

夏广英,高庚渠. 镉污染土壤中生物炭对紫花苜蓿镉吸收、土壤性质及氮矿化的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(23):206-212.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.23.031

镉污染土壤中生物炭对紫花苜蓿镉吸收、土壤性质及氮矿化的影响

夏广英,高庚渠

(河南质量工程职业学院,河南平顶山 467000)

摘要:添加生物炭或植物修复可有效修复土壤重金属污染,然而尚不确定植物修复下生物炭添加率在多大程度上影响着镉(Cd)修复效果。采用盆栽试验,设置对照(CK)、苜蓿种植(MX)、苜蓿种植+1%生物炭(MX+BC1)、苜蓿种植+2%生物炭(MX+BC2)、苜蓿种植+4%生物炭(MX+BC4),研究生物炭及苜蓿修复对Cd累积、土壤性质及相关氮矿化功能基因丰度的影响。结果表明,与MX处理相比,添加生物炭处理(MX+BC1、MX+BC2、MX+BC4)增加了紫花苜蓿生物量和植物Cd累积量,以MX+BC1处理最佳。与CK相比,苜蓿种植单一或与生物炭组施均可显著增加土壤有机质(SOM)含量,并对土壤阳离子交换性能产生显著影响。此外,MX处理提高了与土壤矿化相关的蛋白质酶、几丁质酶、氮矿化速率(R_m)及氮素转化相关的功能基因丰度,但对酶相关基因($nprA$ 、 $aprA$ 、 $chiA$)表达影响较低。相关性分析表明, R_m 与全氮含量、碱性蛋白酶、 $A-Cd$ 、 $nprA$ 、细菌功能基因($AOB-amoA$)呈极显著相关;逐步回归分析表明, $AOB-amoA$ 和 $nprA$ 可预测氮矿化速率。综上所述,与CK相比,苜蓿种植单一或与生物炭一起使用可以通过降低Cd生物有效性和增加 $AOB-amoA$ 、 $nprA$ 、SOM含量及提高氮矿化来修复污染土壤。

关键词:生物炭;紫花苜蓿;镉吸收;氮矿化;基因表达

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)23-0206-07

由于集约化农业迅速发展和土壤地质高背景,农业土壤中重金属污染程度日益严重,其中镉(Cd)污染是胁迫农田健康的主要重金属之一^[1]。镉(Cd)具有高移动性和高毒害性等特征,可对农业生产构成严重威胁,同时通过食物链进一步威胁牲畜和人类健康,因此迫切需要采用生态友好的方法对污染土壤进行修复^[2]。作为绿色友好的修复措施,植物修复技术可有效去除污染物^[3]。紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是世界范围内被广泛用作修复重(类)金属的功能植物,相对于其他修复植物紫花苜蓿具有根深蒂固、高产、耐旱等诸多明显优势^[4]。生物炭是废弃物、畜禽粪便和污泥等生物质材料在限氧或无氧条件下,经热裂解得到的一种富碳产品^[5]。研究表明,生物炭由于其多孔结构、较大的比表面积、较高的表面电荷密度以及高pH值,可以有效吸附和固定重金属离子^[6],目前已广泛运用于修复镉(Cd)、铅(Pb)、铬(Cr)等金属离子污染的

土壤。

对于农业土壤修复,除了去除或钝化土壤污染物外,还应关注土壤养分保持和生物地球化学循环的作用^[7]。土壤养分受植物摄入量和根系分泌物调节,功能性植物可以通过改变土壤物理结构来影响有机质分解、养分释放和土壤呼吸等^[8]。因此,植物修复可以显著改变受污染土壤的理化性质,从而影响功能微生物的丰度,进而影响土壤的生物地球化学循环^[7,9]。土壤氮(N)矿化是地球生物化学N循环的重要过程,主要由功能性微生物介导^[10]。作为N矿化的重要表征,蛋白酶在分解土壤蛋白质以提供矿物质氮方面发挥着关键作用^[11],编码土壤蛋白酶的功能基因包括 $nprA$ 和 $aprA$ 基因,除蛋白酶外,几丁质酶亦参与了土壤有机质中矿物N的释放,微生物中编码几丁质分解酶的关键功能基为 $chiA$ 基因^[12]。属于水解酶的土壤蛋白酶和几丁质酶可以反映整个土壤微生物的活性,同时皆参与了污染物的转化和降解^[13]。众多研究表明,蛋白酶和几丁质酶在恢复土壤生态系统服务中扮演着极其重要的角色。

此外,功能性氨氧化古菌(AOA)和细菌(AOB)对土壤污染物反应较为敏感,因此相对于其他生化

收稿日期:2022-03-01

基金项目:河南省重点研发与推广专项(编号:202002110148)。

作者简介:夏广英(1980—),女,河南平顶山人,讲师,主要从事草业与畜牧研究。E-mail:xiazwz119@163.com。

过程,由于功能多样性较低,土壤矿化对不同类型污染源的敏感性存在差异^[14]。因此,N 素矿化率(R_m)是反映功能微生物丰度、土壤理化性质和污染物含量的重要表征,已被广泛用作量化土壤环境质量的有效指标^[7]。尽管一些研究已经报道了污染土壤中 N 矿化速率的变化特征,然而很少有研究同时关注酶活性和相应的功能基因丰度。基于此,本研究通过盆栽试验探讨了 Cd 污染土壤中生物炭对紫花苜蓿镉吸收、土壤性质及氮矿化相关基因的影响,研究结果可为生物炭和植株修复广泛运用于修复污染土壤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点与材料

试验于 2021 年 4—7 月在河南质量工程职业学院研究场地温室中进行,棚中昼/夜平均温度为 28 ℃/19 ℃,相对湿度为 75%。

供试紫花苜蓿种子来自河南省农业科学院,紫花苜蓿种子在体积分数 10% 的过氧化氢溶液中进行表面消毒,在黑暗中潮湿的滤纸上催芽 24 h。供试生物炭来自河南省生物炭工程技术研究中心,采用玉米和小麦秸秆(质量比 1:2)在低氧、450 ℃ 条件下连续炭化 60 min 制得,其基本性质为:全碳含量 49.5%,总氮含量 2.15%,比表面积为 15.48 m²/g,容重为 0.27 g/cm³,pH 值为 8.32,主要官能团为羟基、烷烃和酰胺基。

供试土壤取自河南省平顶山某镉污染农田土壤 0~20 cm 表层。土壤类型为褐土,pH 值为 8.06,土壤全 Cd 含量为 5.28 mg/kg,根据国家标准环境质量标准(GB 15618—1995),pH 值 > 7.5,Cd 含量 > 1 mg/kg,即为镉超标,该农田土壤 Cd 含量为限额的 5.28 倍。土壤理化性质为:有机质含量 20.26 g/kg,全氮含量 1.05 g/kg、碱解氮含量 140.86 mg/kg,有效磷含量 17.52 mg/kg,速效钾含量 115.61 mg/kg。

1.2 试验设计

试验采用完全随机设计,设置 5 个处理分别为,MX:单独种植紫花苜蓿;MX + BC1:种植紫花苜蓿 + 1% 生物炭;MX + BC2:种植紫花苜蓿 + 2% 生物炭;MX + BC4:种植紫花苜蓿 + 4% 生物炭;不种植苜蓿植物修复和不添加生物炭的为空白对照处理(CK);其中 1%、2%、4% 生物炭指添加生物炭质量与盆栽用土质量的百分比。每个处理 3 次重复。

每盆装土 2 kg。将相应处理的生物炭比例与土壤提前混合均匀。每盆播撒种子 3 粒(按田间种植密度 8×10^7 粒/hm²),保持 70% 土壤持水量。种植期间不定时加入自来水,其他管理措施同作物培育方法,试验培育期 90 d。

1.3 样品采集及测定分析

1.3.1 植株生物量、Cd 含量及土壤 Cd 含量测定

培育结束后收获紫花苜蓿植株,采用清水小心清洗根系,将苜蓿不同部位分离,小心快速冲洗,然后置于烘箱中 105 ℃ 杀青 30 min,70 ℃ 烘干至恒质量并称质量记录。采用石墨炉-原子吸收光谱法测定植物提取物中的 Cd 浓度。

称取 1.00 g 土壤样品于 Teflon PFA 窄口瓶中,加入 2 mL HNO₃ 和 2 mL 30% H₂O₂ 在封闭条件下高温消解得到消解样品。采用电感耦合等离子体光谱仪(ICP-OES)测定土样中的 Cd 浓度。

1.3.2 土壤理化性质、土壤酶活性测定 采用奥豪斯 ST3100/F 型 pH 值计进行土壤 pH 值测定(水:土=2.5:1),采用 K₂Cr₂O₇ 氧化还原滴定法测定土壤有机碳(SOM)含量,总氮(TN)含量采用半微量凯氏定氮法测定,速效氮含量采用碱解扩散法测定,阳离子交换量(CEC)采用 EDTA-铵盐快速法^[15]测定。

土壤中性蛋白酶活性(SNPA)、碱性蛋白酶活性(SAPA)及土壤几丁质酶活性(SCA)分别采用试剂盒 BC0275、BC0880 及 BC1935-100T/48S 测定(Solarbio,北京)。

1.3.3 土壤矿化率测定 每个样本取 40.00 g 土壤放置于 500 mL 的聚乙烯瓶(高 6 cm,直径 4 cm)中,保持 70% 的土壤含水率,在 25 ℃ 的恒温黑暗培养箱中预培养 6 d,然后,在相同的环境条件下正式培养 14 d。在培养 1、7、14 d 分别对培养瓶进行土壤取样,测定样品无机氮浓度。土壤氮矿化速率(R_m)计算参照王子龙的方法^[16]进行, R_m [mg/(kg·d)] = 培养后无机氮(NH₄⁺ - N + NO₃⁻ - N)含量 - 培养前无机氮(NH₄⁺ - N + NO₃⁻ - N)含量/培养时间。

1.3.4 土壤酶活基因及功能基因丰度测定 称取新鲜土壤样品 500 mg,采用 FastDNA® SPIN 土壤试剂盒(MP Biomedicals,USA)提取土壤 DNA。并用 NanoDrop ND-1000 紫外-可见分光光度计(NanoDrop Technologies,Wilmington,简称 DE)采用紫外分光光度法检测 DNA 质量和浓度,并将 DNA

悬浮液保持在 - 20 ℃ 环境。采用实时荧光定量 PCR (RT - PCR) 测定土壤氮循环中关键酶基因的丰度,土壤酶活基因 (*nprA*、*aprA*、*chiA*) 引物参考 Man^[17],AOA 及 AOB 基因引物为常规(古)细菌氨氧化基因引物^[18](表 1)。使用 SYBR GREEN PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan) 和 Bio - Rad CFX96 光学实时检测系统(Bio - Rad Laboratories, Inc. Hercules,CA)上进行 RT - PCR 反应。反应体系为 20 μL,包括 10 μL SYBR® Premix Ex *Taq*TM

(TaKaRa Biotech, 中国大连)、7. 6 μL ddH₂O、0. 2 μL 正向引物(10 μmol/L)、0. 2 μL 反向引物(10 μmol/L)、2. 0 μL 模板 DNA。qRT - PCR 反应步骤为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环。通过对含有评估基因的纯化质粒进行 10 倍连续倍比稀释(10¹ ~ 10⁸ 倍)获得标准曲线。每个反应组都运行包含无菌 ddH₂O 作为模板的空白对照,标准曲线的 *R*² 值范围为 0. 991 ~ 0. 999。

表 1 实时定量 PCR 的引物序列信息

基因名	正向序列 (F - primer)	反向序列 (R - primer)
AOA <i>amoA</i>	5' - STAATGGTCTGGCTTAGACG - 3'	5' - GCGGCCATCCATCTGTATGT - 3'
AOB <i>amoA</i>	5' - GGGGTTTCTACTGGTGCT - 3'	5' - CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC - 3'
<i>nprA</i>	5' - GTDGAYGCHCAYTAYTAYGC - 3'	5' - ACMGCATGBGTYADYTCATG - 3'
<i>aprA</i>	5' - TAYGGBTTCAAYTCCAAYAC - 3'	5' - VGCGATSGAMACRTRTRCC - 3'
<i>chiA</i>	5' - GACGGCATCGACATCGATTGG - 3'	5' - CSGTCCAGCCGCGSCCRTA - 3'

1.4 数据处理与统计分析

采用 Microsoft Excel 2016 进行数据整理,采用 SPSS 22. 0 进行检验分析 (α = 0. 05),采用 Origin 9. 1 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 镉污染土壤中生物炭对紫花苜蓿生物量累积及镉吸收的影响

由表 2 可知,紫花苜蓿地上部生物量、根系生物量及总生物量均表现为生物炭 MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 处理皆显著大于单一苜蓿种植处理

(MX),且生物炭处理中,皆表现为随着生物炭用量增加生物量累积量降低,各处理生物量顺序皆呈 MX + BC1 > MX + BC2 > MX + BC4 > MX 处理,与 MX + BC1 处理相比,地上部生物量、根系生物量及总生物量分别显著降低 27. 24% ~ 68. 93%、29. 12% ~ 72. 97%、27. 77% ~ 70. 07%。在根系 Cd 浓度中,与 MX 处理相比,MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 处理分别显著降低 23. 25%、27. 33%、26. 02%;地上部 Cd 浓度表现为 MX + BC4 > MX + BC1 > MX > MX + BC2 处理,但处理间无显著差异。各处理植株 Cd 累积量与根系生物量累积规律基本一致。

表 2 镉污染土壤中生物炭对紫花苜蓿生物量累积及镉吸收的影响

处理	根系生物量 (kg/hm ²)	地上部生物量 (kg/hm ²)	总生物量 (kg/hm ²)	根系 Cd 浓度 (mg/kg)	地上部 Cd 浓度 (mg/kg)	植株 Cd 累积量 (g/hm ²)
CK	—	—	—	—	—	—
MX	682. 93 ± 41. 56c	1 978. 05 ± 236. 22d	2 660. 98 ± 236. 22d	26. 02 ± 2. 49a	5. 18 ± 0. 83a	28. 02 ± 8. 02c
MX + BC1	2 526. 46 ± 205. 07a	6 365. 68 ± 153. 62a	8 892. 14 ± 253. 76a	19. 97 ± 0. 57b	5. 21 ± 0. 47a	83. 62 ± 5. 41a
MX + BC2	1 790. 88 ± 263. 25b	4 631. 69 ± 194. 65b	6 422. 57 ± 341. 92b	18. 91 ± 2. 56b	4. 76 ± 0. 56a	55. 91 ± 6. 55b
MX + BC4	1 517. 98 ± 269. 08b	2 851. 94 ± 326. 19c	4 369. 92 ± 606. 53c	19. 25 ± 4. 02b	5. 59 ± 0. 88a	45. 16 ± 6. 26b

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著(P < 0. 05)。表 2 同。

2.2 镉污染土壤中生物炭及紫花苜蓿对土壤理化性质的影响

由表 3 可知,pH 值整体以生物炭处理 MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 大于 CK、MX 处理,其中 MX + BC4 处理显著大于 CK、MX 处理。土壤有机质中,不同处理呈 MX + BC4 > MX + BC2 > MX +

BC1 > MX > CK 处理,且较 MX + BC4 处理相比,MX + BC2、MX + BC1、MX、CK 处理分别显著降低 9. 87%、15. 07%、17. 35%、20. 67%。阳离子交换量中,MX 处理显著大于 CK,且生物炭处理均显著高于 CK、MX 处理。各处理全氮含量、速效氮含量规律基本一致,即生物炭处理 MX + BC1、MX + BC2、

MX + BC4 皆显著小于 CK、MX 处理,由于表现在速效氮指标中,且上述 3 个指标中生物炭处理间无显著差异。土壤有效 Cd 浓度中,以苜蓿 + 生物炭处理 MX、MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 较低,皆显

著低于 CK,同时生物炭处理间呈 MX + BC4 < MX + BC2 < MX + BC1,即随着生物炭施用水平增加,土壤有效 Cd 浓度下降。

表 3 镉污染土壤中生物炭及紫花苜蓿对土壤理化性质的影响

处理	pH 值	土壤有机质含量 (g/kg)	全氮含量 (kg/hm ²)	速效氮含量 (mg/kg)	阳离子交换量 (cmol/kg)	土壤有效 Cd 浓度 (μg/kg)
CK	8.06 ± 0.03b	20.26 ± 0.27d	1.05 ± 0.04a	140.86 ± 23.58a	10.85 ± 0.53c	753.28 ± 28.73a
MX	8.02 ± 0.08b	21.11 ± 0.23c	1.03 ± 0.11a	96.52 ± 6.49b	13.17 ± 0.61b	675.70 ± 39.22b
MX + BC1	8.14 ± 0.05ab	21.69 ± 0.92bc	0.86 ± 0.04b	69.97 ± 8.57c	18.81 ± 0.18a	628.72 ± 22.37b
MX + BC2	8.18 ± 0.08ab	23.02 ± 0.38b	0.84 ± 0.05b	62.01 ± 2.91c	18.52 ± 0.45a	471.62 ± 45.68c
MX + BC4	8.21 ± 0.04a	25.54 ± 0.89a	0.84 ± 0.07b	61.97 ± 5.02c	18.69 ± 0.28a	402.92 ± 32.81c

2.3 镉污染土壤中生物炭及紫花苜蓿对土壤酶活性及基因丰度的影响

相关酶活性中,土壤几丁质酶以 MX + BC1 处理活力最大,MX + BC2 处理其次,二者差异显著且皆显著大于其他处理,同时 CK、MX + BC4 这 2 个处理显著低于 MX 处理(图 1-a)。由图 1-b 可知,各处理中性蛋白酶活性表现为 MX + BC4 > MX + BC2 > MX + BC1 > MX > CK 处理,较 CK 相比,苜蓿及生物炭处理 MX、MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 显著提高 31.69% ~ 90.39%。土壤碱性蛋白酶活性仍以 CK 最低,MX + BC2、MX + BC4、MX + BC1、MX 处理较其分别显著提高 267.79%、236.99%、213.50%、154.29%。

相关酶基因丰度中,*chiA* 基因丰度以 CK 最高,其他处理较其显著降低 20.31% ~ 51.81%,此外,MX、MX + BC4 处理显著低于 MX + BC1、MX + BC2 这 2 个处理(图 1-d)。*nprA* 基因丰度中,整体以生物炭处理 MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 较高,均显著高于 CK,且 MX + BC1、MX + BC2 处理显著大于 MX 处理(图 1-e)。*aprA* 基因丰度中,各处理呈 MX < MX + BC1 < CK < MX + BC4 < MX + BC2,但处理间均无显著差异。

2.4 镉污染土壤中生物炭及紫花苜蓿对土壤氮转化基因丰度的影响

由图 2-a 可知,*AOA - amoA* 基因中,以 CK 丰度最低, 1.35×10^8 拷贝数/g,MX、MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 处理较其显著增加 31.85%、77.78%、104.44%、51.11%,其中 CK 与 MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 均存在显著差异。*AOB - amoA* 基因中,以 CK 丰度最低,显著低于其他处理,

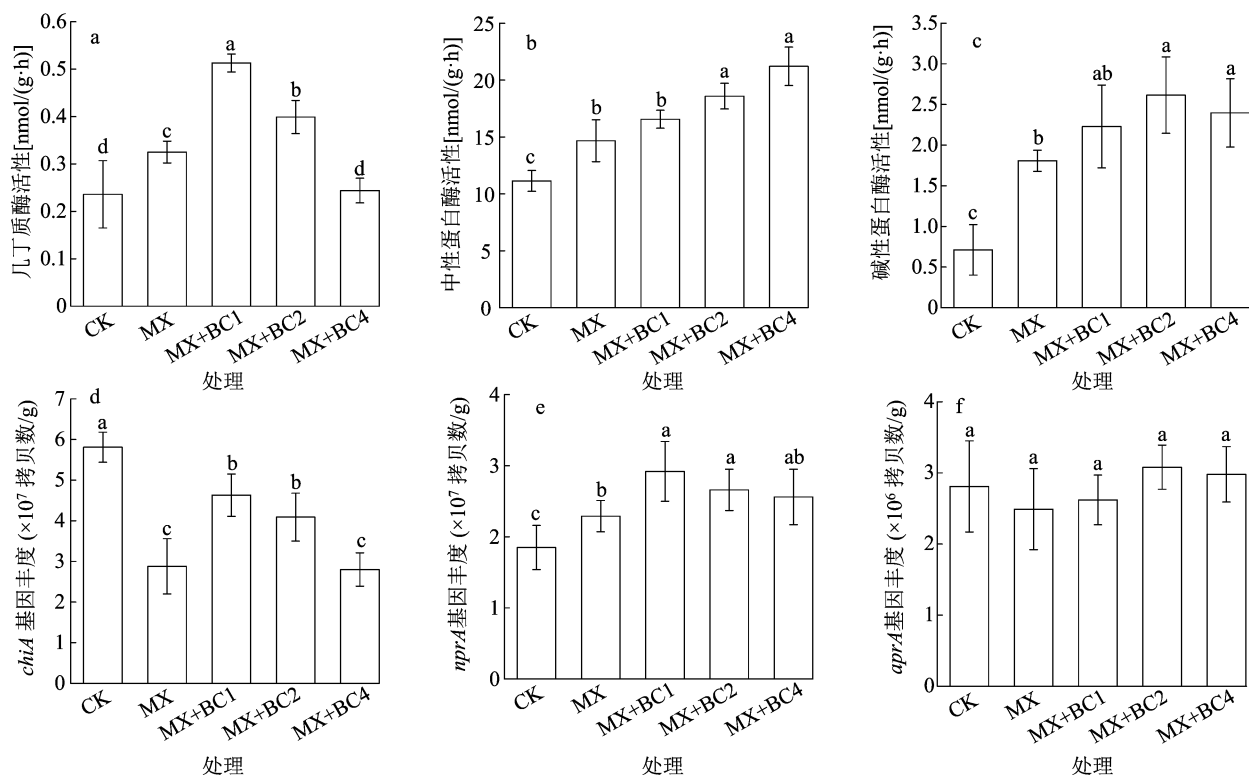
且各处理呈 MX + BC4 > MX + BC2 > MX + BC1 > MX > CK 处理,MX + BC4 处理显著高于其余各处理(图 2-b)。而在 *AOA - amoA/AOB - amoA* 中,CK、MX、MX + BC1、MX + BC2 处理间差距较小,处理间无显著差异;以 MX + BC4 处理比例最低,CK、MX、MX + BC1、MX + BC2 较其分别显著提高 68.35%、49.89%、62.50%、76.02%。

2.5 镉污染土壤中生物炭及紫花苜蓿对土壤氮矿化率的影响

由图 3 可知,氮矿化率以生物炭处理 MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 大于 CK、MX 处理,且生物炭处理间表现为 MX + BC1 > MX + BC2 > MX + BC4 处理,且 MX + BC1 处理显著大于 MX + BC4 处理。以 CK 矿化率最低,MX 处理较其显著提高 58.55%。与单一紫花苜蓿处理 MX 相比,MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 处理分别显著提高 270.62%、235.04%、182.75%。

2.6 氮矿化速率与土壤性质、功能基因丰度之间的关系

从表 4 可以看出,*Rm* 与全氮(TN)、速效氮(AN)土壤有效 Cd 浓度(A - Cd)均呈极显著负相关,*Rm* 与 pH 值、有机质(SOM)、碱性蛋白酶(SAPA)、*nprA*、*AOB - amoA* 呈极显著正相关,与 *AOA - amoA* 呈显著正相关。A - Cd 与土壤性质、功能基因丰度之间的相关性分析则和 *Rm* 相反。由表 5 可知,在 *Rm* 与相关功能基因的逐步回归分析中,回归模型为 $Rm = 18.27 \times AOB - amoA + 6.92 \times 10^{-7} \times nprA - 5.45$,且 $P < 0.01$,同样,*Rm* 与有效 Cd 浓度的逐步回归分析显示 *Rm* 与 A - Cd 浓度存在对数关系,且 $P < 0.01$ 。



圆柱上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。图 2、图 3 同
图1 镉污染土壤中生物炭及紫花苜蓿对土壤酶活性及相关酶基因表达的影响

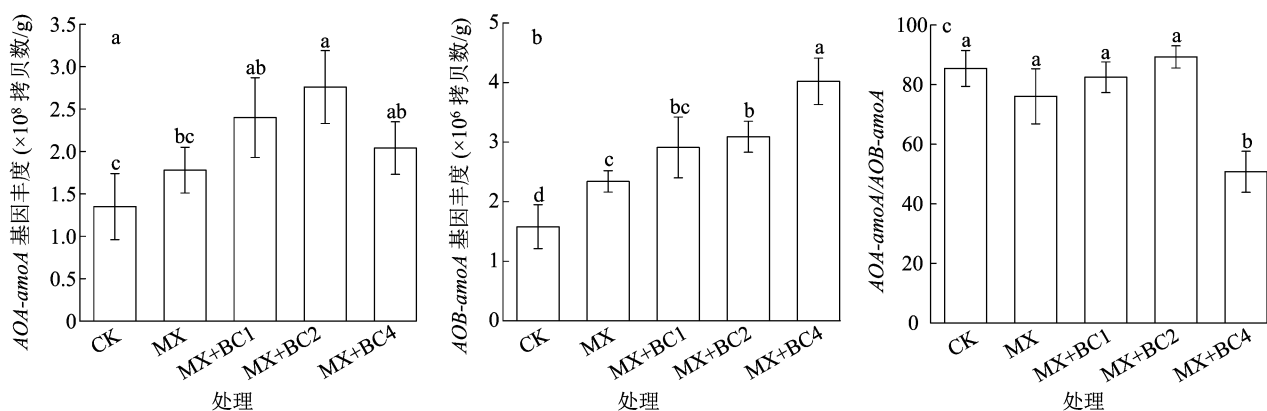


图2 镉污染土壤中生物炭及紫花苜蓿对土壤氮转化基因丰度的影响

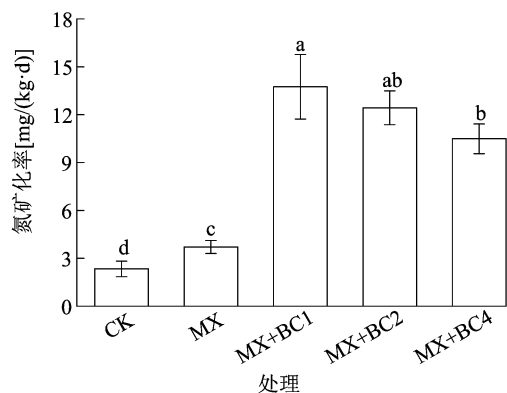


图3 镉污染土壤中生物炭及紫花苜蓿对土壤氮矿化率的影响

3 讨论与结论

土壤 Cd 污染已成为制约农业安全发展的重要因素,物理修复和植物修复已被证明可极大地作用于土壤 Cd 修复^[19-20]。本研究,在 Cd 污染土壤中,紫花苜蓿地上部生物量累积大于根系,而在 Cd 浓度分布趋势则反之,且在植株 Cd 累积量中,表现为 MX + BC1 > MX + BC2 > MX + BC4 > MX 处理,这意味着紫花苜蓿的修复作用涉及根系的吸收富集,从而从根部转移到地上部,然后在地上组织中积

表 4 氮矿化速率与土壤性质、功能基因丰度之间的相关性分析

指标	相关系数														
	A - Cd	SOM	TN	AN	CEC	pH 值	SNPA	SAPA	SCA	<i>nprA</i>	<i>aprA</i>	<i>chiA</i>	<i>AOA - amoA</i>	<i>AOB - amoA</i>	<i>AOA - amoA / AOB - amoA</i>
Rm	-0.761 **	0.624 *	-0.917 **	-0.773 **	-0.920 **	0.676 **	0.564 *	0.719 **	0.477	0.890 **	0.146	-0.030	0.543 *	0.813 **	-0.343
A - Cd	1.000	-0.966 **	0.652 *	0.657 *	0.618 *	-0.852 *	-0.010	-0.965 **	0.383	-0.592 *	-0.553	0.357	-0.455	-0.901 **	0.858 **

注: *、** 分别表示在 0.05、0.01 水平显著相关。

表 5 氮矿化速率与功能基因丰度、有效镉(A - Cd)之间的逐步回归分析

逐步回归模型	R^2	显著性
$Rm = 18.27 \times AOB - amoA + 6.92 \times 10^{-7} \times nprA - 5.45$	0.841	$P < 0.01$
$lgRm = -2.61 \times 10^{-3} \times A - Cd + 10.324$	0.698	$P < 0.01$

累,生物炭可进一步促进紫花苜蓿的修复效果。从植物吸收和土壤微生物的利用角度来看,有效重金属含量是决定植物组织中重金属的吸收和累积的重要因素^[21]。本研究结果表明,紫花苜蓿植物修复处理均显著降低了土壤有效镉含量,造成这种现象的原因可能是:(1)苜蓿根系分泌物与 Cd 络合,降低了有效 Cd 含量^[22];(2)紫花苜蓿根系可以吸附金属离子,且改变土壤微生物群落,从而进一步固定更多的重金属 Cd^[23]。

土壤氮含量、有机质及阳离子交换性能等土壤特性会显著影响土壤氮素代谢微生物活性、生物量和群落结构,从而影响氮素矿化等过程^[7]。本研究中,单一紫花苜蓿种植或与生物炭组合施用均改变了一系列土壤特性,即苜蓿种植显著增加了 SOM、CEC 含量,并且相对于苜蓿单一种植,应用生物炭进一步提高了 SOM、CEC 含量。然而,生物炭及紫花苜蓿提高 SOM 的机制可能不同,前人研究表明,苜蓿具有广泛的主根系统,苜蓿根系分泌物(碳水化合物、酚酸和脂质)有利于根际微生物的建立,具有促进土壤微生物生物量和活性的潜力^[22],因此苜蓿种植可通过功能性微生物(如根瘤菌和丛枝菌根真菌)作用的生物效应增加 SOM 含量^[24],而生物炭则主要通过非生物功能增加 SOM 含量。

作为 N 矿化的重要表征,蛋白酶在分解土壤蛋白质以提供矿物质氮方面发挥着关键作用^[25]。本研究中,紫花苜蓿处理的蛋白酶(中性、碱性)和几丁质酶活性高于对照,这可能是由于土壤蛋白酶和几丁质酶由土壤细菌和真菌活动所介导^[4],在植物修复后细菌和真菌的生物量增加^[21],蛋白酶和几丁

质酶因此增加。另一方面,紫花苜蓿生长需要从试验土壤中摄取矿质 N 并降低有效 N 含量^[23],这可能会对土壤 N 矿化产生正反馈效应并进一步刺激酶活性^[11,25]。土壤酶的整个生物学过程包括 DNA 复制、mRNA 转录和蛋白质表达^[17]。重金属 Cd 可能对 mRNA 转录产生有害影响并下调功能基因表达^[26]。本研究结果表明,CK 土壤有效 Cd 浓度最高,各处理的相关土壤酶基因的绝对丰度波动不大。然而,尽管 CK 中 *aprA* 和 *chiA* 基因丰度与单一苜蓿处理(MX)中的差距不大,但 CK 的酶活性更低,这意味着蛋白质转录过程受到 Cd 抑制。本研究中,添加生物炭处理 MX + BC1、MX + BC2、MX + BC4 对 3 种酶活性和相应的酶功能基因丰度整体提高,这与前人的研究结果^[27]趋于一致。原因可能是添加生物炭后改变了土壤特性如土壤持水能力、pH 值和 SOM 含量,从而影响 mRNA 转录和蛋白质表达^[28]。

氨氧化古菌基因(*AOA - amoA*)和细菌功能基因(*AOB - amoA*)是反映土壤微生物性 N 转化的重要表征。Ribbons 等研究表明,土壤氮转化尤其是氮矿化过程受 *AOA - amoA*、*AOB - amoA* 介导^[29]。相关研究表明,土壤氮矿化率活性主要与 *AOA - amoA* 相关^[23]。本研究结果表明,苜蓿种植处理的 *AOA - amoA*、*AOB - amoA* 丰度皆整体高于 CK,且 *AOA - amoA* 基因丰度始终高于 *AOB - amoA*,这与之前的研究结果一致,即基于植物修复可以显著刺激受污染土壤中 AOA 类固氮微生物的繁殖及其功能活性^[30]。氮素矿化率单一苜蓿处理显著高于 CK,而生物炭处理显著大于上述 2 个处理,表明生物炭在促进土壤氮矿化中具有显著的促进作用。相关性分析表明,*Rm* 与 *AOA - amoA*、*AOB - amoA* 皆呈明显正相关,且与 *AOB - amoA* 关系更密切。此外,本研究表明,*AOA - amoA / AOB - amoA* 的比值与土壤有效 Cd 含量之间存在正相关关系,表明土壤 AOB 对 Cd 的生物毒性比其古细菌更敏感。逐步回归分析表明,*AOB - amoA* 基因比其 *AOA - amoA* 更

能影响 R_m , 表明 AOB 是影响农业土壤中的土壤氮素转化的主要功能菌类^[23,31-32]。

参考文献:

- [1] 燕 辉, 王雪芹, 代智光. 镉胁迫对大豆幼苗生理特性的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2021(6): 269-275.
- [2] 李 英, 商建英, 黄益宗, 等. 镉砷复合污染土壤钝化材料研究进展[J]. 土壤学报, 2021, 58(4): 837-850.
- [3] 王小燕, 张柳青, 杨 艳. 植物修复重金属镉污染土壤的研究进展[J]. 环境保护与循环经济, 2018, 38(8): 38-40.
- [4] Agnello A C, Bagard M, van Hullebusch E D, et al. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation[J]. Science of the Total Environment, 2016, 563/564: 693-703.
- [5] 苏彩霞, 董 旭. 根际促生菌与生物炭制剂对辣椒生长发育及土壤改良效果的影响[J]. 山东农业科学, 2021, 53(12): 109-117.
- [6] 李鸿博, 钟 怡, 张昊楠, 等. 生物炭修复重金属污染农田土壤的机制及应用研究进展[J]. 农业工程学报, 2020, 36(13): 173-185.
- [7] Banning N C, Grant C D, Jones D L, et al. Recovery of soil organic matter, organic matter turnover and nitrogen cycling in a post-mining forest rehabilitation chronosequence[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(8): 2021-2031.
- [8] 吴仁杰, 陈银萍, 曹雯婕, 等. 营养元素与螯合剂强化植物修复重金属污染土壤研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2021(5): 328-337.
- [9] Jiang X J, Hou X Y, Zhou X, et al. pH regulates key players of nitrification in paddy soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 81: 9-16.
- [10] 马 龙, 高 伟, 栾好安, 等. 有机肥/秸秆替代化肥模式对设施菜田土壤氮循环功能基因丰度的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(10): 1767-1778.
- [11] Geisseler D, Horwath W R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(12): 3040-3048.
- [12] Zhang M Y, Wang W J, Wang J, et al. Dynamics of biochemical properties associated with soil nitrogen mineralization following nitrification inhibitor and fungicide applications[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2017, 24(12): 11340-11348.
- [13] Gianfreda L, Rao M A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(4): 339-354.
- [14] 陈修晓, 王翠红, 李程明, 等. 磷与镉对不同类型耕型红壤有机氮矿化的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2012, 38(2): 203-207.
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 83-91.
- [16] 王子龙, 刘传兴, 姜秋香, 等. 气候变暖对冻结期黑土碳氮循环关键过程及指标的影响[J]. 环境科学, 2021, 42(4): 1967-1978.
- [17] Zhang M Y, Wang J, Bai S H, et al. Evaluating the effects of phytoremediation with biochar additions on soil nitrogen mineralization enzymes and fungi[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(23): 23106-23116.
- [18] Zhang M Y, Xu Z H, Teng Y, et al. Non-target effects of repeated chlorothalonil application on soil nitrogen cycling: the key functional gene study[J]. Science of the Total Environment, 2016, 543: 636-643.
- [19] 高 宇, 程 潜, 张梦君, 等. 镉污染土壤修复技术研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 103-110.
- [20] 高 欣, 邓 芸, 季蒙蒙, 等. 氨基酸盐对镉污染土壤的淋洗效果[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 366-372.
- [21] Zhang M Y, Wang J, Bai S H, et al. Assisted phytoremediation of a co-contaminated soil with biochar amendment: Contaminant removals and bacterial community properties[J]. Geoderma, 2019, 348: 115-123.
- [22] Wang Y T, Ren W J, Li Y, et al. Nontargeted metabolomic analysis to unravel the impact of di(2-ethylhexyl) phthalate stress on root exudates of alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Science of the Total Environment, 2019, 646: 212-219.
- [23] Zhang M Y, Bai S H, Tang L, et al. Linking potential nitrification rates, nitrogen cycling genes and soil properties after remediating the agricultural soil contaminated with heavy metal and fungicide[J]. Chemosphere, 2017, 184: 892-899.
- [24] 曹本福, 姜海霞, 陆引罡, 等. 烟草与丛枝菌根真菌的共生效应研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2021(1): 327-338.
- [25] Geisseler D, Horwath W R, Joergensen R G, et al. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - a review[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(12): 2058-2067.
- [26] Williams T D, Diab A M, George S G, et al. Development of the GENIPOL European flounder (*Platichthys flesus*) microarray and determination of temporal transcriptional responses to cadmium at low dose[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(20): 6479-6488.
- [27] Sun Z C, Bruun E W, Arthur E, et al. Effect of biochar on aerobic processes, enzyme activity, and crop yields in two sandy loam soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, 50(7): 1087-1097.
- [28] 吴照祥, 刘巧丽, 李辉虎, 等. 有机肥对退化红壤中细菌群落功能组成影响的 *PICRUSt* 基因预测分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(16): 60-66.
- [29] Ribbons R R, Levy-Booth D J, Masse J, et al. Linking microbial communities, functional genes and nitrogen-cycling processes in forest floors under four tree species[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 103: 181-191.
- [30] 于 翠, 李 欣, 朱志贤, 等. 长期偏施氮肥对桑园土壤氨氧化微生物的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2021(3): 35-44.
- [31] 张 静, 杨 鹏, 余 伟, 等. 攀枝花不同海拔高度烤烟农田红壤中氨氧化细菌与氨氧化古菌的群落结构分析[J]. 生态学报, 2021, 41(8): 3092-3099.
- [32] 陈雪丽, 王玉峰, 王 爽, 等. 农田土壤中氨氧化细菌群落多样性研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(2): 151-154.