

DOI: 10.11766/trxb201604210087

生物炭与氮肥对稻田甲烷产生与氧化菌数量和潜在活性的影响*

许 欣 陈 晨 熊正琴[†]

(南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏省低碳农业和温室气体减排重点实验室, 南京 210095)

摘要 基于稻田中氮肥配施生物炭的田间定位试验, 研究了施用生物炭与氮肥对旱季稻田土壤理化性质、甲烷氧化与产生潜势及甲烷氧化菌和产甲烷菌丰度的影响。田间试验共设置5个处理: 单施生物炭、单施氮肥、氮肥配施生物炭(生物炭设置两个水平)以及对照。结果表明: 施用生物炭三年后显著提高了有机碳和微生物生物量碳含量($p < 0.05$), 与单施氮肥处理相比, 氮肥配施生物炭后可显著提高土壤pH。与对照相比, 单施生物炭显著提高土壤甲烷氧化潜势。在施氮条件下, 甲烷氧化潜势与生物炭施用量之间存在正相关关系, 与氮肥配施 20 t hm^{-2} 处理相比, 40 t hm^{-2} 生物炭处理甲烷氧化潜势增长53.8%。氮肥配施高倍生物炭与配施低倍生物炭处理相比产甲烷潜势由0.001提高至 $0.002 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; 氮肥施用一定程度上抑制了甲烷氧化菌数量的增长, 单施氮肥处理中产甲烷菌数量较对照处理显著增加了3.0%; 单施或配施低水平生物炭显著增加土壤甲烷氧化菌数量。氮肥显著降低了甲烷氧化菌与产甲烷菌基因丰度比($pmoA/mcrA$)。而在同氮肥水平下施加生物炭显著增加了土壤 $pmoA/mcrA$ 比值, 即生物炭对甲烷氧化菌的促进作用显著高于产甲烷菌, 提高了旱季稻田土壤的甲烷氧化能力, 因此有助于减少稻田土壤甲烷的排放。

关键词 生物炭; 甲烷排放; 甲烷氧化菌; 产甲烷菌; 稻田

中图分类号 S154.36 **文献标识码** A

甲烷(CH_4)是全球主要的温室气体之一, 其浓度在大气中的持续增加对人类生存环境具有重要影响^[1]。我国水稻种植面积占全球水稻种植面积的23%, 稻麦轮作是主要的粮食生产方式之一^[2]。我国稻田每年约排放 7.41 Tg CH_4 ^[3], 占世界年排放总量的29.9%。为保障农业产量, 我国农田通常施用大量氮肥, 但这给土壤带来各类问题, 如土壤酸化、温室气体增排等, 从而影响农业产量及环境生态效应^[4-5]。

近年来, 生物炭作为一种重要的再利用资源一直受到人们的关注, 它可以在减少温室气体排放、增加碳汇的同时增加作物产量^[6]。有研究发现,

添加生物炭通过改善土壤理化性质来影响 CH_4 的产生和排放^[7]。也有研究报道, 生物炭可以改变产甲烷菌或甲烷氧化菌的碳源和氮源, 从而影响 CH_4 的产生或消耗, 或者吸附土壤中的水溶性有机碳从而抑制 CH_4 的排放^[8]。然而, Knoblauch等^[9]利用稻壳生物炭开展的2年连续试验发现, 稻壳炭可以在第1年促进 CH_4 的排放, 而第2年却与对照无显著性差异, 生物炭施用的时间效应有待进一步明确。Cai等^[10]提出一定量的尿素会抑制 CH_4 排放, 而Hu等^[11]则认为尿素可促进 CH_4 排放。氮肥施用对 CH_4 的排放具有重要作用, 但尚无定论。

产甲烷菌是稻田土壤中甲烷产生的唯一生物产

* 国家自然科学基金项目(41171238)和国家科技支撑计划项目(2013BAD11B01)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41471192) and the National Key Technology R & D Program of China (No. 2013BAD11B01)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zqxiong@njau.edu.cn

作者简介: 许 欣(1991—), 女, 内蒙古包头人, 硕士研究生, 主要研究方向为农田温室气体排放及相关微生物机理研究。E-mail: 2014103095@njau.edu.cn

收稿日期: 2016-04-21; 收到修改稿日期: 2016-07-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-06

生源^[12]。产甲烷菌的*mcrA*基因控制CH₄产生的最后一步^[13]，甲烷氧化菌的*pmoA*基因则是编码利用CH₄的第一个关键酶，将CH₄氧化为甲醇^[14]。因此，研究稻田CH₄排放的变化情况需进一步研究土壤中产甲烷菌与甲烷氧化菌及两种微生物的比值的变化。研究发现氮肥施用会通过影响甲烷氧化菌的群落结构从而潜在地影响CH₄氧化作用^[15]，Bronson等^[16]提出尿素会促进土壤CH₄的氧化，Ma等^[17]认为尿素施用会显著抑制产甲烷菌的生长，但有研究表明施肥可导致CH₄排放量增加^[11]。因此，研究氮肥和生物炭对稻田CH₄排放的影响，需要从CH₄产生与消耗过程相关微生物的响应机制方面进行深入研究。本试验通过研究氮肥配施生物炭三年后对旱季稻田土壤理化性质、土壤CH₄氧化和产生潜势、以及甲烷氧化菌功能基因(*pmoA*)和产甲烷菌功能基因(*mcrA*)的影响，明确氮肥配施生物炭影响旱季稻田土壤CH₄排放的作用机理，为生物炭和氮肥施用对稻田CH₄排放的影响提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

研究区位于江苏省南京市秣陵镇(31°58'N, 118°48'E)。该区属北亚热带季风气候区，年均日照2 048 h，年均气温15.7 ℃，年均降水量1 050 mm。种植制度为稻麦轮作，土壤类型为水稻土，土壤质地为粉壤土。试验开始前土壤总碳25.3 g kg⁻¹、全氮1.32 g kg⁻¹、全磷0.36 g kg⁻¹、全钾13.5 g kg⁻¹、pH5.7。

生物炭为小麦秸秆在高温(450 ℃)限氧条件下炭化所得，粒径大小为1~2 mm，含总碳467 g kg⁻¹和全氮5.6 g kg⁻¹、pH9.4、阳离子交换量24.1 cmol kg⁻¹、表面积8.9 m² g⁻¹、含灰分20.8%。

1.2 试验设计

田间试验于2012年6月—2015年6月进行，稻麦轮作，共设5个处理，即：N0B0(对照，不施生物炭和氮肥)、N0B1(单施生物炭，20 t hm⁻²生物炭)、N1B0(单施氮肥，N 250 kg hm⁻²尿素)、N1B1(20 t hm⁻²生物炭和250 kg hm⁻²尿素配施)和N1B2(40 t hm⁻²生物炭和250 kg hm⁻²尿素配施)。试验田各小区随机排列，每个小区面积为4 m×5 m，各小区具有独立灌排水系统，并用混凝土分隔。

生物炭于2012年6月翻地前一次性施入，后续不再施用。试验小区肥料管理措施及施用量与当地管理方式保持一致。每季作物移栽或播种前均一次性施用磷肥和钾肥作为基肥，分别为钙镁磷肥(以P₂O₅计)60 kg hm⁻²和氯化钾(以K₂O计)120 kg hm⁻²；每季作物施氮处理均为尿素(以N计)250 kg hm⁻²，其中基肥量为100 kg hm⁻²，两次追肥量均为75 kg hm⁻²。

1.3 样品采集与分析

供试土样于2015年6月5日小麦收割后采集，取0~20 cm表层土壤，用四分法混匀样品，取部分鲜样于冰盒中带回实验室后-80 ℃冷冻储存备用。土壤DNA提取。去杂过2 mm筛，充分混匀后一部分土壤风干用于测定土壤理化性质，另一部分鲜土保存于4 ℃，用于测定甲烷氧化和产生潜势。土壤pH按水土比2.5:1浸提后，用pH计测定；土壤中硝态氮和铵态氮利用2 mol L⁻¹ KCl按水土比5:1进行浸提，用紫外分光光度法测定；土壤有机碳(SOC)含量采用重铬酸钾容量法测定；全氮(TN)含量采用开氏法测定^[18]。微生物生物量碳(MBC)采用底物诱导呼吸法测定^[19]。

甲烷氧化潜势与产甲烷潜势均采用Zhang等^[20]提出的测定方法。取50 g(干土重)待测土样至250 ml培养瓶中，加硅橡胶塞密封。以此硅胶塞及内插玻璃管和软管口作为抽真空、充N₂及气体取样口。甲烷氧化潜势测定时，向培养瓶中加入2.5 ml纯CH₄，使瓶内CH₄的浓度在10 000 μL L⁻¹左右，参照田间实测土温置于暗箱振荡培养(120 r min⁻¹)；根据密闭培养第1天和第2天CH₄浓度的线性变化计算得到甲烷氧化潜势平均值。产甲烷潜势测定时，培养瓶经反复4次抽真空、充纯度为99.99% N₂达一个标准大气压后，参照田间实测土温置于暗箱培养；根据密闭培养1 h和50 h后瓶内CH₄浓度的变化获得CH₄产生潜势。

土壤DNA用土壤DNA快速提取试剂盒(MP Biomedicals, 美国)提取，操作步骤按照试剂盒操作说明进行。用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测所提DNA片段大小，并用超微量紫外分光光度计(ND-1000, NanoDrop Technologies, 美国)测定DNA浓度及质量。本试验选取产甲烷菌的*mcrA*基因、甲烷氧化菌的*pmoA*基因进行实时荧光定量PCR分析，反应在定量PCR仪iCycler iQ5(Bio-Rad, 美国)上进行。反应体系为20 μL，其中包含

表1 荧光实时定量PCR扩增引物及反应条件

Table 1 Amplification primer and reaction condition of quantitative PCR

目的基因 Target gene	引物 Primer	引物序列 (5'→3') Sequence	定量PCR反应程序 Thermal profile	采集信号温度 Data collection temperature	文献 References
<i>mcrA</i>	MLf	GGTGGTGTGAGATTCA	94℃预变性3 min, 94℃变性25 s,	72℃	[21]
		CACARTAYGCWACAGC	50℃退火45s, 72℃延伸60 s, 35个循环		
<i>pmoA</i>	MLr	TTCATTGCRTAGTTWGRTAGTT			
	PmoA A189f	GGNGACTGGGACTTCTGG	95℃预变性5 min, 92℃变性1 min,	72℃	[22]
	PmoAmb661r	CCGGMGCAACGTCYTTACC	55℃退火1.5min, 72℃延伸60 s, 35个循环		

注: Y=C或T; M=A或C; W=A或T; R=A或G Note: Y=C or T; M= A or C; W=A or T; R=A or G

10 μl SYBR Green (TaKaRa, 日本), 0.2 μl Rox DYEII, 1μl DNA模板, 前后引物 (10 μmol L⁻¹) 各0.4 μl, 8 μl灭菌水。各基因定量PCR分析所用的引物和反应条件见表1。

1.4 数据统计与分析

采用Excel 2010及SigmaPlot 12.5软件进行数据计算、相关性分析及图表制作, 采用JMP 9.0软件进行各处理微生物基因丰度以及理化性质的方差分析 ($\alpha = 0.05$)。

2 结 果

2.1 旱季稻田土壤理化性质

施用生物炭与氮肥三年后可增加土壤SOC及MBC, 但氮肥作用不显著。如表2所示, 与N1B0处理相比, N1B1及N1B2处理均显著提高了土壤pH ($p < 0.05$), 说明生物炭施用三年后具有减缓土壤施肥后进一步酸化的潜力。与N0B0处理相比, N0B1处理的土壤SOC含量增加了24.6% ($p < 0.05$)。与N1B0处理相比, N1B1、N1B2处理SOC含量分别显著增加了44.5%和73.2%, TN含量分别增加了12.8%和22.6% ($p < 0.05$)。与N0B1处理相比, N1B1处理土壤碳氮比显著增加14.1% ($p < 0.05$)。氮肥配施生物炭可以增高土壤MBC的含量, 并且随着生物炭施用量的增加而增加 ($p < 0.05$)。

施用氮肥也显著提高土壤铵态氮含量 ($p < 0.05$), N1B0与N1B1处理的铵态氮含量较N0B0处理分别提高了7.5%和5.6%。同一施氮水平下随

着生物炭施用量的增加, 土壤铵态氮呈现下降趋势(表2)。与N0B0处理相比, 施加氮肥与生物炭增加了土壤硝态氮含量, 但是单施生物炭处理(N0B1)处理没有显著影响, 而单施氮肥处理(N1B0)显著增加了土壤硝态氮含量。氮肥配施低倍生物炭对硝态氮无显著影响, 氮肥配施生物炭处理(N1B0、N1B1、N1B2)中, 仅N1B2处理的硝态氮含量显著高于N1B0处理 ($p < 0.05$)。

2.2 旱季稻田土壤甲烷氧化潜势与甲烷氧化菌基因丰度

施用生物炭三年后可显著增加土壤甲烷氧化潜势(图1)。与N1B0相比, N1B1处理的甲烷氧化潜势显著增加了44.4%。甲烷氧化潜势随着生物炭施用量的增加而升高, N1B2处理较N1B1处理升高了54.5%。但施加氮肥会显著减缓因施用生物炭造成的CH₄氧化能力的提高, N1B1处理与N0B1处理相比显著减少了31.6% (图1, $p < 0.05$)。土壤甲烷氧化潜势与土壤SOC、TN及MBC含量均显著正相关 ($p < 0.05$, 表3), 但与铵态氮含量呈极显著负相关 ($p < 0.01$)。甲烷氧化潜势也随着土壤中*pmoA*基因丰度增加而增加 ($r = 0.573$, $p < 0.05$)。

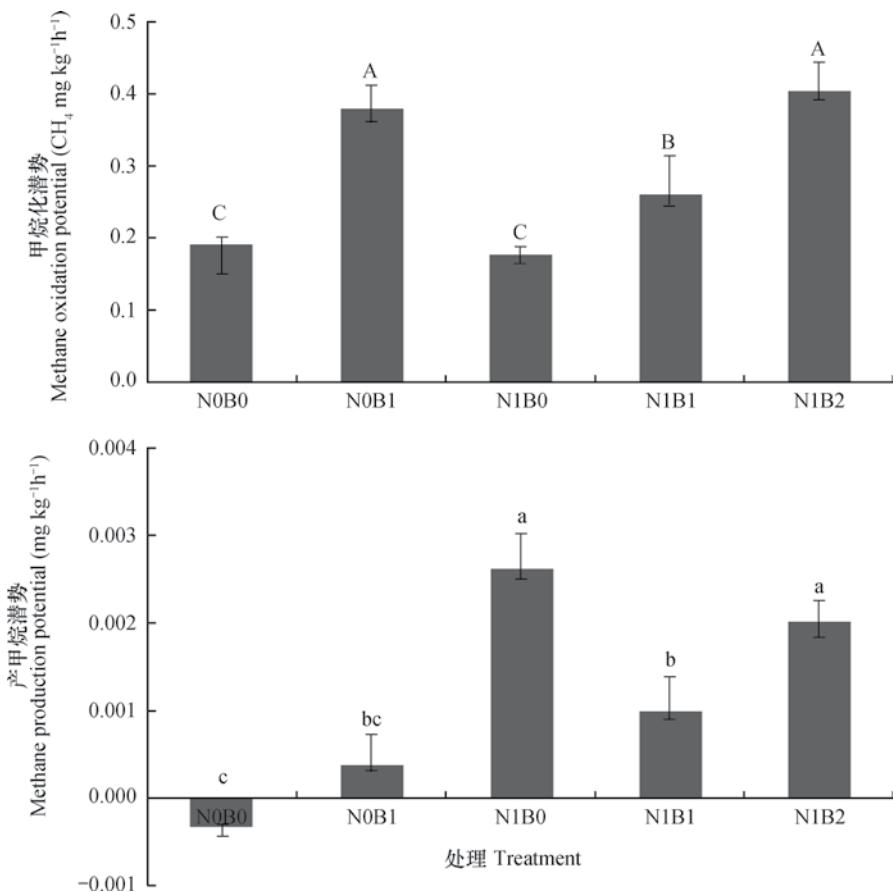
本实验提取土壤DNA纯度即OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为1.86至1.91; 浓度为33.74 ± 5.41至55.24 ± 4.36 μg g⁻¹干土。如图2, 施加生物炭三年后显著提高*pmoA*基因丰度 ($p < 0.05$), 其中N0B1处理最高, *pmoA*基因拷贝数对数为6.57 g⁻¹干土重。N1B2处理*pmoA*基因拷贝数对数显著高于N1B1处理 (图2, $p < 0.05$)。此外, 与N0B0处理相比,

表2 氮肥及生物炭施用后各处理土壤理化性质的变化

Table 2 Variation of physicochemical properties relative to treatment

处理 Treatment	pH (1 : 2.5H ₂ O)	有机碳SOC (g kg ⁻¹)	全氮TN (g kg ⁻¹)	碳氮比 C/N	微生物生物量碳 MBC (mg kg ⁻¹)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N (mg kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N (mg kg ⁻¹)
N0B0	6.74 ± 0.09a	13.89 ± 1.41d	1.30 ± 0.12c	10.52 ± 1.01d	495.02 ± 26.47d	5.31 ± 0.10b	10.21 ± 0.89c
N0B1	6.54 ± 0.10ab	17.30 ± 0.18c	1.41 ± 0.03bc	12.31 ± 0.33c	589.41 ± 6.96bc	5.05 ± 0.03c	10.77 ± 1.24c
N1B0	6.19 ± 0.11c	14.77 ± 0.83d	1.33 ± 0.09c	11.04 ± 0.55cd	553.43 ± 36.21c	5.71 ± 0.15a	13.33 ± 1.02b
N1B1	6.46 ± 0.14b	21.34 ± 1.52b	1.50 ± 0.09ab	14.05 ± 0.59b	624.74 ± 50.80b	5.61 ± 0.07a	12.59 ± 0.56b
N1B2	6.42 ± 0.18b	25.57 ± 2.84a	1.63 ± 0.07a	16.16 ± 1.30a	676.71 ± 39.44a	5.23 ± 0.11bc	16.82 ± 0.99a

注：平均值 ± 标准差 ($n = 3$)。同一列中有相同字母表示在 $p < 0.05$ 时差异不显著。N0B0 (空白对照)、N0B1 (单施20 t hm⁻²生物炭)、N1B0 (单施氮肥)、N1B1 (氮肥配施20 t hm⁻²生物炭)、N1B2 (氮肥配施40 t hm⁻²生物炭)，下同 Note: The data in the table are mean ± standard deviation ($n = 3$) , the data followed by the same letters mean insignificant difference at 5% level. N0B0 (control), N0B1 (biochar only at 20 t hm⁻²), N1B0 (urea only), N1B1 (20 t hm⁻² biochar with urea), N1B2 (40 t hm⁻² biochar with urea). The same below



注：图中不同大、小写字母分别表示不同处理的甲烷氧化潜势与产甲烷潜势在5%水平的差异性显著 Note: Different capital and lowercase letters mean significant differences at 5% level between treatments in methane oxidation potential and methane production potential, respectively

图1 不同处理的土壤甲烷氧化潜势与产甲烷潜势

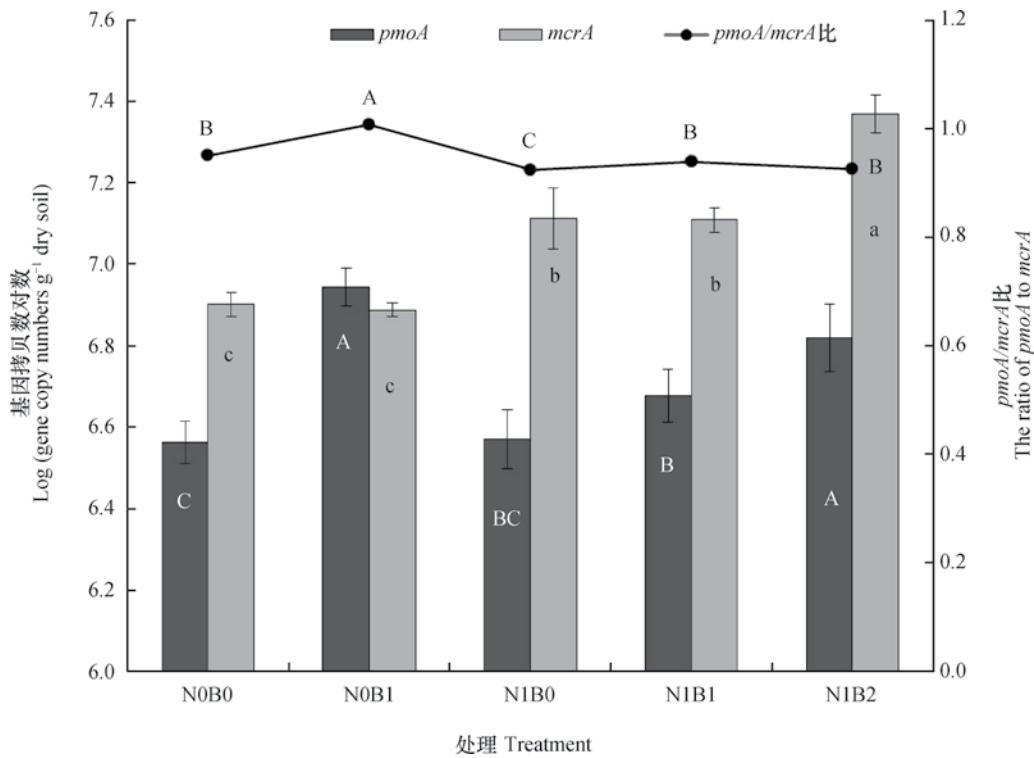
Fig. 1 Methane oxidation potential and methane production potential of the paddy soil relative to treatment

表3 土壤中甲烷氧化菌基因 (*pmoA*)、产甲烷菌基因 (*mcrA*)、甲烷氧化潜势 (MOP) 及产甲烷潜势 (MPP) 与土壤理化性质的相关系数数

Table 3 Correlation coefficients of soil physiochemical properties with the abundance of methanotrophic *pmoA* genes, methanogenic *mcrA* genes, methane oxidation potential (MOP) and methane production potential (MPP)

参数 Factors	pH	有机碳 SOC	全氮 TN	碳氮比 C/N	铵态氮 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$	硝态氮 $\text{NO}_3^- \text{-N}$	微生物生物量 碳MBC	甲烷氧化潜势 MOP	产甲烷潜势 MPP
<i>pmoA</i>	0.077	0.47	0.426	0.417	-0.573*	-0.004***	0.563*	0.573*	
<i>mcrA</i>	-0.449	0.696**	0.675**	0.745***	0.201	0.922***	0.713**	-	0.714**
MOP	0.393	0.575*	0.665**	0.529*	-0.676**	0.208	0.609*	-	-
MPP	-0.721**	0.354	0.327	0.297	0.439	0.337	0.437	-	-

注: *、**和***分别表示各参数之间在 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 及 $p < 0.001$ 相关性显著。下同 Note: * stands for significant correlation at the 0.05 level, ** at the 0.01 level and *** at the 0.001 level. The same below



注: 图中不同大、小写字母分别表示不同处理的 *pmoA* 与 *mcrA* 基因拷贝数对数及其比值在 5% 水平的差异性显著 Note: Different capital and lowercase letters mean significant difference at 5% level between treatments in logarithm of *pmoA* and *mcrA* gene copy numbers and *pmoA/mcrA*

图2 不同处理的土壤中甲烷氧化菌基因 (*pmoA*) 和产甲烷菌基因 (*mcrA*) 拷贝数对数及其比值

Fig. 2 Abundance of methanotrophic gene *pmoA* and methanogenic gene *mcrA* and *pmoA/mcrA* in the paddy soil relative to treatment

N1B0 处理没有显著影响 *pmoA* 基因丰度, 但与 N0B1 处理相比, N1B1 处理 *pmoA* 基因丰度减少了 7.2%。氮肥与生物炭对 *pmoA* 具有极显著的交互作用 (表4, $p < 0.001$)。通过相关性分析结果可知 (表3), *pmoA* 与 MBC 显著正相关 ($r = 0.563$, $p < 0.05$), 与土壤铵态氮呈显著负相关 ($r =$

-0.573, $p < 0.05$)。

2.3 旱季稻田土壤产甲烷潜势与产甲烷菌基因丰度

氮肥与生物炭的施入对土壤产甲烷潜势有显著的交互作用 (表4, $p < 0.001$)。如图1, 对照 (N0B0) 处理的产甲烷潜势为接近零的负值。与对照相比, 单施生物炭 (N0B1) 增加了产甲烷潜

势, 但不显著。单施氮肥 (N1B0) 相对对照处理显著提高了土壤产甲烷潜势 (图1, $p < 0.05$)。氮肥配施高倍生物炭 (N1B2) 处理的产甲烷潜势较氮肥配施低倍生物炭 (N1B1) 处理增加了107.5%。由表3可知, 产甲烷潜势与土壤pH呈极显著负相关 ($r = 0.714$, $p < 0.01$)。土壤产甲烷潜势与产甲烷菌基因丰度的变化显著正相关 ($r = 0.714$, $p < 0.01$)。

如图2所示, 与N0B0处理相比, 单施生物炭 (N0B1) 没有显著影响*mcrA*基因丰度, 但施加氮肥显著增加了*mcrA*基因丰度, 其中N1B0处理较N0B0处理显著提高了3.0%, N1B1处理比N0B1处理提高了3.2% ($p < 0.05$)。此外, 氮肥配施高倍生物炭 (N1B2) 与单施氮肥 (N1B0) 或氮肥配施低倍生物炭 (N1B1) 处理相比, 显著增加了*mcrA*

基因的丰度。由表4可知, 生物炭 (20 t hm^{-2}) 与氮肥对产甲烷菌没有显著的交互作用。产甲烷菌基因丰度的变化与土壤SOC、TN及MBC含量等指标呈显著正相关 ($p < 0.01$), 与土壤碳氮比极显著正相关 ($p < 0.001$)。生物炭施加没有抑制产甲烷菌的繁殖, 相反地, 氮肥配施生物炭在一定程度上促进了产甲烷菌的生长。

2.4 旱季稻田土壤*pmoA/mcrA*比

与对照 (N0B0) 处理相比, 单施生物炭 (N0B1) 处理*pmoA*与*mcrA*的比值显著升高了6.3% ($p < 0.05$), 单施氮肥处理 (N1B0) 处理则显著降低3.2% ($p < 0.05$)。与N1B0处理相比, N1B1处理的*pmoA*与*mcrA*比值显著升高了2.2% ($p < 0.05$), 而随着生物炭施用量的增加, 比值没有显著变化 (图2)。

表4 氮肥及生物炭 (20 t hm^{-2}) 对甲烷氧化菌基因 (*pmoA*)、产甲烷菌基因 (*mcrA*)、甲烷氧化菌基因 (*pmoA*)与产甲烷菌基因 (*mcrA*) 的基因丰度比值 (*pmoA/mcrA*) 以及甲烷氧化潜势 (MOP) 与产甲烷潜势 (MPP) 双因子方差分析 (F值)

Table 4 ANOVA F values of the effects of the amendment of nitrogen (N) and biochar (B) at 20 t hm^{-2} on gene abundance of *pmoA*, *mcrA*, *pmoA/mcrA* and MOP (methane oxidation potential) and MPP (methane production potential)

参数Factors	自由度df	<i>pmoA</i>	<i>mcrA</i>	<i>pmoA/mcrA</i>	MOP	MPP
N	1	9.17**	59.48***	28.59***	6.79*	73.22***
B	1	60.99***	0.06	63.02***	24.92***	4.97
N × B	1	20.85***	0.05	6.42*	0.08	32.18***

3 讨论

3.1 生物炭及氮肥施用对旱季稻田土壤理化性质的影响

生物炭施用三年后显著提高了土壤中SOC、TN及MBC含量, 为微生物活动提供了充足的营养源 (表2, $p < 0.05$)。土壤pH作为一个极其重要的土壤性质, 显著影响土壤微生物^[23]。生物炭为碱性物质, 具有通过提高土壤pH来改善土壤因氮肥施入而逐渐酸化的潜力^[24-25]。此外, 本试验结果还显示生物炭在施氮肥处理下以 40 t hm^{-2} 施用时, 显著增加了土壤硝态氮含量。因此生物炭对土壤中营养物质含量的影响及其对pH的改变可对土壤中微生物产生显著影响。生物炭自身独特的高芳香化表面及多孔性的结构可改变土壤通气性, 并为土壤中微生物提供更多的附着点及更大的生存

空间^[26]。Nielsen等^[27]也指出微生物种群的变化, 或者生物炭对基质的吸附作用, 均可能造成微生物群落发生改变, 从而进一步影响土壤CH₄氧化能力。

通过氮肥对土壤化学性质的影响研究发现, 氮肥添加可显著提高土壤碳氮比 (如表2), 而丁维新和蔡祖聪^[28]研究指出氮肥对土壤CH₄产生的影响受控于土壤化学性质, 土壤活性SOC含量及碳氮比是决定土壤产CH₄能力的核心因素。Darby和Turner^[29]也认为氮输入增加了地上部和地下部生物量, 输入到土壤中的植被枯落物相应增加, 提高了土壤中的SOC含量, 从而为CH₄产生提供更多的有机底物。

3.2 生物炭及氮肥施用对旱季稻田土壤甲烷氧化菌和氧化潜势的影响

土壤中的CH₄氧化过程由CH₄氧化微生物调控完成。本实验通过测定土壤中*pmoA*基因, 发现生

物炭的添加可以显著增加甲烷氧化菌的基因丰度(图2, $p < 0.05$)，而这可能是由于生物炭具有独特的多孔结构，提高了土壤通气性，为土壤中甲烷氧化菌这类好氧的革兰氏阴性菌提供更有利的栖息环境^[23]。施用生物炭也可以通过增加好氧土壤的多孔性和表面积进而提高土壤对大气CH₄的吸附，最终导致土壤CH₄排放降低^[30]。同时甲烷氧化潜势的测定结果也与甲烷氧化菌的数量变化情况相吻合(表3)，由此可发现生物炭显著促进了土壤CH₄氧化能力。与生物炭的作用相反，施加氮肥抑制了甲烷氧化菌增殖(图2)，这是由于氮肥施用显著增加了土壤中铵态氮含量(表2)。因为稻田生态系统施用氮肥后，稻田好氧区域内的铵态氮浓度急剧增加，铵态氮作为甲烷氧化菌的底物，会强烈抑制稻田CH₄的氧化^[31]，所以CH₄与铵态氮之间的竞争是铵态氮对CH₄氧化抑制作用的主要机制。本研究结果也发现*pmoA*基因丰度变化与土壤铵态氮呈显著负相关(表3)。由此推测，本试验结果中施加高倍生物炭显著降低土壤中铵态氮含量，增加硝态氮含量，减少了铵态氮对CH₄氧化的抑制作用，从而提高了甲烷氧化菌丰度及甲烷氧化潜势；相反地，氮肥施入显著增加土壤铵态氮含量，从而抑制了土壤甲烷氧化菌的生长，这与樊玉星等研究结果相一致^[32]。

3.3 生物炭及氮肥施用对旱季稻田土壤产甲烷菌和产甲烷潜势的影响

试验结果显示产甲烷菌基因(*mcrA*)与产甲烷潜势显著正相关(表3)。对照处理的产甲烷潜势为接近零的负值，这可能是由于采样时为小麦收获季，土壤的好氧环境抑制产甲烷菌的生长，在测定产甲烷潜势条件下还可能存在厌氧甲烷氧化^[33]。此外，对照处理长期不施加氮肥与生物炭，土壤中缺乏SOC、MBC等微生物可利用的底物，因此产甲烷能力较弱。生物炭及氮肥施加三年后显著增加了土壤中产甲烷菌数量(图2)，氮肥配施高倍生物炭处理的产甲烷潜势显著高于配施低倍生物炭处理(图1)。Hamer等^[34]研究指出生物炭的添加为产甲烷菌的生长提供了有利的环境。生物炭的添加为土壤提供了更多的MBC与SOC，为产甲烷菌活动提供了充足的养分与能源物质，促进其数量增长。本试验田间试验对产量的测定结果显示^[35]，氮肥配施生物炭后可增加作物产量。随着作物产量的增

加，土壤中的作物残渣也随之增多，为产甲烷菌提供了所需的能源，促进了产甲烷菌数量的增加。此外生物炭所含的易分解组分可以被分解，成为产甲烷微生物的主要底物^[36]。

氮肥施用后显著提高了土壤产甲烷菌数量与产甲烷潜势，这是由于氮肥添加显著提高了土壤碳氮比及土壤铵态氮与硝态氮含量，而土壤碳氮比与*mcrA*基因丰度极显著正相关，产甲烷菌主要以铵态氮为氮源，其增加会加快产甲烷菌的生理活动^[8]。本试验结果中也显示硝态氮含量与产甲烷菌基因显著正相关(表3)，傅利剑等^[37]研究指出土壤碳氮比大于8时，土壤碳源相对“过剩”，要消耗部分硝态氮作为氮源，氮肥施用显著增加土壤硝态氮含量，从而促进产甲烷菌数量增长。

3.4 生物炭及氮肥施用对旱季稻田土壤*pmoA*与*mcrA*比值的影响

试验结果中，施用生物炭不同程度地促进了甲烷氧化菌及产甲烷菌的增长，本文选取*pmoA/mcrA*比值对比研究生物炭对两种微生物的影响程度。已有研究表明*pmoA/mcrA*比值可较好地反映田间CH₄产生、氧化及排放之间的数量关系^[38]。本试验所在的试验田田间原位观测结果也显示：施氮显著增加稻麦轮作系统不同土层CH₄浓度，但配施生物炭能有效降低稻麦轮作土壤剖面7 cm和15 cm处CH₄的浓度($p < 0.05$)，平均降幅为24.8%^[39]；与单施氮肥处理相比，氮肥配施40 t hm⁻²生物炭使土壤表面CH₄排放通量显著降低了11.3%^[35]。郭艳亮等^[40]研究证明旱作土壤施用生物炭显著降低CH₄排放。本试验结果发现单施生物炭处理较对照处理提高了*pmoA/mcrA*比值，氮肥配施生物炭处理较单施氮肥处理显著提高了*pmoA/mcrA*比值，表明施加生物炭对土壤中甲烷氧化菌的促进作用强于产甲烷菌，有助于减少土壤CH₄排放，与田间原位观测结果一致^[35, 39]。因此，我们推测生物炭及氮肥施加影响甲烷氧化与产生潜势主要是通过影响土壤的理化性质，从而影响CH₄氧化与产生相关功能微生物丰度，进一步影响其CH₄的排放通量，在一定程度上解释了生物炭对稻田土壤CH₄减排的微生物机理。由于土壤CH₄排放与水分管理方式、土壤类型和生物炭的原料和化学组分密切相关^[41-42]，生物炭添加对稻麦轮作土壤CH₄排放的影响机制还需要深入研究。

4 结 论

氮肥配施生物炭可有效改善土壤因氮肥施用而逐渐酸化的问题。氮肥添加显著提高了旱季稻田土壤碳氮比及铵态氮和硝态氮含量，并且显著促进产甲烷菌的数量且提高了产CH₄能力，一定程度抑制甲烷氧化菌的数量增长，铵态氮含量与甲烷氧化菌呈显著负相关关系。添加生物炭三年后增加了旱季稻田土壤中产甲烷菌的丰度，但其程度低于生物炭对甲烷氧化菌的促进作用。此外，旱季稻田土壤的CH₄氧化能力也随着生物炭的添加而增强，从而添加生物炭有助于减少稻田土壤CH₄的排放。

参 考 文 献

- [1] Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate change 2013: The physical science basis: Working group I contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Stockholm: Cambridge University Press, 2014
- [2] Frolking S, Qiu J J, Boles S, et al. Combining remote sensing and ground census data to develop new maps of the distribution of rice agriculture in China. *Global Biogeochemical Cycles*, 2002, 16 (4), DOI: 10.1029/2001GB001425
- [3] Yan X Y, Akiyama H, Yagi K, et al. Global estimations of the inventory and mitigation potential of methane emissions from rice cultivation conducted using the 2006 Intergovernmental Panel on Climate Change Guidelines. *Global Biogeochemical Cycles*, 2009, 23 (2) : 125—151
- [4] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands. *Science*, 2010, 327 (5968) : 1008—1010
- [5] Asai H, Samson B K, Stephan H M, et al. Biochar amendment techniques for upland rice production in Northern Laos: 1. Soil physical properties, leaf SPAD and grain yield. *Field Crops Research*, 2009, 111 (1) : 81—84
- [6] Steiner C, Teixeira W G, Lehmann J, et al. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. *Plant and Soil*, 2007, 291 (1/2) : 275—290
- [7] Zhang A F, Bian R J, Pan G X, et al. Effects of biochar amendment on soil quality, crop yield and greenhouse gas emission in a Chinese rice paddy: A field study of 2 consecutive rice growing cycles. *Field Crops Research*, 2012, 127: 153—160
- [8] 颜永毫, 王丹丹, 郑纪勇. 生物炭对土壤N₂O和CH₄排放影响的研究进展. *中国农学通报*, 2013, 29 (8) : 140—146
Yan Y H, Wang D D, Zheng J Y. Advances in effects of biochar on the soil N₂O and CH₄ emissions (In Chinese). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29 (8) : 140—146
- [9] Knoblauch C, Maarifat A, Pfeiffer E M, et al. Degradability of black carbon and its impact on trace gas fluxes and carbon turnover in paddy soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43 (9) : 1768—1778
- [10] Cai Z C, Xing G X, Yan X Y, et al. Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilisers and water management. *Plant and Soil*, 1997, 196 (1) : 7—14
- [11] Hu R G, Hatano R, Kusa K, et al. Effect of nitrogen fertilization on methane flux in a structured clay soil cultivated with onion in central Hokkaido, Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2002, 48 (6) : 797—804
- [12] Watanabe T, Kimura M, Asakawa S. Dynamics of methanogenic archaeal communities based on rRNA analysis and their relation to methanogenic activity in Japanese paddy field soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39 (11) : 2877—2887
- [13] Theisen A R, Ali M H, Radajewski S, et al. Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. *Molecular Microbiology*, 2005, 58 (3) : 682—692
- [14] Conrad R, Klose M, Lu Y, et al. Methanogenic pathway and archaeal communities in three different anoxic soils amended with rice straw and maize straw. *Frontiers in Microbiology*, 2012, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00004
- [15] Zheng Y, Zhang L M, Zheng Y M, et al. Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8 (6) : 406—414
- [16] Bronson K F, Neue H U, Abao E B, et al. Automated chamber measurements of methane and nitrous oxide flux in a flooded rice soil: I. Residue, nitrogen, and water management. *Soil Science Society of America Journal*, 1997, 61 (3) : 981—987
- [17] Ma J, Li X L, Xu H, et al. Effects of nitrogen fertiliser and wheat straw application on CH₄ and N₂O emissions from a paddy rice field. *Soil Research*, 2007, 45

- (5) : 359—367
- [18] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000: 355—356
- Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2000: 355—356
- [19] Anderson J P E, Domsch K H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 1978, 10 (3) : 215—221
- [20] Zhang G B, Ji Y, Ma J, et al. Intermittent irrigation changes production, oxidation, and emission of CH₄ in paddy fields determined with stable carbon isotope technique. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 52: 108—116
- [21] Barbier B A, Dziduch I, Liebner S, et al. Methane-cycling communities in a permafrost-affected soil on Herschel Island, Western Canadian Arctic: Active layer profiling of *mcrA* and *pmoA* genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 82 (2) : 287—302
- [22] Costello A M, Lidstrom M E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (11) : 5066—5074
- [23] Lehmann J, Rillig M C, Thies J, et al. Biochar effects on soil biota-A review. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43 (9) : 1812—1836
- [24] van Zwieten L, Kimber S, Morris S, et al. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. *Plant and Soil*, 2010, 327 (1/2) : 235—246
- [25] 王军, 施雨, 李子媛, 等. 生物炭对退化蔬菜地土壤及其修复过程中N₂O产排的影响. *土壤学报*, 2016, 53 (3) : 713—723
- Wang J, Shi Y, Li Z Y, et al. Effects of biochar application on N₂O emission in degraded vegetable soil and in remediation process of the soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (3) : 713—723
- [26] Farrell M, Kuhn T K, Macdonald L M, et al. Microbial utilisation of biochar-derived carbon. *Science of the Total Environment*, 2013, 465: 288—297
- [27] Nielsen S, Minchin T, Kimber S, et al. Comparative analysis of the microbial communities in agricultural soil amended with enhanced biochars or traditional fertilizers. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2014, 191: 73—82
- [28] 丁维新, 蔡祖聪. 氮肥对土壤甲烷产生的影响. *农业环境科学学报*, 2003, 22 (3) : 380—383
- Ding W X, Cai Z C. Effect of nitrogen fertilization on methane production in wetland soils (In Chinese). *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22 (3) : 380—383
- [29] Darby F A, Turner R E. Effects of eutrophication on salt marsh root and rhizome biomass accumulation. *Marine Ecology Progress Series*, 2008, 363: 63—70
- [30] Karhu K, Mattila T, Bergström I, et al. Biochar addition to agricultural soil increased CH₄ uptake and water holding capacity—Results from a short-term pilot field study. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2011, 140 (1) : 309—313
- [31] 贾仲君, 蔡祖聪. 稻田甲烷氧化与铵氧化关系研究进展. *农村生态环境*, 2003, 19 (4) : 40—44
- Jia Z J, Cai Z C. Methane consumption in relation to ammonia oxidation in paddy soils (In Chinese). *Rural Eco-Environment*, 2003, 19 (4) : 40—44
- [32] 樊玉星, 张洁洁, 同凯龙, 等. 不同施氮水平对水稻土氮素供应和烤烟氮素吸收积累的影响. *土壤*, 2016, 48 (3) : 455—462
- Fan Y X, Zhang J J, Yan K L, et al. Effects of different nitrogen levels on nitrogen supply of paddy soil and nitrogen absorption and accumulation of flue-cured tobacco (In Chinese). *Soils*, 2016, 48 (3) : 455—462
- [33] 吕镇梅, 闵航, 陈中云, 等. 水稻田土壤甲烷厌氧氧化在整个甲烷氧化中的贡献率. *环境科学*, 2005, 26 (4) : 13—17
- Lü Z M, Min H, Chen Z Y, et al. Contribution of anaerobic oxidation of methane to whole methane oxidation (In Chinese). *Environmental Science*, 2005, 26 (4) : 13—17
- [34] Hamer U, Marschner B, Brodowski S, et al. Interactive priming of black carbon and glucose mineralization. *Organic Geochemistry*, 2004, 35 (7) : 823—830
- [35] 李露, 周自强, 潘晓健, 等. 不同时期施用生物炭对稻田N₂O和CH₄排放的影响. *土壤学报*, 2015, 52 (4) : 839—848
- Li L, Zhou Z Q, Pan X J, et al. Effects of biochar on N₂O and CH₄ emissions from paddy field under rice-wheat rotation during rice and wheat growing seasons relative to timing of amendment (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52 (4) : 839—848
- [36] Knoblauch C, Marifaat A, Haefele M S. Biochar in rice-based system: Impact on carbon mineralization and trace gas emissions. *Bioresource Technology*, 2008, 95 (32) : 255—257
- [37] 傅利剑, 郭丹钊, 史春龙, 等. 碳源及碳氮比对异养反硝化微生物异养反硝化作用的影响. *农村生态环境*,

- 2005, 21 (2) : 42—45
- Fu L J, Guo D Z, Shi C L, et al. Effect of carbon source and C/N ratio on heterotrophic denitrification of pure culture (In Chinese). *Rural Eco-Environment*, 2005, 21 (2) : 42—45
- [38] Hyo Jung L, Yoon K S, Pil Joo K, et al. Methane emission and dynamics of methanotrophic and methanogenic communities in a flooded rice field ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88 (1) : 195—212
- [39] 周自强, 李露, 张恒, 等. 氮肥配施小麦秸秆生物炭对稻麦轮作土壤剖面CH₄和N₂O浓度的影响. *南京农业大学学报*, 2015, 38 (3) : 431—438
- Zhou Z Q, Li L, Zhang H, et al. Effects of wheat straw biochar and nitrogen amendment on methane and nitrous oxide distribution characteristics within soil profile in rice-wheat annual rotations (In Chinese). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38 (3) : 431—438
- [40] 郭艳亮, 王丹丹, 郑纪勇, 等. 生物炭添加对半干旱地区土壤温室气体排放的影响. *环境科学*, 2015, 36 (9) : 3393—3400
- Guo Y L, Wang D D, Zheng J Y, et al. Effect of biochar on soil greenhouse gas emissions in semi-arid region (In Chinese). *Environmental Science*, 2015, 36 (9) : 3393—3400
- [41] Xiong Z Q, Guang X X, Zhu Z L. Nitrous oxide and methane emissions as affected by water, soil and nitrogen. *Pedosphere*, 2007, 17 (2) : 146—155
- [42] van Zwieten L, Kimber S, Morris S, et al. Influence of biochars on flux of N₂O and CO₂ from Ferrosol. *Soil Research*, 2010, 48 (7) : 555—568

Effects of Biochar and Nitrogen Fertilizer Amendment on Abundance and Potential Activity of Methanotrophs and Methanogens in Paddy Field

XU Xin CHEN Chen XIONG Zhengqin[†]

(Jiangsu Key Laboratory of Low Carbon Agriculture and GHGs Mitigation, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract 【Objective】Amendment of biochar has a significant impact on methane (CH₄) emission in paddy field, but it is still unclear about its mechanism, so further study should be done to clarify the issue and to provide a scientific basis for the use of biochar in the rice-wheat rotation system. 【Method】Soil samples were collected from a paddy field of a field experiment on amendment of biochar and nitrogen (N) fertilizer after the crop of wheat was harvested in 2015 for analysis to assess effects of biochar and N fertilizer amendment on soil physiochemical properties, methane oxidation potential and methane production potential as well as gene abundances of methanotrophs and methanogens with the *real-time PCR* technology. Biochar was added once to the paddy field before rice transplanting on June 10, 2012. The field experiment was designed to have five treatments in triplicate, that is, Treatment N0B0 (no nitrogen (N) and biochar (B) amended) as control, Treatment NOB1 (only biochar amended, 20 t hm⁻²), Treatment N1B0 (only N fertilizer amended, 250 kg hm⁻² urea), Treatment N1B1 (250 kg hm⁻² urea and 20 t hm⁻² biochar amended, and Treatment N1B2 (250 kg hm⁻² urea and 40 t hm⁻² biochar). 【Result】Results show that Treatments N1B1 and N1B2 significantly increased soil organic carbon and microbial biomass carbon ($p < 0.05$), and soil pH, too, as compared with Treatment N1B0 treatment. Moreover, the abundance of methanotrophs and methanogens were found significantly related to some soil physiochemical properties. Statistical analysis shows that the copy number of *pmoA* gene was significantly and positively correlated with soil microbial biomass carbon ($r = 0.563$, $p < 0.05$), but negatively with soil NH₄⁺-N content ($r = -0.573$, $p < 0.05$). In addition, the copy number of *mcrA* gene was positively related to soil total N ($r = 0.675$, $p < 0.01$), microbial biomass carbon ($r = 0.713$, $p < 0.01$) and soil organic carbon ($r = 0.696$, $p < 0.01$). Besides, methane oxidation potential was positively related to biochar application

rate in the presence of N fertilizer ($p < 0.05$) , and in Treatment N1B2, methane production potential increased from $0.001 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in Treatment N1B1 to $0.002 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Methane oxidation potential was 44.4% higher in Treatment N1B1 than in Treatment N1B0, while being 31.6% lower than in Treatment NOB1. Relative to Treatment N1B1, Treatment N1B2 increased methane oxidation potential from 0.26 to $0.40 \text{ CH}_4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Treatment NOB1 significantly increased the log copy number of *pmoA* gene, from 6.57 g^{-1} dry soil in Treatment NOB0 up to 6.94 g^{-1} dry soil ($p < 0.05$) . Compared with the control or Treatment NOB0, Treatment N1B0 inhibited increase in copy number of *pmoA* gene a certain extent, while increasing the copy number of *mcrA* gene by 3.0%, which indicates that nitrogen fertilizer can significantly stimulate growth of methanogens. Compared with Treatment N1B0, Treatment N1B2 was higher in copy number of both *pmoA* gene and *mcrA* gene, but Treatment N1B1 remained almost unchanged, which suggests that biochar amendment at 40 t hm^{-2} can significantly raise the abundance of methanotrophs and methanogens. Compared with Treatment NOB1, Treatment N1B1 greatly decreased *pmoA/mcrA* ratio from 1.01 to 0.94, and methane oxidation potential by 31.6%. However, biochar amendment increased *pmoA/mcrA* ratio in the treatments the same in nitrogen fertilizer level ($p < 0.05$) . 【Conclusion】 All the findings in this experiment demonstrate that biochar amendment promotes methanotrophs and methanogens in abundance, but the effect is much higher on the former than on the latter, and consequently on methane oxidation capacity than on methane production potential. Therefore, it can be concluded that the practice of biochar amendment helps mitigate methane emissions in the paddy field during the wheat growing season.

Key words Biochar; Methane emission; Methanotrophs; Methanogens; Paddy field

(责任编辑: 卢 萍)