5.1 土壤总 DNA 的提取与纯化

土壤 DNA 的提取与纯化采用 Zhou^[21]的方法。称取 500 mg 土壤样品进行土壤总 DNA 的提取。

1.5.2 PCR 扩增及变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

PCR 扩增也采用 Zhou^[21]的方法, 应用 Bio-Rad 公司 DcodeTM 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行变性梯度凝胶电泳分离(DGGE)^[22]。采用 Quantity One 分析软件(Bio-Rad)分析样品中电泳条带的数目和灰度, 根据各样品在 DGGE 分析的图谱, 用香农-

威纳指数(Shannon-Weiner index)计算不同处理组土壤样品的微生物多样性^[24]。

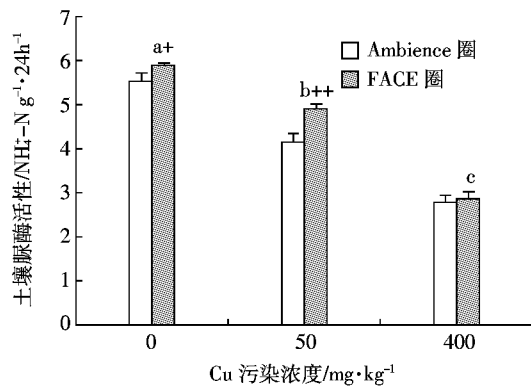
1.6 数据处理

采用 SPSS 12.0 软件进行多因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 土壤 Cu 污染胁迫条件下, 大气 CO₂ 浓度升高对土壤酶活性影响

图 1 给出了 Cu 污染胁迫条件下, 大气 CO₂ 浓度升高对土壤脲酶活性的影响结果。



+表示与对照组(Ambience)之间存在显著性差异, $P < 0.05$, ++表示与对照组之间存在极显著性差异 $P < 0.01$; 字母不同表示不同污染浓度间有显著性差异, 下同。

图 1 不同大气 CO₂ 浓度及土壤 Cu 污染胁迫条件下土壤脲酶活性的变化($n=3$)

Figure 1 Effects of Cu stress on soil urease activity under different atmospheric CO₂

由图 1 可以看出, 无论是 Ambience 圈还是 FACE 圈, 土壤脲酶活性都随着土壤 Cu 污染胁迫的加大而降低。在清洁土壤中, FACE 圈的土壤脲酶活性显著高于 Ambience 圈, 升高了 7.16%。低浓度 Cu 污染胁迫条件下, FACE 圈的土壤脲酶活性显著高于 Ambience 圈, 升高了 19.02%。高浓度 Cu 污染胁迫条件下, FACE 圈的土壤脲酶活性与 Ambience 圈并无显著差异。本实验说明, CO₂ 浓度升高会诱导土壤脲酶活性; 低浓度 Cu 污染胁迫条件下, 与正常大气相比, 大气 CO₂ 浓度升高诱导了土壤脲酶的活性, 而随着 Cu 污染胁迫的加重, 诱导作用减弱。

图 2 给出了 Cu 污染胁迫条件下, 大气 CO₂ 浓度升高对土壤蛋白酶活性的影响结果。

由图 2 中可以看出, 大气 CO₂ 浓度升高极显著诱导了清洁土壤的蛋白酶活性, 诱导率达 40.45%。与土壤脲酶类似, 低浓度 Cu 污染胁迫条件下, FACE 圈土

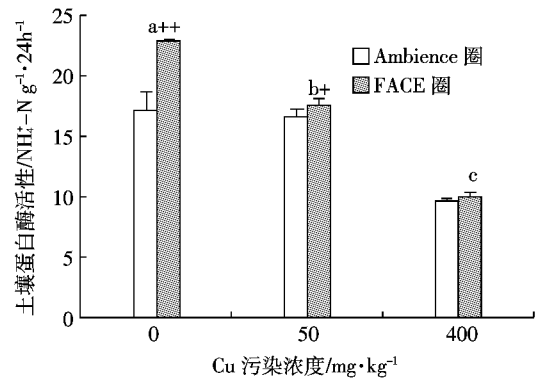


图 2 不同大气 CO₂ 浓度及土壤 Cu 污染胁迫条件下土壤蛋白酶活性的变化($n=3$)

Figure 2 Effects of Cu stress on soil protease activity under different atmospheric CO₂

壤蛋白酶活性显著高于 Ambience 圈; 而高浓度 Cu 污染胁迫条件下, FACE 圈的土壤蛋白酶活性与 Ambience 圈无显著差异。

图 3 给出了不同 Cu 污染胁迫条件下, 大气 CO₂ 浓度升高对土壤尿酸酶活性的影响结果。

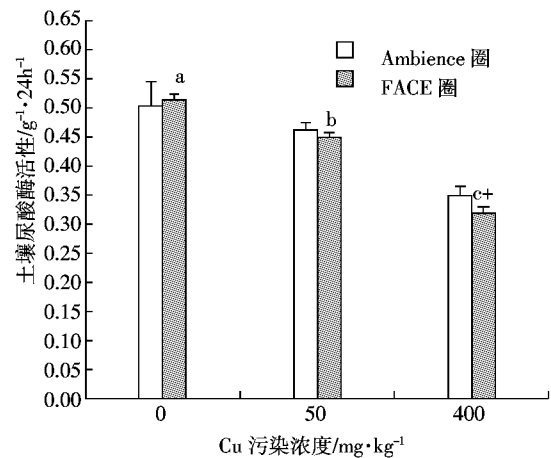


图 3 不同大气 CO₂ 浓度及土壤 Cu 污染胁迫条件下土壤尿酸酶活性的变化($n=3$)

Figure 3 Effects of Cu stress on soil uricase activity under different atmospheric CO₂

由图 3 可以看出, FACE 圈清洁土壤的尿酸酶活性高于 Ambience 圈。在低浓度 Cu 污染胁迫条件下, FACE 圈的土壤尿酸酶活性与 Ambience 圈相比并无显著差异, 而在高浓度 Cu 污染胁迫条件下, FACE 圈的尿酸酶活性显著低于 Ambience 圈, 降低了 8.28%。

2.2 土壤 Cu 污染胁迫条件下, 大气 CO₂ 浓度升高对土壤微生物群落的影响

图 4(a)给出了不同大气 CO₂ 浓度及土壤 Cu 污

染胁迫条件下根际土壤 16S rDNA 的 DGGE 分离结果;图 4(b)给出了不同大气 CO₂ 浓度及土壤 Cu 污染胁迫条件下的 Shannon-Weiner 指数。

由图 4(a)可以看出,不同处理根际土壤样品的 PCR 产物所呈现的条带数目和亮度各不相同,无论 Ambience 圈还是 FACE 圈条带数目都随着 Cu 污染胁迫的增加而减少。在 Cu 污染胁迫条件下,对应处理组 FACE 圈的条带数目都大于 Ambience 圈,在低

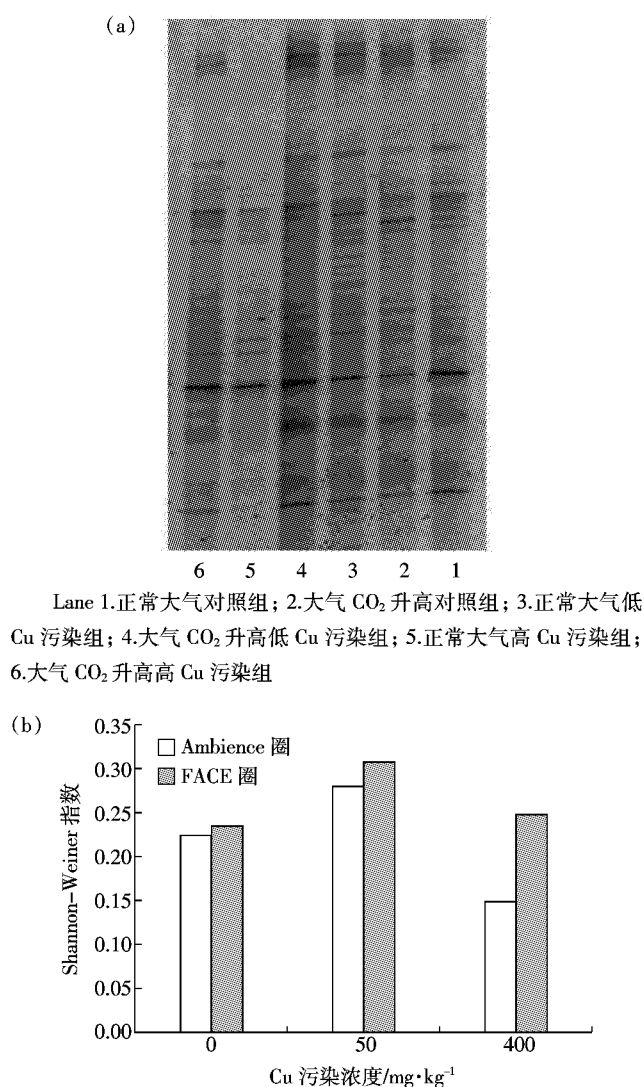
浓度 Cu 污染胁迫条件下的条带数目的增加尤为明显,表明出现了新的微生物或者是原有密度较低的物种在 CO₂ 浓度升高条件下增加。

根据各样品的 DGGE 图谱,采用 Shannon-Weiner 指数来计算各处理组的微生物多样性^[24]。由图 4(b)可以看出,FACE 圈清洁土壤的微生物多样性高于 Ambience 圈,Shannon-Weiner 指数从 0.224 4 上升为 0.234 9。在 Cu 污染胁迫条件下,微生物多样性随着 Cu 污染胁迫的增加而减小。无论是低浓度 Cu 污染胁迫条件下,还是高浓度 Cu 污染胁迫条件下,FACE 圈的微生物多样性都高于 Ambience 圈。大气 CO₂ 升高时低 Cu 污染组的 Shannon-Weiner 指数最大,为 0.308 1。

3 讨论

在无外源重金属污染的条件下,大气 CO₂ 浓度升高明显诱导了土壤脲酶、蛋白酶和尿酸酶活性,该结果与 Zak 等的研究报道一致^[11]。在 FACE 条件下,土壤酶活性的增加表明 C、N 和 P 循环的加快以及营养物质的可利用性增大。但在 Cu 污染胁迫条件下,大气 CO₂ 浓度升高对土壤酶活性的作用不是单纯的诱导,由于土壤酶种类、Cu 污染胁迫条件不同出现了不同的结果。低浓度 Cu 污染胁迫条件下,大气 CO₂ 升高诱导了土壤脲酶、土壤蛋白酶活性。土壤脲酶、土壤蛋白酶、土壤尿酸酶都是与土壤 N 循环、N 供给相关的重要酶类。土壤 Cu 污染胁迫会通过对土壤酶的抑制作用,一定程度上影响土壤 N 循环,使得土壤中可用 N 减少,土壤供肥能力减弱。但是从本研究结果来看,低浓度 Cu 污染胁迫下,FACE 圈的土壤酶活性显著高于正常大气圈,这说明在本实验条件下大气 CO₂ 浓度升高将在一定程度上缓解低浓度 Cu 污染胁迫对土壤酶的毒性效应。

土壤 Cu 污染胁迫条件下,大气 CO₂ 浓度升高对土壤脲酶与土壤蛋白酶的影响规律相似,与正常大气相比,在低浓度 Cu 污染胁迫条件下,大气 CO₂ 浓度升高显著促进了这两种酶活性,高浓度 Cu 污染胁迫条件下,大气 CO₂ 浓度升高对这两种酶活性无显著影响。但是大气 CO₂ 浓度升高对土壤尿酸酶的影响与之不同,低浓度 Cu 污染胁迫条件下,大气 CO₂ 浓度升高对尿酸酶活性无显著影响,高浓度 Cu 污染胁迫条件下,大气 CO₂ 浓度升高显著抑制了其活性。其原因可能是土壤脲酶与蛋白酶功能较为相似,而与土壤尿酸酶相差较远^[20]。土壤脲酶和蛋白酶是氮循环的重要



(a)根际土壤 16S rDNA 的 DGGE 分离结果图;(b)不同处理根际土壤样品的 Shannon-Weiner 指数

(a) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) patterns of PCR amplified 16S rDNA fragments of rhizosphere soil; (b) Shannon-Weiner index of rhizosphere soil samples under different treatment

图4 土壤 Cu 污染胁迫条件下大气 CO₂ 浓度升高对土壤微生物群落的影响

Figure 4 Effects of Cu stress on soil microorganisms under different atmospheric CO₂

酶类,直接参与土壤中含氮有机化合物的转化。而土壤尿酸酶是一类与核酸代谢有关的酶类,主要作用是将土壤中的核酸嘌呤碱基及尿酸等物质氧化生成尿囊素和尿囊酸,进而转化为尿素,供植物利用。此外,上述酶系表现出的差异性可能还和大气 CO₂ 浓度升高对重金属的活化作用有关。大气 CO₂ 浓度升高将会引起植物根系分泌物组成和数量上的变化^[24-25],而根系分泌物可以通过降低土壤 pH 值、充当潜在的金属螯合剂等方式来影响土壤重金属形态^[26],从而导致 Cu 的有效态浓度改变,使得 Cu 污染胁迫对土壤酶活性的作用加强。

已有研究表明,大气 CO₂ 浓度升高在引起土壤根系总有机碳、氨基酸及根系分泌物增加的同时,会进一步影响根际微生物活性和数量^[27],还会促进植物根系与菌根真菌之间的共生结合,引起植物根际环境尤其是菌根际环境发生明显改变^[28]。本实验清洁土壤的研究结果与此相似,大气 CO₂ 浓度升高诱导了清洁土壤的微生物多样性。与清洁土壤相比,低浓度 Cu 污染胁迫增加了土壤微生物多样性,这可能与低浓度 Cu (50 mg·kg⁻¹) 会刺激微生物的生物量、呼吸速率,改变微生物群落结构有关^[29]。本研究发现无论是低浓度还是高浓度 Cu 污染胁迫条件下,大气 CO₂ 浓度升高都有助于提高土壤微生物对 Cu 污染胁迫的抗性,但其影响机制有待进一步研究。

4 结论

本研究发现在正常大气和大气 CO₂ 浓度升高条件下,蛋白酶、脲酶、尿酸酶的酶活性都随着土壤 Cu 污染胁迫的增加而逐渐降低;低浓度 Cu 污染胁迫条件下(50 mg·kg⁻¹),FACE 圈中的土壤脲酶和蛋白酶活性显著高于正常大气(Ambience)圈,尿酸酶活性无显著变化;高浓度 Cu 污染胁迫条件下(400 mg·kg⁻¹),土壤脲酶与蛋白酶活性无显著变化,尿酸酶活性则显著降低。低浓度土壤 Cu 污染(50 mg·kg⁻¹)对微生物生长具有一定的刺激作用,Ambience 圈和 FACE 圈土壤微生物多样性都有所增加,FACE 圈中这种现象更为明显;高浓度 Cu 污染胁迫(400 mg·kg⁻¹)对土壤微生物表现出了明显的毒害作用,微生物多样性有所降低,但在 FACE 圈中土壤微生物多样性的降低程度要低于 Ambience 圈。

上述结果初步表明,在未来大气 CO₂ 浓度升高条件下,土壤 Cu 污染胁迫对蛋白酶、脲酶、尿酸酶以及微生物多样性的伤害作用将会有所降低,但要全面评

价未来气候条件下土壤重金属 Cu 污染对农田土壤生态系统的生态风险,还需进行更多的研究。

参考文献:

- [1] Solomon S, Qin D, Man N M, et al. Climate change 2007; The scientific basis: Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge [R]. Cambridge University Press, 2007.
- [2] Lu J J, He W S, Zhou K Y, et al. Behavior of Zn, Cu, Pb and Cd in biota of Yangtze Estuary[J]. *Sci China Ser B-Chem*, 2001, 44(Suppl 1): 165-172.
- [3] Wong S C, Li X D, Zhang G, et al. Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China[J]. *Environ Pollut*, 2000, 119: 33-44.
- [4] Rogers H H, Runion G B, Krupa S V. Plant responses to atmospheric CO₂ enrichment with emphasis on roots and the rhizosphere[J]. *Environ Pollut*, 1994, 83: 155-189.
- [5] Schotemeyer M, Hartwig U A, Hendrey G R, et al. Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (FACE)[J]. *Soil Biol Biochem*, 1996, 28: 1717-1724.
- [6] Montealegre C M, Kessel C V, Russelle M P, et al. Changes in microbial activity and composition in a pasture ecosystem exposed to elevated atmospheric carbon dioxide[J]. *Plant Soil*, 2002, 243: 197-207.
- [7] Kimball B A, 朱建国, 程 磊, 等. 开放系统中农作物对空气 CO₂ 浓度增加的响应[J]. *应用生态学报*, 2002, 13(10): 1323-1338.
Kimball B A, ZHU Jian-guo, CHENG Lei, et al. Response of crops to Free-Air CO₂ enrichment[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(10): 1323-1338.
- [8] Parthasarathi K, Ranganathan L S. Aging effect on enzyme activities in pressmud vermicasts of *Lampito mauritii* (Kinberg) and *Eudrilus eugeniae* (Kinberg)[J]. *Biol Fertil Soils*, 2000, 30: 347-350.
- [9] Emily E, Austin A C, Hector F, et al. Assessment of 10 years of CO₂ fumigation on soil microbial communities and function in a sweetgum plantation[J]. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41: 514-520.
- [10] Montealegre C M, Kessel C V, Russelle M P, et al. Changes in microbial activity and composition in a pasture ecosystem exposed to elevated atmospheric carbon dioxide[J]. *Plant and Soil*, 2002, 243(2): 197-207.
- [11] Zak D R, Pregitzer K S, Curtis P S, et al. Elevated atmospheric CO₂ and feedbacks between carbon and nitrogen cycles[J]. *Plant and Soil*, 1993, 151(1): 105-117.
- [12] Mikan C J, Zak D R, Kubiske M E, et al. Combined effects of atmospheric CO₂ and N availability on the belowground carbon and nitrogen dynamics of aspen mesocosms[J]. *Oecologia*, 2000, 124(3): 432-445.
- [13] Drissner D, Blum H, Tscherno D, et al. Nine years of enriched CO₂ changes the function and structural diversity of soil microorganisms in a grassland[J]. *European Journal of Soil Science*, 2007, 58: 260-269.
- [14] Korner C, Arnone J A. Responses to elevated carbon dioxide in artificial tropical ecosystems[J]. *Science*, 1992, 257: 1672-1675.
- [15] Dhillon S S, Roy J, Abrams M, et al. Assessing the impact of elevated CO₂ on soil microbial activity in a Mediterranean model ecosystem[J].

- Plant and Soil*, 1995, 187:333–342.
- [16] Sowerby A, Blum H, Gray T R G, et al. The decomposition of *Lolium perenne* in soils exposed to elevated CO₂: Comparisons of mass loss of litter with soil respiration and soil microbial biomass[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32:1359–1366.
- [17] Shi W, Becker J, Bischoff M, et al. Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination[J]. *Appl Environ Microb*, 2002, 68(8):3859–3866.
- [18] Stuczynski T I, McCarty G W, Siebielec G. Response of soil microbiological activities to cadmium, lead, and zinc salt amendments[J]. *J Environ Qual*, 2003, 32:1346–1355.
- [19] 贾海霞, 郭红岩, 尹颖, 等. 开放式空气 CO₂ 浓度增加条件下水稻对土壤微污染铜胁迫响应[J]. 科学通报, 2007, 52(10):1136–1140.
- JIA Hai-xia, GUO Hong-yan, YIN Ying, et al. The response of rice to soil micro-polluted copper stress under free air CO₂ enrichment[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(10):1136–1140.
- [20] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1989:248–256.
- GUAN Song-yin. Soil enzymes and its research method[M]. Beijing: Agriculture Press, 1989:248–256.
- [21] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Appl Environ Microb*, 1996, 62:316–322.
- [22] Van Hannen E J, Zwart G, van Agterveld M P, et al. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses[J]. *Appl Environ Microb*, 1999, 65:795–801.
- [23] Muller A K, Westergaard K, Christensen S, et al. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances[J]. *Microbial Ecol*, 2002, 44:49–59.
- [24] 林伟宏, 王大力. 大气二氧化碳升高对水稻生长及同化物分配的影响[J]. 科学通报, 1998, 43(21):2299–2302.
- LIN Wei-hong, WANG Da-li. Effect of elevated atmospheric carbon dioxide on rice growth and assimilate distribution[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1998, 43(21):2299–2302.
- [25] Norby R J, O'Neill E G, Hood W G, et al. Carbon allocation, root exudation and mycorrhizal colonization of pinus echinata seedlings grown under CO₂ enrichment[J]. *Tree Physiol*, 1987, 3:203–210.
- [26] Cheng W X, Johnson D W. Elevated CO₂, rhizosphere process, and soil organic matter decomposition[J]. *Plant Soil*, 1998, 202:167–174.
- [27] 李杨, 徐国强, 黄国宏, 等. 开放式空气二氧化碳浓度增高(FACE)对稻麦轮作土壤微生物数量的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10):1847–1850.
- LI Yang, XU Guo-qiang, HUANG Guo-hong, et al. Effect of Free-Air CO₂ Enrichment(FACE) on soil microbial quantity in rice-wheat rotation soil[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(10):1847–1850.
- [28] Klironomos J N, Allen M F, Rillig M C, et al. Abrupt rise in atmospheric CO₂ overestimates community response in a model plant-soil system[J]. *Nature*, 2005, 433:621–625.
- [29] 杨元根, Paterson E, Campbell C. 重金属 Cu 的土壤微生物毒性研究[J]. 土壤通报, 2002, 33(2):137–141.
- YANG Yuan-gen, Paterson E, Campbell C. Study on microbial toxicity of heavy metal Cu[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2002, 33(2):137–141.