浙 江 农 林 大 学 学 报，2023，**40**(4)：820–827
Journal of Zhejiang A&F University
doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.20220605

硝化抑制剂对稻田土壤氧化亚氮排放及硝化作用的影响

张闻汉[1,2]，陈照明[2]，张金萍[2]，林海忠[3]，何　杰[3]，张耿苗[4]，赵钰杰[4]，王　强[2]，马军伟[2]

（1. 浙江农林大学 环境与资源学院，浙江 杭州 311300；2. 浙江省农业科学院 环境资源与土壤肥料研究所，浙江 杭州 310021；3. 浙江省台州市黄岩区农业技术推广中心，浙江 台州 318020；4. 浙江省诸暨市农业技术推广中心，浙江 诸暨 311800）

摘要：【目的】为探究硝化抑制剂对土壤硝化作用及氧化亚氮 (N_2O) 排放的影响。选取稻田土为研究对象，采用微宇宙培养，研究尿素配施硝化抑制剂 [3,4-二甲基吡唑磷酸盐 (DMPP) 和 2-氯-6-三氯甲基吡啶 (CP)] 对稻田土 pH、无机氮、N_2O 排放以及氨氧化微生物的影响。**【方法】**设置不加尿素和硝化抑制剂 (ck)、单施尿素 [氮 (N)200 mg·kg^{-1}，U]、尿素+DMPP (添加量为氮量的 1%，DMPP) 和尿素+CP (添加量为氮量的 2%，CP) 4 个处理。**【结果】**添加硝化抑制剂可以显著提高土壤 pH (P<0.05)。与 ck 相比，施用尿素显著增加了土壤铵态氮 (NH_4^+-N) 质量分数 (P<0.05)，而两者之间硝态氮 (NO_3^--N) 质量分数无显著差异。DMPP 和 CP 处理的 NO_3^--N 质量分数处于较低水平，且 2 个处理的净硝化速率都显著低于 ck 和 U 处理 (P<0.05)，有明显的硝化抑制效果。与 ck 相比，施用尿素显著提高了土壤 N_2O 排放 (P<0.05)，而配施硝化抑制剂显著降低了 N_2O 的累积排放 (P<0.05)。与单施尿素相比，添加硝化抑制剂可有效降低氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因拷贝数，而对氨氧化古菌 (AOA) *amoA* 丰度没有显著影响。相关性分析显示：N_2O 排放量与土壤 pH、AOB 丰度和 NO_3^--N 质量分数呈显著相关 (P<0.05)，说明土壤 pH、AOB 丰度和 NO_3^--N 质量分数是影响土壤 N_2O 排放的关键因素。**【结论】**在中性稻田土中，AOB 主导了土壤 N_2O 的排放和硝化作用，DMPP 和 CP 可通过有效降低 AOB 丰度来抑制硝化作用和减少 N_2O 排放。图 4 表 3 参 34

关键词：水稻土；3,4-二甲基吡唑磷酸盐 (DMPP)；2-氯-6-三氯甲基吡啶 (CP)；氧化亚氮；氨氧化微生物

中图分类号：S153　　　**文献标志码：**A　　　**文章编号：**2095-0756(2023)04-0820-08

Effects of nitrification inhibitors on soil N_2O emission and nitrification in a paddy soil

ZHANG Wenhan[1,2], CHEN Zhaoming[2], ZHANG Jinping[2], LIN Haizhong[3], HE Jie[3], ZHANG Gengmiao[4], ZHAO Yujie[4], WANG Qiang[2], MA Junwei[2]

(1. College of Environment and Resources, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Institute of Environmental Resources and Soil Fertilizer, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China; 3. Huangyan Agricultural Technology Extension Center, Taizhou 318020, Zhejiang, China; 4. Zhuji Agricultural Technology Extension Center, Zhuji 311800, Zhejiang, China)

Abstract: [**Objective**] This study, with the conduct of a microcosm incubation using paddy soils, is aimed to investigate the effects of urea combined nitrification inhibitors 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and 2-chloro-6 -trichloromethyl pyridine (CP) on pH, inorganic nitrogen, N_2O emission and ammonia oxidizers with the ultimate purpose to explore the effects of nitrification inhibitors on soil nitrification and N_2O emission.

收稿日期：2022-08-27；修回日期：2023-03-21

基金项目：浙江省重点研发计划项目 (2019C02017，2021C02035，2020C02030-06)；黄岩区农业绿色发展先行先试支持体系建设服务项目 (HY202001)

作者简介：张闻汉 (ORCID: 0009-0008-6637-081X)，从事植物营养研究。E-mail: 1272382716@qq.com。通信作者：马军伟 (ORCID: 0000-0002-1916-8159)，研究员，硕士生导师，从事土壤微生物与碳氮循环研究。E-mail: majunwei11@163.com

[**Method**] Four treatments were included in the whole process, namely no urea and nitrification inhibitor (ck), urea alone (N 200 $mg \cdot kg^{-1}$, U), urea + DMPP (1% of N, DMPP) and urea + CP (2% of N, CP). [**Result**] Addition of nitrification inhibitors significantly increased soil pH relative to ck and U with urea addition significantly enhancing soil NH_4^+-N content (P<0.05) but having no effect on NO_3^--N content when compared with ck; The NO_3^--N contents and net nitrification rates were significantly lower under DMPP and CP treatments than those under ck and U treatments (P< 0.05), indicating that nitrification inhibitors had an obvious effect of nitrification inhibition in paddy soils; Compared with ck, urea addition significantly increased soil N_2O emission (P< 0.05), while combined application of urea and nitrification inhibitors significantly reduced the cumulative N_2O emission (P<0.05); Nitrification inhibitors decreased the *amoA* gene copy number of ammonia-oxidizing bacteria (AOB), but had no effect on the abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA) when compared with U . Correlation analysis showed that soil N_2O emission was significantly correlated with soil pH, AOB abundance and NO_3^--N content (P< 0.05), indicating that soil pH, AOB abundance and NO_3^--N content were the key factors affecting soil N_2O emission. [**Conclusion**] In neutral paddy soils, AOB rather than AOA dominated soil N_2O emission and nitrification while DMPP and CP could inhibit soil nitrification and reduce N_2O emission by decreasing AOB abundance. [Ch, 4 fig. 3 tab. 34 ref.]

Key words: paddy soil; 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP); 2-chloro-6 -trichloromethyl pyridine (CP); nitrous oxide; ammonia oxidizing microorganism

氧化亚氮 (N_2O) 是三大温室气体之一，在 100 a 尺度下，其增温潜势是二氧化碳 (CO_2) 的 298 倍[1]，同时，N_2O 还会破坏大气臭氧层[2]。有研究显示：现在大气中 N_2O 浓度与工业革命前相比提高了 20%，且仍以每年 0.25% 的速率在增加[3]。农田土壤是大气 N_2O 的主要来源之一，人为排放的 N_2O 约 42% 来自农业土壤[4]。其中，稻田土壤 N_2O 排放量约占农田总排放量的 22%，是大气 N_2O 的一个重要排放源[5]。因此，减少稻田土壤中 N_2O 的排放对保护环境及缓解全球变暖具有重要意义。

硝化作用是全球氮循环的关键过程，是土壤 N_2O 产生的主要途径之一[6]。氨氧化是硝化作用的第 1 步，也是其限速步骤，主要由氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria，AOB) 和氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea，AOA) 参与完成[7]。有研究表明：AOA 在酸性、低 NH_4^+ 含量的土壤中对硝化作用起主要作用，而 AOB 在中性和碱性土壤中起主导作用[7]。施用氮肥会促进氨氧化微生物的增长，从而增加 N_2O 的排放[8]。因此，抑制氨氧化微生物的丰度和活性，可以降低土壤硝态氮的累积速率，抑制硝化作用，减少 N_2O 排放[9]。硝化抑制剂是人们为了减少氮素损失、提高氮肥利用率而开发的一类化学或天然生物制剂；它对硝化细菌具有一定的毒性，可以抑制某些硝化细菌的丰度和活性，抑制土壤硝化作用的发生强度[10]。2-氯-6-三氯甲基吡啶 (CP) 和 3,4-二甲基吡唑磷酸盐 (DMPP) 是 2 种农业生产上常用的硝化抑制剂，具有少量高效、作用时间长、对环境友好等优点[11]。杨秀霞等[12] 通过大田试验表明：氮肥配施 CP 不仅可以增加水稻 *Oryza sativa* 产量 17.6%~26.5%，还可以显著提高水稻对氮肥的吸收利用水平。在田间微区试验中，施用 CP 可以减少氮素损失 21.7%~28.1%[13]。李杰等[5] 通过室内培养实验发现：DMPP 可以有效抑制 AOB 生长，减少水稻土中 N_2O 排放。硝化抑制剂的抑制效果与土壤 pH、有机质、含水量等环境因素有着密切的关系[14]。MENÉNDEZ 等[15] 研究发现：土壤含水量和温度是影响硝化抑制剂效果的关键因子，在低温潮湿的环境中 DMPP 可以更有效地减少 N_2O 排放。PUTTANA 等[16] 研究表明：硝化抑制剂的抑制效率随着土壤 pH 的升高而逐渐降低。

目前，前人的研究多是关注硝化抑制剂在旱地土壤上的作用效果[17]，也有学者研究硝化抑制剂对稻田土壤氮转化的影响[18]。但对于 DMPP 和 CP 这 2 种硝化抑制剂在稻田土上的应用效果，尤其是对 N_2O 排放影响的相关研究较少。因此，本研究以浙江省诸暨地区稻田土为对象，使用 DMPP 和 CP 进行室内培养试验，比较不同硝化抑制剂对稻田土硝化作用的抑制效果，以及其对 N_2O 排放和氨氧化微生物的影响，以期为硝化抑制剂在稻田土上的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试稻田土采自浙江省诸暨市暨南街道 (29°43′N，120°14′E)，采集自 0~20 cm 耕层土壤，剔除杂物及残留根系，风干后过 2 mm 筛备用。土壤的基本理化性质如下：pH 7.17，有机质 27.49 $g \cdot kg^{-1}$，全氮 1.59 $g \cdot kg^{-1}$，碱解氮 306.18 $mg \cdot kg^{-1}$，有效磷 41.33 $mg \cdot kg^{-1}$，速效钾 197.35 $mg \cdot kg^{-1}$。

1.2 试验设计

共设 4 个处理，分别为：①不添加尿素和硝化抑制剂 (ck，空白对照)；②尿素 [添加量为氮 (N) 200 $mg \cdot kg^{-1}$，U]；③尿素+CP (添加量为氮量的 2%，CP)；④尿素+DMPP (添加量为氮量的 1%，DMPP)。称取 20 g 风干土置入 100 mL 玻璃瓶中，将土壤含水量调节至田间持水量的 40%，在 25 ℃ 培养箱中预培养 5 d，以激活微生物。预培养后，按要求加入相应的蒸馏水、尿素和 (或) 硝化抑制剂，同时将土壤含水量调至田间持水量的 60%，将 4 个处理组随机分布在 25 ℃ 的恒温培养箱中。每隔 1 d 随机排序以减少温度的干扰。隔 4 d 补充 1 次水分，以保持土壤含水量恒定。在培养开始后的 0、7、14、21 d 进行破坏性取样，每个处理取 3 个重复样品，用于测定土壤 pH、无机氮质量分数和氨氧化微生物丰度。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤理化性质测定　土壤 pH 采用 pH 计进行测定 (土水质量比为 1.0∶2.5)。铵态氮 (NH_4^+-N) 和硝态氮 (NO_3^--N) 测定：称取 10 g 土样，加入 50 mL 2 $mol \cdot L^{-1}$ 氯化钾溶液，然后用 AA3 型连续流动分析仪测定 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 质量分数。N_2O 采集与测定：在加入尿素的 1、2、5、7、10、20、21 d 采集气体样品，采样前，用真空泵将橡胶塞封闭玻璃瓶中的空气抽空，5 h 后用 10 mL 针筒采集瓶内气体，然后用 GS-2014 气象色谱仪进行 N_2O 分析。N_2O 排放速率（F，$ng \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$）公式：$F = \rho \times \Delta C/\Delta t \times 273.15/(273.15+T) \times V/m$。其中，$\rho$ 为标准状态下 N_2O 的密度，为 1.25 $kg \cdot m^{-3}$；$\Delta C/\Delta t$ 为玻璃瓶内 N_2O 浓度变化率 ($10^9 \cdot h^{-1}$)；V 为玻璃瓶上部有效空间体积 (m^3)；T 为环境气温 (℃)；m 为土壤的干质量 (kg)。土壤 N_2O 累积排放量 (M，$\mu g \cdot kg^{-1}$) 公式：$M = F_1 \times 24 + \sum_{i=2}^{n}(F_i + F_{i-1})/2 \times (t_i - t_{i-1}) \times 24$。其中，$F$ 为 N_2O 排放速率 ($\mu g \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$)；$t$ 为采样时间 (d)；i 为采样次数；t_i–t_{i-1} 为 2 次采样的间隔时间 (d)。

1.3.2 土壤 DNA 提取和 RT-qPCR　采用 Fast DNA SPIN 试剂盒 (MP Biomedicals) 提取土壤总 DNA，具体操作步骤按照说明书进行。将提取的土壤总 DNA 分管保存于−20 ℃ 冰箱中备用。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 在 CFX96 Optical Real-Time Detection System(Bio-Rad Laboratories) 上进行检测。AOA 和 AOB 的引物见表 1。反应体系为 20.0 μL：包括 DNA 模板 2.0 μL，Green Premix Ex Taq 10 μL，正反引物各 0.8 μL 以及每管 6.4 μL 灭菌超纯水。AOA 和 AOB 的反应条件均为：94 ℃下初始变性 5 min，94 ℃ 下变性 10 s，55 ℃ 变性15 s，72 ℃ 延伸 45 s，40 个循环。阴性对照采用灭菌超纯水作为模板。每个样品重复 3 次。根据扩增循环阈值 (CT)、已知质粒浓度和阿伏伽德罗常数计算 AOA、AOB *amoA* 基因拷贝数。

表 1　PCR 扩增的引物序列

Table 1　Primers sequences for PCR amplification

微生物	引物名称	引物序列(5′→3′)	目标片段长度/bp	参考文献
AOA	Arch-*amoA* F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635	[17]
	Arch-*amoA* R	GCGGCCATCCATCTGGTATGT		
AOB	*amoA*-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	[18]
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		

1.4 数据分析

净硝化速率 (n) 的计算公式：$n = (n_1 - n_2)/t$。其中，t 为培养天数，n_1 为土壤样品 NO_3^--N 初始质量分数，n_2 为培养第 t 天时土样 NO_3^--N 质量分数。

数据采用 Excel 2007 和 Origin 2019b 进行统计分析和作图，采用 SPSS 13.0 进行方差分析、显著性检验 (0.05 水平) 及相关性分析。

2 结果与分析

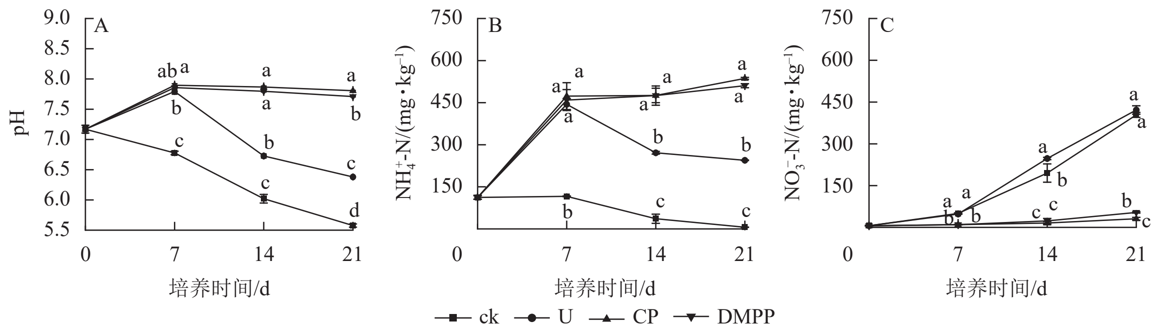
2.1 硝化抑制剂对土壤 pH 的影响

如图 1A 所示：在整个培养期间，ck 处理的 pH 都呈下降的趋势。与 ck 相比，尿素的施用显著提高

了土壤 pH (P＜0.05)。在 0~7 d，U、CP和 DMPP 处理的 pH 均呈上升趋势，并在第 7 天达到最高。7 d 后，U 处理的 pH 快速下降直至培养结束；而 DMPP 与 CP 处理的 pH 在 7 d 后保持稳定。21 d 时，DMPP 与 CP 处理的 pH 分别为 7.71 和 7.81，与 U 处理的 pH 6.38 相比，分别提高了 20.8% 和 22.4%。

2.2　硝化抑制剂对土壤无机氮的影响

由图 1B 可以看出：U 处理的土壤 NH_4^+-N 质量分数呈先上升后下降的趋势。在前 7 d，添加尿素处理的 NH_4^+-N 质量分数迅速增加，达 458.7 mg·kg^{-1}，显著高于 ck 处理的 112.2 mg·kg^{-1}(P＜0.05)，表明尿素的添加显著提高了土壤 NH_4^+-N 质量分数。而在 7 d 后，U 处理的 NH_4^+-N 质量分数快速下降，到 21 d 时降为 244.5 mg·kg^{-1}。硝化抑制剂处理的 NH_4^+-N 质量分数在 7 d 后保持在一个稳定的状态，在 14 d 后还有小幅度上升。到 21 d 时，CP 与 DMPP 处理的 NH_4^+-N 质量分数分别为 536.4 和 510.4 mg·kg^{-1}，显著高于 U 处理 (P＜0.05)，表明 DMPP 与 CP 显著抑制氨氧化作用。如图 1C 所示：各处理的 NO_3^--N 质量分数均随着培养时间的延长而逐渐上升。ck 与 U 处理的 NO_3^--N 质量分数在前 7 d 上升缓慢，在 7 d 后快速上升，直到 21 d。DMPP 和 CP 处理的 NO_3^--N 质量分数在前 14 d 内基本保持不变，在 14 d 后略有上升。DMPP 与 CP 处理的 NO_3^--N 质量分数显著低于 ck 和 U 处理 (P＜0.05)。



不同小写字母表示处理间差异显著 (P＜0.05)。

图 1　硝化抑制剂对土壤 pH、NH_4^+-N 和 NO_3^--N 质量分数的影响

Figure 1　Effects of nitrification inhibitors on pH，NH_4^+-N and NO_3^--N contents in the soil

如表 2 所示：与 ck 和 U 处理相比，硝化抑制剂处理 (DMPP与 CP) 显著降低了土壤净硝化速率 (P＜0.05)。而 U 与 ck 处理的净硝化速率之间没有显著差别。

2.3　硝化抑制剂对土壤 N_2O 排放的影响

如图 2 所示：ck 处理的 2 个排放峰分别出现在培养 5 和 7 d，在到达第 2 个排放峰后，N_2O 的排放速率开始快速下降，到 12 d 时到达较低水平并持续到培养结束。与 ck 处理相比，U 处理的排放峰出现较晚，分别出现在 7 与 12 d，且在培养 7 d 后，U 处理的 N_2O 排放速率远高于其他处理，直到培养结束时 N_2O 的排放速率才降低到和其他处理相近的水平。这表明尿素的添加推迟了土壤 N_2O 排放峰值的出现，提高了 N_2O 的排放速率，同时延长了 N_2O 排放的时间。与处理 U 相比，DMPP 与 CP 处理的 N_2O 排放速率在整个培养期间均处在较低水平，且两者之间没有显著差异。

如图 3 所示：施用尿素显著增加了土壤 N_2O 的累积排放量，是 ck 处理的 3.99 倍。但是 DMPP 与 CP 处理相较于 ck 和 U 处理，显著减少了 N_2O 排放 (P＜0.05)。

表 2　硝化抑制剂对土壤净硝化速率的影响

Table 2　Net nitrification rate of each treatment for the three incubation intervals

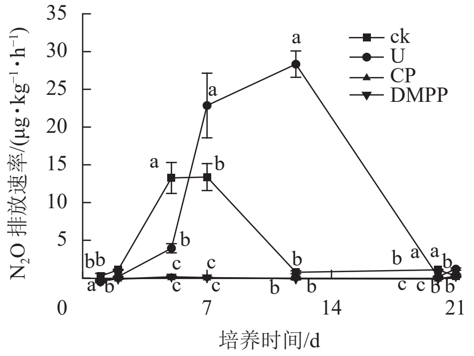
间隔时间/d	净硝化速率/(mg·kg^{-1}·d^{-1})			
	ck	U	CP	DMPP
1~7	6.30±0.24 a	5.99±0.06 a	0.56±0.09 b	0.55±0.09 b
7~14	20.71±4.91 b	28.47±0.66 a	0.82±0.73 c	1.93±1.35 c
14~21	29.83±5.56 a	24.89±1.56 a	2.18±1.24 b	4.33±1.38 b

说明：数值为平均值±标准误。同行不同小写字母表示处理间差异显著 (P＜0.05)。

2.4　硝化抑制剂对氨氧化微生物的影响

AOA *amoA* 的基因拷贝数为 2.6×10^6~7.1×10^6 个·g^{-1}，而 AOB *amoA* 的基因拷贝数为 6.2×10^6~1.5×10^9 个·g^{-1}(图 4)，表明土壤中 AOA 的丰度远低于 AOB。与 ck 处理相比，尿素的添加提高了 AOB 的丰度，而 DMPP 和 CP 的施用显著降低了 AOB 的丰度 (P＜0.05)。尿素和硝化抑制剂的使用对 AOA 的基因丰度无显著影响。培养前 14 d，尿素与 ck 处理

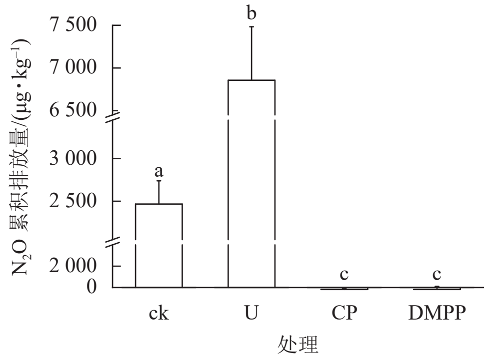
的 AOB 基因丰度都经过了先增后降的过程，在培养的后半段 (14 d 以后)，U 处理的 AOB 数量开始快速增加，到培养结束时达 5.5×10^6 个·g^{-1}，较 ck 处理 (1.6×10^6 个·g^{-1}) 提高了 249.5%。与 U 处理相比，2 种硝化抑制剂处理的 AOB 丰度都保持在极低的水平，且 2 种硝化抑制剂之间的作用效果没有显著差异。



不同小写字母表示处理间差异显著 (P<0.05)。

图 2 硝化抑制剂对土壤 N_2O 排放速率的影响

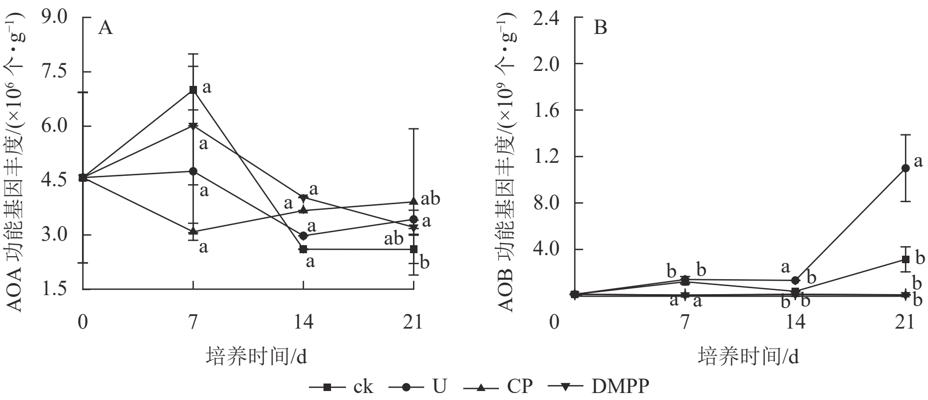
Figure 2 Effect of nitrification inhibitors on N_2O emission from the soil



不同小写字母表示处理间差异显著 (P<0.05)。

图 3 硝化抑制剂对土壤 N_2O 累积排放量的影响

Figure 3 Effect of nitrification inhibitors on cumulative N_2O emission from the soil



不同小写字母表示处理间差异显著 (P<0.05)。

图 4 硝化抑制剂对氨氧化微生物的影响

Figure 4 Effects of nitrification inhibitors on ammonia oxidizing microorganisms

2.5 N_2O 排放量与土壤因子的关系

如表 3 所示：N_2O 排放量与土壤 NH_4^+-N 质量分数，AOB 丰度呈正相关，且都达极显著水平 (P<0.01)；与土壤 pH 呈负相关，达显著水平 (P<0.05)。土壤 pH 与土壤 NH_4^+-N 质量分数呈极显著正相关 (P <0.05)；与土壤 NO_3^--N 质量分数呈极显著负相关 (P <0.01)。

表 3 N_2O 排放量与土壤因子之间的相关性

Table 3 Correlation between N_2O emissions and soil environmental factors

因子	M	NH_4^+-N	NO_3^--N	AOA	AOB	pH
M	1					
NH_4^+-N	−0.526	1				
NO_3^--N	0.827**	−0.906**	1			
AOA	−0.046	0.333	−0.248	1		
AOB	0.960**	−0.452	0.743**	0.012	1	
pH	−0.600*	0.995**	−0.941**	0.313	−0.526	1

说明：M 指 N_2O 累积排放量；NH_4^+-N 和 NO_3^--N 分别指两者的质量分数；AOA. 氨氧化古菌丰度；AOB. 氨氧化细菌丰度；*、**分别表示在 0.05 、0.01 水平上显著相关。

3 讨论

在本研究中，各处理的 AOB *amoA* 基因拷贝数为 6.2×10^6~1.5×10^9 个·g^{-1}，远高于 AOA *amoA* 基因拷贝数 (2.6×10^6~7.1×10^6 个·g^{-1})，说明 AOB 在中性稻田土中是重要的氨氧化微生物，这与前人的研究结果相似[19]，即，pH 7.0~8.5 内适宜 AOB 生长，AOB 是非酸性土壤中主要的氨氧化微生物。本研究结

果还显示：添加尿素显著增加了 AOB 丰度，而对 AOA 丰度无显著影响。到培养结束时，与 ck 处理相比，单施尿素处理中土壤 AOB 丰度增长了 678.56%，而 AOA 丰度有略微下降；且 U 处理中 AOB 丰度是 AOA 丰度的 320.6 倍。这与前人的研究结果一致，即 AOB 更偏向于中性至碱性的土壤[20]，且在施用尿素或铵肥的土壤中丰度更高[21]。

土壤硝化作用主要受到氨氧化微生物丰度和活性的制约[19]。本研究发现：硝化抑制剂的添加可以显著提高土壤中 NH_4^+-N 质量分数以及减降 NO_3^--N 质量分数，将土壤净硝化速率保持在较低水平，表明硝化抑制剂可以有效抑制土壤硝化作用。此外，本研究表明：土壤 NO_3^--N 质量分数与 AOB 丰度呈极显著正相关，而与 AOA 丰度无明显相关；说明 AOB 在土壤硝化作用方面具有更重要的作用，硝化抑制剂是通过抑制 AOB 丰度来达到抑制硝化作用的目的，这与 BENCKISER 等[22] 的研究结果一致。刘天琳等[19] 的室内培养实验表明：在中性紫色稻田土中，AOB 对土壤硝化作用的贡献均值为 55.6%，AOA 对土壤硝化作用的贡献均值为 7.5%，AOB 在硝化作用中起主导作用，这与本研究结果相符。朱云飞等[23] 研究表明：在 pH 为 7.02 的中性稻田土中添加硝化抑制剂，可以有效抑制土壤硝化作用。然而，硝化抑制剂在酸性土壤中的应用效果并不显著。杨剑波等[24] 的室内培养显示：DMPP 可以降低中性稻田土 70.18% 的土壤表观硝化率，而在酸性红壤中只降低了 14.55%。SHI 等[25] 也发现硝化抑制剂对酸性草地土壤的硝化作用没有显著影响。硝化抑制剂在酸性土壤中的作用效果不佳可能与酸性土壤硝化强度较弱、土壤质地和有机质含量不同等因素有关[24]。

氨氧化微生物在土壤养分和氧化亚氮排放的生化循环中扮演着至关重要的角色[26−27]。在本研究中，与 U 处理相比，添加 DMPP 与 CP 显著降低了 AOB 丰度，而对 AOA 丰度无显著影响。同时，AOB 丰度与 N_2O 排放量呈极显著的正相关关系。这些结果进一步证实，硝化抑制剂是通过降低 AOB 丰度来抑制硝化作用和减少 N_2O 排放。这与 FAN 等[28] 的研究结果一致。AOA 和 AOB 对于硝化抑制剂会有不同反应，这可能与 AOA 的混合营养生长以及 2 种微生物不同的酶系统有关[27]。SHEN 等[29] 研究发现：由于细胞代谢的差异，AOB 对硝化抑制剂会更加的敏感。硝化抑制剂在减少 N_2O 排放方面的有效性在不同的施用环境中差异很大，这主要归因于 pH、有机质、土壤质地等非生物因素以及氨氧化微生物等生物因素 2 个方面[30]。FAN 等[28] 研究表明：土壤理化性质是决定硝化抑制剂在 N_2O 减排方面的主要因素，其中土壤 pH 又发挥着至关重要的作用。在本研究也得出了一致的结果，本研究培养对象是 pH 为 7.17 的中性稻田土，结果表明硝化抑制剂在中性稻田土中可以有效减少土壤 N_2O 的排放。DMPP 在碱性石灰性土壤中的研究表明：DMPP 可以减少石灰性土壤中 56%~77% 的 N_2O 排放[31]。孙祥鑫等[32] 研究发现：硝化抑制剂可以有效减少中性稻田土中 74.9% 的 N_2O 累计排放量。然而 FRIEDL 等[33] 研究显示：硝化抑制剂 DMPP 对澳大利亚牧场中酸性土壤 N_2O 的累积排放量没有明显影响，这可能是由于较低的 pH 会干扰蛋白质的组合或者直接影响酶的活性，在转录后影响 N_2O 还原酶，减少 N_2O 的排放，从而限制了硝化抑制剂的效果[34]。

4　结论

施用尿素显著增加了中性稻田土中 AOB 的丰度，并促进了土壤 N_2O 的排放。2 种硝化抑制剂 (DMPP 和 CP) 的添加可以显著降低中性水稻土的净硝化速率，有效抑制土壤硝化作用，并通过降低土壤 AOB 丰度来减少 N_2O 的排放。

5　参考文献

[1] RAVISHANKARA A R, DANIEL J S, PORTMANN R W. Nitrous oxide (N_2O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century [J]. *Science*, 2009, **326**(5949): 123 − 125.

[2] SMITH K A. Changing views of nitrous oxide emissions from agricultural soil: key controlling processes and assessment at different spatial scales [J]. *European Journal of Soil Science*, 2017, **68**(2): 137 − 155.

[3] TAO Rui, ZHAO Xiran, WU Xiaoliang, *et al*. Nitrapyrin coupled with organic amendment mitigates N_2O emissions by inhibiting different ammonia oxidizers in alkaline and acidic soils [J/OL]. *Applied Soil Ecology*, 2021, **166**: 104062 [2022-08-20]. doi : 10.1016/j.apsoil.2021.104062.

[4] 曹文超, 宋贺, 王娅静, 等. 农田土壤N_2O排放的关键过程及影响因素[J]. 植物营养与肥料学报, 2019, **25**(10): 1781 − 1798.

CAO Wenchao, SONG He, WANG Yajing, *et al*. Key production processes and influencing factors of nitrous oxide emissions from agricultural soils [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizes*, 2019, **25**(10): 1781 − 1798.

[5] 李杰, 石元亮, 王玲莉, 等. 硝化抑制剂对稻田土壤N_2O排放和硝化、反硝化菌数量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2019, **25**(12): 2095 − 2101.

LI Jie, SHI Yuanliang, WANG Lingli, *et al*. Comparison of nitrification inhibitors on N_2O emission and abundances of nitrifier and denitrifier in paddy soils [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2019, **25**(12): 2095 − 2101.

[6] 朱永官, 王晓辉, 杨小茹, 等. 农田土壤N_2O产生的关键微生物过程及减排措施[J]. 环境科学, 2014, **35**(2): 792 − 800.

ZHU Yongguan, WANG Xiaohui, YANG Xiaoru, *et al*. Key microbial processes in nitrous oxide emissions of agricultural soil and mitigation strategies [J]. *Environmental Science*, 2014, **35**(2): 792 − 800.

[7] 马芬, 杨荣全, 郭李萍. 控制氮肥施用引起的活性氮气体排放: 脲酶/硝化抑制剂研究进展与展望[J]. 农业环境科学学报, 2020, **39**(4): 908 − 922.

MA Fen, YANG Rongquan, GUO Liping. Decrease the emission of active nitrogen gases in nitrogen fertilizer application: research progresses and perspectives of urease/nitrification inhibitors [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, **39**(4): 908 − 922.

[8] 宋亚娜, 林艳, 陈子强. 氮肥水平对稻田细菌群落及N_2O排放的影响[J]. 中国生态农业学报, 2017, **25**(9): 1266 − 1275.

SONG Ya' na, LIN Yan, CHEN Ziqiang. Effect of nitrogen fertilizer level on bacterial community and N_2O emission in paddy soil [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2017, **25**(9): 1266 − 1275.

[9] AKIYAMA H, YAN Xiaoyuan, YAGI K. Evaluation of effectiveness of enhanced-efficiency fertilizers as mitigation options for N_2O and NO emissions from agricultural soils: meta-analysis [J]. *Global Change Biology*, 2010, **16**(6): 1837 − 1846.

[10] 俞巧钢, 殷建祯, 马军伟, 等. 硝化抑制剂DMPP应用研究进展及其影响因素[J]. 农业环境科学学报, 2014, **33**(6): 1057 − 1066.

YU Qiaogang, YIN Jianzhen, MA Junwei, *et al*. Effects of nitrification inhibitor DMPP application in agricultural ecosystems and their influencing factors: a review [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, **33**(6): 1057 − 1066.

[11] YU Qiangguang, CHEN Yingxu, YE Xuezhu, *et al*. Evaluation of nitrification inhibitor 3, 4-dimethyl pyrazole phosphate on nitrogen leaching in undisturbed soil columns [J]. *Chemosphere*, 2007, **67**(5): 872 − 878.

[12] 杨秀霞, 商庆银, 陈柳燕, 等. 新型氮肥增效剂在水稻上的节肥增产效果研究[J]. 江西农业大学学报, 2016, **38**(4): 616 − 622.

YANG Xiuxia, SHANG Qingyin, CHEN Liuyan, *et al*. Effects of the new synergist of entrench on grain yield and fertilizer-saving for rice [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2016, **38**(4): 616 − 622.

[13] 孙海军, 闵炬, 施卫明, 等. 硝化抑制剂施用对水稻产量与氨挥发的影响[J]. 土壤, 2015, **47**(6): 1027 − 1033.

SUN Haijun, MIN Ju, SHI Weiming, *et al*. Effects of nitrification inhibitor on rice production and ammonia volatilization in paddy rice field [J]. *Soils*, 2015, **47**(6): 1027 − 1033.

[14] GU Yan, WU Lianghuan, HU Zhaoping. Inhibitory effect of soil pH value and moisture on soil nitrification by nitrapyrin application [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, **34**(8): 132 − 138.

[15] MENÉNDEZ S, BARRENA I, SETIEN I, *et al*. Efficiency of nitrification inhibitor DMPP to reduce nitrous oxide emissions under different temperature and moisture conditions [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, **53**: 82 − 89.

[16] PUTTANNA K C I O, GOWDA N M N, RAO E V S P. Effect of concentration, temperature, moisture, liming and organic matter on the efficacy of the nitrification inhibitors benzotriazole, o-nitrophenol, m-nitroaniline and dicyandiamide [J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1999, **54**(3): 251 − 257.

[17] XU Yonggang, YU Wantai, MA Qiang, *et al*. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidisers of an acidic luvisols soil to different nitrogen fertilization rates after 9 years [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, **48**(7): 827 − 837.

[18] 刘钰莹, 张妍, 汪哲远, 等. 硝化抑制剂与生物炭配施对水稻土氮素转化及氮肥利用率的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2021, **47**(2): 223 − 232.

LIU Yuying, ZHANG Yan, WANG Zheyuan, *et al*. Effects of combined application of nitrification inhibitors and biochars on nitrogen transformation and nitrogen use efficiency in paddy soil [J]. *Journal of Zhejiang University* (*Agriculture and Life Sciences*), 2021, **47**(2): 223 − 232.

[19] 刘天琳, 任佳琪, 王天佑, 等. 中性紫色水稻土硝化作用中细菌和古菌的相对贡献[J]. 土壤通报, 2018, **49**(5): 1091 − 1096.

LIU Tianlin, REN Jiaqi, WANG Tianyou, *et al*. Relative contribution of bacteria and archaea to soil nitrification in neutral purple paddy soil [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2018, **49**(5): 1091 − 1096.

[20] DI H J, CAMERON K C, SHEN J P, *et al*. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils [J]. *Nature Geoscience*, 2009, **2**(9): 621 − 624.

[21] SIMONIN M, LE ROUX X, POLY F, *et al*. Coupling between and among ammonia oxidizers and nitrite oxidizers in grassland mesocosms submitted to elevated CO_2 and nitrogen supply [J]. *Microbial Ecology*, 2015, **70**(3): 809 − 818.

[22] BENCKISER G, CHRIST E, HERBERT T, *et al*. The nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole-phosphat (DMPP)-quantification and effects on soil metabolism [J]. *Plant and Soil*, 2013, **371**(1/2): 257 − 266.

[23] 朱云飞, 张琪, 黄一伦, 等. 生物炭与硝化抑制剂联合施用对热带菜地土壤硝化过程及N_2O排放的影响[J]. 热带作物学报, 2021, **42**(10): 3042 − 3048.

ZHU Yunfei, ZHANG Qi, HUANG Yilun, *et al*. Effects of co-application of biochar and nitrification inhibitor on soil nitrification and N_2O emissions in tropical vegetable soil [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, **42**(10): 3042 − 3048.

[24] 杨剑波, 李学超, 徐晶晶, 等. 两种硝化抑制剂在不同土壤中的效果比较[J]. 土壤, 2021, **42**(10): 3042 − 3048.

YANG Jianbo, LI Xuechao, XU Jingjing, *et al*. Effects of nitrification inhibitors on nitrogen transformation different soils [J]. *Soils*, 2021, **42**(10): 3042 − 3048.

[25] SHI Xuzhen, HU Hangwei, HE Jizheng, *et al*. Effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on nitrification and the abundance and community composition of soil ammonia oxidizers in three land uses [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, **52**(7): 927 − 939.

[26] ZHENG Jufeng, CHEN Junhui, PAN Gengxing, *et al*. Biochar decreased microbial metabolic quotient and shifted community composition four years after a single incorporation in a slightly acid rice paddy from southwest China [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, **571**: 206 − 217.

[27] LI Jie, WANG Shuai, LUO Jiafa, *et al*. Effects of biochar and 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on soil ammonia-oxidizing bacteria and nosZ-N_2O reducers in the mitigation of N_2O emissions from paddy soils [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2021, **21**(2): 1089 − 1098.

[28] FAN Xiaoping, YIN Chang, CHEN Hao, *et al*. The efficacy of 3,4-dimethylpyrazole phosphate on N_2O emissions is linked to niche differentiation of ammonia oxidizing archaea and bacteria across four arable soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2019, **130**: 82 − 93.

[29] SHEN Tianlin, STIEGLMEIER M, DAI Jiulan, *et al*. Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon Ca *Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira multiformis* to nitrification inhibitors [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, **344**(2): 121 − 129.

[30] MCGEOUGH K L, WATSON C J, MÜLLER C, *et al*. Evidence that the efficacy of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) is affected by soil properties in UK soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, **94**: 222 − 232.

[31] WU Di, ZHAO Zichao, HAN Xiao, *et al*. Potential dual effect of nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate on nitrifier denitrification in the mitigation of peak N_2O emission events in North China Plain cropping systems [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, **121**: 147 − 153.

[32] 孙祥鑫, 李东坡, 武志杰, 等. 持续施用缓/控释尿素条件下水田土壤NH_3挥发与N_2O排放特征[J]. 应用生态学报, 2016, **27**(6): 1901 − 1909.

SUN Xiangxin, LI Dongpo, WU Zhijie, *et al*. Characteristics of ammonia volatilization and nitrous oxide emission from a paddy soil under continuous application of different slow/controlled release urea [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, **27**(6): 1901 − 1909.

[33] FRIEDL J, SCHEER C, ROWLINGS D W, *et al*. The nitrification inhibitor DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate) reduces N_2 emissions from intensively managed pastures in subtropical Australia [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2017, **108**: 55 − 64.

[34] LIU Binbin, MØRKVED P T, FROSTEGARD A, *et al*. Denitricationgenepools, transcriptionand kineticsof NO, N_2O and N_2 productionas affected by soil pH [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, **72**(3): 407 − 417.