

生物质炭对土壤N₂O消耗的影响及其 微生物影响机理

贺超卉, 董文旭, 胡春胜, 李佳珍

引用本文:

贺超卉, 董文旭, 胡春胜, 等. 生物质炭对土壤N₂O消耗的影响及其 微生物影响机理[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019, 27(9): 1301–1308.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.190175>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

氮肥水平对稻田细菌群落及N₂O排放的影响

Effect of nitrogen fertilizer level on bacterial community and N₂O emission in paddy soil

中国生态农业学报. 2017, 25(9): 1266–1275 <https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.170146>

转基因水稻秸秆还田对土壤硝化反硝化微生物群落的影响

Effect of transgenic rice straw return to soil on nitrification and denitrification microbial community

中国生态农业学报. 2018, 26(1): 8–15 <https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.170794>

种植行距和品种对玉米根际反硝化菌群丰度和功能的影响

Effects of row spacing and maize variety on abundance and function of denitrifying bacterial flora in maize rhizosphere

中国生态农业学报. 2017, 25(3): 391–399 <https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.160882>

不同生物质炭输入水平下旱作农田温室气体排放研究

Effect of different biochar application levels on greenhouse gas emissions in the Loess Plateau semi-arid environment in China

中国生态农业学报. 2016, 24(9): 1185–1195 <https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.151380>

生物炭和秸秆还田对干旱区玉米农田土壤温室气体通量的影响

Effects of biochar and straw on greenhouse gas fluxes of corn fields in arid regions

中国生态农业学报(中英文). 2019, 27(7): 1004–1014 <https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.190008>

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.190175

贺超卉, 董文旭, 胡春胜, 李佳珍. 生物质炭对土壤 N₂O 消耗的影响及其微生物影响机理[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019, 27(9): 1301-1308

HE C H, DONG W X, HU C S, LI J Z. Biochar's effect on soil N₂O consumption and the microbial mechanism[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2019, 27(9): 1301-1308

生物质炭对土壤 N₂O 消耗的影响及其 微生物影响机理*

贺超卉^{1,2,3}, 董文旭², 胡春胜^{2**}, 李佳珍^{2,3}

(1. 中国科学院大学中丹学院 北京 100049; 2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心/河北省土壤生态学重点实验室/中国科学院农业水资源重点实验室 石家庄 050022; 3. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要: 生物质炭在温室气体减排方面具有很大的发展前景, 它不仅能实现固碳, 对于在大气中停留时间长且增温潜势大的 N₂O 也能发挥积极作用。本研究采用室内厌氧培养试验, 按照生物质炭与土壤质量比(0、1%和 5%)加入一定量生物质炭, 土壤重量含水率控制在 20%。利用 Robotized Incubation 平台实时检测 N₂O 和 N₂ 浓度变化, 通过测定土壤中反硝化功能基因丰度(*nirK*、*nirS*、*nosZ*)分析生物质炭对 N₂O 消耗的影响及其微生物方面的影响机理。结果表明: 经过 20 h 厌氧培养后, 0 生物质炭处理的反硝化功能基因丰度(基因拷贝数·g⁻¹)分别为 6.80×10⁷(*nirK*)、5.59×10⁸(*nirS*)和 1.22×10⁸(*nosZ*)。与 0 生物质炭处理相比, 1%生物质炭处理的 *nirS* 基因丰度由最初的 2.65×10⁸ 基因拷贝数·g⁻¹ 升至 7.43×10⁸ 基因拷贝数·g⁻¹, *nosZ* 基因丰度则提高了一个数量级, 由 4.82×10⁷ 基因拷贝数·g⁻¹ 升至 1.50×10⁸ 基因拷贝数·g⁻¹, 然而 *nirK* 基因丰度并无明显变化; 5%生物质炭处理的反硝化功能基因丰度并未发生显著变化。试验结束时, 添加生物质炭处理的 N₂/(N₂O+N₂)比值也明显高于 0 生物质炭处理。相关性分析结果表明, *nirS* 基因丰度和 *nosZ* 基因丰度均与 N₂O 浓度在 0.01 水平上显著相关。试验末期 *nirS* 基因丰度和 *nosZ* 基因丰度均随着 N₂O 浓度的降低而升高。因此在本试验中, 添加 1%生物质炭可显著提高 *nirS* 和 *nosZ* 基因型反硝化细菌的丰度, 增大 N₂/(N₂O+N₂)比值, 促进 N₂O 彻底还原成 N₂。生物质炭对于 N₂O 主要影响机理是增大了可以还原氧化亚氮的细菌活性, 促进完全反硝化。

关键词: 生物质炭; 温室气体减排; 土壤微生物; N₂O 消耗; 反硝化; 基因丰度

中图分类号: S154.1; S154.36

文章编号: 2096-6237(2019)09-1301-08

开放科学码(资源服务)标识码(OSID):



Biochar's effect on soil N₂O consumption and the microbial mechanism*

HE Chaohui^{1,2,3}, DONG Wenxu², HU Chunsheng^{2**}, LI Jiazhen^{2,3}

(1. Sino-Danish College of University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 2. Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences / Hebei Laboratory of Soil Ecology / Key Laboratory of Agricultural Water Resources, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050022, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

* 国家重点研发计划项目(2017YFD0800601)和中国科学院重点项目(ZDRW-ZS-2016-5-1)资助

** 通信作者: 胡春胜, 主要研究方向为农田生态系统碳、氮、水循环及土壤生态过程。E-mail: cshu@sjziam.ac.cn
贺超卉, 主要研究方向为土壤氮循环过程。E-mail: Chaohui_He@outlook.com

收稿日期: 2019-03-08 接受日期: 2019-04-20

* This study was supported by the National Key Research and Development Project of China (2017YFD0800601) and the Key Program of Chinese Academy of Sciences (ZDRW-ZS-2016-5-1).

** Corresponding author, E-mail: cshu@sjziam.ac.cn

Received Mar. 8, 2019; accepted Apr. 20, 2019

Abstract: Biochar is a promising material for mitigating greenhouse gas emissions. In addition to carbon sequestration, it has positive effect on the ozone-depleting gas nitrous oxide (N_2O), which is with long residence time and strong warming potential. In this research effort, an anaerobic incubation experiment was conducted. Three treatments with different biochar application rates were set, taking account of biochar to soil ratio (w/w): 0 (0BC), 1% (1%BC) and 5% (5%BC). Soil gravimetric water content was controlled at 20%. According to the robotized incubation platform providing real-time determination of N_2O and N_2 concentrations and soil denitrification functional gene abundance measurement, we analyzed the impact of biochar on N_2O consumption and biological mechanisms. The main results indicated that after a 20-hour anaerobic incubation, the denitrification functional gene abundance of 0BC treatment was 6.80×10^7 (*nirK*), 5.59×10^8 (*nirS*), 1.22×10^8 (*nosZ*) gene copies per gram soil, respectively. Compared with 0BC treatment, the *nirS* gene abundance of 1%BC treatment increased from the initial 2.65×10^8 to 7.43×10^8 gene copies per gram soil, while, the *nosZ* gene abundance increased by an order of magnitude from 4.82×10^7 to 1.50×10^8 gene copies per gram soil. However, there was no significant change in *nirK* gene abundance. And the denitrification functional gene abundance of 5%BC treatment did not show marked variations. In conclusion, the $N_2/(N_2O+N_2)$ ratio of treatments with biochar application was clearly higher than 0BC treatment. The results of correlation analysis showed that *nirS* and *nosZ* gene abundance was significantly correlated with the N_2O concentration at 0.01 level, and the abundance of *nirS* and *nosZ* genes all increased as N_2O concentration declined at the end of the experiment. Therefore, in the present trial, a 1% biochar addition significantly increased the abundance of denitrifying bacteria with *nirS* and *nosZ* genotypes and $N_2/(N_2O+N_2)$ ratio, and promoted the complete reduction of N_2O to N_2 . The main mechanism of the biochar effect on N_2O emission was the enhanced reduction activities and gene expression of *nosZ*-containing microorganisms, resulting in complete denitrification.

Keywords: Biochar; Greenhouse gases emission reduction; Soil microbe; N_2O consumption; Denitrification; Gene abundance

全球温室气体中约有 8%是由 N_2O 组成的^[1], 由于广泛使用合成氮肥, 农业成为全球 N_2O 排放的主要来源, 农业源温室气体排放量占全球温室气体排放总量的 11%, 已超过 2020 年的排放目标^[2-3]。 N_2O 是一种强效温室气体, 在大气中的停留时间长达 114 年之久, 以 100 年计, 单位质量的 N_2O 增温潜势相当于 CO_2 的 298 倍^[4-5]。并且, 排放过多的 N_2O 到大气中会造成臭氧层破坏, 当其浓度高到一定程度时还会引发酸雨, 进而影响人类活动。目前大气 N_2O 浓度已经大幅上升, 从前工业化时代的 $270 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到现在的 $324 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[6]。虽然曾有研究表明 N_2O 可以通过非生物氧化还原过程产生^[7-8], 但其产生途径主要是由微生物利用土壤中的氮, 经过一系列反应产生的, 包含以下 3 个反应过程: 硝化、反硝化作用和硝酸盐异化还原^[9]。土壤中超过 2/3 的 N_2O 均来自于硝化与反硝化过程^[10], 每个过程排放的相对贡献不仅取决于土壤特征(土壤结构、可用碳源、pH、微生物活性), 还与外部环境条件密切相关(温度、降雨量等)。 N_2O 产生途径的复杂性以及空间和时间的不定性给减少土壤 N_2O 排放带来了巨大的挑战^[11]。

关于生物质炭的研究早在 19 世纪就已经开展, 最初是亚马逊河流域的印第安人在“Terra Preta”上种植农作物, 发现这种土壤可以提高粮食产量。经后面研究证实, 这种黑色土壤富含稳定的生物质炭, 是增加土壤肥力和粮食作物增产的主要原因^[12-14]。随着人们对生物质炭的认识不断深入, 它也逐渐被应用在

各个领域的研究当中。生物质炭是生物质在厌氧或无氧的密闭环境中高温热解(<700)生成的孔隙丰富、性质稳定、富含碳素并具有不同程度芳香化的固态物质^[15-16]。生物质炭能将植物光合作用所固定的有机碳转化为稳定的惰性碳, 使其不被微生物迅速矿化, 从而实现固碳减排。因此, 生物质炭对缓解全球变暖意义重大。

向土壤中添加生物质炭是目前控制土壤 N_2O 排放的重要措施, 首次关于生物质炭可减少土壤 N_2O 排放的报道是温室试验, 研究发现, 向种有黄豆(*Glycine max*)的土壤使用生物质炭后, N_2O 排放可减少 50%, 而对于腐殖生臂形草(*Brachiaria. humidicola*)草地, 减排效率则高达 80%^[17]。此后, 利用生物质炭减少土壤 N_2O 排放成为研究的热点, 并且众多研究者们也根据试验结果提出了不同的假设来解释这一现象。比如, 生物质炭可加强土壤的通气性, 增大土壤 pH, 有利于土壤固氮, 可与土壤中的有机碳和氮反应, 改良酶活性等。然而, 各种机理都存在一定的争议性。迄今为止, 关于生物质炭抑制农田 N_2O 排放的报道及相关研究日渐增加, 由于试验环境、土壤特性和生物质炭的制作条件不尽相同, 因此得出的结论也存在很大的差异。并且众多研究中的关注点都是 N_2O 排放, 少有针对 N_2O 从土壤排放后的消耗进行深入研究。所以本研究探究了添加不同量生物质炭对 N_2O 排放的影响, 同时通过检测不同处理中土壤反硝化功能基因 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 的丰度以

分析生物质炭的微生物作用机理。旨在研究生物质炭影响土壤 N₂O 排放的基础上进一步探讨排放之后的 N₂O 气体在生物质炭改良后的土壤中的微生物消耗机理, 以此从机理层面验证生物质炭对 N₂O 减排的积极作用及其环境效益。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤与生物质炭

选用表层 0~10 cm 的潮褐土(中国科学院栾城农业生态系统试验站, 37°53'N, 114°41'E), 自然风干后挑选出土壤中的植物残渣和石头等杂物, 过 2 mm 筛后避光保存以备用。试验所用生物质炭购买自陕西亿鑫生物能源科技开发有限公司, 最高热解温度(HTT)为 520 °C, 粒径 ≤ 2 mm, 以便与土壤充分混匀。

土壤 pH 用电位法测定。称取 10 g 风干土样于 50 mL 高型烧杯中, 加入 25 mL 蒸馏水, 用玻璃棒搅拌 1~2 min, 静置 30 min, 然后用便携式 pH 计(METTLER TOLEDO)测定上层清液的 pH。土壤总碳和总氮含量采用元素分析仪(vario MACRO cube; Elementar, Germany)测定。土壤有机质的测定采用重铬酸钾容量法-稀释热法。土壤容重采用环刀法测定。土壤孔隙度(P_t)计算如下^[18]:

$$P_t = 1 - D_b / \rho_d \quad (1)$$

式中: D_b 为土壤容重, ρ_d 为土壤比重。

根据上述方法, 本试验用土 pH 为 7.61, 土壤有机碳含量为 9.3 g·kg⁻¹, 全碳和全氮分别为 14.9 g·kg⁻¹ 和 1.0 g·kg⁻¹, 碳氮比是 9.30。土壤容重为 1.30 g·cm⁻³, 孔隙度为 50.94%。

1.2 试验设计

本试验为室内厌氧培养(含氧量为 0), 试验采用 120 mL 培养瓶, 所加土壤质量为 10 g, 按照生物质炭与土壤质量比加入一定量生物质炭[不添加生物质炭(0BC)、添加 1% 生物质炭(1%BC)和添加 5% 生物质炭(5%BC)], 并将土壤含水率调节为 20%, 每个处理设置 3 个重复。为防止小瓶漏气, 准备工作结束后盖上橡胶盖, 并用铝盖压紧密封。随后用真空抽气泵系统将每个小瓶中的空气置换为氦气, 制造厌氧环境。将小瓶内部气压与大气压平衡后, 使用注射器向培养瓶内注入 1 mL 的纯 N₂O 气体(99.8%), 利用 Robotized Incubation 平台实时测定培养瓶内的 N₂O 和 N₂ 浓度变化。为了比较灭菌与不灭菌之间的效果差异, 另外设置了两组灭菌试验, 灭菌温度为 130 °C, 时长为 1 h, 其生物质炭添加量为 0 和 5%, 其他条件和步骤均与不灭菌处理保持一致。试验共进行 20 h, 试验结束后取各重复的土壤样品, 用于后续的

测定。

1.3 土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 测定

试验结束后, 准确称取每个重复的 10.00 g 土样, 加入 50 mL 2 mol·L⁻¹ KCl 溶液浸提, 在振荡机上振荡 1 h, 取出静置并过滤。浸提液中的 NO₃⁻-N 使用紫外分光光度计(UV-2450, Shimadzu, Japan)测定, NH₄⁺-N 使用全自动化学分析仪(SmartChem 140, AMS Alliance, France)测定。

1.4 土壤微生物总 DNA 提取

为了探究生物质炭对土壤 N₂O 消耗的影响及其微生物方面的影响机制, 分别提取了培养前的干土和培养后各处理的土壤样品的 DNA, 提取方法按照 FastDNA Spin Kit for Soil (MP biomedical, USA)试剂盒的操作手册进行。提取后用微量紫外-可见光分光光度计(NanoDrop ND-2000c Technologies, Wilmington, DE)测定其浓度, 初步判断土壤微生物总 DNA 提取效果。随后将提取成功的土壤 DNA 保存至 -20 °C 条件下, 待定量 PCR 扩增时再取出依次将浓度稀释至 20 ng·μL⁻¹ 左右。

1.5 实时荧光定量 PCR

本试验主要分析的基因是土壤中亚硝酸盐还原酶编码基因(*nirK*、*nirS*)和 N₂O 还原酶编码基因(*nosZ*), 基因丰度以每种基因的拷贝数·g⁻¹(干土)表示。反硝化功能基因荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL, 包含 10 μL 2 × TB Green Premix Ex Taq (Takara Biotech, Dalian, China)、各 0.5 μL 的上游引物和下游引物(10 μmol·L⁻¹)、8 μL 超纯水和 1 μL 稀释的 DNA 模板。每种基因对应的引物分别是 F1aCu:R3Cu (*nirK*)^[19], cd3aF:R3cd (*nirS*)^[20-21], nosZ-F:nosZ-1622R (*nosZ*)^[20,22]。分别以含有亚硝酸盐还原酶基因(*nirK*、*nirS*)和一氧化二氮还原酶基因(*nosZ*)的重组 pGEM[®]-T 载体作为标准质粒, 然后计算出标准质粒的拷贝数, 按照 10 倍浓度梯度进行稀释, 并以 10⁸~10² 浓度梯度的标准质粒作为模板, 同时设置 3 个阴性对照, 和 DNA 模板同时在荧光定量 PCR 仪(CFX Connect[™], Bio-Rad, USA)进行定量 PCR 扩增。扩增程序为: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 30 s, 57 °C (*nirK*)、56.8 °C (*nirS*)、59 °C (*nosZ*)退火 40 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。

1.6 数据处理与分析

所有数据均使用 EXCEL 2016 和 IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS Inc., USA)进行处理与分析, 在 SPSS 中采用单因素方差分析, 处理间差异用 Duncan 法进行多重比较, 相关性分析使用 Pearson 法。绘图所用软件为 EXCEL 2016 和 OriginPro 9.0。

2 结果与分析

2.1 N_2O 和 N_2 浓度变化

在厌氧条件下经过 20 h 培养后, 灭菌处理后的土壤中 N_2O 浓度基本保持不变, 显著高于未经灭菌的土壤(图 1), 表明微生物在 N_2O 和 N_2 的转换过程充当重要角色。添加生物质炭时, N_2O 浓度的下降速率和 N_2 的生成速率大于 0BC 处理, 而且在室内培养 20 h 后, 添加 1% 和 5% 生物质炭处理的 N_2O 浓度由最初的近 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 基本降为零, 表明生物质炭可以促进土壤 N_2O 消耗过程。在试验末 1% 和 5% 生物质炭处理的 N_2 浓度稍高于 0BC 处理, 不过 3 个处理间

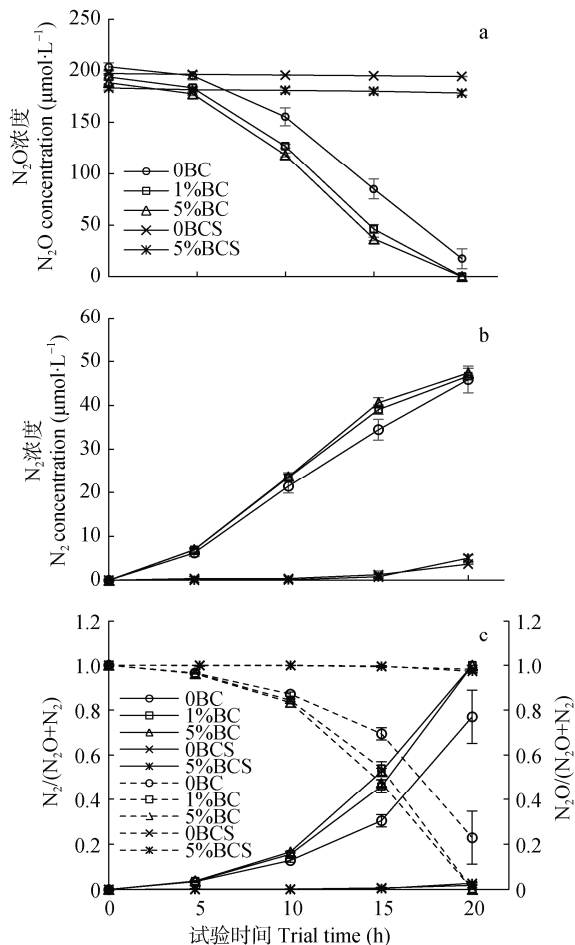


图 1 厌氧条件下添加生物质炭对土壤 N_2O (a)、 N_2 (b) 浓度及其所占比例(c)的影响[图 c 中, 实线为 $N_2/(N_2O+N_2)$ 的比值, 虚线为 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 的比值]

Fig. 1 Impact of biochar on soil concentrations of N_2O (a) and N_2 (b) and ratios of $N_2/(N_2O+N_2)$ and $N_2O/(N_2O+N_2)$ (c) under anaerobic condition [in figure c, the solid line shows the ratio of $N_2/(N_2O+N_2)$, the dashed line shows the ratio of $N_2O/(N_2O+N_2)$]

0BC: 0 生物质炭处理; 1%BC: 1% 生物质炭处理; 5%BC: 5% 生物质炭处理; 0BCS: 0 生物质炭+高压蒸汽灭菌处理; 5%BCS: 5% 生物质炭+高压蒸汽灭菌处理。0BC: 0 biochar application; 1%BC: 1% biochar application; 5%BC: 5% biochar application; 0BCS: 0 biochar application and autoclaving; 5%BCS: 5% biochar application and autoclaving.

的差异不大。由图 1c 可知, $N_2/(N_2O+N_2)$ 及 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 变化趋势基本一致, 意味着在本厌氧试验中, 注入的 N_2O 主要是被微生物通过反硝化过程转化为 N_2 。并且随着培养时间的延长, 不同处理之间的差异也逐渐变大。虽然灭菌处理后 N_2 浓度仍有小幅度上升, 这可能是土壤及土壤与生物质炭的混合物中存在某些化学还原过程, 将少量的 N_2O 还原成了 N_2 。

2.2 土壤 NH_4^+-N 和 $NO_3^- -N$ 含量变化

与试验初始含量相比, 所有处理的土壤 NH_4^+-N 含量都显著升高, 由最初的 $8.12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 左右升至 $19.69 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (0BC)、 $18.72 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (1%BC) 和 $13.97 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (5%BC), 而 $NO_3^- -N$ 含量则由 $6.11 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 降至 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 左右(表 1)。很明显, 此时占主导地位的是反硝化过程, 试验末反硝化过程的底物 $NO_3^- -N$ 基本被完全消耗了。随着生物质炭添加量的增加, 试验末 NH_4^+-N 含量呈现由高到低的趋势, $NO_3^- -N$ 含量大幅度下降, 这可能是在厌氧条件下, 反硝化作用强于硝化过程, 但是生物质炭本身经过高温裂解后可能含有某些有毒有机物, 会抑制微生物生长繁殖, 从而减弱反硝化作用, 使得最后 1% 和 5% 生物质炭处理的 $NO_3^- -N$ 含量稍高于 0BC 处理。此外, 土壤矿化作用及硝酸盐异化还原成铵(DNRA)的过程也会分别增加 NH_4^+-N 和减少 $NO_3^- -N$ 含量。

表 1 厌氧条件下添加生物质炭对试验前和试验末土壤 NH_4^+-N 和 $NO_3^- -N$ 含量的影响

Table 1 Impact of biochar on initial and final soil NH_4^+-N and $NO_3^- -N$ contents under anaerobic condition $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

	初始浓度 Initial content	试验末浓度 Ultimate content		
		0BC	1%BC	5%BC
NH_4^+-N	8.12 ± 0.18	$19.69\pm 0.29a$	$18.72\pm 0.38a$	$13.97\pm 0.22b$
$NO_3^- -N$	6.11 ± 0.10	$0.07\pm 0.01a$	$0.09\pm 0.01a$	$0.10\pm 0.01a$

0BC: 0 生物质炭处理; 1%BC: 1% 生物质炭处理; 5%BC: 5% 生物质炭处理。数据为 3 次重复的平均值加减标准误。同一行内不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平下差异显著。0BC: 0 biochar application; 1%BC: 1% biochar application; 5%BC: 5% biochar application. Values are means \pm S.E. ($n = 3$). Different letters within a row indicate significant differences at $P < 0.05$.

2.3 反硝化功能基因丰度

培养前后每克干土中反硝化功能基因的拷贝数变化如图 2 所示。培养试验开始前, 3 种反硝化功能基因丰度(基因拷贝数 $\cdot\text{g}^{-1}$)分别为 5.59×10^7 (*nirK*)、 2.65×10^8 (*nirS*) 和 4.82×10^7 (*nosZ*)。试验开始时 *nirS* 基因丰度比 *nirK* 及 *nosZ* 大一个数量级, 试验前后土壤中的 *nirS* 基因丰度变化也最为显著。经过 20 h 厌氧培养后, 0、1% 和 5% 生物质炭处理的 *nirK* 基因丰

度变化不大,与0BC处理相比,1%BC和5%BC处理的 *nirK* 基因丰度稍有下降,但是统计学上变化并不显著。而试验前后 *nirS* 及 *nosZ* 基因丰度均显著提高一倍以上,其中以添加1%生物质炭时基因丰度变化最明显。在1%BC处理中,*nirK* 基因丰度由最初的 5.59×10^7 基因拷贝数·g⁻¹ 提高至 6.24×10^7 基因拷贝数·g⁻¹,*nirS* 基因丰度则由 2.65×10^8 基因拷贝数·g⁻¹ 升至 7.43×10^8 拷贝数·g⁻¹,*nosZ* 基因丰度提高了一个数量级,由 4.82×10^7 基因拷贝数·g⁻¹ 升至 1.50×10^8 基因拷贝数·g⁻¹。

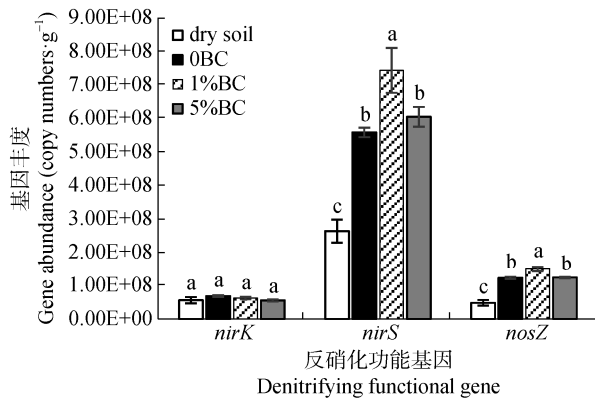


图2 厌氧条件下添加生物质炭对土壤反硝化功能基因丰度的影响

Fig. 2 Impact of biochar on functional gene abundance of denitrification under anaerobic condition

dry soil: 培养前土壤; 0BC: 0 生物质炭处理; 1%BC: 1% 生物质炭处理; 5%BC: 5% 生物质炭处理。不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平下差异显著。dry soil: soil before the experiment; 0BC: 0 biochar application; 1%BC: 1% biochar application; 5%BC: 5% biochar application. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

为进一步了解试验前后反硝化细菌与 N₂O 浓度之间的关系,对所有处理中的基因丰度与 N₂O 浓度数据汇总并进行了相关性分析,汇总结果如图 3 所示。字母“b”表示试验前,字母“a”表示试验后。试验初期由于注入了 1 mL 99.8% 的 N₂O 气体,培养瓶内 N₂O 浓度较大,在试验结束时,3 个生物质炭处理的 N₂O 浓度都明显下降,具体趋势如图 1a 所示。而随着 N₂O 浓度的下降各种反硝化菌基因丰度也出现不同程度的上升,其中 *nirS* 基因丰度变化最为明显。相关性分析显示,*nirS* 基因丰度和 *nosZ* 基因丰度均与 N₂O 浓度在 0.01 水平上显著相关,但是与 *nirK* 基因丰度之间无显著相关性。

3 讨论

亚硝酸盐还原酶(Nir)和氧化亚氮还原酶(Nos)是反硝化过程的关键酶,其中亚硝酸盐还原酶共有两种类型:一种是由 *nirK* 基因编码的^[23],还有一种则是由 *nirS* 基因编码的^[24],*nirK* 和 *nirS* 也是反硝化功能基因中被研究最多的基因^[25]。由 *nosZ* 基因编码

的氧化亚氮还原酶是反硝化作用的最后一步,将 N₂O 催化还原为 N₂。因为在土壤 pH ≤ 6.1 时,微生物很难产生氧化亚氮还原酶^[26],且对 O₂ 十分敏感^[27-28]。故本试验所用土壤 pH 为 7.61,培养环境为厌氧(充满氢气),排除 pH 和 O₂ 对生物质炭作用的影响。

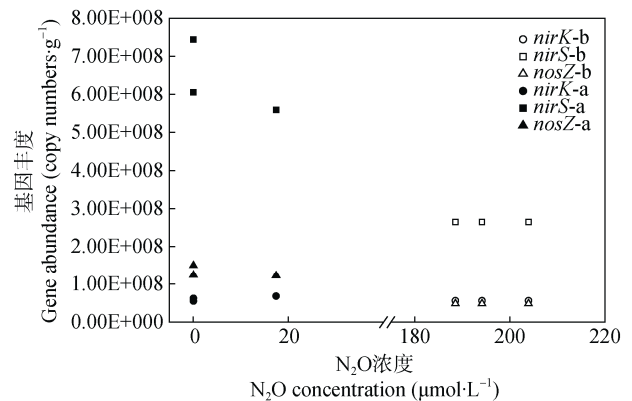


图3 厌氧条件下土壤反硝化 N₂O 浓度和反硝化功能基因丰度关系图

Fig. 3 Relationship between N₂O concentration and denitrification functional gene abundance of soil under anaerobic condition. Hollow symbols indicate gene abundance before the trial (a), filled symbols indicate gene abundance after the trial (b).

本试验结果显示向土壤中施加少量生物质炭可促进 N₂O 向 N₂ 的转化过程,增大 *nirS* 和 *nosZ* 反硝化基因丰度。经过 20 h 厌氧培养后,3 种不同生物质炭处理的 *nirS* 及 *nosZ* 基因拷贝数均显著提高一倍以上,然而 *nirK* 基因丰度稍有上升,但是统计学上变化并不显著。在添加 1% 生物质炭处理中,*nirK* 基因丰度变化不明显,*nosZ* 基因丰度则提高了一个数量级。与 0BC 处理相比,添加生物质炭处理可抑制 N₂O 浓度,并且反硝化功能基因丰度(*nirS* 和 *nosZ*)均高于 0BC 处理。除此之外,生物质炭对 N₂O 的抑制作用在很多学术报道中都有所体现^[18,29-32]。Anderson 等^[33]研究表明,向土壤中施加松木生物质炭后可增大反硝化菌(如 *Bradyrhizobiaceae*)的数量;Chen 等^[34]发现在水稻(*Oryza sativa*)田里施加生物质炭同样可以促进 *Bradyrhizobium* 的生长;但是也有研究者提出添加生物质炭并不会影响 *nosZ* 基因丰度^[35-36]。不过,生物质炭对 N₂O 的具体影响还取决于试验所处的环境及供试土壤和生物质炭类型,试验条件有利于硝化过程的进行或者使用粪肥生产的生物质炭则对 N₂O 排放无抑制作用。在本厌氧培养试验中,向土壤中添加生物质炭可促进 N₂O 转化为 N₂,显著提高 *nirS* 和 *nosZ* 基因型反硝化细菌的丰度,但是却降低了 *nirK* 基因丰度,虽然影响并不显著。这说明生物质炭主要是通过提高 *nosZ* 基因丰度促进完全反硝化过

程,通过微生物消耗途径使得注入培养瓶内的 N_2O 被还原成 N_2 。有研究表明,在堆肥过程中添加生物质炭可显著增大 *nirS* 和 *nosZ* 基因拷贝数,降低 *nirK* 基因丰度从而抑制 N_2O 排放,且在控制 N_2O 排放中起关键作用的是 *nirS* 和 *nosZ* 基因^[37],这与本试验相关性分析得出的结果相吻合,*nirS* 基因丰度和 *nosZ* 基因丰度均与 N_2O 浓度在 0.01 水平上显著相关。在试验后期,随着 N_2O 浓度的降低,*nirS* 基因丰度和 *nosZ* 基因丰度显著升高,以 *nirS* 基因丰度变化最为明显。此外,在砂土(Tenosol)^[38]和粉黏壤土^[39]中施加生物质炭也可提高 *nosZ* 基因丰度。Castaldi 等^[40]和 Xu 等^[41]通过定量研究反硝化酶活性(DEA),指出生物质炭可大幅度提升 DEA 速率。Cayuela 等^[42]通过研究 15 种农田土壤发现与本试验相近的结果,即添加生物质炭后每种土壤的 $N_2O/(N_2O+N_2)$ 比值都有所下降;作者提出生物质炭在增大 *nosZ* 基因丰度的同时,还可以作为传递电子的介质,有利于电子与反硝化微生物之间的传递,促进 N_2O 还原为 N_2 。不过,生物质炭对 N_2O 的抑制机理和整个微生物过程还不是很明确,因为它本身会释放出多环芳烃(PAHs)等有害物质,抑制硝化和反硝化过程^[43-44]。但是 Albuquerque 等^[45]研究结果却又与此相悖,作者提出高浓度的 PAHs(萘、菲和芘等)并不会减弱生物质炭对 N_2O 排放的抑制作用。

在前人的研究中就生物质炭的作用机理也做出了很多假设:降低反硝化速率^[18,46],促进完全反硝化^[41,47],或二者结合^[48-49]。降低反硝化速率主要是因为生物质炭可改善土壤通气性或减少无机氮等底物,从而抑制反硝化过程。本试验结果与 van Zwieten 等^[5]和 Harter 等^[47]在石灰性土壤中施加生物质炭的研究一致,作者提出的机理主要是因为生物质炭提高了土壤 pH 进而增大了还原 N_2O 的细菌活性和 *nosZ* 基因表达,促进完全反硝化。但是生物质炭增大土壤 pH 从而降低 N_2O 排放并不是唯一机理^[50]。有研究发现, pH 增大后甚至还可能促进硝化作用和 N_2O 排放^[51]。Shan 等^[52]分别向酸性土和碱性土中加入生物质炭,发现两种土壤的 pH 都有所上升,且增大了碱性土中的 *nosZ* 基因丰度,但是对酸性土中的 *nosZ* 基因并无影响。生物质炭含有的易分解有机碳(如可溶性有机碳等)含量较高时,也可增强 *nosZ* 基因型的微生物活性,促进 N_2O 生物消耗过程^[53]。向土壤中添加生物质炭后,它本身含有的碳元素也会影响土著微生物群落结构。而且 *nosZ* 基因型微生物对外源加入的碳十分敏感,极易受到影响^[54]。值得一提的是,本研究中添加 1% 生物质炭处理对功能基因的影响最为明显,而添加 5% 生物质炭处理与不添

加对照间无显著差异。这可能与生物质炭含有的某些化学物质有关:低添加量时,可促进反硝化菌生长,高剂量时则表现出一定的毒物效应,抑制反硝化基因表达。这种双向反应也被称为 hormesis 效应^[55],并且生物质炭对微生物的影响并不是简单的线性关系,而存在一个最优剂量^[56]。在本试验中,生物质炭的最佳添加量为土壤质量的 1%。

4 结论

在厌氧培养试验中,褐土中添加生物质炭显著提高了 *nirS* 和 *nosZ* 基因型反硝化细菌的丰度,促进 N_2O 彻底还原成 N_2 。生物质炭对于 N_2O 主要影响机理是增大了还原氧化亚氮的细菌活性,促进完全反硝化。与添加 1% 生物质炭相比,添加 5% 生物质炭对 N_2O 的影响并不明显,原因可能是生物质炭含有的某些化学物质在高浓度时具有一定的生物毒性。

参考文献 References

- [1] IPCC. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change[R]. Geneva, Switzerland: IPCC, 2007: 104
- [2] 赵自超, 韩笑, 石岳峰, 等. 硝化和脲酶抑制剂对华北冬小麦-夏玉米轮作固碳减排效果评价[J]. 农业工程学报, 2016, 32(6): 254-262
ZHAO Z C, HAN X, SHI Y F, et al. Effect of nitrification and urease inhibitor on carbon sequestration and greenhouses gas emissions in winter wheat and summer maize rotation system in North China[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(6): 254-262
- [3] SMITH P, MARTINO D, CAI Z C, et al. Greenhouse gas mitigation in agriculture[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2008, 363(1492): 789-813
- [4] 兰宇, 孟军, 杨旭, 等. 秸秆不同还田方式对棕壤 N_2O 排放和土壤理化性质的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 790-796
LAN Y, MENG J, YANG X, et al. Effects of different straw incorporation ways on N_2O emission and soil physicochemical properties of brown soil[J]. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(3): 790-796
- [5] VAN ZWIETEN L, KIMBER S, MORRIS S, et al. Influence of biochars on flux of N_2O and CO_2 from ferrosol[J]. Australian Journal of Soil Research, 2010, 48(7): 555-568
- [6] USSIRI D, LAL R. Soil Emission of Nitrous Oxide and Its Mitigation[M]. Dordrecht: Springer Press, 2013
- [7] RUBASINGHEGE G, SPAK S N, STANIER C O, et al. Abiotic mechanism for the formation of atmospheric nitrous oxide from ammonium nitrate[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(7): 2691-2697
- [8] SAMARKIN V A, MADIGAN M T, BOWLES M W, et al. Abiotic nitrous oxide emission from the hypersaline Don Juan Pond

- in Antarctica[J]. Nature Geoscience, 2010, 3(5): 341–344
- [9] BAGGS E M. Soil microbial sources of nitrous oxide: Recent advances in knowledge, emerging challenges and future direction[J]. Current Opinion in Environmental Sustainability, 2011, 3(5): 321–327
- [10] THOMSON A J, GIANOPOULOS G, PRETTY J, et al. Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2012, 367(1593): 1157–1168
- [11] VENTERA R T, HALVORSON A D, KITCHEN N, et al. Challenges and opportunities for mitigating nitrous oxide emissions from fertilized cropping systems[J]. Frontiers in Ecology & the Environment, 2012, 10(10): 562–570
- [12] TENENBAUM D J. Biochar: Carbon mitigation from the ground up[J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117(2): A70–A73
- [13] HARDER B. Smoldered-Earth policy: Created by ancient amazonian natives, fertile, dark soils retain abundant carbon[J]. Science News, 2006, 169(9): 133
- [14] MARRIS E. Putting the carbon back: Black is the new green[J]. Nature, 2006, 442(7103): 624–626
- [15] 王欣, 尹带霞, 张凤, 等. 生物炭对土壤肥力与环境质量的影响机制与风险解析[J]. 农业工程学报, 2015, 31(4): 248–257
WANG X, YIN D X, ZHANG F, et al. Analysis of effect mechanism and risk of biochar on soil fertility and environmental quality[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31(4): 248–257
- [16] KARHU K, MATTILA T, BERGSTRÖM I, et al. Biochar addition to agricultural soil increased CH₄ uptake and water holding capacity — Results from a short-term pilot field study[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2011, 140(1/2): 309–313
- [17] RONDON M, RAMIREZ J, LEHMANN J. Greenhouse gas emissions decrease with charcoal additions to tropical soils[C]//Proceedings of the 3rd USDA Symposium on Greenhouse Gases and Carbon Sequestration. Baltimore, USA: University of Delaware, 2005
- [18] YANAI Y, TOYOTA K, OKAZAKI M. Effects of charcoal addition on N₂O emissions from soil resulting from rewetting air-dried soil in short-term laboratory experiments[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2007, 53(2): 181–188
- [19] HALLIN S, LINDGREN P E. PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1652–1657
- [20] 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
- [21] MICHOTÉY V, MÉJEAN V, BONIN P. Comparison of methods for quantification of cytochrome *cd*₁-denitrifying bacteria in environmental marine samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(4): 1564–1571
- [22] KLOOS K, MERGEL A, RÖSCH C, et al. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 2001, 28(9): 991–998
- [23] CASCIOTTI K L, WARD B B. Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2213–2221
- [24] HASEGAWA N, ARAI H, IGARASHI Y. Two *c*-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the *nir* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron donors for nitrite reductase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 288(5): 1223–1230
- [25] BRAKER G, ZHOU J Z, WU L Y, et al. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2096–2104
- [26] LIU B B, FROSTEGÅRD Å, BAKKEN L R. Impaired reduction of N₂O to N₂ in acid soils is due to a posttranscriptional interference with the expression of *nosZ*[J]. mBio, 2014, 5(3): e0138314
- [27] VAN ZWIETEN L, SINGH B P, JOSEPH S D, et al. Biochar and emission of non-CO₂ greenhouse gases from soil[M]//LEHMANN J, JOSEPH S. Biochar for Environmental Management Science and Technology. UK: Earthscan Press, 2009: 227–249
- [28] MCKENNEY D J, DRURY C F, FINDLAY W I, et al. Kinetics of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: Oxygen effects[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26(7): 901–908
- [29] GRUTZMACHER P, PUGA A P, BIBAR M P S, et al. Carbon stability and mitigation of fertilizer induced N₂O emissions in soil amended with biochar[J]. Science of the Total Environment, 2018, 625: 1459–1466
- [30] CHANG J, CLAY D E, CLAY S A, et al. Biochar reduced nitrous oxide and carbon dioxide emissions from soil with different water and temperature cycles[J]. Agronomy Journal, 2016, 108(6): 2214–2221
- [31] ROGOVSKA N, LAIRD D, CRUSE R, et al. Impact of biochar on manure carbon stabilization and greenhouse gas emissions[J]. Soil Science Society of America Journal, 2011, 75(3): 871–879
- [32] SCHEER C, GRACE P R, ROWLINGS D W, et al. Effect of biochar amendment on the soil-atmosphere exchange of greenhouse gases from an intensive subtropical pasture in northern New South Wales, Australia[J]. Plant and Soil, 2011, 345(1/2): 47–58
- [33] ANDERSON C R, CONDRON L M, CLOUGH T J, et al. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus[J]. Pedobiologia, 2011, 54(5/6): 309–320
- [34] CHEN J H, LIU X Y, LI L Q, et al. Consistent increase in abundance and diversity but variable change in community composition of bacteria in topsoil of rice paddy under short term biochar treatment across three sites from South China[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 91: 68–79
- [35] DICKE C, ANDERT J, AMMON C, et al. Effects of different biochars and digestate on N₂O fluxes under field conditions[J].

- Science of the Total Environment 2015, 524/525: 310–318
- [36] ANDERSON C R, HAMONTS K, CLOUGH T J, et al. Biochar does not affect soil N-transformations or microbial community structure under ruminant urine patches but does alter relative proportions of nitrogen cycling bacteria[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2014, 191: 63–72
- [37] WANG C, LU H H, DONG D, et al. Insight into the effects of biochar on manure composting: Evidence supporting the relationship between N₂O emission and denitrifying community[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(13): 7341–7349
- [38] VAN ZWIETEN L, SINGH B P, KIMBER S W L, et al. An incubation study investigating the mechanisms that impact N₂O flux from soil following biochar application[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2014, 191: 53–62
- [39] 陈晨, 许欣, 毕智超, 等. 生物炭和有机肥对菜地土壤 N₂O 排放及硝化、反硝化微生物功能基因丰度的影响[J]. 环境科学学报, 2017, 37(5): 1912–1920
- CHEN C, XU X, BI Z C, et al. Effects of biochar and organic manure on N₂O emissions and the functional gene abundance of nitrification and denitrification microbes under intensive vegetable production[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(5): 1912–1920
- [40] CASTALDI S, RIONDINO M, BARONTI S, et al. Impact of biochar application to a Mediterranean wheat crop on soil microbial activity and greenhouse gas fluxes[J]. Chemosphere, 2011, 85(9): 1464–1471
- [41] 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 & Technology, 2014, 48(16): 9391–9399
- [42] 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
- [43] 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
- [44] SPOKAS K A, BAKER J M, REICOSKY D C. Ethylene: Potential key for biochar amendment impacts[J]. Plant and Soil, 2010, 333(1/2): 443–452
- [45] ALBURQUERQUE J A, SÁNCHEZ-MONEDERO M A, ROIG A, et al. High concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene, phenanthrene and pyrene) failed to explain biochar's capacity to reduce soil nitrous oxide emissions[J]. Environmental Pollution, 2015, 196: 72–77
- [46] KAMMANN C I, LINSEL S, GÖBLING J W, et al. Influence of biochar on drought tolerance of *Chenopodium quinoa* Willd and on soil-plant relations[J]. Plant and Soil, 2011, 345(1/2): 195–210
- [47] HARTER J, KRAUSE H M, SCHUETTLER S, et al. Linking N₂O 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
- [48] CASE S D C, MCNAMARA N P, REAY D S, et al. Biochar suppresses N₂O emissions while maintaining N availability in a sandy loam soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 81: 178–185
- [49] KHAN S, CHAO C, WAQAS M, et al. Sewage sludge biochar influence upon rice (*Oryza sativa* L) yield, metal bioaccumulation and greenhouse gas emissions from acidic paddy soil[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(15): 8624–8632
- [50] HÜPPI R, FELBER R, NEFTEL A, et al. Effect of biochar and liming on soil nitrous oxide emissions from a temperate maize cropping system[J]. Soil, 2015, 1(2): 707–717
- [51] XIAO K C, XU J M, TANG C X, et al. Differences in carbon and nitrogen mineralization in soils of differing initial pH induced by electrokinesis and receiving crop residue amendments[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 67: 70–84
- [52] SHAN J, ZHAO X, MA S T, et al. Wheat straw biochar reduces N₂O emission by increasing denitrification in alkaline and acidic submerged paddy soils[C]//Proceedings of the 2016 International Nitrogen Initiative Conference on Solutions to Improve Nitrogen Use Efficiency for the World. Australia, Melbourne: 2016
- [53] DAI Z M, LI Y, ZHANG X J, et al. Easily mineralizable carbon in manure-based biochar added to a soil influences N₂O emissions and microbial-N cycling genes[J]. Land Degradation & Development, 2019, 30(4): 406–416
- [54] HUANG R, WANG Y Y, LIU J, et al. Variation in N₂O emission and N₂O related microbial functional genes in straw- and biochar-amended and non-amended soils[J]. Applied Soil Ecology, 2019, 137: 57–68
- [55] GRABER E R, HAREL Y M, KOLTON M, et al. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media[J]. Plant and Soil, 2010, 337(1/2): 481–496
- [56] LIU L, SHEN G Q, SUN M X, et al. Effect of biochar on nitrous oxide emission and its potential mechanisms[J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 2014, 64(8): 894–902