

DOI: 10.11766/trxb201908080361

张昊青, 赵学强, 张玲玉, 沈仁芳. 石灰和双氰胺对红壤酸化和硝化作用的影响及其机制[J]. 土壤学报, 2021, 58 (1): 169–179.

ZHANG Haoqing, ZHAO Xueqiang, ZHANG Lingyu, SHEN Renfang. Effects of Liming and Dicyandiamide (DCD) Application on Soil pH and Nitrification of Acidic Red Soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58 (1): 169–179.

石灰和双氰胺对红壤酸化和硝化作用的影响及其机制*

张昊青^{1, 2}, 赵学强^{1, 2†}, 张玲玉^{1, 2}, 沈仁芳^{1, 2}

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 施用石灰是改良酸性土壤的重要措施, 但其对土壤硝化作用的增强不仅加速土壤酸化, 也增加硝态氮流失风险。传统的硝化抑制剂双氰胺(Dicyandiamide, DCD)能否在石灰改变 pH 的条件下始终有效抑制硝化是当前红壤区生产中亟需解决的问题。采用短期土壤培养试验, 探讨了不同用量石灰与 DCD 配合施用对土壤酸化和硝化作用的影响及其机制。结果表明: 施用一定量的石灰($\leq 4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)显著提高土壤 pH, 通过促进氨氧化细菌的生长以促进硝化作用。在不同 pH 条件下, DCD 对红壤硝化过程均有显著抑制效果。在较高 pH (pH 7.0~7.8) 条件下, DCD 主要通过降低氨氧化细菌的丰度以抑制硝化, 而在低 pH (pH < 6.0) 条件下, DCD 对氨氧化古菌和氨氧化细菌的丰度均有抑制作用。此外, DCD 通过抑制土壤硝化, 显著提高了土壤 pH。上述结果表明, 适宜量(2~4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)的石灰和 DCD 结合施用不仅能够减缓红壤酸化, 而且能够抑制硝化作用, 降低硝态氮的潜在环境风险。

关键词: 硝化作用; 硝化抑制剂; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 石灰; 红壤酸化

中图分类号: S158 **文献标志码:** A

Effects of Liming and Dicyandiamide (DCD) Application on Soil pH and Nitrification of Acidic Red Soil

ZHANG Haoqing^{1, 2}, ZHAO Xueqiang^{1, 2†}, ZHANG Lingyu^{1, 2}, SHEN Renfang^{1, 2}

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] Soil acidification is one of the most important limitations on agricultural production in the red soil regions of South China, where the production of staple food crops is negatively affected by acid soil because its high contents of aluminum, manganese and acid hinder efficient use of soil nutrients such as nitrogen (N). Therefore, there is an urgent need for dual improvement of soil pH and N use efficiency in the red soil regions. As a conventional method for ameliorating acidic soils, liming increases soil pH, but inevitably enhances soil nitrification. The enhanced nitrification not only accelerates soil acidification, but also increases the risk of nitrate loss through leaching and runoff in the red soil regions with abundant rainfall. To prevent nitrification, dicyandiamide (DCD) is a commonly used nitrification inhibitor, which will reduce nitrate loss and soil

* 中国科学院战略性先导科技专项 B 类 (XDB15030202, XDB15030302) 资助 Supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Nos. XDB15030202 and XDB15030302)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xqzhao@issas.ac.cn

作者简介: 张昊青(1993—), 女, 宁夏银川人, 博士研究生, 主要从事土壤氮素形态转化与氮高效利用研究。E-mail: hqzhang@issas.ac.cn

收稿日期: 2019-08-08; 收到修改稿日期: 2019-09-16; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2019-10-29

acidification. The use of DCD coupled with lime may be an effective approach to improving red soil productivity. Previous studies only focused on the effect of liming or DCD separately on soil nitrification, and the joint effects of liming and DCD on nitrification of acid red soil are rarely reported. Thus, the objectives of this study are to investigate effects of combined application of lime and DCD on soil pH and nitrification in acid red soil and their underlying mechanisms. 【Method】 Soils collected from the Yingtan Red Soil Ecological Experimental Station in Jiangxi Province were cultivated for 35 days, and 200 mg·kg⁻¹ urea was applied as substrate for nitrification. Two factors were involved in the study, i.e. liming rate (0, 2, 4 and, 6 g·kg⁻¹ soil) and DCD application rate (0 and 20 mg·kg⁻¹). The soil in each treatment was sampled every 7 days for analyzing soil pH, ammonium and nitrate contents to evaluate their variations. At the end of the culture, soil DNA was extracted and *amoA* gene copies of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) were determined. 【Result】 It was found that liming at < 4 g·kg⁻¹ increased soil pH and enhanced nitrification, whereas liming at >4 g·kg⁻¹ increased soil pH a bit and did almost nothing on nitrification compared with 4 g·kg⁻¹. A parabolic relationship curve was observed between soil pH and apparent nitrification rate. Apparent nitrification rate peaked on D7, D14, and D21 in soil 6.9 or so in pH. Soil nitrification was mainly affected by AOA and AOB, either independently or jointly. Path analysis shows that abundance of AOA had certain direct, but negative effect on apparent soil nitrification rate, and also some indirect effect reducing the rate by negatively affecting the abundance of AOB. On the contrary, abundance of AOB had certain positive effect on apparent nitrification rate, indicating that the promoted nitrification was attributed mainly to AOB as a result of liming. Application of DCD displayed a significant inhibitory effect on nitrification in red soil, regardless of soil pH. In soils high in pH (pH 7.0~7.8), DCD inhibited nitrification by reducing the abundance of AOB, while in soils lower in pH (pH < 6.0), DCD inhibited the growth of both AOA and AOB, thus reducing nitrification. Furthermore, soil pH was increased significantly due to the reduced nitrification when DCD was applied. 【Conclusion】 Combined application of an appropriate amount of lime (2~4 g·kg⁻¹) and DCD can not only raise pH of the acidic red soils and alleviate acidification, but also reduce nitrification, thus mitigating the potential threat of nitrate loss to the environment. All the findings in this study may serve as theoretical support to and new ideas for amelioration of acid soils. However, as the present experiment was carried out under well-controlled condition, the effects of combined application of lime and DCD on soil pH and nitrification in fields in the red soil regions need to be further studied for validation.

Key words: Nitrification; Nitrification inhibitor; Ammonia-oxidizing bacteria; Ammonia-oxidizing archaea; Liming; Red soil acidification

中国南方酸性红壤区面积 218 万 km², 约占全国土地总面积的 22.7%^[1]。该地区水热资源丰富, 有着巨大的农业生产潜力^[2]。然而, 由于土壤铝毒、锰毒、酸害及养分缺乏等一系列植物生长限制因子, 酸性土壤的巨大生产潜力难以发挥^[2-3]。近年来, 由于氮肥的大量施用, 我国农田土壤酸化严重, 不仅限制了农业生产力, 也威胁到生态环境质量^[4-5]。与全国其他地区相比, 红壤区的酸化问题更为突出^[6]。实现酸性红壤的可持续利用, 是关系到国家粮食安全和环境保护的重要课题。

施用酸性土壤改良剂是提高酸性土壤作物生产力的一个主要策略^[2-5], 其中石灰是最传统且效果显著的酸性土壤改良剂。施用石灰可快速提高土壤 pH, 显著改善酸性土壤上植物的生长, 但在土壤 pH 提高的同时, 又会不可避免地加速土壤硝化作用^[7]。

硝化作用的加速, 一方面引起质子积累, 加重土壤酸化程度; 另一方面, 增加土壤中硝态氮的累积, 在高温多雨的南方红壤区, 硝态氮极易发生径流、淋洗和反硝化损失, 从而对水体质量和空气质量构成潜在威胁^[8]。由于土壤颗粒表面一般带负电荷, 与带负电的硝酸根相比, 带正电的铵离子更易被土壤吸附和晶格固定, 不易随水淋失^[9]。此外, 与吸收硝态氮相比, 植物根系吸收铵态氮不需要还原过程, 一般耗能较少, 速率较快, 容易获得较高生物量^[10]。酸性土壤硝化作用较弱, 铵态氮/硝态氮的比例较高, 由于长期进化适应的原因, 酸性土壤上生长的植物一般较为偏好铵态氮且耐铝毒^[11]。利用铵态氮和铝的协同作用是提高酸性土壤氮效率的主要策略之一^[12]。因此, 若能有效抑制石灰诱导的酸性红壤硝化作用, 将土壤中的铵硝比维持在较高水平,

不仅可以降低硝态氮淋失及反硝化造成的环境风险,提高氮肥利用效率,同时也能减缓硝化作用引起的土壤酸化,维持酸性红壤区农业的可持续发展。

硝化抑制剂种类较多,其中,双氰胺(Dicyandiamide, DCD)是目前广泛应用于农业生产中的一种硝化抑制剂。利用 DCD 延缓铵态氮向硝态氮的转化,可有效降低土壤氮素损失,提高作物产量和改善品质,提高氮肥利用率^[13]。DCD 在农业上的应用效果已有大量报道,其施用效果经常依赖于土壤环境和管理措施,在不同条件下存在很大差异^[13-15]。在酸性土壤地区,为了改善作物生长,经常施用石灰以提高土壤 pH。一方面,土壤 pH 是调控土壤中的硝化过程和硝化微生物的关键因素^[16],施用石灰导致的土壤 pH 增加会加速酸性土壤中的硝化过程,进而可能会影响 DCD 的作用效果。另一方面,DCD 通过抑制土壤硝化作用,减缓土壤酸化,也可能改变石灰的作用效果。目前研究多集中于石灰或 DCD 单一因素对土壤硝化作用的影响,对于石灰和 DCD 配合施用对酸性土壤硝化过程的影响及其机制的研究尚鲜有报道。基于上述考虑,为了探究石灰和 DCD 配合施用对酸性土壤 pH 和硝化作用的影响及其机制,本文比较分析了石灰和 DCD 交互作用对酸性土壤培养过程中 pH、铵态氮和硝态氮含量及硝化微生物(氨氧化细菌和氨氧化古菌)丰度的影响。研究结果旨在为酸性土壤改良和氮素优化管理提供理论基础和科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试红壤发育于第四纪红黏土,采集自江西省鹰潭市中国科学院红壤生态试验站旱地农田,该地区属于亚热带湿润季风气候,年平均降水量 1 882 mm。采集 0~20 cm 的新鲜土壤样品,剔除杂物及残留根系后,风干,磨细,分别过 1 mm 和 0.149 mm 孔径筛备用。

于试验开始前进行供试土壤的基本理化性质分析。用 pH 计(PB-21, Sartorius, 德国)在土水比为 1:2.5 的条件下测得土壤 pH 为 4.80;用 2 mol·L⁻¹ KCl 浸提,流动分析仪(San++ System, SAKLAR, 荷兰)测得土壤初始硝态氮含量为 1.42 mg·kg⁻¹,铵

态氮含量为 3.10 mg·kg⁻¹;用盐酸-氟化铵浸提,钼锑抗比色法测得土壤有效磷含量为 3.00 mg·kg⁻¹;用 1 mol·L⁻¹ 乙酸铵浸提,火焰光度法测得土壤速效钾含量为 67.90 mg·kg⁻¹;用低温外加热重铬酸钾氧化—比色法测得土壤有机质含量为 8.9 g·kg⁻¹。

1.2 试验设计

试验包括两个因素,A 因素为石灰(CaCO₃)用量,分别为 0、2、4、6 g·kg⁻¹干土;B 因素为 DCD,分为不施用 DCD (-DCD)和施用 DCD (+DCD)。共 8 个处理,每个处理重复 3 次。同时,所有处理均供应 200 mg·kg⁻¹(以 N 计)尿素作为氮源。DCD 用量为 20 mg·kg⁻¹干土(施氮量的 10%)。DCD 由上海麦克林生化科技有限公司生产,含量 980 g·kg⁻¹。

首先,称取 50 g 过 1 mm 筛的风干土于培养瓶中,分别加入不同量的石灰,与土壤充分混匀,得到不同石灰添加量的土壤。再将同一石灰用量的土壤分为两份,一份仅加入尿素溶液,另一份加入尿素和 DCD 的混合溶液。另加入一定量去离子水以维持正常的水分含量和通气状态。用塑料膜将培养瓶封口,并在中间留出小孔以创造好气环境。将培养瓶置于 25 °C 人工气候室中恒温黑暗培养。培养期间每 3 天采用称重法补水 1 次,使土壤水分保持基本恒定。于培养开始后的 0、7、14、21 和 35 d 分别取样,取样后立即用 2 mol·L⁻¹ KCl 溶液浸提,浸提液置于 4 °C 冰箱保存,用于测定土壤铵态氮和硝态氮含量。同时,于培养开始后第 35 天采集土壤样品,置于-20 °C 冰箱,用于土壤 DNA 的提取。

1.3 土壤微生物总 DNA 的提取

于培养结束时(第 35 天),采用 FastDNA Spin Kit For Soil 试剂盒(北京天根生化科技有限公司),提取土壤总 DNA。称取 0.50 g 土壤样品,按照试剂盒说明书进行提取。用微量分光光度计(NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, 美国)检测提取 DNA 样品的浓度和纯度,后保存至-20 °C 冰箱,以用于氨氧化微生物 *amoA* 基因拷贝数检测。

1.4 氨氧化细菌和氨氧化古菌中 *amoA* 基因实时荧光定量 PCR 分析

氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea; AOA)和氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria; AOB)中 *amoA* 基因丰度采用 PCR 扩增仪(LightCycler 480 real-time PCR system, Roche, 德国)进行定量分析。

所采用的引物序列及反应程序如表 1 所示。试验采用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司生产, SYBR Premix Ex Taq 由日本 TaKaRa 公司生产。实时荧光定量 PCR 分析以提取的土壤 DNA 为模板, 反应体

系为 10 μL , 包括 1 μL DNA 模板、5 μL SYBR Premix Ex Taq, 前后引物各 1 μL 及 2 μL 灭菌双蒸水。同时设置空白对照, 即以灭菌双蒸水代替土壤 DNA 作为反应模板。每个样品 3 次技术重复。

表 1 氨氧化古菌 (AOA) 与氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因定量 PCR 引物序列及反应程序

Table 1 Primer sequences and reaction procedures of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) *amoA* gene quantitative PCR

| 基因名称 | 引物序列 | 片段长度 | 反应程序 |
|----------------------------------|---------------------------------------|------------------|---|
| Gene | Primer sequence | Amplicon size/bp | Thermal conditions |
| AOA- <i>amoA</i> ^[17] | <i>amoA</i> F STAATGGTCTGGCTTAGACG | 635 | 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 cycles |
| | <i>amoA</i> R GCGGCCATCCATCTGTATGT | | |
| AOB- <i>amoA</i> ^[18] | <i>amoA</i> -1F GGGGTTTCTACTGGTGGT | 491 | 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 cycles |
| | <i>amoA</i> -2R CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC | | |

标准曲线的制作: 通过溶菌肉汤 (LB, Lysogeny Broth) 培养基培养含有目的基因的克隆子, 按照试剂盒 (FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit, FAVORGEN Bio, 中国) 的操作步骤进行质粒的提取和纯化。提取后的质粒用微量分光光度计 (NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, 美国) 检测其浓度, 并以 10 倍梯度对质粒进行稀释, 得到标准曲线。标准曲线重复 3 次, 扩增效率均在 92%~105% 之间, 决定系数 R^2 均大于 0.99。

1.5 数据处理

土壤表观硝化率是土壤中硝态氮含量占土壤铵态氮含量和硝态氮含量之和的百分数^[19]。

数据采用 SPSS19.0 进行统计分析。采用单因素方差分析检验不同石灰用量处理间土壤硝态氮、铵态氮、表观硝化率、土壤 pH 及 AOA 和 AOB 中 *amoA* 基因丰度的差异显著性。采用独立样本 *t*-检验分析同一石灰用量条件下施 DCD 与不施 DCD 处理之间上述测定指标差异显著性。多重比较采用邓肯 (Duncan) 法, 差异显著性水平为 5%。通径分析方法参考杜家菊和陈志伟^[20]的报道, 通过 SPSS19.0 进行线性回归得到线性回归方程的标准系数, 即为直接通径系数, 再乘以自变量之间的相关系数即得间接通径系数。

2 结果

2.1 石灰和硝化抑制剂对土壤 pH 的影响

由于尿素的水解, 在培养 0 d 时不施石灰处理

pH 显著高于试验初始 pH (4.8)。在整个培养期间, 无论是否施用 DCD, 当石灰用量从 0 增加至 4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 土壤 pH 逐渐升高, 但当石灰用量大于 4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 继续加大石灰用量对土壤 pH 的提升幅度较低 (图 1)。在不施 DCD 的条件下, 培养期间各石灰用量下的土壤 pH 均有下降的趋势 (图 1a)); 而在施用 DCD 的条件下, 土壤 pH 基本保持不变 (图 1b))。在整个培养期间, 施用 DCD 较不施 DCD 处理土壤 pH 均显著增加, 其中, 以施用 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 石灰处理下外加 DCD 对土壤 pH 的提升幅度最大。

2.2 石灰和硝化抑制剂对土壤硝态氮和铵态氮含量的影响

在不施 DCD 的条件下, 施用石灰显著增加土壤硝态氮含量, 在培养 7、14、21 d 时, 施用石灰处理硝态氮含量较不施石灰处理分别增加 391.6%、127.3% 和 72.6%, 其中以施用 4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 石灰处理对土壤硝态氮的提高幅度最大 (图 2a))。随着培养时间的增加, 不施石灰和施用 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 石灰处理的土壤硝态氮含量均在培养 35 d 达到峰值, 而施用 4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 6 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 石灰处理则在培养 14 d 即达到峰值, 后续有降低的趋势。在培养第 35 天时, 各石灰用量之间硝态氮含量无显著差异, 这可能是由于各石灰处理土壤中的铵态氮已经被完全硝化。在施用 DCD 的条件下, 土壤硝态氮含量在整个培养期间内仅有少量增加, 始终显著低于不施 DCD 处理。不同石灰用量对土壤硝态氮含量的影响并不显著, 且均保持较低水平 (40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以下), 意味着土壤 pH 的变化对 DCD 自身的抑制效果无显著影响 (图 2b))。

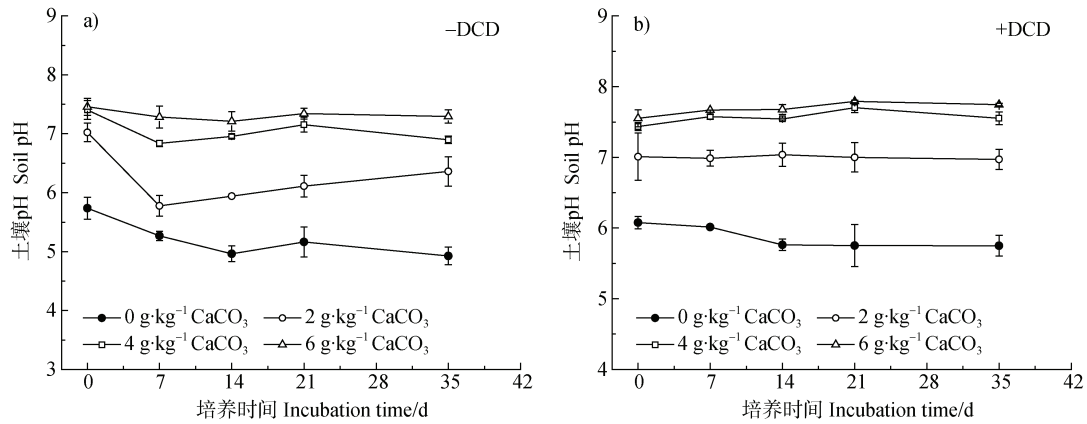


图 1 石灰和双氰胺 (DCD) 处理下土壤 pH 的变化

Fig. 1 Variation of soil pH relative to lime and dicyandiamide (DCD)

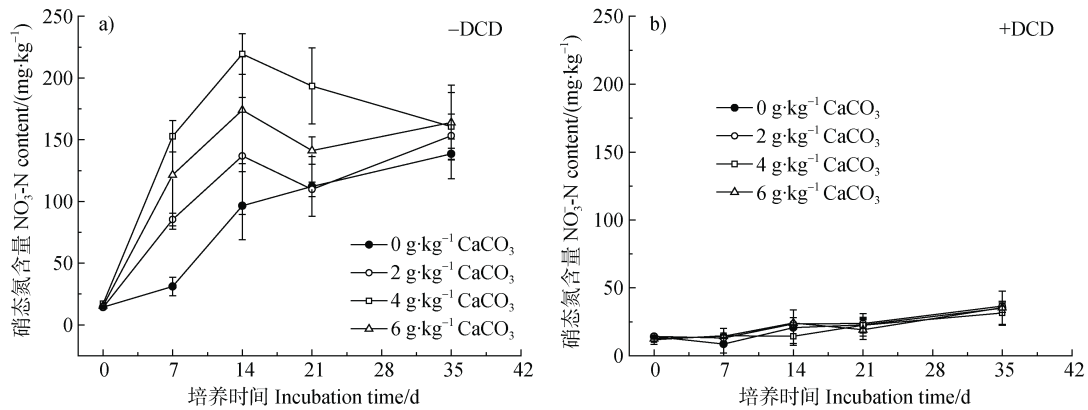


图 2 石灰和 DCD 对土壤硝态氮含量的影响

Fig. 2 Effects of lime and DCD on soil NO_3^- -N content

与硝态氮的变化趋势相反,在不施 DCD 的条件下,石灰处理土壤铵态氮含量在整个培养期间均显著低于对照处理,其中以施用 $4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 石灰处理下铵态氮含量最低,较不施石灰处理降低 62% (图 3a)。随着培养时间的增加,土壤中铵态氮含量急剧下降。培养 21 d 后,除不施石灰处理外,其余处理土壤铵

态氮含量均低于 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,培养 35d 后,各处理土壤铵态氮含量均降至 $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 左右 (图 3a)。在施用 DCD 的条件下,不同石灰用量之间铵态氮含量差异不显著,且整个培养期始终维持在 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以上,显著高于不施 DCD 处理,进一步证明了 DCD 对硝化作用的抑制效果不受土壤 pH 变化的影响 (图 3b))。

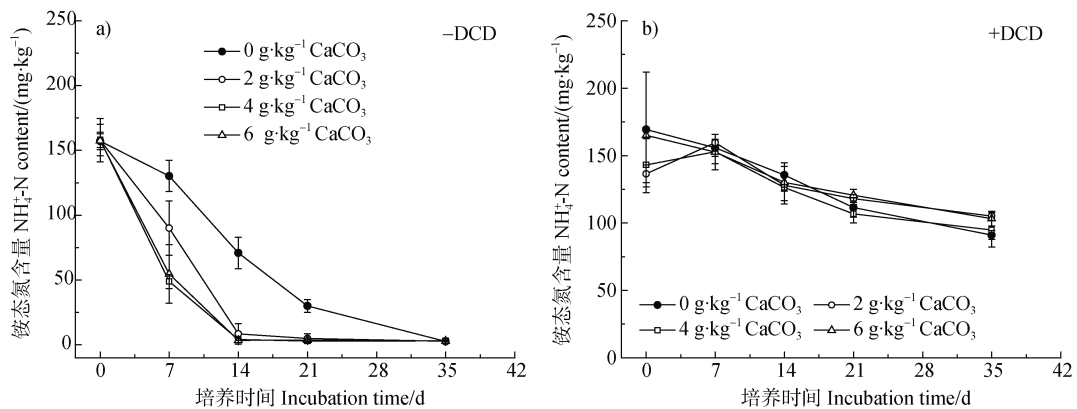


图 3 石灰和 DCD 对土壤铵态氮含量的影响

Fig. 3 Effects of lime and DCD on soil NH_4^+ -N content

2.3 石灰和硝化抑制剂对土壤表观硝化率的影响

在不施 DCD 的条件下,施用石灰显著提高培养 7~21 d 期间土壤的表观硝化率。在培养 7 d 时,在三种石灰用量中,4 g·kg⁻¹石灰处理表观硝化率最高,其次为 6 g·kg⁻¹石灰处理,最低为 2 g·kg⁻¹石灰,而在培养 14 和 21 d,三种石灰用量之间土壤表观硝化率无显著差异;在培养 35 d 后,各处理表观硝化率均达到 98%以上(表 2)。在施用 DCD 的条件

下,不同石灰用量对土壤表观硝化率无显著影响,且均维持在较低水平(<30%),显著低于不施 DCD 处理(表 2)。

进一步分析了施用石灰引起的土壤 pH 变化与表观硝化率之间的相关性。结果表明,在培养第 7、14、21 天,若不添加 DCD,土壤表观硝化率随土壤 pH 的增加呈现先增加后降低的抛物线趋势(图 4)。培养第 7、14、21 天的表观硝化率均在 pH 6.9 左右达

表 2 石灰和 DCD 处理下的土壤表观硝化率

Table 2 Effects of lime and DCD addition on apparent soil nitrification rate/%

| 石灰用量 Lime application rate/ (g·kg ⁻¹) | 7 d | | 14 d | | 21 d | | 35 d | |
|---|---------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|
| | -DCD | +DCD | -DCD | +DCD | -DCD | +DCD | -DCD | +DCD |
| 0 | 19.18c | 5.03a* | 56.68b | 12.68a* | 78.10b | 16.48a* | 98.11a | 27.00a* |
| 2 | 38.52bc | 7.60a* | 91.51a | 15.67a* | 94.49a | 16.67a* | 98.03a | 26.20a* |
| 4 | 75.67a | 2.99a* | 98.15a | 9.97a* | 98.47a | 17.14a* | 98.13a | 24.59a* |
| 6 | 66.86ab | 8.68a* | 97.92a | 15.61a* | 97.44a | 13.43a* | 98.11a | 25.57a* |

注:不同小写字母表示不同石灰用量之间差异显著($P<0.05$);*表示施加 DCD 和不施 DCD 处理之间差异显著($P<0.05$)。Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between different rates of liming ($P<0.05$); * indicates significant difference between +DCD and -DCD treatments ($P<0.05$).

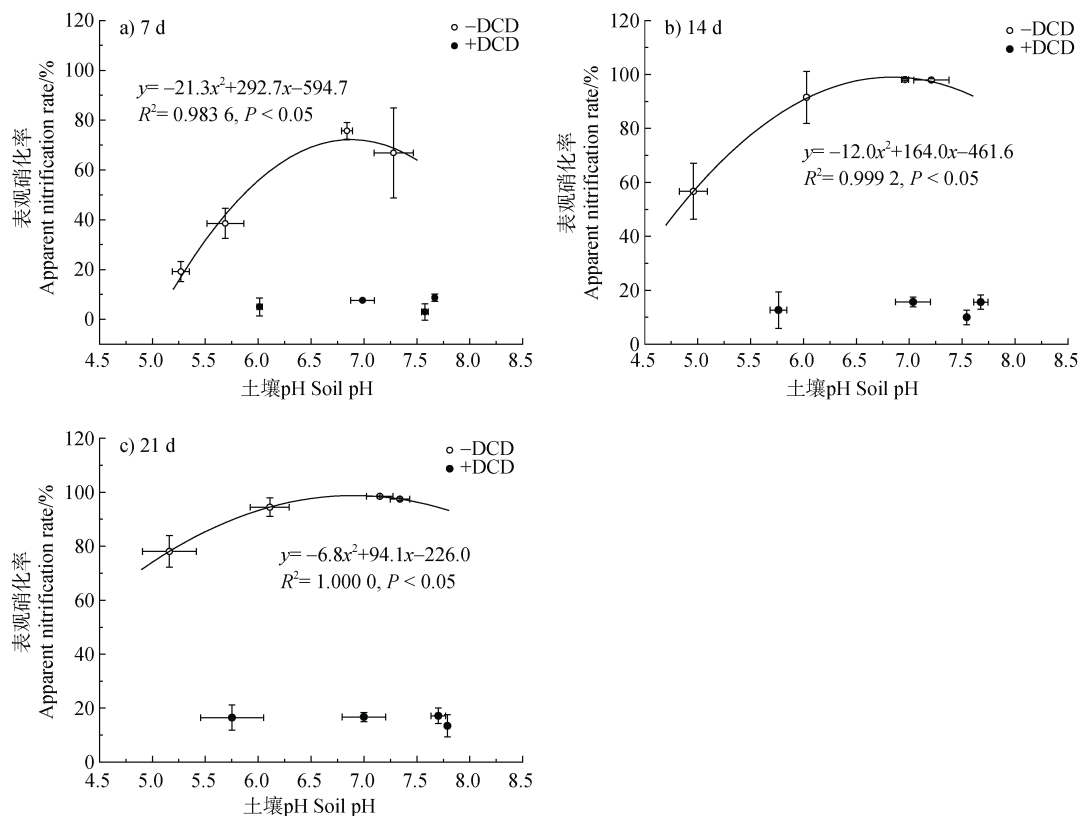


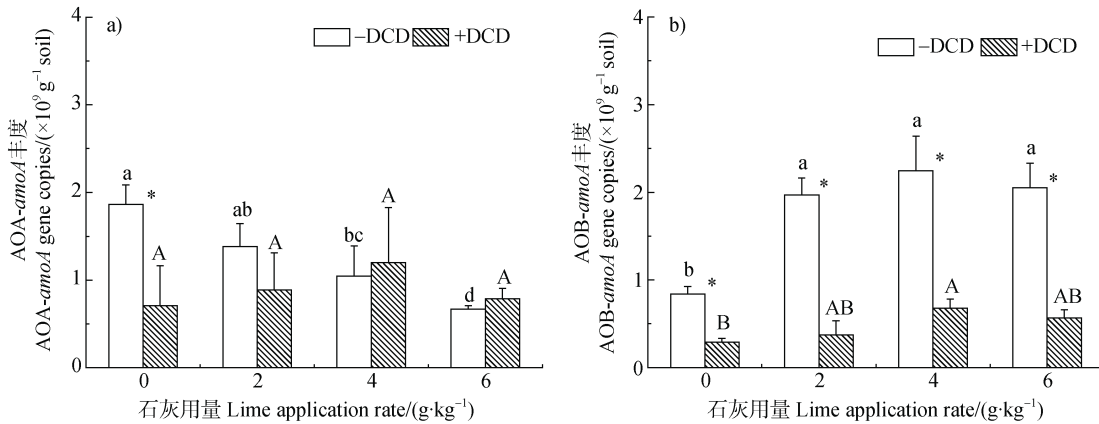
图 4 土壤 pH 与土壤表观硝化率的关系

Fig. 4 Correlations between soil pH and apparent nitrification rate

到峰值，峰值分别为 72.2%、99.1%和 98.8%。若添加 DCD，土壤表观硝化率不受土壤 pH 影响（图 4）。

2.4 石灰和硝化抑制剂对土壤 AOA 和 AOB *amoA* 丰度的影响

在培养 35 d 后，在不施 DCD 的条件下，AOA 的丰度随着石灰用量的增加逐渐降低（图 5a），而石灰的施用却显著增加了土壤中 AOB 的丰度（图 5b）。



注：图中不同小写字母表示在不添加 DCD 的条件下不同石灰用量之间差异显著 ($P < 0.05$)；不同大写字母表示在添加 DCD 的条件下不同石灰用量之间差异显著 ($P < 0.05$)；*表示施加 DCD 和不施 DCD 处理之间差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different rates of liming without DCD addition ($P < 0.05$); different capitals indicate significant differences between different rates of liming with DCD addition ($P < 0.05$); * indicates significant difference between +DCD and -DCD treatments ($P < 0.05$).

图 5 石灰和 DCD 对 AOA 和 AOB *amoA* 基因拷贝数的影响

Fig. 5 Effects of lime and DCD on *amoA* gene copies in AOA and AOB

通径分析一方面可以确定自变量与因变量之间的直接关系（直接通径系数），同时也可确定自变量 1 通过影响自变量 2 而对因变量产生的间接影响（间接通径系数）^[20]。由此可从直接影响和间接影响两方面深入研究自变量与因变量之间的相关性。土壤硝化作用主要由 AOA 和 AOB 来主导，二者可以单独或者联合来控制土壤硝化作用。在添加 DCD 的条件下，土壤硝化作用很弱。通过通径分析进一步分析了在不添加 DCD 的条件下 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度对 7、14、21 d 土壤表观硝化速率的影响（表 3）。在不添加 DCD 的条件下，AOA 丰度对土壤表观硝化率的直接影响为负值，意味着随着 AOA 丰度的增加，土壤表观硝化率降低，但二者之间相关性在统计学上并不显著。同时，AOA 丰度也通过负面影响 AOB 的丰度而间接降低土壤表观硝化率；相反，在培养 14 和 21 d 后，AOB 丰度直接影响表观硝化速率，且呈现显著正相关关系（表 3）。这些结

果进一步证明石灰诱导的酸性红壤硝化作用增强是由 AOB 所主导。

果进一步证明石灰诱导的酸性红壤硝化作用增强是由 AOB 所主导。

3 讨论

3.1 石灰和 DCD 对红壤酸化的影响

本研究表明，无论是否添加 DCD，当石灰用量小于 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时，土壤 pH 随石灰用量的增加显著增加，而当石灰用量大于 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时，继续增施石灰对土壤 pH 的提高并不显著（图 1）。这可能是因为石灰可以在短时间内中和土壤中的 H^+ ，对提高土壤 pH 有很强的瞬时效果，随后由于土壤自身的缓冲作用，当到达土壤缓冲的临界值时，继续增加石灰用量不会造成土壤 pH 的进一步增加^[21]。同时本研究也发现，在不添加 DCD 的条件下，随着培养时间的延长，石灰对土壤 pH 的提高效果有逐渐降低的趋势（图 1），这与前人^[21-22]的研究结果相似。其原因可能是由于

表 3 不施 DCD 条件下对土壤 AOA、AOB 丰度与表观硝化率的途径分析

Table 3 Path coefficient analysis of the *amoA* gene copies in ammonia oxidizing archaea and bacteria and apparent nitrification rate without DCD

| 培养天数 Duration of cultivation/d | 自变量 Independent variable | 与表观硝化率的相关系数 Correlation coefficient | 直接途径系数 (直接作用) Direct path coefficient (direct effect) | | 间接途径系数 (间接作用) Indirect path coefficient (indirect effect) | |
|--------------------------------------|-----------------------------|--|---|-------|--|-------------------------|
| | | | | | AOA 丰度 | AOB 丰度 |
| | | | | | AOA- <i>amoA</i> copies | AOB- <i>amoA</i> copies |
| 7 | AOA 丰度 ^① | -0.897 | -0.548 | — | -0.349 | |
| | AOB 丰度 ^② | 0.875 | 0.419 | 0.456 | — | |
| 14 | AOA 丰度 ^① | -0.883 | -0.186 | — | -0.697 | |
| | AOB 丰度 ^② | 0.993* | 0.838 | 0.155 | — | |
| 21 | AOA 丰度 ^① | -0.876 | -0.154 | — | -0.722 | |
| | AOB 丰度 ^② | 0.996* | 0.868* | 0.128 | — | |

注: *表示自变量与因变量之间显著相关 ($P < 0.05$)。Note: *indicates significant correlations of *amoA* copies in ammonia oxidizing archaea and bacteria with apparent nitrification rate at $P < 0.05$. ①AOA-*amoA* copies, ②AOB-*amoA* copies.

施用石灰增强了土壤硝化作用, 从而增加了 H^+ 的释放^[7]。在添加 DCD 的条件下, 在整个培养期间土壤 pH 一直保持稳定且始终高于不加 DCD 处理。在施用 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 石灰的条件下, 添加 DCD 处理的土壤 pH 可基本与施用 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 石灰处理相持平, 这与刘源等^[23]的研究结果相似。充分说明 DCD 可通过抑制铵态氮的硝化过程以减缓酸化进程。因此, 在酸性土壤改良的过程中, 不仅需要添加石灰提高土壤 pH, 还需从源头抑制硝化作用, 进行酸化阻控。

3.2 石灰用量对红壤硝化作用的影响及其机制

硝化过程是对 pH 高度敏感的生物学过程^[16]。施用石灰在大幅度提高酸性红壤 pH 的同时, 也显著影响硝化反应的进行。在本研究中, 土壤表观硝化率在土壤 pH 为 7 左右时达到峰值, 之后随着土壤 pH 的增加, 表观硝化率呈现降低趋势 (表 2)。这与 Bramley 和 White^[24]的研究结果相似。究其原因主要有以下两点: (1) pH 的升高会促进氨挥发发生, 当 pH 达到 7 左右时, 继续提高土壤 pH 势必会造成更多的氨挥发损失, 进而降低底物浓度; (2) 高 pH 有可能会抑制硝化细菌的活性。Bramley 和 White^[24]研究发现, 土壤硝化细菌活性在土壤 pH 6.0 附近达到最高, 其后随着 pH 的增加而降低。本研究也同样发现, 随着 pH 的增加, AOA 丰度持续降低, AOB 丰度先增加后趋于平缓 (图 5), 与土壤表观硝化率高度相关, 进一步证明高 pH 环境对硝化微生物的抑制作用。但是, 也有研究表明, 将初始

pH 为 7.24 的紫色土用石灰调节至 pH 为 7.70, 在培养 18 d 后, 表观硝化率仍显著增加^[19]。一方面, 在他们的研究中, 施氮量为 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土, 远高于本试验施氮量 ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土), 因此底物浓度不会成为该试验中硝化过程的限制因子; 另一方面, 他们所采用的供试土壤初始 pH 较高 (7.24), 其中的硝化微生物很可能已经适应高 pH 环境, 继续提高土壤 pH 则不会抑制其数量和活性。由此可见, 对于不同土壤、不同培养环境, 达到硝化作用峰值所对应的土壤 pH 也不尽相同, 这可能与添加的底物浓度、土壤初始 pH 及初始硝化微生物数量和活性有关。

本研究中发现, 酸性土壤中增施石灰所引起的硝化作用增强主要是由于 AOB 丰度的增加, 这与众多其他研究结果相似^[7, 25-26]。与前人研究结果不同的是, 在本研究中, 由于 AOA 的喜酸特性^[27], AOA *amoA* 基因丰度随着石灰用量的增加持续降低, 而在 Teutscherova 等^[28]的研究中, 施用石灰后土壤中 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度均显著增加, 造成差异的原因可能与供试土壤中氮素矿化过程有关。AOA 主要利用土壤有机氮矿化释放的少量 NH_3 生长, 在 Teutscherova 等^[28]的研究中, 供试土壤有机碳含量较高 ($25.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 为氮素矿化过程提供了充足碳源。随着 pH 的增加, 土壤中有机氮的矿化过程增强, NH_3 显著增加, 从而促进了 AOA 的生长。而在本研究中, 土壤有机碳含量较低 ($8.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 很可能限制了氮素矿化过程的发生, 进而对 AOA 的生长

无促进作用。

3.3 添加 DCD 对红壤硝化作用的影响及其机制

本研究中,在不施用石灰的条件下,添加 DCD 与不施 DCD 处理相比表观硝化率显著降低,且降低幅度始终保持在 70%左右,证实了 DCD 在抑制酸性红壤硝化过程中的有效性。这与诸多前人^[29-30]研究结果相同。其原因主要是由于 DCD 在酸性条件下显著降低了 AOA 和 AOB 丰度。但是,诸多研究指出,由于 DCD 极易溶于水且移动性较强,降雨会导致其在土壤中发生淋溶损失,减弱其抑制作用^[31]。此外,也有研究表明,DCD 在高温下降解较快,在热带地区不适合采用 DCD 作为硝化抑制剂^[32]。本研究在室内开展,无法完全模拟实际生产中的水热条件。红壤地区多集中于我国东南丘陵区,降雨量大,水热资源丰富,因此,DCD 田间的实际效果尚需进一步验证。

3.4 石灰与 DCD 配合施用对红壤硝化的作用效果

在酸性土壤中,抑制铵态氮向硝态氮的转化对提高酸性土壤氮素利用效率具有重要意义。尽管一般情况下酸性土壤本身的硝化作用较弱,但在生产过程中,人们通常会施用石灰以提高土壤 pH,保证作物产量,由此间接促进了土壤中的硝化过程。传统的硝化抑制剂 DCD 能否在石灰改变 pH 的条件下始终有效抑制硝化是当前红壤区生产中亟需解决的问题。本研究发现,与不施 DCD 对照相比,施用 DCD 在各石灰用量条件下均有效抑制了红壤硝态氮的产生(图 2),显著降低了表观硝化率,且各石灰处理间表观硝化率无显著差异(表 2),充分说明 DCD 的抑制效果不受土壤 pH 升高的影响。与本研究结果不同的是,史云峰等^[32]在海南的砖红壤上研究发现,用石灰调节 pH 后,DCD 的硝化抑制作用随 pH 的升高而降低。此外,最近的研究发现,DCD 在 pH 较高的潮土和水稻土上对硝化作用的抑制效果较明显,而在酸性红壤上的抑制效果较差^[14],也表明 DCD 对硝化作用的抑制效果依赖于土壤 pH,这与本文结果也有所不一致。DCD 施用量的不同可能是造成结果差异的主要原因。在本研究中,DCD 用量为 20 mg·kg⁻¹ 土,为史云峰等^[32]DCD 用量的两倍,早有研究表明,DCD 用量越大,其抑制效果越佳^[33]。因此,需保证 DCD 的较高施用量,以维持较好的抑制效果。

进一步探究 DCD 的作用机理发现,在不同石灰用量条件下,DCD 对硝化作用的抑制机理也不同。在施用石灰的条件下,DCD 主要通过抑制 AOB 的数量达到抑制效果。这与诸多研究^[34]结果相似。原因一方面是由于 AOA 的数量已经被碱性环境强烈抑制,另一方面可能是由于基本代谢和细胞之间的差异,细菌相对古菌更容易受到抑制物的影响^[16]。而在不施石灰的条件下,DCD 对 AOA 和 AOB 的丰度均有显著抑制作用(图 5),意味着在酸性条件下,DCD 可能是通过同时抑制 AOA 和 AOB 来抑制硝化作用。这与 Robinson 等^[26]的结果相同,说明在不同石灰用量(即不同 pH 条件下),DCD 主要通过抑制环境中的主导硝化微生物菌群的生长,从而抑制硝化过程。

4 结 论

通过短期土壤培养试验,本文研究了不同用量石灰和硝化抑制(DCD)对红壤 pH 和硝化作用的影响及其机制。结果发现:(1)施用石灰可以短期显著提高红壤的 pH,但随着培养时间的延长,石灰对红壤 pH 的提高效果有逐渐降低的趋势。施用 DCD 可通过抑制硝化过程提高土壤 pH,减缓土壤酸化;(2)红壤表观硝化率随土壤 pH 的增加呈现先增加后降低的趋势。在土壤 pH 为 6.9 左右时,表观硝化率达到峰值。DCD 对硝化作用的抑制效果不受土壤 pH 影响;(3)施用石灰提高红壤 pH,进而增强硝化作用,其主要是由 AOB 所主导。低 pH(pH < 6.0)条件下,DCD 对 AOA 和 AOB 均有显著抑制作用,而在高 pH(pH 7.0~7.8)条件下,DCD 主要抑制 AOB,而对 AOA 的影响并不显著。这些结果表明,在酸性红壤上,石灰和 DCD 相结合施用,不仅可以提高土壤 pH,减缓土壤酸化,而且可以抑制土壤硝化作用。上述研究结果为酸性红壤改良利用和氮肥施用管理提供了理论支持。

参考文献 (References)

- [1] Zhao Q G. Exploiting resource advantage and innovating research and development potential for social and economic development in red soil region of southern China-In celebration of the 30th anniversary of the establishment of Ecological Experiment Station of Red Soil, Chinese Academy of Sciences[J]. Soils, 2015, 47

- (2): 197—203. [赵其国. 开拓资源优势, 创新研发潜力, 为我国南方红壤地区社会经济发展作贡献——纪念中国科学院红壤生态实验站建站 30 周年[J]. 土壤, 2015, 47 (2): 197—203.]
- [2] Shen R F, Zhao X Q. The sustainable use of acid soils[J]. *Journal of Agriculture*, 2019, 9 (3): 16—20. [沈仁芳, 赵学强. 酸性土壤可持续利用[J]. 农学学报, 2019, 9 (3): 16—20.]
- [3] Zhao X Q, Chen R F, Shen R F. Coadaptation of plants to multiple stresses in acidic soils[J]. *Soil Science*, 2014, 179 (10/11): 503—513.
- [4] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. *Science*, 2010, 327 (5968): 1008—1010.
- [5] Zhang L Y, Zhao X Q, Shen R F. Soil acidification and its ecological effects[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38 (6): 1900—1908. [张玲玉, 赵学强, 沈仁芳. 土壤酸化及其生态效应[J]. 生态学杂志, 2019, 38 (6): 1900—1908.]
- [6] Zhang Z Q, Mao P, Yu D S, et al. Characteristics of soil pH variation in typical red soil region of South China in the past 25 years—A case study of Yujiang County, Jiangxi Province[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2018, 55 (6): 1545—1553. [张忠启, 茆彭, 于东升, 等. 近 25 年来典型红壤区土壤 pH 变化特征——以江西省余江县为例[J]. 土壤学报, 2018, 55 (6): 1545—1553.]
- [7] Che J, Zhao X Q, Zhou X, et al. High pH-enhanced soil nitrification was associated with ammonia oxidizing bacteria rather than archaea in acidic soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 85: 21—29.
- [8] Ju X T, Xing G X, Chen X P, et al. Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106 (9): 3041—3046.
- [9] Nieder R, Benbi D K, Scherer H W. Fixation and defixation of ammonium in soils: A review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47 (1): 1—14.
- [10] Zhang H Q, Zhao X Q, Chen Y L, et al. Case of a stronger capability of maize seedlings to use ammonium being responsible for the higher ¹⁵N recovery efficiency of ammonium compared with nitrate[J]. *Plant and Soil*, 2019, 440 (1/2): 293—309.
- [11] Zhao X Q, Shen R F. Aluminum-nitrogen interactions in the soil-plant system[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: Article 807.
- [12] Zhao X Q, Shen R F. Strategies for increasing the utilization of nitrogen and phosphorus by plants under aluminum stress[J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51 (10): 1583—1589. [赵学强, 沈仁芳. 提高铝毒胁迫下植物氮磷利用的策略分析[J]. 植物生理学报, 2015, 51 (10): 1583—1589.]
- [13] Abalos D, Jeffery S, Sanz-Cobena A, et al. Meta-analysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2014, 189: 136—144.
- [14] Lu Y F, Zhang X N, Jiang J F, et al. Effects of the biological nitrification inhibitor 1, 9-decanediol on nitrification and ammonia oxidizers in three agricultural soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 129: 48—59.
- [15] Yang J B, Li X C, Xu J J, et al. Effects of nitrification inhibitors on nitrogen transformation in different soils [J]. *Soils*, 2014, 46 (2): 319—324. [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, 2014, 46 (2): 319—324.]
- [16] He J Z, Zhang L M. Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation[J]. *Microbiology China*, 2013, 40 (1): 98—108. [贺纪正, 张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制[J]. 微生物学通报, 2013, 40 (1): 98—108.]
- [17] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (41): 14683—14688.
- [18] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 4704—4712.
- [19] Gu Y, Wu L H, Hu Z P. 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. [顾艳, 吴良欢, 胡兆平. 土壤 pH 值和含水量对土壤硝化抑制剂效果的影响[J]. 农业工程学报, 2018, 34 (8): 132—138.]
- [20] Du J J, Chen Z W. Method of path analysis with SPSS linear regression[J]. *Bulletin of Biology*, 2010, 45 (2): 4—6. [杜家菊, 陈志伟. 使用 SPSS 线性回归实现路径分析的方法[J]. 生物学通报, 2010, 45 (2): 4—6.]
- [21] Zhan S J, Yu H, Feng W Q, et al. Effects of different organic material and lime on soil pH and available cadmium[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24 (3): 999—1003. [詹绍军, 喻华, 冯文强, 等. 有机物料与石灰对土壤 pH 和镉有效性的影响[J]. 西南农业学报, 2011, 24 (3): 999—1003.]
- [22] Hu M, Xiang Y S, Lu J W. Effects of lime application rates on soil pH and available nutrient content in acidic soils[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2017 (4): 72—77. [胡敏, 向永生, 鲁剑巍. 石灰用量对酸性土壤 pH 值及有效养分含量的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2017 (4): 72—77.]

- [23] Liu Y, Qian W, Xu R K. Inhibitory effect of dicyandiamide on acidification of red soils induced by ammonium-based fertilizers[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2013, 29 (1): 76—80. [刘源, 钱薇, 徐仁扣. 双氰胺对施氮肥引起的红壤酸化的抑制作用[J]. *生态与农村环境学报*, 2013, 29 (1): 76—80.]
- [24] Bramley R G V, White R E. The effect of pH, liming, moisture and temperature on the activity of nitrifiers in a soil under pasture[J]. *Soil Research*, 1989, 27 (4): 711—724.
- [25] Zhang K, Chen L, Li Y, et al. The effects of combinations of biochar, lime, and organic fertilizer on nitrification and nitrifiers[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53 (1): 77—87.
- [26] Robinson A, Di H J, Cameron K C, et al. The effect of soil pH and dicyandiamide (DCD) on N₂O emissions and ammonia oxidiser abundance in a stimulated grazed pasture soil[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2014, 14 (8): 1434—1444.
- [27] Prosser J I, Nicol G W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil : The quest for niche specialisation and differentiation[J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20 (11): 523—531.
- [28] Teutscherova N, Vazquez E, Masaguer A, et al. Comparison of lime- and biochar-mediated pH changes in nitrification and ammonia oxidizers in degraded acid soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53 (7): 811—821.
- [29] Li Z Y, Liang J Z. The inhibitory effect of dicyandiamide on nitrification in latosolic red soil[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42 (10): 1238—1240. [李卓勇, 梁家作. 双氰胺对赤红壤中氯化铵硝化抑制效应研究[J]. *南方农业学报*, 2011, 42 (10): 1238—1240.]
- [30] Huo M X, Zou J, Huang F Y. Effects of nitrogenous fertilizer synergist on soil N transformation derived from granite in Hainan[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2012 (4): 34—38. [霍敏霞, 邹杰, 黄芳英. 氮肥增效剂对海南砖红壤土壤氮转化影响的研究[J]. *中国土壤与肥料*, 2012 (4): 34—38.]
- [31] Teske W, Matzel W. The influence of decomposition and translocation of dicyandiamide in the soil on its nitrification inhibiting effect[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 1988, 32 (4): 241—246.
- [32] Shi Y F, Zhao M Q, Zhang L L. Research on the factors affecting nitrification inhibition of dicyandiamide (DCD) in Latosol[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2011, 39 (33): 20437—20440. [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[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39 (33): 20437—20440.]
- [33] McCarty G W, Bremner J M. Laboratory evaluation of dicyandiamide as a soil nitrification inhibitor[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1989, 20 (19/20): 2049—2065.
- [34] Mao X W, Cheng M, Xu Q F, et al. Effects of nitrification inhibitors on soil N₂O emission and community structure and abundance of ammonia oxidation microorganism in soil under extensively managed *Phyllostachys edulis* stands[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (6): 1528—1540. [毛新伟, 程敏, 徐秋芳, 等. 硝化抑制剂对毛竹林土壤 N₂O 排放和氨氧化微生物的影响[J]. *土壤学报*, 2016, 53 (6): 1528—1540.]

(责任编辑: 陈荣府)