

# 强酸性茶园土壤中添加不同肥料氮后 N<sub>2</sub>O 释放量变化

黄莹<sup>1</sup>, 李雅颖<sup>2\*</sup>, 姚槐应<sup>1,2</sup>

(1 浙江大学环境与资源学院, 杭州 310058; 2 中国科学院城市环境研究所, 福建厦门 361021)

**摘要:** 茶园由于长期偏施氮肥, 造成土壤酸化现象严重和 N<sub>2</sub>O 大量排放。本文对强酸性茶园土壤进行不同氮肥处理试验, 结果表明, 通过 31 d 的好气培养, 各施肥处理均显著提高 N<sub>2</sub>O 排放, 其中施硝酸钾(KNO<sub>3</sub>)处理平均每天排放的 N<sub>2</sub>O 最高, 总排放量为对照(CK)的 17 倍, 其次是硝酸铵(NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)处理, 尿素[CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]和硫酸铵[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]处理虽然能增加 N<sub>2</sub>O 排放, 但远远小于硝酸钾处理。对各氮肥处理硝化势的测定表明, 尿素、硫酸铵和硝酸铵处理均明显增加土壤硝化活性, 而硝酸钾处理硝化势与对照相比显著降低。强酸性茶园土壤中 N<sub>2</sub>O 排放的主要来源是反硝化作用。氧化亚氮还原酶(*nosZ*)的定量 PCR 分析表明, 硝酸钾处理的 *nosZ* 基因拷贝数与对照相比显著降低( $P < 0.05$ )。因此, 强酸性土壤中 N<sub>2</sub>O 还原酶活性被 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 抑制是导致高 N<sub>2</sub>O 排放的重要原因之一。

**关键词:** 茶园土; 不同氮肥处理; N<sub>2</sub>O 排放; *nosZ* 基因; 定量 PCR

**中图分类号:** S143.1; 153.6      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1008-505X(2013)06-1533-06

## Effects of different nitrogen fertilizers on N<sub>2</sub>O emissions in a highly acid tea orchard soils

HUANG Ying<sup>1</sup>, LI Ya-ying<sup>2\*</sup>, YAO Huai-ying<sup>1,2</sup>

(1 College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2 Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract:** In recent years the long-term application of large amount of nitrogen fertilizers has led to the serious acidification of tea orchard soils with high N<sub>2</sub>O emission. In this study, different N fertilizers were applied to a highly acid tea orchard soil to evaluate the effects of N fertilizers on N<sub>2</sub>O emission. The results suggest that all the treatments increase N<sub>2</sub>O production significantly by the 31 days' aerobic incubation. The average N<sub>2</sub>O emission from the KNO<sub>3</sub> treatment is the highest and total emission is 17 times higher than that of the control. The N<sub>2</sub>O emission of the NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> treatment is the next. The total N<sub>2</sub>O productions from the urea [CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatments are stimulated but the N<sub>2</sub>O emissions are significantly lower than that of the KNO<sub>3</sub> treatment. The Urea, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> treatments significantly stimulate soil nitrification activity, while the KNO<sub>3</sub> treatment decreases nitrification potential. The results that denitrification is the dominant source of N<sub>2</sub>O emission in the highly acid tea orchard soil. To find out the microbial mechanism, quantitative PCR of the functional gene of nitrous oxide reductase(*nosZ*) was determined. The results suggest that *nosZ* gene copies from the KNO<sub>3</sub> treatment are significantly ( $P < 0.05$ ) lower than those of the control. Therefore, the inhibition of N<sub>2</sub>O reductase is one of the important factors to induce the high N<sub>2</sub>O emission in the highly acid soil.

**Key words:** tea orchard soil; nitrogen fertilizer treatment; N<sub>2</sub>O emission; *nosZ* gene; quantitative PCR

收稿日期: 2013-02-06

接受日期: 2013-05-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071869, 31272256)资助。

作者简介: 黄莹(1987—), 女, 安徽池州人, 博士研究生, 主要从事土壤生物化学和微生物生态研究。

Tel: 0592-6190586; E-mail: hybg0418@126.com \* 通信作者 E-mail: yyli@iue.ac.cn.

氧化亚氮( $N_2O$ )是地球上重要的温室气体之一,其增温潜势值为 $310^{[1]}$ ,红外吸收能力大约为 $CO_2$ 的200倍, $CH_4$ 的4倍。而且还参与大气的光化学反应,破坏臭氧层。氧化亚氮一方面使得全球气候变暖,对人类居住环境构成很大的威胁<sup>[2]</sup>;另一方面,使得全球氮沉降持续升高,加剧酸化作用等环境危害<sup>[3]</sup>。在众多 $N_2O$ 产生源中,土壤排放是 $N_2O$ 的最主要来源,因此对陆地系统中 $N_2O$ 的产生进行系统研究十分必要。

土壤中的 $N_2O$ 主要由硝化作用和反硝化作用产生,二者对 $N_2O$ 排放的相对贡献因土壤生态系统不同而存在显著差异<sup>[4-6]</sup>。硝化作用是由 $NH_4^+$ 或 $NH_3$ 氧化为 $NO_2^-$ 和 $NO_3^-$ 的过程, $N_2O$ 产生于 $NH_3$ 氧化为 $NO_2^-$ 的过程中。一般来说,对于施用肥料和含水量较低的土壤,硝化作用在农田土壤 $N_2O$ 排放过程中起主要作用<sup>[7]</sup>,而在湿地等厌氧系统中,反硝化作用能产生大量 $N_2O$ <sup>[8]</sup>。在反硝化过程中, $NO_3^-$ 通过硝酸还原酶(由*narG*,*narH*或者*napA*基因编码)、亚硝酸还原酶(由*nirK*或*nirS*基因编码)、 $NO$ 还原酶(由*qnorB*或*cnorB*基因编码)、 $N_2O$ 还原酶(由*nosZ*基因编码)逐步还原为 $N_2$ , $N_2O$ 是其中的重要中间产物。*nosZ*作为能够编码还原 $N_2O$ 的反硝化细菌群落的功能基因,在土壤 $N_2O$ 释放的过程中起着非常关键的作用<sup>[9]</sup>。

我国茶叶主要分布于砖红壤、黄红壤等酸性红壤地区,是亚热带丘陵地区的重要经济作物。茶树是典型的喜酸作物,最适宜的土壤pH范围为4.5~5.5。近年来,由于对产量效益和茶叶品质的盲目追求,农民偏施氮肥的现象日益严重,导致茶园土壤氮素的积累,使茶园土壤pH普遍下降,目前我国有一半以上的茶园土壤pH低于4.5<sup>[10]</sup>,这不仅加剧了活性铝的毒性也增加了 $N_2O$ 释放量。日本环境部的研究表明,施入化肥氮转化成 $N_2O-N$ 的排放系数,茶园高达2.9%,而稻田和其它作物土壤分别为0.31%和0.62%<sup>[11]</sup>,显然,施氮肥对茶园土壤中 $N_2O$ 排放造成的影响不容忽视。那么不同种类氮肥对茶园土壤中 $N_2O$ 排放的影响是否存在差异? $N_2O$ 排放源由哪个生物过程主导?高强度 $N_2O$ 排放的微生物机制如何?本研究通过31d的好气培养,研究不同氮肥处理对强酸性茶园土壤中 $N_2O$ 排放的影响,并且从功能基因的角度研究其微生物机制。试图通过了解茶园 $N_2O$ 排放现状,为茶园土壤科学合理施肥及促进茶园生态系统可持续发展提供理论

依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样地点及土壤样品处理

土样采自浙江省杭州市西湖区梅家坞茶园( $30^{\circ}11'N, 120^{\circ}05'E$ ),此区属中亚热带湿润季风气候,年平均气温 $15^{\circ}C$ ,年平均降水量大约1500mm。土壤为发育于石英砂岩(薄层页岩相间)母质上的红壤。采样茶园有100年植茶历史,试验分3个小区进行土样采集,每个小区按S形线路选取8个采样点,采样深度0—20cm。采集的新鲜土样充分混匀过2mm筛后,一部分装入无菌塑料袋内,贮存于 $4^{\circ}C$ 的冰箱用于培养试验和生物性质测定,剩余部分风干后供土壤基本理化性质测定。供试土壤基本性质为:有机质含量 $93.1g/kg$ ,全氮 $5.6g/kg$ 、硝态氮 $57.9mg/kg$ 、铵态氮 $22.0mg/kg$ 、微生物量碳 $241.4mg/kg$ 、速效磷( $P_2O_5$ ) $76.1mg/kg$ ,pH3.5。

### 1.2 测定项目和方法

土壤pH以1:2.5土水比用复合电极测定;全氮用浓硫酸消煮—氮磷流动分析仪测定;土壤有机碳用重铬酸钾容量法外加加热法;铵态氮和硝态氮用 $1mol/L$ KCl提取—氮磷流动分析仪测定<sup>[12]</sup>;速效磷用 $0.03mol/L$  $NH_4F-0.025mol/L$ HCl浸提,比色法测定。土壤微生物量碳采用氯仿熏蒸- $0.5mol/L$  $K_2SO_4$ 提取<sup>[13]</sup>,提取液中可溶性有机碳用TOC-500有机碳自动分析仪测定。

### 1.3 培养试验

称取新鲜土壤样品500g(以干土计)5份,以 $N 200mg/kg$ 干土重的量分别加入硝酸铵( $NH_4NO_3$ )、硫酸铵[( $NH_4$ ) $_2SO_4$ ]、尿素[ $CO(NH_2)_2$ ]、硝酸钾( $KNO_3$ ),并设对照处理(CK),调节土壤含水量至田间持水量的60%,装于烧杯中,用锡箔纸于避光处培养,其间称重并定时补充失去的水分。

### 1.4 土壤 $N_2O$ 排放和硝化势的测定

分别于1、3、10、17、24、31d称取土样10g(以干土计)于120mL血清瓶中,用胶塞和铝盖将瓶口密闭。在0h和24h用气相色谱仪测定 $N_2O$ 浓度。然后从血清瓶中取土测定土壤pH和 $NO_3^-$ 含量。以培养时间为横坐标,以 $NO_3^-$ 含量为纵坐标,求出斜率,即土壤硝化势<sup>[12]</sup>。

### 1.5 气样 $N_2O$ 浓度的测定

气样 $N_2O$ 浓度采用中国科学院城市环境研究所的安捷伦7890气相色谱仪进行分析(带有ECD检测器),具体测定条件依据文献进行<sup>[14]</sup>。

## 1.6 DNA 的提取

31 d 培养结束时,称取 500 mg 土壤至 2 mL 灭菌的离心管中,总 DNA 的提取按照 MoBio UltraClean™ (San Diego, CA, USA) 试剂盒标准步骤进行。

## 1.7 定量 PCR

标准质粒的提取方法按照 TIAN Prep Mini Plasmid Kit (TIANGEN BIOTECH BEIJING) 试剂盒标准步骤进行。实验前,对标准质粒进行稀释。采用 ABI PRISM 7500 定量 PCR 仪 (Applied Biosystem USA)。PCR 反应体系 (20 μL) 为: SYBR® premix Ex Taq™ II (Takara Bio, Dalian, Liaoning, China) 10 μL, DNA 样品 2 μL, *nosZ* 使用的基因引物为 *nosZ1F* (5' WCSYTGTTTCMTCGACAGCCAG 3') 和 *nosZ1R* (5' ATGTCGATCARCTGVKCRTTYTC 3')<sup>[10]</sup>, 浓度为 10 μmol/L。 *nosZ* 的 PCR 反应条件为 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 68℃ 1 min (-1℃/cycle), 81.5℃ 30 s, 循环 6 次; 95℃ 15 s, 62℃ 1 min, 81.5℃ 30 s, 循环 40 次。所有样品重复 3 次并设置阴性对照,通过溶解曲线分析和琼脂糖凝胶电泳鉴定产物的特异性。

## 1.8 数据统计

SPSS 16.0 统计软件对数据进行处理,数据为 3 次重复的平均值,采用方差分析,计算最小显著性差异 (LSD),对不同样品平均值之间进行多重比较。

## 2 结果分析

### 2.1 茶园土壤的化学和生物学特性

供试 100 年茶园土由于植茶年龄长、酸化程度严重, pH 仅为 3.5。土壤有效态氮绝大多数仍以 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的形式存在,是 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的 2.6 倍,有机质含量为 92.1 g/kg,微生物量碳含量为 241.1 mg/kg,土壤微生物量碳占土壤有机碳的 1.50%。

### 2.2 不同施肥处理对茶园土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响

2.2.1 对土壤 pH 的影响 茶园土壤 pH 测试结果表明,不同处理间的 pH 变化存在显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。培养初期,尿素在土壤脲酶的水解作用下释放 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 导致土壤 pH 显著增加,以第 1 d 最高,且显著高于其余 4 个处理,此后由于土壤发生硝化作用 pH 逐渐降低。31 d 培养结束时,尿素和对照处理的土壤 pH 差异不显著,但均明显高于其余 3 个处理。硫酸铵、硝酸铵处理的土壤 pH 显著低于对照。硝酸钾处理的土壤 pH 最低,这可能与土壤胶体之间的离子交换有关。

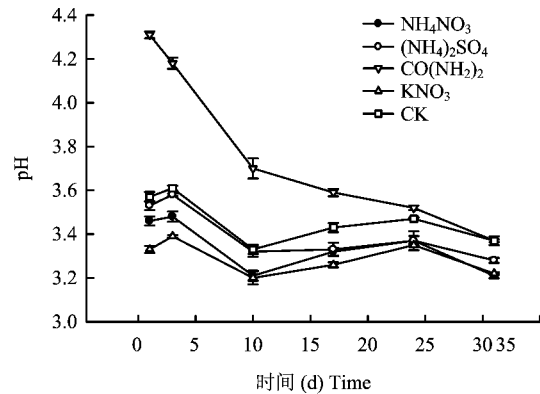


图 1 培养期间不同氮肥处理土壤 pH 变化  
Fig. 1 Soil pH of the different N fertilizer treatments during the incubation

2.2.2 氮肥处理对土壤硝化势的影响 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 作为硝化细菌进行硝化作用的初始反应物,其来源对硝化作用具有显著影响。由图 2 可知,不同氮肥处理中以尿素处理硝化势最高,为 2.7 mg/(kg·d),比对照高 4.7 倍。其次是硫酸铵和硝酸铵处理,硝化势分别为 1.87 和 1.03 mg/(kg·d),比对照增加 3.2 和 1.8 倍。硝酸钾处理不能为硝化作用增加底物,其硝化势与对照相比显著 ( $P < 0.05$ ) 降低。

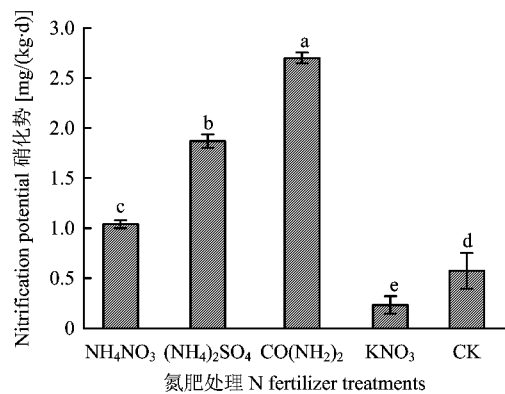


图 2 培养期间不同氮肥处理土壤硝化势的变化  
Fig. 2 Nitrification potential of different N fertilizer treatments during incubation

[注 (Note): 柱上的不同字母表示同一时期处理间差异达到 5% 显著水平 Different letters above the bars at the same stage mean significant difference among treatments at the 5% level.]

2.2.3 对土壤 N<sub>2</sub>O 排放的影响 土壤 N<sub>2</sub>O 排放测定结果表明,不同氮肥处理的 N<sub>2</sub>O 排放量均存在明显差异,并随培养时间增加发生显著变化。图 3 表明,所有土壤 N<sub>2</sub>O 日排放量以第 1 d 最高,此后逐渐

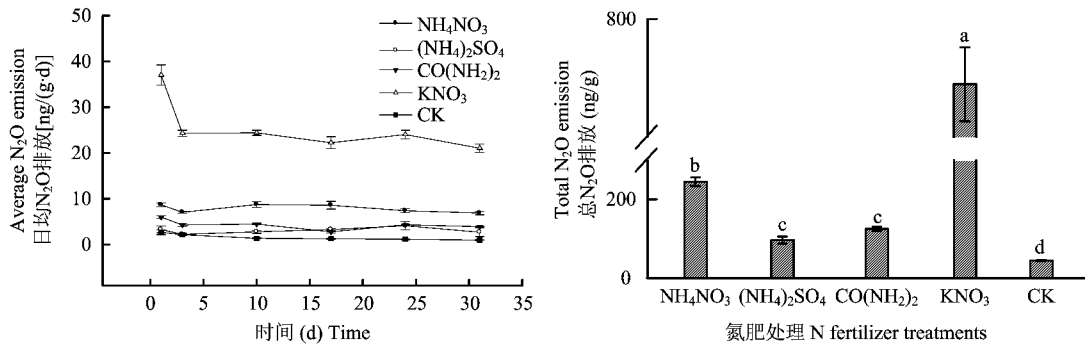


图3 培养期间不同氮肥处理日均 N<sub>2</sub>O 排放及总 N<sub>2</sub>O 排放

Fig. 3 The average and total N<sub>2</sub>O emissions from the different N fertilizer treatments during incubation

[注(Note): 方柱上的不同字母表示处理间差异达到5%显著水平 Different letters above the bars mean significant difference among different treatments at the 5% level.]

降低;其中硝酸钾处理第1 d 排放的 N<sub>2</sub>O 为对照的14 倍,此后排放量迅速降低,3 d 后 N<sub>2</sub>O 排放量基本稳定但仍然高于其余4 个处理;硝酸铵处理的 N<sub>2</sub>O 排放量仅次于硝酸钾处理,但显著高于其余3 个处理;培养前3 d 与对照相比,尿素显著( $P < 0.05$ )刺激 N<sub>2</sub>O 排放;而硫酸铵处理则与对照差异不显著( $P > 0.05$ ),3 d 后硫酸铵处理的 N<sub>2</sub>O 排放逐渐增大,到培养结束时与尿素处理差异不显著。经过31 d 好气培养,硝酸钾处理 N<sub>2</sub>O 总量为744.8 ng/g,比对照增加了16 倍;其次是硝酸铵处理, N<sub>2</sub>O 总排放为对照的5.5 倍;尿素和硫酸铵处理 N<sub>2</sub>O 总排放量分别为4.0 和3.1 ng/g,显著小于硝酸钾处理。

2.2.4 反硝化作用功能微生物的定量 PCR 结果 作为编码 N<sub>2</sub>O 到 N<sub>2</sub> 还原过程的关键基因, *nosZ* 的表达在一定程度上决定 N<sub>2</sub>O 的排放强度。从图4 可以看出,经过31 d 的好气培养,除了尿素处理与对

照差异不显著( $P > 0.05$ )外,其余三种氮肥处理的 *nosZ* 基因丰度均显著( $P < 0.05$ )小于对照。其中硝酸钾和硝酸铵处理的 *nosZ* 基因拷贝数最低,分别为  $4.3 \times 10^9$  和  $2.5 \times 10^9$  copies/g 干土;硫酸铵处理的土壤 *nosZ* 基因拷贝数为  $1.8 \times 10^{10}$  copies/g 干土,也显著( $P < 0.05$ )低于尿素和对照处理。

### 3 讨论

铵态氮肥料能刺激硝化微生物群落生长,提高硝化作用强度<sup>[19-22]</sup>。本试验硫酸铵、硝酸铵施入土壤后均显著促进了硝化活性(见图2)。随着硝化微生物对 NH<sub>3</sub> 的吸收利用,大量 H<sup>+</sup> 被释放到土壤中,导致土壤 pH 较对照显著( $P < 0.05$ )降低。对于尿素处理来说,土壤脲酶能迅速水解尿素为碳酸铵和碳酸氢铵,使得培养初期土壤 pH 显著提高。随后由于硝化作用的进行,土壤 pH 呈下降趋势。施入硝酸钾肥料虽然没有刺激硝化作用,但土壤 pH 仍然下降,这可能与 K<sup>+</sup> 与 H<sup>+</sup> 之间的离子交换有关。

土壤中的 N<sub>2</sub>O 排放主要来自于硝化作用和反硝化作用。长期以来硝化作用被认为是仅由自养细菌参与的、在中性和弱碱性条件下发生的生物学过程;反硝化作用是在嫌气条件下进行的微生物学过程,其最适 pH 是在6~8 之间为中性条件。强酸性环境被认为能明显抑制硝化和反硝化进程<sup>[16-17]</sup>。然而, Hayatsu<sup>[15, 18]</sup> 的研究表明,强酸性茶园土壤中不仅存在嗜酸的自养硝化作用和反硝化作用,并且能释放大量的 N<sub>2</sub>O。本试验对强酸性茶园土壤添加了不同种类的氮肥,结果发现, KNO<sub>3</sub> 处理的 N<sub>2</sub>O 总排放量最高,为对照的17 倍,而硫酸铵和尿素处

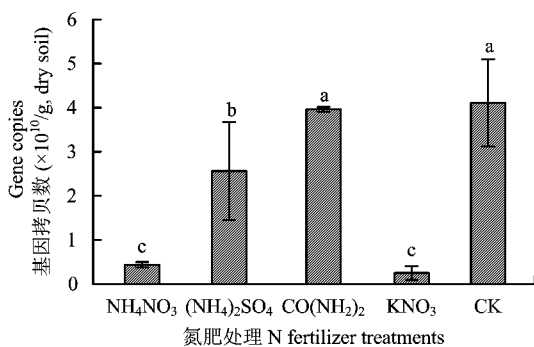


图4 不同氮肥处理 *nosZ* 基因拷贝数

Fig. 4 *nosZ* gene copy numbers per g dry soil from the different N fertilizer treatments

[注(Note): 柱上的不同字母表示处理间差异达到5%显著水平 Different letters above the bars mean significant difference among different treatments at the 5% level.]

理排放的 N<sub>2</sub>O 仅分别为对照的 2.2 倍和 2.8 倍(图 3)。以上结果表明,在强酸性茶园土壤中添加 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 产生的 N<sub>2</sub>O 远远高于添加 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N,反硝化作用很可能是 N<sub>2</sub>O 排放的主要来源。虽然尿素、硫酸铵、硝酸铵肥料处理土壤的硝化势远高于硝酸钾处理,但 N<sub>2</sub>O 排放量却远远低于添加硝酸钾处理,进一步证实了强酸性茶园土壤中 N<sub>2</sub>O 的排放来源主要为反硝化作用而不是硝化作用,这与 Tokuda 和 Hayatsu<sup>[15]</sup> 对日本茶园 N<sub>2</sub>O 排放的研究结果一致。

作为编码 N<sub>2</sub>O 还原过程的关键功能基因,土壤中 *nosZ* 基因表达水平决定 N<sub>2</sub>O 是转化为 N<sub>2</sub> 还是作为温室气体释放到大气中,因此一直受到广泛关注<sup>[23-27]</sup>。为了深入研究不同肥料氮处理 N<sub>2</sub>O 排放的作用机理,我们对 *nosZ* 基因进行定量 PCR 分析。结果表明,除了尿素处理与对照差异不显著( $P > 0.05$ )外,其余三种处理的 *nosZ* 基因丰度均显著低于对照,其中硝酸钾和硝酸铵处理的 *nosZ* 基因丰度最低(图 4)。肥料处理后 *nosZ* 基因丰度下降可能是由于以下因素所致:一方面可能与土壤低 pH 环境有关,有研究表明,低 pH 能显著抑制 N<sub>2</sub>O 还原酶<sup>[28]</sup>,本试验中硫酸铵、硝酸铵、硝酸钾处理的土壤 pH 与对照相比显著降低,进而抑制了 N<sub>2</sub>O 还原酶的活性;另一方面 *nosZ* 基因丰度下降可能与酸性环境下 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 对 N<sub>2</sub>O 还原酶的抑制作用有关<sup>[29]</sup>。本试验的土壤 pH 为 3.5,添加 N 155~200 mg/kg 的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 后,*nosZ* 基因拷贝数明显受到抑制,相应导致了硝态氮肥处理土壤释放了大量的 N<sub>2</sub>O。

## 4 结论

在强酸性茶园土壤中,反硝化过程是产生 N<sub>2</sub>O 的主要来源;不同施肥处理能显著影响 N<sub>2</sub>O 的排放速率,硝态氮肥处理的土壤 N<sub>2</sub>O 排放远远高于铵态氮肥;高浓度硝态氮能显著降低 *nosZ* 基因丰度, N<sub>2</sub>O 还原酶被硝态氮抑制是酸性茶园土壤中高通量 N<sub>2</sub>O 排放的关键原因。

## 参考文献:

[1] Houghton J T, Meira Filho L G, Callander B A *et al.* The science of climate change. Contribution of group I to second assessment report of the intergovernmental panel to climate change[R]. New York, USA: Cambridge University Press, 1995.

[2] 刘义,陈劲松,刘庆,陈林武. 土壤硝化和反硝化作用及影响

因素研究进展[J]. 四川林业科技, 2006, 27(2): 36-41.

Liu Y, Chen J S, Liu Q, Chen L W. Advances in studies of soil nitrification and denitrification and controlling factors [J]. J. Sichuan For. Sci. Tech., 2006, 27(2): 36-41.

[3] 张玉树,丁洪,秦胜金. 农业生态系统中氮素反硝化作用与 N<sub>2</sub>O 排放研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(6): 253-259.

Zhang Y S, Ding H, Qin S J. Progress in the studies of nitrogen denitrification and N<sub>2</sub>O emission in agro-ecosystem [J]. Chin. Agric. Sci. Bull., 2010, 26(6): 253-259.

[4] Firestone M K, Firestone R B, Tiedje J M. Nitrous oxide from soil denitrification: factors controlling its biological production [J]. Science, 1980, 208: 749-751.

[5] Wrage N, Lauf J, Prado A D *et al.* Distinguishing sources of N<sub>2</sub>O in European grasslands by stable isotope analysis [J]. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2004, 18: 1201-1207.

[6] Nakajima Y, Ishizuka S, Tsuruta H *et al.* Microbial processes responsible for nitrous oxide production from acid soils in different land-use patterns in Pasirmayang, central Sumatra, Indonesia [J]. Nutr. Cycl. Agroecosys., 2005, 71: 33-42.

[7] Stevens R J, Laughlin R J, Burns L C *et al.* Measuring the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from soil [J]. Soil Biol. Biochem., 1997, 29: 139-151.

[8] Hefting M M, Bobbink R, De C H. Nitrous oxide emission and denitrification in chronically nitrate-loaded riparian buffer zones [J]. J. Environ. Qual., 2003, 32: 1194-1203.

[9] Henry S, Bru D, Stres B *et al.* Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundance of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2006, 72(8): 5181-5189.

[10] 韩文炎,阮建云,林智,等. 茶园土壤主要营养障碍因子及系列专用肥的研制[J]. 茶叶科学, 2002, 22(1): 70-74.

Han W Y, Ruan J Y, Lin Z *et al.* The major nutritional limiting factors in tea soils and development of tea speciality fertilizer series [J]. J. Tea. Sci., 2002, 22(1): 70-74.

[11] Akiyama H, Yan X, Yagi K. Estimations of emission factors for fertilizer-induced direct N<sub>2</sub>O emissions and estimate of N<sub>2</sub>O emission factors from agricultural soils in Japan: Summary of available data [J]. Soil Sci. Plant Nutr., 2006, 52(6): 774-787.

[12] 鲁如坤. 土壤农业化学分析法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.

Lu R K. Soil and agro-chemistry analysis [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999.

[13] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D C. An extraction method for measuring soil microbial biomass C [J]. Soil Biol. Biochem., 1987, 79: 703-707.

[14] Molstad L, Dörsch P, Bakken L R. Robotized incubation system for monitoring gases (O<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>) in denitrifying cultures [J]. J. Microbiol. Methods, 2007, 71: 202-211.

[15] Tokuda S, Hayatsu M. Nitrous oxide production from strongly

- acid tea field soils[J]. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 2000, 46(4): 835-844.
- [16] Hankinson T R, Schmidt E L. An acidophilic and a neutrophilic nitrobacter strain isolated from the nmentally predominant nitrite-oxidizing population of an acid forest soil[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54: 1536-1540.
- [17] Paul E A, Clark F E. *Soil microbiology and biochemistry*[M]. San Diego, California: Academic Press, 1989.
- [18] Hayatsu M, Kosuge N. Autotrophic nitrification in acid tea soils[J]. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1993, 39(2): 209-217.
- [19] Martikainen P J. Numbers of autotrophic nitrifiers and nitrification in fertilized forest soil[J]. *Soil Biol. Biochem.*, 1985, 17: 245-248.
- [20] Mendum T A, Sockett R E, Hirsch P R. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the  $\beta$  subdivision of the class proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 66: 4155-4162.
- [21] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S *et al.* Population size and specific nitrification potential of soil ammonia-oxidizing bacteria under long-term fertilizer management[J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, 40: 1960-1963.
- [22] Xue D, Gao Y M, Yao H Y, Huang C Y. Nitrification potentials of Chinese tea orchard soils and their adjacent wasteland and forest soils[J]. *J. Environ. Sci.*, 2009, 21: 1225-1229.
- [23] Chon K, Chang J S, Lee E *et al.* Abundance of denitrifying genes coding for nitrate(*narG*), nitrite(*nirS*), and nitrous oxide(*nosZ*) reductases in estuarine versus wastewater effluent-fed constructed wetlands[J]. *Ecol. Eng.*, 2011, 37: 64-69.
- [24] Philippot L, Andert J, Jones C M *et al.* Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for  $N_2O$  emissions from soil[J]. *Glob. Change. Biol.*, 2011, 17: 1497-1504.
- [25] Zhou Z F, Zheng Y M, Shen J P *et al.* Response of denitrification genes *nirS*, *nirK*, and *nosZ* to irrigation water quality in a Chinese agricultural soil[J]. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2011, 18: 1644-1652.
- [26] Palmer K, Biasi C, Horn M A. Contrasting denitrifier communities relate to contrasting  $N_2O$  emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra[J]. *ISME J.*, 2012, 6: 1058-1077.
- [27] Ma W K, Bedard-Haughn A, Siciliano S D, Farrell R E. Relationships between nitrifier and denitrifier community composition and abundance in predicting nitrous oxide emissions from ephemeral wetland soils[J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, 40: 1114-1123.
- [28] Nommik H, Thorin J. A mass spectrometric technique for studying the nitrogenous gases produced on the reaction of nitrite with raw humus[J]. *Agrochimica*, 1972, 16: 319-322.
- [29] Blackmer A M, Bremner J M. Inhibitory effect of nitrate on reduction of  $N_2O$  to  $N_2$  by soil microorganisms[J]. *Soil Biol. Biochem.*, 1978, 10: 187-191.