

引用格式: 刘新雨, 敖静, 王涛, 常瑞英. 氮添加对西南亚高山针叶林不同深度土壤甲烷吸收潜力的影响[J]. 山地学报, 2023, 41(3): 386-398.

LIU Xinyu, AO Jing, WANG Tao, CHANG Ruiying. Effects of nitrogen addition on soil methane uptake potentials at different depths of a subalpine coniferous forest in southwest China [J]. Mountain Research, 2023, 41(3): 386-398.

## 氮添加对西南亚高山针叶林不同深度土壤甲烷吸收潜力的影响

刘新雨<sup>1,2</sup>, 敖静<sup>1,2</sup>, 王涛<sup>1\*</sup>, 常瑞英<sup>1</sup>

(1. 中国科学院、水利部成都山地灾害与环境研究所, 成都 610041; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 森林土壤是重要的大气 CH<sub>4</sub> 汇, 氮添加可能增加、抑制或不影响森林土壤 CH<sub>4</sub> 吸收。亚高山针叶林是中国西南森林的主体, 针对氮添加对亚高山针叶林土壤 CH<sub>4</sub> 吸收影响的研究并不充分。本研究依托贡嘎山亚高山针叶林开展氮沉降(氮添加)试验, 结合室内微宇宙实验及微生物功能基因分析, 测定不同深度土壤在标准实验条件下的 CH<sub>4</sub> 吸收速率, 明确亚高山针叶林不同深度土壤 CH<sub>4</sub> 吸收潜力对氮添加的差异性响应规律及 CH<sub>4</sub> 氧化功能基因的调控作用。结果显示: (1) 同一氮添加处理下, 土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率由大到小为矿质层 0~5 cm、矿质层 5~10 cm、有机层, 氮添加未改变土壤 CH<sub>4</sub> 吸收潜力的剖面垂直分布规律。(2) 氮添加对有机层 CH<sub>4</sub> 吸收速率无显著影响 ( $P>0.05$ ), 但促进了矿质层土壤的 CH<sub>4</sub> 吸收速率。低氮和高氮添加分别促进矿质层 0~5 cm 土壤 CH<sub>4</sub> 吸收 142% 和 58%, 促进 5~10 cm 土壤 CH<sub>4</sub> 吸收 2550% 和 650%。(3) CH<sub>4</sub> 氧化功能基因丰度是调控不同土层 CH<sub>4</sub> 吸收速率的重要因素, 而较高的铵态氮浓度会改变功能基因丰度与 CH<sub>4</sub> 吸收速率的相关关系。本研究深化了氮添加对西南典型亚高山森林土壤 CH<sub>4</sub> 吸收影响的认识, 可为大气氮沉降背景下区域森林土壤 CH<sub>4</sub> 汇的准确核算提供科学依据。

**关键词:** 氮沉降; 森林土壤; 甲烷氧化; 微生物功能基因; 贡嘎山

**中图分类号:** X1

**文献标志码:** A

甲烷(CH<sub>4</sub>)是重要的温室气体, 在百年尺度范围内, CH<sub>4</sub> 的全球增温潜势(Global warming potential, GWP)是 CO<sub>2</sub> 的 28 倍。自工业革命以来, 全球大气 CH<sub>4</sub> 浓度持续上升<sup>[1-2]</sup>, 特别是近 20 年 CH<sub>4</sub> 浓度加速增加<sup>[3]</sup>。据 IPCC 2013 年的评估, CH<sub>4</sub> 对全球变暖的贡献率已高达 25%<sup>[4-5]</sup>。

森林土壤是重要的大气 CH<sub>4</sub> 汇, 对缓解大气中 CH<sub>4</sub> 浓度的快速增加发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。全球土壤 CH<sub>4</sub> 库的最新估计结果表明<sup>[7-8]</sup>, 全球森林

土壤单位面积的 CH<sub>4</sub> 吸收速率平均为  $3.95 \pm 1.78 \text{ kg CH}_4 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ , 总的吸收速率为  $14.98 \pm 6.75 \text{ Tg CH}_4 \cdot \text{a}^{-1}$ , 约占全球土壤 CH<sub>4</sub> 年吸收量的 52%。然而, 近半世纪以来, 全球尺度上大气氮沉降量显著增加<sup>[9-10]</sup>, 对森林土壤 CH<sub>4</sub> 汇的准确核算造成巨大挑战。

模拟大气氮沉降(氮添加)试验表明<sup>[11-12]</sup>: 氮添加可能增加、抑制或不影响森林土壤 CH<sub>4</sub> 吸收, 取决于森林类型、土壤氮素有效性状况、氮添加水平

**收稿日期** (Received date): 2023-05-10; **改回日期** (Accepted date): 2023-06-23

**基金项目** (Foundation item): 四川省科技计划(2023NSFSC0190); 国家自然科学基金(41977398) [Sichuan Science and Technology Program (2023NSFSC0190); National Natural Science Foundation of China(41977398)]

**作者简介** (Biography): 刘新雨(1998-), 女, 山东德州人, 硕士研究生, 主要研究方向: 氮沉降背景下亚高山森林土壤甲烷吸收。[LIU Xinyu (1998-), female, born in the Dezhou, Shandong province, M. Sc. candidate, research on methane uptake in subalpine forest soil elevated underantropogenic N deposition] E-mail: liuxinyu@imde.ac.cn

**\* 通讯作者** (Corresponding author): 王涛(1985-), 男, 山东济宁人, 博士, 研究员, 主要研究方向: 土壤生物地球化学。[WANG Tao (1985-), male, born in Jinan, Shandong province, Ph. D., professor, research on soil biogeochemistry] E-mail: wangtao@imde.ac.cn

等因素。例如:在氮有效性较高的亚热带常绿阔叶林,氮添加普遍抑制土壤  $\text{CH}_4$  吸收<sup>[13]</sup>;在氮受限的北方森林生态系统,通常表现为低氮添加促进,而高氮添加抑制土壤  $\text{CH}_4$  吸收<sup>[14]</sup>。氮添加对土壤  $\text{CH}_4$  吸收影响的已有研究涵盖了多种类型森林生态系统,包括热带雨林<sup>[15]</sup>、南亚热带森林<sup>[13,16]</sup>、温带阔叶林<sup>[17-19]</sup>等。然而,针对中国第二大林区以及西南山地森林的主体——亚高山针叶林的相关报道仍较缺乏。该区域大气氮沉降速率呈增加趋势<sup>[20]</sup>,开展氮沉降对西南亚高山针叶林土壤  $\text{CH}_4$  吸收影响及其机制的研究,有助于准确评估氮沉降背景下西南山地森林土壤  $\text{CH}_4$  汇的变化,服务“碳中和”战略。

研究  $\text{CH}_4$  氧化菌丰度和活性的变化是揭示氮添加对亚高山森林土壤  $\text{CH}_4$  吸收影响机制的关键途径。森林土壤  $\text{CH}_4$  吸收是  $\text{CH}_4$  产生与氧化过程的综合结果,但一般由  $\text{CH}_4$  氧化过程调控土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率<sup>[21-22]</sup>。土壤  $\text{CH}_4$  氧化主要由  $\text{CH}_4$  氧化菌完成,其通过  $\text{CH}_4$  单加氧酶将  $\text{CH}_4$  最终转化为  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[23]</sup>。氮添加直接或间接作用于  $\text{CH}_4$  氧化菌影响土壤  $\text{CH}_4$  吸收。一方面,氮添加通过增加土壤中铵态氮和/或硝态氮浓度直接影响  $\text{CH}_4$  单加氧酶的活性继而影响土壤  $\text{CH}_4$  吸收<sup>[12]</sup>;另一方面,氮添加还可以通过改变土壤理化性质(有机碳、可溶性有机碳、pH 等)影响  $\text{CH}_4$  氧化菌活性间接影响土壤  $\text{CH}_4$  吸收<sup>[24-29]</sup>。此外,鉴于森林土壤  $\text{CH}_4$  氧化菌<sup>[30]</sup>和  $\text{CH}_4$  吸收能力<sup>[31]</sup>都具有沿土壤剖面垂直分布的特征,解析不同深度土壤  $\text{CH}_4$  氧化菌和  $\text{CH}_4$  吸收潜力的关联关系是全面理解氮添加对亚高山森林土壤  $\text{CH}_4$  吸收影响机制的重要切入点。

本文依托贡嘎山东坡峨眉冷杉林多水平氮添加试验,采集长期氮添加实验样地的土壤,结合室内培养实验,研究标准培养实验条件下不同深度土壤  $\text{CH}_4$  吸收潜力及其对氮添加的响应;结合 *pmoA*(编码颗粒  $\text{CH}_4$  单加氧酶  $\beta$  亚基)和 *mmoX*(编码可溶性  $\text{CH}_4$  单加氧酶  $\alpha$  亚基)功能基因分析<sup>[32]</sup>,研究氮添加对土壤  $\text{CH}_4$  氧化菌丰度的影响,并解析氮添加下微生物功能基因对土壤  $\text{CH}_4$  吸收潜力的调控作用。本研究提出以下假设:(1)由于亚高山针叶林是氮受限生态系统<sup>[33]</sup>,低剂量的氮添加会促进土壤  $\text{CH}_4$  吸收;(2)氮添加对土壤  $\text{CH}_4$  氧化相关基因丰度和  $\text{CH}_4$  吸收潜力的影响具有土壤深度依赖性。

本研究成果可为大气氮沉降背景下区域森林土壤  $\text{CH}_4$  汇的准确核算提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

研究区位于贡嘎山东坡的高山生态系统观测实验站( $29^{\circ}34'N$ ,  $101^{\circ}0'E$ )。年平均气温  $3.8^{\circ}\text{C}$ , 年平均降水量 1940 mm, 6—9 月的降水量占全年降水量的 60%。植物群落以冷杉为优势种,林龄约为 80 a,土壤主要为始成土。实验样地处于海拔 3000 m, 大气背景氮沉降速率约为每年  $8.0 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ <sup>[34]</sup>。样地从 2014 年开始施氮模拟大气氮沉降,样地共设置有 3 个氮添加水平,分别为:对照(0)、低氮( $8 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ )和高氮( $40 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ )。高氮添加水平的设置考虑到以下几个因素:(1)  $40 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$  处于前人<sup>[35-36]</sup>森林生态系统模拟氮沉降(氮添加)试验氮添加剂量的中等水平;(2)中国主要森林的大气氮沉降速率范围在  $2.3 \sim 57.5 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ <sup>[37]</sup>, 本实验基本囊括了这个区间,包括中国西南和东南山地森林<sup>[20]</sup>; (3)西南山地森林生态系统氮沉降负荷临界阈值( $50 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ )<sup>[33,38]</sup>。2014 年,在该地点随机选取 5 个  $6 \text{ m} \times 6 \text{ m}$  的地块,每个地块建立了 3 个  $2 \text{ m} \times 2 \text{ m}$  的样方,选择施加硝酸铵( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )模拟氮沉降,将  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  溶于 500 ml 去离子水中,以溶液形式手动喷施到处理小区内,每年 6—8 月每月施氮一次,对照样地土壤施加等量去离子水。每个采样区设置 5 个重复。

### 1.2 土壤采集

2021 年 7 月,在每个样方随机布点采取土样,采集有机层、矿质层 0~5 cm 和矿质层 5~10 cm 土壤。所有土样放在便携式低温冰箱中带回实验室。样品首先过 2 mm 筛,剔除植物根系和砾石等,然后将三个土层的所有土样分成三部分。其中,一部分保存在  $-80^{\circ}\text{C}$  的冰箱中,用于分析土壤微生物功能基因丰度等微生物指标,一部分保存于  $4^{\circ}\text{C}$  的冰箱中,用于室内培养实验;其余部分风干,用于测定理化性质。

### 1.3 土壤理化性质的测定

土壤 pH 采用 pH 电极(HASH, HQ30D, USA)测定(土水质量体积比 1:2.5)。土壤含水量

(SWC)105 °C 烘干至恒重后称重测定<sup>[39]</sup>。土壤有机碳和全氮通过加入 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸去除无机碳后,利用元素分析仪 (Vario Macro, Elementar Instruments Inc, Langenselbold, Germany) 测定。采用 1 mol · L<sup>-1</sup> KCl 溶液浸提有效态硝态氮和铵态氮<sup>[40]</sup>,过滤后利用流动分析仪 (Skalar San ++, Skalar Analytical BV, Breda, The Netherlands) 测定硝态氮和铵态氮浓度。土壤可溶性有机碳和总氮用 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 的硫酸钾溶液浸提后,用液体碳氮分析仪 (Vario TOC, Elementar Instruments Inc., Germany) 测定。

#### 1.4 微生物功能基因丰度的测定

利用 Wafergen 智能芯片实时 PCR 系统 (WaferGenBiosystem, California, USA) 对土壤 CH<sub>4</sub> 氧化相关功能基因的丰度进行检测(相对丰度表达为 *mmoX* 或 *pmoA* 基因拷贝数/16S rRNA 基因拷贝数)。芯片样品准备遵照说明书标准流程,详情参考文献<sup>[41]</sup>。PCR 扩增程序如下:95 °C 初始变性 10 min,然后 40 次循环扩增(95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s)。每个样品设置 3 个技术重复。

#### 1.5 土壤 CH<sub>4</sub> 吸收潜力测定

分别称取 5 g 有机层、矿质层 0 ~ 5 cm 和矿质层 5 ~ 10 cm 土壤样品装至 140 ml 培养瓶中,调节有机层土壤含水率为 70%,矿质层土壤的含水率为 30% (均为最大持水量的 60%),置于 20 °C 培养箱中避光预培养 2 d。预培养结束后,将土样进行充分通气后,继续置于 20 °C 培养箱避光培养 24 h,正式的培养实验一共持续了 20 d。培养 24 h 后利用 20 ml 注射器加三通阀的装置从培养瓶中抽取 10 ml 左右的顶空气体,注入气相色谱仪 (PerkinElmer Clarus 680, Hewlett Packard, USA) 分析气体浓度。通过培养前后培养瓶内 CH<sub>4</sub> 浓度差值计算 CH<sub>4</sub> 吸收速率。

此外,为了排除土壤 CH<sub>4</sub> 产生可能对 CH<sub>4</sub> 吸收造成的影响,通过添加乙炔抑制 CH<sub>4</sub> 氧化过程后研究 CH<sub>4</sub> 净产生速率<sup>[42]</sup>,发现本研究区土壤 CH<sub>4</sub> 产生对 CH<sub>4</sub> 吸收的影响可以忽略不计,因此本研究不再考虑 CH<sub>4</sub> 产生过程。

#### 1.6 数据分析方法

利用线性回归方法(最小二乘法)分析不同深度土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率与土壤理化性质和微生物功

能基因丰度的关系。采用双因素方差分析方法 (LSD 法检测) 比较不同氮处理和不同深度土壤理化性质和微生物功能基因丰度,所有数据均已通过正态性检验。本文中的图表数据均以平均值 ± 1 倍标准误 (mean ± 1 SE) 方式显示,相关图表采用 R 语言进行绘制。采用线性混合效应模型检验培养期间内土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率在不同土层深度和不同氮添加水平下的差异。模型中,将氮添加水平、土层深度及其交互作用作为固定因子,将培养时间 (d) 和样方号 (1 ~ 15) 作为随机因子,利用 Tukey 检验比较 CH<sub>4</sub> 吸收速率在同一氮添加水平下不同土层间的差异以及同一土层深度中不同氮添加水平间的差异。线性混合效应模型分析利用 R lme4 包<sup>[43]</sup> 和 emmeans 包<sup>[44]</sup> 完成。上述所有统计显著性水平均设为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 氮添加对土壤基本化学性质的影响

不同深度土壤的化学性质具有明显的垂直分布特征(表 1)。土壤 pH 随深度递增,而有机碳、总氮、铵态氮、硝态氮以及可溶性有机碳、氮等性质均随土壤深度增加呈显著降低。氮添加对不同深度土壤性质的影响均未达到显著水平(表 2,  $P > 0.05$ ),可能与样地土壤较大的空间异质性有关。低氮和高氮添加对有机层和矿质层 0 ~ 5 cm 土壤铵态氮或硝态氮浓度的影响具有不同趋势:低氮添加倾向于降低土壤铵态氮或硝态氮浓度,而高氮添加倾向于增加土壤铵态氮或硝态氮浓度。然而在矿质层 5 ~ 10 cm,仅低氮添加表现出同时增加土壤铵态氮或硝态氮浓度的趋势。

### 2.2 不同深度土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率

三种氮添加处理下,有机层、矿质层 0 ~ 5 cm 和矿质层 5 ~ 10 cm 三个不同深度的土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率均存在显著差异,表现出矿质层 0 ~ 5 cm 的土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率均明显高于有机层和矿质层 5 ~ 10 cm 土壤的 CH<sub>4</sub> 吸收速率,有机层的 CH<sub>4</sub> 吸收速率最低,部分情况下表现为 CH<sub>4</sub> 净产生(图 1)。结果说明氮添加没有改变土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率的垂直分布格局。

不同氮添加处理下,不同土层 CH<sub>4</sub> 吸收速率随培养时间未发生显著变化(图 1)。对照处理

表 1 不同氮添加水平对土壤化学性质的影响

Tab. 1 Chemical properties of soils with different nitrogen addition levels and depths

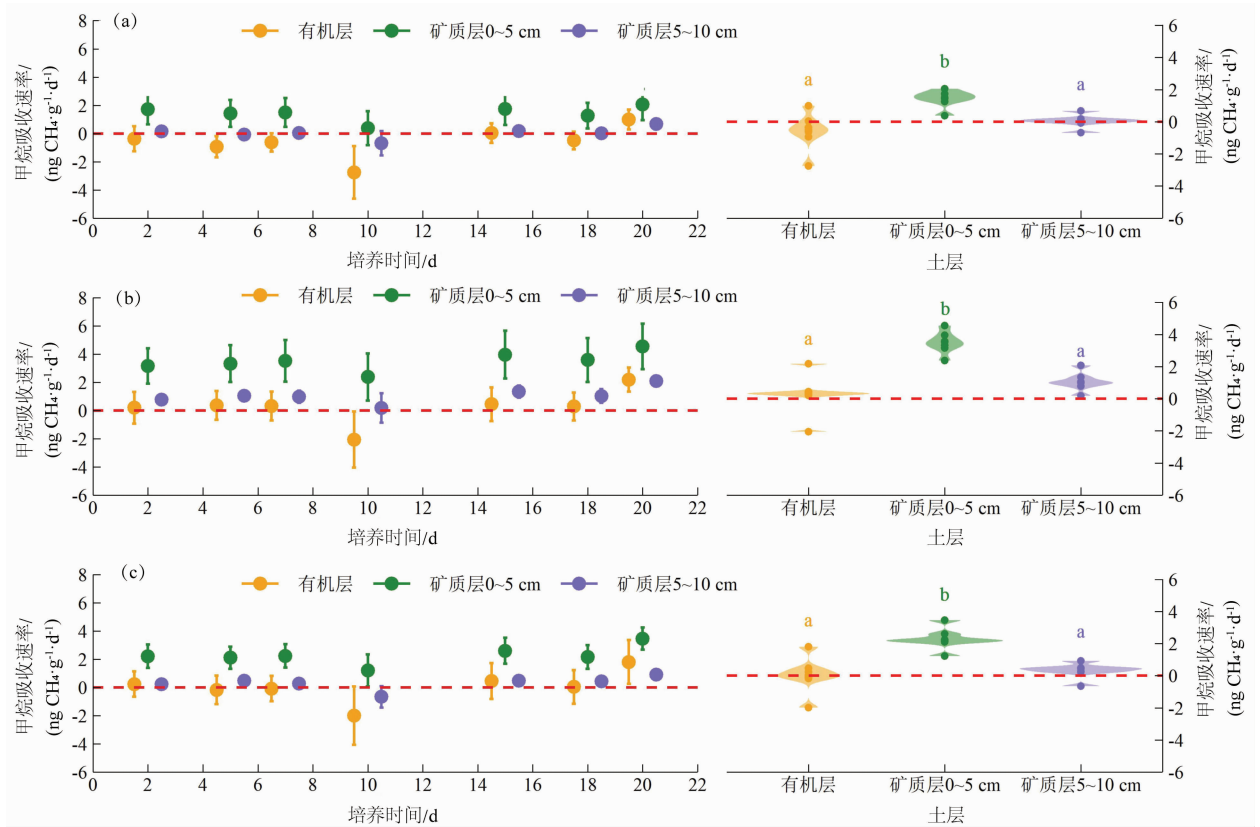
土层	处理	pH	有机碳/ (g · kg <sup>-1</sup> )	总氮/ (g · kg <sup>-1</sup> )	硝态氮/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	铵态氮/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	可溶性有机碳/ (mg · g <sup>-1</sup> )	可溶性氮/ (mg · g <sup>-1</sup> )
有机层	对照	4.44 ± 0.15	241.88 ± 19.46	14.13 ± 0.86	2.58 ± 0.69	81.25 ± 11.04	1.97 ± 0.12	0.22 ± 0.02
	低氮	4.39 ± 0.08	260.26 ± 23.70	15.43 ± 1.45	2.32 ± 0.27	70.70 ± 14.07	2.23 ± 0.37	0.28 ± 0.04
	高氮	4.51 ± 0.15	287.88 ± 13.06	15.01 ± 0.81	2.80 ± 0.37	95.37 ± 16.22	1.90 ± 0.15	0.26 ± 0.02
矿质层 0 ~ 5 cm	对照	4.79 ± 0.13	30.28 ± 5.53	2.21 ± 0.39	2.16 ± 0.21	9.44 ± 2.03	0.41 ± 0.04	0.05 ± 0.00
	低氮	4.63 ± 0.05	29.66 ± 3.99	2.25 ± 0.29	1.88 ± 0.31	8.79 ± 1.60	0.48 ± 0.09	0.08 ± 0.01
	高氮	4.64 ± 0.11	38.22 ± 3.52	2.64 ± 0.28	2.60 ± 0.42	10.46 ± 1.88	0.51 ± 0.05	0.07 ± 0.00
矿质层 5 ~ 10 cm	对照	5.04 ± 0.07	17.77 ± 2.67	1.35 ± 0.21	2.02 ± 0.25	5.01 ± 0.77	0.29 ± 0.15	0.05 ± 0.02
	低氮	4.86 ± 0.07	19.31 ± 4.16	1.47 ± 0.33	3.20 ± 0.81	6.30 ± 2.09	0.27 ± 0.06	0.04 ± 0.01
	高氮	4.98 ± 0.13	19.49 ± 2.09	1.31 ± 0.14	1.77 ± 0.21	5.76 ± 0.71	0.25 ± 0.04	0.03 ± 0.01

表 2 氮添加和土壤深度对土壤理化性质的双因素方差分析

Tab. 2 Two-way ANOVA analysis of nitrogen addition and soil depths on soil physicochemical properties

处理	土壤理化性质						
	pH	有机碳	总氮	硝态氮	铵态氮	可溶性有机碳	可溶性氮
氮添加	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
土壤深度	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
氮添加 × 土壤深度	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

注: n. s. 表示没有显著差异; \* \* \* 代表有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。



不同小写字母表示土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率在同一氮添加处理下不同土层间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 相同小写字母表示土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率在同一氮添加处理下不同土层间无显著差异; 阴影部分反映了数据集中样本点的分布情况。

图 1 不同氮添加水平条件下不同深度土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率随时间的变化及其差异: (a) 对照处理; (b) 低氮添加; (c) 高氮添加

Fig. 1 Changes in CH<sub>4</sub> uptakes rates over time in different soils depths under different nitrogen addition levels:

(a) control treatment; (b) low nitrogen addition; (c) high nitrogen addition

下,有机层、矿质层 0~5 cm 和矿质层 5~10 cm 的平均  $\text{CH}_4$  吸收速率分别为  $-0.60$ 、 $1.44$  和  $0.04 \text{ ng CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;低氮添加处理下,有机层、矿质层 0~5 cm 和矿质层 5~10 cm 的平均  $\text{CH}_4$  吸收速率分别为  $0.24$ 、 $3.49$  和  $1.06 \text{ ng CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;高氮添加处理下,有机层、矿质层 0~5 cm 和矿质层 5~10 cm 的平均  $\text{CH}_4$  吸收速率分别为  $0.04$ 、 $2.28$  和  $0.30 \text{ ng CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

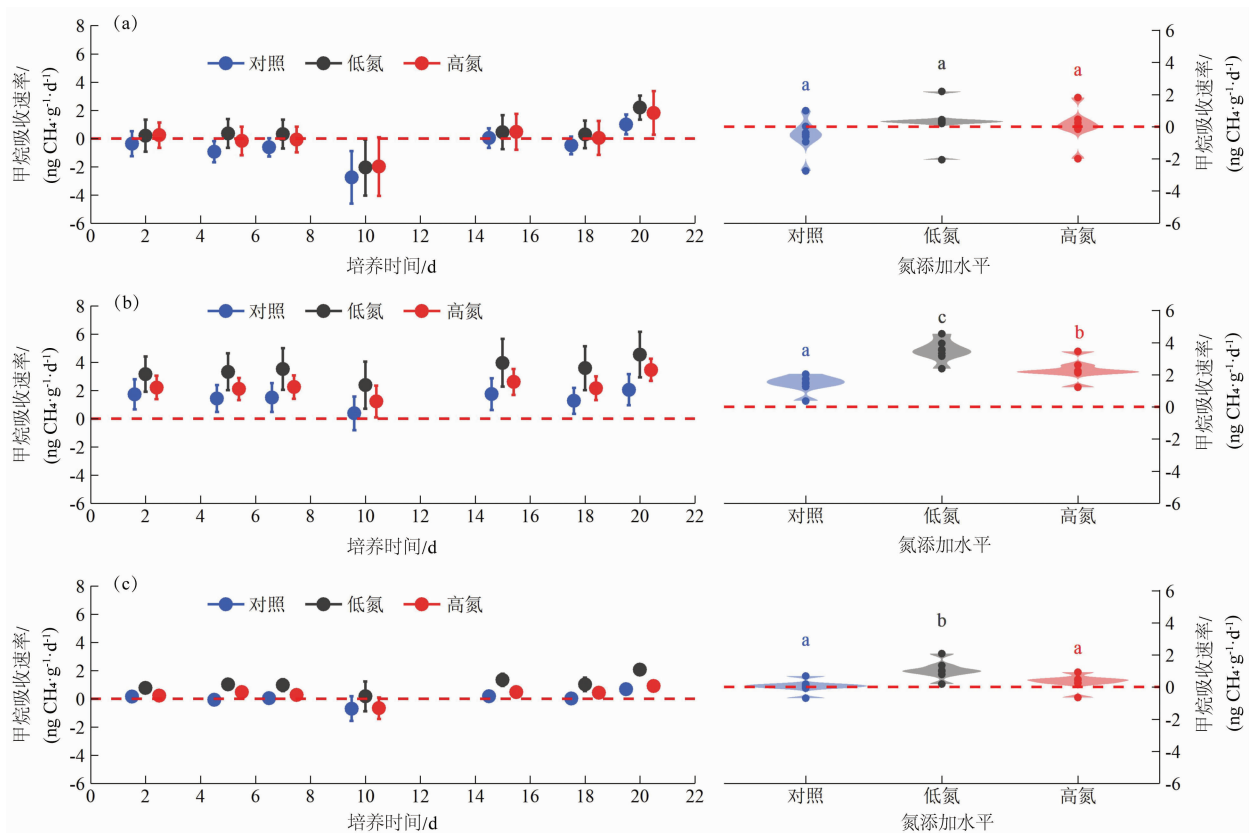
### 2.3 氮添加水平对不同深度土壤 $\text{CH}_4$ 吸收速率的影响

氮添加对土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率的影响与土壤深度和氮添加水平密切相关。有机层的土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率在三种氮添加处理下没有显著差异(图 2a),而矿质层土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率明显受到氮添加水平的影响。施氮后矿质层 0~5 cm 的土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率显著升高( $P < 0.05$ ),其中低氮添加对矿质层

0~5 cm 的土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率的促进效果较高氮添加更明显(图 2b)。低氮添加同样促进了矿质层 5~10 cm 的土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率( $P < 0.05$ ),然而高氮添加对矿质层 5~10 cm 的土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率无显著影响(图 2c)。

### 2.4 氮添加对不同土层土壤 $\text{CH}_4$ 氧化相关基因丰度的影响

测定了 *mmoX* 和 *pmoA* 两种  $\text{CH}_4$  氧化功能基因。结果显示两种功能基因都具有随土壤深度递增的规律,特别是对照处理中,仅在矿质层土壤中检测到了 *mmoX* 和 *pmoA*,而在有机层土壤中并未检出。氮添加增加了各层土壤 *mmoX*(图 3a)和 *pmoA*(图 3b)基因的相对丰度( $P < 0.05$ ),特别是有机层土壤三种功能基因的相对丰度随氮添加水平显著提高。矿质层土壤 *mmoX* 和 *pmoA* 基因相对丰度也随着氮添加水平的加大而增加,其中 0~5 cm 土壤的增加



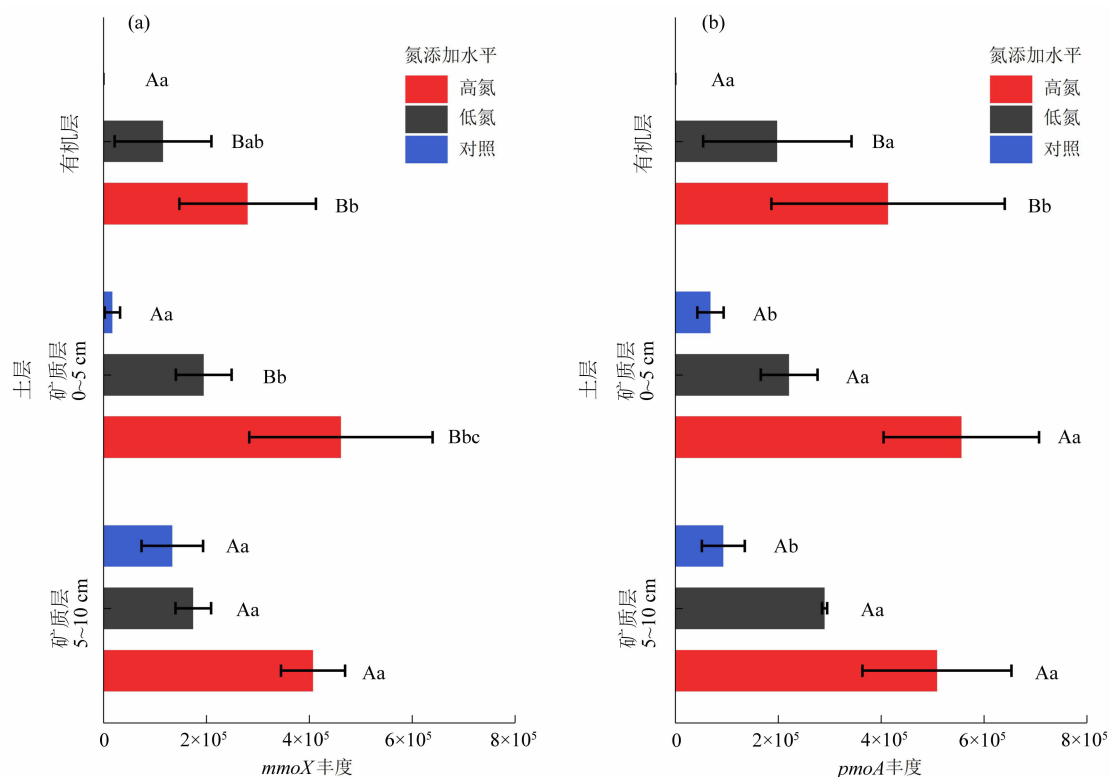
不同小写字母代表土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率在同一土壤深度不同氮添加处理下存在显著差异( $P < 0.05$ ),相同小写字母代表土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率在同一土壤深度不同氮添加处理下无显著差异;阴影部分反映了数据集中样本点的分布情况。

图 2 不同深度土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率对氮添加水平的差异性响应:

(a) 有机层; (b) 矿质层 0~5 cm; (c) 矿质层 5~10 cm

Fig. 2 Differential response of  $\text{CH}_4$  uptake rates to nitrogen addition levels in different soil depths:

(a) organic layer; (b) mineral layer 0~5 cm; (c) mineral layer 5~10 cm



大写字母代表同一深度土壤不同氮添加水平间的显著性差异,小写字母代表同一氮添加处理下不同深度土层土壤的显著性差异。

图3 不同氮添加处理下不同深度土壤  $\text{CH}_4$  氧化功能基因的相对丰度:(a) *mmoX*;(b) *pmoA*

Fig. 3 Relative abundance of  $\text{CH}_4$  oxidation function genes in different soil depths under different nitrogen addition treatments: (a) *mmoX*; (b) *pmoA*

趋势更明显。

## 2.5 氮添加下土壤 $\text{CH}_4$ 吸收潜力与土壤性质的相关分析

为进一步探讨土壤  $\text{CH}_4$  吸收的主要调控因素,进行了土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率与土壤理化性质的相关分析。土壤理化性质与土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率均无显著相关性( $P > 0.05$ ,图4)。然而,值得一提的是,土壤有机碳含量和铵态氮浓度与土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率有弱负相关关系( $0.05 < P < 0.1$ )。

矿质层土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率与  $\text{CH}_4$  氧化功能基因相对丰度的相关分析结果显示,对照和低氮处理中矿质层土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率与 *mmoX* 和 *pmoA* 基因丰度均呈显著正相关( $P < 0.05$ ,图5),表明这两个处理中矿质土壤  $\text{CH}_4$  吸收与  $\text{CH}_4$  氧化功能基因丰度密切相关;而高氮处理土壤降低了二者相关关系的显著性(数据未显示),可能与其较高的铵态氮浓度抑制  $\text{CH}_4$  吸收有关。此外,有机层  $\text{CH}_4$  吸收与  $\text{CH}_4$  氧化功能基因丰度无显著相关关

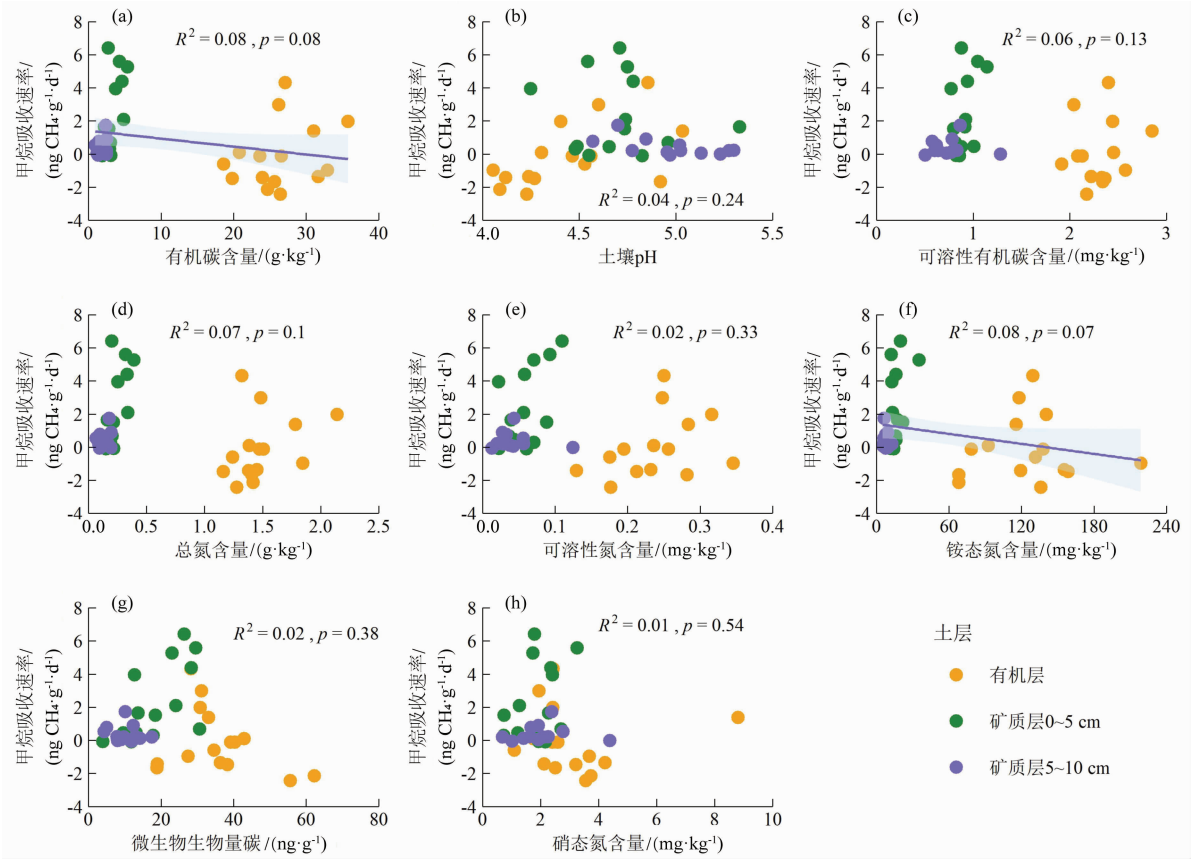
系( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 不同深度土壤 $\text{CH}_4$ 吸收差异的影响因子

与以前的一些研究<sup>[45-47]</sup>结果一致,本研究发现有有机层土壤  $\text{CH}_4$  吸收很少,有时甚至表现为  $\text{CH}_4$  产生。有机层土壤  $\text{CH}_4$  吸收微弱主要有两点原因:一是土壤表层的  $\text{CH}_4$  氧化微生物活性非常低或完全缺乏  $\text{CH}_4$  氧化活性<sup>[48-50]</sup>;二是有机层中高浓度的  $\text{NH}_4^+$  对  $\text{CH}_4$  氧化酶的抑制作用<sup>[31,51-53]</sup>。一方面,本研究并未在有机层检测出 *mmoX* 或 *pmoA* 等  $\text{CH}_4$  氧化功能基因,结果表明  $\text{CH}_4$  氧化相关功能基因的缺失可能是有机层缺乏  $\text{CH}_4$  吸收的重要原因。另一方面,结果显示在有机层检测到了最大的  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  浓度(表1),而较高浓度的  $\text{NH}_4^+$  与  $\text{CH}_4$  竞争  $\text{CH}_4$  单加氧酶上的活性位点,从而抑制  $\text{CH}_4$  氧化<sup>[22,54]</sup>。





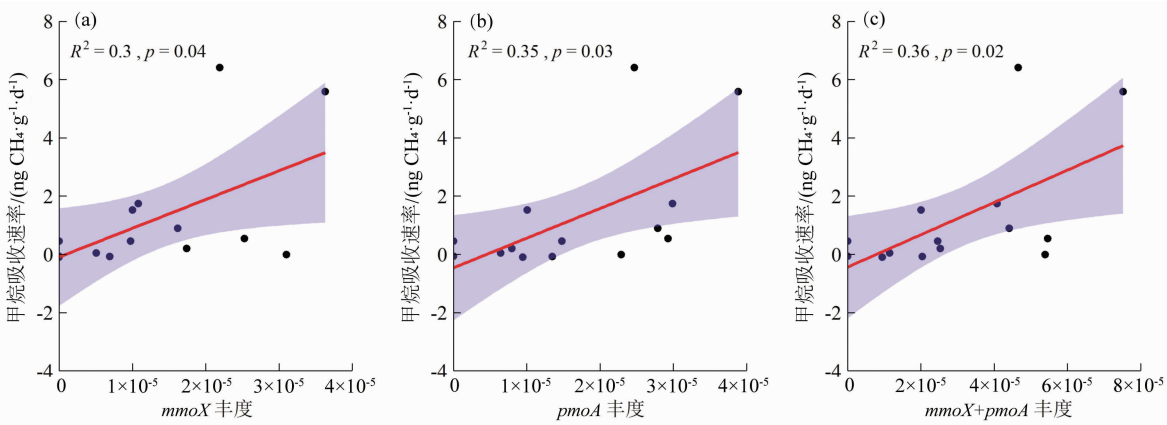
紫线表示土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率与土壤理化性质的相关关系的拟合线;灰色区域表示 95% 置信区间。

图 4 土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率与土壤理化性质的相关分析:(a) 土壤有机碳;(b) 土壤 pH;

(c) 可溶性有机碳;(d) 土壤总氮;(e) 可溶性氮;(f) 土壤铵态氮;(g) 土壤微生物生物量碳;(h) 土壤硝态氮

Fig.4 Correlation analysis between soil CH<sub>4</sub> uptake rates and soil physicochemical properties:

(a) soil organic carbon; (b) soil pH; (c) dissolved organic carbon; (d) total soil nitrogen; (e) dissolved nitrogen; (f) soil ammonium nitrogen; (g) soil microbial biomass carbon; (h) soil nitrate nitrogen



红线表示土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率与 CH<sub>4</sub> 氧化功能基因相对丰度的相关关系的拟合线;紫色区域表示 95% 置信区间。

图 5 对照和低氮处理下矿质层土壤 CH<sub>4</sub> 吸收速率与 CH<sub>4</sub> 氧化功能基因相对丰度的相关关系:

(a) *mmoX*; (b) *pmoA*; (c) *mmoX* + *pmoA*

Fig.5 Correlation between CH<sub>4</sub> uptake rates and relative abundance of CH<sub>4</sub> oxidation function genes in mineral layer soil under control and low nitrogen treatments: (a) *mmoX*; (b) *pmoA*; (c) *mmoX* + *pmoA*

贡嘎山东坡针叶林土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率在矿质表层(0~5 cm)最大,这与不少研究结论<sup>[45,50,55-56]</sup>一致。然而,亦有报道<sup>[51,57]</sup>显示最大土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率发生在矿质次表层,这与本文结果不同,分析发现前人研究采用的土壤深度间隔与本文略有差异,这个可能是造成结论不一致的重要原因。例如,有研究<sup>[48]</sup>每隔 2 cm 测定不同深度的土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率,发现在土壤深度为 2~4 cm 处具有最大的  $\text{CH}_4$  吸收速率,而本文 0~5 cm 土壤深度区间囊括了前文研究的表层和次表层土壤,因此土壤最大  $\text{CH}_4$  吸收速率在矿质表层(0~5 cm)并非例外。此外,气候带、森林类型、土壤特性等因素的差异也可能是造成不同森林土壤  $\text{CH}_4$  吸收剖面分布规律差异的原因<sup>[57]</sup>。

回归分析结果显示,矿质表层土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率与  $\text{CH}_4$  氧化功能基因相对丰度显著相关( $P < 0.05$ )。研究表明, $\text{CH}_4$  氧化相关的功能基因相对丰度是表征土壤  $\text{CH}_4$  吸收潜力的重要因子<sup>[58]</sup>,土壤  $\text{CH}_4$  氧化菌活性是影响土壤  $\text{CH}_4$  吸收潜力的根本原因<sup>[59-60]</sup>。山毛榉和云杉林土壤对大气  $\text{CH}_4$  吸收的差异就是由于有机层和矿质层表层土壤中  $\text{CH}_4$  氧化菌的氧化能力不同引起的<sup>[61]</sup>。不同  $\text{CH}_4$  和  $\text{O}_2$  浓度下土壤甲烷氧化菌群落活性和结构的检测结果显示,仅在矿质层表层检测到了 *pmoA*,发现高  $\text{CH}_4$  氧化能力与  $\text{CH}_4$  氧化功能基因丰度呈正相关<sup>[62]</sup>。综上所述,不同深度土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率的差异是由  $\text{CH}_4$  氧化功能基因调控的。

### 3.2 氮添加对不同深度土壤 $\text{CH}_4$ 吸收的影响

本研究结果显示,氮添加对土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率的影响依赖于土壤深度和氮添加水平。氮添加对矿质层 0~5 cm 土壤  $\text{CH}_4$  吸收的促进作用最大,对矿质层 5~10 cm 的影响次之,而对有机层  $\text{CH}_4$  吸收几乎无影响(图 2),部分证实了假说(1)和(2)。由于氮添加没有显著改变土壤理化性质(表 2)且土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率与土壤理化性质相关性较弱(图 4),表明本文培养体系下土壤理化性质对土壤  $\text{CH}_4$  吸收的影响较小。对照和低氮添加处理下,土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率与 *mmoX* 的相对丰度呈显著正相关,进一步证实了假说(2)。

结合上面的讨论,氮添加对矿质层土壤  $\text{CH}_4$  吸收的促进作用可能主要得益于氮添加下  $\text{CH}_4$  氧化

菌相对丰度的提高。虽然氮添加也增加了有机层 *mmoX* 功能基因相对丰度,但氮添加对有机层土壤  $\text{CH}_4$  吸收的促进作用不明显,一方面可能与有机层  $\text{CH}_4$  氧化功能基因丰度变化较小有关;另一方面可能是有机层土壤中过量的  $\text{NH}_4^+$  对  $\text{CH}_4$  吸收的抑制抵消了因功能基因增加而增加的  $\text{CH}_4$  氧化潜力。

虽然高氮比低氮添加更利于增加矿质土壤  $\text{CH}_4$  氧化功能基因丰度(图 3),但高氮添加对  $\text{CH}_4$  吸收速率的促进作用不如低氮添加明显<sup>[63-64]</sup>。在 0~5 cm 矿质层,原因可能是高氮添加相较于低氮添加更利于提高土壤  $\text{NH}_4^+$  的含量,而过量  $\text{NH}_4^+$  与  $\text{CH}_4$  竞争  $\text{CH}_4$  单加氧酶上的活性位点,从而抑制  $\text{CH}_4$  的氧化<sup>[14,65-66]</sup>;然而在 5~10 cm 矿质层, $\text{NH}_4^+$  浓度的变化无法解释低氮比高氮添加具有更强的效应,说明除了土壤  $\text{CH}_4$  氧化功能基因和  $\text{NH}_4^+$  浓度外,其他因素也能影响峨眉冷杉林土壤  $\text{CH}_4$  吸收,需要未来进一步研究。

综上,氮添加显著促进了贡嘎山东坡峨眉冷杉林矿质层土壤  $\text{CH}_4$  吸收,特别是低氮处理的促进作用更强,这与同一实验样地原位连续监测的结论一致<sup>[67]</sup>,表明室内培养实验保留了原位土壤  $\text{CH}_4$  吸收对氮添加的响应规律。在排除植被、控制水分和温度等环境因素的前提下,本研究发现氮添加下土壤  $\text{CH}_4$  吸收与  $\text{CH}_4$  氧化功能基因丰度密切相关,进一步表明  $\text{CH}_4$  氧化菌是揭示氮添加对亚高山森林土壤  $\text{CH}_4$  吸收影响机制的关键切入点。然而,由于室内培养实验无法呈现野外自然环境条件的复杂性,本文的结果具有一定局限性,例如野外长期连续监测显示土壤  $\text{CH}_4$  吸收具有明显的季节动态规律,但室内微宇宙实验和功能基因分析等仅选取了生长季的土壤样品,至多只能回答生长季调控土壤  $\text{CH}_4$  吸收的关键土层、功能基因和影响因子,这些信息是否适用于非生长季土壤  $\text{CH}_4$  吸收亟待进一步研究。此外,虽然森林有机层和矿质层 0~10 cm 土壤氧分压一般较高,但完全好氧培养的方法可能部分高估了  $\text{CH}_4$  吸收潜力,未来需要充分考虑原位氧分压和水分条件、利用原状土柱进行微宇宙实验。

## 4 结论

通过对不同氮添加水平和不同深度的亚高山针叶林土壤  $\text{CH}_4$  吸收速率的分析,可得出如下结论:



(1) 贡嘎山东坡亚高山针叶林不同深度土壤的  $\text{CH}_4$  吸收潜力存在差异, 0 ~ 5 cm 矿质层土壤展示出最大的  $\text{CH}_4$  吸收潜力, 对照处理下, 其平均  $\text{CH}_4$  吸收速率为  $1.44 \text{ ng CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 5 ~ 10 cm 矿质层次之, 而有机层几乎没有  $\text{CH}_4$  吸收。 $\text{CH}_4$  氧化和氨氧化相关功能基因丰度可以部分解释不同深度土壤  $\text{CH}_4$  吸收潜力。

(2) 氮添加影响土壤  $\text{CH}_4$  吸收潜力, 但影响强度依赖于土壤深度和氮添加水平, 氮添加对矿质层 0 ~ 5 cm 土壤  $\text{CH}_4$  吸收影响最大, 对有机层和矿质层 5 ~ 10 cm 的  $\text{CH}_4$  吸收影响较小, 但高氮添加对矿质表层土壤  $\text{CH}_4$  吸收的促进作用不如低氮添加明显。就此推测, 伴随着大气氮沉降水平的上升, 氮添加对森林土壤  $\text{CH}_4$  吸收能力的促进作用会减弱, 甚至会消失。

## 参考文献 (References)

- [1] ETHERIDGE D M, STEELE L P, FRANCEY R J, et al. Atmospheric methane between 1000 AD and present: Evidence of anthropogenic emissions and climatic variability [J]. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 1998, **103**(D13): 15979 – 15993. DOI: 10.1029/98JD00923
- [2] KIRSCHKE S, BOUSQUET P, CIAIS P, et al. Three decades of global methane sources and sinks [J]. *Nature Geoscience*, 2013, **6**(10): 813 – 823. DOI: 10.1038/NCEO1955
- [3] FLETCHER S E M, SCHAEFER H. Rising methane: A new climate challenge [J]. *Science*, 2019, **364**(6444): 932 – 933. DOI: 10.1126/science.aax1828
- [4] FRANKENBERG C, MEIRINK J F, VAN WEELE M, et al. Assessing methane emissions from global space-borne observations [J]. *Science*, 2005, **308**(5724): 1010 – 1014. DOI: 10.1126/science.1106644
- [5] MYHRE G, SHINDELL D, BRÉON FM, et al. Anthropogenic and natural radiative forcing [G]//STOCKER T F, QIN Dahe, PLATTNER G K, et al. *Climate change 2013: The physical science basis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2013: 659 – 740.
- [6] SAUNOIS M, STAVERT A R, POULTER B, et al. The global methane budget 2000 – 2017 [J]. *Earth System Science Data*, 2020, **12**(3): 1561 – 1623. DOI: 10.5194/essd – 12 – 1561 – 2020
- [7] DENMAN K L, BRASSEUR G, CHIDTHAISONG A, et al. Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry [G]//SOLOMON S, QIN Dahe, MANNING M, et al. *Climate change 2007: The physical science basis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007: 499 – 587.
- [8] FENG Huili, GUO Jiahuan, PENG Changhui, et al. Global estimates of forest soil methane flux identify a temperate and tropical forest methane sink [J]. *Geoderma*, 2023, **429**: 116239. DOI: 10.1016/J.GEODERMA.2022.116239
- [9] MEUNIER C L, GUNDALE M J, SÁNCHEZ I S, et al. Impact of nitrogen deposition on forest and lake food webs in nitrogen - limited environments [J]. *Global Change Biology*, 2016, **22**(1): 164 – 179. DOI: 10.1111/gcb.12967
- [10] GRUBER N, GALLOWAY J N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle [J]. *Nature*, 2008, **451**(7176): 293 – 296. DOI: 10.1038/nature06592
- [11] 何姗, 刘娟, 姜培坤, 等. 全球变化对森林土壤甲烷吸收的影响及其机制研究进展[J]. *应用生态学报*, 2019, **30**(2): 677 – 684. [HE Shan, LIU Juan, JIANG Peikun, et al. Effects of global change on methane uptake in forest soils and its mechanisms: A review [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, **30**(2): 677 – 684 ] DOI: 10.13287/j.1001 – 9332.201902.028
- [12] 程淑兰, 方华军, 于贵瑞, 等. 森林土壤甲烷吸收的主控因子及其对增氮的响应研究进展[J]. *生态学报*, 2012, **32**(15): 4914 – 4923. [CHENG Shulan, FANG Huajun, YU Guirui, et al. The primary factors controlling methane uptake from forest soils and their responses to increased atmospheric nitrogen deposition: A review [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, **32**(15): 4914 – 4923 ] DOI: 10.5846/stxb201111101703
- [13] ZHANG Wei, MO Jiangming, ZHOU Guoyi, et al. Methane uptake responses to nitrogen deposition in three tropical forests in southern China [J]. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 2008, **113**: D11116. DOI: 10.1029/2007JD009195
- [14] XIA Nan, DU Enzai, WU Xinhui, et al. Effects of nitrogen addition on soil methane uptake in global forest biomes [J]. *Environmental Pollution*, 2020, **264**: 114751. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114751
- [15] WU Fangtao, PENG Changhui, WANG Chuanyao, et al. Responses of soil  $\text{CH}_4$  fluxes to nitrogen addition in two tropical montane rainforests in southern China [J]. *Forest Ecosystems*, 2022, **9**: 100031. DOI: 10.1016/j.fecs.2022.100031
- [16] 莫江明, 方运霆, 徐国良, 等. 鼎湖山苗圃和主要森林土壤  $\text{CO}_2$  排放和  $\text{CH}_4$  吸收对模拟 N 沉降的短期响应[J]. *生态学报*, 2005, **25**(4): 682 – 690. [MO Jiangming, FANG Yunting, XU Guoliang, et al. The short-term responses of soil  $\text{CO}_2$  emission and  $\text{CH}_4$  uptake to simulated N deposition in nursery and forests of Dinghushan in subtropical China [J]. *Acta Ecologica Sinica*. 2005, **25**(4): 682 – 690 ] DOI: 10.3321/j.issn:1000 – 0933.2005.04.005
- [17] BORKEN W, BRUMME R. Methane uptake by temperate forest soils [J]. *Functioning and Management of European Beech Ecosystems*, 2009: 369 – 385. DOI: 10.1007/978 – 3 – 642 – 00340 – 0 – 19
- [18] AMBUS P, ROBERTSON G P. The effect of increased N deposition on nitrous oxide, methane and carbon dioxide fluxes

- from unmanaged forest and grassland communities in Michigan [J]. *Biogeochemistry*, 2006, **79**: 315 – 337. DOI: 10.1007/s10533-005-5313-x
- [19] GULLEDGE J, HRYWNA Y, CAVANAUGH C, et al. Effects of long-term nitrogen fertilization on the uptake kinetics of atmospheric methane in temperate forest soils [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **49**(3): 389 – 400. DOI: 10.1016/S0168-6496(04)00149-7
- [20] PENG Yuanrui, WANG Tao, CHANG Ruiying. An increasing trend of inorganic nitrogen deposition across montane regions of China [J]. *Atmospheric Environment*, 2023, **304**: 119780. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2023.119780
- [21] LE MER J, ROGER P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2001, **37**(1): 25 – 50. DOI: 10.1016/S1164-5563(01)01067-6
- [22] BODELIER P L E, LAANBROEK H J. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **47**(3): 265 – 277. DOI: 10.1016/S0168-6496(03)00304-0
- [23] 张丹丹, 莫柳莹, 陈新, 等. 氮沉降对温带森林土壤甲烷氧化菌的影响 [J]. *生态学报*, 2017, **37**(24): 8254 – 8263. [ZHANG Dandan, MO Liuying, CHEN Xin, et al. Effects of nitrogen addition on Methanotrophs in temperate forest soil [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, **37**(24): 8254 – 8263] DOI: 10.5846/stxb201701080064
- [24] 邓湘雯, 杨晶晶, 陈槐, 等. 森林土壤氧化(吸收) 甲烷研究进展 [J]. *生态环境学报*, 2012, **21**(3): 577 – 583. [DENG Xiangwen, YANG Jingjing, CHEN Huai, et al. Advances in the research of methane oxidation in forest soils [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, **21**(3): 577 – 583] DOI: 10.3969/j.issn.1674-5906.2012.03.031
- [25] TIAN Jing, DUNGAIT J A J, LU Xiankai, et al. Long - term nitrogen addition modifies microbial composition and functions for slow carbon cycling and increased sequestration in tropical forest soil [J]. *Global Change Biology*, 2019, **25**(10): 3267 – 3281. DOI: 10.1111/gcb.14750
- [26] ZHOU Zhenghu, WANG Chuankuan, ZHENG Mianhai, et al. Patterns and mechanisms of responses by soil microbial communities to nitrogen addition [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, **115**: 433 – 441. DOI: 10.1016/j.soilbio.2017.09.015
- [27] 王晶苑, 张心昱, 温学发, 等. 氮沉降对森林土壤有机质和凋落物分解的影响及其微生物学机制 [J]. *生态学报*, 2013, **33**(5): 1337 – 1346. [WANG Jingyuan, ZHANG Xinyu, WEN Xuefa, et al. The effect of nitrogen deposition on forest soil organic matter and litter decomposition and the microbial mechanism [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, **33**(5): 1337 – 1346] DOI: 10.5846/stxb201204300621
- [28] 方华, 莫江明. 氮沉降对森林凋落物分解的影响 [J]. *生态学报*, 2006, **26**(9): 3127 – 3136. [FANG Hua, MO Jiangming. Effects of nitrogen deposition on forest litter decomposition [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, **26**(9): 3127 – 3136] DOI: 10.3321/j.issn:1000-0933.2006.09.043
- [29] JOHNSON J, PANNATIER G E, CARNICELLI S, et al. The response of soil solution chemistry in European forests to decreasing acid deposition [J]. *Global Change Biology*, 2018, **24**(8): 3603 – 3619. DOI: 10.1111/gcb.14156
- [30] KING G M, ADAMSEN A P S. Effects of temperature on methane consumption in a forest soil and in pure cultures of the methanotroph *Methylobacterium rubra* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**(9): 2758 – 2763. DOI: 10.1128/AEM.58.9.2758-2763.1992
- [31] 梁战备, 史奕, 王琛瑞, 等. 长白山阔叶红松林不同深度森林土壤 CH<sub>4</sub> 氧化研究 [J]. *应用生态学报*, 2003, **14**(12): 2269 – 2272. [LIANG Zhanbei, SHI Yi, WANG Chenrui, et al. Methane oxidation in soil profiles of broad-leaved Korean pine mixed forest in Changbai Mountain [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, **14**(12): 2269 – 2272] DOI: 10.13287/j.1001-9332.2003.0501
- [32] 刘洋炎, 王尚, 厉舒祯, 等. 基于功能基因的微生物碳循环分子生态学研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2017, **44**(7): 1676 – 1689. [LIU Yangying, WANG Shang, LI Shuzhen, et al. Advances in molecular ecology on microbial functional genes of carbon cycle [J]. *Microbiology China*, 2017, **44**(7): 1676 – 1689] DOI: 10.13344/j.microbiol.china.160941
- [33] 尹明珍, 郭婉玑, 朱晓敏, 等. 氮沉降下西南亚高山针叶林生长的养分限制特征 [J]. *应用与环境生物学报*, 2021, **27**(1): 1 – 7. [YIN Mingzhen, GUO Wanji, ZHU Xiaomin, et al. Nutrient limiting characteristics of subalpine coniferous forests under conditions of nitrogen deposition in the southwest mountains of China [J]. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2021, **27**(1): 1 – 7] DOI: 10.19675/j.cnki.1006-687x.2020.07040
- [34] CHANG Ruiying, LI Na, SUN Xiangyang, et al. Nitrogen addition reduces dissolved organic carbon leaching in a montane forest [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, **127**: 31 – 38. DOI: 10.1016/j.soilbio.2018.09.006
- [35] CHENG Yi, WANG Jing, CHANG S X, et al. Nitrogen deposition affects both net and gross soil nitrogen transformations in forest ecosystems: A review [J]. *Environmental Pollution*, 2019, **244**: 608 – 616. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.10.054
- [36] TIAN Di, DU Enzai, JIANG Lai, et al. Responses of forest ecosystems to increasing N deposition in China: A critical review [J]. *Environmental Pollution*, 2018, **243**: 75 – 86. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.08.010
- [37] DU Enzai, JIANG Yuan, FANG Jingyun, et al. Inorganic nitrogen deposition in China's forests: Status and characteristics [J].

- Atmospheric Environment, 2014, **98**: 474–482. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2014.09.005
- [38] YU Guirui, JIA Yanlong, HE Nianpeng, et al. Stabilization of atmospheric nitrogen deposition in China over the past decade [J]. Nature Geoscience, 2019, **12**(6): 424–429. DOI: 10.1038/s41561-019-0352-4
- [39] BITTELLI M. Measuring soil water content: A review [J]. Hortechonology, 2011, **21**(3): 293–300. DOI: 10.1016/j.scienta.2011.03.038
- [40] MULVANEY R L. Nitrogen-inorganic forms [J]. Methods of Soil Analysis; Part 3 Chemical Methods, 1996, **5**: 1123–1184. DOI: 10.2136/sssabookser5.3.c38
- [41] ZHENG Bangxiao, ZHU Yongguan, SARDANS J, et al. QMEC: A tool for high-throughput quantitative assessment of microbial functional potential in C, N, P, and S biogeochemical cycling [J]. Science China: Life Sciences, 2018, **61**: 1451–1462. DOI: 10.1007/s11427-018-9364-7
- [42] URMANN K, SCHROTH M H, ZEYER J. Recovery of in-situ methanotrophic activity following acetylene inhibition [J]. Biogeochemistry, 2008, **89**: 347–355. DOI: 10.1007/s10533-008-9223-6
- [43] BATES D. Lme4: Linear Mixed-Effects Models Using ‘Eigen’ and S4. R package version 1.1–34 [DB/OL]. [2022-11-01]. <https://cran.r-project.org/web/packages/lme4/index.html>
- [44] LENTH R. Emmeans: Estimated Marginal Means, Aka Least-Squares Means. R package version 1.8.2 [DB/OL]. [2022-11-01]. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- [45] SAARI A, HEISKANEN J, MARTIKAINEN P J. Effect of the organic horizon on methane oxidation and uptake in soil of a boreal Scots pine forest [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, **26**(3): 245–255. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1998.tb00509.x
- [46] ISHIZUKA S, SAKATA T, ISHIZUKA K. Methane oxidation in Japanese forest soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, **32**(6): 769–777. DOI: 10.1016/S0038-0717(99)00200-X
- [47] BORKEN W, BEESE F. Methane and nitrous oxide fluxes of soils in pure and mixed stands of European beech and Norway spruce [J]. European Journal of Soil Science, 2006, **57**(5): 617–625. DOI: 10.1111/j.1365-2389.2005.00752.x
- [48] KOSCHORRECK M, CONRAD R. Oxidation of atmospheric methane in soil: Measurements in the field, in soil cores and in soil samples [J]. Global Biogeochemical Cycles, 1993, **7**(1): 109–121. DOI: 10.1029/92GB02814
- [49] ANGEL R, CONRAD R. In situ measurement of methane fluxes and analysis of transcribed particulate methane monooxygenase in desert soils [J]. Environmental Microbiology, 2009, **11**(10): 2598–2610. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01984.x
- [50] TERÁN E J, PRIANO M E, JULIARENA M P, et al. Pine afforestation improves the biological soil attributes linked to methane oxidation in a temperate zone of Argentina [J]. Cerne, 2022, **28**: e-102967. DOI: 10.1590/0104776020228012967
- [51] CAI Zucong, YAN Xiaoyuan. Kinetic model for methane oxidation by paddy soil as affected by temperature, moisture and N addition [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, **31**(5): 715–725. DOI: 10.1016/S0038-0717(98)00170-9
- [52] WANG Zhiping, INESON P. Methane oxidation in a temperate coniferous forest soil: Effects of inorganic N [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, **35**(3): 427–433. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.06.002
- [53] MAURER D, KOLB S, HAUMAIER L, et al. Inhibition of atmospheric methane oxidation by monoterpenes in Norway spruce and European beech soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, **40**(12): 3014–3020. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.08.023
- [54] SCHNELL S, KING G M. Mechanistic analysis of ammonium inhibition of atmospheric methane consumption in forest soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(10): 3514–3521.
- [55] STEINKAMP R, BUTTERBACH-BAHL K, PAPEN H. Methane oxidation by soils of an N limited and N fertilized spruce forest in the Black Forest, Germany [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, **33**(2): 145–153. DOI: 10.1128/AEM.60.10.3514-3521.1994
- [56] SABREKOV A F, DANILOVA O V, TEREENTIEVA I E, et al. Atmospheric methane consumption and methanotroph communities in west Siberian Boreal upland forest ecosystems [J]. Forests, 2021, **12**(12): 1738. DOI: 10.3390/f12121738
- [57] 张金凤, 杨智杰, 谢锦升, 等. 两种亚热带森林土壤甲烷氧化活性的垂直分布特征[J]. 亚热带资源与环境学报, 2015, **10**(4): 1–7. [ZHANG Jinfeng, YANG Zhijie, XIE Jinsheng, et al. Vertical distribution of methane oxidation activity in two subtropical forest soils [J]. Journal of Subtropical Resources and Environment, 2015, **10**(4): 1–7] DOI: 10.3969/j.issn.1673-7105.2015.04.001
- [58] LI Quan, PENG Changhui, ZHANG Junbo, et al. Nitrogen addition decreases methane uptake caused by methanotroph and methanogen imbalances in a Moso bamboo forest [J]. Scientific Reports, 2021, **11**(1): 1–14. DOI: 10.1038/s41598-021-84422-3
- [59] 孙万龙, 孙志高, 孙文广, 等. 黄河口潮滩湿地土壤 CH<sub>4</sub> 氧化潜力及其对有机物输入的响应[J]. 草业学报, 2014, **23**(1): 104–112. [SUN Wanlong, SUN Zhigao, SUN Wenguang, et al. The methane oxidation potential of soils in tidal marshes of the Yellow River Estuary and its response to import of organic matter [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2014, **23**(1): 104–112] DOI: 10.11686/cyxb20140113
- [60] 杨铭德, 焦燕, 李新, 等. 外源盐对不同盐碱程度土壤 CH<sub>4</sub> 吸收潜力的影响[J]. 环境科学学报, 2017, **37**(2): 737–746. [YANG Mingde, JIAO Yan, LI Xin, et al. Influence of exogenous

- salt on  $\text{CH}_4$  absorption potential indifferent saline-alkaline soils [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, **37** (2): 737 – 746] DOI: 10.13671/j. hjkxb. 2016. 0162
- [61] DEGELMANN D M, BORKEN W, DRAKE H L, et al. Different atmospheric methane-oxidizing communities in European beech and Norway spruce soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, **76** (10): 3228 – 3235. DOI: 10.1128/AEM.02730 – 09
- [62] HENCKEL T, ROSLEV P, CONRAD R. Effects of  $\text{O}_2$  and  $\text{CH}_4$  on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil [J]. *Environmental Microbiology*, 2000, **2** (6): 666 – 679. DOI: 10.1046/j. 1462 – 2920. 2000. 00149. x
- [63] LIU Junhua, XU Yunjian, ZHU Yingmo, et al. Enhanced soil methane oxidation in both organic layer and topsoil during the succession of subtropical forests [J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2023, **170**: 865 – 876. DOI: 10.1016/j. psep. 2022. 12. 064
- [64] WAGNER D, LIPSKI A, EMBACHER A, et al. Methane fluxes in permafrost habitats of the Lena Delta: Effects of microbial community structure and organic matter quality [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, **7** (10): 1582 – 1592. DOI: 10.1111/J. 1462 – 2920. 2005. 00849. x
- [65] 齐润杰, 陈金霞, 但建国. 外源氮对琼北不同类型土壤甲烷氧化能力的影响 [J]. *热带作物学报*, 2016, **37** (8): 1534 – 1539. [QI Runjie, CHEN Jinxia, DAN Jianguo. Effects of exogenous nitrogen on methane oxidation in upland soils of different types in northern Hainan Island [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, **37** (8): 1534 – 1539] DOI: 10.3969/j. issn. 1000 – 2561. 2016. 08. 015
- [66] MISHRA V K, SHUKLA R, SHUKLA P N. Inhibition of soil methane oxidation by fertilizer application: An intriguing but persistent paradigm [J]. *Environmental Pollution and Protection*, 2018, **3** (2): 57 – 69. DOI: 10.22606/epp. 2018. 32001
- [67] CHANG Ruiying, LIU Xinyu, WANG Tao, et al. Stimulated or inhibited response of methane flux to nitrogen addition depends on nitrogen levels [J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2021, **126** (11): e2021JG006600. DOI: 10.1029/2021JG006600

## Effects of Nitrogen Addition on Soil Methane Uptake Potentials at Different Depths of a Subalpine Coniferous Forest in Southwest China

LIU Xinyu<sup>1,2</sup>, AO Jing<sup>1,2</sup>, WANG Tao<sup>1\*</sup>, CHANG Ruiying<sup>1</sup>

(1. *Institute of Mountain Hazards and Environment, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;*

2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract:** Forest soils are important atmospheric  $\text{CH}_4$  sinks. Nitrogen addition may increase, inhibit, or not affect  $\text{CH}_4$  uptake in forest soils. Subalpine coniferous forests are the mainstay of forests in southwest China, which are largely affected by elevated atmospheric nitrogen (N) deposition. Unfortunately, there was not adequate research on the effect of nitrogen addition on  $\text{CH}_4$  absorption in subalpine coniferous forest soil. Previous studies mostly concerned about the general functions of N deposition on  $\text{CH}_4$  uptake as per a whole soil profile; however, the distribution of soil  $\text{CH}_4$  uptake potential at different soil depths and how it is affected by N deposition had remained unclear.

In this study, simulated N deposition (i. e. N addition) experiments were conducted at a plot of typical subalpine coniferous forest located at the east flank of Mt. Gongga, southwest China to explore the effect of N addition on soil  $\text{CH}_4$  uptake potential at different soil depths; soil samples were collected from organic layers, 0 – 5 cm and 5 – 10 cm mineral layers, separately and then incubated under controlled laboratory conditions (60% of water holding capacity, aerobically at 20 °C in dark). Soil physicochemical properties and the abundance of microbial functional genes associated with  $\text{CH}_4$  oxidation were determined to reveal the factors regulating  $\text{CH}_4$  uptake.

It had following findings. (1) By the same quantity of nitrogen addition,  $\text{CH}_4$  uptake rate varied along soil depths, with the highest value observed at a depth of 0 – 5 cm in the mineral layer, followed by 5 – 10 cm in the mineral layer, and the lowest rate to be found in the organic layer. Nitrogen addition did not change the vertical distribution of soil  $\text{CH}_4$  absorption potential profile. (2) N addition had no significant ( $P > 0.05$ ) effect on  $\text{CH}_4$  uptake rate in the organic layer, but it worked in the mineral layers. Compared to the control group, in the depth of 0 – 5 cm mineral soil low N ( $8 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ ) addition and high N ( $40 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ ) addition promoted  $\text{CH}_4$  uptake by 142% and 58% , respectively , whereas in 5 – 10 cm soil their promotion were 2550% and 650% , respectively. (3) The abundance of  $\text{CH}_4$  oxidation functional genes played an important role in regulating the uptake rate of  $\text{CH}_4$  in different soil layers. And higher concentrations of ammonium could weaken the relationship between the abundance of functional genes and the uptake rate of  $\text{CH}_4$ .

This study deepens an understanding of the effect of N addition on soil  $\text{CH}_4$  uptake in typical subalpine forests soils in southwestern China, and provides a scientific basis for accounting of  $\text{CH}_4$  sink in regional forest soils under the background of atmospheric nitrogen deposition.

**Key words:** nitrogen deposition; forest soil; methane oxidation; microbial functional genes; Mt. Gongga

(责任编辑 钟雨倩)