

生物炭对设施退化土壤氮相关功能微生物群落丰度的影响*

王晓辉^{1,3} 郭光霞¹ 郑瑞伦¹ 钟 敏¹ 朱永官^{1, 2†}

(1 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

(2 中国科学院城市环境研究所, 厦门 361021)

(3 中国科学院大学, 北京 100049)

EFFECT OF BIOCHAR ON ABUNDANCE OF N-RELATED FUNCTIONAL MICROBIAL COMMUNITIES IN DEGRADED GREENHOUSE SOIL

Wang Xiaohui^{1,3} Guo Guangxia¹ Zheng Ruilun¹ Zhong Min¹ Zhu Yongguan^{1,2†}

(1 Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

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

(3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

关键词 生物炭; 设施栽培土壤; 硝化作用; 反硝化作用

中图分类号 S154.36 文献标识码 A

设施栽培土壤在人工调控下进行生产, 长期处在高温高湿、无降水淋洗、高复种指数、持续大量施肥等特殊环境条件下, 它的物理结构和生化性状产生很大变化。菜农因传统施肥经验而形成的盲目大量施肥行为造成氮肥的过量摄入, 从而愈加加重了土壤表层养分富集、酸化板结、养分失调等, 继而导致蔬菜品质严重下降, 在部分种植年限较长的大棚已不能进行蔬菜生产, 严重制约了各地区设施农业的可持续发展^[1]。而长期过量的施用氮肥还会使设施土壤中硝态氮含量升高, 减少土壤中的硝化微生物菌群的丰度, 提高反硝化微生物的活性, 促进 N₂O 的排放通量^[2]。因此, 为了保证设施栽培产业能够健康、可持续地发展, 使蔬菜生产向高产、高效、优质的方向发展, 对设施土壤氮循环的研究已迫在眉睫。

生物炭 (biochar), 一般指生物质在缺氧和相对“较低” (< 700 °C) 温度条件下热解而形成的固体产物^[3]。生物炭可溶性极低, 一般显碱性, 具有高度羧酸酯化和芳香化结构, 拥有较大的孔隙度和比表

面积, 这些基本性质使其具有减缓土壤酸化、减少土壤中无机态氮的淋溶及为土壤微生物提供营养元素和栖居场所的潜能^[4-5]。目前, 关于生物炭与氮循环的研究显示生物炭可以增加土壤全氮^[6]、增强土壤生物固氮能力^[7]、减少铵态氮的淋溶和减少田间 N₂O 的排放^[8]、增强森林土壤的硝化速率和氨氧化细菌的丰度^[9]。然而, 关于氮循环微生物对生物炭的分子响应机制的研究还鲜有报道。本试验试图研究生物炭对典型设施土壤及蔬菜品质的改良作用, 及其对设施土壤中微生物群落丰度 (硝化和反硝化微生物) 的影响, 旨在为生物炭改良设施土壤、实现设施栽培蔬菜的优质高产和设施土壤的可持续利用提供理论基础和生态风险评价依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤是采自安徽省和县某蔬菜基地 (31°50'N, 118°28'E) 设施栽培土壤的耕层土。该地区属亚热带

* 国家自然科学基金项目 (41090284) 资助

† 通讯作者, E-mail: ygzhu@rcees.ac.cn

作者简介: 王晓辉 (1986—), 男, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事生物炭对设施土壤氮循环的研究。E-mail: wangxiaohui_86@126.com

收稿日期: 2012-09-18; 收到修改稿日期: 2012-12-04

湿润型季风气候区,平均降水量 1 067 mm,年平均温度 15.8℃。土壤经风干、磨碎、过 2 mm 筛后备用。土壤的基本理化性质如下:pH 4.70,有效磷 118 mg kg⁻¹,硝态氮 520 mg kg⁻¹,铵态氮 63.6 mg kg⁻¹,砂粒、粉粒和黏粒的比例分别为 10.3%、78.7% 和 11.0%,属粉壤土。与露地土壤相比(pH 7.00),设施土壤的 pH 已经降到了 4.70,酸化现象非常严重。

1.2 生物炭

本试验选用两种生物炭,原材料分别为水稻秸秆和市政污泥,均取自福建省厦门市。将风干的秸秆和市政污泥放入智能化快速升温裂解炉(Iso-temp, Fisher Scientific, 美国)中,在通氮气的厌氧条件下分别升温至 500℃(秸秆)和 700℃(污泥)后炭化 4 h,冷却至室温后取出,制成秸秆生物炭和污泥生物炭。将制备好的生物炭经研磨、过 2 mm 筛后备用。生物炭的基本性状见表 1。

表 1 生物炭的基本特征

	pH	全氮 (g kg ⁻¹)	全碳 (g kg ⁻¹)	C/N	比表面积 (m ² g ⁻¹)	平均孔径 (nm)
污泥生物炭	7.62	15.7	221	14.0	38.2	11.0
秸秆生物炭	10.5	16.6	478	28.8	12.0	5.18

1.3 试验处理

试验在中国科学院生态环境研究中心的温室内利用盆栽培养的方式进行,自然光照射,温度 16~25℃,相对湿度 70%。试验共设 6 个处理,其中三个处理不种植油菜:对照土壤(S-P)、添加污泥生物炭(SS-P)、添加秸秆生物炭(SR-P);另三个处理种植油菜:对照土壤(S+P)、添加污泥生物炭(SS+P)、添加秸秆生物炭(SR+P),每个处理 4 次重复,每盆装 400 g 土壤。本试验不施 NPK 基肥,将准备好的生物炭按 5% 的质量比加入土壤并混合均匀,浇灌去离子水使得土壤含水率为 20%,陈化培养 1 周后,处理 S+P、SS+P 和 SR+P 中每盆播种 4 颗油菜种子,出苗后间苗至 2 棵。油菜于 2011 年 10 月 6 日播种,2011 年 11 月 19 日收获,生长时间为 45 d。油菜收获的同时采集土样。不种油菜的处理在培养 45 天后采集土样。

1.4 植株和土壤的分析

油菜地上部收获后用去离子水冲洗干净,一部分于 80℃ 下 48 h 烘干后称重,另一部分新鲜植株用来测定其体内的氮形态。硝态氮和铵态氮的测定采用研磨抽取法^[10]:准确称取 5.00 g 新鲜植株放入

研钵中,加 1.0 ml 30% 的三氯乙酸和少量石英砂(约 0.50 g),研磨至匀浆,用 29.0 ml 蒸馏水准确地转移至 50 ml 离心管中,以 4 000 r min⁻¹ 的速度离心 10 min,吸取上清液 2.0 ml,定容至 100 ml,保存在 4℃ 冰箱待测。亚硝酸盐含量依据食品安全国家标准^[11]测定。

油菜收获后,立即将花盆中的土壤充分混匀,去除植物根系,一部分鲜土保存于 -80℃,用于提取土壤 DNA,另一部分鲜土保存于 4℃,用于氮形态、硝化潜势和反硝化潜势的测定,其余土样风干后过 10 目筛用于测定土壤 pH、过 100 目筛用于测定全碳和全氮。土壤 pH 按水土质量比 2.5:1 浸提后,用 pH 计(Delta 320, Mettler-Toledo Instruments Co., 中国)测定。土壤中硝态氮和铵态氮利用 2 mol L⁻¹ KCl 按水土质量比 5:1 进行浸提。土壤和植物浸提液中的硝态氮和铵态氮浓度采用连续流动分析仪(SAN⁺⁺, Skalar, 荷兰)进行测定。土壤的全碳及全氮含量采用元素分析仪(FlashEA1112, ThermoFinnigan, 意大利)进行测定。土壤的硝化潜势根据修订的 Kurola 方法^[12]测定,反硝化潜势利用乙炔(C₂H₂)抑制法^[13]进行测定。

1.5 土壤 DNA 提取

用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil(MP Biomedicals, 美国)提取土壤 DNA,操作步骤按照试剂盒操作说明进行。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 片段大小,并用超微量紫外分光光度计(ND-1000, NanoDrop Technologies, 美国)测定 DNA 浓度及质量。

1.6 荧光实时定量 PCR 分析

本试验选取古菌和细菌的 16S rRNA 基因、氨氧化古菌和氨氧化细菌的氨单加氧酶(*amoA*)基因、亚硝酸盐还原酶(*nirK*、*nirS*)基因和一氧化二氮还原酶(*nosZ*)基因进行定量分析,反应在定量 PCR 仪 iCycler iQ5 (Bio-Rad, 美国)仪器上进行。细菌 16S rRNA 基因的定量分析采用 TaqMan 探针法^[12],反应体系为 25 μl,其中包含 12.5 μl Premix Ex Taq[™] (TaKaRa, 日本),0.5 μl Taqman 探针(3 μmol L⁻¹, TaKaRa, 日本),1 μl DNA 模板,前后引物(10 μmol L⁻¹)各 0.5 μl。其余基因的反应体系均按 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa, 日本)说明书操作。质粒及标准曲线的制备参照文献^[13]。各基因定量 PCR 分析所用的引物和探针及反应条件见表 2。

表 2 荧光实时定量 PCR 扩增引物和探针及反应条件

目的基因	引物和探针	引物序列(5'→3') ²⁾	定量 PCR 反应程序	参考文献
Bacterial 16S rRNA	1369F	CGGTGAATACGTTTCYCGG	95℃ 预变性 10 s, 95℃ 变性 15 s, 56℃ 退火 1 min, 35 个循环	[12]
	1492R	GGWTACCTTGTTACGACTT		
	TM1389F	CTTGACACACCGCCCGTC		
Archaeal 16S rRNA	A364aF	CGGGGYGCASCAGGCGCGAA	94℃ 预变性 30 s, 94℃ 变性 20 s, 63℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环	[14]
	Ar958R	YCCGGCGTTGAVTCCAATT		
AOA ¹⁾	Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 10 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环	[12]
	Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT		
AOB ¹⁾	amoA-1F	GGGTTTCTACTGGTGTT	94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 68℃ 延伸 30 s, 40 个循环	[12]
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
<i>nirK</i>	1F	GGMATGGTKCCSTGGCA	95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 30 s, 34 个循环	[13]
	5R	GCCTCGATCAGRTRTGTGT		
<i>nirS</i>	cd3aF	GTSAAAGTSAAGGARACSGG	94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ ~ 53℃ (前 5 个循环每循环降低 1℃) 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环	[13]
	R3cd	GASTTCGGRTGSGCTCTGA		
<i>nosZ</i>	F	CGYTGTTCMTGACAGCCAG	94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ ~ 53℃ (前 5 个循环每循环降低 1℃) 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环	[13]
	1622R	CGRASGGCAASAAGGTSCG		

1) AOA-氨氧化古菌, AOB-氨氧化细菌。2) Y = C 或 T; M = A 或 G; W = A 或 T; R = A 或 G; K = G 或 T; S = C 或 G

1.7 数据处理

试验数据使用 SPSS 19.0 (IBM Co., Armonk, NY, 美国) 进行统计分析, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA, $n = 4, p < 0.05$) 和 SNK (Student-Newman-Keuls) 多重比较检验各处理间的差异显著性 ($p < 0.05$)。相关性分析采用 Pearson 相关分析法进行双尾检验确定显著性 ($n = 24, p < 0.05$)。

2 结果

2.1 土壤化学性质的变化

生物炭的添加显著影响了土壤的化学性质 (表 3)。与对照相比, 两种生物炭的添加均显著提高了设施栽培土壤的 pH, 其变化范围为 4.71 ~ 6.78, 表

表 3 各处理土壤的化学性质变化

处理	pH	全氮 (g kg ⁻¹)	全碳 (g kg ⁻¹)	C/N	硝态氮 (mg kg ⁻¹)	铵态氮 (mg kg ⁻¹)
S-P	4.71 ± 0.02 f*	2.1 ± 0.1 c	15.6 ± 0.2 c	7.52 ± 0.07 d	258 ± 11 a	5.70 ± 0.25 c
S + P	4.91 ± 0.01 e	2.0 ± 0.1 c	16.6 ± 0.1 c	8.49 ± 0.01 c	20.3 ± 0.6 b	14.6 ± 0.3 a
SS-P	5.26 ± 0.01 d	2.9 ± 0.1 a	25.7 ± 0.5 b	8.97 ± 0.17 c	256 ± 4 a	4.42 ± 0.30 d
SS + P	5.40 ± 0.02 c	2.6 ± 0.1 b	26.3 ± 1.1 b	10.0 ± 0.2 b	24.5 ± 0.6 b	11.5 ± 0.3 b
SR-P	6.47 ± 0.02 b	2.8 ± 0.1 a	39.5 ± 2.0 a	14.3 ± 0.5 a	231 ± 9 a	5.33 ± 0.34 c
SR + P	6.78 ± 0.02 a	2.6 ± 0.1 b	40.1 ± 1.5 a	15.1 ± 0.4 a	21.4 ± 0.7 b	5.52 ± 0.33 c

注: * 表中值为平均值 ± 标准误 ($n = 4$), 同一列值后随相同字母表示在 $p < 0.05$ 时不显著。下同

明生物炭具有减缓土壤酸化的潜能。种植油菜的土壤 pH 整体高于不种植油菜的土壤, 说明油菜生长也会影响设施土壤的 pH。此外, 添加生物炭还可以显著提高土壤的全氮、全碳与碳氮比 (C/N), 分别提高 30.0% ~ 38.1%、58.4% ~ 141.6% 和 17.9% ~ 89.6%。添加生物炭后土壤中的硝态氮含量并无显

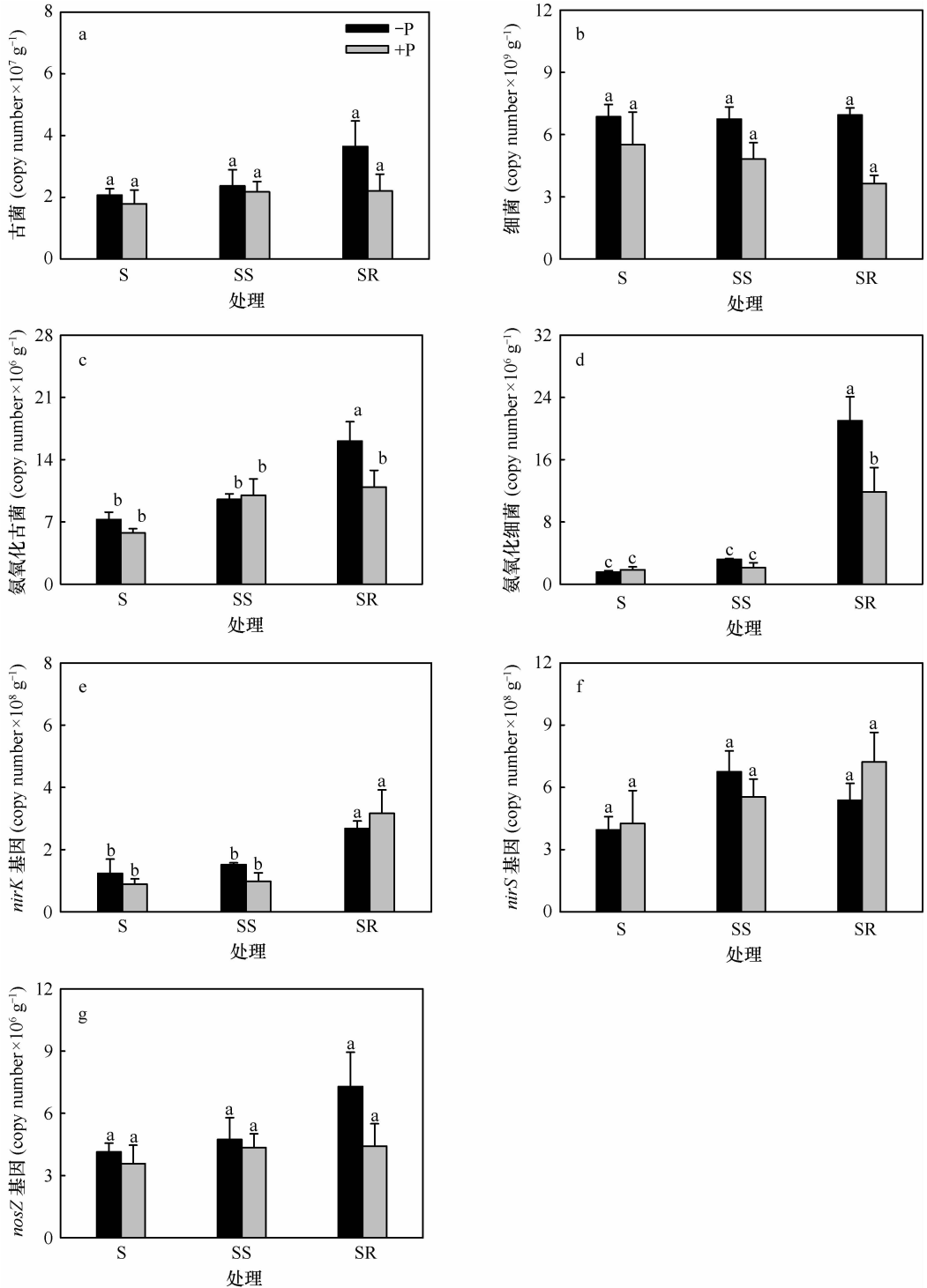
著变化, 而铵态氮含量在添加生物炭之后 (除处理 SR-P 外) 显著下降。

2.2 基因丰度的变化

添加生物炭显著影响了土壤中的氮循环相关功能微生物的基因丰度。与对照相比, 添加稻秆生物炭显著增加了土壤中的氨氧化古菌的绝对丰度,

显著增加氨氧化细菌和 *nirK* 基因的绝对丰度和相对丰度,并没有显著影响土壤中的古菌和细菌 16S rRNA 基因, *nirS* 基因(除处理 SR + P 外)与 *nosZ* 基因的丰度(图 1),降低了土壤中的氨氧化古菌/氨氧

化细菌(AOA/AOB)的比例,但提高了 *nirK/nirS* 及 (*nirK + nirS*)/*nosZ* 的比例(表 4)。添加污泥生物炭并没有引起土壤中氮循环相关功能基因绝对丰度与相对丰度的变化(图 1),也没有显著改变土壤



注: 图中值为平均值 \pm 标准误 ($n=4$); 图中不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同

图 1 不同处理的温室土壤中古菌和细菌、氨氧化古菌和氨氧化细菌、*nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因型反硝化细菌的拷贝数

中的 AOA/AOB、*nirK/nirS* 及 (*nirK + nirS*)/*nosZ* 的比例(表 4)。

相关性分析可知, AOA 与 AOB 拷贝数与土壤 pH、全氮、全碳和碳氮比显著正相关, AOA/AOB 与土壤 pH、全氮、全碳和碳氮比显著负相关, AOA、AOB 及 AOA/AOB 均与土壤中的硝态氮和铵态氮含量不相关(表 5)。*nirK* 基因拷贝数与土壤 pH、全碳和碳氮比显著正相关, 与土壤中铵态氮含量显著负相关, 与土壤全氮和硝态氮含量不相关; *nirS* 和

nosZ 基因拷贝数与土壤 pH、全氮、全碳、碳氮比及硝态氮与铵态氮含量并没有显著相关性。同时, *nirK/nirS* 与土壤 pH、全碳和碳氮比显著正相关, 与土壤中铵态氮含量显著负相关, 而 (*nirK + nirS*)/*nosZ* 与土壤 pH 和碳氮比显著正相关, 与土壤中硝态氮含量显著负相关(表 5)。这说明生物炭可以通过改善土壤 pH、全氮、全碳和碳氮比, 继而引起相关功能基因丰度的变化, 从而来调节土壤中氮素形态与含量的变化, 以此改善设施土壤的生产力。

表 4 不同处理的温室土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌的 *amoA*、*nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因的相对丰度

处理	AOA/AOB	<i>nirK/nirS</i>	(<i>nirK + nirS</i>)/ <i>nosZ</i>	相对丰度(16S rRNA 拷贝数的百分数)				
				AOA	AOB	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZ</i>
S-P	0.48 ± 0.02 a	0.30 ± 0.13 b	125 ± 20 b	4.03 ± 0.31 a	0.02 ± 0.00 b	1.74 ± 0.54 c	5.82 ± 0.86 b	0.06 ± 0.00 a
S + P	0.45 ± 0.09 a	0.40 ± 0.04 b	138 ± 19 b	4.36 ± 0.49 a	0.02 ± 0.00 b	1.51 ± 0.35 c	5.79 ± 0.72 b	0.06 ± 0.01 a
SS-P	0.24 ± 0.06 b	0.18 ± 0.09 ab	130 ± 13 b	4.18 ± 0.67 a	0.06 ± 0.01 b	1.75 ± 0.33 c	10.8 ± 1.4 ab	0.07 ± 0.01 a
SS + P	0.42 ± 0.10 a	0.19 ± 0.09 ab	152 ± 18 b	4.55 ± 0.52 a	0.05 ± 0.01 b	1.98 ± 0.27 c	11.8 ± 1.5 ab	0.09 ± 0.01 a
SR-P	0.13 ± 0.05 c	0.52 ± 0.11 a	123 ± 26 b	5.85 ± 0.34 a	0.29 ± 0.03 a	3.92 ± 0.48 b	7.86 ± 1.35 b	0.08 ± 0.00 a
SR + P	0.09 ± 0.01 c	0.44 ± 0.04 a	268 ± 27 a	4.62 ± 0.39 a	0.25 ± 0.05 a	6.48 ± 0.11 a	14.3 ± 2.1 a	0.10 ± 0.02 a

表 5 土壤氮循环相关功能基因、硝化潜势和反硝化潜势与土壤性质的相关分析

	pH	硝态氮	铵态氮	全碳	全氮	C/N
AOA	0.631 **	0.191	-0.396	0.755 **	0.587 **	0.721 **
AOB	0.781 **	0.030	-0.390	0.834 **	0.564 **	0.841 **
AOA/AOB	-0.876 **	0.179	0.383	-0.800 **	-0.465 *	-0.854 **
<i>nirK</i>	0.746 **	0.100	-0.588 **	0.691 **	0.397	0.743 **
<i>nirS</i>	0.345	-0.065	-0.279	0.252	0.377	0.233
<i>nirK/nirS</i>	0.639 **	0.261	-0.489 *	0.595 **	0.201	0.683 **
<i>nosZ</i>	0.320	0.236	-0.311	0.361	0.346	0.352
(<i>nirK + nirS</i>)/ <i>nosZ</i>	0.520 *	-0.448 *	-0.139	0.398	0.123	0.474 *
硝化潜势	0.957 **	-0.078	-0.544 **	0.908 **	0.506 *	0.928 **
反硝化潜势	0.498 *	-0.793 **	0.157	0.319	-0.002	0.417

注: * 和 ** 分别表示显著 ($p < 0.05$) 和极显著 ($p < 0.01$) 相关

2.3 硝化潜势与反硝化潜势

与对照土壤相比, 添加污泥生物炭和稻秆生物炭后土壤的硝化潜势(除处理 SS + P 外)均显著提高, 同时添加稻秆生物炭比添加污泥生物炭有更显著的提高效果, 并且添加稻秆生物炭后种植油菜的处理具有最高的硝化潜势(图 2a)。与对照土壤相比, 添加两种生物炭后土壤的反硝化潜势仅处理 SR + P 会显著增高, 其余处理均不会产生显著的变化, 并且种植油菜的土壤的反硝化潜势整体高于不种植油菜的土壤的反硝化潜势(图 2b)。

生物炭能够有效改善土壤的化学特性(pH、全氮、全碳和碳氮比等), 而土壤化学特性又会在很大程度上影响土壤中的微生物丰度, 继而影响硝化潜势与反硝化潜势。相关性分析表明, 硝化潜势与 pH、全碳、全氮和 C/N 显著正相关, 与铵态氮含量显著负相关; 反硝化潜势仅与土壤 pH 显著正相关, 与硝态氮含量显著负相关(表 5)。同时, 硝化潜势与氨氧化细菌的相对丰度显著正相关, 并且与 AOA/AOB 显著负相关; 反硝化潜势与 *nirK*、*nirS* 与 *nosZ* 基因的相对丰度及 (*nirK + nirS*)/*nosZ* 显著正相关(表 6)。

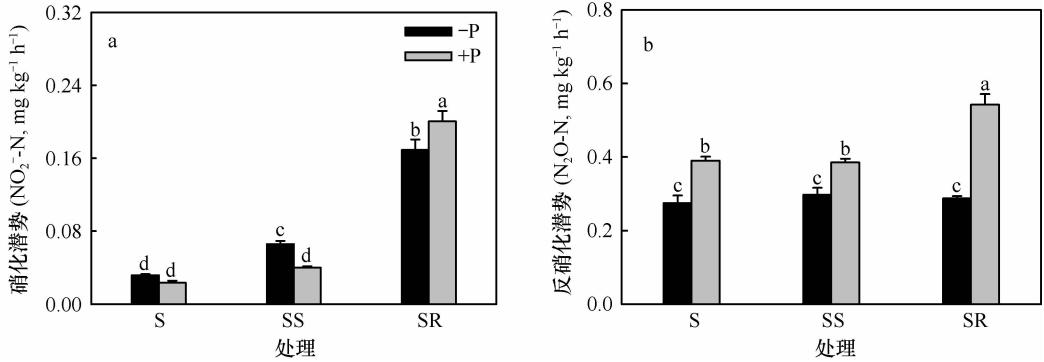


图2 不同处理的温室土壤硝化潜势与反硝化潜势

表6 硝化潜势和反硝化潜势与土壤氮循环相关功能基因丰度间的相关分析

	AOA 的 相对丰度	AOB 的 相对丰度	AOA/AOB	<i>nirK</i> 的 相对丰度	<i>nirS</i> 的 相对丰度	<i>nosZ</i> 的 相对丰度	<i>nirK/nirS</i>	(<i>nirK</i> + <i>nirS</i>)/ <i>nosZ</i>
硝化潜势	0.318	0.911 **	-0.894 **	—	—	—	—	—
反硝化潜势	—	—	—	0.629 **	0.533 **	0.454 *	0.005	0.645 **

2.4 植株生长量与体内硝酸盐、亚硝酸盐含量的变化

添加生物炭并没有提高油菜的产量,但是减少了油菜体内的硝酸盐与亚硝酸盐含量,提高了蔬菜的品质。与对照相比,两种生物炭的添加均没有显著改变油菜的产量及其体内全氮、全碳的含量和碳氮比(表7),但显著降低了植株体内累积的硝酸盐

含量,降幅为20.0%~33.1%。与污泥生物炭相比,稻秆生物炭对减少油菜体内累积的硝酸盐含量有更明显的效果,其效果约是污泥生物炭的1.65倍。此外,与对照相比,添加稻秆生物炭可以明显降低油菜体内累积的亚硝酸盐含量,降幅为16.7%,而添加污泥生物炭则显著减少了油菜体内累积的铵态氮盐含量,减少量为23.5%。

表7 不同处理下油菜地上部生物量及其体内无机氮含量

处理	生物量 (g pot ⁻¹ , DW)	全氮 (g kg ⁻¹)	全碳 (g kg ⁻¹)	C/N	NO ₂ ⁻ -N (NaNO ₂ , mg kg ⁻¹ , FW)	NO ₃ ⁻ -N (mg kg ⁻¹ , FW)	NH ₄ ⁺ -N (mg kg ⁻¹ , FW)
S	2.05 ± 0.03 a	57.1 ± 2.4 a	348 ± 10 a	5.94 ± 0.36 a	2.33 ± 0.09 a	719 ± 5 a	89.1 ± 4.0 a
SS	2.06 ± 0.02 a	48.4 ± 2.2 a	368 ± 2 a	7.65 ± 0.41 a	2.29 ± 0.09 a	575 ± 17 b	68.2 ± 1.1 b
SR	1.92 ± 0.07 a	49.7 ± 3.6 a	359 ± 6 a	7.35 ± 0.57 a	1.94 ± 0.07 b	481 ± 35 c	80.4 ± 3.1 a

3 讨论

添加生物炭显著提高了氨氧化古菌和氨氧化细菌群落的丰度,这可能是因为生物炭的孔隙结构及水肥吸附作用使其成为土壤微生物的良好栖息环境,为土壤有益微生物提供保护,促进土壤中的氮循环相关功能微生物的繁殖^[15];同时,已有报道表明^[9,12,16],氨氧化古菌和氨氧化细菌的丰度与土壤pH具有显著相关性,而本文中添加生物炭提高了土壤pH,进而引起土壤中氨氧化古菌和氨氧化细菌的丰度变化,这也再次表明土壤pH对氨氧化古

菌和氨氧化细菌的丰度变化发挥着重要作用。硝化潜势与土壤pH和氨氧化细菌的丰度显著正相关,这是由于生物炭添加可以提高酸性设施土壤的pH,继而增加土壤中氨氧化细菌的丰度,从而增强土壤的硝化潜势。Katyal等^[17]研究显示pH为4.6~5.1的土壤的硝化作用不明显,pH为5.8~6.0的土壤的硝化作用缓慢进行,pH为6.4~8.3的土壤的硝化作用才强烈进行。Ball等研究显示生物炭的添加可以增加酸性森林土壤的氨氧化细菌的丰度,从而增强土壤的硝化速率^[9],这与本研究相契合。Di等^[18]的研究发现,高氮素酸性草原土壤的氨氧化过程是由氨氧化细菌而不是由氨氧化古菌驱动

的。Jia 和 Conrad^[19]的研究也表明氨氧化细菌是农田土壤氨氧化过程的主要作用者。这些研究均说明在高氮素摄入的生态系统中,氨氧化细菌是氨氧化过程的主要驱动者。添加生物炭降低了 AOA/AOB 的比例,这表明添加生物炭更容易刺激氨氧化细菌的丰度变化。在酸性设施土壤的氨氧化过程中,氨氧化细菌很可能发挥更重要作用,需要开展 AOA 和 AOB 群落结构变化的研究来进一步验证。

生物炭的添加显著提高了 *nirK* 基因的丰度,并没有显著影响土壤中的 *nirS* 与 *nosZ* 基因的丰度,这是因为 *nirK* 基因拷贝数与土壤 pH 显著正相关,而 *nirS* 与 *nosZ* 基因的拷贝数与土壤 pH 并没有显著相关性^[20],添加生物炭提高了土壤 pH,进而引起土壤中的 *nirK* 基因型反硝化细菌的丰度变化,这表明土壤 pH 对 *nirK* 基因型反硝化细菌的丰度变化发挥着重要作用。土壤的 pH 与硝态氮含量影响土壤的反硝化过程,在一定范围内提高土壤的 pH 可以增强反硝化酶活性,过高硝态氮含量抑制反硝化酶活性^[21]。生物炭的添加提高土壤的 pH,同时种植油菜吸收土壤的硝态氮,导致土壤的硝态氮含量降低,继而引起土壤的反硝化速率增加,因此,种植油菜的土壤的反硝化潜势整体高于不种植油菜的土壤的反硝化潜势。我们的研究表明,反硝化潜势与 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因的相对丰度显著正相关,而添加生物炭仅能增加土壤中的 *nirK* 基因的丰度,却没有明显影响 *nirS* 与 *nosZ* 基因的丰度,同时土壤的反硝化潜势无显著差异,这表明 *nirS* 与 *nosZ* 基因在酸性设施土壤的反硝化作用中发挥更重要作用。先前的研究显示反硝化酶活性与 *nirS* 基因^[22]与 *nosZ* 基因^[23]的拷贝数显著正相关,这表明带有这些功能基因的反硝化细菌在反硝化过程中发挥重要作用,同时反硝化菌群的丰度可以预测相应的进程^[23]。

在油菜幼苗生长期,添加生物炭并没有显著影响油菜的生物量,但能够减少油菜体内累积的硝酸盐与亚硝酸盐含量,从而提高蔬菜的品质。生物炭的添加没有显著影响油菜产量的原因可能是由于生物炭具有很高的 pH 和碳氮比以及部分生物炭分解导致氮的固定,降低了土壤的有效氮,限制了植株对有效氮的吸收^[24]。硝态氮是蔬菜吸收的主要氮素形态。进入植物体的硝态氮必须经硝酸还原酶作用还原成氨,才能形成氨基酸和蛋白质,参与植物体的氮代谢过程。在氮素用量合适时,吸入的硝态氮会很快被还原转化。但在过量施用氮肥情

况下,蔬菜吸收的硝态氮不能及时还原,便累积在体内^[10]。生物炭的添加导致油菜体内累积的硝酸盐与亚硝酸盐含量减少的原因可能是生物炭可固定了土壤中的部分有效氮,从而在满足植株生长需求的同时降低植株体内硝态氮的累积量和进一步还原产生的亚硝态氮含量,最终降低油菜体内的硝酸盐与亚硝酸盐含量。

4 结 论

添加生物炭可以显著提高设施退化土壤的 pH,有效抑制设施土壤的酸化,提高土壤的全碳、全氮含量及 C/N。添加生物炭还可以显著增加土壤中氨氧化古菌与氨氧化细菌和 *nirK* 基因的丰度,提高土壤的硝化潜势,但对反硝化潜势的影响较小,未能达到显著的统计差异。同时,添加生物炭可以显著降低植物(油菜)体内的硝酸盐、亚硝酸盐的含量,提高设施栽培蔬菜的品质,改善农产品安全。在维持土壤生产力的前提下,添加生物炭能够在一定程度上调控土壤氮元素转化,减少氮肥的施入量及由此造成的土壤生产力下降等问题。

参 考 文 献

- [1] 杜新民, 吴忠红, 张永清, 等. 不同种植年限日光温室土壤盐分和养分变化研究. 水土保持学报, 2007, 21(2): 78—80
- [2] Hofstra N, Bouwman A F. Denitrification in agricultural soils: Summarizing published data and estimating global annual rates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2005, 72(3): 267—278
- [3] Lehmann J. Bio-energy in the black. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2007, 5(7): 381—387
- [4] Kramer R W, Kujawinski E B, Hatcher P G. Identification of black carbon derived structures in a volcanic ash soil humic acid by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(12): 3387—3395
- [5] Cornelissen G, Kukulka Z, Kalaitzidis S, et al. Relations between environmental black carbon sorption and geochemical sorbent characteristics. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(13): 3632—3640
- [6] Zhang A F, Bian R J, Pan G X, et al. Effects of biochar amendment on soil quality, crop yield and greenhouse gas emission in a Chinese rice paddy: A field study of 2 consecutive rice growing cycles. *Field Crops Research*, 2012, 127: 153—160
- [7] Rondon M A, Lehmann J, Ramirez J, et al. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with biochar additions. *Biology and Fertility of Soils*, 2007, 43(6): 699—708
- [8] Singh B P, Hatton B J, Singh B, et al. Influence of biochars on nitrous oxide emission and nitrogen leaching from two contrasting soils.

- Journal of Environmental Quality, 2010, 39(4): 1224—1235
- [9] Ball P N, MacKenzie M D, DeLuca T H, et al. Wildfire and charcoal enhance nitrification and ammonium-oxidizing bacterial abundance in dry montane forest soils. *Journal of Environment Quality*, 2010, 39(4): 1243
- [10] 王朝辉, 田霄鸿, 李生秀. 叶类蔬菜的硝态氮累积及成因研究. *生态学报*, 2001, 21(7): 1136—1141
- [11] 食品安全国家标准. 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定. 国家质检总局: GB 5009.33 - 2010, 2010 - 03 - 26
- [12] He J Z, Shen J P, Zhang L M, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364—2374
- [13] Guo G X, Deng H, Qiao M, et al. Effect of pyrene on denitrification activity and abundance and composition of denitrifying community in an agricultural soil. *Environ Pollut*, 2011, 159(7): 1886—1895
- [14] Kemnitz D, Kolb S, Conrad R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 60(3): 442—448
- [15] Steinbeiss S, Gleixner G, Antonietti M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(6): 1301—1310
- [16] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia -oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601—1611
- [17] Katyal J C, Carter M F, Vlek P L G. Nitrification activity in submerged soils and its relation to denitrification loss. *Biology and Fertility of Soils*, 1988, 7(1): 16—22
- [18] Di H J, Cameron K C, Shen J P, et al. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geosci*, 2009, 2(9): 621—624
- [19] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658—1671
- [20] Dandie C E, Wertz S, Leclair C L, et al. Abundance, diversity and functional gene expression of denitrifier communities in adjacent riparian and agricultural zones. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, 77(1): 69—82
- [21] Blanco-Jarvio A, Chavez-Lopez C, Luna-Guido M, et al. Denitrification in a chinampa soil of Mexico City as affected by methylparathion: A laboratory study. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(5): 271—278
- [22] Throback I N, Johansson M, Rosenquist M, et al. Silver (Ag^+) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 270(2): 189—194
- [23] Hallin S, Jones C M, Schloter M, et al. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *ISME Journal*, 2009, 3(5): 597—605
- [24] 张晗芝, 黄云, 刘钢, 等. 生物炭对玉米苗期生长、养分吸收及土壤化学性状的影响. *生态环境学报*, 2011, 19(11): 2713—2717

(责任编辑:汪叔生)