

DOI: 10.11766/trxb202108250452

朱爽阁, 张前前, 徐昕彤, 毕瑞玉, 宋燕凤, 熊正琴. 田间老化生物质炭减缓稻麦轮作系统土壤 N₂O 排放能力降低的机理[J]. 土壤学报, 2023, 60 (3): 716–725.

ZHU Shuangge, ZHANG Qianqian, XU Xintong, BI Ruiyu, SONG Yanfeng, XIONG Zhengqin. Mechanisms of Diminishing Capacity for Mitigating Nitrous Oxide Emissions by Field-Aged Biochar in the Rice-Wheat Rotation Ecosystem[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60 (3): 716–725.

田间老化生物质炭减缓稻麦轮作系统土壤 N₂O 排放能力降低的机理*

朱爽阁, 张前前, 徐昕彤, 毕瑞玉, 宋燕凤, 熊正琴[†]

(南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏省低碳农业与温室气体减排重点实验室, 南京 210095)

摘要: 生物质炭作为一种重要的土壤调节剂, 在固碳减排尤其氧化亚氮 (N₂O) 减排方面的作用日益突出。为明确生物质炭对田间 N₂O 排放的持续效应及其作用机理, 通过田间定位试验, 分析稻麦轮作体系新鲜和田间不同时间老化生物质炭对 N₂O 排放的影响。试验共设置 5 个处理, 分别为 CK (不施氮肥和生物质炭)、N (施氮肥)、NB_{0y} (氮肥+新鲜生物质炭)、NB_{2y} (氮肥+2 年老化生物质炭) 和 NB_{5y} (氮肥+5 年老化生物质炭), 动态监测稻麦轮作周期 N₂O 排放, 测定水稻和小麦收获后土壤理化性质和氮循环功能基因丰度。结果表明, 生物质炭显著降低土壤 N₂O 累积排放量 32.4%~54.0%, 且表现为 NB_{0y}>NB_{2y}>NB_{5y}。与 N 处理相比, NB_{0y}、NB_{2y} 和 NB_{5y} 处理显著提高土壤 pH 0.6~1.2 个单位、土壤有机碳 (SOC) 含量 21.4%~58.6%、硝态氮 (NO₃⁻-N) 含量 1.7%~31.3%, 对土壤 pH 改善能力随着生物质炭老化而下降。生物质炭处理显著提高 *nosZ* 基因丰度 54.9%~249.4%, 土壤 (*nirS+nirK*)/*nosZ* 比值随着生物质炭老化而增加。相关性分析表明, 土壤 N₂O 累积排放量与 pH 呈显著负相关, 与 NO₃⁻-N 含量和 *amoA-AOB* (氨氧化细菌) 丰度呈显著正相关。因此, 新鲜和田间不同时间老化生物质炭均能显著改善土壤理化特性, 降低土壤 N₂O 排放且新鲜生物质炭的作用效果优于老化生物质炭。土壤 NO₃⁻-N 含量及 (*nirS+nirK*)/*nosZ* 比值的增加, 是导致老化生物质炭减排 N₂O 能力降低的主要原因。

关键词: 稻麦轮作系统; 老化生物质炭; 氧化亚氮 (N₂O) 排放

中图分类号: S158 文献标志码: A

Mechanisms of Diminishing Capacity for Mitigating Nitrous Oxide Emissions by Field-Aged Biochar in the Rice-Wheat Rotation Ecosystem

ZHU Shuangge, ZHANG Qianqian, XU Xintong, BI Ruiyu, SONG Yanfeng, XIONG Zhengqin[†]

(Jiangsu Key Laboratory of Low Carbon Agriculture and GHGs Mitigation, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

* 国家自然科学基金项目 (41977078) 和江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX21_0618) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41977078) and the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province, China (No. KYCX21_0618)

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

作者简介: 朱爽阁 (1996—), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 主要从事土壤碳氮循环研究。E-mail: 2019103087@njau.edu.cn

收稿日期: 2021-08-25; 收到修改稿日期: 2021-10-18; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2022-01-28

Abstract: 【Objective】 Biochar is an important soil amendment material, as it plays an increasingly prominent role in carbon sequestration and greenhouse gas mitigations, especially in nitrous oxide (N₂O) mitigation. To investigate the effects and the mechanisms of the biochar aging process on soil N₂O emissions under a rice-wheat rotation system, an *in situ* field experiment was conducted. 【Method】 Five treatments were established as follows: CK (without urea and biochar), N (urea), NB_{0y} (urea with fresh biochar), NB_{2y} (urea with 2-year aged biochar) and NB_{5y} (urea with 5-year aged biochar). Soil N₂O emission dynamics were monitored during rice and wheat annual rotation. Also, soil physicochemical characteristics and the abundance of relevant microbial functional genes during the N₂O production process were determined after rice and wheat harvest. 【Result】 Biochar treatment significantly reduced the cumulative N₂O emissions by 32.4%–54.0%, with the reduction capacity following NB_{0y} > NB_{2y} > NB_{5y}. Compared with the N treatment, NB_{0y}, NB_{2y} and NB_{5y} treatment significantly increased soil pH by 0.6–1.2 units, soil NO₃⁻-N content by 1.7%–31.3%, and soil organic carbon (SOC) content by 21.4%–58.6%. Nevertheless, the ability of biochar to improve soil pH was decreased with aging. Also, NB_{0y}, NB_{2y} and NB_{5y} treatments significantly increased the abundance of *nosZ* gene by 54.9%–249.4%, and the soil (*nirS+nirK*)/*nosZ* ratio increased with the biochar age. Meanwhile, the cumulative N₂O emissions showed a significant negative correlation with soil pH, and a positive correlation with NO₃⁻-N content and *amoA*-AOB gene abundance. 【Conclusion】 In summary, both fresh and aged biochar can significantly improve soil physical and chemical properties and decrease soil N₂O emissions, but the effect of fresh biochar was better than that of aged biochar. The mitigation capacity of aged biochar decreased mainly due to the increase of soil NO₃⁻-N content and (*nirS+nirK*)/*nosZ* ratio.

Key words: Rice-wheat rotation; Aged biochar; Nitrous oxide (N₂O) emission

生物质炭作为一种富碳产物, 因具有良好的多级孔隙结构和功能特性, 被用作土壤改良剂, 不仅能够提高土壤肥力、修复土壤污染, 还可以增加原位土壤固碳、减缓温室气体氧化亚氮 (N₂O) 排放, 缓解气候变化^[1]。农田土壤作为 N₂O 排放的重要来源, 已成为全球关注和研究的热点^[2]。我国作为粮食生产大国, 截至 2020 年, 粮食播种面积已达 11.7 亿公顷, 其中水稻和小麦总播种面积占 45.8%^[3]。稻麦轮作制度是我国东南部典型的种植制度之一, 占我国粮食生产面积的 8.2%, 是我国温室气体排放的重要来源, 其中稻田占全球 N₂O 排放的 11%^[4-5]。研究表明生物质炭减少农田 N₂O 排放的主要机制有直接吸附、提高土壤 pH、提高 N₂O 还原酶 *nosZ* 基因的表达及促进电子传递等^[6-9]。但大多数研究仅集中于生物质炭短期一次性大量施用^[10], 关于生物质炭长期效应的研究较少^[11]。

生物质炭施用到土壤后受周围环境影响逐渐老化, 导致其物理性质 (比表面积、孔隙度和孔径) 和化学性质 (pH 和表面官能团) 发生变化^[12], 进而影响土壤 N₂O 排放。研究发现温和老化生物质炭比表面积增大, 微孔结构增多^[13], 会增加对 N₂O 的直接吸附。田间自然老化或利用化学条件老化产生的生物质炭 pH 会显著降低^[14], 则可能会削弱其对 N₂O 排放的抑制效果。Duan 等^[15]大田试验观测到 2 年老

化生物质炭仍具有显著降低黑钙土 N₂O 排放的能力, 主要与生物质炭改善土壤曝气、提高土壤 pH 有关。Wu 等^[5, 16-17]田间试验研究也表明, 3 年和 6 年老化生物质炭均能够降低稻麦轮作体系温室气体排放, 且 3 年老化生物质炭显著增加稻季土壤 AOA (氨氧化古菌) 和 AOB (氨氧化细菌) 丰度。但 Spokas^[18]和 Duan 等^[19]室内培养试验研究发现, 3 年老化生物质炭丧失了最初对土壤 N₂O 排放的抑制能力, 5 年老化生物质炭则会促进酸、碱性土壤 N₂O 的排放。由此可见, 不同试验条件下老化生物质炭对土壤 N₂O 排放的影响结果并不一致, 作用机理也存在争议, 需要在田间定位试验中探究其作用机理。

因此, 本研究选择稻麦轮作系统开展田间定位试验, 设置仅施氮肥、氮肥配施新鲜生物质炭、2 年老化生物质炭和 5 年老化生物质炭处理, 通过动态监测稻麦轮作周期内 N₂O 气体排放、测定土壤理化和氮循环相关功能基因丰度, 综合评估生物质炭对 N₂O 缓解的长期效应及其微生物机制, 以期为农业土壤施用生物质炭减排 N₂O 的措施提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

田间定位试验于江苏省南京市江宁区秣陵镇

(31°48'N, 118°50'E) 开展, 试验区为典型稻-麦轮作系统, 属亚热带季风气候区, 年均温与年均降雨量分别为 15.4℃和 1 050 mm。试验观测期内日降雨和日均温如图 1 所示。

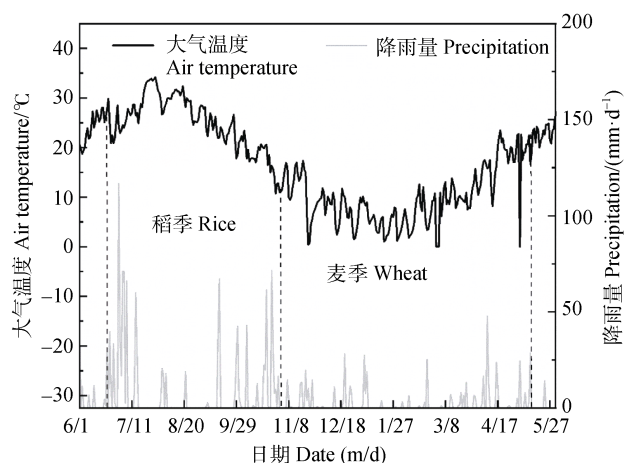


图 1 2017—2018 年水稻-小麦轮作周期内日降雨量和气温的动态变化

Fig. 1 Daily precipitation and temperature during the rice and wheat annual rotation cycle in 2017-2018

试验地土壤类型为水稻土, 质地为黏壤土, pH6.4、有机碳 $15.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全氮 $1.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全磷 $0.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全钾 $13.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、容重 $1.2 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 。试验供试生物质炭为 400°C 限氧条件下热解获得的小麦秸秆生物质炭, 基本性质: pH 9.2、全碳 $462.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全氮 $7.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、阳离子交换量(CEC) $24.3 \text{ cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、比表面积 $9 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ 、灰分 21.4%。

1.2 试验设计与管理

田间定位试验采用随机区组设计, 共设 5 个处理, 每个处理 3 次重复, 共 15 个小区, 分别为 CK (不施氮肥和生物质炭)、N (氮肥)、NB_{0y} (氮肥+新鲜生物质炭, 2017 年 6 月施入)、NB_{2y} (氮肥+2 年老化生物质炭, 2015 年 6 月施入) 和 NB_{5y} (氮肥+5 年老化生物质炭, 2012 年 6 月施入)。每个小区面积为 20 m^2 ($5 \text{ m} \times 4 \text{ m}$), 各小区之间设有 20 cm 宽、40 cm 深的水泥隔板和独立的灌水排水系统。

稻麦轮作田间管理措施与当地常规管理一致, 水稻季和小麦季施肥分为基肥和追肥, 其中尿素(以 N 计) $250 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, 以 4:3:3 (基肥:追肥:追肥) 的比例施入, 钙镁磷肥(以 P_2O_5 计) $60 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 和氯化钾(以 K_2O 计) $120 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 均作为基肥一次性施入。具体施肥日期见 Wu 等^[5]研究。生物质炭

分别于 2012 年、2015 年和 2017 年 6 月水稻移栽前一次性翻耕施入 $40 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$, 后续不再施用。

1.3 气体样品采集与测定

试验观测期(2017 年 6 月 17 日至 2018 年 5 月 22 日)采用静态暗箱法采集气体样品, 同时测定采样箱内温度, 施肥后和水稻烤田期每周观测 4~5 次, 其余时间每周至少观测 1 次。采样箱规格为 $43 \text{ cm} \times 43 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ (作物生长前期)或 $43 \text{ cm} \times 43 \text{ cm} \times 110 \text{ cm}$ (作物生长后期), 采样时间(特殊情况除外)集中于上午 8:00~11:00, 于采样箱密封后 0、10、20、30 min 用 20 mL 针筒采集气体样品, 返回实验室后立即用气相色谱仪(Agilent 7890A, Agilent Ltd, Shanghai, China)测定。按照吴震等^[17]提供的方法计算 N_2O 排放通量及其累积排放量。

1.4 土壤样品采集与测定

2017 年 10 月水稻和 2018 年 5 月小麦收获后, 各小区均按照五点取样法采集 0~20 cm 耕层土壤。采集的土壤样品一式两份: 一份存放于 4°C 用于土壤理化分析; 一份过 2 mm 筛, 存放于 -80°C 用于土壤 DNA 提取。土壤 pH 按水:土比 5:1 浸提, Mettler-Toledo pH 计(FE28, 上海)测定。土壤充水孔隙度(WFPS)经烘干法测定土壤质量含水后转换而得, 土壤铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)和硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)含量用 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 溶液浸提, 紫外分光光度计(HITACHI, UV-2900, Japan)测定。土壤有机碳(SOC)采用重铬酸钾氧化法, 全氮采用元素分析仪(Vario MAX, 艾力蒙塔, 德国)^[20]。

1.5 土壤 DNA 提取和 qPCR 定量分析

称取 0.5 g 土壤样品用 Fast DNA SPIN Kit 试剂盒(MP Biomedicals, Eschwege, Germany)提取 DNA, 采用 SYBR Premix Ex Taq TM 试剂盒分别对土壤微生物功能基因 *amoA*-AOA、*amoA*-AOB、*nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 进行定量分析。并将上述已知拷贝数的目的基因质粒 DNA 进行连续 10 倍梯度稀释后, 在 PCR 扩增仪 iCycler iQ5 (Bio-Rad, 美国)上进行荧光定量, 得到标准曲线(三次平行)。各基因定量 PCR 分析引物和反应条件见表 1 所示。

1.6 数据处理

采用 Microsoft Excel 2019 和 SPSS 22.0 (IBM Co, Armonk, NY, USA) 对数据进行统计分析; 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Turkey

表 1 荧光实时定量 PCR 扩增引物和反应条件

Table 1 The amplification primer and reaction condition of quantitative PCR

目的基因 Target gene	引物 Primer	引物序列 Sequence (3'-5')	反应过程 Thermal profile	参考文献 Reference
<i>amoA</i> -AOA	Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	30 个循环, 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s	[21-22]
	Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT		
<i>amoA</i> -AOB	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	72℃延伸 60 s	[23]
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
<i>nirS</i>	nirSCd3Af	G TSAACG TSAAGGASACSGG	30 个循环, 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s	[24-25]
	nirSR3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA		
<i>nirK</i>	nirKF1aCu	ATCATGGTCTGCCGCG	72℃延伸 60 s	[7]
	nirKR3Cu	GCCTCGATCAGRTTGTGGTT		
<i>nosZ</i>	nosZ-F	AGAACGACCAGCTGATCGACA		[16]
	nosZ-R	TCCATGGTGACGCCGTGGTTG		

比较法对各指标进行差异显著性分析 ($P < 0.05$); 并利用 Origin 2018 (Origin Lab, USA) 进行绘图。

2 结果

2.1 生物质炭对土壤理化性质的影响

如图 2 所示, 各处理对土壤理化性质的影响趋势稻麦两季基本一致。与 CK 处理相比, N 处理显著提高稻麦两季土壤 TN、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 含量。生物质炭处理较 N 处理显著提高 SOC 含量 35.6%~58.6%、TN 含量 8.4%~24.2%、NO₃⁻-N 含量 13.3%~31.3%, 降低 NH₄⁺-N 含量 4.2%~13.9%, 且 TN、NO₃⁻-N 含量随着生物质炭老化年限的增加而增加, NH₄⁺-N 含量则逐渐降低。

与 N 处理相比, 生物质炭处理显著提高麦季土壤 pH 0.53~1.17 个单位, 且均表现为 NB_{0y} > NB_{2y} > NB_{5y}, 并显著改善土壤充水孔隙度 (WFPS)。生物质炭处理较 N 处理相比, 显著提高土壤 SOC 含量 21.4%~35.4%、TN 含量 9.7%~30.5%、NO₃⁻-N 含量 1.7%~12.3%, 降低 NH₄⁺-N 含量 5.6%~25.3%, 且 TN、NO₃⁻-N、NH₄⁺-N 含量随生物质炭老化变化趋势与水稻季一致。综上所述, 生物质炭老化后对土壤养分含量仍具有显著影响, 但随着老化年限的增加其改善效果显著降低。

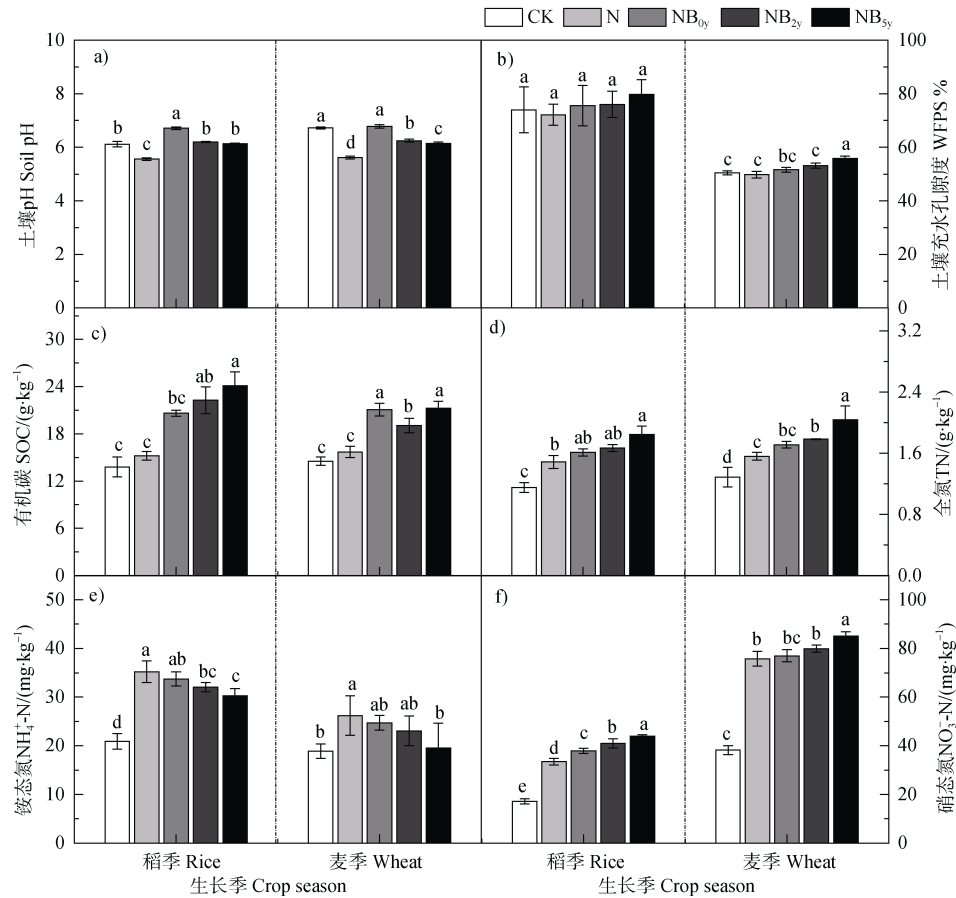
2.2 生物质炭对稻麦轮作系统 N₂O 排放的影响

由图 3 可知, 水稻季土壤 N₂O 排放通量仅在烤田期出现峰值, 且变化范围为 N 36.36~205.2 μg·m⁻²·h⁻¹。小麦季则在基肥和第二次追肥后出现两次峰值, 其变化范围分别为 N 21.58~735.8 μg·m⁻²·h⁻¹ 和 23.61~343.4 μg·m⁻²·h⁻¹。与 N 处理相比, 生物质炭处理可降低稻麦整个周期内 N₂O 排放通量, 且降低趋势为 NB_{0y} > NB_{2y} > NB_{5y}。

土壤 N₂O 累积排放量表现为 N 处理最高, 生物质炭处理随老化年限增加, N₂O 累积排放量增加, 且表现为麦季 > 稻季。与 N 处理相比, NB_{0y}、NB_{2y} 和 NB_{5y} 处理均显著降低 N₂O 累积排放量, 稻季分别显著降低 54.0%、39.4%和 35.5%, 麦季分别显著降低 44.6%、34.5%和 32.4%。综上所述, 老化生物质炭仍可在一定程度上降低土壤 N₂O 累积排放量, 但随着老化年限增加其减排能力有降低趋势。

2.3 生物质炭对 N₂O 排放相关功能基因丰度的影响

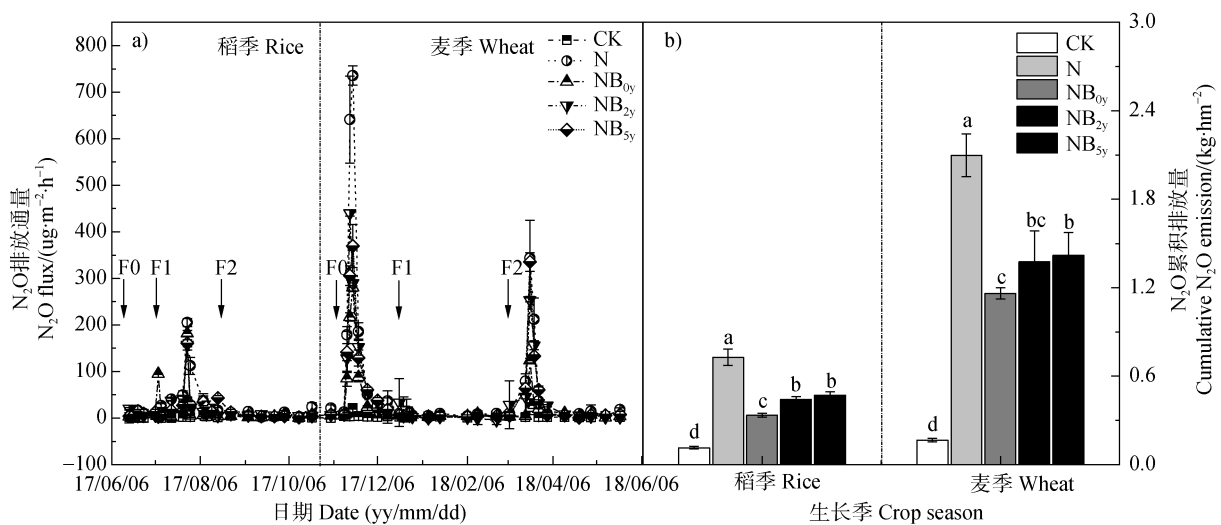
由图 4 可知, 与 CK 相比, 各处理均显著提高稻麦两季 *amoA*-AOA、*amoA*-AOB、*nirK*、*nosZ* 基因丰度, 而 *nirS* 基因丰度仅在麦季显著增加。与 N 处理相比, NB_{0y} 处理显著降低稻季 *amoA*-AOB 基因丰度 31.9%, 与 *amoA*-AOA 基因丰度无显著差异; 相反, NB_{5y} 处理显著提高 *amoA*-AOA 基因丰度 39.1%, 与 *amoA*-AOB 基因丰度无显著差异。生物质炭处理显著提高麦季 *amoA*-AOA 基因丰度



注: 无相同字母表示同一作物生长季内差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Different letters meant significant differences at 0.05 level within each crop season.

图 2 不同处理对 2017—2018 年稻麦轮作周期内土壤理化性质的影响

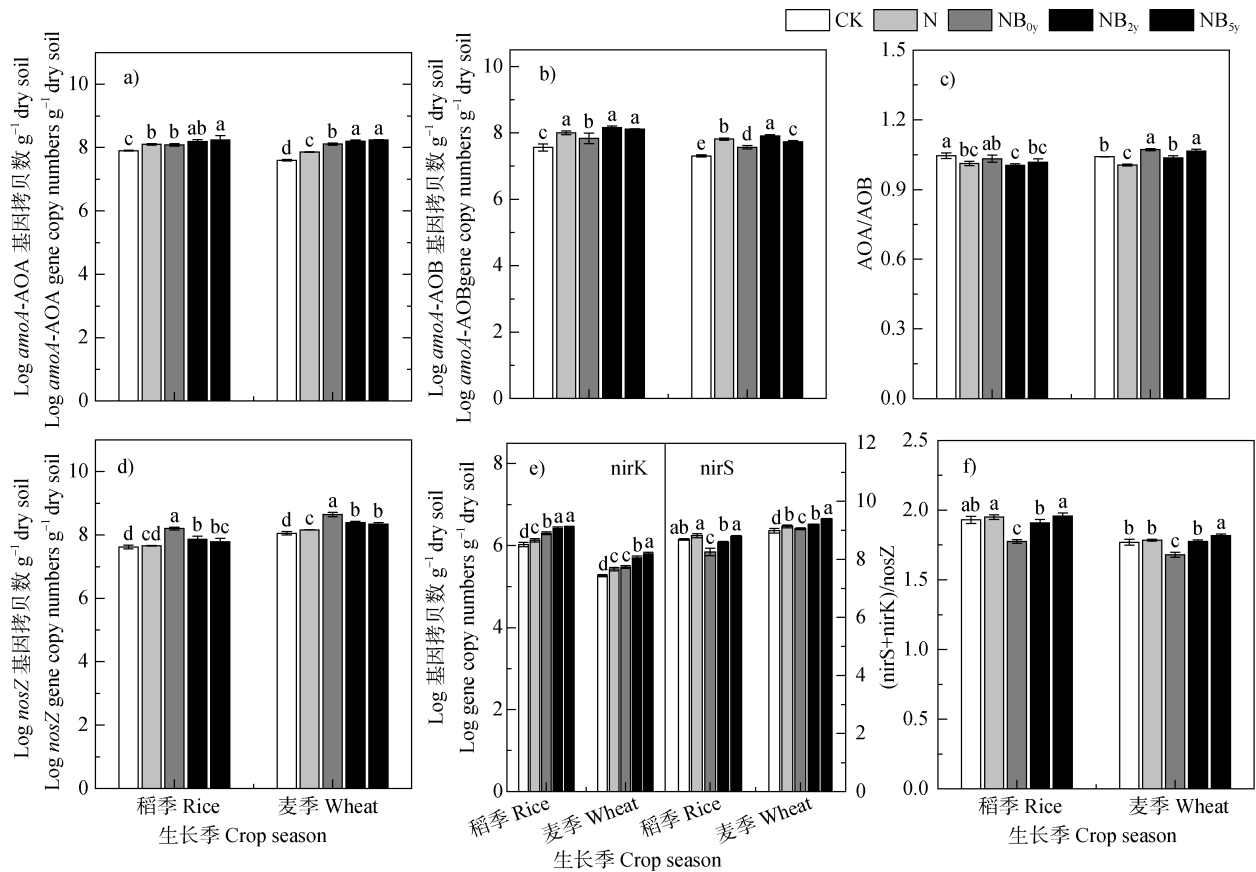
Fig. 2 Variation in soil physicochemical properties under different treatments during rice-wheat rotation cycle in 2017-2018



注: F0: 基肥 Basal fertilization; F1: 第 1 次追肥 First top-dressing; F2: 第 2 次追肥 Second top-dressing; 不同字母表示同一作物生长季内差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters meant significant differences at 0.05 level within each crop season.

图 3 不同处理 2017—2018 年稻麦轮作周期内 N_2O 通量动态和季节性累积排放量

Fig. 3 Flux dynamics and seasonal cumulative emissions of N_2O under different treatments during rice-wheat rotation cycle in 2017-2018



注：无相同字母表示同一作物生长季内差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters meant significant differences at 0.05 level within each crop season.

图 4 2017—2018 年稻麦轮作周期内不同处理 N₂O 排放相关功能基因丰度的变化

Fig. 4 Abundance of functional genes related to N₂O emissions under different treatments during rice-wheat rotation cycle in 2017-2018

79.2%~136.2%，而对 *amoA-AOB* 影响各异。与 N 处理相比，生物质炭处理对稻季 AOA/AOB 比值影响无显著差异，麦季则显著增加。

与 N 处理相比，生物质炭处理降低稻季 *nirS* 基因丰度 6.0%~72.0%，增加 *nirK* 和 *nosZ* 基因丰度 47.9%~110.5%和 33.7%~249.4%，且 *nirK* 基因增幅表现为 NB_{3y} > NB_{2y} > NB_{0y}，*nosZ* 则相反。麦季生物质炭处理较 N 处理分别增加 *nirS*、*nirK* 和 *nosZ* 基因丰度 -16.18%~80.58%、12.2%~138.1%和 54.88%~206.7%，且 *nirK* 和 *nosZ* 基因丰度增长趋势与稻季一致。与 N 处理相比，生物质炭处理均能降低稻麦两季 (*nirS+nirK*)/*nosZ* 比值，但随着生物质炭老化年限的增加逐渐增加。

2.4 N₂O 排放及相关功能基因与土壤理化性质的相关关系

由表 2 可知，稻季 N₂O 累积排放量与土壤 pH

呈显著负相关 ($P < 0.05$)，与 NO₃⁻-N 含量、NH₄⁺-N 含量、*amoA-AOA* 及 *amoA-AOB* 基因丰度呈显著正相关。*amoA-AOA* 与 *amoA-AOB* 基因丰度与 SOC、TN、NO₃⁻-N、NH₄⁺-N 含量均呈显著正相关 ($P < 0.01$)。土壤 pH 与 *nirS* 基因丰度呈极显著负相关，与 *nosZ* 基因丰度呈极显著正相关。*nirK* 基因丰度与 SOC、TN、NO₃⁻-N 含量均呈显著正相关。

由表 3 可知，同稻季结果一致，麦季 N₂O 累积排放量与土壤 pH 值呈显著负相关，与 NO₃⁻-N 含量及 *amoA-AOB* 基因丰度呈显著正相关 ($P < 0.01$)。*amoA-AOA* 和 *amoA-AOB* 基因丰度均与 TN、NO₃⁻-N 含量呈显著正相关，且仅 *amoA-AOB* 基因丰度与土壤 pH 值呈极显著负相关。*nirK*、*nirS* 及 *nosZ* 基因丰度与 SOC、TN、NO₃⁻-N 含量均呈显著正相关。

表 2 稻季土壤 N₂O 累积排放与氨氧化古菌基因、氨氧化细菌基因、亚硝酸盐还原酶基因、N₂O 还原酶基因及土壤理化性质之间的相关关系

Table 2 Correlation coefficients of soil physicochemical properties and cumulative N₂O emission, the abundance of ammonia-oxidizing archaea (*amoA*-AOA), ammonia-oxidizing bacteria gene (*amoA*-AOB), abundance of nitrite reductase (*nirS*, *nirK*) gene, N₂O reductase (*nosZ*) gene during the rice-growing season

	N ₂ O 累积排放 Cumulative N ₂ O emission	pH	土壤充水孔隙 度 WFPS%	有机碳 SOC	全氮 TN	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N
N ₂ O 累积排放	—	-0.594*	-0.029	0.155	0.461	0.774**	0.551*
<i>amoA</i> -AOA	0.552*	-0.005	0.304	0.714**	0.684**	0.571*	0.875**
<i>amoA</i> -AOB	0.687**	-0.163	0.365	0.646**	0.673**	0.644**	0.857**
<i>nirS</i>	0.368	-0.841**	-0.042	-0.224	-0.017	-0.159	-0.140
<i>nirK</i>	0.243	0.371	0.428	0.919**	0.825**	0.464	0.908**
<i>nosZ</i>	-0.108	0.798**	0.153	0.534*	0.374	0.460	0.484

注: *和**分别表示显著性水平在 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。Note: *indicates significant correlation at the 0.05 level and ** at the 0.01 level.

表 3 麦季土壤 N₂O 累积排放与氨氧化古菌基因、氨氧化细菌基因、亚硝酸盐还原酶基因、N₂O 还原酶基因及土壤理化性质之间的相关关系

Table 3 Correlation coefficients of soil physicochemical properties and cumulative N₂O emission, the abundance of ammonia-oxidizing archaea (*amoA*-AOA), ammonia-oxidizing bacteria gene (*amoA*-AOB), abundance of nitrite reductase (*nirS*, *nirK*) gene, N₂O reductase (*nosZ*) gene during the wheat-growing season

	N ₂ O 累积排放 Cumulative N ₂ O emission	pH	土壤充水孔隙 度 WFPS %	有机碳 SOC	全氮 TN	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N
N ₂ O 累积排放	—	-0.824**	0.073	0.249	0.452	0.460	0.800**
<i>amoA</i> -AOA	0.491	-0.118	0.709**	0.884**	0.885**	0.119	0.892**
<i>amoA</i> -AOB	0.832**	-0.696**	0.286	0.358	0.594*	0.410	0.819**
<i>nirS</i>	0.494	-0.472	0.793**	0.603*	0.764**	-0.158	0.713**
<i>nirK</i>	0.432	-0.278	0.867**	0.740**	0.892**	-0.111	0.804**
<i>nosZ</i>	0.207	0.326	0.353	0.822**	0.585*	0.214	0.630*

注: *和**分别表示显著性水平在 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 。Note: *indicates significant correlation at the 0.05 level and ** at the 0.01 level.

3 讨论

本研究结果表明, 稻季 N₂O 排放峰主要在烤田期, 而麦季则主要在施肥后, 且各处理麦季 N₂O 累积排放量均显著高于稻季, 同 Liu 等^[4]和 Wu 等^[5]研究结果一致。由于稻田长期处于淹水状态, 导致土壤通气性差, 氧浓度低, 反硝化作用进行完全, 进而减少了 N₂O 的排放^[26-27]。

与 N 处理相比, 无论是稻季还是麦季, 生物质炭处理均显著降低 N₂O 排放, 且减排效果表现为 NB_{0y} > NB_{2y} > NB_{5y} (图 3), 表明老化生物质炭对土壤 N₂O 排放的抑制作用降低。Liu 等^[28]研究表明生物质炭对 N₂O 排放的影响受生物质炭施用年限的影响, 与新鲜生物质炭相比, 田间老化两年后减排 N₂O 能力显著降低。老化生物质炭自身表面特性变化也与 N₂O 排放密切相关。本研究发现不同时间老化生

物质炭表面结构破坏严重, H 和 O 含量增加, 灰分含量降低(数据未发表)。Spokas 等^[18]室内分析指出田间老化生物质炭孔隙结构被堵塞、表面附着的硝化反硝化抑制剂被分解, 可能导致其对 N₂O 的吸附和抑制能力下降。另有研究发现生物质炭在田间老化后, 表面有明显覆盖层, 可吸附大量细颗粒, 增加硅、氧、铝等元素, 降低碳含量, 去除矿物覆盖层后与新鲜生物炭具有相似减排 N₂O 能力^[29]。老化生物质炭减排 N₂O 能力下降, 还可能与土壤 pH 有关。土壤 pH 是调节土壤 N₂O 排放的重要因素, N₂O 累积排放与土壤 pH 呈显著负相关(表 2、表 3)。与 N 处理相比, 生物质炭处理增加土壤 pH, 但增幅随老化年限的增加而降低。研究指出, 新鲜生物质炭表面有机酸在微生物作用下被分解, 导致土壤 pH 增加^[30], 促进电子向反硝化微生物转移, 有效降低 N₂O 的排放^[31]。随着生物质炭在田间自然老化, 表面灰分降解, 氧化和酸化作用使得生物质炭表面酸性含氧官能团羧基(-COOH)和羟基(-OH)等增加, 导致土壤 pH 下降, 可能会刺激 N₂O 排放^[29, 32]。

土壤无机氮含量的变化可能导致老化生物质炭减排 N₂O 能力下降。稻麦季土壤 N₂O 累积排放均与土壤 NO₃⁻-N 含量呈显著正相关, 仅稻季土壤 N₂O 累积排放还与土壤 NH₄⁺-N 含量呈正相关(表 2、表 3)。与 N 处理相比, 土壤 NH₄⁺-N 含量随着生物质炭的老化逐渐下降, 而 NO₃⁻-N 则逐渐增加。Duan 等^[19]对田间老化生物质炭进行剥离、室内重培养试验后发现, 老化生物质炭能够增加土壤总氮矿化、氮固持及硝化速率, 进而增加氮的生物有效性, 并指出老化生物质炭能够显著增加土壤硝化和反硝化作用对 N₂O 的排放。本研究基于田间原位观测发现, N₂O 排放可能与生物质炭的直接吸附作用导致 NH₄⁺-N 含量下降有关, 且伴随生物质炭老化, 表面酚基和羧基等酸性官能团增加, 吸附作用加强, 有利于减少硝化反应对 N₂O 的贡献^[33]。作为反硝化过程的底物和电子受体, 老化生物质炭表面氢键化学吸附加强, 增加 NO₃⁻-N 在土壤中的保留, 有效减少土壤 NO₃⁻-N 的淋溶, 又能促进反硝化作用 N₂O 的排放^[34]。老化生物质炭还通过影响硝化细菌反硝化过程降低 N₂O 排放^[35]。

生物质炭通过影响氮循环功能基因丰度影响土

壤 N₂O 排放。与 N 处理相比, NB_{0y} 处理显著降低 *amoA*-AOB 基因丰度, BN_{2y} 和 NB_{5y} 则有不同程度的增加; 生物质炭处理显著增加 *amoA*-AOA 丰度, 增长趋势为 NB_{5y} > NB_{2y} > NB_{0y}。已有研究表明, 中碱性土壤中硝化作用主要由 AOB 而不是 AOA 主导^[36]。因此, 新鲜生物质炭显著降低 N₂O 排放可能主要与 *amoA*-AOB 丰度降低有关。随着生物质炭老化, *amoA*-AOB 丰度显著增加。徐刚等^[37]认为生物质炭主要是通过吸附作用降低抑制 AOB 活性的酚类化合物, 促进硝化作用 N₂O 排放。Liu 等^[38]则认为生物质炭能够促进铵(NH₄⁺)转化为氨(NH₃), 为氨单加氧酶(AOM)催化提供足够的底物, 并能通过增加 AOA 和 AOB 丰度, 促进硝化过程进行。

与 N 处理相比, 随生物质炭老化, 土壤 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度逐渐增加(图 4)。通常认为 *nirK* 和 *nirS* 基因是反硝化过程中 N₂O 排放的主要贡献者。*nirK* 基因与 SOC 呈显著正相关(表 2、3), 已有研究表明富含有机分子的秸秆生物质炭会刺激 *nirK* 基因增加^[39], 且老化生物质炭会进一步提高 *nirK* 基因丰度^[19]。与 N 处理相比, 生物质炭处理增加了稻麦季土壤 *nosZ* 基因丰度, 且增幅表现为 NB_{0y} > NB_{2y} > NB_{5y}。Sun 等^[40]研究也发现生物质炭能够增加反硝化过程中 *nosZ* 基因丰度, 从而降低 N₂O 排放。*nosZ* 基因丰度与稻季土壤 pH 呈显著正相关(表 2)。Obia 等^[8]指出生物质炭诱导土壤 pH 增加, 会导致土壤中编码 N₂O 还原酶 *nosZ* 基因丰度增加, 使反硝化产物 N₂/N₂O 的化学计量比增加, 从而减少 N₂O 的排放。在田间自然条件下, 老化生物质炭 pH 显著降低, 对 *nosZ* 基因丰度影响减弱^[12], 导致其减排 N₂O 能力下降。 $(nirS+nirK)/nosZ$ 作为 N₂O 排放重要的指示指标, 随着生物质炭老化年限的增加, $(nirS+nirK)/nosZ$ 逐渐增加(图 4), 表明老化生物质炭减排 N₂O 的能力下降。

4 结 论

在稻-麦轮作周期内, 新、老生物质炭均能显著改善土壤理化特性, 降低土壤 N₂O 的排放; 随着生物质炭老化年限的增加, 土壤硝态氮含量及 $(nirS+nirK)/nosZ$ 比值逐渐增加, 从而导致生物质炭对土壤 N₂O 减排能力逐渐降低。本研究利用田间

定位试验在 2 年和 5 年的时间尺度上分析了老化生物质炭对稻麦轮作体系土壤 N_2O 排放的作用机理, 尚需从更长时间尺度探究自然老化生物质炭对 N_2O 排放的长期效应。

参考文献 (References)

- [1] Bolan N, Hoang S A, Beiyuan J Z, et al. Multifunctional applications of biochar beyond carbon storage[J]. *International Materials Reviews*, 2021: 1—51.
- [2] Cao W C, Song H, Wang Y J, et al. Key production processes and influencing factors of nitrous oxide emissions from agricultural soils[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2019, 25 (10): 1781—1798. [曹文超, 宋贺, 王娅静, 等. 农田土壤 N_2O 排放的关键过程及影响因素[J]. *植物营养与肥料学报*, 2019, 25 (10): 1781—1798.]
- [3] National Bureau of Statistics of China. China statistical yearbook[M]. Beijing: China Statistics Press, 2018. [国家统计局. 中国统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2020.]
- [4] Liu S W, Qin Y M, Zou J W, et al. Effects of water regime during rice-growing season on annual direct N_2O emission in a paddy rice-winter wheat rotation system in southeast China[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408 (4): 906—913.
- [5] Wu Z, Zhang X, Dong Y B, et al. Biochar amendment reduced greenhouse gas intensities in the rice-wheat rotation system: Six-year field observation and meta-analysis[J]. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2019, 278: 107625.
- [6] Cayuela M L, van Zwieten L, Singh B P, et al. Biochar's role in mitigating soil nitrous oxide emissions: A review and meta-analysis[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2014, 191: 5—16.
- [7] Harter J, Krause H M, Schuettler S, et al. Linking N_2O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8 (3): 660—674.
- [8] Obia A, Cornelissen G, Mulder J, et al. Effect of soil pH increase by biochar on NO , N_2O and N_2 production during denitrification in acid soils[J]. *PLoS One*, 2015, 10 (9): e0138781.
- [9] Yuan H J, Zhang Z J, Li M Y, et al. Biochar's role as an electron shuttle for mediating soil N_2O emissions[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2019, 133: 94—96.
- [10] Xie Z B, Liu Q. Rational application of biochar to sequester carbon and mitigate soil GHGs emissions: A review[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39 (4): 901—907. [谢祖彬, 刘琦. 生物质炭的固碳减排与合理施用[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39 (4): 901—907.]
- [11] Clough T, Condon L, Kammann C, et al. A review of biochar and soil nitrogen dynamics[J]. *Agronomy*, 2013, 3 (2): 275—293.
- [12] Yuan H J, Deng G S, Zhou S G, et al. Biochar ageing and its effects on greenhouse gases emissions: A review[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2019, 28 (9): 1907—1914. [袁海静, 邓桂森, 周顺桂, 等. 生物炭的老化及其对温室气体排放影响的研究进展[J]. *生态环境学报*, 2019, 28 (9): 1907—1914.]
- [13] Liu Y Y, Sohi S P, Jing F Q, et al. Oxidative ageing induces change in the functionality of biochar and hydrochar: Mechanistic insights from sorption of atrazine[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 249: 1002—1010.
- [14] Li B, Bi Z C, Xiong Z Q. Dynamic responses of nitrous oxide emission and nitrogen use efficiency to nitrogen and biochar amendment in an intensified vegetable field in southeastern China[J]. *GCB Bioenergy*, 2017, 9 (2): 400—413.
- [15] Duan M, Wu F P, Jia Z K, et al. Wheat straw and its biochar differently affect soil properties and field-based greenhouse gas emission in a Chernozemic soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2020, 56 (7): 1023—1036.
- [16] Wu Z, Zhang X, Dong Y B, et al. Microbial explanations for field-aged biochar mitigating greenhouse gas emissions during a rice-growing season[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25 (31): 31307—31317.
- [17] Wu Z, Dong Y B, Xiong Z Q. Effects of biochar application three-years ago on global warming potentials of CH_4 and N_2O in a rice-wheat rotation system[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29 (1): 141—148. [吴震, 董玉兵, 熊正琴. 生物炭施用 3 年后对稻麦轮作系统 CH_4 和 N_2O 综合温室效应的影响[J]. *应用生态学报*, 2018, 29 (1): 141—148.]
- [18] Spokas K A. Impact of biochar field aging on laboratory greenhouse gas production potentials[J]. *GCB Bioenergy*, 2013, 5 (2): 165—176.
- [19] Duan P P, Zhang X, Zhang Q Q, et al. Field-aged biochar stimulated N_2O production from greenhouse vegetable production soils by nitrification and denitrification[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 642: 1303—1310.
- [20] Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2000. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.]
- [21] Leininger S, Urlich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442 (7104): 806—809.
- [22] Schauss K, Focks A, Leininger S, et al. Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils[J]. *Environmental Microbiology*,

- 2009, 11 (2): 446—456.
- [23] Rothauwe 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63 (12): 4704—4712.
- [24] Michotey V, Méjean V, Bonin P. Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd₁* -denitrifying bacteria in environmental marine samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(4): 1564—1571.
- [25] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49 (3): 401—417.
- [26] Stein L Y. The long-term relationship between microbial metabolism and greenhouse gases[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28 (6): 500—511.
- [27] Yan X Y, Shi S L, Du L J, et al. N₂O emission from paddy soil as affected by water regime[J]. Acta Pedologica Sinica, 2000, 37 (4): 482—489. [颜晓元, 施书莲, 杜丽娟, 等. 水分状况对水田土壤 N₂O 排放的影响[J]. 土壤学报, 2000, 37 (4): 482—489.]
- [28] Liu H Y, Li H B, Zhang A P, et al. Inhibited effect of biochar application on N₂O emissions is amount and time-dependent by regulating denitrification in a wheat-maize rotation system in North China[J]. Science of the Total Environment, 2020, 721: 137636.
- [29] Wang L, Gao C C, Yang K, et al. Effects of biochar aging in the soil on its mechanical property and performance for soil CO₂ and N₂O emissions[J]. Science of the Total Environment, 2021, 782: 146824.
- [30] Hua Y, Zheng X B, Xue L H, et al. Microbial aging of hydrochar as a way to increase cadmium ion adsorption capacity: Process and mechanism[J]. Bioresource Technology, 2020, 300: 122708.
- [31] Cayuela M L, Sánchez-Monedero M A, Roig A, et al. Biochar and denitrification in soils: When, how much and why does biochar reduce N₂O emissions?[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 1732.
- [32] Wang L W, O'Connor D, Rinklebe J, et al. Biochar aging: Mechanisms, physicochemical changes, assessment, and implications for field applications[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54 (23): 14797—14814.
- [33] Mia S, Dijkstra F A, Singh B. Aging induced changes in biochar's functionality and adsorption behavior for phosphate and ammonium[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51 (15): 8359—8367.
- [34] Bai S H, Reverchon F, Xu C Y, et al. Wood biochar increases nitrogen retention in field settings mainly through abiotic processes[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2015, 90: 232—240.
- [35] Zhang Q Q, Wu Z, Zhang X, et al. Biochar amendment mitigated N₂O emissions from paddy field during the wheat growing season[J]. Environmental Pollution, 2021, 281: 117026.
- [36] Zhang H L, Sun H F, Zhou S, et al. Effect of straw and straw biochar on the community structure and diversity of ammonia-oxidizing bacteria and Archaea in rice-wheat rotation ecosystems[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 9367.
- [37] Xu G, Zhang Y, Wu Y, et al. Effects of biochar application on nitrogen and phosphorus availability in soils: A review[J]. Scientia Sinica: Vitae, 2016, 46(9): 1085—1090. [徐刚, 张友, 武玉, 等. 生物炭对土壤中氮磷有效性影响的研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46 (9): 1085—1090.]
- [38] Liu Q, Zhang Y H, Liu B J, et al. How does biochar influence soil N cycle? A meta-analysis[J]. Plant and Soil, 2018, 426 (1/2): 211—225.
- [39] Xiao Z G, Rasmann S, Yue L, et al. The effect of biochar amendment on N-cycling genes in soils: A meta-analysis[J]. Science of the Total Environment, 2019, 696: 133984.
- [40] Sun X, Han X G, Ping F, et al. Effect of rice-straw biochar on nitrous oxide emissions from paddy soils under elevated CO₂ and temperature[J]. Science of the Total Environment, 2018, 628/629: 1009—1016.

(责任编辑：卢萍)