

红壤旱地中土壤酶对长期施肥的响应*

林 天 何园球[†] 李成亮 杨 芳 徐江兵

(中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

RESPONSE OF SOIL ENZYMES TO LONG-TERM FERTILIZATION IN UPLAND RED SOIL

Lin Tian He Yuanqiu[†] Li Chengliang Yang Fang Xu Jiangbing

(Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

关键词 红壤旱地; 土壤酶; 长期施肥; 响应

中图分类号 S154.2 文献标识码 A

土壤酶是土壤生物学活性的重要组成部分, 它催化有机物的矿化释放无机养分, 参与土壤腐殖物质的分解形成, 反映了土壤各种生物化学过程的动向和强度; 其活性与土壤的理化性质和其他生物学特征紧密相关, 且有易于测定的优点, 是近年来土壤质量评估工作中必不可少的内容^[1]。土壤酶一直受到红壤研究者的重视^[2,3], 但这些研究涉及的酶的种类较少, 近年来国外相关文献中的一些常见的酶, 如葡萄糖苷酶、荧光素水解酶、芳基硫酸酯酶等^[4-6]鲜见报道; 也没有回答在长期不同施肥管理条件下, 红壤中酶活性的综合水平特点和土壤酶动力学特征的差异等问题。本文的工作则针对上述问题开展研究, 以期为合理化提高红壤肥力的施肥措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点与供试土壤

样品采自江西余江县中国科学院红壤生态实验站(北纬 28° 15' 20", 东经 116° 55' 30") 长期实验田。2002 和 2003 年 8 月花生收获后采样。按五点法取 0~ 20cm 土壤并将之均匀混合成一个样品。样品分别磨细过 100 目和 20 目筛。供试土壤基本化学性

质见表 1。

表 1 供试土壤的基本化学性质

实验区	pH ¹⁾	———— (g kg ⁻¹) ————			———— (mg kg ⁻¹) ————		
		有机质	全氮	全磷	全钾	有效磷	交换性钾
有机肥	4.7	6.4	0.34	0.53	10.5	3.9	50
无机肥	4.6	5.8	0.40	0.63	11.2	3.7	69

1) W_±: W_水 = 1: 2.5

1.2 试验设计

该试验始于 1989 年, 处理设 3 个重复, 小区面积为 33m²。试验初采取花生—油菜轮作的种植制度, 1994 年以后改为花生单作。具体施肥方案如下:

1.2.1 无机肥试验 设置了 NPKCaS、NPKCa、NPK、NP、NK 和 PK 等共 6 个处理, 其中“Ca”指施用石灰, “S”指施用石膏和四硼酸钠、钼酸铵。

无机肥试验前三年花生施肥量为氮(尿素, N) 75 kg hm⁻², 磷(钙镁磷肥, P₂O₅) 127.5 kg hm⁻², 钾(氯化钾, K₂O) 75 kg hm⁻², 以后化肥用量减至原来用量的 1/2。油菜除氮肥为 1 055 kg hm⁻²外, 其余同花生。石灰用量 1 500 g hm⁻², 硫(石膏, S) 41.85 kg hm⁻², 钼(钼酸铵, Mo) 163.02 g hm⁻², 硼(四硼酸钠, B) 170.1 g hm⁻²。

* 中国科学院知识创新项目(ISSASIP0201, KZCX2-413) 资助

† 通讯作者, E-mail: yqhe@issas.ac.cn

作者简介: 林 天(1979-), 硕士, 从事农业管理措施对土壤酶的影响方面的研究

收稿日期: 2004-05-26; 收到修改稿日期: 2005-01-26

1.2.2 有机肥试验 设置了对照(CK, 施少量化肥)、厩肥、秸秆、绿肥和花生秸秆还田(还田)共 5 个处理。

有机肥试验的前三年化肥施用量同无机肥试验, 每个处理都施。1991 年后化肥用量减至原用量的 1/3。

1.3 分析测试

1.3.1 养分分析 按常规养分分析方法^[7]。

1.3.2 土壤酶活性测定 (1) 脱氢酶(DH): 按 Casida 方法^[8,9] 测定, 酶活性以三苯基甲 (TPF) $\mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$, 37℃表示。(2) β -葡糖苷酶(β -GLY): 按 Eivizi 和 Tabatabai 方法^[9] 测定, 酶活性以对硝基酚(PNP) $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, 37℃表示。(3) 荧光素水解酶(FDA): 按 Schn rer 和 Adam 方法^[10] 测定, 酶活性以荧光素(fluorescein) $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, 30℃表示。(4) 脲酶

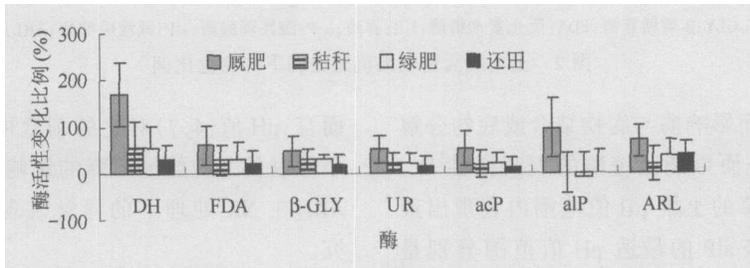
(UR): 按 Kandeler 方法^[11] 测定, 酶活性以铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$) $\mu\text{g g}^{-1} 2\text{h}^{-1}$, 37℃表示。(5) 磷酸酶(acP, 酸性磷酸酶; alP, 碱性磷酸酶): 按 Eivizi 和 Tabatabai 方法^[9] 测定, 酶活性以对硝基酚(PNP) $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, 37℃表示。(6) 芳基硫酸酯酶(ARL): 按 Tabatabai 和 Bremner 方法^[9], 酶活性以对硝基酚(PNP) $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, 37℃表示。

每个样品设 1 个无基质对照和 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 土壤酶活性对长期施用不同有机肥的响应

长期施用有机肥使各种土壤酶活性有不同幅度的提高(以 CK 处理的酶活性为 100%)(图 1)。



DH: 脱氢酶; β -GLY: β -葡糖苷酶; FDA: 荧光素水解酶; UR: 脲酶; acP: 酸性磷酸酶; alP: 碱性磷酸酶; ARL: 芳基硫酸酯酶

图 1 土壤酶活性在有机肥处理下的变化比例

与单施化肥相比, 所有的酶对有机肥都有积极的响应。有机肥对土壤酶活性的贡献主要来自以下三个方面: (1) 有机肥含有丰富的酶, 它对土壤有“加酶”作用; (2) 有机肥改善了土壤的理化性质, 有利于作物和土壤(微)生物的生长, 使更多的酶伴随着旺盛的根系活动和土壤动物、微生物的生命活动而进入土壤; (3) 它能为土壤酶创造良好的反应环境如充足的底物、适宜水分、pH 值、土壤结构等。本实验中以厩肥的效果最佳, 与其他有机肥处理的差异都达到了显著水平, 这说明厩肥在上述几方面优于其他三种有机肥。

其他三种有机肥之间的效果差异均不显著。可能的原因有: (1) 长期施肥使每次施肥的刺激效果减小。持续施用有机肥虽能巩固前一次施肥的效果, 但酶活性因此而增加的幅度会小于前一次的, 如姚胜蕊等^[12] 的实验结果。(2) 土壤结构的影响。土壤中游离土壤酶的含量一般小于总含量的 1%^[11], 大多数土壤酶是以酶-矿物黏粒或酶-腐殖质等复合

体形态而存在。有机肥实验中各级土壤微团聚体含量大都与土壤酶活性在 $p < 0.01$ 水平上显著相关(见表 2), 说明在被研究的土壤中, 各粒径土壤微团聚体的含量对土壤酶有很大影响。因此, 土壤酶活性变化也呈现出与各级土壤微团聚体的变化(数据未列出)相似的趋势, 即以厩肥处理下的和对照的差异显著, 而在其他三种有机肥处理两两之间没有显著差异。

2.2 土壤酶活性对长期施用不同化肥的响应

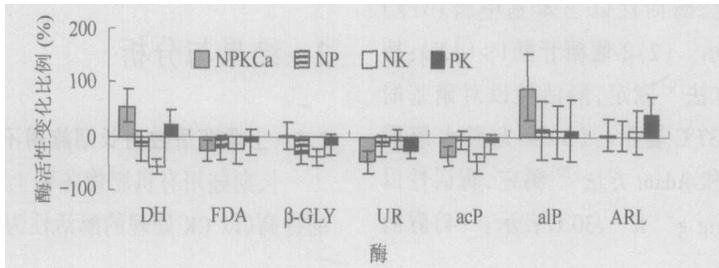
长期施用化肥条件下土壤酶活性的变化比例(以 NPK 处理的酶活性为 100%) 差异很大(图 2)。

长期施用石灰使土壤的 pH 值由 5.8 上升至 7.3, DH 和 alP 因此分别比对照的活性增加了 56% 和 90%, UR、FDA 和 acP 则分别比对照减少了 48% (差异显著)、38% 和 37%, 而 ARL 和 β -GLY 几乎不受石灰的影响, 分别为 NPK 处理的 102% 和 95%。土壤 pH 值是土壤酶促反应重要的环境条件之一, 它通过作用于酶的空间结构、活性部位催化基团、结

表 2 土壤酶活性与土壤微团聚体百分比含量的相关性¹⁾

	DH ²⁾	β -GLY ³⁾	FDA ⁴⁾	UR ⁵⁾	acP ⁶⁾	alP ⁷⁾	ARL ⁸⁾
> 0.25 mm	0.962*	0.804*	0.868*	0.907*	0.944*	0.942*	0.730*
0.25~ 0.05 mm	0.822*	0.965*	0.883*	0.878*	0.838*	0.552	0.682*
0.05~ 0.002 mm	- 0.820*	- 0.824*	- 0.897*	- 0.878*	- 0.84*	- 0.743*	- 0.954*
< 0.002 mm	- 0.795*	- 0.899*	- 0.803*	- 0.802*	- 0.798*	- 0.539	- 0.534

1) $n = 15, p < 0.01, r = 0.694$; * 表示显著相关; 2) DH: 脱氢酶; 3) β -GLY: β -葡萄糖苷酶; 4) FDA: 荧光素水解酶; 5) UR: 脲酶; 6) acP: 酸性磷酸酶; 7) alP: 碱性磷酸酶; 8) ARL: 芳基硫酸酯酶



DH: 脱氢酶; β -GLY: β -葡萄糖苷酶; FDA: 荧光素水解酶; UR: 脲酶; acP: 酸性磷酸酶; alP: 碱性磷酸酶; ARL: 芳基硫酸酯酶

图 2 土壤酶活性在无机肥处理下的变化比例

合基团的解离状态而影响酶与底物结合或底物分解为产物的过程, 并进而影响土壤酶的表现活性^[13]。多数土壤酶都在较窄的土壤 pH 值范围内表现出最大活性。DH、acP 和 alP 的最适 pH 值范围分别是 8~ 9、4~ 6 和 8~ 10^[14,15], 可见上文土壤的 pH 值的改变是有利于 DH 和 alP 而不利 acP 的。此外, β -GLY 的变化也与 Acosta-Martinez^[16] 的长期施石灰实验的结果吻合。而 UR 活性的下降或许应归咎于土壤中累积的 Ca 对产 UR 微生物的毒害作用^[17]。

NK 处理下(长期缺施 P 肥), DH、acP、 β -GLY 和 FDA 的活性分别比对照下降了 56%、48%、38% 和 26%, 均低于其他两个缺素处理的酶活性, 这是因为该处理下的作物的生物量接近于零, 土壤中有有机质、养分含量和 pH 值均低于其他处理, 土壤微生物生命活动因而减缓, 土壤酶活性的下降即是表现之一。而 UR、alP 和 ARL 的活性分别是对照的 93%、109% 和 108%, 即都高于其他两个缺素处理下的酶活性。UR 表现特殊的原因可能有如下三点: (1) NK 处理并没有减少 UR 的底物尿素的供应; (2) 风干土中的 UR 能在很长时间(10a)内维持其大部分活性^[18], 且本实验数据表明它与全 P、有效 P 均无显著相关(数据未列出), 所以它表现出来的活性可能更多的是在作物减产前残留在土壤中的酶活性; (3) 本实验中以钙镁磷肥为无机磷源, 则如上文提到的, NK 处理的土壤有可能因没有 Ca 对产 UR 微生物的胁迫作用而比其他缺素处理的土壤中有更多的 UR。对 alP

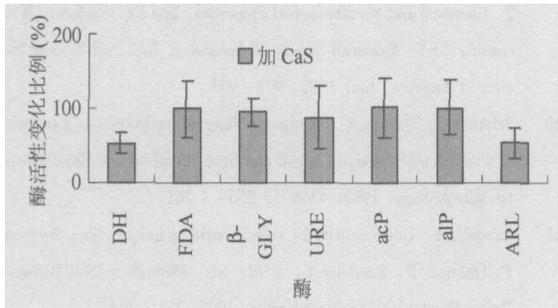
而言, pH 值(4.7)对它的刺激可能掩盖了其他不利条件以及酶的数量下降的影响而使它的活性升高。ARL 在 NK 处理下的异常表现则需要进一步的研究。

NP 处理(长期缺施钾肥)对作物产量和土壤全钾含量都没有明显影响(数据未列出), 与之对应的是所有土壤酶在 NP 处理中虽略有下降但都不明显, 说明土壤中的钾素供应对土壤酶活性影响不大, 这与多数研究者的结果一致^[14]。由于花生有共生固氮功能, PK 处理对作物生长的影响在三种缺素处理中是最小的, 土壤酶对此的反映也与之相似, 但 DH 和 ARL 的活性却分别比 NPK 处理下的增加了 24% 和 40%。尿素对 DH 和 ARL 的这种抑制作用与 Michel 观察到的无机氮肥对土壤中 β -GLY 和多酚氧化酶的抑制作用相似^[19]。

NPKCaS 处理下除 DH 和 ARL 分别比 NPKCa 处理的下降了 48% 和 46% 外, 其他土壤酶的反应则不明显(图 3)。SO₄²⁻ (石膏)能够降低 ARL 的活性^[4], 而根据 Bremner 和 Tabatabai^[20] 的研究, 它还能刺激 DH 活性, 可见钼肥和硼肥对 DH 有抑制作用。

2.3 土壤酶活性综合评价

鉴于土壤酶对各种环境因子的敏感性, 以单一的土壤酶活性为标准容易失之偏颇, 而将它们活性作一个综合的考量则更有可能得到全面客观的结果。本文以主成分分析法^[21]得到各个处理的土壤酶活性的综合分值(图 4)。



DH: 脱氢酶; β-GLY: β-葡糖苷酶; FDA: 荧光素水解酶; UR: 脲酶; acP: 酸性磷酸酶; alP: 碱性磷酸酶; ARL: 芳基硫酸酯酶

图 3 土壤酶活性在 NPKCaS 处理下的变化比例

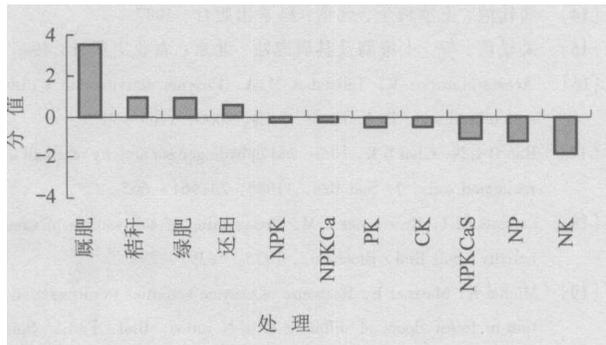


图 4 不同处理下土壤酶活性主成分分析

由图 4 可见, 土壤酶活性综合分值排序为: 厩肥 > 秸秆 > 绿肥 > 还田 > NPK > NPKCa > PK > CK > NPKCaS > NP > NK。以第一和第二主成分(累积贡献率为 88.07%) 中标准化酶活性指标的特征向量的绝对值大小为依据可知, 土壤酶活性中起主要作用的因子群是: β-GLY、FDA、acP 和 ARL 是提供大部分信息的因子群, 它们表征了 C、P、S 的循环强度和真菌、细菌的活性水平^[4~6, 10, 19]; DH 和 UR 次之, 它们与土壤的整体微生物活力水平和尿素水解状况有关^[8, 11]; 而主要受土壤酸度控制的 alP 在主成分分析的结果中作用最小。

2.4 土壤酶动力学特征

土壤酶促动力学研究可以阐明环境因素对酶促反应速度的影响, 而国内关于长期实验对土壤酶动力学的影响的研究还不多见^[22]。本研究通过 Michaelis-Menten 方程 $[S]/V = 1/V_{max}[S] + K_m/V_{max}$ 来探讨长期施肥对土壤酶的最大反应速度 (V_{max}) 及其与底物结合牢固程度 (K_m) 的影响。这里选择 CK、厩肥和还田处理下的三种土壤为研究对象, 实验所得的 acP 和 β-GLY 的特征常数列于表 3。

表 3 长期施肥处理 acP 和 β-GLY 的动力学常数

处理	R ²		V _{max} (μg g ⁻¹)		K _m (mmol g ⁻¹)		V _{max} /K _m	
	acP	β-GLY	acP	β-GLY	acP	β-GLY	acP	β-GLY
CK	0.993	0.990	232.6	35.1	3.25	1.26	71.6	27.9
厩肥	0.994	0.997	250.0	48.3	1.88	1.05	133.0	46.0
还田	0.989	0.993	172.4	32.3	1.60	0.83	107.8	38.9

由表 3 可见, acP 与 β-GLY 的动力学常数在三种处理下的变化趋势基本一致, 即: (1) V_{max} 以厩肥处理下为最高, CK 的次之, 还田的最低, 由于 V_{max} 可表征酶-底物复合体分解为酶和产物(酶促反应控速步骤)的难易程度^[14], 因此这也即三种土壤的酶促反应速度的顺序。此外有学者^[22]认为, V_{max} 还反映了土壤中稳定存在的胞外酶的数量, 可见, 较之于花生秸秆, 厩肥不仅为土壤带入更丰富的酶, 还能更好地保护土壤酶。但花生秸秆还田处理降低 V_{max} 的原因还有待进一步研究。(2) K_m 值以 CK > 厩肥 > 还田, K_m 值越大, 酶对底物的亲和力越小, 从而形成酶-底物复合体的可能性越小, 可见单施化肥不利于提高土壤酶与底物的亲和力, 这可能是因为改变了土壤微生物群落在土壤结构中的分布位置^[8], 而厩肥虽然增加了土壤中酶的数量但同时也使增加的酶更多地与腐殖物质结合, 增加了酶-底物复合体形成的难度, 使 K_m 值提高。(3) V_{max}/K_m 是酶促反应初速度最重要的指标, 它的变化顺序为: 厩肥 > 还田 > CK, 这说明有机肥能提高土壤酶促反应的初速度, 且以厩肥效果为最佳。这与其他学者的研究结果一致^[22]。

3 结 论

1) 所有的酶活性都在厩肥处理下有最高值而对稻草秸秆、绿肥、花生还田的刺激不敏感。与 NPK 处理相比, NPKCa 处理提高了 DH 和 alP 的活性, 但抑制了 UR、FDA、acP 的活性; 石灰和钙镁磷肥使产 UR 细菌受到 Ca 的毒害; 除 DH 和 ARL 活性下降可能分别归咎于四硼酸钠、钼酸和 SO_4^{2-} 的抑制作用外, 其他土壤酶对 NPKCaS 处理都不敏感; NP 处理对所有土壤酶的影响均不显著, 而 PK 处理除明显降低了 DH 和 FDA 的活性外, 效果与 NPK 处理类似; NK 处理使除 UR、alP 和 ARL 外的其他酶活性显著降低。

2) 11种长期施肥土壤的土壤酶的综合活性次序: 厩肥> 秸秆> 绿肥> 还田> NPK> NPKCa> PK> CK> NPKCaS> NP> NK。 β -GLY、FDA、aP和ARL对这个排名的贡献最大, DH和UR次之, aP的作用最小。

3) 本研究中三种处理下土壤酶的动力学特征常数比较: V_{max} 为厩肥> CK> 还田; K_m 为CK> 厩肥> 还田; V_{max}/K_m 为厩肥> 还田> CK。

参考文献

[1] 杨万勤, 王开运. 土壤酶研究动态与展望. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 564~570

[2] 杨玉盛, 何宗明, 林光耀, 等. 退化红壤不同治理模式对土壤肥力的影响. 土壤学报, 1998, 35(2): 276~282

[3] 邱开业, 汪金莲, 陈尚妍, 等. 茶多酚抑制红壤稻田脲酶及其对水稻生长的影响. 土壤学报, 2003, 40(3): 460~464

[4] Klose S, Moore J M, Tabatabai M A. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soil as affected by cropping systems. Biol. Fertil. Soils, 1999, 29: 46~54

[5] Lundgren B. Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil. Okios, 1981, 36: 17~22

[6] Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere, 2000, 40: 339~346

[7] 刘光崧, 等编. 土壤理化分析与剖面描述. 北京: 中国标准出版社, 1996

[8] Masicianlaro G, Ceccanti B, Ronchi V, *et al.* Kinetic parameters of dehydrogenase in the assesment of the response of soil to vermicopost and inorganic fertilizers. Biol. Fertil. Soils, 2000, 32: 429~483

[9] Page A L, Miller R H, Keeney D R. Methods of Soil Analysis, Part

2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd Ed. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, Inc, Soil Science Society of America, Inc, 1982. 903~947

[10] Schn rer J, Thomas R. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(6): 1256~1261

[11] Kandeler E. Urase activity by colorimetric technique. In: Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, *et al.* eds. Methods in Soil Biology. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1995. 171~174

[12] 姚胜蕊, 薛炳焯, 束怀瑞. 有机物料对盆栽苹果土壤酶活性的影响. 土壤肥料, 2000, 1: 32~34

[13] 张建林, 陆欣, 王申贵. 有机物料配比施用对土壤碱性磷酸酶活性的影响. 土壤通报, 2001, 32(3): 75~79

[14] 周礼恺. 土壤酶学. 北京: 科学出版社, 1987

[15] 关松荫, 等. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986

[16] Acosta-Martinez V, Tabatabai M A. Enzyme activities in a limed agricultural soil. Biol. Fertil. Soils, 2000, 3: 85~91

[17] Rao O L N, Ghai S K. Urase and dehydrogenase activity of alkali and reclaimed soils. J. Soil Res., 1985, 23: 661~665

[18] Zantava M I, Bremener J M. Preservation of soil sample of urase activity. Soil Biol. Biochem., 1975, 7: 297~299

[19] Michel K, Matzner E. Response of enzyme activities to nitrogen addition in forest floors of different G-to-N ratios. Biol. Fertil. Soils, 2003, 38: 102~109

[20] Bremner J M, Tabatabai M A. Effect of some inorganic substance on TTC assay of dehydrogenase activity in soils. Soil Biol. Biochem., 1973, 5: 385~386

[21] 程毛林, 李宏文. 全局主成分分析模型及其在环境评价中的应用. 苏州科技学院学报(自然科学版), 2003, 20(2): 29~32

[22] 樊军, 郝明德. 旱地农田土壤脲酶与碱性磷酸酶动力学特征. 干旱地区农业研究, 2002, 20(1): 35~37