

DOI: 10.5846/stxb201212131797

何莉莉, 杨慧敏, 钟哲科, 公丕涛, 刘玉学, 吕豪豪, 杨生茂. 生物炭对农田土壤细菌群落多样性影响的 PCR-DGGE 分析. 生态学报, 2014, 34(15): 4288-4294.

He L L, Yang H M, Zhong Z K, Gong P T, Liu Y X, Lü H H, Yang S M. PCR-DGGE analysis of soil bacterium community diversity in farmland influenced by biochar. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(15): 4288-4294.

生物炭对农田土壤细菌群落多样性影响的 PCR-DGGE 分析

何莉莉¹, 杨慧敏^{1,2}, 钟哲科^{1,2,*}, 公丕涛¹, 刘玉学^{2,3}, 吕豪豪^{2,3}, 杨生茂^{2,3}

(1. 国家林业局竹子研究开发中心, 杭州 310012; 2. 浙江省生物炭工程技术研究中心, 杭州 310021;

3. 浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所, 杭州 310021)

摘要:为评价生物炭对农田土壤细菌群落多样性的影响, 对不同施肥方式农田土壤细菌总 DNA 进行提取和 16S rDNA 特异性扩增, 运用变性梯度凝胶电泳 DGGE 的分子生物学技术, 对施肥土壤细菌群落的多样性进行表征。DGGE 电泳结果表明, 不同处理均可得到 20 条以上的电泳条带, 说明水稻土壤细菌群落较丰富。从泳道条带数量及光密度值方面对细菌群落多样性指标比较发现, 施加生物炭的土壤 (T2、T3、T4) 细菌丰富度最高, 细菌种群较多, 其次为秸秆还田处理土壤 (T1), 而空白对照处理土壤 (CK1) 细菌群落丰富度最低, 各处理之间的细菌种群均匀度指数差异不显著; 对细菌群落的条带信息与土壤理化性质进行相关性分析得到, 细菌群落的结构变化与各土壤理化性质的相关性大小依次为速效钾>总有机碳>有效磷>全氮>pH。

关键词:细菌群落; 多样性; 变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE); 生物炭; 秸秆还田

PCR-DGGE analysis of soil bacterium community diversity in farmland influenced by biochar

HE Lili¹, YANG Huimin^{1,2}, ZHONG Zheke^{1,2,*}, GONG Pitao¹, LIU Yuxue^{2,3}, LÜ Hao hao^{2,3}, YANG Shengmao^{2,3}

1 China National Bamboo Research Center, Hangzhou 310012, China

2 Zhejiang Biochar Engineering and Technology Research Center, Hangzhou 310021, China

3 Institute of Environment Resource Soil and Fertilizer, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou 310021, China

Abstract: Biochar is a carbon-rich solid material produced from incomplete combustion of biomass. Owing to its unique properties in soil amendment, mitigation of greenhouse gases and increase of soil carbon stock, it plays a more and more important role in environmental science. However, until now the impact of biochar application on soil properties has not been fully understood, and many mechanisms are still unclear. Soil microbe is the significant pusher in the circulation of chemical substances and its activity is an indicator of soil quality. In recently years, culture-independent molecular techniques including terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), cloning, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) have been widely employed to study the diversity of soil microbe. In this study, soils samples were collected from paddy-upland rotation experiment, six treatments were established, including: No fertilizer (CK1), Regular fertilizing (chemical NPK, CK2), Straw returning to field + regular fertilizing (T1), Rice straw biochar + regular fertilizing (T2), Rice straw biochar + 70% regular fertilizing (T3), Garbage biochar + regular fertilizing (T4). The nutrient indexes of soil, such as total nitrogen (TN), available K and available P were measured with standard

基金项目:国家自然科学基金 (31070545, 41301247); 国家公益性行业专项 (201303095); 浙江省国际合作项目 (2013C34G4010015)

收稿日期:2012-12-13; **网络出版日期:**2014-03-03

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhekez@163.com

experimental methods. Molecular biology technique of PCR-DGGE was used to characterize the diversity of soil bacteria. Quantity One Software was used to analyze electrophoretogram. The DGGE fingerprinting profile of bacterial indicated the composition and distribution of bands of six treatments. The number of DGGE bands of fertilizer treatments (CK2、T1—T4) was more than CK1's. The intensity of some bands (band 3, 4, 5, 6) of biochar treatments (T2—T4) increased and some specific bands appeared in rice straw biochar + 70% regular fertilizing treatment (T3), indicating the structure of soil microbial community had been obviously influenced by the addition of biochar and fertilizer. The similarity of bacterial community among six treatments was higher than 48.6%, and the results of cluster analysis have shown that the bacterial community of seven treatments could be divided into four clusters. The bacterial community of Rice straw biochar (T2, T3) belonged to one cluster, while the bacterial community of Garbage biochar (T4) and Straw returning to soil (T1) were in a same cluster, and the bacterial community of CK1 and the bacterial community of CK2 belonged to individual cluster. Shannon diversity indices calculated from DGGE profiles indicated that the abundances of T1, T2, T3 and T4 were much higher than the abundances of CK1's and CK2's. Statistics analysis showed that there was positive correlation between Shannon diversity indices (H) and species richness (S), and the correlation coefficient was 0.939 ($P = 0.000 < 0.01$). Study on correlation between soil nutrients and the diversity of soil microorganisms found that the diversity of soil microorganisms among the six treatments was closely related to the soil properties. In summary, biochar treatments played an active role in the development of diversity of bacterial community in the soil, while the straw returning to field treatment showed less influence on it. Those results provided a scientific basis for field application of biomass.

Key Words: bacterium community; diversity; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE); biochar; straw returning to field

近几十年来,土壤生产力的维持和农业增产大都依赖化学肥料,但长期单一的施用化学肥料带来了一系列的生态后果,如土壤结构破坏、土壤质量下降等^[1-3]。为此,科学家先后提出了增施有机肥、轮作、秸秆还田^[4-8]等一系列措施来应对农业土壤健康发展的问題。生物炭是作物秸秆等生物质材料在完全或部分缺氧的情况下经低温热解炭化产生的一类高度芳香化难溶性固态物质,科学家对巴西亚马逊河流域黑炭肥土(*Terra Preta*)的研究发现,生物炭在保持土壤肥力、维持土壤固碳能力和生态功能等多方面具有十分重要的作用^[9]。因此,针对当前农业出现的化肥使用量增加、土壤碳汇降低等问题,利用生物炭改良土壤的技术研究已愈来愈引起人们的重视。刘玉学等^[10]发现,竹质生物炭表面富含的含氧官能团,可以提高土壤阳离子交换量,使其对 NH_4^+ 、 NO_3^- 等离子具有较强的吸附能力,进而提高土壤肥力。Laird^[11] 和陈红霞^[12-15] 等研究证实,生物炭在提高土壤保水和保肥性能的同时,也可以提高土壤碳汇和降低温室气体排放等。Feng 等^[16] 将不同温度下热解产生的生物炭施加到水稻田中,研究表明生

物炭处理使甲烷氧化菌数量增加,产甲烷菌与甲烷氧化菌的比例降低。由于生物炭施入增加了土壤肥力、改善了土壤质量,其多孔性也为微生物生存提供了适宜的载体,长期施入对土壤微生物群落结构会产生一定的影响,具体的影响及影响机制还有待进一步研究。

土壤细菌约占土壤微生物总量的 70%—90%,主要包括各种细菌生理菌群如固氮菌、甲烷产生菌/氧化菌等,对土壤碳氮元素循环起着重要作用^[17]。传统研究细菌的方法主要是室内平板培养法,但大多数细菌不可培养致使其存在一定的局限性^[18]。现代分子生物学技术通过直接或间接方法提取土壤 DNA,从基因水平研究土壤微生物的多样性^[19-20]。本文通过对比常规施肥、秸秆、生物炭与化肥混施等不同施肥处理,研究生物炭对水稻田土壤细菌群落多样性的影响。运用分子生物学技术 PCR-DGGE 从遗传多样性方面对土壤细菌群落多样性进行表征,旨在揭示生物炭对农田土壤微生物多样性的影响,为生物炭对土壤质量演变及其生产性能提高等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地点位于浙江省海宁市许村镇杨渡村(120°24′23″ E, 30°26′07″ N), 隶属浙江省农业科学院杨渡试验基地。属亚热带海洋性季风气候, 海拔 3—4 m, 年降雨量 1500—1600 mm, 蒸发量 1000—1100 mm, 年平均气温 16—17℃, 无霜期 240—250 d, 年日照时数 1900—2000 h, 年太阳辐射量 100—115 J/cm²。土壤类型归属水稻土类、黄松田土种。

1.2 试验处理

本试验设置 6 个不同的施肥处理, 分别是空白对照(CK1)、常规施肥(CK2)、秸秆还田+常规施肥(T1)、稻秆炭+常规施肥(T2)、稻秆炭+70%常规施肥(T3)及垃圾炭+常规施肥(T4)。种植制度为水稻-油菜轮作, 其中, 油菜施氮量为 150 kg/hm², 化肥施用均按照 N:P₂O₅:K₂O=2:1:1.2 实施, 氮肥为尿

素, 磷肥为普通过磷酸钙, 钾肥为氯化钾。减量施肥为常规施肥量的 70%。随机区组设计, 每个处理设置 3 个重复, 小区面积 94 m²。

试验始于 2011 年 7 月, 化肥与秸秆、生物炭一次性施入, 生物炭粒径大小为 1—2 mm。供试土样于 2012 年 5 月 29 日第 1 轮油菜收割后采集, 取 0—20 cm 表层土壤, 用四分法混匀样品, 取 1 kg 左右带回实验室。去杂过 2 mm 筛, 充分混匀后一份风干供土壤 pH、全氮、总有机碳、有效磷和速效钾等测定, 另一份鲜样用于土壤 DNA 提取, -75℃ 冷冻储存备用。

1.3 供试材料

试验所用的秸秆炭及垃圾炭分别由水稻秸秆、生活垃圾于 600℃ 炭化所得。秸秆炭、垃圾炭的含碳量分别为 42.7%、30.3%, 比表面积分别为 81.8 m²/g、12.9 m²/g。各个区组施肥处理及土壤理化性质如表 1 所示。

表 1 不同施肥处理土壤理化性质
Table1 The physical and chemical properties of soils treated by different fertilizers

处理 Treatments	化肥 Fertilizer	其他 Others/ (kg/hm ²)	土壤全氮 Total nitrogen/ (g/kg)	总有机碳 Total Organic Carbon / (g/kg)	速效磷 Avail. phosphorus/ (mg/kg)	速效钾 Avail. potassium/ (mg/kg)	pH/ (土:水=1:2.5)
CK1	0	0	0.82 c	10.62c	27.82b	66.97c	6.2b
CK2	RF	0	0.96ab	12.70ab	28.34b	86.37bc	6.02bc
T1	RF	RS16.7	1.04a	12.44b	33.42b	86.94abc	5.87c
T2	RF	RSC16.7	0.95ab	12.31b	39.78a	110.42a	5.95bc
T3	70%RF	RSC16.7	0.96ab	13.75a	33.14b	103.33ab	6.03bc
T4	RF	SC22.2	0.86bc	11.58bc	31.46b	84.90bc	6.52a

表中同列不同小写字母表示 5% 水平的差异性显著; 空白对照(CK1); 常规施肥(CK2); 秸秆还田+常规施肥(T1); 稻秆炭+常规施肥(T2); 稻秆炭+70%常规施肥(T3); 垃圾炭+常规施肥(T4); 常规施肥(RF); 稻秆(RS); 稻秆炭(RSC)

Figure with the same small letter is not significant difference at 5% level; Control blank (CK1), Regular fertilizing (CK2)/RF, Straw returning + regular fertilizing (T1), Rice stem carbon+ regular fertilizing (T2), Rice stem carbon+70% regular fertilizing (T3), Garbage carbon+ regular fertilizing (T4), Rice stem (RS), Rice stem carbon(RSC)

1.4 土壤 DNA 提取及聚合酶链式反应(PCR)

采用上海生工生物工程公司提供的试剂盒(Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒)提取土壤总 DNA。PCR 引物为细菌通用引物 338FC-GC(引物 1: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGG- GCGGGGCGGGG GCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 518R(引物 2: 5'-ATTA- CCGCGCTGCTGG-3'), 均由上海生工生物工程公司提供。

50 μL PCR 反应体系: Premix Taq 酶 25 μL; 引物 1/1 μL、引物 2/1 μL; 模板 1 μL, 最后加灭菌水至 50 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 2 min; 35 个循环为 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s; 最后补充 72℃ 延伸 7 min; 扩增后的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

(1) 聚丙烯酰胺凝胶浓度是 8%, 变性梯度从上

到下是 35%—55%,上样量为 45 μL 。运行条件为:1 $\times$ TAE电泳缓冲液,60 $^{\circ}\text{C}$ 电泳条件下,85 V,16 h。电泳完毕后,用 SYBR GREEN 避光染色 30 min,再用去离子水漂洗。染色后的凝胶用 Bio-RAD 的 GeDoc-2000 凝胶成像系统拍照;用 Quantity One 分析软件分析样品电泳条带的数量、亮度峰值及平均光密度值。各泳道图谱的相似性通过计算戴斯系数比较得出,通过非加权配对算数平均法 UPGMA 对各泳道进行聚类分析。戴斯系数:

$$Cs = 2j / (a + b)$$

式中, j 是 a 、 b 共有的条带数, a 、 b 是各自的条带数, c 的范围是从 0 (没有共同条带) 到 1 (所有条带都相同)。

(2) 微生物遗传多样性指数计算方法:

Shannon-Weaver Index 指数:

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \log_2 P_i$$

均匀度指数: $E = H / \ln s$

式中, $P_i = n_i / N$, n_i 为 DGGE 图谱中第 i 条带的峰密度, N 为全部条带峰密度的总和, s 为个体所有的条带数, H 为 Shannon-Weaver Index 指数。

2 结果与分析

2.1 DGGE 分析 16S rDNA V3 区片段的 PCR 产物

细菌 PCR 产物的 DGGE 谱图(图 1a)可直观的反映各处理对应的条带数目及迁移距离等信息,从中得出不同处理均可分离得到 20 条以上的电泳条带,且多数条带为不同处理间所共有的,但不同处理之间 PCR 产物的条带数及亮度存在一定的差异。运用 Quantity One 软件对图谱进行基本的背景排除,然后经泳道识别、条带识别和配对等步骤,可得到泳道间的对比分析结果图 1b (Quantity One 软件能识别肉眼无法分清和区分的条带,实图 1a 与电泳比较图 1b 编号不一致)。未施肥处理 CK1 与其他施肥处理相比较,其条带数较少且亮度较浅,未施肥处理 CK1 的 1—3 号泳道条带位置及亮度几乎无差异,重复性较好;各施肥处理之间共有条带数较多但亮度差异明显,且各处理的 3 个样品条带位置几乎一致,只是个别条带亮度一致性较差。如泳道 4 的编号 1 条带与泳道 5、6 的 1 号条带亮度差异较大,但泳道 5 号和 6 号的优势菌群相似性较高。

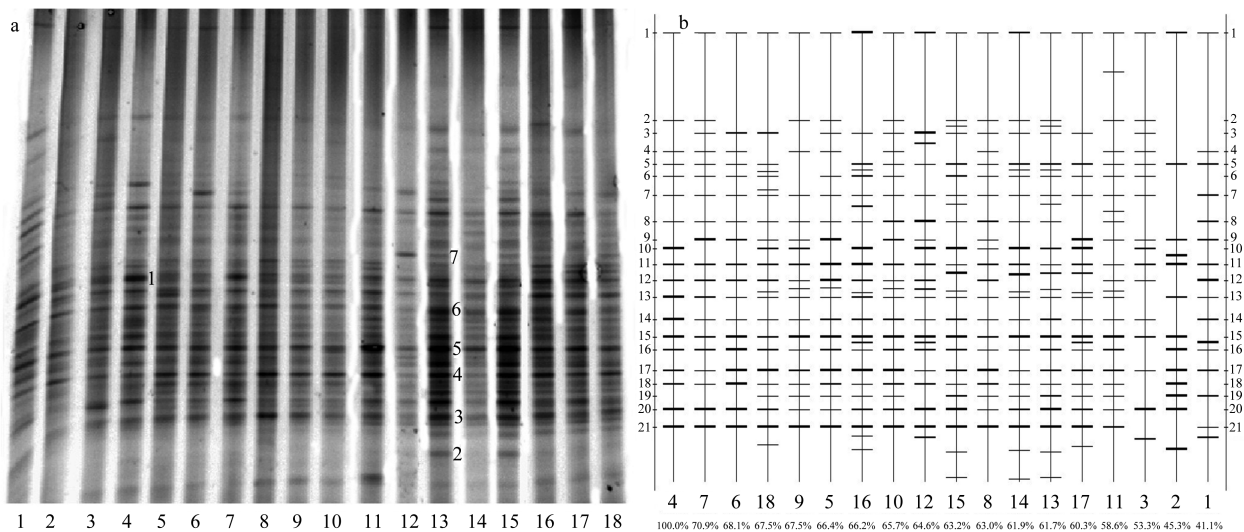


图 1 16S rDNA V3 区扩增片段 DGGE 分析结果 (a) 及电泳比较图 (b)

Fig.1 DGGE profile of amplified 16S rDNA fragments from soil samples (a) and land compare (b)

1—3 空白对照 (CK1) Control Blank (CK1); 4—6 常规施肥 (CK2) Regular fertilizing (CK2); 7—9 秸秆还田+常规施肥 (T1) Straw returning to field + regular fertilizing (T1); 10—12 稻秆炭+常规施肥 (T2) Rice stem carbon+ regular fertilizing (T2); 13—15 稻秆炭+70%常规施肥 (T3) Rice stem carbon+70% regular fertilizing (T3); 16—18 垃圾炭+常规施肥 (T4) Garbage carbon+ regular fertilizing (T4)

仔细观察图 1a 可以发现,条带编号 3、4、5、6 所代表的菌群是各处理所共有的优势菌群。与未施肥处理相比,施肥处理不同程度的增加了优势菌群代表的条带亮度,如 T3 处理的 4 号条带亮度比其他处

理亮度明显增加。秸秆还田(T1)处理中编号为 1 的条带亮度较生物炭处理(T2—T4)处理中编号为 1 的条带亮度亮,可能是由于秸秆富含易分解利用的碳源,从而促进了该菌群的活动。生物炭处理明显增

加了各条带的亮度,且出现了特征菌群,如条带编号 7。条带编号 2 是 T3 处理的特征菌群,说明施加生物炭与常规施肥相比,改变了土壤细菌群落的结构,提高了细菌群落的多样性。常规施肥与不施肥相比改变了细菌群落的丰度,但对其群落结构影响不大。

2.2 不同施肥处理的土壤细菌群落多样性分析

运用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱做相似性分析,得到不同处理微生物群落相似性指数(表 2)。分析各处理间的相似性矩阵可以发现,不同处理之间的相似性都高于 48.6%。其中,常规施肥 CK2 与空白对照 CK1 的相似性为 61.6%;秸秆还田、稻秆炭、垃圾炭处理的施肥方式(T1—T4)与空白对照 CK1 的相似性分别为 59.2%、56.2%、48.6%、58.1%,与常规施肥的相似性分别为 67.7%、62.2%、57.7%、62.7%。王奇赞等^[21]认为,不同处理之间相似性高于 60%,说明处理之间有很好的相似性。本研究 中秸秆还田、稻秆炭、垃圾炭处理与空白对照 CK1、稻秆炭减量 T3 处理与常规施肥的相似性质都低于 60%,这表明施入外源物质可能改变了土壤细菌群落结构,而单施化肥对土壤细菌群落影响不大。利用相似性矩阵,通过 UPGMA (The Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) 进行聚类分析(图 2)进一步发现:所有处理土壤的微生物群落可分成 4 类,空白对照单独分为 1 类,且明显区别于其他处理;施肥处理中,施加稻秆炭的两个处理距离较近聚为 1 类,垃圾炭与秸秆还田处理聚为 1 类。原因可能是不同施肥处理改变了土壤微生物的生存环境并影响了相互之间的适应性。

表 2 不同处理微生物群落相似性指数
Table 2 Similarity coefficient of microbial populations under different treatments

处理 Treatments	CK1	CK2	T1	T2	T3	T4
CK1	100.0					
CK2	61.6	100.0				
T1	59.2	67.7	100.0			
T2	56.2	62.2	63.4	100.0		
T3	48.6	57.7	60.1	70.1	100.0	
T4	58.1	62.7	71.7	71.3	67.6	100.0

Shannon-Weaver 指数为一个可以直观的反映细菌群落遗传多样性的指标,主要包括两个成分:细菌种数和细菌种间的均匀度(*E*);细菌群落 DNA 的丰

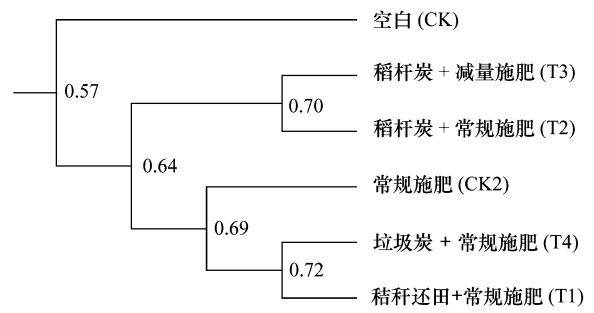


图 2 不同处理 DGGE 谱图的聚类分析
Fig.2 Clustering analysis of DGGE band profiles on soils

富度(*S*)可以用细菌种数即电泳条带的数量表征。不同处理间细菌群落的丰富度与 Shannon-Weaver Index 指数见图 3。由图可知,空白对照 CK1 的微生物丰度及 Shannon-Weaver Index 指数最低,这与刘恩科等^[22]的研究结果类似,长期不施肥而种植作物的土壤可见条带数比化肥与厩肥配施的土壤条带数少 32%。秸秆还田、稻秆炭、垃圾炭施肥处理的土壤微生物丰富度高于常规施肥 CK2 与空白对照处理 CK1,约是空白对照处理下的两倍;秸秆还田施肥处理的土壤微生物丰富度低于生物炭处理;生物炭施肥处理中,稻秆炭处理的土壤微生物 Shannon-Weaver Index 指数略高于垃圾炭处理,这可能由于本试验所用的稻秆炭比表面积比垃圾炭比表面积高约 5 倍,生物炭大的比表面积及多孔性可为土壤微生物提供适宜的生存环境。统计分析表明微生物多样性指数与丰富度极相关,相关系数为 0.939 ($P=0.000<0.01$),不同处理的均匀度指数分别为 1.37、1.35、1.36、1.33、1.35、1.38 ($P>0.05$),差异性不显著。

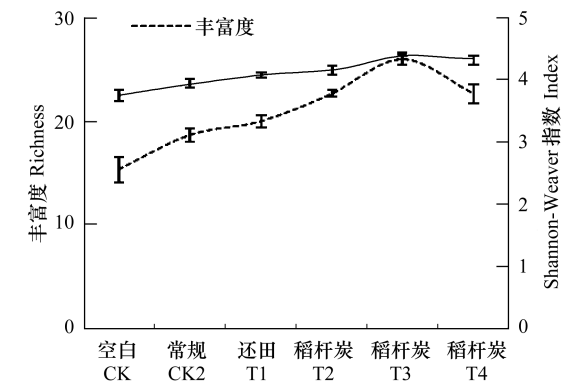


图 3 不同处理细菌群落的丰富度与 Shannon-Weaver Index 指数
Fig.3 Microbial species richness and Shannon-Weaver Index of different treatments

2.3 土壤细菌群落与环境因子的相关性分析

用 DGGE 谱图所得到的细菌群落的条带信息与土壤理化性质进行相关性分析,如表 3。细菌群落的结构变化与各理化性质的相关性顺序依次为速效钾>总有机碳>有效磷>全氮>pH。细菌群落的结构变化与土壤速效钾养分含量相关性最大,与总有机碳含量相关性其次。可能原因有与南方酸性土壤有关,其地处湿热地带、高温多雨、土壤的分解与矿化过程较快,土壤元素的迁移及淋溶较强,尤其是钾的流失量较大,土壤含钾量低,而植物秸秆等富含钾元素,回归到土壤改善了土壤质量,促进土壤微生物的

生长;矿质元素是构成微生物细胞结构、调节细胞渗透压等微生物生命活动不可缺少的物质。秸秆还田将收割所带走的有机物质及营养元素返还土壤,增加土壤总有机碳,减少土壤侵蚀,提高了土壤质量,为微生物的生长提高适宜的环境。生物炭比表面积大,丰富的孔隙及适宜的 pH 为微生物的生长提供适宜的生长环境。从表看出,土壤酸碱度与微生物群落结构相关性较小,这可能是由于各处理的土壤 pH 值处于 5.8—6.6 之间,差异性很小且处于微生物生长所需的酸碱度范围内,对其结构影响不大。

表 3 土壤细菌群落与土壤养分之间的相关性指数

Table 3 Correlation analysis between soil properties and bacterial community structure

项目 Items	全氮 Total nitrogen/ (g/Kg)	总有机碳 Total organic carbon/ (g/kg)	有效磷 Avail. phosphorus/ (g/Kg)	速效钾 Avail. potassium/ (g/Kg)	pH
相关性 Relations	0.274	0.629	0.501	0.684	0.165
P	0.600	0.181	0.311	0.134	0.755

3 结论与讨论

PCR-DGGE 技术利用变性梯度分离细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物,从而得出数目不等、位置各异的电泳条带。本研究中,6 种不同的处理均可分离得到 20 条以上的电泳条带,说明水稻田土壤细菌群落较为丰富。大部分条带为共有条带,表明了这一部分条带所代表的土壤细菌种类和数量较稳定,基本上不受施肥管理措施的影响,但也有一部分条带受施肥处理的影响增加或缺失,生物炭处理明显增加了各条带的亮度,且出现了特征菌群。

由戴斯系数计算出的 6 个处理间的相似性系数发现,秸秆还田、生物炭施肥处理与空白对照 CK1、稻秆炭减量 T3 处理和常规施肥的相似性均较低。土壤养分含量和碳源供给是影响微生物群落的主要因素^[23],秸秆还田带入大量的无机营养元素和有机物,短期内会促进分解纤维素的微生物群落的生长;生物炭含有的一些低分子易分解有机化合物可以作为微生物的碳源,有利于提高微生物的生物量和活性,且其吸附能力强、孔隙率高,适合作为微生物和养分的载体。本试验施肥处理配施的秸秆和生物炭改变了土壤微生物生存的根本微域环境,从而影响了微生物的组成及其活性。

对 DGGE 谱图信息进行统计分析发现:生物炭处理的施肥方式的细菌丰富度指数及 Shannon-Weaver Index 指数最高,约是未施肥处理的 2 倍;土壤细菌群落结构变化与土壤速效养分、总有机碳含量有较大的相关性。研究表明,将生物炭施加到土壤对土壤的物理^[24]、化学及生物特性^[25]能产生积极的影响,从而改善了土壤质量为微生物提供了适宜的生存环境。生物炭在土壤中稳定性高、分解速度慢,从长期效应来说,生物炭配施化肥更有利于提高土壤微生物群落多样性^[26-27]。

References:

- [1] Li X H. Fertilization Systems and Sustainable Use of Arable Land [D]. Beijing: The Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2005.
- [2] Liu Z L, Yu W T, Zhou H, Xu Y G, Huang B T. Effects of long-term fertilization on aggregate size distribution and nutrient content. *Soils*, 2011, 43(5): 720-728.
- [3] Liu Y L. Changes in Soil Properties and Its Relation with Soil Productivity Under Long-Term Fertilization in Paddy Fields [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2007.
- [4] Sun N K, Suo D R. Effects of long-term mixed use of organic manure and chemical fertilizers on crop yield and indigenous soil nutrients. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2011, 31(4): 42-46.
- [5] Tan H W. Effect of three years continuous application of bio-organic fertilizer in sugarcane planting areas. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42(8): 940-943.

- [6] Kuma K, Goh K M. Management practices of antecedent leguminous and non-leguminous crop residues in relation to winter wheat yields, nitrogen uptake, soil nitrogen mineralization and simple nitrogen balance. *European Journal of Agronomy*, 2002, 16 (4): 295-308.
- [7] Liang A Z, Zhang X P, Yang X M, Drury C F. Short-term effects of tillage on soil organic carbon storage in the plow layer of black soil in northeast China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39 (6): 1287-1293.
- [8] Zhang Q Z, Wu W L, Wang M X, Zhou Z R, Chen S F. The effects of crop residue amendment and N rate on soil respiration. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(11): 2883-2887.
- [9] Grossman JM, O'Neill BE, Tsai SM, Liang B, Neves E, Lehmann J, Thies JE. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. *Environmental Microbiology*, 2010, 60(1): 192-205.
- [10] Liu Y X. Effect of Biochar on the Characteristic of Nitrogen Loss and Greenhouse Gas Emission from Soil [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [11] Laird D A, Fleming P, David D D, Horton R, Wang B Q, Karlen D L. Impact of biochar amendments on the quality of a typical Midwestern agricultural soil. *Geoderma*, 2010, 158 (3/4): 443-449.
- [12] Chen H X, Du Z L, Guo W, Zhang Q Z. Effects of biochar amendment on cropland soil bulk density, cation exchange capacity, and particulate organic matter content in the North China Plain. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22 (11): 2930-2934.
- [13] Lehmann J. Bio-energy in the black. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2007, 5(7): 381-387.
- [14] Rondon M, Lehmann J, Ramírez J, Hurtado M. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with biochar additions. *Biology and Fertility of Soils*, 2007, 43(6): 699-708.
- [15] Hamer U, Marschner B, Brodowski S, Amelung W. Interactive priming of black carbon and glucose mineralization. *Organic Geochemistry*, 2004, 35(7): 823-830.
- [16] Feng Y Z, Xu Y P, Yu Y C, Xie Z B, Lin X G. Mechanisms of biochar decreasing methane emission from Chinese paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 46: 80-88.
- [17] Bardgett R D, Freeman C, Ostle N. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2008, 2(8): 805-814.
- [18] Davis K E R, Joseph S J, Jansen P H. Effects of growth medium, inoculum size and incubation on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (2): 826-834.
- [19] Stefanis C, Alexopoulos A, Voidarou C, Vavias S, Bezirtzoglou E. Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities. *Folia Microbiologica*, 2013, 58 (1): 61-68.
- [20] Bai L, Zhao M W, Jia J W. Analysis of soil bacterial community composition by 16S rDNA clone library sampling from transgenic carnation. *Microbiology*, 2012, 39(4): 435-447.
- [21] Wang Q Z, Xu Q F, Jiang P K, Qin H. DGGE analysis of PCR of 16S rDNA V3 fragments of soil bacteria community in soil under natural broadleaf forest invaded by *Phyllostachy pubescens* in Tianmu mountain nature reserve. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(4): 662-669.
- [22] Liu E K, Zhao B Q, Li X Y, Jiang R B, Hwat B S. Microbial C and N biomass and soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V3 fragment PCR products under different long-term fertilization systems. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27 (3): 1079-1085.
- [23] Xu Z X. The influence of long-term rice straw returned to farmland on yield of winter wheat and soil fertility. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2010, 29(1): 10-13.
- [24] Peng X, Ye L L, Wang C H, Zhou H, Sun B. Temperature-and duration-dependent rice straw-derived biochar: Characteristics and its effects on soil properties of an Ultisol in southern China. *Soil and Tillage Research*, 2011, 112(2): 159-166.
- [25] Van Z L, Kimber S, Morris S, Chan K Y, Downie A, Rust J, Joseph S, Cowie A. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. *Plant and Soil*, 2010, 327(1/2): 235-246.
- [26] Chan K Y, Van Z L, Meszaros I, Downie A, Joseph S. Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. *Australian Journal of Soil Research*, 2007, 45(8): 629-634.
- [27] Yang Y H, Yao J, Hu S, YE Q. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD marker. *Microbial Ecology*, 2000, 39(1): 72-79.

参考文献:

- [1] 李絮花. 施肥制度与土壤可持续利用 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [2] 刘中良, 宇万太, 周桦, 徐永刚, 黄宝同. 长期施肥对土壤团聚体分布和养分含量的影响. *土壤*, 2011, 43(5): 720-728.
- [3] 刘艳丽. 长期施肥下水稻土壤性质变化及其与生产力的关系研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [4] 孙宁科, 索东让. 有机肥与化肥长期配施对作物产量和灌漠土养分库的影响. *水土保持通报*, 2011, 31(4): 42-46.
- [5] 谭宏伟. 蔗区土壤连续施用生物有机肥效应研究. *南方农业学报*, 2011, 42(8): 940-943.
- [7] 梁爱珍, 张晓平, 杨学明, Drury C F. 耕作方式对耕层黑土有机碳库储量的短期影响. *中国农业科学*, 2006, 39 (6): 1287-1293.
- [8] 张庆忠, 吴文良, 王明新, 周中仁, 陈淑峰. 秸秆还田和施氮对农田土壤呼吸的影响. *生态学报*, 2005, 25 (11): 2883-2887.
- [10] 刘玉学. 生物质炭输入对土壤氮素流失及温室气体排放特性的影响 [D]. 浙江: 浙江大学, 2011.
- [12] 陈红霞, 杜章留, 郭伟, 张庆忠. 施用生物炭对华北平原农田土壤容重、阳离子交换量和颗粒有机质含量的影响. *应用生态学报*, 2011, 22(11): 2930-2934.
- [20] 白蓝, 赵明文, 贾军伟. 16S rDNA 克隆文库法探索转基因香石竹对土壤细菌群落的影响. *微生物学通报*, 2012, 39(4): 435-447.
- [21] 王奇赞, 徐秋芳, 姜培坤, 秦华. 天目山毛竹入侵阔叶林后土壤细菌群落 16S rDNA V3 区片段 PCR 的 DGGE 分析. *土壤学报*, 2009, 46(4): 662-669.
- [22] 刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 姜瑞波, Hwat B S. 不同施肥制度土壤微生物量碳氮变化及细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析. *生态学报*, 2007, 27(3): 1079-1085.
- [23] 徐祖祥. 长期秸秆还田对冬小麦产量及土壤肥力的影响. *山地农业生物学报*, 2010, 29(1): 10-13.