

DOI: 10.11766/trxb201503300044

# 施磷处理对中性紫色土土壤硝化作用的影响\*

赵浩淳<sup>1</sup> 周志峰<sup>1</sup> 秦子娴<sup>1</sup> 郭涛<sup>1, 2†</sup>

(1 西南大学资源环境学院, 重庆 400716)

(2 国家紫色土土壤肥力与肥料效益监测基地, 重庆 400716)

**摘要** 针对长期定位试验站长期不施化肥的低磷土壤, 设置了不同水平的磷素添加共9个处理 ( $P_2O_5$  0 ~ 150 mg kg<sup>-1</sup>土), 通过75 d的室内培养实验, 探讨磷素处理对土壤硝化细菌及硝化作用的影响。结果表明, 适量磷素添加显著刺激了硝化细菌生长, 但高浓度磷素添加将抑制硝化细菌数量。进一步通过好氧培养法和悬液法分别测定了土壤硝化潜势, 发现不同水平的磷素短期培养后, 土壤硝化潜势均出现不同幅度的增加, 并且均在 $P_2O_5$  40 ~ 60 mg kg<sup>-1</sup>土之间最高, 但磷素供应水平影响硝化作用的机制仍待进一步研究。

**关键词** 硝化潜势; 硝化细菌; 磷

**中图分类号** S158 **文献标识码** A

土壤氮素是植物生长的主要养分控制因子。农田土壤有机氮转化为无机氮需经过一系列的微生物过程, 将蛋白质、核酸、氨基糖等复杂含氮化合物分解为简单的氨基化合物和铵态氮, 为植物生长提供氮源。同时, 通过微生物氨氧化, 铵态氮可被硝化细菌氧化为亚硝酸盐氮, 进而被亚硝化细菌氧化为硝酸盐, 完成硝化过程<sup>[1]</sup>。由于氨氧化过程是硝化作用的关键限速步骤, 氨氧化微生物常被认为是氮素循环的重要调控者。大量研究发现, 各种地理气候和农业管理等环境因子, 包括温度、pH、施肥、土壤类型及土地利用方式等均可能影响土壤硝化作用<sup>[2-6]</sup>。已有的研究大多关注土壤碳氮交互作用及其对硝化过程的影响, 最近也有报道表明, 磷素供应水平显著影响土壤矿化作用<sup>[7]</sup>以及氨氧化化细菌和古菌的多样性<sup>[8]</sup>。但是, 这一研究依托长期定位实验的田间原位样品分析完成, 长期不

同磷素供应水平导致的土壤物理化学和生物属性差异, 是否与实验室理想的短期模拟结果一致, 目前尚未有相关报道。据此, 本研究针对长期定位试验站的无肥处理土壤, 设置了不同的土壤磷素供应水平, 通过室内培养的方式, 研究了施磷处理对紫色水稻土硝化过程的影响, 初步探索了土壤磷素介导下的土壤氮素转化过程及其影响机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试土壤采自于重庆市北碚区西南大学教学农场“国家紫色土土壤肥力与肥料效益监测基地”(东经106° 26', 北纬30° 26')。年气温18.4 °C (30年平均), 年均降水量1 106 mm、日照1 277 h, 为亚热带季风气候<sup>[8]</sup>。该实验站从1991年开始

\* 国家科技支撑计划项目 (2012BAD05B03)、中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2010B012) 和农业部公益性行业科研专项 (201203030) 资助 Supported by the National Key Technology R&D Program of China (No. 2012BAD05B03), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. XDJK2010B012), and the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201203030)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guotaosd@swu.edu.cn

作者简介: 赵浩淳 (1995—), 女, 四川达州人, 主要研究方向为土壤肥力。E-mail: 1342162733@qq.com

收稿日期: 2015-03-30; 收到修改稿日期: 2015-05-27

行长期肥料定位试验，距今已有24年历史，试验地的种植方式为稻—麦水旱轮作。

于2014年10月水稻收割后采集长期无肥(CK)处理土样，采用“S”布点法随机选定10个点用土钻钻取0~20 cm的耕作层土样混合后，挑去肉眼可见细根，放入冰箱于4℃保存，用于土壤短期磷酸二氢钠处理培养。土壤基本理化性质如下：pH 7.94、土壤有机质20.63 g kg<sup>-1</sup>、全氮1.07 g kg<sup>-1</sup>、全磷0.46 g kg<sup>-1</sup>、全钾19.67 g kg<sup>-1</sup>、硝态氮3.19 mg kg<sup>-1</sup>、铵态氮9.23 mg kg<sup>-1</sup>、有效磷1.58 mg kg<sup>-1</sup>、速效钾53.50 mg kg<sup>-1</sup>。

## 1.2 试验方法

称取长期无肥(CK)处理新鲜土样2 000 g过2 mm筛，测定含水量，放于一塑料小盆中，记录重量后置于25℃恒温培养箱中预培养10 d，期间每天按重量变化补充损失水分，使土壤含水量保持恒定。预培养结束后，取约50 g土于50 ml干净离心管中，每个土壤分别以溶液形式添加有效磷(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)浓度为0、10、20、30、40、50、70、100、150 mg kg<sup>-1</sup>土的磷酸二氢钠，混匀，不同土壤保持相同的含水量，于25℃恒温避光培养75 d，期间根据重量补充水分。一共9个处理，每个处理4个重复。75 d后取样，土样样品用于硝化细菌数量、硝化潜势和硝化强度的测定。

硝化细菌的测数采用最大或然值法(Most probable number, MPN)<sup>[9]</sup>。土壤硝化潜势(Potential nitrification rate, PNR)测定采用氯酸盐抑制法<sup>[10]</sup>。以水土比4:1向5 g土壤中加入含1 mmol L<sup>-1</sup>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的磷酸盐缓冲液(NaCl 8.0 g L<sup>-1</sup>, KCl 0.2 g L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g L<sup>-1</sup>; pH 7.4)，并加入10 mmol L<sup>-1</sup> KClO<sub>3</sub>溶液抑制亚硝酸盐的氧化。土样悬液于25℃黑暗培养24 h后加入5 ml 2 mol L<sup>-1</sup> KCl溶液浸提NO<sub>2</sub>-N。NO<sub>2</sub>-N以N-(1-萘基)-乙二胺显色，在540 nm波长下测定，用测得单位时间单位土壤样品增加的NO<sub>2</sub>-N含量表示硝化潜势。硝化强度(Nitrification intensity)的测定采用好氧土壤硝化势测定法<sup>[11]</sup>。称取各处理过2 mm筛相当于20 g干土的新鲜土样于500 ml三角瓶中，加入一定量的碳酸钙粉，调节土壤pH至6.2~6.5，再加入相当于N 250 mg kg<sup>-1</sup>干土的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液，调节土壤含水量为最大持水量的60%，加塞，于30℃恒温箱培养21 d，培养

结束后，采用1 mol L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浸提，离心，上清液除去NO<sub>2</sub>后用比色法测定NO<sub>3</sub>-N浓度，硝化强度用测得单位土壤样品增加的NO<sub>3</sub>-N含量百分比表示。这两种不同的方法均用于表示水稻土的硝化潜势。

## 1.3 统计分析

原始数据在Excel中进行标准化处理，采用Excel、SPSS等统计软件进行统计分析，5%水平下LSD多重比较检验各处理平均值之间的差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 短期不同磷素供应水平下土壤硝化细菌数量的变化

如图1所示，长期未施用化肥的中性水稻土，添加不同水平P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>培养75 d后土壤硝化细菌数量发生明显变化。添加P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 20 mg kg<sup>-1</sup>土处理的硝化细菌数量最高达17.65 × 10<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>干土，30 mg kg<sup>-1</sup>土处理次之，且差异不显著；其次为40 mg kg<sup>-1</sup>土处理；50 mg kg<sup>-1</sup>和100 mg kg<sup>-1</sup>土处理土壤硝化细菌数量相差不大，但均高于0 mg kg<sup>-1</sup>土处理；其他处理与0 mg kg<sup>-1</sup>土处理无显著性差异。总体而言，当磷素(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)供应水平高于20 mg kg<sup>-1</sup>土，土壤硝化细菌数量随磷酸盐浓度的提高而减少，但未表现出线性规律。

### 2.2 短期不同磷素供应水平下土壤硝化潜势的变化

如图2所示，长期(自1991年)未施用化肥的中性水稻土培养75 d后，随着磷素添加水平的提高土壤硝化潜势呈升高趋势。P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>在50 mg kg<sup>-1</sup>土处理土壤硝化潜势最高，并且之后随着磷素供应水平的提高，硝化潜势呈降低趋势，但总体仍高于对照未添加磷素处理。且50 mg kg<sup>-1</sup>土处理土壤硝化潜势最高达NO<sub>2</sub>-N为0.421 μg g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>，其次为70、100、40和30 mg kg<sup>-1</sup>土处理，各处理间无显著性差异。P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>在150、20、10 mg kg<sup>-1</sup>土处理与0 mg kg<sup>-1</sup>土处理相比差异不显著。由此说明中性紫色水稻土硝化潜势与磷酸盐浓度有较强规律性。

### 2.3 短期不同磷素供应水平下土壤硝化强度的变化

从图3可知，长期未施用化肥的中性水稻土培养75 d后，随着磷素添加水平的提高土壤硝化强度呈升高趋势，在添加P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>为40 mg kg<sup>-1</sup>土处理土壤硝化强度最大，并且之后随着磷素供应水平的增

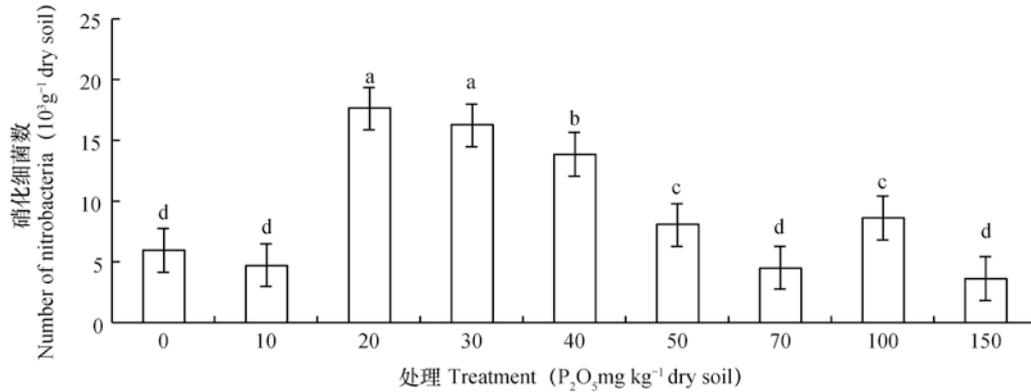


图1 施入磷酸二氢钠75 d后土壤硝化细菌数的变化

Fig. 1 Number of nitrifying bacteria in a neutral paddy soil 75 days after application of disodium dihydrogen pyrophosphate

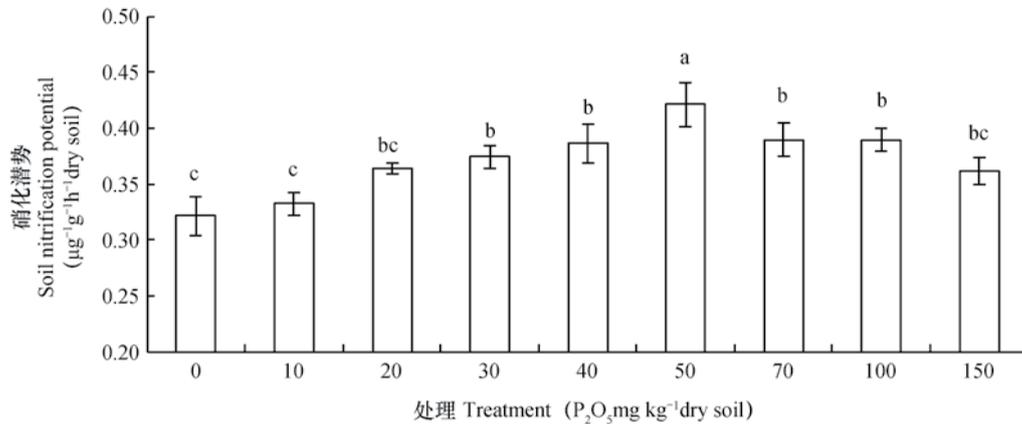


图2 施入磷酸二氢钠75 d后土壤硝化潜力的变化

Fig. 2 Variation of soil nitrification potential 75 days after application of disodium dihydrogen pyrophosphate

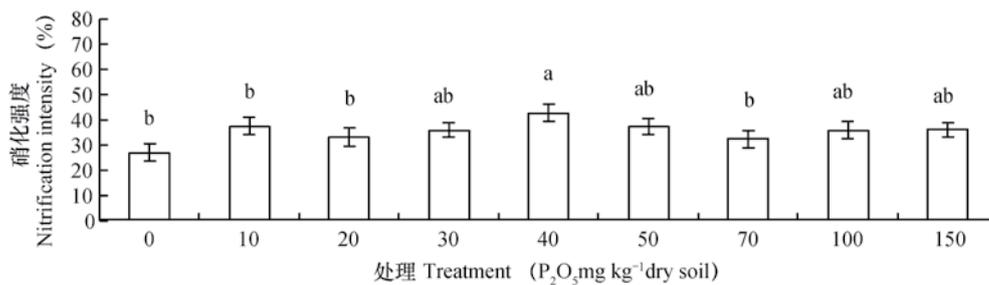


图3 施入磷酸二氢钠75 d后土壤硝化强度的变化

Fig. 3 Variation of soil nitrification intensity 75 days after application of disodium dihydrogen pyrophosphate

加, 硝化强度呈降低趋势。在P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>为40 mg kg<sup>-1</sup>土处理土壤硝化强度高达42.9%, 其次为50、100、30 mg kg<sup>-1</sup>和150 mg kg<sup>-1</sup>土处理, 但各处理间无显著性差异。对比综合图2、图3, 土壤硝化潜力、土壤硝化强度呈现出基本相似的规律。

### 3 讨论

硝化细菌数量的多少能在一定程度上反映土壤氮素供给能力。已有的研究表明, 土壤有效磷与中性紫色水稻土硝化细菌的数量呈显著正相关关系

( $r=0.656$ ,  $p<0.05$ ), 可能在一定程度上影响了土壤硝化作用<sup>[12]</sup>。结果显示, 短期磷酸二氢钠处理75 d后, 添加 $P_2O_5$ 为 $20\text{ mg kg}^{-1}$ 土处理的硝化细菌数量最高达 $17.65 \times 10^3\text{ g}^{-1}$ 干土, 是未添加磷处理土壤硝化细菌数量的2.94倍, 可能外源添加磷源硝化细菌提供了充足的营养物质所致, 随着磷酸二氢钠投入的增加土壤硝化细菌数量呈下降趋势, 郑宪清等<sup>[13]</sup>研究结果也表明施磷会降低硝化细菌的数量, 本试验进一步验证了土壤磷营养是硝化细菌数量的主要影响因子之一<sup>[14]</sup>, 但其具体规律和影响机理有待深入研究。

本试验还表明了土壤硝化潜势呈规律性变化。用氯酸盐抑制法(即悬液法)测定土壤硝化潜势的变化时,  $P_2O_5$ 在 $0\sim 50\text{ mg kg}^{-1}$ 土处理中, 随着施磷水平的提高, 土壤硝化潜势表现出相应增强, 而后随着施磷水平的提高, 土壤硝化潜势则表现出减弱的趋势, 可能与该处理土壤硝化微生物数量或活性受到磷影响有关, 而高于 $50\text{ mg kg}^{-1}$ 土处理土壤硝化潜势有所降低, 高浓度的磷酸盐可能抑制了土壤硝化菌的生长, 这与他人的研究类似<sup>[15-16]</sup>。关于不同磷水平浓度对于硝化潜势的影响及原因报道较少, T-RFLP的研究表明长期定位施磷处理与未施磷处理之间的氨氧化微生物的多样性有所差异, 在功能上也表现出相对应的变化<sup>[8]</sup>。

施肥是影响土壤微生物硝化强度的重要因素<sup>[17]</sup>。用好氧土壤硝化势测定法测定土壤硝化强度的变化, 与用氯酸盐抑制法测定土壤硝化潜势的变化相比呈现出基本一致的规律。本试验各处理施入磷酸二氢钠75 d后土壤硝化强度在添加 $P_2O_5$ 为 $40\text{ mg kg}^{-1}$ 土处理土壤硝化强度高达42.9%, 之后随着磷素供应水平的提高, 硝化强度呈降低趋势。说明土壤磷酸盐浓度对土壤硝化强度有一定影响, 这与用氯酸盐抑制法得出的结果基本一致。

此项研究结果初步表明了施加无机磷对土壤硝化作用的规律性影响, 但具体机制仍不清楚。研究影响硝化作用的关键微生物及影响该微生物的关键因子, 以及用不同水平的磷素进行室内连续培养实验并测定具体的变化规律将是下一步研究的主要方向。

## 4 结 论

通过短期培养施加不同水平磷对中性紫色土硝化作用的初步探究得出, 适量磷素添加显著刺激了

硝化细菌生长, 但高浓度抑制其生长。不同水平的磷素短期培养后, 土壤硝化潜势均出现不同幅度的增加, 并且均在 $P_2O_5\ 40\sim 60\text{ mg kg}^{-1}$ 土之间最高。

## 参 考 文 献

- [1] Falkowski P G, Fenchel T, Delong E F. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*, 2008, 320 (5879): 1034—1039
- [2] Gruber N, Galloway J N. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 2008, 451 (7176): 293—296
- [3] Prosser J. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 1990, 30: 125
- [4] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. *生态学报*, 2009, 29 (1): 406—415  
He J Z, Zhang L M. *Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle (In Chinese)*. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29 (1): 406—415
- [5] 张苗苗, 王伯仁, 李冬初, 等. 长期施加氮肥及氧化钙调节对酸性土壤硝化作用及氨氧化微生物的影响. *生态学报*, 2015, 35 (19): 1—12  
Zhang M M, Wang B R, Li D C, et al. Effects of long-term N fertilizers application and liming on nitrification and ammonia oxidizers in acidic soils (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35 (19): 1—12
- [6] 贺纪正, 张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制. *微生物学通报*, 2013, 40 (1): 98—108  
He J Z, Zhang L M. Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation (In Chinese). *Microbiology*, 2013, 40 (1): 98—108
- [7] 秦子娟, 张宇亭, 周志峰, 等. 长期施肥对中性紫色水稻土氮素矿化和硝化作用的影响. *中国农业科学*, 2013, 46 (16): 3392—3400  
Qin Z X, Zhang Y T, Zhou Z F, et al. Characteristics of mineralization and nitrification in neutral purple paddy soil from a long-term fertilization experiment (In Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46 (16): 3392—3400
- [8] Zhou Z F, Shi X J, Zheng Y, et al. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in purple soil under long-term fertilization. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 60: 24—33
- [9] 丁昌璞, 徐仁扣. 土壤的氧化还原过程及其研究法. 北京: 科学出版社, 2011: 60—62  
Ding C P, Xu R K. *The oxidation reduction processes of soils and their research methods (In Chinese)*. Beijing: Science Press, 2011: 60—62

- [ 10 ] Kurolo J, Salkinoja-Salonen M, Aarnio T, et al. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 250 ( 1 ) : 33—38
- [ 11 ] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 260—262
- Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry ( In Chinese ). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000: 260—262
- [ 12 ] 秦子娴. 长期施肥紫色水稻土氮素矿化及氨氧化菌的分子生态学研究. 重庆: 西南大学, 2014
- Qin Z X. Nitrification and ammonia-oxidizing microorganisms in purple paddy soil from long-term fertilization experimen ( In Chinese ). Chongqing: Southwest University, 2014
- [ 13 ] 郑宪清, 孙波, 胡锋, 等. 中亚热带水热条件对农田置换土壤硝化强度的影响. *生态学报*, 2009, 29 ( 2 ) : 1024—1031
- Zheng X Q, Sun B, Hu F, et al. Impact of temperature and rain fall on soil nitrification intensity in the middle subtropical region ( In Chinese ). *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29 ( 2 ) : 1024—1031
- [ 14 ] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam under different long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 ( 6 ) : 1601—1611
- [ 15 ] 武传东, 辛亮, 李秀颖, 等. 长期施肥对黄土旱塬黑垆土氨氧化古菌群落多样性和丰度的影响. *中国农业科学*, 2011, 44 ( 20 ) : 4230—4239
- Wu C D, Xin L, Li X Y, et al. Effects of long-term fertilization on diversity of ammonia-oxidizing archaea communities and abundance in dry highland soil of Loess Plateau ( In Chinese ). *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44 ( 20 ) : 4230—4239
- [ 16 ] Herfort L, Schouten S, Abbas B, et al. Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62 ( 3 ) : 242—257
- [ 17 ] 郭志英, 贾仲君. 中国典型生态系统土壤硝化强度的整合分析. *土壤学报*, 2014, 51 ( 6 ) : 1317—1324
- Guo Z Y, Jia Z J. Meta-analysis of soil nitrification activity in typical ecosystems of China ( In Chinese ). *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51 ( 6 ) : 1317—1324

## Influence of Phosphorus Application on Nitrification of Neutral Purple Soil

ZHAO Haochun<sup>1</sup> ZHOU Zhifeng<sup>1</sup> QIN Zixian<sup>1</sup> GUO Tao<sup>1, 2†</sup>

( 1 College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China )

( 2 National Monitoring Base for Purple Soil Fertility and Fertilizer Efficiency, Chongqing 400716, China )

**Abstracts** Samples of soils low in phosphorus availability were collected from the National Monitoring Base for Purple Soil Fertility and Fertilizer Efficiency for an indoor experiment, which was designed to have 9 treatments, in terms of phosphate application rate (  $P_2O_5$  0 ~ 150 mg  $kg^{-1}$  ) and had the soil samples incubated for 75 days, after P fertilizer in the form of disodium dihydrogen pyrophosphate was amended. Analysis of the incubated samples shows that the application of a proper rate of P significantly stimulated the growth of nitrifying bacteria and that of a higher rate had a reverse effect. Treatment 20 (  $P_2O_5$  20 mg  $kg^{-1}$  ) was the highest in number of the bacteria. Potential nitrification rates ( PNR ) of the soil samples were determined with the aerobic incubation method and the suspension method, separately. PNR increased in all the treatments to a varying extent and Treatment 50 (  $P_2O_5$  50 mg  $kg^{-1}$  ) was found to be the highest in PNR. The effect of phosphorus on soil nitrifying capacity is similar to that on PNR in tendency. However, further study is needed mechanisms of phosphorus application rate affecting soil nitrification.

**Key words** Soil nitrification potential; Nitrifying bacteria; Phosphorus

( 责任编辑: 卢 萍 )