

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2024.01.003

马明坤, 陆玉芳, 王方嘉, 等. 不同生物硝化抑制剂对红壤性水稻土 N<sub>2</sub>O 排放的影响及其机制. 土壤, 2024, 56(1): 19–27.

# 不同生物硝化抑制剂对红壤性水稻土 N<sub>2</sub>O 排放的影响及其机制<sup>①</sup>

马明坤<sup>1,2</sup>, 陆玉芳<sup>1</sup>, 王方嘉<sup>1,2</sup>, 俞海冰<sup>1</sup>, 施卫明<sup>1,2\*</sup>

(1 土壤与农业可持续发展重点实验室(中国科学院), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 为揭示不同生物硝化抑制剂(BNIs)对红壤性水稻土 N<sub>2</sub>O 排放的影响差异及作用机制, 通过 21 d 的土柱淹水培养试验, 比较了三种 BNIs 1,9-癸二醇(1,9-D)、亚麻酸(LN)和 3-(4-羟基苯基)丙酸甲酯(MHPP)与化学合成硝化抑制剂双氰胺(DCD)对土壤 N<sub>2</sub>O 排放及相关硝化、反硝化功能基因的影响。结果表明: 不同 BNIs(1,9-D、LN、MHPP)可以显著平均降低土壤 N<sub>2</sub>O 日排放峰值 40.1%; 1,9-D 和 MHPP 可分别抑制 N<sub>2</sub>O 排放总量 44.5% 和 43.9%, 而 DCD 和 LN 对 N<sub>2</sub>O 排放总量没有显著影响。1,9-D 和 MHPP 对 AOA(氨氧化古菌)、AOB(氨氧化细菌)硝化菌和 *nirS*、*nirK* 型反硝化菌的调控均有所不同, 1,9-D 可以同时抑制 AOA、AOB 和 *nirS* 微生物的生长; MHPP 仅可以抑制 AOA 的生长; 其中, AOA-*amoA* 和 *nirS* 基因丰度与土壤 N<sub>2</sub>O 的排放呈显著正相关关系。同时, 1,9-D 和 MHPP 均增加了 *nosZ* 基因丰度及其与 AOA-*amoA*+AOB-*amoA*、*nirS*+*nirK* 和 AOA-*amoA*+AOB-*amoA*+*nirS*+*nirK* 的比值, 且 *nosZ* 基因丰度及其相关比值与土壤 N<sub>2</sub>O 排放均呈显著负相关关系。总之, 生物硝化抑制剂 1,9-D 和 MHPP 引起的 AOA-*amoA* 和 *nosZ* 基因丰度变化在红壤性水稻土 N<sub>2</sub>O 减排方面发挥了重要的作用。

**关键词:** 生物硝化抑制剂; 红壤性水稻土; N<sub>2</sub>O; AOA-*amoA*; *nosZ*

中图分类号: S143.1+6 文献标志码: A

## Effects and Mechanisms of Different Biological Nitrification Inhibitors on N<sub>2</sub>O Emissions from Red Paddy Soil

MA Mingkun<sup>1,2</sup>, LU Yufang<sup>1</sup>, WANG Fangjia<sup>1,2</sup>, YU Haibing<sup>1</sup>, SHI Weiming<sup>1,2\*</sup>

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

**Abstract:** To reveal the differences in the effects and mechanisms of different biological nitrification inhibitors (BNIs) on N<sub>2</sub>O emissions from red paddy soil, a 21-day soil column flooding incubation experiment was conducted to compare three BNIs, 1,9-decanediol (1,9-D), linolenic acid (LN) and methyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate (MHPP) with the chemically synthesized nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on soil N<sub>2</sub>O emissions and associated nitrification and denitrification functional genes. The results showed that the different BNIs (1,9-D, LN, MHPP) significantly reduced peak N<sub>2</sub>O emissions by 40.1% on average; 1,9-D and MHPP suppressed total N<sub>2</sub>O emissions by 44.5% and 43.9%, respectively, while DCD and LN had no significant effects. Both 1,9-D and MHPP differed in their regulations of nitrifying and denitrifying bacteria, with 1,9-D inhibiting the growth of both AOA, AOB, and *nirS* microorganisms; MHPP only inhibited the growth of AOA; whereas the abundance of AOA-*amoA* and *nirS* genes were significant and positively correlated with soil N<sub>2</sub>O emissions. Meanwhile, both 1,9-D and MHPP increased *nosZ* gene abundances and their ratios to AOA-*amoA*+AOB-*amoA*, *nirS*+*nirK* and AOA-*amoA*+AOB-*amoA*+*nirS*+*nirK*, which were significantly negatively correlated with soil N<sub>2</sub>O emissions. In conclusion, changes in the abundance of AOA-*amoA* and *nosZ* genes caused by the biological nitrification inhibitors 1,9-D and MHPP play important roles in N<sub>2</sub>O reduction in red paddy soil.

**Key words:** Biological nitrification inhibitors; Paddy soil derived from red earth; N<sub>2</sub>O; AOA-*amoA*; *nosZ*

氧化亚氮(N<sub>2</sub>O)是一种温室气体, 其全球变暖效应和臭氧层破坏, 使其受到了广泛的关注<sup>[2-4]</sup>。潜力是 CO<sub>2</sub> 的 298 倍<sup>[1]</sup>。由于 N<sub>2</sub>O 造成的较强温室农业是 N<sub>2</sub>O 重要的排放源, 由施肥和自然土壤排

①基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1700604)和国家自然科学基金项目(32030099)资助。

\* 通讯作者(wmshi@issas.ac.cn)

作者简介: 马明坤 (1994—), 男, 吉林敦化人, 博士研究生, 主要从事生物硝化抑制剂方面的研究。E-mail: mamingkun94@163.com

放的  $N_2O$  量占全球所有  $N_2O$  来源的 56%~70%<sup>[5]</sup>, 因此提高氮肥利用率和减少农业  $N_2O$  排放变得至关重要。

土壤的硝化和反硝化作用均可以产生  $N_2O$ <sup>[6]</sup>。其中, 氨单加氧酶编码基因 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 是硝化作用的关键功能基因, 亚硝酸盐还原酶编码基因 *nirK*、*nirS* 和  $N_2O$  还原酶基因 *nosZ* 是反硝化作用的关键功能基因<sup>[7-8]</sup>。硝化抑制剂可以抑制土壤的硝化作用, 并且可以有效降低土壤中  $NO_3^-$ -N 含量, 进而减少  $N_2O$  排放<sup>[9-11]</sup>。但目前大多数可用的硝化抑制剂均是化学合成, 其应用受多种因素的影响<sup>[12]</sup>; 同时, 合成硝化抑制剂的应用会增加农业生产成本, 也可能会造成潜在的环境污染风险<sup>[13-14]</sup>。

生物硝化抑制剂(Biological Nitrification Inhibitors, BNIs)是一类由植物分泌并具有抑制土壤硝化作用的物质<sup>[15-19]</sup>。这种天然源的物质比合成硝化抑制剂更环保<sup>[20]</sup>, 是现代农业生产中提高氮肥利用率和减少环境污染的新策略<sup>[21-23]</sup>。在过去 20 年中, 研究人员从不同植物根系分泌物中鉴定出了不同类型的 BNIs。在高粱根系分泌物中鉴定出 3 种 BNIs, 分别为 3-(4-羟基苯基)丙酸甲酯(methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, MHPP)、樱花素(sakuranetin)和高粱酮(sorgoleone)<sup>[17-24]</sup>。在臂形草(*Brachiaria humidicola*)根系中分离出臂形草内酯(brachialactone)<sup>[25]</sup>。在水稻根系分泌物中先后鉴定出 2 种 BNIs, 分别是 1,9-癸二醇(1,9-D)和丁香酸<sup>[18,26-28]</sup>。在玉米根系分泌物中分离出 2,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone 和 2-hydroxy-4,7-dimethoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one<sup>[29]</sup>。研究发现, 植物 BNIs 的分泌量与土壤  $N_2O$  排放呈显著负相关关系<sup>[25]</sup>, 同时, 将富含 BNIs 的牧草覆盖在土壤牛尿斑块上, 可以显著降低土壤  $N_2O$  排放 60%<sup>[30]</sup>。

此外, 在一些土壤类型上, MHPP 可显著降低土壤  $N_2O$  排放 18.1%~72.2%<sup>[31-32]</sup>; 1,9-D 可显著平均降低典型土壤  $N_2O$  排放 48%<sup>[15]</sup>。然而, 现有研究均是针对 BNIs 在调控土壤  $N_2O$  排放方面的作用, 不同 BNIs 之间对  $N_2O$  排放的影响差异尚不清楚, 且 BNIs 对  $N_2O$  减排的微生物学机制也鲜有报道。

红壤作为我国南方典型土壤, 由于人为和自然因素, 面临着土壤酸化、养分匮乏和流失等多种问题, 制约了土壤的绿色健康发展<sup>[33]</sup>。在红壤上开垦种植水稻以加速红壤熟化, 成为发展丘陵地区农业生产的有效途径<sup>[34]</sup>。虽然在红壤性水稻土上筛选适宜的合成硝化抑制剂来调控土壤  $N_2O$  排放也有较多报道<sup>[35-36]</sup>, 但不同 BNIs 在该土壤上对  $N_2O$  排放效果及机制尚不清楚。因此, 本研究通过土柱培养试验, 比较了 3 种不同的 BNIs(1,9-D、LN(亚麻酸)、MHPP)在红壤性水稻土淹水条件下对  $N_2O$  排放及硝化、反硝化相关功能基因(AOA-*amoA*、AOB-*amoA*、*nirK*、*nirS* 和 *nosZ*) 的影响, 并分析了功能基因与  $N_2O$  排放间的关系, 以为 BNIs 在农田上的精准应用及有效的  $N_2O$  减排措施制定提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试土壤采自中国科学院江西鹰潭农业生态系统国家野外科学观测研究站(28°15'N, 116°55'E), 该地区年均气温 17.6 °C, 年均降水量为 1 795 mm。供试土壤类型为水稻土, 质地为砂壤, 采自 0~20 cm 耕层。采集的土样经风干、过筛(<2 mm)、混匀, 备用, 土壤理化性质见表 1。供试 1,9-D 定制于药明康德新药开发有限公司, 纯度大于 97%。LN、MHPP 和双氰胺(DCD)购买于 Sigma 公司。

表 1 试验用土理化性质

Table 1 Physicochemical properties of tested red paddy soil

pH	全氮 (g/kg)	有机质 (g/kg)	$NH_4^+$ -N (mg/kg)	$NO_3^-$ -N (mg/kg)	机械组成(g/kg)		
					<0.002 mm 黏粒	0.002~0.02 mm 粉粒	0.02~2 mm 砂粒
5.06	0.92	16.6	9.94	7.49	162.0	119.0	719.0

### 1.2 试验设计

试验采用土柱培养方式, 土柱高 18 cm, 内径 5 cm, 从上至下依次为 1 cm 空余层、2 cm 淹水层、14 cm 土肥混合层和 1 cm 淋溶层。试验开始前 1 天, 先在土柱底部放置多孔挡板和石英砂, 然后加入 370 g 试验用土, 压实后浇透水, 并放置 1 d 以使土壤活力达到稳定状态。第 2 天, 将各处理的氮肥和硝化抑制剂

溶于蒸馏水后注射入 5 cm 深的土肥混合层, 然后保持 2 cm 淹水, 开始试验。试验每天收集完  $N_2O$  后再收集一定体积的淋溶液, 以模拟田间状态。

试验处理为: ①氮肥(尿素, N 200 mg/kg 土, 记作 U); ②DCD 20 mg/kg 土+氮肥(记作 DCD); ③1,9-D 100 mg/kg 土+氮肥(记作 1,9-D); ④LN 100 mg/kg 土+氮肥(记作 LN); ④MHPP(100 mg/kg 土)+氮肥(记作

MHPP)。其中, 1,9-D、LN、MHPP 和 DCD 的使用量设置参考其他 BNIs 的室内培养研究<sup>[15,37-38]</sup>。

### 1.3 土壤 N<sub>2</sub>O 排放测定

通过使用密闭式静态暗箱-气相色谱法测定 N<sub>2</sub>O。该密闭生长箱内径 5 cm, 高 15 cm, 上部封口, 下部有凹槽可与土柱扣紧, 侧边开孔以便气体的采集, 内贴锡纸防止太阳辐射及箱内温度升高。在施肥后连续 21 d 进行气体采集, 分别在盖箱后 2 h 和 4 h 时用注射器收集 15 mL 气体于真空瓶(气袋)中, 同时收集 3 管大气作为空白对照, N<sub>2</sub>O 浓度与用安捷伦 7890A 气相色谱仪(ECD 检测器)测定。

N<sub>2</sub>O 日排放量计算公式<sup>[39]</sup>:  $F(N, \mu\text{g}/\text{kg}) = (M/V_M) \times V \times dc/dt \times 273 / (273 + T) \times P / P_0 \times 24$ 。式中:  $F$  为 N<sub>2</sub>O 的排放通量;  $M$  为 N<sub>2</sub>O-N 标准状态下的摩尔质量(28 g/mol);  $V_M$  为气体的摩尔体积, 22.4 L/mol;  $V$  为密闭静态箱体积(L);  $dc/dt$  为采样过程中箱内 N<sub>2</sub>O 气体

浓度变化率(N,  $\mu\text{g}/(\text{L} \times \text{h})$ );  $T$  为采样时箱内的平均温度(°C);  $P$  为采样箱内气压;  $P_0$  为标准大气压。试验场地海拔高度为 30 m, 压强影响较小, 实际计算中忽略气压的影响。

### 1.4 土壤 DNA 提取和定量 PCR

土壤细菌 DNA 使用 MoBio PowerSoil DNA 试剂盒(美国)进行提取, 根据制造商要求进行操作, 提取土壤 DNA 后, 使用 NanoDrop ND100 分光光度计(威尔明顿, 美国)评估提取的 DNA 浓度和质量。使用 LightCycler 480 实时 PCR 系统(罗氏诊断公司, 曼海姆, 德国)进行实时定量 PCR 测定, 使用引物见表 2。10  $\mu\text{L}$  反应混合液中包含 5  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex Taq 酶(TaKaRa, 东京, 日本)、0.4  $\mu\text{L}$  前引物、0.4  $\mu\text{L}$  后引物和 0.5  $\mu\text{L}$  DNA。将含有目标基因质粒按照 10 倍浓度梯度进行稀释制成标准曲线。每次循环结束后进行溶解曲线分析以评估定量 PCR 扩增的特异性。

表 2 定量 PCR 的引物及扩增条件

Table 2 Primers sequences and real-time PCR program

目的基因	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增条件	参考文献
AOA-amoA	Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGAC	94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 45 s, 53 °C 60 s, 72 °C 60 s, 30 个循环	[40]
	Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT		
AOB-amoA	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环	[41]
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC		
nirK	FlaCu	ATCATGGTCTGCCGCG	94 °C 3 min, 1 个循环; 94 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 60 s, 40 个循环	[42]
	R3Cu	GCCTCGATCAGRTTGTGGTT		
nirS	Cd3aF	G TSAACG TSAAGGARACSGG	94 °C 3 min, 1 个循环; 94 °C 30 s, 58 °C 45 s, 72 °C 60 s, 40 个循环	[7]
	R3ed	GASTTCGGRTGSGTCTTGA		
nosZ	2F	CGCRACGGCAASAAGGTSMSSTG	95 °C 3 min, 1 个循环; 95 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 60 s, 40 个循环	[43]
	2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA		

### 1.5 数据统计与分析

试验数据采用 Excel 2021 程序和 SPSS 20 软件进行处理与统计分析, 采用单因素方差分析和 Duncan 法进行显著性检验和多重比较, 采用 Pearson 法对各变量进行相关性分析。采用 Origin 2022 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 BNIs 与 DCD 对土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响

由图 1A 可以发现, 所有施肥处理的土壤 N<sub>2</sub>O 日排放量在施肥后 3 d 时达到峰值, 在施肥 7 d 后趋于稳定。但与 U 处理相比, 不同 BNIs 处理可平均降低土壤 N<sub>2</sub>O 日排放峰值 40.1%, 远高于 DCD 处理的 19.6%。同时, 在不同 BNIs 处理之间, 1,9-D 处理对 N<sub>2</sub>O 日排放峰值的抑制作用最好(44.5%), 其次是 MHPP 处理(43.9%)和 LN 处理(31.8%)。从土壤 N<sub>2</sub>O

排放累积量来看(图 1B), LN 和 DCD 处理对 N<sub>2</sub>O 排放量没有显著抑制作用, 1,9-D 和 MHPP 处理可以显著抑制土壤 N<sub>2</sub>O 排放量, 其中, 1,9-D 处理可以减排 22.5%, MHPP 处理可以减排 17.4%。由此可见, 在淹水条件下, 1,9-D 对红壤性水稻土 N<sub>2</sub>O 的减排作用优于 MHPP、LN 和 DCD。

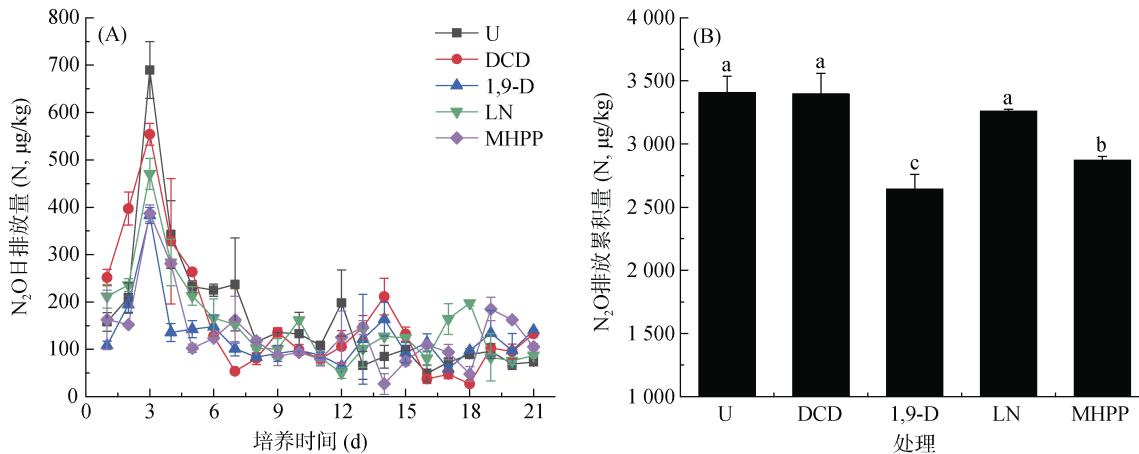
### 2.2 不同 BNIs 与 DCD 对土壤硝化和反硝化功能基因丰度的影响

通过荧光定量 PCR 测定土壤硝化和反硝化过程关键功能基因丰度发现, 与 U 处理相比, 不同 BNIs 处理可平均显著降低土壤氨氧化古菌(AOA)基因丰度 24.1%, 远高于 DCD 处理的 7.9%(图 2A, 图 2B); 其中, 1,9-D 处理对 AOA 基因丰度的抑制作用(37.3%)远高于 LN 处理(25.3%)和 MHPP 处理(9.5%)。对于氨氧化细菌(AOB)基因丰度, DCD 处理的抑制率为

33.3%，高于 BNIs 处理；而不同 BNIs 处理间，1,9-D 处理的抑制作用(23.7%)高于 LN 处理(1.2%)和 MHPP 处理(11.5%)。

对于反硝化基因，不同 BNIs 和 DCD 处理则表现出不同的趋势(图 2C, 图 2D)。与 U 处理相比，1,9-D

处理显著降低土壤 *nirS* 基因丰度 38.2%，LN、MHPP 和 DCD 处理则没有显著的抑制作用。DCD 处理显著降低土壤 *nirK* 基因丰度 33.3%，1,9-D 和 MHPP 处理没有显著的影响，而 LN 处理显著提高 *nirK* 基因丰度 54.1%。



(图中不同小写字母表示处理间差异在  $P < 0.05$  水平显著，下同)

图 1 不同 BNIs 与 DCD 对  $N_2O$  排放的影响

Fig.1 Effects of different BNIs and DCD on  $N_2O$  emissions

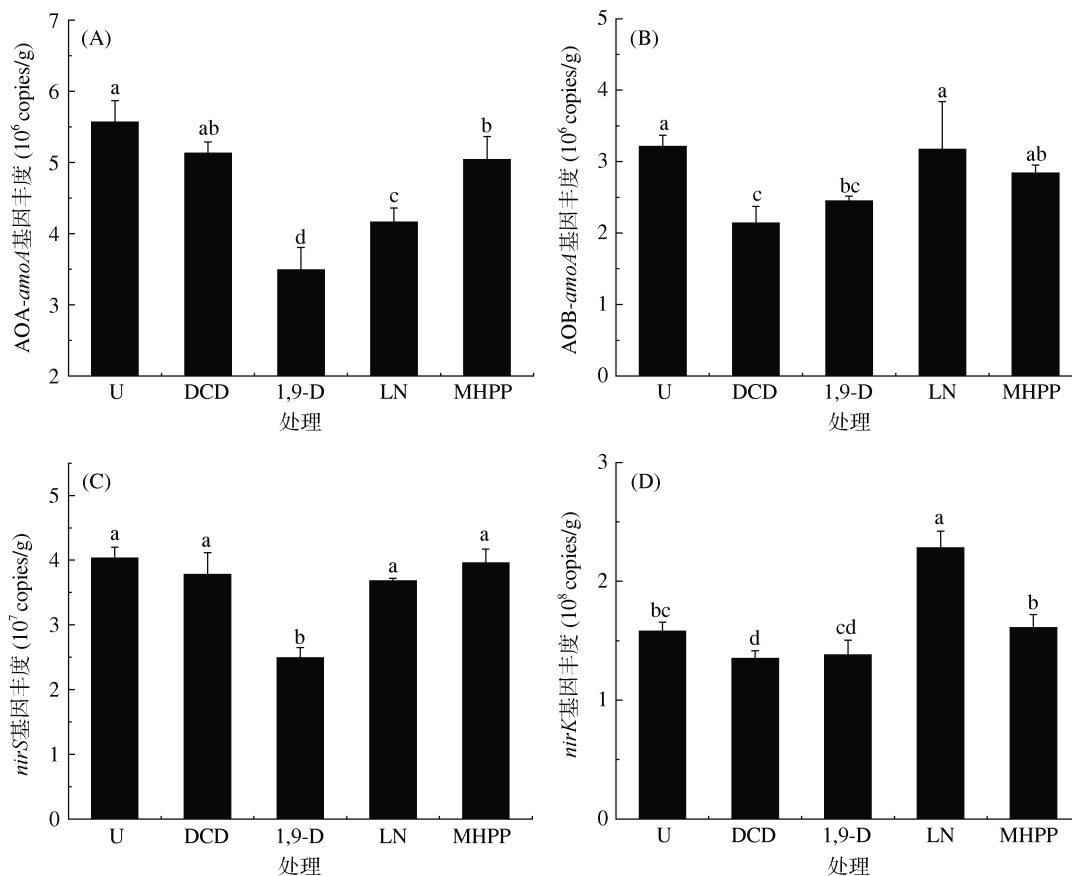


图 2 不同 BNIs 和 DCD 对土壤硝化(AOA-*amoA*、AOB-*amoA*)和反硝化功能基因(*nirS*、*nirK*)丰度的影响

Fig.2 Effects of different BNIs and DCD on gene abundances of soil nitrification (AOA-*amoA*, AOB-*amoA*) and denitrification functional genes (*nirS*, *nirK*)

### 2.3 不同 BNIs 和 DCD 对 *nosZ* 基因丰度及其与硝化、反硝化相关功能基因比值的影响

由图 3A 可知, BNIs 处理对土壤 *nosZ* 基因丰度的促进作用远高于 DCD 处理。在不同 BNIs 处理中, 1,9-D 和 MHPP 处理可以显著提高 *nosZ* 基因丰度 18.5% 和 34.4%, LN 处理则显著降低 *nosZ* 基因丰度 52.9%。通过 *nosZ* 基因丰度与硝化或反硝化细菌功能基因丰度的比值(图 3B~3D), 可以看出 BNIs 处理的

*nosZ*/(AOA-*amoA*+ AOB-*amoA*+ *nirS*+ *nirK*)平均比值均高于 DCD 处理。与 U 处理相比, 1,9-D 和 MHPP 处理均显著提高 3 组比值, 分别为 81.2% 和 47.8%、31.3% 和 19.3%、32.9% 和 21.5%, 1,9-D 处理的 3 组比值均高于 MHPP 处理; LN 和 DCD 处理则显著降低 3 组比值, 分别降低 14.7% 和 47.8%、24.1% 和 66.3%、24.1% 和 65.8%, 其中, DCD 处理的 3 组比值均高于 LN 处理, 但均低于 1,9-D 和 MHPP 处理。

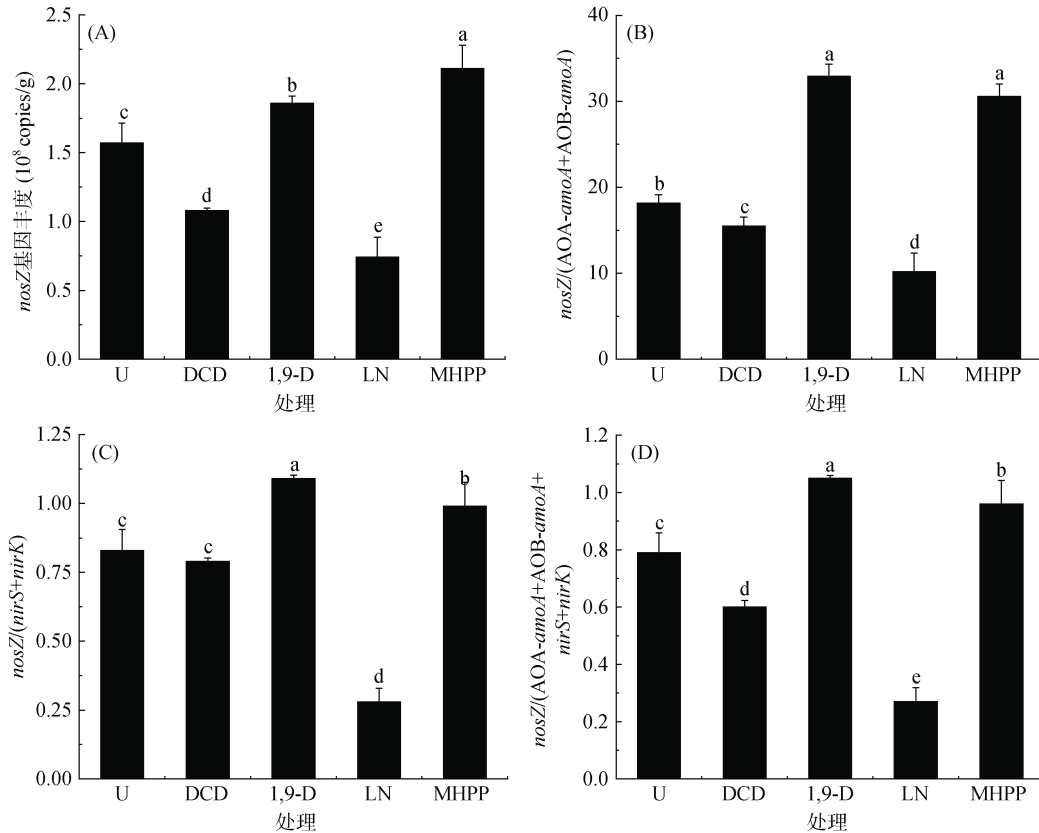


图 3 不同 BNIs 与 DCD 对 *nosZ* 基因丰度, *nosZ*/(AOA-*amoA*+ AOB-*amoA*)、*nosZ*/(*nirS*+ *nirK*)和 *nosZ*/(AOA-*amoA*+ AOB-*amoA*+ *nirS*+ *nirK*)比值的影响

Fig. 3 Effects of different BNIs and DCD on *nosZ* gene abundance, *nosZ*/(AOA-*amoA*+ AOB-*amoA*), *nosZ*/(*nirS*+ *nirK*), and *nosZ*/(AOA-*amoA*+ AOB-*amoA*+ *nirS*+ *nirK*) ratios

### 2.4 土壤 N<sub>2</sub>O 排放与硝化、反硝化功能基因的相关性

对土壤 N<sub>2</sub>O 排放与不同功能基因进行相关性分析, 发现在红壤性水稻土淹水条件下, 土壤 N<sub>2</sub>O 排放总量与硝化过程功能基因 AOA-*amoA* 丰度呈显著正相关( $R^2=0.40$ ,  $P<0.05$ ), 与 AOB-*amoA* 丰度则无显著相关性(图 4)。对于反硝化功能基因, 土壤 N<sub>2</sub>O 排放总量与 *nirS* 丰度呈显著正相关( $R^2=0.38$ ,  $P<0.05$ ), 与 *nosZ* 丰度呈显著负相关( $R^2=0.43$ ,  $P<0.05$ ), 与 *nirK* 丰度无显著相关关系。值得关注的是, 土壤 N<sub>2</sub>O 排放总量与 *nosZ*/(AOA-*amoA*+AOB-*amoA*)相关

性最高( $R^2=0.71$ ,  $P<0.01$ ), 与 *nosZ*/(AOA-*amoA*+AOB-*amoA*+*nirS*+ *nirK*)( $R^2=0.47$ ,  $P<0.01$ )和 *nosZ*/(*nirS*+ *nirK*)( $R^2=0.46$ ,  $P<0.01$ )呈显著负相关关系。

## 3 讨论

生物硝化抑制剂(BNIs)作为一种可以抑制土壤硝化作用的物质, 被认为具有调控土壤 N<sub>2</sub>O 排放的潜力<sup>[15,21-23,31,44]</sup>。本研究中, DCD 虽然可以降低红壤性水稻土淹水条件下土壤 N<sub>2</sub>O 日排放峰值, 但对 N<sub>2</sub>O 排放总量没有显著的影响, 这与以往 DCD 在红壤上的研究结果一致<sup>[15]</sup>。但 DCD 在碱性潮土和水稻土上

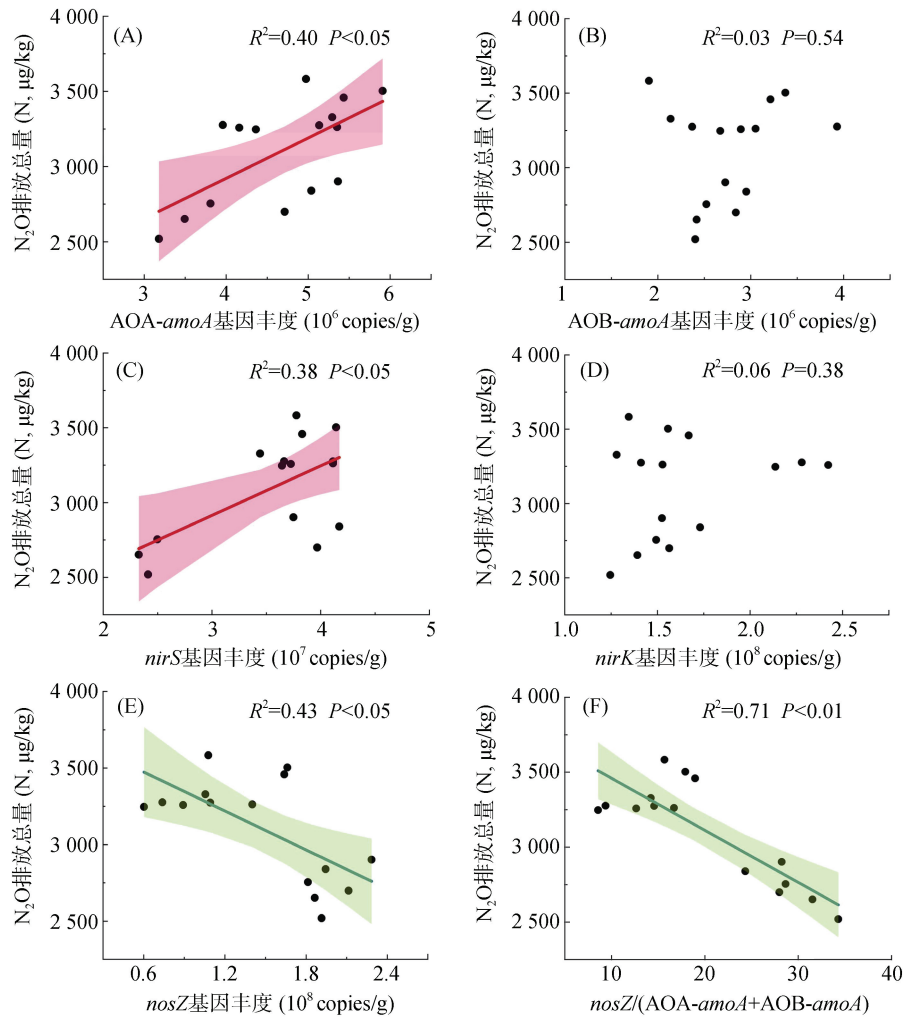


图 4 土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放总量与硝化、反硝化功能基因丰度和相关功能基因比值的相关性

Fig. 4 Correlation analysis of total soil  $\text{N}_2\text{O}$  emissions with abundances of nitrification and denitrification functional genes and the ratios of related functional genes

却表现出较好的  $\text{N}_2\text{O}$  减排趋势<sup>[45-48]</sup>, 这说明 DCD 的减排作用可能与土壤类型有关。本研究中, 不同 BNIs 均比 DCD 具有更低的  $\text{N}_2\text{O}$  日排放峰值和排放总量, 在不同 BNIs 中以 1,9-D 对  $\text{N}_2\text{O}$  减排作用最好, 其次是 MHPP 和 LN。其中, 1,9-D 可以降低  $\text{N}_2\text{O}$  排放总量 44.5%, 略低于 Lu 等<sup>[15]</sup>研究; MHPP 可以显著抑制土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放总量 43.9%, 但减排效果弱于 Lan 等<sup>[31]</sup>研究, 这可能是因为本研究中 MHPP 施用量仅为 100 mg/kg 土, 低于 Lan 等<sup>[31]</sup>研究的施用量 500 mg/kg 土, 这预示着 MHPP 调控  $\text{N}_2\text{O}$  的排放可能具有浓度效应, 值得今后深入研究。LN 虽然可以显著降低土壤  $\text{N}_2\text{O}$  日排放的峰值, 但对土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放的总量却没有显著的抑制作用, 这与 LN 在高硝化土壤中的  $\text{N}_2\text{O}$  减排作用结果一致<sup>[38]</sup>。

虽然不同 BNIs 均可以降低  $\text{N}_2\text{O}$  排放, 但 BNIs 之间的减排作用却有较大的差异。本研究中, 仅有

1,9-D 和 MHPP 对土壤  $\text{N}_2\text{O}$  具有显著的减排作用, 而且 1,9-D 对  $\text{N}_2\text{O}$  的减排作用优于 MHPP。一方面是因为 1,9-D 处理比 MHPP 处理具有更低的 AOA-*amoA*、AOB-*amoA* 和 *nirS* 基因丰度; 另一方面, 1,9-D 处理比 MHPP 处理有更高的 *nosZ*/(AOA-*amoA*+ AOB-*amoA*)、*nosZ*/(*nirS*+ *nirK*) 和 *nosZ*/(AOA-*amoA*+ AOB-*amoA*+*nirS*+ *nirK*) 比值。而 *nosZ* 基因丰度与硝化、反硝化功能基因丰度的比值可决定部分  $\text{N}_2\text{O}$  净产生水平<sup>[49]</sup>, 这说明 1,9-D 比 MHPP 能更好地同时调控硝化和反硝化过程, 进而产生更少的土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放。同时, 由于本实验体系为了模拟田间真实情况会收集淋溶液, 而 MHPP 作为水溶性物质<sup>[17]</sup>, 易随水流失, 从而可能减弱了其对土壤硝化过程的抑制作用及减排  $\text{N}_2\text{O}$  的效果; 1,9-D 作为水稻根系分泌的脂溶性物质<sup>[18]</sup>, 不易在土壤中移动, 为更好更长久地调控  $\text{N}_2\text{O}$  排放提供了可能性。

硝化过程中的 AOA 和 AOB 硝化菌基因丰度与土壤 N<sub>2</sub>O 排放密切相关<sup>[6]</sup>。本研究中,淹水条件下红壤性水稻土的 N<sub>2</sub>O 排放总量与 AOA 硝化菌基因丰度呈显著正相关关系( $R^2=0.40$ ,  $P<0.05$ ),与 AOB 硝化菌基因丰度无显著相关性,这与 Ji 等<sup>[49]</sup>和 Yang 等<sup>[50]</sup>的研究结果相似。这可能是因为 AOA 数量在大多数土壤中优于 AOB,使得土壤硝化作用产生的 N<sub>2</sub>O 总排放量中很大一部分来源于 AOA 过程<sup>[51-52]</sup>;同时,在酸性土壤中,土壤微生物优势种群会发生转变,进而使 N<sub>2</sub>O 排放与土壤 AOA 基因丰度具有更好的交互性<sup>[15]</sup>。*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 均是反硝化过程中产生 N<sub>2</sub>O 的主要功能基因<sup>[53-54]</sup>。本研究发现,土壤 N<sub>2</sub>O 排放总量与 *nirS* 和 *nosZ* 基因丰度呈显著正相关关系,与 *nirK* 基因丰度无显著相关性。这说明在红壤淹水体系下,除了硝化过程,反硝化过程在调控土壤 N<sub>2</sub>O 排放中也扮演重要的角色<sup>[55]</sup>。此外,土壤 N<sub>2</sub>O 排放总量还与 *nosZ* 基因丰度相关比值呈显著正相关关系,进一步证实了淹水条件下 1,9-D 和 MHPP 对土壤 N<sub>2</sub>O 的调控是硝化和反硝化过程共同作用的结果。然而以往的研究大都关注了 AOA 和 AOB 这些硝化功能基因在 N<sub>2</sub>O 排放中的作用<sup>[15,31]</sup>。本研究中,尽管 1,9-D 和 MHPP 均有抑制 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因丰度的趋势,但这两种 BNIs 对 N<sub>2</sub>O 的减排主要是通过抑制前者实现,因为 AOA-*amoA* 的丰度与 N<sub>2</sub>O 减排呈正相关。研究表明,BNIs 对 AOA 的亲性和普遍比 AOB 强<sup>[15,37]</sup>。1,9-D 和 MHPP 处理的 *nosZ* 基因丰度及相关比值的促进表明这两种 BNIs 能够增强 N<sub>2</sub>O 到 N<sub>2</sub> 的还原过程。Florio 等<sup>[56]</sup>研究发现高 BNIs 活性的森林树种比无 BNIs 活性的树种更能显著抑制 N<sub>2</sub>O 排放,这与其能促进 *nosZ* 基因丰度有关。然而 BNIs 影响 *nosZ* 还原微生物的机理还尚不清楚,有待进一步研究。

#### 4 结论

在红壤性水稻土淹水条件下,生物硝化抑制剂 1,9-D 和 MHPP 能显著抑制 N<sub>2</sub>O 排放峰值和总量,而 LN 和 DCD 无显著影响。这些生物硝化抑制剂和化学合成硝化抑制剂对 N<sub>2</sub>O 排放的效果差异与微生物硝化与反硝化过程密切相关。AOB-*amoA*、*nirS* 和 *nosZ* 基因丰度与土壤 N<sub>2</sub>O 排放主要关联。1,9-D 抑制了 AOA、AOB、*nirS* 型反硝化微生物,促进了 N<sub>2</sub>O 还原菌的生长,而 MHPP 主要改变了 AOA 微生物和 N<sub>2</sub>O 还原菌的生长。可见,施用生物硝化抑制剂 1,9-D 和 MHPP 将有望成为红壤性水稻土中提高氮素利用

率与减少 N<sub>2</sub>O 排放的潜力措施。然而,未来这些 BNIs 的减排效果需要在田间条件下通过更长的试验周期进行验证。

#### 参考文献:

- [1] Solomon S C, Qin D, Manning M R, et al. Climate change: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change[J]. Summary for Policymakers, 2007.
- [2] Smith K A, Mosier A R, Crutzen P J, et al. The role of N<sub>2</sub>O derived from crop-based biofuels, and from agriculture in general, in Earth's climate[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2012, 367(1593): 1169–1174.
- [3] Sun H J, Zhang H L, Powlson D, et al. Rice production, nitrous oxide emission and ammonia volatilization as impacted by the nitrification inhibitor 2-chloro-6-(trichloromethyl)-pyridine[J]. Field Crops Research, 2015, 173: 1–7.
- [4] Xu J Y, Min J, Sun H J, et al. Biostimulants decreased nitrogen leaching and NH<sub>3</sub> volatilization but increased N<sub>2</sub>O emission from plastic-shed greenhouse vegetable soil[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, 29(4): 6093–6102.
- [5] Syakila A, Kroeze C. The global nitrous oxide budget revisited[J]. Greenhouse Gas Measurement and Management, 2011, 1(1): 17–26.
- [6] Liu Y R, Delgado-Baquerizo M, Trivedi P, et al. Species identity of biocrust-forming lichens drives the response of soil nitrogen cycle to altered precipitation frequency and nitrogen amendment[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 96: 128–136.
- [7] Ligi T, Truu M, Truu J, et al. Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes (*nirS*, *nirK*, and *nosZ*) abundances in a created riverine wetland complex[J]. Ecological Engineering, 2014, 72: 47–55.
- [8] Xu H J, Wang X H, Li H, et al. Biochar impacts soil microbial community composition and nitrogen cycling in an acidic soil planted with rape[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(16): 9391–9399.
- [9] Min J, Sun H J, Kronzucker H J, et al. Comprehensive assessment of the effects of nitrification inhibitor application on reactive nitrogen loss in intensive vegetable production systems[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2021, 307: 107227.
- [10] 沈晓忆, 夏围围, 张洁, 等. 硝化抑制剂与尿素配施对旱地土壤温室气体排放及硝化微生物的影响[J]. 土壤, 2021, 53(3): 512–521.
- [11] 孙海军, 闵炬, 施卫明, 等. 硝化抑制剂影响小麦产量、N<sub>2</sub>O 与 NH<sub>3</sub> 排放的研究[J]. 土壤, 2017, 49(5): 876–881.
- [12] 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 & Environment*, 2014, 189: 136–144.
- [13] Sun H J, Min J, Shi W M, et al. Effects of nitrification inhibitor application on wheat grain yield, N<sub>2</sub>O emission and NH<sub>3</sub> volatilization[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 49(5): 876–881.
- [14] Woodward E E, Hladik M L, Kolpin D W. Nitrapyrin in streams: The first study documenting off-field transport of a nitrogen stabilizer compound[J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2016, 3(11): 387–392.
- [15] 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.
- [16] Subbarao G V, Ishikawa T, Ito O, et al. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: A case study with *Brachiaria humidicola*[J]. *Plant and Soil*, 2006, 288(1): 101–112.
- [17] Subbarao G V, Nakahara K, Ishikawa T, et al. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization[J]. *Plant and Soil*, 2013, 366(1): 243–259.
- [18] Sun L, Lu Y F, Yu F W, et al. Biological nitrification inhibition by rice root exudates and its relationship with nitrogen-use efficiency[J]. *The New Phytologist*, 2016, 212(3): 646–656.
- [19] Zhang X N, Lu Y F, Yang T, et al. Factors influencing the release of the biological nitrification inhibitor 1, 9-decanediol from rice (*Oryza sativa* L.) roots[J]. *Plant and Soil*, 2019, 436(1): 253–265.
- [20] 陆玉芳, 施卫明. 根际化学信号物质与土壤养分转化[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(9): 14–24.
- [21] Coskun D, Britto D T, Shi W M, et al. Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 17074.
- [22] 曾后清, 朱毅勇, 王火焰, 等. 生物硝化抑制剂——一种控制农田氮素流失的新策略[J]. *土壤学报*, 2012, 49(2): 382–388.
- [23] 陆玉芳, 施卫明. 生物硝化抑制剂的研究进展及其农业应用前景[J]. *土壤学报*, 2021, 58(3): 545–557.
- [24] Zakir H A K M, Subbarao G V, Pearse S J, et al. Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by *Sorghum* (*Sorghum bicolor*)[J]. *The New Phytologist*, 2008, 180(2): 442–451.
- [25] Subbarao G V, Nakahara K, Hurtado M P, et al. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(41): 17302–17307.
- [26] Lu Y F, Zhang X N, Ma M K, et al. Syringic acid from rice as a biological nitrification and urease inhibitor and its synergism with 1, 9-decanediol[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2022, 58(3): 277–289.
- [27] 杨婷, 陆玉芳, 马明坤, 等. 超声提取-气相色谱法测定土壤 1, 9-癸二醇[J]. *土壤学报*, 2021, 58(4): 968–977.
- [28] 张晓楠, 陆玉芳, 杨婷, 等. 水稻生物硝化抑制剂 1, 9-癸二醇的定量方法优化[J]. *土壤*, 2020, 52(6): 1152–1157.
- [29] Otaka J, Subbarao G V, Ono H, et al. Biological nitrification inhibition in maize—Isolation and identification of hydrophobic inhibitors from root exudates[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2022, 58(3): 251–264.
- [30] Byrnes R C, Nùñez J, Arenas L, et al. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria* grasses mitigates soil nitrous oxide emissions from bovine urine patches[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 107: 156–163.
- [31] Lan T, Huang Y X, Song X, et al. Biological nitrification inhibitor co-application with urease inhibitor or biochar yield different synergistic interaction effects on NH<sub>3</sub> volatilization, N leaching, and N use efficiency in a calcareous soil under rice cropping[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 293: 118499.
- [32] Zhang M, Fan C H, Li Q L, et al. A 2-yr field assessment of the effects of chemical and biological nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions and nitrogen use efficiency in an intensively managed vegetable cropping system[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2015, 201: 43–50.
- [33] 谢正苗, 吕军, 俞劲炎, 等. 红壤退化过程与生态位的研究[J]. *应用生态学报*, 1998, 9(6): 669–672.
- [34] 邓铁金, 樊友安, 周任发. 红壤性水稻土的形成过程特点及其肥力演变[J]. *土壤学报*, 1985, 22(1): 1–12.
- [35] 崔磊, 李东坡, 武志杰, 等. 不同硝化抑制剂对红壤氮素硝化作用及玉米产量和氮素利用率的影响[J]. *应用生态学报*, 2021, 32(11): 3953–3960.
- [36] 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.
- [37] Lan T, Xie N, Chen C, et al. Effects of biological nitrification inhibitor in regulating NH<sub>3</sub> volatilization and fertilizer nitrogen recovery efficiency in soils under rice cropping[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 838: 155857.
- [38] Ma Y, Jones D L, Wang J Y, et al. Relative efficacy and stability of biological and synthetic nitrification inhibitors in a highly nitrifying soil: Evidence of apparent nitrification inhibition by linoleic acid and linolenic acid[J]. *European Journal of Soil Science*, 2021, 72(6): 2356–2371.
- [39] Gao X S, Deng O P, Ling J, et al. Effects of controlled-release fertilizer on nitrous oxide and nitric oxide emissions during wheat-growing season: Field and pot experiments[J]. *Paddy and Water Environment*, 2018, 16(1): 99–108.
- [40] 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.



- [41] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monoxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704–4712.
- [42] Hallin S, Lindgren P E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1652–1657.
- [43] Henry S, Bru D, Stres B, et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5181–5189.
- [44] Subbarao G V, Ito O, Sahrawat K L, et al. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems—Challenges and opportunities[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2006, 25(4): 303–335.
- [45] Ding W X, Yu H Y, Cai Z C. Impact of urease and nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions from fluvo-aquic soil in the North China Plain[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(1): 91–99.
- [46] Lan T, Han Y, Roelcke M, et al. Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on gross N transformation rates and mitigating N<sub>2</sub>O emission in paddy soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 67: 174–182.
- [47] Li X L, Zhang G B, Xu H, et al. Effect of timing of joint application of hydroquinone and dicyandiamide on nitrous oxide emission from irrigated lowland rice paddy field[J]. *Chemosphere*, 2009, 75(10): 1417–1422.
- [48] 王艳群, 李迎春, 彭正萍, 等. 氮素配施双氰胺对冬小麦-夏玉米轮作系统 N<sub>2</sub>O 排放的影响及效益分析[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(7): 1999–2006.
- [49] Ji C, Li S Q, Geng Y J, et al. Decreased N<sub>2</sub>O and NO emissions associated with stimulated denitrification following biochar amendment in subtropical tea plantations[J]. *Geoderma*, 2020, 365: 114223.
- [50] Yang L Q, Zhu G D, Ju X T, et al. How nitrification-related N<sub>2</sub>O is associated with soil ammonia oxidizers in two contrasting soils in China?[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 770: 143212.
- [51] Jung M Y, Well R, Min D, et al. Isotopic signatures of N<sub>2</sub>O produced by ammonia-oxidizing Archaea from soils[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(5): 1115–1125.
- [52] Schleper C. Ammonia oxidation: Different niches for bacteria and Archaea?[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(9): 1092–1094.
- [53] Chèneby D, Hartmann A, Hénault C, et al. Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N<sub>2</sub>O in two soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1998, 28(1): 19–26.
- [54] Cytryn E, Levkovitch I, Negreanu Y, et al. Impact of short-term acidification on nitrification and nitrifying bacterial community dynamics in soilless cultivation media[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(18): 6576–6582.
- [55] Estavillo J, Merino P, Pinto M, et al. Short term effect of ploughing a permanent pasture on N<sub>2</sub>O production from nitrification and denitrification[J]. *Plant and Soil*, 2002, 239(2): 253–265.
- [56] Florio A, Marechal M, Legout A, et al. Influence of biological nitrification inhibition by forest tree species on soil denitrifiers and N<sub>2</sub>O emissions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 155: 108164.