

DOI: 10.5846/stxb202006041438

刘领, 马宜林, 悦飞雪, 乔鑫鑫, 尹飞, 王艳芳. 生物炭对褐土旱地玉米季氮转化功能基因、丛枝菌根真菌及  $N_2O$  释放的影响. 生态学报, 2021, 41(7): 2803-2815.

Liu L, Ma Y L, Yue F X, Qiao X X, Yin F, Wang Y F. Effects of biochar on nitrogen transformation functional genes abundances, arbuscular mycorrhizal fungi and  $N_2O$  emission of rainfed maize season in cinnamon soil. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(7): 2803-2815.

## 生物炭对褐土旱地玉米季氮转化功能基因、丛枝菌根真菌及 $N_2O$ 释放的影响

刘 领, 马宜林, 悦飞雪, 乔鑫鑫, 尹 飞, 王艳芳\*

河南科技大学农学院, 洛阳 471023

**摘要:**以豫西旱地玉米农田为研究对象, 设置不同生物炭施用量处理(T0: 不施用生物炭; T1: 施用生物炭 20 t/hm<sup>2</sup>; T2: 施用生物炭 40 t/hm<sup>2</sup>), 采用密闭式静态箱法测定  $N_2O$  排放通量和荧光定量 PCR 法分析丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌、氨单加氧酶(*amoA*)、亚硝酸盐还原酶(*nirS*、*nirK*)以及氧化亚氮还原酶(*nosZ*)的基因丰度, 同时测定土壤理化性状的变化。研究表明, 随着生物炭施用量的增加, 土壤 pH 和含水量呈增加趋势, 土壤有机碳、全氮和铵态氮含量显著提高, 土壤容重和硝态氮含量显著降低。T1 和 T2 处理土壤有机碳含量分别较 T0 显著提高 38.44% 和 71.01%; T1 和 T2 处理土壤铵态氮含量分别较 T0 显著增加 15.89% 和 30.46%; T2 处理土壤全氮含量较 T0 处理显著提高 14.87%; T1 和 T2 处理土壤硝态氮含量分别较 T0 减少 10.57% 和 21.40%。随着生物炭施用量的增加, AM 真菌侵染率显著增加, T1 和 T2 处理分别较 T0 处理提高 71.88% 和 115.88%; AOA、AOB、*nirK* 和 *nirS* 基因丰度显著降低; *nosZ* 基因丰度增加。施加生物炭处理的  $N_2O$  排放通量和累积排放量均低于不施生物炭处理, 具体表现为: T0>T1>T2。相关分析表明, 生物炭施用量与 AM 真菌基因丰度呈显著正相关; 与 *nosZ* 基因丰度呈正相关; 与 AOA、AOB、*nirK*、*nirS* 基因丰度呈极显著负相关。 $N_2O$  排放通量与 AOA、*nirK*、*nirS* 基因丰度呈极显著正相关; 与土壤含水量和土壤硝态氮含量呈显著正相关; 与 AM 真菌、*nosZ* 基因丰度、易提取球囊霉素含量、铵态氮含量呈极显著负相关。集成推进树(ABT)分析表明, AOA 对  $N_2O$  排放的影响最大, 其次是 AM 真菌和 *nirS*。总之, 生物炭处理改善土壤理化性质、提高土壤 AM 真菌侵染率、调节硝化、反硝化相关功能基因的丰度, 减少  $N_2O$  气体排放, 为旱地农田合理施用生物炭减少  $N_2O$  气体排放提供理论依据。

**关键词:** 生物炭;  $N_2O$ ; 旱地玉米; AM 真菌; 基因丰度

## Effects of biochar on nitrogen transformation functional genes abundances, arbuscular mycorrhizal fungi and $N_2O$ emission of rainfed maize season in cinnamon soil

LIU Ling, MA Yilin, YUE Feixue, QIAO Xinxin, YIN Fei, WANG Yanfang\*

College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

**Abstract:** Biochar soil amendments are attracting the increased attention as one strategy to improve soil microbially ecological environment and regulate soil nitrogen cycle. The rainfed maize cropland in the western Henan was established to study the effects of biochar application rates (T0: 0 t/hm<sup>2</sup>, T1: 20 t/hm<sup>2</sup>, and T2: 40 t/hm<sup>2</sup>) on soil physicochemical properties and  $N_2O$  emission fluxes using the static chamber/gas chromatography method, and the function marker genes of

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31700367); 国家重点研发计划项目(2017YFD0301101); 河南科技大学学科提升振兴 A 计划项目(13660002); 河南科技大学博士科研启动基金(4024-13480081)

收稿日期: 2020-06-04; 网络出版日期: 2021-01-27

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wyfl1977@126.com

arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, ammonia monooxygenase gene (*amoA*), *nirK*, *nirS* and *nosZ*, which were responsible for nitrification and denitrification using real-time fluorescence quota PCR. The results showed that the soil pH and water content increased, soil organic carbon, total nitrogen and ammonium nitrogen content increased significantly, and soil bulk density and nitrate nitrogen content decreased significantly with increasing biochar applied. Compared with T0 treatment, soil organic carbon increased significantly by 38.44% and 71.01% under T1 and T2 treatments, respectively; soil ammonium nitrogen content increased significantly by 15.89% and 30.46% under T1 and T2 treatments, respectively; soil total nitrogen content increased significantly by 14.87% under T2 treatment; nitrate nitrogen content decreased by 10.57% and 21.40% under T1 and T2 treatments, respectively. Moreover, the AM fungi colonization rate and *nosZ* gene abundance increased significantly, and AOA, AOB, *nirK* and *nirS* gene abundance decreased significantly with increasing biochar applied. Compared with T0 treatment, AM fungi increased significantly by 71.88% and 115.88% under T1 and T2 treatments, respectively. The N<sub>2</sub>O emission fluxes and emission accumulations under biochar addition were all lower than those under no biochar, ranked as T0>T1>T2. The correlation analysis showed that the abundance of AM fungi was significantly positively ( $P<0.05$ ) correlated with the biochar rate, and the abundance of *nosZ* gene and biochar rate was significant. There was a significantly negative correlation between AOA, AOB, *nirK*, *nirS* gene abundance and biochar rate ( $P<0.01$ ). The N<sub>2</sub>O emission fluxes showed a significantly positive correlation ( $P<0.01$ ) with AOA, *nirK*, *nirS*, soil water content and nitrate nitrogen, but significantly negatively ( $P<0.01$ ) correlated with AM fungi, *nosZ*, ammonium nitrogen and extractable glomalin related soil protein content. Aggregated boosted trees (ABT) analysis showed that the relative influence of AOA on N<sub>2</sub>O emission fluxes was the largest, followed by AM fungi and *nirK*. In summary, the application of biochar improved soil physicochemical properties, increased soil AM fungi colonization rates, regulated nitrification and denitrification functional genes, and reduced N<sub>2</sub>O emission, which provided a theoretical basis for the rational application of biochar and reduction of N<sub>2</sub>O emissions in rainfed maize cropland.

**Key Words:** biochar; N<sub>2</sub>O; rainfed maize; arbuscular mycorrhizal fungi; gene abundance

氧化亚氮(N<sub>2</sub>O)是除甲烷(CH<sub>4</sub>)和二氧化碳(CO<sub>2</sub>)之外的一种重要温室气体,其增温潜势比CO<sub>2</sub>高约300倍,N<sub>2</sub>O可以破坏臭氧层,造成气候变暖,威胁人类健康<sup>[1]</sup>。农田土壤由于大量施入氮肥,成为N<sub>2</sub>O的主要排放源,大约占总排放量的80%<sup>[2]</sup>。N<sub>2</sub>O的产生主要来自于土壤的硝化作用和反硝化作用。在硝化过程中,N<sub>2</sub>O是羟胺氧化成N<sub>2</sub>O-N过程中产生的,主要由含有氨单加氧酶(*amoA*)基因的氨氧化古菌(Amonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(Amonia-oxidizing bacteria, AOB)参与完成,并对土壤硝化起着限速作用<sup>[3-4]</sup>。在反硝化过程中,N<sub>2</sub>O则是由NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>逐步还原成NO、N<sub>2</sub>O、N<sub>2</sub>过程中产生的。土壤N<sub>2</sub>O的产生主要受反硝化微生物活性的影响,其中亚硝酸还原酶和氧化亚氮还原酶是土壤反硝化作用的关键酶和限速酶,编码亚硝酸还原酶的*nirS*、*nirK*基因和编码氧化亚氮还原酶的*nosZ*基因代表反硝化微生物活性。在*nirS*、*nirK*基因编码的亚硝酸还原酶的作用下NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原为NO,并生成N<sub>2</sub>O,同时在由*nosZ*基因编码的氧化亚氮还原酶的作用下N<sub>2</sub>O还原为N<sub>2</sub>。

丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌是一类分布广泛(能与80%以上植物根系形成共生体)且数量丰富(占土壤总微生物生物量的30%以上)的土壤有益微生物,AM真菌对土壤N素循环起着重要作用,可以显著影响N素的吸收与矿化、生物固N、硝化和反硝化,以及N素的淋失等诸多土壤氮素循环过程<sup>[5]</sup>。已有研究表明,AM真菌影响农田N<sub>2</sub>O排放的潜在机理主要为:AM真菌可以通过改变作物-土壤系统的水分关系、影响土壤结构和土壤通气性能来调控N<sub>2</sub>O排放;AM真菌能够通过竞争吸收氮素来调控N<sub>2</sub>O排放;AM真菌可以通过改变根际沉积过程来调控N<sub>2</sub>O排放,接种AM真菌能够改变植物根系分泌物的组成及数量,从而导致根际及菌根际微生物群落发生变化,包括硝化、反硝化细菌群落来调控N<sub>2</sub>O排放<sup>[6-8]</sup>。

生物炭是一些农作物秸秆、薪柴、杂草、粪便等生物质在缺氧或低氧条件下通过高温裂解后的富碳固体产

物。近年来,国内外学者对生物炭在改良土壤、提高作物产量、碳固存、温室气体减排等方面进行了研究<sup>[9-12]</sup>,特别是农田施用生物炭对  $\text{N}_2\text{O}$  排放的影响机制得到了广泛的关注。一些研究表明,农田施入生物炭可以通过影响硝化、反硝化功能基因来影响土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放<sup>[7, 13]</sup>。另外一些研究表明,生物炭对 AM 真菌具有特别的促进作用,生物炭影响土壤 AM 真菌的机制主要表现在:生物炭改善土壤理化特性有利于 AM 真菌孢子的萌发和生长;生物炭调节植物-真菌信号物质影响 AM 真菌的萌发和菌丝的分枝;生物炭可能通过影响土壤中的解磷细菌活性,从而间接影响 AM 真菌<sup>[14-16]</sup>。

基于  $\text{N}_2\text{O}$  排放是一系列复杂土壤生态过程的综合反映,并受到多种生物和非生物因素的交互影响。生物炭输入是如何调节土壤硝化、反硝化功能基因和 AM 真菌的,以及他们之间的关系需要进一步了解。目前多数研究主要针对生物炭对 AM 真菌的影响<sup>[15, 17]</sup>或生物炭对 N 转化相关功能基因及  $\text{N}_2\text{O}$  释放的影响<sup>[3, 13]</sup>,然而对施入生物炭对土壤 AM 真菌及 N 转化相关功能基因的影响以及它们之间的关系研究较少。

河南省西部(豫西)位于黄土丘陵区,属暖温带大陆性季风气候,土壤类型为褐土,旱地农业在该地区占据重要地位,由于农田化肥使用量大,成为  $\text{N}_2\text{O}$  的重要排放源<sup>[9]</sup>。本研究以豫西地区旱地玉米农田为研究对象,探讨生物炭施入后对土壤理化性质、N 转化相关功能基因丰度、AM 真菌及  $\text{N}_2\text{O}$  释放的影响,并探讨它们之间的相关性,以期为旱地农田合理施用生物炭实现  $\text{N}_2\text{O}$  减排提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

试验在河南省洛阳市河南科技大学开元校区农场(34°41'N, 112°27'E)进行。该地区年均气温 13.7 °C, 年均无霜期 216 d, 年降水量约 600—800 mm, 主要分布在 6—8 月, 作物种植方式为小麦-玉米轮作, 土壤类型为褐土, 土壤基本理化性质为: pH 值为 7.4, 有机质含量为 15.1 g/kg, 总氮 1.0 g/kg, 碱解氮 78.6 mg/kg, 速效磷 9.2 mg/kg, 速效钾 116.5 mg/kg, 粘粒、粉粒、砂粒比例分别为 20.34%、30.87%、48.79%。

### 1.2 试验材料

供试的玉米品种为“郑单 958”, 供试生物炭材料为小麦秸秆生物炭(河南商丘三利新能源有限公司, 热裂解炭化温度 350—450 °C), 生物炭基本理化性质为: pH 值 10.4, 比表面积为 8.92 m<sup>2</sup>/g, 有机碳为 52.2%, 全氮为 5.9 g/kg, 全磷为 0.89 g/kg, 全钾为 23.2 g/kg。

### 1.3 试验设计

试验于 2019 年 6 月 5 日开始, 9 月 10 日结束。试验期内总降雨量为 428.3 mm, 与常年相比, 属于平水年。生物炭用量共设 3 个处理: T0: 对照, 不施用生物炭; T1: 施用生物炭 20 t/hm<sup>2</sup>; T2: 施用生物炭 40 t/hm<sup>2</sup>; 每处理重复 3 次, 共 9 个小区, 小区面积 32 m<sup>2</sup> (4 m×8 m)。2019 年 6 月 5 日种植玉米, 行距为 60 cm, 株距为 25 cm, 种植密度为 67000 株/hm<sup>2</sup>, 各处理施氮量 225 kg N/hm<sup>2</sup>, 以含氮量 46% 的尿素为氮源, 分 2 次施用, 其中基肥占 60%, 大喇叭口期追肥占 40%。各处理施磷肥 40 kg P/hm<sup>2</sup>, 钾肥 80 kg K/hm<sup>2</sup>, 分别以含 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 12% 的过磷酸钙和含 K<sub>2</sub>O 45% 的硫酸钾作为肥源。生物炭、基施氮肥、磷肥和钾肥均在播前撒于地表后微耕机翻耕, 与 10 cm 左右土层混合均匀, 大喇叭口期在玉米茎一侧距离植株 5—6 cm 处采用点种器追施氮肥, 穴深 6—8 cm, 施入氮肥后立即覆土。试验期间采用雨养方式, 不进行灌溉, 定期除草。

### 1.4 测定项目与方法

#### 1.4.1 $\text{N}_2\text{O}$ 排放通量测定

本试验于追肥后第 2 天开始进行气体样品采集, 每 2 天采样 1 次, 连续采样 4 次恢复为 5—7 d 采样 1 次, 强降雨后第 2 天开始每 2 天采样 1 次, 连续采样 3 次恢复为 5—7 d 采样 1 次, 采气直至成熟期。采用密闭式静态箱法测定  $\text{N}_2\text{O}$  排放通量, 箱体由有机玻璃制作而成, 包括底座和顶箱两部分。顶箱长、宽、高均为 50 cm, 箱体外侧包有一层 2.5 cm 厚的聚苯乙烯泡沫板, 以减小采样时因太阳辐射所引起的箱内温度变化, 箱内安装风扇以将箱内气体混匀。底座长、宽、高分别为 50 cm、50 cm、15 cm, 底座上缘有 1.5 cm 深的凹槽, 待玉米发

芽后将底座随机安置在不同处理的小区,插入土层 5 cm 深处,整个生长季不再移动,不同处理小区安置 5 个底座,底座内种植两棵玉米,玉米长至九叶期折断,只留 45 cm 高度<sup>[17]</sup>。

采集气体时将顶箱套在底座凹型槽内,将水注入凹槽加以密封。采样时间为 08:00—10:00,分别于罩箱后 0、10、20、30 min 用 40 mL 注射器采集箱内气体 40 mL,将采集的气体注射入 40 mL 的已抽为真空的集气瓶中,带回实验室检测。采用岛津气相色谱仪(GC-2010)测定 N<sub>2</sub>O 气体浓度,电子捕获检测器(ECD)检测 N<sub>2</sub>O 含量。

N<sub>2</sub>O 排放通量计算公式为:

$$F = \frac{273}{273 + T} \times \rho \times h \times \frac{dc}{dt} \times 1000 \times 60 \quad (1)$$

式中, $F$  为 N<sub>2</sub>O 排放通量( $\mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ); $T$  为采样箱内的平均温度( $^{\circ}\text{C}$ ); $\rho$  为标准状态下 N<sub>2</sub>O 气体密度,值为 1.977 g/L; $h$  为采气箱高度(m); $dc/dt$  为采气箱内 N<sub>2</sub>O 浓度变化率( $\text{mL L}^{-1} \text{min}^{-1}$ )。

N<sub>2</sub>O 累积排放量的计算公式如下

$$M = \sum \frac{(F_{i+1} + F_i)}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \times 24 \quad (2)$$

式中, $M$  为土壤 N<sub>2</sub>O 累积排放量( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ); $F$  为 N<sub>2</sub>O 排放通量( $\mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ); $i$  为采样次数; $t_{i+1} - t_i$  为采样间隔天数。

#### 1.4.2 土壤 DNA 提取、土壤 pH、含水量、容重、有机碳、土壤全氮、硝态氮和铵态氮测定

玉米追肥后 10 d,处于玉米抽雄、开花期,是由营养生长转向生殖生长的关键时期,肥水需求量大,生理比较活跃,我们取该时期土壤测定土壤理化性质和提取土壤 DNA。采用环刀法取 0—20 cm 土层测定土壤容重,用抖根法<sup>[18]</sup>采集玉米根际土壤,一个小区取 3 个土壤样品,一部分土壤样品储存在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱用于土壤 DNA 提取,一部分土壤用于测定土壤 pH、含水量、土壤有机碳、土壤全氮、硝态氮、铵态氮、易提取球囊霉素相关土壤蛋白(EE-GRSP)和总球囊霉素相关土壤蛋白(T-GRSP)。土壤硝态氮和铵态氮采用连续流动分析仪(SAN++, Skalar, 荷兰)测定;土壤含水量采用烘干法进行测定;土壤 pH 值采用 pH 计测定(上海精密科学仪器有限公司,雷磁 pHs-3C),水土比为 5:1。土壤有机碳(SOC)测定采用外加热、重铬酸钾(K)容量法<sup>[19]</sup>;全氮(TN)采用凯氏定氮法(2300 全自动定氮仪, Sweden)测定<sup>[20]</sup>。每个样品重复测定 3 次。

采用 Fast DNAsPIN Kit for Soil(MP Biomedicals, 美国)提取土壤 DNA,操作步骤按照试剂盒操作说明进行。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,用紫外分光光度计(NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific, 美国)测定 DNA 浓度及质量。检测质量合格的 DNA 样品交由上海美吉生物医药有限公司进行荧光定量 PCR 分析。

#### 1.4.3 AM 真菌侵染率和球囊霉素相关土壤蛋白的测定

使用抖根法取好土壤样品后,仔细收集玉米根系,用清水清洗干净,用于 AM 真菌侵染率的测定。AM 真菌侵染率采用 Bierman & Linderman(1981)的方法测定<sup>[21]</sup>。易提取球囊霉素相关土壤蛋白(EE-GRSP)、总球囊霉素相关土壤蛋白(T-GRSP)采用李少朋等<sup>[22]</sup>的方法测定。

#### 1.4.4 实时荧光定量 PCR 分析

本试验选取土壤中 AM 真菌、氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)的氨单加氧酶(*amoA*)基因、亚硝酸盐还原酶(*nirK*、*nirS*)基因和氧化亚氮还原酶(*nosZ*)基因进行定量分析,在 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)进行荧光绝对定量 PCR 分析。荧光定量 PCR 的反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,其中包含 10  $\mu\text{L}$  的 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (2X)(南京诺唯赞生物科技有限公司),前后引物( $5\mu\text{mol L}^{-1}$ )各 0.8  $\mu\text{L}$ ,1  $\mu\text{L}$  DNA 模板,7.4  $\mu\text{L}$  超纯水。具体 PCR 引物和扩增条件见表 1,每个样品重复 3 次。分别以含有 AM 真菌基因、氨氧化古菌 *amoA* 基因、氨氧化细菌 *amoA* 基因、亚硝酸盐还原酶(*nirK*、*nirS*)基因和一氧化二氮还原酶(*nosZ*)基因的重组 PMD18-T 载体作为标准质粒,然后计算出标准质粒的拷贝数,10 倍梯度稀释构建



好的各质粒,90 $\mu$ L 稀释液+10 $\mu$ L 质粒,一般做 4—6 个点,通过预实验分别选取 AOA 标准品的 10<sup>-2</sup>—10<sup>-6</sup> 稀释液、AM、AOB、*nirS*、*nosZ* 标准品的 10<sup>-2</sup>—10<sup>-7</sup> 稀释液、*nirK* 标准品的 10<sup>-2</sup>—10<sup>-5</sup> 稀释液用于制备标准曲线,根据标准曲线计算基因丰度。

表 1 荧光定量 PCR 扩增引物和反应条件

Table 1 Primer sets for quantitative amplification PCR and reaction conditions

目的基因 Targeted gene	引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	定量 PCR 反应程序 Reaction conditions of quantitative amplification PCR	扩增片段长度 Amplified fragment length/(bp)	扩增效率 Amplified efficiency/%	参考文献 References
AM 真菌	AMV4-5NF AMDGR	AAGCTCGTAGTTGAATTCG CCCAACTATCCCTATTAATCAT	95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环	258	95.81	[23]
AOA- <i>amoA</i>	Arch- <i>amoA</i> F Arch- <i>amoA</i> R	STAATGGTCTGGCTTAGACG GCGGCCATCCATCTGTATGT	95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环	636	102.91	[24]
AOB- <i>amoA</i>	<i>AmoA</i> -1F <i>AmoA</i> -2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环	492	100.38	[25]
<i>nirK</i>	<i>nirK</i> 1F R3Cu	GGMATGGTKCCSTGGCA GCCTCGATCAGRTTTRTGGTT	95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环	503	92.86	[26]
<i>nirS</i>	cd3AF R3cd	GTSACGTSAGGARACSGG GASTTCGGRTGSGTCTTGA	95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环	407	100.18	[27]
<i>nosZ</i>	<i>nosZ</i> -f <i>nosZ</i> -1622R	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG CGSACCTTSTTGCCSTYCGC	95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环	455	95.09	[27]

AM 真菌:丛枝菌根真菌 Arbuscular mycorrhizal fungi; AOA-*amoA*:氨氧化古菌 Ammonia oxidizing archaea; AOB-*amoA*:氨氧化细菌, Ammonia oxidizing bacteria

## 1.5 数据处理与分析

采用 Microsoft Office Excel 2007 和 SPSS 17.0 对数据进行整理和分析,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 LSD 法比较不同处理间的差异显著性( $P < 0.05$ ),采用 Pearson 相关分析对生物炭施用量、土壤 pH 值、含水量、容重、土壤硝态氮、铵态氮,有机碳、土壤各基因丰度与 N<sub>2</sub>O 排放通量之间相关性和显著性进行分析,差异极显著为  $P < 0.01$ ,差异显著为  $P < 0.05$ 。采用 Origin 10.0 软件绘图。利用 R 2.7.1 软件里的“gbmpls”统计包,进行聚类推进树(Aggregated boosted tree, ABT)分析土壤因子、硝化、反硝化功能基因和 AM 真菌丰度对 N<sub>2</sub>O 排放量的相对重要性。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤理化性质变化

由表 2 可知,不同生物炭处理条件下,土壤理化性质发生相应变化。随着生物炭施用量的增加,土壤 pH 和土壤含水量呈增加趋势,但均未达到显著水平( $P > 0.05$ )。施加生物炭显著降低土壤容重,T1 和 T2 处理土壤容重分别较 T0 显著降低 3.97% 和 8.78% ( $P < 0.05$ );施加生物炭显著提高土壤有机碳含量,T1 和 T2 处理土壤有机碳含量分别较 T0 显著提高 38.44% 和 71.01% ( $P < 0.05$ );与 T0 相比,T1 处理土壤全氮含量未达到显著水平( $P > 0.05$ ),T2 处理显著提高土壤全氮含量,较 T0 处理显著提高 14.87% ( $P < 0.05$ );添加生物炭土壤硝态氮含量显著降低,与 T0 相比,T1 和 T2 处理土壤硝态氮含量分别减少 10.57% 和 21.40% ( $P < 0.05$ ),T1 和 T2 两处理间未达到显著水平( $P > 0.05$ )。添加生物炭后土壤铵态氮含量显著高于不添加生物炭处理,T1 和 T2 处理土壤铵态氮含量分别较 T0 显著增加 15.89% 和 30.46% ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 不同生物炭处理对硝化、反硝化功能基因丰度的影响

#### 2.2.1 不同生物炭处理对 AOA-*amoA*、AOB-*amoA* 基因丰度的影响

由图 1 可知,各处理土壤 AOA-*amoA* 基因拷贝数显著高于 AOB-*amoA*。随着生物炭施用量的增加,AOA-*amoA* 基因丰度显著降低( $P < 0.05$ ),表现为 T0>T1>T2。T0、T1 和 T2 处理下 AOA-*amoA* 基因丰度分别为  $7.57 \times 10^9$ 、 $4.92 \times 10^9$  和  $2.50 \times 10^9$  拷贝/g,T1 和 T2 处理分别较 T0 处理显著降低 35.07% 和 66.96% ( $P < 0.05$ )。与 T0

相比,TI 和 T2 处理的 AOB-amoA 基因丰度显著下降( $P<0.05$ ),但 T1 和 T2 处理未达到显著水平( $P>0.05$ )。T0、T1 和 T2 处理下 AOB-amoA 基因丰度分别为  $3.60\times10^6$ 、 $2.02\times10^6$ 、 $2.36\times10^6$  拷贝/g,T1 和 T2 分别较 T0 处理显著降低 43.83%和 34.58%( $P<0.05$ )。说明生物炭对旱地玉米土壤 AOA 和 AOB 生长具有抑制作用。

表 2 不同生物炭处理土壤理化性质

Table 2 Soil physical and chemical properties under different biochar treatments

处理 Treatment	pH	土壤含水量 Soil water content/%	土壤容重 Bulk density/ (g/cm <sup>3</sup> )	有机碳 Soil organic carbon/(g/kg)	全氮 Total N/ (g/kg)	硝态氮 Nitrate N/ (mg/kg)	铵态氮 Ammonium N/ (mg/kg)
T0	7.39±0.24a	22.53±0.92ab	1.18±0.13a	11.84±0.61c	1.21±0.04b	27.52±1.53a	1.51±0.15c
T1	7.42±0.16a	23.24±0.59ab	1.13±0.08b	16.39±0.44b	1.28±0.02ab	24.61±0.90bc	1.75±0.09b
T2	7.48±0.25a	23.98±0.50a	1.07±0.10c	20.24±0.31a	1.39±0.03a	21.63±0.71c	1.97±0.09a

同一列中不同字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ );T0:不施用生物炭 No biochar application;T1:施用生物炭 20t/hm<sup>2</sup> Biochar application rate of 20 t/hm<sup>2</sup>;T2:施用生物炭 40t/hm<sup>2</sup> Biochar application rate of 40 t/hm<sup>2</sup>

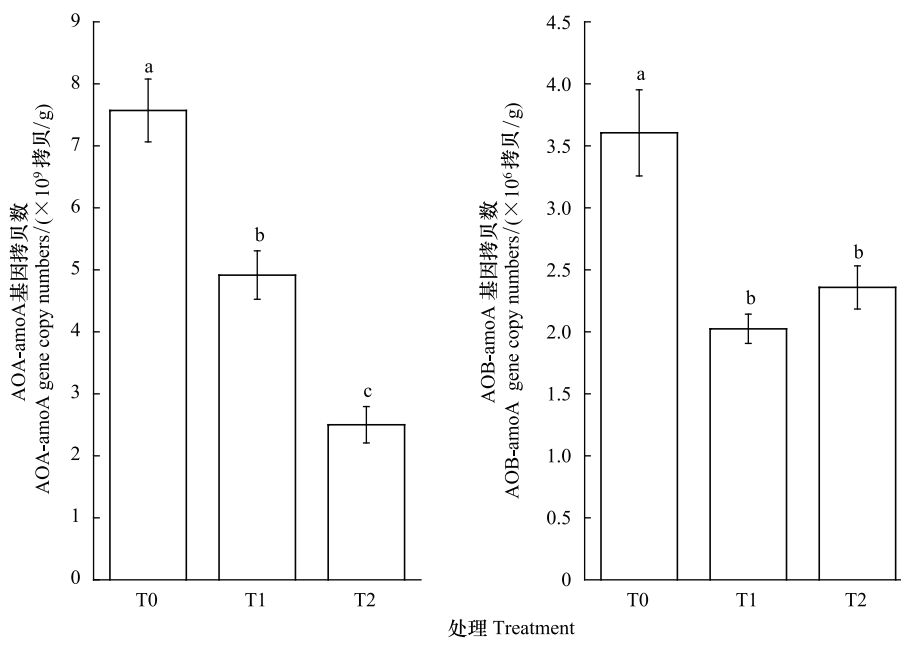


图 1 不同生物炭处理下氨氧化细菌、氨氧化古菌基因丰度

Fig.1 The gene abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea under different biochar treatments

不同字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ );T0:不施用生物炭 No biochar application;T1:施用生物炭 20t/hm<sup>2</sup> Biochar application rate of 20 t/hm<sup>2</sup>;T2:施用生物炭 40t/hm<sup>2</sup> Biochar application rate of 40 t/hm<sup>2</sup>;AOA-amoA:氨氧化古菌 Ammonia oxidizing archaea;AOB-amoB:氨氧化细菌 Ammonia oxidizing bacteria

## 2.2.2 不同生物炭处理对反硝化基因丰度的影响

由图 2 可知,随着生物炭施用量的增加,*nirK* 基因丰度显著降低( $P<0.05$ ),表现为  $T0>T1>T2$ 。T0、T1 和 T2 处理下 *nirK* 基因丰度分别为  $1.08\times10^{10}$ 、 $7.33\times10^9$ 、 $6.16\times10^9$  拷贝/g,T1 和 T2 分别较 T0 处理显著降低 31.90%和 42.78%( $P<0.05$ ),T1 和 T2 两处理间无显著差异( $P>0.05$ )。随着生物炭施用量的增加 *nirS* 基因丰度降低,表现为  $T0>T1>T2$ ,T0、T1 和 T2 处理下 *nirS* 基因丰度分别为  $3.57\times10^7$ 、 $3.12\times10^7$ 、 $1.90\times10^7$  拷贝/g,T1 和 T0 两处理间无显著差异( $P>0.05$ ),T2 分别较 T0 和 T1 处理显著降低 46.69%和 38.91%( $P<0.05$ ),说明生物炭能够抑制反硝化反应进程。施加生物炭 *nosZ* 基因丰度增加,表现为  $T1>T2>T0$ 。T0、T1 和 T2 处理下 *nosZ* 基因丰度分别为  $2.11\times10^7$ 、 $3.74\times10^7$ 、 $2.92\times10^7$  拷贝/g,以 T1 处理 *nosZ* 基因丰度最高,T1 和 T2 处理分别较 T0

显著提高 77.28% 和 38.33% ( $P < 0.05$ ), 说明施用生物炭能够促进 *nosZ* 基因表达, 加快了  $N_2O$  还原进程。 $(nirK+nirS)/nosZ$  的比值越大表明排放  $N_2O$  的能力越强。由图 2 可知, 生物炭处理显著降低  $(nirK+nirS)/nosZ$  的比值 ( $P < 0.05$ )。与 T0 处理相比, T1 和 T2 处理显著降低  $(nirK+nirS)/nosZ$  的比值 ( $P < 0.05$ ), 但 T1 和 T2 处理之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

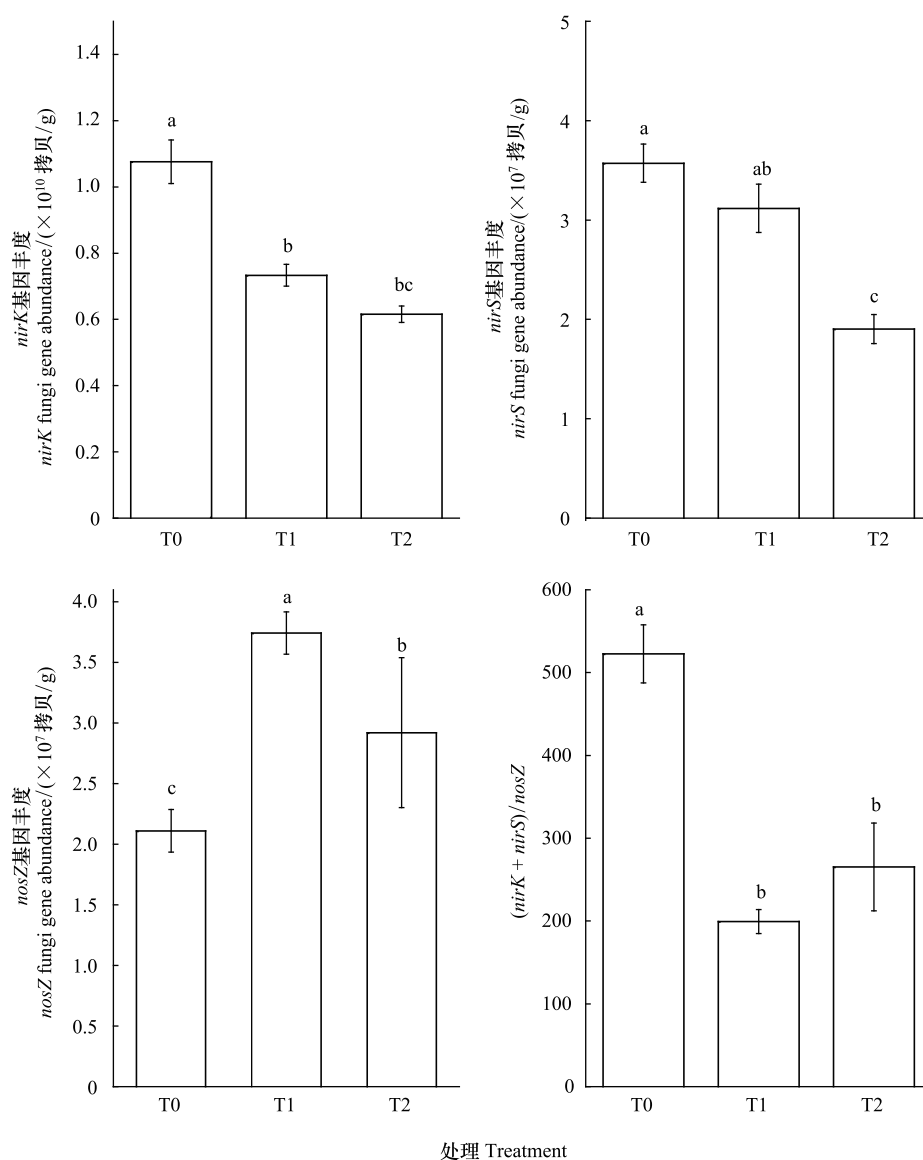


图 2 不同生物炭处理下反硝化基因丰度

Fig.2 The gene abundance of denitrifying bacteria under different biochar treatments

不同字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )

### 2.3 生物炭对旱地玉米农田土壤 AM 真菌的影响

由表 3 可知, 随着生物炭施用量的增加, 菌根侵染率随之增加, 与 T0 相比, T1 和 T2 处理均显著增加菌根侵染率 ( $P < 0.05$ ), 但 T1 和 T2 处理差异不显著 ( $P > 0.05$ )。随着生物炭施用量的增加 AM 真菌基因丰度显著增加 ( $P < 0.05$ ), 表现为  $T2 > T1 > T0$ 。T1 和 T2 分别较 T0 处理显著提高 71.88% 和 115.88% ( $P < 0.05$ ), 说明生物炭对 AM 真菌生长具有明显的促进作用。施加生物炭显著提高土壤总球囊霉素相关土壤蛋白和易提取球囊霉素相关土壤蛋白含量, T1 和 T2 处理土壤总球囊霉素相关土壤蛋白含量分别较 T0 显著提高 20.67% 和 34.36% ( $P < 0.05$ ), T1 和 T2 处理土壤易提取球囊霉素相关土壤蛋白含量分别较 T0 显著提高 17.40% 和

43.50% ( $P<0.05$ )。

2.4 生物炭对旱地玉米生长期 N<sub>2</sub>O 排放通量的影响

玉米大喇叭口期追肥后 N<sub>2</sub>O 排放通量和累积排放量动态变化如图 3 所示。在不同时期,施加生物炭处理的 N<sub>2</sub>O 排放通量均低于不施生物炭处理,N<sub>2</sub>O 排放通量具体表现为:T0>T1>T2。追肥(7 月 24 日)后,不同处理 N<sub>2</sub>O 排放通量的变化趋势基本一致,均表现为先升高后下降的趋势。追肥(7 月 24 日)后第 1 天 N<sub>2</sub>O 排放量升高,追肥后第 3 天出现排放峰最高值,T0、T1、T2 处理下 N<sub>2</sub>O 排放通量分别为 522.14、409.35 和 382.35  $\mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ,T1、T2 处理分别较 T0 处理降低 21.60%和 26.77%。强降雨(8 月 6 日)后第 2 天,出现第二次排放峰,T0、T1、T2 处理 N<sub>2</sub>O 排放通量分别为 210.59、158.04、139.63  $\mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ,T1、T2 处理分别较 T0 处理降低 24.95%和 33.70%。8 月 14 日和 8 月 21 日降雨后又出现两次排放峰。总的来说,施用生物炭降低旱地玉米土壤 N<sub>2</sub>O 排放,且施肥和降雨后会引引起 N<sub>2</sub>O 排放量增加。

表 3 不同生物炭处理 AM 真菌侵染率、总球囊霉素相关土壤蛋白和易提取球囊霉素相关土壤蛋白含量

Table 3 AM fungi colonization, EE-GRSP and T-GRSP contents under different biochar treatments

处理 Treatment	菌根侵染率 Mycorrhizal colonization/%	AM 真菌拷贝数 AM fungi copy numbers/ (10 <sup>6</sup> 拷贝/g)	总球囊霉素相关 土壤蛋白含量 T-GRSP content/(mg/g)	易提取球囊霉素相关 土壤蛋白含量 EE-GRSP content/(mg/g)
T0	20.39±1.04b	4.93±0.75c	1.86 c	0.47c
T1	23.42±2.06a	8.48±0.63b	2.24 b	0.55b
T2	24.48±1.75a	10.71±0.97a	2.49 a	0.67a

同一列中不同字母表示不同处理间差异显著 ( $P<0.05$ );AM 真菌:丛枝菌根真菌 Arbuscular mycorrhizal fungi;EE-GRSP:易提取球囊霉素相关土壤蛋白含量 Easily extractable glomalin-related soil protein;T-GRSP:总球囊霉素相关土壤蛋白,Total glomalin-related soil protein

由图 3 可知,随着生物炭施用量的增加 N<sub>2</sub>O 累积排放量呈减少趋势,表现为 T0>T1>T2。施加生物炭显著降低 N<sub>2</sub>O 累积排放量( $P<0.05$ ),T0、T1 和 T2 处理下的 N<sub>2</sub>O 累积排放量分别为 162.97、136.38、120.56  $\text{mg/m}^2$ ,T1 和 T2 分别较 T0 处理显著降低 16.31%和 26.02% ( $P<0.05$ ),说明施用生物炭对降低旱地玉米土壤 N<sub>2</sub>O 排放具有积极作用。

2.5 生物炭施用量与 AM 真菌及 N 转化相关功能基因丰度的相关性分析

如表 4 所示,为生物炭施用量与 AM 真菌及 N 转化相关功能基因丰度的相关分析,AM 真菌基因丰度与生物炭施用量呈显著正相关关系 ( $P<0.05$ );AOA、AOB、*nirK*、*nirS* 基因丰度与生物炭施用量呈极显著负相关关系 ( $P<0.01$ );*nosZ* 与生物炭施用量未达到显著水平 ( $P>0.05$ )。其中,*nirK* 基因丰度与生物炭施用量的相关性系数最大,为-0.763,说明 *nirK* 基因丰度受生物炭施用量影响较大。

表 4 生物炭施用量与各功能基因丰度的相关关系分析

Table 4 Pearson correlation coefficients between biochar application rate and functional gene abundance

	AM 真菌 AM fungi/ (10 <sup>6</sup> 拷贝/g)	AOA/ (拷贝/g)	AOB/ (拷贝/g)	<i>nirK</i> / (拷贝/g)	<i>nirS</i> / (拷贝/g)	<i>nosZ</i> / (拷贝/g)
相关系数 Correlation coefficient	0.368 *	-0.587 **	-0.480 **	-0.763 **	-0.626 **	0.285

\* \* 表示相关性达 0.01 极显著水平; \* 表示相关性达 0.05 显著水平

2.6 N<sub>2</sub>O 排放通量与硝化、反硝化功能基因、AM 真菌基因丰度的相关性分析

由表 5 可知,AM 真菌、*nosZ* 基因丰度和 N<sub>2</sub>O 排放通量呈极显著负相关 ( $P<0.01$ ),AOA、*nirK*、*nirS* 和 N<sub>2</sub>O 排放通量呈极显著正相关 ( $P<0.01$ ),AOB 与 N<sub>2</sub>O 排放通量未达到显著水平 ( $P>0.05$ )。说明 AM 真菌、AOA、*nosZ*、*nirK* 和 *nirS* 是影响 N<sub>2</sub>O 排放的主要因子。



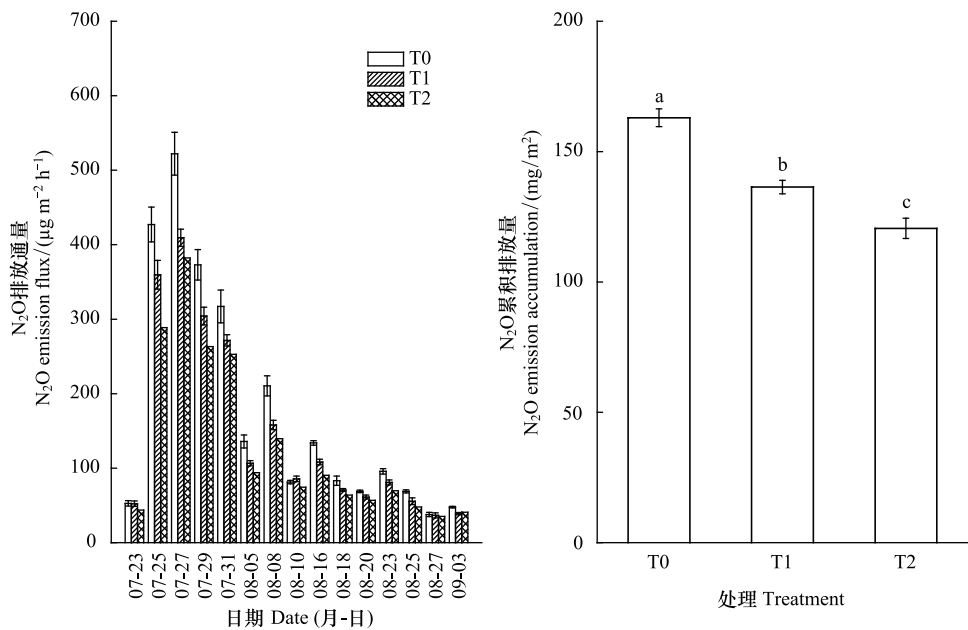


图 3 生物炭对旱地玉米农田土壤 N<sub>2</sub>O 排放通量的影响  
Fig.3 Effect of biochar on soil N<sub>2</sub>O emission fluxes of rainfed maize  
不同字母表示不同处理间差异显著 (P<0.05)

表 5 N<sub>2</sub>O 排放通量与各功能基因丰度的相关关系分析

	AM 真菌 AM fungi/ (10 <sup>6</sup> 拷贝/g)	AOA/ (拷贝/g)	AOB/ (拷贝/g)	nirK/ (拷贝/g)	nirS/ (拷贝/g)	nosZ/ (拷贝/g)
相关系数 Correlation coefficient	-0.865 **	0.819 **	0.207	0.623 **	0.799 **	-0.629 **

\* \* 表示相关性达 0.01 极显著水平; \* 表示相关性达 0.05 显著水平

2.7 N<sub>2</sub>O 排放通量与土壤各因子的相关性分析

N<sub>2</sub>O 排放通量与土壤各因子的相关性分析如表 6 所示。由表 6 可知,土壤含水量与 N<sub>2</sub>O 排放通量呈显著正相关关系 (P<0.05), N<sub>2</sub>O 排放峰出现在降雨后,土壤水分是影响 N<sub>2</sub>O 排放的主要因子。土壤容重、pH 和总球囊霉素相关土壤蛋白含量与 N<sub>2</sub>O 排放通量未达到显著水平 (P>0.05); 土壤有机碳含量与 N<sub>2</sub>O 排放通量呈显著负相关关系 (P<0.05); 易提取球囊霉素相关土壤蛋白含量、铵态氮含量与 N<sub>2</sub>O 排放通量呈极显著负相关关系 (P<0.01); 土壤硝态氮含量与 N<sub>2</sub>O 排放通量呈极显著正相关关系 (P<0.01)。其中,易提取球囊霉素相关土壤蛋白、硝态氮、铵态氮含量与 N<sub>2</sub>O 排放通量的相关系数分别为-0.887、0.738、-0.909,说明易提取球囊霉素相关土壤蛋白、硝态氮、铵态氮含量是影响 N<sub>2</sub>O 排放的主要因子。

表 6 N<sub>2</sub>O 排放通量与土壤各因子的相关关系分析

	土壤含水量 Soil water content/%	土壤容重 Bulk density /(g/cm <sup>3</sup> )	pH	有机碳 Soil organic carbon/ (g/kg)	硝态氮 Nitrate N /(mg/kg)	铵态氮 Ammonium N /(mg/kg)	T-GRSP /(mg/g)	EE-GRSP /(mg/g)
相关系数 Correlation coefficient	0.503 *	0.387	-0.355	-0.565 *	0.738 **	-0.909 **	0.311	-0.887 **

\* \* 表示相关性达 0.01 极显著水平; \* 表示相关性达 0.05 显著水平。T-GRSP: 总球囊霉素相关土壤蛋白; EE-GRSP: 易提取球囊霉素相关土壤蛋白

2.8 硝化、反硝化功能基因与 AM 真菌变化之间的相关性分析

硝化、反硝化功能基因与 AM 真菌的相关性分析如表 7 所示。从表 7 中可得知,AM 真菌与 AOA、AOB、*nirK*、*nirS* 基因丰度呈极显著负相关( $P<0.01$ ),与 *nosZ* 呈极显著正相关( $P<0.01$ );AOA 与 AOB、*nirK*、*nirS* 基因丰度呈极显著正相关( $P<0.01$ ),与 *nosZ* 呈极显著负相关( $P<0.01$ );AOB 与 *nirK* 基因丰度呈极显著正相关( $P<0.01$ ),与 *nosZ* 呈极显著负相关( $P<0.01$ );*nirK* 与 *nirS* 基因丰度呈极显著正相关( $P<0.01$ ),与 *nosZ* 呈极显著负相关( $P<0.01$ );*nirS* 与 *nosZ* 基因丰度呈显著负相关( $P<0.05$ )。

表 7 AM 真菌与硝化、反硝化功能基因丰度的相关关系分析  
Table 7 Pearson correlation coefficients between AM fungi and functional gene abundance

	AM 真菌 AM fungi/ ( $10^6$ 拷贝/g)	AOA/ (拷贝/g)	AOB/ (拷贝/g)	<i>nirK</i> / (拷贝/g)	<i>nirS</i> / (拷贝/g)	<i>nosZ</i> / (拷贝/g)
AM 真菌 AM fungi/( $10^6$ 拷贝/g)	1					
AOA/(拷贝/g)	-0.715 **	1				
AOB/(拷贝/g)	-0.554 **	0.605 **	1			
<i>nirK</i> /(拷贝/g)	-0.727 **	0.708 **	0.667 **	1		
<i>nirS</i> /(拷贝/g)	-0.743 **	0.803 **	0.398 *	0.772 **	1	
<i>nosZ</i> /(拷贝/g)	0.607 **	-0.572 **	-0.503 **	-0.616 **	-0.323 *	1

2.9 土壤因子、硝化、反硝化功能基因和 AM 真菌丰度对 N<sub>2</sub>O 排放的相对贡献率

将土壤因子、硝化、反硝化功能基因和 AM 真菌丰度分别加入 ABT 模型进行分析(图 4),结果表明,AOA 对 N<sub>2</sub>O 排放的影响最大(21.1%),其次是 AM 真菌(19.2%)和 *nirS*(11.8%),其余因子贡献率均不足 10%;影响 N<sub>2</sub>O 排放量的相对贡献率由大到小依次为:AOA、AM 真菌、*nirS*、*nosZ*、AOB、铵态氮、土壤含水量、有机碳、硝态氮、*nirK*、土壤容重、pH。

3 结论与讨论

许多研究表明,农田土壤施入生物炭后,土壤理化性质如 pH、含水量、容重、有机碳、氮等发生相应变化<sup>[17,28]</sup>。本研究表明,施入生物炭后,土壤 pH 值和土壤含水量呈增加趋势,但均未达到显著水平,主要是因为生物炭自身呈碱性,施入土壤后能够提高土壤 pH 值,但本试验地土壤为弱碱性,具有一定的酸碱缓冲能力,因此各处理间土壤 pH 值差异不显著(表 2),另外生物炭具有较好的亲水性和持水能力,增加了水分的渗流模式和路径,减缓了土壤水分的蒸发损失,引起土壤含水量增加。这和李培培等<sup>[28]</sup>的研究结果一致。施入生物炭后,土壤容重呈减少趋势,这与 Baiaomonte 等<sup>[29]</sup>的研究结果一致,主要是由于生物炭具有多孔疏松的结构、大的比表面积,自身密度较小,施入土壤之后对土壤具有“稀释效应”<sup>[30]</sup>。施入生物炭后土壤有机碳的增加主要是由于以下几方面原因:首先是由生物质热解形成的生物炭中的碳主要以惰性的芳香环状结构存在,

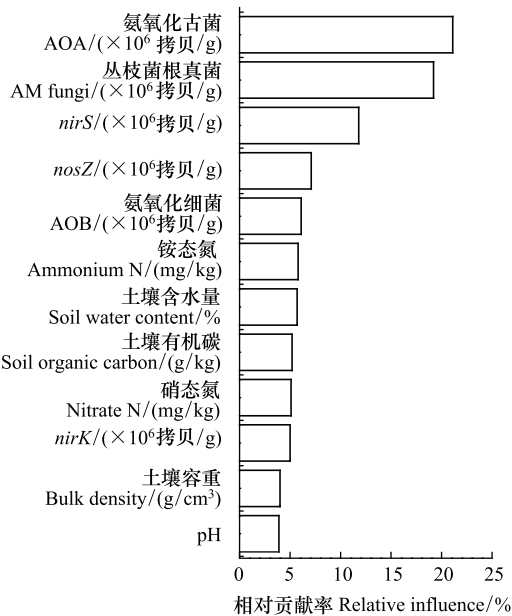


图 4 土壤因子、硝化、反硝化功能基因和 AM 真菌丰度对 N<sub>2</sub>O 排放的相对影响的 ABT 分析  
Fig.4 Relative importance of soil factors, nitrification and denitrification functional gene abundances and AM fungi for N<sub>2</sub>O emission by the aggregated boosted tree (ABT) model

本身碳含量非常高,在土壤中加入生物炭可以提高土壤有机碳的含量;其次是生物炭具有较强的吸附性,能够吸附土壤有机小分子,促进有机小分子聚合形成土壤有机质<sup>[31]</sup>,另外生物炭的多孔结构为微生物的生长繁殖提供附着位点,为微生物提供了良好的栖息环境,土壤微生物量增加,加速了土壤有机态养分的分解释放,从而增加土壤有机碳含量<sup>[17]</sup>。本研究表明,施入生物炭后,土壤全氮、铵态氮含量增加。这与 Nguyen 等<sup>[32]</sup>通过荟萃分析得出的结果不同,Nguyen 等研究发现生物炭的高 C/N 特性及带入的活性物质引起微生物对土壤矿质氮的固定,因此降低了氮素有效性。与宋大利等<sup>[33]</sup>和刘遵奇等<sup>[34]</sup>的研究结果相一致。主要是由于生物炭本身含有一定量的氮素;另外施用生物炭可降低氮素淋失和改善土壤通气状况抑制了微生物的反硝化作用,从而减少了  $\text{N}_2\text{O}$  的形成和排放,进而使得土壤中全氮含量增加。

生物炭孔隙由于能够贮存水分和养分,为微生物栖息生活提供了优越的天然微环境,生物炭施入土壤能够显著增加微生物数量及活性。本研究表明,施入生物炭能够显著提高 AM 真菌侵染率和 AM 真菌基因丰度,与 Hammer 等<sup>[17]</sup>的研究结果一致。主要原因可能为:(1)生物炭改善土壤理化特性有利于 AM 真菌孢子的萌发和生长,生物炭多孔结构为 AM 真菌提供栖息地<sup>[15]</sup>;(2)生物炭调节植物-真菌信号物质影响 AM 真菌的萌发和菌丝的分枝<sup>[35]</sup>;(3)生物炭可能通过影响土壤中的解磷细菌活性,从而间接影响 AM 真菌<sup>[36]</sup>。AM 真菌在氮素吸收利用和土壤氮素循环过程中有着重要的作用,一方面 AM 真菌能够通过竞争吸收氮素来调控  $\text{N}_2\text{O}$  排放。AM 真菌吸收大量氮素用以自身生长需要,并改善宿主植物的氮素营养<sup>[37]</sup>,从而减少硝化、反硝化作用底物浓度而降低  $\text{N}_2\text{O}$  排放速率;另一方面 AM 真菌能够改变植物根系分泌物的组成及数量,从而导致根际微生物群落发生变化,包括一些硝化、反硝化细菌群落,从而影响  $\text{N}_2\text{O}$  排放<sup>[38-39]</sup>。

土壤  $\text{N}_2\text{O}$  的排放主要是微生物活动过程产生的,硝化细菌和反硝化细菌的数量是影响  $\text{N}_2\text{O}$  排放的关键因素<sup>[40]</sup>。本试验结果表明,施用生物炭改变了 AOA 和 AOB 的基因丰度,且 AOA 和 AOB 的基因丰度与生物炭施用量呈极显著负相关关系,AOA 基因丰度随生物炭施用量的增加表现出显著降低的趋势,而 T1 和 T2 两处理间对 AOB 的基因丰度无显著影响,说明增加生物炭施用量对 AOB 基因丰度的影响较小,总的来说生物炭抑制了 AOA 和 AOB 的生长。这可能是因为生物炭对  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的吸附以及 AM 真菌对  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的吸收固定,减少了硝化反应的底物浓度,从而抑制了氨氧化菌的生长<sup>[5,41]</sup>。*nirK*、*nirS*、*nosZ* 基因丰度的高低直接影响反硝化作用的进程<sup>[42]</sup>,本研究表明,生物炭处理降低了 *nirK* 和 *nirS* 基因丰度,其中 T1 和 T2 处理较 T0 处理显著提高了 *nirK* 基因丰度,但 T1 和 T2 两处理间无显著差异,而 T2 处理较 T0 处理显著增加了 *nirS* 基因丰度, T1 处理对比 T0 处理无显著影响,说明 *nirK* 基因型反硝化细菌对低生物炭施用量比较敏感,而 *nirS* 基因型反硝化细菌对高生物炭施用量比较敏感,生物炭对 *nirK* 和 *nirS* 基因型反硝化细菌的繁殖有抑制作用。这与刘杏认等<sup>[3]</sup>的研究结果不同,可能是因为盆栽试验与大田试验土壤反硝化微生物所处的环境差异较大,从而使土壤反硝化微生物对生物炭的反映不尽相同。*nirK* 和 *nirS* 基因丰度与生物炭施用量呈极显著负相关。虽然生物炭处理增加了 *nosZ* 基因丰度,*nosZ* 基因丰度与生物炭施用量呈正相关,但未达到显著水平。生物炭增加 *nosZ* 基因丰度促使  $\text{N}_2\text{O}$  的还原,解释了生物炭对旱地农田土壤  $\text{N}_2\text{O}$  减排具有较大潜力。

AM 真菌与硝化、反硝化微生物的相互作用对  $\text{N}_2\text{O}$  排放具有重要意义。相关分析表明,AM 真菌与 AOA、AOB、*nirK*、*nirS* 基因丰度呈极显著负相关( $P<0.01$ ),与 *nosZ* 呈极显著正相关( $P<0.01$ )。Chen 等<sup>[43]</sup>通过室内盆栽模拟试验研究发现 AM 真菌可显著降低菌根际土壤 AOA、AOB 基因丰度,并且还分别间接、直接影响菌根室、菌丝室中 AOA 的群落组成。Veresoglou 等<sup>[44]</sup>研究发现接种 AM 真菌可能降低土壤中 AOA、AOB 的基因丰度。主要是由于 AM 真菌、氨氧化微生物(AOA 和 AOB)均以  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  为底物,二者在竞争土壤  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  时,氨氧化微生物(AOA 和 AOB)一般处于劣势,在土壤中  $\text{NH}_4^+$  较低时,AM 真菌优先利用  $\text{NH}_4^+$  并抑制氨氧化微生物对  $\text{NH}_4^+$  的利用,造成 AOA 和 AOB 丰度和土壤硝化速率的降低,进而减少了硝化过程中产生的  $\text{N}_2\text{O}$ 。Bender 等<sup>[1]</sup>研究发现野生型番茄接种 AM 真菌后土壤中 *nirK* 基因丰度和 AM 真菌侵染率呈线性负相关,和 *nosZ* 基因丰度则呈正相关,且土壤  $\text{N}_2\text{O}$  排放量显著下降。表明 AM 真菌降低了土壤中硝化、反硝化微生物的基因丰度,提高了 *nosZ* 基因的丰度,进而降低  $\text{N}_2\text{O}$  的排放。集成推进树(ABT)分析表明,AOA 对  $\text{N}_2\text{O}$  排放的

影响最大,其次是 AM 真菌、*nirS* 和 *nosZ*,刘杏仁等<sup>[3]</sup>研究认为盆栽小麦土壤  $N_2O$  的排放主要受 AOA、*nirS* 和 *nosZ* 影响,Liu 等<sup>[13]</sup>研究认为华北农田玉米季  $N_2O$  的排放主要受 AOB 和 *nosZ* 影响,主要由于土壤类型和所种植的农作物种类不同,造成影响  $N_2O$  排放的主要因子不同。

总的来说,生物炭处理提高土壤 AM 真菌侵染率、调节土壤理化性质,生物炭和 AM 真菌协同调节土壤微生物,特别是对硝化、反硝化相关基因的调节,进而影响土壤 N 循环和  $N_2O$  气体的排放,但生物炭和 AM 真菌之间的协调机制需要进行更进一步研究。

#### 参考文献 (References):

- [1] Bender S F, Plantenga F, Nefel A, Jocher M, Oberholzer H R, Köhl L, Giles M, Daniell T J, van der Heijden M G A. Symbiotic relationships between soil fungi and plants reduce  $N_2O$  emissions from soil. *The ISME Journal*, 2014, 8(6): 1336-1345.
- [2] Meng Q F, Yue S C, Hou P, Cui Z L, Chen X P. Improving yield and nitrogen use efficiency simultaneously for maize and wheat in China: a review. *Pedosphere*, 2016, 26(2): 137-147.
- [3] 刘杏认, 赵光昕, 张晴雯, 田秀平. 生物炭对华北农田土壤  $N_2O$  通量及相关功能基因丰度的影响. *环境科学*, 2018, 39(8): 3816-3825.
- [4] 贾仲君, 翁佳华, 林先贵, Conrad R. 氨氧化古菌的生态学研究进展. *微生物学报*, 2010, 50(4): 431-437.
- [5] 陈永亮, 陈保冬, 刘蕾, 胡亚军, 徐天乐, 张莘. 丛枝菌根真菌在土壤氮素循环中的作用. *生态学报*, 2014, 34(17): 4807-4815.
- [6] Kang F R, Yang B, Wujisiguleng, Yang X, Wang L, Guo J X, Sun W, Zhang Q, Zhang T. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate the negative effect of nitrogen deposition on ecosystem functions in meadow grassland. *Land Degradation & Development*, 2020, 31(6): 748-759.
- [7] Qiu Y P, Jiang Y, Guo L J, Zhang L, Burkey K O, Zobel R W, Reberg-Horton S C, Shew H D, Hu S J. Shifts in the composition and activities of denitrifiers dominate  $CO_2$  stimulation of  $N_2O$  emissions. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(19): 11204-11213.
- [8] Zhang H, Voroney R P, Price G W. Effects of temperature and processing conditions on biochar chemical properties and their influence on soil C and N transformations. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 19-28.
- [9] 陈温福, 张伟明, 孟军. 农用生物炭研究进展与前景. *中国农业科学*, 2013, 46(16): 3324-3333.
- [10] Li S L, Wang S, Fan M C, Wu Y, Shanguan Z P. Interactions between biochar and nitrogen impact soil carbon mineralization and the microbial community. *Soil and Tillage Research*, 2020, 196: 104437.
- [11] 刘杏认, 张星, 张晴雯, 李贵春, 张庆忠. 施用生物炭和秸秆还田对华北农田  $CO_2$ 、 $N_2O$  排放的影响. *生态学报*, 2017, 37(20): 6700-6711.
- [12] 姬强, 马媛媛, 刘永刚, 王锐, 孙权. 秸秆生物炭对土壤结构体与活性碳分布、转化酶动力学参数及小麦生长的影响. *生态学报*, 2019, 39(12): 4366-4375.
- [13] Liu X R, Ren J Q, Zhang Q W, Liu C. Long-term effects of biochar addition and straw return on  $N_2O$  fluxes and the related functional gene abundances under wheat-maize rotation system in the North China Plain. *Applied Soil Ecology*, 2019, 135: 44-55.
- [14] Gomez J D, Denef K, Stewart C E, Zheng J, Cotrufo M F. Biochar addition rate influences soil microbial abundance and activity in temperate soils. *European Journal of Soil Science*, 2014, 65(1): 28-39.
- [15] Hammer E C, Forstreuter M, Rillig M C, Kohler J. Biochar increases arbuscular mycorrhizal plant growth enhancement and ameliorates salinity stress. *Applied Soil Ecology*, 2015, 96: 114-121.
- [16] Zhang L, Qiu Y P, Cheng L, Wang Y, Liu L L, Tu C, Bowman D C, Burkey K O, Bian X M, Zhang W J, Hu S J. Atmospheric  $CO_2$  enrichment and reactive nitrogen inputs interactively stimulate soil cation losses and acidification. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(12): 6895-6902.
- [17] Hammer E C, Balogh-Brunstad Z, Jakobsen I, Olsson P A, Stipp S L S, Rillig M C. A mycorrhizal fungus grows on biochar and captures phosphorus from its surfaces. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 77: 252-260.
- [18] 张学林, 徐钧, 安婷婷, 侯小畔, 李潮海. 不同氮肥水平下玉米根际土壤特性与产量的关系. *中国农业科学*, 2016, 49(14): 2687-2699.
- [19] Kalembasa S J, Jenkinson D S. A comparative study of titrimetric and gravimetric methods for the determination of organic carbon in soil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1973, 24(9): 1085-1090.
- [20] Jackson M L. *Soil Chemical Analysis*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1973.
- [21] Biermann B, Linderman R G. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. *New Phytologist*, 1981, 87(1): 63-67.
- [22] 李少朋, 毕银丽, 陈咄圳, Yryszhan Z, 刘生. 外源钙与丛枝菌根真菌协同对玉米生长的影响与土壤改良效应. *农业工程学报*, 2013, 29(1): 109-116.



- [23] van Geel M, Busschaert P, Honnay O, Lievens B. Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 106: 93-100.
- [24] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, Santoro A E, Oakley B B. 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.
- [25] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [26] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3769-3775.
- [27] Throbäck I N, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49(3): 401-417.
- [28] 李培培, 汪强, 文倩, 李慧, 吴传发, 熊伟东, 韩燕来. 不同还田方式对砂质潮土理化性质及微生物的影响. *生态学报*, 2017, 37(11): 3665-3672.
- [29] Baiaumont G, Crescimanno G, Parrino F, De Pasquale C. Effect of biochar on the physical and structural properties of a sandy soil. *Catena*, 2019, 175: 294-303.
- [30] 韩召强, 陈效民, 曲成闯, 张晓玲, 张俊, 黄春燕, 刘云梅. 生物炭对黄瓜连作土壤理化性状、酶活性及土壤质量的持续效应. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(5): 1227-1236.
- [31] Grunwald D, Kaiser M, Junker S, Marhan S, Piepho H P, Poll C, Bamminger C, Ludwig B. Influence of elevated soil temperature and biochar application on organic matter associated with aggregate-size and density fractions in an arable soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, 241: 79-87.
- [32] Nguyen T T N, Xu C Y, Tahmasbian I, Che R X, Xu Z H, Zhou X H, Wallace H M, Bai S H. Effects of biochar on soil available inorganic nitrogen: a review and meta-analysis. *Geoderma*, 2017, 288: 79-96.
- [33] 宋大利, 习向银, 黄绍敏, 张水清, 袁秀梅, 黄伏森, 刘阳, 王秀斌. 秸秆生物炭配施氮肥对潮土土壤碳氮含量及作物产量的影响. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(2): 369-379.
- [34] 刘遵奇, 兰宇, 杨铁鑫, 张艺潇, 孟军. 减肥条件下生物炭施用方式对土壤肥力及酶活性的影响. *农业资源与环境学报*, 2020, 37(4): 544-551.
- [35] Atkinson C J, Fitzgerald J D, Hipps N A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. *Plant and Soil*, 2010, 337(1/2): 1-18.
- [36] Warnock D D, Lehmann J, Kuyper T W, Rillig M C. Mycorrhizal responses to biochar in soil-concepts and mechanisms. *Plant and Soil*, 2007, 300(1/2): 9-20.
- [37] Hodge A, Fitter A H. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(31): 13754-13759.
- [38] 韦莉莉, 卢昌熠, 丁晶, 俞慎. 丛枝菌根真菌参与下植物-土壤系统的养分交流及调控. *生态学报*, 2016, 36(14): 4233-4243.
- [39] 赵兰凤, 张新明, 程根, 张丽娟, 刘小锋, 李华兴. 生物炭对菜园土壤微生物功能多样性的影响. *生态学报*, 2017, 37(14): 4754-4762.
- [40] Cui X Q, Hao H L, Zhang C K, He Z L, Yang X E. Capacity and mechanisms of ammonium and cadmium sorption on different wetland-plant derived biochars. *Science of the Total Environment*, 2016, 539: 566-575.
- [41] Li S L, Wang S, Shangguan Z P. Combined biochar and nitrogen fertilization at appropriate rates could balance the leaching and availability of soil inorganic nitrogen. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2019, 276: 21-30.
- [42] Ji C, Li S Q, Geng Y J, Miao Y C, Ding Y, Liu S W, Zou J W. Differential responses of soil  $N_2O$  to biochar depend on the predominant microbial pathway. *Applied Soil Ecology*, 2020, 145: 103348.
- [43] Chen Y L, Chen B D, Hu Y J, Li T, Zhang X, Hao Z P, Wang Y S. Direct and indirect influence of arbuscular mycorrhizal fungi on abundance and community structure of ammonia oxidizing bacteria and archaea in soil microcosms. *Pedobiologia*, 2013, 56(4/6): 205-212.
- [44] Veresoglou S D, Sen R, Mamolos A P, Veresoglou D S. Plant species identity and arbuscular mycorrhizal status modulate potential nitrification rates in nitrogen-limited grassland soils. *Journal of Ecology*, 2011, 99(6): 1339-1349.