

# 添加生物炭改善菜地土壤氨氧化细菌群落并提高净硝化率

王先芳<sup>1</sup>, 任天志<sup>2\*</sup>, 智燕彩<sup>2</sup>, 张贵龙<sup>2</sup>, 李洁<sup>2\*</sup>, 王知文<sup>2</sup>

(1 东北农业大学资源与环境学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2 农业农村部环境保护科研监测所/天津市农业环境与农产品安全重点实验室, 天津 300191)

**摘要:**【目的】氨氧化过程是硝化作用的限速步骤, 对氮循环有着重要影响。本研究通过分析生物炭输入下土壤氨氧化微生物群落的变化, 揭示其影响土壤硝化作用的生物学机制。【方法】以华北潮土区设施菜地土壤为对象, 设置生物炭梯度 (C<sub>0</sub>、C<sub>0.5</sub>、C<sub>1.5</sub>、C<sub>4.0</sub>) 土壤培养试验, 结合 PCR 和 T-RFLP 等分析技术, 观测生物炭输入下土壤氨氧化细菌群落变化动态, 解析生物炭、土壤硝化作用与氨氧化细菌群落之间的关系。【结果】添加生物炭明显改变了土壤氨氧化微生物群落结构及氮素硝化过程。与未添加生物炭处理相比, 生物炭添加处理培养前期土壤氨氧化细菌群落 Shannon、Evenness 指数分别升高 5.4%~18.8%、26.2%~33.8%, 后期 Shannon 指数降低 20.7%~34.2%。生物炭输入对 AOA 群落没有明显影响, AOB 群落 256、58 bp 代表物种丰度分别增加 61.4%~56.0%、60.6%~78.6%, 488 bp 代表物种丰度降低 22.8%~26.9%。21 bp 代表物种丰度前期增加后期降低, 与 491 bp 代表物种丰度变化相反。添加生物炭土壤 AOB *amoA* 基因丰度增加 48.9%~53.2%。土壤 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量提高 1.7%~25.6%, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量下降 13.4%~31.1%, 土壤净硝化速率提高 21.8%~70.2%。【结论】生物炭的输入可以改善以 AOB 为主的土壤氨氧化微生物群落结构, 提高 *amoA* 酶活性, 但是对氨氧化古菌微生物群落结构未产生明显影响。因此, 生物炭提高土壤净硝化速率的作用与其对土壤氨氧化细菌群落和组成的影响密切相关。

**关键词:** 生物炭; 土壤; 氨氧化微生物; 硝化作用

## Biochar application improves ammonia oxidation microbial community and increases net nitrification in vegetable soils

WANG Xian-fang<sup>1</sup>, REN Tian-zhi<sup>2\*</sup>, ZHI Yan-cai<sup>2</sup>, ZHANG Gui-long<sup>2</sup>, LI Jie<sup>2\*</sup>, WANG Zhi-wen<sup>2</sup>

(1 College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

2 Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Tianjin Key Laboratory of Agro-Environment and Agro-Product Safety, Tianjin 300191, China)

**Abstract:** 【Objectives】Ammonia oxidation process is a rate-limiting step of nitrification and impacts the cycling of nitrogen in soil. By analyzing the changes of soil ammonia-oxidizing microbial communities under the input of biochar to reveal the influence of biochar input on soil nitrification and the biological mechanism. 【Methods】We set up biochar gradient (C<sub>0</sub>, C<sub>0.5</sub>, C<sub>1.5</sub>, C<sub>4.0</sub>) soil incubation experiments in northern meadow district. PCR and T-RFLP analysis technology were used for observation of ammonia oxidizing bacterial community dynamic under biochar input soil and analysis of the relationship among biochar, soil nitrification and ammonia oxidizing bacteria. 【Results】The addition of biochar significantly changed the ammonia oxidation microbial community structure and nitrogen nitrification process. Compared with C<sub>0</sub>, the Shannon and Evenness indices of the soil ammonia oxidizing bacteria community were increased by 5.4%–18.8%, 26.2%–33.8%, and the Shannon index were decreased by 20.7%–34.2% in late stage. The biochar input had no significant effect on the AOA community.

收稿日期: 2019-07-01 接受日期: 2019-09-12

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程; 国家重点研发计划课题 (2018YFD0800404); 国家自然科学基金项目 (41571292)。

联系方式: 王先芳 E-mail: wxfdel63yx@163.com

\* 通信作者 任天志 E-mail: rentianzhi@caas.cn; 李洁 E-mail: lijie@caas.cn

In the community of AOB, 256 bp and 58 bp represented species abundance were increased by 61.4%–56.0%, 60.6%–78.6%, and 488 bp represented species abundance decreased by 22.8%–26.9%. 21 bp represented species abundance increase at early stage and decrease at the later stage, which was contrary to the change of 491 bp represented species abundance. In biochar added soil, the abundance of AOB *amoA* gene were increased by 48.9%–53.2%. The content of  $\text{NO}_3^-$ -N were increased by 1.7%–25.6%, the content of  $\text{NH}_4^+$ -N decreased by 13.4%–31.1%, and the net nitrification rate increased by 21.8%–70.2%. 【 **Conclusions** 】 The input of biochar improved the structure of soil ammonia-oxidizing microbial community dominated by AOB and stimulates the activity of *amoA* enzyme. However, it has no significant effect on the microbial community structure of ammonia-oxidizing archaea. The influence of biochar on soil net nitrification rate is closely related to the influence of biochar on soil ammonia-oxidizing bacteria community composition.

**Key words:** biochar; soil; ammonia oxidizing microorganism; nitrification

生物炭作为一种富碳的多功能材料, 输入土壤后可为微生物提供栖息场所, 丰富碳氮源, 影响其生长繁殖<sup>[1-3]</sup>。研究表明, 水稻土中施用小麦秸秆生物炭 (350℃~550℃), 短期内显著改变了黄棕壤和潮土的微生物群落结构, 其中黄棕壤的微生物丰富度和多样性显著提高<sup>[4]</sup>。在红壤、棕壤和盐渍土施用水稻秸秆生物炭不同程度地增加了硫杆菌 (*Thiobacillus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) 和黄杆菌 (*Flavobacterium*) 在土壤中的相对丰度和分布<sup>[5-6]</sup>。土壤微生物是农田土壤养分循环的重要驱动者, 其中氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) 是氮素转化过程中的关键微生物<sup>[7-8]</sup>。在森林土壤中, 已经发现 AOB 的 *amoA* 基因的丰度和硝化速率随着木屑生物炭的添加而增加<sup>[9-10]</sup>。有研究结果显示, 同时添加尿素和玉米秸秆生物炭显著提高了土壤中 AOB、AOA 的 *amoA* 硝化基因及 *nirS*、*nirK*、*nosZ* 型反硝化基因的丰度<sup>[11]</sup>。生物炭还可以通过提高土壤 pH 等环境因子和催化铵态氮的氧化过程等来促进硝化作用<sup>[9,12]</sup>。然而, 也有研究发现, 施加生物炭对土壤的硝化作用不产生显著影响, 甚至产生抑制作用, 认为生物炭中含硝化抑制化合物 ( $\alpha$ -pinene 烯)、微生物毒性芳香类化合物 (PHCs) 等物质, 对 AOB 等微生物生长活动造成不利影响<sup>[13-14]</sup>。不同原料、热解工艺等制备的生物炭的理化性质差异较大<sup>[15]</sup>, 如玉米秸秆生物炭、木屑生物炭、花生壳生物炭等不同材料生物炭本身的理化性状<sup>[16]</sup>、吸附特征<sup>[17]</sup>、有害物质释放量<sup>[18]</sup>等存在差异, 高温热解生物炭多呈碱性、灰分成分较少, 低温热解生物炭多呈中性或弱碱性, 灰分成分多<sup>[19]</sup>。另外, 不同的添加量、土壤类型等<sup>[5]</sup>也可能导致不同的效应。

菜地作为一种农田利用类型, 耕作方式、栽培管理等有别于粮田, 土壤养分循环及生物群落结构

等性状有一定的特异性<sup>[20]</sup>。探索生物炭施用条件下菜地土壤微生物群落的变化特征, 解析其与氮素循环的关系, 对于丰富生物炭影响土壤肥力的认识具有积极意义。本研究以花生壳为原料, 在 600℃ 条件下厌氧热解制备生物炭, 设置梯度土壤培养试验, 结合 qPCR 和 T-RFLP 等分析技术, 观测生物炭输入条件下华北潮土设施菜地土壤氨氧化关键微生物群落及土壤硝化作用的变化, 解析生物炭、氨氧化微生物及硝化作用之间的关系, 以揭示生物炭对菜地土壤氮素转化的影响及机制, 为生物炭在菜地氮肥优化管理中的应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

供试土壤取自天津市静海区生宝谷物设施农业园区 (38.48° N、117.16° E) 的设施黄瓜菜地, 采样深度为耕层 0—20 cm。供试土壤理化性质: pH 7.87、电导率 2.68  $\mu\text{S}/\text{cm}$ 、铵态氮 28.6 mg/kg、硝态氮 191 mg/kg、有机碳 20.31 g/kg、全氮 16.96 g/kg、C/N 为 1.19。将采集的土壤挑去细根和石块, 分两部分保存, 一部分过 2 mm 筛用于培养试验; 另一部分经风干、研磨, 过 0.25、1 mm 筛后, 用于测定其基本理化性质。

### 1.2 生物炭的制备

以花生壳为原料, 研磨过 1 mm 筛后在 600℃ 条件下高温裂解制成生物炭, 后经酸洗再水洗至中性, 烘干研磨过 2 mm 筛, 密封保存备用。生物炭基本性质以及表面元素质量分数如表 1。

### 1.3 试验设计

将土壤在 25℃ 和 55% 的持水量 (WHC) 下预培

表 1 生物炭的组分分析和化学性质

Table 1 Basic properties of peanut shell biochar and mass fraction of surface elements

pH	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/kg)	CEC (cmol/k)	SSA (m <sup>2</sup> /g)	孔隙度 Porosity (nm)	灰分 (%) Ash	挥发分 (%) Volatile matter	固定碳 Fixed C (%)	
7.92	0.83	40.5	19.36	0.89	3.00	0.66	96.3	
相对原子比 Relative atomic ratio (%)								
C	H	O	S	P	Mg	Cl	K	Ca
80.74	0.98	15.43	0.07	0.18	0.48	0.34	0.8	1.05

注 (Note): SSA—比表面积 Specific surface area; CEC—阳离子交换量 Cation exchange capacity

养 7 天。称取 200 g 土壤, 设置 4 个梯度生物炭 0、0.5%、1.5%、4.0%, 分别标记为 C<sub>0</sub>、C<sub>0.5</sub>、C<sub>1.5</sub>、C<sub>4.0</sub>, 与等量尿素氮肥 (200 kg/hm<sup>2</sup>) 混合施入土壤, 设置 4 次重复, 放置于玻璃器皿 (高 20 cm、直径 5 cm) 中, 加水至田间最大持水量的 55%, 置于 25℃ 恒温培养。每隔两天用称重法加水, 在第 0、3、5、10、15、30、55、90 天进行取样, 取得的土样分别放置于 4℃、-20℃、-70℃ 保存, 用于各种指标测定。

#### 1.4 土壤理化性质测定

土壤含水量采用烘干法测定, 土壤有机质含量采用重铬酸钾容量法测定, 土壤 pH 采用电位法 (水土比 2.5:1), 土壤全氮含量采用消煮—流动分析法测定<sup>[21]</sup>。土壤硝态氮和铵态氮采用 0.01 mol/L CaCl<sub>2</sub> 浸提—流动分析法测定<sup>[22-23]</sup>, 并且根据 Persson 和 Wirén 等式计算净硝化率 (n)<sup>[24]</sup>:

$$n[\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})] = \frac{n_1 - n_2}{t}$$

式中,  $t$  为培养天数,  $n_1$  为土样 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 初始含量,  $n_2$  培养第  $t$  天时土样 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量。

#### 1.5 土壤总 DNA 提取

采用 Power Soil TM Total DNA Isolation 试剂盒 (Mo Bio Laboratories, Solana Beach, CA, USA) 提取土壤总 DNA。称取 0.25~0.50 g 保存于 -70℃ 冰箱

中的土壤样品, 按照试剂盒操作说明书进行提取, 最后用 100 μL ddH<sub>2</sub>O 洗脱获得 DNA 样品。所获得的土壤总 DNA 质量采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并保存于 -70℃ 中用于后续试验与分析。

#### 1.6 定量 PCR (qPCR) 分析

qPCR 反应体系中含上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、2 × PCR Master Mix 10 μL、模板 DNA 2 μL、补充 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL, 每个 DNA 样品各 3 次重复, 并设置无模板对照 (no template control, NTC)。对含有克隆 *amoA* 基因的线性化质粒进行 10 倍梯度连续稀释, 得到校准曲线。采用 PCR 效率为 90%~110%, 相关系数 > 0.98 的标准曲线。qPCR 引物信息和反应条件见表 2。

#### 1.7 末端片段长度多态性分析 (T-RFLP)

采用 T-RFLP 技术研究土壤 AOB 和 AOA 的 *amoA* 基因多样性变化, 引物分别为 *amoA*-1F/*amoA*-2R<sup>[25]</sup>和 Arch-*amoA*F/Arch-*amoA*R<sup>[26]</sup> (引物信息见表 2), 其中上游引物 *amoA*-1F 和 Arch-*amoA*F 的 5'端采用 6-羧基二乙酸荧光素 (FAM) 标记。PCR 反应体系包括: 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 2.5 μL, dNTP Mixture 2 μL, 模板 DNA 1 μL, 加灭菌水补至 25 μL, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒 (Promega, USA) 进行

表 2 qPCR 引物和反应条件

Table 2 qPCR primers and reaction conditions

目标基因 Target gene	引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 (°C) Annealing temperature	产物片段 <sup>[26]</sup> (bp) Product fragmentsize
氨氧化细菌 <i>amoA</i> (AOB)	<i>amoA</i> -1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	56	491
	<i>amoA</i> -2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
氨氧化古菌 <i>amoA</i> (AOA)	Arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	55	629
	Arch- <i>amoA</i> R	GCGGCCATCCATCTGTATGT		

纯化。

AOB PCR 产物纯化后用限制性内切酶 *Msp* I (TaKaRa) 进行酶切, AOA PCR 产物纯化后用限制性内切酶 *Hha* I (TaKaRa) 进行酶切, 酶切条件为 37℃ 3 h, 酶切产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行自动测序分析。数据分析时相差为 ± 1 bp 的片段归为同一 T-RF<sup>[27]</sup>, 参照 Lukow 等<sup>[28]</sup>的方法计算相对丰度 (Relative abundance, Ra), 所有 Ra 大于 1% 的 T-RFs 为有意义片段并用于 T-RFLP 分析, Ra 大于 10% 的 T-RFs 为该样品的优势种群<sup>[27-28]</sup>。生物多样性用 Shannon 指数 (*H*) 和 Evenness 指数 (*EH*) 评价。计算公式如下:

$$H = -\sum P_i \ln P_i$$

$$EH = H / \ln S$$

式中: *H* 为 Shannon 指数; *EH* 为 Evenness 指数; *S* 为不同片段的种类数; *P<sub>i</sub>* 为第 *i* 条片段峰面积占该样品总峰面积的比率。

### 1.8 统计分析

采用 MxPro-Mx 3005P v 4.00 (Agilent, USA) 软件收集 qPCR 反应数据, 并获得标准曲线。数据采用 Origin 9.1 和 SPSS 22.0 软件进行处理, 不同土壤样品之间的差异显著性用单因素 (One-Way ANOVA) 的 Duncan 法进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 添加生物炭对土壤 AOA 和 AOB 多样性的影响

施加生物炭显著改变土壤 AOB 多样性 (表 3)。与 CK (C<sub>0</sub>) 相比, 生物炭处理 (C<sub>0.5</sub>、C<sub>1.5</sub>、C<sub>4.0</sub>) 培养初期土壤 AOB Shannon 指数提高 5.4%~18.8%, Evenness 指数提高 26.2%~33.8%, 后期 Shannon 指

数下降 20.7%~34.2%。土壤 AOA 指数随生物炭的添加没有发生显著变化, 其对生物炭的输入响应不敏感。

### 2.2 添加生物炭对土壤 AOB 和 AOA 群落结构的影响

土壤 AOB 群落结构随生物炭的输入变化明显 (图 1), 与 CK 相比, 生物炭处理 256、58 bp 片段代表物种丰度培养前期 (0 天) 分别增多 61.4%~56.0%、60.6%~78.6%, 后期 (90 天) 分别增多 14.8%~65.1%、2.6%~65.7%, 488 bp 片段代表物种丰度前期降低 22.8%~26.9%, 后期中高量生物炭处理 (C<sub>1.5</sub>、C<sub>4.0</sub>) 检测不到丰度。中高量生物炭处理 491 bp 片段代表物种前期检测不到丰度后期增加。21 bp 片段代表物种丰度前期增多 1.7%~53.2%, 后期检测不到丰度。施用生物炭对土壤 AOA 群落结构的影响没有明显的规律性。

### 2.3 添加生物炭对氨氧化菌 *amoA* 基因丰度的影响

添加生物炭提高土壤氨氧化菌氨单加氧酶基因 *amoA* 丰度 (用基因拷贝数表示) (图 2)。培养初期 (0 天), 生物炭处理显著增加土壤氨氧化古菌 (AOA) *amoA* 基因的丰度, 与 CK (C<sub>0</sub>) 相比, 添加生物炭 0.5%、1.5% 和 4.0% 处理分别增加 26.3%、37.3%、40.2%; 随培养时间延长, 施加生物炭对 AOA *amoA* 基因丰度的增加作用减弱, 而对 AOB *amoA* 基因丰度增加作用逐渐增强; 培养后期 (90 天), 生物炭处理土壤氨氧化细菌 (AOB) *amoA* 基因丰度增加 48.9%~53.2%, 较 CK 平均增加  $6.23 \times 10^6$  copies/g 土, 添加中低量生物炭 (0.5%、1.5%) 处理的基因丰度显著高于高量生物炭 (4.0%) 处理。

### 2.4 添加生物炭对土壤无机氮含量的影响

由图 3 可见, 随着培养天数的延长, 各处理的

表 3 培养 0 和 90 天时 AOA 和 AOB 的 Shannon 指数和 Evenness 指数

Table 3 Shannon and evenness index of soil AOA and AOB at incubation of 0 and 90 days

培养天数 (d) Incubation day	AOA				AOB			
	C <sub>0</sub>	C <sub>0.5</sub>	C <sub>1.5</sub>	C <sub>4.0</sub>	C <sub>0</sub>	C <sub>0.5</sub>	C <sub>1.5</sub>	C <sub>4.0</sub>
	Shannon							
0	0.76 ± 0.23 a	0.81 ± 0.09 a	0.77 ± 0.19 a	0.84 ± 0.16 a	1.28 ± 0.56 c	1.49 ± 0.07 ab	1.52 ± 0.08 a	1.35 ± 0.01 b
90	1.08 ± 0.26 a	1.08 ± 0.03 a	0.95 ± 0.05 a	1.04 ± 0.02 a	2.66 ± 0.04 a	2.11 ± 0.10 ab	1.90 ± 0.07 bc	1.75 ± 0.10 c
	Evenness							
0	0.53 ± 0.12 a	0.52 ± 0.03 a	0.54 ± 0.06 a	0.54 ± 0.08 a	0.65 ± 0.03 b	0.82 ± 0.04 a	0.84 ± 0.02 a	0.87 ± 0.04 a
90	0.68 ± 0.32 a	0.61 ± 0.01 a	0.61 ± 0.03 a	0.69 ± 0.03 a	0.86 ± 0.01 a	0.79 ± 0.04 a	0.84 ± 0.01 a	0.78 ± 0.02 a

注 (Note): 同行数据后不同字母表示同一时间不同生物炭添加量间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Values followed by different small letters in a row indicate significant difference among different biochar addition amounts at the same time ( $P < 0.05$ ).

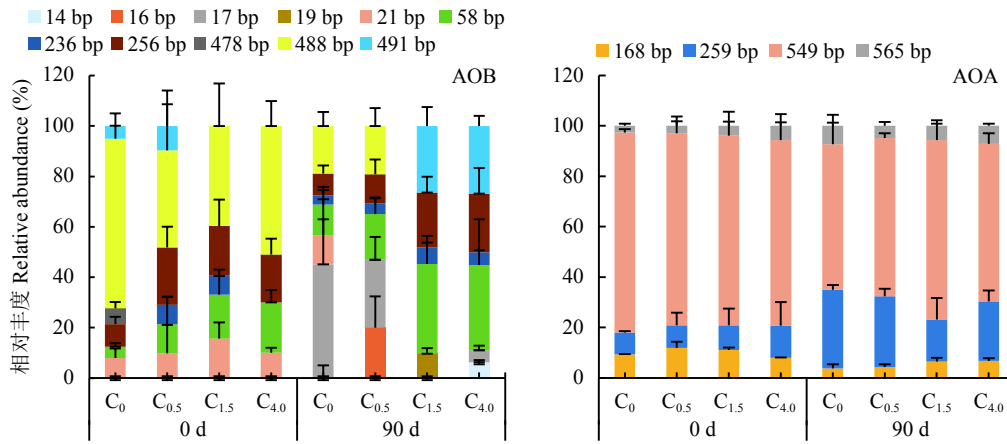


图 1 生物炭处理下土壤 AOB 和 AOA 的限制性酶切片段相对丰度

Fig. 1 Average relative abundance of AOB and AOA T-RFs in soils applied with biochar

[注 (Note) : 图中相对丰度代表每个片段代表物种的相对丰度

The relative abundance in the figure represents the relative abundance of each species represented by the fragment.]

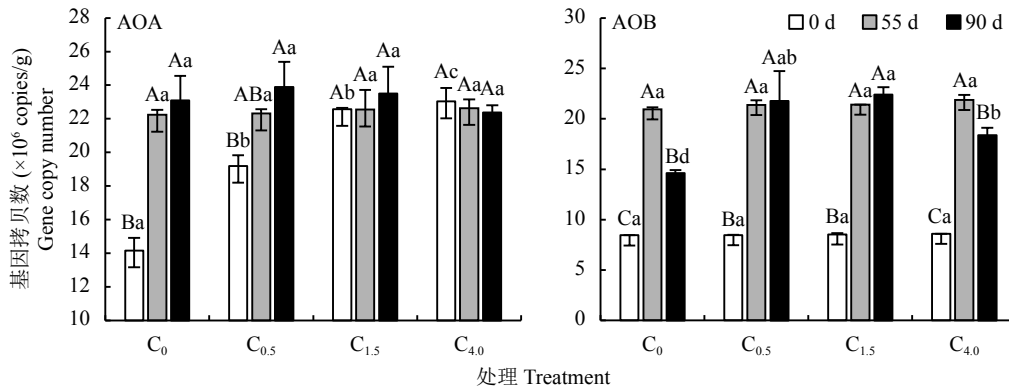


图 2 生物炭处理土壤在不同培养天数 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数

Fig. 2 *amoA* gene copies of AOA and AOB in soils applied with biochar at different incubation days

[注 (Note) : 柱上不同小写字母表示同一培养时间不同生物炭添加量间差异显著, 不同大写字母表示同一生物炭添加量下不同培养天数间差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different lowercase letters above the bars indicate significant difference among different biochar addition amounts, and different capital letters indicate significant difference among different incubation days under the same biochar addition amount ( $P < 0.05$ ).]

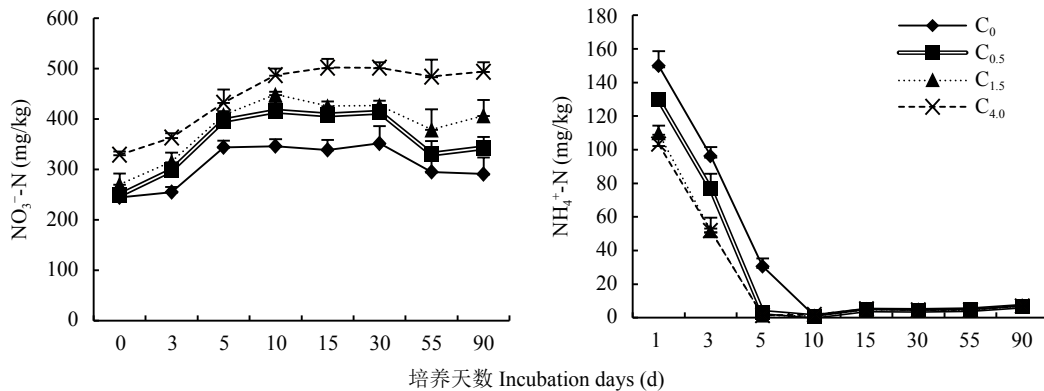


图 3 生物炭处理下土壤  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度随培养天数的变化

Fig. 3 Dynamics of soil  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  and  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  concentrations under differnt biochar treatments with incubation days



土壤硝态氮 ( $\text{NO}_3^-$ -N) 含量增加而铵态氮含量急速下降, 添加生物炭的处理较  $\text{C}_0$  处理  $\text{NH}_4^+$ -N 下降了 13.4%~31.1%。 $\text{C}_{0.5}$ ~ $\text{C}_{4.0}$  处理土壤  $\text{NO}_3^-$ -N 含量始终高于  $\text{C}_0$ , 提高了 1.7%~25.6%, 且呈现随生物炭施用量增加而升高的趋势, 其中,  $\text{C}_{4.0}$  处理在整个培养期间的  $\text{NO}_3^-$ -N 含量始终明显高于对照处理, 而  $\text{C}_{0.5}$  和  $\text{C}_{1.5}$  从第 3 天后开始明显高于对照处理。 $\text{C}_{4.0}$  处理的  $\text{NO}_3^-$ -N 含量除第 5 天时与其他生物炭处理无明显差异外, 其余培养天数均与其他生物炭处理有明显差异。培养期间土壤  $\text{NO}_3^-$ -N 含量呈“抛物线”式变化, 前期升高, 中期稳定在一定水平, 后期下降。

### 2.5 添加生物炭对土壤净硝化速率的影响

施用生物炭显著加快土壤净硝化速率, 但不同时期生物炭用量处理效果不同 (图 4)。土壤净硝化速率随培养时间呈先升后降“单峰”曲线变化。培养早期 (3~5 天),  $\text{C}_{0.5}$ ~ $\text{C}_{4.0}$  处理土壤净硝化速率平均较  $\text{C}_0$  提升 21.8%~70.2%,  $\text{C}_{0.5}$  和  $\text{C}_{1.5}$  处理提升的幅度较大; 培养中期 (10~30 天), 施加生物炭处理净硝化速率平均提升 35.3%~42.1%, 3 个施生物炭处理间没有显著差异; 培养后期 (55~90 天),  $\text{C}_{4.0}$  处理土壤净硝化速率仍显著高于  $\text{C}_{0.5}$  和  $\text{C}_0$ , 而  $\text{C}_{1.5}$  与  $\text{C}_{0.5}$  和  $\text{C}_0$  没有显著差异。

## 3 讨论

氨氧化作用是土壤氮素硝化作用的第一步, 也是氮素转化的关键环节, 其中, 氨氧化细菌 (AOB) 和氨氧化古菌 (AOA) 是主要驱动者, 近年来, 科学

家又发现一类全程硝化菌 (Comammox), 可直接将氨氧化为硝酸盐<sup>[29]</sup>, 相关文献已经报道 Comammox 在自然和人工系统环境中分布广泛<sup>[30]</sup>。生物炭含少量易分解有机物质, 输入土壤可为微生物活动提供碳、氮源。施加生物炭极大地丰富了土壤孔隙结构, 也可为菌根和细菌等微生物提供生存和繁殖场所, 促进特殊类群土壤微生物栖息生长<sup>[31]</sup>, 提高了土壤 AOA 和 AOB 的基因丰度, 并在一定程度上改变 AOA 和 AOB 群落结构<sup>[32-33]</sup>。农田土壤中施入花生壳生物炭, 显著增加土壤 AOB 的基因丰度和群落多样性<sup>[34-35]</sup>; 但也有研究表明, 生物炭输入会增加油菜地土壤和红砂土中的 AOB 的丰度, 抑制 AOA 丰度或增加 AOA 丰度, 降低 AOB 的丰度<sup>[36-37]</sup>。本研究中生物炭施用仅明显改变了土壤 AOB 多样性和群落结构, 但没有引起 AOA 群落发生显著的规律性变化。说明不同土壤环境对生物炭的输入响应趋势不同, 一般认为 AOB 群落较适应碱性环境<sup>[34]</sup>, AOA 较适应酸性环境<sup>[35]</sup>, 另外不同原料生物炭、施用量及土壤不同等也影响作用效果<sup>[38-39]</sup>。因此, 本研究中施加生物炭对硝化过程的促进, 主要还是由于生物炭输入刺激土壤氨氧化关键酶活性, 改变了氨氧化细菌群落结构。

本试验中, AOA 的 *amoA* 基因丰度仅在添加生物炭初期有一定的增加, 但 AOB *amoA* 基因丰度在整个培养期间均显著增加, 这与陈晨等<sup>[11]</sup>和刘杏认等<sup>[40]</sup>在菜地土壤中施加玉米秸秆生物炭的研究结果类似, 初期 AOA *amoA* 基因丰度增加可能与生物炭输入引起土壤短期内微环境变化有关, 如带入少量易分解物质<sup>[41]</sup>, 土壤含水量<sup>[42]</sup>、通气性<sup>[43]</sup>等的变化。

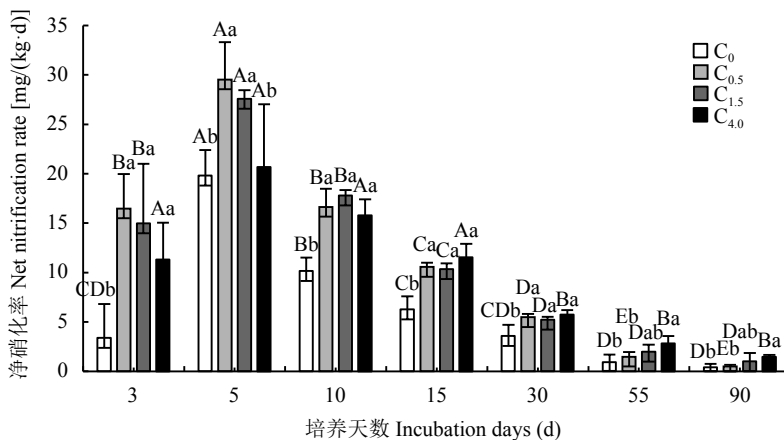


图 4 生物炭处理下土壤净硝化速率随培养时间的变化

Fig. 4 Changes of net nitrification rates in soils applied with biochar with incubation days

[注 (Note): 柱上不同小写字母表示同一培养时间不同生物炭添加量间差异显著, 不同大写字母表示同一生物炭添加量处理不同培养时间之间差异显著 ( $P < 5\%$ ) Different lowercase letters above the bars indicate significant difference among biochar amounts at the same incubation day, and different capital letters indicate significant difference among different incubation days under the same biochar addition amount ( $P < 5\%$ ).]

He 等<sup>[44]</sup>在酸性氧化土壤中施加花生壳生物炭,发现土壤硝化潜势(PNR)与 AOB 的 *amoA* 基因丰度显著正相关,但与 AOA 不相关。土壤的酸碱性、土壤与生物炭接触及生物炭老化程度等也是影响生物炭作用的主要因素,在中碱性氧化土中添加生物炭提高 AOA *amoA* 基因的丰度,高量(11.3 t/hm<sup>2</sup>)添加增加 AOB *amoA* 基因丰度,低量(2.25 t/hm<sup>2</sup>)添加没显著影响<sup>[44]</sup>, AOB *amoA* 基因丰度在生物炭附近的土壤中高于远离生物炭的土壤,而 AOA *amoA* 基因的丰度没有显著变化<sup>[46]</sup>。Duan 等<sup>[5]</sup>发现,在碱性土壤中施用老化生物炭增加 AOA *amoA* 基因的丰度。有研究认为,生物炭多呈碱性,输入后通过调节土壤 pH,引起 AOA *amoA* 和 AOB *amoA* 丰度变化, AOA *amoA*/AOB *amoA* 丰度值与土壤 pH 呈显著负相关,随着土壤 pH 的增加, AOB *amoA* 的丰度相应增加,而 AOA *amoA* 丰度逐渐降低<sup>[45-46]</sup>。可见,不同条件下,生物炭的输入引起 AOA *amoA* 和 AOB *amoA* 丰度响应趋势存在差异。

添加生物炭后土壤 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的含量在培养初期急剧下降, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的累积增加,加快土壤净硝化速率, Chen 等<sup>[6]</sup>和刘杏认等<sup>[40]</sup>的研究也有类似的结果,表明生物炭的输入显著促进了土壤氨氧化作用。这主要是生物炭输入改变了 AOB 群落多样性,增加了 AOB *amoA* 基因丰度。王晓辉等<sup>[39]</sup>研究表明,在设施栽培土壤的耕层土中施加水稻秸秆生物炭,使氨氧化细菌的丰度增加,导致了硝化潜势的增加。此外, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的累积也可以进一步提高 AOB 的活性<sup>[47]</sup>,进而提升净硝化速率。有研究认为,生物炭的添加吸附并富集土壤 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N,一定程度丰富了硝化作用的底物<sup>[48]</sup>,进而提高硝化势,并且有研究表明,生物炭的孔隙结构有利于 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 在土壤中停留<sup>[49]</sup>,土壤和作物根系对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的吸收促进了土壤有机氮的矿化<sup>[50]</sup>,丰富了氨氧化微生物作用的底物 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 增加,进而提升 AOB 丰度,形成良性的循环<sup>[51]</sup>。土壤中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的累积上升除了硝化作用的来源外,也可能由于施加生物炭后,生物炭老化过程中,表面官能团断裂,暴露较多 H 键,增加了对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 化学吸附,减少土壤 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的损失<sup>[52]</sup>,表现 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 净累积增加。氮素在土壤中的迁移转化过程十分复杂,明确其具体机制还需要形成一个完整体系。

## 4 结论

经过 90 天的培养后,添加生物炭主要改变了土壤 AOB 群落多样性与组成,增加了 AOB 数量,促

进了硝化作用,而对 AOA 群落无明显影响。因此 AOB 的丰度增加及其群落结构的改变是生物炭促进菜地土壤硝化作用的主要原因。

## 参 考 文 献:

- [1] Nguyen T T N, Wallace H M, Xu C Y, *et al.* The effects of short term, long term and reapplication of biochar on soil bacteria[J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 636: 142–151.
- [2] Quilliam R S, Glanville H C, Wade S C, Jones D L. Life in the ‘charosphere’ - Does biochar in agricultural soil provide a significant habitat for microorganisms[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 65: 287–293.
- [3] Sasidharan S, Torkezaban S, Bradford S A, *et al.* Transport and retention of bacteria and viruses in biochar-amended sand[J]. *The Science of the Total Environment*, 2016: 548–549.
- [4] 张梦阳,夏浩,吕波,等. 短期生物炭添加对不同类型土壤细菌和氨氧化微生物的影响[J]. *中国农业科学*, 2019, 52(7): 1260–1271. Zhang M Y, Xia H, Lü B, *et al.* Short-term effect of biochar amendments on total bacteria and ammonia oxidizers communities in different type soils[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(7): 1260–1271.
- [5] Duan P P, Zhang X, Zhang Q Q, *et al.* Field-aged biochar stimulated N<sub>2</sub>O production from greenhouse vegetable production soils by nitrification and denitrification[J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 642: 1303–1310.
- [6] Chen Y N, Liu Y, Li Y P, *et al.* Influence of biochar on heavy metals and microbial community during composting of river sediment with agricultural wastes[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 347–355.
- [7] Jin T, Zhang T, Yan Q. Characterization and quantification of ammonia oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(3): 1167–1176.
- [8] Li M, Gu J D. Community structure and transcript responses of anammox bacteria, AOA, and AOB in mangrove sediment microcosms amended with ammonium and nitrite[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(22): 9859–9874.
- [9] Nelissen V, Rütting T, Huygens D, *et al.* Maize biochars accelerate short-term soil nitrogen dynamics in a loamy sand soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 55: 20–27.
- [10] 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[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(2): 321–332.
- [11] 陈晨,王春隆,周璐瑶,等. 施用生物炭和硝化抑制剂对菜地 N<sub>2</sub>O 排放和蔬菜产量的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2017, 40(2): 287–294. Chen C, Wang C L, Zhu L Y, *et al.* Effects of biochar and nitrification inhibitor amendment on N<sub>2</sub>O emissions and vegetable yield under intensive vegetable production[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(2): 287–294.
- [12] Prommer J, Wanek W, Hofhansl F, *et al.* Biochar decelerates soil organic nitrogen cycling but stimulates soil nitrification in a

- temperate arable field trial[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9: e86388.
- [13] Cheng Y, Cai Z C, Chang S X, *et al.* Wheat straw and its biochar have contrasting effects on inorganic N retention and N<sub>2</sub>O production in a cultivated Black Chernozem[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(8): 941–946.
- [14] Clough T J, Bertram J E, Ray J L, *et al.* Unweathered wood biochar impact on nitrous oxide emissions from a bovine-urine-amended pasture soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2010, 74(3): 852–860.
- [15] 王茹, 侯书林, 赵立欣, 等. 生物质热解炭化的关键影响因素分析[J]. *可再生能源*, 2013, 31(6): 96–101.  
Wang R, Hou S L, Zhao L X, *et al.* Analysis on influence factors of biomass pyrolysis carbonization[J]. *Renewable Energy Resources*, 2013, 31(6): 96–101.
- [16] Uzoma K C, Inonu M, Andry H, *et al.* Effect of cow manure biochar on maize productivity under sandy soil condition[J]. *Soil Use and Management*, 2011, 27(2): 205–212.
- [17] 王章鸿, 郭海艳, 沈飞, 等. 热解条件对生物炭性质氮和磷吸附性能的影响[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(9): 2805–2812.  
Wang Z H, Guo H Y, Shen F, *et al.* Effects of pyrolysis conditions on nitrogen and phosphorus adsorption properties of biochar properties[J]. *Journal of Environmental Science*, 2015, 35(9): 2805–2812.
- [18] Taghizaden-Toosi A, Clough T J, Sherlock R R, *et al.* A wood based low-temperature biochar capture NH<sub>3</sub>-N generated from ruminant urine-N, retaining its bioavailability[J]. *Plant and Soil*, 2012, 353(1/2): 73–84.
- [19] 高德才, 张蕾, 刘强, 等. 旱地土壤施用生物炭减少土壤氮损失及提高氮素利用率[J]. *农业工程学报*, 2014, 30(6): 54–61.  
Gao D C, Zhang L, Liu Q, *et al.* Application of biochar in dryland soil to reduce soil nitrogen loss and increase nitrogen use efficiency[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30(6): 54–61.
- [20] 梅沛沛, 王永, 郭卫丽, 等. 设施菜地土壤基础养分含量分析[J]. *中国瓜菜*, 2019, 32(6): 48–52.  
Mei P P, Wang Y, Guo W L, *et al.* Analysis of soil nutrient content in vegetable greenhouse[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2019, 32(6): 48–52.
- [21] 南京农学院. 土壤农化分析[M]. 北京: 农业出版社, 1980.  
Nanjing Agricultural College. *Soil agrochemical analysis*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1980.
- [22] 谢涛, 郭小强. 连续流动分析仪测定土壤中的氨氮[J]. *科技创新导报*, 2013, (26): 109.  
Xie T, Guo X Q. Determination of ammonia nitrogen in soil by continuous flow analyzer[J]. *Science and Technology Innovation Herald*, 2013, (26): 109.
- [23] 武娟, 章明洪. AA3 型连续流动分析仪测定复混肥料中硝态氮[J]. *磷肥与复肥*, 2008, 23(6): 70–72.  
Wu J, Zhang M H. Determination of nitrate nitrogen in compound fertilizer by AA3 continuous flow analyzer[J]. *Phosphate & Compound Fertilizer*, 2008, 23(6): 70–72.
- [24] Persson T, Wirén A. Nitrogen mineralization and potential nitrification at different depths in acid forest soils[J]. *Plant and Soil*, 1995, 168(1): 55–65.
- [25] Wang Y, Ke X, Wu L. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32: 27–36.
- [26] Francis C A, Roberts K J, Beman J M. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 14683–14688.
- [27] Yuan H, Ge T, Wu X, *et al.* Long-term field fertilization alters the diversity of autotrophic bacteria based on the ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large-subunit genes in paddy soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(4): 1061–1071.
- [28] Lukow T, Dunfield P F, Liesack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure with in an agricultural soil planted with transgenic and no transgenic potato plants[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 32: 241–247.
- [29] Daims H, Lebedeva E V, Pjevac P, *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira bacteria*[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 504–509.
- [30] Hu H W, He J Z. Comammox-a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle[J]. *Journal of Soils & Sediments*, 2017, 17(12): 1–9.
- [31] Lecroy C, Masiello C A, Rudgers J A, *et al.* Nitrogen, biochar, and mycorrhizae: Alteration of the symbiosis and oxidation of the char surface[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 58: 248–254.
- [32] 刘远, 朱继荣, 吴雨晨, 等. 施用生物炭对采煤塌陷区土壤氨氧化微生物丰度和群落结构的影响[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(10): 3417–3423.  
Liu Y, Zhu J R, Wu Y C, *et al.* Effects of biochar application on the abundance and structure of ammonia-oxidizer communities in coal-mining area[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(10): 3417–3423.
- [33] He L, Liu Y, Zhao J, *et al.* Comparison of straw-biochar-mediated changes in nitrification and ammonia oxidizers in agricultural oxisols and cambosols[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52(2): 137–149.
- [34] Wang Z Y, Zheng H, Luo Y, *et al.* Characterization and influence of biochars on nitrous oxide emission from agricultural soil[J]. *Environmental Pollution*, 2013, 174: 289–296.
- [35] Wang Z Y, Zong H Y, Zheng H, *et al.* Reduced nitrification and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in acidic soil amended with biochar[J]. *Chemosphere*, 2015, 138: 576–583.
- [36] 章晓劼. 生物炭、水分和氮源对农田土壤 N<sub>2</sub>O 排放和相关微生物的影响[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2017.  
Zhang X J. Effect of incorporation of biochar, moisture content and nitrogen source on N<sub>2</sub>O emissions and related microorganisms' abundance in a farmland soil[D]. Hangzhou: MS Thesis of Zhejiang University, 2017.
- [37] Xu H J, Wang X H, Li H, *et al.* Biochar impacts soil microbial community composition and nitrogen cycling in an acidic soil planted with rape[J]. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(16):



- 9391–9399.
- [38] 刘帅. 典型生境中氨氧化古菌 (AOA) 和氨氧化细菌 (AOB) 的微生物生态学研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2015.  
Liu S. Microbial ecology of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in typical ecosystems[D]. Hangzhou: PhD Dissertation of Zhejiang University, 2015.
- [39] 王晓辉, 郭光霞, 郑瑞伦, 等. 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[J]. 土壤学报, 2013, 50(3): 624–631.  
Wang X H, Guo G X, Zheng R L, *et al.* Effect of biochar on abundance of N-related functional microbial communities in degraded greenhouse soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(3): 624–631.
- [40] 刘杏认, 赵光昕, 张晴雯, 田秀平. 生物炭对华北农田土壤 N<sub>2</sub>O 通量及相关功能基因丰度的影响[J]. 环境科学, 2018, 39(8): 3816–3825.  
Liu X R, Zhao G X, Zhang Q W, Tian X P. Effects of biochar on nitrous oxide fluxes and the abundance of related functional genes from agriculture soil in the north China plain[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(8): 3816–3825.
- [41] Hamer U, Marschner B, Brodowski S, Amelung W. Interactive priming of black carbon and glucose mineralisation[J]. *Organic Geochemistry*, 2004, 35(7): 823–830.
- [42] 陈静, 李恋卿, 郑金伟, 等. 生物质炭保水剂的吸水保水性能研究[J]. 水土保持通报, 2013, 33(6): 302–307.  
Chen J, Li L Q, Zheng J W, *et al.* Research on water retention capacity of water-retaining agent of PAM-biochar[J]. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2013, 33(6): 302–307.
- [43] Zwieten V L, Singh B, Joseph S, *et al.* Biochar reduces emissions of non-CO<sub>2</sub>GHG from soil[A]. Lehmann J, Joseph S. Biochar for environmental management[M]. London: Earthscan Publications, 2009. 227–249.
- [44] He L L, Bi Y C, Zhao J, *et al.* Population and community structure shifts of ammonia oxidizers after four-year successive biochar application to agricultural acidic and alkaline soils[J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 619–620: 1105–1115.
- [45] Yu M J, Meng J, Lu Y, *et al.* Changes in nitrogen related functional genes along soil pH, C and nutrient gradients in the charosphere[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 626–632.
- [46] Ball P N, MacKenzie M D, DeLuca T H, Holben W E. Wildfire and charcoal enhance nitrification and ammonium-oxidizing bacterial abundance in dry montane forest soils[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2010, 39(4): 1243–53.
- [47] 王小纯, 李高飞, 安帅, 等. 氮素形态对中后期小麦根际土壤氮转化微生物及酶活性的影响[J]. 水土保持学报, 2010, 24(6): 204–207, 245.  
Wang X C, Li G F, An S, *et al.* Effects of nitrogen forms on rhizosphere microorganisms and soil enzyme activity for nitrogen transform of wheat cultivar during elongation and grain filling stage[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2010, 24(6): 204–207, 245.
- [48] 王朝旭, 陈绍荣, 张峰, 崔建国. 玉米秸秆生物炭及其老化对石灰性农田土壤氨挥发的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(10): 2350–2358.  
Wang C X, Chen S R, Zhang F, Cui J G. Effects of fresh and aged maize straw-derived biochars on ammonia volatilization in a calcareous arable soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(10): 2350–2358.
- [49] Prendergast M T, Duvall M, Sohi S P. Biochar-root interactions are mediated by biochar nutrient content and impacts on soil nutrient availability[J]. *European Journal of Soil Science*, 2014, 65(1): 173–185.
- [50] Fiorentino N, Sánchez-Monedero M A, Lehmann J, *et al.* Interactive priming of soil N transformations from combining biochar and urea inputs: A <sup>15</sup>N isotope tracer study[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 131: 166–175.
- [51] 虞璐. 生物质炭对酸化土壤的改良效应及其对土壤硝化作用的影响[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2019.  
Yu L. The effect of biochar on acidic soil amelioration and soil nitrification[D]. Hangzhou: PhD Dissertation of Zhejiang University, 2019.
- [52] 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 and Biochemistry*, 2015, 90: 232–240.