



马星竹,陈利军,周宝库,等.长期施肥对黑土脲酶活性和动力学特性的影响[J].黑龙江农业科学,2020(12):49-53.

长期施肥对黑土脲酶活性和动力学特性的影响

马星竹¹,陈利军²,周宝库¹,郝小雨¹,朱健³,武志杰²

(1. 黑龙江省农业科学院 土壤肥料与环境资源研究所,黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 中国科学院 沈阳应用生态研究所,辽宁 沈阳 110016; 3. 内蒙古民族大学,内蒙古 通辽 028000)

摘要:为揭示土壤脲酶活性对长期施肥的响应特征,本文以长期施肥的黑土为供试对象,对土壤脲酶的活性和动力学特性进行研究。结果表明:不同施肥处理和剖面土层变化对土壤脲酶活性变化具有交互作用。与对照相比,有机肥、有机肥配施化肥处理的土壤脲酶活性显著增强,在土壤剖面中,脲酶活性具有随土层加深逐渐递减的趋势。同时,土壤脲酶的酶促反应符合一级反应动力学模型。与不施肥处理相比较,施肥处理的 K_m 值减小,有机肥处理的 V_{max} 和 V_{max}/K_m 比值都高于单施化肥处理和对照,长期施用有机肥土壤脲酶催化能力增强。

关键词:黑土;长期施肥;脲酶活性;动力学

黑土具有深厚的腐殖质层,良好的物理、化学性质和生物学特性,是中国重要的农业土壤资源和商品粮生产基地。但是随着黑土的开垦,过渡垦殖和长期高强度利用等因素使得耕地土壤的自然肥力逐年下降,主要表现为黑土表层土壤有机质锐减,耕作层变浅,犁底层增厚等土壤物理、化学以及生物学性质的恶化^[1-2]。其中化学肥料大量施用产生的效果尤为明显,因此,如何合理的施用肥料,最大限度地发挥肥效成为关注的焦点。

土壤酶积极参与土壤中多种营养物质的转化和代谢,同时具有较强的催化能力,它是一类高分

子蛋白质,主要来源于活性生物细胞产生的胞外酶和胞内酶,其中脲酶是土壤氮素转化过程中的重要酶类之一,是氨基水解酶,促进尿素分解。尿素只有在土壤脲酶作用下水解成铵态氮后,才能被作物吸收利用,参与土壤中的氮素循环^[3-4]。以往研究表明,土壤脲酶活性与微生物数量、土壤有机质、全氮和速效氮等因素有关^[5-6]。长期施肥条件下,脲酶活性的变化趋势和机理研究较多,有机肥、有机肥配施无机肥等施肥方式能够使得土壤脲酶活性增强^[6-8]。原因与脲酶作用的底物浓度和土壤整体肥力水平有关,即当土壤中尿素的浓度升高时,脲酶活性增加,另外有机肥能够提高土壤有机质含量,直接使得土壤酶活性免遭变性或降解,间接增加了脲酶活性^[9]。

酶活性对施肥制度的响应有助于了解酶促反应的特定结果,但无法了解酶促反应的过程特征;土壤酶动力学参数可以表征土壤中酶对底物的作用过程^[3]。以往关于温度^[10]、土壤质地和底物浓

收稿日期:2020-10-21

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD0300101-4,2017YFD0300502-1);黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”专项(HNK2019CX1311);黑龙江省领军人才后备带头人资助(2019TF)。

第一作者:马星竹(1980-),女,博士,研究员,从事土壤生物活性与土壤植物营养研究。E-mail: maxingzhu@163.com。

通信作者:武志杰(1962-),男,学士,研究员,从事新型肥料研究。E-mail: wuzj@iae.ac.cn。

Abstract: Maize and rice straw yield is abundant in Northeast China, while straw ash and rice husk ash are rich in vitamins and organic matter which can be used by crops. In order to improve the utilization rate of biomass ash and realize the recyclable development of agriculture, two different biomass ash extracts, straw ash and rice husk ash, were used for indoor germination of cucumber seeds. The effects of two different concentrations of biomass ash on the germination and seedling quality of cucumber seeds were studied. The concentration of straw ash and rice husk ash extracts was 5 times, 10 times and 50 times of the original solution. The experiment showed that the two kinds of biomass ash extracts at different concentrations could promote the germination of cucumber seeds. When the concentration of the two kinds of biomass ash extracts was 5 times, the growth of cucumber seedlings was the best. This indicated that the biochar extract of this concentration was the most suitable for cucumber seed germination.

Keywords: biomass ash; cucumber seeds; seedling quality

度^[11-12]、施肥和灌溉^[13-14]等对土壤脲酶动力学的影响有所研究,但是鲜见对黑土长期定位条件下不同施肥处理土壤脲酶活性与动力学研究,本文试图通过研究长期定位条件下不同施肥处理土壤脲酶活性和动力学特性,揭示土壤脲酶的动力学特性,为氮素转化与土壤生物活性关系研究提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

土壤样品来源于吉林省农业科学院黑土肥力长期定位监测试验(43°30′23″N, 124°48′33.9″E),该试验于 1980 年建立,为全国化肥网试验;试验区属于一年一季雨养农业典型黑土区,雨热同季,年降水量 500~650 mm,年平均气温 5~6 ℃,年

无霜期为 130 d 左右,年有效积温 2 600~3 000 ℃。

1.2 材料

供试氮肥为尿素、磷肥为三料磷肥、钾肥为硫酸铵,有机肥为过圈粪肥,其养分含量为有机质 70.00~80.00 g·kg⁻¹,全氮 3.00~4.00 g·kg⁻¹,碱解氮 200.00~400.00 mg·kg⁻¹。供试玉米品种为吉单 209。

1.3 方法

1.3.1 长期定位试验 本研究选取长期定位试验中的 4 个处理,即不施肥对照(CK)、化肥处理(NPK)、有机肥处理(M)及有机肥配施化肥处理(M+NPK),具体施肥量详见表 1;小区面积 100 m²。

表 1 长期施肥处理肥料用量
Table 1 Fertilizer amount of long-term fertilizations

处理 Treatments	氮肥用量 Amount of pure N/ (kg·hm ⁻²)	磷肥用量 Amount of P ₂ O ₅ / (kg·hm ⁻²)	钾肥用量 Amount of K ₂ O/ (kg·hm ⁻²)	有机肥用量 Amount of organic fertilizer/(t·hm ⁻²)
未施肥对照(CK)	0	0	0	0
化肥(NPK)	150	75	75	0
有机肥(M)	0	0	0	42
有机肥配施化肥(M+NPK)	150	75	75	42

1.3.2 样品采集 作物收获完成后采用“S”型的取样方法,即在耕层选取 5~7 个点,每点采集一定量土壤样品,然后通过四分法获得一个样品,样品用塑料自封袋保存,采集后置于 4 ℃冷藏,7 d内完成了土壤脲酶活性的测定。

1.3.3 测定方法 土壤脲酶活性的测定采用尿素残留量法。以尿素为底物,在 37 ℃条件下恒温培养 5 h,用连续流动分析仪测定剩余尿素量,单位为 mg·kg⁻¹·5 h⁻¹^[15]。

土壤脲酶动力学参数测定分别设定以下 5 个底物浓度(尿素的浓度),分别是 6,14,20,30 和 50 mmol·L⁻¹。

1.3.4 米氏常数计算与数据处理 酶促反应动力学参数计算:米氏常数 K_m和最大速度 V_{max}可根据 Michaelis-Menten 方程,变换基质浓度[S],以基质浓度[S]/酶活性[V]对基质浓度作图,求出截距 K_m/V_{max}和斜率 1/V_{max},从而计算出 K_m和 V_{max}值。Michaelis-Menten 方程为^[3]:

$$\frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_{\max}}[S] + \frac{K_m}{V_{\max}}$$

1.3.5 数据分析 数据处理与作图运用 Excel 2019,统计分析运用 SPSS 20.0,差异显著性分析运用 S-N-K 法;相关分析和多因素分析分别采用 Bivariate 和 Univariate 进行比较。

2 结果与分析

2.1 长期施肥土壤脲酶活性的剖面变化

不同施肥处理和土层对脲酶活性变化具有一定的影响,土壤不同剖面变化和不同施肥处理均对脲酶活性的影响到达极显著水平(P<0.001),且二者对脲酶活性变化具有交互作用(表 2)。

表 2 长期施肥方式下土壤深度和施肥处理与剖面土壤脲酶活性的方差分析结果

Table 2 F-values for effects of soil depth and fertilizer treatments on black soil urease activity in soil profiles under long-term fertilizations

处理 Treatments	F	P
土壤深度 D	27.00	<0.001
施肥处理 T	30.19	<0.001
D&T	2.39	0.019

黑土表层(0~20 cm)不施肥和化肥处理与下层土壤(20~40 cm)相比土壤脲酶活性略有降低,40 cm以下土壤脲酶活性的整体趋势是随着剖面的加深而降低,但变化幅度不大;有机肥及其与化肥配施处理土壤脲酶活性随着剖面的加深而降低,与其他3个处理相比,此处理脲酶活性在剖面中整体变化幅度不大(图1)。

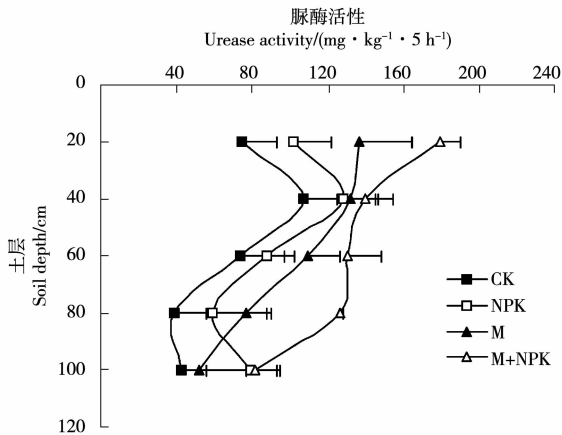


图1 黑土长期施肥剖面土壤脲酶活性变化
Fig.1 Variations of urease activity in black soil profiles under long-term fertilizations

不同施肥方式下剖面土壤脲酶活性差异显著性比较结果表明,黑土有机肥配施化肥处理表层(0~20 cm)土壤脲酶活性显著高于下层土壤脲酶活性($P<0.05$),与不施肥土壤相比,黑土有机肥处理的脲酶活性显著增强($P<0.05$)(表3)。

表3 不同施肥方式下剖面土壤脲酶活性差异显著性比较

Table 3 The significant difference comparisons about the activity of soil urease in black soil profiles with different fertilizations

剖面/cm	CK	NPK	M	M+NPK
0~20	74.8±18.6 abC	101.7±20.0 abBC	136.6±27.8 aB	179.5±10.6 aA
20~40	107.4±17.8 aA	128.0±18.5 aA	131.9±13.2 aA	139.7±14.7 bA
40~60	73.6±23.9 abC	87.7±15.1 bcBC	109.7±16.9 abB	130.7±18 bA
60~80	39.2±16.3 bB	59.2±30.6 cB	76.8±10.8 bcB	126.4±2.0 bA
80~100	42.5±13.8 bA	79.1±15.9 bcA	52.3±24.3 c A	81.2±12.1 c A

注:不同大写字母表示同一土层不同施肥处理间土壤脲酶活性差异显著($P<0.05$);不同小写字母表示同一处理不同土层间土壤脲酶活性差异显著($P<0.05$)。

Note:Different capital letters indicate soil urease activity significantly different under different fertilizations in the same soil depth($P<0.05$);Different lowercase letters indicate soil urease activity significantly different under the same fertilization in different soil depths($P<0.05$).

2.2.2 土壤脲酶酶促反应的 K_m 、 V_{max} 和 V_{max}/K_m 由表4可知,与长期施用化肥和不施肥处理相比,M和M+NPK有助于提高土壤脲酶的

2.2 土壤脲酶催化动力学特性

2.2.1 底物浓度对脲酶酶促反应速度的影响

由图2可知,不同施肥土壤脲酶酶促反应速度随着底物浓度的增加而增大,并逐渐趋于最大值,是单底物一级反应动力学;相同底物浓度情况下,长期施肥处理中的M和M+NPK处理有助于增加土壤脲酶的酶促反应速度,单独施用化肥和不施肥处理脲酶的酶促反应速度较低。图2中的数据经米氏方程变换后,得到图3,即Lineweaver-Burk图。脲酶所作用的底物为尿素,在酶促反应中,随尿素浓度的增加,酶活性中心饱和度增大,酶活性升高^[16]。施肥能显著提高土壤酶活性,反应速度随浓度增加而增加,与以往研究结果一致^[12]。

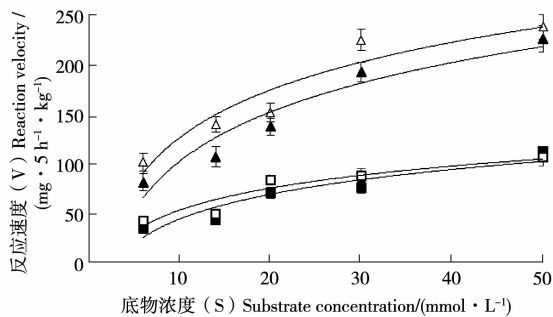


图2 长期施肥黑土脲酶反应速度
Fig.2 Plot of reaction velocity of black soil urease under long-term fertilizations

V_{max} 和 V_{max}/K_m 比值。与不施肥处理相比较,施肥处理的 K_m 值减小。脲酶 V_{max} 的变化遵循一定的规律,有机肥处理有较大的增加,表明酶促反应

产物较易分解,表观脲酶活性提高^[17]。土壤中的脲酶一般以吸附态存在,通常吸附态酶的 K_m 值大于游离态酶的 K_m 值^[18],这主要是因为土壤中固体吸附态酶的活性部位在一定程度上被覆盖,或发生三级结构的改变,使酶产生位阻效应,进而酶与底物较均质体系难以靠近、结合,与底物接触的机会大大减弱,致使酶与底物的亲合力下降^[19], K_m 值增加;然而,本研究施肥后脲酶 K_m 值变小; V_{max}/K_m 作为酶促反应初速度的重要指标,其变化趋势与 V_{max} 一致;同时此比值可作为衡量酶催化能力的参数^[19],比值大即催化能力较强,因此,施用有机肥土壤脲酶催化能力较强。

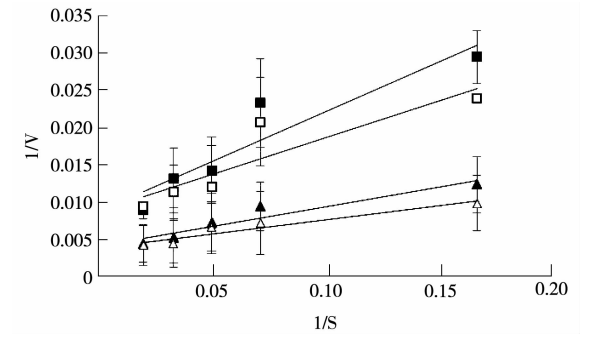


图 3 长期施肥黑土脲酶 Lineweaver-Burk 图
 Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of black soil urease under long-term fertilizations

表 4 不同施肥处理的黑土脲酶动力学参数
 Table 4 Urease kinetic parameters of black soil under different fertilization treatments

处理 Treatments	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m
CK	144.94±5.22	15.46±1.17	7.43±1.18
NPK	113.64±2.25	11.31±1.98	10.05±1.46
M	243.90±6.37	12.95±2.86	18.83±2.15
M+NPK	256.41±7.56	9.77±1.70	26.25±0.98

3 结论与讨论

通常上层土壤(0~20 cm)脲酶活性较高,这与大量掉落物和腐殖质关系密切,表层土壤多具有高有机质含量的特点,同时其物理性质良好,这些都为微生物的生长提供了有利的环境,因此微生物生长旺盛、代谢活跃、呼吸强度加大,与下层土壤相比,上层土壤的酶活性均较高。0~20 cm 和 40~60 cm 以及 60~80 cm 土层中 M+NPK 处理显著提供了土壤脲酶活性,其原因可能是长

期有机肥配施化肥增加了土壤有机质积累,增加了土壤中可供脲酶作用的底物数量和浓度,使得土壤微生物活动的环境得到改善,微生物的群体数量增加;同时,有机肥处理可以改善土壤理化性质,促进作物根系生长,从而能够分泌大量的脲酶^[20]。有机肥的施入可以显著地改善土壤中氮素营养状况^[21]。本研究土壤脲酶活性剖面变化与以往研究结果一致^[22-23]。本结果中长期施用有机肥、有机肥配施化肥处理土壤脲酶活性高于对照不施肥处理,与以往研究中有相似结果, Nayak 等^[6]、Goyal 等^[7] 研究得到长期使用有机肥配施无机肥处理能够显著提供土壤脲酶活性^[6-7];Tejada 等^[8] 研究表明施用有机肥使脲酶活性增强的原因在于土壤中微生物的活性被激活了,主要是由于有机肥能够将大量的微生物和酶带入到土壤中。不同土壤脲酶的亲和系数(K_m)受土壤类型、施肥方式影响,变化趋势各不相同,本研究中施化肥后土壤脲酶 K_m 值变小,原因可能是向土壤施入肥料后带入了大量的酶,同时刺激微生物分泌释放更多的酶,大量的酶与土壤中的底物充分结合,使得酶与底物的亲合力增强, K_m 值变小。长期施肥可以显著影响黑土脲酶活性和动力学特性,其中有机肥处理土壤脲酶活性显著增强,且 V_{max} 和 V_{max}/K_m 比值增大,而施肥处理 K_m 值减小^[19];长期施肥,特别是施用有机肥能增强土壤脲酶催化能力,且不同施肥处理土壤脲酶活性随着土层加深逐渐降低。

参考文献:

[1] 邹文秀,韩晓增,陆欣春,等.肥沃耕层构建对东北黑土区旱地土壤肥力和玉米产量的影响[J].应用生态学报,https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1253.Q.20200930.1624.005.html.

[2] 韩晓增,李娜.中国东北黑土地研究进展与展望[J].地理科学,2018,38(7):1032-1041.

[3] 李军,辛晓通,李嘉琦,等.玉米—大豆轮作条件下长期定位施肥对土壤酶活性的影响[J].沈阳农业大学学报,2015,46(4):417-423.

[4] 马春梅,王家睿,战厚强,等.稻草还田对土壤脲酶活性及土壤溶液无机氮含量影响[J].东北农业大学学报,2016,47(3):38-43.

[5] Taylor J P, Wilson B, Mills M S. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and sub-soils using various techniques [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34:387-401.

- [6] Nayak D R, Babu Y J, Adhya T K. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aerobic Endoaquept planted to rice under flooded condition [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(8): 1897-1906.
- [7] Goyal S, Chander K, Mundra M C, et al. Influence of inorganic fertilizers and organic amendments on soil organic matter and soil microbial properties under tropical conditions [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(2): 196-220.
- [8] Tejada M, Gonzalez J L, Garcia-Martinez A M, et al. Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: Soil effect on soil microbial properties [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(8): 872-880.
- [9] Tisdale S L, Nelson W L. 土壤肥力与肥料[M]. 金继运, 刘荣乐, 等译. 北京: 中国农业科技出版社, 1998: 95-155.
- [10] 张玉兰. 东北主要土壤水解酶催化动力学特性[D]. 沈阳: 中国科学院沈阳应用生态研究所, 2004.
- [11] Knight T R, Dick R P. Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36: 2089-2096.
- [12] 邱莉萍, 刘军, 王益权, 等. 长期施肥土壤中酶活性的剖面分布及其动力学特征研究 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2005, 11(6): 737-741.
- [13] 翟红梅, 曹彩云, 刘孟雨. 长期咸水灌溉对土壤酶活性及反应动力学的影响 [J]. *干旱地区农业研究*, 2018, 36(1): 95-101.
- [14] 和文祥, 朱铭莪. 陕西土壤脲酶与土壤肥力关系研究 II 土壤脲酶的动力学特征 [J]. *土壤学报*, 1997, 34(1): 42-52.
- [15] Tabatabai M A. Soil enzymes. Microbiological and biochemical properties [M]//Weaver R W, Augle J S, Bottomley P S. *Methods of soil analysis (Part 2). SSSA book series no. 5. SSSA, Madison, Wis.*, 1994: 775-883.
- [16] 和文祥, 刘恩斌, 朱铭莪. 土壤脲酶活性与底物浓度定量关系研究 [J]. *西北农业学报*, 2001, 10(1): 62-66.
- [17] 樊军, 郝明德. 旱地农田土壤脲酶与碱性磷酸酶动力学特征 [J]. *干旱地区农业研究*, 2002, 20(1): 35-37.
- [18] McLaren A D, Packer. Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems [J]. *Advances in Enzymology Related Areas of Molecular Biology*, 1970, 33(6): 245-308.
- [19] Gianfreda L, Cristofaro A D, Rao M A, et al. Kinetics behavior of synthetic organo- and organo-mineral-urease complexes [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1995, 59(3): 811-815.
- [20] 邱莉萍, 刘军, 和文祥, 等. 长期培肥对土壤酶活性的影响 [J]. *干旱地区农业研究*, 2003, 21(4): 44-47.
- [21] 袁玲, 杨邦俊, 郑兰君, 等. 长期施肥对土壤酶活性和氮磷养分的影响 [J]. *植物营养与肥料学报*, 1997, 3(4): 300-306.
- [22] 于镇华, 李彦生, 金剑, 等. 不同施肥措施对农田黑土剖面土壤酶活性特征的影响 [J]. *土壤与作物*, 2018, 7(3): 276-283.
- [23] 沈慧, 姜凤岐, 杜晓军, 等. 水土保持林土壤肥力及其评价指标 [J]. *水土保持学报*, 2000, 14(2): 60-65.

Activities and Kinetics of Soil Urease Under Long-term Fertilization

MA Xing-zhu¹, CHEN Li-jun², ZHOU Bao-ku¹, HAO Xiao-yu¹, ZHU Jian³, WU Zhi-jie²

(1. Institute of Soil Fertilizer and Environmental Resources, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Shenyang Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 3. Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

Abstract: In order to reveal the response characteristics of soil urease activity under long-term fertilizations, the activities and kinetic characteristics of soil urease were studied in black soil with long-term fertilization. The results showed that different fertilization treatments and changes of soil depth had interactions on soil urease activities. As compared with control, the activity of soil urease increased significantly under organic manure fertilization and its plus with chemical fertilizer treatments, and also the activity of urease decreased with soil depth increasing in soil profile. Meanwhile, the enzymatic reaction of soil urease followed first-order kinetics. K_m value decreased under fertilization, while organic manure fertilization increased the values of V_{max} and V_{max}/K_m , which were higher than chemical fertilizer treatment and the control, the catalysis capability of soil urease enhanced under long-term organic manure fertilization.

Keywords: black soil; long-term fertilization; urease activity; kinetics