

DOI: 10.11766/trxb202101080015

沈晓忆, 夏围围, 次仁拉姆, 李乙坤. 短期培养下抑制剂烯丙基硫脲对土壤硝化作用及微生物的影响[J]. 土壤学报, 2021, 58(6): 1552–1563.
SHEN Xiaoyi, XIA Weiwei, Cirenlamu, LI Yikun. Effect of Allylthiourea on Soil Nitrification and the Underlying Microbial Mechanism in Short-term Laboratory Microcosms[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58(6): 1552–1563.

短期培养下抑制剂烯丙基硫脲对土壤硝化作用及微生物的影响*

沈晓忆, 夏围围[†], 次仁拉姆, 李乙坤

(南京信息工程大学应用气象学院/江苏省农业气象重点实验室, 南京 210044)

摘要: 硝化抑制剂烯丙基硫脲(ATU)对土壤硝化作用及温室效应的影响及机理尚不清楚。采集典型旱地土壤,进行21 d室内微宇宙培养,探究氮肥与不同剂量ATU(分别为氮素用量的1%、5%、10%、15%和20%)配施对土壤硝化作用及N₂O和CO₂排放通量的影响,并通过实时荧光定量PCR和高通量测序16S rRNA基因技术监测硝化微生物群落变化,同时与传统硝化抑制剂双氰胺(DCD)进行保氮减排效果的对比。结果表明,与未施加氮肥的对照相比(CK),单施氮肥(N)显著提高土壤硝化强度并促进N₂O排放。DCD能显著抑制硝态氮和N₂O的积累,抑制效率分别为68.6%和93.3%。而低浓度ATU对土壤硝化作用无影响,仅在高浓度具有抑制效应,且抑制效率最高仅为14.7%。所有ATU处理N₂O排放量均显著降低,降幅为60.3%~68.2%,仍远高于DCD处理。处理间N₂O和CO₂的综合温室效应强弱顺序为N>ATU+N>DCD+N≈CK,不同ATU施用量处理之间差异不显著。相关分析发现氨氧化细菌(AOB),而不是氨氧化古菌(AOA)和全程氨氧化细菌(Comammox),与土壤硝态氮积累和N₂O排放显著正相关,与土壤pH显著负相关。高通量测序结果表明*Nitrosovibrio tenuis*类型AOB对氮肥诱导的硝化过程起主导作用。此外,ATU和DCD还能显著提高*Cupriavidus*,并降低*Patulibacter*、*Aeromicrobium*、*Actinomycetospora*、*Defluviicoccus*和*Acidipila*等微生物属在群落中的相对丰度。该研究为深化土壤碳氮循环理论,合理使用硝化抑制剂以及减缓温室气体排放提供科学依据。

关键词: 烯丙基硫脲(ATU); 双氰胺(DCD); 硝化作用; N₂O; 土壤微生物

中图分类号: X171 : S154.3 **文献标志码:** A

Effect of Allylthiourea on Soil Nitrification and the Underlying Microbial Mechanism in Short-term Laboratory Microcosms

SHEN Xiaoyi, XIA Weiwei[†], Cirenlamu, LI Yikun

(Jiangsu Key Laboratory of Agricultural Meteorology, College of Applied Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China)

* 国家自然科学基金项目(41501267)和土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放课题(Y20160025)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41501267) and the State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences (No. Y20160025)

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

作者简介: 沈晓忆(2000—),女,江苏苏州人,主要从事农田土壤硝化过程的调控机理研究。E-mail: shen_xiaoyi0721@163.com

收稿日期: 2021-01-08; 收到修改稿日期: 2021-03-22; 网络首发日期(www.cnki.net): 2021-06-01

Abstract: 【Objective】 Allylthiourea (ATU) is a promising nitrification inhibitor. However, its effects on soil nitrification and greenhouse gas (GHG) mitigation are still unclear. 【Method】 In this study, a 21-day microcosm incubation was established with the application of nitrogen (N) and different doses of ATU (1%, 5%, 10%, 15% and 20% of N applied) to a yellow-brown upland soil. Also, dicyandiamide (DCD, 10% of N applied) was applied to compare the inhibition efficiency on nitrification and GHG emission with ATU. The dynamics of inorganic nitrogen and N_2O/CO_2 emission during the incubation were detected, and changes in the different microbial population were analyzed by real-time PCR and 16S rRNA gene-based high through-put sequencing. 【Result】 N application greatly stimulated soil nitrification activity and promoted N_2O emission. DCD had a strong inhibitory effect on soil nitrification (68.6%) and N_2O emission (93.3%). ATU did not influence soil nitrification at low doses (<5%), but inhibited the nitrate accumulation at high doses (>10%) with the highest inhibition efficiency of 14.7%. All treatments with ATU decreased N_2O emission by 60.3%~68.2% but was still much higher than when DCD was applied. In general, the global warming potential (GWP) of N_2O and CO_2 were the highest in N treatment and seconded by ATU+N treatment. There were no significant differences in GWP between DCD+N and CK treatment, or among different doses of ATU with N treatments. The quantitative real-time PCR of *amoA* genes suggested that ammonia-oxidizing bacteria (AOB) rather than ammonia-oxidizing archaea (AOA) and complete ammonia-oxidizing bacteria (Comammox), had a positive relationship with soil nitrate accumulation and N_2O emission: but a negative correlation with pH. Microbial community analysis by high through-put sequencing revealed *Nitrosovibrio tenuis*-like AOB dominated in soil nitrification process which was greatly stimulated by nitrogen. Besides, ATU and DCD significantly increased the relative abundance of *cupriavidus* but reduced the relative abundance of *Patulibacter*, *Aeromicrobium*, *Actinomycetospora*, *Defluviicoccus* and *Acidipila*. 【Conclusion】 This study reveals the exact mechanisms of ATU on soil microbial guilds and GHG emission and plays an important role in the future implementation of agricultural management strategies and the evaluation of global climate change.

Key words: Allylthiourea (ATU); Dicyandiamide (DCD); Nitrification; N_2O ; Soil microorganism

硝化作用是全球氮循环的中心环节，是微生物在有氧条件下将铵态氮 (NH_4^+-N) 转变为硝态氮 ($NO_3^- -N$) 的主要过程。农田土壤的硝化作用导致约 70% 铵态氮肥损失，还会产生大量易淋溶硝酸盐和温室气体 N_2O ^[1-2]。因此，研究硝化抑制剂，降低硝化微生物的活性，减缓铵态氮向硝态氮的转化，能够提升氮肥利用率，并有利于生态环境保护。

硝化作用由氨氧化微生物和亚硝酸盐氧化微生物 (NOB) 共同催化完成。由于氨氧化是硝化作用第一步且是限速步骤，因此，氨氧化微生物成为全球氮循环的研究热点。氨氧化微生物主要包括氨氧化古菌 (AOA)、细菌 (AOB) 和新发现的全程氨氧化细菌 (Comammox)^[3]。土壤中 AOA 数量通常高于 AOB^[4]。然而，AOA 和 AOB 生理活性受土壤 pH、氮的来源和浓度等环境因素的影响。其中，AOA 倾向于贫营养环境生长，在酸性土壤中主导硝化过程^[5]，而 AOB 则更加适应铵态氮浓度较高的环境，如中性-碱性土壤^[6]。Comammox 可以进行一步硝化，挑战了传统分步硝化理论。已培养的 Comammox 具有贫营养生活方式^[7]，但最近 Li 等^[8]

发现 Comammox 在施用氮肥的农田土壤中也具有硝化活性，表明 Comammox 在氮循环中的生态作用仍需深入评估。

硝化抑制剂主要通过影响氨单加氧酶 AMO 活性、抑制硝化细菌呼吸、改变土壤微域环境或影响土壤氮矿化和固持过程等方式，抑制硝化作用^[9]。硝化抑制剂与氮肥配施已被证明是一项现实有效的保氮减排措施。其中，双氰胺 (DCD) 的应用最为广泛，在较多田间试验中表现出显著抑制硝酸盐积累，并降低 N_2O 排放的效果^[10]。烯丙基硫脲 (ATU) 在众多液体培养基和污泥反应器研究中显示出优越的抑制细菌硝化的性能^[11]，表明其在调控 AOB 主导的土壤硝化过程中具有应用潜力。一些研究表明 ATU 可以显著抑制土壤 AOB 生长和硝酸盐积累^[12-13]，也有研究表明 ATU 不能有效抑制土壤硝化作用^[14]，以上结果差异可能与 ATU 施用量和土壤类型有关。张苗苗等^[9]还指出 ATU 可能存在一定化学毒性不宜推广，但可能引发何种生态效应未见报道。因此，系统探究 ATU 在土壤中的有效抑制浓度和微生物机理，有利于明确 ATU 施用的生态环境后果。

本研究以 DCD 为参考, 采用室内微宇宙培养法, 评价 ATU 施用量对土壤氮素转化及 N_2O 和 CO_2 排放的影响, 进一步结合分子生物学手段, 明确不同土壤微生物类型对 ATU 的响应机制。该研究将加深碳氮循环微生物机理的理解, 为指导农业生产和缓解气候变化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

土壤取自安徽省巢湖市栏杆集镇 (117°50'E, 31°59'N), 土壤类型为黄棕壤, 种植作物为玉米, 采集于 2019 年 10 月玉米收获后。采用五点交叉法进行采样, 用土钻采集耕层 0~20 cm 土壤混合组成代表土样。将土样去除石块、植物残体, 过 2 mm 筛并混合均匀, 4 °C 保存待用。土壤基本理化性质为: pH (H_2O) 5.99; 硝态氮 9.20 $mg \cdot kg^{-1}$; 铵态氮 1.18 $mg \cdot kg^{-1}$; 全碳 7.41 $g \cdot kg^{-1}$; 全氮 0.75 $g \cdot kg^{-1}$; 碳氮比 9.92; 含水量 5.88%; 最大持水量 (SWHC) 61.5%。

1.2 微宇宙培养

培养设 8 个处理: (1) CK 处理: 以等体积去离子水代替其他底物加入土壤; (2) N 处理: 氮肥选用硫酸铵, 以 N 200 $\mu g \cdot g^{-1}$ 施入土壤, 其他施氮处理的氮肥形式和用量与此相同; (3) 1-ATU+N 处理: ATU 用量为施氮量的 1%, 按 2 $\mu g \cdot g^{-1}$ 施入土壤; (4) 5-ATU+N 处理: ATU 用量为施氮量的 5%, 按 10 $\mu g \cdot g^{-1}$ 施入土壤; (5) 10-ATU+N 处理: ATU 用量为施氮量的 10%, 按 20 $\mu g \cdot g^{-1}$ 施入土壤; (6) 15-ATU+N 处理: ATU 用量为施氮量的 15%, 按 30 $\mu g \cdot g^{-1}$ 施入土壤; (7) 20-ATU+N 处理: ATU 用量为施氮量的 20%, 按 40 $\mu g \cdot g^{-1}$ 施入土壤; (8) 10-DCD+N 处理: DCD 用量为施氮量的 10%, 按 20 $\mu g \cdot g^{-1}$ 施入土壤。

具体实验操作^[15]如下: 称取 5.29 g 新鲜土壤(相当于 5.0 g 干土), 均匀平铺于 120 mL 玻璃培养瓶瓶底, 用微量注射器逐滴均匀向土壤中加入灭菌去离子水, 调节土壤水分至最大持水量 40%, 用橡胶塞密封, 于 28 °C 恒温培养箱中, 避光预培养 3 d, 以恢复土壤微生物活性。预培养结束后, 将培养瓶取出, 打开橡胶塞, 更新培养瓶上部空气, 用微量注射器逐滴均匀向土壤加入对应底物, 使土壤水分

达最大持水量 60%, 塞紧橡胶塞, 重新置于 28 °C 恒温培养箱, 避光培养 21 d。每个处理设置 3 个重复。

1.3 温室气体 CO_2 、 N_2O 和 CH_4 的排放动态

在 0、7、14、21 d 分别采集培养瓶上部气体, 用气相色谱仪 (Agilent7890) 分别对 CO_2 、 N_2O 和 CH_4 的浓度进行检测。采完气后, 将培养瓶橡胶塞打开, 更新瓶内空气, 再塞紧橡胶塞, 于 28 °C 恒温培养箱中继续培养。每种气体的累积排放量以其周排放量之和表示。经检测, CH_4 排放量低于检测限, 故仅以图表展示 CO_2 和 N_2O 动态排放情况。

N_2O 的增温潜势是 100 年时间尺度上单位质量 CO_2 的 298 倍。由 CO_2 和 N_2O 的累积排放量, 可计算综合温室效应 (Global warming potentials, GWP), 公式如下:

$$GWP = GWP_{CO_2} + GWP_{N_2O} \times 298 \quad (1)$$

1.4 土壤无机氮与 pH 测定

在 7、14、21 d 进行破坏性采样。从每个培养瓶中各取 1.5 g 土壤置于无菌离心管, 保存于 -20 °C, 以备后续分子生物学分析。再取出 1.5 g 于 10 mL 离心管中, 以 1:5 (w/v) 加入 1 mol·L⁻¹ KCl 溶液, 充分震荡并静置 30 min, 用玻璃电极测定土壤 pH^[16]; 剩余土壤(约 3.8 g)以 1:5 (w/v) 加入 2 mol·L⁻¹ KCl 溶液, 以 200 r·min⁻¹ 震荡 60 min, 过滤后将滤液经流动分析仪 (Skalar, Inc., Breda, Netherlands) 测定土壤铵态氮和硝态氮含量。

1.5 土壤微生物 DNA 提取和实时荧光定量 PCR 监测

利用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) 试剂盒提取土壤微生物总 DNA, 并溶解于 100 μL 无菌水。通过 Nano Drop[®] ND-2000 微量紫外分光光度计, 测定土壤总 DNA 浓度和纯度, 确保大部分 DNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.0 之间以保证 DNA 质量。最后将 DNA 稀释 10 倍后, 保存于 -20 °C。

实时荧光定量 PCR 的引物和反应条件, 见表 1。PCR 扩增反应体系为: 10 μL 的 TB Green[™] Premix Ex Taq[™] II (Takara), 上、下游引物 (20 $\mu mol \cdot L^{-1}$) 各 1.0 μL , 1.0 μL 稀释 10 倍的 DNA 模板, 补充灭菌双蒸水至 20 μL 。采用无菌水代替 DNA 作为严格的阴性对照。定量 PCR 反应在 CFX96 Optical

表 1 荧光实时定量 PCR 引物和反应条件

Table 1 Primers and conditions used in this study

目标基因 Targeted gene	引物 Primer	PCR 反应条件 Thermal profile
16S rRNA gene	515F/907R	95℃, 3 min: 40 cycles × (95℃, 30 s: 55℃, 30 s: 72℃, 30 s)
AOB <i>amoA</i> gene	amoA-1F/amoA-2R	95℃, 3 min: 40 cycles × (95℃, 30 s: 56℃, 30 s: 72℃, 30 s)
AOA <i>amoA</i> gene	Arch-amoAF/Arch-amoAR	95℃, 3 min: 40 cycles × (95℃, 30 s: 55℃, 30 s: 72℃, 45 s)
Comammox <i>amoA</i> gene	comamoA F/comamoA R	95℃, 3 min: 40 cycles × (95℃, 30 s: 56℃, 30 s: 72℃, 30 s)

Real-Time Detection System (Bio-Rad) 上进行。获得扩增产物后, 通过 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的特异性。

1.6 高通量测序 16S rRNA 基因分析土壤微生物群落

由上海派森诺生物科技股份有限公司 (Shanghai Personal Biotechnology Co., Ltd) 对土壤样品中微生物 16S rRNA 基因 V4 区进行扩增 (引物 515F/907R) 和建库, 最后在 Illumina NovaSeq PE250 测序系统上进行双端测序。下机数据先根据 barcode 信息进行样本划分, 去除 barcode 序列。再通过 FLASH^[17] 软件进行双端合并 (-m 15 -M 300 -x 0.2 -p 33 -t 6)。最后利用 QIIME2^[18] 流程进行 ASV (100% 相似度聚类) 分析, 主要步骤为: 使用 dada2 denoise-single 插件^[19] 进行质控和特征序列 ASV 提取 (--p-trim-left 0 --p-trunc-len 350), 获取 ASVs 丰度表; 再将 ASVs 用 classify-consensus-blast 插件, 按照默认参数^[20], 以 silva138 数据库^[21] 为参考进行物种注释。最后, 在各分类水平统计样本的群落组成和各分类单元的相对丰度。相对丰度, 以各样本中每个分类单元的 ASV 序列除以总序列条数的值表示。所测序列已提交至 NCBI SRA (Sequence Read Archive), 序列号 PRJNA699396。

1.7 统计分析

采用 SPSS 16.0 进行统计分析。采用单因素方差分析检验同一时刻不同处理样品间的差异显著性 ($P < 0.05$)。采用 Pearson 双尾 t 检验分析土壤微生物指标与温室气体排放量以及土壤理化性质的相关性。

2 结果

2.1 土壤无机氮转化强度

土壤硝化强度, 以培养期内土壤 NO_3^- -N 增加量

表示。由图 1 可知, 与 CK 对照相比, 施用氮肥显著提高了土壤硝化强度, DCD 极大程度上抑制了土壤硝化作用, 而低浓度 ATU 对硝化强度的影响不显著, 提高 ATU 浓度对 NO_3^- -N 的积累产生了一定抑制。经过 21 d 培养, N 处理土壤 NO_3^- -N 含量较 CK 处理增加 $215.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。10-DCD+N 处理土壤 NO_3^- -N 含量较 N 处理减少了 $152.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (抑制效率 68.6%), 且每周净硝化速率 (图 1c) 均低于 N 处理。培养 21 d 后, ATU+N 处理 (除 1-ATU+N) 显著抑制了土壤 NO_3^- -N 的增加, 且随 ATU 用量增大, 对硝化的抑制程度增强。20-ATU+N 处理对硝化作用的抑制效率仅为 14.7%, 远低于 10-DCD+N 处理。培养 21 d 后, N 和 ATU+N 处理土壤中大量 NH_4^+ -N 已转变为 NO_3^- -N, 而 10-DCD+N 处理中土壤 NH_4^+ -N 含量仍维持在较高水平。

DCD 和 ATU 均能通过抑制硝化, 减缓土壤酸化。与 CK 相比, N 处理显著降低了土壤 pH, 在 14 和 21 d 分别降低 0.41 和 0.63。ATU 和 DCD 在 14 和 21 d 土壤 pH 则均显著高于 N 处理。10-DCD+N 处理在 14 和 21 d 土壤 pH 与 CK 处理无显著差异。

2.2 N_2O 和 CO_2 通量变化及综合温室效应

N_2O 和 CO_2 累积排放量随培养时间延长而增加, 但处理间存在明显差异 (图 2)。N₂O 的排放情况, 如图 2a 所示。在 21 d 培养期内, CK 处理 N₂O 累积排放量最低, 仅为 $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。而单独施氮 (N 处理) 强烈刺激了 N₂O 排放, N₂O 累积排放量在所有处理中最高, 达 $3.15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 较 CK 处理提高 87.6 倍。ATU 与 N 配施显著抑制了 N₂O 排放, 但不同 ATU 用量间差异不显著。ATU+N 处理中 N₂O 累积排放量较 N 处理降低了 60.3%~68.2%。与 ATU+N 相比, 10-DCD+N 处理对 N₂O 抑制作用更为强烈, N₂O 累积排放量仅为 N 处理的 6.7%。各处理 CO₂ 累积排放量 (图 2b) 均高于 N₂O, 是 N₂O 的 118.7

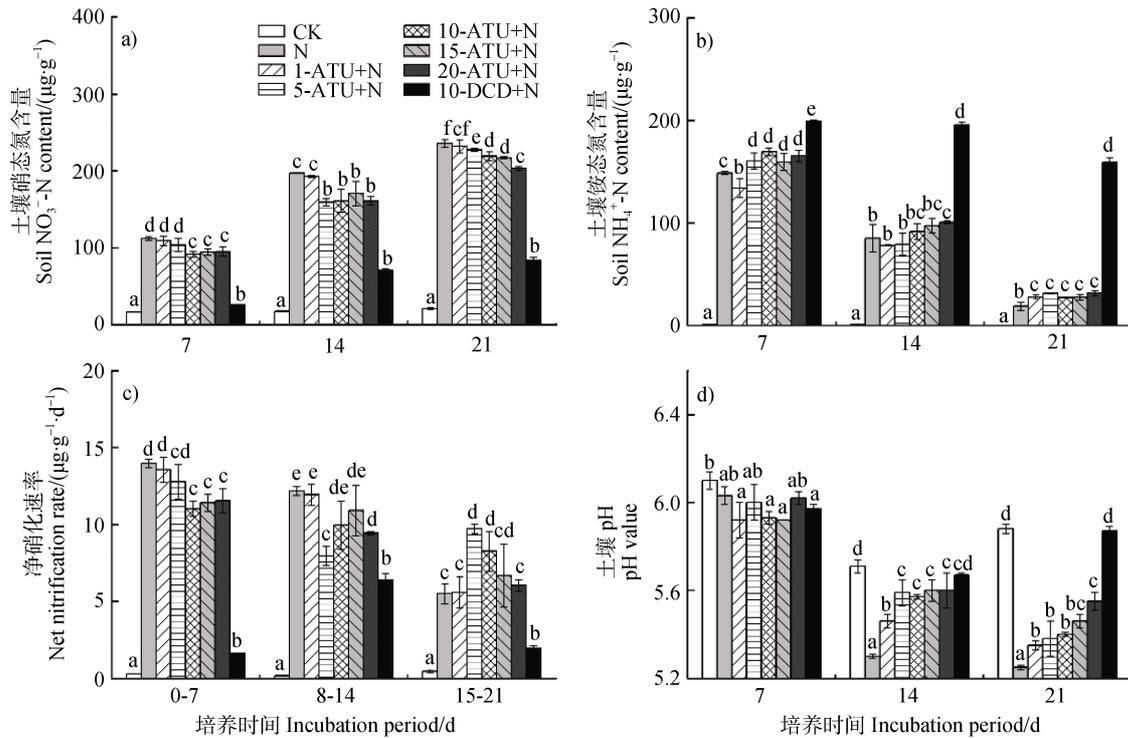


图 1 培养期间各处理土壤硝态氮含量 (a)、铵态氮含量 (b)、净硝化速率 (c) 以及 pH (d) 的变化

Fig. 1 Change of soil NO_3^- -N (a) and NH_4^+ -N content (b), net nitrification rate (c) and pH (d) in different treatments during the microcosm incubation

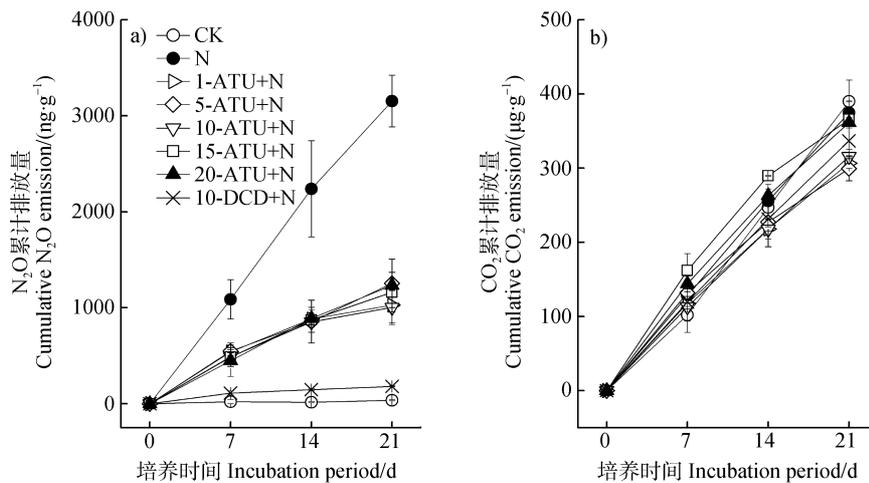


图 2 培养期间各处理 N_2O (a) 和 CO_2 (b) 的排放动态

Fig. 2 Dynamics of greenhouse gas N_2O (a) and CO_2 emission (b) during the incubation

倍以上。培养 21 d 后, 1-ATU+N 与 5-ATU+N 处理 CO_2 累积排放量显著低于 N 处理, 其他施氮处理间无显著差异。

各处理产生的综合温室效应 (GWP), 如表 2 所示, 总体而言, $\text{N} > \text{ATU+N} > 10\text{-DCD+N} \approx \text{CK}$, 且

不同 ATU 施用量差异不显著。N 处理产生的综合温室效应最高, 约为 $1314.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (以 CO_2 当量计), 较 CK 处理增加 227.9%, 而 ATU+N 处理 GWP 较 CK 处理增加 53.4%~81.9%。CK 处理 CO_2 排放对总 GWP 的贡献高达 97.3%。单独施 N 促进 N_2O 的

排放,使 N₂O 对 GWP 的贡献由 2.7% 上升至 71.5%。对 GWP 的贡献下降到 48.6%~55.5%, DCD 使 N₂O 硝化抑制剂 ATU 降低了 N₂O 的排放,从而使 N₂O 的贡献降至更低水平(13.8%)。

表 2 培养期间 CO₂ 和 N₂O 的累积排放量和温室效应

Table 2 The emission and global warming potential of CO₂ and N₂O during the incubation

处理 Treatment	温室效应 GWP/ (CO ₂ μg·g ⁻¹)			GWP 增加 Increase/%	对 GWP 的贡献 Contribution to GWP/%	
	CO ₂	N ₂ O	综合温室效应 Total GWP		CO ₂	N ₂ O
CK	390.1±0.5c	10.7±1.4a	400.8±2.0a	—	97.3	2.7
N	374.6±16.1bc	939.8±80.2c	1314.4±96.3c	227.9	28.5	71.5
1-ATU+N	306.7±7.0a	305.8±55.3b	612.5±62.3b	52.8	50.1	49.9
5-ATU+N	299.6±16.6a	373.5±75.3b	673.1±91.9b	67.9	44.5	55.5
10-ATU+N	315.8±9.7ab	298.8±53.1b	614.6±62.8b	53.4	51.4	48.6
15-ATU+N	365.7±53.2abc	346.2±61.9b	711.9±115.2b	77.6	51.4	48.6
20-ATU+N	361.4±7.1abc	367.8±18.8b	729.1±25.9b	81.9	49.6	50.4
10-DCD+N	337.0±20.3abc	53.8±1.1a	390.8±21.4a	-2.5	86.2	13.8

2.3 土壤硝化微生物数量

通过荧光定量 PCR 评估了土壤不同微生物类群对氮肥及硝化抑制剂的响应。研究表明土壤总体微生物 16S rRNA 基因拷贝数约为 (3.65~5.10) × 10⁹ g⁻¹, 在施氮处理间变化不显著(图 3a)。但是, AOB、AOA 以及 Comammox 这三类硝化微生物对不同处理的响应规律不同(图 3b-图 3d)。单施氮肥促进 AOB 生长, 培养 21 d 后 AOB *amoA* 基因达到 3.59 × 10⁸ g⁻¹, 是 CK 处理 1.60 倍。DCD+N 能够显著抑制 AOB 增长, 与 CK 相比无显著变化。ATU 对 AOB 的影响表现为: 低浓度促进, 高浓度抑制。1-ATU+N 处理中 AOB *amoA* 基因数量最多 (3.88 × 10⁸ g⁻¹), 是 N 处理 1.08 倍, 20-ATU+N 处理 AOB *amoA* 基因最低 (2.56 × 10⁸ g⁻¹), 仅为 N 处理的 0.71 倍。ATU+N 对 AOA 和 Comammox 特征 *amoA* 基因的拷贝数无显著影响。而 DCD+N 显著刺激了 AOA 和 Comammox 生长, 其 *amoA* 基因拷贝数分别为 2.56 × 10⁸ g⁻¹ 和 3.45 × 10⁸ g⁻¹, 是 N 处理的 1.58 倍和 1.22 倍。

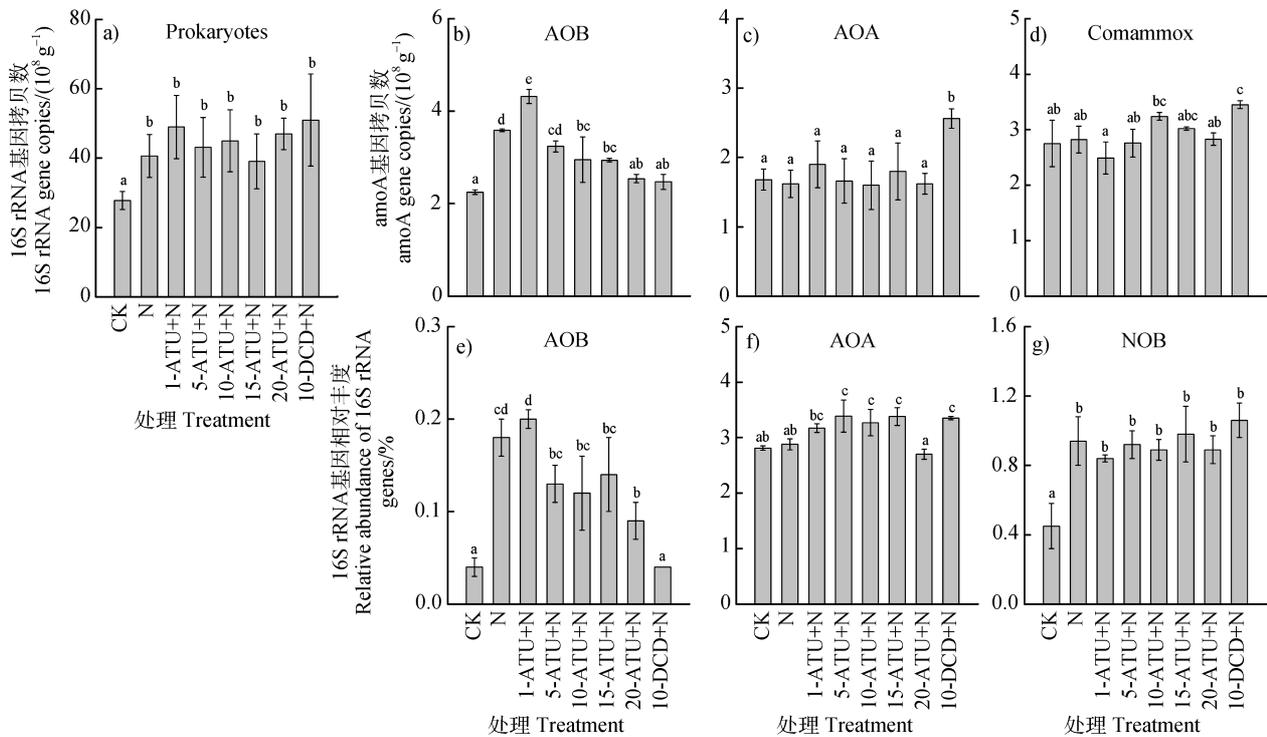
通过高通量测序技术对培养 21 d 后土壤整体微生物群落组成进行分析可知, 不同处理 AOB 的 16S rRNA 基因相对丰度与其 *amoA* 基因丰度的变化趋势较为一致(图 3e)。N 处理 AOB 相对丰度增加到

0.179%, 是 CK 处理 4.34 倍。与 N 处理相比, 高浓度 ATU (20-ATU+N) 显著抑制了 AOB 的增加, AOB 相对丰度仅为 N 处理的 0.53 倍。10-DCD+N 处理 AOB 相对丰度与 CK 处理无显著差异, 进一步证明 DCD 能够通过抑制 AOB 生长而较大程度抑制硝化作用。N 处理对 AOA 相对丰度的影响不显著(图 3f)。相比于单施氮肥, 中等浓度 ATU (5-ATU+N、10-ATU+N 和 15-ATU+N) 和 DCD 与氮肥配施使 AOA 相对丰度有所提高, 但彼此之间无显著差异。氮肥及与硝化抑制剂配施处理均检测到大量 NOB 生长(图 3g), NOB 相对丰度 (0.840~1.061%) 均显著高于 CK 处理 (0.454%)。

总体而言, 土壤硝化作用直接导致了土壤 pH 降低和 N₂O 排放。土壤 NO₃⁻-N 含量与土壤 pH 极显著负相关 ($r=-0.95$, $P<0.001$), 而与 N₂O 排放量极显著正相关 ($r=0.71$, $P<0.01$)。土壤 NO₃⁻-N 含量和 N₂O 排放通量与 AOB 数量显著正相关(表 3)。此外, AOA 和 Comammox *amoA* 基因拷贝数以及 NOB 相对丰度还与土壤 NH₄⁺-N 含量呈现显著正相关性(表 3)。

2.4 土壤硝化微生物群落组成

培养 21 d 后, 土壤 AOB 群落组成在处理间存在明显差异(图 4a), 而 AOA 和 NOB 群落组成在



注：柱形图上方标注的不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Bars with different letters above indicate a significant difference ($P < 0.05$) among treatments.

图 3 培养 21 d 后各处理土壤原核微生物 16S rRNA 基因拷贝数 (a)、硝化微生物 *amoA* 基因拷贝数 (b, c, d) 和 16S rRNA 基因相对丰度 (e, f, g)

Fig. 3 Copy number of 16S rRNA genes of soil prokaryotic microbes (a) and *amoA* genes of soil AOB (b), AOA (c) and Comammox (d), and the relative abundance of soil AOB (e), AOA (f) and NOB (g) based on 16S rRNA gene sequencing in different treatments after a 21-day incubation

表 3 土壤硝化微生物的丰度与温室气体 N₂O、CO₂ 累计排放量以及土壤理化性质的相关分析

Table 3 Correlation between the relative abundance of different nitrifying guilds and greenhouse gas (N₂O and CO₂) emission and soil properties

指标 Index	<i>amoA</i> 基因拷贝数 Copy number of <i>amoA</i> genes			16S rRNA 基因相对丰度 Relative abundance of 16S rRNA genes		
	AOB	AOA	Comammox	AOB	AOA	NOB
	NO ₃ ⁻ -N	0.71**	-0.45	-0.17	0.84***	0.13
NH ₄ ⁺ -N	0.49	0.86***	0.63**	-0.34	0.44	0.54**
pH	-0.77***	0.53*	0.33	-0.91***	-0.02	-0.28
N ₂ O	0.60*	0.35	-0.27	0.67**	-0.26	0.16
CO ₂	-0.56*	-0.20	-0.20	-0.44	-0.47	-0.15

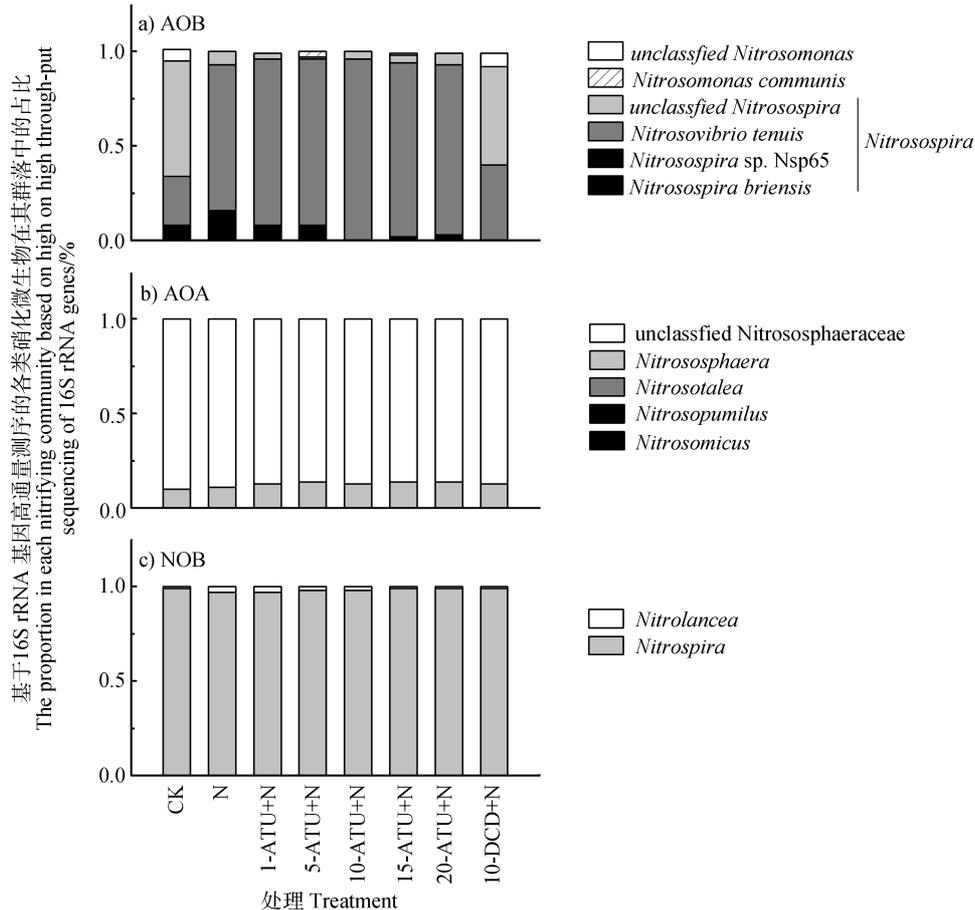
注: Pearson 双尾显著性检验, n=24; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。Note: Pearson's two-tailed *t* test, n=24; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

处理间较为相似 (图 4b, 图 4c)。高通量测序结果显示 *Nitrosospira* 属在 AOB 群落中占主导地位

(>93%), 远远多于 *Nitrosomonas* 属 AOB。在分类水平可将 *Nitrosospira* 属 AOB 分为四个类型, 其

中, CK 处理 AOB 群落中, unclassified *Nitrosospira* 占比最大, 其次为 *Nitrosovibrio tenuis*。*Nitrosovibrio tenuis* 类 AOB 在氮肥刺激下快速生长, 但受到 DCD 强烈抑制, 表明 *Nitrosovibrio tenuis* 类 AOB 主导土壤硝化作用和高水平 N_2O 的产生。ATU 对 *Nitrosospira* sp. Nsp65 类 AOB 抑制作用随 ATU 用

量增加而增强, 可能与 N_2O 排放的降低有关。AOA 在共检测到 5 个属, 但各处理土壤 AOA 群落组成基本保持一致, 其中, unclassified *Nitrososphaeraceae* 所占比例最大 (86%~90%), 其次为 *Nitrososphaera* (10%~14%)。NOB 群落共检测到两个属, 其中 *Nitrospira* 的生长占据绝对优势 (97%~99%)。



注: 以各类型硝化微生物的相对丰度在其群落总相对丰度中的百分比表示。Note: The value was calculated by the relative abundance of each taxonomic group in the total relative abundance of each nitrifying community.

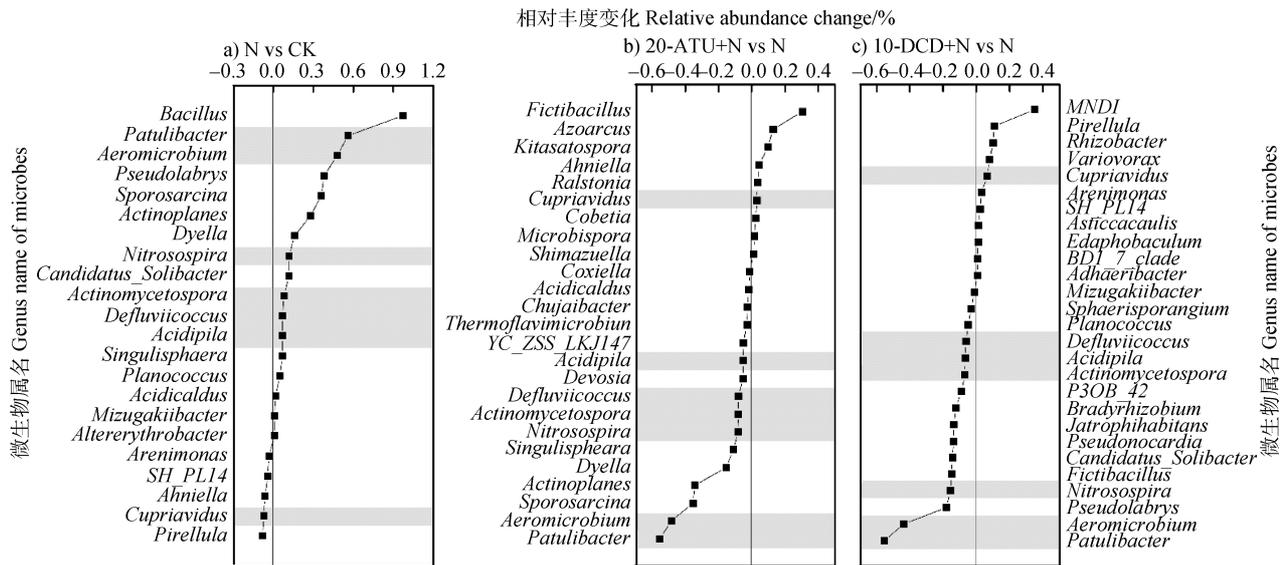
图 4 培养 21 d 后各处理土壤 AOB (a)、AOA (b) 和 NOB (c) 的群落结构变化

Fig. 4 Community change of soil AOB (a), AOA (b) and NOB (c) in different treatments after 21-day incubation

2.5 其他类型土壤微生物

高通量测序结果的生物信息分析显示, 在分类属水平, 特定微生物在处理间存在显著差异。如图 5 所示, N 与 CK 处理相比、20-ATU+N 与 N 处理相比、以及 10-DCD+N 与 N 处理相比, 分别存在 22 个、25 个以及 27 个显著改变的微生物属。其中, 除 AOB *Nitrosospira* 属外, 在三组比较中存在 6 个共有微生物属发生显著改变, 分别为 *Patulibacter*、*Aeromicrobium*、*Actinomycetospora*、*Defluviicoccus*、

Acidipila 和 *Cupriavidus*。单独施 N 促进前 5 个属微生物相对丰度显著增加, 其中 *Patulibacter* 和 *Aeromicrobium* 增加最多。同时单独施 N 还对 *Cupriavidus* 产生了一定抑制, 其相对丰度低于 CK。ATU 和 DCD 与 N 配施对这 6 个属微生物的影响趋势与 N 处理相反, 且 *Patulibacter* 和 *Aeromicrobium* 降幅最大, 一定程度上缓解了施 N 引起的微生物变化。此外, 单独施 N 显著刺激了 *Bacillus* 生长, 而 ATU 和 DCD 均未对其产生明显作用; ATU 最大程



注：图中列出了处理间发生显著变化的微生物属 ($P < 0.05$)。(a) 表示 N 与 CK 处理之间比较；(b) 表示 20-ATU+N 与 N 处理之间比较；(c) 表示 10-DCD+N 与 N 处理之间比较。以平均相对丰度之差表示对应微生物属的相对丰度变化。标注灰色的属为在三组 (a, b, c) 比较中均显著变化的微生物类型。Note: The genera which were influenced significantly were shown above ($P < 0.05$). (a) represents the comparisons between N and CK treatments; (b) represents the comparison between 20-ATU+N and N treatments; (c) represents the comparison between 10-DCD+N and N treatments. The change of relative abundance was expressed by the difference of average relative abundance of each genus in treatments. The genus marked with the grey color changed significantly in all three comparisons (a, b, c).

图 5 不同微生物属在处理间的相对丰度变化

Fig. 5 Relative abundance change of different microbial genus between treatments

度促进了 *Fictibacillus* 的增加, 而 DCD 对 MNDI 有最强的刺激作用。

3 讨论

硝化抑制剂与氮肥配施可以抑制硝化作用, 减少 N_2O 排放, 从而降低温室效应。本研究通过室内培养试验模拟了抑制剂 ATU 和 DCD 与氮肥配合施入农田土壤的过程, 发现单独施 N 产生的综合温室效应最高, ATU+N 处理次之, DCD+N 处理最低。在 21 d 培养期内, DCD 使土壤 NO_3^- -N 积累量和 N_2O 排放量分别减少了 68.6% 和 93.3%, 而 ATU 仅分别减少了 14.7% 和 68.2%, 表明 ATU 可以通过抑制硝化降低温室气体排放, 但在土壤中的保氮减排效果低于 DCD。考虑到相同用量 ($20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) DCD 的保氮减排效果更好, 且实际价格远低于 ATU, 说明 DCD 与氮肥配施是一项性价比较高且有效的农业措施。DCD 对土壤 N_2O 减排效率高于以往报道的 30%~70%^[22], 可能受土壤类型、温度等因素影响。

此外, 本研究采用微宇宙法室内培养, 在恒定的温度、水分以及密闭培养瓶中进行, 区别与原位田间条件, 室内观测结果是否可以代表原位状况仍需评估。

AOA 和 AOB 对 ATU 的响应并不一致。多数 AOB 菌株对 ATU 敏感, 小于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATU 即对其产生强烈抑制^[23]。而 AOA 对 ATU 敏感范围较广, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATU 能够完全抑制一些嗜酸 *Nitrosotalea* 类 AOA, 但中性 *Nitrososphaera* 类 AOA 则需要更高 ATU 浓度 ($>500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 才有较强抑制^[23-24]。本研究设置了一系列 ATU 与氮肥的施用配比, 发现 20% ATU ($40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 与氮肥配施对土壤硝化作用的抑制最强此时土壤溶液中 ATU 浓度约为 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著抑制了 AOB 生长并改变了 AOB 群落结构。*Nitrosospira* sp. Nsp65 类 AOB 在群落中的占比明显下降, 表明其对 ATU 较为敏感, 与几株代表性 AOB 菌株的动力学特征较为相似^[23, 25], 而 *Nitrosovibrio tenuis* 类 AOB 在群落中的占比增加, 表明其具有较强 ATU 耐受能力, 与上述类型有

所不同, 表明 AOB 群落具有较高的生理多样性。主导供试土壤 AOA 群落的中性 *Nitrososphaera* 类和 unclassified *Nitrososphaeraceae* AOA 未受明显影响, 表明其对 ATU 耐受能力较强, 与先前研究较为一致^[23]。

ATU 在土壤中的施用效果差异较大。如 Li 等^[12]发现 14% ATU ($14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 在草地土壤中显著降低了 AOB 和 Comammox 的数量, 但在中性农田土壤中却明显刺激了 Comammox 的生长。另一些农田或草地土壤中观测到 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATU 降低了 AOB 的生长活性^[26-27], 但在冰岛草地土壤中相同浓度 ATU 似乎未对 AOB 和 AOA 生长产生影响^[14]。由此可见, 硝化微生物对 ATU 的响应规律因土壤类型而异。硝化微生物群落组成差异、微生物的相互作用以及土壤本身的高度异质性等因素, 都可能使土壤硝化微生物对 ATU 的响应机制更加复杂。

Comammox 对陆地生态系统氮循环的贡献正在重新评估。已培养的 Comammox 代表菌株 *Nitrospira inopinata* 的 $K_m(\text{NH}_3)$ 仅为 $63 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[7]。供试黄棕壤原位 NH_3 浓度与该值较为接近, 并检测到了丰富的 Comammox *amoA* 基因, 证明该土壤在无外源氮输入情况下能够为 Comammox 生长提供适宜底物条件。而施入氮肥后土壤游离 NH_3 的浓度高于 $220 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 不利于 Comammox 生长, 同时 Comammox *amoA* 基因拷贝数与土壤 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 无相关关系 ($P>0.05$), 表明 Comammox 在氮肥诱导的土壤硝化作用中贡献较小^[26]。但最近 Li 等^[8]发现 Comammox 能够在施氮农田土壤中硝化并同化 $^{13}\text{CO}_2$ 生长, 表明 NH_3 浓度不是决定 Comammox 生态功能的唯一因素。相关研究已证实 Comammox *Nitrospira* Clade A 分支与 NH_4^+ 浓度呈正相关, 而 Clade B 分支则与土壤 pH 负相关^[28]。可见土壤 Comammox 群落组成直接影响其在不同土壤硝化过程中的重要性。

本研究施用 DCD 处理中 Comammox 和 AOA *amoA* 基因显著增加, 表明硝化群落中部分氨氧化菌对 DCD 不敏感, 生长活性不受 DCD 抑制, 具有区别于典型氨氧化菌的生理特点。Palomo 等^[29]已经证实 Comammox *Nitrospira* Clade B 可能通过非氨氧化途径产能, 并还原三羧酸循环进行 CO_2 固定, 为其适应更多生境提供了能量代谢基础。未来在纯培养体系中展开更硝化菌株生理代谢和基因水平研究, 可以为揭示复杂环境中硝化微生物生态功能多样性

提供理论依据。

此外, ATU 和 DCD 可以促进多种有益微生物或植物促生菌 (PGPR) 的生长。例如, ATU 处理中 *Azoarcus* 属和 DCD 处理中 *Rhizobacter* 属均显著提高, 可以固氮或促进植物根系氮吸收^[30-31], 提高作物产量和品质。ATU 和 DCD 还刺激了 *Cupriavidus* 属的生长, 而已知 *Cupriavidus* 属多个代表菌株均具有固氮结瘤潜力^[32]。DCD 处理中 *Variovorax* 属也显著增加, 而其能够改变植物激素水平, 解除根系生长抑制^[33]。具有降解有机物能力的微生物属也在加入抑制剂后迅速增加, 如 *Arenimonas*, *Ralstonia* 等。此外, 硫脲类化合物具有一定杀菌作用, 本研究发现 ATU 对 16 个微生物属有显著抑制作用 (图 5), 其中, 降幅最大的两个属 (*Patulibacter* 和 *Aeromicrobium*) 均属于放线菌门。DCD 也具有相似的抑菌效果。鉴于目前在更低分类水平的微生物功能划分未有准确认知, 它们对土壤生态功能的影响以及对植物生长的调节作用有待进一步研究。

4 结 论

单施氮素提高了土壤硝化强度和 N_2O 排放, 导致土壤 pH 下降。低浓度烯丙基硫脲对硝化作用的抑制不明显, 随烯丙基硫脲浓度提高, 抑制效果增强。与烯丙基硫脲相比, 双氰胺能更大程度抑制土壤硝化作用和 N_2O 排放。*Nitrosospira* 属 AOB 是黄棕壤农田土壤硝化过程的主要驱动者, 而 AOA 和 NOB 群落对施肥措施无明显响应。除硝化微生物外, 一些特定微生物属对 ATU 和 DCD 产生相似响应规律。

参考文献 (References)

- [1] Meinhardt K A, Stopnisek N, Pannu M W, et al. Ammonia-oxidizing bacteria are the primary N_2O producers in an ammonia-oxidizing archaea dominated alkaline agricultural soil[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20 (6): 2195—2206.
- [2] Yan X Y, Zhou W. Groundwater nitrate removal through denitrification under farmland in Yangtze River Delta[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (2): 350—362. [颜晓元, 周伟. 长江三角洲农田地下水反硝化对硝酸盐的去除作用[J]. *土壤学报*, 2019, 56 (2): 350—362.]
- [3] Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528

- (7583): 504—509.
- [4] Leininger S, Urich T, Schloter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442 (7104): 806—809.
- [5] Lu L, Jia Z J. Urease gene-containing archaea dominate autotrophic ammonia oxidation in two acid soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(6): 1795—1809.
- [6] Xia W W, Zhang C X, Zeng X W, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5 (7): 1226—1236.
- [7] Kits K D, Sedlacek C J, Lebedeva E V, et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle[J]. *Nature*, 2017, 549 (7671): 269—272.
- [8] Li C Y, Hu H W, Chen Q L, et al. Comammox *Nitrospira* play an active role in nitrification of agricultural soils amended with nitrogen fertilizers[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 138: 107609.
- [9] Zhang M M, Shen J P, He J Z, et al. Microbial mechanisms of nitrification inhibitors and their application[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33 (11): 2077—2083. [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[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33 (11): 2077—2083.]
- [10] Zhang H Q, Zhao X Q, Zhang L Y, et al. 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. [张昊青, 赵学强, 张玲玉, 等. 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.]
- [11] He X J, Ji G D. Responses of AOA and AOB activity and DNA/cDNA community structure to allylthiourea exposure in the water level fluctuation zone soil[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27 (13): 15233—15244.
- [12] Li C Y, Hu H W, Chen Q L, et al. Growth of comammox *Nitrospira* is inhibited by nitrification inhibitors in agricultural soils[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2020, 20 (2): 621—628.
- [13] Taylor A E, Zeglin L H, Dooley S, et al. Evidence for different contributions of archaea and bacteria to the ammonia-oxidizing potential of diverse Oregon soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (23): 7691—7698.
- [14] Daebeler A, Bodelier P L E, Hefting M M, et al. Ammonia-limited conditions cause of Thaumarchaeal dominance in volcanic grassland soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91 (3): fiv014.
- [15] Zhou X, Wang S W, Ma S T, et al. Effects of commonly used nitrification inhibitors—dicyandiamide (DCD), 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP), and nitrapyrin—on soil nitrogen dynamics and nitrifiers in three typical paddy soils[J]. *Geoderma*, 2020, 380: 114637.
- [16] Zhang X P, Zhong Z K, Bian F Y, et al. Effects of composted bamboo residue amendments on soil microbial communities in an intensively managed bamboo (*Phyllostachys praecox*) plantation[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 136: 178—183.
- [17] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27 (21): 2957—2963.
- [18] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37 (8): 852—857.
- [19] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. *Nature Methods*, 2016, 13 (7): 581—583.
- [20] Bokulich N A, Kaehler B D, Rideout J R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. *Microbiome*, 2018, 6: 90.
- [21] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41 (D1): D590-D596.
- [22] Dai Y, He J Z, Shen J P. Effects and influence factors of dicyandiamide (DCD) application in agricultural ecosystem[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25 (1): 279—286. [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[J]. *应用生态学报*, 2014, 25 (1): 279—286.]
- [23] Shen T L, Stieglmeier M, Dai J L, et al. Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multififormis* to nitrification inhibitors[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 344 (2): 121—129.
- [24] Taylor A E, Vajjala N, Giguere A T, et al. Use of aliphatic n-alkynes to discriminate soil nitrification activities of ammonia-oxidizing thaumarchaea and bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (21): 6544—6551.
- [25] Ginestet P, Audic J M, Urbain V, et al. Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 2266—2268.
- [26] Wang J C, Wang J L, Rhodes G, et al. Adaptive responses of comammox *Nitrospira* and canonical ammonia oxidizers to long-term fertilizations: Implications for the relative contributions of different ammonia oxidizers to

- soil nitrogen cycling[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 668: 224—233.
- [27] Liu T L, Ren J Q, Wang T Y, et al. Relative contribution of bacteria and archaea to soil nitrification in neutral paddy soil[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2018, 49 (5): 1091—1096. [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.]
- [28] Shi X Z, Hu H W, Wang J Q, et al. Niche separation of comammox *Nitrospira* and canonical ammonia oxidizers in an acidic subtropical forest soil under long-term nitrogen deposition[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, 126: 114—122.
- [29] Koch H, van Kessel M A H J, Lüscher S. Complete nitrification: Insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103 (1): 177—189.
- [30] Hurek T, Reinhold-Hurek B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes[J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 106 (2/3): 169—178.
- [31] Sun Z, Zheng L, Qiu H B. Research advances on colonization of plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33 (2): 8—15. [孙真, 郑亮, 邱浩斌. 植物根际促生细菌定殖研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33 (2): 8—15.]
- [32] Checcucci A, DiCenzo G C, Perrin E, et al. Genomic diversity and evolution of rhizobia[M]//Microbial diversity in the genomic era. Amsterdam: Elsevier, 2019: 37—46.
- [33] Finkel O M, Salas-González I, Castrillo G, et al. A single bacterial genus maintains root growth in a complex microbiome[J]. *Nature*, 2020, 587 (7832): 103—108.

(责任编辑: 卢 萍)