

ICS 13.080.01  
CCS B10

T/SSSC

中国土壤学会团体标准

T/SSSC 0 —2026

## 旱地农田黑土健康评价方法

Soil health assessment methodology for upland black soil

2026-XX-XX 发布

2026-XX-XX 实施

中国土壤学会 发布

# 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	2
4 土壤健康评价流程 .....	2
5 田间调查与样本采集 .....	3
5.1 样点布设与田间调查 .....	3
5.2 土壤样品采集 .....	3
5.3 样品前处理与保存 .....	3
6 土壤健康评价备选指标确定 .....	4
7. 指标测定 .....	4
7.1 土壤物理指标 .....	4
7.2 土壤化学指标 .....	5
7.3 土壤生物指标 .....	5
8. 最小数据集指标筛选 .....	6
8.1 主成分分析 .....	6
8.2 综合载荷计算 .....	6
8.3 相关性分析 .....	7
8.4 旱地农田黑土健康最小数据集 .....	7
9 土壤健康指数计算 .....	7
9.1 指标赋分 .....	7
9.1.1 评分函数类型确定 .....	7
9.1.2 评分函数建立 .....	9
9.2 土壤健康指数计算 .....	9
9.3 土壤健康等级划分 .....	10
9.4 土壤健康评价报告 .....	10
附录 A 土壤质地的测定 .....	12
附录 B 脲酶活性的测定 .....	13
附录 C 固氮酶活性的测定 .....	14
附录 D 反硝化酶活性的测定 .....	15
附录 E 细菌、真菌及原生生物的 $\alpha$ -多样性指数(Shannon index, Chao1 richness)与 $\beta$ -多样性(即 NMDS1 值)的测定与计算 .....	16
参考文献 .....	18

# 前言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国科学院生态环境研究中心提出。

本文件由中国土壤学会归口。

本文件起草单位：中国科学院生态环境研究中心、中国科学院东北地理与农业生态研究所、中国科学院南京土壤研究所。

本文件主要起草人：张丽梅、贾仲君、田春杰、张佳宝、韩丽丽、宋晓桐、乔敏、陈卫平、刘四义、黄斯韵、张雅博、丁龙君、朱永官。

# 旱地农田黑土健康评价方法

## 1 范围

本文件描述了旱地农田黑土健康评价总则和流程、田间调查与样本采集、土壤健康评价指标测定和筛选、土壤健康指数计算等内容。

本文件适用于旱地农田黑土的自然健康评价、障碍因子识别与土壤健康管理。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 32720 土壤微生物呼吸的实验室测定方法

GB/T 39228 土壤微生物生物量的测定 熏蒸提取法

GB/T 41223 土壤质量 硝化作用潜势的测定和硝化作用的抑制 氧化铵快速试验

GB/T 42487 土壤质量 土壤硝态氮、亚硝态氮和铵态氮的测定 氯化钾溶液浸提手工分析法

HJ 613 土壤 干物质和水分的测定 重量法

HJ 704 土壤 有效磷的测定 碳酸氢钠浸提-钼锑抗分光光度法

HJ 802 土壤 电导率的测定 电极法

HJ 889 土壤 阳离子交换量的测定 三氯化六氨合钴浸提-分光光度法

HJ 962 土壤 pH 值的测定 电位法

HJ 974 土壤和沉积物 11 种元素的测定 碱熔-电感耦合等离子体发射光谱法

NY/T 296 土壤全量钙、镁、钠的测定

NY/T 889 土壤速效钾和缓效钾含量的测定

NY/T 1121.1 土壤检测 第一部分：土壤样品的采集、处理和贮存

NY/T 1121.4 土壤检测 第 4 部分：土壤容重的测定

NY/T 1121.22 土壤检测 第 22 部分：土壤田间持水量的测定-环刀法

T/NAIA 012 土壤磷酸酶活性的测定 磷酸苯二钠比色法

T/NAIA 0280 土壤中全磷、全钾及氟化物的测定 氢氧化钠熔融法

T/JAASS 144 土壤微生物胞外酶活性测定 荧光法

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

##### **黑土 Black soil**

黑土是指以黑色或暗黑色腐殖质表土层为标志、具有高有机碳含量的土壤。本标准中的黑土泛指我国东北黑土区分布的以黑色或暗黑色腐殖质表土层为特征、富含有机碳的土壤，即包括在该区域分布的典型黑土和其他土壤类型。

#### 3.2

##### **土壤健康 Soil health**

土壤健康是指土壤作为一个动态生命系统持续维持植物、动物和人类生命活动功能的能力。

本标准中土壤健康评价主要针对**土壤自然健康（Soil attribute health）**而言，指在现有土地利用和管理背景下，由土壤固有的物理、化学和生物等自然属性所体现的土壤健康状况，不包括对人为耕作和管理等的评价。

### 4 土壤健康评价流程

土壤健康评价流程包括以下 4 个环节：（1）土样采集，根据评价区域面积，确定田间取样布点方案，样点布设兼顾代表性和经济可行性，采用统一方法，在同一时间段完成样品采集与保存；

（2）指标筛选，采样统一方法测定土壤物理、化学和生物学指标，获取备选指标数据集。参考康奈尔土壤健康评价体系（Comprehensive Assessment of Soil Health, CASH），采用主成分分析结合综合

载荷值和相关性分析，筛选建立最小数据集；（3）指标赋分与整合，采用累积概率分布函数，对指标测定值进行标准化并赋分，进一步计算各指标得分均值，得到土壤健康指数；（4）验证与优化：综合专家意见与用户对评价结果的满意度和意见反馈，对最小数据集指标选取及评分函数进行修订，并对土壤健康指数进行迭代计算与优化。流程图如下：

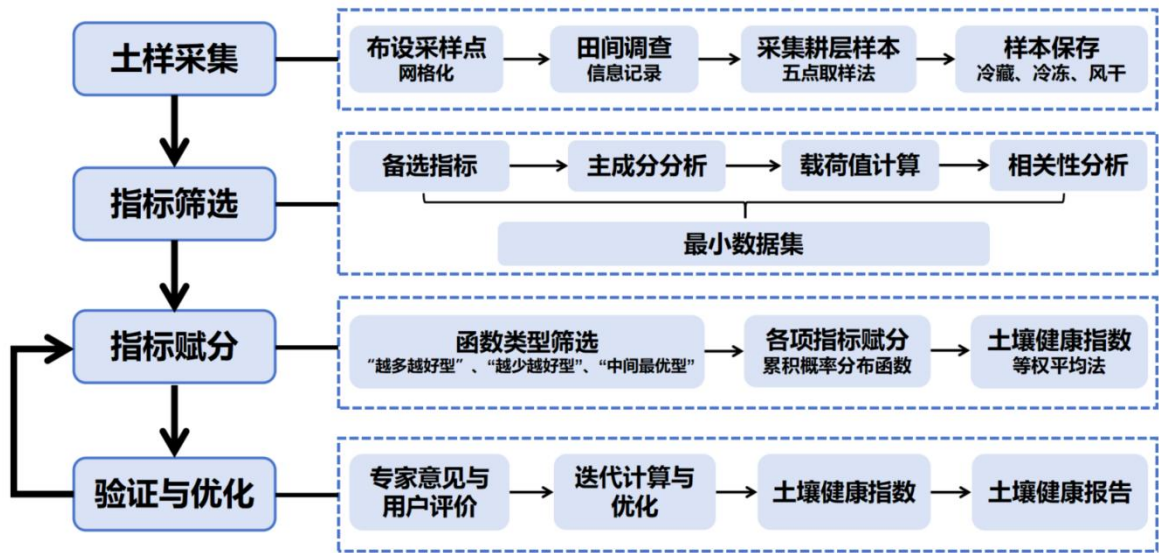


图 1 旱地农田黑土健康评价流程

## 5 田间调查与样本采集

### 5.1 样点布设与田间调查

采取 40×40 km 网格化布点，网格尽量覆盖不同乡镇，每个网格根据作物类型分布选取 6-9 个样点，每个样点间相距 3-5 km 千米左右，保证每种作物类型有 4 个以上田块重复。记录样点地理信息（包括经纬度、海拔、坡度等）、土壤类型、作物类型、长势、病害情况等，并向当地农户了解施肥和耕作管理、种植历史等信息。

### 5.2 土壤样品采集

土壤样品采集于作物旺盛生长期（8 月中旬）进行。采用五点采样法，于作物行内两株作物之间采集土壤样本，取样深度统一为 15 cm。（对于土壤采集的技术细节，可参考 NY/T 1121.1 的规定执行）

### 5.3 样品前处理与保存

样品经去除可见根系和石砾、过 2 mm 筛后，分装为三份：一份（约 500 g）于 4℃冷藏，供土壤理化和生物性质测定；一份（约 100 g）于 -80℃或 -20℃冰箱保存（如在 -20℃下保存，但建议相关分析在 6 个月内完成），用于 DNA 提取；其余部分（约 200 g）进行风干保存。

### 6 土壤健康评价备选指标确定

参考康奈尔土壤健康评价体系（CASH）、相关文献并结合专家意见，本标准确定土壤健康评价备选指标共 46 项（表 1）。

表 1 旱地农田黑土健康评价备选指标

指标属性	具体指标
物理	容重、田间持水量、质地（粘粒、粉粒、砂粒含量）、电导率
化学	酸碱度、总碳、有机碳、总氮、碳氮比、可溶性有机氮、可溶性有机碳、铵态氮、硝态氮、阳离子交换量、微量元素含量（铁、镁、铝、钙、钠、锰）、总磷、总钾、有效磷、速效钾
生物	微生物量碳、微生物量氮、微生物量碳氮比、基础呼吸速率、呼吸熵、土壤酶活性（β-葡萄糖苷酶活性、磷酸酶活性、脲酶活性、固氮酶活性）、硝化潜势、反硝化潜势、细菌、真菌及原生生物群落的α-多样性指数（Shannon、Chao1）、β-多样性（NMDS1）

注：在样本量较大的情况下，首先选择约 15%的代表性样品进行 46 项指标的分析测定，通过主成分分析、相关分析并结合文献资料整理，初步筛选出了 32 项指标（表 1 中加黑指标）。在此基础上，扩大样本量，对约 50%的样品进行 32 项指标的分析测定，进一步通过主成分分析和相关分析等，结合专家咨询决策，最终筛选出最小数据集指标用于土壤健康评价。

### 7. 指标测定

#### 7.1 土壤物理指标

土壤物理指标包括容重、田间持水量、电导率、土壤质地（粘粒、粉粒与砂粒含量），共 4 项。容重测定按 NY/T 1121.4，田间持水量测定按 NY/T 1121.22，电导率按 HJ 802，土壤质地测定按附录 A 的规定执行。

## 7.2 土壤化学指标

土壤化学指标包括酸碱度、总碳、有机碳、总氮、碳氮比、铵态氮、硝态氮、阳离子交换量、铁、镁、铝、钙、钠、锰元素含量、总磷、总钾、速效磷、速效钾，共 19 项。土壤酸碱度测定按 HJ 962，机碳含量按《土壤中有机碳的测定 燃烧法》（征求意见稿）的规定执行，土壤总碳、总氮含量按《土壤中总碳和有机质的测定 元素分析仪法》（征求意见稿）的规定执行。碳氮比按公式（1）计算。

$$C/N = \frac{TC}{TN} \quad (1)$$

式中：

C/N——土壤碳氮比；

TC——土壤总碳含量，单位为克每千克（g kg<sup>-1</sup>）；

TN——土壤总氮含量，单位为克每千克（g kg<sup>-1</sup>）。

土壤铵态氮、硝态氮含量测定按 GB/T 42487 的规定执行，阳离子交换量按 HJ 889，铁、镁、铝、钙、锰元素含量按 HJ 974，钠含量按 NY/T 296，总磷与总钾含量按 T/NAIA 0280，速效磷含量按 HJ 704，速效钾含量按 NY/T 889 的规定执行。

## 7.3 土壤生物指标

土壤生物指标包括微生物量碳、微生物量氮、微生物量碳氮比、基础呼吸速率、呼吸熵、β-葡萄糖苷酶活性、磷酸酶活性、脲酶活性、固氮酶活性、反硝化酶活性、硝化潜势、细菌、真菌及原生生物的α-多样性指数（Shannon、Chao1）和β-多样性（NMDS1）共 20 项。

微生物量碳（MBC）、微生物量氮（MBN）测定按 GB/T 39228 的规定执行，土壤基础呼吸速率（SBR）按 GB/T 32720 的规定执行。微生物量碳氮比按公式（2）计算，呼吸熵（qCO<sub>2</sub>）按公式（3）计算。

$$MBC/MBN = \frac{MBC}{MBN} \quad (2)$$

式中：



MBC/MBN——微生物量碳氮比；

MBC——土壤微生物碳含量，单位为毫克每千克（ $\text{mg kg}^{-1}$ ）；

MBN——土壤微生物氮含量，单位为毫克每千克（ $\text{mg kg}^{-1}$ ）。

$$q\text{CO}_2 = \text{SBR}/\text{MBC} \quad (3)$$

式中：

$q\text{CO}_2$ ——呼吸熵，单位为微克每毫克每小时（ $\mu\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ）

SBR——土壤基础呼吸速率，单位为微克每千克每小时（ $\mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ）；

MBC——土壤微生物碳，单位为毫克每千克（ $\text{mg kg}^{-1}$ ）。

$\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定按 T/JAASS 144 的规定执行，磷酸酶活性测定按 T/NAIA 012，脲酶活性测定按附录 B 的规定执行，固氮酶活性的测定按附录 C 的规定执行，反硝化酶活性的测定按附录 D 的规定执行，硝化潜势按 GB/T 41223 的规定执行。

细菌、真菌及原生生物的 $\alpha$ -多样性指数（Shannon、Chao1）和 $\beta$ -多样性（NMDS1）测定按附录 E 的规定执行。

## 8. 最小数据集指标筛选

### 8.1 主成分分析

对上述指标数据做主成分分析，提取特征值 $\geq 1$ 的主成分。统计各指标在每个主成分上的载荷，选出载荷绝对值 $\geq 0.5$ 的指标，纳入后续分析。

### 8.2 综合载荷计算

通过计算各指标在所有主成分上的综合载荷（公式（4）），以表征指标在主成分多维空间中的信息贡献度。综合载荷值越大，表明该指标的信息量越全面。据此，选取综合载荷值最大的前 40% 的指标，构建最小数据集。

$$N_{ik} = \sqrt{\sum_{i=1}^k (U_{ik}^2 \lambda_k)} \quad (4)$$

式中：

Nik——第 i 个变量在特征值≥1 的前 k 个主成分上的综合载荷值；

Uik——第 i 个变量在第 k 个主成分上的载荷；

Λk——第 k 个主成分的特征值。

8.3 相关性分析

分析综合载荷前 40%指标间的相关性，并剔除与综合载荷值最大值指标相关度大于 0.6 的指标，最终从各主成分中确定一组非冗余核心指标，构成最小数据集。

8.4 旱地农田黑土健康最小数据集

经过上述分析，筛选出 13 项土壤健康评价最小数据集指标，包括容重、田间持水量、电导率、酸碱度、有机碳、全氮、可溶性有机碳、可溶性有机氮、微生物量碳、微生物量氮、微生物量碳氮比、呼吸速率和呼吸熵。结合专家意见咨询和决策，最终确定 10 项指标纳入旱地农田黑土健康评价最小数据集。

表 2 旱地农田黑土健康评价最小数据集指标

属性	具体指标
物理	容重
	田间持水量
	粘粒含量
	砂粒含量
	电导率
化学	酸碱度
	有机碳含量
生物	微生物量碳
	基础呼吸速率
	呼吸熵

9 土壤健康指数计算

9.1 指标赋分

9.1.1 评分函数类型确定

参考康奈尔土壤健康评价体系（CASH）、相关文献并结合专家意见，确定每个指标的函数类型，即“越多越好型”、“越少越好型”或“中间最优型”（图2）。

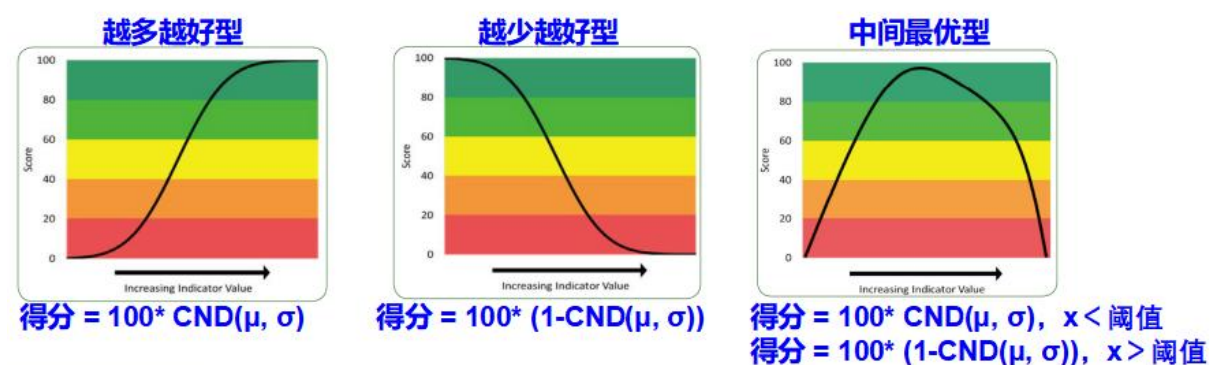


图2 旱地农田黑土健康评价指标评分函数类型

表3 旱地农田黑土健康最小数据集指标评分函数类型

土壤健康指标	评分函数类型	公式
<b>物理指标</b>		
容重	中间最优型	得分 = 100* CND( $\mu$ , $\sigma$ ), $x < \text{阈值}$ ; 得分 = 100* [1-CND( $\mu$ , $\sigma$ )], $x > \text{阈值}$
田间持水量	越多越好	得分 = 100* CND( $\mu$ , $\sigma$ )
粘粒含量 (< 40%)	越多越好	得分 = 100* CND( $\mu$ , $\sigma$ )
粘粒含量 (> 40%)	越少越好	得分 = 100* [1-CND( $\mu$ , $\sigma$ )]
砂粒含量	越少越好	得分 = 100* [1-CND( $\mu$ , $\sigma$ )]
电导率 < 200 us · cm <sup>-1</sup>	越多越好	得分 = 100* CND( $\mu$ , $\sigma$ )
电导率 > 200 us · cm <sup>-1</sup>	越少越好	得分 = 100* [1-CND( $\mu$ , $\sigma$ )]
<b>化学指标</b>		
酸碱度	中间最优型	得分 = 100* CND( $\mu$ , $\sigma$ ), $x < \text{阈值}$ ; 得分 = 100* [1-CND( $\mu$ , $\sigma$ )], $x > \text{阈值}$
有机碳含量	越多越好	得分 = 100* CND( $\mu$ , $\sigma$ )
<b>生物指标</b>		
微生物量碳	越多越好	得分 = 100* CND( $\mu$ , $\sigma$ )
基础呼吸速率	越多越好	得分 = 100* CND( $\mu$ , $\sigma$ )

### 9.1.2 评分函数建立

获取每个指标全部测定数据的高斯分布参数（平均值和标准差），根据上述确定的评分函数类型（即“越多越好型”、“越少越好型”、“中间最优型”），以得到各指标的累积概率分布函数（Cumulative Normal Distribution, CND）（公式（5）），观测值对应的概率值（ $p$ ）乘以 100 即为无量纲赋值。

$$p=f(x, \mu, \sigma)=\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}}\int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}dx \quad (5)$$

式中：

$p$ （介于 0 到 1）——观测变量值  $x$  落在区间内  $(+\infty, -\infty)$  某一位置的概率值；

$\mu$ ——指标平均值；

$\sigma$ ——为指标标准差。

### 9.2 土壤健康指数计算

采用等权重计算土壤健康指数（Soil health index），即各指标得分均值为土壤健康指数。即采样公式（6）

*Soil health index* =

$$\frac{\sum (Score_{BD} + Score_{WHC} + Score_{clay} + Score_{sand} + Score_{EC} + Score_{pH} + Score_{SOC} + Score_{MBC} + Score_{Resp} + Score_{qCO2})}{10} \quad (6)$$

式中：

Soil health index——土壤健康指数；

Score<sub>BD</sub>——土壤容重得分；

Score<sub>WHC</sub>——土壤田间持水量得分；

Score<sub>Clay</sub>——土壤黏粒含量得分；

Score<sub>Sand</sub>——土壤砂粒含量得分；

Score<sub>EC</sub>——土壤电导率得分；

Score<sub>pH</sub>——土壤酸碱度得分；

Score<sub>SOC</sub>——土壤有机碳含量得分；

Score<sub>MBC</sub>——土壤微生物量碳得分；

Score<sub>Resp</sub>——土壤基础呼吸速率得分；

Score<sub>qCO<sub>2</sub></sub>——土壤呼吸熵得分。

邀请专家和农户对土壤健康评价的初步结果进行评议，根据其反馈意见，对最小数据集指标选取及评分函数进行针对性修订，并对土壤健康指数进行迭代计算。

9.3 土壤健康等级划分

根据全部样本的土壤健康指数分布情况，对土壤综合健康状况给予定性评级（等级从低到高分别为：十级、九级、八级、七级、六级、五级、四级、三级、二级、一级）。

表 4 土壤健康等级划分表

土壤健康指数	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
等级	十级	九级	八级	七级	六级	五级	四级	三级	二级	一级

9.4 土壤健康评价报告

土壤健康评价报告包含各土壤健康指标的测量值和赋分值，以及土壤健康综合指数和等级，以便于农田管理者理解。具体说来，包含以下 3 部分内容：

（1）土壤背景信息栏：包括农场名、联系方式、土样编号、采样日期、作物类型、耕作方式、排水状况、农田地表坡度和土壤质地等信息；

（2）土壤健康指标栏：包括测定的土壤健康指标的名称、土壤健康指标测定值、土壤健康指标分值（0~40 分为低分值，40~60 分为中分值，60~100 分为高分值）、低分值指标反映的土壤受限功能、土壤健康指标值对应的累积频率；

（3）土壤健康状况综合评价栏：包括土壤健康总分和土壤健康等级。

土壤健康报告示例如下。

表 5 土壤健康报告示例

土壤健康报告				
<b>编号：DA21Z028-②</b> <b>地点：</b> 通榆县新兴乡 G1015 铁科高速林水村 <b>经纬度：</b> 122.747474, 44.835123 <b>海拔：</b> 160 m <b>坡度：</b> <2° <b>土壤类型：</b> 深位苏打盐化碱土 <b>土壤质地：</b> 粘粒 5.7%，粉粒 13.4%，砂粒 80.8% Loamy sand <b>作物：</b> 玉米 <b>田间观察情况：</b> 沙土，土壤较干。 <b>土壤健康状况：</b> 土壤化学、物理、生物性质均存在限制因子，主要为土壤肥力低、作物养分供应能力差、保水性差、生物活性低。	土壤健康指标	测量值	赋分值（百分制）	土壤受限功能
	物理指标			
	容重(g/cm <sup>3</sup> )	1.39	82	土壤通气、入渗、根系生长
	田间持水量 (%)	28.06	51	土壤保水性
	粘粒含量(%)	5.72	38	土壤结构稳定性
	砂粒含量(%)	69.85	0	土壤结构稳定性
	电导率(μm/cm)	79.56	33	
	化学指标			
	酸碱度	8.66	10	碱胁迫与作物营养有效性
	有机碳(g/kg)	5.74	8	
	生物指标			
	微生物量碳(mg/kg)	80.29	20	土壤生物活性
	土壤呼吸速率 (pmol/g*s)	1.15	39	土壤生物活性
	呼吸熵(pmol/g*h)	6.17	16	土壤生物活性（碳利用效率低）
	<b>土壤健康总分</b>	—	<b>29.7</b>	<b>八级（低）健康程度</b>

## 附录 A 土壤质地的测定

采用激光粒度分析法对土壤质地进行测定。

称取 0.5 g 风干样品于 100 ml 小烧杯中，加入 10 ml 10% 双氧水，置于电炉上加热，加热过程中不断用水冲洗烧杯壁，防止烧干，加热至混合液变清没有细小泡沫，以除去样品中的有机质，然后加入 10 ml 10% 盐酸加热至沸腾，以除去样品中的碳酸盐。从电炉上取下小烧杯，排放整齐后注满去离子水，静置浸泡 12h 后，将上清液小心抽取，抽至保留约 10 ml，最后加入 10 ml 分散剂（0.05M 六偏磷酸钠溶液），置于超声波振荡器 2~8 min，以形成高分散的颗粒悬浮液，通过激光粒度仪（Mastersizer 2000, Malvern, USA）分析各粒级百分含量、粒度累积曲线及平均粒径、中值粒径、标准偏差（SD）、偏度（SK）、尖度（Kg）等粒度参数，三次平行分析误差低于 2 %。

粒径分级：粒径小于 2 $\mu$ m 的土壤颗粒划分为粘粒；粒径介于 2 $\mu$ m 与 50 $\mu$ m 的土壤颗粒划分为粉粒；粒径大于 50 $\mu$ m 的土壤颗粒划分为砂粒。粘粒、粉粒与砂粒含量的单位为百分比（%）。

## 附录 B 脲酶活性的测定

利用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定土壤脲酶活性。

取 5 g 鲜土或 10 g 干土，置于 50 mL 三角瓶中，加入 1 mL 甲苯。15 min 后加 10 mL 10 % 尿素液和 20 mL pH 6.7 柠檬酸盐缓冲液，摇匀后在 37℃ 恒温箱中培养 24 h。培养结束后取出培养液，过滤，取 3 mL 滤液于 50 mL 容量瓶，然后加水至 20 mL，再加 4 mL 苯酚钠溶液，仔细混合，加入 3 mL 次氯酸钠溶液，充分摇荡，放置 20 min，用水稀释至刻度，一小时之内将着色液在紫外分光光度计上于波长 578 nm 处进行比色测定，记录吸光度值。同时，设置氨浓度标准曲线、无土空白对照以及无基质空白对照。

脲酶活性按公式 (G.1) 计算。

$$\text{Ure} = \frac{(a_{\text{样本}} - a_{\text{无土对照}} - a_{\text{无基质对照}}) \times V \times n}{m}$$

式中：

Ure——脲酶活性，单位为毫克每克每天 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$ )；

a 样本——由吸光值经氨浓度标准曲线求得的样本氨浓度，单位为毫克每毫升 ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )；

a 无土对照——由吸光值经氨浓度标准曲线求得的无土对照氨浓度，单位为毫克每毫升 ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )；

a 无基质对照——由吸光值经氨浓度标准曲线求得的无基质对照氨浓度，单位为毫克每毫升 ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )；

V——显色液体积，单位为毫升 (ml)；

n——稀释倍数，无单位；

m——土壤干重，单位为克 (g)。



## 附录 C 固氮酶活性的测定

将 10 g 鲜土置于 120 ml 灭菌的血清瓶中，向瓶中加入 4 ml 葡萄糖（1mg C/g dry soil）和苹果酸钠溶液（1mg C/ g dry soil）；然后向血清瓶中加入 10 %的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>（Air : C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> = 90 : 10），于 25 °C 环境中培养 24 h。同时设置不加入土壤的空白瓶作为对照。利用气相色谱测定瓶内上空乙烯的浓度。

固氮酶活性按公式（B.1）计算。

$$V_{nif} = (c - c_0) \times 110 / (m \times 22.4)$$

式中：

$V_{nif}$ ——固氮酶活性，单位为毫摩尔每克土每天（nmol·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>）；

$c$ ——样本瓶内乙烯浓度，单位为百万分比浓度（ppm）；

$c_0$ ——空白瓶内乙烯浓度，单位为百万分比浓度（ppm）；

110——气体体积，单位为毫升（ml）；

$m$ ——土壤干重，单位为克（g）；

22.4——标准状况下气体摩尔体积，单位为摩尔每升（mol·L<sup>-1</sup>）。

## 附录 D 反硝化酶活性的测定

准确称取 5 g 鲜土于玻璃血清瓶中，加入 5 ml 蒸馏水，充分振荡混匀，用橡皮塞和铝盖密封瓶口。用针头向血清瓶内充入高纯氮气，同时在橡皮塞上插入另一根针头，整个过程持续 5 min 用以排出血清瓶中的空气。将装有 5 ml 蒸馏水的注射器插入橡皮塞内，直到无气泡产生为止，确保瓶内为一个标准大气压。向瓶内充入 10 % (V/V) 的乙炔气体 (10 ml)，充分混匀，再次调节大气压至一个标准大气压。将处理好的血清瓶置于 25 °C 避光培养 12 h，最后抽取瓶内气体，用气相色谱测定其中 N<sub>2</sub>O 气体的含量。

## 附录 E 细菌、真菌及原生生物的 $\alpha$ -多样性指数 (Shannon index, Chao1 richness) 与 $\beta$ -多样性 (即 NMDS1 值) 的测定与计算

称取 0.5 g 土壤, 使用 DNesay PowerSoil Kit (QIAGEN GmbH, Germany) 进行土壤样品中的总 DNA 的提取。使用 Nanodrop 分光光度计 (Thermoscientific, Wilmington, DE) 进行 DNA 浓度和纯度的测定。

利用 Illumina 公司的 NovaSeq PE250 平台, 采用 16S rRNA 基因 V3-V4 区的细菌群落的特异性引物 515FmodF (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') 与 806RmodR (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增获得细菌群落 (Caporaso et al.2011)。采用真菌的特异性引物 ITS7 (5'-GTGARTCATCGAATCTTTG -3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 反应扩增 (Ihrmark et al.2012) 获得真菌群落。使用 18S rRNA V4search 区的微型真核生物通用引物 TAREuk454FWD1F (5'-CCAGCASCYGC GGTAATTCC-3') 和 TAREukREV3R (5'-ACTTTTCGTTCTTGATYRA-3') 进行 PCR 扩增 (Stoeck et al.2010), 获得原生生物群落。

在 QIIME 1.9.0 软件平台使用 USEARCH (Edgar, 2010) 对原始序列进行处理。首先将引物序列及低质量 (Q score < 30) 序列的末端进行裁剪后进行合并, 并去除合并后错误值大于 0.5 的序列。用 UNIOSE3 方法去除序列中的嵌合体, 按照序列相似度 100% 进行降噪以形成“零半径 OTUs” (Zero-radius OTUs, ZOTUs) (Edgar, 2016)。结合样本的测序深度以及稀释曲线结果确定抽平序列数, 产生的 ZOTU 表进行下游分析。使用 alpha\_diversity.py 计算 $\alpha$ -多样性以获得细菌、真菌和原生生物的 Shannon 多样性指数和 Chao1 丰富度指数。在 R 语言中, 利用 vegan 包对细菌、真菌和原生生物群落进行非度量多维尺度分析 (non-metric multidimensional scaling, NMDS), 从生成的坐标矩阵中提取第一列数据, 即对应第一轴的坐标值 (即 NMDS1 值) 作为微生物群落的 $\beta$ -多样性。

多样性指数按公式 (G.1) 计算。

$$\text{Shannon index} = -\sum_{i=1}^S (p_i \times \ln p_i) \quad (\text{G.1})$$

式中：

Shannon index——多样性指数；

S——物种总数；

$p_i$ ——第  $i$  个物种的相对丰度，即第  $i$  个物种的个体数量除以所有物种的总个体数量。

丰富度估计量按公式（G.2）计算。

$$\text{Chao1 richness} = \text{Sobs} + \frac{F_1(F_1 - 1)}{2(F_2 + 1)}$$

式中：

Chao1 richness——丰富度估计量；

Sobs——物种总数；

$F_1$ ——丰度为 1 的物种数量；

$F_2$ ——丰度为 2 的物种数量。

## 参考文献

- [1] FAO. Global status of black soils[M/OL]// FAO, 2022.
  - [2] LEHMANN J, BOSSIO D A, KÖGEL-KNABNER I, et al. The concept and future prospects of soil health[J/OL]. *Nature Reviews Earth & Environment*, 2020, 1(10): 544-553. DOI:10.1038/s43017-020-0080-8.
  - [3] FINE A K, VAN ES H M, SCHINDELBECK R R. Statistics, Scoring Functions, and Regional Analysis of a Comprehensive Soil Health Database[J/OL]. *Soil Science Society of America Journal*, 2017, 81(3): 589-601.
  - [4] MOEBIUS-CLUNE B N, MOEBIUS-CLUNE B K, GUGINO O J, et al. Comprehensive Assessment of Soil Health – The Cornell Framework Manual[M/OL]// Edition 3.0. New York: Cornell University, 2016.
  - [5] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J/OL]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108: 4516-4522.
  - [6] IHRMARK K, BÖDEKER I T M, CRUZ-MARTINEZ K, et al. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities[J/OL]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 82(3): 666-677.
  - [7] STOECK T, BASS D, NEBEL M, et al. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water[J]. 2010, 19: 21-31.
  - [8] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J/OL]. *Bioinformatics* (Oxford, England), 2010, 26(19): 2460-2461.
  - [9] EDGAR R C. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing[A/OL]. *bioRxiv*, 2016: 081257.
-