

DOI: 10.5846/stxb201901220172

朱孟涛, 刘秀霞, 王佳盟, 刘志伟, 郑聚锋, 卞荣军, 王艮梅, 张旭辉, 李恋卿, 潘根兴. 生物质炭对水稻土团聚体微生物多样性的影响. 生态学报, 2020, 40(5): 1505-1516.

Zhu M T, Liu X X, Wang J M, Liu Z W, Zheng J F, Bian R J, Wang G M, Zhang X H, Li L Q, Pan G X. Effects of biochar application on soil microbial diversity in soil aggregates from paddy soil. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(5): 1505-1516.

生物质炭对水稻土团聚体微生物多样性的影响

朱孟涛^{1,3}, 刘秀霞^{1,3}, 王佳盟^{1,3}, 刘志伟^{1,3}, 郑聚锋^{1,3,*}, 卞荣军^{1,3}, 王艮梅², 张旭辉^{1,3}, 李恋卿^{1,3}, 潘根兴^{1,3}

1 南京农业大学农业资源与生态环境研究所, 南京 210095

2 南京林业大学林学院, 南京 210037

3 江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心, 南京 210095

摘要: 生物质炭施用对土壤微生物群落结构的影响已有报道, 但土壤团聚体粒组中微生物群落对生物质炭施用的响应的研究还相对不足。以施用玉米秸秆生物质炭两年后的水稻土为对象, 采用团聚体湿筛法, 通过高通量测序对土壤团聚体的微生物群落结构与多样性进行分析, 结果表明: (1) 与对照相比, 生物质炭施用显著促进了大团聚体 (2000—250 μm) 的形成, 并提高了团聚体的稳定性。(2) 不同粒径团聚体间微生物相对丰度存在显著差异。在未施生物质炭的处理 (C0) 中, 随着团聚体粒径增大, 变形菌门、子囊菌门、 β -变形杆菌目、格孢腔菌目的相对丰度逐渐降低, 而酸杆菌门、担子菌门、粘球菌目、类球囊霉目的相对丰度逐渐升高。(3) 生物质炭施用显著改变了团聚体间的微生物群落结构。与 C0 处理相比, 生物质炭施用处理的大团聚体中变形菌门、鞭毛菌门和 β -变形杆菌目的相对丰度分别显著提高了 14.37%、33.28% 和 33.82%; 微团聚体 (250—53 μm) 中酸杆菌门、子囊菌门和粘球菌目的相对丰度分别显著降低了 20.15%、19.93% 和 17.66%; 粉、黏粒组分 (<53 μm) 中担子菌门的相对丰度升高 90.25%, 而子囊菌门和鞭毛菌门的相对丰度分别降低 12.15% 和 12.58%。由此可见, 生物质炭不仅改变土壤团聚体组成和分布, 同时伴随着土壤微生物群落结构的改变。

关键词: 生物质炭; 水稻土; 土壤团聚体; 高通量测序; 土壤微生物群落

Effects of biochar application on soil microbial diversity in soil aggregates from paddy soil

ZHU Mengtao^{1,3}, LIU Xiuxia^{1,3}, WANG Jiameng^{1,3}, LIU Zhiwei^{1,3}, ZHENG Jufeng^{1,3,*}, BIAN Rongjun^{1,3}, WANG Genmei², ZHANG Xuhui^{1,3}, LI Lianqing^{1,3}, PAN Genxing^{1,3}

1 Institute of Resource, Ecosystem and Environment of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

3 Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing 210095, China

Abstract: Numerous studies have reported the effect of biochar addition on the structure of soil microbiota, but little information is available on the response of microbial composition to biochar application in soil aggregates. In this study, a single amendment of biochar was applied to a typical paddy field in southern China. Following two years, soil samples separated by a wet sieving method, and the microbial community structure was analyzed using Illumina MiSeq Next Generation sequencing. Results showed that the application of biochar (1) increased significantly the stability of soil aggregates and the proportion of the macro-aggregates fraction (2000—250 μm), and (2) changed significantly the relative

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41877097, 41877096, 41371300)

收稿日期: 2019-01-22; 网络出版日期: 2019-12-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhengjufeng@njau.edu.cn

abundances of bacteria and fungi among soil aggregates. For instance, the relative abundances of Proteobacteria, Ascomycota, Betaproteobacteriales, and Pleosporales decreased with the increase of aggregate size in C0 treatment, while the relative abundances of Acidobacteria, Basidiomycota, Myxococcales, and Paraglomerales increased gradually. In addition, the application of biochar (3) altered significantly the composition of microbes in different soil aggregates. Compared with C0 treatment, the relative abundances of Proteobacteria, Mortierellomycota, and Betaproteobacteriales increased significantly by 14.37%, 33.28%, and 33.82%, respectively, in the macro-aggregates fraction (2000—250 μm) under biochar amendment, while the relative abundances of Acidobacteria, Ascomycota, and Myxococcales decreased significantly by 20.15%, 19.93%, and 17.66%, respectively, in the micro-aggregates fraction (250—53 μm) under biochar amendment. Lastly, the relative abundances of Basidiomycota increased significantly by 90.25%, whereas Ascomycota and Mortierellomycota decreased significantly by 12.15% and 12.58%, respectively, in the silt-clay fraction (<53 μm). Overall, the application of biochar in a typical paddy field not only changed the structure and distribution of soil aggregates but also the composition of the soil microbial community in this study.

Key Words: biochar; paddy soil; soil aggregates; Illumina Miseq sequence; soil microbial community

生物质炭是生物质在限氧条件下经过热裂解产生的高度芳香化的有机物质,具有比表面积大、吸附能力强、稳定性高等特点^[1],其农业应用被认为是有效增加土壤碳固定与减缓气候变化的重要途径^[2-3]。研究表明,生物质炭在土壤中施用有多重效应,如改善土壤理化性质、增加土壤有机碳含量、提升保水性能、减少温室气体排放、降低养分淋失和提升作物产量等作用^[4-6]。此外,生物质炭施用还能显著影响土壤微生物群落结构和活性^[7-8],由于土壤中的诸多物质转化过程(如温室气体产生)大多依赖于土壤微生物的调节,因此,研究生物质炭施用对土壤微生物群落结构的影响对于深刻认识土壤的微观过程机制具有重要意义^[9]。

目前,已有大量研究开始采用不同分子生物学技术(如 PLFA、高通量测序等)探索生物质炭施用下土壤微生物群落结构变化及其与温室气体排放的关系,如 Feng 等^[10]发现施用不同温度制备的生物质炭(300, 400, 500 $^{\circ}\text{C}$)显著降低土壤甲烷的排放,进一步通过高通量测序表明甲烷氧化菌和产甲烷菌相对变化是 CH_4 排放降低的主要原因;Sheng 和 Zhu^[11]研究发现,生物质炭在酸性土壤中施用会导致富营养型微生物(拟杆菌门、芽单孢菌门等)丰度增加,而在碱性土壤中会使贫养型微生物(酸杆菌门)增加;Chen 等^[12]发现在旱地土壤中施用小麦秸秆(350—550 $^{\circ}\text{C}$)生物质炭(0, 20, 40 t/hm^2)三年后,40 t/hm^2 生物质炭处理中放线菌门、 γ -变形菌纲、厚壁菌门和子囊菌门的丰度显著降低,同时显著降低土壤呼吸对温度的敏感性。另外,有研究指出,生物质炭施用显著增加革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌比例($G+/G-$)的同时降低了真菌与细菌的比例^[13]。这些结果表明微生物群落结构或活性在生物质炭不同施用时间尺度下均发生了改变,但由于生物质炭原料、制备工艺、生产条件以及土壤类型存在较大差异,生物质炭施用对微生物的影响程度存在不同结果。除此以外,生物质炭施入土壤后与土壤颗粒相互作用形成的“生物质炭-土壤颗粒”微系统可改变土壤微生物的生境,这可能对土壤微生物群落结构及分布产生影响。然而到目前为止,这方面的研究还相对缺乏。

土壤团聚体是土壤结构的基本单元,对保持土壤水分和养分、协调土壤环境与微生物活性、维持土壤结构稳定具有重要意义^[14]。不同农田管理措施(施肥、灌溉、耕作等)能不同程度的影响团聚体稳定性^[15-16],同时伴随着土壤养分、微生物群落结构及酶活性变化^[17-18]。随着生物质炭在土壤应用中研究的深入,生物质炭施用对土壤团聚体的组成、分布以及稳定性的影响已有报道^[19],而且,不同团聚体中有机碳组分及结构也随生物质炭施用而发生变化^[20-21]。尽管目前生物质炭应用对土壤微生物影响的研究已开展了大量工作,但主要集中在全土范畴^[22-23]。作为微生物在微观尺度上的载体,土壤团聚体粒组的分布在土壤施用生物质炭条件下发生改变,这可能伴随微域环境中有机物组成、孔隙、水分等生态因子的重组,从而导致微生物群落不同粒组中的重新分配,进而影响微域环境中的物质和元素循环。然而,团聚体尺度上土壤微生物群落结构如何响应于生物质炭,不同团聚体粒组中微生物对其响应是否一致,目前都还少有报道。

为此,本试验选择太湖地区施用生物质炭两年后的水稻土为研究对象,采集表层(0—15 cm)原状土壤,采用湿筛法^[24]进行团聚体分组,并通过 Illumina Miseq 平台对土壤微生物进行高通量测序,以期在团聚体尺度上揭示生物质炭施用对稻田土壤微生物群落和多样性的影响。

1 材料方法

1.1 试验地概况与试验设计

田间试验开始于 2016 年 5 月,地点位于江苏省宜兴市徐舍镇(31°41'N, 119°73'E)。该地属于亚热带季风气候,年均温为 15.7℃,年均降水量为 1246.3 mm。土壤类型是太湖地区第四纪湖积物发育的典型脱潜型水稻土-乌泥土,种植制度为夏水稻-冬小麦轮作。试验设置两个处理,未施生物质炭(C0)和生物质炭处理(C15),小区面积为 30 m²(5 m×6 m),每个处理设 3 次重复,完全随机区组设计。所施入的玉米秸秆生物质炭在 450℃ 下限氧烧制,于 2016 年 5 月水稻种植前按 15 t/hm²的用量一次性施入土壤表层,通过翻耕使其与土壤均匀混合(0—15 cm)。生物质炭基础理化性质为:有机碳含量 431.00 g/kg,全氮含量为 7.97 g/kg, C/N 为 51.82,速效磷含量为 2.36 mg/kg, pH 为 8.79。土壤的基础性质见表 1。

表 1 供试土壤的基础性质

Table 1 Physical and chemical properties of studied soil

处理 Treatments	pH (H ₂ O)	土壤有机碳 Soil organic carbon/ (g/kg)	全氮 Total nitrogen/ (g/kg)	碳氮比 C/N	速效磷 Available P/ (mg/kg)
C0	5.72	23.06	2.06	11.2	20.99
C15	6.01	28.73	2.22	12.9	16.46

C0, 未施用生物质炭处理 Soil without biochar amendment; C15, 生物质炭施用量为 15 t/hm²的处理 Soil with biochar amendment at the rate of 15 t/hm²

1.2 土壤样品采集与处理

土壤样品于 2018 年 4 月采集,按照 S 形路线使用不锈钢半圆柱专用采样铲采集表层土壤(0—15 cm),每个小区采集 6 个土壤样品。将采集的原状土置于不锈钢收集罐后立即带回实验室,按照自然裂隙掰成约 1 cm³大小土块并混合均匀。由于微生物对外界环境反应迅速,因此,在样品取回实验室 24 h 内完成团聚体样品的分离。另一部分混合样品风干处理,剔除植物残体及侵入体,以备土壤基础性质测定。

1.3 团聚体分组

(1) 土壤团聚体分组根据 Six 等^[24]的方法略加修改。简单来说,称取一定量新鲜土样(相当于 50 g 风干土重)置于孔径为 2000 μm 筛中,在室温下(20±2)℃浸没于无菌水中 30 min,使水分充满土壤孔隙。上下震荡筛子,振幅在 3 cm 左右,频率为每分钟 50 次,震荡 3 min,使土壤全部过筛。将过筛后的土壤悬浊液置于 250 μm 筛中,按上述操作继续震荡 3 分钟,然后将滞留于筛上的土壤颗粒用水清洗并转移至离心管中,在 4000 rpm 的条件下离心 30 min。将得到的团聚体迅速置于-80℃冰箱冷藏。此步骤得到 2000—250 μm 土壤粒组(大团聚体),以 Mac 表示。按上述步骤,进一步可以得到 250—53 μm 土壤粒组(微团聚体),以 Mic 表示,<53 μm 的土壤粒组(粉、黏粒组分),以 SC 表示。并通过平均质量直径(MWD)和大于 250 μm 团聚体的质量比例($R_{0.25}$)两个指标表示团聚体稳定性。

团聚体稳定性评价指标:

(2) 平均质量直径(MWD)

$$MWD = \sum_{i=1}^n (\bar{X}_i W_i)$$

式中, $\bar{X}_i$ 为各粒径团聚体的平均直径; W_i 表示相应粒径团聚体占总团聚体质量的比例。

(3) 大于 250 μm 团聚体的质量比例($R_{0.25}$)

$$R_{0.25} = \frac{M_{R_{0.25}}}{M_T}$$

式中, $M_{R_{0.25}}$ 表示大于 250 μm 团聚体的质量; M_T 表示团聚体总质量。

1.4 微生物高通量测序

使用 PowerSoilR DNA 提取试剂盒 (Mo Bio Laboratories Inc., CA) 按说明书提供的步骤对土壤样品进行细菌和真菌的 DNA 提取, 并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 质量。之后对细菌 16S rRNA 中的 V3—V4 高变区进行 PCR 扩增, 引物序列为 F338 (ACTCTACGGGAGGCAGCAG) 和 R158 (ATTACCGCGGCTGCTGG); 对真菌 18S rRNA 的 ITS1 基因进行 PCR 扩增, 引物为 1737F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) 和 2043R (TGCCTTCTTCATCGATGC)。扩增后, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 之后切胶、回收、建立文库并使用 Illumina Miseq 平台进行测序。对测得的数据进行过滤, 去除嵌合体、短序列后得到优质序列。用 usearch 方法按照 97% 相似度对序列进行 OTU 聚类 (不含单序列)。通过 Chao1 指数评估群落中 OTU 数目, Shannon 指数估算样品中微生物多样性。通过与细菌 silva128 数据库和真菌 Unite 数据库比对, 使用 Qiime 平台的 Ribosomal Database Project (RDP) Classifier 算法 (70% 置信度) 生成不同分类水平的微生物丰度表, 以此评估各团聚体粒组中门、纲、目、科、属、种 (phylum, class, order, family, genus, species) 水平细菌和真菌物种组成及相对丰度。

1.5 数据处理

试验所得数据使用 Microsoft Excel 2016 进行处理, SPSS 20.0 软件进行方差分析, 采用 Duncan 法进行显著性差异比较 ($P < 0.05$), 最后用 OriginPro 2015 进行图形绘制。利用 Mothur 软件对每个样品做 α -多样性指数 (Chao1, Shannon) 分析。在 β -多样性指数中, 使用 UniFrac 软件对 PCA 结果进行分析以明确不同处理及团聚体间微生物群落是否存在差异。

2 结果与分析

2.1 土壤团聚体

由表 2 可知, C0 和 C15 处理的质量回收率分别为 95.6% 和 97.7%。从团聚体的分布来看, 粉、黏粒组分在两个处理中均比例最高, 达到 75.85%—80.49%; 而大团聚体和微团聚体所占比例都在 10% 左右。与 C0 处理相比, 生物质炭施用下大团聚体显著增加 42.00%, 而粉、黏粒组分降低 5.76%, 同时 MWD 和 $R_{0.25}$ 分别显著增加 35.92% 和 21.05%。

表 2 团聚体分布和稳定性指标

Table 2 Soil aggregate distribution and index of aggregate stability

处理 Treatment	质量百分比 Soil aggregate fractions/%			回收率 Recovery/%	团聚体稳定性指标 Index of aggregate stability	
	Mac	Mic	SC		$R_{0.25}/\%$	MWD/ μm
C0	7.50 $\pm$ 1.73Bc	11.3 $\pm$ 1.11Ab	80.49 $\pm$ 2.62Ba	95.6	18.93 $\pm$ 2.54B	101.66 $\pm$ 20.39B
C15	10.65 $\pm$ 0.99Ac	11.99 $\pm$ 1.02Ab	75.85 $\pm$ 1.81Aa	97.7	22.99 $\pm$ 1.60A	138.18 $\pm$ 11.58A

Mac, 大团聚体 macro-aggregates; Mic, 微团聚体 micro-aggregates; SC, 粉、黏粒组分 silt-clay fraction; $R_{0.25}$, 粒径大于 250 μm 的团聚体的质量比例; MWD, 平均质量直径 Mean weight diameter; 表中不同小写字母表示同一个处理内部不同粒径团聚体间存在显著差异, 不同大写字母表示同一粒径的团聚体在不同处理间存在显著差异 ($P < 0.05$); 图中数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($n = 3$)

2.2 OTU 及 α -多样性

与 C0 处理相比, C15 处理全土中细菌的 OTU 和 Chao1 指数分别升高 12.39%, 13.89%; 真菌的 OTU、Chao1 和 Shannon 指数分别明显升高 27.60%, 15.47% 和 12.32%。显然施炭增加了全土微生物 OTU 和 α -多样性 (表 3)。就同一个处理内不同粒径团聚体而言, 无论是 C0 还是 C15 处理, 细菌的 OTU、Chao1 和 Shannon 指数均无明显差异。而真菌在 C15 处理大团聚体中的 OTU 明显低于其他组分, 同时微团聚体的 Shannon 指

数明显低于粉、黏粒组分。从不同处理的同一团聚体粒径中的微生物来看,生物质炭施用显著提高了各粒径团聚体中细菌 OTU 数目和 α -多样性,但对真菌无显著影响。

表 3 不同处理下全土及团聚体中微生物 OTU 及 α -多样性指数

Table 3 The α -diversity index and OTU of soil bacterial and fungal from dbulk soil and ifferent aggregates under different treatments

处理 Treatment		细菌 Bacteria			真菌 Fungus		
		OTU	Chao1	Shannon	OTU	Chao1	Shannon
C0	全土	2493.00±46.03Ba	3399.26±89.92Ba	9.82±0.08Ba	567.67±52.05Bb	808.37±74.83Aa	5.41±0.28Ba
	Mac	2453.33±157.82Ba	3485.43±338.75Aa	9.67±0.21Ba	726.67±53.20Aa	947.77±67.00Aa	5.95±0.35Aa
	Mic	2452.00±57.71Ba	3476.41±155.51Ba	9.79±0.02Ba	737.33±34.50Aa	934.63±31.81Aa	5.58±0.25Aa
	SC	2466.00±41.58Ba	3432.10±80.96Ba	9.71±0.03Ba	624.00±119.89Aab	792.05±152.08Aa	5.46±0.34Aa
C15	全土	2802.00±45.04Aa	3871.52±113.02Aab	10.10±0.05Aa	724.33±13.32Aa	933.46±67.57Aa	6.08±0.14Aa
	Mac	2734.67±32.39Aa	3705.49±83.64Ab	10.04±0.04Aa	648.33±38.42Ab	848.72±34.11Aa	5.62±0.22Abc
	Mic	2762.33±11.68Aa	3891.68±40.57Aa	10.07±0.03Aa	708.33±36.67Aa	911.54±53.41Aa	5.44±0.28Ac
	SC	2791.67±70.09Aa	3771.79±96.04Aab	10.08±0.07Aa	755.33±26.84Aa	911.02±59.91Aa	5.97±0.23Aab

OTU,操作分类单元 operational taxonomic unit; Chao1,丰富度估计量 Chao1 richness estimator; Shannon,香农多样性指数 Shannon diversity index;表中不同小写字母表示同一个处理间不同粒径团聚体中的 OTU 及 α -多样性指数的显著差异,不同大写字母表示不同处理间相同粒径团聚体中 OTU 及 α -多样性指数的显著差异 ($P<0.05$);图中数据为平均值±标准差 ($n=3$)

2.3 细菌和真菌多样性

通过主成分分析(PCA)可以清晰的看出(图 1),两处理间及团聚体间微生物群落结构存在明显差异。细菌和真菌的前两个主要成分分别能够解释总变异度的 55.86%和 54.58%。在第一主成分上(PC1),C0 和 C15 处理间的微生物均能显著分开,这表明生物质炭施用导致微生物的群落结构产生变化。在第二主成分上,对细菌而言,无论是 C0 还是 C15 处理,大团聚体和微团聚体间的距离较近,且与粉、黏粒组分显著分开,这表明细菌在大团聚体和微团聚体中的群落相似,而与粉、黏粒组分存在较大差异。与细菌的变化有所不同,对真菌而言,C0 处理中的大团聚体与<250 μm 组分(微团聚体+粉、黏粒组分)的群落结构在第二主成分上明显分开。而在 C15 处理中,微团聚体中的群落结构有向大团聚体群落结构靠近的趋势。这表明,生物质炭的施用会使微团聚体中的真菌群落结构向着大团聚体中群落结构方向发展。

图 2 为两处理主要细菌门和目水平的相对丰度。本研究中共发现 43 个门,主要包括变形菌门(Proteobacteria),酸杆菌门(Acidobacteria),绿弯菌门(Chloroflexi),芽单胞菌门(Gemmatimonadetes),放线菌门(Actinobacteria),硝化螺旋菌门(Nitrospirae)和拟杆菌门(Bacteroidetes)等。共发现 263 个目,主要包括 β -变形杆菌目(Betaproteobacteriales),SBR1031,粘球菌目(Myococcales),厌氧绳菌目(Anaerolineales),根瘤菌目(Rhizobiales),溶菌目(Solibacterales)和芽单胞菌目(Gemmatimonadales)等。同一个处理中不同粒组团聚体的微生物相对丰度存在差异。对 C0 处理而言,随着团聚体粒径的增大,门水平的变形菌门、芽单胞菌门和硝化螺旋杆菌门以及目水平的 β -变形杆菌目、芽单胞菌目的相对丰度逐渐降低,而酸杆菌门、粘球菌目、厌氧绳菌目、溶菌目的相对丰度逐渐升高。C15 处理中,随着团聚体粒径的增大,变形菌门、SBR1031、根瘤菌目的相对丰度升高,而硝化螺旋杆菌门、Patescibacteria、疣孢菌门(Verrucomicrobia)的相对丰度逐渐降低。施用生物质炭显著改变了土壤微生物的相对丰度。从全土来看,C15 处理的酸杆菌门和芽单胞菌门的相对丰度比 C0 处理分别下降 36.93%和 16.44%,而变形菌门、硝化螺旋杆菌门和拟杆菌门的相对丰度分别增加 23.38%,71.28%和 31.31%。在目水平上,施炭导致厌氧绳菌目相对丰度下降 32.86%,而 β -变形杆菌目和根瘤菌目的相对丰度分别升高 42.28%和 22.89%。从不同粒组团聚体中微生物的相对丰度来看,与 C0 处理相比,随着团聚体的粒径增加,C15 处理中的变形菌门相对丰度变化分别为-4.19%、7.05%和 14.37%,变形菌门中的 β -变形杆菌目的变化趋势相似,分别为-3.92%,12.96%,33.82%;酸杆菌门分别下降 0.40%,17.31%和 20.15%,溶菌目分别降低 25.85%,19.04%,19.59%;芽单胞菌门由降低 34.50%和 26.40%至无显著变化(2.82%),相似的,芽单胞菌目的变化分别为-33.28%,-25.63%,7.02%。

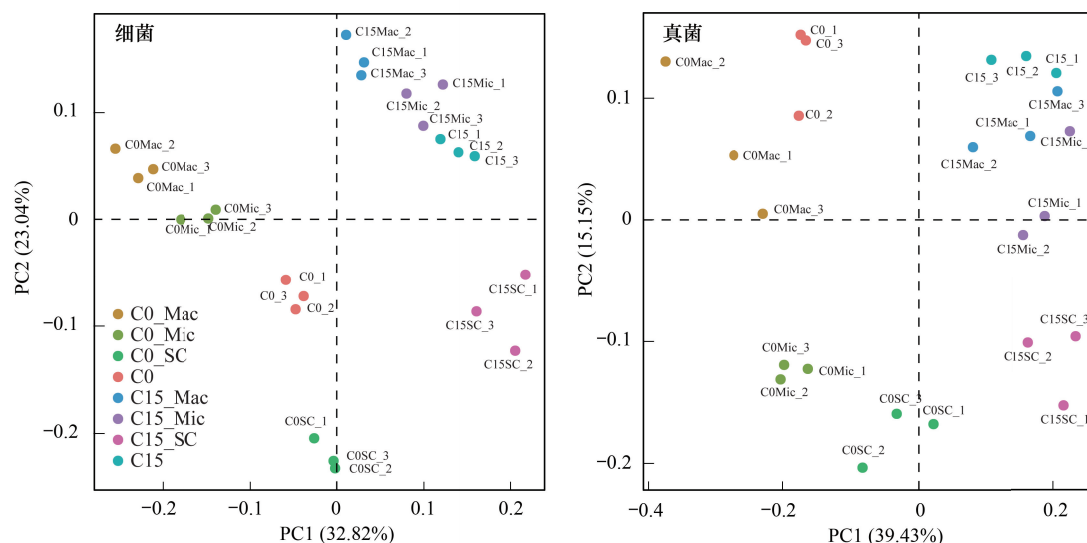


图 1 细菌、真菌群落结构主成分分析 (PCA)

Fig.1 Principal component analysis of bacteria and fungus

C0_Mac, C0 处理中的大团聚体组分样本 The macro-aggregates fraction in C0 treatment; C0_Mic, C0 处理中的微团聚体组分样本 The micro-aggregates fraction in C0 treatment; C0_SC, C0 处理中的粉、黏粒组分样本 The silt-clay fraction in C0 treatment; C0, C0 处理的全土样本 The bulk soil in C0 treatment; C15_Mac, C15 处理中的大团聚体组分样本 The macro-aggregates fraction in C15 treatment; C15_Mic, C15 处理中的微团聚体组分样本 The micro-aggregates fraction in C15 treatment; C15_SC, C15 处理中的粉、黏粒组分样本 The silt-clay fraction in C15 treatment; C15, C15 处理的全土样本 The bulk soil in C15 treatment

图 3 为两处理主要真菌门和目水平的相对丰度。本试验样本中共发现 17 个真菌门, 主要包括子囊菌门 (Ascomycota), 鞭毛菌门 (Mortierellomycota), 担子菌门 (Basidiomycota) 和球囊菌门 (Glomeromycota)。共发现 114 个真菌目, 主要包括被孢霉目 (Mortierellales)、竹盖菌目 (Hypocreales)、粪壳菌目 (Sordariales)、座囊菌目 (Dothideomycetes)、格孢腔菌目 (Pleosporales) 和佩齐亚目 (Pezizales) 等。与细菌相似, 同一个处理不同粒径团聚体间的真菌相对丰度存在差异, 并且随着团聚体粒径的增大, 两处理中均呈现出子囊菌门、罗茨菌门、格孢腔菌目相对丰度逐渐减少和担子菌门、球囊菌门、类球囊霉目相对丰度增加的趋势。从全土角度来看, C15 处理中担子菌门、球囊菌门的相对丰度比 C0 处理分别增加 139.97% 和 18.88%, 而子囊菌门相对丰度降低 20.16%, 其中, 子囊菌门中的粪壳菌目和佩齐亚目的相对丰度分别显著降低 25.06% 和 81.88%。从土壤团聚体角度来看, 与 C0 处理相比, 随着团聚体粒径的增加 (从粉、黏粒组分到大团聚体粒组), C15 处理中子囊菌门相对丰度的变化表现为 -12.15%、19.93% 和 25.94%。竹盖菌目相对丰度变化为 -29.28%、-6.17% 和 35.52%。粪壳菌目在 3 个团聚体粒组中都出现下降 (-34.04%、-29.37%、-43.42%)。担子菌门的相对丰度在粉、黏粒组和微团聚体中分别显著增加 90.52% 和 38.14%, 而在大团聚体粒组中无显著变化。

3 讨论

3.1 生物质炭对土壤团聚体分布的影响

土壤团聚体组成与分布受农田管理措施显著影响, 生物质炭施用可显著改变其存在状态。部分试验表明生物质炭施用能显著促进团聚体的形成^[25], Yoo 等^[26] 通过向种植水稻和牧草的土壤中分别添加 5% 的玉米秸秆及其制备的生物质炭 (450℃), 培养 18 周后发现, 生物质炭添加使微团聚体 (250—53 μm) 增加超过 200%; Liu 等^[25] 以油菜-土豆轮作系统为对象, 在中国亚热带山地红壤中施用 350—550℃ 小麦秸秆生物质炭 (0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 t/hm²) 后发现, 施炭显著增加表层土壤中大团聚体数量并且提高团聚体 MWD 的 28.02%。本研究结果发现, 相对于未施生物质炭处理, 施用生物质炭两年后大团聚体显著增加 42.00%, 而且

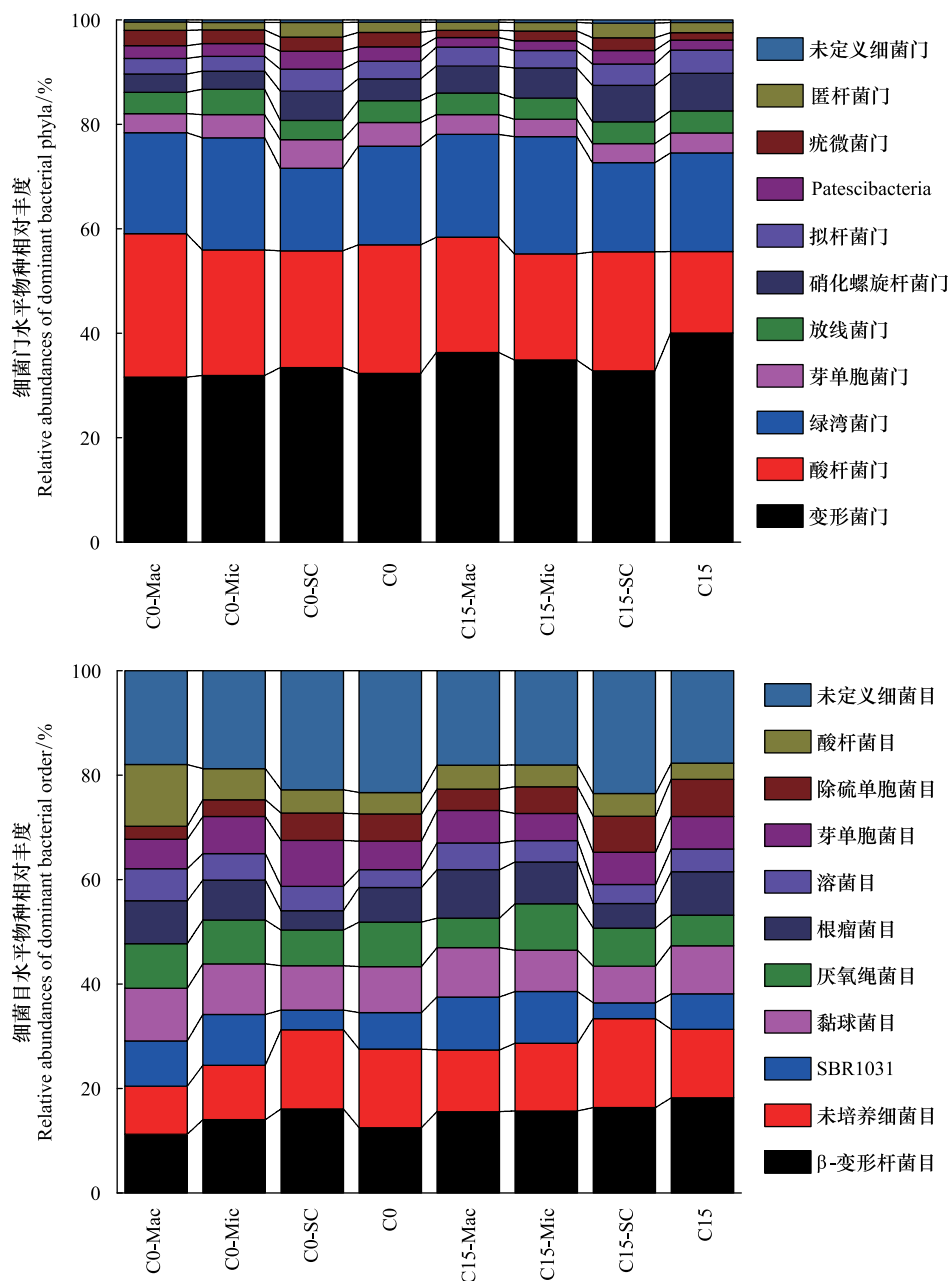


图2 细菌门、目水平相对丰度

Fig.2 Relative abundances of the dominant bacterial phyla and order under different treatments

土壤团聚体的 MWD 和 $R_{0.25}$ 分别显著增加 35.92% 和 21.05% (表 2)。这表明生物质炭在不同土壤类型中, 无论短期还是长期作用下均可促进团聚体的形成和团聚体稳定性的增加。生物质炭农田应用对土壤团聚体分布的改变与生物质炭本身的粒径大小和结构有很大关系^[27], 由于生物质炭巨大的比表面积和各类官能团, 使其具有较强的吸附性能^[28-29], 从而在土壤中充当了胶结剂的作用, 增加对粉、黏粒组分的团聚作用^[30]。其次, 生物质炭包含从纳米到厘米级的颗粒, 在田间大量施用后, 小颗粒生物质炭可以进入团聚体内部或与矿物结合态有机物结合^[31], 增加其胶结性。而游离的大尺寸生物质炭颗粒则对土壤颗粒或微团聚体进行吸附, 可进一步促进了土壤颗粒的团聚过程。另外, 生物质炭在土壤中可以刺激真菌菌丝的生长, 增加土壤颗粒的胶结作用, 从而促进其向大团聚体的演变。通过对团聚体进行扫描电镜 (SEM) 观察发现游离的大颗粒生物质炭表面附着大量土壤颗粒 (图 4), 这也成为生物质炭促进土壤颗粒团聚化的直观证据。再者, 由于生物质炭自

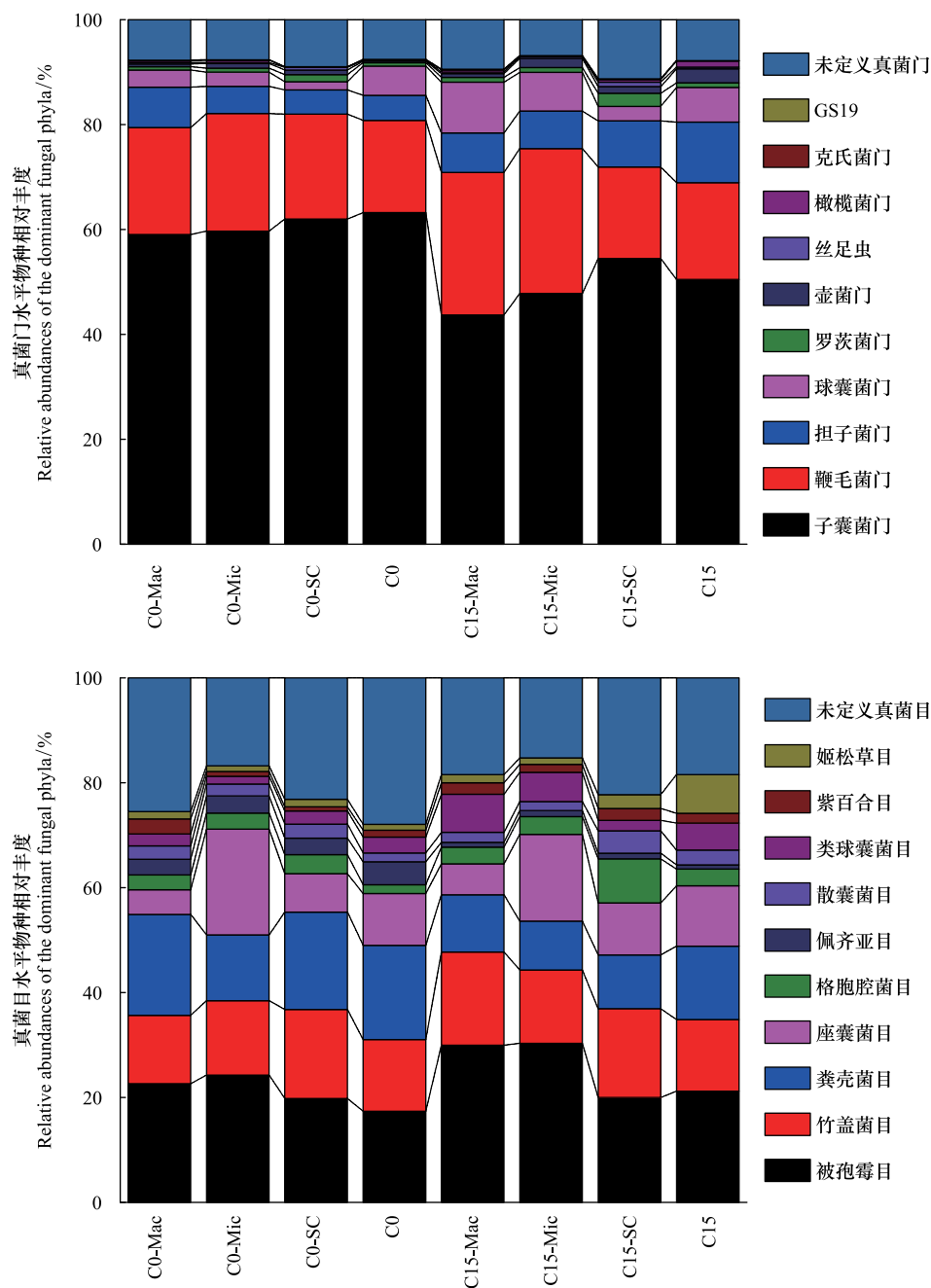


图3 真菌门、目水平相对丰度

Fig.3 Relative abundances of the dominant fungal phyla and order under different treatments

身极强的抗分解能力,使得以生物质炭为核心的团聚体的稳定性远高于以植物凋落物为核心的团聚体,这会大大降低由微生物对活性有机组分利用而导致团聚体结构毁坏的可能性^[32]。

3.2 生物质炭对土壤微生物丰度和多样性的影响

土壤微生物多样性和丰度的增加对增强水稻土生态功能的稳定和健康具有重要意义^[9]。研究表明生物质炭施用对土壤细菌和真菌群落结构的影响不尽相同,如 Zheng 等^[9]在中国西南部酸性水稻土中施用 350—550℃ 的小麦秸秆生物质炭(0,20,40 t/hm²)发现,生物质炭施用 4 年后明显增加了细菌 α -多样性,同时降低了真菌的丰度。在本研究中,生物质炭处理两年后同时提高了土壤中细菌和真菌的 α -多样性。这表明,生物质炭短期添加和长期存在对微生物产生的影响可能存在差异。一些室内短期培养试验表明生物质炭本身的

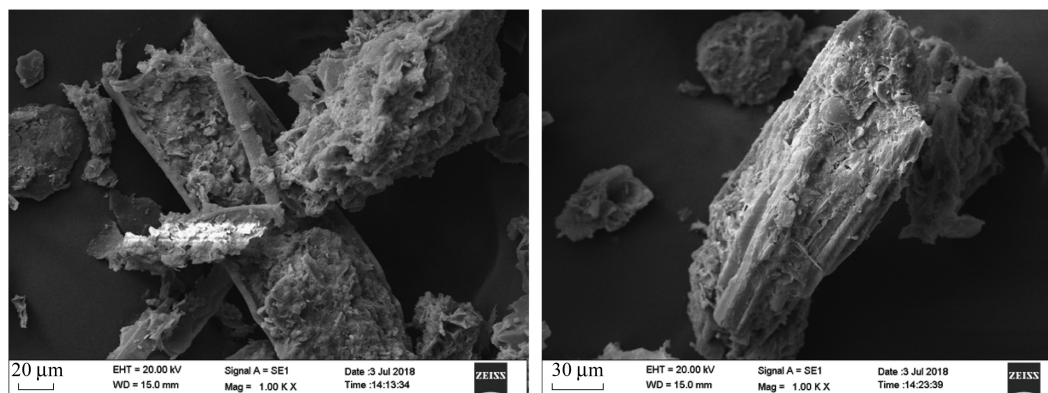


图 4 生物质炭在土壤团聚体中的扫描电子显微镜图

Fig.4 Scanning electron microscope (SEM) image of biochar in soil aggregates

性质,如 pH、孔隙结构和化学组成特性等,是影响微生物丰度和多样性的重要原因^[11,33]。而在一些中长期田间试验中,土壤理化性质的改善(降低土壤容重、增加土壤通气性、提升土壤保水性等)被认为是提高微生物丰度和多样性的重要因素^[34-35]。如最近一些研究发现,田间施用生物质炭缓解了作物与微生物对营养元素的竞争,这一方面是因为生物质炭本身携带的活性物质为微生物提供了丰富的养分和能源,另一方面,由于生物质炭施用对作物生长的促进作用,间接增加了光合产物由根系向土壤中的输入^[36-37],从而促进了土壤微生物的生长与繁殖。

微生物群落结构的改变直接影响土壤养分循环^[38]。本研究发现生物质炭施用两年后的土壤中主要的微生物门水平(变形菌门、酸杆菌门、子囊菌门、担子菌门)以及目水平(β -变形杆菌目、粘球菌目、被孢霉目、竹盖菌目)的相对丰度均发生明显变化,这会进一步影响其在土壤中的功能。就富营养型微生物的变形菌门以及对简单碳水化合物利用效率较高的被孢霉目而言,二者通常被认为与土壤中活性碳组分的含量呈正相关关系^[39],而贫养型微生物的酸杆菌门与可溶性有机碳(DOC)含量存在负相关关系^[40]。研究表明施用生物质炭不仅增加土壤中的惰性碳组分,同时也会提高土壤中 DOC 等活性碳库的含量^[41],这可能是本试验中变形菌门和被孢霉目相对丰度的升高的重要原因。不同土壤利用类型及生物质炭原料对酸杆菌门的影响可能存在差异,如 Chen 等^[12]在旱地土壤中施用 350—550℃ 小麦秸秆生物质炭(0, 20, 40 t/hm²)三年后发现,施炭后酸杆菌门的相对丰度有所升高;而 Li 等^[42]在中国紫土中施入玉米秸秆生物质炭(500℃)后却导致酸杆菌门相对丰度的降低。酸杆菌门主要对木质素、纤维素和半纤维素等有机物的分解起关键作用^[43]。因此,在本试验中酸杆菌门相对丰度的降低表明施用生物质炭有利于植物残体在土壤中的积累。真菌对于稳定性较高的碳组分的取食能力以及在高 C/N 条件下的生存能力高于细菌^[44]。生物质炭的施用显著提升土壤碳氮比的同时改善土壤通气状况,这有利于担子菌门的生长。研究表明,担子菌门与高稳定性有机组分(木质素、纤维素等)的含量呈正相关关系^[45]。而生物质炭含有的大量芳香性稳定有机物可能会促进担子菌门相对丰度的升高。在本研究中占据主导地位的子囊菌门是高稳定性有机物降解的主要参与者^[42],其相对丰度显著降低可能促进土壤有机碳的积累。

3.3 生物质炭施用对水稻土团聚体中微生物群落分布的影响

土壤团聚体包含大小不同的孔隙和土壤颗粒,能为土壤微生物提供多样的栖息环境,从而影响土壤微生物在微域环境的分布^[46]。研究表明,真菌与细菌的比例在>1.0 mm 的团聚体中明显高于<1.0 mm 团聚体,且土壤微生物生物量和群落结构受 0.05—5.0 mm 团聚体含量的显著影响^[47]。本次试验的 PCA 分析表明,无论是对细菌还是真菌,微生物在不同粒组团聚体中的分布存在显著差异。大团聚体的酸杆菌门和担子菌门, SBR1031 和根瘤菌目的相对丰度明显高于粉、黏粒组分,而粉、黏粒组分中的硝化螺旋杆菌门、子囊菌门、格孢腔菌目和散囊菌目(*Eurotiales*)的相对丰度则高于大团聚体。这些差异与土壤团聚体形成的微环境的差异有

密切关系,如不同粒径团聚体中的有机物化学组成、C/N、孔隙组成、水分状况和氧气含量等生态因子的多样化使微生物分布出现明显异质性^[48-49]。而生物质炭处理相比无炭土壤,变形菌门、鞭毛菌门、 β 变形杆菌目、被孢霉目的相对丰度在大团聚体中明显增加,酸杆菌门、粪壳菌目、厌氧绳菌目的相对丰度在微团聚体明显降低。这些结果表明,生物质炭施用在微域环境中使土壤微生物产生了分异,这些变化可能与以下因素有关。首先,生物质炭通过胶结或包裹作用或真菌的菌丝作用增加了土壤的团聚作用,改变了原始土壤颗粒的组合方式,从而在空间分布上使微生物群落发生重新组合和分配;其次,由于生物质炭对土壤的改善作用(如改善通气性、保水性等),在土壤颗粒重新组合后,相应的在土壤微环境中的营养物质和生态因子也随之改变,在此情况下,微生物在新环境中重新适应,进而影响微生物的生长繁殖并改变其结构和组成。由于各粒组微环境的变化程度并不一致,因而导致在不同团聚体粒组中敏感微生物的变异不尽相同。反过来,这些敏感微生物群落的改变又可能影响所在生境中养分转化和循环^[30],然而,它们之间的相互作用机制还有待于进一步研究。

4 结论

(1)水稻土施用生物质炭显著改变了土壤团聚体的分布及稳定性,主要表现为大团聚体含量的增加与稳定性的提高。

(2)施用生物质炭显著改变了土壤微生物群落结构和多样性。与对照相比,生物质炭施用下全土中细菌和真菌的多样性显著增加。在门水平上,变形菌门、硝化螺旋杆菌门和担子菌门的相对丰度明显升高,而子囊菌门、酸杆菌门和芽单胞菌门的相对丰度明显下降;在目水平上, β -变形杆菌目、竹盖菌目和被孢霉目的相对丰度明显升高,而粪壳菌目、厌氧绳菌目和溶菌目的相对丰度明显下降。

(3)不同粒径团聚体中微生物群落结构存在明显差异。大团聚体中酸杆菌门、担子菌门、根瘤菌目的相对丰度明显高于其他粒组,而硝化螺旋杆菌门、子囊菌门、 β -变形杆菌目呈相反趋势。施用生物质炭显著改变了不同粒组中微生物群落分布。与未施用生物质炭相比,生物质炭施用显著增加了大团聚体中变形菌门、鞭毛菌门、竹盖菌目、 β -变形杆菌目以及粉、黏粒组中的担子菌门、球囊菌门、格孢腔菌目的相对丰度,降低了微团聚体中酸杆菌门、放线菌门、子囊菌门、粪壳菌目以及粉、黏粒组分中芽单胞菌门、子囊菌门和厌氧绳菌目的相对丰度。

参考文献(References):

- [1] Lehmann J, Rillig M C, Thies J, Masiello C A, Hockaday W C, Crowley D. Biochar effects on soil biota-a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(9): 1812-1836.
- [2] Maestrini B, Nannipieri P, Abiven S. A meta-analysis on pyrogenic organic matter induced priming effect. *Global Change Biology Bioenergy*, 2015, 7(4): 577-590.
- [3] Lehmann J. A handful of carbon. *Nature*, 2007, 447(7141): 143-144.
- [4] 孔丝纺,姚兴成,张江勇,姚晓东,曾辉. 生物质炭的特性及其应用的研究进展. *生态环境学报*, 2015, 24(4): 716-723.
- [5] Stewart C E, Zheng J Y, Botte J, Cotrufo M F. Co-generated fast pyrolysis biochar mitigates green-house gas emissions and increases carbon sequestration in temperate soils. *Global Change Biology Bioenergy*, 2013, 5(2): 153-164.
- [6] Malghani S, Gleixner G, Trumbore S E. Chars produced by slow pyrolysis and hydrothermal carbonization vary in carbon sequestration potential and greenhouse gases emissions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 62: 137-146.
- [7] Prayogo C, Jones J E, Baeyens J, Bending G D. Impact of biochar on mineralisation of C and N from soil and willow litter and its relationship with microbial community biomass and structure. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(4): 695-702.
- [8] Xu H J, Wang X H, Li H, Yao H Y, Su J Q, Zhu Y G. Biochar impacts soil microbial community composition and nitrogen cycling in an acidic soil planted with rape. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(16): 9391-9399.
- [9] Zheng J F, Chen J H, Pan G X, Liu X Y, Zhang X H, Li L Q, Bian R J, Cheng K, Zheng J W. Biochar decreased microbial metabolic quotient and shifted community composition four years after a single incorporation in a slightly acid rice paddy from southwest China. *Science of the Total Environment*, 2016, 571: 206-217.

- [10] 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.
- [11] Sheng Y, Zhu L Z. Biochar alters microbial community and carbon sequestration potential across different soil pH. *Science of the Total Environment*, 2018, 622-623: 1391-1399.
- [12] Chen J H, Sun X, Zheng J F, Zhang X H, Liu X Y, Bian R J, Li L Q, Cheng K, Zheng J W, Pan G X. Biochar amendment changes temperature sensitivity of soil respiration and composition of microbial communities 3 years after incorporation in an organic carbon-poor dry cropland soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54(2): 175-188.
- [13] Chen J H, Chen D, Xu Q F, Fuhrmann J J, Li L Q, Pan G X, Li Y F, Qin H, Liang C F, Sun X. Organic carbon quality, composition of main microbial groups, enzyme activities, and temperature sensitivity of soil respiration of an acid paddy soil treated with biochar. *Biology and Fertility of Soils*, 2019, 55(2): 185-197.
- [14] 李娜, 韩晓增, 尤孟阳, 许玉芝. 土壤团聚体与微生物相互作用研究. *生态环境学报*, 2013, 22(9): 1625-1632.
- [15] 刘真勇, 高振, 王艳玲, 姚怡. 旱地转变为稻田对关键带红壤剖面土壤团聚体碳含量的影响. *土壤学报*, 1-11[2019-01-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1119.P.20181126.1042.002.html>.
- [16] 冯欢, 张俊岭, 张风华. 不同复垦模式对土壤团聚体及水溶性阳离子的影响. *水土保持研究*, 2018, 25(6): 94-99, 108-108.
- [17] Trivedi P, Rochester I J, Trivedi C, Van Nostrand J D, Zhou J Z, Karunaratne S, Anderson I C, Singh B K. Soil aggregate size mediates the impacts of cropping regimes on soil carbon and microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 91: 169-181.
- [18] Wang R, Dorodnikov M, Yang S, Zhang Y Y, Filley T R, Turco R F, Zhang Y G, Xu Z W, Li H, Jiang Y. Responses of enzymatic activities within soil aggregates to 9-year nitrogen and water addition in a semi-arid grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 81: 159-167.
- [19] Pituello C, Dal Ferro N, Francioso O, Simonetti G, Berti A, Piccoli I, Pisi A, Morari F. Effects of biochar on the dynamics of aggregate stability in clay and sandy loam soils. *European Journal of Soil Science*, 2018, 69(5): 827-842.
- [20] Huang R, Tian D, Liu J, Lv S, He X H, Gao M. Responses of soil carbon pool and soil aggregates associated organic carbon to straw and straw-derived biochar addition in a dryland cropping mesocosm system. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2018, 265: 576-586.
- [21] Sarker T C, Incerti G, Spaccini R, Piccolo A, Mazzoleni S, Bonanomi G. Linking organic matter chemistry with soil aggregate stability: Insight from ^{13}C NMR spectroscopy. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 117: 175-184.
- [22] Steinbeiss S, Gleixner G, Antonietti M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(6): 1301-1310.
- [23] Graber E R, Harel Y M, Kolton M, Cytryn E, Silber A, David D R, Tsechansky L, Borenshtein M, Elad Y. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant and Soil*, 2010, 337(1/2): 481-496.
- [24] Six J, Elliott E T, Paustian K, Doran J W. Aggregation and soil organic matter accumulation in cultivated and native grassland soils. *Soil Science Society of America Journal*, 1998, 62(5): 1367-1377.
- [25] Liu Z X, Chen X M, Jing Y, Li Q X, Zhang J B, Huang Q R. Effects of biochar amendment on rapeseed and sweet potato yields and water stable aggregate in upland red soil. *CATENA*, 2014, 123: 45-51.
- [26] Yoo G, Kim H, Choi J Y. Soil Aggregate dynamics influenced by biochar addition using the C natural abundance method. *Soil Science Society of America Journal*, 2017, 81(3): 612-621.
- [27] Herath H M S K, Camps-Arbestain M, Hedley M, Van Hale R, Kaal J. Fate of biochar in chemically- and physically-defined soil organic carbon pools. *Organic Geochemistry*, 2014, 73: 35-46.
- [28] Klüpfel L, Keiluweit M, Kleber M, Sander M. Redox properties of plant biomass-derived black carbon (Biochar). *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(10): 5601-5611.
- [29] Archanjo B S, Baptista D L, Sena L A, Cançado L G, Falcão N P S, Jorio A, Achete C A. Nanoscale mapping of carbon oxidation in pyrogenic black carbon from ancient Amazonian anthrosols. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2015, 17(4): 775-779.
- [30] Gul S, Whalen J K, Thomas B W, Sachdeva V, Deng H Y. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: mechanisms and future directions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2015, 206: 46-59.
- [31] Solomon D, Lehmann J, Wang J, Kinyangi J, Heymann K, Lu Y S, Wirrick S, Jacobsen C. Micro- and Nano-environments of C sequestration in soil; a multi-elemental STXM-NEXAFS assessment of black C and organomineral associations. *Science of the Total Environment*, 2012, 438: 372-388.
- [32] Six J, Paustian K. Aggregate-associated soil organic matter as an ecosystem property and a measurement tool. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 68: A4-A9.
- [33] Zheng H, Wang X, Luo X X, Wang Z Y, Xing B S. Biochar-induced negative carbon mineralization priming effects in a coastal wetland soil: roles of soil aggregation and microbial modulation. *Science of the Total Environment*, 2018, 610-611: 951-960.

- [34] Maestrini B, Herrmann A M, Nannipieri P, Schmidt M W I, Abiven S. Ryegrass-derived pyrogenic organic matter changes organic carbon and nitrogen mineralization in a temperate forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 69(4): 291-301.
- [35] Domene X, Mattana S, Hanley K, Enders A, Lehmann J. Medium-term effects of corn biochar addition on soil biota activities and functions in a temperate soil cropped to corn. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 72: 152-162.
- [36] Kolton M, Graber E R, Tsehansky L, Elad Y, Cytryn E. Biochar-stimulated plant performance is strongly linked to microbial diversity and metabolic potential in the rhizosphere. *New Phytologist*, 2017, 213(3): 1393-1404.
- [37] Ge T D, Liu C, Yuan H Z, Zhao Z W, Wu X H, Zhu Z K, Brookes P, Wu J S. Tracking the photosynthesized carbon input into soil organic carbon pools in a rice soil fertilized with nitrogen. *Plant and Soil*, 2014, 392(1/2): 17-25.
- [38] Nielsen S, Minchin T, Kimber S, van Zwieten L, Gilbert J, Munroe P, Joseph S, Thomas T. Comparative analysis of the microbial communities in agricultural soil amended with enhanced biochars or traditional fertilisers. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2014, 191: 73-82.
- [39] Wang Y H, Yu Z H, Li Y S, Wang G H, Liu J, Liu J J, Liu X B, Jin J. Microbial association with the dynamics of particulate organic carbon in response to the amendment of elevated CO₂-derived wheat residue into a Mollisol. *Science of the Total Environment*, 2017, 607-608: 972-981.
- [40] Zhang A F, Zhou X, Li M, Wu H M. Impacts of biochar addition on soil dissolved organic matter characteristics in a wheat-maize rotation system in Loess Plateau of China. *Chemosphere*, 2017, 186: 986-993.
- [41] Jenkins S N, Rushton S P, Lanyon C V, Whiteley A S, Waite I S, Brookes P C, Kemmitt S, Evershed R P, O'Donnell A G. Taxon-specific responses of soil bacteria to the addition of low level C inputs. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(9): 1624-1631.
- [42] Li Y, Yang Y Q, Shen F, Tian D, Zeng Y M, Yang G, Zhang Y Z, Deng S H. Partitioning biochar properties to elucidate their contributions to bacterial and fungal community composition of purple soil. *Science of the Total Environment*, 2019, 648: 1333-1341.
- [43] Eichorst S A, Kuske C R, Schmidt T M. Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum Acidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(2): 586-596.
- [44] 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.
- [45] Lopes A R, Manaia C M, Nunes O C. Bacterial community variations in an alfalfa-rice rotation system revealed by 16S rRNA gene 454-pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87(3): 650-663.
- [46] Gupta V V S R, Germida J J. Soil aggregation: Influence on microbial biomass and implications for biological processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 80: A3-A9.
- [47] Jiang X, Wright A L, Wang J, Li Z. Long-term tillage effects on the distribution patterns of microbial biomass and activities within soil aggregates. *CATENA*, 2011, 87(2): 276-280.
- [48] Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbière F, Thioulouse J, Nazaret S. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbial Ecology*, 2000, 39(4): 263-272.
- [49] Briar S S, Fonte S J, Park I, Six J, Scow K, Ferris H. The distribution of nematodes and soil microbial communities across soil aggregate fractions and farm management systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(5): 905-914.