

# 硝化抑制剂对不同旱地农田土壤 $\text{N}_2\text{O}$ 排放的影响\*

白雪<sup>1,2</sup> 夏宗伟<sup>1</sup> 郭彦玲<sup>1</sup> 张颖<sup>1</sup> 徐慧<sup>1\*\*</sup> 王振宇<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; <sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** 通过室内培养法,研究了硝化抑制剂双氰胺(DCD)和3,4-二甲基吡唑磷酸盐(DMPP)对施加尿素的沈阳草甸棕壤、运城褐土、美国明尼苏达州粉砂壤土的 $\text{N}_2\text{O}$ 排放、氮素转化速率和微生物群落结构的影响。结果表明:抑制剂DCD和DMPP对草甸棕壤的 $\text{N}_2\text{O}$ 减排率为54.1%~75.9%,但对速效氮含量影响不显著,约24%的硝化潜势被DCD所抑制,而在高含水量下DMPP却对硝化潜势无抑制作用;在褐土中,DMPP抑制效果显著,其在两种含水量下的 $\text{N}_2\text{O}$ 减排率为85.5%和66.7%、对硝化作用潜势抑制率为97.2%和96.4%,但DCD只在低含水量下有少许抑制效果(24.6%~57.5%),而在高含水量下则失效;DMPP对粉砂壤土在两种含水量下的 $\text{N}_2\text{O}$ 减排率为42.9%和53.1%,而DCD在高含水量下未能减排 $\text{N}_2\text{O}$ ;在草甸棕壤和褐土中,施氮肥有效促进氨氧化细菌(AOB)的生长繁殖,DCD与DMPP使AOB *amoA* 数量减少了4.1%~63.5%,有显著抑制作用,而对氨氧化古菌(AOA)和反硝化菌则影响不大;与AOB相比,AOA在数量上占优势,但AOB *amoA* 基因丰度与硝化潜势显著正相关,表明AOB在硝化过程中起了更重要的作用。

**关键词** 旱地土壤;硝化抑制剂; $\text{N}_2\text{O}$ ;硝化潜势;氨氧化细菌;氨氧化古菌

**中图分类号** Q938.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)9-2319-11

**Effects of nitrification inhibitors on  $\text{N}_2\text{O}$  emission from different upland agricultural soils.**

BAI Xue<sup>1,2</sup>, XIA Zong-wei<sup>1</sup>, GUO Yan-ling<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, XU Hui<sup>1\*\*</sup>, WANG Zhen-yu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

<sup>2</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(9): 2319–2329.

**Abstract:** A laboratory incubation experiment was conducted to evaluate the effects of nitrification inhibitors dicyandiamide (DCD) and 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) applied with urea fertilizer on the  $\text{N}_2\text{O}$  emission, nitrogen transformation rate, and microbial community structure in meadow brown soil (Shenyang, Northeast China), cinnamon soil (Yuncheng, Central China), and silt loam soil (Minnesota, USA). In meadow brown soil, both of the two nitrification inhibitors reduced the  $\text{N}_2\text{O}$  emission by 54.1%–75.9%, but had no effects on soil mineral nitrogen content. The DCD inhibited the nitrification potential of meadow brown soil by about 24%, while the DMPP was inefficient under the higher soil moisture content. In cinnamon soil, the DMPP had significant inhibitory effect on the  $\text{N}_2\text{O}$  emission and nitrification potential, with the  $\text{N}_2\text{O}$  emission decreased by 85.5% and 66.7% and the nitrification potential reduced by 97.2% and 96.4% under lower and higher soil moisture contents, respectively. The DCD in cinnamon soil showed a weak inhibitory effect on the  $\text{N}_2\text{O}$  emission (decreased by 24.6%–57.5%) under lower soil moisture content, and no effect under the higher soil moisture content. The DMPP in silt loam soil decreased the  $\text{N}_2\text{O}$  emission by 42.9% and 53.1% under lower and higher soil moisture contents, respectively, while the DCD was inefficient under higher soil moisture content. In meadow brown soil and cinnamon soil, applying urea fertilizer alone promoted the growth and reproduction of soil ammonia-oxidizing bacteria (AOB) effectively, while the application of DCD and DMPP decreased the abundance of AOB by 4.1%–63.5% but had little effects

\* 国家科技支撑计划项目(2008BAD95B01)和国家公益性行业(农业)科研专项(201103039)资助。

\*\* 通讯作者 E-mail: xuhui@iae.ac.cn

收稿日期: 2012-04-19 接受日期: 2012-05-24

on the abundance of soil ammonia-oxidizing archaea (AOA) and denitrifying bacteria. As compared with AOB, AOA were dominant in meadow brown soil and cinnamon soil, but the abundance of AOB *amoA* had a significant positive correlation with soil nitrification potential, indicating that soil AOB played more important role in the nitrification of these two soils.

**Key words:** upland soil; nitrification inhibitor; N<sub>2</sub>O; nitrification potential; ammonia-oxidizing bacteria; ammonia-oxidizing archaea.

氧化亚氮(N<sub>2</sub>O)被《联合国气候变化框架公约》列为仅次于二氧化碳(CO<sub>2</sub>)和甲烷(CH<sub>4</sub>)的管制温室气体,其全球增温潜势(GWP)是CO<sub>2</sub>的298~310倍。农田是主要N<sub>2</sub>O排放源之一,约占全球N<sub>2</sub>O排放量的60%,且仍在继续增加(IPCC, 2007)。农田土壤中硝化作用与反硝化作用是N<sub>2</sub>O的主要产生过程。硝化作用是指在好氧条件下,由氨氧化菌与亚硝酸盐氧化菌将NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N氧化为NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N的过程;反硝化作用则是指在厌氧条件下,由反硝化菌将NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N还原为N<sub>2</sub>O、NO或N<sub>2</sub>的过程。此外,硝化细菌的反硝化作用也被认为是一种重要的N<sub>2</sub>O产生过程(Wrage *et al.*, 2001)。

影响农田土壤N<sub>2</sub>O排放的主要因素包括土壤温度、土壤水分、土壤pH、土壤质地及施肥与耕作等(谢立勇等, 2011)。氮肥使用量过多及氮肥利用率低下是中国农田大量产生并排放N<sub>2</sub>O的主要原因。在中国,氮肥利用率仅为30%~40%(朱兆良, 2000),远低于发达国家。

关于农田土壤N<sub>2</sub>O减排措施的研究主要集中在减少氮肥施用量、优化氮肥施用时间、施用有机肥、推广长效缓释肥料、秸秆还田、施用硝化抑制剂及精准农业等方面(侯爱新等, 1998; 黄国宏等, 1998; de Klein & Ledgard, 2005; Oenema *et al.*, 2005; Asing *et al.*, 2008; Hadi *et al.*, 2008)。硝化抑制剂技术被认为是最有效的N<sub>2</sub>O减排技术之一。已报道的硝化抑制剂有双氰胺(DCD)、2-氯-6-(三氯甲基)吡啶(nitrapyrin)、3, 4-二甲基吡唑磷酸盐(DMPP)、脒基硫脲(ASU)、2-胺-4-氯-6-甲基嘧啶(AM)、2-巯基苯并噻唑(MBT)和乙炔等。但是,不同硝化抑制剂的作用机理不同,且抑制效率还受土

壤类型、有机质含量、温度、水分、土壤管理措施等因素影响(孙志梅等, 2008)。故而,往往不易确定在某种特定土壤上究竟应用哪种硝化抑制剂、在哪些条件下才能有较好的N<sub>2</sub>O减排效果。而此前,中国关于硝化抑制剂对不同类型土壤N<sub>2</sub>O排放速率影响的研究则较鲜见。因此,本文选取3种旱地农田土壤和2种硝化抑制剂为研究对象开展土壤培养试验,目的在于考察不同硝化抑制剂在不同土壤中对于N<sub>2</sub>O减排的适用性。

另外,硝化抑制剂对不同供试土壤N<sub>2</sub>O排放的抑制程度不同,其可能原因之一在于土壤微生物群落结构的差别,即硝化、反硝化菌群落对不同硝化抑制剂的敏感程度存在区别。因此,本文在比较不同土壤N<sub>2</sub>O排放对不同硝化抑制剂响应的同时,分析了土壤微生物群落结构的区别,旨在探讨土壤微生物群落结构与硝化抑制剂应用效果和N<sub>2</sub>O排放速率间的联系,以期为进一步提出旱地土壤N<sub>2</sub>O减排技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

3种供试土壤为草甸棕壤(S)、褐土(Y)、粉砂壤土(M),采自位于辽宁省沈阳市苏家屯区十里河镇的辽宁沈阳农田生态系统国家野外研究站(41°31'N, 123°22'E)、位于山西省运城市的董村农场(34°56'N, 110°43'E)以及位于美国明尼苏达州罗斯芒特的野外试验站(44°45'N, 93°04'E)。土壤样品采集深度为0~20 cm,剔除杂物及残留根系,风干后过2 mm筛备用。3种土壤的基本理化性质见表1。

表 1 供试土壤的基本理化性质  
Table 1 Basic physical and chemical properties of the tested soils

供试土壤	全碳 (g · kg <sup>-1</sup> )	有机碳 (g · kg <sup>-1</sup> )	全氮 (g · kg <sup>-1</sup> )	pH	容重 (g · cm <sup>-3</sup> )	粘粒 (%)	粉粒 (%)	砂粒 (%)
沈阳草甸棕壤(S)	11.7	10.6	1.7	5.7	1.25	14.88	66.70	18.42
运城褐土(Y)	22.1	8.7	1.7	8.1	1.23	37.40	46.00	16.60
明尼苏达粉砂壤土(M)	24.8	21.8	2.7	6.3	1.33	23.00	55.00	22.00

1.2 试验设计

本试验设置如下 4 种基本处理:Ⅰ,CK(空白对照);Ⅱ,Urea(单施尿素);Ⅲ,DCD(尿素+DCD);Ⅳ,DMPP(尿素+DMPP),其中尿素用量均为 200 mg N·kg<sup>-1</sup> dry soil,DCD 与 DMPP 用量均为施用尿素 N 量的 1%。为比较土壤含水量的影响,每种基本处理再设置低(L)、高(H)2 种水分状况处理,其土壤质量含水量分别为 20% 和 30% (w/w)。共计 8 种处理,每种处理设 6 个重复。

本试验采用室内培养法,称取相当于 100 g 干土重的风干土置于 300 mL 培养瓶中,用蒸馏水将土壤含水量调至质量含水量 20%,于 25 ℃ 恒温培养箱中预培养一周。预培养结束后,将尿素与硝化抑制剂溶于蒸馏水,均匀滴入相应处理的土壤中,并用蒸馏水调至指定土壤含水量,以封口膜将培养瓶封口后 25 ℃ 培养。

上述培养试验的 6 个重复中,3 个重复用于 N<sub>2</sub>O 排放量测定,另 3 个重复用于硝化作用指标测定及微生物群落结构分析。

1.3 分析方法

1.3.1 土壤 N<sub>2</sub>O 通量 按 1.2 中试验设计进行相应处理,用于 N<sub>2</sub>O 排放量测定的那一组,先用空气泵置换瓶内空气,以橡胶塞封口,胶塞中央插入连接三通阀的不锈钢针头(培养中呈密闭状态);25 ℃ 培养 24 h 后用注射器抽取 2 mL 瓶内气体,测定其中 N<sub>2</sub>O 含量;测定结束后再用空气泵置换瓶内气体,以封口膜封口,置于 25 ℃ 培养。在培养期间定期测定瓶内 N<sub>2</sub>O 的产生量,同时定期补充水分,以保持土壤含水量。

气体样品中的 N<sub>2</sub>O 含量用日本岛津 GC-14A 气相色谱仪测定,检测器为电子捕获器 ECD,分离柱内填充料为 Porapak Q,载气为 Ar 和 CH<sub>4</sub> 的混合气。分离柱温度、进样口温度、检测器温度分别为 60、100、300 ℃。

根据公式  $F = \Delta m / (W \times \Delta t) = \rho \times V \times \Delta C / (W \times \Delta t)$  计算 N<sub>2</sub>O 通量。式中, $F$  为 N<sub>2</sub>O 通量, $\Delta m$  和  $\Delta C$  分别为  $\Delta t$  时间里培养瓶中增加或减少气体质量和混合比浓度, $V$  和  $W$  分别是瓶内有效空间的体积和土样重量, $\rho$  为标准状况下气体密度。

1.3.2 土壤 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 与 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量 选取沈阳草甸棕壤、运城褐土 2 种土壤,称取相当于 200 g 干土重的风干土于 500 mL 烧杯中,以 1.2 中的相同处理进行培养。分别于培养第 1、3、8、16、22、37 天,称取

10 g 土样,按照固液比 1:5 的比例,以 2 mol·L<sup>-1</sup> KCl 溶液振荡浸提 1 h,用 Bran+Luebbe 公司 AA3 型连续流动分析仪测定 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 与 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量。

1.3.3 土壤硝化作用潜势 于培养第 2 天和第 9 天称取土样,采用土壤培养法(Schinner *et al.*, 1995),以 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为底物,以 NaClO<sub>3</sub> 抑制 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 到 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的氧化作用,30 ℃ 振荡培养 5 h,产生的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 用 2 mol·L<sup>-1</sup> KCl 溶液振荡浸提,用分光光度计在 520 nm 下比色测定。硝化潜势以 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 浓度的变化速率来表示。

1.3.4 土壤微生物硝化与反硝化功能基因的定量分析 于培养第 2 天和第 9 天取土样,风干后-20 ℃ 保存。称取 0.25 g 土样,用土壤 DNA 提取试剂盒 MoBio UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit(MoBio Laboratories,CAT. No. 12800-100)提取土壤微生物基因组 DNA,提取与纯化步骤按照试剂盒说明书进行。

采用 real-time PCR 技术对氨氧化细菌(AOB)与氨氧化古菌(AOA)的氨氧化功能基因 *amoA* 和反硝化细菌的反硝化功能基因 *nirS* 进行定量分析,3 个基因的扩增引物见表 2。分别以 3 对引物 PCR 扩增 DNA 模板,将 PCR 产物纯化,测定 OD 值并计算基因拷贝数。将 PCR 产物按 10 倍梯度稀释后进行 real-time PCR,构建标准曲线。PCR 反应体系包括 1 μL DNA 模板,10 μL SYBR Master Mix (2×)(TaKaRa,大连),前、后引物各 0.75 μL (10 μmol·L<sup>-1</sup>),补超纯水至 20 μL。反应条件为 95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 变性 20 s,55 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 40 个循环。

1.4 统计分析

显著性检验、ANOVA 分析、LSD 法多重比较及

表 2 PCR 扩增引物  
Table 2 Primers for PCR

目的基因	引物	序列 (5'-3')	参考文献
<i>amoA</i>	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGCTG-GT	Rothhauwe <i>et al.</i> , 1997
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCT-TCTTC	
Archaeal <i>amoA</i>	Arch-amoAF	STAATGCTCTGGCT-TAGACG	Francis <i>et al.</i> , 2005
	Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTG-TATGT	
<i>nirS</i>	nirS cd3AF	G TSAACG TSAAGGA-RACSGG	Throback <i>et al.</i> , 2004
	nirS R3cd	GASTCGGRTGSGTCTT-GA	

相关性分析均采用 SPSS 17.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 硝化抑制剂对土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响

沈阳草甸棕壤单施尿素组在 2 种含水量下的 N<sub>2</sub>O 排放量均显著高于另外 3 个处理组的 N<sub>2</sub>O 排放量,且在培养至第 4 天或第 8 天达到 N<sub>2</sub>O 排放高峰(图 1a)。分别施加 2 种硝化抑制剂的 DCD 组和 DMPP 组比不施尿素空白对照组(CK)的 N<sub>2</sub>O 排放量略高,但均显著低于单施尿素组,这表明 DCD 与 DMPP 对草甸棕壤均有显著的减排效果。另外,草甸棕壤中 DMPP 的减排效果比 DCD 略好( $P < 0.01$ ),主要表现在高含水量下 DCD 组在第 8 天

N<sub>2</sub>O 排放量即有上升趋势,而 DMPP 组则始终较低。

运城褐土在施入尿素后 N<sub>2</sub>O 排放量增幅巨大,可达对照组的 75 倍,且在第 2~3 天即达到排放高峰(图 1b),该高峰期比草甸棕壤提前约 4~5 d。褐土对 2 种抑制剂的响应表现出明显差异,DMPP 在 2 种含水量下均有很好的减排效果,DCD 在高含水量下效果甚微、在低含水量下有效但效果劣于 DMPP。

明尼苏达粉砂壤土室内培养实验中监测了 N<sub>2</sub>O 排放量(图 1c)。在低含水量时,DCD 与 DMPP 均有很好的减排效果,两者差异不显著。在培养第 21 天左右,单施尿素组 N<sub>2</sub>O 排放量已恢复到较低水平,抑制剂组的 N<sub>2</sub>O 排放量在培养中期略有上升,但最高值仍显著低于单施尿素组。在高含水量条件下

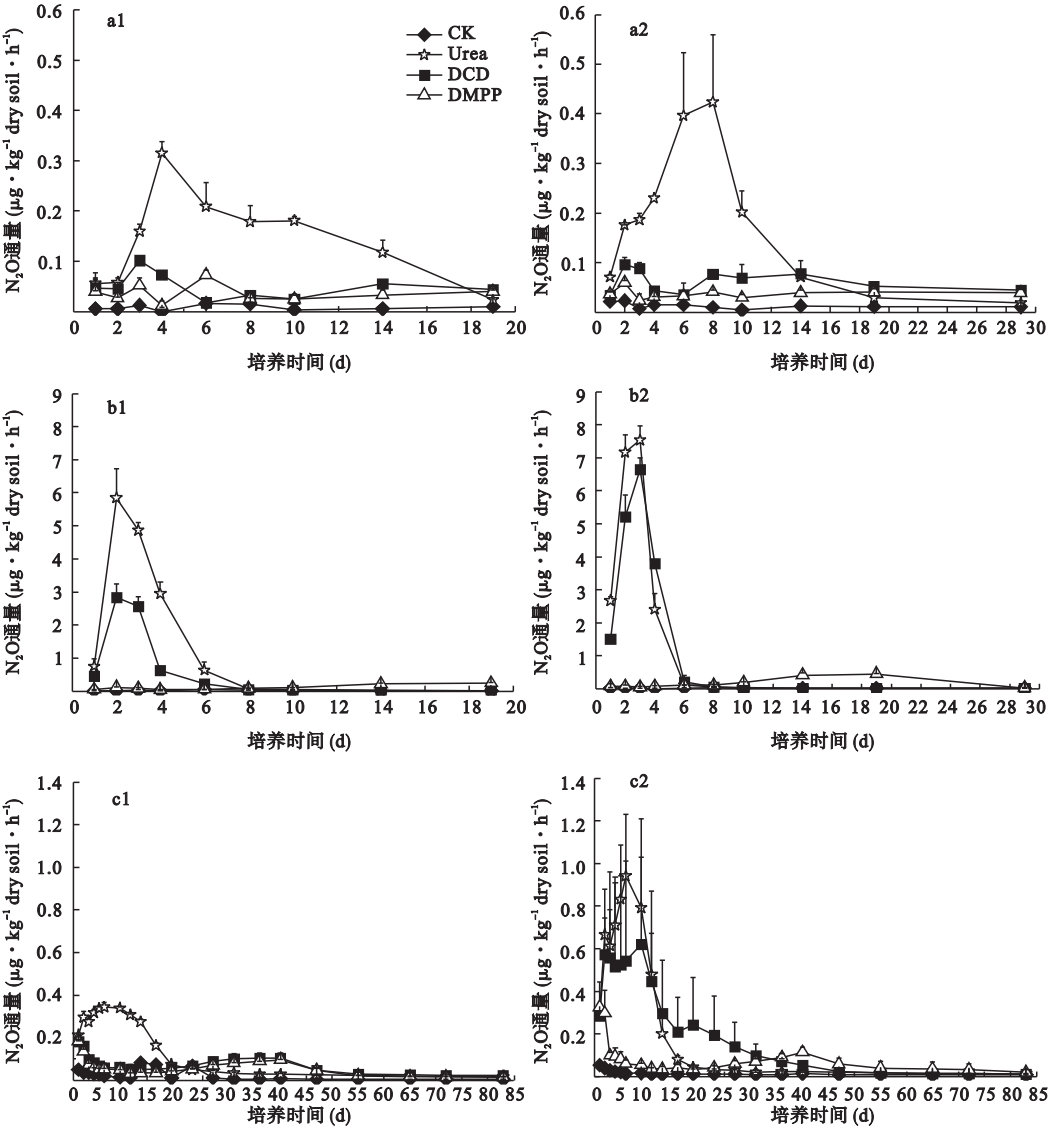


图 1 硝化抑制剂对不同土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响  
Fig. 1 Effect of nitrification inhibitors on N<sub>2</sub>O emissions from different soils  
a, 沈阳草甸棕壤; b, 运城褐土; c, 明尼苏达州粉砂壤土; 1, 低含水量; 2, 高含水量。



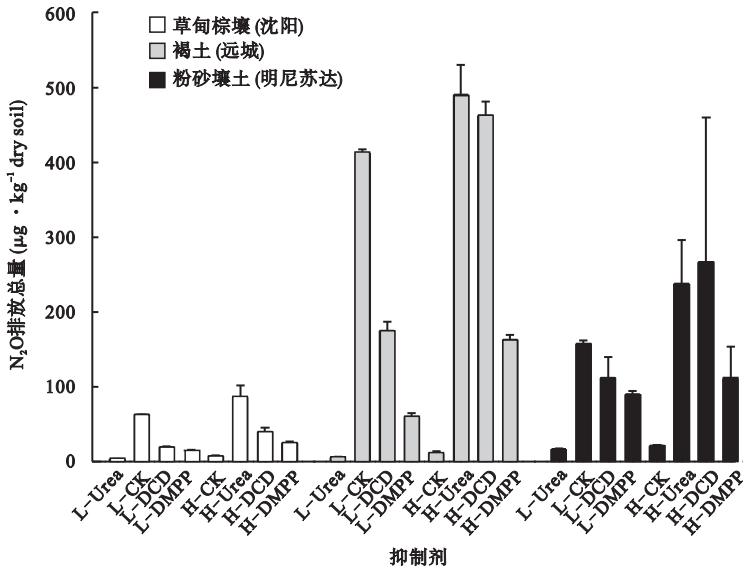


图2 硝化抑制剂对土壤培养期间 N<sub>2</sub>O 排放总量的影响

Fig.2 Effect of nitrification inhibitors on sum of N<sub>2</sub>O emissions from different soils during the period of treatment  
L,低含水量;H,高含水量。

N<sub>2</sub>O 排放量显著高于低含水量组,DMPP 仍表现出极好的减排效果,而 DCD 组则减排效果较差。

3 种土壤在高含水量下的 N<sub>2</sub>O 排放量比低含水量下的 N<sub>2</sub>O 排放量高约 58% ~ 73% (图 2)。比较 3 种土壤在培养期间的 N<sub>2</sub>O 总排放量,其中褐土最大 (1.78 mg · kg<sup>-1</sup>),草甸棕壤最小 (0.26 mg · kg<sup>-1</sup>)。

DCD 在不同土壤中及一种土壤不同水分状况下的 N<sub>2</sub>O 减排率有较大差异 (表 3),表现为对草甸棕壤及低含水量下的褐土和粉砂壤土的 N<sub>2</sub>O 减排效果较好,而对高含水量下的褐土和粉砂壤土基本无效。与 DCD 相比,DMPP 在不同土壤及不同含水量下 N<sub>2</sub>O 减排率相差不大,且均高于 DCD 组。

2.2 硝化抑制剂对土壤速效氮含量的影响

土壤速效氮的动态变化也可反映出硝化抑制剂的抑制效果。如图 3a1、3b1 所示,施尿素使土壤中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 浓度迅速增加,随后逐渐下降,最终降回至初始浓度。草甸棕壤 (图 3a) 的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 浓度对硝化抑制剂的响应效果不明显,2 种硝化抑制剂下 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 浓度差异不显著。褐土 (图 3b) 单施尿素组

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 浓度下降极快,在培养第 9 天已降回到初始浓度,DCD 略微减缓了 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的消耗,而 DMPP 有效地减慢了 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 浓度的下降速度,使其较长时间保持在较高浓度。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度随 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 浓度降低而升高,在培养后期,由于微生物固持及硝化作用和反硝化作用的消耗,土壤无机氮含量减少,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度下降。

2.3 硝化抑制剂对土壤硝化作用潜势的影响

硝化作用潜势是土壤处于最优底物、水分、通气等条件时的硝化作用速率。硝化作用潜势与 N<sub>2</sub>O 通量及 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度变化趋势基本一致 (图 4)。单施尿素组土壤硝化作用潜势较高,DCD 对草甸棕壤硝化作用潜势的抑制效果较好 (图 4a),而 DMPP 对褐土的抑制效果较好 (图 4b)。

2.4 硝化抑制剂对土壤硝化与反硝化功能基因丰度的影响

本文分别以培养第 9 天的草甸棕壤和培养第 2 天的褐土样品为对象 (因草甸棕壤和褐土分别在培养至第 9 天和第 2 天出现了最大 N<sub>2</sub>O 通量),测定其硝化菌群 (AOB 和 AOA) 和反硝化细菌功能基因的丰度。

草甸棕壤 (图 5a) 单施尿素组 AOB *amoA* 基因拷贝数显著高于对照组 ( $P<0.01$ ),DCD 与 DMPP 均显著地降低了 AOB *amoA* 基因拷贝数 ( $P<0.01$ );褐土 (图 5b) 各处理组间 AOB 数量差异不显著,但第 9 天高含水量下单施尿素组和 DCD 组 AOB *amoA*

表 3 硝化抑制剂对不同土壤的 N<sub>2</sub>O 减排效果比较

Table 3 Comparison of effects of nitrification inhibitors on N<sub>2</sub>O emissions in different soils

土壤含水量	DCD 减排率 (%)			DMPP 减排率 (%)		
	草甸棕壤	褐土	粉砂壤土	草甸棕壤	褐土	粉砂壤土
低含水量	69.1	57.5	29.1	75.9	85.5	42.9
高含水量	54.1	5.6	-12.2	70.7	66.7	53.1

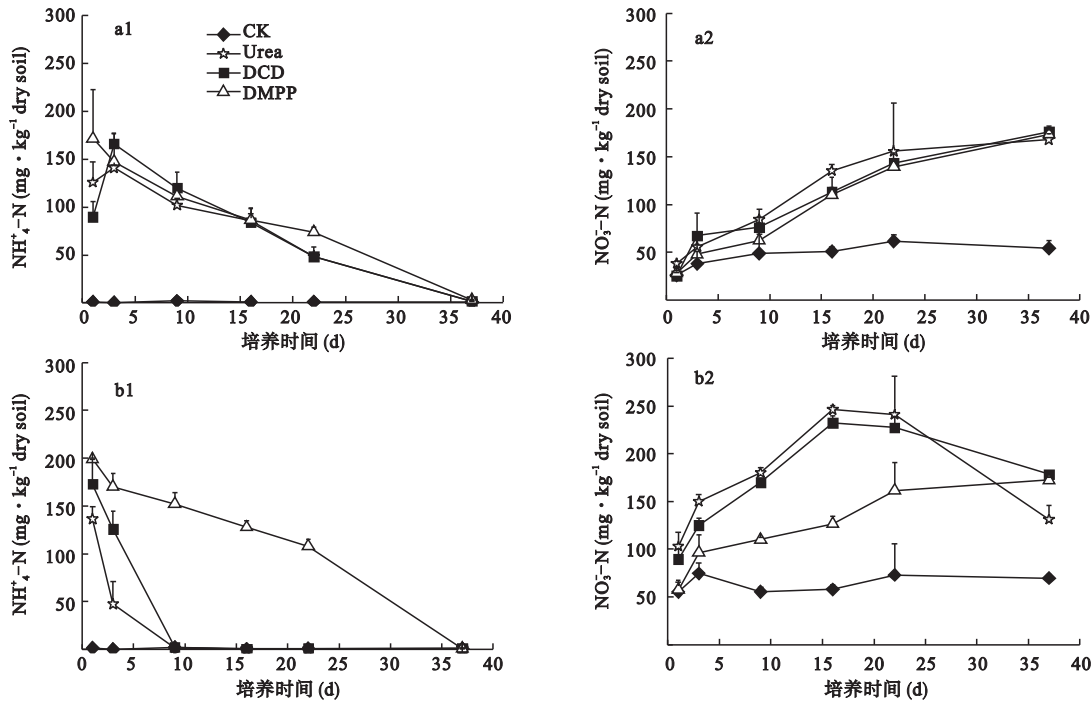


图 3 硝化抑制剂对不同土壤  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度的影响  
Fig.3 Effect of nitrification inhibitors on  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  concentration in different soils  
a, 沈阳草甸棕壤; b, 运城褐土; 1,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ; 2,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ .

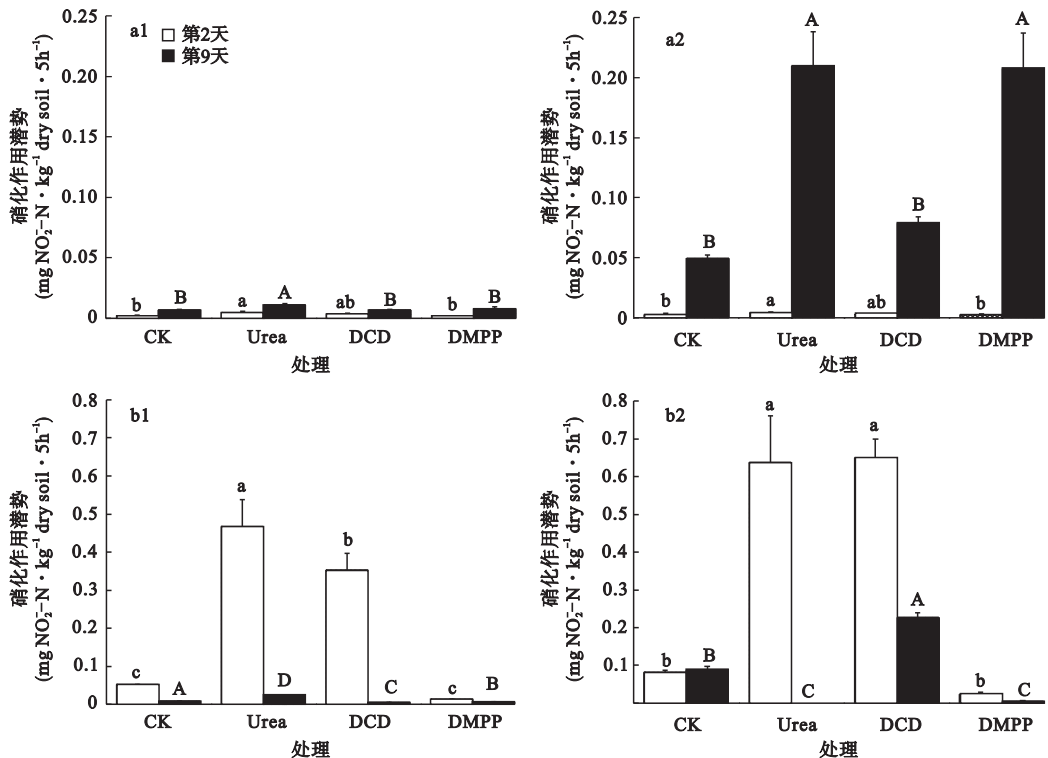


图 4 硝化抑制剂对不同土壤硝化作用潜势的影响  
Fig.4 Effect of nitrification inhibitors on nitrification potential in different soils  
a, 沈阳草甸棕壤; b, 运城褐土; 1, 低含水量; 2, 高含水量。

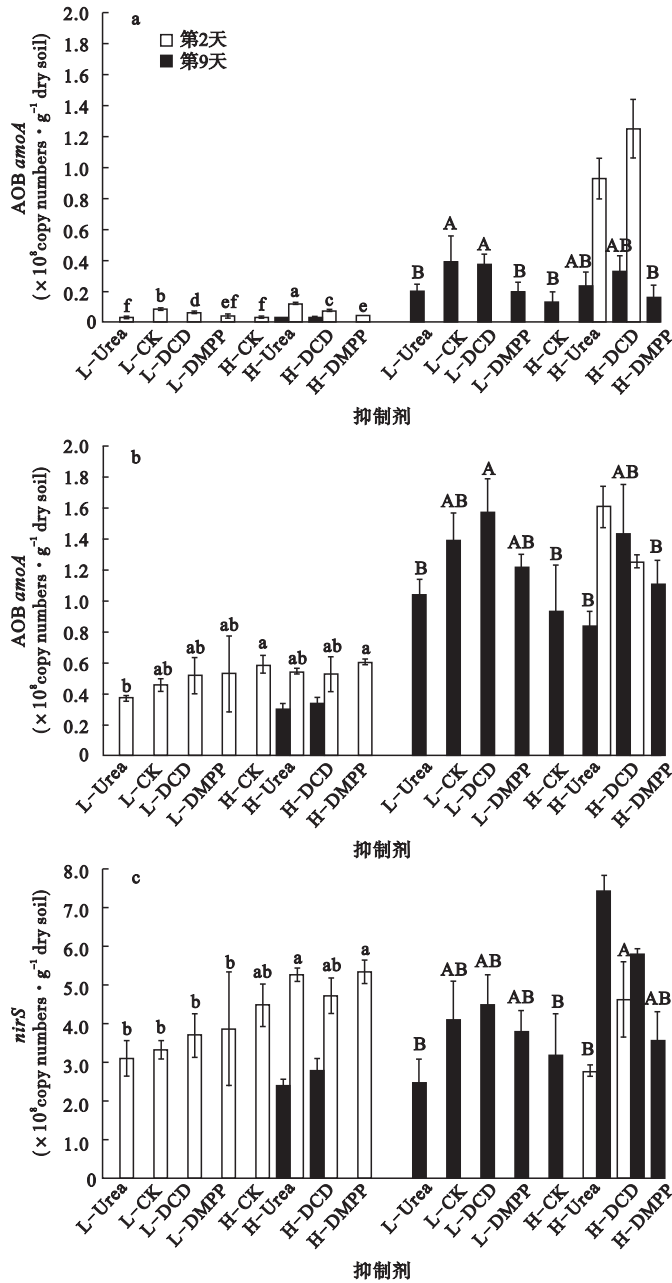


图5 硝化抑制剂对不同土壤硝化与反硝化功能基因丰度的影响

Fig. 5 Effect of nitrification inhibitors on abundance of nitrification and denitrification gene in different soils

(a), AOB *amoA* gene; (b), AOA *amoA* gene; (c), *nirS* gene; S, 草甸棕壤; Y, 褐土; L, 低含水量; H, 高含水量。

基因拷贝数均高于第2天 ( $P < 0.01$ )。另一方面, 2种土壤在4种处理下的 AOA *amoA* 和 *nirS* 基因拷贝数无显著差别, 但在培养至第9天, 褐土 DCD 组的 AOA *amoA* 和 *nirS* 基因拷贝数显著低于单施尿素组 ( $P < 0.01$ )。

从图6看出, 在2种土壤中, AOA *amoA* 基因拷贝数均高于 AOB *amoA* 基因拷贝数, 草甸棕壤2种含水量下单施尿素组 AOA *amoA*/AOB *amoA* 分别为 5.34 和 4.53, 而褐土为 4.04 和 4.35, 均是该含水量

下4个处理中的最低值。草甸棕壤单施尿素组 AOA *amoA*/AOB *amoA* 与对照组有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 但在褐土中该差异不显著。2种硝化抑制剂均抑制了土壤施尿素所造成的 AOB *amoA*/AOA *amoA* 的上升 (表4), DCD 的抑制率为 11.4% ~ 39.3%, 而 DMPP 的抑制率为 41.4% ~ 67.4%, DMPP 在2种土壤中的抑制率均高于 DCD。

草甸棕壤和褐土的硝化作用潜势分别与 AOB、AOA 的 *amoA* 基因丰度的线性回归分析 (图7) 结果

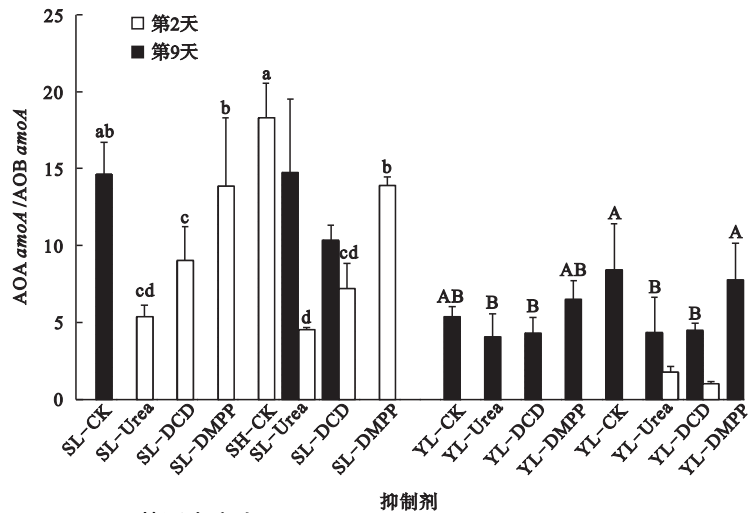


图 6 AOA *amoA* 基因与 AOB *amoA* 基因丰度比

Fig. 6 Ratio of abundance of AOA *amoA* gene to AOB *amoA* gene

S, 草甸棕壤; Y, 褐土; L, 低含水量; H, 高含水量。

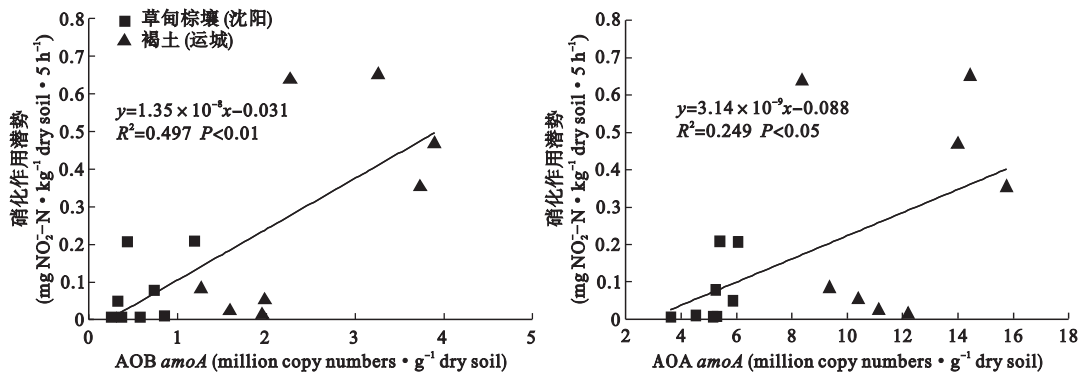


图 7 *amoA* 基因拷贝数与硝化作用潜势的关系

Fig. 7 Relationships between *amoA* gene copy numbers and nitrification potential

显示,硝化作用潜势与 AOB *amoA* 基因拷贝数有极显著的正相关关系 (adjusted  $R^2 = 0.497$ ,  $n = 16$ ,  $P < 0.01$ ),同时硝化作用潜势与 AOA *amoA* 基因拷贝数也有显著的正相关关系 (adjusted  $R^2 = 0.249$ ,  $n = 16$ ,  $P < 0.05$ ),但后者的相关系数要远低于前者。但单独对每种土壤做回归分析时,因为样品数量较少,其硝化作用潜势与 AOB、AOA 的 *amoA* 基因丰度的关系不显著。

表 4 硝化抑制剂对土壤 AOB *amoA*/AOA *amoA* 的影响

Table 4 Effect of nitrification inhibitors on AOB *amoA*/AOA *amoA*

处理	类型	草甸棕壤		褐土	
		低含水量	高含水量	低含水量	高含水量
单施尿素	AOB <i>amoA</i> /AOA <i>amoA</i>	0.19 a	0.22 a	0.27 A	0.27 A
	抑制率	39.3%	34.9%	11.4%	16.3%
DMP	AOB <i>amoA</i> /AOA <i>amoA</i>	0.08 c	0.07 c	0.16 AB	0.14 B
	抑制率	59.0%	67.4%	41.4%	48.4%

3 讨论

尿素施入土壤后,在土壤脲酶作用下水解成  $\text{NH}_4^+$  (闫双堆等,2008), $\text{NH}_4^+$  作为硝化作用的第一步氨氧化作用的底物,可通过硝化作用以及后续的反硝化作用转化成  $\text{N}_2\text{O}$ ,导致单施尿素组的  $\text{N}_2\text{O}$  排放高峰。氨氧化作用由氨氧化菌 (AOM) 完成,而 AOB 与 AOA,究竟谁在其中扮演更重要的角色仍是一个讨论焦点,这也可能与在某种土壤中硝化抑制剂的有效性相关联。在本研究的 2 种供试土壤中, AOA *amoA* 基因拷贝数均高于 AOB *amoA* 基因拷贝数,这与之前的其他报道 (Leininger *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Prosser & Nicol, 2008) 相一致。已有研究表明,土壤中 AOA *amoA* 基因拷贝数比 AOB *amoA* 基因拷贝数普遍高 1 ~ 2 个数量级。Leininger 等 (2006) 的研究结果显示, AOA *amoA* 基



因拷贝数在所有供试土壤样品中均较高,其中 Crenarchaeota 中的 AOA *amoA* 最高,为 AOB *amoA* 的 3000 倍,在上层土(0 ~ 15 cm)中 AOA *amoA* / AOB *amoA* 为 1.5 ~ 230。而本文中 AOA *amoA* / AOB *amoA* 相对偏小,为 1.02 ~ 18.31。

以往研究表明,影响细菌与古菌分布的环境因子主要有 pH、盐浓度、温度、土壤类型和土壤氮水平等。一项以中国砂质壤土为对象的研究表明,施氮肥土壤中 AOA *amoA* / AOB *amoA* 低于未施氮肥土壤 (Shen *et al.*, 2008), 本文结果与之一致。Di 等 (2010) 指出,适宜 AOB 与 AOA 生长的土壤含氮量不同, AOB 生长在高氮环境,在营养丰富的表层土中丰度较高,是硝化作用的主要执行者,对 DCD 的响应明显;而 AOA 更倾向于营养贫瘠的低 N 环境,在下层土中的数量远高于 AOB,但硝化活性低,且对 DCD 的响应较弱,该研究认为,虽然 AOA 的数量和分布均比 AOB 丰富,但是 AOB 在农田土壤氨氧化过程中发挥更重要的作用。本研究 2 种供试土壤 2 种含水量下,单施尿素组 AOA *amoA* / AOB *amoA* 均是该含水量下 4 个处理中的最低值,说明施尿素所形成的高氨氮环境明显促进了 AOB 的生长繁殖,而对 AOA 的影响则小于对 AOB 的影响。另外,有报道指出,当 pH 在 3.4 ~ 8.6 时,硝化作用与 pH 呈正相关,较低的 pH 会使硝化菌群的数量降低因而对硝化过程起到抑制作用 (Paavolainen *et al.*, 2000),而氨氧化细菌与古菌的 *amoA* 基因拷贝数在不同 pH 梯度上呈现出不同的分布特征, AOA 的丰度随 pH 升高而减少, AOB 丰度始终较 AOA 低,但随 pH 升高而增加 (Nicol *et al.*, 2008)。本文中,草甸棕壤 pH 为 5.7, AOA *amoA* / AOB *amoA* 为 4.53 ~ 18.31,而褐土 pH 为 8.1, AOA *amoA* / AOB *amoA* 为 1.02 ~ 8.42,这表明 AOB *amoA* 在高 pH 环境中丰度较大;同时,与草甸棕壤相比,褐土中 AOB 与 AOA 的 *amoA* 丰度均较大,其弱碱性的环境更有利于 AOB 的生长繁殖及发挥硝化活性,这可能是褐土中  $\text{N}_2\text{O}$  排放量较大的原因之一。此外,本文的相关性分析结果显示, AOB 与硝化作用潜势具有极显著正相关。Morimoto 等 (2011) 在考察土壤类型对 AOB 与 AOA 分布状况的影响时,也得到了相似的结果,这表明 AOB 与硝化作用潜势的关系比 AOA 更紧密,这也与已有研究指出的土壤中的氨氧化作用是由 AOB 而非 AOA 来执行 (Jia *et al.*, 2009) 的观点一致。而本文结果中, AOA 与硝化作用潜势也有显

著的相关性,表明 2 种土壤中 AOA 也参与了硝化过程。此外,本文测定样品的 AOB *amoA* 变异系数 (12%) 大于 AOA *amoA* 变异系数 (6%), 也表明尿素及抑制剂对 AOB 的影响更大。然而,有研究指出, AOA 比 AOB 与硝化势的关系更为密切 (张慧等, 2011), 因此关于不同环境条件下 AOB 与 AOA 在硝化过程中的作用仍需进行更深入的探究。

迄今已发现或发明了数百种具有硝化抑制作用的化合物 (Prasad & Power, 1995; McCarty, 1999; Subbarao *et al.*, 2007), 且作用机理各有不同, 主要包括: 螯合氨单加氧酶活性位点上的 Cu 来抑制氨氧化过程 (Stein & Arp, 1998); 直接影响亚硝化细菌的呼吸作用以及细胞色素氧化酶的活性, 从而抑制亚硝化细菌的生长繁殖 (Nuti *et al.*, 1975); 改变土壤微环境, 降低土壤 pH, 抑制亚硝化细菌的生长繁殖; 通过影响土壤氮的矿化和固持过程抑制硝化作用 (Bending & Lincoln, 2000)。Nuti 等 (1975) 认为, DCD 通过抑制 AOB 呼吸作用过程中的电子转移和干扰细胞色素氧化酶的功能而抑制硝化作用; 而 Zacherl 等 (1990) 提出, DCD 的抑制作用可能由于 DCD 结构中含有的与  $\text{NH}_3$  相似的结构干扰了 AOB 对底物  $\text{NH}_3$  的利用。DMPP 则可能是通过抑制氨单加氧酶 (AMO) 来实现其硝化抑制功能 (Zerulla *et al.*, 2001)。

本研究中, DCD 对褐土的  $\text{N}_2\text{O}$  通量、无机氮含量、硝化作用潜势及 AOM 数量的抑制效果均较差, 甚至在高含水量下无效, 其原因可能是: 由于褐土偏碱性的条件适宜硝化与反硝化作用的进行, AOM 丰度较大, 大量施入氮肥促进其生长繁殖, 土壤氮素加速周转, 造成  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度迅速下降, 同时释放出大量  $\text{N}_2\text{O}$ ; 而 DCD 本身抑制效率较低 (McCarty & Bremner, 1989), 本文施入的剂量 (尿素 N 的 1%) 达不到对褐土中大量硝化菌群起抑制效果的浓度要求; 此外, DCD 降解速率快 (Weiske *et al.*, 2001), 且因水溶性高、在土壤剖面中移动性强而易发生与  $\text{NH}_4^+$  分离的现象进而影响其硝化抑制效果 (Rajbanshi *et al.*, 1992)。与 DCD 相比, DMPP 对褐土在 2 种含水量下均表现出较好的抑制效果, 它有效抑制了褐土中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  向  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的转化, 使土壤中的氮素较长时间以  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  形式存在, 显著减少了  $\text{N}_2\text{O}$  排放, 同时 DMPP 抑制了 AOM (尤其是 AOB) 的 *amoA* 基因拷贝数的增长, 这可能是其对褐土  $\text{N}_2\text{O}$  减排效果较好的原因之一。此外, DMPP 作为较新

型的硝化抑制剂,具有降解速度慢(Fettweis *et al.*, 2001)从而使抑制效果保持得更长久、由于吸附作用限制了移动性从而不易与  $\text{NH}_4^+$  分离及造成淋溶损失(Zerulla *et al.*, 2001)等优越性。

另外,研究表明,当土壤充水孔隙度(WFPS)低于60%时,产生的  $\text{N}_2\text{O}$  以硝化作用为主(Grani & Boeckman, 1994),而反硝化作用产生的  $\text{N}_2\text{O}$  随着土壤水分增加而上升;WFPS在60%~80%范围内时,  $\text{N}_2\text{O}$  的排放作用最强;当WFPS达80%以上时,虽然反硝化速率最大,但过高的土壤湿度会阻碍  $\text{N}_2\text{O}$  扩散,增加  $\text{N}_2\text{O}$  进一步还原为  $\text{N}_2$  的几率(刘广深等, 2002)。本文高含水量处理组土壤质量含水量为30%,对应于3种土壤的WFPS分别为71%、69%、80%,此时可能反硝化作用对  $\text{N}_2\text{O}$  排放量的贡献较大,而Li等(2008)研究指出,DMPP对反硝化过程中的2种酶——硝酸还原酶(NAR)和亚硝酸还原酶(NIR)有抑制作用,因此本文中DMPP可能通过抑制反硝化作用而减少了  $\text{N}_2\text{O}$  排放。而DCD对反硝化作用的抑制性则未见报道,这可能解释了其在高含水量下失效的原因。

DCD与DMPP对草甸棕壤  $\text{N}_2\text{O}$  通量、无机氮含量、硝化作用潜势及AOM数量的抑制能力均较弱,且两抑制剂间抑制效果差异不显著,可能是因为草甸棕壤偏酸性的条件对硝化过程有抑制作用,AOM丰度较低,虽然施加了氮肥,但是土壤本身的硝化能力限制了氮素周转,因此  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  浓度下降缓慢,  $\text{N}_2\text{O}$  排放量低,而硝化抑制剂的施入可能对草甸棕壤的硝化作用起到了一定的抑制作用,但是由于该土壤本身硝化能力较低,表现出来的抑制作用并不像褐土中那样明显,且2种硝化抑制剂也未表现出显著差异。

## 4 结 论

供试的3种土壤的  $\text{N}_2\text{O}$  排放总量相差较大,从高到低依次为褐土(运城)、粉砂壤土(美国明尼苏达州)、草甸棕壤(沈阳)。DCD对低和高含水量的草甸棕壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放均有显著抑制效果,对褐土和粉砂壤土在低含水量下具较好抑制效果,但在高含水量下则无显著抑制效果,而DMPP在高含水量下比DCD具有更好的抑制效果。相同浓度下,DMPP的抑制效果(约65.8%)普遍优于DCD(约33.9%)。

DMPP能有效地抑制褐土中  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  向  $\text{NO}_3^--\text{N}$  的转化,而在草甸棕壤中DCD与DMPP的抑制效果

均不显著,但DCD对其硝化潜势的抑制效果略好。

施入氮肥能有效促进AOB的生长繁殖,DCD与DMPP均对AOB有抑制效果,而对AOA和反硝化菌的影响不大。尽管草甸棕壤、褐土中的AOA在数量上占优势,但AOB *amoA* 基因丰度与硝化潜势相关性更好,表明AOB在硝化过程中起更重要作用。

总之,尽管在低含水量下的草甸棕壤中DCD有较好的效果,但DMPP比DCD更适于抑制供试土壤的  $\text{N}_2\text{O}$  排放,缘于它对氨氧化细菌数量和活性的有效抑制。

## 参考文献

- 侯爱新, 陈冠雄, Van Cleemput O. 1998. 不同种类氮肥对土壤释放  $\text{N}_2\text{O}$  的影响. 应用生态学报, **9**(2): 176-180.
- 黄国宏, 陈冠雄, 张志明. 1998. 玉米田  $\text{N}_2\text{O}$  排放及减排措施研究. 环境科学学报, **18**: 344-349.
- 刘广深, 徐文彬, 洪业汤, 等. 2002. 土壤  $\text{N}_2\text{O}$  释放通量季节变化的主要环境驱动因素研究. 矿物学报, **3**: 229-234.
- 孙志梅, 武志杰, 陈利军, 等. 2008. 硝化抑制剂的施用效果、影响因素及其评价. 应用生态学报, **19**(7): 1611-1618.
- 谢立勇, 叶丹丹, 张贺, 等. 2011. 旱地土壤温室气体排放影响因子及减排增汇措施分析. 中国农业气象, **32**(4): 481-487.
- 闫双堆, 刘利军. 2008. 腐植酸-尿素络合物对尿素转化及氮素释放的影响. 中国农业生态学报, **16**(1): 109-112.
- 张慧, 袁红朝, 朱亦君, 等. 2011. 不同利用方式对红壤坡地微生物多样性和硝化势的影响. 生态学杂志, **30**(6): 1169-1176.
- 朱兆良. 2000. 农田中氮肥的损失与对策. 土壤与环境, **9**(1): 1-6.
- Asing J, Saggar S, Singh J, *et al.* 2008. Assessment of nitrogen losses from urea and an organic manure with and without nitrification inhibitor, dicyandiamide, applied to lettuce under glasshouse conditions. *Australian Journal of Soil Research*, **46**: 535-541.
- Bending GD, Lincoln SD. 2000. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 1261-1269.
- Chen XP, Zhu YG, Xia Y, *et al.* 2008. Ammonia-oxidizing archaea: Important players in paddy rhizosphere soil. *Environmental Microbiology*, **10**: 1978-1987.
- de Klein CAM, Ledgard SF. 2005. Nitrous oxide emissions from New Zealand agriculture: Key sources and mitigation strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **72**: 77-85.
- Di HJ, Cameron KC, Shen JP, *et al.* 2010. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, **72**: 386-394.

- Fettweis U, Mittelstaedt W, Schimansky C, *et al.* 2001. Lysimeter experiments on the translocation of the carbon-14-labelled nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in a gleyic cambisol. *Biology and Fertility of Soils*, **34**: 126–130.
- Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, *et al.* 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 14683–14688.
- Granli T, Boeckman OC. 1994. Nitrous oxide from agriculture. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, **12** (Suppl.): 127–128.
- Hadi A, Jumadi O, Inubushi K, *et al.* 2008. Mitigation options for N<sub>2</sub>O emission from a corn field in Kalimantan, Indonesia. *Soil Science and Plant Nutrition*, **54**: 644–649.
- IPCC. 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis; Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jia ZJ, Conrad R. 2009. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, **11**: 1658–1671.
- Leininger S, Ulrich T, Schlöter M, *et al.* 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, **442**: 806–809.
- Li H, Liang XQ, Chen YX, *et al.* 2008. Effect of nitrification inhibitor DMPP on nitrogen leaching, nitrifying organisms, and enzyme activities in a rice-oilseed rape cropping system. *Journal of Environmental Sciences*, **20**: 149–155.
- McCarty GW, Bremner JM. 1989. Laboratory evaluation of dicyandiamide as a soil nitrification inhibitor. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, **20**: 2049–2065.
- McCarty GW. 1999. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, **29**: 1–9.
- Morimoto S, Hayatsu M, Hoshino YT, *et al.* 2011. Quantitative analyses of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in fields with different soil types. *Microbes and Environments*, **26**: 248–253.
- Nicol GW, Leininger S, Schleper C, *et al.* 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, **10**: 2966–2978.
- Nuti MP, Neglia RG, Verona O. 1975. Azione del solfato di diclandiamidina sul metabolismo chemoautotrofo di *Nitrosomonas europaea*. *L'agricoltura (Italiana)*, **104**: 219–225.
- Oenema O, Wrage N, Velthof GL, *et al.* 2005. Trends in global nitrous oxide emissions from animal production systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **72**: 51–65.
- Paavolainen L, Fox M, Smolander A. 2000. Nitrification and denitrification in forest soil subjected to sprinkling infiltration. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 669–678.
- Prasad R, Power JF. 1995. Nitrification inhibitors for agriculture, health and the environment. *Advances in Agronomy*, **54**: 233–281.
- Prosser JI, Nicol GW. 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology*, **10**: 2931–2941.
- Rajbanshi SS, Benckiser G, Ottow JCG. 1992. Effects of concentration, incubation temperature, and repeated applications on degradation kinetics of dicyandiamide (DCD) in model experiments with a silt loam soil. *Biology and Fertility of Soils*, **13**: 61–64.
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4704–4712.
- Schinner F, Ohlinger R, Kandeler E, *et al.* 1995. Methods in Soil Biology. Berlin: Springer-Verlag.
- Shen JP, Zhang ML, Zhu YG, *et al.* 2008. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, **10**: 1601–1611.
- Stein LY, Arp DJ. 1998. Ammonium limitation results in the loss of ammonia-oxidizing activity in *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 1514–1521.
- Subbarao GV, Rondon M, Ito O, *et al.* 2007. Biological nitrification inhibition (BNI): Is it a widespread phenomenon. *Plant and Soil*, **294**: 5–18.
- Throbäck IN, Enwall K, Jarvis Å, *et al.* 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, **49**: 401–417.
- Weiske A, Benckiser G, Herbert T, *et al.* 2001. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biology and Fertility of Soils*, **34**: 109–117.
- Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML, *et al.* 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**: 1723–1732.
- Zacherl B, Amberger A. 1990. Effect of the nitrification inhibitors dicyandiamide, nitrapyrin and thiourea on *Nitrosomonas europaea*. *Fertilizer Research*, **22**: 37–44.
- Zarulla W, Barth T, Dressel J, *et al.* 2001. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP): A new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biology and Fertility of Soils*, **34**: 79–84.

作者简介 白雪,女,1986年生,硕士研究生,主要从事环境微生物学的研究。E-mail: xuerff@126.com

责任编辑 李凤芹