

DOI: 10.11766/trxb201603120052

硝化抑制剂对毛竹林土壤 N_2O 排放和 氨氧化微生物的影响*

毛新伟 程敏 徐秋芳[†] 陈俊辉 赵天心 余晓 李永春

(浙江农林大学环境与资源学院, 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江临安 311300)

摘要 为了探索硝化抑制剂在毛竹生产中的施用技术, 通过培养试验研究 3, 4-二甲基吡唑磷酸盐 (DMPP) 和双氰胺 (DCD) 两种硝化抑制剂对毛竹林施用尿素后土壤 N_2O 排放、氮素转化和相关氨氧化细菌 (AOB)、氨氧化古菌 (AOA) 群落结构和丰度的影响。试验设 (1) 对照 (CK)、(2) 单施尿素 (Urea)、(3) 尿素+1%DMPP (DMPP 占总 N 的 1%, 下同); (4) 尿素+1.5%DMPP; (5) 尿素+10%DCD; (6) 尿素+15%DCD 等 6 个处理, 测定 N_2O 的排放动态以及气体排放转折点时的土壤特征指标。结果表明: 与单施尿素相比, 160 d 的时间内两种 DMPP 用量处理的土壤 N_2O 累积排放减排幅度均为 54%, 而 10%DCD 和 15%DCD 处理的土壤分别减少 28% 和 41%。DMPP 和 DCD 处理 50 d 和 90 d 时土壤的 NH_4^+-N 含量均显著高于 ($p < 0.05$) 单施尿素处理, 而 NO_3^-N 含量和表观硝化率则恰好相反, 但两种抑制剂间无差异。DMPP 处理的 AOB 群落结构的变化从 10 d 开始显现, 至 50 d 和 90 d 时仍保持明显的抑制状态, 而 DCD 处理则至 90 d 时抑制作用基本消失。单施尿素 AOB 功能基因 (*amoA*) 的丰度均显著高于硝化抑制剂处理 (90 d 时尿素+10%DCD 处理除外); 在整个培养期内, 尿素和对照土壤的 AOA 群落结构相似, 硝化抑制剂反而增加了 AOA 功能基因的丰度, 表明硝化抑制剂对 AOA 丰度无明显抑制作用。即两种硝化抑制剂主要通过抑制 AOB 起作用; 调节土壤 pH 至中性范围, 并在 1%DMPP 施用条件下, 硝化抑制剂的抑制效果最显著。

关键词 N_2O ; 3, 4-甲基吡唑磷酸盐; 双氰胺; 毛竹林; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌

中图分类号 S714.3 **文献标识码** A

氮肥的大量施用在促进现代农业快速发展的同时也给人类赖以生存的环境带来了巨大的风险。其中, 由硝化作用而导致的氮肥利用率低是造成水体污染和气候变暖等问题的重要根源之一。氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 或氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) 在氨单加氧酶和羟胺氧化还原酶的催化下, 将 NH_3 氧

化成 NO_2^- , 是硝化作用的关键步骤, 也是限速步骤^[1], 该过程的中间产物 NH_2OH 会发生化学分解而释放出 N_2O 。研究表明, 在 35%~60% 孔隙含水率 (Water filled pore space, WFPS) 时硝化作用是土壤 N_2O 排放的主要来源^[2]。因此, 施用硝化抑制剂被认为是提高氮肥利用率、减轻氮肥污染的有效措施^[3]。

* 国家自然科学基金项目 (41271274)、浙江省新苗人才计划项目 (2014R412050) 和浙江农林大学农林碳汇与生态环境修复研究中心预研基金项目 (2013CB03) 共同资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41271274), Xin Miao Talents Program of Zhejiang Province of China (No. 2014R412050) and Research Program supported by Research Center for Agriculture and Forestry Carbon Sequestration and Environmental Remediation of Zhejiang A&F University of China (No. 2013CB03)

[†] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xuqiuqiang@zafu.edu.cn

作者简介: 毛新伟 (1990—), 男, 浙江衢州人, 硕士研究生, 主要从事土壤生物与生物化学研究。E-mail: 404052428@qq.com

收稿日期: 2016-03-12; 收到修改稿日期: 2016-04-08; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2016-05-06

硝化抑制剂通过选择性抑制土壤硝化微生物的活动, 有效减缓土壤中铵态氮向硝态氮的转化, 在减少硝酸盐淋溶损失和氮氧化物排放方面具有显著作用^[2-4]。双氰胺 (Dicyandiamide, DCD) 和3, 4-甲基吡唑磷酸盐 (3, 4-dimethylpyrazole phosphate, DMPP) 是农业生产中常用的两种硝化抑制剂。DCD 是氰胺类硝化抑制剂的典型代表, 具有较好的硝化抑制作用, 在国内外农业生产中得到了广泛应用。Di和Cameron^[3-4]通过多年系统研究表明, 向添加高浓度氮肥的新西兰草地土壤中喷施水溶态的 DCD 可减少 42%~83%的硝酸盐淋失, 而且可降低40%~82%的 N_2O 总排放量。此外, DCD 还能减少小麦、水稻和玉米等作物生产过程中土壤硝酸盐的淋溶损失和 N_2O 的排放^[5]。研究表明, DCD 在农田合理施用仅对参与氨氧化过程的微生物具有明显抑制作用, 对其他微生物的活性均无显著影响^[6-7]。DMPP是由德国政府批准巴斯夫公司生产的新型硝化抑制剂, DMPP价格较 DCD 高, 但其抑制效率要远高于DCD, 且一次施入的抑制效果可持续4~10周^[8-9]。研究发现, 添加 1%DMPP能有效抑制土壤氨氧化反应的发生, 降低硝态氮垂直迁移的淋溶损失, 增加氮素被植物体吸收利用的几率^[10]。Weiske等^[11]通过 3 年的田间试验发现DMPP可使农田土壤 N_2O 年均排放量减少49%。Kleineidam等^[12]对农田土壤添加DMPP发现, DMPP在两周的时间内显著抑制了氨氧化细菌, 而氨氧化古菌未受到影响, 表明DMPP 施用对土壤微生物的活性、种群结构和数量产生影响。然而, 不同硝化抑制剂本身的性质、生物活性和作用机理差异较大, 抑制效率高、有效期长短及施用效果还受土壤类型、有机质含量、温度、水分和土壤管理措施等诸多因素的显著影响^[13]。因此, 在野外施用之前, 有必要通过试验确定特定土壤上应选用何种类型和用量的硝化抑制剂, 优化方案, 节约成本。

近年来我国竹林产业迅速发展, 农户通过施肥和翻耕松土、除草等经营方式来增加毛竹产量, 提高生产效益。农户为毛竹林增施大量氮肥时, 往往造成氮肥利用率下降、氮素大量流失等, 进而引起水体富营养化问题^[14], 同时其促进的氨挥发和土壤微生物的硝化作用引起了诸如 N_2O 等温室气体排放的大量增加, 造成资源浪费和经济效益下降。因此, 对于氮肥施用日益增多的经营性毛竹

林, N_2O 排放和氮素转化问题不容忽视。有必要通过施用硝化抑制剂和合理规划经营措施来提高氮素利用率。目前国内外针对DCD和DMPP的应用和研究较多集中在农田和草原的试验, 培养试验也大多集中于土壤性质差异培养, 而且培养试验一般时间较短。这些抑制剂施用对毛竹林土壤硝化作用抑制效果、有效期和对氨氧化微生物群落的影响几乎未见报道。因此, 本研究采用室内培养方法, 比较不同硝化抑制剂和用量对粗放经营型毛竹林土壤 N_2O 排放和硝化作用抑制效果, 采用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 和荧光定量PCR (realtime fluorescence quantitative PCR, RT-PCR) 手段分析了AOA和AOB群落结构和丰度的动态变化, 目的在于考察两种硝化抑制剂在毛竹林土壤中的适用性, 为竹林专用氮肥开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

采自浙江省临安市青山镇 (30°14' N, 119°42' E) 粗放经营毛竹林。该地属于亚热带季风气候区, 多年平均降水量为1 628 mm, 气温16.4℃, 日照时数1 847 h, 无霜期237 d。毛竹林栽培区属低山丘陵地貌, 土壤为砂页岩发育而来的湿润富铁土 (红壤)。研究区内毛竹林为一百多年前阔叶林改造而成, 毛竹林主要采用冬季劈除林下杂灌、但不翻耕施肥的粗放经营措施为主。于2014年采集粗放经营毛竹林地土壤进行调研, 随机选取4个 10 m × 10 m 标准样地, 每个样地选取5个采样点, 采集0~20 cm土壤充分混匀, 剔除杂物和残留根系并过2 mm钢筛, 形成有代表性的混合土壤样品备用。供试土壤质地较黏, 砂粒、粉粒和黏粒含量分别为40.2%、34.0%和25.8%, 有机质、碱解氮、有效磷、速效钾、硝态氮、铵态氮和pH分别为43.70 g kg⁻¹、84.65 mg kg⁻¹、2.96 mg kg⁻¹、47.0 mg kg⁻¹、20.76 mg kg⁻¹、41.34 mg kg⁻¹和5.26。

1.2 试验处理及培养过程

本试验设6个处理, 每处理3个重复: 处理 (1) 对照; (2) 单施用尿素 (U); (3) 尿素 + 3, 4-二甲基吡唑磷酸盐 (1%, 占尿素纯氮量的比例) (1%DMPP); (4) 尿素 + 3, 4-二甲基吡唑磷酸盐 (1.5%) (1.5%DMPP); (5) 尿素

+双氰胺 (10%) (10%DCD); (6) 尿素+双氰胺 (15%) (15%DCD)。每千克干土尿素用量为 0.64 g, 两种硝化抑制剂的施用量根据查阅文献推荐量选择, DMPP和DCD的用量分别占尿素纯氮量的 1%~2%和10%~20%^[15], 如DCD10%处理添加DCD29.89 mg kg⁻¹干土, 具体用量按上述方案添加。试验前将尿素与硝化抑制剂混匀, 然后按照处理添加到150 g 鲜土 (含水量28.0%) 混匀, 置于250 ml玻璃瓶中, 容器以湿润纱布棉花覆盖以防止水分损失, 定时称重控制土壤含水量。容器置于25℃培养箱内, 每隔2 d对样品进行随机排列以减少温度干扰。

1.3 气体采集与分析

采气前用橡胶塞封闭玻璃瓶, 24 h后用采气针筒混匀瓶内气体, 抽取30 ml气体到密封气袋。采气时间为第5、10、15、20、30、40、50、70、90、110、130、160天。每次采完气体后移走橡胶塞, 让瓶内空气与瓶外混匀。用GC-2014气相色谱仪 (岛津, 日本) 进行N₂O分析。N₂O排放通量即单位时间内单位土壤N₂O的排放量, 计算公式:

$$F = \Delta m / (W \times \Delta t) = \rho \times V \times \Delta c / (W \times \Delta t) \times T_0 / T \quad (1)$$

式中, F ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) 为N₂O排放通量, V 和 W 分别为瓶内有效空间的体积和土样重量, ρ 为标准状况下N₂O气体的密度, Δm 、 Δc 分别为 Δt 时间内玻璃容器内气体质量和混合比密度浓度的变化量, T_0/T 为玻璃容器内的温度比 (绝对温度 K)。

1.4 土壤采集与分析

在N₂O排放转折点 (培养第10 d、50 d、90 d) 破坏性采集土壤样品两份, 一份自然风干用于土壤基本理化性质分析, 一份鲜土放至-70℃冰箱, 冷冻干燥后, 用于提取土壤细菌总DNA。

土壤理化性质分析: pH测定采用1:2.5土水质量比混匀, 室温下200 r min⁻¹振荡20 min, 静置1 h后用pH计读取。另取鲜土用2 mol L⁻¹KCl溶液浸提, 采用紫外分光光度法和靛酚蓝比色法分别测定土壤硝态氮和铵态氮; 表观硝化率=硝态氮含量/(硝态氮含量+铵态氮含量), 表观硝化率可以粗略地表征土壤硝化作用强弱和效率。

土壤总DNA的提取: 采用PowerSoil[®] DNA Isolation Kit试剂盒提取土壤总DNA。称取0.50 g冷冻干燥土壤样品, 按试剂盒说明书进行提取, 经1%质量体积比 (m/v) 的琼脂糖凝胶电泳检测DNA

片段大小, 并用微量分光光度计 (NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, 美国) 检测其浓度和纯度。提取后的DNA样品保存于-20℃。

氨氧化细菌和古菌PCR-DGGE分析: 采用PCR的方法扩增目的片段, 氨氧化细菌和氨氧化古菌功能基因扩增引物分别为: *amoA*-1F-GC/*amoA*-2R和Arch-*amoA*R-GC/Arch-*amoA*F^[16], 反应体系和参数等均参照郭帅等^[17]研究。反应设置阴性对照组, 取4 μl PCR产物经1.2% (m/v) 琼脂糖凝胶电泳检测产物及其纯度。

使用DCode[™] Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, 美国) 进行DGGE分析, 取AOA *amoA*、AOB *amoA*的PCR产物在6%的聚丙烯酰胺和变性梯度分别为22.5%~42.5%和40%~65%凝胶上进行电泳 (100%变性胶含有7 mol L⁻¹尿素和40% (v/v) 去离子甲酰胺)。在60℃、80 V条件下电泳13.5 h后, 核酸凝胶染料Gel Red (1:10 000) 染色30 min, 用Gel Doc[™] EQ凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国) 拍照保存, 并使用Quantity One 4.5.1软件 (Bio-Rad, 美国) 进行图像分析。

氨氧化细菌和古菌RT-PCR分析: 用CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad, 美国) 仪器对土壤硝化微生物AOB和AOA功能基因进行荧光定量PCR扩增, 每个样品3次重复, 引物分别为*amoA*-1F/*amoA*-2R和Arch-*amoA*R/Arch-*amoA*F^[18], 反应体系和参数等均参照郭帅等^[17]研究。标准曲线制作: 将测序获得的已知种属的阳性克隆子扩增培养后提取质粒DNA, 经Nanodrop[®] ND-1000测定质粒浓度, 最后计算AOA *amoA*拷贝数为 7.39×10^{10} copies μl^{-1} , AOB *amoA*拷贝数为 1.91×10^{10} copies μl^{-1} , 以10倍梯度对重组质粒进行梯度稀释 (10^{-3} ~ 10^{-8}), 每个梯度3次重复, 所得标准曲线扩增效率 (E) 均在90%~120%内, 决定系数 (R^2) 均大于0.99。

1.5 数据处理

采用Microsoft Excel 2010软件对数据进行处理, SPSS 18.0进行显著性检验、方差分析 (ANOVA) 和多重比较 (LSD)。DGGE图谱经Quantity One软件数字化, 并采用香农多样性指数 (H)、丰富度指数 (D) 以及均匀度指数 (E) 对土壤AOA *amoA*和AOB *amoA*多样性进行分析, 其计算公式分别为:

$$H = -\sum (n_i/N) \ln (n_i/N) \quad (2)$$

$$D = (S-1) / \ln N \quad (3)$$

$$E = H / \ln S \quad (4)$$

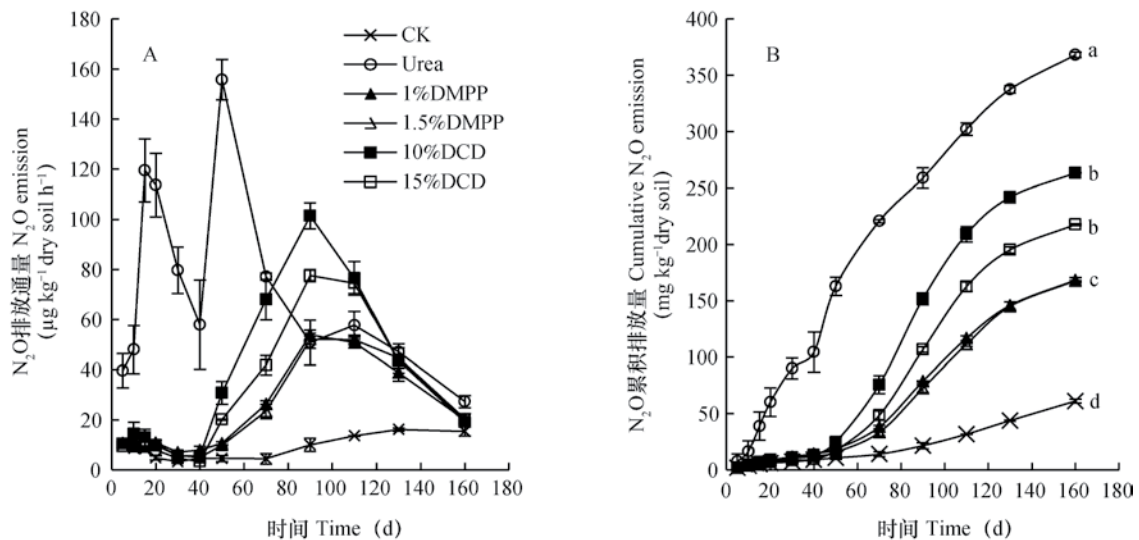
式(2)~式(4)中, n_i 为每条电泳条带光密度峰值, N 为同一泳道中所有条带光密度峰值总和, S 为每一泳道总的条带数, 电泳条带光密度峰值通过Quantity One 4.5.1软件获取。

2 结果

2.1 硝化抑制剂对 N_2O 排放的影响

从图1A中可以看出, 单施尿素处理较对照 N_2O 排放通量有显著提高, 并且在25 d和50 d出现

排放高峰; 与单施尿素相比, 添加两种硝化抑制剂处理在前40 d均对 N_2O 排放有明显抑制作用, 之后两种抑制剂均逐渐减弱, 在90 d出现排放高峰, 但DCD处理高于DMPP处理。图1B为 N_2O 的累积排放量动态图, 硝化抑制剂显著减少土壤累积 N_2O 排放, 160 d培养结束时, 对照处理土壤排放总量为 61.1 mg kg^{-1} (即换算成每千克干土累计 N_2O 排放总量), 施尿素处理的累积 N_2O 排放为 368.1 mg kg^{-1} , 约为对照组5倍, 添加1% DMPP和1.5% DMPP处理的 N_2O 累积排放量分别较尿素组减少54.28%和54.40%, 而添加10% DCD和15% DCD处理分别减排28.47%和40.87%, 与尿素处理组比较均呈显著差异 ($p < 0.05$)。



注: CK表示对照(不施肥), Urea表示单施尿素。1%DMPP(3, 4-甲基吡唑磷酸盐)、1.5%DMPP、10%DCD(双氰胺)和15%DCD分别代表施加尿素并添加1%DMPP(DMPP占总N的1%,下同)、1.5%DMPP、10%DCD和15%DCD。不同字母表示培养160 d时不同处理之间累积排放量在5%水平上差异显著, 即 $p < 0.05$ 。下同 Note: CK stands for control (no fertilizer), Urea for application of Urea only. 1%DMPP (3, 4-dimethylpyrazole phosphate), 1.5%DMPP, 10%DCD (dicyandiamide) and 15%DCD stands for application of Urea in combination with 1% DMPP (1% of urea in quantity), 1.5% DMPP (1.5% of urea in quantity), 10% DCD (10% of urea in quantity), and 15% DCD (15% of urea in quantity), respectively. Different letters means significant differences in N_2O emission between different treatments on D160 of incubation ($p < 0.05$). The same below

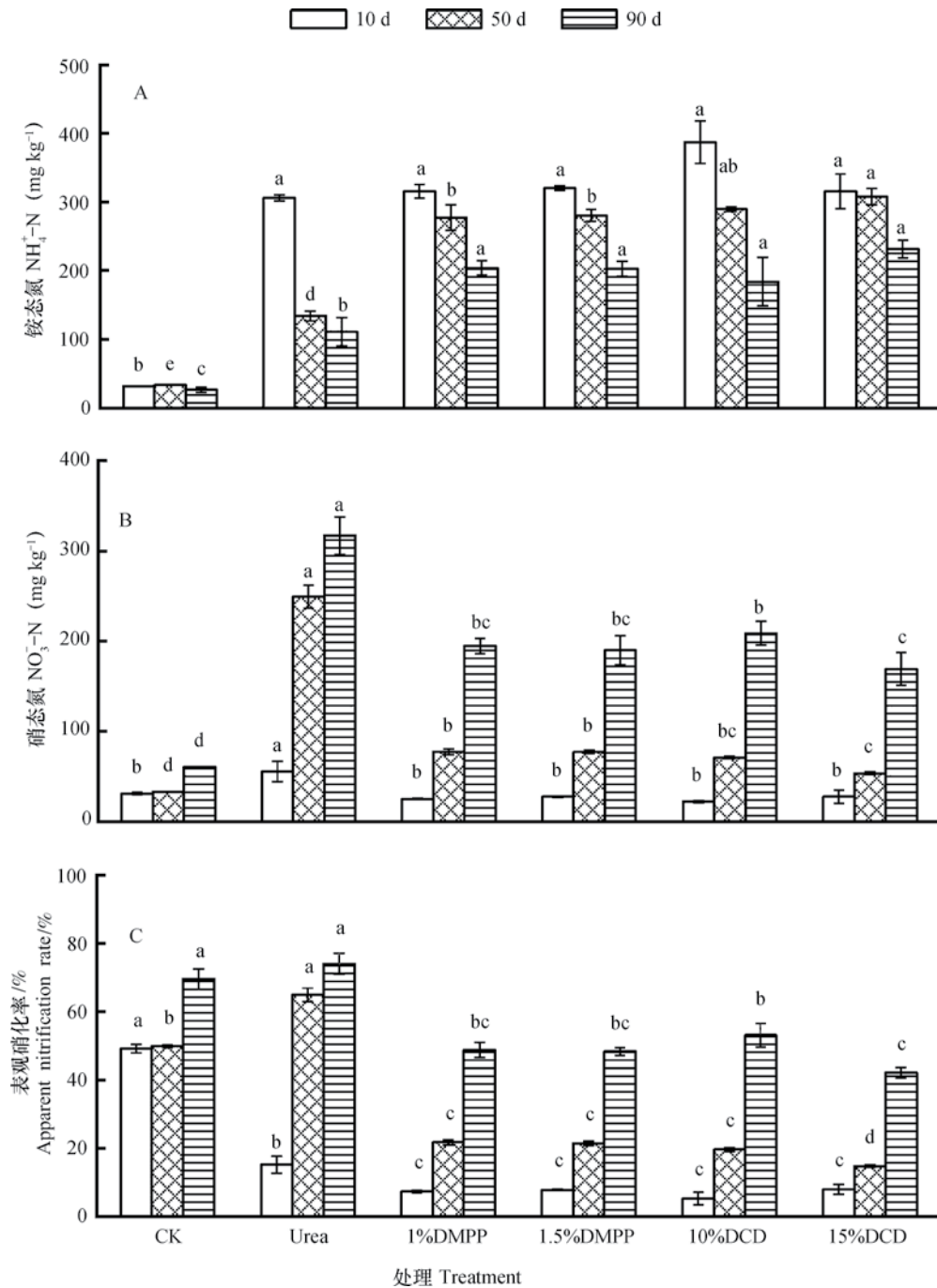
图1 硝化抑制剂对土壤 N_2O 排放通量(A)和 N_2O 累积排放量(B)的影响

Fig. 1 Effects of nitrification inhibitors on N_2O emission (A) and cumulative N_2O emission (B) from the soil

2.2 硝化抑制剂对土壤 NH_4^+-N 和 $NO_3^- -N$ 的影响

整个培养过程中, 施用尿素的5个处理土壤 NH_4^+ 含量均显著高于对照(图2A), 但随着培养的持续其含量不断下降, 其中单施尿素处理在10~50 d期间下降幅度最大, 而50~90 d期间4个添加硝化抑制剂处理均较尿素显著下降 ($p < 0.05$); 培养90 d时尿素处理 NH_4^+ 含量低于添加硝化抑制剂的4个

处理, 说明尿素处理硝化作用最强, 两种抑制剂处理显著抑制了 NH_4^+ 的降低。硝态氮的变化规律恰好与铵态氮相反, 培养90 d时尿素处理 NO_3^- 含量显著高于添加硝化抑制剂的4个处理 ($p < 0.05$)。不同浓度DCD和DMPP间无显著差异。在50 d前添加硝化抑制剂使土壤的表观硝化率显著低于尿素处理, 但随着培养时间的延续, 表观硝化率逐渐升高, 至



注：图例中 10 d、50 d 和 90 d 代表不同试验时间，不同字母表示同一培养时间不同处理之间在 5% 水平上差异显著，即 $p < 0.05$ 。下同
 Note: 10 d, 50 d and 90 d in legend stands for D10, D50 and D90 of incubation. Different letters means significant differences between different treatments at the same time ($p < 0.05$). The same below

图 2 硝化抑制剂对土壤铵态氮 (A)、硝态氮 (B) 和表观硝化率 (C) 的影响

Fig. 2 Effects of nitrification inhibitors on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (A), $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (B) and apparent nitrification rate (C) in the soil

90 d 时与尿素处理之间的差距不断缩小，说明培养后期硝化抑制剂作用明显减弱。

2.3 硝化抑制剂对土壤氨氧化细菌和古菌群落结构的影响

根据 PCR-DGGE 分析以及 DGGE 图谱中每条条

带的位置和亮度，对不同处理下土壤 AOA *amoA*, AOB *amoA* 多样性指数进行分析发现，培养 10 d 时土壤 AOA 和 AOB 的条带类型和亮度在不同处理间差别不明显 (图 3A 和图 3B)，表明尿素和硝化抑制剂添加对 AOA 和 AOB 群落结构前期影响不显著，

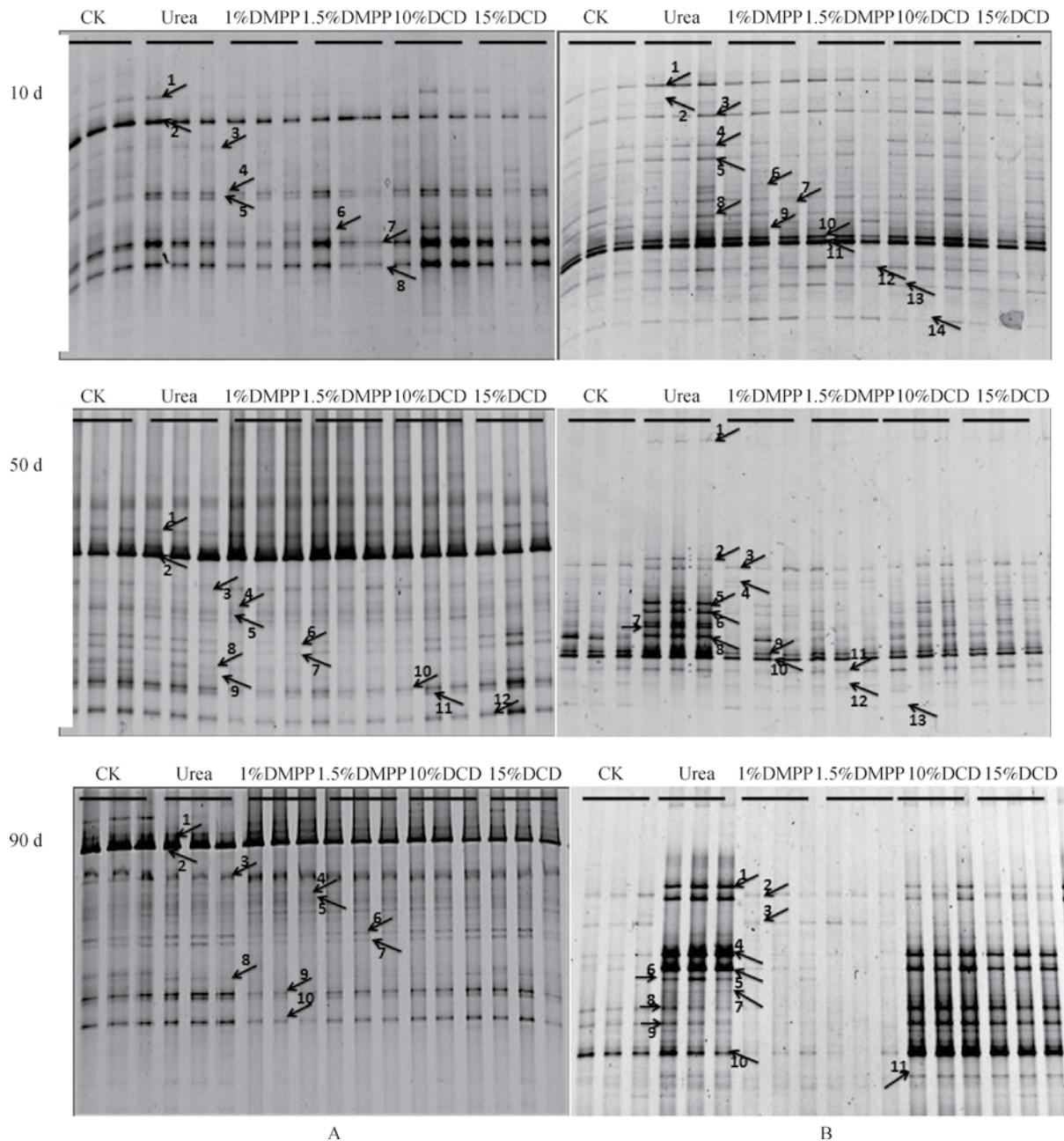


图3 不同培养时间(10 d、50 d和90 d)下的土壤氨氧化古菌(A)和氨氧化细菌(B)的DGGE图谱
 Fig. 3 DGGE fingerprinting of AOA (A) and AOB (B) genes in the soil at different times (D10, D50 and D90) of incubation

但不同处理间Shannon指数和丰富度指数则表现差异(表1), 尿素处理土壤AOA的2个指数最高, 1.5%DMPP处理最低。培养50d时, 施肥以及硝化抑制剂添加均对AOA有一定影响(图3A), 主要表现在施肥及硝化抑制剂处理在条带3~12区间亮度较对照弱, 特别是DMPP处理的条带6、7、8、9; DMPP和DCD处理的Shannon指数和丰富度指数明显小于($p < 0.05$)对照和尿素处理。尿素处理培养50 d时AOB的DGGE图谱与其他处理差异明

显, 其条带2至10的强度明显提高(图3B), 其中DMPP处理土壤的条带结构与对照相似, DCD处理的各条带亮度居于尿素和对照之间, 且DCD处理只对AOA *amoA*的多样性指数有削弱作用, DMPP则对AOA *amoA*、AOB *amoA*多样性和丰富度指数均有抑制作用($p < 0.05$)。在培养90 d时DMPP处理土壤的AOB所有条带亮度均微弱(图3B), 多样性指数和丰富度指数也处于相对较低水平, 说明各类AOB仍处于抑制状态; 而DCD处理90 d时AOA

表1 硝化抑制剂对土壤氨氧化古菌和细菌基因多样性指数的影响

Table 1 Effects of nitrification inhibitors on the biodiversity indices of AOA *amoA*, AOB *amoA* in the soil

时间 Time	处理 Treatment	氨氧化古菌AOA			氨氧化细菌AOB		
		香农指数 Shannon index	丰富度指数 Richness index	均匀度指数 Evenness index	香农指数 Shannon index	丰富度指数 Richness index	均匀度指数 Evenness index
10 d	CK	2.18 ± 0.00a	0.82 ± 0.00a	0.99 ± 0.00a	2.70 ± 0.04a	1.44 ± 0.05ab	0.99 ± 0.00a
	Urea	1.97 ± 0.07bc	0.66 ± 0.05bc	0.99 ± 0.00a	2.71 ± 0.03a	1.44 ± 0.05ab	0.99 ± 0.00a
	1%DMPP	1.88 ± 0.09c	0.60 ± 0.06c	0.99 ± 0.00a	2.77 ± 0.07a	1.54 ± 0.10a	0.99 ± 0.00a
	1.5%DMPP	1.66 ± 0.09d	0.47 ± 0.05d	0.99 ± 0.01a	2.72 ± 0.09a	1.45 ± 0.13ab	0.99 ± 0.00a
	10%DCD	2.08 ± 0.13ab	0.74 ± 0.10ab	0.99 ± 0.01a	2.72 ± 0.04a	1.45 ± 0.05ab	0.99 ± 0.01a
	15%DCD	2.05 ± 0.01ab	0.72 ± 0.01ab	0.99 ± 0.01a	2.64 ± 0.22a	1.31 ± 0.09b	0.97 ± 0.03a
50 d	CK	2.52 ± 0.16b	1.35 ± 0.01a	0.96 ± 0.06b	2.43 ± 0.01d	1.13 ± 0.01e	0.98 ± 0.00a
	Urea	2.87 ± 0.01a	1.36 ± 0.01a	0.99 ± 0.01a	2.62 ± 0.00c	1.36 ± 0.00c	0.97 ± 0.00a
	1%DMPP	2.41 ± 0.30b	1.35 ± 0.01a	0.91 ± 0.11b	2.43 ± 0.00d	1.15 ± 0.00d	0.98 ± 0.00a
	1.5%DMPP	2.34 ± 0.11b	1.24 ± 0.01b	0.91 ± 0.04b	2.44 ± 0.00d	1.16 ± 0.01d	0.98 ± 0.00a
	10%DCD	2.41 ± 0.11b	1.35 ± 0.01a	0.91 ± 0.04b	2.65 ± 0.01b	1.42 ± 0.01b	0.98 ± 0.00a
	15%DCD	2.28 ± 0.21b	1.36 ± 0.02a	0.87 ± 0.08b	2.67 ± 0.00a	1.44 ± 0.01a	0.98 ± 0.00a
90 d	CK	2.37 ± 0.05a	1.12 ± 0.02b	0.96 ± 0.01a	2.27 ± 0.02c	1.04 ± 0.02d	0.99 ± 0.02b
	Urea	2.40 ± 0.02a	1.17 ± 0.01a	0.97 ± 0.01a	2.68 ± 0.01a	1.54 ± 0.01a	0.97 ± 0.00c
	1%DMPP	2.27 ± 0.01b	1.05 ± 0.00c	0.94 ± 0.00b	2.07 ± 0.01d	0.85 ± 0.00e	1.00 ± 0.00a
	1.5%DMPP	2.30 ± 0.01b	1.06 ± 0.01c	0.96 ± 0.00a	1.94 ± 0.01e	0.75 ± 0.00f	1.00 ± 0.00a
	10%DCD	2.38 ± 0.02a	1.17 ± 0.00a	0.96 ± 0.01a	2.61 ± 0.01b	1.42 ± 0.00c	0.96 ± 0.00c
	15%DCD	2.39 ± 0.02a	1.18 ± 0.01a	0.96 ± 0.01a	2.60 ± 0.01b	1.47 ± 0.02b	0.96 ± 0.02c

注：表中数据为平均值 ± 标准差， $n=3$ 。同列不同字母表示同一时间处理间差异显著 ($p < 0.05$) Note: Means ± SD, $n=3$. Different letters in the same column mean significant difference between treatments at the same time ($p < 0.05$)

和AOB条带亮度均较50 d增加，AOA *amoA*、AOB *amoA*多样性和丰富度指数也与尿素处理无显著差异，表明培养后期DCD处理的AOB群落结构得到了恢复。

2.4 硝化抑制剂对土壤氨氧化细菌和古菌丰度的影响

如图4所示，培养10 d时，尿素和抑制剂处理对AOA *amoA*拷贝数无影响，培养50 d和90 d时两种抑制剂处理AOA *amoA*拷贝数均显著高于 ($p < 0.05$) 对照和尿素处理，而DMPP两种浓度处理又均高于DCD处理 ($p < 0.05$)。培养10 d时尿素处理显著提高了AOB *amoA*拷贝数，但抑制剂与对照间无差别。培养50 d时，尿素处理使AOB *amoA*拷贝数迅速升高，与其他处理间的差异增大，而不同硝化抑制剂处理以及对照间仍无差别；相比尿素处理，1%DMPP和1.5%DMPP处

理土壤AOB *amoA*拷贝数降低幅度分别为95.51%和96.04%，10%DCD和15%DCD处理土壤降低幅度分别为84.64%和91.03%。培养90 d时，与尿素相比1%DMPP和1.5%DMPP处理使AOB *amoA*的丰度的降幅增加至96.05%和96.98%，10%DCD和15%DCD处理则分别为11.42%和41.77%。尿素施用使得AOA *amoA*/AOB *amoA*比例相对对照显著降低，1%DMPP和1.5%DMPP处理在50 d和90 d时使AOA *amoA*/AOB *amoA*比例相对对照反而升高，而DCD对AOA *amoA*/AOB *amoA*比例影响较小。

3 讨论

土壤中 N_2O 的排放途径多样、机理复杂，但硝化作用是旱地土壤 N_2O 排放的主要途径。土壤pH、质地、水分和温度等性质以及底物和产物浓度均会

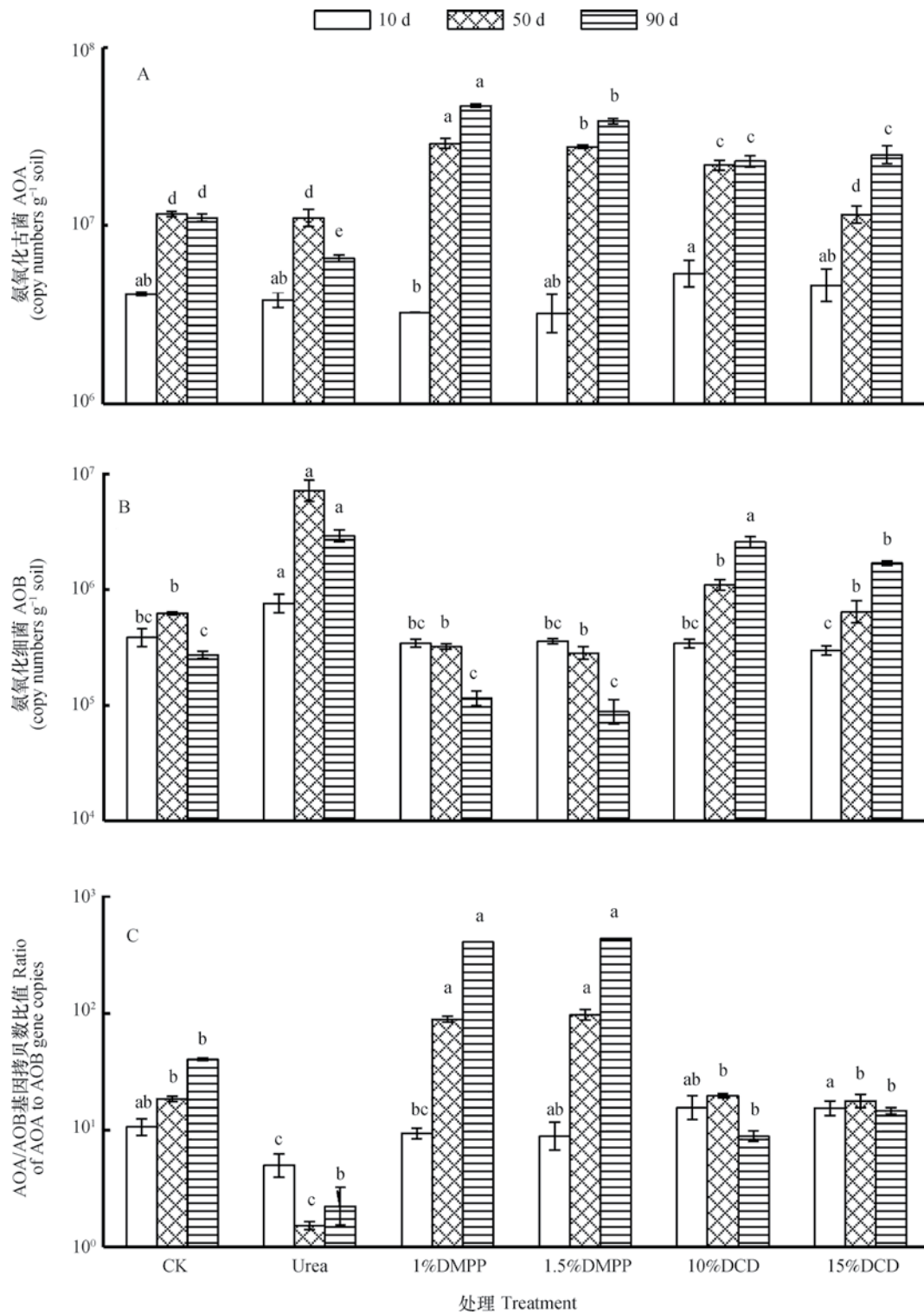


图4 硝化抑制剂对土壤AOA丰度 (A)、AOB丰度 (B) 和AOA /AOB基因拷贝数比值 (C) 的影响

Fig. 4 Effects of nitrification inhibitors on abundance of AOA (A), AOB (B) and ratio of AOA to AOB gene copies (C) in the soil

影响土壤 N_2O 排放, 本试验设计的影响因子是不同种类和用量的硝化抑制剂, 虽然其他性质相同, 但不同处理在培养过程中可能发生的pH、底物和产物浓度以及硝化作用相关微生物的结构和丰度的变化会有差异。反应底物(铵态氮)浓度和微生物的活性则是最直接和核心的两个控制因素, pH则间接影响微生物活性。已有研究证明, 将氨氧化为亚硝酸是硝化作用的限速步骤^[1], 因此控制此过程的微生物(AOA和AOB)也就成为控制 N_2O 排放的重要因素^[19]。单纯施用尿素土壤 N_2O 排放明显高于($p < 0.05$)尿素加硝化抑制剂处理, 添加抑制剂后 N_2O 排放动态以及微生物的丰度变化明显不同于纯尿素处理。下面分析讨论不同处理土壤 N_2O 排放动态与土壤pH、底物和产物浓度以及AOA和AOB的结构与丰度变化的关系。

3.1 纯尿素处理土壤 N_2O 排放的影响因素

本研究中尿素处理 N_2O 排放分别在15 d和50 d出现两次排放高峰, 培养前期尿素处理 N_2O 排放随着时间而增加, 至15 d达到第一个高峰, 因为尿素水解产生大量的铵态氮, 培养10 d时土壤 NH_4^+-N 浓度高达 300 mg kg^{-1} (图2A), 为硝化作用提供充足的底物, 在氨氧化微生物作用下释放大量中间产物 N_2O ^[20], 且在一定范围内pH与硝化速率呈正相关^[21]。15 d后 N_2O 排放开始下降的原因可能是作为硝化作用的底物 NH_4^+-N 不断被转化为 $NO_3^- - N$, 因为尿素水解结束后 NH_4^+-N 不会再通过水解补充。冉炜^[22]研究发现, 加入 100 mg kg^{-1} 尿素后, 潮土、砂姜黑土、滨海盐土、灰钙土、荒漠土、褐土和潮棕壤中的在24 h内基本上全部水解, 黄潮棕壤和马肝土在32 h后也未检测到尿素的残留, 但在96 h后仍有75%以上的尿素残留在砖红壤中, 甚至216 h后也能检测到尿素存在。本研究虽然未测定20 d、30 d、40 d时尿素处理的 NH_4^+-N 浓度, 但从50 d时 NH_4^+-N 浓度明显低于10 d的结果推测, 随着硝化作用的进行, NH_4^+-N 不断被消耗。研究表明, 随着尿素水解反应的进行, 土壤pH的升高会使土壤脲酶和尿素亲和系数降低^[23-24], 导致尿素水解速率降低, 可能会延长尿素的水解时间。培养10d时尿素的pH(5.88)明显高于对照(5.27), 可能对尿素水解不利; 而硝化作用则释放 H^+ 降低pH, 因此, 尿素水解和硝化作用过程的强弱将决定土壤pH的变化, 而pH的变化又影响尿素水解和硝化作用过程。培养50d时 N_2O 排放达到

第二个高峰, $NO_3^- - N$ 也明显增加, 虽然此时土壤 NH_4^+-N 的浓度明显低于培养10 d的土壤, 但AOB *amoA*拷贝数达到最高值, 可能微生物对 N_2O 的产生起主要作用。50 d之后, 直至90 d时土壤AOB *amoA*拷贝数仍保持较高水平, 但 N_2O 排放迅速下降, 可能是由于土壤中硝化作用的剩余底物 NH_4^+-N 不足。所以, 未添加硝化抑制剂的尿素处理, 控制土壤的硝化作用产生 N_2O 的主要因素是 NH_4^+-N 浓度和AOB *amoA*的丰度, 而 NH_4^+-N 浓度对 N_2O 排放影响较硝化作用微生物丰度更大。

3.2 硝化抑制剂处理对土壤 N_2O 排放和氨氧化微生物的影响

尿素添加不同用量的硝化抑制剂DMPP和DCD处理, N_2O 排放分3个阶段。第一阶段是培养40 d以前, N_2O 排放均较低, 虽然底物 NH_4^+-N 很丰富, AOA功能基因*amoA*拷贝数也明显高于尿素, 但AOB功能基因*amoA*拷贝数明显低于尿素处理(图4B), 说明此阶段AOB是硝化作用的主要驱动者, 且受到硝化抑制剂的抑制。研究发现高N(铵态氮)环境不利于AOA发挥作用^[25]。在加入外源氨氮后, AOA因环境中的基质浓度低于其基质抑制临界浓度而被抑制^[26]。且在40 d内DMPP抑制效果最佳, 这与殷建祯等^[27]研究相符。第二阶段是40~90 d之间, N_2O 排放逐渐增加并达到峰值, 土壤 NH_4^+-N 浓度虽然呈下降趋势但仍较丰富; 90 d时4个处理土壤的AOA较50 d略有增加, 不同处理之间差异不显著; AOB功能基因变化趋势则不同, DMPP处理土壤下降明显, 而DCD处理则增加。DMPP处理土壤AOB下降明显, 但 N_2O 排放增加, 这可能是由于土壤pH下降(图5), AOA发挥主要作用。因为土壤pH下降对AOA有利(图4A和图5), 部分AOA可以在pH低于5.0的生境中进行氨的氧化, 而低pH环境使得AOB无法进行正常生长代谢^[28]。由此得到启示, 在施用硝化抑制剂的同时, 如调节土壤pH至中性或微碱性(中和或缓解硝化作用引起的酸化)可抑制AOA发挥作用, 达到更好地控制硝化作用以及减少 N_2O 排放的效果。90 d时DCD处理土壤的AOB较50 d有增加, 加上AOA的作用, 可能是DCD处理 N_2O 排放高于DMPP的原因, 说明AOB在pH 5.2左右土壤中也能发挥作用。第三阶段是90~160 d之间, 根据前人研究表明, DCD和DMPP的抑制效果持续时间分别在50~60 d^[29]和80~90 d^[11-12]左右, 且根据土壤

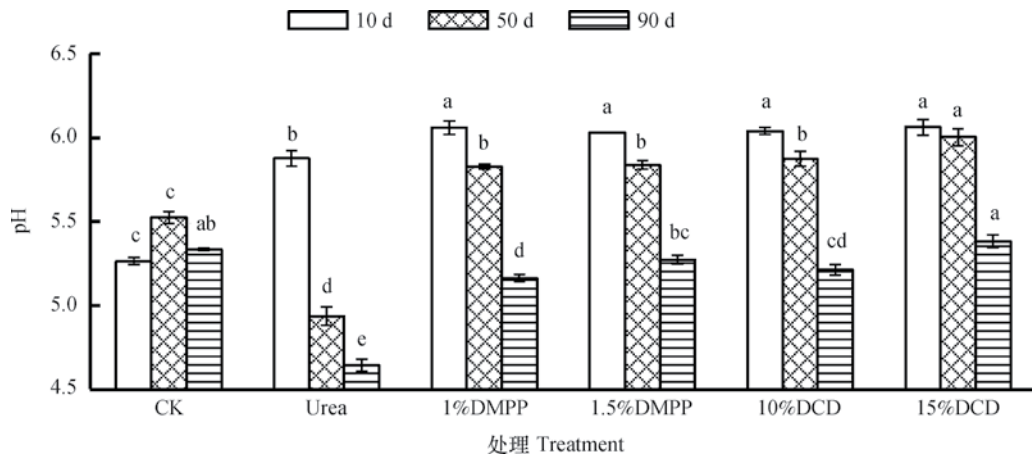


图5 硝化抑制剂对土壤pH的影响

Fig. 5 Effects of nitrification inhibitors on pH in the soil

N_2O 排放动态趋于平衡，推测随着硝化作用不断进行，土壤 NH_4^+-N 浓度和pH将继续下降，不同用量的DMPP和DCD处理对土壤AOA和AOB的抑制作用消失。研究发现，在寡营养的酸性林地土壤中，每克土壤AOA的数量可高达 $10^8 \sim 10^9$ 拷贝，而AOB的数量低于检测线^[30]。第三阶段土壤环境与寡营养的酸性林地土壤相似，土壤中AOA可以发挥作用，所以土壤 N_2O 排放下降的主要原因应该是底物浓度减少。随着培养时间的增加，对DCD和DMPP抑制效果均逐渐减弱，对其机理研究发现，DCD主要通过底物竞争的形式干扰氨氧化微生物对底物的利用而抑制硝化作用，推测随着硝化过程不断产生的 H^+ 剥离了其吸附的 NH_4^+ 导致失效^[31-32]，而DMPP则可能由于土壤中硝化微生物群落结构变化减弱了其抑制效果^[33]。

综上所述，土壤 N_2O 排放动态与底物 NH_4^+-N 含量、AOB和AOA功能基因(*amoA*)丰度未呈现完全同步的变化规律，说明不同时期的主要作用因素不同，前40 d的低排放与AOB被抑制相关，虽然底物丰富且AOA丰度并不低，但微酸性(pH约6.0)土壤不利于AOA发挥作用；而之后土壤pH下降至酸性时AOA的作用得到发挥，虽然AOB功能基因丰度仍很低，但 N_2O 排放逐渐增加。

4 结论

尿素施用促使了氨氧化菌群尤其是AOB的迅速繁殖，增加了 N_2O 排放总量。两种硝化抑制剂(DCD和DMPP)的施用均显著降低毛竹林土壤

N_2O 排放，抑制土壤铵态氮向硝态氮转化。两种硝化抑制剂均能显著降低土壤AOB丰度并改变其群落结构，而对AOA影响较小；AOB在前期的高氮和微酸至中性土壤环境中起主要作用，但随着培养过程的进行，土壤pH和 NH_4^+-N 浓度的下降，AOA的作用得到发挥。DMPP对毛竹林土壤氨氧化作用的抑制效果较DCD持久高效。因此，两种硝化抑制剂主要通过抑制AOB起作用，可适当调节土壤pH至中性，并在1%DMPP施用条件下，硝化抑制剂能有更长效的抑制效果。

参考文献

- [1] Frame C H, Casciotti K L. Biogeochemical controls and isotopic signatures of nitrous oxide production by a marine ammonia-oxidizing bacterium. *Biogeosciences*, 2010, 7 (2): 2695-2709
- [2] Case S D C, Mcnamara N P, Reay D S, et al. The effect of biochar addition on N_2O and CO_2 emissions from a sandy loam soil-The role of soil aeration. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 51 (3): 125-134
- [3] Di H J, Cameron K C. Reducing environmental impacts of agriculture by using a fine particle suspension nitrification inhibitor to decrease nitrate leaching from grazed pastures. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2005, 109 (3/4): 202-212
- [4] Di H J, Cameron K C. Nitrate leaching losses and pasture yields as affected by different rates of animal urine nitrogen returns and application of a nitrification inhibitor—Alysimeter study. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2007, 79 (3): 281-290
- [5] Boeckx P, Xu X, Van Cleemput O. Mitigation of N_2O

- and CH₄ emission from rice and wheat cropping systems using dicyandiamide and hydroquinone. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2005, 72 (1): 41—49
- [6] Zhang L M, Hu H W, Shen J P, et al. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *ISME Journal*, 2012, 6 (5): 1032—1045
- [7] 杨扬, 孟德龙, 秦红灵, 等. 硝化抑制剂对蔬菜土硝化和反硝化细菌的影响. *生态学报*, 2012, 32 (21): 6803—6810
- Yang Y, Meng D L, Qin H L, et al. Mechanism of nitrification inhibitor on nitrogen-transformation bacteria in vegetable soil (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32 (21): 6803—6810
- [8] Pasda G, Hähndel R, Zerulla W. The new nitrification inhibitor DMPP (ENTEC®)-Effects on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Plant Nutrition*, 2002, 92: 758—759
- [9] Xu X, Boeckx P, Cleemput O V, et al. Mineral nitrogen in a rhizosphere soil and in standing water during rice (*Oryza sativa* L.) growth: Effect of hydroquinone and dicyandiamide. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2005, 109 (1/2): 107—117
- [10] Subbarao G V, Rondon M, Ito O, et al. Biological nitrification inhibition (BNI)—Is it a widespread phenomenon? *Plant and Soil*, 2007, 294 (1/2): 5—18
- [11] Weiske A, Benckiser G, Herbert T, et al. Influence of the nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPPP) 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*, 2001, 34 (2): 109—117
- [12] Kleineidam K, Košmrlj K, Kublik S, et al. Influence of the nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere*, 2011, 84 (1): 182—186
- [13] 孙志梅, 武志杰, 陈利军, 等. 硝化抑制剂的施用效果、影响因素及其评价. *应用生态学报*, 2008, 19 (7): 1611—1618
- Sun Z M, Wu Z J, Chen L J, et al. Application effect, affecting factors, and evaluation of nitrification inhibitor: A review (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19 (7): 1611—1618
- [14] 俞巧钢, 陈英旭. DMPP 对稻田田面水氮素转化及流失潜能的影响. *中国环境科学*, 2010 (9): 1274—1280
- Yu Q G, Chen Y X. Influences of nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate on nitrogen transformation and potential runoff loss in rice fields (In Chinese). *China Environmental Science*, 2010 (9): 1274—1280
- [15] Barth G, Tucher S V, Schmidhalter U. Effectiveness of 3, 4-dimethylpyrazole phosphate as nitrification inhibitor in soil as influenced by inhibitor concentration, application form, and soil matrix potential. *Pedosphere*, 2008, 18 (3): 378—385
- [16] Xu Y, Yu W, Ma Q, et al. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidisers of an acidic luvisols soil to different nitrogen fertilization rates after 9 years. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48 (7): 827—837
- [17] 郭帅, 徐秋芳, 沈振明, 等. 雷竹林土壤氨氧化微生物对不同肥料的响应. *浙江农林大学学报*, 2014, 31 (3): 343—351
- Guo S, Xu Q F, Shen Z M, et al. Response of soil ammonia-oxidizing organisms on fertilization and mulch in *Phyllostachys violascens* stands (In Chinese). *Journal of Zhejiang A & F University*, 2014, 31 (3): 343—351
- [18] Di H J, Cameron K C, Shen J P, et al. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72 (3): 386—394
- [19] Cui P, Fan F, Yin C, et al. Urea-and nitrapyrin-affected N₂O emission is coupled mainly with ammonia oxidizing bacteria growth in microcosms of three typical Chinese arable soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 66 (11): 214—221
- [20] 佟德利, 徐仁扣, 顾天夏. 施用尿素和硫酸铵对红壤硝化和酸化作用的影响. *生态与农村环境学报*, 2012, 28 (4): 404—409
- Tong D L, Xu R K, Gu T X. Effect of application of urea and ammonium sulfate on nitrification and acidification in red soils different in initial pH (In Chinese). *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2012, 28 (4): 404—409
- [21] 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. *土壤*, 2014, 46 (2): 319—324
- Yang J B, Li X C, Xu J J, et al. Effects of nitrification inhibitors on nitrogen transformation in different soils (In Chinese). *Soils*, 2014, 46 (2): 319—324
- [22] 冉炜. 农业土壤中化肥氮的形态转化机理及其调控研究. 南京: 南京农业大学, 2000
- Ran W. Mechanisms and regulations of nitrogen

- transformation in agricultural soils amended with mineral fertilizers (In Chinese). Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2000
- [23] Cabrera M L, Kissel D E, Bock B R. Urea hydrolysis in soil: Effects of urea concentration and soil pH. *Soil Biology & Biochemistry*, 1991, 23 (12): 1121—1124
- [24] Singh R, Nye P H. The effect of soil pH and high urea concentrations on urease activity in soil. *European Journal of Soil Science*, 2006, 35 (4): 519—527
- [25] Jia Z, Conrad R. Bacteria rather than archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11 (7): 1658—1671
- [26] Di H J, Cameron K C, Shen J P, et al. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen rich grassland soils. *Nature Geoscience*, 2009, 2 (9): 621—624
- [27] 殷建祯, 俞巧钢, 符建荣, 等. 不同作用因子下有机无机配施添加DMPP对氮素转化的影响. *土壤学报*, 2013, 50 (3): 574—583
- Yin J Z, Yu Q G, Fu J R, et al. Effects of combined application of organic and inorganic fertilizers plus DMPP on nitrogen transformation in soils as affected by different factors (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50 (3): 574—583
- [28] Lehtovirta-Morley L E, Stoecker K, Vilcinskis A, et al. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (38): 15892—15897
- [29] 史云峰, 赵牧秋, 张丽莉. 双氰胺 (DCD) 在砖红壤中硝化抑制效果的影响因素研究. *安徽农业科学*, 2011, 39 (33): 20437—20440
- Shi Y F, Zhao M Q, Zhang L L. Research on the factors affecting nitrification inhibition of dicyandiamide (DCD) in latosol. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39 (33): 20437—20440
- [30] Isobe K, Koba K, Suwa Y, et al. High abundance of ammonia-oxidizing archaea in acidified subtropical forest soils in southern China after long-term N deposition. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 80 (1): 193—203
- [31] 张苗苗, 沈菊培, 贺纪正, 等. 硝化抑制剂的微生物抑制机理及其应用. *农业环境科学学报*, 2014, 33 (11): 2077—2083
- Zhang M M, Shen J P, He J Z, et al. Microbial mechanisms of nitrification inhibitors and their application (In Chinese). *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33 (11): 2077—2083
- [32] 戴宇, 贺纪正, 沈菊培. 双氰胺在农业生态系统中的应用效果及其影响因素. *应用生态学报*, 2014, 25 (1): 279—286
- Dai Y, He J Z, Shen J P. Effects and influence factors of dicyandiamide (DCD) application in agricultural ecosystem (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25 (1): 279—286
- [33] 孙志梅, 武志杰, 陈利军, 等. 土壤硝化作用的抑制剂调控及其机理. *应用生态学报*, 2008, 19 (6): 1389—1395
- Sun Z M, Wu Z J, Chen L J, et al. Regulation of soil nitrification with nitrification inhibitors and related mechanisms (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19 (6): 1389—1395

Effects of Nitrification Inhibitors on Soil N_2O Emission and Community Structure and Abundance of Ammonia Oxidation Microorganism in Soil under Extensively Managed *Phyllostachys edulis* Stands

MAO Xinwei CHENG Min XU Qiufang[†] CHEN Junhui ZHAO Tianxin YU Xiao LI Yongchun
(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon cycling in Forest Ecosystems and Carbon sequestration, School of Environmental and Resources, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

Abstract 【Objective】 Combined application of nitrification inhibitors and ammonium-containing fertilizers is considered an effective means for improving N utilization efficiency and reducing pollution risk. To determine effects of the use of two nitrification inhibitors: dicyandiamide (DCD) and 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), separately, on N_2O emission, nitrogen transformation rate, and community structure and abundance of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing

archaea (AOA) in soils applied with ammonium-containing fertilizers. **【Method】** An in-lab incubation test was conducted of soil samples collected from an extensively managed *Phyllostachys edulis* plantation. The soil samples were subjected to six treatments, separately, that is (1) CK (no fertilizer); (2) Urea (Urea); (3) Urea + 1% DMPP (1% of Urea in quantity); (4) Urea + 1.5% DMPP; (5) Urea + 10% DCD; (6) Urea + 15% DCD. Dynamics of N₂O emission and soil parameters at the time of N₂O emission turning point (10 d, 50 d and 90 d) were determined. **【Result】** Results show that both of the two nitrification inhibitors greatly reduced N₂O emission during the 160 days of incubation. The reduction rate in Treatments Urea + DMPP (both 1% and 1.5%), Treatment Urea + 10% DCD, and Treatment Urea + 15% DCD was 54%, 28%, and 41%, respectively. Significant differences were found in cumulative emission of N₂O ($p < 0.05$) between the treatments, but not between the two Urea + DMPP treatments. The treatments in which urea was combined with nitrification inhibitors were similar to Treatment CK in N₂O emission rate during the first 40 days of incubation, and then the formers began to rise gradually with the incubation going on and exceeded CK. Significantly lower N₂O cumulative emission was observed in Treatment Urea + 15% DCD than in Treatment Urea + 10% DCD. Soil NH₄⁺-N levels due to urea application increased rapidly to a maximum and then decreased gradually, with Treatment Urea being lower than all the urea + inhibitor treatments on D50 and D90 of incubation; NO₃⁻-N concentrations exhibited an opposite trend. The DGGE profiles of soil ammonia oxidizing archaea (AOA) and ammonia oxidizing bacteria (AOB) revealed that DCD and DMPP significantly inhibited AOB in abundance. The effect began to be obvious on D10 of incubation and remained to be significant on D50 and D90 in Treatments Urea + MPP, but faded on D90 in Treatments Urea + DCD. Treatment Urea was obviously much higher than all the urea + inhibitor treatments in abundance of AOB *amoA* except for Treatment Urea + 10% DCD on D 90 of incubation. In contrast, little effect of the use of inhibitors was detected on AOA community, with AOA *amoA* copy number actually increasing in all treatments. In summary, the dynamics of N₂O emission, soil NH₄⁺-N content, and abundance of AOB *amoA* and AOA *amoA* did vary synchronously, indicating that N₂O emission was controlled by different factors in different time periods for the two bacterial groups. The effect of nitrification inhibitors suppressing AOB led to low N₂O emission during the first 40 days of incubation. Although the soil was sufficient in ammonium content and abundant in AOA, the slightly acidic condition (pH about 6.0) may have limited nitrification activity of the group. During the period of D50–D90 of incubation, Changes in AOA triggered by decrease in soil pH with time may be responsible for the increase in N₂O emission because the AOB *amoA* abundance was still low. **【Conclusion】** In conclusion, nitrification was mainly controlled via inhibition of AOB activity and application of DMPP at a 1% rate appears to be sufficient to reduce nitrification. It is also suggested that adjusting soil pH to nearly neutral may prolong the effect of the inhibitor DMPP.

Keywords N₂O; 3, 4-dimethylpyrazole (DMPP); Dicyandiamide (DCD); *Phyllostachys edulis* plantation; Ammonia-oxidizing bacteria (AOB); Ammonia-oxidizing archaea (AOA)

(责任编辑: 陈荣府)