

DOI: 10.11766/trxb201912050570

夏文建, 柳开楼, 张丽芳, 刘佳, 叶会财, 邓国强, 李大明, 李祖章, 王萍, 李瑶, 杨成春, 彭春瑞, 陈金. 长期施肥对红壤稻田土壤微生物生物量和酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2021, 58 (3): 628–637.

XIA Wenjian, LIU Kailou, ZHANG Lifang, LIU Jia, YE Huicai, DENG Guoqiang, LI Daming, LI Zuzhang, WANG Ping, LI Yao, YANG Chengchun, PENG Chunrui, CHEN Jin. Effect of Long-term Fertilization on Soil Microbial Biomass and Enzyme Activities in Reddish Paddy Soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58 (3): 628–637.

长期施肥对红壤稻田土壤微生物生物量和酶活性的影响*

夏文建¹, 柳开楼², 张丽芳¹, 刘佳¹, 叶会财², 邓国强¹, 李大明²,
李祖章¹, 王萍¹, 李瑶¹, 杨成春¹, 彭春瑞^{1†}, 陈金^{1†}

(1. 江西省农业科学院土壤肥料与资源环境研究所/农业农村部长江中下游作物生理生态与耕作重点实验室/国家红壤改良工程技术研究中心, 南昌 330200; 2. 江西省红壤研究所, 南昌 330046)

摘要: 研究长期施肥下红壤双季稻田土壤胞外酶活性 (EEAs) 变化特征及其主要驱动因子, 可为该地区稻田土壤培肥和合理施肥提供理论依据。选择持续了 37 a 的长期定位试验的不施肥 (CK)、化肥 (NPK)、高倍化肥 (HNPK) 和化肥有机肥配施 (NPKM) 4 个处理, 采用微孔板荧光法测定了土壤胞外酶活性, 分析了土壤化学指标和土壤微生物生物量碳 (MBC) 和微生物生物量氮 (MBN), 并通过主成分分析和冗余分析探讨土壤胞外酶分布特征及其与土壤养分和微生物生物量碳氮的关系。研究结果显示, 长期施肥提高了土壤养分含量和水稻产量; 与 CK 处理相比, NPKM 处理土壤 MBC 和 MBN 分别提高了 60.2% 和 60.4%, 土壤 α -葡萄糖苷酶 (AG)、 β -葡萄糖苷酶 (BG)、乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 和酸性磷酸酶 (ACP) 活性分别提高 12.7%、41.1%、36.2% 和 50.0%, 酚氧化酶 (POX) 活性下降 29.7%。红壤稻田土壤 EEAs 的变化主要由养分因子驱动, 其中土壤全氮 (TN) 和 MBC 是关键的决定因子, 分别解释了酶活性变异的 34.3% 和 20.9%。化肥配施有机肥有利于土壤养分、微生物生物量和土壤胞外酶活性提高, 是维持作物高产和提升土壤质量最优的施肥管理措施。

关键词: 长期施肥; 化肥有机肥配施; 红壤性水稻土; 土壤养分; 土壤胞外酶活性

中图分类号: S154.2; S147.35 **文献标志码:** A

Effect of Long-term Fertilization on Soil Microbial Biomass and Enzyme Activities in Reddish Paddy Soil

XIA Wenjian¹, LIU Kailou², ZHANG Lifang¹, LIU Jia¹, YE Huicai², DENG Guoqiang¹, LI Daming², LI Zuzhang¹, WANG Ping¹, LI Yao¹, YANG Chengchun¹, PENG Chunrui¹, CHEN Jin¹

(1. Institute of Soil Fertilizer and Resource Environment, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System for the Middle and Lower Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / National Engineering and Technology Research Center for Red Soil Improvement, Nanchang 330200, China; 2. Jiangxi Red Soil Research Institute, Nanchang 330046, China)

* 国家重点研发计划项目 (2016YFD0300900) 和国家自然科学基金项目 (31560582, 31601263) 资助 Supported by the National Basic Research Program of China (No. 2016YFD0300900) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31560582 and 31601263)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: chenjin2004777@163.com; pterfs@163.com

作者简介: 夏文建 (1982—), 男, 湖北咸宁人, 博士, 助理研究员, 主要研究农田养分循环。E-mail: xiawenjian@163.com

收稿日期: 2019–12–05; 收到修改稿日期: 2020–03–10; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2020–04–17

Abstract: 【Objective】 It is very important to know how extracellular enzyme activities (EEAs) vary and what are their driving factors in reddish paddy soil under long-term fertilization. The knowledge may serve as a certain theoretical basis for improvement of soil fertility and rational fertilization in the region. To that end, this study was unfolded. 【Method】 Based on a long-term fertilization field experiment that was started in 1981 and designed to have four treatments, that is (CK, without fertilization), NPK (fertilizer N, P and K), HNPK (double dosage of fertilizer N, P and K), NPKM (NPK fertilizers plus organic manure), soil samples were collected separately in each plot of the treatments after the later rice was harvested in 2017 for analysis of microbial biomass and soil chemical properties. Six soil extracellular enzymes involved in C, N and P cycling, were investigated with the microplate fluorometric assay method. For exploration of the distribution characteristics of soil EEAs and their relationship with soil nutrients and microbial biomass carbon and nitrogen in the reddish paddy soil, principal component analysis (PCA) and redundancy analysis (RDA) were performed. 【Result】 Results show that long-term fertilization increased soil nutrient content and rice yield. Compared with no fertilization control (CK), treatment NPKM increased soil microbial biomass carbon (MBC) and microbial biomass nitrogen (MBN) significantly or by 60.2% and 60.4%, respectively, and soil AG, BG, NAG and ACP activities by 12.7%, 41.1%, 36.2%, and 50.0%, respectively, but reduced POX activity by 29.7%. The variations of EEAs were closely related to soil nutrient factors, among which soil total nitrogen (TN) and MBC might be the key determinants, accounting for 34.3% and 20.9% of the variation of EEAs, respectively. 【Conclusion】 It can be seen that the combined application of chemical fertilizer and organic manure is beneficial to improvement of soil fertility, microbial biomass and soil extracellular enzyme activity, and considered as the best fertilization management practice to maintain crop yield and improve soil quality.

Key words: Long-term fertilization; Combined application of organic manure and chemical fertilizer; Reddish paddy soil; Soil nutrient; Soil extracellular enzyme activity

在农田生态系统养分循环中，土壤胞外酶活性 (Extracellular enzyme activities, EEAs) 与土壤功能密切相关，能够反映土壤养分状况，是表征土壤肥力和土壤质量的重要指标之一^[1-2]。同时，土壤胞外酶活性与土壤微生物活动密切相关，可以较为全面地反映土壤微生物群落的功能特征，在土壤生态系统和土壤质量评价中受到广泛关注^[3]。施肥^[4-5]，特别是氮^[6-7]、磷^[8]等养分投入对土壤酶活性的影响已有较多研究，一般认为养分的投入会增加土壤微生物生物量，刺激微生物产生对应的酶，引起土壤胞外酶活性的增加，尤其以化肥和有机肥配施的效果最佳^[9-11]。

魏亮等^[12]研究了水稻不同生育期根际与非根际 EEAs 对施氮的响应，发现根际和非根际影响胞外酶活性的因素不同，土壤酶活性与多种环境因子存在复杂关系。在长期不同比例有机肥替代化肥的试验条件下，土壤碳氮比是影响 EEAs 的主要因素之一^[13]。而长期施用化肥和不同有机肥处理条件下，EEAs 与水溶性有机碳之间有更强的相关性^[14]。调控物质循环的水解酶或氧化还原酶活性受到了对应的土壤养分状况影响^[14-15]。然而，由于供试土壤和试验环境的差异，不同研究者所获得的研究结果不尽一致。

现有研究更关注长期施肥对土壤养分和微生物群落的影响^[16]，对于土壤生物活性和功能研究相对较少，或者仅选择 2~3 种土壤胞外酶描述土壤功能^[8, 12]，关于长期施肥对土壤碳、氮、磷等养分物质循环相关胞外酶活性总体分布特征的研究不多。土壤胞外酶活性可以较为全面地指示土壤生境变化和生态功能特征，且对土壤环境变化敏感^[1, 17]。因此，开展长期施肥土壤胞外酶活性特征及与环境因子的关系研究，对于深入理解碳、氮、磷等养分物质循环过程具有重要意义^[17-18]。

为了研究长期施肥对红壤稻田土壤胞外酶活性 (EEAs) 的影响及其驱动因子，本文利用持续了 37 a 的长期定位试验，采用微孔板荧光法测定了土壤 α -葡萄糖苷酶 (AG)、 β -葡萄糖苷酶 (BG)、纤维素水解酶 (CBH)、乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG)、酸性磷酸酶 (ACP) 和酚氧化酶 (POX) 等 6 种酶，涵盖了土壤 C、N、P 等养分循环和有机物氧化，同时分析了土壤化学指标和土壤微生物生物量碳氮，通过主成分分析和冗余分析探讨土壤胞外酶分布特征及其与土壤养分和微生物生物量的关系，以期解析长期施肥影响 EEAs 特征的关键因子，为红壤稻田肥力培育提供微生物酶学方面的理论参考。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

红壤稻田长期定位试验位于进贤县张公镇江西省红壤研究所 (116°20'24"N、28°15'30"E)。平均海拔 30 m, 属中亚热带季风气候, 年均气温 17.6 °C, 有效积温 5 528 °C; 年降水量 1 785 mm, 无霜期约 280 d, 日照时数 1 950 h。

长期定位试验始于 1981 年^[19], 种植制度为双季稻。供试土壤为第四纪红色黏土发育的水稻土。试验前土壤耕层基础肥力状况为: 土壤 pH 6.9, 有机碳 16.3 g·kg⁻¹, 全氮 1.49 g·kg⁻¹, 全磷 0.48 g·kg⁻¹, 全钾 10.39 g·kg⁻¹, 碱解氮 150.4 mg·kg⁻¹, 有效磷 4.15 mg·kg⁻¹, 速效钾 80.52 mg·kg⁻¹。

1.2 试验设计

本研究选择长期定位试验中的 4 个处理, 分别为: 不施肥 (CK)、化肥 (NPK)、2 倍氮磷钾 (HNPK) 和氮磷钾+有机肥 (NPKM)。小区面积 46.67 m², 3 次重复。每季施肥量: 氮肥纯 N 90 kg·hm⁻², 磷肥 P₂O₅ 45 kg·hm⁻², 钾肥 K₂O 75 kg·hm⁻², 有机肥 22 500 kg·hm⁻²。肥料品种氮肥为尿素, 磷肥为钙镁磷肥, 钾肥为氯化钾。有机肥早稻为紫云英, 晚稻为猪粪。根据多年结果计算^[19-20], 紫云英和猪粪带入的纯氮、P₂O₅、K₂O 分别为 27 kg·hm⁻²、17.0 kg·hm⁻²、28.5 kg·hm⁻² 和 33.8 kg·hm⁻²、58.0 kg·hm⁻²、33.9 kg·hm⁻²。氮肥 60%作基肥, 剩下的 40%于水稻返青后作追肥施用; 钾肥全部于水稻返青后作追肥施用; 磷肥和有机肥全部作基肥。所有小区的播种、移栽、灌溉和打药等日常管理措施与当地习惯相同。

1.3 研究方法

2017 年晚稻收获后, 每小区 S 型采集 0~20 cm 耕层土壤样品。按四分法分出 1/2 鲜样分析土壤胞外酶活性和微生物生物量, 剩余 1/2 样品摊匀风干, 磨细过筛分析土壤理化性质。水稻产量为周年早稻和晚稻产量之和, 由小区实测产量换算。

土壤化学性质采用常规实验方法测定^[21]: 土壤 pH(2.5:1)采用酸度计电位法; 土壤有机碳 (SOC) 采用重铬酸钾外加热法测定。全氮 (TN) 用半微量凯氏法测定; 全磷 (TP) 用碱熔—钼锑抗比色法测定; 碱解氮 (AN) 用碱解扩散法测定; 有效磷 (AP) 用 Olsen 法测定; 速效钾 (AK) 用 1 mol L⁻¹ NH₄OAc 浸提—火焰光度法测定。土壤微生物生物量碳

(MBC) 和微生物生物量氮 (MBN) 采用氯仿熏蒸培养法测定^[22]。

土壤胞外酶活性采用 96 微孔酶标板荧光分析法测定^[23]。AG、BG 和 CBH 催化葡萄糖和纤维素水解, 是与土壤碳循环有关的酶; NAG 催化几丁质和肽聚糖水解, 是与土壤氮循环有关的酶; ACP 催化有机磷水解, 是与土壤磷循环有关的酶; POX 催化酚类物质氧化, 是与土壤腐殖化过程等相关的酶^[16, 24]。用甲基伞形酮 (4-methylumbelliferyl, 4-MUB) 作为底物标示水解酶活性, 用 L-二羟苯丙氨酸 (L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) 为底物标示酚氧化酶 (POX) 活性, 利用多功能酶标仪在激发波长 365 nm、发射波长 450 nm 的条件下测定。测定的 6 种土壤胞外酶的名称、缩写、功能、底物和国际酶学委员会编码 (EC 编码) 见表 1。

1.4 数据处理

试验数据用 Excel 2016 整理、计算和绘图, 图表数据为平均值和标准误 (SE), 运用 SPSS 17.0 进行相关性分析、单因素方差分析和差异显著性检验 (最小显著差异 (LSD) 法, $P < 0.05$)。采用 Canoco 5.0 软件进行主成分分析 (PCA) 和冗余分析 (RDA)。

2 结果

2.1 长期施肥对土壤化学性质和水稻产量的影响

经过 37 a 的长期不同施肥处理, 土壤化学性质和水稻产量发生了显著变化 (表 2)。与 CK 处理相比, NPK 处理显著提高了土壤 SOC、AN 和 AP 含量, HNPK 处理显著提高了土壤 SOC 和氮、磷、钾养分含量; 与 NPK 处理相比, HNPK 处理显著提高了土壤 TP、AP 和 AK; 而 NPKM 处理与 HNPK 处理相比, 显著提高了 SOC 和氮、磷、钾等养分含量。与 CK 处理相比, 施肥处理土壤 pH 均有所下降, 但未达到显著水平。各施肥处理周年水稻产量较 CK 处理增加了 81.4%~158.4%。

2.2 长期施肥对土壤微生物生物量的影响

长期施肥土壤 MBC 和 MBN 呈增加的趋势 (图 1)。NPK 处理土壤 MBC 和 MBN 较 CK 处理增加了 20.8%和 33.6%; 与 CK 相比, HNPK 和 NPKM 处理显著提高了土壤 MBC 和 MBN ($P < 0.05$), 其中, HNPK 处理土壤 MBC 和 MBN 分别增加了 41.1%和 42.9%, NPKM 处理则分别增加了 60.2%和 60.4%。

表 1 土壤胞外酶名称、缩写、所用底物和国际酶学委员会编码

Table 1 Names, abbreviations, substrates used and International Enzyme Commission number of the soil extracellular enzymes involved in the study

酶名称 Enzyme	缩写 Abbreviation	功能 Function	底物 Substrate	EC 编码 EC number
α -葡萄糖苷酶 α -glucosidase	AG	目标碳源水解 C-targeting hydrolysis	4-MUB- α -D-葡萄糖苷 4-MUB- α -D-glucoside	3.2.1.20
β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	BG	目标碳源水解 C-targeting hydrolysis	4-MUB- β -D-葡萄糖苷 4-MUB- β -D-glucoside	3.2.1.21
纤维素水解酶 β -cellobiohydrolase	CBH	目标碳源水解 C-targeting hydrolysis	4-MUB- β -D-纤维二糖苷 4-MUB- β -D-cellobioside	3.2.1.91
乙酰氨基葡萄糖苷酶 N-acetyl-glucosaminidase	NAG	氮获取相关的酶 N acquiring enzyme	4-MUB-乙酰氨基葡萄糖苷 4-MUB-N-acetyl- β -D-glucosaminide	3.2.1.30
酸性磷酸酶 Acid phosphatase	ACP	磷获取相关的酶 P acquiring enzyme	4-MUB-磷酸酯 4-MUB-phosphate	3.1.3.2
酚氧化酶 Phenol oxidase	POX	惰性碳氧化 Recalcitrant C oxidation	L-二羟苯丙氨酸 L-DOPA	1.10.3.1

注: EC 编码: 酶的国际酶学委员会编码, 4-MUB: 4-甲基伞形酮, L-DOPA: L-二羟苯丙氨酸. Note: EC number: International Enzyme Commission number, 4-MUB: 4-methylumbelliferyl, L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphenylalanine.

表 2 长期施肥下的土壤化学性质和水稻产量

Table 2 Soil chemical properties and rice yield of the paddy fields under long-term fertilization

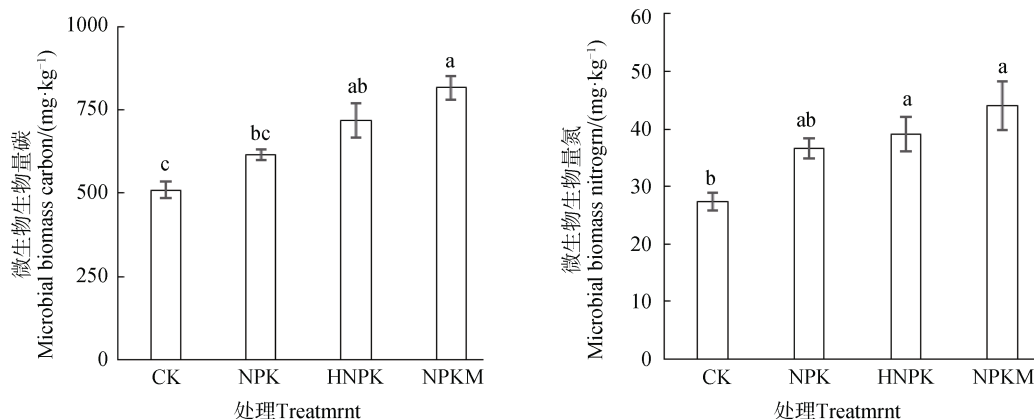
处理 Treatments	pH	SOC /(g·kg ⁻¹)	TN /(g·kg ⁻¹)	TP /(g·kg ⁻¹)	AN /(mg·kg ⁻¹)	AP /(mg·kg ⁻¹)	AK /(mg·kg ⁻¹)	GY /(t·hm ⁻²)
CK	5.65±0.02a	18.47±0.35c	1.73±0.02c	0.55±0.06c	154.24±5.78c	4.27±0.26d	39.47±0.54c	5.74±0.35d
NPK	5.54±0.07a	19.83±0.52b	1.83±0.06bc	0.64±0.04c	164.01±3.69b	9.00±0.22c	41.25±1.55c	10.42±0.34c
HNPK	5.52±0.02a	21.06±0.27b	1.89±0.01b	0.89±0.05b	170.66±3.13b	15.54±0.26b	47.38±3.08b	13.60±0.50b
NPKM	5.57±0.10a	23.46±0.29a	2.53±0.05a	1.28±0.03a	233.99±3.16a	62.42±1.72a	53.78±1.07a	14.84±0.22a

注: CK: 不施肥, NPK: 氮磷钾肥, HNPK: 2 倍氮磷钾肥, NPKM: 氮磷钾配施有机肥. SOC: 土壤有机碳, TN: 全氮, TP: 全磷, AN: 碱解氮, AP: 有效磷, AK: 速效钾, GY: 水稻产量. 表中数据为平均值±标准误, 同一列不同字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$), 下同. Note: CK, without fertilization, NPK: fertilizer N, P and K, HNPK: double dosage of fertilizer N, P and K, NPKM: organic manure plus fertilizer N, P and K. SOC: soil organic carbon, TN: total nitrogen, TP: total phosphorus, AN: alkaline nitrogen, AP: available phosphorus, AK: available potassium, GY: grain yield. The data are means±SE. Different letters affixed to the data in the same column indicate difference between treatments at the $P<0.05$ level. The same below.

2.3 长期施肥对土壤胞外酶活性的影响

长期施肥改变了土壤 EEAs 状况 (表 3), 不同土壤胞外酶对施肥的响应存在差异. 与不施肥 (CK)

相比, NPK 处理显著提高了 AG 和 NAG 活性; HNPK 处理显著提高了 AG 和 NAG 活性, 显著降低了 ACP 和 POX 活性; NPKM 处理 AG、BG、NAG 和 ACP



注: CK: 不施肥, NPK: 氮磷钾肥, HNPK: 2 倍氮磷钾肥, NPKM: 氮磷钾配施有机肥。不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。Note: CK, without fertilization, NPK: fertilizer N, P and K, HNPK: double dosage of fertilizer N, P and K, NPKM: organic manure plus fertilizer N, P and K. Different letters indicate difference between treatments at the $P < 0.05$ level.

图 1 长期施肥下的土壤微生物生物量碳和微生物生物量氮

Fig. 1 Content of microbial biomass carbon (MBC) and nitrogen (MBN) as affected by long-term fertilization

表 3 长期施肥下的土壤胞外酶活性

Table 3 Activities of soil extracellular enzyme as affected by long-term fertilization

处理 Treatments	AG ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	BG ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	CBH ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	NAG ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	ACP ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	POX ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
CK	7.12±0.07b	36.00±1.06bc	13.56±0.61a	40.17±2.68c	218.98±8.14b	10.21±0.22a
NPK	9.37±0.28a	42.69±2.48b	13.90±0.73a	52.43±3.08b	254.89±4.32b	9.81±0.60a
HNPK	9.52±0.47a	34.38±2.25c	14.19±0.28a	63.07±1.66a	136.16±5.38c	8.04±0.38b
NPKM	8.03±0.03ab	50.80±1.76a	15.58±0.67a	54.72±1.5ab	328.47±16.75a	7.16±0.57b

注: AG: α -葡萄糖苷酶, BG: β -葡萄糖苷酶, CBH: 纤维素水解酶, NAG: 乙酰氨基葡萄糖苷酶, ACP: 酸性磷酸酶, POX: 酚氧化酶。下同。Note: AG: α -glucosidase, BG: β -glucosidase, CBH: β -cellobiohydrolase, NAG: N-acetyl-glucosaminidase, ACP: Acid phosphatase, POX: Phenol oxidase. The same below.

活性分别提高 12.7%、41.1%、36.2%和 50.0%, POX 活性显著下降 29.7% ($P < 0.05$)。各施肥处理 CBH 活性略有增加, 但处理之间差异均不显著。

2.4 土壤胞外酶活性与土壤化学性质、微生物生物量和水稻产量的相互关系

土壤 EEAs 与土壤化学性质、微生物生物量和水稻产量的相关分析 (表 4) 结果显示, 土壤 NAG 活性与土壤微生物生物量 (MBC 和 MBN) 和水稻产量之间相关性达到显著水平, 但与土壤养分之间相关性不显著; 土壤 BG 活性与土壤 SOC 和氮、磷养分 (TN、TP、AN 和 AP) 之间相关性达显著水平; 土壤 CBH 活性与土壤 TN、MBC 和速效养分 (AN、AP 和 AK) 之间相关性达显著水平; 土壤 ACP

活性与土壤 TN、AN、AP 之间相关性达显著水平; 土壤 POX 活性与除 pH 外的各指标均呈极显著负相关, 而 AG 与各指标间相关性均不显著。可见, 土壤 EEAs 受到了土壤养分和微生物影响, 但不同胞外酶对土壤养分的响应存在较大差异。

2.5 土壤胞外酶活性分布特征及关键驱动因子

通过对 6 种土壤 EEAs 进行主成分分析, 前两个主成分共包含了土壤 EEAs 分布特征的 87.8% (图 2)。长期不同施肥使 EEAs 分布产生差异, CK 处理分布于上方中间部位, NPK 处理分布在中心原点附近, HNPK 处理主要分布在右下方, 而 NPKM 处理主要分布在左下方。以土壤 EEAs 为响应变量, 土壤化学性质、微生物生物量为解释变量进行 RDA 分析

表 4 土壤胞外酶活性与土壤化学性质、微生物生物量和水稻产量的相关性

Table 4 Correlations analysis of soil extracellular enzyme activities with soil chemical properties, microbial biomass and grain yield

	AG	BG	CBH	NAG	ACP	POX
pH	-0.475	-0.061	0.015	-0.49	0.208	0.368
SOC	0.161	0.618*	0.500	0.539	0.431	-0.905**
TN	-0.090	0.749**	0.639*	0.344	0.689*	-0.738**
TP	0.075	0.627*	0.574	0.513	0.461	-0.855**
AN	-0.097	0.782**	0.652*	0.281	0.677*	-0.749**
AP	-0.124	0.764**	0.666*	0.301	0.681*	-0.758**
AK	0.052	0.507	0.671*	0.515	0.328	-0.825**
GY	0.491	0.450	0.466	0.796**	0.163	-0.821**
MBN	0.470	0.563	0.182	0.632*	0.229	-0.816**
MBC	0.264	0.455	0.657*	0.716**	0.326	-0.748**

注：*和**分别表示 5%和 1%显著水平。Note: * and ** represents a significance at 5% and 1% level, respectively.

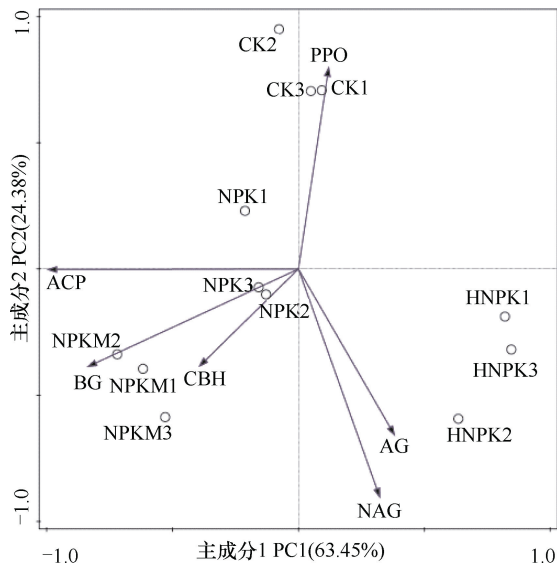
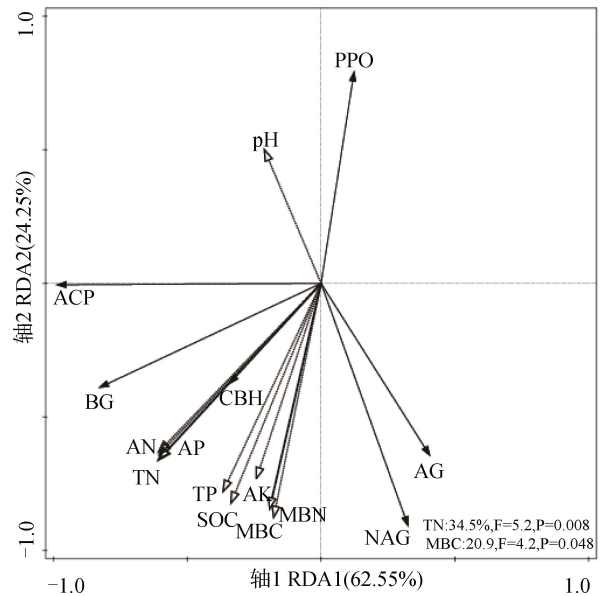


图 2 长期施肥下土壤胞外酶活性主成分分析 (PCA)

Fig. 2 Principal Component Analysis (PCA) of soil extracellular enzyme activities in the soil under long-term fertilization

析 (表 4) 的结果一致。



注：空心箭头表示解释变量，实线空心箭头表示该土壤性状与土壤胞外酶活性显著相关。Note: Hollow arrows represent explanatory variable, hollow arrows with solid line indicate significant correlation between soil properties and soil extracellular enzyme activities ($P < 0.05$).

图 3 土壤胞外酶活性与土壤指标的冗余分析 (RDA)

Fig. 3 Redundancy Analysis (RDA) of relationship between soil extracellular enzyme activities with soil indexes

(图 3)。RDA 前两个排序轴保留了土壤胞外酶活性数据总方差的 86.8%，即 9 个环境因子在前两轴中累计解释了土壤胞外酶活性特征的 86.8%。响应变量与解释变量之间的箭头夹角的余弦值可以表示两者之间的相关性^[25]，RDA 排序图可以看出 TN、AN、AP 与 BG、CBH、ACP 之间呈正相关关系，MBC 和 MBN 与 NAG 相关性较高，而土壤养分和微生物生物量与 POX 之间呈负相关关系，该结果与相关分

各试验处理点在 RDA 图上的分布及与响应变

量 (EEAs) 的位置关系可以看出, 不施肥 (CK) 处理 POX 活性较高, NPKM 处理主要提高了 ACP、BG 和 CBH 活性, HNPK 处理主要提高了 AG 和 NAG 活性, 而 NPK 处理胞外酶活性处于居中的位置。土壤 EEAs 的变化主要由土壤养分状况驱动, 其中土壤全氮 (TN) 和微生物生物量碳 (MBC) 分别解释了方差变异的 34.3% 和 20.9%, 达到显著水平, 表明长期施肥引起土壤酶活性的变化可以由 TN 和 MBC 这两个参数来解析。

3 讨论

3.1 长期施肥对红壤稻田土壤养分和微生物生物量的影响

稻田长期均衡施用氮磷钾肥以及氮磷钾肥与有机肥配施有利于土壤肥力的提升, 长期化肥配施有机肥使土壤 SOC、TN、TP、AN 和 AP 等养分显著增加^[26]。本研究发现, 与低量氮磷钾肥 (NPK) 相比, 提高化肥用量 (HNPK) 对 SOC、TN 和 AN 的增加不显著, 而有机无机配施 (NPKM) 显著提高了土壤有机碳和氮、磷、钾养分含量 (表 2), 表明有机无机配施对于提升土壤养分具有更佳效果。Meta 大数据分析也有相似的结论, 与化肥处理相比, 有机肥或有机无机配施处理作物产量平均增加 27%、SOC 增加 38%、TN 增加 20%^[11]。

土壤微生物生物量代表了参与土壤中养分循环和有机物质转化的微生物数量^[27], 土壤 MBC 和 MBN 转化迅速, 是敏感的土壤质量指标^[27-28], 施用化肥可以提高土壤 MBC 和 MBN。在不同利用方式土壤中的统计结果显示, 与不施肥相比, 长期施用化肥农田土壤 MBC 增加 15.1%^[2], 稻田土壤 MBC 和 MBN 分别增加 26% 和 13%^[10]; 而有机肥投入具有更加显著的提升效果, 与化肥处理相比 MBC 和 MBN 分别增加 51% 和 24%^[11]。本研究发现, 与 CK 相比, NPK、HNPK 和 NPKM 处理 MBC 分别增加 20.8%、41.1% 和 60.2%, MBN 分别增加 33.6%、42.9% 和 60.4% (图 1), 表明土壤微生物生物量随化学肥料投入量在一定用量范围内呈递增趋势, 而有机无机配施 (NPKM) 提升效果更为明显。

3.2 长期施肥对红壤稻田土壤胞外酶活性的影响

土壤胞外酶是土壤生态系统养分循环和代谢的主要驱动力, 胞外酶活性反映了土壤的生物活性和

生化反应的活跃程度^[1-3]。土壤胞外酶活性对土壤环境因素敏感, 不同研究者在不同区域和土壤上的研究结果存在较大差异。红壤旱地长期施用化肥或化肥与有机肥配施可以显著提高参与碳循环 (BG、CBH) 和氮循环 (NAG) 相关的水解酶活性^[29-30]; 稻田土壤施用化肥使参与碳循环水解酶 BG 活性较对照提高了 35%~118%, 参与氮循环水解酶 NAG 活性较对照提高了 9%~30%^[31]; 而化肥配施有机肥可以进一步提高 BG 和 NAG 活性^[31-32]。Meta 分析也有相似的结论, 化肥投入可增加 AG、BG、CBH、NAG 等酶活性^[6, 9], 有机肥投入促使相关酶活性大幅增加^[11]。本研究发现长期施用化肥 (NPK 和 HNPK) 或有机无机配施 (NPKM) 提高了稻田土壤 SOC 和 MBC (表 2, 图 1), 从而促进了 AG、BG 和 CBH 等碳循环相关水解酶的活性 (表 3); 施用化肥增加了土壤氮素养分含量 (TN、AN 和 MBN) (表 2, 图 1), 提高了氮循环有关的 NAG 活性 (表 3), 而有机无机配施 (NPKM) 处理土壤有效氮含量大幅增加, 消减了土壤微生物代谢对氮素限制, 使氮水解酶的分泌降低, 导致 NAG 活性较高量化肥 (HNPK) 处理有所降低; 低量氮磷钾 (NPK) 处理提高了土壤 ACP 活性, 而高量氮磷钾 (HNPK) 处理降低了土壤 ACP 活性 (表 3), 这可能由于高量无机磷投入抑制了解磷菌活性和酸性磷酸酶的合成与分泌, 从而导致 ACP 活性下降^[33-34], 而有机无机配施 (NPKM) 处理施用紫云英和猪粪, 提供了丰富的碳源和有机磷, 显著提高了 ACP 活性^[35-36]。酚氧化酶 (POX) 参与木质素的降解与腐殖化过程^[17], 荣勤雷等^[32]长期有机培肥的数据显示不同肥料品种对土壤 POX 的影响存在差异, 与不施肥相比, 化肥配施畜禽粪便 POX 活性略有提高, 单施化肥及化肥与绿肥或秸秆配施土壤 POX 活性均显著降低。长期定位研究发现, 施用化肥或有机肥显著降低 POX 活性^[14, 16]; 而 Zhang 等^[37]在稻田短期试验的研究结果却显示增施有机肥提高了 POX 的活性, 这可能与稻田有机物料腐解产生的还原物质短期内引起土壤微生物的响应有关。本研究中 POX 活性随化肥用量增加而下降, 有机无机配施 POX 活性最低 (表 3), 与前人研究结果^[32-36]基本一致。

3.3 红壤稻田土壤胞外酶活性分布特征及其驱动因子

本研究通过对碳 (AG、BG、CBH)、氮 (NAG)、磷 (ACP) 循环相关的水解酶和氧化酶 (POX) 进

行主成分分析, 发现长期不同施肥处理造成土壤养分发生显著变化, 从而显著影响了土壤 EEAs 的分布特征 (图 2)。土壤 EEAs 与养分之间存在典型相关关系^[31], EEAs 的变化趋势与微生物生物量、有机碳和全氮的变化趋势基本一致^[30]。Allison 和 Vitousek^[38]研究认为微生物胞外酶的合成符合经济学理论, 当微生物营养受到限制时会激发相应酶的分泌, 而且土壤胞外酶活性与对应的功能基因数量有很强的相关性, 两者之间的关系受到了土壤微生物结构、土壤有机碳、pH 等调控^[3], 但在不同土壤环境条件下, 土壤 EEAs 的主要影响因素存在一定差异。本研究通过土壤 EEAs 与环境因子的 RDA 分析发现, EEAs 的变化主要由土壤 TN 和 MBC 驱动, 分别解释了酶活性变异的 34.3% 和 20.9% (图 3), 表明氮素和有机物投入是影响红壤性稻田土壤 EEAs 的关键因素。

4 结 论

长期施肥显著影响了红壤性水稻土养分状况和微生物生物量碳氮, 从而影响土壤胞外酶活性 (EEAs), 其中土壤全氮 (TN) 和微生物生物量碳 (MBC) 是关键的决定因子, 分别解释了酶活性变异的 34.3% 和 20.9%。化肥配施有机肥有利于水稻增产, 并提高土壤养分、微生物生物量和土壤碳、氮、磷循环相关水解酶活性, 是维持作物高产和提升土壤质量最优的施肥管理措施。土壤胞外酶活性 EEAs 是土壤质量的敏感指标, 但土壤 EEAs 与环境因子之间关系、长期施肥对 EEAs 特征的影响及有关机制尚待进一步研究, 特别是深入研究不同培肥措施引起的土壤胞外酶活性与土壤微生物数量、结构和功能变化之间的关系。

致 谢 感谢江西农业大学荣勤雷博士和江苏太湖地区农业科学研究所施林林博士在数据分析上给予的帮助。

参考文献 (References)

- [1] Sinsabaugh R L, Follstad Shah J J. Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory[J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2012, 43 (1): 313—343.
- [2] Geisseler D, Scow K M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms—A review[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 75: 54—63.
- [3] Trivedi P, Delgado-Baquerizo M, Trivedi C, et al. Microbial regulation of the soil carbon cycle: Evidence from gene–enzyme relationships[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10 (11): 2593—2604.
- [4] Zhang X Y, Dong W Y, Dai X Q, et al. Responses of absolute and specific soil enzyme activities to long term additions of organic and mineral fertilizer[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 536: 59—67.
- [5] Xiao Q, Wang Q Q, Wu L, et al. Fertilization impacts on soil microbial communities and enzyme activities across China's croplands: A meta-analysis[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 24(6): 1598—1609. [肖琼, 王齐齐, 邬磊, 等. 施肥对中国农田土壤微生物群落结构与酶活性影响的整合分析[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24 (6): 1598—1609.]
- [6] Jian S Y, Li J W, Chen J, et al. Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 101: 32—43.
- [7] Chen H, Li D J, Zhao J, et al. Nitrogen addition aggravates microbial carbon limitation: Evidence from ecoenzymatic stoichiometry[J]. *Geoderma*, 2018, 329: 61—64.
- [8] Liu Y H, Wei X M, Wei L, et al. Responses of extracellular enzymes to carbon and phosphorus additions in rice rhizosphere and bulk soil[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51 (9): 1653—1663. [刘玉槐, 魏晓梦, 魏亮, 等. 水稻根际和非根际土磷酸酶活性对碳、磷添加的响应[J]. *中国农业科学*, 2018, 51 (9): 1653—1663.]
- [9] 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. [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.]
- [10] Geisseler D, Linnquist B A, Lazicki P A. Effect of fertilization on soil microorganisms in paddy rice systems—A meta-analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 452—460.
- [11] Luo G W, Li L, Friman V P, et al. Organic amendments increase crop yields by improving microbe-mediated soil functioning of agroecosystems: A meta-analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 124: 105—115.
- [12] Wei L, Tang Z Z, Zhu Z K, et al. Responses of extracellular enzymes to nitrogen application in rice of various ages with rhizosphere and bulk soil[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(8): 3489—3496. [魏亮, 汤珍珠, 祝贞科, 等. 水稻不同生育期根际与非根

- 际土壤胞外酶对施氮的响应[J]. 环境科学, 2017, 38(8): 3489—3496.]
- [13] Dai X L, Zhou W, Liu G R, et al. Soil C/N and pH together as a comprehensive indicator for evaluating the effects of organic substitution management in subtropical paddy fields after application of high-quality amendments[J]. *Geoderma*, 2019, 337: 1116—1125.
- [14] Li J, Cooper J M, Lin Z A, et al. Soil microbial community structure and function are significantly affected by long-term organic and mineral fertilization regimes in the North China Plain[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96: 75—87.
- [15] Cenini V L, Fornara D A, McMullan G, et al. Linkages between extracellular enzyme activities and the carbon and nitrogen content of grassland soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96: 198—206.
- [16] Ai C, Liang G Q, Sun J W, et al. Responses of extracellular enzyme activities and microbial community in both the rhizosphere and bulk soil to long-term fertilization practices in a fluvo-aquic soil[J]. *Geoderma*, 2012, 173/174: 330—338.
- [17] Burns R G, DeForest J L, Marxsen J, et al. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 58: 216—234.
- [18] Ai C, Zhang S Q, Zhang X, et al. Distinct responses of soil bacterial and fungal communities to changes in fertilization regime and crop rotation[J]. *Geoderma*, 2018, 319: 156—166.
- [19] Yu X C, Li D M, Liu K L, et al. Evolution and influencing factors of soil organic carbon under long-term fertilization in subtropical paddy field of China[J]. *Soils*, 2013, 45(4): 655—660. [余喜初, 李大明, 柳开楼, 等. 长期施肥红壤稻田有机碳演变规律及影响因素[J]. 土壤, 2013, 45(4): 655—660.]
- [20] Liu K L, Zhang H M, Han T F, et al. Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on root biomass and nutrient in double cropping rice system[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(18): 3540—3548. [柳开楼, 张会民, 韩天富, 等. 长期化肥和有机肥施用对双季稻根茬生物量及养分积累特征的影响[J]. 中国农业科学, 2017, 50(18): 3540—3548.]
- [21] Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.]
- [22] Wu J S, Lin Q M, Huang Q Y, et al. Soil microbial biomass measurement method and its application[M]. Beijing: China Meteorological Press, 2006. [吴金水, 林启美, 黄巧云, 等. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京: 气象出版社, 2006.]
- [23] DeForest J L. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and l-DOPA[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(6): 1180—1186.
- [24] Meng C, Tian D S, Zeng H, et al. Global meta-analysis on the responses of soil extracellular enzyme activities to warming[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 705: 135992.
- [25] Smilauer P, Lepš J. Multivariate analysis of ecological data using CANOCO 5[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.
- [26] Lü Z Z, Wu X D, Hou H Q, et al. Effect of different application ratios of chemical and organic fertilizers on soil quality in double cropping paddy fields[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2017, 23(4): 904—913. [吕真真, 吴向东, 侯红乾, 等. 有机-无机肥配比比例对双季稻田土壤质量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(4): 904—913.]
- [27] Sun B, Zhao Q G, Zhang T L, et al. Soil quality and sustainable environment -- III. Biological index of soil quality evaluation [J]. *Soils*, 1997, 29(5): 225—234. [孙波, 赵其国, 张桃林, 等. 土壤质量与持续环境—III. 土壤质量评价的生物学指标[J]. 土壤, 1997, 29(5): 225—234.]
- [28] Xu Y C, Shen Q R, Ran W. Effects of zero-tillage and application of manure on soil microbial biomass C, N, and P after sixteen years of cropping[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2002, 39(1): 83—90. [徐阳春, 沈其荣, 冉炜. 长期免耕与施用有机肥对土壤微生物生物量碳、氮、磷的影响[J]. 土壤学报, 2002, 39(1): 83—90.]
- [29] Fan M Z, Yin C, Fan F L, et al. Effects of different long-term fertilization on the activities of enzymes related to carbon, nitrogen, and phosphorus cycles in a red soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(3): 833—838. [范森珍, 尹昌, 范分良, 等. 长期不同施肥对红壤碳、氮、磷循环相关酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2015, 26(3): 833—838.]
- [30] Tian S Y, Wang M W, Cheng Y H, et al. Long-term effects of chemical and organic amendments on red soil enzyme activities[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(15): 4963—4972. [田善义, 王明伟, 成艳红, 等. 化肥和有机肥长期施用对红壤酶活性的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(15): 4963—4972.]
- [31] Du L S, Tang M L, Zhu Z K, et al. Effects of long-term fertilization on enzyme activities in profile of paddy soil profiles[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(8): 3901—3909. [杜林森, 唐美铃, 祝贞科, 等. 长期施肥对不同深度稻田土壤碳氮水解酶活性的影响特征[J]. 环境科学, 2018, 39(8): 3901—3909.]
- [32] Rong Q L, Liang G Q, Zhou W, et al. Effects of different organic fertilization on fertility and enzyme activities of yellow clayey soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(5): 1168—1177. [荣勤雷, 梁国庆,

- 周卫, 等. 不同有机肥对黄泥田土壤培肥效果及土壤酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20 (5): 1168—1177.]
- [33] Xiao W, Chen X, Jing X, et al. A meta-analysis of soil extracellular enzyme activities in response to global change[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 123: 21—32.
- [34] Hong H B, Lin C F, Peng J Q, et al. Effects of phosphorus addition on fine root decomposition and enzyme activity of *Castanopsis carlesii* and *Cunninghamia lanceolata* in subtropical forest[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37 (1): 136—146. [洪慧滨, 林成芳, 彭建勤, 等. 磷添加对中亚热带米槠和杉木细根分解及其酶活性的影响[J]. 生态学报, 2017, 37 (1): 136—146.]
- [35] [35] Lu Y H, Yang Z P, Zheng S X, et al. Effects of long-term application of chemical fertilizer, pig manure, and rice straw on chemical and biochemical properties of reddish paddy soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21 (4): 921—929. [鲁艳红, 杨曾平, 郑圣先, 等. 长期施用化肥、猪粪和稻草对红壤水稻土化学和生物化学性质的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21 (4): 921—929.]
- [36] Yang X D, Zeng X B, Wen J, et al. Effects of application of pig manure on physicochemical properties and enzyme activities of red soil pmland[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57 (3): 739—749. [杨小东, 曾希柏, 文炯, 等. 猪粪施用量对红壤旱地理化性质及酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2020, 2020, 57 (3): 739—749.]
- [37] Zhang Q, Zhou W, Liang G Q, et al. Effects of different organic manures on the biochemical and microbial characteristics of albic paddy soil in a short-term experiment[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124096>.
- [38] Allison S D, Vitousek P M. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37 (5): 937—944.

(责任编辑：陈荣府)