

土壤中双氰胺降解及与降解菌的关系

罗 涛¹, 王煌平¹, 张晓玲², 张 青¹, 蔡开地³, 翁伯琦⁴

(1.福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福州 350013; 2.福建农林大学资环学院, 福州 350002; 3.福建省莆田市荔城区土壤肥料技术站, 福建 莆田 351131; 4.福建省农业科学院农业生态研究所, 福州 350013)

摘 要:采用灭菌土培、非灭菌土培、田间蔬菜种植、添加外源降解菌土培试验研究了土壤中双氰胺(DCD)降解及与降解菌的关系。结果显示,不论是单施 DCD、尿素配施 DCD,还是碳酸氢铵配施 DCD 的土壤,灭菌处理的土壤中 DCD 半衰期分别比不灭菌处理的长 13.56、5.79、14.51 d。降解菌生长期间,降解菌总量(x)与 DCD 降解呈显著正相关,拟合的线性方程为 $y=3.184 1x-2.545 2$, $r=0.975 2$ 。外源 DCD 降解真菌可在灭菌土壤中定殖并有效降解 DCD,培养 15 d 后, U+DCD+DCD 降解菌处理土壤中 DCD 降解真菌的数量增加至 36.40×10^5 cfu,且 DCD 含量极显著降低。这些结果表明土壤中 DCD 降解与降解菌关系极为密切,添加外源真菌加速了土壤中 DCD 降解。

关键词:双氰胺;尿素;碳酸氢铵;降解菌;降解

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)11-2174-06

Degradation of Dicyandiamide in Soil and Its Relationship with Degrading Microorganism

LUO Tao¹, WANG Huang-ping¹, ZHANG Xiao-ling², ZHANG Qing¹, CAI Kai-di³, WENG Bo-qi⁴

(1.Institute of Soil and Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2.College of Resource and Environment, Fujian University of Agriculture and Forestry, Fuzhou 350002, China; 3.Technical Station of Soil and Fertilizer in Licheng District, Putian, 351131, China; 4.Institute of Agricultural Ecology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: Sterilized, non-sterilized and application of exogenous fungi with soil cultivations, and field plating tests were employed to investigate the degradation of dicyandiamide(DCD), relating to soil microorganism populations. Application of DCD(control), DCD with urea, or DCD with ammonium bicarbonate in sterilized soil cultivations, the half-lives of DCD degradation were longer than those of non-sterilized soils of 13.56 d, 5.79 d and 14.51 d, respectively. The sigmoidal growth of microbial populations(x) observed significantly correlation with the degradation of DCD(y), showing the linear equation of $y=3.184 1x-2.545 2$, $r=0.975 2$. Application of exogenous fungi could be colonized in sterilized soil and effectively degraded DCD. Application of urea+ DCD +exogenous fungi, the population of soil fungi increased of 36.40×10^5 cfu and decreased significantly DCD content after 15 d of incubation. The degradation of DCD was shown close relationship with soil microorganism. Exogenous fungi enhanced the degradation of DCD in soils.

Keywords: dicyandiamide; urea; ammonium bicarbonate; degrading microorganism; degradation

蔬菜硝酸盐累积与土壤硝化作用密切相关,除土壤类型、蔬菜品种等因素之外,施肥是影响蔬菜硝酸盐含量的主要外部因素,也是最不易于人为调控的因素^[1-3]。双氰胺(DCD)是在生产中得到应用的为数不多

的硝化抑制剂之一^[4-5],其不仅能提高氮肥利用率、降低蔬菜硝酸盐累积,而且对减少农田环境污染和温室气体排放等方面有一定作用^[6-10]。据报道,DCD 在土壤中可降解,DCD 在土壤中的硝化抑制效果不仅与本身的特性有关,而且与 DCD 在土壤中的降解因子密切相关^[11-12]。土壤中 DCD 如果在土壤中分解过快,势必影响其硝化抑制效果^[13],而分解过慢,作用时间就长。目前对 DCD 硝化抑制特性的研究较多,但有关 DCD 降解的报道较少。为此,本研究从非灭菌和灭

收稿日期:2012-04-13

基金项目:国家科技支撑计划(2012BAD14B15);福建省财政专项-福建省农业科学院科技创新团队建设基金(STIF-Y01);福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2011R1024-5)

作者简介:罗 涛(1961—),男,江苏苏州人,研究员,主要从事土壤环境、肥料与植物营养研究。E-mail:luotaofjz@188.com

菌土培试验,田间蔬菜种植试验以及添加外源降解菌的土培试验来验证 DCD 降解菌的存在,且通过其动态变化来探讨 DCD 的降解机理及与 DCD 降解菌的关系,为科学施用 DCD 等硝化抑制剂以及农田生态环境保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土壤培养试验

试验设非灭菌和灭菌两个条件,每个条件均设 3 个处理,即:①单施 DCD、②尿素+DCD(U+DCD)、③碳酸氢铵+DCD(ABC+DCD)。每个处理 18 次重复。供试土壤类型为黄泥土,基础肥力为:pH 5.09,有机质 $31.55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮 $1.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全磷 $0.39 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,碱解氮 $83.94 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,有效磷 $12.60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效钾 $44.06 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。将过 2 mm 筛的 40 g 风干土壤装到 100 mL 宽口三角瓶中,用蒸馏水调节土壤含水量至田间最大持水量的 60%。

非灭菌土培试验塞上棉塞后,于 28 °C 恒温气候培养箱预培养 7 d,以恢复土壤的生物学活性。随后将尿素、碳酸氢铵、磷酸二氢钾、硫酸钾、DCD 配制成溶液加入相应处理的三角瓶中,3 个处理磷钾和 DCD 均为分析纯,含量分别为: P_2O_5 $0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 K_2O $0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、DCD $34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干土,增施氮肥处理氮含量为 $0.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。添加处理液后补充蒸馏水以调节土壤含水量至田间最大持水量的 60%。各处理均放置于 28 °C 恒温气候培养箱中暗培养 61 d,采用称总量法每间隔 5 d 调节土壤含水量,使之保持恒定。

灭菌试验处理土壤于 121 °C 灭菌 30 min,间歇灭菌 3 次,冷却后,在无菌操作台通过 $0.45 \mu\text{m}$ 的无菌滤膜添加处理液,并补充无菌水以调节土壤含水量,间隔期间除用无菌水调节土壤含水量外,其余步骤与非灭菌土培试验相同。

1.2 田间验证试验

田间试验地设在福建省农科院土壤肥料研究所农业部福建耕地保育科学观测实验站。供试蔬菜品种为台湾清江小白白菜 (*Brassica chinensis* L.cv.Ching-Geeng),供试土壤、试验设计同 1.1 的土壤培养试验,每个处理 3 次重复,小区随机区组排列,共 9 个小区。小区面积均为 12.1 m^2 ($5.5 \text{ m} \times 2.2 \text{ m}$),尿素和碳酸氢铵的氮肥用量均为 $\text{N } 255 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。各处理磷钾肥均为过磷酸钙和硫酸钾,用量分别为 P_2O_5 $90 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 、 K_2O $180 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。DCD 为分析纯试剂,用量为 $25.5 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$,每区氮磷钾肥及 DCD 均做基肥一次性施入。

1.3 添加外源降解菌灭菌土培试验

试验设 2 个处理,即:①尿素+DCD(U+DCD)、②尿素+DCD+DCD 降解真菌 (U+DCD+DCD 降解菌)。每个处理 3 次重复,供试的土壤与化学试剂同 1.1。将过 2 mm 筛的 40 g 风干土壤装到 100 mL 宽口三角瓶中,依处理分别加入尿素与 DCD,用量分别为 $\text{N } 0.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、DCD $34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干土。宽口三角瓶共 6 个,于 121 °C 灭菌 30 min,间歇灭菌 3 次,冷却后将经 DCD 选择培养基从土壤中分离纯化出对 DCD 降解效果较好,再经 PDA 培养基摇瓶培养至孢子期的 DCD 降解真菌 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,用生理盐水反复冲洗后稀释至 $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,在无菌操作台操作,每瓶添加 5 mL 菌液,各处理土壤含水量保持土壤田间持水量的 60%,每隔 5 d 采用称重法保持土壤含水量,放置于 28 °C 恒温气候培养箱中暗培养。

1.4 样品采集与分析方法

无添加外源菌的土培试验在培养的第 2、4、8、16、31、61 d 分别随机取 3 个重复用于测定土壤 DCD 残留量,并对土壤中可培养的好氧 DCD 降解菌进行计数。种植蔬菜的田间验证试验于施肥后 9、14、19、24、29、34 d 分别取 0~20 cm 耕层土壤的土样对土壤 DCD 降解细菌(放线菌酮做真菌抑制剂)和降解真菌(青霉素做细菌抑制剂)进行计数。添加外源 DCD 降解真菌的土培试验培养 15 d 后,取样测定 DCD 含量和 DCD 降解菌数量。所有用于测定 DCD 残留量和 DCD 降解菌试验土样均分别保存在 -20 °C 和 4 °C 冰箱中。

DCD 测定采用高效液相色谱法(HPLC):准确称取 10.000 g 配施 DCD 的土样,20 mL 超纯水超声 30 min,上清液过滤后进样。标准工业液:准确称取硝化抑制剂 I 10.000 mg 标准品,制成 $C_{\text{标}}=10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。使用仪器 Waters Alliance 2695,色谱分离条件:色谱柱 Xterra RP 4.6 mm $\times$ 150 mm,流动相组成为乙腈: $[2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NHSO}_4 + 25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4]$ 为 5:95,流速 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 30 °C,柱压 14 MPa,进样量 10 μL 。检测条件:Water 2996 二极管阵列检测器 220 nm 检测。

DCD 降解菌计数采用平板稀释法:称取 10.000 g 鲜土样,加入到预先灭菌的带有玻璃珠并盛有 90 mL 磷酸盐缓冲液的三角瓶中,摇匀 30 s 后吸取 10 mL 该稀释度为 10^{-1} 的土壤悬浊液至另一只预先灭菌的装有 90 mL 磷酸盐缓冲液的三角瓶中摇匀,得到稀释度为 10^{-2} 的土壤悬浊液,再取 1 mL 到装有 9 mL 灭菌

缓冲液的玻璃试管中,依次稀释到 10^{-6} 。选取 5 个连续稀释度,采用稀释平板法测定土壤 DCD 降解菌的数量性状。所用培养基为(1 L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10.25 g、 KH_2PO_4 5.2 g、葡萄糖 5 g、DCD 1.6 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30.2 g、 ZnCl_2 10 μL 、 FeSO_4 10 μL 、 MnSO_4 5 μL 、 CoCl_2 5 μL 、 MoPO_4 5 μL 、 CuSO_4 1 μL (微量元素盐浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。所有药品试剂均为分析纯。

1.5 数据处理及计算

数据整理采用 Microsoft Excel 2003,数据统计分析采用 DPS 7.05 统计软件中的单因素方差分析(ANOVA)进行差异显著性测验,并作 Duncan 检验。

2 结果与分析

2.1 灭菌和非灭菌条件下 DCD 降解的比较

图 1 表明,不论是灭菌土培还是非灭菌土培,土壤中 DCD 含量随培养时间的延长呈逐渐降低的趋势,DCD 的降解均符合一级动力学关系($y=ae^{bx}$),但灭菌土培的降解速率均小于非灭菌土培。

起始浓度为 $34.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 DCD 土壤培养 2、4、8、16、31、61 d 后,单施 DCD 的处理中,灭菌土培的 DCD 降解率分别为 15.15%、16.72%、16.94%、28.90%、44.05%、61.06%,其拟合的降解动态方程为 $C_{\text{DCD}} = 30.197 4e^{-0.013 8t}$ ($r=0.994 3, P=0.000 1$);非灭菌土培的降解率分别为 16.27%、23.10%、26.35%、36.85%、57.05%、69.47%,降解动态方程为 $C_{\text{DCD}} = 28.818 2e^{-0.018 8t}$ ($r=0.990 8, P=0.000 1$),灭菌处理的 DCD 半衰期比常规处理长 13.56 d。

U+DCD 的处理中,灭菌土培的 DCD 降解率分别为 0.59%、18.42%、18.47%、30.44%、47.11%、69.47%,降解动态方程为 $C_{\text{U+DCD}} = 32.551 7e^{-0.019 3t}$ ($r=0.982 3, P=0.000 5$),非灭菌土培的 DCD 降解率分别为 1.84%、20.30%、26.46%、39.36%、48.40%、75.75%,降解动态方程为 $C_{\text{U+DCD}} = 31.558 4e^{-0.022 2t}$ ($r=0.972 4, P=0.001 1$),灭菌处理的 DCD 半衰期比常规处理长 5.79 d。

ABC+DCD 的处理中,灭菌土培的 DCD 降解率分别为 0.47%、10.59%、17.35%、22.26%、37.29%、54.82%,降解动态方程为 $C_{\text{ABC+DCD}} = 32.732 1e^{-0.013 2t}$ ($r=0.984 4, P=0.000 4$),非灭菌土培的 DCD 降解率分别为 14.71%、22.94%、28.44%、30.41%、40.85%、71.03%,降解动态方程为 $C_{\text{UABC+DCD}} = 28.992 1e^{-0.015 2t}$ ($r=0.974 7, P=0.001$),灭菌处理的 DCD 半衰期比常规处理长 14.51 d。

从各处理均表现出灭菌条件下 DCD 半衰期长于

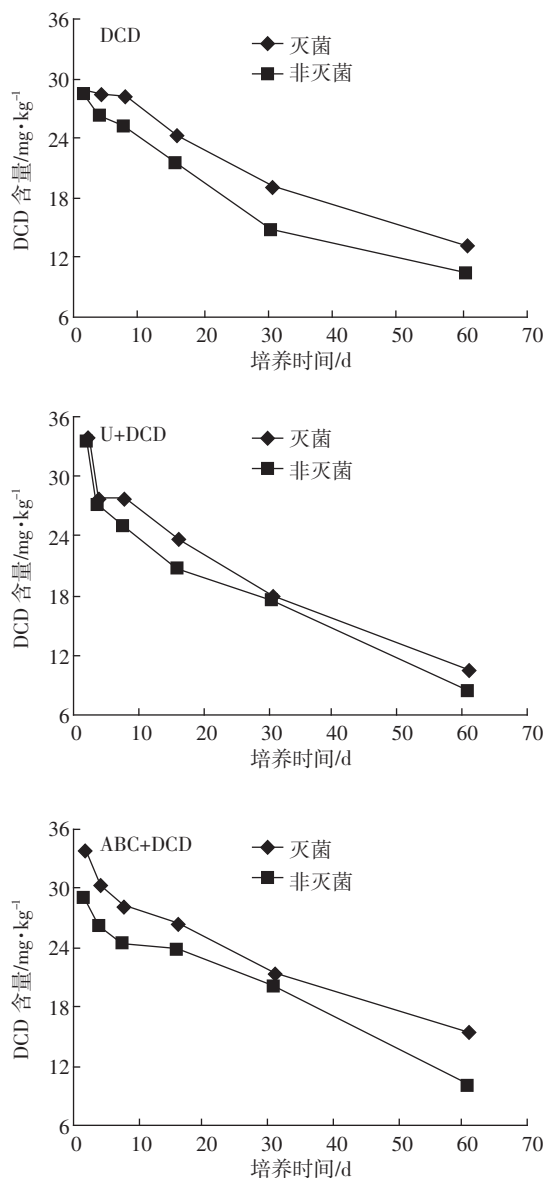


图 1 灭菌和非灭菌条件下 DCD 降解的动态变化

Figure 1 Dynamic changes in dicyandiamide degradation under sterilization and non-sterile conditions

非灭菌的现象来看,土壤土著微生物对土壤中 DCD 的降解有较大的促进作用,微生物的存在加快了 DCD 的降解进程^[14-15],同时氮素形态对 DCD 的降解也有一定影响。

2.2 DCD 降解细菌和降解真菌的动态变化

田间试验表明,土壤中存在土著的 DCD 降解菌,包括降解细菌和降解真菌。如图 2 所示,不同处理的 DCD 降解细菌动态变化均先升高后降低。其中,DCD 和 U+DCD 处理的 DCD 降解细菌的数量在施肥 14 d 后达到最大值,分别为 $28.11 \times 10^3 \text{ cfu}$ 和 $29.02 \times 10^3 \text{ cfu}$,ABC+DCD 处理则在施肥 24 d 后达到最大值,为

32.31×10^3 cfu。而 DCD 降解真菌的数量先呈下降趋势,而后维持在一定范围内波动。DCD、U+DCD 和 ABC+DCD 处理的 DCD 降解真菌数量分别由 1.03×10^3 cfu 降低到 0.41×10^3 cfu, 1.09×10^3 cfu 降低到 0.23×10^3 cfu, 1.07×10^3 cfu 降低到 0.44×10^3 cfu,并在施肥 14 d 后分别维持在 $0.36 \times 10^3 \sim 0.78 \times 10^3$ cfu、 $0.14 \times 10^3 \sim 0.68 \times 10^3$ cfu 和 $0.39 \times 10^3 \sim 0.53 \times 10^3$ cfu 范围内。

由图 2 还可以看出,6 次取样的 DCD 降解细菌的数量均明显高于相应的 DCD 降解真菌的数量。DCD、U+DCD 和 ABC+DCD 处理降解细菌的数量分别为 DCD 降解真菌数量的 2.02~28.56 倍、0.87~124.39 倍、2.72~83.56 倍,这可能与土壤中细菌数量高于真菌的数量有关。

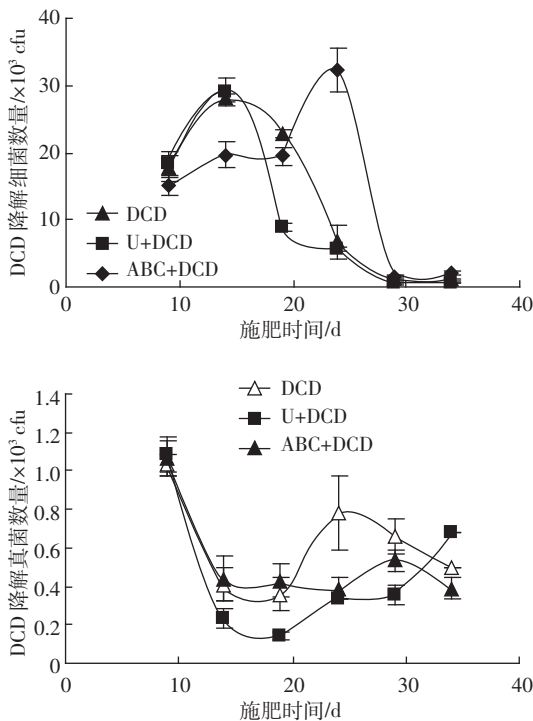


图 2 蔬菜种植条件下 DCD 降解细菌和降解真菌的动态变化
Figure 2 Dynamic changes of dicyandiamide degrading bacteria and fungi under the condition of vegetable cultivation

2.3 DCD 降解与 DCD 降解菌的关系

由图 3 可知,田间蔬菜种植条件下的 DCD 降解动态与土培试验的 DCD 降解规律相似,但不同处理均表现为田间试验的降解速率大于土培试验,这可能与田间 DCD 随水淋失至耕层以下土层有关^[16]。DCD、U+DCD、ABC+DCD 处理的 DCD 降解均符合一级动态方程,各处理拟合的动态方程分别为 $C_{\text{DCD}}=58.2177e^{-0.1397t}$ ($r=0.9772, P=0.0008$)、 $C_{\text{U+DCD}}=14.8419e^{-0.0523t}$ ($r=0.8702,$

$P=0.0242$)、 $C_{\text{ABC+DCD}}=43.8287e^{-0.1214t}$ ($r=0.9943, P=0.0001$),其降解半衰期分别为 13.74、10.64、12.35 d。

从图 3 还可以看出,DCD 降解菌与 DCD 降解细菌变化趋势相似,DCD 和 U+DCD 处理的 DCD 降解菌的数量在施肥 14 d 后达到最大值,ABC+DCD 处理在施肥 24 d 后达到最大值,6 次取样的 DCD 降解菌总量以 ABC+DCD 处理为最高,达 93.42×10^3 cfu。

土壤 DCD 降解菌在经过对数生长期后,随着 DCD 的降解,DCD 降解菌也呈现降低的趋势(图 3)。相关分析表明(图 4),对数生长期后的 DCD 降解菌数量(x)与 DCD 含量(y)呈显著正相关关系,拟合的线性方程为 $y=3.1841x-2.5452$ ($r=0.9752, P=0.0047$)。

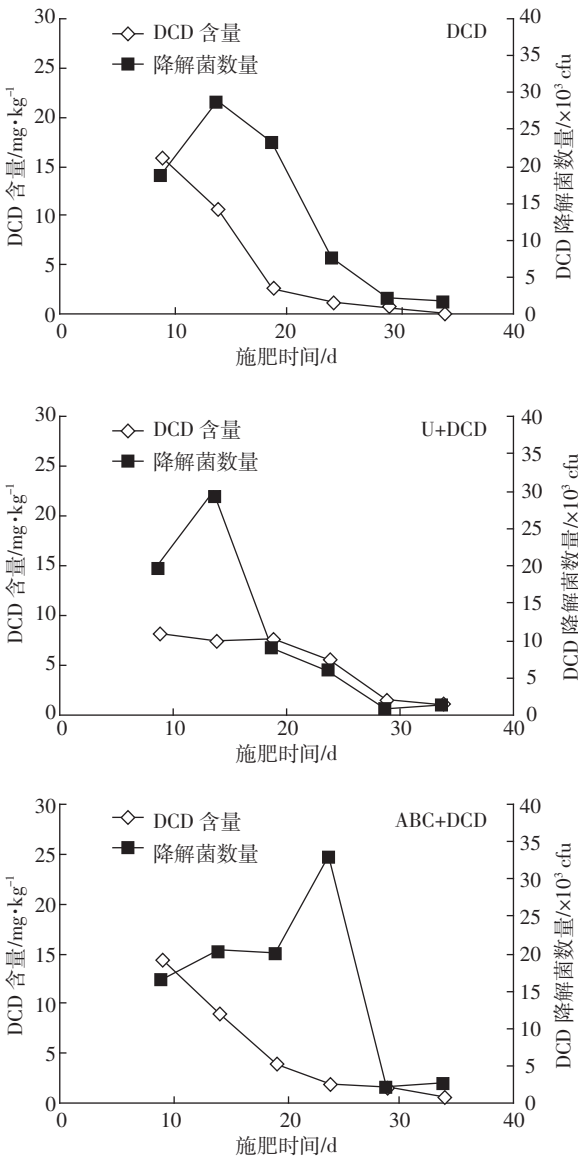


图 3 蔬菜种植条件下 DCD 及其降解菌的动态变化
Figure 3 Dynamic changes of dicyandiamide and its degrading microorganism under the condition of vegetable cultivation

由此可见,土壤中 DCD 降解与 DCD 降解菌密切相关。土壤中施入 DCD,促进了 DCD 降解菌的生长繁殖,当 DCD 降解菌经过对数生长期后,随着 DCD 降解,土壤中降解菌数量也相应减少。

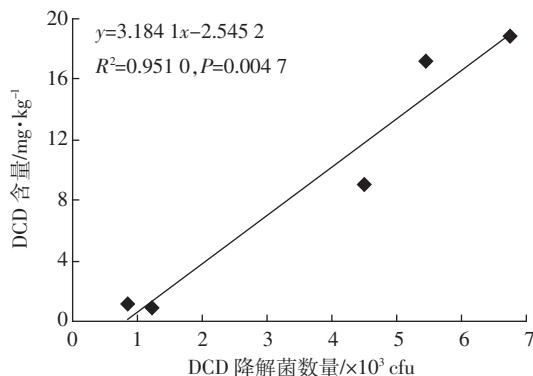


图 4 DCD 降解菌数量与 DCD 降解的关系

Figure 4 The relationship between dicyandiamide degradation and degrading microorganism count in soil cultivation

2.4 外源 DCD 降解真菌对 DCD 降解的影响

通过 DCD 选择培养基,从试验土壤中分离纯化出对 DCD 降解能力较强的真菌菌株作为外源 DCD 降解真菌。在灭菌土壤中添加 5 mL 外源 DCD 降解真菌培养 15 d 后,U+DCD+DCD 降解菌处理中降解菌数量为 36.40×10^5 cfu,表明在无其他杂菌影响下,外源 DCD 降解菌可在以 DCD 和尿素为氮源的土壤中定殖。图 5 显示,U+DCD 和 U+DCD+DCD 降解菌处理的 DCD 含量分别为 $9.51 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $8.07 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,相差 $1.44 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,差异达极显著水平,这表明灭菌土壤中定殖的外源 DCD 降解菌有助于土壤中 DCD 的降解。

3 讨论

DCD 配施可延缓土壤中的铵态氮向硝态氮的转

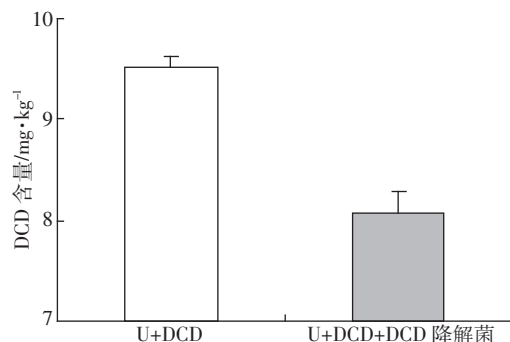


图 5 外源 DCD 降解真菌对 DCD 降解的影响

Figure 5 The effect of exogenous degrading fungi on dicyandiamide degradation

化^[6],但 DCD 抑制硝化作用只是暂时的,一旦施入土壤中,DCD 最终都将被降解成 H_2O 、 CO_2 和 NH_4^+ ^[17]。DCD 降解势必影响其硝化抑制效果^[13, 18],而 DCD 是以何种途径降解的?早期 Bronson 等^[19]研究认为 DCD 是通过物理化学过程降解,DCD 矿化的速度随着温度的升高而加快。而 Rajbanshi 等^[20]的试验结果表明,DCD 的降解是土壤微生物作用而不是简单的物理化学过程,土壤微生物降解 DCD 是由降解菌产生的胞外酶酶解作用引起的^[21]。至今关于 DCD 降解途径仍尚无定论,但至少可知,土壤微生物影响着土壤中 DCD 的降解进程。本研究表明,土壤中 DCD 的降解规律符合一级动力学方程,土壤微生物影响着土壤中 DCD 的降解进程,不同形态氮素也影响着土壤中 DCD 降解菌的数量和 DCD 的降解,但不同氮素是如何影响着 DCD 降解菌的生长以及 DCD 的降解还需进一步深化研究,以便在生产实际中使 DCD 更好地与氮肥配施,充分发挥其良好的作用。

关于 DCD 降解菌的研究,Hallinger 和 Schwarzer 等也从土壤中分离到 DCD 降解细菌 *Pseudomonas* sp. 和 *Rhodococcus* sp.,这两个菌株的降解途径各异。菌株 *Rhodococcus* sp. 对 DCD 的降解产物有 3 种,而 *Pseudomonas* sp. 的降解产物有 2 种^[15, 21],但这些研究均为微生物纯培养研究。本研究认为,土壤中不仅存在 DCD 降解细菌,同时也存在 DCD 降解真菌。从土壤中分离纯化得到的 DCD 降解真菌,经摇瓶大量培养后添加到含 DCD 的土壤中,可在土壤中定殖并加速土壤中 DCD 的降解。但本研究并未确定降解菌的具体菌种并深化降解途径的研究。菜地配施 DCD 能显著降低菜体硝酸盐含量^[6-8],若 DCD 降解菌数量大,则会降低硝化抑制效果,如果 DCD 降解菌数量少,则 DCD 可能在农田富集。因此,DCD 降解菌具有双重作用,如何根据生产实际来调控 DCD 降解菌数量还有待深入地系统研究。

4 结论

综上所述,土壤中 DCD 降解符合一级动力学方程,DCD 降解菌数量与 DCD 含量显著相关,外源 DCD 降解菌的定殖加速土壤中 DCD 的降解,这表明土壤中 DCD 降解与 DCD 降解菌关系极为密切。

参考文献:

[1] 何 盈,蔡顺香,何春梅,等.蔬菜硝酸盐累积的主要影响因子及其

- 防治对策研究现状[J]. 福建农业学报, 2007, 22(1): 100–105.
- HE Ying, CAI Shun-xiang, HE Chun-mei, et al. Current status on the study of the nitrate accumulation in vegetables and its control[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2007, 22(1): 100–105.
- [2] 罗涛, 王煌平, 张青, 等. 菠菜硝酸盐含量符合安全生产的氮肥用量研究[J]. 植物营养与肥料科学, 2010, 16(5): 1282–1287.
- LUO Tao, WANG Huang-ping, ZHANG Qing, et al. Effects of nitrogen fertilization on nitrate content of spinach under the production safety standard[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2010, 16(5): 1282–1287.
- [3] 张万杰, 李志芳, 张庆忠, 等. 生物质炭和氮肥配施对菠菜产量和硝酸盐含量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(10): 1946–1952.
- ZHANG Wan-jie, LI Zhi-fang, ZHANG Qing-zhong, et al. Impacts of biochar and nitrogen fertilizer on spinach yield and tissue nitrate content from a pot experiment[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(10): 1946–1952.
- [4] 武志杰, 史云峰, 陈利军. 硝化抑制作用机理研究进展[J]. 土壤通报, 2008, 39(4): 962–970.
- WU Zhi-jie, SHI Yun-feng, CHEN Li-jun. Research progress of the mechanisms of nitrification inhibition[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2008, 39(4): 962–970.
- [5] 孙志梅, 武志杰, 陈利军, 等. 土壤硝化作用的抑制剂调控及其机理[J]. 应用生态学报, 2008, 19(6): 1389–1395.
- SUN Zhi-mei, WU Zhi-jie, CHEN Li-jun, et al. Regulation of soil nitrification with nitrification inhibitors and related mechanisms[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(6): 1389–1395.
- [6] 罗涛, 王煌平, 何盈, 等. 两种氮肥不同用量及添加双氰胺对蔬菜品质和土壤氮形态的影响[J]. 土壤通报, 2010, 41(2): 383–388.
- LUO Tao, WANG Huang-ping, HE Ying, et al. Effects of different dosage of two nitrogenous fertilizers and dicyandiamide on vegetable quality and soil N form[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2010, 41(2): 383–388.
- [7] 项琳琳, 赵牧秋, 王俊, 等. 双氰胺对设施菜地土壤硝酸盐淋溶和苦苣硝酸盐累积的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(9): 1965–1969.
- XIANG Lin-lin, ZHAO Mu-qiu, WANG Jun, et al. Effects of dicyandiamide on soil nitrate leaching and nitrate accumulation in chicory under protected cultivation[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(9): 1965–1969.
- [8] 串丽敏, 赵同科, 安志装, 等. 添加硝化抑制剂双氰胺对油菜生长及品质的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(5): 870–874.
- CHUAN Li-min, ZHAO Tong-ke, AN Zhi-zhuang, et al. Effects of adding a nitrification inhibitor dicyandiamide(DCD) on the growth and quality of rape[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(5): 870–874.
- [9] Cui Min, Sun Xue-cheng, Hu Cheng-xiao, et al. Effective mitigation of nitrate leaching and nitrous oxide emissions in intensive vegetable production systems using a nitrification inhibitor, dicyandiamide[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(5): 722–730.
- [10] O'Connora P J, Hennessy D, Brophy C, et al. The effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide(DCD) on herbage production when applied at different times and rates in the autumn and winter[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2012, 152(1): 79–89.
- [11] Rajbanshi S S, Benckiser G, Ottow J C G. Effects of concentration, incubation temperature, and repeated applications on degradation kinetics of dicyandiamide(DCD) in model experiments with a silt loam soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1992, 13(2): 61–64.
- [12] Kelliher F M, Clough T J, Clark H, et al. The temperature dependence of dicyandiamide(DCD) degradation in soils: A data synthesis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(7): 1878–1882.
- [13] Mohanty S R, Bharati K, Rao V R, et al. Dynamics of changes in methanogenesis and associated microflora in a flooded alluvial soil following repeated application of dicyandiamide, a nitrification inhibitor[J]. *Microbiological Research*, 2009, 164(1): 71–80.
- [14] Hauser M, Haselwandter K. Degradation of dicyandiamide by soil bacteria[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1990, 22(1): 113–114.
- [15] Hallinger S, Wallnöfer P R, Goldbach H, et al. Several aspects of bacterial dicyandiamide degradation[J]. *Naturwissenschaften*, 1990, 77(7): 332–334.
- [16] Zaman M, Saggar S, Blennerhassett J D, et al. Effect of urease and nitrification inhibitors on N transformation, gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, pasture yield and N uptake in grazed pasture system[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41: 1270–1280.
- [17] Klein C A M, Cameron K C, Di H J, et al. Repeated annual use of the nitrification inhibitor dicyandiamide(DCD) does not alter its effectiveness in reducing N_2O emissions from cow urine[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2011, 166: 480–491.
- [18] Mahmood T, Ali R, Latif Z, et al. Dicyandiamide increases the fertilizer N loss from an alkaline calcareous soil treated with ^{15}N -labelled urea under warm climate and under different crops[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47: 619–631.
- [19] Bronson K F, Touchton J T, Hauck R D. Decomposition rate of dicyandiamide and nitrification inhibition[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1989, 20: 19–20.
- [20] Rajbanshi S S, Benckiser G, Ottow J C G. Mineralization kinetics and utilization as an N source of dicyandiamide(DCD) in soil[J]. *Naturwissenschaften*, 1992, 79: 26–27.
- [21] Schwarzer C, Haselwandter K. Enzymatic degradation of the nitrification inhibitor dicyandiamide by a soil bacterium[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1991, 23(3): 309–310.