

陈意超, 李伏生, 李焰布. 不同灌溉方式和尿素猪粪比例对稻田氮素转化相关微生物活性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(1): 31-39.

不同灌溉方式和尿素猪粪比例对稻田氮素转化相关微生物活性的影响

陈意超, 李伏生, 李焰布

(广西大学 农学院/广西喀斯特地区节水农业新技术院士工作站/广西高校作物栽培学与耕作学重点实验室, 广西 南宁 530005)

摘要:【目的】弄清“薄浅湿晒”和干湿交替灌溉方式下稻田氮素转化相关微生物活性的变化规律。【方法】试验设3种灌溉方式(CIR: 常规灌溉; TIR: “薄浅湿晒”灌溉; DIR: 干湿交替灌溉)和3种施氮处理(FM1: 全尿素; FM2: 猪粪替代30%尿素; FM3: 猪粪替代50%尿素), 测定了分蘖期、孕穗期、乳熟期和成熟期土壤亚硝酸细菌、硝酸细菌和反硝化细菌数量以及脲酶、羟胺还原酶、亚硝酸还原酶和硝酸还原酶的活性, 并分析了各微生物活性指标之间的相互关系。【结果】孕穗期不同处理土壤亚硝酸细菌、硝酸细菌和反硝化细菌数量较多, 脲酶、亚硝酸还原酶和硝酸还原酶活性较高, 且DIR方式下土壤羟胺还原酶活性较高。FM3处理下, 与CIR方式相比, DIR方式下的土壤亚硝酸细菌数量在分蘖期提高2.31倍, 分蘖期至乳熟期的平均土壤硝酸细菌数量及脲酶、羟胺还原酶、亚硝酸还原酶活性分别增加2.07、0.81、554.72和1.78倍, 但是4个时期的平均反硝化细菌数量以及硝酸还原酶活性分别下降31.34%和43.82%。TIR方式下的土壤氮素转化相关微生物指标与CIR方式的差异因施肥处理和生育期而异。DIR方式下, 与FM1相比, FM3处理显著增加乳熟期土壤亚硝酸细菌数量、孕穗期和成熟期硝酸细菌数量、分蘖期和成熟期反硝化细菌数量、乳熟期和成熟期土壤脲酶活性、分蘖期和乳熟期土壤羟胺还原酶活性以及孕穗期土壤亚硝酸还原酶和硝酸还原酶活性。除硝酸还原酶活性与硝酸细菌数量、亚硝酸还原酶活性之间的相关关系不显著外, 其他指标之间呈显著相关。【结论】水稻孕穗期是稻田土壤氮素转化相关微生物的活跃时期, DIR方式能有效提高分蘖期和孕穗期大部分土壤氮素转化相关微生物指标, 而TIR方式和FM3处理在乳熟期或成熟期可显著增加土壤氮素转化相关微生物活性。

关键词: 节水灌溉; 有机无机氮比例; 水稻土; 氮素转化; 酶活性

中图分类号: S154.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2018)01-0031-09

Effects of different irrigation methods and ratios of urea pig manure on microbial activity related to nitrogen transformation in paddy soil

CHEN Yichao, LI Fusheng, LI Luobu

(College of Agriculture, Guangxi University/Guangxi Academician Work Station of the New Technology of Water-saving Agriculture in Karst Region/Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Crop Cultivation and Tillage, Nanning 530005, China)

Abstract: 【Objective】To understand the changes of microbial indexes related to nitrogen transformation in paddy field under “thin-shallow-wet-dry” and alternate drying and wetting irrigation methods. 【Method】We used three irrigation methods (CIR: conventional irrigation, TIR: “thin-shallow-wet-dry” irrigation, DIR: alternate

收稿日期: 2017-04-26 优先出版时间: 2017-12-29

优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20171229.1142.036.html>

作者简介: 陈意超 (1990—), 男, 硕士研究生, E-mail: 376422530@qq.com; 李伏生 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: lpfu6@163.com; 通信作者: 李伏生 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: lpfu6@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (51469003)

drying and wetting irrigation), and three nitrogen (N) treatments (FM1: all urea, FM2: 30% urea substituted by pig manure, FM3: 50% urea substituted by pig manure). The numbers of nitrite bacteria, nitrate bacteria, denitrifying bacteria and the activities of urease, hydroxylamine reductase, nitrite reductase and nitrate reductase were measured at tillering, booting, milky and ripening stages. The relationships among the microbial activity indices were analyzed. 【Result】 At booting stage, the numbers of nitrite bacteria, nitrate bacteria and denitrifying bacteria were relatively large, and the activities of urease, nitrite reductase and nitrate reductase were relatively high in soil under different treatments. Hydroxylamine reductase activity was relatively high by DIR method. Under FM3 treatment, compared to CIR method, DIR method increased the number of nitrite bacteria by 2.31 times at tillering stage, increased the number of nitrate bacteria and the activities of urease, hydroxylamine reductase and nitrite reductase by 2.07, 0.81, 554.72 and 1.78 times from tillering stage to milky stage, but reduced the average number of denitrifying bacteria and nitrate reductase activity by 31.34% and 43.82% respectively at four growth stages. The differences of microbial indexes related to nitrogen transformation in paddy soil between TIR and CIR methods varied with N treatments and growth stages. Using DIR method, compared to FM1, FM3 significantly increased the number of nitrite bacteria at milky stage, the number of nitrate bacteria at booting and ripening stages, the number of denitrifying bacteria at tillering and ripening stages, urease activity at milky and ripening stages, hydroxylamine reductase activity from tillering stage to milky stage, and activities of nitrite reductase and nitrate reductase at booting stage. Except the insignificant correlations among nitrate reductase activity, the number of nitrate bacteria and nitrite reductase activity, there were significant correlations among other microbial indexes. 【Conclusion】 The rice booting stage is the active stage of microbial activity related to nitrogen transformation in paddy field. DIR method can effectively enhance most microbial indexes related to nitrogen transformation in soil at tillering and booting stages. TIR method and FM3 treatment can significantly increase microbial activities related to nitrogen transformation in soil at milky and ripening stages.

Key words: water-saving irrigation; ratio of organic to inorganic nitrogen; paddy soil; nitrogen transformation; enzyme activity

土壤氮素转化相关微生物是构成稻田氮循环的关键环节，其数量会受到土壤灌水方式与施肥的影响^[1]，但不同微生物对土壤环境改变的敏感程度不同^[2]。研究表明，在有水层条件下，土壤亚硝酸细菌和硝酸细菌生长缓慢，而反硝化细菌能够生长较快；干湿交替初期刺激反硝化细菌数量增长，硝化细菌数量降低^[3]。“薄浅湿晒”灌溉方式土壤硝化细菌数量较常规灌溉方式有所增加，而反硝化细菌数量有所下降^[4]。长期单施化肥或 NPK 肥均衡施用土壤硝化细菌数量较不施肥土壤增加，而土壤反硝化细菌数量减少；NPK 配施秸秆或有机肥较单施化肥、非均衡施肥或撂荒土壤硝化、反硝化细菌数量均显著增加^[5-6]。

土壤氮素转化相关酶活性可以反映土壤氮素转化与供给状况^[7]，也受灌水方式和施肥等因素影响^[8]。脲酶促使尿素水解为氨和二氧化碳^[9]，其活性可以表征土壤无机氮供应能力。硝酸还原酶和亚硝酸还原酶是土壤反硝化作用中的 2 种关键性还原酶（反硝化酶），其活性大小体现了土壤反硝化能力的强弱^[9]。羟胺还原酶是土壤硝态氮同化还原为铵的中间产物酶，可将中间产物 NH_2OH 还原成 $\text{NH}_3\text{—OH}$ ^[8]，其活性大小与土壤氨挥发和 N_2O 排放

有关。以往研究指出，与常规灌溉相比，控制灌溉和间歇灌溉可提高土壤脲酶活性^[10]，反硝化酶活性随干旱—复湿的进行呈现“脉冲”式变化，但在淹水或恒湿条件下其活性较大^[11]。土壤高含水量情况下，硝酸还原酶和亚硝酸还原酶活性均较高，而羟胺还原酶活性较低^[12]。有关有机无机肥配施对土壤酶活性的影响报道较多，有机肥的施入可显著提高氮素转化酶活性，且有机肥结合化肥施用效果最佳^[13-14]。

“薄浅湿晒”和干湿交替灌溉技术是我国南方地区应用较广的稻田节水灌溉方式^[15-16]，通过调节水稻不同生育期灌水量，达到提高水稻产量和水分利用效率的目的。但由于这 2 种灌溉方式下不同时期土壤水分不同，土壤通气状况相应变化，从而土壤氮素转化相关微生物活性将受到影响。且在有机肥替代化肥条件下，“薄浅湿晒”和干湿交替灌溉对水稻不同生育期土壤氮素转化相关微生物数量与酶活性的影响研究较少，有待探明这 2 种灌溉方式稻田氮素转化相关微生物活性的变化规律。因此，本文在不同尿素猪粪比例下，研究不同灌溉方式对水稻不同生育时期土壤氮素转化相关的亚硝酸细菌、硝酸细菌和反硝化细菌数量以及脲酶、羟胺还原酶、亚硝酸还原酶和硝酸还原酶活性的影

响, 并分析土壤各微生物活性指标之间的关系, 以揭示“薄浅湿晒”和干湿交替灌溉下的稻田氮素转化相关微生物活性的变化规律。

1 材料与方法

1.1 试验材料

盆栽试验在广西大学农业资源与环境系网室内进行。供试土壤为第四纪红色黏土发育的赤红壤, 风干、粉碎、过 10 mm 筛备用, 土壤 pH 6.41, 有机质 17.36 g·kg⁻¹, 碱解氮 114.6 mg·kg⁻¹(1 mol·L⁻¹NaOH 碱解扩散法), 速效磷 35.9 mg·kg⁻¹(0.5 mol·L⁻¹NaHCO₃, 钼蓝比色法) 和速效钾 89.2 mg·kg⁻¹(1 mol·L⁻¹中性 NH₄Ac 法提取, 火焰光度计法测定)。供试有机肥为腐熟猪粪, 其全 N、P₂O₅、K₂O 和有机质质量分数分别为 0.53%、0.49%、0.37% 和 14.87%(干基), 水分含量 (w) 为 71.23%。试验尿素为 w(N)=46%, 过磷酸钙为 w(P₂O₅)=12%, 氯化钾为 w(K₂O)=60%。供试水稻 *Oryza sativa* 品种为‘Y 两优 3218’。试验盆钵规格: 上部直径 38 cm, 下部直径 35 cm, 高 40 cm; 每盆称取上述土壤 20.0 kg 拌匀基肥于桶内, 装盆后淹水 3 d(20~30 mm 水层)。盆底没有排水孔, 故没有水分排出。

1.2 试验方法

盆栽试验设 3 种灌溉模式, 即常规灌溉 (CIR): 移栽返青期、分蘖期到乳熟期盆内均保持 25~30 mm 水层左右, 分蘖末期和成熟期仅保持土壤湿润; 干湿交替灌溉 (DIR): 参照张自常等^[17]的方法, 移栽后 7 d 内盆内保持 20 mm 左右水层, 而后进行干湿交替灌溉, 即当土壤水势为-15 kPa(用张力计 TEN45 监测, 南京土壤研究所工厂) 时, 灌水至 20 mm, 如此循环, 至水稻成熟结束; “薄浅湿晒”灌溉 (TIR): 参照梁燕菲等^[4]的方法。3 种施氮处理为 FM1(全尿素)、FM2(猪粪替代 30% 尿素) 和 FM3(猪粪替代

50% 尿素), 所有处理 N、P₂O₅ 和 K₂O 用量相同, 分别为 0.150、0.075 和 0.150 g·kg⁻¹, 其中 FM1 不施猪粪, FM2 每盆施猪粪 169.8 g, FM3 每盆施猪粪 283.0 g。全部磷肥和猪粪, 部分尿素、氯化钾作基肥施入, 装盆时与土壤充分混匀, 其中 FM1 施入 50% 的尿素和氯化钾, FM2 施入全部猪粪和 20% 尿素 N, 以及 FM3 施入全部猪粪, 根据有机肥中钾用量, 用氯化钾补足作基肥, 余下 50% 的尿素和氯化钾分别以分蘖肥 (移栽后 15 d) 和穗肥 (移栽后 55 d) 均按 25% 的比例施入。试验共 9 个处理, 每处理 3 个重复, 共 27 盆, 随机排列。

试验于 2014 年 6 月 13 日播种, 水稻催芽露白后, 培育至三叶一心期, 选取长势一致的幼苗于 7 月 10 日移栽, 每盆 3 穴, 1 穴 1 株, 移栽深度 2~3 cm。秧苗移栽前所有盆内土壤均保持浅水层 (20~30 mm)。不同灌水处理从 7 月 16 日秧苗返青后进行, 至 10 月 20 日水稻黄熟后结束, 10 月 23 日全部收获完毕, 全生育期 132 d。此外, 试验期间其他农学管理措施一致。

1.3 土壤采集与测定

在分蘖期 (7 月 26 日, 移栽后 16 d)、孕穗期 (8 月 30 日, 移栽后 51 d)、乳熟期 (9 月 20 日, 移栽后 72 d) 与成熟期 (10 月 13 日, 移栽后 95 d) 采集土样, 每次采样时间为灌水处理后的次日上午, 分别采集不同处理 0~20 cm 土层土壤并混匀, 装入保鲜袋, 迅速带回实验室, 用于测定微生物数量、酶活性, 不能及时处理的部分土壤于冰箱 4 ℃ 条件下保存, 1 周内完成测定。同时用烘干法测定土壤含水率, 以便计算每克干土中土壤微生物数量和酶活性。

土壤亚硝酸细菌、硝酸细菌和反硝化细菌培养基配方见表 1, 均用 MPN 计数法测定。亚硝酸细菌数量用 Griess 试剂进行检测, 硝酸细菌数量用二苯胺试剂检测, 反硝化细菌数量用奈氏试剂、格利斯

表 1 不同微生物培养基配方
Tab. 1 The medium formulas of different microorganisms

亚硝化细菌		硝化细菌		反硝化细菌	
成分	m/g	成分	m/g	成分	m/g
硫酸铵(NH ₄) ₂ SO ₄	2.00	亚硝酸钠(NaNO ₂)	1.00	柠檬酸钠(C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ ·3H ₂ O)	5.00
磷酸氢二钾K ₂ HPO ₄	0.75	磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	0.75	磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	1.00
磷酸二氢钠NaH ₂ PO ₄	0.25	磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄)	0.25	磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.00
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.03	硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.03	硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.20
碳酸钙(CaCO ₃)	5.00	碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	5.00	硝酸钾(KNO ₃)	2.00
硫酸锰(MnSO ₄ ·4H ₂ O)	0.01	硫酸锰(MnSO ₄ ·4H ₂ O)	0.01	蒸馏水	1 000.00
蒸馏水	1 000.00	蒸馏水	1 000.00		
pH	7.2	pH	7.2	pH	7.2

试剂和二苯胺试剂结合检测^[9]。脲酶活性用苯酚-次氯酸钠测定^[18],羟胺还原酶活性用硫酸亚铁邻菲罗啉法测定^[19],硝酸还原酶活性用酚二磺酸比色法测定^[20],亚硝酸还原酶活性用格里试剂显色与酶促反应前后 NO₂⁻-N 变化表征^[6]。

1.4 统计分析

试验所有数据均采用 Excel2003 和 SPSS17.0 软件进行分析,不同处理各指标平均值的比较采用 Duncan’s 新复极差法。

2 结果与分析

2.1 土壤硝化和反硝化细菌数量

2.1.1 亚硝酸细菌数量 表 2 表明,不同处理土壤亚硝酸细菌数量以孕穗期较多,其他时期数量较少。在分蘖期 DIR 土壤亚硝酸细菌平均数量为 25.62×10³ g⁻¹,显著高于 CIR 和 TIR;全尿素

(FM1) 处理下乳熟期 TIR 土壤亚硝酸细菌数量为 18.51×10³ g⁻¹,较 CIR 和 DIR 分别多 109.63% 和 83.27%,且差异显著;FM2 处理下 TIR 与 DIR 土壤亚硝酸细菌数量在乳熟期显著高于 CIR,成熟期显著低于 CIR;FM3 处理下孕穗期和乳熟期 TIR 土壤亚硝酸细菌数量均显著高于 CIR,成熟期 DIR 土壤亚硝酸细菌数量显著低于 CIR 和 TIR。相同灌溉方式下,DIR 的分蘖期 FM3 处理土壤亚硝酸细菌数量 (21.56×10³ g⁻¹),显著低于 FM1 和 FM2,而在孕穗期 (40.23×10³ g⁻¹),显著高于 FM1 和 FM2;孕穗期 TIR 灌溉方式下 FM3 处理的土壤亚硝酸细菌数量为 37.96×10³ g⁻¹,较 FM1 增加 53.68%,乳熟期各灌溉方式下 FM1 处理的土壤亚硝酸细菌数量均显著低于 FM3,成熟期 CIR 和 TIR 灌溉方式下 FM3 处理的土壤亚硝酸细菌数量显著高于 FM1。

表 2 灌溉方式和施氮处理对土壤亚硝酸细菌数量的影响

Tab. 2 Effect of irrigation method and N treatment on the number of nitrite bacteria in soil

灌溉方式	施氮处理 ¹⁾	亚硝酸细菌数量 ²⁾ /(×10 ³ g ⁻¹)			
		分蘖期	孕穗期	乳熟期	成熟期
常规灌溉(CIR)	FM1	10.96±1.48cd	19.09±2.75d	8.83±0.82c	8.85±1.13bc
	FM2	9.01±0.89d	28.99±3.49c	10.92±1.80c	12.83±1.16a
	FM3	6.51±0.70d	25.14±2.93cd	14.74±2.54b	13.34±1.26a
干湿交替(DIR)	FM1	25.99±4.18a	26.91±3.89cd	10.10±1.11c	7.32±0.97c
	FM2	29.30±3.54a	31.31±3.66bc	15.36±1.63b	7.07±1.00c
	FM3	21.56±3.67b	40.23±5.03a	16.27±2.41b	8.46±1.37c
薄浅湿晒(TIR)	FM1	15.59±2.28c	24.70±2.30cd	18.51±2.46b	7.47±0.97c
	FM2	12.16±1.26cd	30.15±3.86bc	18.73±2.71b	9.64±0.97bc
	FM3	8.17±1.16d	37.96±5.04ab	24.67±2.71a	11.13±1.30ab

1) FM1 为全尿素,FM2 为猪粪替代 30% 尿素,FM3 为猪粪替代 50% 尿素; 2) 表中数据为平均值±标准差,同列数据后凡具有一个相同字母者表示处理间差异不显著(P>0.05,n=3,Duncan’s 新复极差法)

2.1.2 硝酸细菌数量 表 3 表明,不同处理土壤硝酸细菌数量也以孕穗期较多,其他时期数量较少。分蘖期至乳熟期,相同施氮处理下 DIR 和 TIR 土壤硝酸细菌数量高于 CIR,成熟期 FM1 处理下 DIR 和 TIR 土壤硝酸细菌数量分别为 1.80×10³ 和 2.22×10³ g⁻¹,显著低于 CIR,而 FM2 和 FM3 处理下 3 种灌溉方式土壤硝酸细菌数量之间的差异均不显著。相同灌溉方式下,DIR 的分蘖期 FM1 的土壤硝酸细菌数量达 7.03×10³ g⁻¹,较 FM2 和 FM3 分别多 38.11% 和 94.67%,且差异显著,而在孕穗期和成熟期显著低于 FM2 和 FM3。CIR 和 TIR 灌溉方式下 4 个采样时期土壤硝酸细菌数量受施氮处理的影响多数不显著。

2.1.3 反硝化细菌数量 不同处理土壤反硝化细

菌数量以孕穗期较多,成熟期较少 (表 4)。相同施氮处理下,DIR 处理 4 个时期土壤反硝化细菌数量低于相应的 CIR 处理,成熟期 TIR 土壤反硝化细菌平均数量为 18.32×10⁴ g⁻¹,显著低于 CIR 方式 (30.44×10⁴ g⁻¹)。相同灌溉方式下,分蘖期猪粪代替尿素处理对土壤反硝化细菌数量提高作用显著,与 FM1 相比,CIR、DIR 和 TIR 方式下 FM2 处理的土壤反硝化细菌数量分别提高 86.68%、40.13% 和 62.99%,FM3 处理分别提高 144.96%、86.33% 和 146.99%;此外,与 FM1 相比,CIR 方式下 FM3 处理也能够显著提高孕穗期、乳熟期和成熟期土壤反硝化细菌数量,而 DIR 和 TIR 方式下 FM3 处理仅显著提高成熟期土壤反硝化细菌数量 (表 4)。

表 3 灌溉方式和施氮处理对土壤硝酸细菌数量的影响
Tab. 3 Effect of irrigation method and N treatment on the number of nitrifying bacteria in soil

灌溉方式	施氮处理 ¹⁾	硝酸细菌数量 ^{2)/} ($\times 10^3\text{ g}^{-1}$)			
		分蘖期	孕穗期	乳熟期	成熟期
常规灌溉(CIR)	FM1	2.74±0.45de	3.46±0.48de	2.51±0.28d	3.10±0.38ab
	FM2	2.38±0.30e	3.69±0.43de	2.95±0.29cd	3.43±0.57a
	FM3	1.62±0.22e	2.57±0.44e	3.11±0.42cd	3.22±0.20ab
干湿交替(DIR)	FM1	7.03±0.90a	8.68±1.21b	4.42±0.6ab	1.80±0.19d
	FM2	5.09±0.80b	11.23±1.64a	5.29±0.68ab	2.65±0.43abc
	FM3	3.75±0.53cd	13.01±1.54a	5.69±0.80a	2.52±0.29bc
薄浅湿晒(TIR)	FM1	4.22±0.49bc	5.23±0.85cd	4.06±0.47bc	2.22±0.20cd
	FM2	4.74±0.70bc	6.77±0.69bc	4.71±0.52ab	2.72±0.20abc
	FM3	3.58±0.36cd	7.88±1.17b	5.41±0.75ab	3.17±0.32ab

1) FM1 为全尿素,FM2 为猪粪替代 30% 尿素,FM3 为猪粪替代 50% 尿素; 2) 表中数据为平均值±标准差, 同列数据后凡具有一个相同字母者表示处理间差异不显著($P>0.05$, $n=3$, Duncan's 新复极差法)

表 4 灌溉方式和施氮处理对土壤反硝化细菌数量的影响
Tab. 4 Effect of irrigation method and N treatment on the number of denitrifying bacteria in soil

灌溉方式	施氮处理 ¹⁾	反硝化细菌数量 ^{2)/} ($\times 10^4\text{ g}^{-1}$)			
		分蘖期	孕穗期	乳熟期	成熟期
常规灌溉(CIR)	FM1	55.81±6.89d	95.67±10.82bc	65.80±8.96bcd	22.71±3.30c
	FM2	104.19±10.25b	114.42±15.69ab	78.24±8.48abc	29.76±2.37b
	FM3	136.71±18.86a	138.56±15.40a	98.41±15.72a	38.81±5.36a
干湿交替(DIR)	FM1	48.00±6.65d	62.08±5.76d	47.13±4.80d	13.71±1.88d
	FM2	67.26±10.93cd	107.52±14.69abc	54.20±5.31cd	17.43±1.59cd
	FM3	89.44±11.91bc	80.05±8.53cd	69.07±12.00bcd	23.81±3.27c
薄浅湿晒(TIR)	FM1	61.67±9.13d	106.78±10.18abc	60.44±10.87bcd	15.36±2.21d
	FM2	100.51±12.36b	131.61±14.68a	82.76±6.81ab	20.11±2.28cd
	FM3	152.32±22.48a	120.83±16.46ab	76.12±10.10abc	33.35±4.07b

1) FM1 为全尿素,FM2 为猪粪替代 30% 尿素,FM3 为猪粪替代 50% 尿素; 2) 表中数据为平均值±标准差, 同列数据后凡具有一个相同字母者表示处理间差异不显著($P>0.05$, $n=3$, Duncan's 新复极差法)

2.2 土壤氮素转化相关酶活性

2.2.1 脲酶活性 表 5 表明, 不同处理土壤脲酶活性也以孕穗期较高, 其他时期相对较低。与 CIR 相比, DIR 和 TIR 方式可提高分蘖期至乳熟期土壤脲酶活性, 而在成熟期各灌溉方式的土壤脲酶活性差异不显著。相同灌溉方式下, 与 FM1 相比, TIR 方式下的 FM2 处理在孕穗期 ($1.12\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 和 FM3 处理在乳熟期 ($0.92\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), DIR 方式下的 FM2 处理在分蘖期 ($0.76\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), FM3 处理在乳熟期 ($0.68\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 和成熟期 ($0.43\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 均能显著提高土壤脲酶活性, 其他条件下不同施氮处理的土壤脲酶活性之间差异不显著。

2.2.2 羟胺还原酶活性 表 6 表明, CIR 和 TIR 灌溉方式下, 各施氮处理的土壤羟胺还原酶活性在分

蘖期至乳熟期极低, 而在成熟期显著提高; DIR 方式下的土壤羟胺还原酶活性在 4 个时期均较高, 以孕穗期最高, 平均活性为 $111.72\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。相同施氮处理下, 在分蘖期至乳熟期, DIR 方式下的土壤羟胺还原酶活性显著高于 CIR 和 TIR, 而后两者之间差异不显著, 在成熟期, 土壤羟胺还原酶活性也差异不显著。相同灌溉方式下, CIR 和 TIR 方式下仅在成熟期出现猪粪代替尿素处理土壤羟胺还原酶活性高于纯尿素处理的现象; DIR 灌溉方式下, 在分蘖期 FM2 和 FM3 处理的土壤羟胺还原酶活性分别为 49.55 和 $42.62\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 较 FM1 处理 ($36.22\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 分别提高 36.79% 和 17.67% , 在孕穗期 FM3 处理的土壤羟胺还原酶活性 ($124.00\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 较 FM2 处理 ($100.59\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 提高

23.27%，在乳熟期 FM3 处理的土壤羟胺还原酶活性 (89.47 mg·g⁻¹·d⁻¹)，较 FM1 处理 (72.54 mg·g⁻¹·d⁻¹) 提高 23.34%，差异均达到显著水平。

表 5 灌溉方式和施氮处理对土壤脲酶活性的影响
Tab. 5 Effect of irrigation method and N treatment on soil urease activity

灌溉方式	施氮处理 ¹⁾	脲酶活性 ²⁾ /(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)			
		分蘖期	孕穗期	乳熟期	成熟期
常规灌溉(CIR)	FM1	0.41±0.04de	0.61±0.05d	0.40±0.06d	0.34±0.05ab
	FM2	0.42±0.06de	0.79±0.11bcd	0.44±0.05cd	0.41±0.06a
	FM3	0.31±0.04e	0.72±0.12cd	0.47±0.08cd	0.36±0.06ab
干湿交替(DIR)	FM1	0.58±0.09bc	0.92±0.13abc	0.48±0.06cd	0.28±0.05b
	FM2	0.76±0.10a	1.07±0.11ab	0.51±0.06cd	0.35±0.05ab
	FM3	0.69±0.07ab	1.19±0.19a	0.68±0.08b	0.43±0.06a
薄浅湿晒(TIR)	FM1	0.40±0.05de	0.74±0.11cd	0.61±0.08bc	0.32±0.04ab
	FM2	0.55±0.07cd	1.12±0.14a	0.71±0.08b	0.43±0.04a
	FM3	0.48±0.08cd	0.99±0.09abc	0.92±0.09a	0.46±0.06a

1) FM1 为全尿素,FM2 为猪粪替代 30% 尿素,FM3 为猪粪替代 50% 尿素; 2) 表中数据为平均值±标准差, 同列数据后凡具有一个相同字母者表示处理间差异不显著($P>0.05$, $n=3$, Duncan's 新复极差法)

表 6 灌溉方式和施氮处理对土壤羟胺还原酶活性的影响
Tab. 6 Effect of irrigation method and N treatment on soil hydroxylamine reductase activity

灌溉方式	施氮处理 ¹⁾	羟胺还原酶活性 ²⁾ /(mg·g ⁻¹ ·d ⁻¹)			
		分蘖期	孕穗期	乳熟期	成熟期
常规灌溉(CIR)	FM1	0.40±0.12d	0.10±0.00c	0.29±0.05c	33.62±3.89bc
	FM2	0.11±0.06d	0.18±0.11c	0.11±0.11c	48.62±5.38a
	FM3	0.10±0.08d	0.10±0.08c	0.35±0.06c	41.92±5.18abc
干湿交替(DIR)	FM1	36.22±5.28c	110.56±12.54ab	72.54±9.34b	29.92±3.08c
	FM2	49.55±5.02a	100.59±13.44b	81.23±10.36ab	41.26±4.43abc
	FM3	42.62±6.51b	124.00±15.63a	89.47±13.56a	39.79±5.48abc
薄浅湿晒(TIR)	FM1	0.13±0.11d	0.13±0.06c	0.62±0.08c	36.13±3.86bc
	FM2	0.03±0.03d	0.35±0.06c	1.06±0.13c	44.45±3.77ab
	FM3	0.43±0.05d	0.22±0.14c	1.70±0.17c	49.60±6.61a

1) FM1 为全尿素,FM2 为猪粪替代 30% 尿素,FM3 为猪粪替代 50% 尿素; 2) 表中数据为平均值±标准差, 同列数据后凡具有一个相同字母者表示处理间差异不显著($P>0.05$, $n=3$, Duncan's 新复极差法)

2.2.3 亚硝酸还原酶活性 表 7 表明, 各处理的土壤亚硝酸还原酶在分蘖期至乳熟期活性较高, 成熟期活性下降。相同施氮处理下, 与 CIR 相比, 在分蘖期至乳熟期 DIR 灌溉方式显著提高土壤亚硝酸还原酶活性, TIR 与 CIR 灌溉方式的土壤亚硝酸还原酶活性差异多数不显著。与 FM1 相比, CIR 方式下乳熟期 FM3 以及成熟期 FM3 和 FM2 处理显著提高土壤亚硝酸还原酶活性; 与 FMI 相比 DIR 方式下分蘖期 FM2 和 FM3、孕穗期 FM3、乳熟期和成熟期 FM2 处理均显著提高土壤亚硝酸还原酶活性; 与 FMI 相比, TIR 方式下成熟期 FM2 和 FM3 处理

显著提高了土壤亚硝酸还原酶活性。
2.2.4 硝酸还原酶活性 表 8 表明, 不同处理土壤硝酸还原酶活性也表现为在孕穗期前上升, 随后下降。相同施氮处理下, 分蘖期至乳熟期, DIR 较 CIR 灌溉方式显著降低土壤硝酸还原酶活性, TIR 与 CIR 灌溉方式的土壤硝酸还原酶活性多数差异不显著。相同灌溉方式下, 与 FM1 相比, DIR 方式的乳熟期 FM3 处理、TIR 方式的孕穗期至成熟期 FM3 处理及成熟期 FM2 处理、CIR 方式的成熟期 FM2 和 FM3 处理均显著提高了土壤硝酸还原酶活性。

2.3 各微生物活性指标之间的相关性

表 9 是各微生物活性指标之间的相关系数。除硝酸还原酶活性与硝酸细菌数量和亚硝酸还原酶

活性之间的关系不显著外, 其他指标之间的关系呈现显著或极显著正相关或负相关, 说明这些指标是相互联系的。

表 7 灌溉方式和施氮处理对土壤亚硝酸还原酶活性的影响

Tab. 7 Effect of irrigation method and N treatment on soil nitrite reductase activity

灌溉方式	施氮处理 ¹⁾	亚硝酸还原酶活性 ²⁾ /(mg·g ⁻¹ ·d ⁻¹)			
		分蘖期	孕穗期	乳熟期	成熟期
常规灌溉(CIR)	FM1	48.66±5.03cde	49.30±3.92cd	30.94±3.33d	24.19±3.19d
	FM2	35.87±4.03de	57.13±7.93cd	46.19±5.47cd	37.14±4.49abc
	FM3	30.97±3.32e	40.39±4.60d	57.83±7.19bc	41.16±5.87ab
干湿交替(DIR)	FM1	80.69±13.29b	100.15±18.01b	65.15±9.49bc	26.72±3.51cd
	FM2	118.44±13.65a	120.02±13.39b	93.10±16.03a	39.62±5.73ab
	FM3	107.07±11.33a	142.17±24.87a	78.32±10.12ab	36.60±4.47abc
薄浅湿晒(TIR)	FM1	49.90±5.79cde	45.84±5.28cd	49.16±7.39cd	29.93±2.93bcd
	FM2	61.81±5.14c	73.23±5.75c	55.18±6.99c	46.22±5.71a
	FM3	53.69±6.87cd	60.97±8.72cd	68.54±8.88bc	42.86±4.33a

1) FM1 为全尿素,FM2 为猪粪替代 30% 尿素,FM3 为猪粪替代 50% 尿素; 2) 表中数据为平均值±标准差, 同列数据后凡具有一个相同字母者表示处理间差异不显著($P>0.05$, $n=3$, Duncan's 新复极差法)

表 8 灌溉方式和施氮处理对土壤硝酸还原酶活性的影响

Tab. 8 Effect of irrigation method and N treatment on soil nitrate reductase activity

灌溉方式	施氮处理 ¹⁾	硝酸还原酶活性 ²⁾ /(mg·g ⁻¹ ·d ⁻¹)			
		分蘖期	孕穗期	乳熟期	成熟期
常规灌溉(CIR)	FM1	46.64±5.79bcd	81.60±6.54b	57.36±6.29b	18.38±2.32de
	FM2	56.49±7.89abc	93.25±11.03b	67.70±7.94ab	29.36±4.71abc
	FM3	62.48±9.94ab	89.39±6.43b	72.65±10.74ab	35.57±4.82a
干湿交替(DIR)	FM1	26.28±3.73e	33.19±3.87d	23.77±3.47d	14.08±2.06e
	FM2	33.57±6.20de	38.23±3.55d	30.32±2.98cd	22.24±2.54cde
	FM3	41.89±6.46cde	54.30±6.89c	41.26±4.10c	19.07±3.12de
薄浅湿晒(TIR)	FM1	69.49±10.87a	97.81±10.87b	58.46±7.99b	16.19±1.94e
	FM2	66.00±5.83a	102.33±13.03ab	69.59±7.51ab	30.81±5.58ab
	FM3	76.16±13.59a	115.90±8.51a	77.66±11.99a	25.67±3.35bcd

1) FM1 为全尿素,FM2 为猪粪替代 30% 尿素,FM3 为猪粪替代 50% 尿素; 2) 表中数据为平均值±标准差, 同列数据后凡具有一个相同字母者表示处理间差异不显著($P>0.05$, $n=3$, Duncan's 新复极差法)

表 9 各微生物活性指标间的相关系数¹⁾

Tab. 9 Relationships among different indexes of microbial activities

测定指标	反硝化细菌数量	亚硝酸细菌数量	硝酸细菌数量	脲酶活性	羟胺还原酶活性	亚硝酸还原酶活性
亚硝酸细菌数量	0.450**					
硝酸细菌数量	0.256**	0.812**				
脲酶活性	0.510**	0.526**	0.444**			
羟胺还原酶活性	-0.350**	0.243*	0.588**	0.292**		
亚硝酸还原酶活性	0.242*	0.726**	0.728**	0.547**	0.433**	
硝酸还原酶活性	0.627**	0.492**	0.175	0.500**	-0.570**	0.035

1) “*” 表示显著相关($r_{0.05}=0.187\ 4$, $n=108$), “**” 表示极显著相关($r_{0.01}=0.244\ 7$, $n=108$)(Pearson 相关分析法)

3 讨论与结论

孕穗期是水稻生长的旺盛时期,该时期植株通气组织发达、根系泌氧功能完善,且根系生长在盆内有限的空间中,提高了根际环境比例,因而本研究孕穗期土壤硝化细菌数量增加;同时根系代谢产生的分泌物和脱落物增加了土壤碳源^[21],是本研究孕穗期反硝化细菌数量较高的原因;作物旺长期有利于土壤微生物胞外脲酶的产生和活性的提高^[22],这是本研究孕穗期脲酶活性较高的原因。本研究中,孕穗期土壤硝酸还原酶活性较高可能与该时期根系大量泌氧导致硝化作用加剧有关。亚硝酸还原酶多为胞内酶,可由 NO₂⁻诱导产生,以消除其累积毒害效应^[23]。由于淹水条件下 NO₂⁻来源于硝酸还原酶的还原,所以两者活性受生育期的影响较为一致。羟胺还原酶与硝态氮的还原途径有关系^[24],不同生育期水分管理是造成其生育期羟胺还原酶活性差异的因素。

不同灌溉方式直接影响土壤水分含量和通气性。DIR 方式的灌水层薄、部分时期无水层,对硝化细菌的生长有利,因此其数量在分蘖期和孕穗期较 CIR 方式显著增加。淹水处理对反硝化细菌的影响不显著,但 DIR 方式落干时段表层土壤反硝化细菌死亡^[25],因而其数量较低。良好的通气条件加速土壤矿质营养的释放,同时落干-复水过程使得硝化作用和反硝化作用频繁交替发生会造成土壤氮素过度损失,在固定施肥量的盆栽试验中易导致水稻生育中后期养分不足,这可能是 DIR 方式下乳熟期和成熟期微生物数量下降的原因。与此不同的是, CIR 和 TIR 方式较长时期处于淹水状态,有机物分解缓慢,同时抑制好氧微生物增加,以减弱其对养分的竞争,到乳熟期或成熟期进行湿润、落干处理时矿化量增加,释放出养分,各项微生物数量指标较 DIR 均有所提高。DIR 和 TIR 较 CIR 方式通气条件好,可改善微生物生长环境,利于脲酶活性的提高^[26]。相同施氮处理下,与 CIR 相比,DIR 方式下的土壤硝酸还原酶活性除成熟期外其余时期显著降低,表明淹水处理较干湿交替处理存在活性更强的硝酸还原酶,这与以往研究结果一致^[27-28]。本试验显示,DIR 方式下的土壤羟胺还原酶和亚硝酸还原酶活性同时较高,且大部分时期显著高于相同施肥条件下的 CIR 与 TIR 方式。亚硝酸还原酶是在好气条件中催化 NO₂⁻还原形成 NH₂OH(同化反硝化作用),以及厌氧条件下催化其还原形成 N₂O 或 N₂(异化反硝化作用)的中间酶^[29]。因此,在 CIR 与

TIR 方式下的淹水期间,NO₂⁻难以被还原形成 NH₂OH 诱导产生相应的羟胺还原酶,可能是导致其活性低的主要原因。

施肥主要通过养分的释放与供给或刺激作物生长来直接或间接影响土壤微生物的活性。尿素氮释放迅速是造成 DIR 方式下分蘖期 FM1 处理土壤硝化细菌数量显著高于其他处理的主要原因。与尿素氮相比,猪粪矿化缓慢且分解过程消耗氧气加剧厌氧环境,抑制了硝化细菌数量的增加,但猪粪为反硝化细菌提供了丰富的碳、氮源,造成其数量显著增加,因此,分蘖期 FM2 和 FM3 处理的土壤硝化细菌数量较少,而反硝化细菌数量较多和硝酸还原酶活性较高。同时猪粪中本身存在一定数量的脲酶,可能是导致 FM2 和 FM3 处理脲酶活性较尿素处理高的一个因素^[30]。但本研究 CIR 方式下分蘖期 FM3 处理的土壤脲酶活性显著低于 FM1 和 FM2,可能与淹水条件下土壤中有机物质累积,腐殖质与土壤酶复合处于物理性保护状态^[31],使其活性相对稳定有关^[32]。生育中后期,猪粪养分的释放提供了持续的氮素供应,有利于土壤微生物活性的保持,因此 FM2 和 FM3 处理的多数微生物指标显著高于 FM1。此外,持续的氮素供应增加了土壤落干时硝化作用所需的 NH₄⁺,为复水后反硝化作用形成了更多的 NO₃⁻,易造成土壤氮素的损失。

本试验结果显示,稻田氮素转化各微生物数量及酶活性在水稻孕穗期较高;与常规灌溉相比,干湿交替提高分蘖期和孕穗期大部分土壤氮素相关微生物数量及酶活性,降低反硝化细菌数量和硝酸还原酶活性;“薄浅湿晒”和 50% 猪粪代替尿素处理对乳熟期和成熟期土壤氮素转化微生物活性提高作用明显。

参考文献:

[1] 顾明华, 区惠平, 刘昔辉, 等. 不同耕作方式下稻田土壤的氮素形态及氮素转化菌特征[J]. 应用生态学报, 2009, 20 (6): 1362-1368.

[2] 郝晓晖, 刘守龙, 童成立, 等. 长期施肥对两种稻田土壤微生物量氮及有机氮组分的影响[J]. 中国农业科学, 2007, 40 (4): 757-764.

[3] BORKEN W, MATZNER E. Reappraisal of drying and wetting effects on C and N mineralization and fluxes in soils[J]. Global Change Biol, 2009, 15(4): 808-824.

[4] 梁燕菲, 张潇潇, 李伏生. “薄浅湿晒”灌溉稻田土壤微生物量碳、氮和酶活性研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(6): 1403-1410.

[5] 张玉树. 农业管理方式对亚热带土壤氮转化过程的影响[D]. 南京: 南京师范大学, 2015.

[6] 关荫松, 张德生, 张志明. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 332-335.

[7] 孙瑞莲, 赵秉强, 朱鲁生, 等. 长期定位施肥对土壤酶活性的影响及其调控土壤肥力的作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(4): 406-410.

[8] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 397-413.

[9] 周礼恺. 土壤的酶活性[J]. 土壤学进展, 1980, 8(4): 9-15.

[10] 刘宇锋, 邓少虹, 梁燕菲, 等. 灌溉方式与有机无机氮配施对水稻土壤微生物活性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2012, 4(31): 428-435.

[11] 郑莹莹. 干湿交替对土壤氮素转化及生物学特性的影响[D]. 上海: 东华大学, 2013.

[12] 黄树辉. 裂缝条件下稻田土壤中 N_2O 的释放和氮溶质运移的机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.

[13] 王苏平, 辉建春, 林立金, 等. 施肥制度对川中丘陵区玉米不同生育期土壤反硝化酶活性的影响[J]. 水土保持研究, 2012, 19(3): 274-277.

[14] 和文祥, 魏燕燕, 蔡少华. 土壤反硝化酶活性测定方法及影响因素研究[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2006, 34(1): 121-124.

[15] 谢先红, 崔远来. 典型灌溉模式下灌溉水利用效率尺度变化模拟[J]. 武汉大学学报 (工学版), 2009, 42(5): 653-656.

[16] 徐芬芬, 曾晓春, 石庆华. 干湿交替灌溉方式下水稻节水增产机理研究[J]. 杂交水稻, 2009, 24(3): 72-75.

[17] 张自常, 李鸿伟, 曹转勤, 等. 施氮量和灌溉方式的交互作用对水稻产量和品质影响[J]. 作物学报, 2013, 39(1): 84-92.

[18] 章家恩. 生态学常用实验研究方法与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 163-164.

[19] 史云峰, 武志杰, 史奕, 等. 土壤羟胺还原酶活性测定方法的改进[J]. 生态学杂志, 2007, 26(7): 1133-1137.

[20] 哈兹耶夫 (苏). 土壤酶活性[M]. 郑洪元, 等, 译. 北京: 科学出版社, 1980.

[21] 李秀英, 赵秉强, 李絮花, 等. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1591-1599.

[22] 李东坡, 武志杰, 陈利军, 等. 长期培肥黑土脲酶活性动态变化及其影响因素[J]. 应用生态学报, 2003, 14(12): 2208-2212.

[23] 李东坡, 武志杰, 梁成华. 土壤环境污染与农产品质量[J]. 水土保持通报, 2008, 28(4): 172-177.

[24] 李香兰, 徐华, 蔡祖聪. 水分管理影响稻田氧化亚氮排放研究进展[J]. 土壤, 2009, 41(1): 1-7.

[25] 刘龙龙. 不同深度细沙人工湿地中微生物种群及数量分布研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2014.

[26] 叶玉适. 水肥耦合管理对稻田生源要素碳氮磷迁移转化的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.

[27] ABDELMAGID H M, TABATABAI M A. Nitrate reductase activity of soils[J]. Soil Biol Biochem, 1987, 19(4): 421-427.

[28] FU M H, TABATABAI M A. Nitrate reductase activity in soils: Effects of trace elements[J]. Soil Biol Biochem, 1989, 21(7): 943-946.

[29] 陈利军, 武志杰, 姜勇, 等. 与氮转化有关的土壤酶活性对抑制剂施用的响应[J]. 应用生态学报, 2002, 13(9): 1099-1103.

[30] 籍景淑. 猪场氨气控制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.

[31] 范业成, 陶其骧, 叶厚专. 稻田肥料效应和肥力监测阶段性研究报告[J]. 江西农业学报, 1996, 8(2): 114-122.

[32] MARX M C, KANDELER E, WOOD M, et al. Exploring the enzymatic landscape: Distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions[J]. Soil Biol Biochem, 2005, 37(1): 35-48.

【责任编辑 李晓卉】