

第四类脲酶抑制剂对土壤脲酶活性和微生物量的影响

王趁义^{1,2}, 陈仙仙¹, 黄兆玮¹, 付佳佳¹, 汪少奇¹

(1. 浙江万里学院, 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100; 2. 宁波晟乾环境技术开发有限公司, 浙江 宁波 315100)

摘要: [目的] 研究第四类脲酶抑制剂对土壤微生物的影响, 揭示此类脲酶抑制剂的微生物学效应, 为农业生产中施用含 Schiff 碱配合物型脲酶抑制剂缓控释尿素的安全性评价提供理论依据。[方法] 采用室内恒温恒湿培养的方法, 测定在不同浓度(按尿素施用量的 0.1%, 0.5%, 1%)新型 Schiff 碱铜配合物型脲酶抑制剂作用下土壤脲酶活性以及土壤细菌、真菌和放线菌微生物量指标。[结果] ①当抑制剂施用浓度为 0.1% 和 0.5% 时对土壤脲酶活性影响不显著, 当施用浓度为 1% 时, 对土壤脲酶活性抑制效果最好, 最大抑制率达 40.8%, 起到了适度调控的目的; ②土壤细菌、真菌和放线菌对尿素水解的敏感程度不同, 其中放线菌和真菌比较敏感, 尿素水解对其最大抑制率分别为 46.4% 和 89.7%。与此相反, 尿素的水解反而会促进细菌生长, 最大促进率达 83.6%; ③第四类脲酶抑制能够促进土壤细菌、放线菌和真菌的生长, 其对细菌、放线菌和真菌的最大促进率分别为 86.2%, 31.9% 和 83.6%。因此第四类脲酶抑制剂对土壤放线菌生长的促进作用较小, 对土壤细菌和真菌生长的促进作用较大。[结论] 第四类脲酶抑制剂对土壤脲酶活性有很好地抑制作用且能促进土壤细菌、真菌和放线菌的生长, 施用抑制剂浓度为 1% 时效果最显著, 即 1% 为其最佳用量。

关键词: 第四类脲酶抑制剂; Schiff 碱配合物; 土壤微生物; 脲酶活性; 生态安全

文献标识码: B

文章编号: 1000-288X(2019)02-0149-06

中图分类号: Q556, S154.3

文献参数: 王趁义, 陈仙仙, 黄兆玮, 等. 第四类脲酶抑制剂对土壤脲酶活性和微生物量的影响[J]. 水土保持通报, 2019, 39(2):149-154. DOI:10.13961/j.cnki.stbctb.2019.02.024; Wang Chenyi, Chen Xianxian, Huang Zhaowei, et al. Effects of fourth-type urease inhibitors on soil urease activity and microbial growth [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2019, 39(2):149-154.

Effects of Fourth-type Urease Inhibitors on Soil Urease Activity and Microbial Growth

Wang Chenyi^{1,2}, Chen Xianxian¹, Huang Zhaowei¹, Fu Jiajia¹, Wang Shaoqi¹

(1. College of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo, Zhejiang 315100, China;
2. Ningbo Shengqian Environmental Technology Development Co., Ltd., Ningbo, Zhejiang 315100, China)

Abstract: [Objectives] The effect of the fourth-type urease inhibitors on soil microorganisms was investigated to provide a theoretical basis for the safety evaluation of slow-release urea containing Schiff base complexes urease inhibitors in agricultural production. [Methods] Using indoor constant temperature and humidity incubation, the soil urease activity and bacteria, fungi and actinomycetes were determined at different concentrations(0.1%, 0.5%, 1% of urea application) under the condition of new Schiff copper base urease inhibitors. [Results] ① When the inhibitor concentration was 0.5% and 0.1%, the effect on soil urease activity was not significant. When the concentration was 1%, the inhibitory effect on soil urease activity was the best, and the maximum inhibition rate was 40.8%, which played the role of moderate regulation. ② Soil bacteria, fungi and actinomycetes showed different sensitivity to urea hydrolysis, among which actinomycetes and fungi were more sensitive. The maximum inhibitory rate of urea hydrolysis on soil actinomycetes and fungi was 46.4% and 89.7%,

收稿日期: 2018-10-10

修回日期: 2018-10-18

资助项目: 国家自然科学基金项目“第四类新型脲酶抑制剂的优化合成、活性筛选及其作用机制研究”(31071856); 浙江省自然科学基金项目(LY16C150002); 浙江省重中之重学科“生物工程”学生创新项目(CX2017002; CX2017004); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201810876047X); 浙江省公益性技术应用研究项目(2010C32060)

第一作者: 王趁义(1964—), 男(汉族), 江苏省徐州市人, 博士, 教授, 主要从事新型缓释肥料的开发与面源污染治理等方面的研究。E-mail: wcyxz@163.com.

respectively. In contrast, the hydrolysis of urea can promote the growth of bacteria, and the maximum promotion rate is 83.6%. ③ The fourth-type urea inhibition could promote the growth of soil bacteria, actinomyces and fungi. The maximum promotion rate of bacteria, actinomyces and fungi is 86.2%, 31.9% and 83.6%, respectively. Therefore, it can be concluded that the fourth-type urease inhibitors have little effect on actinomycetes, while have greater effect on bacteria and fungi. [Conclusion] The fourth-type urease inhibitor has a good inhibitory effect on soil urease activity and can promote the growth of soil bacteria, fungi and actinomycetes. The optimal application concentration of the fourth-type urease inhibitor is 1%.

Keywords: the fourth type of urease inhibitor; Schiff base complexes; soil microorganism; urease activity; ecological safety

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分之一,几乎所有的土壤物理、化学和生物学性质都直接或间接地与土壤微生物有关,土壤微生物参数变化将有可能成为土壤生态系统变化的预警及敏感指标^[1]。其中的细菌、真菌和放线菌不仅是土壤有机物质转化的执行者,又是植物营养元素的活性库^[2]。因此土壤微生物在有机质转化、养分循环、肥力形成、污染物降解以及能量流动方面具有重要的作用^[3-5]。另外由于微生物生长繁殖的最适温度、湿度及养分条件与植物相似,故可以综合反映土壤肥力和环境质量状况^[6]。尿素作为主要的化学氮肥品种,约占氮肥消耗总量 60%以上,然而在生产实践中我国水稻、玉米、小麦三大粮食作物氮肥的当季平均利用率仅为 33%,远低于美国、欧洲粮食作物的氮肥利用率(分别为 50%, 65%左右)^[7]。主要原因是土壤中的脲酶能将尿素迅速催化水解成 NH_3 ,其速率是未经催化水解的 10^{14} 倍^[7],极大地降低了动植物对氮素的利用,而我国每年因氮肥利用率低下导致的直接经济损失达 450 亿元^[8]。尿素的快速分解,不仅造成农业资源的严重浪费,同时也会引起一系列的生态环境问题^[8-9],如导致植物“烧苗”^[10];引起严重的环境氮污染和农村面源污染^[11];加速土壤酸化、耕地板结的进程^[12];造成大气污染,比如温室效应^[13],臭氧层破坏^[14]等。因此,如何在保障土壤供肥能力的同时,提高氮肥利用率,减少氮肥引起的环境污染和生态效应,已成为一个世界性研究课题^[8,15-16]。脲酶活性的抑制剂调控技术已成为提高尿素利用率最有效的生物化学方法。但现有的 3 类脲酶抑制剂中,金属盐类毒性较大;有机类的则因高残留、有耐药性、有效抑制时间短等原因,难以被大范围推广应用;而植物源类抑制剂有效成分小、药效慢、植物的采集具有季节性等缺点不易为农民接受^[7]。基于前 3 类脲酶抑制剂的弊端,目前新型高效绿色的配合物型脲酶抑制剂(以下简称第四类抑制剂)已引起国内外学者的广泛关注^[8],尤其是

Schiff 碱配合物型,因其结构中 N 原子上含有孤对电子,毒性小,与金属离子的配位能力较强,可以与多种过渡金属离子形成配合物,表现出优良的抗菌、抗癌、抑制脲酶活性,有望成为一类性能优良的新型脲酶抑制剂^[8,17]。但其施加后对土壤环境的影响还鲜有报道,只有在探明其对土壤影响的基础上方可推广应用于大田作物生产或肥料企业。郭晨^[18]认为土壤微生物的数量与土壤肥力存在正比例关系,通过测量土壤微生物的多少就能够知道土壤肥力以及肥料、农药或者进入土壤中的外来化学物质对土壤状况的影响,这种方式相较于正常的化学测定方式而言更为便捷与高效。目前,针对第四类脲酶抑制剂对土壤脲酶活性和土壤微生物生长影响的研究报道极少,仅有的一些研究也只报道了一些传统的脲酶抑制剂如 N-丁基硫代磷酰三胺(nBPT)^[19]、氢醌(HQ)^[20]、腐植酸^[21-22]等对土壤微生物类群分布、土壤酶活性及土壤微生物种类和数量的影响。本文的研究结果能为第四类脲酶抑制剂的安全性评价及相关脲酶抑制剂产品的开发与应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

第四类脲酶抑制剂来自项目组前期合成的 Schiff 碱铜配合物型抑制剂,化学式 $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_6\text{Cu}$ ^[23];尿素($\text{N} \geq 46\%$)购于国药集团有限公司;供试土壤采自宁波市鄞州区首南街道月浦稻田的水稻土,按 5 点法采取 5—20 cm 层土样,风干、混匀、研磨,过 2 mm 筛备用。土壤基本理化性质为:水分含量 32.2%,pH 值 6.7,有机质 14.5%,全氮 2.26 g/kg,硝态氮 0.77 mg/kg,铵态氮 3.58 mg/kg,有效磷 62.96 mg/kg。

1.2 试验设计

取 500 g 风干土样于若干个 10 cm×14 cm 培养容器中,调节土样的含水量至田间持水量的 60%,然后置于 28 ℃ 人工气候箱中培养 1 周以恢复生物活性,并定期搅拌土壤,保持土壤通气性。预培养结束

后,将上述土壤分成 5 组,第 1 组为空白(K),第 2 组仅加入 5 g 尿素(U),第 3—5 组分别加入尿素和尿素量的 0.1%,0.5%和 1%的第四脲酶抑制剂,所组成的混合物分别记作 UI 0.1%,UI 0.5%和 UI 1%。各组所加肥料均溶于水之后再施用,每个处理 3 次重复。然后将上述试验组置于 20 °C 的人工气候箱中于 4 月 18 号开始培养,4 月 24 号开始取样并且每隔 6 d 取样测定一次微生物数量和土壤脲酶活性,总共取样 7 次于 5 月 31 号结束,试验期间每天通过称重法加 1 次水以保持土壤含水量不变。

1.3 测定项目与方法

土壤脲酶活性测定采用靛酚蓝比色法^[24];土壤微生物的计数采用稀释涂平板计数法^[25]。称取土样 1 g,放入盛有 99 ml 无菌水的三角瓶中振荡 20 min,使土样与水充分混合,制成 10^{-2} 土壤悬液。用无菌吸管从中吸取 1 ml 土壤悬液加入盛有 9 ml 无菌水的试管中充分混匀,以此类推制成 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 等不同稀释度的土壤悬液。然后用无菌吸管各吸取不同稀释度的土壤悬液 0.2 ml 对号放入已制好的平板培养基中。细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基于 37 °C 培养箱中培养 1 d,稀释梯度选用 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ;放线菌采用高氏 I 号培养基于 28 °C 培养箱中培养 4 d,稀释梯度选用 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ;真菌采用虎红琼脂培养基于 27 °C 培养箱中培养 3 d,稀释梯度选用 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ^[26]。

1.4 数据统计分析

土壤微生物数量计算公式为:每克土壤样品菌数=某稀释倍数的菌落平均数×稀释倍数。

采用 Excel 软件进行数据处理,Origin 8.0 软件对数据进行绘图,SPSS 软件对数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 第四类脲酶抑制剂对土壤脲酶活性的影响

抑制剂不同施用浓度对脲酶活性的影响如图 1 所示。由图 1 可见,尿素表施到土壤后,U,UI 0.1%,UI 0.5%,UI 1%处理土壤脲酶活性逐渐增强,在第 12 d 土壤脲酶活性达到最大,而空白处理的土壤脲酶活性基本不变,这表明尿素在早期能够被土壤中的脲酶快速分解成碳酸铵。在脲酶抑制剂的作用下,UI 0.1%,UI 0.5%,UI 1%处理组在第 12 d,24 d 和第 36 d 土壤脲酶活性受到了显著抑制,其中 UI 1%处理的土壤脲酶活性在第 12 d,24 d 和 36 d 分别比仅加尿素处理组降低了 22.1%,32.2%和 40.8%,第 36 d UI 1%处理和仅加尿素处理达到显著差异($p < 0.05$),说明此类脲酶抑制剂的抑制作用

施用后期大于施用前期,这可能与抑制剂本身稳定性有关,由于 Schiff 碱金属配合物是由 Schiff 碱配体和金属铜离子配位反应合成的,它的热稳定性会比一般有机物要好一点,因此普通脲酶抑制剂在前期几天就分解完了而第四类脲酶抑制剂在后期还能继续作用,但是具体作用机制有待进一步深入研究。而 UI 0.5%和 UI 0.1%处理对土壤脲酶活性的抑制率低于 UI 1%处理,这表明了当抑制剂的浓度配比达到了 1%时,对土壤脲酶活性抑制效果最好。U,UI 0.1%,UI 0.5%,UI 1%的土壤脲酶活性在第 12 d 之后开始下降并在第 42 d 之后基本一致,表明了第四类脲酶抑制剂对土壤脲酶活性的抑制时效性达 42 d。

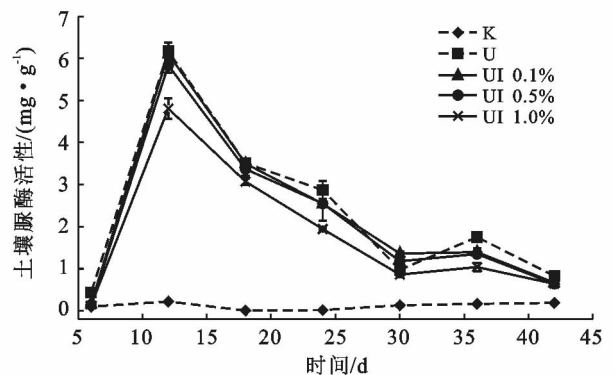


图 1 抑制剂不同施用浓度对脲酶活性的影响

2.2 第四类脲酶抑制剂对土壤细菌数量的影响

第四类脲酶抑制剂对土壤细菌数量的影响如图 2 所示。5 个处理组的土壤细菌数在培养第 6 d 时差别不大(2.00×10^7),第 6 d 之后都有不同程度的增加,其中 UI 1%和 UI 0.5%处理组较仅加尿素处理增加的幅度较大,而 UI 0.1%处理与仅加尿素处理的细菌数差别不大。12 d 之后 UI 0.1%和 UI 0.5%处理组的土壤细菌增长数量基本一致。各处理的土壤细菌数在第 24 d 达到最大,之后逐渐减少并在第 42 d 达到与空白组细菌一样的数量。在整个培养期间,空白组细菌一直处于较低水平。仅加尿素处理的土壤细菌数比空白处理土壤的细菌数多,表明了尿素对土壤细菌生长有促进作用,最大增长率为 63.6%。与空白处理组细菌数量相比得出的第四类脲酶抑制剂处理组细菌增长率明显超过了仅加尿素处理组,其最大增长率为 86.2%,这主要与以下两个原因有关,一个原因是脲酶抑制剂可以减少尿素水解产生的高浓度氨和铵对细菌生长的胁迫作用,另外能够保证后期有足够的碳源和氮源供细菌生长^[27-28]。另一个原因是脲酶抑制剂的加入使细菌生长环境发生了变化(pH 值升高、渗透压增加、脲酶活性降低等),给细菌

提供了一个良好的生长环境。UI 0.1% 和 UI 0.5% 处理的土壤细菌数量趋向一致,明显低于 UI 1% 处理的土壤细菌数量,对比图 1 与相应浓度处理的土壤脲酶活性差距相一致,因此可以得出这可能与抑制抑制土壤脲酶活性强弱有关。在培养第 42 d 时,各处理的土壤细菌数达到一致,说明尿素已全部水解,不再为细菌生长提供碳源和氮源。

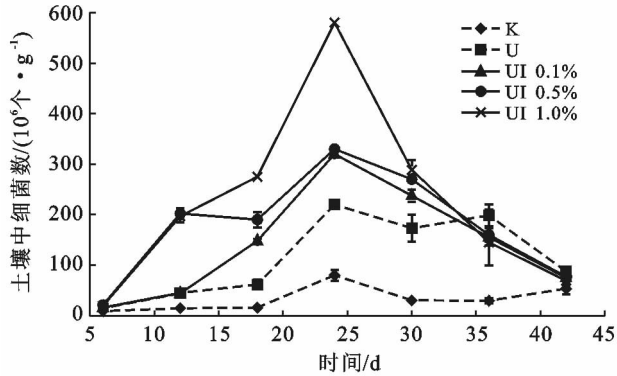


图 2 第四类脲酶抑制剂对土壤细菌数量的影响

2.3 第四类脲酶抑制剂对土壤放线菌数量的影响

第四类脲酶抑制剂对土壤放线菌数量的影响如图 3 所示,各处理的土壤放线菌数量变化规律大致相同,先上升后下降最后趋于平稳。土壤放线菌数量在第 18 d 达到最高值,在第 30 d 趋于平稳。在第 42 d,施用脲酶抑制剂处理组的放线菌数量与仅加尿素处理组放线菌数量趋向一致,而空白组的放线菌数量远高于其它 4 个处理组的放线菌数量。空白组的放线菌数量在整个培养期间要远高于仅加尿素处理组的放线菌数量,这说明尿素对放线菌的生长有抑制作用,最大抑制率达 46.4%。3 种加了第四类脲酶抑制剂的处理组放线菌数量要高于仅加尿素组放线菌的数量,其中在第 12 d 和第 18 d,UI 0.5%,UI 1% 处理组和仅加尿素组达到显著差异 ($p < 0.05$),说明第四类脲酶抑制剂对放线菌的生长有显著促进作用。

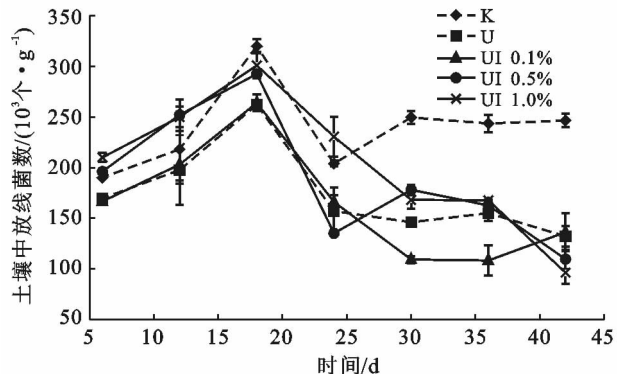


图 3 第四类脲酶抑制剂对土壤放线菌数量的影响

2.4 第四类脲酶抑制剂对土壤真菌数量的影响

第四类脲酶抑制剂对土壤真菌数量的影响如图 4 所示,在整个培养期间,UI 1% 处理组真菌的数量要高于其它 4 个处理组真菌的数量。UI 1% 处理组真菌的数量在第 6 d 后有一个较大幅度的升高,而其它 4 个处理组的真菌数量在第 18 d 后才有一个较大幅度的增长。各个处理组的真菌数量在第 24 d 达到生长高峰期,之后开始下降,其中 U, UI 0.1%, UI 0.5% 处理组真菌数量在第 42 d 与空白组真菌数量趋向一致。仅加尿素处理组的真菌数量比其它几组真菌数量要低,表明尿素抑制了土壤真菌的生长,最大抑制率达 89.7%。UI 0.1% 和仅加尿素处理组的真菌数量基本相同,说明低浓度的抑制剂对土壤真菌生长没有太大的影响,当抑制剂浓度继续增大,土壤真菌数量相较于仅加尿素处理组有一个较大的增长,UI 0.5% 处理组最大增长率为 46.9%,UI 1% 处理组最大增长率为 83.6%,由此说明第四类脲酶抑制剂的加入能够促进土壤真菌的生长。在第 42 d, U, UI 0.1%, UI 0.5% 处理组和空白处理组的土壤真菌增长率趋向一致说明尿素已基本水解完全,UI 1% 处理组真菌的数量在第 42 d 有一个小幅度的增长,说明高浓度的第四类脲酶抑制剂抑制土壤脲酶活性时效性比较长,能延长对土壤真菌的影响。

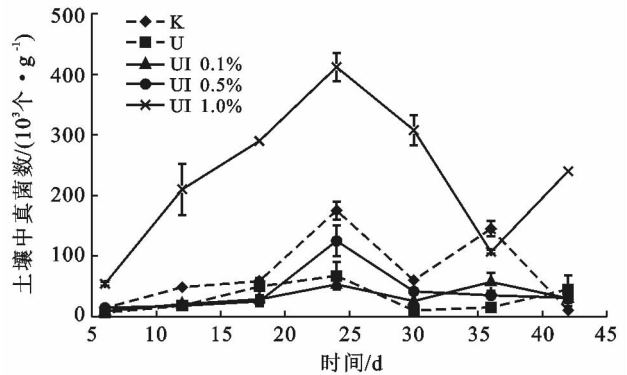


图 4 第四类脲酶抑制剂对土壤真菌数量的影响

3 讨论

土壤脲酶活性受到诸多因素的影响,与基质浓度、温度、pH 值、有机质含量等因素相关,在一定时间内可被脲酶抑制剂所抑制^[29-30]。研究表明,施加第四类脲酶抑制剂处理的抑制效果都是随施用时间的延长而增强,抑制活性在第 36 d 达到最强,施入的后期作用大于前期,这与其它类别的脲酶抑制剂的研究结果不一致。赵略^[31] 研究结果表明第二类脲酶抑制剂 nBPT 的抑制效果随施用时间的延长而减弱,施入

的前期作用大于后期,抑制剂对脲酶的抑制活性在抑制剂施入后的第 10 d 达到最强,这说明与第二类脲酶抑制剂相比,第四类脲酶抑制剂对土壤脲酶活性抑制的时效性明显延长,这可能是由于第四类抑制剂的两种组合单元(Schiff 碱配体、植物生长必需的金属元素)被限制在配合物骨架中,同时拥有了双活性位点的原因,兼具了无机和有机功能基因各自的性质和功能,从而使它作用时间延长,毒性大为降低^[32]。然而,这些认知只是停留在理论意义上,尚需进一步地进行试验验证。

土壤脲酶主要来源于土壤当中的一些菌体^[33],第四类脲酶抑制剂对土壤脲酶的抑制活性随着抑制剂浓度的增大而增强,抑制剂浓度为 1% 的抑制作用要远高于抑制剂浓度为 0.5% 和 0.1%。土壤脲酶主要来源于土壤当中的一些微生物菌体^[32],第四类脲酶抑制剂对土壤脲酶的抑制活性随着抑制剂浓度的增大而增强,抑制剂浓度为 1% 的抑制作用要远高于抑制剂浓度为 0.5% 和 0.1%。主要原因是由于土壤脲酶为诱导酶,底物浓度对酶活性影响较大。在脲酶蛋白合成过程中,第四类脲酶抑制剂降低了底物对脲酶合成的诱导和促进作用,从而阻碍了酶的活性中心形成^[29]。

土壤微生物是土壤生物中最活跃的部分,他们参与土壤的有机质分解、腐殖质合成、养分转化和土壤的发育及形成,既是土壤中营养元素的“源”,又是营养元素的“库”。施肥后,由于肥料在土壤上要分解(有机肥)或溶解(化肥)成更小的分子或离子,就形成了局部高浓度现象,这些短时间内产生的局部高浓度会对土壤微生物产生明显的影响。但土壤 3 大微生物对尿素的敏感程度不一样,其中土壤放线菌和土壤真菌对尿素比较敏感,尿素会抑制其生长,这可能与尿素水解产生的铵过度累积有关。Arnebrandt 等^[34]的研究表明,施用氮肥对土壤微生物群落特别是菌根真菌有直接的抑制作用,其机制是抑制酶活力和积累毒性化合物。而细菌相反,尿素可促进其生长,这可能与尿素水解产生的氮源类物质会给细菌生长提供氮源和碳源有关。

第四类脲酶抑制剂的加入能够促进土壤微生物的生长,这与脲酶抑制剂能够减缓尿素的水解有关,因为脲酶抑制剂与尿素一起使用延长了施肥点处尿素的扩散时间,并延缓了酰胺态氮向铵态氮的转化进程,从而降低土壤溶液中 NH_4^+ 和 NH_3 的浓度,减少尿素对土壤微生物的毒性。脲酶抑制剂施用浓度小时,对土壤微生物的促进作用不明显,当抑制剂浓度为 1% 时,能够较大幅度促进土壤微生物的生长,第

四类脲酶抑制剂施用浓度为 1% 是最佳用量。这为后期第四类脲酶抑制剂投入农业生产用量提供了科学依据。

在土壤的 3 大微生物群体中,第四类脲酶抑制剂对土壤放线菌的生长影响作用较小,对土壤真菌的生长影响较大,对土壤细菌的影响最大。有研究表明土壤中细菌数量的增加有利于土壤养分的转化,能为植物的生长提供良好的环境,土壤中放线菌数量的增加不仅能转化土壤有机质,对植物的土传病原菌也起到一定的拮抗作用,促进土壤微生物区系向健康方向发展^[35]。探讨第四类脲酶抑制剂对土壤微生物的影响,对于实现化肥零增长,发展绿色和生态农业的战略需求具有重要的理论意义和应用价值。

4 结论

(1) 第四类脲酶抑制剂浓度为 1% 对土壤脲酶活性的抑制作用远高于抑制剂浓度为 0.5% 和 0.1%, 最大抑制率达 40.8%, 可以实现适度调控的目的。

(2) 尿素对土壤细菌生长有促进作用,最大促进率达 83.6%; 对真菌和放线菌有抑制作用,最大抑制率分别为 89.7%, 46.4%。

(3) 第四类脲酶抑制剂能够促进土壤细菌、放线菌和真菌的生长,抑制剂浓度为 1% 时促进作用最明显。综合不同浓度抑制剂对土壤脲酶抑制活性的强弱,可以得出第四类脲酶抑制剂施用浓度为 1% 是最佳用量。

[参 考 文 献]

- [1] 范夫静,黄国勤,宋同清,等.西南峡谷型喀斯特坡地土壤微生物量 C, N, P 空间变异特征[J].生态学报, 2014, 34(12): 3293-3301.
- [2] 张新慧,王霞霞,张恩和. 2,4-二叔丁基苯酚对啤酒花根际土壤微生物数量的化感效应研究[J].中国生态农业学报, 2008, 16(6): 1606-1608.
- [3] 李雪萍,李建宏,漆永红,等.青稞根腐病对根际土壤微生物及酶活性的影响[J].生态学报, 2017, 37(17): 5640-5649.
- [4] Kluge B, Peters A, Krüger J, et al. Detection of soil microbial activity by infrared thermography (IRT) [J]. Soil Biology Biochemistry, 2013, 57(3): 383-389.
- [5] Petersen D G, Blazewicz S J, Firestone M, et al. Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska [J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(4): 993-1008.
- [6] 姬兴杰,杨颖颖,熊淑萍,等.不同肥料对土壤微生物数量及全氮时空变化的影响[J].中国生态农业学报,

- 2008,16(3):576-582.
- [7] Chen Xianxian, Wang Chenyi, Fu Jiajia, et al. Synthesis, inhibitory activity and inhibitory mechanism studies of Schiff base Cu(II) complex as the fourth type urease inhibitors [J]. *Inorganic Chemistry Communications*, 2019,99(1):70-76.
- [8] Fu Jiajia, Wang Chenyi, Chen Xianxian, et al. Classification research and type of slow controlled release fertilizers(SRFs): A review[J], *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 2018,49(17):2219-2230.
- [9] 栾江,仇宏伟,赵静. 中国农业生产中化肥过度使用状况及地域分布差异[J]. *青岛农业大学学报:自然科学版*, 2018,35(1):40-48.
- [10] 张总正. 深松和控释尿素对玉米氮素吸收、分配与利用的影响[D]. 山东泰安:山东农业大学,2013.
- [11] Choudhury A T M A, Kecskés M L, Kennedy I R. Utilization of BNF technology supplementing urea N for sustainable rice production[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2014,37(10):1627-1647.
- [12] Guo Jingheng, Liu Xuejun, Zhang Ying, et al. Significant acidification in major chinese croplands[J]. *Science*, 2010,327(5968):1008-1010.
- [13] Hube S, Alfaro M A, Scheer C, et al. Effect of nitrification and urease inhibitors on nitrous oxide and methane emissions from an oat crop in a volcanic ash soil [J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2017,238(3):46-54.
- [14] Reay D S, Davidson E A, Smith K A, et al. Global agriculture and nitrous oxide emissions[J]. *Nature Climate Change*, 2012,2(6):410-416.
- [15] 孟庆英,朱宝国,王囡囡,等. 控释尿素与常规尿素不同配施对根际土壤微生物数目、土壤氮素及玉米产量的影响[J]. *土壤通报*, 2012,43(5):1173-1176.
- [16] 王大鹏,郑亮,吴小平,等. 旱地土壤硝态氮的产生、淋洗迁移及调控措施[J]. *中国生态农业学报*, 2017,25(12):1731-1741.
- [17] 陆瑞娥. 氨基苯乙酮类 Schiff 碱配体及其配合物的合成、结构和性质研究[D]. 甘肃兰州:兰州交通大学, 2015.
- [18] 郭晨. 浅析微生物对土壤肥力的影响[J]. *吉林农业*, 2018(12):69.
- [19] 崔亚兰. 水田土壤氮库和微生物对持续 7 a 施用缓释尿素的响应[D]. 北京:中国科学院大学,2015.
- [20] Giovambattista S, Moreno T, Bruno M. Use of compost to manage Fe nutrition of pear trees grown in calcareous soil[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012,136(2):87-94.
- [21] Pant A P, Radovich T J K, Hue N V, et al. Biochemical properties of compost tea associated with compost quality and effects on pak choi growth[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012,148(1):138-146.
- [22] Fan Xiaopin, Yin Chang, Yan Guochao, et al. The contrasting effects of N-(n-butyl) thiophosphoric triamide(NBPT) on N₂O emissions in arable soils differing in pH are underlain by complex microbial mechanisms[J]. *Science of the Total Environment*, 2018,642(24):155-167
- [23] Wang Chenyi, Ye Jinyun. Synthesis, crystal structures, and urease inhibitory activity of cooper(II) complexes with schiff bases[J]. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 2011,37(3):235-241.
- [24] 沈萍,陈向东. 微生物学试验[M]. 4版. 北京:高等教育出版社,2007.
- [25] 霍璐阳,李志国,刘晴,等. 短密木霉、咪唑乙烟酸和种植大豆对土壤脲酶活性的影响[J]. *东北林业大学学报*, 2018,46(3):91-93.
- [26] 林先贵. 土壤微生物学研究的原理和方法[M]. 北京:高等教育出版社,2010.
- [27] 杜慧玲,郭平毅. 尿素和多效唑对苯磺隆胁迫土壤微生物数量的影响[J]. *山西农业科学*, 2009,37(6):45-49.
- [28] 鲁艳红,聂军,廖育林,等. 氮素抑制剂对双季稻产量、氮素利用效率及土壤氮平衡的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018,24(1):95-104.
- [29] 张文学,杨成春,王少先,等. 脲酶抑制剂与硝化抑制剂对稻田土壤氮素转化的影响[J]. *中国水稻科学*, 2017,31(4):417-424.
- [30] 周旋,吴良欢,戴锋. 新型磷酰胺类脲酶抑制剂对不同质地土壤尿素转化的影响[J]. *应用生态学报*, 2016,27(12):4003-4012.
- [31] 赵略,孙庆元,于英梅,等. 脲酶抑制剂 nBPT 对土壤脲酶活性和脲酶产生菌的影响[J]. *大连工业大学学报*, 2007,26(1):24-27.
- [32] Chen Xianxian, Wang Chenyi, Fu Jiajia, et al. Research status and progress of inhibitory effects and inhibitory mechanism of complex-type urease inhibitors: A review[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2019,50(3):1-10.
- [33] 曹慧,孙辉,杨浩,等. 土壤酶活性及其对土壤质量的指示研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2003,9(1):105-109.
- [34] Arnebrant K, Baath E, Söderström B. Changes in microfungus community structure after fertilization of scots pine forest soil with ammonium nitrate or urea [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1990,22(3):309-312.
- [35] 姜蓉,徐智,汤利. 化肥减量配施不同有机肥对设施菊花土壤微生物功能多样性的影响[J]. *云南农业大学学报*, 2017,32(5):895-902.