

DOI: 10.11766/trxb201901290650

秸秆直接还田与炭化还田对潮土硝化微生物的影响*

李培培 仝昊天 韩燕来[†] 姜 瑛 吴传发

(河南农业大学资源与环境学院, 郑州 450002)

摘 要 为比较秸秆直接还田和炭化还田对黄淮海平原小麦/玉米轮作体系典型潮土硝化作用及硝化微生物群落的影响, 设置 4 个处理: 全量小麦秸秆还田 (S)、全量秸秆炭化还田 (B)、半量秸秆半量生物质炭还田 (SB) 和不进行秸秆或生物质炭还田的对照 (CK), 连续进行 3 a 田间试验。对小麦、玉米两个生长季土壤理化性质进行分析, 用末端限制性片段长度多态性 (Terminal-restriction length polymorphism, T-RFLP) 技术和克隆文库技术对氨氧化古菌 (Ammonia-oxidizing archaea, AOA) 和氨氧化细菌 (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 群落结构和多样性进行分析。结果表明, 在小麦季, 与 S 处理相比, B 处理显著降低了土壤容重, 提高了土壤 pH、有机碳 (SOC) 和速效钾 (AK) 含量 ($P < 0.05$), 但并未显著影响土壤水分、铵态氮 ($\text{NH}_4^+ \text{-N}$) 和硝态氮 ($\text{NO}_3^- \text{-N}$) 含量; B 和 SB 处理的硝化潜势 (Potential nitrification rate, PNR) 分别为 0.58、0.49 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (以 NO_2^- 计, 下同), 显著高于 CK, 与 S 处理 (0.40 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) 差异不显著。玉米季, B 处理显著提高了土壤水分、SOC 和 AK ($P < 0.05$), 各处理玉米季的 PNR 整体低于小麦季, B 处理最高 (0.27 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), 显著高于 CK 和 S 处理 ($P < 0.05$)。小麦季 PNR 分别与 AK、 NH_4^+ 浓度和土壤容重显著相关 ($P < 0.05$), 与 AOA 和 AOB 群落组成均无显著关系; 玉米季 PNR 仅与理化因子 SOC 显著相关, 但该季节 PNR 与 AOB 群落结构显著相关。冗余分析 (RDA) 表明, 土壤 SOC、容重、pH 和 AK 是显著影响硝化微生物群落结构的主要因子, 对 AOA 和 AOB 群落结构总变异的解释量分别为 76.4% 和 75.5%。系统发育树分析表明, AOA 大部分属于土壤古菌 Group1.1b, AOB 多属于亚硝化螺菌 *Nitrosospira* 簇 3。综上, 与秸秆直接还田相比, 炭化还田提高土壤硝化活性, 改善部分土壤理化性质, 引起土壤硝化微生物群落结构变化。

关键词 砂质潮土; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 秸秆直接还田; 秸秆炭化还田; 硝化作用

中图分类号 S147; S154 **文献标识码** A

华北平原是我国主要的粮食产区之一, 实行冬小麦/夏玉米两季轮作模式。为了提高作物产量, 该地区氮肥施用量大, 大量施肥在提高作物产量的同时, 也会引起一系列的问题, 如造成氮肥利用率低、土壤酸化、氮素损失和环境污染等^[1-2]。硝态氮淋溶是华北平原主要的氮素流失途径之一, 该地区主要的土壤类型为石灰性潮土, 该土壤具有较强的硝化作用^[3]。此外, 该区域作物产量高, 秸秆作为粮食生产的副产品随作物产量增加而增加, 其量占全

国秸秆总量的 26.4%^[4], 该地区秸秆利用的问题尤为突出, 秸秆量过大难以有效利用, 秸秆直接还田是最普遍的农业措施。在科学研究上, 秸秆直接还田的利弊一直广受争议, 不利因素如腐解缓慢、养分周转时间长、影响出苗、易爆发病虫害^[5]及导致土壤有机酸积累等问题^[5], 而生物质炭作为土壤改良剂对土壤理化性质改善、降低酸度、肥力提升和促进作物增产^[6-9]等方面被众多研究者认同。秸秆炭化还田作为一种新的还田模式在促

* 国家重点研发项目 (2017YFD0301103) 和国家自然科学基金项目 (41401273) 共同资助 Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0301103) and the National Natural Science Foundation of China (No. 41401273)

[†] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hanyanlai@henau.edu.cn

作者简介: 李培培 (1982—), 女, 河南开封人, 博士副教授, 主要从事土壤培肥和微生物生态研究。E-mail: lipei@henau.edu.cn

收稿日期: 2019-01-29; 收到修改稿日期: 2019-04-28; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2019-05-31

进土壤碳氮元素及速效养分的累积^[10]、有效调节土壤酸碱度^[8]和提高阳离子交换量^[11]等方面有显著的效果。

硝化作用是在微生物作用下将铵态氮转化成移动性较强的硝态氮的过程,是氮转化过程中一个备受关注的环节,氨氧化古菌(Ammonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)被认为是土壤中硝化作用的主要驱动者^[12]。目前有大量添加生物质炭对不同类型土壤 AOA 和 AOB 群落结构变化的研究报道,以培养试验居多,研究表明不同类型生物质炭及不同量的添加能影响硝化微生物结构,并能不同程度地刺激土壤硝化作用^[13-15];也有研究认为生物质炭抑制轻壤土的硝化作用,不同质地土壤表现出不同的使用效果^[16]。综上,添加生物炭对土壤理化性质硝化作用有显著影响,但直接还田、炭化还田及混合还田对潮土硝化作用的影响程度尚不明确,研究不同还田方式的效应差异及土壤微环境的变化,探讨理化性质变异、硝化功能与相应微生物群落之间的关系,有助于深入理解炭化还田土壤生态系统氮素循环过程。本研究在施氮量较高的华北平原典型潮土上,分析不同还田模式对土壤理化性质、硝化作用及氨氧化微生物群落变化的影响,于大田条件下进行了连续 3 a 的田间定位试验,以期为华北地区秸秆资源化利用提供新的途径和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验设置在河南省中牟县三官庙乡姬庄村进行。该区地处黄河流域,季风气候,四季分明。平均气温 16.7℃。无霜期年平均 233 d,年均降水量 676.1 mm,最大降水量 1 083 mm,6—9 月份降水量占全年降水量的 63%。种植模式采用华北典型的冬小麦/夏玉米一年两熟制。土壤类型为砂质潮土,其基本理化性质为:有机碳(SOC) 10.10 g·kg⁻¹,碱解氮 32.62 mg·kg⁻¹,有效磷 9.3 mg·kg⁻¹,速效钾 45.0 mg·kg⁻¹,pH 为 7.2;0~60 cm 土壤机械组成为,砂粒 783 g·kg⁻¹,粉粒 139 g·kg⁻¹,黏粒 78 g·kg⁻¹。

1.2 试验设计

试验用生物质炭购自商丘三利生物能源有限公

司,原料为玉米秸秆,经厌氧 450℃炭化而成。其基本性质为:总碳 530.5 g·kg⁻¹,C/N 为 58.0,pH 为 8.3。小麦品种为周麦 17、玉米品种为郑单 958。

2014 年 10 月玉米收获后进行整地划分小区。试验设置①无秸秆还田(CK),②全量秸秆还田(S),③全量玉米秸秆炭化为生物质炭还田(B);④半量秸秆半量生物质炭还田(SB)(一半秸秆炭化为生物质炭还田),共 4 种不同物料还田方式。每处理设置 3 个重复,随机区组排列,小区面积为 6 m×3 m=18 m²。为阻断水分和养分的移动,小区间用 3 mm 厚的塑料板隔开,隔板深度为 60 cm。试验开展后,在每年玉米收获后小麦播种前,连续实施上述 4 种还田处理,所用生物质炭为玉米秸秆定制生物质炭,根据得炭率折算每个小区需要的生物质炭量。各小区耕作方式均为旋耕 15 cm 深,化肥施用量一致,均为每季纯 N 220 kg·hm⁻²、P₂O₅ 120 kg·hm⁻²、K₂O 60 kg·hm⁻²,磷钾肥在作物播种时一次性底施,氮肥 60%作基肥,40%作追肥,分别在小麦拔节期和玉米大喇叭口期追肥沟施。其他农田栽培管理措施与当地农民管理习惯一致。

采样时间分别为 2017 年 6 月和 2017 年 9 月,即小麦、玉米收获前 1 周。采用“S”形取样法采集试验点 0~15 cm 土层土壤样品,每个小区采集 10 钻作为待测样品,然后用无菌袋密封保存带回实验室做后期的处理分析。用于微生物分析的土壤样品带回实验室后冻干、-20℃保藏。

1.3 土壤理化指标与硝化潜势测定

土壤含水量采用烘干法测定;土壤 pH 采用 pH 计(Delta 320, Mettler-Toledo, 上海)测定,水土比为 2.5:1。土壤有机质、全氮、有效磷和速效钾测定参照《土壤农化分析》^[17];土壤铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)用 2 mol·L⁻¹KCl 浸提后,用连续流动分析仪(SAN++, Skalar, 荷兰)测定其浓度。

土壤硝化潜势(Potential nitrification rate, PNR)的测定采用氯酸盐抑制法^[18],主要步骤:称取 5.0 g 新鲜土壤样品置于 50 mL 的离心管中,加入 20 mL 磷酸盐缓冲液(8.0 g·L⁻¹NaCl, 0.2 g·L⁻¹KCl, 0.2 g·L⁻¹Na₂HPO₄, 0.2 g·L⁻¹NaH₂PO₄),并添加 1 mmol·L⁻¹(NH₄)₂SO₄和 10 mg·mL⁻¹的 KClO₃。将离心管置于室温(25℃)下,180 r·min⁻¹振荡培养 24 h。培养结束后,加入 5 mL 浓度为 2 mol·L⁻¹

的 KCl 溶液提取 NO_2^- -N, 其浓度以对氨基苯磺酸和 α -萘胺显色, 然后在酶标仪 (Thermo Scientific Multiskan, GO, Thermo Fisher Scientific, 美国) 上 545 nm 波长下比色。

1.4 土壤微生物总 DNA 的提取

土壤微生物总 DNA 采用 MoBio PowerSoil Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, 美国) 的试剂盒提取, 操作步骤按试剂盒上的说明进行。用分光光度计 (Nanodrop ND-2000c UV-Vis, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, 美国) 检测浓度和纯度后于 -20°C 保存待用, 使用时 DNA 稀释至 $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 用于后续 PCR 扩增。

1.5 AOA 和 AOB *amoA* 基因扩增

所用引物分别为 Arch-amoAF/Arch-amoAR^[19] 和 amoA1F/amoA2R^[20] 扩增 AOA 和 AOB *amoA* 基因。PCR 反应体系为 $25\ \mu\text{L}$, 包含 $12.5\ \mu\text{L}$ Premix Ex TaqTM (TaKaRa, 日本), $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物各 $0.5\ \mu\text{L}$, DNA 模板 $2\ \mu\text{L}$, 其余用双蒸水补至 $25\ \mu\text{L}$ 。每个样品 3 次重复, 反应条件依据参考文献[21]进行。获取的 PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳检测片段大小和单一性, 冷冻避光保存用于后续分析。

1.6 末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 和克隆文库分析

同等 PCR 条件下, 正向引物均用标记物 6-荧光素 (6-FAM) 标记的 PCR 扩增产物经纯化回收后进行酶切。酶切体系为 $10\ \mu\text{L}$, 包括大约 $200\ \text{ng}$ PCR 产物、 $5\ \text{U}$ 的限制性内切酶、 $0.1\ \mu\text{L}$ 牛血清蛋白和 $1\ \mu\text{L}$ $10\times$ 反应缓冲液 (NEBuffer)。AOA 选用的内切酶是 *HpyCH₄V*, AOB 选用的内切酶是 *RsaI*。酶切及分析方法参考文献[22]进行: 在 37°C 条件下保持 $3\ \text{h}$, 95°C 内切酶失活, 酶切产物片段在 ABI3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, 加拿大) 上进行测定。末端限制性片段 (T-RFs) 相对的丰度使用 GeneMarkerV2.2 (ABI, 美国) 软件进行分析, 分析电泳图谱中各峰的片段长度和峰面积。每个样品中低于最高峰值 2% 的峰从后续分析中剔除, 片段长度差异小于等于 $1\ \text{bp}$ 的两个峰作为一个峰进行分析。依据图谱中 T-RFs 的数目及其相对丰度进行香农多样性指数 (Shannon 指数) 的计算。

根据末端限制性片段多样性结果, 筛选 T-RFs 多样性丰富度最高的 3 个 DNA 样品构建 AOA 和 AOB *amoA* 基因克隆文库, 不带荧光标记的引物扩增的 PCR 产物经过切胶纯化后, 连接到 pGEM-T Easy 载体上 (Promega, Madison, WI, 美国), 然后将载体转化入 *Escherichia coli* JM109 活化细胞中。每个样品文库分别随机挑选 50 个白色克隆子, 共 150 个白色克隆子, 送测序公司测序。所获目的基因序列利用 QIIME 软件进行序列分析, 按照 97% 同源划分可操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTU), 分别获得 19 个 AOA 和 16 个 AOB 特异性序列, 然后将每个 OTU 的代表序列用序列检索工具 (BLAST) 进行相似序列搜索比对, 最后选择代表性序列应用 MEGA 7.0 软件邻接法 (Neighbor-joining) 构建 AOA 和 AOB 系统发育树。本研究中获取的代表性 AOA-*amoA* 和 AOB-*amoA* 基因已提交至美国国家生物技术信息中心 (NCBI), 其序列号分别为 MK732036-MK732051 和 MK732052-MK732066。

1.7 数据分析

所得试验数据采用 Excel 2007 软件进行制表、绘图, 不同处理之间土壤基本性质、硝化潜势和 *amoA* 基因 T-RFs 的差异显著性用单因素方差分析进行计算。所有统计分析使用 SPSS 19.0 软件 (IBM Co, Armonk, NY, 美国) 实现。采用皮尔森 (Pearson) 相关分析土壤理化因子、硝化微生物多样性指数和硝化潜势之间的相关关系。 $P < 0.05$ 被认为具有显著性差异。使用 R 语言中的 vegan 数据包对土壤理化性质和基于不同 T-RFs 相对丰度的硝化微生物群落结构的关系进行冗余分析 (Redundancy analysis, RDA)。

2 结果

2.1 秸秆还田方式对土壤基础理化性质的影响

由表 1 可知, 连续进行 3 a 秸秆和秸秆生物质炭还田后, B 和 SB 处理土壤 pH 较高, 分别为 7.25 和 7.20, 但二者差异不显著, 与 S 处理相比, 仅 B 处理显著增加 ($P < 0.05$); 在小麦和玉米两季, 与 S 相比, B 和 SB 处理土壤全氮、 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N

表 1 秸秆不同还田方式下小麦玉米两季潮土理化因子

Table 1 Soil properties under different straw and biochar application treatments in wheat and maize season

处理	TN (g·kg ⁻¹)	SOC (g·kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N (mg·kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N (mg·kg ⁻¹)	pH	Mo (g·kg ⁻¹)	AK (mg·kg ⁻¹)	BD (g·kg ⁻¹)
小麦 Wheat								
CK	0.66±0.04a	6.29±0.24c	6.51±0.53a	11.0±1.6a	7.11±0.16ab	51.2±2.2a	39.3±8.1b	142±4a
S	0.67±0.08a	6.46±0.09bc	5.98±0.39ab	11.1±0.9a	6.79±0.06b	54.9±4.4a	42.0±12.0b	138±0ab
B	0.68±0.07a	7.52±0.26a	5.54±0.64b	14.0±2.4a	7.25±0.03a	56.0±3.2a	57.7±5.9a	126±3c
SB	0.71±0.04a	6.82±0.19b	5.27±0.33b	10.9±2.0a	7.20±0.18ab	58.2±6.9a	52.7±1.2ab	136±3b
玉米 Maize								
CK	0.66±0.02b	6.52±0.04c	8.20±1.85b	15.6±1.3b	7.00±0.16a	72.0±0.5b	71.4±4.7b	143±3a
S	0.69±0.03ab	6.57±0.12bc	11.38±1.06a	18.1±1.9a	6.71±0.19b	73.1±1.0b	72.7±4.2b	143±5a
B	0.70±0.02a	7.61±0.26a	10.63±1.97a	20.0±1.5a	7.14±0.06a	75.6±0.5a	87.7±11.0a	133±12a
SB	0.67±0.02ab	6.86±0.20b	9.10±1.62a	18.9±3.3a	6.96±0.07a	73.6±1.5b	84.31±6.8ab	137±4a

注: CK、S、B、SB 分别表示不进行秸秆或生物炭还田的对照、全量小麦秸秆还田、全量秸秆炭化还田、半量秸秆半量生物炭还田; TN、SOC、Mo、BD 分别表示全氮、有机碳、水分、容重。表中数据表示均值, 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。下同 Note: CK, Control; S, straw; B, biochar; SB, half straw replaced by biochar. TN, total nitrogen; SOC, soil organic matter; Mo, moisture; BD, bulk density. Means with different lowercase letters indicate significant differences among biochar and straw application treatments ($P<0.05$). The same below

的含量均未显著增加或降低, 但与 CK 相比各处理显著增加 ($P<0.05$)。与 S 相比, B 处理显著提高了土壤 SOC 含量 ($P<0.05$), 在小麦和玉米两个季节分别增加了 19.6% 和 16.7%, 而 SB 提高并不显著; B 处理还显著提高了玉米季土壤水分含量 ($P<0.05$), 但小麦季土壤水分含量无显著提高。

与常规秸秆还田相比, B 处理显著提高了两季土壤速效钾含量、降低了小麦季土壤容重 ($P<0.05$), 而 SB 与 S 差异不显著。

2.2 秸秆还田方式对土壤硝化潜势的影响

不同秸秆还田方式显著影响了土壤硝化潜势 (图 1)。小麦季, PNR 的大小顺序为: B>SB>S>CK,

B 和 SB 处理分别为 0.58 和 0.49 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (以 NO_2^- 计, 下同), 显著高于 CK 处理 ($P<0.05$); 虽然秸秆还田也增加了 PNR, 但是与 CK 相比未达到差异显著水平, 这表明生物炭替代秸秆还田显著增加砂质潮土硝化潜势。玉米季 PNR 整体低于小麦季, 但是各处理 PNR 与小麦季规律一致, 最高值为 B 处理, 为 0.27 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土。

2.3 AOA 和 AOB 的群落结构

对小麦和玉米两季的 AOA 和 AOB *amoA* 基因片段进行 T-RFLP 分析 (图 2), 获得 AOA 的 T-RFs 片段长度 10 个, 主要的 T-RFs 依次为 204 bp、365 bp、76 bp、258 bp 和 250 bp, 在各个处理中均能检测到,

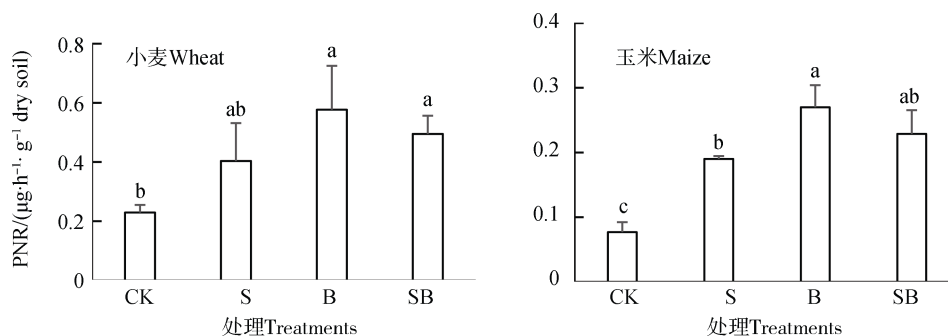


图 1 不同处理小麦和玉米生长季土壤硝化潜势 (PNR)

Fig. 1 Soil potential nitrification rate (PNR) during the wheat and maize seasons relative to treatment

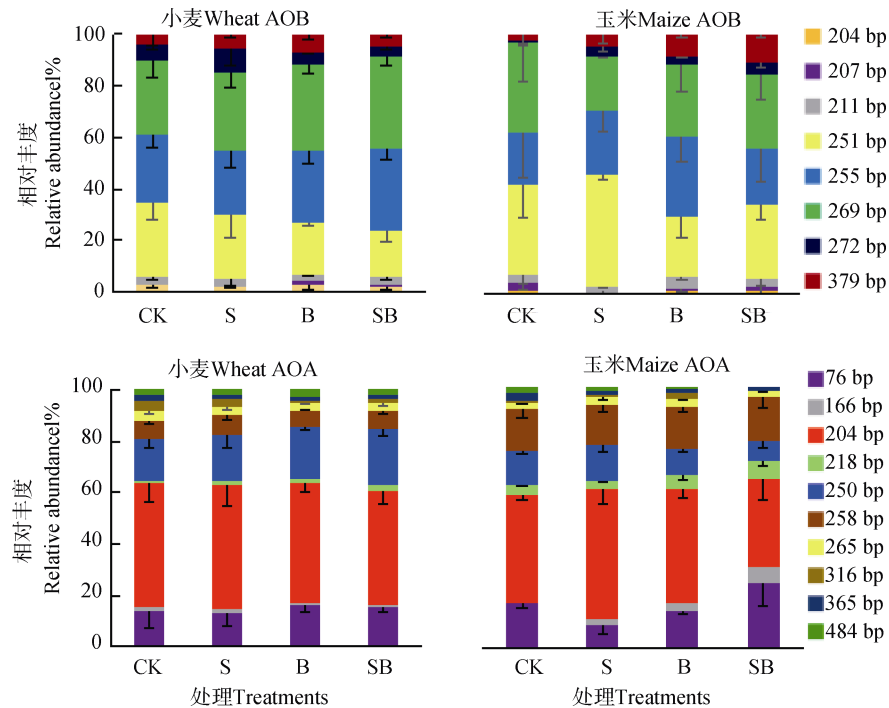


图2 末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 分析不同处理小麦玉米两季氨氧化细菌 (AOB) 和古菌 (AOA) 的群落结构

Fig. 2 Relative abundance of Terminal-restriction fragments (T-RFs) of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) *amoA* gene during the wheat and maize seasons relative to treatment

各处理组成比例存在差异, 其中优势片段 204 bp 占总片段的 34.2%~49.6%; 玉米季 SB 处理的比例显著降低, 而片段 258 bp 的占比在玉米季节较小麦季均显著增加。共获得 8 个 AOB 的 T-RFs 片段长度, 其中 269 bp、255 bp、251 bp 为主要片段, 分别占总片段的 18.5%~35.8%, 15.8%~31.7%, 18.0%~37.9%; 玉米季各处理间的变化较小麦季明显, 其中优势片段 251 bp 在 CK、S、B 和 SB 处理占比为 27.1%、37.9%、20.2%和 24.3%。

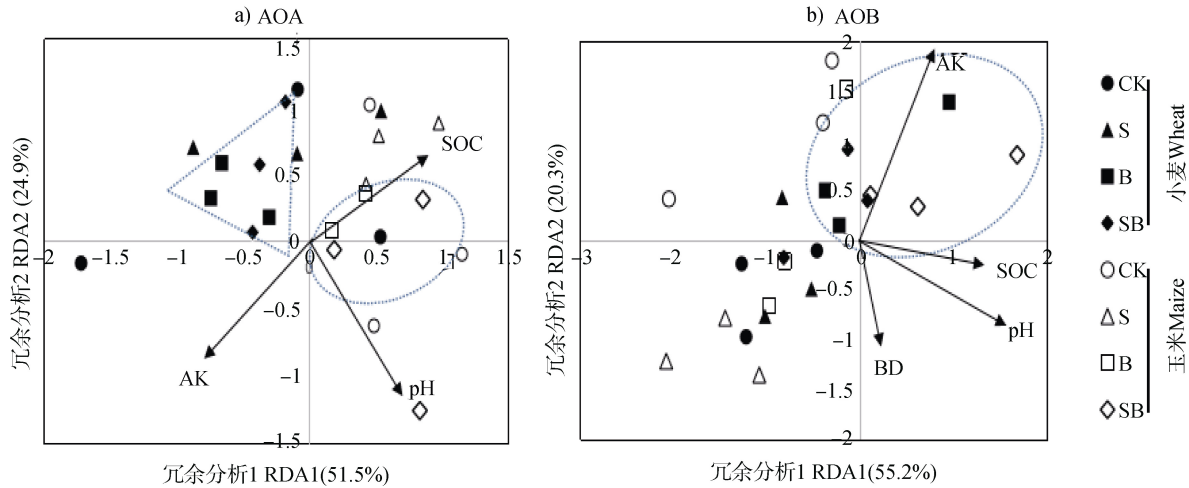
2.4 不同处理间土壤理化因子对微生物群落结构的影响

利用 RDA 方法分别分析不同作物生长季节土壤理化因子对硝化微生物群落组成的影响 (图 3) 可知, AOA 的群落结构在小麦和玉米两个季节有较为明显的区分 (图 3a), 空心符号代表的玉米季样本和实心符号代表的小麦季样本左右明显分开, 小麦季秸秆炭化还田处理 B 和 SB 的样本倾向聚类在一起。AOB 的 RDA 分析可以看出 (图 3b), 小麦、玉米两季节的样本混合在一起, 无明显的季节区分; 施用生物炭处理 B 和 SB 处理群落聚在一起, 表现极大的群落结构相似性。

土壤因子 pH、SOC 和速效 K (AK) 依次分别显著影响 AOA 的群落结构, 第一排序轴 (Axis 1) 解释了样本中 51.5%的变异, 第二排序轴 (Axis 2) 解释了样本 24.9%的变异, 两者合并解释了样本 76.4%的总变异。速效 K (AK)、pH、SOC 和土壤容重 (BD) 显著影响 AOB 的群落结构, 第一排序轴 (Axis 1) 解释了样本中 55.2%的变异, 第二排序轴 (Axis 2) 解释了样本 20.3%的变异, 两者合并解释了样本 75.5%的总变异。

2.5 AOA 和 AOB 基因序列的系统发育树

克隆文库序列经筛选和序列比对, 获得 15 个 AOA 的基因操作分类单元, 系统发育树结果 (图 4) 表明, AOA *amoA* 基因序列大部分聚类在 Group1.1b (*Nitrososphaera*) 类群中, 优势片段 204 bp、76 bp 和 258 bp 均属于该类群; 片段 76 bp 属于 Group1.1a associated, 在大部分处理中占比 20%以下。获得 8 个 AOB 的基因操作分类单元, 系统发育树结果表明, AOB *amoA* 基因序列聚类在 *Nitrosospira* 属的 Cluster 3a, 优势片段 269 bp 和 255 bp 聚类在 Cluster 3a.2, 优势片段 251 bp 和 211 bp 聚类在 Cluster 3a.1, 还有少量片段聚类在 Cluster 4 和 Cluster 1。



注：不同颜色的点表示不同处理的土壤 AOA (a)) 和 AOB (b)) 群落结构特性 (实心图表示小麦季土壤样品, 空心图表示玉米季土壤样品) Note : Dots different in color represents AOA and AOB communities from different soil samples (solid and vacant dots represent soil samples collected during the wheat and maize seasons , respectively)

图 3 土壤理化因子与硝化微生物群落多样性的冗余分析 (RDA)

Fig. 3 Redundancy analysis (RDA) of soil physio-chemical properties and microbial community of nitrifying microbes in the soil during the wheat and maize seasons relative to treatment

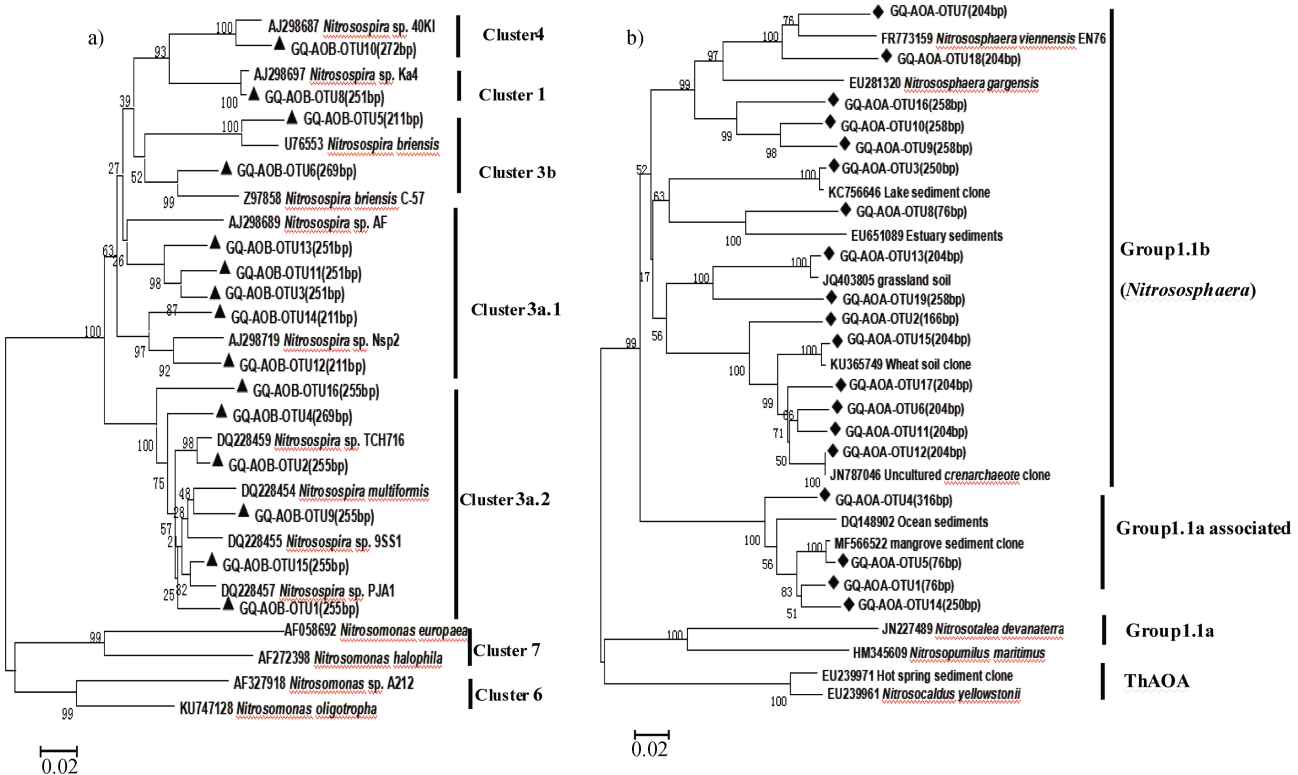


图 4 邻接法构建 AOB (a) 和 AOA (b) amoA 基因系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic trees, build with the neighbor-joining method, of archaeal amoA sequences (a) and bacterial amoA sequences (b) retrieved from the soil relative to treatments

2.6 土壤理化因子、硝化活性与硝化微生物菌群的相关性

相关性分析表明 (表 2), 小麦季 SOC、AK 与

PNR 呈显著正相关关系, 而 NH_4^+ 和土壤容重 (BD) 与 PNR 呈显著负相关, 这 4 个指标变化显著影响了硝化作用, 而在该季节, AOB 群落香农指数与理化因子、

硝化作用之间均无显著相关, AOA 群落香农指数与 SOC 显著负相关, AOA、AOB 群落结构与 PNR 之间均无显著相关。在玉米季, 理化因子 SOC 与 PNR 显

著相关, 而 pH 与 AOA 群落香农指数呈显著正相关, SOC 与 AOB 群落呈显著正相关, 该季节 PNR 与 AOB 群落香农指数极显著正相关, 与 AOA 无显著相关关系。

表 2 不同还田处理土壤理化性质、硝化微生物群落与硝化潜势 (PNR) 的相关系数 ($n=12$)

Table 2 Correlation coefficient of potential nitrification rate (PNR) with of soil properties and nitrifier community relative to season and treatment

	TN	SOC	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	pH	Mo	AK	BD	PNR
小麦 Wheat									
PNR	0.045	0.822**	-0.673*	-0.084	0.462	0.09	0.730**	-0.693*	-
AOA 香农指数 ^①	-0.354	-0.575*	0.218	-0.201	-0.212	0.013	-0.254	0.277	-0.356
AOB 香农指数 ^②	0.397	-0.205	0.095	-0.035	0.264	0.218	-0.049	-0.353	0.404
玉米 Maize									
PNR	0.475	0.815**	0.491	0.486	0.152	0.24	0.465	-0.419	-
AOA 香农指数 ^①	0.13	0.157	-0.218	0.006	0.560*	0.219	0.530	-0.381	-0.074
AOB 香农指数 ^②	0.435	0.564*	0.414	0.073	0.408	0.343	0.520	-0.356	0.766**

* $P<0.05$; ** $P<0.01$; ①AOA Shannon index, ②AOB Shannon index

3 讨论

3.1 秸秆直接还田与炭化还田对潮土理化性质的影响

与秸秆相比, 生物质炭有较稳定的物理化学结构, 其对土壤理化因子的影响因土壤类型、生物质炭数量和种类而不尽一致。无论是短期的室内培养试验还是大田试验, 均有研究结果表明施用生物质炭能显著提高土壤的有机质含量^[7, 16], 而本研究试验潮土质地较轻, 有机质含量低, 秸秆炭化还田能有效增加有机质积累 (表 1)。秸秆直接还田导致土壤酸化加剧, 添加生物质炭缓解酸性土壤酸化, 调节土壤的缓冲能力^[23], 本研究结果也证明了生物质炭替代秸秆还田当季能有效增加土壤 pH (表 1), 克服秸秆直接还田的不利影响; 相比于秸秆还田, 秸秆炭化高温杀灭病虫害, 生物质炭替代还田还可能降低下茬作物病虫害的发生^[5]。因本研究生物质炭用量较小, 按照玉米秸秆全量还田的生物质炭替代量, 每年小麦播种季施入量折合仅 $2.0 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的生物质炭, 在生物质炭施入的当季显著增加了 pH, 在玉米季 pH 与对照无显著差异 (表 1), 可能是还田的生物质炭随着时间受土壤缓冲作用的影响所致, 说明全量秸秆转化成生物质炭还田并不会导

致试验潮土 pH 强烈增加的风险。

田间条件下, 前人研究所用生物质炭量一般较高, 从几吨到数十吨不等^[13, 16, 24], 且多为一次施入, 而本研究采用等量的玉米秸秆炭化还田, 每年小麦播种季施入一次, 用量相对较低, 经过三年的连续试验, 生物质炭替代秸秆还田较常规秸秆还田显著提高了土壤的有机碳含量, 而半量秸秆炭化还田与常规秸秆还田之间无显著差异 (表 1), 这与本研究所有生物质炭量相对较低有关。本研究秸秆炭化还田与常规秸秆还田相比, 并未显著增加土壤的 TN、NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量 (表 1), 与一些生物质炭添加试验研究结果一致^[15, 24-25]。有些施生物质炭的研究表明, 在配合不同施肥条件下增施生物质炭提高了土壤全氮的含量^[16, 26]。有田间试验表明, 施用生物质炭能显著提高土壤的保水性^[16, 24, 27]。本研究中, 全量秸秆炭化还田显著提高了玉米季土壤水分, 但并未显著提高小麦季水分含量 (表 1), 这可能与试验地所在区域小麦生育期水分亏缺有关, 该区域冬春少雨, 土壤质地轻, 水分容量小, 玉米生育期夏季雨水多, 土壤含水量相比较较高, 生物质炭在土壤水分含量较高的情况下增加了水分的吸持。本研究还测定了有效磷和速效钾含量, 因有效磷在 4 个处理间无显著差异, 其数据并未列出, 而秸秆炭化还

田显著提高了土壤速效钾含量(表 1)。施生物质炭能提高土壤速效钾量^[28], 秸秆炭化还田增产的关键因素之一为 AK 含量的增加^[10], 在等秸秆量和等氮磷钾养分条件下, 秸秆炭化还田对提高土壤盐基离子含量、有效阳离子交换量的效果明显优于秸秆直接还田^[11], 本研究中小麦季 AK 和 PNR 显著相关(表 2), 这与供试潮土沙粒含量高、质地轻、肥力低、相对缺钾有关, 秸秆炭化还田通过提高 AK 含量, 增强微生物的硝化活性。

3.2 秸秆直接还田与炭化还田对潮土硝化作用的影响

添加生物质炭影响土壤硝化作用, 较高量的生物质炭添加刺激土壤硝化作用的增加^[13, 29]。Abujabbar 等^[16]研究认为, 添加中量生物质炭(10 t·hm⁻²)显著增加轻质土壤硝化作用, 并影响微生物群落结构和功能。生物质炭疏松多孔, 有效降低土壤容重, 土壤的透气性增加, 硝化微生物活性增强, 进而提高硝化活性^[30]。与前人研究结果一致, 本研究发现, 在玉米季, 与常规秸秆还田相比, 秸秆炭化还田显著增加了土壤硝化作用, 但半量秸秆炭化处理与常规处理无显著差异(图 1)。生物质炭还田影响土壤容重, 增加通气性和 SOC 含量, SOC 与 PNR 呈极显著正相关, 与小麦季的 AOA 和玉米季的 AOB 群落结构呈显著相关关系(表 2)。Muema 等^[31]研究表明, SOC 对硝化微生物群落结构起决定性作用。潮土是华北平原的主要农田土壤类型, 在该类型农田土壤上的研究一致认为, AOB 主导氨的氧化^[32]。与前人结果相似, 本研究中玉米季 AOB 群落结构与 PNR 显著正相关, 小麦季也有较高的相关系数, 但未达到差异显著水平; 两个季节 AOA 群落结构与 PNR 均无显著相关性(表 2)。

3.3 土壤环境因子对 AOA 和 AOB 群落结构的影响

AOA 和 AOB 群落结构与土壤理化因子的 RDA 分析表明, pH、SOC 和速效 K 显著影响 AOA 和 AOB 的群落结构(图 3), AOA 群落结构小麦季和玉米季分开, 显著受到季节的影响, 且玉米季 PNR 整体低于小麦季也证明由微生物介导的硝化活性受季节影响。华北小麦/玉米轮作区多为季风气候, 小麦和玉米生长季节土壤养分及环境条件有较大差异, 如玉米季土壤含水量高, 生物质炭缓冲作用或根际分泌物的影响等导致的土壤 pH 较低, 温度较高等因素的变化是 AOA 群落结构季节分异的原因;

全量和半量秸秆炭化还田处理与常规秸秆还田、不还田 CK 相比, 氨氧化微生物相似度较高, 说明秸秆炭化还田影响了硝化微生物群落结构。系统发育显示, 大部分 AOA 基因序列聚类于土壤古菌 Group1.1b (*Nitrososphaera*), AOB 多聚类于 *Nitrosospira* Cluster 3 (亚硝化螺菌, 簇 3)(图 3), 前人研究证明中性和碱性土壤中古菌组成以 Group1.1b 类群为主, 而 AOB 组成以 *Nitrosospira* Cluster 3 占优势地位^[33]。Group1.1a associated AOA 主要分布于酸性土壤, 本研究中性、偏碱性潮土中检测到该嗜酸性古菌类群的存在, 表明其对中性土壤有一定的适应性, 前人^[12]在河南封丘不同施肥潮土中也检测到该类群 AOA 的少量存在。综合分析, 秸秆炭化还田通过提高土壤 SOC、增加 pH、降低土壤容重和增加速效 K 的含量, 增强硝化作用, 并影响硝化微生物群落结构。

潮土本身硝化作用强, 施氮量大, 推广秸秆炭化还田会增强硝化作用, 这可能意味着会加剧硝态氮的淋洗损失。有研究者通过在石灰性褐土上的一季试验表明, 秸秆直接和炭化还田相比, 直接还田更能增加土壤微生物对肥料氮的固持, 减少氮素损失^[34]。因此在华北偏碱性的潮土上, 需要进一步开展长期秸秆炭化还田对硝态氮淋洗风险的研究。此外, 需注意本研究中硝化微生物群落结构的认识主要基于少量土壤样品 DNA 的提取, 且生物质炭添加引起土壤性质的变化可能对 DNA 提取质量及后续 PCR 扩增的影响并未考虑, 因此在后续的研究中, 可改进 DNA 提取方式及增加其他微生物研究手段, 在继续大田定位试验的基础上, 深入开展秸秆炭化还田对土壤微生物生态的认识。

4 结 论

与直接秸秆还田相比, 炭化还田明显提高了试验潮土的 SOC 含量、pH 和速效钾含量, 降低了土壤容重, 提高了试验潮土的硝化活性、并影响了硝化微生物群落组成, 显著变化的土壤理化因子很大程度解释了土壤氨氧化细菌和古菌群落变化。

参 考 文 献

- [1] Ju X T, Xing G X, Chen X P, et al. Reducing environmental risk by improving N management in

- intensive Chinese agricultural systems. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106 (9): 3041—3046
- [2] Zhu Z L, Chen D L. Nitrogen fertilizer use in China—contributions to food production, impacts on the environment and best management strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2002, 63 (2/3): 117—127
- [3] Huang T, Ju X T, Yang H. Nitrate leaching in a winter wheat-summer maize rotation on a calcareous soil as affected by nitrogen and straw management. *Scientific Reports*, 2017 (7): Article number 42247
- [4] 宋大利, 侯胜鹏, 王秀斌, 等. 中国秸秆养分资源数量及替代化肥潜力. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(1): 1—21
- Song D L, Hou S P, Wang X B, et al. Nutrient resource quantity of crop straw and its potential of substituting (In Chinese). *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 24 (1): 1—21
- [5] 李正东, 李懋, 潘根兴, 等. 作物秸秆还田的新问题—对河南商丘地区农民的问卷调查. *中国农学通报*, 2013, 29 (32): 204—208
- Li Z D, Li M, Pan G X, et al. Challenges for crop straw return: A questionnaire survey on farmers' vision from Shangqiu municipality, Henan Province (In Chinese). *China Agricultural Science Bulletin*. 2013, 29 (32): 204—208
- [6] 高学振, 张丛志, 张佳宝, 等. 生物炭、秸秆和有机肥对砂姜黑土改性效果的对比研究. *土壤*, 2016, 48(3): 468—474
- Gao X Z, Zhang C Z, Zhang J B, et al. Comparison of biochar, straw and manure in improving shajiang black soil (In Chinese). *Soils*, 2016, 48 (3): 468—474
- [7] Asai H, Samson B K, Stephan H M, et al. Biochar amendment techniques for upland rice production in Northern Laos: I. Soil physical properties, leaf SPAD and grain yield. *Field Crops Research*, 2009, 111(3): 81—84
- [8] 俞映惊, 薛利红, 杨林章, 等. 生物炭添加对酸化土壤中小白菜氮素利用的影响. *土壤学报*, 2015, 52 (4): 759—767
- Yu Y L, Xue L H, Yang L Z, et al. Effect of biochar application on pakchoi (*Brassica chinensis* L.) utilizing nitrogen in acid soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52 (4): 759—767
- [9] Lehmann J, Rillig M C, Thies J, et al. Biochar effects on soil biota—A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43 (9): 1812—1836
- [10] 张璐, 董达, 平帆, 等. 逐年全量秸秆炭化还田对水稻产量和土壤养分的影响. *农业环境科学学报*, 2018, 37 (10): 2319—2326
- Zhang L, Dong D, Ping F, et al. The effects of successive whole-dose biochar application on rice yield and soil nutrient concentrations (In Chinese). *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37 (10): 2319—2326
- [11] 郭春雷, 李娜, 彭靖, 等. 秸秆直接还田及炭化还田对土壤酸度和交换性能的影响. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24 (5): 1205—1213
- Guo C L, Li N, Peng J, et al. Direct returning of maize straw or as biochar to the field triggers change in acidity and exchangeable capacity in soil (In Chinese). *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 24 (5): 1205—1213
- [12] 贺纪正, 张丽梅. 土壤氮素转化的关键微生物过程及机制. *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(In Chinese). *Microbiology China*, 2013, 40 (1): 98—108
- [13] He L, Liu Y, Zhao J, et al. Comparison of straw-biochar-mediated changes in nitrification and ammonia oxidizers in agricultural oxisols and cambosols. *Biology & Fertility of Soils*, 2016, 52 (2): 137—149
- [14] Song Y, Zhang X, Ma B, et al. Biochar addition affected the dynamics of ammonia oxidizers and nitrification in microcosms of a coastal alkaline soil. *Biology & Fertility of Soils*, 2014, 50 (2): 321—332
- [15] Prommer J, Wanek W, Hofhansl F, et al. Biochar decelerates soil organic nitrogen cycling but stimulates soil nitrification in a temperate arable field trial. *PLoS One*, 2014, 9 (1): e86388
- [16] Abujabbar I S, Doyle R, Bound S A, et al. The effect of biochar loading rates on soil fertility, soil biomass, potential nitrification, and soil community metabolic profiles in three different soils. *Journal of Soils and Sediments*, 2016, 16 (9): 2211—2222
- [17] 鲍士旦. 土壤农化分析. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000
- Bao S D. *Soil and agricultural chemistry analysis*(In Chinese). 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000
- [18] Kurola J, Salkinoja-Salonen M, Aarnio T, et al. Activity, diversity and population size of ammonia-oxidizing bacteria in oil-contaminated landfarming soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 250: 33—38
- [19] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (41): 14683—14688
- [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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704—4712
- [21] 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. *ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2012, 6 (5): 1032—1045
- [22] 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. *Applied Soil Ecology*, 2013, 68: 36—45
- [23] Zhao R, Coles N, Kong Z, et al. Effects of aged and fresh biochars on soil acidity under different incubation conditions. *Soil and Tillage Research*, 2015, 146 (3): 133—138
- [24] 刘园, Jamal Khan M, 靳海洋, 等. 秸秆生物炭对潮土作物产量和土壤性状的影响. *土壤学报*, 2015, 52(4): 849—858
Liu Y, Jamal Khan M, Jin H Y, et al. Effects of successive application of crop-straw biochar on crop yield and soil properties in cambosols (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52 (4): 849—858
- [25] Hu Y L, Wu F P, Zeng D H, et al. Wheat straw and its biochar had contrasting effects on soil C and N cycling two growing seasons after addition to a Black Chernozemic soil planted to barley. *Biology & Fertility of Soils*, 2014, 50 (8): 1291—1299
- [26] Zhang A, Liu Y, Pan G, et al. Effect of biochar amendment on maize yield and greenhouse gas emissions from a soil organic carbon poor calcareous loamy soil from central china plain. *Plant and Soil*, 2012, 351(1/2): 263—275
- [27] Haider G, Steffens D, Moser G, et al. Biochar reduced nitrate leaching and improved soil moisture content without yield improvements in a four-year field study. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2017, 237 (1): 80—94
- [28] Oram N J, van de Voorde T F J, Ouweland G J, et al. Soil amendment with biochar increases the competitive ability of legumes via increased potassium availability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2014, 191 (12): 92—98
- [29] He L, Zhao X, Wang S, et al. The effects of rice-straw biochar addition on nitrification activity and nitrous oxide emissions in two Oxisols. *Soil and Tillage Research*, 2016, 164 (12): 52—62
- [30] Tao R, Wakelin S A, Liang Y, et al. Response of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in calcareous soil to mineral and organic fertilizer application and their relative contribution to nitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 114 (11): 20—30
- [31] Muema E K, Cadisch G, Röhl C, et al. Response of ammonia-oxidizing bacteria and archaea to biochemical quality of organic inputs combined with mineral nitrogen fertilizer in an arable soil. *Applied Soil Ecology*, 2015, 95 (11): 128—139
- [32] Xia W, Zhang C, Zeng X, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The ISME Journal*, 2011, 5 (7): 1226—1236
- [33] Jia Z, Conrad R. Bacteria rather than archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658—1671
- [34] 武爱莲, 王劲松, 董二伟, 等. 施用生物炭和秸秆对石灰性褐土氮肥去向的影响. *土壤学报*, 2019, 56 (1): 176—185
Wu A L, Wang J S, Dong E W, et al. Effect of application of biochar and straw on fate of fertilizer N in cinnamon soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (1): 176—185

Effect of Straw Return, Directly or as Biochar, on Nitrifying Microbes in Fluvo-aquic Soil

LI Peipei TONG Haotian HAN Yanlai[†] JIANG Ying WU Chuanfa

(College of Resources and Environmental Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract 【 Objective 】 Biochar has increasingly been used as soil amendment to increase soil carbon storage and improve soil chemical and biological properties. However, so far little has been found in the literature talking comparatively about effects of returning maize stalk, directly or as biochar on soil properties, nitrification and ammonia oxidizer communities. 【 Method 】 A 3-year field experiment was conducted in a field of typical fluvo-aquic soil under the wheat/maize rotation-system commons in the North China Plain. The field experiment was designed to have four treatments: Treatment S (application of straw); Treatment B(application of straw-derived biochar); Treatment SB(half straw and half straw-derived biochar) and Treatment CK (no straw or biochar applied). Soil samples were collected in the wheat and maize seasons for analysis of soil properties and community structure and

diversity of, ammonia oxidizing archaea and bacteria with the terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and clone library techniques. 【 Result 】 It was found that during the wheat season Treatment B significantly enhanced soil pH, soil organic carbon (SOC) and readily available potassium (AK), while decreasing soil bulk density, but did not affect the contents of total nitrogen (TN), NO_3^- -N or soil water as compared to Treatment S, and PNR in Treatments B and SB was measured to be 0.58 and 0.49 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively, significantly higher than that in CK (0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), but did not differ much from that in Treatment S (0.40 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). During the maize season, Treatment B significantly increased soil water content, SOC and AK, and PNR on the whole was relatively lower in the maize season than in the wheat season, regardless of treatment, and much higher in Treatment B (0.27 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) than in Treatments CK and S ($P<0.05$). During the wheat season, Potential nitrification rate (PNR) was closely related to AK, NH_4^+ and soil bulk density ($P<0.05$), but not so to ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) community structure. During the maize season, PNR was significantly related only to SOC and to AOB community structure as well. Redundancy variance analysis (RDA) shows that soil SOC, bulk density, pH and AK are the main factors significantly affecting community structure of soil AOA and AOB, which explained 76.4% and 75.5% of their total variation. Phylogenetic tree analysis shows that all archaeal *amoA* gene sequences were exclusively clustered with group 1.1b (*Nitrososphaera*); and almost all the bacterial *amoA* sequences in the fluvo-aquic soil belonged to *Nitrospira* cluster 3. 【 Conclusion 】 To sum up, application of biochar stimulates nitrification in the sandy fluvo-aquic soil by changing soil SOC, bulk density, pH and AK. The finding in the sequencing and RDA further indicate that biochar application triggers changes of AOA and AOB in community structure. The finding may serve as theoretical references in rational utilization of straw and its biochar.

Key words Fluvo-aquic soil; Ammonia-oxidizing bacteria (AOB); Ammonia-oxidizing archaea (AOA); Straw return; Straw-derived biochar return; Nitrification

(责任编辑：陈荣府)