

生物炭施用对华北潮土土壤细菌多样性的影响

乌英嘎^{1,2}, 张贵龙^{2*}, 赖欣², 刘红梅², 杨殿林²

(1.内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022; 2.农业部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘要:采用田间小区试验, 结合 DGGE-cloning 测序技术, 研究了潮土中施用生物炭对土壤细菌多样性的影响。结果表明: 施用生物炭的处理 C₂ (15 t·hm⁻² 生物炭+225 kg·hm⁻² 氮肥)、C₃ (25 t·hm⁻² 生物炭+225 kg·hm⁻² 氮肥)、C₄ (30 t·hm⁻² 生物炭+225 kg·hm⁻² 氮肥) 土壤 16S rDNA DGGE 指纹图谱条带数较对照 CK₁ (不施生物炭不施氮肥) 和 CK₂ (不施生物炭施 225 kg·hm⁻² 氮肥) 增多 4~5 条, Shannon-Wiener 多样性指数和 Pielou 均匀度指数却分别下降 11.5%~13.0% 和 14.1%~16.5%; 不施用生物炭处理的土壤细菌群落相似度高, 且与施用生物炭的土壤存在差异, 其中 C₄ 处理的土壤细菌群落与其他处理差别最大; 选取 DGGE 指纹图谱中有代表性的 13 个条带进行测序结果显示, C₃、C₄ 处理中增加的条带 p、q、r 等代表的均为未分类的细菌, 条带 e 和 g 为变形菌门 (*Proteobacteria*)。可见, 生物炭施用虽然促进新的细菌生长, 但同时也抑制了原有某些细菌的生长, 改变了土壤细菌群落组分, 最终导致土壤细菌多样性和均匀度下降。

关键词: 生物炭; 潮土; 土壤细菌; 多样性

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2014)05-0965-07 doi:10.11654/jaes.2014.05.020

Effects of Biochar Applications on Bacterial Diversity in Fluvo-aquic Soil of North China

WU Ying-ga^{1,2}, ZHANG Gui-long^{2*}, LAI Xin², LIU Hong-mei², YANG Dian-lin²

(1. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China; 2. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China)

Abstract: As a by-product of biomass pyrolysis, biochar has been deployed to alleviate anthropogenically triggered increases in atmospheric CO₂ concentrations. It is generally accepted that biochar-C is largely unavailable to soil microbes but can change soil physicochemical properties. Applying biochar with metabolically available labile-C compounds may shift soil microbial community structure. In the present research, a field experiment was designed to investigate temporal changes in bacterial diversity after biochar additions in fluvo-aquic soil in North China. Six treatments with four replicates were used: CK₁ (no biochar or urea-N); CK₂ (no biochar+225 kg urea-N·hm⁻²); C₁ (7.5 t·hm⁻² biochar +225 kg urea-N·hm⁻²); C₂ (15 t·hm⁻² biochar+225 kg urea-N·hm⁻²); C₃ (25 t·hm⁻² biochar+225 kg urea-N·hm⁻²); C₄ (30 t·hm⁻² biochar+225 kg urea-N·hm⁻²). The biochar used in the experiment was pyrolytic peanut shell processed at 300 °C. The experimental treatments were randomly assigned. Bacterial diversity was measured using DGGE-cloning sequencing method. Compared with controls (CK₁, CK₂), biochar treatments increased DGGE fingerprints by 4 or 5 bands, but decreased the Shannon-Wiener diversity and Pielou evenness index by 11.5%~13.0%, 14.1%~16.5%, respectively. Cluster analysis indicated that DGGE fingerprints shared at least 60% similarity among all treatments. Additions of biochar reduced the similarity of bacterial community composition. Sequencing 13 bands selected from DGGE gel according to their peculiarity showed that new bands p, q and r were found but the bands e and g representing *Proteobacteria* disappeared in the treatment C₃ and C₄. The present results indicate that biochar promotes the growth of new bacteria but inhibit some known bacteria, thus changing the bacterial community composition and decreasing the diversity and evenness index of soil bacterial community.

Keywords: biochar; fluvo-aquic soil; soil bacteria; biodiversity

收稿日期: 2013-12-11

基金项目: 天津市自然科学基金(13JCYBJC25400); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所)

作者简介: 乌英嘎(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物资源学。E-mail: wuyingga111@126.com

* 通信作者: 张贵龙 E-mail: zgl_2008@126.com

生物炭是生物质在低氧环境下,经过高温热解(300~700℃)而得到的一类具有大比表面积、多孔且高度芳香化的富碳物质。近年来,生物炭作为一种功能材料在农业上的应用引起广泛关注,其在土壤耕性改良^[1]、肥力提升^[2]及污染修复^[3]等方面呈现可观潜力,为农业可持续发展、增强农业应对气候变化能力提供了新的思路。生物炭具有较高的热稳定性和化学稳定性,在土壤中能够长期驻留,利用其多孔性,可以有效疏松土层^[4],增加土壤通气性,为土壤微生物提供栖息和繁衍场所,促进土壤微生物菌群结构^[5]、微生物区系组成及活性发生变化^[6]。

土壤细菌是土壤微生物的重要组成部分,在土壤有机质分解、腐殖质形成、养分转化与吸收等过程中起到重要作用,其群落结构组成及多样性变化是表征土壤环境质量的敏感指标,因此,在土壤生态学研究,土壤细菌群落的变化逐渐成为人们探索的重要方向之一。有研究表明生物炭可以显著提高土壤细菌群落多样性^[7],Anderson等^[5]发现添加生物炭后土壤慢生根瘤(*Bradyrhizobiaceae*)和生丝微菌(*Hyphomicrobiaceae*)种群丰度分别增加8%和14%。陈伟等^[8]观测到生物炭处理的土壤中平邑甜茶根际可培养的细菌数量是CK(不施用生物炭处理)的2.63~8.23倍。但另有研究表明生物炭施用会降低土壤微生物的多样性^[9],Spokas等^[10]认为由生物炭释放出的乙烯可以抑制一些细菌的活性,在Anderson等^[5]研究中也发现了土壤链球菌和小单孢菌数较未施用生物炭的分别降低11%和8%。此外,也有研究认为生物炭输入对土壤菌落的生长没有显著影响^[11],Pietikainen等^[12]认为生物炭输入总体上对土壤微生物量影响不大。不同原料及热解条件制备的生物炭的孔型结构、表面特征及化学组成等性质存在较大差异,这可能是导致上述研究结果不一致的重要原因,另外,细菌种群的生理差异及土壤质地的不同也可能引起一些研究结果相悖。由此看来,生物炭对土壤细菌群落活动的影响过程较为复杂,仍需进一步深入探索。本研究采用田间小区试验,利用DGGE-cloning测序技术,观测生物炭施用条件下土壤细菌群落结构多样性变化,以期揭示其对生物炭输入的响应特征,为生物炭农学应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

试验于2012年6—10月在农业部环境保护科研

监测所综合试验场区(39°5′N,117°8′E)进行。该试验场区地处天津市南开区,属温带大陆性季风气候,年平均气温为12.3℃,年平均降雨量为550~680mm。供试土壤为华北平原潮土,作物轮作方式为冬小麦-夏玉米,该试验季种植作物为夏玉米(丹玉22)。土壤pH值7.6,有机质含量18.8g·kg⁻¹,全氮含量1.08g·kg⁻¹,全磷含量0.69g·kg⁻¹,铵态氮含量4.7mg·kg⁻¹,硝态氮含量43.3mg·kg⁻¹,速效磷含量18.4mg·kg⁻¹,速效钾含量21.0mg·kg⁻¹。

1.2 生物炭制备

生物炭由河南三利新能源公司制备,原料为花生壳。花生壳风干后,粉碎过2mm筛,然后放入已设置好程序的热解炉中,炉中保持N₂通过,流量为0.1m³·h⁻¹。热解温度控制:启动温度为40℃,以5℃·min⁻¹幅度升温至170℃,保持30min,然后再按照5℃·min⁻¹幅度升温至300℃,保持6h,然后保持通N₂状态冷却至室温。冷却后,将生物炭过2mm筛,密闭保存备用。生物炭比表面积(S_{BET})73m²·g⁻¹,孔径23.9nm,灰分含量3.2%,pH值9.7,C(碳)含量74.0%,K(钾)含量4.6%,Mg(镁)含量0.12g·kg⁻¹,Ca(钙)含量0.1g·kg⁻¹。

1.3 试验设计

试验共设6个处理,分别为CK₁(即不施生物炭也不施氮肥)、CK₂(不施生物炭施氮肥)、C₁(7.5t·hm⁻²生物炭+氮肥)、C₂(15t·hm⁻²生物炭+氮肥)、C₃(25t·hm⁻²生物炭+氮肥)、C₄(30t·hm⁻²生物炭+氮肥),每处理重复4次。除CK₁外,所有处理氮肥用量均为225kg·hm⁻²,以尿素的形式40%在播种前整地时连同生物炭一起施入,其余60%在小喇叭口期作追肥施入,其他管理同一般大田生产。

1.4 样品采集

玉米播种整地前和收获后,每小区内选择10个点取样(S型),在玉米行间,取土深度0~20cm,将采集的土样混匀,装入无菌自封袋带回实验室,剔除植物残渣等杂物,按四分法取样。样品分两部分:一部分放入4℃冰箱保存,用于土壤微生物指标的测定;另一部用于土壤化学指标测定。

1.5 分析方法

1.5.1 土壤理化性质测定

土壤有机质采用重铬酸钾-浓硫酸油浴法;全氮采用凯氏定氮法;硝态氮和铵态氮采用KCl浸提-流动分析仪法;全磷采用HClO₄-H₂SO₄法;速效磷采用钼蓝比色法;速效钾采用火焰光度计法;pH采用电位

计法(水土比 2.5:1);土壤含水量采用铝盒烘干法;微生物量采用氯仿熏蒸法。

1.5.2 生物炭理化指标测定

孔隙度采用氮吸附连续流动法;比表面积、总孔体积和平均孔径,采用容量法;pH 值采用(10 g 生物炭于 150 mL 蒸馏水中振荡 24 h 过滤,取滤液 50 mL)电位计测定;C 元素含量采用 TruSpec CN 元素分析仪(美国 LECO 分析仪器公司)测定;K 采用原子吸收法;Mg、Ca 采用 EDTA 滴定法测定。

1.5.3 土壤 DNA 的提取与纯化

采用 BBI 公司的 EZ-10 SpinDNA Extraction kit 试剂盒,按操作说明进行土壤 DNA 提取与纯化。

1.5.4 PCR 扩增

采用 PCR 扩增方法扩增土壤细菌基因序列片段。PCR 反应体系:Premix Ex Taq 25 μ L, DNA 模板 1 μ L,引物(341f-GC 和 534r)1 μ L,用灭菌蒸馏水补足终体积至 50 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 7 min,94 $^{\circ}$ C 1 min,61 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 7 min,保温至 25 $^{\circ}$ C。所用引物及序列如表 1。

1.5.5 DGGE 分析

PCR 产物采用 Dcode™ 通用突变检测系统(Bio-Rad, USA)按照操作说明进行 DGGE 分析。聚丙烯酰胺凝胶(37.5:1)浓度为 8%,变性剂梯度为 40%~60%(变性梯度为 100%凝胶的配方:40%双丙烯酰胺 20 mL,50 $\times$ TAE buffer 2 mL,去离子甲酰胺 40 mL,尿素 42 g,补水至 100 mL)。凝胶板制作好后,组装放入含有 1 $\times$ TAE 的电泳槽中,预热到 60 $^{\circ}$ C 时加样,将 20 μ L PCR 产物和 4 μ L 6 $\times$ loading buffer 用微量进样器加入胶孔中,50 V 预热 30 min,然后 100 V、60 $^{\circ}$ C 条件下电泳 16 h。电泳结束后,小心取出凝胶,放在 SYBRTM Green I(1:10 000 稀释)染色液中染色 30 min,然后在 Bio-rad 公司的凝胶成像系统下进行观察和拍照。

1.5.6 割胶回收测序

在紫外灯下对 DGGE 图谱的优势条带和主要特异条带进行割胶,将切下的 DNA 条带分别放入 1.5 mL 离心管中,加入 500 μ L 的灭菌超纯水,4 $^{\circ}$ C 保存过夜。次日,取 5 μ L 溶液作为 PCR 模板,采用无发夹

结构的 341f 和 534r 引物进行扩增,PCR 的反应体系是:Premix Ex Taq 25 μ L,胶回收产物 5 μ L,引物各 1 μ L,灭菌蒸馏水补足至 50 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测并进行胶回收纯化。所得产物克隆至 pGEM-T Easy Vector System(Promega, USA)载体中并进行序列测定,测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。将测序所得 DNA 序列与 NCBI 数据库中的已有序列进行 BLAST 序列比对并建立进化发育树。

1.5.7 数据处理

采用 Quantity One 凝胶成像图像处理系统对 DGGE 图谱中的条带的位置和亮度进行数字化处理和聚类分析;应用 MEGA 4.0 软件建立系统发育进化树;使用 Excel 进行数据处理及方差分析。细菌多样性指数(Shannon-Wiener)和均匀度指数(Pielou)分别用 H' 和 EH' 表示,其计算公式如下:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

$$EH' = H' / \ln S$$

式中: S 代表条带总数或丰度; P_i 代表第 i 条带占总密度的比例。

2 结果与分析

2.1 土壤 DNA 与细菌群落 DGGE 图谱分析

由图 1 可知,PCR 扩增产物位于 250 bp 左右,所提取的土壤总 DNA 质量较好,能够满足 PCR-DGGE 分析要求。DGGE 指纹图谱显示, C_1 处理与对照(CK_1 和 CK_2) 无明显差异; C_2 、 C_3 、 C_4 处理条带数均达到 35

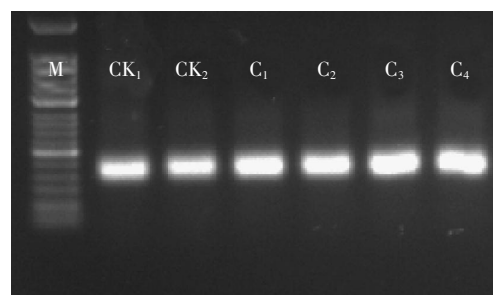


图 1 土壤微生物总 DNA 电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of soil microbial total DNA

表 1 细菌 PCR 扩增的引物及其序列

Table 1 Primers used for amplifying bacterial genes

引物 Primer	引物序列 Primer sequences	片段长度 Length/bp
341f-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGG CGGGCGGGGCACGGGGGCGCTACGGGAGGCAGCA-3'	56
534r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	17

条,较对照(CK₁和CK₂)增多4~5条(图2,表2),说明施用生物炭促进了某些细菌的生长。对图2 DGGE 指纹图谱分析表明,不同处理间有许多共有条带,土壤菌群结构表现出较高的相似性,说明这些条带所代表的土壤细菌很稳定,不受施用生物炭的影响。但在生物炭添加处理中,即C₁、C₂、C₃、C₄泳道上出现与CK₁和CK₂不同的条带(o、p、q、r),也有一部分条带逐渐消失或丢失(b、e、g、k),使得土壤细菌群落结构发生变化。

施用生物炭处理(C₁、C₂、C₃、C₄)的土壤细菌多样

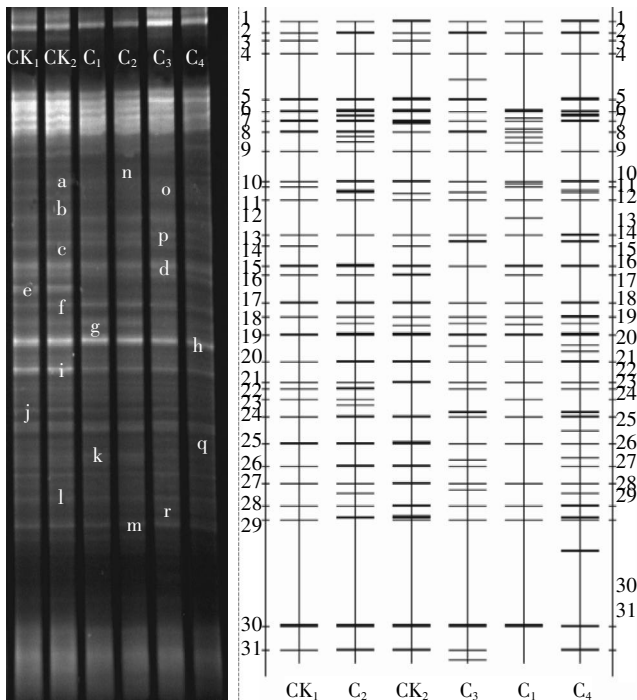


图 2 16S rDNA 扩增片段的 DGGE 图谱

Figure 2 DGGE profiles of 16S rDNA PCR products

表 2 土壤细菌 DGGE 图谱条带数、Shannon-Winner 指数、均匀度指数

Table 2 DGGE band numbers, Shannon-Winner index and Evenness index of soil bacterial community

处理 Treatment	条带数 Band number	多样性指数 Shannon-Winner index	均匀度指数 Evenness index
CK ₁	31	3.27±0.04a	0.95±0.01a
CK ₂	30	3.26±0.04a	0.94±0.01a
C ₁	31	3.09±0.05b	0.89±0.02ab
C ₂	35	2.88±0.04b	0.80±0.01b
C ₃	35	2.93±0.04b	0.82±0.02b
C ₄	35	2.65±0.03c	0.72±0.02c

注:CK₁(不施肥)、CK₂(单施氮肥 225 kg·hm⁻²)、C₂(15 t·hm⁻²+225 kg·hm⁻² 氮肥)、C₃(25 t·hm⁻²+225 kg·hm⁻² 氮肥)、C₄(30 t·hm⁻²+225 kg·hm⁻² 氮肥)。

性指数为2.62~3.14(表2),较不施生物炭的处理(CK₁、CK₂)平均降低11.5%~13.0%;土壤细菌群落的均匀度指数也呈逐渐下降的趋势,施用生物炭的处理较不施用的平均降低14.1%~16.5%,这表明施用生物炭可能降低土壤菌群结构多样性和均匀度,总体呈现为CK₁>CK₂>C₁>C₃>C₂>C₄(其中C₃>C₂,但不显著)。

2.2 细菌群落 DGGE 图谱聚类分析

聚类分析表明,所有处理土壤细菌 DGGE 图谱相似性均达60%以上(图3)。其中CK₁与CK₂处理土壤细菌 DGGE 图谱相似性达到84%,并聚成一簇。C₁与C₂处理土壤细菌 DGGE 图谱相似性达85%,并聚成一簇。C₄明显与其他处理土壤细菌 DGGE 图谱差异较大,自己为一簇。从以上结果来看,发现没有添加生物炭的归为一簇,添加生物炭的土壤归为一簇,说明添加生物炭与未添加生物炭的土壤细菌群落结构存在差异,且表现出随生物炭用量增加,土壤菌群结构与未施用的相似度降低的趋势,表明施用生物炭引起土壤细菌群落组分发生一定的变异。但总体来看,发生变异的幅度约20%~40%,意味着只有部分菌群发生变化,多数菌群仍维持原有状态。

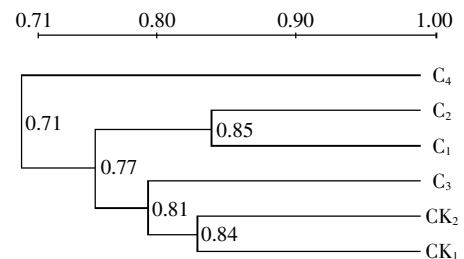


图 3 DGGE 图谱聚类分析

Figure 3 Cluster analysis of DGGE banding patterns

2.3 细菌群落 DGGE-cloning 测序分析

将 DGGE 优势条带切胶分离,基于 DGGE 图谱条带位置和亮度,选择性切取13条带,其中所有处理共有条带6条,分别为条带c、d、f、h、i和m;条带a、b、e为CK₁和CK₂特有(表3);条带n、g为C₃和C₄缺失条带;条带j为C₄缺失条带;条带r为C₁和C₂缺失条带。可见,施用生物炭改变了原有土壤细菌群落结构,在增加土壤特异菌种的同时也抑制了原有菌种的生长。核糖体数据库(Ribosomal Database Project)比对结果表明(图4):在数据库中匹配的13个序列均为细菌,其中条带i代表的细菌属于拟杆菌门(*Bacteroidetes*),为革兰氏阴性菌。条带e和g代表的细菌属于变形菌门(*Proteobacteria*),革兰氏阴性菌,多数细菌营兼性或者专性厌氧及异养生活,一些自由

表 3 16S rDNA DGGE 片段测序分析结果
Table 3 Sequencing results of 16S rDNA DGGE fragments

编号 No.	处理 Treatment	与 NCBI 数据库最相近序列 Similar sequence in NCBI	相似度 Similarity/%	序列号 Accession No.
a	CK ₂	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	86	FJ499356.1
b	CK ₂	Bacterium enrichment culture DGGE band D6 genomic sequence	85	GU270493.1
c	CK ₂	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91	GQ996402.1
d	C ₃	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97	FJ499356.1
e	CK ₁	<i>Lysobacter</i> sp. Zs60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	JQ977478.1
f	CK ₂	Uncultured soil bacterium clone 1_A5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	EU589251.1
g	C ₁	Uncultured <i>Steroidobacter</i> sp. clone R4C_062_27F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	KC785932.1
h	C ₄	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	FJ499343.1
i	CK ₂	Bacterium enrichment culture DGGE band D6 genomic sequence	92	GU270493.1
j	CK ₁	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	FJ499343.1
k	C ₁	Bacterium enrichment culture DGGE band D6 genomic sequence	85	GU270493.1
l	CK ₂	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	FJ499343.1
m	C ₂	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	FJ499343.1

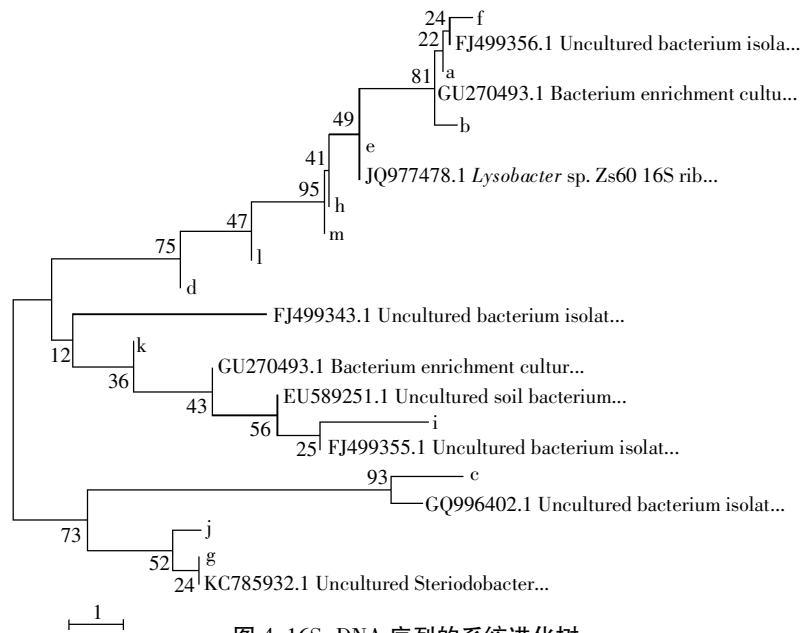


图 4 16S rDNA 序列的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic relationship of 16S rDNA sequences

生活的种类可以进行固氮,其中 e 条带为 *Lysobacter* 溶杆菌属,是一种潜在的生防菌。C₃、C₄ 处理增加的条带 p、q、r 及其他条带代表的细菌均未分类。

3 讨论

普遍认为生物炭中所含的碳多数是土壤微生物难以直接利用的,但是通过施用生物炭可以改变土壤理化性质,且生物炭的多孔性及表面特性也能够为微生物生存提供附着位点和空间^[13],另外,生物炭中也含有少量易氧化分解的有机碳,能够为微生物生存提供碳源。因此,土壤添加生物炭后可能对土壤微生物

生长、发育和繁殖或多或少地产生影响^[14-15]。Kolb 等^[16]研究发现生物炭施用能够长期地提高土壤微生物数量。Ameloot 等^[17]研究表明施用生物炭显著增加土壤微生物量碳,且土壤微生物群落结构变得更为复杂,革兰氏阴性菌和阳性菌数量均显著增多。Doan 等^[18]在施用化学肥料和生物有机肥的土壤中添加生物炭,发现土壤细菌数量、群落结构多样性(Shannon)指数和丰富度指数均显著增加。本研究也发现施用生物炭后,土壤细菌 DGGE 图谱条带数增多,表明生物炭施用促进了某类细菌的生长,但同时发现土壤细菌群落结构多样性指数和均匀度下降。推测认为生物炭施用

在一定程度上改善了土壤微环境,为某类细菌生长提供有利条件,引起细菌群落个体大小或数量差异增大,群落均匀度降低,进而导致多样性指数减小,Marluthi 等^[9]和 Hamer 等^[19]研究中也发现类似的现象。

已有研究表明,土壤中添加生物炭后,细菌的群落组成会发生变化^[20-21],在添加黑炭和生物炭的土壤中,细菌群落组成成分显著多于未添加的土壤^[7-22]。Grossman 等^[20]用 DGGE 的方法研究了亚马逊黑土土壤细菌和古菌的种群结构,表明亚马逊黑土(Terra preta)土壤细菌和古菌的种群结构与相邻未改造土相比有 90%以上的群落存在差异,但三种黑土土壤细菌群落组成表现出很高的相似性。Jin^[23]研究表明,在玉米的根际土壤和非根际土壤中,添加生物炭,土壤细菌群落组分变异度增加,且高量施用生物炭(12~30 t·hm⁻²)处理的根际土壤细菌群落组分与低量(1 t·hm⁻²)施用或未施用生物炭处理的非根际土壤细菌群落组分差异最大。本研究发现施用生物炭引起了土壤细菌群落组分发生了变异,再次印证了上述研究结论。但值得说明的是,只是引起少数菌群结构发生了变异,并未引起大幅度的变化,一定程度上维持了原有土壤细菌群落结构。

由土壤细菌 DGGE-cloning 测序结果判断,施用生物炭促进了土壤某类细菌的生长,但也抑制了某类原有细菌的生长,如溶杆菌属 *Lysobacte*, 变形菌门(*Proteobacteria*)的细菌,这与 Kolton 等^[24]研究结果一致。溶杆菌(*Lysobacte*)具有滑移性^[25],该属细菌首次于 1973 年报道,1978 年命名^[26],广泛存在于水体、土壤和海绵中,具有良好的定殖活性,对许多植物病原菌、水藻以及线虫等都有很强的拮抗作用,是一类具有极大生防潜力的生防菌^[27]。Steinbeiss 等^[28]利用磷脂脂肪酸法研究发现来源于酵母的生物炭能促进真菌生长,而源于葡萄糖的生物炭仅促进革兰氏阴性细菌的生长。Anderson 等^[5]研究发现,施用生物炭后土壤酸热菌(*Acidothermaceae*)、纤维素单胞菌(*Cellulomonadaceae*)、芽球菌(*Geodermatophilaceae*)和微杆菌(*Microbacteriaceae*)数量增加,而红色杆菌(*Conexibacteraceae*)、微球菌(*Micrococcaceae*)、微单胞菌(*Micromonosporaceae*)、类诺卡氏科(*Nocardoidaceae*)和链霉菌(*Streptomyetaceae*)数量减少。这可能与土壤微环境改善、养分有效性提高^[29-30]及生物炭携带碳源等因素有关^[31-32]。土壤中有些微生物可以把生物炭中的可溶性碳及易氧化碳作为生存的碳源,生物炭中所含的部分矿物质也能被微生物所利用^[33],因此,土壤

中加入生物炭后会促进某类群微生物的生长^[19]。另外,生物炭中也含有一些对微生物有害的物质,如乙烯^[10]、高盐类物质^[34]和重金属^[35]等能够抑制其生长^[36-37],当然,其具体作用机制仍待进一步深入研究。

4 结论

施用生物炭增加了土壤细菌 DGGE 图谱条数,促进土壤某类细菌的生长,菌群结构的差异变大,导致土壤细菌群落结构多样性指数和均匀度下降;随生物炭施用量的增加,土壤菌群组分与未施用生物炭的土壤菌群组分相似度呈降低趋势,表明施用生物炭改变了土壤原有细菌群落组分;施用生物炭引起土壤细菌种群结构发生变异,不仅增加了一些特异细菌种类,而且抑制了原有土壤细菌的生长。

参考文献:

- [1] 殷大伟. 生物炭改良白浆土的初步研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2013.
YIN Da-wei. Preliminary study on the improvement of albic soil by using biochar[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2013.
- [2] 张晗芝, 黄云, 刘钢, 等. 生物炭对玉米苗期生长、养分吸收及土壤化学性状的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(11): 2713-2717.
ZHANG Han-zhi, HUANG Yu, LIU Gang, et al. Effects of biochar on corn growth, nutrient uptake and soil chemical properties in seeding stage[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(11): 2713-2717.
- [3] 张振宇. 生物炭对稻田土壤镉生物有效性的影响研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2013.
ZHANG Zhen-yu. Effect of biochar on cadmium bio-availability in paddy soil[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2013.
- [4] Smith J L, Collins H P, Bailey V L. The effect of young biochar on soil respiration[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42(12): 2345-2347.
- [5] Anderson C R, Condron L M, Clough T J, et al. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus[J]. *Pedobiologia-International Journal of Soil Biology*, 2011, 54(516): 309-320.
- [6] Ducey James T F, Ippolitob A, Cantrell K B, et al. Addition of activated switch grass biochar to an aridic subsoil increases microbial nitrogen cycling gene abundances[J]. *Applied Soil Ecology*, 2013(65): 65-72.
- [7] O'Neill B, Grossman J, Tsai M T, et al. Bacterial community composition in Brazilian Anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification[J]. *Microbial Ecology*, 2009, 58(1): 23-35.
- [8] 陈伟, 束怀瑞. 施肥对平邑甜茶根际微生物的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(2): 328-333.
CHEN Wei, SHU Huai-rui. Effects of fertilization on rhizosphere microorganisms of *Malus hupehensis* Rehd[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2008, 14(2): 328-333.
- [9] Marluthi S, Lehmann J, Kuyper J W, et al. Biochar: Impact on soil microbial ecology[C]. Poster presented at UK Biochar Research Centre's 2nd Annual Biochar Workshop, Rothamsted. April, 2009.

- [10] Spokas K A, Baker J M, Reicosky D C. Ethylene: Potential key for biochar amendment impacts[J]. *Plant and Soil*, 2010, 333(112):443–452.
- [11] Castaldi S, Riondino M, Baronti S, et al. Impact of biochar application to a Mediterranean wheat crop on soil microbial activity and greenhouse gas fluxes[J]. *Chemosphere*, 2011, 85(9):1464–1471.
- [12] Pietikainen J, Kiikkila O, Fritze H, et al. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus[J]. *Oikos*, 2000, 89:231–242.
- [13] 李力, 刘娅, 陆宇超, 等. 生物炭的环境效应及其应用的研究进展[J]. *环境化学*, 2011, 30(8):1411–1421.
LI Li, LIU Ya, LU Yu-chao, et al. Review on environmental effects and applications of biochar [J]. *Environmental Chemistry*, 2011, 30(8):1411–1421.
- [14] Khodadad C L M, Zimmerman A R, Green S J, et al. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(2):385–392.
- [15] Dempster D N, Gleeson D B, Solaiman Z M, et al. Decreased soil microbial biomass and nitrogen mineralisation with *Eucalyptus* biochar addition to a coarse textured soil[J]. *Plant and Soil*, 2012, 354(6):311–324.
- [16] Kolb S E, Fermanich K J, Dornbush M, et al. Effect of charcoal quantity on microbial biomass and activity in temperate soils[J]. *Soil Science Society of American Journal*, 2009, 73(4):1173–1181.
- [17] Ameloot N, Graber E R, Verheijen F G A, et al. Interactions between biochar stability and soil organisms: Review and research needs [J]. *Eur J Soil Sci*, 2013, 64(4):379–390.
- [18] Doan T T, Bouviera C, Bettarel Y, et al. Influence of buffalo manure, compost, vermicompost and biochar amendments on bacterial and viral communities in soil and adjacent aquatic systems[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 73:78–86.
- [19] Hamer U, Marschner B, Brodowski S, et al. Interactive priming of black carbon and glucose mineralization[J]. *Organic Geochemistry*, 2004, 35(7):823–830.
- [20] Grossman J, O'Neill B E, Tsai S M, et al. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60:192–205.
- [21] Khodadad C L M, Zimmerman A R, Green S J, et al. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43:385–392.
- [22] Kim J S, Sparovek G, Longo R M, et al. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the western amazon[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(2):684–690.
- [23] Jin H. Characterization of microbial life colonizing biochar and biochar-amended soils[D]. Ithaca: Cornell University, 2010.
- [24] Kolton M, Graber E R, Harel Y M, et al. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(14):4924–4930.
- [25] 姬广海, 魏兰芳, 吴亚鹏. 一种新型生防细菌菌株 13-1 鉴定及其生物学特性[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(7):974–980.
- JI Guang-hai, WEI Lan-fang, WU Ya-peng. Identification and biological characteristics on a novel strain 13-1 from rhizosphere of *amorphophallus konjac*[J]. *Institute of Microbiology*, 2009, 36(7):974–980.
- [26] 王斐斐, 武坤毅, 郭玲, 等. 溶杆菌属 *Lysobacter yanansis* sp. nov. 胞内外蛋白双向电泳条件优化及图谱建立[J]. *生物技术通报*, 2013(4):140–146.
WANG Fei-fei, WU Kun-yi, GUO Ling, et al. Optimization and construction of the intracellular and extracellular proteomic map of *Lysobacter yanansis* sp. nov[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(4):140–146.
- [27] Postma J, Stevens L H, Wiegiers G L, et al. Biological control of *Pythium aphanidermatum* in cucumber with a combined application of *Lysobacter enzymogenes* strain 3. 1 T8 and chitosan[J]. *Biological Control*, 2009, 48(3):301–309.
- [28] Steinbeiss S, Gleixner G, Antonietti M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(6):1301–1310.
- [29] Glaser B, Lehmann J, Zech W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with biochar a review [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 35(4):219–230.
- [30] 韩光明, 孟军, 曹婷, 等. 生物炭对菠菜根际微生物及土壤理化性质的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2012, 43(5):515–520.
HAN Guang-ming, MENG Jun, CAO Ting, et al. Effect of biochar on microorganisms quantities and soil physicochemical property in rhizosphere of spinach[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2012, 43(5):515–520.
- [31] Singh B P, Hatton B J, Singh B, et al. Influence of biochars on nitrous oxide emission and nitrogen leaching from two contrasting soils [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2010, 39:1224–1235.
- [32] 孙大荃, 孟军, 张伟明, 等. 生物炭对棕壤大豆根际微生物的影响 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2011(5):521–526.
SUN Da-quan, MENG Jun, ZHANG Wei-ming, et al. Effect of biochar on soybean rhizosphere microbes from brown earth soil[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2011(5):521–526.
- [33] Leinweber P, Kruse J, Walley F L, et al. Nitrogen K-edge XANES: An overview of reference compounds used to identify “unknown” organic nitrogen in environmental samples[J]. *Journal of Synchrotron Radiation*, 2007, 14:500–511.
- [34] Killham K, Firestone M K. Salt stress control of intracellular solutes in streptomycetes indigenous to saline soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47(2):301–306.
- [35] Killham K, Firestone M K. Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions[J]. *Plant and Soil*, 1983, 72(1):39–48.
- [36] Birk J J, Steiner C, Teixeira W C, et al. Microbial response to charcoal amendments and fertilization of a highly weathered tropical soil[J]. *A Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision*, 2009:309–324.
- [37] Warnock D D, Mummey D L, McBride B, et al. Influences of non-herbaceous biochar on arbuscular mycorrhizal fungal abundances in roots and soils: Results from growth-chamber and field experiments [J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 46:450–456.