

# 脲酶抑制剂与硝化抑制剂对稻田土壤硝化、反硝化功能菌的影响

张文学, 王少先<sup>†</sup>, 夏文建, 孙刚\*, 刘增兵, 李祖章, 刘光荣  
(江西省农业科学院土壤肥料与资源环境研究所/农业部双季稻营养与农业环境观测实验站/  
国家红壤改良工程技术研究中心, 南昌 330200)

**摘要:** 【目的】在农业生产中, 脲酶抑制剂 (urease inhibitor, UI) 与硝化抑制剂 (nitrification inhibitor, NI) 常作为氮肥增效剂来提高肥料利用率。本文研究了在我国南方红壤稻田施用脲酶抑制剂与硝化抑制剂后, 土壤中氨氧化细菌 (ammonia oxidizing bacteria, AOB)、氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA) 以及反硝化细菌的丰度以及群落结构的变化特征, 旨在揭示抑制剂的作用机理及其对土壤环境的影响。【方法】试验在我国南方红壤稻田进行, 共设 5 个处理: 1) 不施氮肥 (CK); 2) 尿素 (U); 3) 尿素 + 脲酶抑制剂 (U + UI); 4) 尿素 + 硝化抑制剂 (U + NI); 5) 尿素 + 脲酶抑制剂 + 硝化抑制剂 (U + UI + NI), 3 次重复。脲酶抑制剂与硝化抑制剂分别为 NBPT [N-(n-butyl) thiophosphoric triamide, N-丁基硫代磷酸三胺] 和 DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate, 3,4-二甲基吡唑磷酸盐)。通过荧光定量 PCR (Real-time PCR) 研究水稻分蘖期与孕穗期抑制剂对三类微生物标记基因拷贝数的影响, 并分析土壤铵态氮、硝态氮与三种菌群丰度的相关性; 利用变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) 分析抑制剂对土壤 AOB、AOA 以及反硝化细菌群落结构的影响, 并对优势菌群进行系统发育分析。【结果】1) 荧光定量 PCR 结果表明, 施用氮肥对两个时期土壤中 AOB 的 *amoA* 基因与反硝化细菌 *nirK* 基因的拷贝数均有显著提高, 而对 AOA 的 *amoA* 基因始终没有明显影响; AOB 与 *nirK* 反硝化细菌的丰度与两个时期的铵态氮含量、分蘖期的硝态氮含量呈极显著正相关, 与孕穗期的硝态氮含量相关性不显著; DMPP 仅在分蘖期显著减少了 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数, 表明 DMPP 主要通过限制 AOB 的生长来抑制稻田土壤硝化过程; NBPT 对三类微生物的丰度无明显影响; 2) DGGE 图谱表明, 在分蘖期与孕穗期, 施用氮肥均明显增加了图谱中 AOB 的条带数, 而对 AOA 却没有明显影响; 氮肥明显增加了孕穗期反硝化细菌的条带数; 与氮肥的影响相比, 抑制剂 NBPT 与 DMPP 对 AOA、AOB 以及反硝化菌的群落结构影响甚微; 系统发育分析结果表明, 与土壤中 AOB 的优势菌群序列较为接近的有亚硝化单胞菌和亚硝化螺菌。【结论】在南方红壤稻田中, 施入氮肥可显著提高 AOB 与反硝化细菌的丰度, 明显影响两种菌群的群落结构, 而 AOA 较为稳定; NBPT 对三类微生物的群落结构丰度无明显影响; 硝化抑制剂 DMPP 可抑制 AOB 的生长但仅表现在分蘖期, 这可能是其缓解硝化反应的主要途径; 这也说明二者对土壤生态环境均安全可靠。

**关键词:** 抑制剂; 稻田; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 反硝化细菌

## Effects of urease inhibitor and nitrification inhibitor on functional nitrifier and denitrifier in paddy soil

ZHANG Wen-xue, WANG Shao-xian<sup>†</sup>, XIA Wen-jian, SUN Gang\*, LIU Zeng-bing, LI Zu-zhang, LIU Guang-rong  
(Institute of Soil and Fertilizer & Resources and Environment, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences/Double Cropping Rice Nutrition and Agricultural Environment Observation Experimental Station of Ministry of Agriculture/National Engineering Technology Research Center for Red Soil Improvement, Nanchang 330200, China)

**Abstract:** 【Objectives】Urease inhibitor (UI) and nitrification inhibitor (NI), as nitrogen synergist, are used to improve the efficiency of nitrogen (N) fertilizer in agriculture. The aim of this study was to investigate the effect

收稿日期: 2018-06-11 接受日期: 2019-03-11

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0301603, 2016YFD0200109, 2017YFD0301601); 国家自然科学基金项目 (31560585, 31560582); 江西省农业科学院创新基金博士启动项目 (2014ZCBS009)。

联系方式: 张文学 E-mail: xuezi405@163.com; <sup>†</sup>王少先与第一作者同等贡献 E-mail: wshxjx@126.com

\* 通信作者 孙刚 E-mail: sgemail@163.com

of UI and NI on the abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria (AOB), ammonia-oxidizing archaea (AOA), and denitrifying bacteria in paddy soil, and reveal the synergy mechanism of the inhibitors and their effects on soil environment. **【 Methods 】** A field experiment was conducted in a paddy field of red soil in southern China. A randomized block design with five treatments and three replicates was as follows: 1) CK (no N control), 2) U (Urea), 3) U + UI, 4) U + NI, 5) U + UI + NI. The urease inhibitor and nitrification inhibitor were NBPT [N-(n-butyl) thiophosphoric triamide] and DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate) respectively. The abundance and composition of AOB, AOA and denitrifying bacteria were investigated by fluorescent quantitative real-time PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches based on *amoA* and *nirK* genes, at tillering stage and booting stage, respectively. Then, dominant populations were sequenced and phylogenetic analyzed. **【 Results 】** 1) Real-time PCR analysis showed that N fertilizer remarkably increased the gene copy numbers of *amoA* in AOB and *nirK* in denitrifying bacteria in soil at both stages, respectively. But this effect was not observed in the abundance of AOA all the time. Moreover, the abundance of AOB and denitrifying bacteria was very significantly ( $P < 0.01$ ) related to the content of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  at both stages and  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  at tillering stage. DMPP mainly decreased the abundance of AOB but not AOA at tillering stage, which revealed that DMPP inhibited the soil nitrification by limiting the growth of AOB. Little changes in the abundance of AOB, AOA and denitrifying bacteria were detected among the treatments added with NBPT. 2) The profile of DGGE fingerprint indicated that, N fertilizer notably increased the band numbers in fingerprint of AOB but not affected that of AOA at both stages. In addition, N fertilizer obviously enhanced the band number in fingerprint of denitrifying bacteria at booting stage. The effects of NBPT and DMPP on the community structures of AOB, AOA and denitrifying bacteria were too little to be observed. Phylogenetic analysis indicated that the sequences of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* were more similar to dominant microflora of AOB in paddy field. **【 Conclusions 】** The abundance of AOB and denitrifying bacteria was distinctly improved by N fertilizer, and the community structures of both bacteria were sensitive to N fertilizer in paddy field, but AOA was stable, in red soil area of Southern China. The effect of urease inhibitor NBPT on the abundance and community structure of AOA, AOB and denitrifying bacteria was little. The nitrification inhibitor DMPP limited the growth of AOB at tillering stage, while the effect was negligible at booting stage. It may be the main way to alleviate nitrification. It is estimated that both NBPT and DMPP are harmless to the soil environment.

**Key words:** inhibitor; paddy field; ammonia oxidizing bacteria (AOB); ammonia-oxidizing archaea (AOA); denitrifying bacteria

尿素是一种高浓度的酰胺态氮肥，因其较高的含氮量被作为农业生产上最常用的氮肥，但是尿素施入农田后会导致氮素损失是一直被关注的。硝化-反硝化作用是稻田氮素损失的重要途径<sup>[1]</sup>，而且硝化、反硝化一般是紧密相连、相继发生的，又被称为成对硝化和反硝化过程<sup>[2]</sup>，这两个反应过程被证明均由土壤微生物所驱动<sup>[3]</sup>。

硝化作用可分为两步：氨氧化过程 ( $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$ ) 与亚硝酸盐氧化过程 ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ )，氨氧化过程被认为是硝化作用的限速步骤<sup>[3-7]</sup>。氨氧化过程又可以分两步为  $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^-$ ，且分别由氨单加氧酶 (ammonia monooxygenase, AMO) 与羟胺氧化还原酶 (hydroxylamine oxidoreductase, HAO) 催化完成<sup>[8]</sup>。氨单加氧酶是一种胞内酶，由基因 *amoA*、*amoB* 和

*amoC* 编码的三个亚基组成，由于 *amoA* 基因的序列具有一定的保守性，且所编码的蛋白亚基含有该酶的活性位点，因此常被作为氨单加氧酶的功能标记基因<sup>[4-5]</sup>。氨氧化细菌 (ammonia oxidizing bacteria, AOB)、氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA) 作为氨氧化的主要完成者，均含有编码氨单加氧酶的基因 *amoA*、*amoB* 和 *amoC*<sup>[9]</sup>，且 *amoA* 基因被作为研究 AOB 与 AOA 的标记基因。反硝化作用 ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) 一般发生在嫌气或低氧的环境，硝酸盐在硝酸盐还原酶 (Nar)、亚硝酸盐还原酶 (Nir)、NO 还原酶 (Nor) 和  $\text{N}_2\text{O}$  还原酶 (Nos) 的催化作用下依次还原为  $\text{NO}_2^-$ 、NO、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$ ，对编码以上四种酶的功能基因主要有 *narG*、*nirK/nirS*、*norB*、*nosZ*<sup>[3,10]</sup>，由于亚硝酸盐还原酶 (Nir) 催化的反

应是反硝化过程中关键的限速步骤, 因此, 关于编码该酶的功能基因 *nirK* 和 *nirS* 的研究也较多, 主要用作反硝化微生物群落的分子标记物<sup>[11]</sup>, 而且, 研究发现 *nirK* 基因对环境因子的响应较 *nirS* 基因更灵敏<sup>[12-13]</sup>。

由于脲酶抑制剂可以通过抑制脲酶活性以达到延缓尿素水解为铵态氮的目的, 硝化抑制剂可以抑制铵态氮的硝化作用, 从而减少  $\text{NO}_3^-$  的形成、淋失以及随后的反硝化损失<sup>[14-15]</sup>, 二者常被用在农业生产上提高氮肥利用率<sup>[16-17]</sup>。有报道指出, 参与硝化、反硝化菌的群落结构以及丰度对土壤养分、pH、温度等理化性状的变化有着灵敏的响应<sup>[3, 18-19]</sup>。但关于两种抑制剂及其配施对稻田硝化与反硝化菌群结构、丰度的影响报道较少。本文以南方红壤稻田为研究对象, 在添加脲酶抑制剂 NBPT 与硝化抑制剂 DMPP 之后, 研究了分蘖期与孕穗期土壤中铵态氮、硝态氮含量、*amoA* 与 *nirK* 基因丰度以及 AOB、AOA 与反硝化细菌群落结构的变化, 旨在进一步揭示抑制剂的作用机理及其对土壤环境的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地点

试验于 2012 年 4—7 月在江西省农业科学院土壤肥料与资源环境研究所南昌试验基地 (28°21'12"N, 115°54'25"E) 进行。该区属于亚热带湿润气候, 海拔高度 20 m, 平均气温 17.8℃,  $\geq 10^\circ\text{C}$  的积温为 5432℃, 无霜期长达 240~307 d, 年降水量 1662 mm, 降水季节分配不均, 全年降水 50% 以上集中在 4—6 月。供试土壤为第四纪红粘土发育的潮砂泥田, 土壤质地为壤土。播种前土壤有机质含量 20.12 g/kg, 全氮含量 2.06 g/kg、硝态氮含量 1.8 mg/kg、铵态氮含量 16.2 mg/kg、有效磷 2.6 mg/kg、速效钾 94.55 mg/kg、pH 4.97、土壤容重为 1.19 g/cm<sup>3</sup>。

### 1.2 供试材料与试验设计

水稻供试品种为株两优 30, 脲酶抑制剂为 NBPT (N-丁基硫代磷酸三胺), 硝化抑制剂为 DMPP (3,4-二甲基吡唑磷酸盐)。供试肥料品种: 氮肥为尿素 (含 N 46%)、磷肥为钙镁磷肥 (含  $\text{P}_2\text{O}_5$  12%)、钾肥为氯化钾 (含  $\text{K}_2\text{O}$  60%)。

试验共设 5 个处理: 1) 不施氮肥 (CK); 2) 尿素 (U); 3) 尿素 + 脲酶抑制剂 (U + UI); 4) 尿素 + 硝化抑制剂 (U + NI); 5) 尿素 + 脲酶抑制剂 + 硝化抑制剂 (U + UI + NI)。设 3 次重复, 各小区随机区组排列, 每个小区面积 30 m<sup>2</sup> (5 m × 6 m), 各小区以 50 cm

的间隔行隔开, 且保持小区间的田埂高出地面 40 cm, 并用塑料薄膜包裹田埂以防止相互串水串肥, 实现各小区独立排灌的管理目的。试验氮 (N)、磷 ( $\text{P}_2\text{O}_5$ )、钾 ( $\text{K}_2\text{O}$ ) 用量分别为 135 kg/hm<sup>2</sup>、75 kg/hm<sup>2</sup> 和 150 kg/hm<sup>2</sup>。抑制剂与尿素混匀施入, 抑制剂用量为尿素的 1%。氮肥和磷肥作基肥于移栽前一次性施入; 钾肥分 3 次施入, 40% 作基肥, 30% 作分蘖肥, 30% 作孕穗肥。试验于 2012 年 3 月 10 日播种, 4 月 23 日移栽, 7 月 20 日收获, 水稻种植密度以及各项栽培管理措施同当地农民习惯。

样品采集: 在水稻分蘖期、孕穗期分别采集各小区耕层土壤, 一部分保存于 4℃ 冰箱用于测定土壤铵态氮、硝态氮含量, 另一部分保存于 -20℃ 用于土壤 DNA 提取, 分析 AOB、AOA 以及反硝化细菌的基因丰度与群落结构。

### 1.3 样品测定与数据分析

1.3.1 土壤中铵态氮与硝态氮含量的测定 土壤中的铵态氮与硝态氮含量用 1 mol/L 的 KCl 溶液浸提, 采用全自动间断化学分析仪 (Smartchem TM200 discrete chemistry analyzer) Smartchem 200 测定。

1.3.2 土壤微生物总 DNA 的提取 将土壤样品按照土壤 DNA 提取试剂盒 (Fast DNA SPIN Kit for soil MP-bio, USA) 的说明进行操作, 并用 0.7% (w/v) 的琼脂糖检验 DNA, 提取成功的样品保存于 -20℃ 冰箱待用。

1.3.3 聚合酶链式反应 (PCR) 对提取成功的 DNA 模板进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR), 运用特异性引物对土壤中特定微生物的 DNA 片段进行扩增。AOB 与 AOA 的 *amoA* 基因所用的扩增引物分别为 *amoA*-1F/*amoA*-2R<sup>[20]</sup> 与 Crenamo A23f/Crenamo A616r<sup>[21-22]</sup>, 反硝化细菌的 *nirK* 基因所用的引物为 F1aCu/R3Cu<sup>[23]</sup>, 具体引物序列以及 PCR 反应程序见表 1。PCR 反应体系共 25  $\mu\text{L}$ : 12.5  $\mu\text{L}$  的 2 × EasyTaq PCR SuperMix (TransGen 生物技术公司, 中国北京), 0.5  $\mu\text{L}$  的上、下引物和 1  $\mu\text{L}$  稀释 10 倍的 DNA 模板, 10.5  $\mu\text{L}$  的灭菌双蒸水, 终体积为 25  $\mu\text{L}$ 。在 MyCycler 热循环仪 (Bio-Rad 公司) 进行 PCR 反应, 所有 PCR 产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 扩增反应的效果。

1.3.4 荧光定量 PCR AOB、AOA 的 *amoA* 基因和 *nirK* 基因的定量 PCR 利用荧光定量 PCR 仪 Bio-Rad iQ5 (Bio-Rad, USA) 分析, 运行程序按定量试剂盒说明书执行。PCR 体系包括: 5  $\mu\text{L}$  SYBR Green I PCR Mix (TaKaRa, Dalian, China), 0.2  $\mu\text{L}$  的引物, 0.8  $\mu\text{L}$  DNA 模板, 终体积为 10  $\mu\text{L}$ 。AOB、AOA 的

表 1 PCR 引物序列及反应程序

Table 1 Primers and conditions used for the conventional PCR

目标群落 Target group	引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	热循环程序 Thermal profile	参考文献 Reference
氨氧化细菌 AOB	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	95℃, 预变性 300 s, 40 个循环为 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 60 s; 最后 72℃ 末端延伸 600 s。	[20]
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
氨氧化古菌 AOA	crenamoA23f	ATGGTCTGGCTWAGACG	95℃, 预变性 300 s, 前 10 个循环为 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s; 后 25 个循环为: 93℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s 和 72℃ 延伸 60 s; 最 后 72℃ 末端延伸 600 s。	[21-22]
	crenamoA616r	GCCATCCATCTGTATGTCCA		
<i>nirK</i> 型反硝化细菌 Denitrifying bacteria ( <i>nirK</i> )	F1aCu	ATCATGGTSCTGCCGCG	95℃, 预变性 180 s, 前 12 个循环为 95℃ 变性 30 s, 68℃ 退火 30 s (每循环降低 1.0℃), 72℃ 延伸 45 s; 后 20 个循环为 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s; 最后 72℃ 末端延伸 600 s。	[23]
	R3Cu	GCCTCGATCAGRITGTGGTT		

*amoA* 基因和 *nirK* 基因定量 PCR 所用引物见表 1。含有目标基因片段的质粒从  $10^8$ — $10^2$  进行 10 倍浓度梯度连续稀释制作标准曲线, 通过溶解曲线确定定量 PCR 的扩增特异性; 每个样品重复 3 次。反应结束后, 运行程序会根据标准曲线以及样品的 Ct 值 (每个样品管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数) 定量计算出样品的起始拷贝数。

1.3.5 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 聚丙烯酰胺浓度为 8% (w/v), AOB、AOA 与 *nirK* 型反硝化细菌的 DGGE 变性浓度分别为 50%~70%、30%~50% 与 45%~65%。在 1 倍 TAE 缓冲液中, 75 V 电压、60℃ 条件下电泳 16 h, 电泳后用 1  $\mu$ L 的 SyBR green I (Invitrogen) (稀释 10000 倍) 核酸染料染色 30 min, 然后用 Bio-Rad 成像系统 (Bio-Rad, USA) 拍照。DGGE 图谱采用 Quantity One 软件分析样品的电泳条带特征, 聚类分析采用 UPGMA 运算法则。

1.3.6 序列比较与系统发育分析 将 DGGE 图谱中的优势菌群切胶回收纯化, 并用表 1 中相应的引物进行 PCR 扩增, 将扩增产物进行纯化后测序 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 测序得到的序列信息输入 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 通过 Blast 与 Gene Bank 中的已知序列比对, 确定序列的微生物种类, 并运用 MEGA6.0 软件的邻接法 (Neighbor joining method) 进行系统发育分析。

1.3.7 数据处理 数据经 Excel 2007 整理后, 采用 SAS9.1 软件进行统计分析; PCR-DGGE 成像用 quantity one 软件分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤铵态氮与硝态氮含量

稻田土壤中的铵态氮含量明显高于硝态氮的含

量 (图 1)。在水稻分蘖期, 与处理 U 相比, 处理 U + UI 和 U + UI + NI 的铵态氮含量显著降低, 而处理 U + NI 与处理 U 相比无显著差异, 这可能由于 NBPT 减缓了尿素水解, 显著降低了此时土壤的铵态氮含量, 而单独添加 DMPP 则无此效应。在孕穗期, 所有处理的土壤铵态氮含量较分蘖期的均急剧下降, 可能是由于分蘖期到孕穗期水稻快速生长对氮肥的大量吸收所致; 施氮肥的四个处理相比, 添加 NBPT 的处理 U + UI 与 U + UI + NI 的铵态氮含量明显高于处理 U 与 U + NI 的, 这可能由于 NBPT 此时已分解, 失去了对脲酶活性的抑制作用, 尿素进一步水解, 增加了铵态氮的含量, 可为水稻的后期生长提供充足的氮源。

与土壤铵态氮含量相比, 硝态氮含量极低, 且同一时期内处理间的差异均不显著 ( $P > 0.05$ ), 这说明添加 NBPT 虽然显著降低了分蘖期土壤中铵态氮的含量, 但是对于硝态氮含量没有显著影响, 这可能由于淹水条件下硝化作用极弱, 导致铵态氮的含量对硝化作用无明显影响, 同理, 硝化抑制剂 DMPP 对硝化反应的影响也很微弱。

### 2.2 土壤硝化、反硝化菌丰度

处理间 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数存在显著差异 (图 2)。在分蘖期, AOB 的 *amoA* 基因拷贝数范围在  $2.0 \times 10^6$ ~ $3.4 \times 10^6$  copies/g, 施氮处理中 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数显著高于不施氮处理; 处理 U + NI 与 U + UI + NI 的 *amoA* 基因拷贝数显著低于处理 U 和 U + UI。这说明施用氮肥显著增加了分蘖期稻田土壤中 AOB 的丰度, 然而添加硝化抑制剂 DMPP 能够有效抑制 AOB 的生长。在孕穗期, 所有施氮处理相比 CK 均增加了土壤 *amoA* 基因拷贝数,

而施用氮肥 4 个处理间无显著差异, 说明施用氮肥对孕穗期的 AOB 生长依然有促进作用, 但 DMPP 对 AOB 的抑制作用已消失, 可能此时 DMPP 的时效性已过。

图 3 显示, AOA 的 *amoA* 拷贝数范围在  $17.3 \times 10^6 \sim 20.5 \times 10^6$  copies/g 之间, 是氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数的 6.1~10.2 倍, 说明在红壤稻田 AOA 在数量上居于主导地位; AOA 的 *amoA* 基因拷贝数在分蘖期明显高于孕穗期的, 说明生育期对 AOA 的丰

度有明显影响, 而所有处理间始终无显著差异, 说明 AOA 的丰度对施用氮肥、NBPT 以及 DMPP 均无明显响应。

由图 4 可知, *nirK* 基因拷贝数在  $21.0 \times 10^7 \sim 36.3 \times 10^7$  copies/g 之间, 在分蘖期与孕穗期, 施氮肥处理的 *nirK* 基因拷贝数均显著高于不施氮肥的, 而处理 U、U+UI、U+NI 与 U+UI+NI 在分蘖期或孕穗期均无显著差异, 说明施用氮肥可以显著提高 *nirK* 型反硝化细菌的丰度, 而脲酶抑制剂 NBPT 或

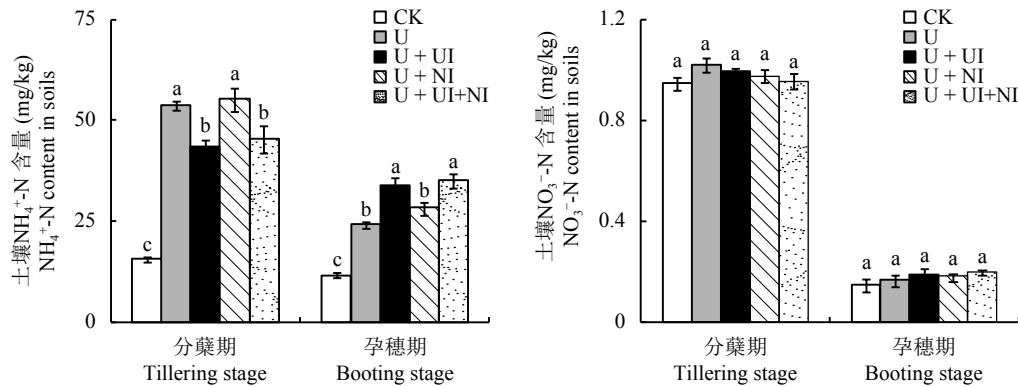


图 1 土壤铵态氮与硝态氮含量

Fig. 1 Contents of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N in soils

[注 (Note): CK—不施氮肥 Zero N fertilizer; U—尿素 Urea; U+UI—尿素+脲酶抑制剂 Urea+Urease inhibitor; U+NI—尿素+硝化抑制剂 Urea+Nitrification inhibitor; U+UI+NI—尿素+脲酶抑制剂+硝化抑制剂 Urea+Urease inhibitor+Nitrification inhibitor. 方柱上不同小写字母代表同一时期内处理间差异在 5% 水平显著 Different small letters above the bars mean significant differences among treatments in the same stage at 5% level.]

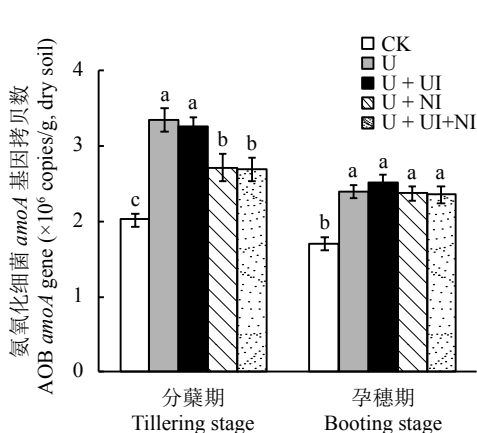


图 2 土壤氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因拷贝数

Fig. 2 Ammonia-oxidizing bacterial (AOB) *amoA* gene copy numbers in soils

[注 (Note): CK—不施氮肥 Zero N fertilizer; U—尿素 Urea; U+UI—尿素+脲酶抑制剂 Urea+Urease inhibitor; U+NI—尿素+硝化抑制剂 Urea+Nitrification inhibitor; U+UI+NI—尿素+脲酶抑制剂+硝化抑制剂 Urea+Urease inhibitor+Nitrification inhibitor. 方柱上不同小写字母代表同一时期内处理间差异在 5% 水平显著 Different small letters above the bars mean significant differences among treatments in the same stage at 5% level.]

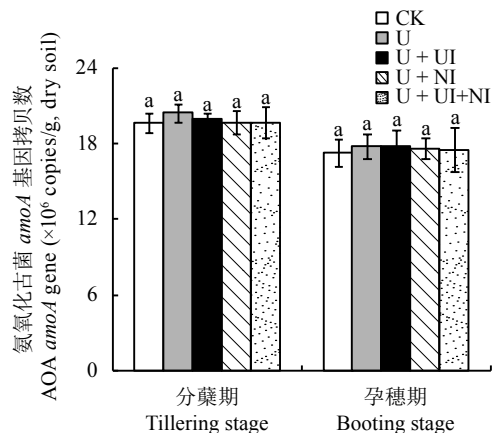


图 3 土壤氨氧化古菌 (AOA) *amoA* 基因拷贝数

Fig. 3 Ammonia-oxidizing archaeal (AOA) *amoA* gene copy numbers in soils

[注 (Note): CK—不施氮肥 Zero N fertilizer; U—尿素 Urea; U+UI—尿素+脲酶抑制剂 Urea+Urease inhibitor; U+NI—尿素+硝化抑制剂 Urea+Nitrification inhibitor; U+UI+NI—尿素+脲酶抑制剂+硝化抑制剂 Urea+Urease inhibitor+Nitrification inhibitor; 方柱上不同小写字母代表同一时期内处理间差异在 5% 水平显著 Different small letters above the bars mean significant differences among treatments in the same stage at 5% level.]

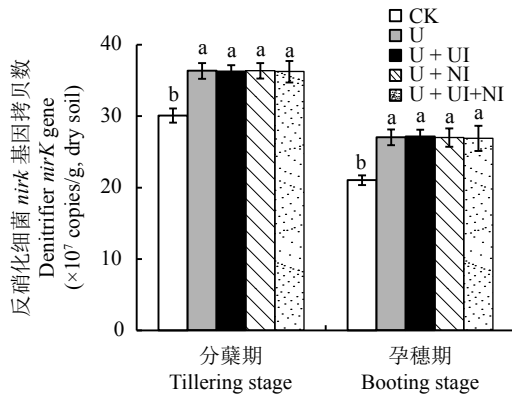


图4 土壤反硝化细菌 *nirK* 基因拷贝数

Fig. 4 Denitrifier *nirK* gene copy numbers in soils

[注 (Note): CK—不施氮肥 Zero N fertilizer; U—尿素 Urea; U+UI—尿素+脲酶抑制剂 Urea + Urease inhibitor; U+NI—尿素+硝化抑制剂 Urea + Nitrification inhibitor; U+UI+NI—尿素+脲酶抑制剂+硝化抑制剂 Urea + Urease inhibitor + Nitrification inhibitor. 柱上不同小写字母代表同一时期内处理间差异在 5% 水平显著 Different small letters above the bars mean significant differences among treatments in the same stage at 5% level.]

硝化抑制剂 DMPP 对此无明显影响。分蘖期的 *nirK* 基因拷贝数均显著高于孕穗期的，可能主要原因是孕穗期土壤中氮肥的消耗导致反硝化细菌的响应，另外，不同生育期土壤生态环境的变化对此也存在有一定程度的影响。从三种菌群丰度来看，古菌 *amoA*/细菌 *amoA* 拷贝数比值大于 6.1，而 *nirK*/(细菌 *amoA* + 古菌 *amoA*) 拷贝数比值大于 11.1，这可能由于稻田特定的生态环境所决定。

### 2.3 土壤铵态氮、硝态氮含量与硝化、反硝化菌丰度的相关性

由表 2 可知，AOB 的丰度与分蘖期铵态氮、硝态氮以及孕穗期的铵态氮含量呈极显著正相关 ( $P < 0.01$ )，说明 AOB 对氮肥的施入有灵敏的响应，而且对氨氧化作用有重要的贡献；另外，因为 NBPT 对土壤  $\text{NH}_4^+$ -N 含量有明显的调节作用，因此推测

NBPT 对 AOB 的丰度也有着间接的影响。AOB 的丰度与孕穗期的硝态氮含量相关性不显著，可能由于此时硝态氮含量过低所致。

AOA 丰度与两个时期的土壤铵态氮、硝态氮含量的相关性均不显著 ( $P > 0.5$ )，表明 AOA 比较稳定，对氮肥的施入没有明显响应。

反硝化细菌与分蘖期铵态氮、硝态氮以及孕穗期的铵态氮含量呈极显著正相关 ( $P < 0.01$ )，这与 AOB 的规律相似。以上结果说明，AOB 与反硝化细菌对氮肥的施入反应灵敏，而 AOA 则比较稳定。

### 2.4 硝化、反硝化菌的群落结构特征

运用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 的方法研究 AOB 的群落结构。首先利用引物 *amoA*-1F/*amoA*-2R 对 AOB 的 *amoA* 基因进行 PCR 扩增，扩增产物再通过 DGGE 分析，得到相应的 DGGE 图谱 (图 5)。与不施氮肥相比，施用氮肥对分蘖期与孕穗期 AOB 的群落结构均有明显影响，主要表现为优势条带明显增多。在分蘖期，CK 处理的主要条带包括 B3 和 B4，施用氮肥的 4 个处理还明显增强了 B1 和 B2 条带的信号强度；然而，单施氮肥处理与添加了抑制剂的处理 (U 与 U+NI、U+UI、U+UI+NI) 之间 AOB 的图谱差异不大，且条带 B2 和 B3 信号强度均较高，表明 B2 与 B3 是施氮肥稻田土壤中 AOB 的优势菌群。此外，我们发现不同生育期对 AOB 群落结构的影响在处理 CK 的差异比较明显，分蘖期处理 CK 的优势条带为 B3，而在孕穗期优势条带转变为 B2，表明随着时间的推移，土壤 AOB 优势菌群是动态变化的，这可能与气候条件变化或者土壤养分的消耗有关。优势菌群 B3 在孕穗期时，所有处理的信号均明显变弱，这可能由于条带 B3 所代表的 AOB 对氮肥的响应更灵敏，随氮肥的减少，B3 丰度明显下降。经聚类分析 (UPGMA) 的结果表明，所有处理分为两大类，分蘖期的 CK 处

表 2 土壤铵态氮、硝态氮含量与硝化、反硝化菌丰度的相关性

Table 2 Relations between contents of  $\text{NH}_4^+$ -N and  $\text{NO}_3^-$ -N with abundances of AOB, AOA and denitrifying bacteria in soils

菌群丰度 Bacteria abundance	分蘖期 Tillering stage		孕穗期 Booting stage	
	铵态氮含量 $\text{NH}_4^+$ -N content	硝态氮含量 $\text{NO}_3^-$ -N content	铵态氮含量 $\text{NH}_4^+$ -N content	硝态氮含量 $\text{NO}_3^-$ -N content
AOB	0.7581**	0.6880**	0.7929***	0.4842
AOA	0.1498	-0.0136	0.2804	0.2298
反硝化细菌 Denitrifying bacteria ( <i>nirK</i> )	0.8960***	0.8151**	0.7730**	0.4873

注 (Note): \*\*— $P < 0.01$ ; \*\*\*— $P < 0.001$ .

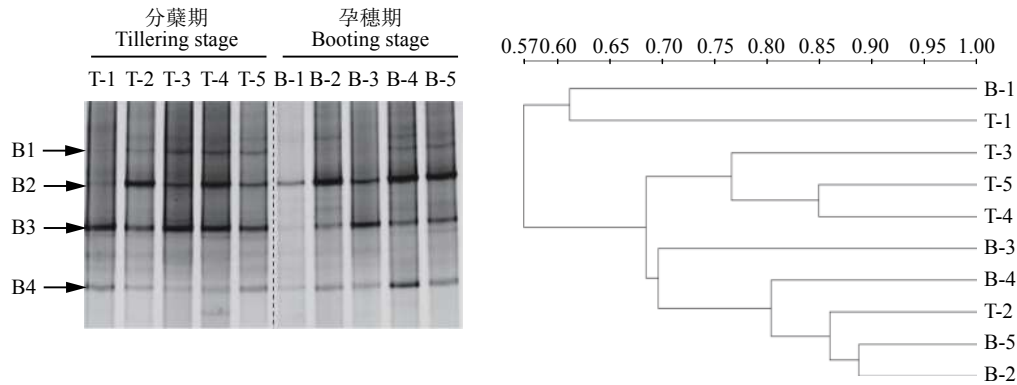


图 5 氨氧化细菌 *amoA* 基因的 DGGE 图谱及其聚类分析

Fig. 5 DGGE profile and clustering analysis of DGGE patterns of ammonia-oxidizing bacterial *amoA* gene

[注 (Note): T-1、T-2、T-3、T-4、T-5 与 B-1、B-2、B-3、B-4、B-5 分别表示分蘖期、孕穗期的 5 个处理 CK、U、U+UI、U+NI、U+UI+NI; B1、B2、B3、B4 为优势条带。T-1、T-2、T-3、T-4、T-5 and B-1、B-2、B-3、B-4、B-5 mean treatments CK, U, U+UI, U+NI, U+UI+NI at tillering stage and booting stage, respectively; B1, B2, B3, B4 mean predominant bands.]

理和孕穗期的 CK 单独一簇, 其余处理聚为一簇, 两个时期所有施用氮肥处理的 AOB 群落结构的相似性大于 68%, 表明施用氮肥显著影响了 AOB 的群落结构, 而脲酶抑制剂 NBPT 和硝化抑制剂 DMPP 对 AOB 群落结构的影响较小。

对 AOB 的 DGGE 凝胶上的 4 个条带进行切胶纯化测序, 所得序列经 NCBI 数据库的 BLAST 比对分析后发现, 所有序列与数据库中来源于土壤的氨氧化细菌 *amoA* 基因的相似性大于 96%。将检测到的 4 个基因序列及其相似序列构建系统发育树 (图 6) 可知, B1 与 B3 聚为一簇, 二者同源性较高, B2 与 B4 各自为一簇; 与 B1 和 B3 同源性较高的序列有来

源于砂壤土的亚硝化单胞菌目 (*Nitrosomonadales*) 以及来源于红壤、酸性土壤、湖泊的氨氧化细菌 *amoA* 基因; 与 B2 同源性较高的序列有来源于土壤的亚硝化螺菌属 (*Nitrospira* sp.) 以及来源于稻田氨氧化细菌的 *amoA* 基因; 与 B4 同源性较高的序列有来源于土壤的亚硝化螺菌属以及亚硝化叶菌属 (*Nitrosolobus multiformis*)。

利用引物 *crenamoA* 23fd 和 *crenamoA* 616rd 对 AOA 的 *amoA* 基因进行 PCR 扩增, 随后进行 DGGE 分析, 相应的 DGGE 图谱见图 7。所有处理均包括 6 条主要的条带 (A1—A6), 说明这 6 条带是稻田土壤中 AOA 的优势菌群。相比 AOB 的群落结

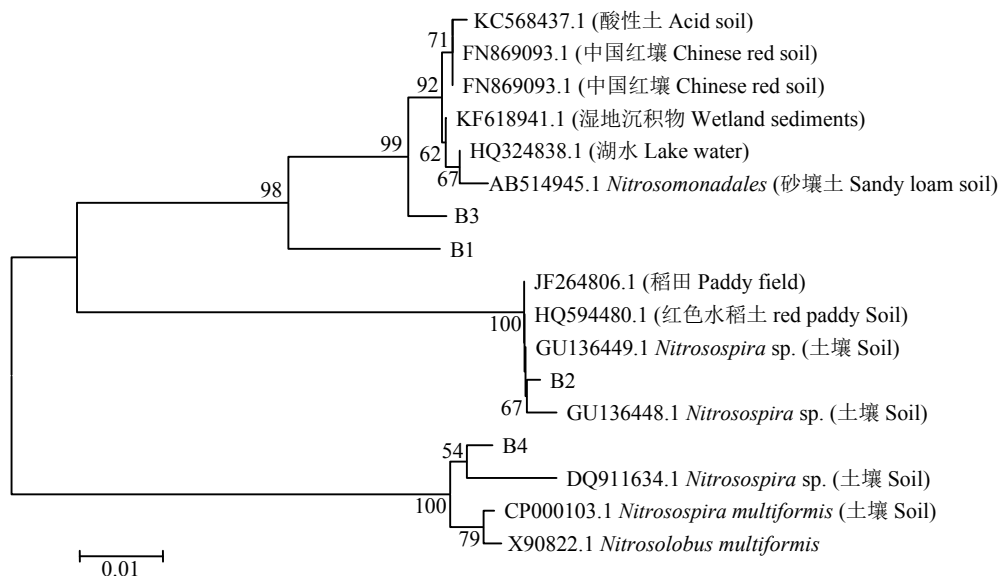


图 6 *amoA* 基因的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of ammonia-oxidizing bacterial *amoA* sequences from DGGE bands using neighbor-joining analysis

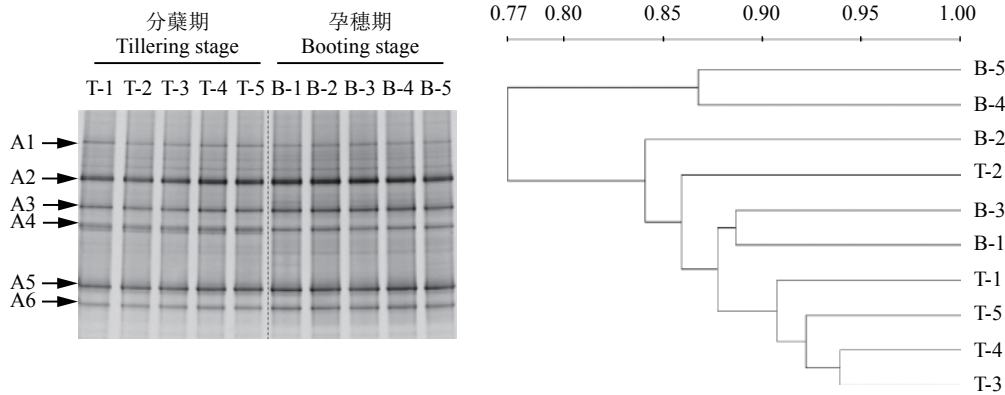


图7 氨氧化古菌 *amoA* 基因的 DGGE 图谱及其聚类分析

Fig. 7 DGGE profile and clustering analysis of ammonia-oxidizing archaeal *amoA* gene

[注 (Note): T-1、T-2、T-3、T-4、T-5 与 B-1、B-2、B-3、B-4、B-5 分别表示分蘖期、孕穗期的 5 个处理 CK、U、U+UI、U+NI、U+UI+NI; A1、A2、A3、A4、A5、A6 为优势条带。T-1、T-2、T-3、T-4、T-5 and B-1、B-2、B-3、B-4、B-5 mean treatments CK, U, U+UI, U+NI, U+UI+NI at tillering stage and booting stage, respectively; A1, A2, A3, A4, A5, A6 mean predominant bands.]

构变化, 各处理对 AOA 的群落没有明显影响; 两个时期也无显著变化, 说明该稻田土壤中 AOA 对不同施肥处理以及环境变化不敏感, 在水稻不同生育期间较为稳定。聚类分析 (UPGMA) 的结果表明, 两个时期所有处理的氨氧化古菌群落结构的相似度大于 77%, 说明施用氮肥、脲酶抑制剂 NBPT 以及硝化抑制剂 DMPP 对 AOA 的群落结构均无明显影响。

对 AOA 的 DGGE 凝胶上的 6 个条带进行切胶纯化测序, 所得序列经 NCBI 数据库的 BLAST 比对分析后发现, 与数据库中 AOA 的 *amoA* 基因相似度高于 92%, 将目的序列及其相似的序列建立系统发育树 (图 8), 所有条带被分为两大类: 条带 A2、A5 与 A3、A6 聚为一簇, A1、A4 聚为一簇, 说明 A2、A5、A3、A6 序列同源性较高, A1 与 A4 的序列同源性较高; 与 A2、A5 同源性较高的序列主要来自于酸性土壤, 与 A3、A6 同源性较高的序列主要来源于红壤以及稻田 AOA 的 *amoA* 基因; 而与 A1、A4 聚为一簇的主要来自于玉米地及沉积物 AOA 的 *amoA* 基因等。

利用引物 F1aCu/R3Cu 对反硝化细菌的 *nirK* 基因进行 PCR 扩增, 并进行 DGGE 分析 (图 9), 所有处理在分蘖期的条带数明显多于孕穗期的, 其中条带 K1、K2、K3、K5 与 K7 信号强度最为强烈, 说明包含这 5 类 *nirK* 基因的细菌是该稻田土壤中 *nirK* 型反硝化菌的优势菌群; 施用氮肥以及不同抑制剂对分蘖期的反硝化细菌群落结构没有明显影响。在孕穗期, 所有处理的各条带均明显变弱, 尤其是不施肥处理下, 可见条带更为稀疏, 说明此时 *nirK* 型反硝化细菌的丰度明显下降, 这可能与此时

氮肥已大量消耗有关, 因为反硝化细菌对氮肥有灵敏的响应<sup>[12]</sup>。聚类分析 (UPGMA) 的结果表明, 两个时期所有处理的反硝化细菌群落结构被分为三大类: 孕穗期的 CK 处理单独一簇, 其余处理的聚为一簇, 分蘖期的所有处理聚为一簇, 说明不同生育期对 *nirK* 型反硝化菌群落结构有着明显的影响。以上结果说明, 水稻生育期以及施用氮肥对 *nirK* 型反硝化菌群落结构有明显影响, 而两种抑制剂则无此效应, 这说明两种抑制剂的作用具有专一性, 对反硝化细菌无明显影响。

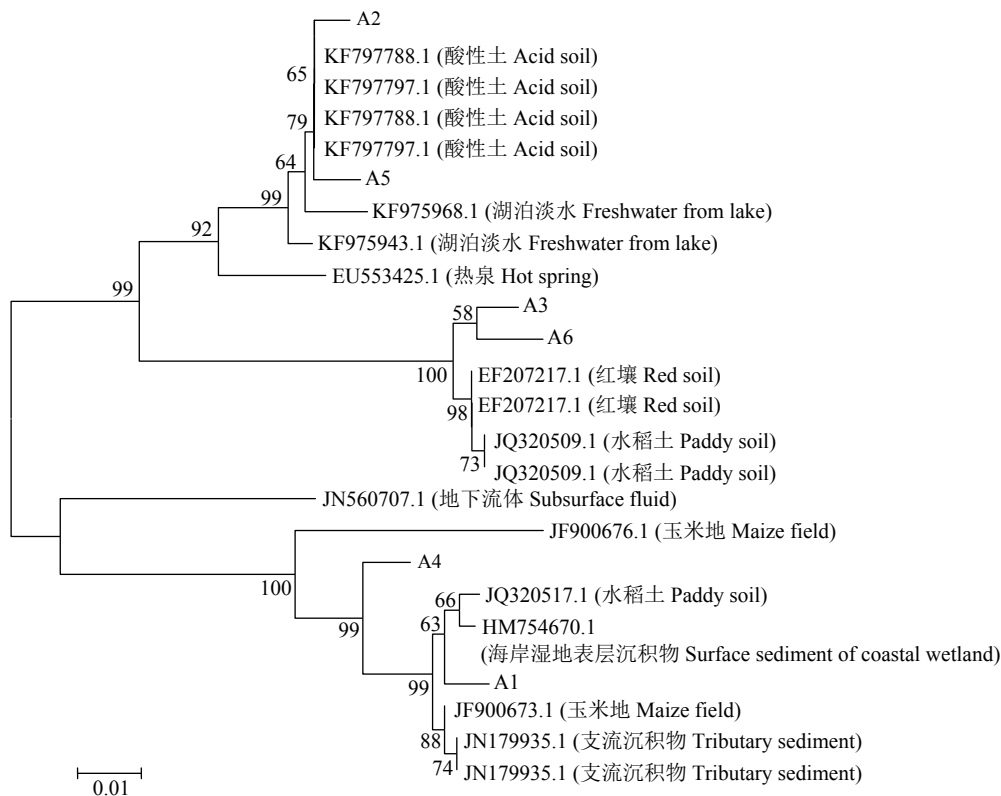
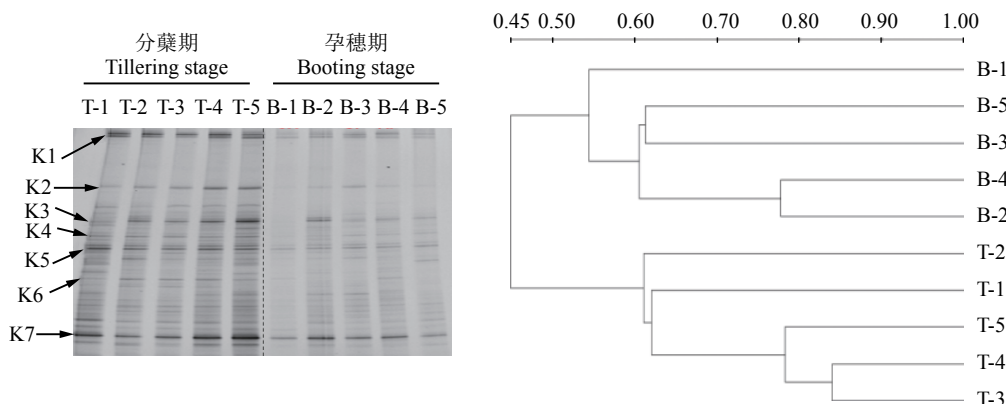
对反硝化细菌 *nirK* 基因 DGGE 凝胶上的 7 个条带进行切胶测序分析, 所得序列经 NCBI 数据库的 BLAST 比对分析, 建立系统发育树 (图 10), 系统发育树明显的分为两簇, 大多数条带 (K1、K2、K3、K4、K5 和 K6) 分布在第一簇中, 这一簇的 *nirK* 基因序列主要来源于农田、高山草甸、稻田等, 而 K7 单独分布在另一簇, 与其它 *nirK* 基因遗传距离较远。

### 3 讨论

脲酶抑制剂可以提高氮素利用率<sup>[16, 24]</sup>, 本研究表明, 添加 NBPT (或 NBPT 与 DMPP 配施) 延缓了尿素水解, 显著提高了水稻孕穗期土壤中的铵态氮含量, 为水稻后期生长提供充足氮肥, 这可能是其增产增效的主要原因, 而单独添加 DMPP 则无此效应, 说明稻田不适宜单独添加硝化抑制剂。

有研究表明, 土壤养分、pH 以及施肥制度等环境因素对 AOB、AOA 的生长繁殖有不同程度的影响<sup>[25-28]</sup>。农田施入氮肥可明显促进 AOB 的生长<sup>[29]</sup>, 增加其丰度<sup>[30-31]</sup>, 而对 AOA 则无明显影响<sup>[32-33]</sup>。不同



图 8 氨氧化古菌 *amoA* 基因的系统进化树Fig. 8 Phylogenetic tree of ammonia-oxidizing archaeal *amoA* sequences from DGGE bands using neighbor-joining analysis图 9 反硝化细菌 *nirK* 基因的 DGGE 图谱及其聚类分析Fig. 9 DGGE profile and clustering analysis of denitrifying bacterial *nirK* gene

[注 (Note): T-1、T-2、T-3、T-4、T-5 与 B-1、B-2、B-3、B-4、B-5 分别表示分蘖期、孕穗期的 5 个处理 CK、U、U+UI、U+NI、U+UI+NI; K1、K2、K3、K4、K5、K6、K7 为优势条带。T-1, T-2, T-3, T-4, T-5 and B-1, B-2, B-3, B-4, B-5 mean treatments CK, U, U + UI, U + NI, U + UI + NI at tillering stage and booting stage, respectively; K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7 mean predominant bands.]

的硝化抑制剂对 AOB 以及 AOA 的影响不同, 有的可显著抑制 AOB 的生长<sup>[34-37]</sup>, 对 AOA 没有明显影响<sup>[38]</sup>; 有的则效果相反<sup>[39-40]</sup>, 这可能由于不同抑制剂的作用机理不尽相同所致, 因为抑制剂可通过抑制硝化菌的生长、呼吸<sup>[16, 41-42]</sup>或活性<sup>[16]</sup>等多种方式来发挥作用。本研究表明, 施用氮肥显著增加了分蘖期

与孕穗期稻田土壤中 AOB 的丰度, 然而添加硝化抑制剂 DMPP 在分蘖期能够有效抑制 AOB 的生长, 到孕穗期对 AOB 的抑制作用消失, 可能此时 DMPP 已降解所致。DMPP 对 AOA 的生长则始终无明显的影响, 这可能与本试验地的稻田土壤性质以及生态环境有关, 或者由于 AOA 有较强的稳定性而导致。由

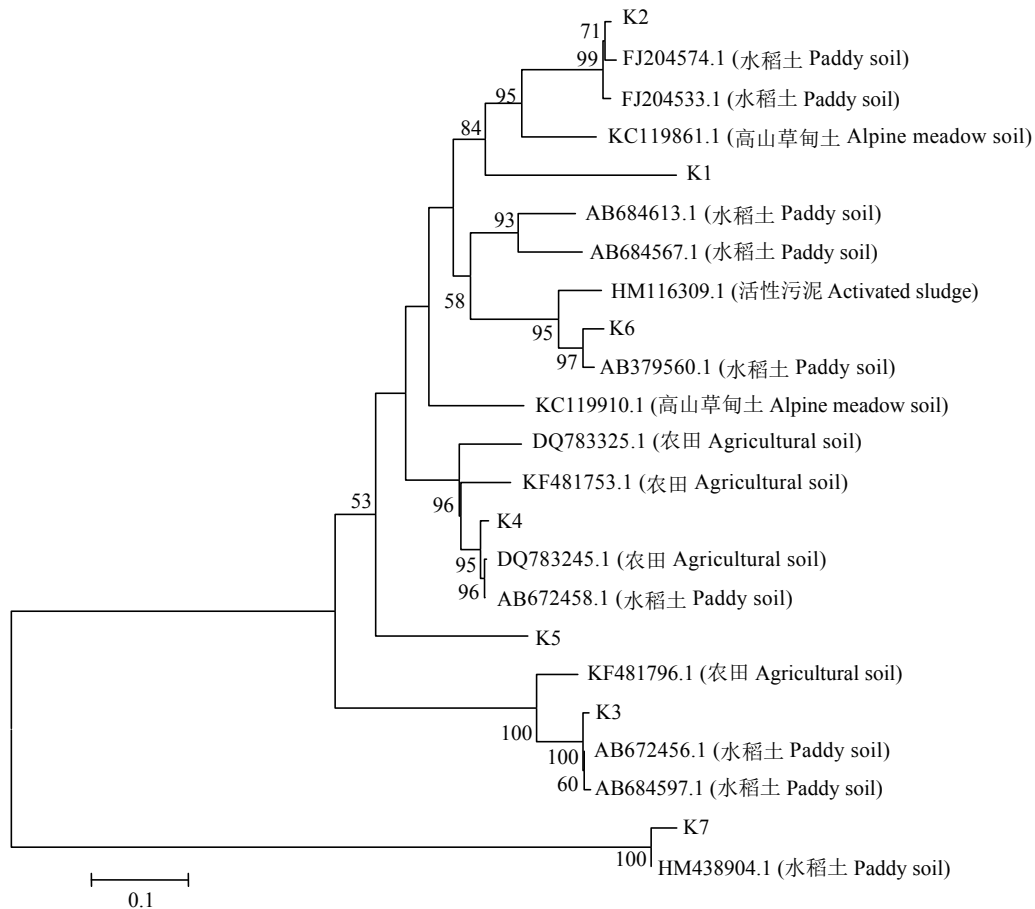


图 10 反硝化细菌 *nirK* 基因的系统进化树

Fig. 10 Phylogenetic tree of denitrifying bacterial *nirK* gene based on DGGE band sequences using neighbor-joining analysis

此可知, DMPP 在稻田减弱硝化反应的主要途径是通过抑制 AOB 的生长而实现。添加 NBPT 对 AOA、AOB 的丰度无明显影响, 证明 NBPT 仅与土壤中的脲酶结合起作用, 抑制其活性, 对土壤微生物无明显的直接影响。

土壤理化性质如土壤养分、含水量、pH、有机质等因素同样影响着反硝化细菌的群落结构和种群丰度<sup>[13, 43]</sup>。有研究表明, 施用氮肥可以明显提高反硝化细菌 *nirK*、*nirS* 基因的丰度<sup>[12, 44-47]</sup>。本研究结果证明, 施用氮肥可显著提高 *nirK* 型反硝化细菌的丰度, 随着氮肥消耗, 到孕穗期, 所有处理下反硝化细菌的丰度明显下降, 而添加抑制剂 NBPT 与 DMPP 的则没有表现出明显的变化, 这说明氮肥可直接引起反硝化细菌的响应, 不同生育期则可能通过土壤理化性质或土壤微生态的变化间接地影响反硝化细菌的丰度, 而抑制剂则无此效应, 进一步说明 NBPT 与 DMPP 对土壤环境的安全性。有报道指出, DMPP 可通过降低底物浓度而间接影响 *nirK* 型反硝化菌的丰度<sup>[48]</sup>, 本研究没有监测到此种关联, 可能由于所试稻田长期淹水, 反硝化反应底物浓度极低所致。

有报道指出, 在水稻田等 pH 较低的土壤中, AOA 的数量远超过 AOB 的<sup>[49-50]</sup>, 且在氨氧化过程中发挥主导作用<sup>[38]</sup>, 同时, 反硝化细菌 *nirK* 基因的拷贝数又远超过 *amoA* (AOA + AOB) 基因的拷贝数<sup>[11]</sup>。本研究的结果也表明, 古菌 *amoA*/细菌 *amoA* 拷贝数比值大于 6.1, 而 *nirK*/(细菌 *amoA* + 古菌 *amoA*) 拷贝数比值大于 11.1, 与以上结论一致。

从三种菌群丰度与铵态氮、硝态氮含量的相关性分析来看, AOB 与 *nirK* 反硝化细菌的丰度与分蘖期时期土壤中铵态氮、硝态氮含量以及孕穗期铵态氮含量呈极显著正相关, 证明了二者对氮肥的敏感性, 而 AOA 则没有此相关性, 说明 AOA 的稳定性, 与 Chen 等报道一致<sup>[32]</sup>。由于 NBPT 对铵态氮含量有明显的调节作用, 由此推测, NBPT 对 AOB 以及反硝化菌也有间接的影响。

施用化肥对土壤硝化、反硝化菌群落结构及其组成有着明显的影响<sup>[19]</sup>。本研究中 DGGE 指纹图谱表明, 施用氮肥明显增加了图谱中 AOB 的条带数, 随着氮肥的消耗, 反应灵敏的优势菌群到了孕穗期

信号强度明显减弱; 施用氮肥对反硝化细菌群落结构的影响, 主要体现在氮肥大量消耗后的孕穗期, 此时, 不施氮肥处理的 DGGE 图谱中优势菌群条带仅剩 3 条依稀可辨, 远远少于施氮肥处理的; AOA 在两个时期对氮肥均没有明显的响应。另外, 抑制剂的施用在 DGGE 图谱中也没有表现出明显影响, 可能由于 DGGE 图谱只是定性反应群落组成, 而抑制剂只对菌群丰度有影响, 对其组成没有影响所致。

## 4 结论

1) NBPT 显著提高了分蘖期土壤铵态氮含量, 显著降低了孕穗期的铵态氮含量, AOB 与 *nirK* 反硝化细菌的丰度与土壤中铵态氮、硝态氮含量有极显著正相关关系, AOA 则与两种形态的氮相关性不显著, 说明 AOA 比较稳定, AOB 与反硝化细菌对氮肥有灵敏的响应, 尤其是无机氮离子, 而 NBPT 可调节铵态氮含量, 因此, NBPT 对 AOB 与 *nirK* 反硝化细菌的丰度可能有着间接的影响。

2) 硝化抑制剂 DMPP 对 AOB 有明显的抑制作用, 但仅表现在分蘖期, 孕穗期抑制作用基本消失, 而对 AOA 以及反硝化细菌则始终没有明显影响, DMPP 在稻田抑制硝化作用的途径是通过抑制 AOB 的生长来实现的。

3) DGGE 图谱直观地反映了三种菌群对氮肥的响应, AOB 与反硝化细菌的群落结构在施用氮肥下条带数明显增加, 而 AOA 则无明显响应, 再次证明 AOB 与反硝化细菌对氮肥的敏感性以及 AOA 的稳定性。

4) 脲酶抑制剂 NBPT 对三类微生物的群落结构以及丰度没有明显的直接影响, 硝化抑制剂 DMPP 仅在分蘖期对 AOB 的生长有抑制作用, 这说明 NBPT 与 DMPP 对土壤生态的安全性。

## 参 考 文 献:

- [1] 朱兆良. 农田中氮肥的损失与对策[J]. *土壤与环境*, 2000, 9(1): 1-6. Zhu Z L. Loss of fertilizer N from plants-soil system and the strategies and techniques for its reduction[J]. *Soil and Environmental Sciences*, 2000, 9(1): 1-6.
- [2] 蔡祖聪. 尿素和  $\text{KNO}_3$  对水稻土无机氮转化过程和产物的影响 I. 无机氮转化过程[J]. *土壤学报*, 2003, 40(2): 239-245. Cai Z C. Effects of urea and  $\text{KNO}_3$  on processes and products of inorganic nitrogen transformation in paddy soils I. processes of inorganic nitrogen[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(2): 239-245.
- [3] 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. He J Z, Zhang L M. Key processes and microbial mechanisms of soil nitrogen transformation[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 98-108.
- [4] 陈春兰, 吴敏娜, 魏文学. 长期施用氮肥对土壤细菌硝化基因多样性及组成的影响[J]. *环境科学*, 2011, 32(5): 1489-1496. Chen C L, Wu M N, Wei W X. Effect of long-term application of nitrogen fertilizer on the diversity of nitrifying genes (*amoA* and *hao*) in paddy soil[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(5): 1489-1496.
- [5] 郝永俊, 吴松维, 吴伟祥, 等. 好氧氨氧化菌的种群生态学进展[J]. *生态学报*, 2007, 27(4): 1573-1582. Hao Y J, Wu S W, Wu W X, et al. Research progress on the microbial ecology of aerobic ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(4): 1573-1582.
- [6] 侯海军, 秦红灵, 陈春兰, 等. 土壤氮循环微生物过程的分子生态学进展[J]. *农业现代化研究*, 2014, 35(5): 588-594. Hou H J, Qin H L, Chen C L, et al. Research progress of the molecular ecology on microbiological processes in soil nitrogen cycling[J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2014, 35(5): 588-594.
- [7] 刘正辉, 李德豪. 氨氧化古菌及其对氮循环贡献的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(4): 774-782. Liu Z H, Li D H. Ammonia-oxidizing archaea and their contribution to global nitrogen cycling: a review[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(4): 774-782.
- [8] Sayavedra-Soto L A, Hommes N G, Arp D J. Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(2): 504-510.
- [9] Nicol G W, Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle?[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(5): 207-212.
- [10] 王海涛, 郑天凌, 杨小茹. 土壤反硝化的分子生态学进展及其影响因素[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(10): 1915-1924. Wang H T, Zheng T L, Yang X R. Molecular ecology research progress for soil denitrification and research status for its influencing factors[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(10): 1915-1924.
- [11] Hussain Q, Liu Y, Jin Z, et al. Temporal dynamics of ammonia oxidizer (*amoA*) and denitrifier (*nirK*) communities in the rhizosphere of a rice ecosystem from Tai Lake region, China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, 48(2): 210-218.
- [12] Chen Z, Luo X, Hu R, et al. Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(4): 850-861.
- [13] 李刚, 修伟明, 王杰, 等. 不同植被恢复模式下呼伦贝尔沙地土壤反硝化细菌 *nirK* 基因组成结构和多样性研究[J]. *草业学报*, 2015, 24(1): 115-123. Li G, Xiu W M, Wang J, et al. Community structure and diversity of soil denitrifying bacteria of the *nirK* gene type under different vegetation restoration patterns in the Hulun Buir sandy land[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(1): 115-123.
- [14] Hou J, Dong Y, Fan Z. Effects of coated urea amended with biological inhibitors on physiological characteristics, yield and quality of peanut[J]. *Communications in Soil Science and Plant*

- Analysis*, 2014, 45(7): 896–911.
- [15] 徐星凯, 周礼恺. 脲酶抑制剂/硝化抑制剂对植稻土壤中尿素N行为的影响[J]. *生态学报*, 2001, 21(10): 1682–1686.  
Xu X K, Zhou L K. Effect of urease/nitrification inhibitors on the behavior of urea-N in the soil planted to rice[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(10): 1682–1686.
- [16] Trenkel M E. Slow-and controlled-release and stabilized fertilizers[M]. an option for enhancing nutrient efficiency in agriculture (2nd edition)[M]. Paris, France: International Fertilizer Industry Association, 2010.
- [17] 张文学, 孙刚, 何萍, 等. 脲酶抑制剂与硝化抑制剂对稻田氨挥发的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2013, 19(6): 1411–1419.  
Zhang W X, Sun G, He P, *et al.* Effects of urease and nitrification inhibitors on ammonia volatilization from paddy fields[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2013, 19(6): 1411–1419.
- [18] 王慧颖, 徐明岗, 马想, 等. 长期施肥下我国农田土壤微生物及氨氧化菌研究进展[J]. *中国土壤与肥料*, 2018, (2): 1–12.  
Wang H Y, Xu M G, Ma X, *et al.* Research advances of microorganism and ammonia oxidizing bacteria under long term fertilization in Chinese typical cropland[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2018, (2): 1–12.
- [19] 王军, 申田田, 车钊, 等. 有机和无机肥比对黄褐土硝化和反硝化微生物丰度及功能的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(3): 1–10.  
Wang J, Shen T T, Che Z, *et al.* Effects of combination of organic and inorganic fertilizers on abundances of nitrifiers and denitrifiers and their function in yellow-cinnamon soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2018, 24(3): 1–10.
- [20] 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(12): 4704–4712.
- [21] Long X, Chen C, Xu Z, *et al.* Abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a temperate forest ecosystem under ten-years elevated CO<sub>2</sub>[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 46: 163–171.
- [22] Tournay M, Freitag T E, Nicol G W, *et al.* Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(5): 1357–1364.
- [23] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, *et al.* Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49(3): 401–417.
- [24] 张文学, 孙刚, 何萍, 等. 双季稻田添加脲酶抑制剂NBPT氮肥的最高减量潜力研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(4): 821–830.  
Zhang W X, Sun G, He P, *et al.* Highest potential of subtracting nitrogen fertilizer through addition of urease inhibitor NBPT in double-cropping paddy fields[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(4): 821–830.
- [25] 陈哲, 袁红朝, 吴金水, 等. 长期施肥制度对稻田土壤反硝化细菌群落活性和结构的影响[J]. *生态学报*, 2009, 29(11): 5923–5929.  
Chen Z, Yuan H C, Wu J S, *et al.* Activity and composition of the denitrifying bacteria community respond differently to long-term fertilization[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(11): 5923–5929.
- [26] Wang Y, Ke X, Wu L, *et al.* Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(1): 27–36.
- [27] 解开治, 徐培智, 蒋瑞萍, 等. 有机无机肥配施提升冷浸田土壤氮转化相关微生物丰度和水稻产量[J]. *植物营养与肥料学报*, 2016, 22(5): 1267–1277.  
Xie K Z, Xu P Z, Jiang R P, *et al.* Combined application of inorganic and organic fertilizers improve rice yield and the abundance of soil nitrogen-cycling microbes in cold waterlogged paddy fields[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2016, 22(5): 1267–1277.
- [28] 卢圣鄂, 王莹燕, 陈勇, 等. 不同施肥制度对石灰性紫色水稻土中氨氧化古菌群落结构的影响[J]. *生态学报*, 2016, 36(21): 6919–6927.  
Lu S E, Wang Y Y, Chen Y, *et al.* Impact of different long-term fertilization systems on ammonia oxidation Archaea community structures in Calcareous Purple Paddy soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(21): 6919–6927.
- [29] Ouyang Y, Norton J M, Stark J M, *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96: 4–15.
- [30] Huang L, Dong H, Wang S, *et al.* Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in diverse Chinese paddy soils[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2014, 31(1): 12–22.
- [31] Cui P Y, Fan F L, Yin C, *et al.* Urea- and nitrapyrin-affected N<sub>2</sub>O emission is coupled mainly with ammonia oxidizing bacteria growth in microcosms of three typical Chinese arable soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 66: 214–221.
- [32] Chen Y, Xu Z, Hu H, *et al.* Responses of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen fertilization and precipitation increment in a typical temperate steppe in Inner Mongolia[J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 68: 36–45.
- [33] Okano Y, Hristova K R, Leutenegger C M, *et al.* Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 1008–1016.
- [34] Di H J, Cameron K C, Shen J P, *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 72(3): 386–394.
- [35] Gong P, Zhang L, Wu Z, *et al.* Does the nitrification inhibitor dicyandiamide affect the abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a Hap-Udic Luvisol?[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2013, 13(1): 35–42.
- [36] Dai Y, Di H J, Cameron K C, *et al.* Effects of nitrogen application rate and a nitrification inhibitor dicyandiamide on ammonia oxidizers and N<sub>2</sub>O emissions in a grazed pasture soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 465: 125–135.
- [37] 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[J]. *Chemosphere*, 2011, 84(1): 182–186.

- [38] 周卉, 田光明, 李华. DMPP减少稻田土壤氮素损失的研究进展[J]. 土壤, 2013, 45(6): 964–969.  
Zhou H, Tian G M, Li H. Research progress of DMPP in reducing nitrogen losses from paddy fields[J]. *Soils*, 2013, 45(6): 964–969.
- [39] 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[J]. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2012, 6(5): 1032–1045.
- [40] Gubry-Rangin C, Nicol G W, Prosser J I. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 74(3): 566–574.
- [41] Zerulla W, Barth T, Dressel J, *et al.* 3,4-dimethylpyrazole phosphate(DMPP) – a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 34: 79–84.
- [42] 武志杰, 陈利军. 缓释/控释肥料: 原理与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2003.  
Wu Z J, Chen L J. Slow/controlled-release fertilizer: Principle and application[M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [43] 曾希柏, 王亚男, 王玉忠, 等. 施肥对设施菜地*nirK*型反硝化细菌群落结构和丰度的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(2): 505–514.  
Zeng X B, Wang Y N, Wang Y Z, *et al.* Effects of different fertilization regimes on abundance and community structure of the *nirK*-type denitrifying bacteria in greenhouse vegetable soils[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(2): 505–514.
- [44] Hayatsu M, Tago K, Saito M. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2008, 54(1): 33–45.
- [45] 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.
- [46] Jin Z, Li L, Liu X, *et al.* Impact of long-term fertilization on community structure of ammonia oxidizing and denitrifying bacteria based on *amoA* and *nirK* genes in a rice paddy from Tai Lake Region, China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13(10): 2286–2298.
- [47] 宋亚娜, 吴明基, 林艳. 稻田土壤*nirS*型反硝化细菌群落对氮肥水平的响应[J]. 中国农业科学, 2013, 46(9): 1818–1826.  
Song Y N, Wu M J, Lin Y. Response of the denitrifying bacterial *nirS* gene community to nitrogen fertilizer in paddy field[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(9): 1818–1826.
- [48] Barrena I, Menéndez S, Correa-Galeote D, *et al.* Soil water content modulates the effect of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on nitrifying and denitrifying bacteria[J]. *Geoderma*, 2017, 303: 1–8.
- [49] He J Z, C X, Zhang L M, *et al.* Ammonia-oxidizing bacteria and archaea in different paddy soils of China[A]. International Union of Soil Sciences. Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science: Soil solutions for a changing world[C]. Brisbane, Australia, 2010. 9–12.
- [50] Chen X P, Zhu Y G, Xia Y, *et al.* Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil?[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8): 1978–1987.