

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Department of Agricultural Chemistry  
College of Bioresources and Agriculture  
National Taiwan University



Master Thesis

不同生物炭對紅壤的化學性質  
與微生物活性及族群之影響

The effects of different biochars on red soil  
chemical properties, microbial activity, and  
community structure

黃昭穎

Zhao-Ying Huang

指導教授：鍾仁賜 博士

Advisor: Ren-Shih Chung, Ph.D.

中華民國 104 年 7 月

July, 2015

## 誌謝



兩年的光陰稍縱即逝，此刻將結束碩士班的生涯，過程中有太多的感謝，遇見太多人貴人與友人，這不是可以獨自完成的論文，是因為有你們。

非常感謝恩師鍾仁賜老師。「兩年是虛度或充實，由你自己選擇」，老師教導的不只是學識，而負責、親力親為的人生的態度，在兩年中更是受到老師的包容與關懷，能夠成為老師最後一屆的學生，實所幸福。

感謝口試委員：陳仁炫老師、張必輝老師、張義宏老師、李達源老師，百忙之中仍抽空給予建議，使我能夠從不同面向去思考問題，並發現許多沒注意到的細節，受益良多，使論文充實且完整。

特別感謝 張義宏學長 義無反顧的指導，在關渡的日子，是實驗中最珍貴的回憶，學長總把我當作自己的學生一樣的教導與關懷，能夠在求學生涯中遇到這樣的貴人，實在幸運。

感謝蘇育菽學姊的瞻前顧後，總是提醒我們許多遺漏的事情，讓我們總能順利的完成許多行政的作業與期限。感謝張必輝學姊，雖然認識短短半年，但是學界真的非常好相處，跟學姊一起上老師的課真的很開心。謝謝金鳳學姊，畢業後依然幫助我解決實驗上的問題。謝謝彥涵學長，不論在實驗上或是未來都給我許多建議。謝謝承翰學長，在實驗與相機都交了我許多。謝謝育歆學姊，讓我在最後關渡實驗以及實驗室外食的日子不孤單。感謝植營好夥伴盧逸，在白熱化的良性競爭中，讓自己各方面都進步許多，在你的一言一行中總能感受到少女情懷，使實驗室不陽剛多了份柔情。感謝勁甫，你的海派與好相處總是讓實驗室的氣氛融洽，從你身上學習到許多與異性相處的訣竅，受益良多。感謝德宏，總是幫忙處理實驗室的 3C 疑難雜症，但還是不得不說豬腳真的神好吃。謝謝鈞憲、朝源，終於能在研究所破冰，緣分太奇妙，很開心在研究所重新認識你們。能夠在又溫馨又歡樂的實驗室，是這兩年最幸福的事情。

感謝中興好朋友：簡柏勛、張傑誠、張穎捷、業佳榮、鄭意真、金蓓伶、林

宜，能夠在研究所繼續做同學真的很開心，儘管忙碌但大家總有一種默契，相互打氣與關心。感謝 R02 快樂夥伴阿貞的醞釀。感謝我的信仰，台大研究生會與研究生企劃室的所有夥伴們，雖然大家都非常忙碌，但是都完成了許多不可思議的事情，在研究生涯中締結了一生共戰的繫絆。


最後，我要感謝我的父母與弟弟，總在身旁支持著我，疲憊的回家總有削好的水果與關心，實驗忙碌無法陪伴也沒有怨言，讓我不論精神或是經濟都無須擔憂，感謝家人。

「我想，這兩年是充實的」，因為全力以赴了，所以沒有遺憾。感謝一路上出現的貴人與友人，沒有你們或許就沒有今天的成果，希望能與你分享，並且送上我最誠摯的感謝與祝福。

昭穎

2015. 08. 20

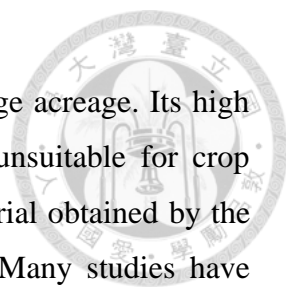
## 摘要



紅壤為台灣地區重要耕作土壤之一，其化學性質常不利於作物栽培，若加以改良，則可利於栽培。生物炭 (biochar) 是生質材料在低氧下，高溫熱裂解而成，具有碳含量高、多孔性結構等特性，不同原物料或熱解溫度會導致生物炭有不同的性質。生物炭可做為土壤改良劑，可促進土壤肥力、作物生長、土壤微生物活性等。本研究之目的為探討五種不同來源之生物炭 (稻殼、柳杉、棕櫚殼與兩種不同粒徑大小之煤灰，施用 2% w/w)，與添加有機質肥料與否的兩種屬性，經由不同時間 (0 天、90 天與 180 天) 對土壤化學性質、生物性質及微生物族群結構的影響。結果顯示，在本試驗之生物炭使用量下，其中和紅壤酸性的能力弱，但使土壤 EC 值下降。15-30  $\mu\text{m}$  粒徑之煤灰生物炭增加土壤總氮，但所有處理之土壤總氮增加並不明顯。土壤有機碳濃度因生物炭添加而增加，顯示生物炭中的有機碳具抗微生物分解能力。稻殼、柳杉、棕櫚殼生物炭提升紅壤中磷、鉀、鈣之有效性，然而，生物炭對土壤鎂、鐵、鋅含量沒有顯著影響，但使土壤銅、錳含量下降。生物炭使未添加有機質肥料之紅壤酵素活性降低，添加有機質肥料之紅壤唯棕櫚殼與煤灰生物炭使活性下降。稻殼、柳杉與棕櫚殼生物炭提高土壤呼吸作用，顯示供給土壤微生物利用之碳源較多，反之，煤灰生物炭降低土壤呼吸作用。呼吸作用亦隨孵育時間越長而下降，顯示生物炭所含之易變動碳只能短暫供應。生物炭對土壤生質氮、生質碳影響不大，對微生物生質量影響小。DGGE 與 PLFA 之結果顯示，添加不同生物炭對群落結構造成不同影響，而隨孵育時間越長，影響群落越明顯，其中又以 15-30  $\mu\text{m}$  粒徑之煤灰生物炭影響最大，而添加有機質肥料對微生物群落結構的影響大於生物炭。本研究說明不同生物炭之添加，會影響土壤的化學性質與生物活性，稻殼、柳杉、棕櫚殼生物炭對紅壤肥力與微生物相改良有較高的潛力，而煤灰則無。

**關鍵字：**土壤酵素、土壤呼吸作用、微生物生質碳、微生物生質氮、磷脂質脂肪酸分析、變性梯度膠體電泳。

## Abstract



Oxisol is an important cultivation soil in Taiwan due to its large acreage. Its high clay content and very acidic property are important reasons for unsuitable for crop cultivation. Biochar is a carbon-rich and porous carbonaceous material obtained by the biomass pyrolysis under anaerobic or oxygen-limited conditions. Many studies have shown that biochar improved soil physical and chemical properties. The different raw materials and pyrolysis temperatures would result in biochars with different properties. The objective of this study was to investigate the effects of different biochars (rice husk biochar (RH), japanese cedar biochar (JC), palm fern shell biochar (PKS), 5-8  $\mu\text{m}$  (SC) and 15-30  $\mu\text{m}$  (LC) particle size of coal ash biochars) on chemical properties, microbial activity and community structure of an Oxisol after different incubation time (0, 90, 180 days) under with or without that organic matter application. The results showed that the biochars were poor to change of soil pH values, however, decreased soil EC value. Biochar of LC increased total nitrogen content of soil and all the biochars applied increased soil organic carbon content. Application of biochar of RH, JC and PKS increased phosphorous, potassium and calcium availability of soil. Application of biochar did not affect soil available magnesium, iron and zinc, however, decreased available copper and manganese. Biochar application resulted in decrease different enzyme activities. With application of organic matter, the biochar PKS and SC decreased soil enzyme activities. Application of RH, JC and PKS biochar increased soil respiration rate, in contrast, biochar SC and LC decreased it. After incubation for 180 days, all biochars decreased soil respiration rate. DGGE and PLFA analyses showed the biochars addition significantly affected microbial community structure after application.

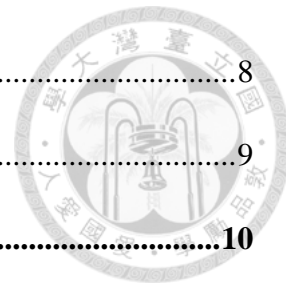
**Key words:** soil microbial activity, soil enzyme, soil respiration, microbial biomass carbon, microbial biomass nitrogen, PLFA, DGGE.

# 目錄



誌謝 .....	ii
摘要 .....	iv
Abstract.....	v
目錄 .....	vi
圖目錄 .....	x
表目錄 .....	xi
第一章 前言 .....	2
第二章 文獻回顧 .....	3
<b>2.1 生物炭 .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 生物炭原料 .....</b>	<b>4</b>
2.2.1 稻殼 .....	4
2.2.2 柳杉 .....	4
2.2.3 棕櫚殼 .....	5
2.2.4 煤灰 .....	5
<b>2.3 土壤酵素 .....</b>	<b>5</b>
2.3.1 去氫酶 .....	6
2.3.2 $\beta$ -醅醣酶 .....	6
2.3.3 尿素酶 .....	7
2.3.4 酸性與鹼性磷酸單酯酶 .....	7
2.3.5 芳香基硫酸酯酶 .....	7

<b>2.4</b>	<b>土壤微生物性質 .....</b>	<b>8</b>
2.4.1	土壤呼吸作用 .....	8
2.4.2	土壤微生物生質碳與氮 .....	9
<b>2.5</b>	<b>土壤微生物群落結構 .....</b>	<b>10</b>
2.5.1	磷脂質脂肪酸分析法 .....	11
2.5.2	DNA 分子序列分析法 .....	13
第三章 材料與方法 .....		14
<b>3.1</b>	<b>土壤與有機質肥料 .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>試驗設計 .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3</b>	<b>生物炭原料 .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4</b>	<b>孵育實驗 .....</b>	<b>15</b>
<b>3.5</b>	<b>樣品處理 .....</b>	<b>16</b>
<b>3.6</b>	<b>生物炭基本性質分析 .....</b>	<b>16</b>
3.6.1	生物炭 pH 與飽和導水度 (Li et al., 2013) .....	16
3.6.2	碳、氮、氫、氧元素含量 (Chen et al., 2014) .....	16
3.6.3	固態核磁共振光譜分析 (Chen et al., 2014) .....	16
<b>3.7</b>	<b>土壤樣品化學性質分析 .....</b>	<b>20</b>
3.7.1	土壤 pH 值：玻璃電極法 (Thomas, 1969) .....	20
3.7.2	土壤飽和水導電度 (Rhoades, 1996) .....	20
3.7.3	土壤有機質與有機碳 (Ball, 1964) .....	20
3.7.4	土壤總氮 (Bremner and Mulvaney, 1982) .....	20
3.7.5	土壤 Mehlich III 可萃取性陽離子 (Mehlich, 1985) .....	21
3.7.6	土壤 Mehlich III 可萃取性磷：鉬藍法 (Murphy and Riley, 1962) .....	21

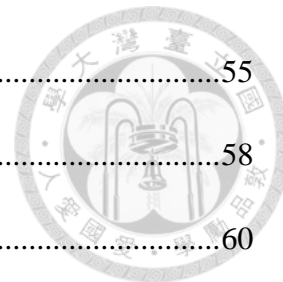


<b>3.8</b>	<b>土壤微生物酵素活性分析 .....</b>	<b>22</b>
3.8.1	去氫酶 (Thalman, 1968) .....	22
3.8.2	$\beta$ -醱糖酶 (Tabatabai, 1982) .....	23
3.8.3	尿素酶 (Kandeler and Gerner, 1988) .....	24
3.8.4	酸性和鹼性磷酸單酯酶 (Tabatabai and Bremner, 1969) .....	25
3.8.5	芳香基硫酸酯酶 (Tabatabai and Bremner, 1970) .....	26
<b>3.9</b>	<b>土壤微生物性質分析 .....</b>	<b>27</b>
3.9.1	土壤呼吸作用 (Jaggi et al., 1976; Alef, 1993) .....	27
3.9.2	土壤微生物生質碳與氮 (Vance et al., 1987) .....	28
<b>3.10</b>	<b>土壤微生物群落結構分析 .....</b>	<b>31</b>
3.10.1	磷脂質脂肪酸分析法 (Bossio et al., 1998) .....	31
3.10.2	DNA 分子序列分析法 .....	33
<b>3.11</b>	<b>統計分析 .....</b>	<b>37</b>
第四章 結果與討論 .....		38
<b>4.1</b>	<b>土壤基本化學性質 .....</b>	<b>38</b>
4.1.1	生物炭對土壤 pH 值之影響 .....	38
4.1.2	生物炭對土壤 EC 值之影響 .....	39
4.1.3	生物炭對土壤有機碳之影響 .....	40
4.1.4	生物炭對土壤總氮之影響 .....	40
4.1.5	生物炭對土壤 Mehlich III 可萃取養分陽離子之影響 .....	45
<b>4.2</b>	<b>土壤微生物性質 .....</b>	<b>49</b>
4.2.1	土壤微生物生質碳與氮 .....	49
4.2.2	土壤呼吸作用 .....	54





<b>4.3</b>	<b>土壤酵素活性 .....</b>	<b>55</b>
4.3.1	去氫酶 .....	55
4.3.2	$\beta$ -配醣酶 .....	58
4.3.3	尿素酶 .....	60
4.3.4	酸性與鹼性磷酸單酯酶 .....	62
4.3.5	芳香基硫酸酯酶 .....	66
<b>4.4</b>	<b>土壤微生物種類及群落結構 .....</b>	<b>68</b>
4.4.1	微生物群落結構：磷脂質脂肪酸分析法 .....	68
4.4.2	微生物群落：DNA 分子序列分析法 .....	79
第五章	結論 .....	88
第六章	參考文獻 .....	89
第七章	附錄 .....	101



## 圖目錄

圖一、所使用五種生物炭之 $^{13}\text{C}$ -NMR 圖譜。 .....	19
圖二、不同生物炭處理下，孵育第 0、90、180 天之去氫酶活性 .....	57
圖三、不同生物炭處理下，孵育第 0、90、180 天之 $\beta$ -配醣酶活性 .....	59
圖四、不同生物炭處理下，孵育第 0、90、180 天之尿素酶活性 .....	61
圖五、不同生物炭處理下，孵育第 0、90、180 天之酸性磷酸單酯酶活性 .....	64
圖六、不同生物炭處理下，孵育第 0、90、180 天之鹼性磷酸單酯酶活性 .....	65
圖七、不同生物炭處理下，孵育第 0、90、180 天之芳香基硫酸酯酶活性 .....	67
圖八、不同生物炭處理下土壤 PLFA 組成對微生物群落結構之主成分分析 .....	76
圖九、不同生物炭處理下土壤 PLFA 組成對微生物群落結構之主成分分析 .....	77
圖十、不同生物炭處理下土壤 PLFA 組成對微生物群落結構之主成分分析 .....	78
圖十一、不同生物炭處理之土壤 16S rRNA 基因之變性梯度膠體電泳圖譜 (第 0 天) .....	80
圖十二、不同生物炭處理之土壤 16S rRNA 基因之主成分分析 (第 0 天).....	81
圖十三、不同生物炭處理之土壤 18S rRNA 基因之變性梯度膠體電泳圖譜 (第 0 天) .....	82
圖十四、不同生物炭處理之土壤 18S rRNA 基因之主成分分析 (第 0 天).....	83
圖十五、不同生物炭處理之土壤 16S rRNA 基因之變性梯度膠體電泳圖譜 (第 180 天).....	84
圖十六、不同生物炭處理之土壤 16S rRNA 基因之主成分分析 (第 180 天).....	85
圖十七、不同生物炭處理之土壤 18S rRNA 基因之變性梯度膠體電泳圖譜 (第 180 天).....	86
圖十八、不同生物炭處理之土壤 18S rRNA 基因之主成分分析 (第 180 天).....	87

## 表目錄

表一、試驗施用有機質肥料之基本性質 .....	14
表二、所使用五種生物炭之一些性質 .....	18
表三、本試驗使用之引子 .....	34
表四、細菌 (16S) 及真菌 (18S) 之聚合酶連鎖反應混合液 .....	34
表五、細菌之 6% acrylamide 變性梯度膠體配製 .....	36
表六、真菌之 7% acrylamide 變性梯度膠體配製 .....	36
表七、變性梯度膠體電泳之電泳條件 .....	37
表八、不同生物炭處理下之土壤基本化學性質 (孵育第 0 天) .....	42
表九、不同生物炭處理下之土壤基本化學性質 (孵育第 90 天) .....	43
表十、不同生物炭處理下之土壤基本化學性質 (孵育第 180 天) .....	44
表十一、不同生物炭處理下土壤 Mehlich III 可萃取陽離子含量 (第 0 天).....	48
表十四、不同生物炭處理下土壤生質碳、氮及呼吸作用速率 (第 180 天) .....	53
附錄一、不同生物炭處理下土壤 Mehlich III 可萃取陽離子含量 (第 90 天).....	101
附錄二、不同生物炭處理下土壤 Mehlich III 可萃取陽離子含量 (第 180 天)...	102
附錄三、不同生物炭處理下之土壤酵素活性 (孵育第 0 天) .....	103
附錄四、不同生物炭處理下之土壤酵素活性 (孵育第 90 天) .....	104
附錄五、不同生物炭處理下之土壤酵素活性 (孵育第 180 天) .....	105

# 第一章 前言

臺灣位處亞熱帶與熱帶地區，氣候型態主要為高溫多雨，以致土壤有機質分解快。此外，臺灣地狹人稠，農業耕地有限，為使農作物獲高產量，農地集約並超限利用的情況嚴重，因此，長期耕作之下便造成土壤肥力下降。紅壤為臺灣重要耕作土壤之一，但因紅壤本來即是低肥力的土壤，其物理化學性質如黏重、強酸、固定磷能力強等，常為限制作物生長之因子，故被歸類為不利作物生長的低生產力土壤 (Zhang and Xu, 2005)。為使土壤永續利用、提升作物產量與維持土壤品質，對紅壤之管理與改良是必須的。

有機資材作為土壤添加劑進行土壤改良，為近年常見之方法，然而，以往農業所利用之主要有機資材如生物固體 (biosolids)、堆肥 (composts) 或綠肥 (green manure) 等。有鑒於日前常用的改良之有機資材易隨時間礦化分解，若將廢棄物 (農業廢棄物或生物固體) 炭化製成生物炭 (biochar)，利用其在土壤中留存之時間比一般有機質肥料久之特性，作為土壤改良劑為近年來新興之方法。

生物炭為富含碳之固形物質，是由生物質 (biomass) 在低氧含量之環境下，高溫熱裂解製成。由於生物炭經由高溫炭化將物質縮合，因此，其本身之有機碳較難被微生物分解，可將碳儲存於土壤中，減少碳以溫室氣體形態排放至空氣，長期維持土壤中之碳含量。生物炭亦可改善土壤品質，如促進土壤構造、團粒穩定性、導水度，亦可增加土壤中微生物生質量與活性及減少養分淋洗損失，甚至促進植物生長 (Lehmann and Joseph, 2009)。然而，不同原料、裂解溫度、裂解時間等環境因素，會使生物炭有不同性質。而不同生物炭的特性，對於土壤理化性質、生物性質之影響也不同，因此，在應用生物炭之前，需要了解其特性，並且評估生物炭對於土壤物化與生物性質之影響，以利管理。

本研究之目的以常見農林廢棄物包含稻殼、柳杉、棕櫚殼、煤灰所製成之不同生物炭，對於紅壤之化學性質、微生物活性及族群之影響，評估其作為土壤改良劑，提升土壤品質之潛力。

## 第二章 文獻回顧



### 2.1 生物炭

生物炭 (biochar) 是將生物質在低氧氣的情況下，以較低的溫度 ( $< 700$  °C) 熱裂解 (pyrolysis) 而得，具有碳含量高、多孔性結構 (porous structure) 等性質 (Lehmann and Joseph, 2009)。生物炭與傳統的黑炭、木炭 (charcoal) 相似，然而，生物炭除了原料來源不受限於木質材料，亦包含農業廢棄物、都市廢棄物和廐肥 (manure) 等生質材料 (Bruun et al., 2012; Rajkovich et al., 2012)，添加於土壤之中是生物炭一項重要的特徵。

生物炭可以增加土壤中的碳吸存 (Brady et al., 2008)、減緩土壤釋放二氧化碳、氧化亞氮與甲烷等溫室氣體 (Ameloot et al., 2013) 以及作為農業上的土壤改良劑 (Sohi et al., 2010)。生物炭與土壤混合後，能夠改變土壤的物理及化學性質，藉此提昇土壤的生產力 (Chan et al., 2007)。生物炭本身的多孔隙結構與廣大的表面積 (surface area)，與土壤混合後能夠使土壤的總體密度 (bulk density) 下降，孔隙度 (porosity) 上升，增加土壤的通氣性與保水力 (Yanai et al., 2007; Oguntunde et al., 2008; Karhu et al., 2011)。在化學性質上，生物炭會提高土壤 pH 值、陽離子交換容量 (cation exchange capacity, CEC) 與可交換性養分元素 (如氮、磷、鉀等) (Atkinson et al., 2010)。生物炭亦會增加土壤中有機質、易變動 (labile) 有機碳的含量，進而促進土壤微生物的含量，改變微生物群落結構，影響土壤酵素的活性，而土壤生物性質的改變，也間接影響了土壤中的養分循環 (Lehmann et al., 2011)。



## 2.2 生物炭原料

不同原料性質與熱裂解條件，如來源、裂解溫度或是裂解時間等，會使生物炭有不同的物化特性 (Downie et al., 2009; Wang et al., 2013)。不同性質的生物炭施用於土壤會有不同的影響 (Heitkötter and Marschner., 2015)。如施用稻草生物炭，土壤微生物生質量與活性上升；麥稈生物炭穩定性高，則提高土壤中有機碳，並有利於長期土壤固碳 (Purakayastha., 2015)。製作生物炭的過程中，生物質裂解炭化所產生的濕煙，經凝結之液體沉澱分層收集之後，所得之透明黃色液體為木醋液 (wood vinegar)。木醋液主要的成分是由乙酸（即醋酸）為主的小分子有機酸所組成，一般可當作醫藥原料、飼料添加劑、脫臭劑、木材防腐劑等用途。在農業上則可增進作物根部與葉片活力、減緩老化、降低果實酸度、延長果實儲藏時間等，而剩下之炭化副產物則常以生物炭作為土壤添加劑。

### 2.2.1 稻殼

以水稻為主食的地區中，稻殼為最常見之農業廢棄物，將其炭化是一種普遍的處理方式。稻殼經炭化處理時會產生稻殼乾餾液，亦稱為稻殼醋液，精製後則成為金黃色的透明液體，成分與木醋液相似，可抑制多種病原菌，對害蟲也有忌避的效果。炭化稻殼比重輕、比表面積大、孔隙度、表面特性及粒徑符合理想的介質標準，對於黏性高的土壤之改良潛力大，亦可提供土壤微生物的棲所，提高土壤的生物活性，也能提供土壤養分，促進作物生長 (Walter and Rao., 2015)。

### 2.2.2 柳杉

柳杉為常見之樹木之一，除了提供木材做工業用途之外，疏伐的柳杉也會在林地直接炭化處理供該區域發電。炭化柳杉具有高含碳量、多孔性結構、大的比表面積等性質，除了有利於固碳作用，施入土壤可以提升作物產量，是近年來被研究生物炭木材原料之一 (Kim et al., 2013; Lai et al., 2013)。



### 2.2.3 棕櫚殼

提煉棕櫚油時，會先從棕櫚果肉中抽取果核，再將果核的外殼去除，此去除之廢棄部分為棕櫚殼。棕櫚富含多酚類生物性油脂與木質素，因此，炭化棕櫚殼所產生的熱值比一般的生物燃料較高，而其化學特性可減低溫室氣體排放，為常見之生質能燃料 (Choi et al., 2015)。炭化棕櫚殼具有含碳量高，多孔性結構大且穩定等性質，應用於土壤可提升土壤品質 (Titiladunayo et al., 2012; Lee et al., 2015)。

### 2.2.4 煤灰

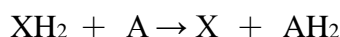
煤灰為煤碳能源生產燃燒後之產物，已作為土壤改良劑多年。研究顯示，添加煤灰生物炭可提高土壤保水力、改善土壤質地、通氣性，並減緩土壤表面徑流與土壤侵蝕 (Blissett and Rowson, 2012)。在農業應用上，煤灰生物炭可調整土壤 pH 值，並且提供微量元素供作物生長。另一方面，添加煤灰於土壤中可減緩地下水污染等問題 (Jala and Goyal, 2006)。

## 2.3 土壤酵素

土壤中的微生物，會藉由土壤酵素參與土壤的養分循環。研究指出，土壤酵素活性與土壤有機質分解速率高度相關 (Xu et al., 2015)。土壤酵素主要來自土壤微生物，部分由植物根部分泌，或由動植物殘體所釋出 (Tabatabai, 1994)。不同來源之土壤酵素，可分為生物性與非生物性兩種。生物性酵素來自微生物及動植物之活體細胞；非生物性酵素則包含釋放性蛋白、或從微生物及動植物之細胞殘體釋放至土壤溶液中。若土壤酵素活性較高，即使被土壤膠體或有機質吸附仍具有活性 (Burns, 1982)。土壤酵素通常具有對土壤管理反應敏感與快速，即可以即時反應土壤狀態、活性測定方便等優點 (Lin et al., 2010)，因此，常用於評估土壤微生物活性指標。

### 2.3.1 去氫酶

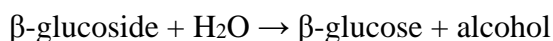
去氫酶 (dehydrogenase) 普遍存在各種細胞中 (Tabatabai, 1994)，利用代謝輔酶 NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide) 或 NADP<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 作為受質，直接參與細胞內的氧化還原反應 (Salazar et al., 2011)，其反應式為：



其中 XH<sub>2</sub> 為有機受質，A 為氫的接受者。去氫酶只在活體細胞中具有活性，在土壤中的去氫酶無法作用，因此，可作為土壤微生物活性的指標 (Yuan and Yue, 2012)。去氫酶活性與土壤有機質含量及 pH 值有關 (Moeskops et al., 2010)。因此，不同的生物炭與添加量，對於去氫酶活性會有不同影響 (Demisie et al., 2014)。

### 2.3.2 β-配醣酶

β-配醣酶 (β-glucosidase) 全名為 β-D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶 (β-D-glucoside glucohydrolase)，是微生物將纖維素降解成葡萄糖之律速酵素 (rate limiting enzyme)，主要參與土壤中碳的循環 (Salazar et al., 2011)，其反應式為：



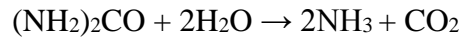
β-配醣酶存在真菌、酵母菌與植物體中 (Tabatabai, 1994)，在土壤中是有機質分解初期重要的酵素，其作用產物葡萄糖 (β-glucose) 為土壤微生物重要之能源 (Dick, 2011)。β-配醣酶在碳循環中的角色使之為良好的土壤管理效應指標，可顯著代表微生物生態 (Bandick and Dick, 1999)。研究指出 β-配醣酶之活性，與土壤有機質含量、pH 值、不同生物炭、裂解條件、施用量等有關 (Moeskops et al., 2010; Demisie et al., 2014)。





### 2.3.3 尿素酶

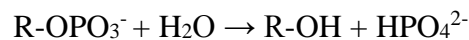
尿素酶 (urease) 參與土壤氮的循環 (Salazar et al., 2011)，其反應式為：



尿素酶廣泛的分佈在自然中，存在微生物、植物與動物體內，為第一個被純化出來的酵素蛋白質，其生成物二氧化碳與氨容易被測定 (Tabatabai, 1994)，儘管尿素酶與微生物生質量無顯著相關性，但其對於土壤中的重金屬含量、氧氣濃度、氮有效性的變化反應敏感 (McCarty et al., 1992)，且對農業耕作系統及不同作物影響敏感，因此，常被作為土壤品質指標 (Drissner et al., 2007)。有研究顯示，生物炭施用量增加，會提高尿素酶活性 (Demisie et al., 2014)。

### 2.3.4 酸性與鹼性磷酸單酯酶

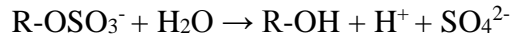
酸性與鹼性磷酸單酯酶 (acid and alkaline phosphomonoesterase) 參與土壤磷的循環 (Salazar et al., 2011)，其反應式為：



磷酸單酯酶為常見的磷酸酶之一，依據適合酸鹼環境之活性不同，分為酸性磷酸單酯酶與鹼性磷酸單酯酶 (Purcena et al., 2014)。在微生物中，酸性磷酸單酯酶主要來自真菌，鹼性則多來自細菌 (張, 2015)。Jordan 等人 (1995) 指出磷酸酯酶活性是土壤有機質含量與土壤管理成效的一項重要指標。磷酸單酯酶僅能催化酯化一次的磷酸酯鍵化合物水解，即把磷酸單酯鍵切斷而使磷酸基游離產生磷酸氫根 ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) 及磷酸二氫根 ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) 離子，有利於植物吸收磷 (Klose and Tabatabai, 2002)。生物炭施加量多，亦會提高含量 (Masto et al., 2013)。

### 2.3.5 芳香基硫酸酯酶

芳香基硫酸酯酶 (arylsulphatase) 參與土壤硫的循環 (Salazar et al., 2011)，其反應式為：



芳香基硫酸酯酶廣泛存在動植物與微生物中 (Tabatabai, 1994)，在動物殘體及組織亦可測到芳香基硫酸酯酶活性 (Tabataba and Bremner, 1970)。芳香基硫酸酯酶參與微生物硫酸酯合成與降解，是礦化土壤中有機硫為植物可利用硫的重要角色 (Dick, 2011)。

## 2.4 土壤微生物性質

土壤微生物與土壤組成、養分循環、有機質轉換息息相關 (Yeates et al., 1999)。土壤化學性質須經由長期試驗才能顯示差異性，然而，微生物性質易隨著環境、季節變化，能即時反應土壤狀態，適合作為土壤短期指標 (Stark et al., 2007)。土壤微生物性質包含土壤呼吸作用、微生物生質量、微生物群落結構等。呼吸作用可代表微生物整體之活性，微生物生質碳氮代表微生物之生質量，而微生物群落結構可使用磷脂質脂肪酸 (phospholipid fatty acids) 分析法及分子序列 DNA 分析法測定。添加生物炭會影響土壤微生物性質 (Purakayastha et al., 2015)，如提升土壤中的微生物生質量、促進碳與氮之礦化作用等。土壤微生物是影響土壤質地、有機質含量、養分循環的重要因子，且土壤微生物族群間的交互作用複雜緊密，因此，微生物族群量與組成的變化會影響土壤品質。

### 2.4.1 土壤呼吸作用

土壤中好氧微生物需經由呼吸作用將有機碳轉化、分解，以獲得能量，而在此過程中釋出二氧化碳即為呼吸作用，若定量此二氧化碳，可做為土壤微生物活性指標 (Raubuch et al., 2010)。土壤微生物群落的大小與功能，是影響土壤中碳的消耗與土壤呼吸作用 (碳的釋放) 的重要因素，而土壤中微生物族群的活性與土壤呼吸作用呈高度相關，因此，土壤呼吸作用常代表土壤微生物的整體活性 (Schlesinger and Andrews, 2000)。環境因子常影響土壤微生物族群，例如溫度、

水分，微生物活性與土壤溫度顯著相關 (Xu et al., 2015)，環境溫度越高，土壤呼吸作用速率也越快 (Hagerty et al., 2014)，呼吸作用對環境中碳的變化敏感，若在土壤中加入葡萄糖等容易分解的碳源，呼吸作用速率會顯著提高 (Chander et al., 2001)。然而，土壤中加入生物炭，亦會影響土壤呼吸作用。Zimmerman 等人 (2011) 研究發現，生物炭加入土壤後孵育一個月至一年當中，土壤呼吸作用逐漸下降，顯示生物炭吸附土壤中有機碳，影響呼吸作用 (Purakayastha et al., 2015)。呼吸作用可整體的呈現土壤微生物生長，並反應土壤環境變化對土壤微生物之影響。

比呼吸速率 (呼吸作用與微生物生質碳的比值，specific respiration rate = respiration rate/MBC，或代謝商，metabolic quotient) 代表土壤微生物之基礎代謝速率，亦可當作短期快速生長指標。若比呼吸速率高，可能是微生物族群遭受逆境，以致每單位之微生物生質碳進行高強度之呼吸作用，提高代謝速率 (Raubuch et al., 2010)。

#### 2.4.2 土壤微生物生質碳與氮

土壤中的微生物將有機碳與氮同化後把能量儲存於體內，即為微生物生質碳與氮 (microbial biomass carbon and nitrogen, MBC and MBN)，儲存的生質碳與氮用於維持微生物生長、繁殖與基本代謝作用 (Raubuch et al., 2010)。微生物生質碳與氮代表的是土壤中微生物的量，藉由氣仿燻蒸將微生物細胞膜溶解釋出細胞內含物，分別測定燻蒸與否之樣品中有機碳與氮之含量估得微生物生質碳與氮含量 (Vance et al., 1987)。可使一般測量土壤中的有機碳含量之重鉻酸鉀氧化法測定微生物生質碳 (Kalembas and Jenkinso, 1973)。微生物生質氮則用一般定量自由態胺基酸總量之茚滿三酮 (ninhydrin) 法測定，茚滿三酮主要與  $\alpha$ -胺基 ( $\alpha$ -amino group) 反應，但是對多胜、蛋白質或其他含有自由胺基的化合物亦有反應。因此，分別測定燻蒸與否之樣品中所含胺基酸量即可估得微生物生質氮量

(Joergensen and Brookes, 1990)。

微生物生質碳對於環境變化的影響敏感，因此，除了當作微生物生質量指標，也在短期之養分供需中扮演重要的角色。土壤添加生物炭會改變微生物生質碳，乃因影響土壤碳庫含量，進而影響微生物的動態，最終影響生質碳與氮之含量 (Demisie et al., 2014; Wang et al., 2014; Purakayastha et al., 2015)。微生物生質碳與氮可整體呈現土壤微生物生長情形，並反應土壤環境變化對土壤微生物族群大小之影響。

微生物族群的大小，可藉由微生物生質碳與土壤有機碳的比值 (MBC/SOC) 評估。當環境改變時，微生物生質碳的分解速率會大於土壤有機質 (Badaluco et al., 1990)，因此，微生物生質碳與土壤有機碳比有其生態意義，生質碳含量高時表示微生物族群量大，當微生物生質碳與土壤有機碳比愈大，表示土壤中微生物所佔之比例愈高，對於環境變動的緩衝能力亦較高。

## 2.5 土壤微生物群落結構

土壤中微生物種類多樣且複雜，而這豐富多樣的微生物功能，在土壤生態系中，扮演重要的角色，如影響礦化作用、有機質分解、土壤養分循環、土壤團粒穩定度等 (Demisie et al., 2014; Xu et al., 2015)。由於添加生物炭使環境改變，進而影響土壤微生物群落結構，而微生物群落結構改變也會影響土壤中的原有之各項功能。目前主要以磷脂質脂肪酸分析法及分子序列 DNA 分析測定土壤微生物群落結構。

## 2.5.1 磷脂質脂肪酸分析法

許多微生物目前無法以人工方式培養，因此，傳統土壤微生物以實驗室培養後測量菌數的方式，只能分析可培養之微生物。儘管土壤酵素活性、土壤呼吸作用與微生物生質量等生物性質分析項目已屬普遍，但無法得知微生物之群落結構、物種歧異度或是針對特定微生物族群等土壤微生物特性，因此，可利用微生物細胞內特殊組成分來進行觀察。磷脂質脂肪酸 (phospholipid ester-linked fatty acid, PLFA) 存在所有活的細胞中的細胞膜，為細胞膜之主要組成分，但其不為儲存性脂肪，細胞生長時代謝活躍，在細胞死亡後容易分解。因細菌、真菌、藻類或原生生物等含有特殊或特別大量的磷脂質脂肪酸，利用磷脂質脂肪酸分析可大方向的分析不同生物界的群落結構，例如含側鏈飽和磷脂質脂肪酸主要存在革蘭氏陽性菌中，如：i15:0、a15:0 等；含環丙烷脂肪酸通常存在革蘭氏陰性菌中，如：cy17:0、cy19:0 等；甲基-結核硬脂酸 (10Me18:0) 只發現於放線菌中。PLFA 方法雖無法鑑定單一物種，但可一次萃取土壤中的整體微生物族群之磷脂質脂肪酸，以此定量並以宏觀角度觀察整體微生物族群與數量之消長。

脂肪酸之命名以總碳數：雙鍵數表示，雙鍵數後數字為雙鍵位置（從甲基端數來第幾個碳上）。在總碳數前代號 i 及 a 分別代表 iso- 與 anteiso- 側鏈；雙鍵位置後代號 c 及 t 分別代表 cis 及 trans 異構物；10Me 代表從羧基端數來第十個碳上有一甲基；cy 表示含有環丙烷 (cyclopropane) 結構； $\omega$  表示倒著數（從羧基端開始數）。各微生物群落之代表性磷脂質脂肪酸：細菌群落數量的指標為 i15:0、a15:0、15:0、i16:0、16:1 $\omega$ 7c、17:0、i17:0、cy17:0、18:1 $\omega$ 7c 與 cy19:0 之加總；代表革蘭氏陽性菌群落數量的指標為 i15:0、a15:0、i16:0 及 i17:0 之加總；代表革蘭氏陰性菌群落數量的指標為 16:1 $\omega$ 7c、cy17:0、18:1 $\omega$ 7c 及 cy19:0 之加總；代表放線菌群落數量的指標為 10Me18:0；代表真菌群落數量的指標為 18:2 $\omega$ 6c (Moeskops et al., 2010)。

革蘭氏陽性菌/陰性菌 (G<sup>+</sup>/G<sup>-</sup>)、放線菌/細菌 (actinomycete/bacteria) 與真菌/

細菌 (fungi/bacteria) 之 PLFA 比例可作為土壤微生物族群變動之參考 (Fierer et al., 2003)。革蘭氏陽性菌對環境敏感，而革蘭氏陰性菌因其具有在肽聚糖層之外的外層膜 (outer membrane)，以及酯多糖層 (lipopolysaccharide layer)，對環境變化適應力較革蘭氏陽性菌高。因此，在逆境下革蘭氏陰性菌含量高，而革蘭氏陽性菌/陰性菌比降低 (Zelles et al., 1994)。土壤 PLFA 真菌/細菌比可作為逆境指標，其比值受到環境 pH 值影響，隨 pH 值降低而提高，同時受土壤中碳的分布所影響 (Blagodatskaya et al., 2014)。另外，含有環己烷的脂肪酸 (cyclopropyl fatty acids) 在微生物在穩定生長期，若受質不足及環境 pH 值低，其含量將會增加，可作為逆境指標；含環己烷脂肪酸與其前驅物之比值，如 cy17:0/16:1 $\omega$ 7c、cy19:0/18:1 $\omega$ 7c 亦可作為微生物養分逆境指標 (Thomas et al., 1969; Bossio et al., 1998)。Kaur 等人 (2005) 指出，當遭受逆境時，微生物透過將順式不飽和脂肪酸 (cis-fatty acids, 16:1 $\omega$ 7c, 18:1 $\omega$ 7c) 轉換成反式不飽和脂肪酸 (trans-fatty acids, 16:1 $\omega$ 7t, 18:1 $\omega$ 7t)，以增加細胞膜之通透性。因此，trans/cis (16:1 $\omega$ 7t/16:1 $\omega$ 7c, 18:1 $\omega$ 7t/18:1 $\omega$ 7c) 之比例亦可作為微生物逆境指標。

微生物含有特殊或特別大量的磷脂質脂肪酸，而不同微生物其含有之特殊磷脂質脂肪酸或其含量不盡相同，因此，可以利用磷脂質脂肪酸分析整體大方向之不同生物界的群落結構。土壤微生物族群與土壤中養分循環有關，並與土壤結構、養分有效性相互影響，其中土壤微生物整體族群、細菌及放線菌與土壤有機質分解速率高度相關 (Xu et al., 2015)。土壤微生物環境存在複雜而多變的交互作用，隨時進行各種化學反應而達穩定的動態平衡，作物的健康與土壤肥力受到作物與土壤微生物的交互作用所影響 (Chen et al., 2014)。添加生物炭會影響土壤的物理化學性質，包含養分循環、土壤團粒、含水量與 pH 值等，甚至有些生物炭帶有毒害微生物之物質 (PAHs)，因此，生物炭會影響土壤微生物生質量與群落結構。Lehmann 等人 (2011) 的研究指出，添加生物炭後，土壤微生物相產生變化，如生物炭的多孔隙結構提供微生物良好的棲息環境，而有些生物炭亦可供應木質素，利於真菌生長，進而使真菌與細菌比例改變。Farrell 等人 (2013) 認為生物炭可

以提供微生物生長之養分，影響土壤微生物之組成。Steinbeiss 等人 (2009) 發現，酵母生物炭會促進土壤中的真菌增加，而葡萄糖生物炭主要促進革蘭氏陽性菌生長。由土壤微生物結構與多樣性的變化，反應生物炭對土壤微生物組成的影響。

## 2.5.2 DNA 分子序列分析法

土壤 DNA 分子序列分析為普遍分類微生物群落之依據 (Woese., 1987)，有別於磷脂質脂肪酸，DNA 分子序列分析法除了可探討整體土壤中微生物群落結構外，可以更進一步以 DNA 定序得知土壤中的微生物種類。

萃取土壤 DNA 後，利用 16S rRNA 及 18S rRNA 基因序列設計引子 (多數原核生物為 16S，表示細菌族群；真核生物為 18S，表示真菌族群)，經過聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 放大，最後以變性梯度膠體電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 分離，以分析不同微生物間基因序列差異偵測族群多樣性，更可進一步將變性梯度膠體電泳中的條帶切膠、萃取並定序後，精確得知土壤中的微生物種類 (屬或種)，以探討微生物不同族群間的交互作用及其相互關係。

變性梯度膠體電泳可依據不同的變性條件，區分大小相同但序列不同之 DNA 片段。DGGE 以尿素 (urea) 及甲醯胺 (formamide) 作為化學變性劑，使 DNA 分子結構變性。DNA 含有不同之鹼基對包含 A=T 及 C≡G，其中含三個氫鍵之 C≡G 鹼基對，其鍵結力較 A=T 鹼基對強，因此，較難打斷變性。在試驗中利用含有變性梯度的電泳膠片，於電泳中 DNA 分子核酸的含量及排序皆會影響打開鍵結所需之變性劑濃度，依此特性，大小相同但序列不同之 DNA 片段可以在不同濃度之變性劑下被分離。但 DNA 分子若全部被打開則無法辨識，因此，在試驗中會在其中一端引子加上 GC-clamp (一段富含 GC 之核酸序列)，當 DNA 片段被放大時某一端即具有一段 GC 序列 (Muyzer et al., 1993)。研究指出加入 GC-clamp 之 PCR 產物，可以區分差異僅為一個鹼基對的兩組序列，其分析成功率接近 100% (Sheffield et al., 1989)。

## 第三章 材料與方法



### 3.1 土壤與有機質肥料

本研究之土壤採自桃園楊梅之茶業改良場之紅壤，屬美國土壤分類之 Hapludults。其 pH 值 (1:1) 為 4.3、飽和水電導度  $1.82 \text{ dS m}^{-1}$ 、有機碳  $17.8 \text{ g kg}^{-1}$ 、總氮  $1.1 \text{ g kg}^{-1}$ 、Mehlich III 可萃取磷、鉀、鈣、鎂、鐵、錳、鋅與銅分別為 70、20、56、49、428、436、26 與  $6.2 \text{ mg kg}^{-1}$ 。有機質肥料添加  $50 \text{ g kg}^{-1}$  之禽畜糞肥，堆肥之基本性質如表一所示。

表一、試驗施用有機質肥料之基本性質

Table 1. Some selected chemical properties of the organic fertilizer used in the experiment

pH (1:10)	4.93
EC <sup>1</sup> (1:5) ( $\text{dS m}^{-1}$ )	13.6
Total N ( $\text{g kg}^{-1}$ )	46.0
Total P ( $\text{g kg}^{-1}$ )	15.0
Total K ( $\text{g kg}^{-1}$ )	17.8
Total Ca ( $\text{g kg}^{-1}$ )	16.2
Total Mg ( $\text{g kg}^{-1}$ )	9.0
Total Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	32.4
Total Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	152
Total Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	5.5
Total Ni ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	2.26
Total Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	4.01
OM <sup>1</sup> ( $\text{g kg}^{-1}$ )	861

<sup>1</sup> EC: Electrical conductivity of saturation extract; OM: Organic matter.





## 3.2 試驗設計

本研究以紅壤在有或無添加有機質肥料後，分別施用五種不同生物炭。未施用有機肥料之處理分別為：不添加生物炭之控制組 (BK)、稻殼生物炭處理 (RH)、柳杉生物炭處理 (JC)、棕櫚殼生物炭處理 (PKS)、粒徑 5-8  $\mu\text{m}$  煤灰生物炭處理 (SC)、粒徑 15-30  $\mu\text{m}$  煤灰生物炭處理 (LC)；添加有機質肥料之處理分別為稻殼生物炭處理 (RHM)、柳杉生物炭處理 (JCM)、棕櫚殼生物炭處理 (PKSM)、粒徑 5-8  $\mu\text{m}$  煤灰生物炭處理 (SCM)、粒徑 15-30  $\mu\text{m}$  煤灰生物炭處理 (LCM) 與未添加生物炭控制組 (BKM)，所有處理三重複，以完全隨機設計排列 (completely randomized design, CRD)，每個處理之土壤約一公斤重。

## 3.3 生物炭原料

所使用之生物炭分別為：稻殼 (rice husk, RH)、柳杉 (Japanese cedar, JC)、棕櫚殼 (palm fernel shell, PKS)、粒徑 5-8  $\mu\text{m}$  煤灰 (small particle size of coal ash, SC)、粒徑 15-30  $\mu\text{m}$  煤灰 (large particle size of coal ash, LC) 等五種。稻殼、柳杉、棕櫚殼為 500°C 下裂解製成。生物炭以粉碎機粉碎後通過 2 mm 篩網，各處理之生物炭施量為 20 g kg<sup>-1</sup>。

## 3.4 孵育實驗

孵育試驗共 180 天，由施入生物炭時開始計算天數，添加生物炭當天混勻後即進行第一次採樣 (0 d)，孵育 90 天後為第二次採樣 (90 d)，第三次為第 180 天 (180 d)，每次採樣約 300 g。孵育過程避光，環境溫度平均 25°C，土壤含水量保持飽和水之 30%。

## 3.5 樣品處理

採集後之土壤樣品，保存處理分為化學性質與生物性質分析。供化學性質分析之土壤樣品經自然風乾後，過 20 mesh 篩網（篩孔直徑 1 mm），儲存於室溫下待測。供生物性質分析之土壤樣品需為鮮土，稍微風乾尚保持濕潤時過 10 mesh 篩網（篩孔直徑 2 mm），保存於 -20°C，部分鮮土儲存於 4°C 下，於四週內完成分析，包含土壤呼吸作用、土壤微生物生質碳、氮含量、土壤之各項酵素活性等。測量變性梯度膠體電泳 (DGGE) 及微生物群落結構分析 (PLFA) 之土壤樣品（過 10 mesh 篩網），經冷凍乾燥去除水分後，儲存於 -20°C 下。

## 3.6 生物炭基本性質分析

### 3.6.1 生物炭 pH 與飽和導水度 (Li et al., 2013)

取 10 g 生物炭於 100 mL 塑膠燒杯中，加入 50 mL 去離子水攪勻，平衡 60 分鐘（其中間歇以玻棒攪拌二次），以玻璃電極測定懸浮液 pH 值後，抽氣過濾，取濾液以電導度計測定飽和水導電度。

### 3.6.2 碳、氮、氫、氧元素含量 (Chen et al., 2014)

將生物炭樣品以球磨機細磨 (Oscillating Mill MM400 by Retsch, Newtown, PA, USA)，細磨後取粉末樣品（粒徑 < 2 mm）進行分析，取重量 1.5-2.5 mg，包於 4 x 3.2 mm 錫囊中。以元素分析儀 (Perkin Elmer 2200, MA, USA) 量測碳、氮、氫的百分比。生物炭樣品扣除碳、氮、氫與灰分的重量百分比後，可求得生物炭中氧的百分比。

### 3.6.3 固態核磁共振光譜分析 (Chen et al., 2014)

生物炭的化學構造以固態核磁共振光譜分析 (Solid state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance, NMR) 分析，以固態核磁共振光譜儀 (Advance III 400, Bruker, Germany) 進行。NMR 試驗條件如下：

$^{13}\text{C}$  光譜頻率 (spectra frequency, SF01) 100 MHz, 在交叉極化魔角旋轉 (cross polarization magic angle spinning, CPMAS) 下的自旋速度 (spinning rate) 10 kHz, 接觸時間 (contact time) 3 ms, 遲滯時間 (delay time) 1 sec, 循環時間 1 sec, 掃描次數 (number of scan) 10,000 次。

NMR 圖譜結果如圖一所示, 相對應化學結構參考 Baldock 和 Smernik. (2002) 之結果, 將  $^{13}\text{C}$ -NMR 的化學位移做分類, 0 - 45 ppm 為烷基碳鍵結 (alkyl C), 45 - 110 ppm 為含氮或氧原子的烷基碳鍵結 (O/N-alkyl C), 110 - 145 ppm 為芳香族碳鍵結 (alkyl C), 145 - 165 ppm 為含氧原子的芳香族碳鍵結 (O-alkyl C), 165 - 190 ppm 為羰基碳鍵結 (carbonyl C)。



表二、所使用五種生物炭之一些性質

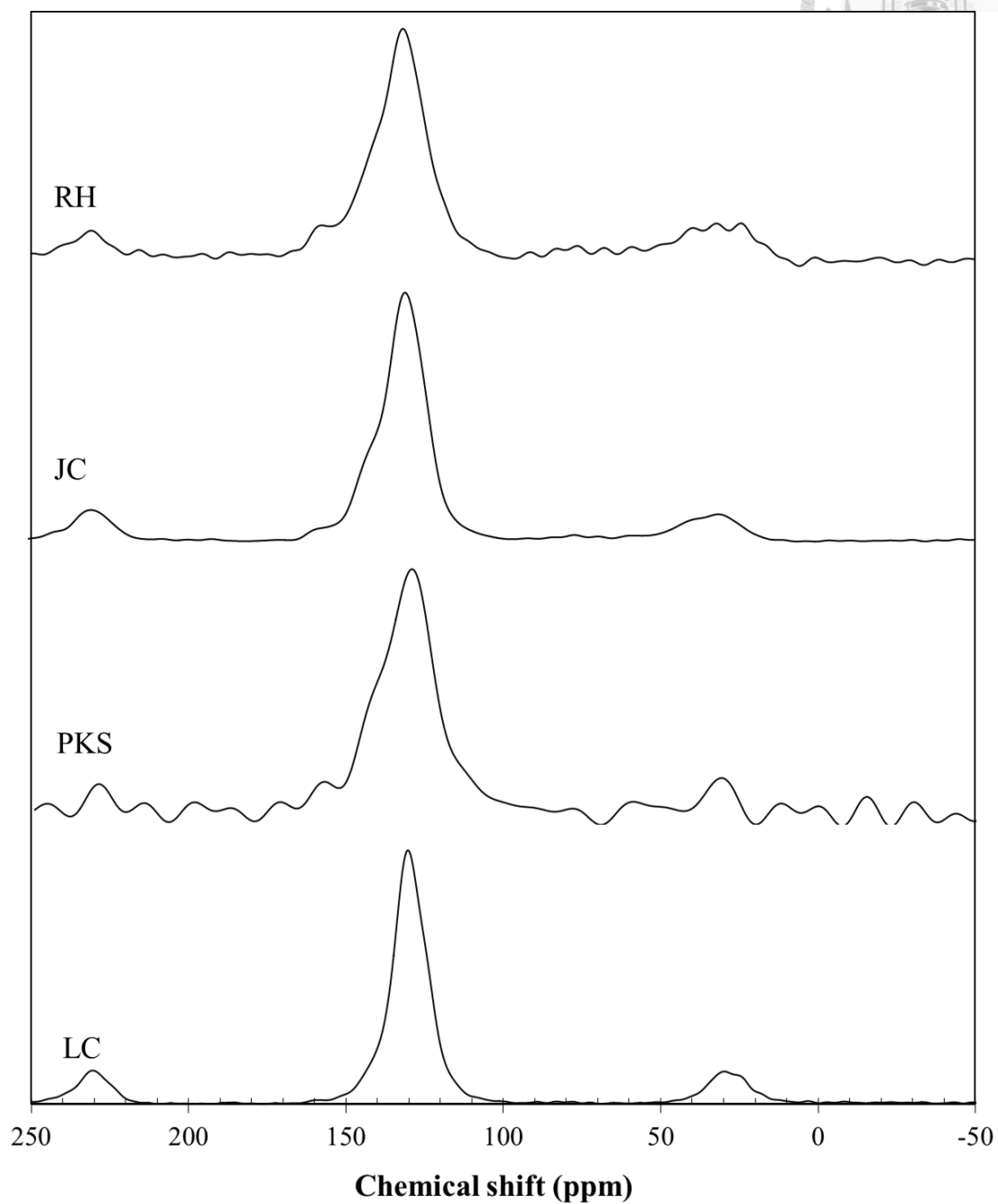
Table 2. Some selected properties the five kind of biochars used in the study.

Biochar	RH <sup>3</sup>	JC	PKS	SC	LC
pH (1:5)	8.2 ± 0.1 <sup>1</sup>	9.4 ± 0.1	9.2 ± 0.1	5.3 ± 0.3	5.6 ± 0.2
EC <sup>2</sup> (1:5) (dS m <sup>-1</sup> )	1.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Organic carbon (g kg <sup>-1</sup> )	199.7 ± 43.4	417.1 ± 0.6	352.6 ± 2.3	5.8 ± 0.7	298.7 ± 13.6
Surface area (m <sup>2</sup> /g)	2.7 ± 0.1	83.8 ± 0.2	286.3 ± 1.3	12.7 ± 0.5	2.3 ± 0.1
C (g kg <sup>-1</sup> )	418.3	850.0	747.8	950.6	936.4
H (g kg <sup>-1</sup> )	27.6	28.2	25.2	4.2	41.5
N (g kg <sup>-1</sup> )	6.4	2.5	6.5	1.5	12.4
O (g kg <sup>-1</sup> )	547.7	119.3	220.5	43.7	9.7

<sup>1</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>2</sup> EC: Electrical conductivity of saturation extract.

<sup>3</sup> RH: Rice husk biochar ; JC: Japanese cedar biochar ; PKS: Palm fernel shell biochar ; SC: Small particle size of coal ash ; LC: large particle size of coal ash ; BK: without applying biochar and organic matter ; M: applying organic matter.



圖一、所使用五種生物炭之  $^{13}\text{C}$ -NMR 圖譜。

Fig. 1.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of the five kind of biochar used. RH: Rice husk biochar ;  
JC: Japanese cedar biochar ; PKS: Palm fernel shell biochar ; LC: large particle size  
of coal ash.



### 3.7 土壤樣品化學性質分析

#### 3.7.1 土壤 pH 值：玻璃電極法 (Thomas, 1969)

取 20 g 通過 20 mesh 之土壤於 100 mL 塑膠燒杯中，加入 20 mL 去離子水，平衡 60 分鐘（其中間歇以玻棒攪拌二次），測定前以玻棒攪勻後再以玻璃電極測定土壤懸浮液 pH 值。

#### 3.7.2 土壤飽和水導電度 (Rhoades, 1996)

取 50 g 通過 20 mesh 之土壤於 100 mL 塑膠燒杯中，緩慢地加入去離子水，同時以玻棒攪拌使之形成水飽和土糊，靜置 30 分鐘後抽氣過濾，取濾液以電導度計測定土壤飽和水導電度 (electrical conductivity, EC)。

#### 3.7.3 土壤有機質與有機碳 (Ball, 1964)

記錄坩鍋編號與重量 ( $W_0$ )，取 20 g 通過 20 mesh 之土壤於坩鍋中，置於 105°C 下加熱二小時，放入乾燥皿中冷卻至室溫後稱重 ( $W_1$ )。置於高溫灰化爐 (muffle furnace) 中 250°C 下加熱二小時，接著於 375°C 下加熱 16 小時，停止加熱後在高溫灰化爐內冷卻至 200°C，放入乾燥皿中冷卻至室溫後稱重 ( $W_2$ )。

$$\text{有機物 OM (g kg}^{-1}\text{)} = (W_2 - W_3) / (W_2 - W_0) \times 1000$$

$$\text{有機碳 OC (g kg}^{-1}\text{)} = 0.458 \times \text{OM} - 0.4$$

#### 3.7.4 土壤總氮 (Bremner and Mulvaney, 1982)

精稱 1 g 通過 20 mesh 之土壤置於分解管中，加入 2 mL 去離子水靜置 30 分鐘，加入 1.1 g 分解促進劑（硫酸鉀：硫酸銅：硒 = 100：10：1），加入 0.2 g 水楊酸及 5 mL 濃硫酸，混勻封口後靜置隔夜。加入 0.3 g 硫代硫酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 後以微火加熱 (100°C)，至不產生泡沫時，以每 20-30 分鐘升溫 50°C 之速度加熱至 350°C，接著以 350°C 之溫度加熱至固體分解，此時硫酸溶液呈醬油色。取出分解管降溫，加入 2 mL 30% 之過氧化氫，繼續以 350°C 加熱啟基脫色至澄清（約 20 分鐘）。若未澄清，則重複加入過氧化氫並加熱使其澄清為止。冷卻後，先加入少許去離子水使其釋出部份稀釋熱，再將分解液定量至 50 mL，均勻混合後過濾至 50 mL 樣品

瓶保存。以蒸餾法測土壤總氮含量。



### 3.7.5 土壤 Mehlich III 可萃取性陽離子 (Mehlich, 1985)

#### 3.7.5.1 試劑

1. Mehlich III 儲備液：秤取 277.8 g 氟化銨與 146.1 g EDTA 溶於 1,200 mL 去離子水中，再定量至 2 L。
2. Mehlich III 萃取液：秤取 1,000 g 硝酸銨於 40 L 去離子水中，加入 200 mL Mehlich III 儲備液，再加入 575 mL 冰醋酸 (glacial acetic acid) 及 41 mL 濃硝酸，以去離子水稀釋至 50 L 並均勻混合。Mehlich III 萃取液之 pH 值為  $2.5 \pm 0.1$ ，內含 0.2 N 醋酸、0.25 N 硝酸銨、0.015 N 氟化銨、0.013 N 硝酸及 0.001 M EDTA。

#### 3.7.5.2 步驟

秤取 4 mL 通過 20 mesh 之土壤於 50 mL 塑膠離心管中，加入 40 mL Mehlich III 萃取液，於 200 rpm 下震盪五分鐘，經過濾後，以焰光光度計 (flame photometer, Sherwood Model 410, Cambridge, UK) 測定鉀濃度；以原子吸收光譜儀 (atomic absorption spectrophotometer, Hitachi 180-30, Tokyo, Japan) 測定鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅之濃度。

### 3.7.6 土壤 Mehlich III 可萃取性磷：鉬藍法 (Murphy and Riley, 1962)

#### 3.7.6.1 試劑

Murphy 和 Riley (1962) 之磷比色法之單一試劑 (single solution)

1. 5 N 硫酸：將 70 mL 濃硫酸稀釋至 500 mL。
2. 鉬酸銨溶液  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ ：將 20 g 鉬酸銨溶於去離子水中並定量至 500 mL。
3. 抗壞血酸溶液 (ascorbic acid)：將 1.32 g 抗壞血酸溶於 75 mL 去離子水中。
4. 酒石酸銻鉀溶液  $(\text{KSbC}_4\text{H}_4\text{O}_7)$  ( $1 \text{ g Sb L}^{-1}$ )：將 0.2743 g 酒石酸銻鉀溶於去離子水中並稀釋成 100 mL。
5. 混合：將 125 mL 5 N 硫酸，37.5 mL 鉬酸銨溶液，75 mL 抗壞血酸溶液及 12.5

ml 酒石酸銻鉀溶液混合後即為單一試劑。由於抗壞血酸易氧化，故混合液不宜放置超過 24 小時，抗壞血酸宜於使用前加入。



#### 3.7.6.2 步驟

1. 取 1 mL 土壤樣品之 Mehlich III 萃取液加入 50 mL 定量瓶內，加入去離子水使總體積約 40 mL，混合後加 8 mL 單一試劑並以去離子水定量至 50 mL。混合均勻後靜置 30 分鐘，以波長 882 nm 下測定吸光值。
2. 檢量線：配終濃度 (end concentration) 為 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg L<sup>-1</sup> 之磷呈色液並在 882 nm 測其吸光值。

### 3.8 土壤微生物酵素活性分析

#### 3.8.1 去氫酶 (Thalman, 1968)

##### 3.8.1.1 試劑

1. Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.5)：取 12.1 g Tris 溶於 700 mL 去離子水中，以 1 M 鹽酸將 pH 調至 7.5 再定量到 1 L，儲存於 4°C。
2. TTC 溶液 (TTC solution, 1.5%)：取 1.5 g 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 以 tris-HCl buffer 定量到 100 mL (鮮配)。
3. 標準 TPF 溶液 (TPF standard solution, 500 mg TPF L<sup>-1</sup>)：取 0.025 g trisphenylformazan (TPF) 以丙酮定量到 50 mL，避光 (鮮配)。
4. 丙酮 (acetone)。

##### 3.8.1.2 步驟

1. 取 1 g 通過 10 mesh 之鮮土放入 50 mL 離心管，加入 1 mL TTC 溶液，30°C 下孵育 24 h。空白組以 1 mL Tris-HCl buffer 取代 1 mL TTC 溶液。孵育後，加入 16 mL 丙酮，避光震盪二小時以萃取 TPF，再以濾紙過濾，濾液呈紅色，以波長 546 nm 下測吸光值。





2. 檢量線：取 0、0.5、1、2、3、4 mL 標準 TPF 溶液放入 50 mL 定量瓶，加入 8.3 mL Tris-HCl buffer，以丙酮定量到 50 mL (終濃度為：0、5、10、20、30、40 mg TPF L<sup>-1</sup>)，以波長 546 nm 下測吸光值。
3. 計算：去氫酶活性 (mg TPF kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) = (C × V) / (s × t)  
C：測得 TPF 之濃度 (mg L<sup>-1</sup>)  
V：土壤懸浮液總體積 (17 mL)  
t：孵育時間 (1 d)  
s：1 g 鮮土乾重 (g)

### 3.8.2 β-配糖酶 (Tabatabai, 1982)

#### 3.8.2.1 試劑

1. Modified universal buffer (MUB) 儲備液：取 12.1 g Tris、11.6 g 蘋果酸 (maleic acid)、14 g 檸檬酸 (citric acid) 或 15.31 g 檸檬酸一水合物 (citric acid monohydrate)、6.3 g 硼酸 (boric acid) 溶於 500 mL 1 M 氫氧化鈉溶液，再除去離子水定量到 1 L，4°C 冷藏備用。
2. Modified universal buffer (MUB) (pH 6.0)：取 200 mL MUB 儲備液，以 1 M 鹽酸將 pH 值調至 6.0，以去離子水定量到 1 L，儲存於 4°C。
3. 0.5 M 氯化鈣溶液 (CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M)：取 73.5 g 氯化鈣 (CaCl<sub>2</sub>)，以去離子水定量到 1 L，儲存於 4°C。
4. Tris buffer (0.1 M, pH 12)：取 12.1 g Tris，溶於 800 mL 水，以氫氧化鈉溶液將 pH 值調至 12，再除去離子水定量到 1 L，儲存於 4°C。
5. 對硝基酚標準液 (p-nitrophenol standard solution, 10 mg L<sup>-1</sup>)：取 1 g 對硝基酚 (p-nitrophenol)，以水定量到 1 L，此為 1,000 mg L<sup>-1</sup>。再稀釋 100 倍為 10 mg L<sup>-1</sup>。
6. 對硝基酚-β-D-吡喃葡萄糖苷溶液 (p-nitrophenol-β-D-glucopyranoside solution, PNG, 25 mM)：取 0.754 g 對硝基酚-β-D-吡喃葡萄糖苷 (PNG)，以 MUB (pH 6.0) 定量到 100 mL (鮮配)。



### 3.8.2.2 步驟

1. 取 1 g 通過 10 mesh 之鮮土放入 50 mL 離心管，加入 4 mL MUB (pH 6.0) 及 1 mL 25 mM 對硝基酚- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷溶液，37°C 下孵育 1 h。然後，加入 1 mL 0.5 M 氯化鈣溶液及 4 mL Tris buffer (pH 12)，混合均勻後過濾，濾液呈黃色，以波長 400 nm 下測吸光值。空白組為過濾前才加 1 mL 25 mM 對硝基酚- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷溶液，其餘步驟皆相同。
2. 檢量線：取 0、1、2、3、4、5 mL 對硝基酚標準液放入 10 mL 試管，分別加入 5、4、3、2、1、0 mL 水，再加入 1 mL 氯化鈣溶液及 4 mL Tris buffer (終濃度為：0、1、2、3、4、5 mg p-nitrophenol L<sup>-1</sup>)，以波長 400 nm 下測吸光值。
3. 計算： $\beta$ -醣苷酶活性 (mg p-nitrophenol kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) = (C × V) / (s × t)  
C：測得 p-nitrophenol 之濃度  
V：土壤懸浮液總體積 (10 mL)  
t：孵育時間 (1 h)  
s：1 g 鮮土乾重 (g)

### 3.8.3 尿素酶 (Kandeler and Gerner, 1988)

#### 3.8.3.1 試劑

1. 尿素溶液 (urea solution)：取 0.48 g 尿素溶於水，定量到 100 mL (鮮配)。
2. 氯化鉀溶液 (KCl solution, 1 M)：取 74.55g 氯化鉀 (KCl) 溶於去離子水中，加入 10 mL 1 M 鹽酸，再以去離子水定量到 1 L。
3. 0.3 M 氫氧化鈉 (NaOH, 0.3 M)：取 12 g 氫氧化鈉溶於水，定量到 1 L。
4. 水楊酸鈉溶液 (sodium salicylate solution)：取 17 g 水楊酸鈉 (sodium salicylate)、0.12 g 亞硝基鐵氰化鈉 (sodium nitroprusside) 溶於水，定量到 100 mL (鮮配)。
5. 水楊酸鈉/氫氧化鈉溶液 (sodium salicylate/NaOH solution)：將 0.3 M 氫氧化鈉溶液、水楊酸鈉溶液及水以 1：1：1 比例均勻混合 (鮮配)。
6. 二氯異氰尿酸鈉溶液 (sodium dichloroisocyanide solution, 0.1%)：取 0.1 g 二氯異氰尿酸鈉 (sodium dichloroisocyanide) 溶於水，定量到 100 mL (鮮配)。
7. 四硼酸鈉緩衝液 (borate buffer, pH 10)：取 56.85 g 四硼酸鈉 (disodium

tetraborate decahydrate,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 或 30 g 無水四硼酸鈉 (disodium tetraborate) 溶於 1,500 mL 溫水, 冷卻後用 20% 氫氧化鈉溶液將 pH 調至 10.0, 再定量至 2 L, 儲存於 4°C。



8. 銨標準液 (ammonium standard solution) :

溶液一: 取 3.82 g 氯化銨 (ammonium chloride) 溶於水, 定量到 1 L (即為 1,000 mg  $\text{NH}_4\text{-N L}^{-1}$ )。

溶液二: 分別取 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 mL 之溶液一至 50 mL 定量瓶, 以 1 M 氯化鉀溶液定量到 50 mL (即為 0、5、10、20、25 mg  $\text{NH}_4\text{-N L}^{-1}$ )。

3.8.3.2 步驟

1. 取 1 g 通過 10 mesh 之鮮土放入 50 mL 離心管, 加入 0.5 mL 尿素溶液及 4 mL 四硼酸鈉緩衝液, 37°C 下孵育 2 h。然後, 加入 6 mL 1 M 氯化鉀溶液, 震盪 30 min, 過濾。
2. 取 1 mL 濾液加入 20 mL 試管,
3. 加入 5 mL 水楊酸鈉/氫氧化鈉溶液、2 mL 二氯異氰尿酸鈉溶液及 9 mL 水, 混合均勻, 此時液體呈藍綠色, 靜置 30 min 後以波長 690 nm 測吸光值。空白組以水取代尿素溶液, 其餘步驟皆相同。
4. 檢量線: 將各濃度之溶液二各取 1 mL 到 20 mL 試管中, 下續步驟如步驟 3 (標準曲線濃度以溶液二之濃度作計算)。
5. 計算: 尿素酶濃度 ( $\text{mg NH}_4\text{-N kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) =  $(C \times V) / (s \times t)$

C: 測得  $\text{NH}_4\text{-N}$  之濃度

V: 土壤懸浮液總體積 (10.5 mL)

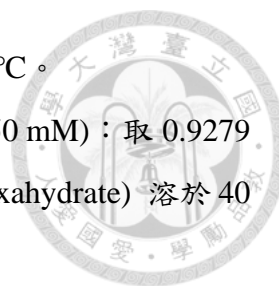
t: 孵育時間 (2 h)

s: 1 g 鮮土乾重 (g)

3.8.4 酸性和鹼性磷酸單酯酶 (Tabatabai and Bremner, 1969)

3.8.4.1 試劑

1. Modified universal buffer (MUB) (pH 6.5 及 11): 取 200 mL MUB 儲備液, 酸性磷酸單酯酶以 0.1 M 鹽酸將 pH 值調至 6.5 (鹼性磷酸單酯酶以 0.1 M 氫氧化鈉



溶液將 pH 值調至 11)，再以去離子水定量到 1 L，儲存於 4°C。

2. 對硝基酚磷酸鹽溶液 (p-nitrophenol phosphate solution, PNP, 50 mM)：取 0.9279 g 對硝基酚磷酸二鈉 (4-nitrophenyl phosphatedisodium salt hexahydrate) 溶於 40 mL MUB (pH 6.5)，再定量到 50 mL，儲存於 4°C (鮮配)。
3. 0.5 M 氯化鈣溶液 (CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M)：如 3.3.2 β-配醣酶活性之測定。
4. 0.5 M 氫氧化鈉 (NaOH, 0.5 M)：取 20 g 氫氧化鈉溶於去離子水，定量到 1 L。
5. 對硝基酚標準液 (p-nitrophenol standard solution, 10 mg L<sup>-1</sup>)：如 3.3.2 β-配醣酶活性之測定。

#### 3.8.4.2 步驟

1. 取 1 g 通過 10 mesh 之鮮土放入 50 mL 離心管，加入 4 mL MUB (酸性磷酸單酯酶使用 pH 6.5 MUB；鹼性磷酸單酯酶使用 pH 11 MUB) 及 1 mL 對硝基酚磷酸鹽溶液，均勻混合後於 37°C 下孵育 1 h。
2. 接著，加入 1 mL 氯化鈣溶液及 4 mL 0.5 M 氫氧化鈉溶液，混合均勻後過濾，濾液呈黃色，以波長 400 nm 下測吸光值。空白組為過濾前才加對硝基酚磷酸鹽溶液，其餘步驟皆相同。
3. 檢量線：取 0、1、2、3、4、5 mL 對硝基酚標準液放入 10 mL 試管，分別加入 5、4、3、2、1、0 mL 水，再加入 1 mL 氯化鈣溶液及 4 mL 0.5 M 氫氧化鈉溶液，混合均勻後過濾 (終濃度為：0、1、2、3、4、5 mg p-nitrophenol L<sup>-1</sup>)，以波長 400 nm 下測吸光值。
4. 計算：如 3.3.2 β-配醣酶活性之測定。

#### 3.8.5 芳香基硫酸酯酶 (Tabatabai and Bremner, 1970)

##### 3.8.5.1 試劑

1. 醋酸鹽緩衝液 (acetate buffer, 0.5 M, pH 5.8)：取 68 g 醋酸鈉 (sodium acetate trihydrate) 溶於 700 mL 去離子水，以醋酸將 pH 調至 5.8，再以去離子水定量到 1 L，儲存於 4°C。
2. 對硝基酚硫酸鹽溶液 (p-nitrophenol sulphate solution, PSP, 25 mM)：取 0.3216 g 對硝基酚硫酸鉀 (potassium 4-nitrophenyl sulfate) 溶於醋酸鹽緩衝液，再定量到



50 mL (鮮配)。

3. 0.5 M 氯化鈣溶液 ( $\text{CaCl}_2$ , 0.5 M)：如 3.3.2  $\beta$ -配醣酶活性之測定。
4. 0.5 M 氫氧化鈉溶液 ( $\text{NaOH}$ , 0.5 M)：如 3.3.4 酸性和鹼性磷酸單酯酶活性。
5. 0.1 M 氫氧化鈉溶液 ( $\text{NaOH}$ , 0.1 M)：如 3.3.4 酸性和鹼性磷酸單酯酶活性。
6. 對硝基酚標準液：如 3.3.2  $\beta$ -配醣酶活性之測定。

#### 3.8.5.2 步驟

1. 取 1 g 通過 10 mesh 之鮮土放入 50 mL 離心管，加入 4 mL 醋酸鹽緩衝液及 1 mL 對硝基酚硫酸鹽溶液， $37^\circ\text{C}$  下孵育 1 h。
2. 加入 1 mL 氯化鈣溶液及 4 mL 0.5 M 氫氧化鈉溶液，混合均勻後過濾，濾液呈黃色，以波長 400 nm 下測吸光值。空白組為過濾前才加 1 mL 對硝基酚硫酸鹽溶液，其餘步驟皆相同。
3. 檢量線：取 0、1、2、3、4、5 mL 對硝基酚標準液於 10 mL 試管，分別加入 5、4、3、2、1、0 mL 水，再加入 1 mL 氯化鈣溶液及 4 mL 0.5 M 氫氧化鈉溶液，混合均勻後過濾（終濃度為：0、1、2、3、4、5 mg p-nitrophenol  $\text{L}^{-1}$ ），以波長 400 nm 下測吸光值。
4. 計算：如 3.3.2  $\beta$ -配醣酶活性之測定。

## 3.9 土壤微生物性質分析

### 3.9.1 土壤呼吸作用 (Jaggi et al., 1976; Alef, 1993)

#### 3.9.1.1 試劑

1. 0.05 M 氫氧化鈉溶液 ( $\text{NaOH}$ , 0.05 M)：取 2 g 氫氧化鈉溶於去離子水中，定量至 1 L。
2. 0.05 M 鹽酸 ( $\text{HCl}$ , 0.1 M)：取 1 M 鹽酸標準液加入去離子水稀釋至 0.05 M。
3. 0.5 M 氯化鋇溶液 ( $\text{BaCl}_2$ , 0.5 M)：取 122.14 g  $\text{BaCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  溶於 600 mL 去離子水中，定量到 1 L。
4. 酚酞指示劑：取 0.1 g 酚酞 (phenolphthalein) 溶於 80 mL 乙醇 (ethanol, 60% v/v) 中，以乙醇定量到 100 mL。



### 3.9.1.2 步驟

1. 取 20 g 通過 10 mesh 之鮮土放入有透氣孔之離心管，並將離心管置入內含 20 mL 0.05 M 氫氧化鈉溶液之血清瓶 (250 mL) 中，離心管之上緣嵌於血清瓶口，使離心管懸空不與氫氧化鈉液體接觸，血清瓶蓋內加入矽膠墊片，上蓋鎖緊，置於 26°C 之培養箱內，避光孵育 72 h，各處理兩重複。空白組離心管不含土壤樣品，作三重複。
2. 取出離心管，加入 5 mL 0.5 M 氯化鋇溶液及數滴酚酞指示劑於血清瓶內。以 0.05 M 鹽酸滴定至無色，紀錄滴定量。
3. 計算：呼吸作用速率 ( $\text{mg CO}_2\text{-C kg}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) =  $(V_0 - V) \times C / (t \times s)$

$V_0$ ：空白組滴定量 (mL)

$V$ ：土壤樣品滴定量 (mL)

$t$ ：孵育時間 (3 d)


$s$ ：20 g 濕土乾重 (g)

$C$ ：轉換因子 conversion factor = 1.1 (1 mL 0.05 M 氫氧化鈉相當於 1.1 mg 二氧化碳)。

## 3.9.2 土壤微生物生質碳與氮 (Vance et al., 1987)

### 3.9.2.1 試劑

1. 無酒精氯仿 (ethanol free  $\text{CHCl}_3$ )。
2. 0.5 M 硫酸鉀 (0.5 M  $\text{K}_2\text{SO}_4$ )：取 87.1 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  溶於去離子水中，定量至 1 L。
3. 66.7 mM 重鉻酸鉀 (66.7 mM  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 0.4 N, 19.6125 g  $\text{L}^{-1}$ )：將  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  於 105°C 烘乾二小時後取 19.6 g 溶於去離子水中，定量到 1 L。
4. 硫酸/磷酸混合液 ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  mixture, v/v)：將濃  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  以 2:1 的體積均勻混合。
5. 硫酸亞鐵銨滴定試劑 (40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )：取 15.69 g 硫酸亞鐵銨溶於去離子水中，再加入 20 mL 濃硫酸，定量至 1 L。
6. 二苯胺指示劑：將 0.5 g 的二苯胺 (diphenylamine) 溶於 20 mL 去離子水及 100 mL 濃硫酸中。

- 
7. 茚滿三酮試劑 (ninhydrin, 1,2,3-indantrione H<sub>2</sub>O)：取 10 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5 g 茚滿三酮及 0.3 g 果糖 (fructose) 於去離子水中，並定量至 100 mL。其 pH 應為 6.6-6.8 (儘量避光)。
  8. 稀釋溶液：將 2 g 碘酸鉀 (KIO<sub>3</sub>) 溶於 600 mL 之水中，完全溶解後加入 400 mL 95% 乙醇，均勻混合後貯存於 4°C。
  9. 標準胺基酸 (amino acid, A.A.) 儲存溶液：溶解 214.4 mg 甘胺酸 (glycine) 於去離子水中，定量至 200 mL，貯存於 0°C；此溶液為 200 mg NH<sub>2</sub>-N L<sup>-1</sup>。
  10. 檸檬酸緩衝液：取 56 g 檸檬酸及 21.3 g 氫氧化鈉溶於水中，定量至 1 L。

### 3.9.2.2 土壤微生物生質碳、氮萃取氣仿燻蒸萃取法 (Vance et al., 1987)

#### 步驟

1. 先將數張以去離子水濕潤之濾紙置於乾燥皿底部及壁上，並將乾燥皿置於抽氣櫃中。
2. 取 20 g 通過 10 mesh 之鮮土於玻璃培養皿中，將培養皿放入乾燥皿。
3. 將燒杯裝入 20 mL 無酒精氣仿及數顆沸石，置於乾燥皿中間。
4. 在抽氣櫃內將乾燥皿連接抽氣馬達，抽氣至氣仿沸騰，使乾燥皿中充滿氣仿蒸氣。密封乾燥皿後停止抽氣，並以黑色塑膠袋覆蓋乾燥皿，於黑暗下 25°C 孵育 24 小時 (若低於 25°C，燻蒸可能不完全，則燻蒸時間需要延長)。
5. 孵育後，在抽氣櫃內將乾燥皿連接抽氣馬達，反覆抽氣將氣仿抽出後再開啟乾燥皿。
6. 將土壤從培養皿移至 250 mL 錐形瓶中，加入 80 mL 0.5 M 硫酸鉀溶液，震盪萃取 30 分鐘後過濾，萃取液儲存於 -20°C 待分析。
7. 空白組 (未燻蒸) 則直接將鮮土 (10 mesh) 置於 250 mL 錐形瓶中震盪萃取後過濾。

### 3.9.2.3 土壤微生物生質碳-重鉻酸鉀氧化法 (Kalembas and Jenkinso, 1973)

#### 步驟：

1. 取 8 mL 樣品萃取液於 250 mL 錐形瓶中，再加入 2 mL 66.7 mM 重鉻酸鉀溶液和 15 mL 硫酸/磷酸混合液。
2. 以加熱板 100°C 加熱 30 分鐘，冷卻至室溫後加入 20 mL 去離子水 (此時溶液



為黃色)。

3. 冷卻至室溫後加入數滴二苯胺指示劑 (此時溶液呈墨黃色)，以硫酸亞鐵銨滴定試劑滴定，溶液在滴定過程中由墨黃色轉為灰紫色最後滴定終點為碧綠色。
4. 空白組為以去離子水取代樣品萃取液，其餘步驟相同。
5. 計算：

可萃取有機碳濃度 ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) =

$$\left[ \frac{(H - S)}{B} \times M \times D \times (1 / A) \times E \times 10^3 \right] (K + w) / s$$

微生物生質碳濃度 = 可萃取有機碳濃度 / 0.38

A：加入之萃取液量 (mL) (8 mL)

B：水取代萃取液之空白組滴定量 (mL)

H：未燻蒸土壤樣品滴定量 (mL)

S：燻蒸土壤樣品滴定量 (mL)

M：重鉻酸鉀之當量 (0.4 N)

D：加入重鉻酸鉀反應的 mL 數 (2 mL)

E：C 的分子量 / 電子轉移數 =  $12 / 4 = 3$  [ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CO}_2$  (氧化一個碳，轉移四個電子)]

K：硫酸鉀總萃取液量 (mL) (80 mL)

w：20 g 鮮土水分含量 (mL)

s：20 鮮土乾重 (g)

#### 3.9.2.4 土壤微生物生質氮 (Joergensen and Brookes, 1990)

步驟：

1. 將  $200 \text{ mg NH}_2\text{-N L}^{-1}$  標準胺基酸儲存溶液，稀釋為 2、4、6、8、10  $\text{mg NH}_2\text{-N L}^{-1}$ 。分別取 2 mL 標準胺基酸試驗溶液到 15 mL 有旋蓋試管中。
2. 取 2 mL 樣品萃取液至 15 mL 有旋蓋玻璃試管中，空白組以 2 mL 去離子水取代萃取液。
3. 分別加入 1 mL 檸檬酸緩衝液及 1 mL 茚滿三酮試劑，混合均勻後將試管口蓋緊。





4. 在沸水中加熱 16 分鐘，在 20°C 之水浴冷卻 20 分鐘。
  5. 加入 5 mL 稀釋溶液，混合均勻後 30 分鐘內，以波長 570 nm 測定吸光值。
  6. 計算：微生物生質氮濃度 ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) =  $(S - B) \times (L + w) \times 2.64 / s$
- S：燻蒸土壤樣品測得濃度 ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
- B：未燻蒸土壤樣品測得濃度 ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
- L：硫酸鉀總萃取液量 (mL) (80 mL)
- w：20 g 鮮土水分含量 (mL)
- s：20 g 鮮土乾重 (g)

### 3.10 土壤微生物群落結構分析


#### 3.10.1 磷脂質脂肪酸分析法 (Bossio et al., 1998)

##### 3.10.1.1 試劑

1. 0.15 M 檸檬酸鹽緩衝液：將 14.4 g 檸檬酸溶於 250 mL 去離子水中，加入 210 mL 0.5 M 氫氧化鈉溶液，將 pH 值調至 4，定量至 500 mL。
2. 單相混合萃取液 (one phase extraction buffer)：將氯仿、甲醇與檸檬酸鹽緩衝液以 1：2：0.8 體積比均勻混合。
3. 甲醇/甲苯混合溶液：將甲醇與甲苯以 1：1 體積比均勻混合。
4. 0.2 M 氫氧化鉀溶液：將 0.5611 g 氫氧化鉀溶於 50 mL 甲醇均勻混合。
5. 正己烷氯仿混合溶液：將正己烷與氯仿以 4：1 體積比均勻混合。
6. 1 M 醋酸：將 57.417 mL 冰醋酸以去離子水定量至 1,000 mL。

##### 3.10.1.2 步驟

1. 取 4 g 冷凍乾燥之土壤樣品於鐵氟龍離心管中。
2. 加入 19 mL 單相混合萃取液，內含氯仿：甲醇：檸檬酸鹽緩衝液 = 1：2：0.8 v/v/v (one phase extraction buffer, chloroform:methanol:phosphate buffer = 1：2：0.8 v/v/v)，避光震盪二小時。以 2,500 rpm 離心 10 分鐘後將上清液移至分液漏斗。此步驟進行二次，第二次加入 8 mL 萃取液避光震盪半小時且離心過濾後，將上清液移至與前次之上清液混合。加入 7.1 mL 氯仿和 5.0 mL 檸檬酸鹽緩衝液於分液漏斗中。劇烈振盪均勻一分鐘，避光靜置 18 小時。

- 
3. 取出分液漏斗的下層溶液 (氯仿層) 於試管中，以氮氣使氯仿揮發，待乾燥後，將試管避光儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$  中。
  4. 將脂質以每次  $250\ \mu\text{L}$  氯仿回溶，轉移至固相矽膠 (silica gel) 萃取層析管柱，此步驟重複進行四次。接著加入  $5\ \text{mL}$  氯仿淋洗固相萃取層析管柱。再分別加入  $5\ \text{mL}$  丙酮淋洗層析管兩次。最後加入  $5\ \text{mL}$  甲醇淋洗層析管，並收集此次淋洗液，在淋洗的過程中可以利用抽氣增加淋洗速度。以氮氣使甲醇揮發後，避光儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$  中。
  5. 加入  $1\ \text{mL}$  甲醇/甲苯混合溶液 (甲醇：甲苯 = 1：1 v/v) 及  $1\ \text{mL}$   $0.2\ \text{M}$  氫氧化鉀溶液 (氫氧化鉀溶於甲醇)，旋轉振盪器 (vortex) 震盪混合均勻，以  $35^{\circ}\text{C}$  避光水浴  $15$  分鐘。
  6. 加入  $2\ \text{mL}$  正己烷氯仿混合溶液 (正己烷：氯仿 = 4：1 v/v) 及  $0.3\ \text{mL}$   $1\ \text{M}$  醋酸溶液調整 pH 值。加入  $2\ \text{mL}$  超純水後 vortex  $30$  秒。以  $2,000\ \text{rpm}$  離心五分鐘，將上清液移至氣相層析儀專用樣品瓶。此步驟進行二次，以氮氣將溶液揮發後，避光儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$  下。
  7. 以  $150\ \mu\text{L}$  含十九酸甲酯 (19：0) (bacterial acid methyl ester mix CP, 47080, Sigma-Aldrich) 正己烷回溶後，使用氣相層析儀 - 火焰離子化偵測器 (gas chromatography with a flame ionization detector, GC-FID) (Thermo Finnigan Trace GC, USA) 分析樣品各脂肪酸含量。
  8. 樣品中未知的甲基酯化脂肪酸之相對滯留時間與標準品 (19：0) 之相對滯留時間相比，即可判定為何種脂肪酸。
  9. 使用管柱為直徑  $0.25\ \text{mm}$ 、 $60\ \text{m}$  長之 Thermo TR-5 column，載流氣體為氮氣，注射器為毛細式管柱注射器 (split mode)。
  10. 溫度條件：管柱起始溫度為  $70^{\circ}\text{C}$  持續二分鐘，接著每分鐘提升  $30^{\circ}\text{C}$  升溫至  $160^{\circ}\text{C}$ ，再以每分鐘  $2.5^{\circ}\text{C}$  提升至最終溫度  $280^{\circ}\text{C}$  持續  $15$  分鐘。
  11. 脂肪酸之命名：總碳數：雙鍵數，雙鍵數後數字為雙鍵位置 (從甲基端數來第幾個碳上)。在總碳數前代號 i 及 a 分別代表 iso- 與 anteiso- 側鏈；雙鍵位置後代號 c 及 t 分別代表 cis 及 trans 異構物；10 Me 代表從羧基端數來第十個碳上有一甲基；cy 表示含有環丙烷 (cyclopropane) 結構； $\omega$  表示倒著數 (從羧基端開始數)。

12. 各微生物群落之代表性 PLFA：細菌群落數量的指標為 i15:0、a15:0、15:0、i16:0、16:1 $\omega$ 7c、17:0、i17:0、cy17:0、18:1 $\omega$ 7c 與 cy19:0 之加總；代表革蘭氏陽性菌群落數量的指標為 i15:0、a15:0、i16 及 i17:0 之加總；代表革蘭氏陰性菌群落數量的指標為 16:1 $\omega$ 7c、cy17:0、18:1 $\omega$ 7c 及 cy19:0 之加總；代表放線菌群落數量的指標為 10Me18:0；代表真菌群落數量的指標為 18:2 $\omega$ 6c (Moeskops et al., 2010)。

### 3.10.2 DNA 分子序列分析法

#### 3.10.2.1 土壤 DNA 萃取

使用 MO BIO PowerSioI® DNA isolation kit 萃取土壤 DNA。

1. 取 0.25 g 冷凍乾燥後的土壤樣品置於 bead tube。
2. 加入 60  $\mu$ L C1 溶液，置於均質機 (Tissue Lyser II, Qiagen) 以每秒 25 下水平震盪 10 min，以打破細菌與真菌細胞。
3. 以 1,000 g 離心 1 min 將土壤與 DNA 分離。
4. 取出上清液至微量離心管 (enppendorf)，加入 250  $\mu$ L C2 溶液，震盪混合。
5. 冰浴 5 min，以沉澱非 DNA 之有機與無機雜質。
6. 以 1,000 g 離心 1 min 後取出上清液，加入 200  $\mu$ L C3 溶液，震盪混合。
7. 冰浴 5 min，以加強去除有機酸、蛋白質與細胞殘骸等雜質。
8. 以 1,000 g 離心 1 min 後取出上清液，加入 1,200  $\mu$ L C4 溶液，震盪混合。
9. 取約 650  $\mu$ L 至 Spin filter 以 1,000 g 離心 1 min，重複三次，此時 DNA 會因 C4 的高鹽濃度而與矽膠膜結合。
10. 加入 500  $\mu$ L C5 溶液離心 1 min，以清洗多餘鹽類、腐植酸及其他雜質。
11. 離心 3 min，倒掉廢液後再離心 1 min，以完全去除殘餘酒精。
12. 最後以 50  $\mu$ L 淋洗緩衝液 (elution buffer) 將 DNA 回溶，保存於 -20°C。

#### 3.10.2.2 16S 及 18S rDNA 基因聚合酶連鎖反應

16S 及 18S rRNA 基因 (ribosomal ribonucleic acid gene) 為常被用於物種鑑定之基因片段，分別代表原核生物與真核生物。因 16S 及 18S rRNA 基因在生物演進分類及鑑定上具有獨特性 (Woese, 1987)，所以可以根據 16S 及 18S rRNA 基因

序列設計探針 (probe)，來偵測自然環境中的微生物。聚合酶連鎖反應利用引子 (primer) 夾取目標基因片段，並將此片段增幅放大，使 DNA 量足夠進行後續相關試驗。本試驗利用 PCR 放大土壤樣品 DNA 中 16S 及 18S rRNA 基因序列片段後，進行變性梯度膠體電泳，藉以分析土壤細菌及真菌群落。

PCR 使用之引子、反應混合液與條件設定：

表三、本試驗使用之引子

Table 3. The primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Reference
<b>Bacteria (16S)</b>		
<b>F984GC</b>	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC	(Nubel et al., 1996)
<b>R1378</b>	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	(Heuer et al., 1997)
<b>Fungi (18S)</b>		
<b>NS1</b>	GTAGTCATATGCTTGTCTC CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCC	(White, 1990)
<b>GCFungi</b>	GCCCCGCCCCATTCCCCGTTACCCGTTG	(May et al., 2001)

表四、細菌 (16S) 及真菌 (18S) 之聚合酶連鎖反應混合液

Table 4. The premix of PCR reaction for 16S and 18S used in this study

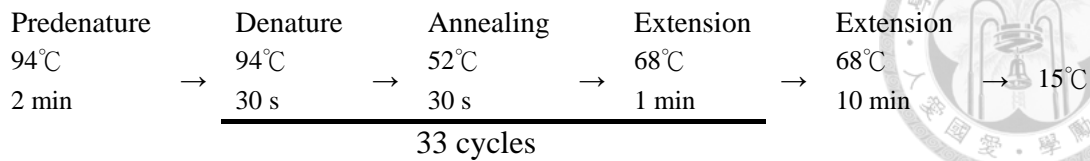
Bacteria (16S)	( $\mu$ L)	Fungi (18S)	( $\mu$ L)
ddH <sub>2</sub> O	22	ddH <sub>2</sub> O	22
2x Quick Taq HS DyeMix	25	2x Quick Taq HS DyeMix	25
10 $\mu$ M F984GC	1	10 $\mu$ M NS1	1
10 $\mu$ M R1378	1	10 $\mu$ M GCFungi	1
Soil DNA (5 g L <sup>-1</sup> )	1	Soil DNA (5 g L <sup>-1</sup> )	1
Total	50	Total	50

PCR 條件設定：

細菌 (16S)：

Pre-denature	Denature	Annealing	Extension	Extension
94°C	94°C	61.5°C	68°C	68°C
2 min	30 s	30 s	1 min	10 min
	→	→	→	→ 15°C
35 cycles				

真菌 (18S) :



### 3.10.2.3 變性梯度膠體電泳

本研究利用變性梯度膠體電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 觀測不同生物炭添加於土壤後，其細菌與真菌菌相之變化。使用甲醯胺 (formamide) 及尿素 (urea) 作為變性劑。細菌使用之變性梯度為 50%-70%；真菌使用之變性梯度為 20%-45%。

#### 1. 製作變性梯度膠體

- (1) 將大、小玻璃片內面以 70% 酒精及拭鏡紙擦拭乾淨。
- (2) 在大片玻璃左右兩側放上墊片 (spacer) 後，蓋上小片玻璃，使大小片玻璃與墊片底部切齊，以鑄膠夾 (clamp) 稍微固定後整組放在鑄膠台 (casting stand) 上。利用校準卡 (alignment card) 放入兩片玻璃間以校正墊片的位置，旋緊鑄膠夾上方旋鈕。取下鑄膠組確認玻璃與墊片底部是否水平切齊，將整組架在鑄膠台的鑄膠位置 (casting position) 上，使鑄膠組緊壓在橡膠墊 (gray sponge) 上且呈水平狀態。
- (3) 取高濃度膠體溶液 3 mL 製成底層膠，分別由兩端各緩慢注入 1.5 mL 於玻璃夾層間確認膠體上緣呈水平，靜待十分鐘左右，使底層膠凝固以避免漏膠。
- (4) 參照表五及表六配製分別配製細菌 6% 及真菌 7% 之丙烯醯胺 (acrylamide) 變性凝膠，以 0.2  $\mu\text{m}$  濾紙抽氣過濾，避光儲存於 4°C。各取 22.5 mL 膠體溶液，在最後注膠前加入 9  $\mu\text{L}$  tetramethylenediamine (TEMED) 和 225  $\mu\text{L}$  10% 過硫酸銨 (ammonium persulfate, APS) 使膠體凝結，高濃度膠體溶液可以加入 100  $\mu\text{L}$  染劑，利於觀察灌膠情形。將上述膠體溶液混合均勻後，分別以 50 mL 針筒吸取溶液後排除管內空氣，並將兩針筒固定於鑄膠器上，透過 Y 型注射管連接至針頭 (事先將針頭固定於鑄膠組中央位置)。順時針方向以緩慢且穩定之速度推動鑄膠器，膠片於七分鐘內灌注完畢，製成變性梯度膠體。上層再注入 running buffer 以壓平膠體上緣。

- (5) 靜置約 90 分鐘，待梯度膠體凝固後，移除上層 running buffer，插上適當大小的尺梳，注入無添加變性劑之上層膠（檢查是否有氣泡），避免抽出尺梳時造成膠孔變形。
- (6) 上層膠凝固後抽出尺梳，洗淨各膠孔，即可準備將各樣品注入各膠孔中。

表五、細菌之 6% acrylamide 變性梯度膠體配製

Table 5. The composition of denaturing gradient gel with 6% acrylamide for bacteria

	50% denaturing solution	70% denaturing solution
<b>40% acrylamide</b>	15 mL	15 mL
<b>50x TAE</b>	2 mL	2 mL
<b>Formamide</b>	20 mL	28 mL
<b>Urea</b>	21 g	29.4 g
<b>Glycerin</b>	2 mL	2 mL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	To 100 mL	To 100 mL

表六、真菌之 7% acrylamide 變性梯度膠體配製

Table 6. The composition of denaturing gradient gel with 7% acrylamide for fungi

	20% denaturing solution	45% denaturing solution
<b>40% acrylamide</b>	17.5 mL	17.5 mL
<b>50x TAE</b>	2 mL	2 mL
<b>Formamide</b>	8 mL	18 mL
<b>Urea</b>	8.4 g	18.9 g
<b>Glycerin</b>	2 mL	2 mL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	To 100 mL	To 100 mL

## 2. 進行電泳

- (1) 在等待上層膠凝結的過程中，就要開啟電泳槽的加熱及攪拌裝置，將 running buffer (1 × TAE buffer) 預熱至 65°C (溫度可以設定高於電泳溫度，避免加樣品時溫度下降過多)。
- (2) 先在準備好的上層膠膠孔內，加上 running buffer 後，分別取適量的各樣品 PCR 產物與適量的 loading dye 混合均勻，緩緩注入各膠孔中。
- (3) 將製備好的整個變性梯度膠體電泳組放入電泳槽內，依表七條件進行電泳。



表七、變性梯度膠體電泳之電泳條件

Table 7. The condition of denaturing gradient gel electrophoresis

Condition	Bacteria	Fungi
Acrylamide concentration	6%	7%
Denaturing concentration gradient	50%-70%	20%-45%
Temperature	58°C	60°C
Voltage	60 V	60 V
Time	15 h	16 h

### 3. DGGE 膠片的螢光染色及影像偵測

- (1) 本研究以毒性小且靈敏度高之螢光染劑 Gelstar，進行 DGGE 膠片電泳後之染色。於一不透光的平底盤內加入 200 mL 的 ddH<sub>2</sub>O，電泳完成後的膠片連同鑄膠器取出洗淨後，依序拆卸各零件，利用塑膠片 (slide) 將膠片取出放置於染劑中 (200 mL TAE buffer + 20  $\mu$ L Gelstar)，於水平震盪器上以 50 rpm 避光搖晃染色 30 分鐘。由於光線會破壞染劑，因此，
- (2) 染色過程必須全程避光。
- (3) 染色完取出膠片，利用 Bio-Red ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS system 以紫外光進行偵測與成像記錄，並以 Quantuty one® 1-D analysis software 進行圖譜分析。

### 3.11 統計分析

本研究孵育採完全隨機設計 (CRD)，每處理三重複，數據使用統計軟體 R 進行統計分析，樣品之化學與生物性質數據以 R version 3.1.3 package [agricolae] 進行單因子變方分析 (one-way ANOVA)；處理間差異以最小差異測驗法 (least significant difference test, LSD) 在顯著水準  $p < 0.05$  之下，進行均值間兩兩比較。變性梯度膠體電泳試驗圖譜及磷脂質脂肪酸試驗結果使用 IBM SPSS (statistical product and service solutions) 進行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 比較處理間之差異。

## 第四章 結果與討論



### 4.1 土壤基本化學性質

#### 4.1.1 生物炭對土壤 pH 值之影響

Glaser 等人 (2001; 2002) 研究顯示，生物炭添加於低 pH 值之高度風化熱帶土壤，可提升其 pH 值。本試驗顯示，在孵育第 0 天，加入生物炭處理之土壤 pH 值均顯著提升 (表八)。在施有機質肥料之土壤中，除了粒徑 5-8  $\mu\text{m}$  煤灰生物炭 (SC) 處理組外，其他處理之 pH 皆顯著提升。各處理提高 pH 值之高低不同，此應與生物炭本身之化學性質有關 (表二)，柳杉生物炭 (JC) 與棕櫚殼生物炭 (PKS) 之 pH 值較其他生物炭高，與其處理土壤後之結果一致。一般煤灰 pH 值之變化範圍為 4.5-12.0，主要為煤灰中之硫含量與煤炭之原料類型所影響 (Plank and Martens, 1974)。而 SC 與粒徑 15-30  $\mu\text{m}$  煤灰生物炭 (LC) 之 pH 值為 5.3 與 5.6，儘管不是鹼性但仍比紅壤之 pH 值高，因此，施入土壤中，除了 SCM 處理組與對照組 BK 及 BKM 相比不顯著之外，其餘 pH 值皆提升。本研究也顯示，添加本試驗所使用之有機質肥料，對於土壤 pH 影響小，為有機質肥料未偏酸性所致 (表一)。孵育 90 天與 180 天後，整體 pH 值皆下降 (表九、表十)，特別是添加生物炭處理組下降較多。研究顯示，孵育四個月後，添加生物炭之土壤 pH 值下降，可能為有機質分解後所產生之酸性物質所導致 (Senesi and Plaza, 2007; Dias et al., 2010)，此外，生物炭能促進土壤有機質之分解，因此，土壤有機質分解所產生之酸性物質也累積較快 (Liu and Zhang, 2012)，此結果顯示所施用之生物炭有中和土壤酸性之能力 (capacity)，但其作用時間短，在四個月內其所含之鹼即耗盡。

土壤 pH 值為土壤化學性質中重要因子之一，影響土壤之物理、化學性質與生物反應甚大，如作物生長、有機質的合成與分解、微生物的活性、養分的轉化與釋放以及土壤保肥力等，且與土壤中養分有效性密切相關 (張, 2015)。生物炭之 pH 值受其原料來源、生產溫度、生產時間的不同，而有不同之影響 (Liu and Zhang, 2012)。有機資材生物炭亦含礦物化合物，富含二氧化矽、碳酸鈣、氯化鉀、硫酸鈣、硝酸鹽類等氧化物與氫氧化物 (Parr and Sullivan, 2005; Amonette and Joseph, 2009)。Chan 和 Xu (2009) 認為生物炭高鹼度性質的原因，主要為其富含碳酸鹽類



等鹼性陽離子與有機陰離子，而 Yuan 等人 (2011) 也以 X 光能量分散光譜儀 (energy dispersive X-ray spectrometry, EDS) 證實生物炭存在碳酸鹽類。



#### 4.1.2 生物炭對土壤 EC 值之影響

土壤飽和水電導度 (EC) 大小表示土壤溶液可溶性鹽類 (例如  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  等) 含量的多寡，EC 值越高表示土壤養分含量越多，但在土壤飽和水萃取液在  $25^\circ\text{C}$  下之電導度  $\geq 4 \text{ dS m}^{-1}$  時，則表示土壤中的可溶性鹽含量過高，屬於鹽土，不利於一般植物生長 (Brady and Weil, 2008)。

表八顯示，在孵育第 0 天時，未添加有機質肥料的條件下，生物炭之添加對土壤 EC 值不但無增加之效應，甚至減少；顯示由生物炭而來之可溶性鹽量少 (表二)，而其吸附的能力將原有在土壤中之可溶性鹽類吸附，故造成 EC 值下降，如 JC、PKS 及 LC 三個處理 (表八)。施有機質肥料之土壤亦有相同的現象，土壤 EC 值因有機質肥料施用而增加 (BKM 處理)，但是除了 RHM 與 SCM 處理組外，生物炭之添加均使土壤 EC 值下降。經過 90 天孵育後，未施有機質肥料之 BK 處理的 EC 值比第 0 天時增加，其歸因於孵育時土壤之物理、化學與生物性質之變化，使物質溶解並增加；添加生物炭處理應有相似的反應，但生物炭之高吸附能力使其 EC 值下降，如第 0 天所顯示；添加有機質肥料之處理亦有相同的情形，BKM 處理之 EC 值比第 0 天時增加，但是添加生物炭時，則又使其下降，其下降之多寡則與生物炭之種類有關。而孵育到 180 天時，BK 與 BKM 兩處理的 EC 值比第 90 天時下降，顯示隨時間增加而使土壤中之化學或生物反應有很大的不同，然而，生物炭對可溶性鹽的影響與第 0 天及第 90 天的情形則是相同的。有關於生物炭與 EC 值之直接關係之研究較少，Jones 等人 (2011) 之研究顯示，生物炭與土壤中 EC 值沒有顯著相關，而 Hossain 等人 (2011) 以富含礦物質之地下水底泥生物炭，使土壤之 EC 值顯著上升。因此，不同生物炭與不同施用環境之條件下，對於土壤 EC 值影響不同。儘管 Steiner 等人 (2007) 之研究顯示，生物炭之大量碳酸鹽，可以使土壤 EC 值提升，但本研究結果顯示下降，為所使用之生物炭，因吸附可溶性鹽所致。



#### 4.1.3 生物炭對土壤有機碳之影響

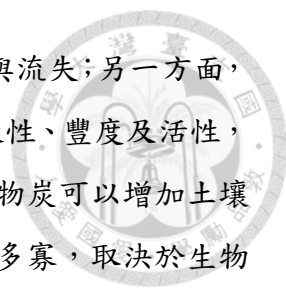
土壤有機碳 (soil organic carbon, SOC) 含量取決於投入之碳量 (地上凋落物或施用有機質肥料等) 與分解速率, 土地利用與管理顯著影響土壤有機碳含量 (陳等, 2000)。表八顯示, 在孵育第 0 天時, 除了 SC 與 SCM 處理外, 其餘各處理的 SOC 含量因生物炭之添加而有顯著增加。整體而言, 相同之處理在不同的取樣時間所測得之 SOC 不同, 甚至有增加的現象, 此結果說明生物炭在土壤中不易混合得非常均勻, 但由表八、表九與表十可知, 所有使用之生物炭, 不論是否添加有機質肥料, 在 180 天之孵育期間, 其被分解應為少量, 即生物炭抗微生物之分解。然而, 也可能因為孵育時間較短, 不易觀察土壤有機碳之變化。

許多研究顯示, 生物炭與有機質肥料之添加, 均使土壤中之有機碳含量增加。Haefelea 等人 (2011) 將碳化稻殼加入水稻田土壤, 增加土壤總有機碳; Prabha 等人 (2013) 以每公頃施用 16 噸之橡木生物炭, 使土壤之有機碳增加 11.1%; Borchard 等人 (2014) 使用木炭生物炭, 提升土壤中之有機碳與總氮。生物炭本身之有機碳含量多寡, 以及抵抗微生物分解之特性, 為土壤有機碳含量增加之主要原因。

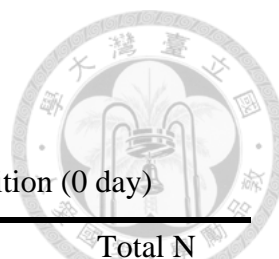
#### 4.1.4 生物炭對土壤總氮之影響

氮廣泛分布於自然界中, 但土壤中的氮僅佔其中的一小部分, 其中植物有效氮所佔之比例更少, 但為影響土壤生態的重要因子之一。表八顯示, 在第 0 天時, 不論是否添加有機質肥料, 添加生物炭對土壤總氮的影響小, 其中 LC 處理與 BK 處理之總氮含量呈現上升, 而 SC 處理組則略為下降。添加有機質肥料時, 除 LCM 處理上升外, 其餘所有處理皆無差異, 因由生物炭而來的氮少。孵育 90 天與 180 天時, 各處理對總氮的影響與第 0 天相近 (表九與表十), 顯示在六個月的孵育期間, 土壤中總氮的變化小。然而, 有機質肥料之添加, 則使土壤總氮顯著增加。

生物炭能提高土壤氮含量, 但不能直接提供植物生長之有效性氮。生物炭影響土壤中氮循環, 提升氮之有效性, 其主要原因為影響土壤中氮的持留與轉化: 生物



炭的多孔性構造與廣大的比表面積，可以吸持氮，降低氮的淋洗與流失；另一方面，生物炭影響土壤之物化性質，直接或間接影響土壤微生物之多樣性、豐度及活性，進而影響土壤中氮的循環 (Spokas et al., 2012)。理論上，添加生物炭可以增加土壤中氮含量 (Haefelea et al., 2011)，而添加後土壤中氮含量增加之多寡，取決於生物炭原有之氮含量 (Borchard et al., 2014)。本試驗之生物炭中，含氮濃度最高為 LC 煤灰生物炭 (表二)，與其增加最多土壤中氮含量之結果互相吻合。然而，生物炭亦會持留土壤中的氮，因此，生物炭之比表面積亦會影響土壤中氮含量 (Wu et al., 2014)。



表八、不同生物炭處理下之土壤基本化學性質 (孵育第 0 天)

Table 8. Chemical properties of the soils under different biochar addition (0 day)

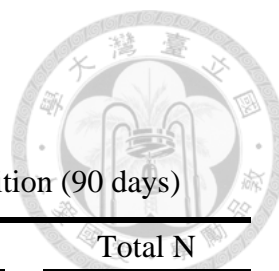
Treatment	pH	EC <sup>2</sup>	SOC <sup>2</sup>	Total N
	(1:1)	dS m <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>
RH <sup>1</sup>	4.8 ± 0.1 <sup>3</sup> c <sup>4</sup>	1.86 ± 0.04 a	32.3 ± 2.2 b	1.5 ± 0.2 b
JC	4.9 ± 0.0 b	1.17 ± 0.12 d	37.9 ± 2.0 a	1.4 ± 0.0 b
PKS	5.2 ± 0.0 a	1.39 ± 0.00 c	31.6 ± 2.0 b	1.5 ± 0.1 b
SC	4.3 ± 0.0 e	1.71 ± 0.09 ab	17.5 ± 0.5 c	0.9 ± 0.1 c
LC	4.4 ± 0.0 d	1.67 ± 0.15 d	29.1 ± 3.1 b	1.8 ± 0.1 a
BK	4.3 ± 0.0 e	1.82 ± 0.02 ab	17.8 ± 0.9 c	1.1 ± 0.2 c
RHM	4.6 ± 0.0 c	8.56 ± 0.41 a	44.4 ± 0.6 ab	3.3 ± 0.3 ab
JCM	4.8 ± 0.0 b	6.13 ± 0.23 c	47.5 ± 3.0 a	2.8 ± 0.2 cd
PKSM	5.0 ± 0.0 a	5.94 ± 0.23 c	40.9 ± 2.9 b	3.2 ± 0.2 bc
SCM	4.2 ± 0.0 e	8.08 ± 0.09 ab	28.5 ± 1.5 d	2.7 ± 0.5 d
LCM	4.3 ± 0.0 d	7.56 ± 0.37 b	35.7 ± 0.8 c	3.7 ± 0.0 a
BKM	4.2 ± 0.0 e	8.05 ± 0.37 ab	29.6 ± 1.4 d	3.0 ± 0.1 bcd

<sup>1</sup>Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter

<sup>2</sup>EC : Electrical conductivity of saturation extract ; SOC : Soil organic carbon.

<sup>3</sup>Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup>Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.



表九、不同生物炭處理下之土壤基本化學性質 (孵育第 90 天)

Table 9. Chemical properties of the soils under different biochar addition (90 days)

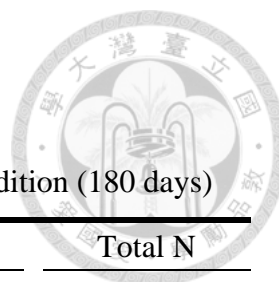
Treatment	pH (1:1)	<sup>2</sup> EC dS m <sup>-1</sup>	<sup>2</sup> SOC g kg <sup>-1</sup>	Total N g kg <sup>-1</sup>
RH <sup>1</sup>	4.2 ± 0.1 <sup>3</sup> c <sup>4</sup>	2.65 ± 0.27 a	28.6 ± 0.6 b	1.4 ± 0.1 b
JC	4.5 ± 0.0 b	1.21 ± 0.05 d	37.8 ± 2.1 a	1.3 ± 0.0 bc
PKS	4.9 ± 0.1 a	1.40 ± 0.01 cd	35.9 ± 0.7 a	1.5 ± 0.1 b
SC	3.9 ± 0.0 d	2.14 ± 0.28 b	17.2 ± 1.0 c	1.1 ± 0.3 c
LC	4.1 ± 0.1 c	1.57 ± 0.05 c	37.1 ± 2.5 a	1.8 ± 0.3 a
BK	3.8 ± 0.1 d	2.74 ± 0.23 a	17.2 ± 0.3 c	1.4 ± 0.0 b
RHM	4.3 ± 0.0 c	9.14 ± 0.95 a	42.8 ± 1.9 c	3.5 ± 0.2 ab
JCM	4.6 ± 0.0 b	6.11 ± 0.09 d	52.8 ± 1.0 a	3.0 ± 0.2 c
PKSM	4.8 ± 0.0 a	6.71 ± 0.71 cd	46.9 ± 2.4 b	3.3 ± 0.3 bc
SCM	4.1 ± 0.0 d	8.51 ± 0.84 ab	28.6 ± 0.9 d	3.4 ± 0.6 abc
LCM	4.3 ± 0.1 c	7.53 ± 0.35 bc	45.6 ± 2.4 bc	3.8 ± 0.1 a
BKM	4.0 ± 0.0 e	9.51 ± 0.76 a	28.8 ± 1.0 d	3.4 ± 0.1 abc

<sup>1</sup>Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter

<sup>2</sup>EC : Electrical conductivity of saturation extract ; SOC : Soil organic carbon.

<sup>3</sup>Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup>Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.



表十、不同生物炭處理下之土壤基本化學性質 (孵育第 180 天)

Table 10. Chemical properties of the soils under different biochar addition (180 days)

Treatment	pH	<sup>2</sup> EC	<sup>2</sup> SOC	Total N
	(1:1)	dS m <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>
RH <sup>1</sup>	4.2 ± 0.0 <sup>3</sup> c <sup>4</sup>	2.36 ± 0.19 a	30.7 ± 1.0 b	1.5 ± 0.0 b
JC	4.4 ± 0.1 b	1.09 ± 0.15 d	41.5 ± 2.2 a	1.3 ± 0.0 c
PKS	4.8 ± 0.1 a	1.32 ± 0.11 cd	45.2 ± 14.6 a	1.4 ± 0.1 b
SC	3.9 ± 0.1 d	2.19 ± 0.03 ab	18.6 ± 0.4 c	1.2 ± 0.1 d
LC	4.2 ± 0.0 c	1.42 ± 0.19 c	42.5 ± 1.8 a	1.8 ± 0.0 a
BK	3.9 ± 0.0 d	2.08 ± 0.13 b	18.3 ± 0.1 c	1.2 ± 0.1 d
RHM	4.2 ± 0.1 c	9.01 ± 0.37 a	43.1 ± 1.0 d	3.3 ± 0.1 ab
JCM	4.5 ± 0.0 b	5.91 ± 0.57 c	52.4 ± 1.1 a	2.9 ± 0.2 c
PKSM	4.8 ± 0.1 a	6.18 ± 0.57 c	47.2 ± 1.4 c	3.1 ± 0.1 bc
SCM	4.0 ± 0.1 d	7.88 ± 0.76 ab	28.0 ± 1.0 e	2.9 ± 0.2 c
LCM	4.3 ± 0.1 c	6.91 ± 0.18 bc	50.1 ± 1.2 b	3.5 ± 0.2 a
BKM	4.0 ± 0.1 d	8.49 ± 1.03 a	29.0 ± 1.5 e	3.2 ± 0.3 abc

<sup>1</sup>Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter

<sup>2</sup>EC : Electrical conductivity of saturation extract ; SOC : Soil organic carbon.

<sup>3</sup>Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup>Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.



#### 4.1.5 生物炭對土壤 Mehlich III 可萃取養分陽離子之影響

生物炭之原料若為高養分含量，其經由高溫裂解後會生成富含養分之生物炭，然而，一般生物炭容易在高溫裂解的過程中，造成大部分之氮、磷與硫損失 (Giardina et al., 2000)。有許多研究探討生物炭是否能直接提供養分供給作物生長。生物炭富有大量的碳以及巨量和微量元素，其含量受原料與裂解環境影響 (Amonette and Joseph, 2009)。不同性質與養分含量之生物炭對作物影響不一：如作物產量與生物炭添加量呈正相關，使產量增加 20% 至 220% (Lehmann et al., 2003; Lehmann and Rondon, 2006)，然而，Blackwell 等人 (2007) 之研究則未得到使作物產量增加的結果。

生物炭之裂解溫度與生物炭之來源種類，是影響生物炭供給土壤養分之關鍵。Gaskin 等人 (2008) 研究表示，添加以 400°C 與 500°C 裂解之生物炭後，可萃取之磷、鉀、鈣含量皆有增加，而隨著來源與裂解溫度的不同，增加量也不同。Laird 等人 (2010) 以櫟木、山核桃木等混合硬木之生物炭加入土壤後，其土壤之 Mehlich III 萃取磷、鉀、鈣、鎂含量皆提升，但不影響硫、銅、鋅之含量。有機質肥料添加，顯著增加土壤中的 Mehlich III 可萃取磷、鉀、鈣、鎂與鐵，對 Mehlich III 可萃取之錳、鋅及銅影響小。

##### 4.1.5.1 Mehlich III 可萃取之磷、鉀

土壤中之磷容易被固定，且土壤 pH 值對磷之有效性影響甚大。Mehlich III 可萃取磷為評估土壤磷有效性之指標之一，包含水溶性磷和部分吸附有機磷與無機磷等。土壤中之鉀大部分儲存於原生礦物中，植物無法直接利用 (陳，1991)，因此，為增加土壤中可交換性鉀含量，可額外添加資材以增加土壤中有效鉀。

表十一顯示，在第 0 天時，RH 與 RHM 兩處理組之 Mehlich III 可萃取磷含量相較 BK 及 BKM 顯著提升，顯示稻殼生物炭提升土壤中有效性磷。而在 Mehlich III 可萃取鉀含量結果顯示，稻殼、柳杉及棕櫚殼生物炭均可增加土壤的有效鉀，而兩種煤灰則否，因為煤灰中的鉀含量低。添加生物炭於土壤中，可提升有效性磷與鉀之含量。Hao 等人 (2011) 研究表示，生物炭會吸附環境中之水鐵礦，進而降

低水鐵礦吸附磷的能力，提高土壤中磷有效性。Parvage 等人 (2013) 也發現將麥稈生物炭加入土壤後，土壤之水溶性磷含量上升。Borchard 等人 (2014) 將生物炭施入酸性土壤後，土壤中之有效性磷、鉀含量提升。在 Mehlich III 可萃取磷方面，RH 與 PKS 處理組皆有顯著提升，此結果與前人研究相吻合，其他沒有顯著差異之處理，應與生物炭種類不同有關。

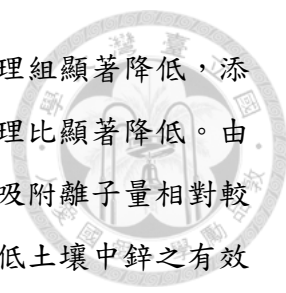
#### 4.1.5.2 Mehlich III 可萃取之鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅

在第 0 天時，不論土壤是否添加有機質肥料，RH、JC 與 PKS 三種生物炭之添加使 Mehlich III 可萃取鈣增加（雖然在統計上不一定顯著），兩種粒徑之煤灰則無此效應（表十一）。生物炭對 Mehlich III 萃取鎂之含量則皆沒有差異。對於添加生物炭增加土壤中有效性鈣、鎂含量之研究結果不一：Tsai 等人 (2013) 表示添加生物炭會降低 Mehlich III 可萃取之鈣、鎂含量，而 Zwieten 等人 (2010) 結果表示生物炭施入紅壤，其交換性鈣、鎂含量會增加。Glaser 等人 (2015) 之結果則顯示生物炭提升土壤有效性鉀、鎂含量，但對有效性鈣則沒有影響，應與生物炭之鈣、鎂含量有關。

表十一顯示，在第 0 天時，PKS 處理組之 Mehlich III 可萃取之鐵含量比 BK 處理顯著提高，其它處理間則無顯著差異，而添加有機質肥料後，生物炭之施用對 Mehlich III 可萃取鐵影響小，應是由生物炭所供之鐵含量較有機質肥料少所致。Mehlich III 可萃取之錳含量，在 SC 與 LC 處理皆比 BK 處理顯著下降，添加有機質肥料之 RHM 處理與 BKM 處理並無顯著差異，其餘處理之 Mehlich III 可萃取錳含量皆顯著下降；顯示生物炭對錳的吸附效應大。生物炭有助於土壤中鐵、錳溶於土壤水溶液中，提升其在土壤的有效性 (Graber et al., 2014)，但也有研究指出，生物炭會提高土壤 pH 值與負電荷膠體之含量，使鐵、錳等金屬離子被吸附而降低有效性 (Cui et al., 2011)。

表十一顯示，第 0 天之 Mehlich III 可萃取之鋅含量，LC 處理比 BK 處理顯著降低外，其他皆沒有顯著差異；而在添加有機質肥料後，可萃取之鋅含量除了 JCM 處理與 BKM 處理組沒有顯著差異外，其他皆有顯著提高。在施有機質肥料的土壤中，生物炭的施用提高了鋅有效性，而在未施有機質肥料之紅壤中，LC 生物炭吸





附鋅使其含量下降。Mehlich III 可萃取之銅含量在 SC 與 LC 處理組顯著降低，添加有機質肥料之土壤則為 JCM、PKSM、SCM 處理與 BKM 處理比顯著降低。由於 JC、PKS 與 SC 生物炭之比表面積相對較高（表二），因此，吸附離子量相對較多。儘管有研究顯示，生物炭可以吸附土壤中金屬離子，進而將低土壤中鋅之有效性，但這類研究方向多著重應用於鋅污染之土壤修復 (Zheng et al., 2012; Houben et al., 2013)。然而，也有許多研究表示，富含鋅之生物炭，添加於土壤後其有效鋅含量顯著增加 (Olmo et al., 2014)。也有研究指出，添加生物炭對土壤中 Mehlich III 可萃取之鋅、銅含量沒有顯著影響 (Laird et al., 2010)。造成諸多不同結果的原因，取決於生物炭之特性、裂解條件與施用之土壤環境等因素。由於本試驗觀察生物炭添加後，立即提供於土壤養分之含量，因此，著重討論孵育第 0 天。



表十一、不同生物炭處理下土壤 Mehlich III 可萃取陽離子含量 (孵育第 0 天)

Table 11. Melich III extractable nutrients of the soils under different biochar addition (0 day)

Treatment	Mehlich III extractable ( mg kg <sup>-1</sup> )							
	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
RH <sup>1</sup>	108 ± 15 <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	56 ± 1 a	356 ± 176 b	1162 ± 590 a	414 ± 21 b	453 ± 20 a	26 ± 0 ab	6.5 ± 0.1 a
JC	75 ± 14 b	42 ± 2 b	195 ± 23 c	169 ± 31 a	407 ± 15 b	418 ± 9 bcd	24 ± 1 b	5.8 ± 0.2 bc
PKS	105 ± 17 ab	34 ± 2 c	499 ± 48 a	408 ± 190 a	497 ± 35 a	425 ± 4 bc	27 ± 4 a	6.0 ± 0.4 ab
SC	83 ± 27 b	20 ± 1 d	141 ± 6 c	1512 ± 2345 a	436 ± 28 b	413 ± 12 cd	26 ± 2 ab	4.4 ± 0.2 d
LC	76 ± 5 b	19 ± 1 d	152 ± 6 c	202 ± 64 a	413 ± 9 b	401 ± 4 d	5 ± 0 c	5.5 ± 0.3 c
BK	70 ± 1 b	20 ± 1 d	156 ± 16 c	219 ± 87 a	428 ± 60 b	436 ± 4 ab	26 ± 1 ab	6.2 ± 0.3 ab
RHM	1998 ± 118 a	123 ± 6 a	1141 ± 80 b	1081 ± 57 a	643 ± 31 bc	545 ± 35 a	40 ± 7 bc	6.3 ± 0.2 a
JCM	1799 ± 42 ab	110 ± 0 b	1014 ± 76 bcd	1290 ± 325 a	605 ± 10 ab	481 ± 28 b	37 ± 3 cd	5.8 ± 0.1 b
PKSM	1914 ± 53 ab	106 ± 3 b	1734 ± 154 a	2752 ± 2556 a	680 ± 13 ab	503 ± 10 b	46 ± 4 b	5.5 ± 0.2 b
SCM	1776 ± 58 b	89 ± 5 c	944 ± 148 cd	1638 ± 964 a	622 ± 25 cd	497 ± 7 b	38 ± 4 c	4.9 ± 0.1 c
LCM	1760 ± 133 b	90 ± 2 c	875 ± 65 d	2085 ± 1421 a	678 ± 12 ab	503 ± 15 b	74 ± 2 a	6.2 ± 0.1 a
BKM	1855 ± 121 b	94 ± 4 c	1070 ± 75 bc	1494 ± 340 a	691 ± 27 bc	571 ± 26 a	30 ± 1 d	6.6 ± 0.3 a

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applied organic matter.

<sup>2</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>3</sup> Average followed by the same capital letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.

## 4.2 土壤微生物性質

土壤微生物與土壤組成、養分循環、有機質轉換的過程息息相關，因此，對環境敏感性高，也是評估土壤肥力的重要指標之一 (Yeates et al., 1999)。土壤呼吸作用、微生物生質量、微生物群落結構等，為常見之重要土壤微生物性質，而不同的生物炭種類，對土壤微生物性質會有不同影響 (Lehmann et al., 2011)。

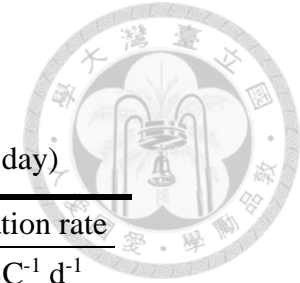
### 4.2.1 土壤微生物生質碳與氮

表十二顯示，在第 0 天時，不論是否有添加有機質肥料，生物炭處理之土壤之微生物生質碳含量分別與 BK 與 BKM 處理比都沒有顯著差異；顯示生物炭對土壤之微生物生質量沒有顯著影響。生質氮在未添加有機質肥料之土壤中，PKS 處理之含量較 BK 處理顯著下降，其餘則無顯著差異，而在添加有機質肥料之土壤中，JCM 處理較 BKM 處理顯著提高。孵育 90 天後 (表十三)，未添加有機質肥料壤之所有處理，其微生物生質碳含量皆沒有顯著差異，而在有添加有機質肥料之土壤中，SCM 處理比 BKM 處理顯著提高，顯示 SC 生物炭與有機質肥料一同添加於土壤孵育 90 天後，其微生物生質量增加。微生物生質氮在未添加有機質之土壤中，JC 與 SC 處理比 BK 處理顯著下降，而添加有機質肥料之土壤中，則都沒有顯著影響。孵育 180 天後，所有處理與對照組皆沒有差異 (表十四)。

表十二顯示，在第 0 天時，未添加有機質紅壤之處理中，RH、JC 與 PKS 處理比 BK 處理之 MBC/SOC 顯著下降，顯示 RH、JC 與 PKS 三種生物炭添加後，其土壤中微生物利用有機質之效率差，而使微生物生質量下降 (表十二)，而添加有機質肥料之處理，其 MBC/SOC 沒有顯著差異。孵育 90 天後 (表十三)，未添加有機質肥料土壤之 LC 處理，其 MBC/SOC 比 BK 處理顯著下降，表示微生物生長受到影響，而有添加有機質肥料土壤之處理中，SCM 處理則比 BKM 處理顯著提升，顯示在有機質肥料之添加下，經過孵育之小粒徑煤灰生物炭促進微生物生長，然而，在孵育時間長至 180 天後 (表十四)，所有處理皆沒有差異，顯示隨孵育時間越長，生物炭與有機質肥料對土壤的影響越小，最後趨於平衡。然而，生物炭添加後對於土壤中生質碳之影響的研究結果不一致：Dempster 等人 (2012) 之研究顯示，添加生物炭降低微生物生質碳，而 Purakayastha 等人 (2015) 則表示添加不同生物炭皆提高微生物生質碳；Masto 等人 (2013) 表示添加生物炭之量越多，其微生物生質

碳越高，而生物炭對微生物生質氮之影響不大 (Dempster et al., 2012)。

微生物生質碳與土壤有機碳的比值 (MBC/SOC) 為土壤微生物生質量佔土壤有機碳的比例，可作為土壤有機質轉換效率的指標，數值越大表示微生物對土壤有機質利用效率越高 (Insam and Merschak, 1997)。儘管土壤生質量佔土壤有機物的量少於 5% (Dalal, 1998)，但環境改變時，微生物生質碳之分解速率可能會快於土壤中有機質 (Badalucco et al., 1990)，因此，微生物生質碳與土壤有機碳比 (MBC/SOC) 有其生態意義。本研究中 MBC/SOC 均小於 1%，其可歸咎於添加有機質肥料或生物炭，而使 SOC 值變大，而 BK 處理之 MBC/SOC 亦小則說明其微生物量少。



表十二、不同生物炭處理下土壤生質碳、氮及呼吸作用速率 (孵育第 0 天)

Table 12. Soil microbial carbon (MBC), nitrogen (MBN) and respiration rate of the soils under different biochars addition (0 day)

Treatment	MBC <sup>2</sup>	MBC/SOC <sup>2</sup>	MBN <sup>2</sup>	Respiration rate	Specific respiration rate
	mg C kg <sup>-1</sup>	%	mg N kg <sup>-1</sup>	mg CO <sub>2</sub> -C kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	CO <sub>2</sub> -C MBC <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
RH <sup>1</sup>	42.3 ± 24.6 <sup>3</sup> b <sup>4</sup>	0.13 ± 0.07 c	1.6 ± 0.8 ab	0.021 ± 0.006 bc	0.0006 ± 0.0004 ab
JC	66.7 ± 18.0 b	0.18 ± 0.05 bc	1.8 ± 2.0 ab	0.034 ± 0.005 a	0.0006 ± 0.0002 ab
PKS	44.8 ± 32.3 b	0.14 ± 0.10 bc	0.4 ± 0.5 b	0.032 ± 0.008 ab	0.0012 ± 0.0011 a
SC	56.5 ± 49.6 b	0.33 ± 0.30 abc	3.3 ± 1.9 ab	0.000 ± 0.004 d	0.0000 ± 0.0000 b
LC	144.9 ± 43.9 a	0.49 ± 0.10 ab	1.6 ± 0.6 ab	0.020 ± 0.011 bc	0.0002 ± 0.0001 b
BK	103.4 ± 62.1 ab	0.58 ± 0.35 a	4.7 ± 3.9 a	0.019 ± 0.007 c	0.0002 ± 0.0001 b
RHM	109.6 ± 36.3 a	0.25 ± 0.08 ab	6.5 ± 1.0 ab	0.273 ± 0.002 a	0.0027 ± 0.0011 ab
JCM	94.2 ± 23.7 a	0.20 ± 0.06 ab	9.9 ± 6.1 a	0.274 ± 0.042 a	0.0030 ± 0.0010 ab
PKSM	51.0 ± 36.5 a	0.12 ± 0.09 b	5.0 ± 2.3 ab	0.291 ± 0.062 a	0.0109 ± 0.0109 a
SCM	103.9 ± 15.6 a	0.36 ± 0.04 a	2.6 ± 2.2 b	0.161 ± 0.020 b	0.0016 ± 0.0002 b
LCM	90.2 ± 54.0 a	0.25 ± 0.15 ab	2.2 ± 1.2 b	0.181 ± 0.015 b	0.0031 ± 0.0028 ab
BKM	80.5 ± 51.2 a	0.28 ± 0.19 ab	3.2 ± 1.1 b	0.212 ± 0.014 b	0.0035 ± 0.0021 ab

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter

<sup>2</sup> MBC : Microbial biomass carbon ; MBN : Microbial biomass nitrogen ; SOC : Soil organic carbon.

<sup>3</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.

表十三、不同生物炭處理下土壤生質碳、氮及呼吸作用速率 (孵育第 90 天)

Table 13. Soil microbial carbon (MBC), nitrogen (MBN) and respiration rate of the soils under different biochars addition (90 day)

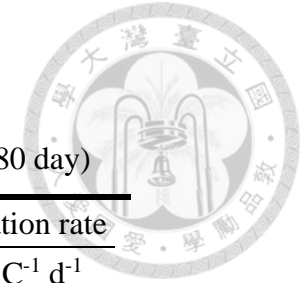
Treatment	MBC <sup>2</sup>	MBC/SOC <sup>2</sup>	MBN <sup>2</sup>	Respiration rate	Specific respiration rate
	mg C kg <sup>-1</sup>	%	mg N kg <sup>-1</sup>	mg CO <sub>2</sub> -C kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	CO <sub>2</sub> -C MBC <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
RH <sup>1</sup>	81.6 ± 34.2 <sup>3</sup> ab <sup>4</sup>	0.28 ± 0.12 abc	0.9 ± 0.5 ab	0.004 ± 0.007 a	0.0001 ± 0.0001 a
JC	17.8 ± 14.5 bc	0.05 ± 0.04 bc	0.3 ± 0.2 b	0.000 ± 0.014 a	0.0002 ± 0.0004 a
PKS	123.3 ± 46.5 a	0.34 ± 0.13 abc	0.5 ± 0.3 ab	0.007 ± 0.009 a	0.0001 ± 0.0001 a
SC	74.3 ± 50.3 abc	0.44 ± 0.32 a	0.3 ± 0.1 b	0.000 ± 0.004 a	0.0000 ± 0.0000 a
LC	10.1 ± 24.8 c	0.03 ± 0.07 c	0.5 ± 0.3 ab	0.011 ± 0.012 a	0.0015 ± 0.0021 a
BK	61.9 ± 39.8 abc	0.36 ± 0.24 ab	1.0 ± 0.7 a	0.000 ± 0.004 a	0.0000 ± 0.0000 a
RHM	45.7 ± 42.1 c	0.11 ± 0.10 b	5.7 ± 0.8 a	0.118 ± 0.025 a	0.0077 ± 0.0102 a
JCM	158.8 ± 60.4 ab	0.30 ± 0.11 b	5.6 ± 2.7 a	0.068 ± 0.045 a	0.0005 ± 0.0004 a
PKSM	138.5 ± 91.2 abc	0.29 ± 0.18 b	3.6 ± 0.7 ab	0.062 ± 0.048 a	0.0011 ± 0.0016 a
SCM	169.3 ± 14.2 a	0.59 ± 0.04 a	2.8 ± 1.6 b	0.068 ± 0.060 a	0.0004 ± 0.0004 a
LCM	106.3 ± 52.2 abc	0.23 ± 0.11 b	4.9 ± 0.7 ab	0.097 ± 0.025 a	0.0011 ± 0.0006 a
BKM	68.6 ± 27.0 bc	0.24 ± 0.10 b	4.6 ± 1.8 ab	0.101 ± 0.066 a	0.0019 ± 0.0016 a

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter

<sup>2</sup> MBC : Microbial biomass carbon ; MBN : Microbial biomass nitrogen ; SOC : Soil organic carbon.

<sup>3</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.



表十四、不同生物炭處理下土壤生質碳、氮及呼吸作用速率 (孵育第 180 天)

Table 14. Soil microbial carbon (MBC), nitrogen (MBN) and respiration rate of the soils under different biochars addition (180 day)

Treatment	MBC <sup>2</sup>	MBC/SOC <sup>2</sup>	MBN <sup>2</sup>	Respiration rate	Specific respiration rate
	mg C kg <sup>-1</sup>	%	mg N kg <sup>-1</sup>	mg CO <sub>2</sub> -C kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	CO <sub>2</sub> -C MBC <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
RH <sup>1</sup>	67.8 ± 46.5 <sup>3</sup> a <sup>4</sup>	0.22 ± 0.14 a	1.0 ± 0.4 ab	0.012 ± 0.008 a	0.0002 ± 0.0002 b
JC	44.6 ± 32.4 a	0.11 ± 0.07 a	1.0 ± 0.9 ab	0.009 ± 0.009 a	0.0002 ± 0.0002 b
PKS	31.1 ± 13.5 a	0.08 ± 0.05 a	2.2 ± 0.4 a	0.022 ± 0.002 a	0.0008 ± 0.0004 a
SC	37.2 ± 22.9 a	0.20 ± 0.12 a	0.7 ± 0.4 b	0.002 ± 0.005 a	0.0002 ± 0.0002 b
LC	69.0 ± 27.4 a	0.16 ± 0.06 a	1.5 ± 1.3 ab	0.000 ± 0.001 a	0.0000 ± 0.0000 b
BK	27.1 ± 25.0 a	0.15 ± 0.14 a	1.1 ± 0.5 ab	0.000 ± 0.005 a	0.0000 ± 0.0001 b
RHM	59.0 ± 27.2 a	0.14 ± 0.06 a	7.1 ± 1.0 a	0.018 ± 0.016 a	0.0005 ± 0.0005 a
JCM	66.3 ± 30.7 a	0.13 ± 0.06 a	5.8 ± 1.3 a	0.013 ± 0.013 a	0.0003 ± 0.0004 a
PKSM	77.0 ± 11.1 a	0.16 ± 0.03 a	4.4 ± 0.3 a	0.000 ± 0.001 a	0.0000 ± 0.0000 a
SCM	39.0 ± 20.1 a	0.14 ± 0.08 a	9.3 ± 7.8 a	0.009 ± 0.011 a	0.0002 ± 0.0002 a
LCM	59.8 ± 12.5 a	0.12 ± 0.02 a	3.8 ± 1.1 a	0.019 ± 0.018 a	0.0003 ± 0.0003 a
BKM	49.6 ± 38.4 a	0.17 ± 0.13 a	3.8 ± 4.8 a	0.021 ± 0.025 a	0.0003 ± 0.0003 a

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter

<sup>2</sup> MBC : Microbial biomass carbon ; MBN : Microbial biomass nitrogen ; SOC : Soil organic carbon.

<sup>3</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.

#### 4.2.2 土壤呼吸作用

表十二顯示，第 0 天時，不論土壤有無添加有機質肥料，RH、JC 與 PKS 生物炭的施用皆提高土壤呼吸作用，而 SC 生物炭則使土壤之呼吸作用下降，LC 生物炭則使添加有機質肥料土壤之呼吸作用顯著下降，但若未添加有機質肥料時，則無影響，顯示稻殼、柳杉與棕櫚殼三種生物炭含易變動之碳源量多，可供給土壤微生物，提高其土壤之呼吸作用，而兩種煤灰生物炭可供微生物利用之易變動碳少，顯示兩種煤灰對土壤微生物造成負面影響，使微生物生質量下降。孵育 90 天與 180 天後（表十三、十四），不論有機質肥料的添加與否，生物炭皆對土壤之呼吸作用無顯著影響，表示生物炭含有之易變動碳只能短暫供應，而整體呼吸作用亦隨孵育時間而下降，與 Purakayastha 等人 (2015) 結果一致。

表十二顯示，在第 0 天時，PKS 與 PKSM 處理分別比 BK 與 BKM 處理之比呼吸速率顯著較高，表示棕櫚殼生物炭添加後，土壤中微生物快速增長，代謝速率快，而不論土壤有無添加有機質肥料，其他生物炭處理之比呼吸速率沒有顯著影響。孵育 90 天與 180 天後（表十三、十四），不論有機質肥料的添加與否，生物炭皆對土壤之比呼吸速率亦無顯著影響，表示生物炭對比呼吸速率之影響持續時間不長。呼吸作用與微生物生質碳之比值即比呼吸速率，代表基礎代謝速率，也可以當作短期快速生長之指標 (Raubuch et al., 2010)。

Zimmerman 等人 (2011) 指出添加生物炭之土壤所釋放之碳量，較未添加生物炭之土壤多，而其累積之碳礦化作用含量，隨生物炭之熱解溫度降低而升高，研究也發現在微生物呼吸早期所產生之 CO<sub>2</sub> 主要來自生物炭中易分解之有機碳，在孵育後期，呼吸作用反而受生物炭抑制。然而，除了裂解溫度與孵育時間之外，生物炭之種類對於土壤呼吸作用有不同影響：Schomberg 等人 (2012) 以花生殼、山核桃殼、雞糞、柳枝與木材廢棄混合物為原料製成生物炭，施入土壤後不影響呼吸作用；Purakayastha 等人 (2015) 也以四種不同原料製成生物炭，顯示稻草生物炭增加土壤呼吸作用，珍珠粟、麥稈與玉米稈生物炭無顯著影響甚至降低，但呼吸作用隨孵育時間越長而越低。



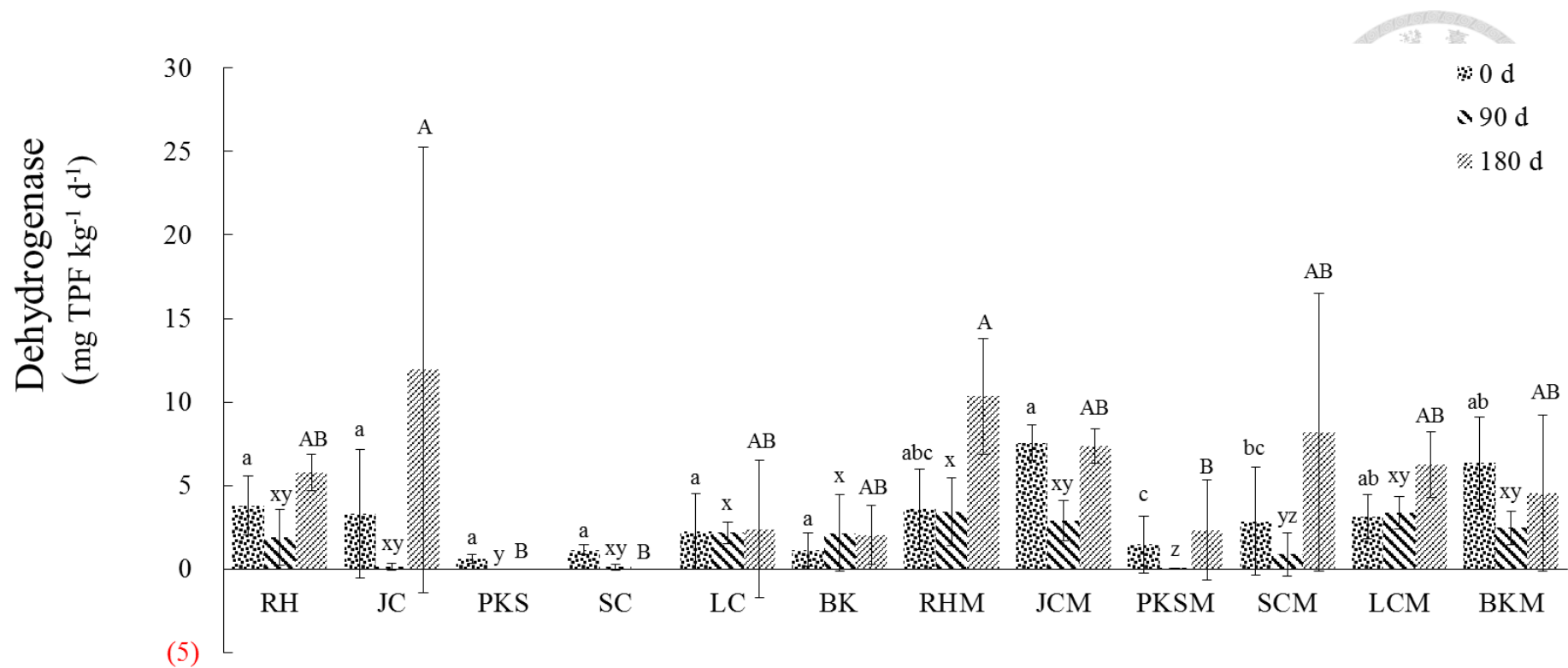
## 4.3 土壤酵素活性

土壤生物性質對於土壤環境的變化反應快且敏感，為評估土壤品質的重要指標之一。與其他生物性質比，土壤酵素檢測方便且對土壤管理變化敏感，可即時反應土壤受環境影響改變的狀態 (Lin et al., 2010)，因此，適合做為土壤品質指標。由於微生物在土壤中藉由土壤酵素直接參與土壤的養分循環，因此，土壤酵素活性與土壤養分及土壤有機質分解速率高度相關 (Xu et al., 2015)，然而，在整體生化特性的變化，是由於生物炭本身之特性 (pH 值、易變動有機碳、總碳、氮含量) 會影響土壤性質，進而改變土壤酵素活性與微生物群落 (Muhammad et al., 2014)。在土壤生態系中，碳、氮、磷、硫元素循環之五種土壤酵素 (去氫酶、 $\beta$ -醣酶、尿素酶、磷酸酯酶、芳香基硫酸酯酶) 最具代表性，分別討論如下。

### 4.3.1 去氫酶

圖二顯示，在第 0 天，未添加有機質肥料的條件下，所使用之生物炭不影響去氫酶活性，而添加有機質肥料之土壤中，除 PKSM 比 BKM 顯著降低外，其餘生物炭處理組與對照組比較，無顯著差異。孵育第 90 天與第 180 天，PKS 與 PKSM 處理之去氫酶活性均比與其相對之 BK 與 BKM 處理顯著下降，而在第 180 天時，SC 處理也比 BK 處理顯著下降，其餘處理，不論是否添加有機質肥料，添加生物炭均與不添加者無顯著差異。即本試驗除棕櫚殼生物炭外，其餘生物炭不論添加有機質肥料與否，皆不影響土壤去氫酶活性，與 Oleszczuk 等人 (2014) 之研究結果一致。本試驗所使用棕櫚殼生物炭 (PKS) 使去氫酶活性顯著下降，與 Wu 等人 (2013) 將 450°C 裂解生物炭施入土壤，其去氫酶與尿素酶活性降低之結果一致。有研究指出去氫酶活性會受到土壤 pH 值影響 (Moeskops et al., 2010)，pH 值越低則其活性越高，然而，孵育第 90 天與 180 天之 PKS 與 PKSM 處理，其土壤 pH 值比第 0 天時，顯著提升 (表九、表十)，而本研究之去氫酶活性與 pH 值相關係數為  $r = -0.24$  未達顯著水準，因此，棕櫚殼原料本身影響土壤去氫酶活性而非土壤 pH 值。Ameloot 等人 (2014) 表示，生物炭裂解後容易產生有毒性之多環芳香烴碳氫化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)，會使土壤中的酵素活性下降。整體而言，添加有機質肥料使土壤去氫酶活性提高。

研究顯示，添加生物炭之後，因土壤中微生物生質量提高，進而使去氫酶活性提高 (Paz-Ferreiro et al., 2012; Mastro et al., 2013; Demisie et al., 2014)。然而，有些研究卻認為只有少數情況才會顯著提升微生物酵素活性 (Ameloot et al., 2013; Sopenña and Bending, 2013)，如Ameloot 等人 (2013) 表示，生物炭影響去氫酶活性的主要原因為生物炭之裂解溫度：在較高溫度 (700°C) 下裂解之生物炭，施用土壤後會降低去氫酶活性，而在較低溫 (350°C) 裂解的生物炭，會提升土壤中去氫酶活性。Oleszczuk 等人 (2014) 以 650°C 裂解製成之生物炭，其對去氫酶等土壤酵素亦無促進作用，因此，生物炭之裂解溫度與原料來源，為影響土壤酵素之關鍵因素之一。



圖二、不同生物炭處理下，孵育第0、90、180天之去氫酶活性

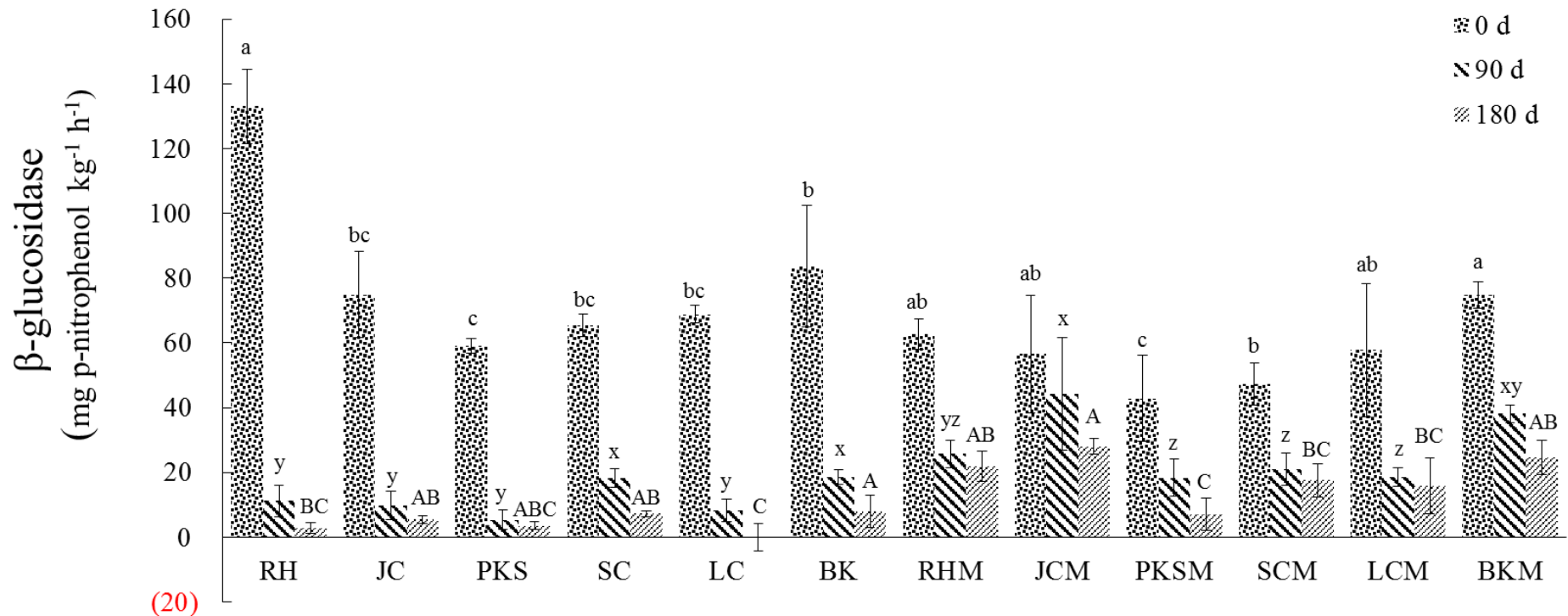
Fig. 2. Dehydrogenase activities of the soils under different biochars addition. Bars are means  $\pm$  standard error of four replicates. RH, Rice husk biochar; JC, Japanese cedar biochar; PKS, Palm kernel shell biochar; SC, Small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without biochar; M, high organic matter soil. Different letters indicate significant difference at the 5% level by LSD test. Lowercase a, b and c compared between treatments of the initial samples (the 0 day); lowercase x, y and z compared between treatments of 90 days after incubation; uppercase A and B compared between treatments of 180 days after incubation.

### 4.3.2 $\beta$ -配醣酶

圖三顯示，在第 0 天，未添加有機質土壤之  $\beta$ -配醣酶活性 RH 處理比 BK 處理顯著提升，顯示 RH 生物炭提供碳源或對  $\beta$ -配醣酶活性無抑制影響，PKS 則比 BK 處理顯著下降，其餘添加生物炭之處理則與 BK 處理無顯著差異；添加有機質肥料的處理，PKSM 與 SCM 處理之  $\beta$ -配醣酶活性顯著低於 BKM 處理，其餘之生物炭則無顯著影響。孵育 90 天與 180 天時亦然，且結果與去氫酶一致，表示棕櫚殼與小粒徑煤灰生物炭對土壤酵素活性有負面影響。孵育 180 天後，只 RH 與 LC 處理顯著下降，表示不同生物炭影響  $\beta$ -配醣酶活性之時效不同。

整體而言，添加生物炭後， $\beta$ -配醣酶多為顯著下降，與前人研究吻合，顯示生物炭會使土壤酵素活性下降，其中 PKS 生物炭使  $\beta$ -配醣酶活性下降最多。然而，添加有機質肥料，會使整體  $\beta$ -配醣酶活性增加，顯示其對土壤酵素活性之影響大於生物炭。此外，有研究指出  $\beta$ -配醣酶之活性與土壤有機質含量及 pH 值有關 (Moeskops et al., 2010)，但在本研究中， $\beta$ -配醣酶活性與 pH 值及土壤有機碳含量，均未達顯著水準。

前人研究顯示生物炭對土壤  $\beta$ -配醣酶活性多為負面影響。Demisie 等人 (2014) 將櫟木生物炭與竹生物炭分別加入土壤後，土壤中之  $\beta$ -配醣酶活性沒有顯著差異，而隨施用量增加，櫟木生物炭處理之  $\beta$ -配醣酶顯著下降，竹生物炭則沒有顯著差異，認為是由於原料不同，其本身化學性質不同所致。Ameloot 等人 (2014) 也在研究中發現，添加生物炭使土壤  $\beta$ -配醣酶與去氫酶活性顯著下降，其原因可能為生物炭裂解後所產生帶有毒之多環芳香烴碳氫化合物 (PAHs)，對未添加有機質肥料土壤之去氫酶與  $\beta$ -配醣酶等土壤酵素，會產生負面影響。



圖三、不同生物炭處理下，孵育第0、90、180天之 $\beta$ -配醣酶活性

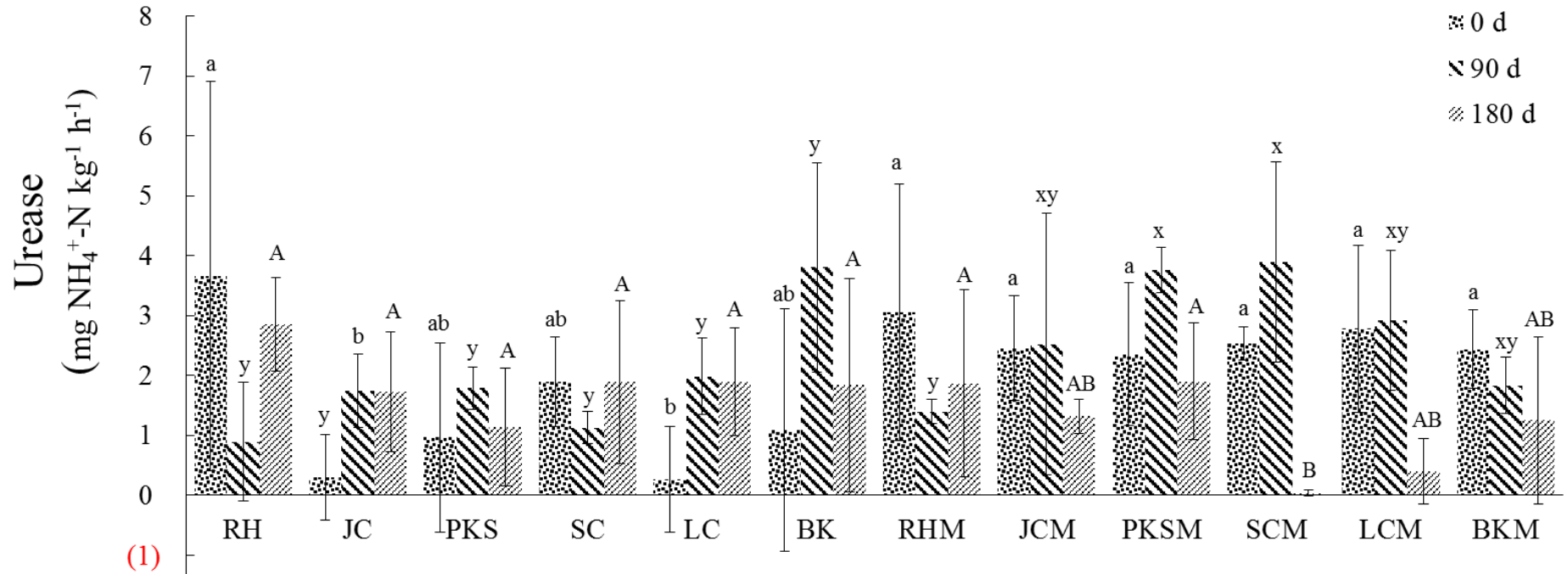
Fig. 3.  $\beta$ -glucosidase activities of the soils under different biochars addition. Bars are means  $\pm$  standard error of four replicates. RH, Rice husk biochar; JC, Japanese cedar biochar; PKS, Palm kernel shell biochar; SC, Small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without biochar; M, high organic matter soil. Different letters indicate significant difference at the 5% level by LSD test. Lowercase a, b and c compared between treatments of the initial samples (the 0 day); lowercase x, y and z compared between treatments of 90 days after incubation; uppercase A, B and C compared between treatments of 180 days after incubation.

### 4.3.3 尿素酶

圖四顯示，在第 0 天，不論有無添加有機質於土壤，所有添加之生物炭對尿素酶活性皆無顯著影響，然而，孵育 90 天後，未添加有機質肥料土壤之所有處理，比 BK 處理皆顯著下降，但添加有機質肥料土壤之所有處理仍無顯著差異，表示本試驗之所用生物炭，經過孵育後，對無添加有機質肥料土壤之尿素酶影響較大，而添加有機質肥料時，則使尿素酶活性不受影響。孵育 180 天後，不論有無添加有機質肥料於土壤，其尿素酶活性皆無顯著差異，顯示生物炭對於土壤之尿素酶影響不超過 180 天。

由整體而言，孵育後第 90 天在未添加有機質肥料土壤之尿素酶活性有顯著下降外，其餘皆無顯著差異，其中 RH 生物炭下降最多，可知此五種生物炭在低養分之土壤中，經過孵育會使尿素酶活性下降，而在添加有機質肥料之養分較高的土壤，則沒有顯著影響。

許多研究表示長期施用有機質資材，可以提高土壤中尿素酶活性 (Dick et al., 1988; Chakrabarti et al., 2000)。添加生物炭於土壤中，對尿素酶活性之影響，研究結果常不一致：Wu 等人 (2014) 將麥稈生物炭添加於土壤後，土壤中尿素酶活性顯著降低，然而，Demisie 等人 (2014) 以櫟木生物炭與竹生物炭分別施用於土壤後，尿素酶活性皆顯著提高。



圖四、不同生物炭處理下，孵育第0、90、180天之尿素酶活性

Fig. 4. Urease activities of the soils under different biochars addition. Bars are means  $\pm$  standard error of four replicates. RH, Rice husk biochar; JC, Japanese cedar biochar; PKS, Palm kernel shell biochar; SC, Small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without biochar; M, high organic matter soil. Different letters indicate significant difference at the 5% level by LSD test. Lowercase a and b compared between treatments of the initial samples (the 0 day); lowercase x and y compared between treatments of 90 days after incubation; uppercase A and B compared between treatments of 180 days after incubation.

#### 4.3.4 酸性與鹼性磷酸單酯酶

圖五顯示，在第 0 天，未添加有機質肥料土壤之 RH 處理，其酸性磷酸酯酶活性比 BK 處理顯著下降，而 LC 處理組顯著提高，其餘皆沒有差別，表示不同生物炭對其活性之影響不同。施用有機質肥料之土壤中，所有處理之酸性磷酸酯酶活性皆比 BKM 處理顯著下降，其中又以 PKSM 處理組降低最多；顯示生物炭與有機質肥料一同添加，對酸性磷酸酯酶活性之負面影響較大。孵育 90 天後，JC、PKS 與 SC 處理之活性比 BK 處理顯著下降，其中又以 PKS 處理降低最多，而添加有機質肥料之土壤除 JCM 處理與 BKM 處理比沒有顯著差異外，其餘皆顯著下降，而又以 PKSM 降低最多，顯示 PKS、SC 二種生物炭不論是否有無添加有機質肥料，皆使酸性磷酸酯酶活性下降，而添加有機質肥料後，JC 生物炭反而沒有顯著影響，其餘生物炭則都使活性下降。孵育 180 天後，除了添加有機質紅壤之 LCM 處理之活性顯著下降外，其餘處理皆沒有顯著差異，顯示不同種類生物炭對酸性磷酸酯酶之活性影響不同。

整體而言，PKS 生物炭對土壤中酸性磷酸酯酶之影響較為顯著，除了可能為 PKS 生物炭吸附磷酸酯酶外，PKS 處理組與 PKSM 處理組之 pH 值較其他處理高(表八、表九、表十)，對酸性磷酸酯酶之活性亦有影響。研究指出酸性磷酸單酯酶受土壤 pH 值影響 (Dick, 2011)，然而，本研究之酸性磷酸單酯酶活性與 pH 值無一定相關。另外，酸性磷酸單酯酶活性與土壤中 Mehlich III 可萃取磷為顯著線性相關 ( $r = 0.93, p < 0.01, n = 36$ )，但研究指出土壤中有效性磷含量不影響酸性磷酸酯酶之活性 (Shi et al., 2013)。

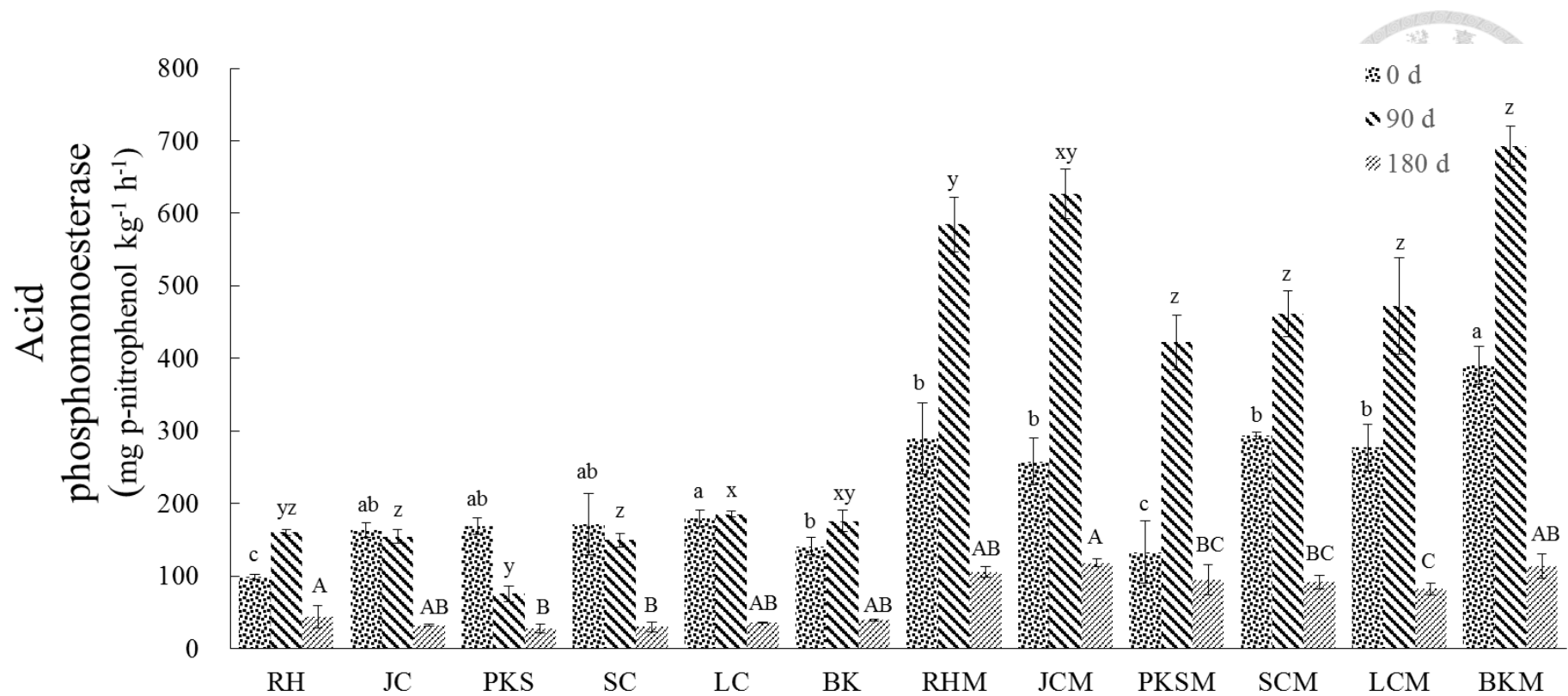
圖六顯示，在第 0 天時，在未添加有機質肥料之土壤，LC 處理之鹼性磷酸酯酶活性比 BK 處理顯著下降，其餘處理則無顯著差異；添加有機質肥料之土壤中，添加生物炭均不影響鹼性磷酸單之酶活性。然而，孵育 90 天後，不論有機質肥料添加與否，PKS 與 PKSM 處理皆比 BK 與 BKM 處理顯著下降，其餘則無顯著差異。孵育 180 天後，只有未添加有機質紅壤之 LC 處理組顯著下降，其餘無論添加有機與否都無顯著差異。

整體而言，PKS 生物炭對於土壤中鹼性磷酸酯酶之影響較為顯著，除了可能為 PKS 生物炭吸附磷酸酯酶外，PKS 處理組與 PKSM 處理組之 pH 值較其他處理



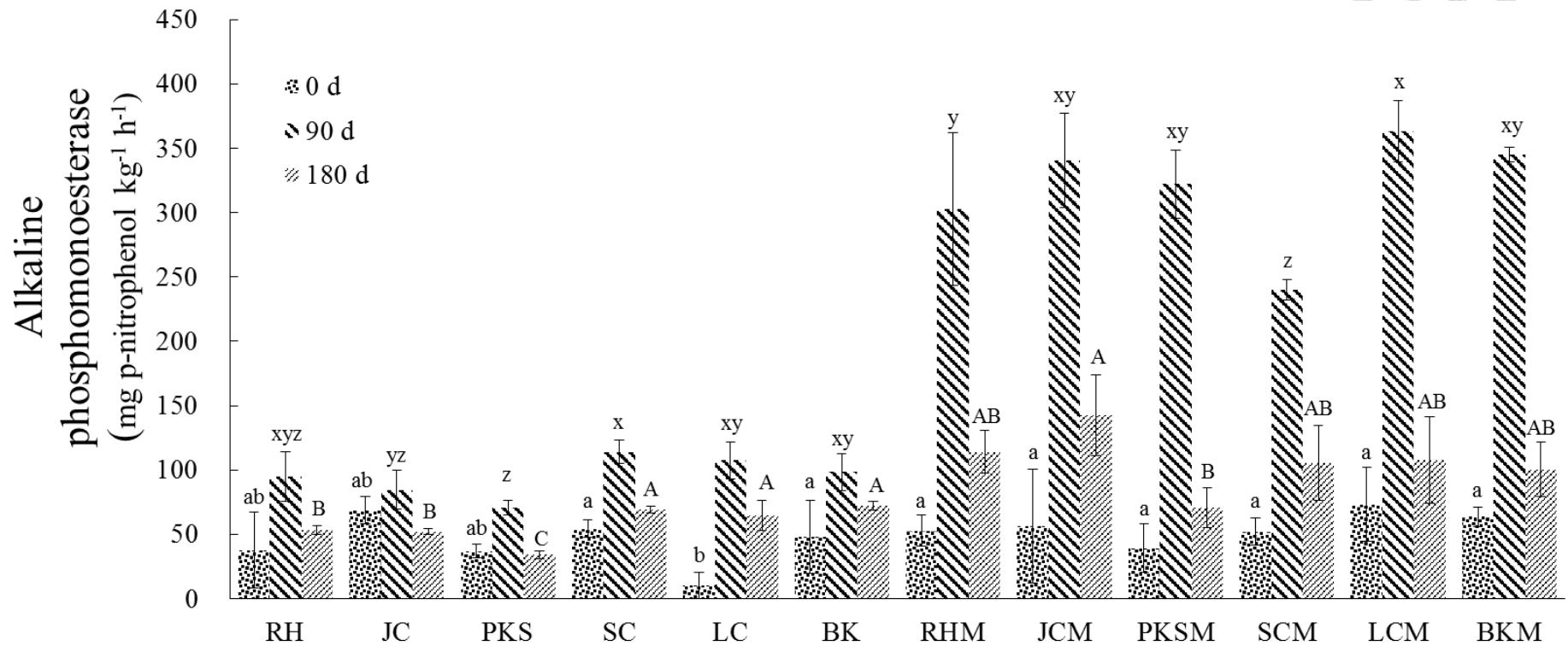
高 (表八、表九、表十)，應提高鹼性磷酸酯酶之活性，顯示 PKS 生物炭之影響非因土壤 pH 值之效應。本研究鹼性磷酸單酯酶活性與 pH 值之間無一定的關係，而鹼性磷酸單酯酶活性與土壤中 Mehlich III 可萃取磷之相關性高 ( $r=0.95, p<0.01$ )，達顯著相關。研究指出土壤中有效性磷含量不影響鹼性磷酸酯酶之活性 (Shi et al., 2013)，本試驗紅壤為酸性，故酸性磷酸單酯酶之整體活性大於鹼性磷酸單酯酶。

許多研究表示，生物炭添加於土壤後，會提升土壤中磷酸酯酶的活性：Masto 等人 (2013) 與 Oleszczuk 等人 (2013) 之研究皆表示將生物炭添入土壤中，其土壤之酸性與鹼性磷酸酯酶活性提升，然而，Purakayastha 等人 (2015) 以四種不同生物炭分別施入土壤後，有些生物炭提升磷酸酯酶活性、有些則降低，且隨孵育時間不同而有不同變化。認為是由於有些生物炭吸附對硝基苯磷酸酯 (*p*-nitrophenyl phosphate) 斷鍵所釋放之硝基苯酚，造成磷酸酯酶活性下降。



圖五、不同生物炭處理下，孵育第0、90、180天之酸性磷酸單酯酶活性

Fig. 5. Acid phosphomonoesterase activities of the soils under different biochars addition. Bars are means  $\pm$  standard error of four replicates. RH, Rice husk biochar; JC, Japanese cedar biochar; PKS, Palm kernel shell biochar; SC, Small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without biochar; M, high organic matter soil. Different letters indicate significant difference at the 5% level by LSD test. Lowercase a, b and c compared between treatments of the initial samples (the 0 day); lowercase x, y and z compared between treatments of 90 days after incubation; uppercase A, B and C compared between treatments of 180 days after incubation.



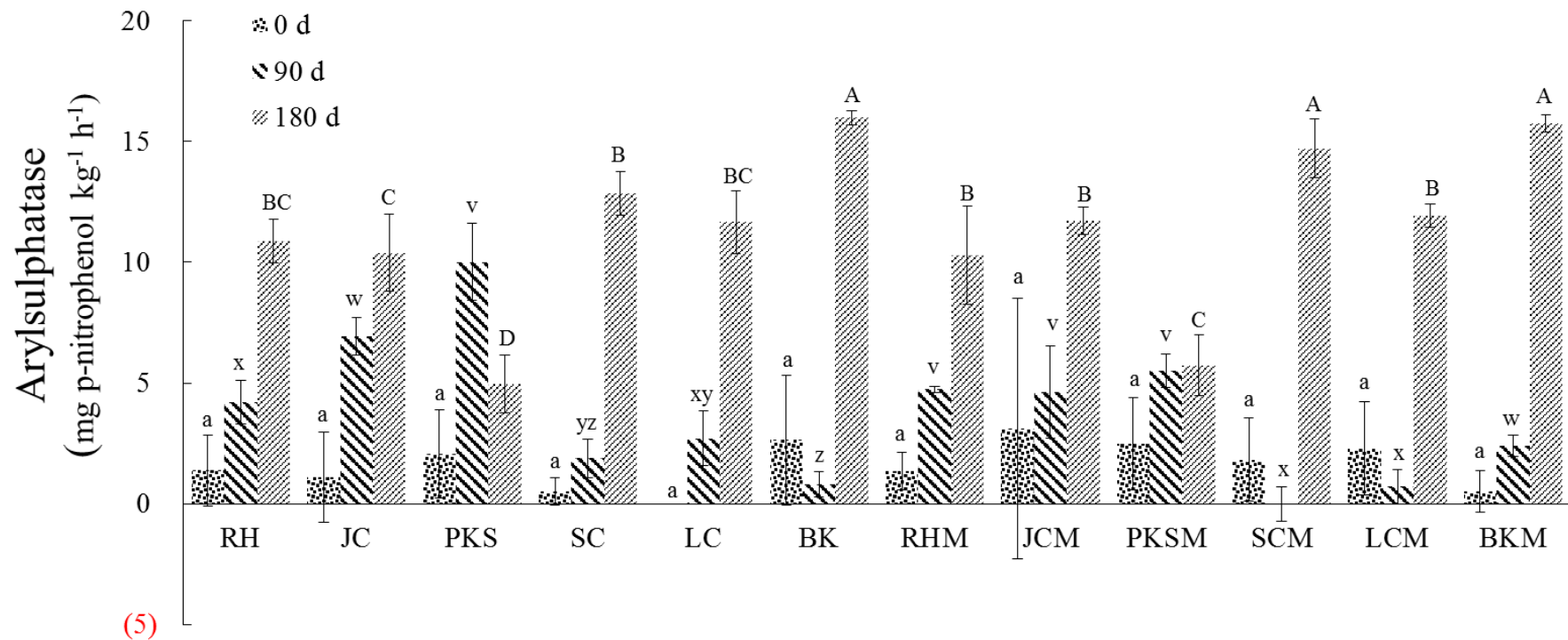
圖六、不同生物炭處理下，孵育第0、90、180天之鹼性磷酸單酯酶活性

Fig. 6. Alkaline phosphomonoesterase activities of the soils under different biochars addition. Bars are means  $\pm$  standard error of four replicates. RH, Rice husk biochar; JC, Japanese cedar biochar; PKS, Palm kernel shell biochar; SC, Small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without biochar; M, high organic matter soil. Different letters indicate significant difference at the 5% level by LSD test. Lowercase a and b compared between treatments of the initial samples (the 0 day); lowercase x, y and z compared between treatments of 90 days after incubation; uppercase A, B and C compared between treatments of 180 days after incubation.

#### 4.3.5 芳香基硫酸酯酶

圖七顯示，第 0 天時，所使用之生物炭，不影響土壤之芳香基硫酸酯酶活性，添加有機質肥料之處理亦然。然而，孵育 90 天後，未添加有機質肥料之土壤之所有處理，其活性比 BK 處理皆顯著提高，而添加有機質肥料的 RHM、JCM 與 PKSM 處理活性比 BKM 處理顯著提高，SCM 與 LCM 則顯著降低。孵育 180 天後，除了添加有機質紅壤之 SCM 處理與 BKM 無顯著差異外，其餘處理皆顯著下降，其中又以 PKSM 處理下降最多。

土壤中之芳基硫酸酯酶主要是來自於土壤微生物，主要為真菌，因此，芳基硫酸酯酶之活性也可以作為真菌活性之參考指標 (Bandick and Dick, 1999)。在孵育 90 天之硫酸酯酶活性有顯著提升，然而，在 PLFA 分析之孵育 90 天時真菌含量卻沒有顯著增加 (表十五)。以土壤環境而言，土壤中之有機質與無機硫含量會影響芳基硫酸酯酶之活性，土壤有機質含量越高，通常硫酸酯酶活性也會提高 (Perucci and Scarponi, 1983)。本研究之土壤有機碳與硫酸酯酶活性顯著相關 ( $r = 0.38, p < 0.05$ )，與前人研究一致。然而，Carlson 等人 (2015) 研究卻指出，土壤中有機碳、總氮、總磷等含量，與芳香基硫酸酯酶與尿素酶沒有關係。因此，硫酸酯酶活性不僅與土壤有機質、有效硫供應有關，也與生物炭種類和土壤本身化學性質有關。芳香基硫酸酯酶活性之最適 pH 值為 6.2 (Tabatabai, 1994)。本試驗之紅壤原屬酸性，添加生物炭後有顯著提升，因此，孵育 90 天之硫酸酯酶活性也有顯著提高，本研究之土壤 pH 值與硫酸酯酶活性相關係數 ( $r = 0.79, p < 0.01$ )，達顯著相關。然而，許多研究也表示，生物炭對土壤中硫酸酯酶活性之影響不大，如 Paz-Ferreiro 等人 (2012) 與 Sun 等人 (2014) 之研究結果顯示，添加生物炭於土壤中，對芳香基硫酸酯酶之活性沒有顯著影響。



圖七、不同生物炭處理下，孵育第0、90、180天之芳香基硫酸酯酶活性

Fig. 7. Arylsulphatase activities of the soils under different biochars addition. Bars are means  $\pm$  standard error of four replicates. RH, Rice husk biochar; JC, Japanese cedar biochar; PKS, Palm kernel shell biochar; SC, Small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without biochar; M, high organic matter soil. Different letters indicate significant difference at the 5% level by LSD test. Lowercase a, b and c compared between treatments of the initial samples (the 0 day); lowercase v, w, x, y and z compared between treatments of 90 days after incubation; uppercase A, B and C compared between treatments of 180 days after incubation.

## 4.4 土壤微生物種類及群落結構

### 4.4.1 微生物群落結構：磷脂質脂肪酸分析法

表十五為第 0 天不同處理的土壤，顯示未添加有機質肥料之土壤添加生物炭後，細菌、革蘭氏陰性、陽性菌、放線菌與真菌等，相對於 BK 處理皆顯著下降，PLFA 總量也顯著降低，顯示生物炭在極短時間內使土壤微生物生質量降低。添加有機質肥料的土壤中，LC 生物炭的施入使其細菌含量顯著下降，因此，LCM 處理組之 PLFA 總量亦顯著降低，其餘處理間微生物族群之比值則無顯著差異。孵育 90 天後（表十六），LC 生物炭在未添加有機質肥料之土壤中，使土壤細菌之含量及革蘭氏陰性菌含量比 BK 處理顯著下降，顯示 LC 生物炭對土壤之細菌影響時間較久，然而，卻使放線菌之含量顯著提高，其他處理組則對任何菌含量無顯著差異。孵育 180 天後（表十七），所有試驗之生物炭的施用對土壤微生物族群皆無顯著影響，表示生物炭對於土壤微生物群落組成之影響在孵育初期較為顯著。

表十四顯示，第 0 天之未添加有機質肥料之土壤，LC 處理較 BK 處理之革蘭氏陽性菌/陰性菌之 PLFA 比例顯著增加，而添加有機質肥料土壤之處理間無顯著差異，顯示 LC 生物炭短期內即影響細菌之組成。不論是否添加有機質肥料於土壤，添加供試之生物炭，對於土壤之放線菌/細菌比與真菌/細菌比皆沒有造成顯著影響。在未添加有機質肥料土壤中，SC 與 LC 處理皆比 BK 處理顯著提高放線菌/細菌，顯示土壤中之細菌族群較少，而放線菌含量相對較高。孵育 90 與 180 天後（表十六、十七），未添加有機質肥料土壤處理間皆無顯著差異，而在添加有機質肥料之土壤中，LCM 處理與 BKM 處理有顯著差異，表示 LC 生物炭在有機質含量較高之土壤，對其細菌組成之影響較久。另外，LC 生物炭也在孵育第 90 天時，不論有添加有機質肥料與否，其顯著增加 PLFA 放線菌/細菌之比值。

含有環己烷的脂肪酸 (cyclopropyl fatty acids) 在微生物在穩定生長期若受質不足或環境 pH 值低，其含量將會增加，可作為逆境指標；含環己烷脂肪酸與其前驅物之比值，如 cy17:0/16:1 $\omega$ 7c 與 cy19:0/18:1 $\omega$ 7c 亦可作為微生物養分逆境指標 (Thomas *et al.*, 1969; Bossio *et al.*, 1998)。表十五顯示第 0 天時，凡添加 LC 與 LCM 處理之 cy17:0/16:1 $\omega$ 7c 含量比 BK 與 BKM 顯著降低。而孵育 90 天後（表十六）亦同第 0 天，LC 與 LCM 處理顯著下降。孵育 180 天後（表十七），未添加有


機質肥料土壤之 cy17:0/16:1 $\omega$ 7c 皆無顯著差異，而在添加有機質肥料之土壤中，RHM 與 LCM 處理則顯著降低，SCM 卻顯著提高；顯示 SC 生物炭可能將土壤中養分吸附，使其無法供應微生物生長，或產生毒害微生物之物質，使微生物遭受逆境。而 cy19:0/18:1 $\omega$ 7c 含量在第 0 與 180 天時 (表十五、表十七)，所有生物炭處理皆沒有顯著差異，然而，在孵育 90 天時 (表十六)，除添加有機質肥料土壤之 LCM 無顯著差異外，其餘皆顯著下降。顯示 LC 生物炭影響土壤之微生物有孵育時間性。

Kaur 等人 (2005) 指出，當微生物遭受逆境時，會將順式不飽和脂肪酸 (*cis*-fatty acids, 16:1 $\omega$ 7c, 18:1 $\omega$ 7c) 轉換成反式不飽和脂肪酸 (*trans*-fatty acids, 16:1 $\omega$ 7t, 18:1 $\omega$ 7t)，以增加細胞膜之通透性。因此，*trans/cis* (16:1 $\omega$ 7t/16:1 $\omega$ 7c, 18:1 $\omega$ 7t/18:1 $\omega$ 7c) 之比例亦可作為微生物逆境指標。本試驗 16:1 $\omega$ 7t/16:1 $\omega$ 7c 之 PLFA 比例在第 0 天時 (表十五)，不論施予有機質肥料與否，處理間皆無顯著差異。孵育 90 天後 (表十六)，在未添加有機質肥料土壤中，LC 處理比 BK 處理顯著提升，在添加有機質肥料土壤中，LCM 與 PKSM 處理比 BKM 處理顯著上升，顯示 LC 生物炭經過孵育後，對於土壤之微生物有負面影響，而 PKS 生物炭則對有機質含量較高之土壤有負面影響。孵育 180 天後 (表十七)，未添加有機質的紅壤中，亦為 LC 處理顯著提升，在添加有機質肥料土壤中，為 JCM、PKSM 與 LCM 處理較 BKM 處理顯著提升，顯示生物炭添加於有機質含量較高的土壤中，隨孵育時間越長而越容易對微生物造成負面影響。

然而，影響土壤微生物之因子複雜，利用主成分分析 (principal component analysis) 將所有磷脂質脂肪酸一同分析，可觀察生物炭影響整體土壤微生物群落之變化。由圖八可將所有處理分為三群，經過孵育 90 天之後 (圖九)，可大致分為四群，其中 LC 與 LCM 處理之變化極大，與前面討論 LC 生物炭對微生物群落之影響大之結果一致。孵育 180 天後 (圖十)，微生物群落亦改變甚大，顯示添加生物炭後，隨著孵育時間越長，會影響土壤微生物群落之變化。Pietikainen 等人 (2000) 表示，生物炭對總體微生物生質量之影響不大，然而，對土壤微生物群落結構影響甚大，而 Kolton 等人 (2011) 研究也指出，添加生物炭後，微生物之優勢種類消長變化大，但其變化都有助於植物生長與抵抗病害。

表十五、不同生物炭處理下土壤微生物群落 PLFA 濃度 (孵育第 0 天)

Table 15. Microbial communities PLFA concentrations of the soils under different biochars addition (0 day)



Treatment	Bacteria	Gram-positive bacteria	Gram-negative bacteria	Actinomycete	Fungi	Total PLFA <sup>2</sup>
$\mu\text{mol PLFA kg}^{-1}$						
RH <sup>1</sup>	5.41 ± 1.36 <sup>3</sup> b <sup>4</sup>	3.66 ± 0.69 b	2.24 ± 0.60 b	0.41 ± 0.02 b	0.30 ± 0.05 b	20.82 ± 0.87 b
JC	6.06 ± 0.77 b	3.97 ± 0.51 b	2.62 ± 0.26 b	0.39 ± 0.05 b	0.31 ± 0.07 b	21.14 ± 2.22 b
PKS	5.92 ± 0.87 b	3.87 ± 0.66 b	2.59 ± 0.34 b	0.39 ± 0.06 b	0.27 ± 0.04 b	20.31 ± 2.36 b
SC	5.80 ± 1.14 b	3.77 ± 0.83 b	2.60 ± 0.40 b	0.38 ± 0.08 b	0.33 ± 0.01 b	20.28 ± 3.10 b
LC	6.20 ± 0.32 b	4.27 ± 0.18 b	2.30 ± 0.17 b	0.44 ± 0.04 b	0.32 ± 0.01 b	22.19 ± 1.05 b
BK	9.19 ± 0.30 a	5.95 ± 0.13 a	3.96 ± 0.15 a	0.64 ± 0.03 a	0.45 ± 0.03 a	29.47 ± 1.16 a
RHM	20.06 ± 3.56 a	12.81 ± 0.82 a	7.80 ± 2.37 ab	2.09 ± 1.01 a	1.82 ± 1.16 a	63.66 ± 5.42 a
JCM	18.50 ± 2.00 ab	11.71 ± 1.29 a	7.22 ± 1.51 ab	1.87 ± 1.22 a	1.25 ± 0.70 a	58.31 ± 6.89 a
PKSM	19.75 ± 4.67 a	11.77 ± 2.57 a	8.21 ± 2.28 a	1.33 ± 0.25 a	1.95 ± 0.85 a	60.14 ± 12.94 a
SCM	20.93 ± 0.81 a	11.92 ± 0.38 a	9.11 ± 0.41 a	1.38 ± 0.07 a	2.36 ± 0.22 a	63.12 ± 2.13 a
LCM	13.93 ± 1.28 b	8.64 ± 0.45 b	5.06 ± 0.72 b	0.96 ± 0.06 a	1.42 ± 0.13 a	44.98 ± 2.41 b
BKM	22.73 ± 1.94 a	12.97 ± 0.60 a	8.95 ± 1.23 a	1.48 ± 0.12 a	2.26 ± 0.10 a	67.41 ± 3.88 a

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter.

<sup>2</sup> PLFA : phospholipid ester-linked fatty acid

<sup>3</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.





表十五、不同生物炭處理下土壤微生物群落 PLFA 濃度 (續)(孵育第 0 天)

Table 15. Microbial communities PLFA concentrations of the soils under different biochars addition (continued) (0 day)

Treatment	G+/G <sup>-2</sup>	Actino <sup>2</sup> /Bact <sup>2</sup>	Fungi/Bact	cy17:0/16:1 ω 7c	cy19:0/18:1 ω 7c	16:1 ω 7t/16:1 ω 7c
RH <sup>1</sup>	1.66 ± 0.16 <sup>3</sup> b <sup>4</sup>	0.08 ± 0.02 a	0.06 ± 0.02 a	2.12 ± 0.10 bc	1.09 ± 0.86 a	0.00 ± 0.00 a
JC	1.51 ± 0.05 bc	0.06 ± 0.01 a	0.05 ± 0.01 a	2.26 ± 0.09 ab	1.58 ± 0.08 a	0.00 ± 0.00 a
PKS	1.49 ± 0.06 c	0.07 ± 0.00 a	0.05 ± 0.00 a	2.07 ± 0.08 c	1.56 ± 0.06 a	0.00 ± 0.00 a
SC	1.45 ± 0.10 c	0.07 ± 0.00 a	0.06 ± 0.01 a	2.42 ± 0.04 a	1.64 ± 0.09 a	0.00 ± 0.00 a
LC	1.86 ± 0.06 a	0.07 ± 0.00 a	0.05 ± 0.00 a	2.33 ± 0.06 a	1.53 ± 0.11 a	0.07 ± 0.13 a
BK	1.51 ± 0.03 bc	0.07 ± 0.00 a	0.05 ± 0.00 a	2.14 ± 0.13 bc	1.66 ± 0.03 a	0.11 ± 0.10 a
RHM	1.73 ± 0.48 a	0.11 ± 0.07 a	0.09 ± 0.05 ab	1.03 ± 1.35 a	1.27 ± 0.98 a	0.41 ± 0.05 a
JCM	1.69 ± 0.52 a	0.10 ± 0.08 a	0.07 ± 0.03 b	1.73 ± 1.30 a	1.47 ± 1.15 a	0.39 ± 0.03 a
PKSM	1.45 ± 0.13 a	0.07 ± 0.00 a	0.10 ± 0.02 ab	0.96 ± 1.17 a	2.06 ± 0.11 a	0.42 ± 0.03 a
SCM	1.30 ± 0.05 a	0.07 ± 0.00 a	0.12 ± 0.01 a	2.89 ± 0.46 a	2.25 ± 0.03 a	0.43 ± 0.06 a
LCM	1.72 ± 0.15 a	0.07 ± 0.00 a	0.10 ± 0.01 ab	1.25 ± 1.46 a	2.14 ± 0.15 a	0.51 ± 0.02 a
BKM	1.46 ± 0.17 a	0.07 ± 0.00 a	0.10 ± 0.00 ab	3.09 ± 3.00 a	2.06 ± 0.08 a	0.32 ± 0.28 a

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter.

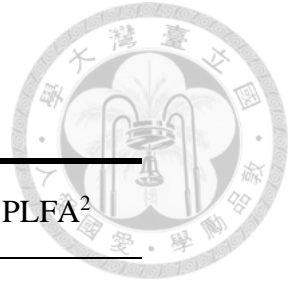
<sup>2</sup> G+ : gram positive bacteria ; G- : Gram-negative bacteria ; Actino : actinomycete ; Bact : bacteria.

<sup>3</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.

表十六、不同生物炭處理下土壤微生物群落 PLFA 濃度 (孵育第 90 天)

Table 16. Microbial communities PLFA concentrations of the soils under different biochars addition (90 days)



Treatment	Bacteria	Gram-positive bacteria	Gram-negative bacteria	Actinomycete	Fungi	Total PLFA <sup>2</sup>
$\mu \text{ mol PLFA kg}^{-1}$						
RH <sup>1</sup>	9.60 ± 0.74 <sup>3</sup> a <sup>4</sup>	6.05 ± 0.55 a	3.86 ± 0.46 a	0.43 ± 0.06 b	0.28 ± 0.08 b	29.47 ± 2.16 a
JC	8.40 ± 0.88 bc	5.60 ± 0.87 ab	3.03 ± 0.36 bc	0.39 ± 0.09 b	0.42 ± 0.10 a	28.09 ± 4.14 a
PKS	8.14 ± 0.83 bc	5.30 ± 0.23 ab	3.12 ± 0.89 abc	0.41 ± 0.00 b	0.26 ± 0.05 b	26.45 ± 1.15 a
SC	8.10 ± 0.32 bc	5.06 ± 0.19 b	3.33 ± 0.18 ab	0.41 ± 0.03 b	0.26 ± 0.04 b	26.72 ± 0.99 a
LC	7.76 ± 0.54 c	5.28 ± 0.41 ab	2.37 ± 0.03 c	0.92 ± 0.08 a	0.18 ± 0.02 b	27.00 ± 1.76 a
BK	9.19 ± 0.46 ab	5.94 ± 0.36 a	3.49 ± 0.08 ab	0.42 ± 0.00 b	0.20 ± 0.10 b	29.67 ± 1.34 a
RHM	17.87 ± 2.24 a	8.93 ± 2.12 a	7.85 ± 0.21 ab	1.03 ± 0.05 b	1.38 ± 0.12 ab	53.02 ± 3.37 a
JCM	21.73 ± 5.55 a	11.41 ± 2.83 a	8.89 ± 2.47 a	1.22 ± 0.20 b	1.95 ± 0.15 a	62.11 ± 13.68 a
PKSM	17.18 ± 2.97 a	9.40 ± 1.66 a	6.91 ± 1.15 ab	1.16 ± 0.13 b	1.45 ± 0.45 ab	51.43 ± 7.38 a
SCM	18.37 ± 2.44 a	9.90 ± 1.31 a	7.37 ± 1.02 ab	1.04 ± 0.28 b	1.21 ± 0.11 b	56.24 ± 8.28 a
LCM	16.65 ± 2.70 a	10.04 ± 2.01 a	5.53 ± 0.39 b	2.43 ± 0.79 a	1.69 ± 0.60 ab	57.38 ± 11.65 a
BKM	21.50 ± 5.31 a	11.38 ± 2.73 a	8.32 ± 2.23 a	1.25 ± 0.24 b	1.58 ± 0.52 ab	63.33 ± 13.92 a

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter

<sup>2</sup> PLFA : phospholipid ester-linked fatty acid.

<sup>3</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.



表十六、不同生物炭處理下土壤微生物群落 PLFA 濃度 (續)(孵育第 90 天)

Table 16. Microbial communities PLFA concentrations of the soils under different biochars addition (continued) (90 day)

Treatment	G+/G <sup>-2</sup>	Actino <sup>2</sup> /Bact <sup>2</sup>	Fungi/Bact	cy17:0/16:1 ω7c	cy19:0/18:1 ω7c	16:1 ω7t/16:1 ω7c
RH <sup>1</sup>	1.57 ± 0.11 b	0.04 ± 0.00 b	0.03 ± 0.01 b	1.97 ± 0.13 a	2.59 ± 0.20 a	0.00 ± 0.00 b
JC	1.86 ± 0.32 ab	0.05 ± 0.01 b	0.05 ± 0.01 a	1.10 ± 0.85 bc	2.22 ± 0.24 a	0.00 ± 0.00 b
PKS	1.82 ± 0.67 ab	0.05 ± 0.01 b	0.03 ± 0.01 b	1.49 ± 0.07 abc	1.65 ± 1.43 a	0.00 ± 0.00 b
SC	1.51 ± 0.02 b	0.05 ± 0.00 b	0.03 ± 0.01 b	1.54 ± 0.02 abc	2.16 ± 0.05 a	0.00 ± 0.00 b
LC	2.23 ± 0.15 a	0.12 ± 0.01 a	0.02 ± 0.00 b	0.94 ± 0.20 c	2.39 ± 0.33 a	0.75 ± 0.06 a
BK	1.70 ± 0.06 ab	0.05 ± 0.00 b	0.02 ± 0.01 b	1.71 ± 0.10 ab	2.13 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 b
RHM	1.13 ± 0.25 b	0.06 ± 0.00 b	0.08 ± 0.02 ab	2.87 ± 0.35 a	3.04 ± 0.03 a	0.36 ± 0.01 c
JCM	1.29 ± 0.06 b	0.06 ± 0.01 b	0.09 ± 0.02 ab	2.89 ± 0.28 a	3.18 ± 0.16 a	0.37 ± 0.06 c
PKSM	1.36 ± 0.05 b	0.07 ± 0.01 b	0.08 ± 0.02 ab	3.26 ± 0.12 a	3.03 ± 0.23 a	0.47 ± 0.04 b
SCM	1.32 ± 0.01 b	0.06 ± 0.01 b	0.07 ± 0.01 b	3.76 ± 0.23 a	2.79 ± 0.52 a	0.34 ± 0.01 c
LCM	1.80 ± 0.24 a	0.14 ± 0.03 a	0.10 ± 0.02 a	1.41 ± 1.56 b	2.33 ± 0.28 b	1.20 ± 0.05 a
BKM	1.38 ± 0.06 b	0.06 ± 0.00 b	0.07 ± 0.01 ab	2.98 ± 0.01 a	2.26 ± 0.17 b	0.35 ± 0.03 c

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter.


<sup>2</sup> G+ : gram positive bacteria ; G- : Gram-negative bacteria ; Actino : actinomycete ; Bact : bacteria.

<sup>3</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.

表十七、不同生物炭處理下土壤微生物群落 PLFA 濃度 (孵育第 180 天)

Table 17. Microbial communities PLFA concentrations of the soils under different biochars addition (180 days)



Treatment	Bacteria	Gram-positive bacteria	Gram-negative bacteria	Actinomycete	Fungi	Total PLFA <sup>2</sup>
$\mu \text{ mol PLFA kg}^{-1}$						
RH <sup>1</sup>	2.66 ± 1.04 <sup>3</sup> a <sup>4</sup>	1.55 ± 0.38 a	0.97 ± 0.46 a	0.09 ± 0.12 a	0.15 ± 0.22 a	13.54 ± 3.98 a
JC	2.98 ± 0.26 a	2.05 ± 0.12 a	0.98 ± 0.14 a	0.11 ± 0.01 a	0.09 ± 0.02 a	12.87 ± 1.66 a
PKS	3.59 ± 0.41 a	2.34 ± 0.35 a	1.26 ± 0.16 a	0.08 ± 0.03 a	0.04 ± 0.04 a	14.92 ± 0.83 a
SC	14.29 ± 19.93 a	11.14 ± 15.91 a	2.80 ± 3.42 a	2.90 ± 4.79 a	0.03 ± 0.02 a	87.00 ± 126.23 a
LC	4.30 ± 0.55 a	2.92 ± 0.40 a	1.28 ± 0.13 a	0.50 ± 0.08 a	0.09 ± 0.03 a	16.99 ± 1.05 a
BK	2.99 ± 1.25 a	1.99 ± 0.56 a	1.03 ± 0.67 a	0.15 ± 0.04 a	0.06 ± 0.03 a	14.36 ± 4.33 a
RHM	10.18 ± 4.76 a	5.77 ± 2.71 a	4.29 ± 1.79 ab	0.66 ± 0.37 a	1.23 ± 1.35 a	30.70 ± 11.47 a
JCM	14.78 ± 2.82 a	9.26 ± 2.95 a	6.14 ± 1.27 a	1.70 ± 1.36 a	0.95 ± 0.73 a	47.50 ± 13.58 a
PKSM	13.66 ± 6.28 a	8.02 ± 3.63 a	5.41 ± 2.62 ab	1.03 ± 0.47 a	1.00 ± 0.26 a	40.21 ± 15.42 a
SCM	9.19 ± 2.33 a	5.52 ± 1.14 a	3.51 ± 1.11 ab	0.62 ± 0.14 a	0.53 ± 0.25 a	29.89 ± 7.51 a
LCM	9.62 ± 0.47 a	6.21 ± 0.95 a	2.74 ± 0.58 b	1.42 ± 0.17 a	1.03 ± 0.24 a	37.75 ± 4.04 a
BKM	9.61 ± 1.91 a	5.42 ± 0.97 a	3.92 ± 0.86 ab	0.65 ± 0.12 a	0.64 ± 0.21 a	31.70 ± 5.68 a

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter.

<sup>2</sup> PLFA : phospholipid ester-linked fatty acid.

<sup>3</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.



表十七、不同生物炭處理下土壤微生物群落 PLFA 濃度 (續)(孵育第 180 天)

Table 17. Microbial communities PLFA concentrations of the soils under different biochars addition (continued) (180 day)

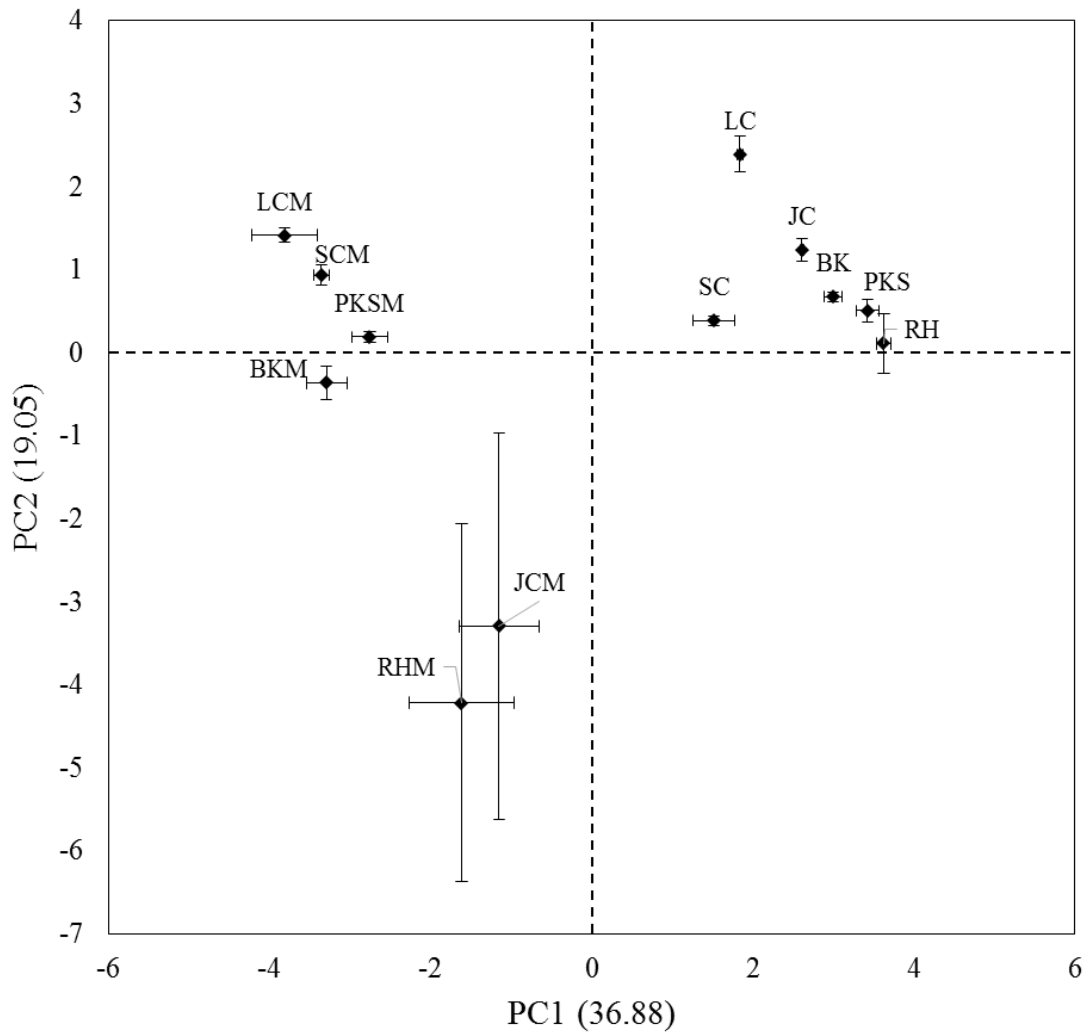
Treatment	G+/G <sup>-2</sup>	Actino <sup>2</sup> /Bact <sup>2</sup>	Fungi/Bact	cy17:0/16:1 ω7c	cy19:0/18:1 ω7c	16:1 ω7t/16:1 ω7c
RH <sup>1</sup>	1.72 ± 0.45 b	0.03 ± 0.03 b	0.04 ± 0.06 a	2.22 ± 2.12 a	2.52 ± 0.20 a	0.28 ± 0.49 ab
JC	2.12 ± 0.19 ab	0.04 ± 0.00 ab	0.03 ± 0.01 a	2.51 ± 0.38 a	2.17 ± 0.39 a	0.00 ± 0.00 b
PKS	1.85 ± 0.08 b	0.02 ± 0.01 b	0.01 ± 0.01 a	1.94 ± 0.39 a	2.33 ± 0.26 a	0.00 ± 0.00 b
SC	3.31 ± 1.51 a	0.14 ± 0.13 a	0.01 ± 0.01 a	2.33 ± 0.51 a	0.87 ± 1.23 b	0.00 ± 0.00 b
LC	2.28 ± 0.09 ab	0.12 ± 0.02 a	0.02 ± 0.01 a	1.91 ± 0.40 a	2.47 ± 0.11 a	0.57 ± 0.14 a
BK	2.23 ± 0.68 ab	0.05 ± 0.01 ab	0.02 ± 0.00 a	2.08 ± 2.19 a	1.98 ± 0.38 ab	0.00 ± 0.00 b
RHM	1.32 ± 0.18 b	0.06 ± 0.01 b	0.10 ± 0.09 a	2.58 ± 0.75 c	3.11 ± 0.22 a	0.36 ± 0.31 c
JCM	1.49 ± 0.18 b	0.11 ± 0.07 ab	0.07 ± 0.06 a	3.72 ± 0.12 b	1.97 ± 1.59 ab	0.64 ± 0.05 b
PKSM	1.50 ± 0.08 b	0.08 ± 0.00 b	0.08 ± 0.04 a	3.65 ± 0.87 b	2.95 ± 0.15 ab	0.67 ± 0.14 b
SCM	1.73 ± 0.29 b	0.07 ± 0.01 b	0.05 ± 0.02 a	5.98 ± 1.02 a	2.19 ± 0.73 ab	0.59 ± 0.04 bc
LCM	2.40 ± 0.96 a	0.15 ± 0.01 a	0.11 ± 0.02 a	2.56 ± 0.19 c	1.41 ± 1.22 b	1.15 ± 0.18 a
BKM	1.39 ± 0.08 b	0.07 ± 0.00 b	0.07 ± 0.01 a	3.90 ± 0.36 b	2.44 ± 0.22 ab	0.36 ± 0.08 c

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter.

<sup>2</sup> G+ : gram positive bacteria ; G- : Gram-negative bacteria ; Actino : actinomycete ; Bact : bacteria.

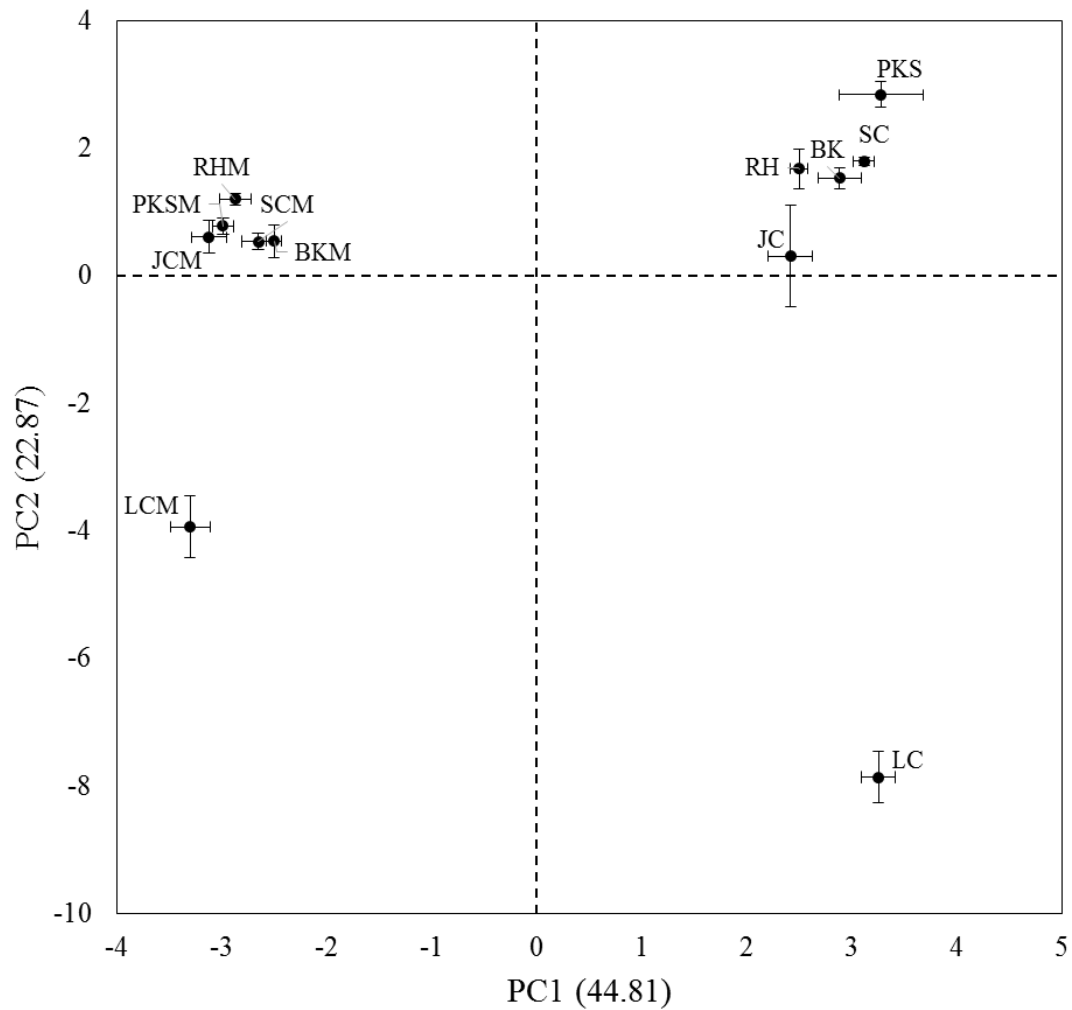
<sup>3</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>4</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.



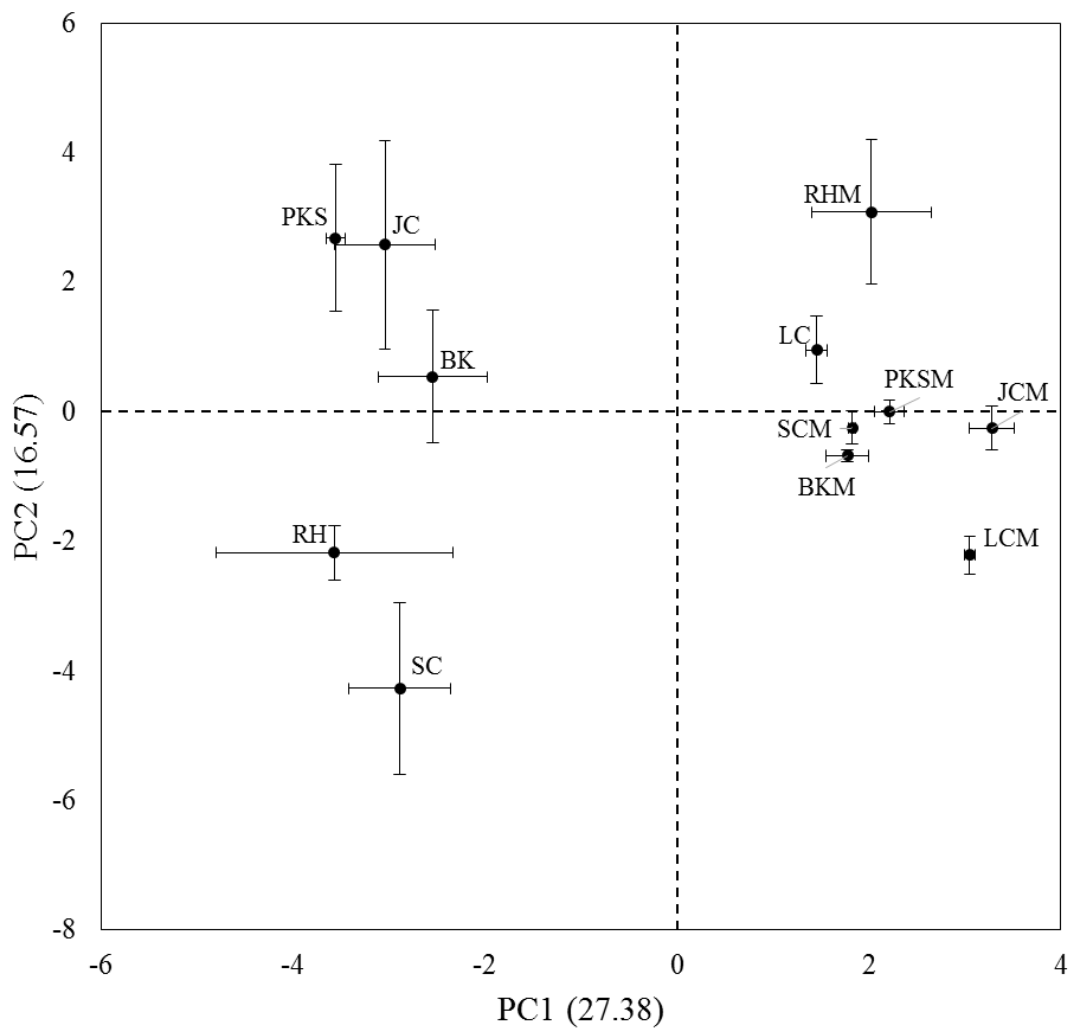
圖八、不同生物炭處理下土壤 PLFA 組成對微生物群落結構之主成分分析  
 第一主成分 (PC1) 與第二主成分 (PC2) 分別可解釋 42.57% 及  
 17.70% 的變異。(第 0 天)

Fig. 8. Principal component analysis (PCA) of PLFA pattern from soils immediately after application of biochar and organic matter. Principal component 1 (PC1) could explain 36.88% variance while PC2 could explain 19.05%. Error bars are means  $\pm$  standard error of three replicates. Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.



圖九、不同生物炭處理下土壤 PLFA 組成對微生物群落結構之主成分分析  
第一主成分 (PC1) 與第二主成分 (PC2) 分別可解釋 44.81% 及  
22.87% 的變異 (孵育第 90 天)

Fig. 9. Principal component analysis (PCA) of PLFA pattern from soils after 90 days of application of biochar and organic matter. Principal component 1 (PC1) could explain 44.81% variance while PC2 could explain 22.87%. Error bars are means  $\pm$  standard error of three replicates. Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.



圖十、不同生物炭處理下土壤 PLFA 組成對微生物群落結構之主成分分析  
第一主成分 (PC1) 與第二主成分 (PC2) 分別可解釋 27.38% 及  
16.57% 的變異 (孵育第 180 天)

Fig. 10. Principal component analysis (PCA) of PLFA pattern from soils after 180 days of application of biochar and organic matter. Principal component 1 (PC1) could explain 27.38% variance while PC2 could explain 16.57%. Error bars are means  $\pm$  standard error of three replicates. Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.



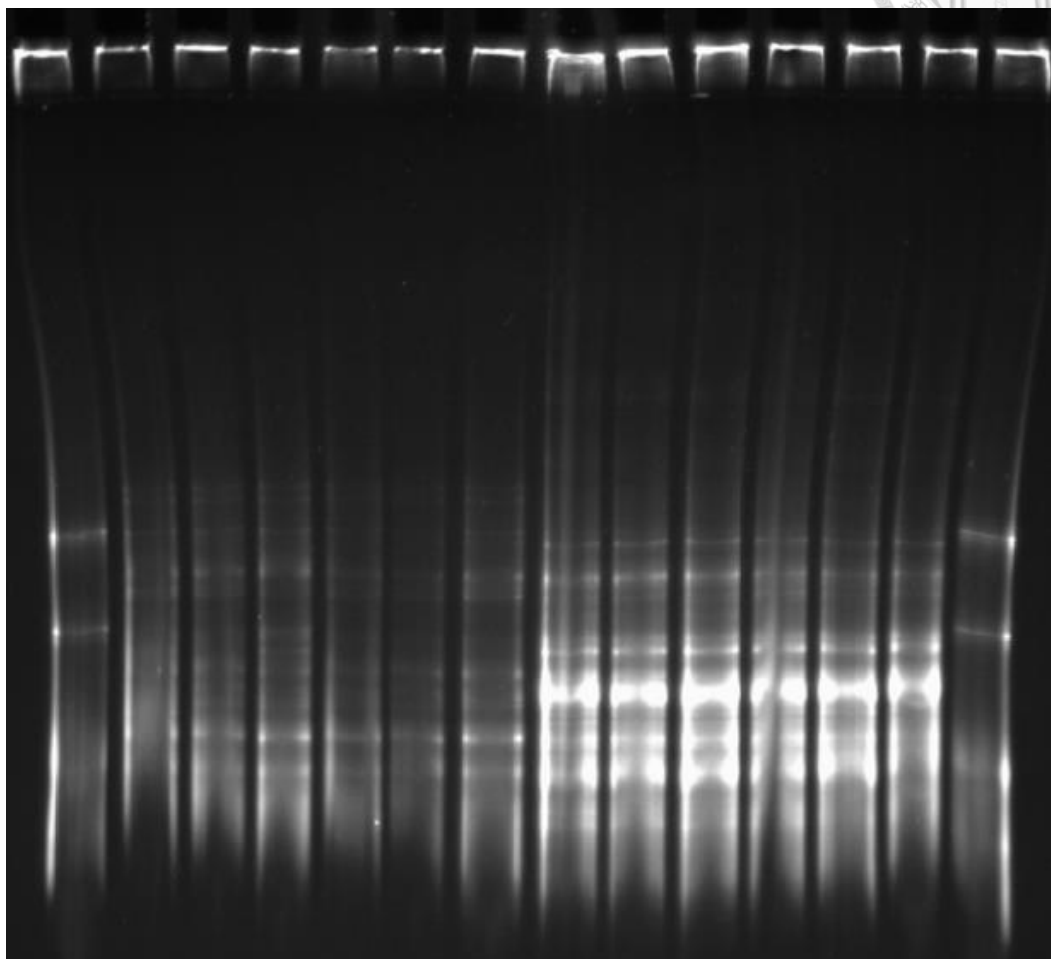
#### 4.4.2 微生物群落：DNA 分子序列分析法

圖十一為第 0 天之土壤細菌 (16S) 族群 DGGE 分析圖譜，由此圖譜可大致看出有添加有機質肥料之處理之微生物多樣性較為豐富，而圖十二為其組成成分分析結果，可看出有添加有機質肥料與否，已分為左右兩群，然而，在未添加有機質肥料處理中，除 RH 生物炭對於微生物相影響較有差異外，其他與 BK 處理相近。而在添加有機質肥料之土壤中，添加生物炭之處理影響接近，且有別於 BKM 處理，顯示添加有機質肥料影響土壤細菌之效應，大於添加生物炭對於土壤細菌之影響。圖十三顯示第 0 天之土壤真菌 (18S) 族群 DGGE 分析圖譜，此圖亦可大致看出添加有機質肥料與否之差別甚大。而在其主成分分析結果 (十四)，顯示分為三群，在未添加有機質肥料土壤之所有處理，其影響因子相近，而在添加有機質肥料的土壤中，分為兩群，而 SC、LC 煤灰生物炭與 BKM 為一群，顯示對於原群落影響不大，而 PKSM、RHM 與 JCM 則為同一群落，顯示影響因子相近。

孵育 180 天後，圖十五為土壤細菌 (16S) 族群 DGGE 分析圖譜，與第 0 天圖譜 (圖十二) 差別甚大，而其主成分分析 (圖十六) 顯示，除 SCM 處理有較大的分離外，其餘皆散佈狀，顯示不同生物炭對添加有機質肥料與否之土壤細菌群落組成，經由孵育一段時間後，皆有不同之影響。圖十七為孵育第 180 天之土壤真菌 (18S) 族群 DGGE 分析圖譜，同樣可以明顯看出添加有機質肥料與否的微生物相差別甚大，經由主成分分析 (圖十八)，BKM 處理與其他處理相差甚遠，顯示在添加有機質肥料之土壤中，添加生物炭孵育一段時間後，影響真菌群落。整體分析顯示，添加生物炭孵育一段時間後，確實影響微生物群落的結構，其中又以添加有機質肥料之處理影響明顯，因此，菌相之分析結果沒有相似性，且變化甚大。

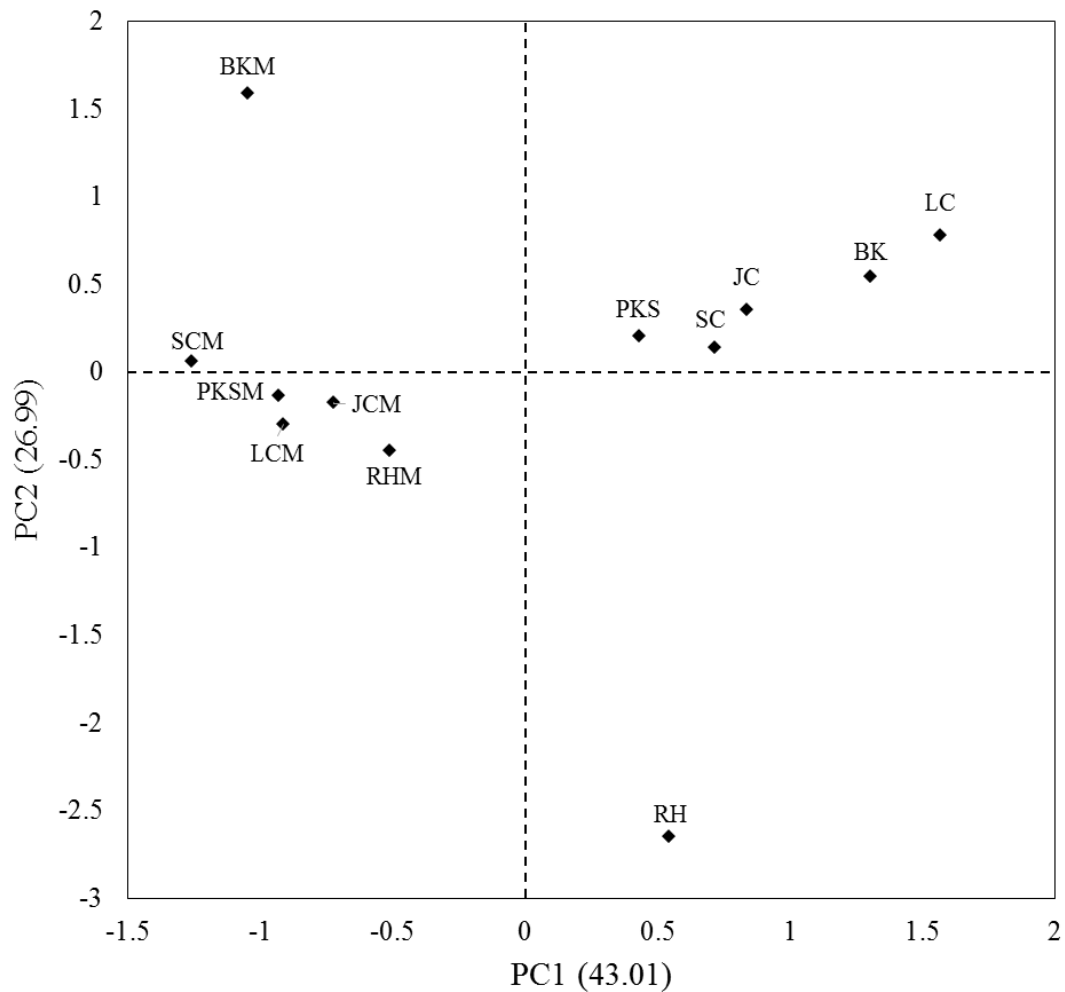
將化學分析與土壤酵素分析比較 DGGE 分析，其可觀察到不同生物炭處理對土壤細菌及真菌族群之不同影響，前人研究亦有發現生物炭對於土壤之細菌與真菌族群影響不同 (Pietikainen et al., 2000)。土壤微生物與土壤養分息息相關，因此，土壤微生物族群結構改變時，亦會影響土壤養分循環，微生物族群間的複雜交互作用也會隨之變動，故土壤細菌及真菌族群的改變將影響土壤品質。

RH JC PKS SC LC BK RHM JCM PKSM SCM LCM BKM



圖十一、不同生物炭處理之土壤 16S rRNA 基因之變性梯度膠體電泳圖譜 (第 0 天)

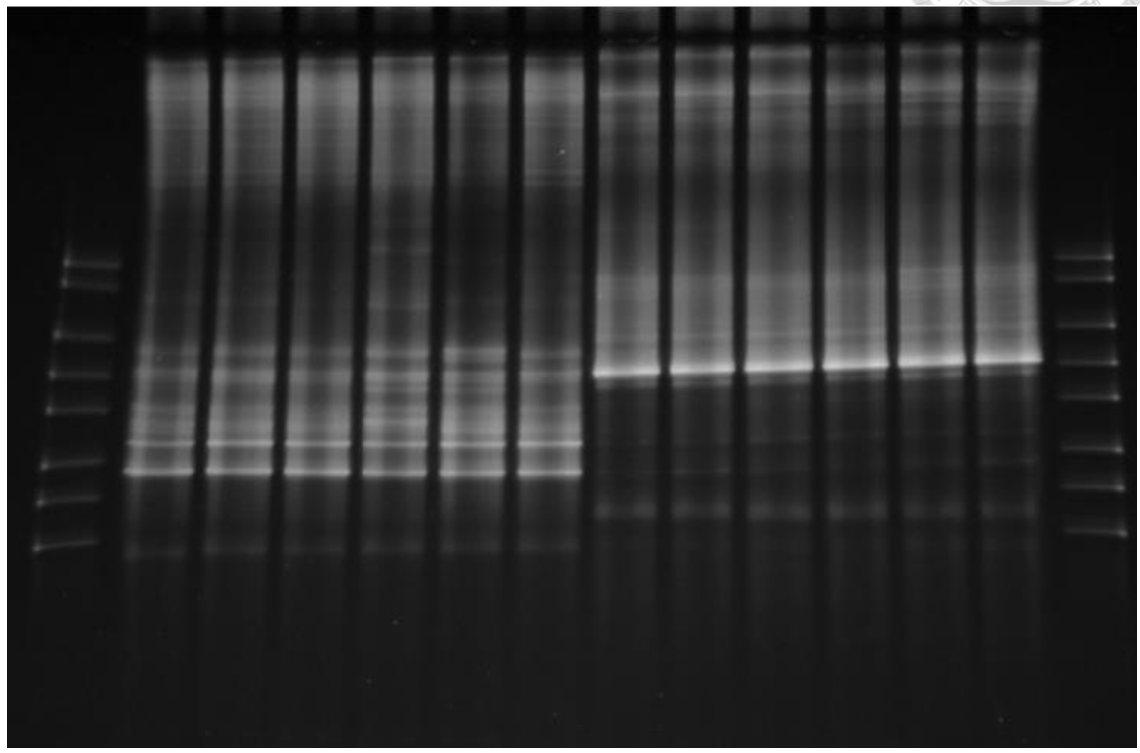
Fig. 11. DGGE pattern of 16S rRNA gene of the soils under different biochars addition with or without organic matter addition (0 day). Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.



圖十二、不同生物炭處理之土壤 16S rRNA 基因之主成分分析 (第 0 天)  
 第一主成分 (PC1) 與第二主成分 (PC2) 分別可解釋 43.01% 及 26.99%  
 的變異

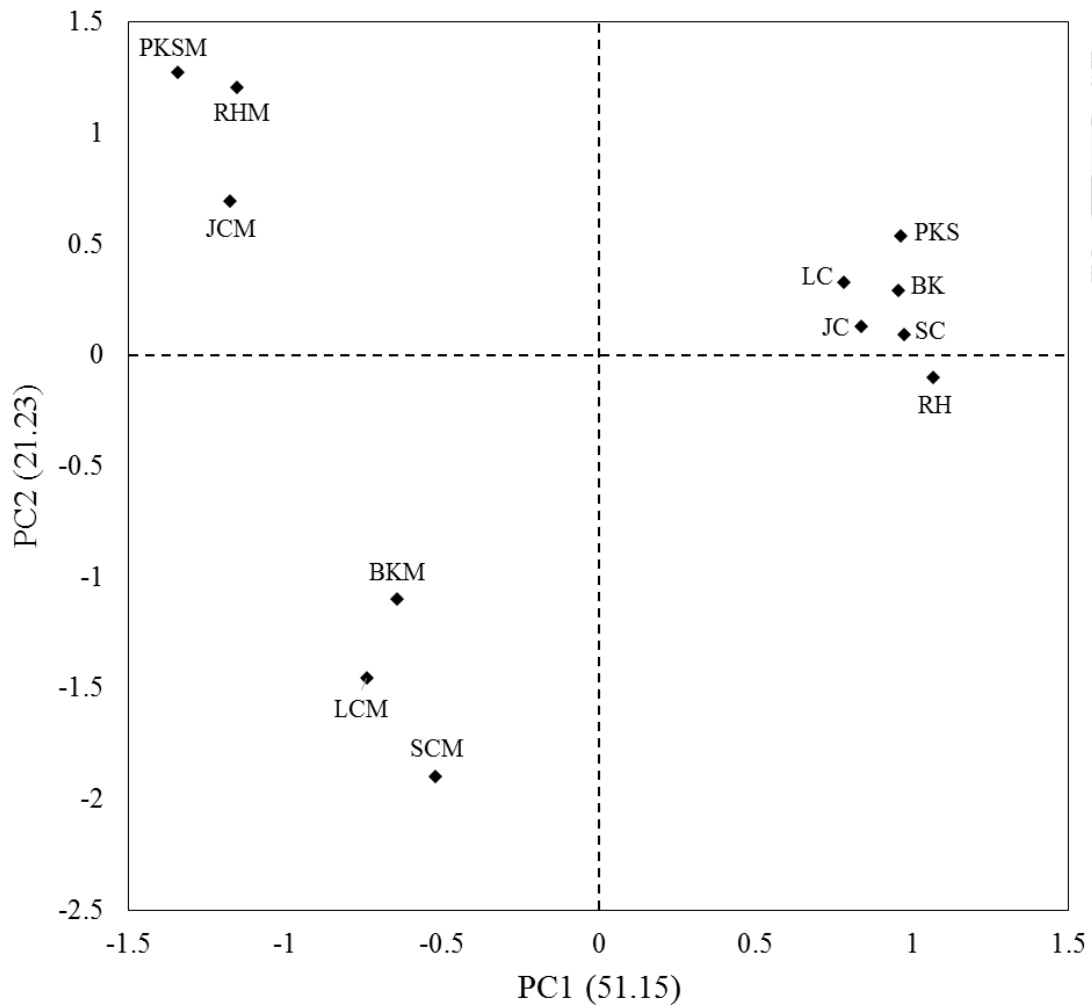
Fig. 12. Principal component analysis of 16S rRNA gene of soils immediately after application of biochar and organic matter. Principal component 1 (PC1) could explain 43.01% variance while PC2 could explain 26.99%. Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.

RH JC PKS SC LC BK RHM JCM PKSM SCM



圖十三、不同生物炭處理之土壤 18S rRNA 基因之變性梯度膠體電泳圖譜 (第 0 天)

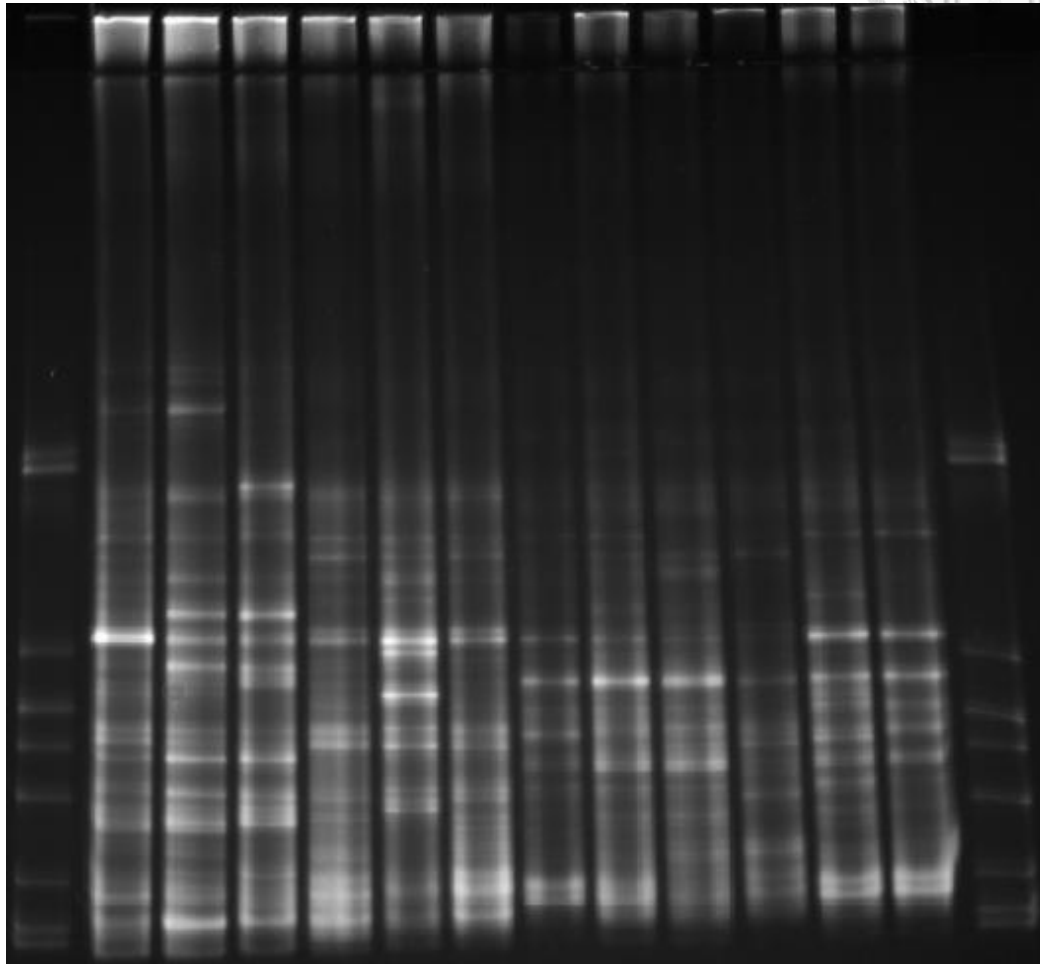
Fig. 13. DGGE pattern of 18S rRNA gene of the soils under different biochars addition with or without organic matter addition (0 day). Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.



圖十四、不同生物炭處理之土壤 18S rRNA 基因之主成分分析 (第 0 天)  
 第一主成分 (PC1) 與第二主成分 (PC2) 分別可解釋 51.15% 及 21.23%  
 的變異

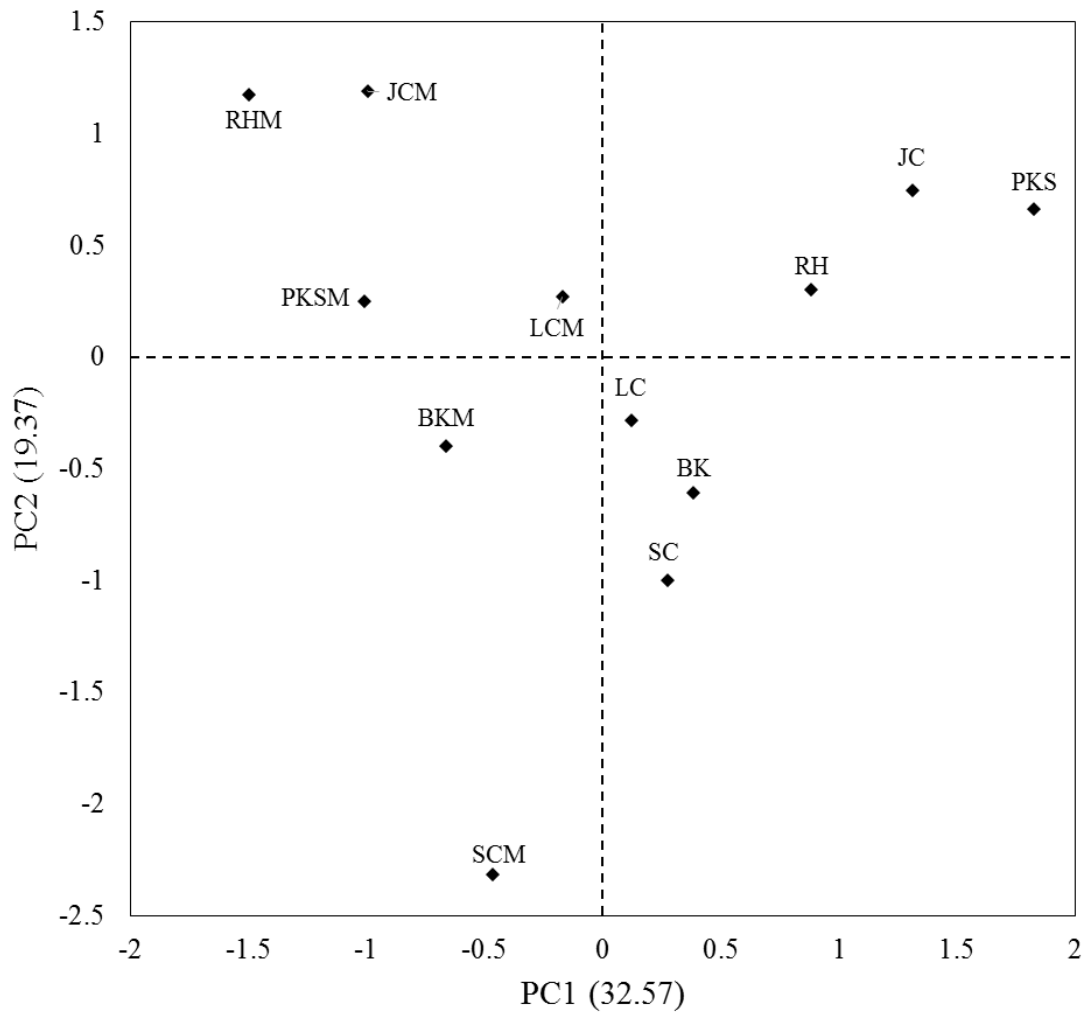
Fig. 14. Principal component analysis of 18S rRNA gene of soils immediately after application of biochar and organic matter. Principal component 1 (PC1) could explain 51.15% variance while PC2 could explain 21.23%. Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.

RH JC PKS SC LC BK RHM JCM PKSM SCM LCM BKM



圖十五、不同生物炭處理之土壤 16S rRNA 基因之變性梯度膠體電泳圖譜 (第 180 天)

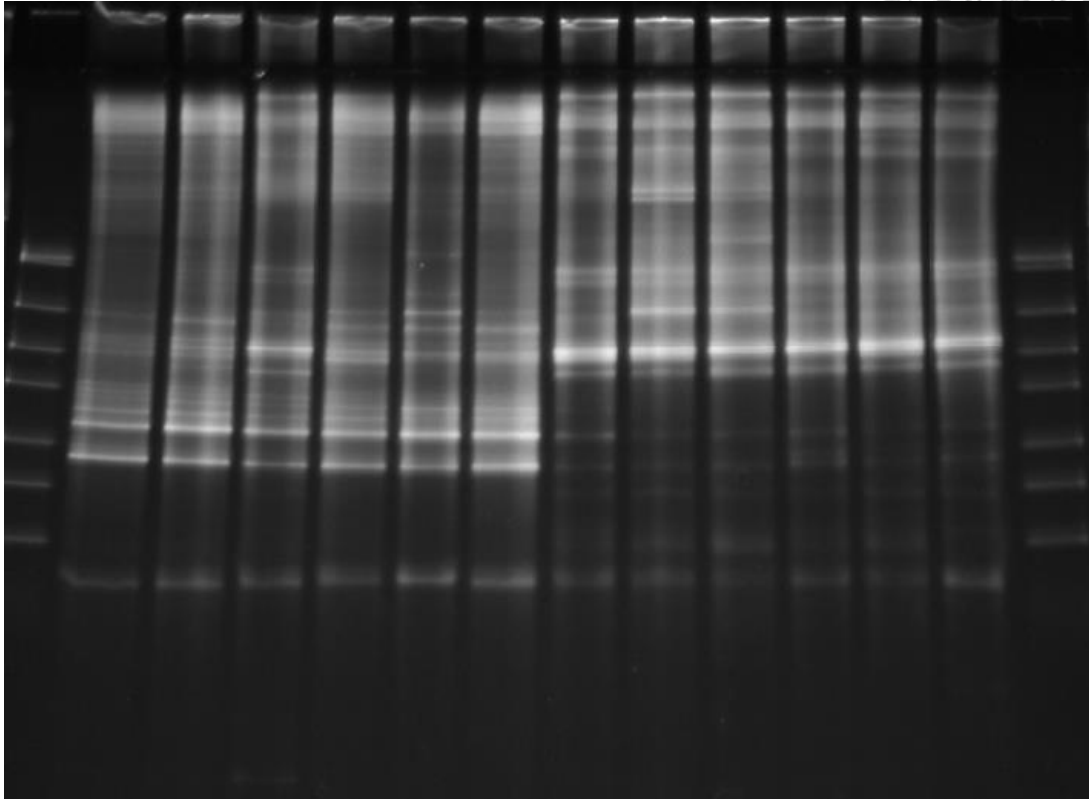
Fig. 15. DGGE pattern of 16S rRNA gene of the soils under different biochars addition with or without organic matter addition (180 day). Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.



圖十六、不同生物炭處理之土壤 16S rRNA 基因之主成分分析 (第 180 天)  
 第一主成分 (PC1) 與第二主成分 (PC2) 分別可解釋 32.57% 及 19.37%  
 的變異

Fig. 16. Principal component analysis of 16S rRNA gene of soils after 180 days application of biochar and organic matter. Principal component 1 (PC1) could explain 32.57% variance while PC2 could explain 19.37%. Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.

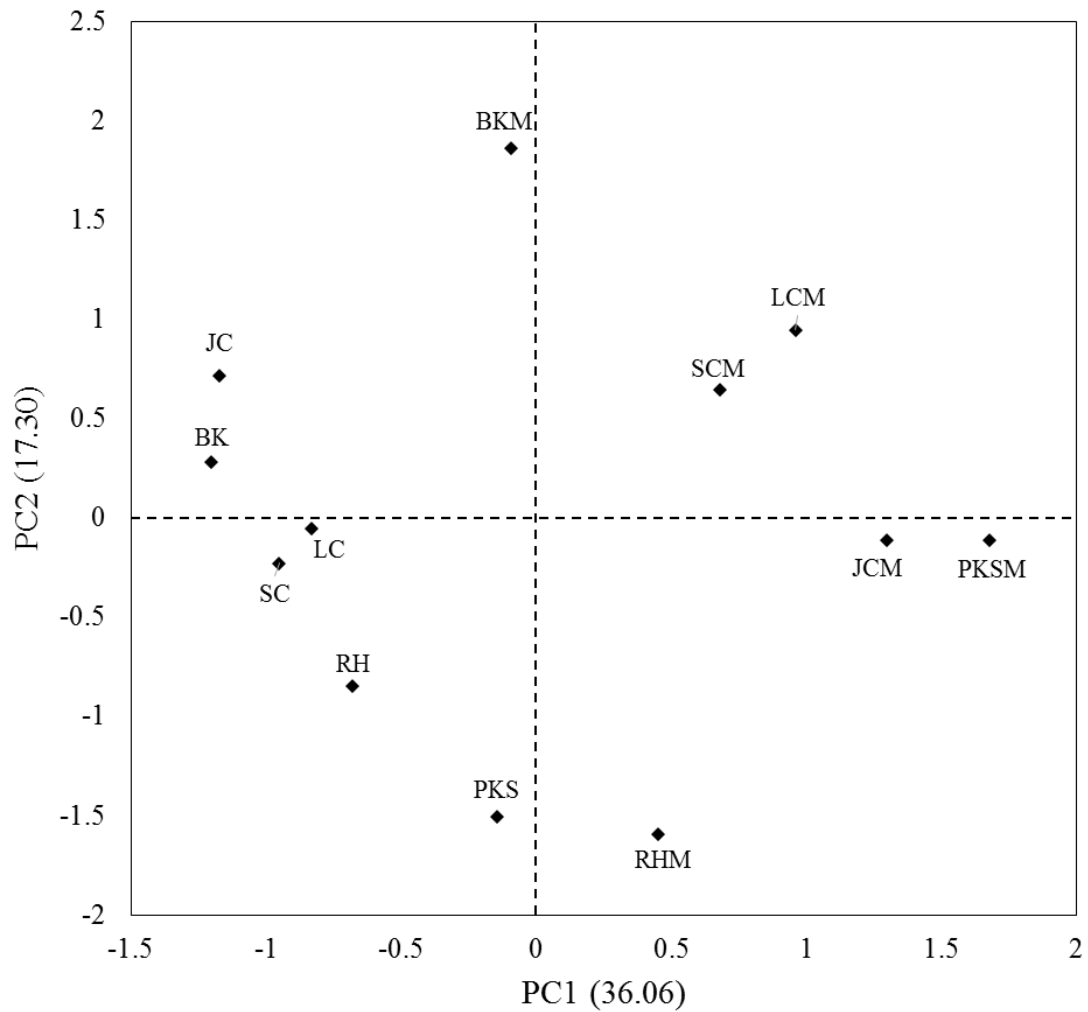
RH JC PKS SC LC BK RHM JCM PKSM SCM LCM BKM



圖十七、不同生物炭處理之土壤 18S rRNA 基因之變性梯度膠體電泳圖譜 (第 180 天)

Fig. 17. DGGE pattern of 18S rRNA gene of the soils under different biochars addition with or without organic matter addition (180 day). Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.





圖十八、不同生物炭處理之土壤 18S rRNA 基因之主成分分析 (第 180 天)  
 第一主成分 (PC1) 與第二主成分 (PC2) 分別可解釋 36.06% 及 17.30%  
 的變異

Fig. 18. Principal component analysis of 18S rRNA gene of soils after 180 days application of biochar and organic matter. Principal component 1 (PC1) could explain 36.06% variance while PC2 could explain 17.30%. Treatment: RH, rice husk biochar; JC, japanese cedar biochar; PKS, palm kernel shell biochar; SC, small particle size of coal ash; LC, large particle size of coal ash; BK, without applying biochar and organic matter; M, applying organic matter.

## 第五章 結論

不同原料來源之生物炭，對紅壤化學性質與微生物活性影響不同。本研究生物炭用量小，其中和紅壤酸性的能力不大，對土壤 pH 值無明顯提升。生物炭吸附可溶性鹽類能力強，使土壤 EC 值下降。生物炭含氮量均影響土壤總氮，尤以 15-30  $\mu\text{m}$  粒徑之煤灰生物炭增加最多，但所有處理之土壤總氮增加並不明顯。土壤有機碳濃度因生物炭添加而增加，顯示生物炭之有機碳含量多或抗微生物分解能力強。稻殼生物炭、柳杉、棕櫚殼生物炭增加紅壤中磷、鉀、鈣，其中又以稻殼生物炭提升最多，對於紅壤肥力改良有較高潛力。生物炭對鈣、鐵、鋅在土壤中之含量無顯著影響，但因對錳、銅之吸附效應大，使其土壤之含量下降。不論是否有添加有機質肥料，棕櫚殼生物炭明顯抑制土壤酵素活性，本研究之生物炭對未添加有機質紅壤之  $\beta$ -醣苷酶、酸性磷酸酯酶活性影響較大，而棕櫚殼與煤灰生物炭對添加有機質紅壤之酵素活性影響較為明顯，使活性下降。稻殼、柳杉與棕櫚殼生物炭提高土壤呼吸作用，而煤灰生物炭則降低，顯示稻殼、柳杉與棕櫚殼三種生物炭供給土壤微生物利用之碳源較多。整體呼吸作用隨孵育時間而下降，顯示生物炭所含之易變動碳只能短暫供應。生物炭對土壤生質氮、生質碳影響不大，對微生物生質量影響小。生物炭對土壤微生物群落結構影響大，添加不同生物炭對群落結構造成不同影響，而隨孵育時間越長，影響群落越明顯。其中又以 15-30  $\mu\text{m}$  粒徑之煤灰生物炭影響最大，而添加有機質肥料對微生物群落結構的影響大於生物炭。

## 第六章 參考文獻

- 邱凡晟。2010。不同施肥管理對青蔥生長、土壤化學性質、酵素活性及微生物族群結構之影響。國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文，台北，台灣。
- 張金鳳。2015。不同旱作輪作系統對土壤化學性質、微生物活性及群落結構之影響。國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文，台北，台灣。
- 陳仁炫。1991。肥效增進原則與對策，(四) 鉀肥。農藥世界，90: 30-35.
- 陳存澤。2008。不同的施肥管理對土壤化學性質、酵素活性及微生物族群結構的影響。國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文，台北，台灣。
- 陳琦玲、林木連、郭鴻裕、江志峰、劉滄琴、朱戩良。2000。土地利用改變對台灣農地土壤有機碳存量之影響評估。土壤與環境，3: 362-378。
- 黃旭瑩。2012。稻殼生物炭對紫色葉用甘藷產量、養分吸收與抗氧化性質的影響。國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文，台北，台灣。
- 楊承翰。2014。長期施用不同有機質肥料對溫室栽培作物土壤的微生物群落結構與化學性質之影響。國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文，台北，台灣。
- 蔡天寧。2014。生物炭對土壤微生物群落結構與氧化亞氮代謝相關基因量之影響。國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文，台北，台灣。
- Alef, K. 1993. Estimation of microbial biomass in soil - A critical-view. *Soil Science and Plant Nutrition*, 156: 109-114.
- Ameloot, N., D. Neve, S. Jegajeevagan, K. Yildiz, G. Buchan, D. Funkuin, Y. N. Prins, W. Bouckaert, L. Sleutel, S. 2013. Short-term CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions and microbial properties of biochar amended sandy loam soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 57: 401-410.
- Amonette, J. E. and S. Joseph. 2009. Biochar for environmental management science and technology. In: *Characteristics of biochar: Microchemical properties*. Lehmann J. and S. Joseph (editor), pp. 33-43. Earthscan, London, UK.
- Atkinson, C. J., J. D. Fitzgerald and N.A. Hips. 2010. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits form biochar application to temperate soils: a review. *Plant and Soil*, 337: 1-18.
- Badalucco, L., P. Nannipieri, S. Grego and C. Ciardi. 1990. Microbial biomass and anthrone-reactive carbon in soils with different organic-matter contents. *Soil*

Biology and Biochemistry, 22: 899-904.

- Ball, D. F. 1964. Loss-on-ignition as estimate of Organic matter + Organic carbon in non-calcareous soils. *Journal of Soil Science*, 15: 84-89.
- Bandick, A. K. and R. P. Dick. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1471-1479.
- Blackwell, P., S. Shea, P. Storer, Z. Solaiman, M. Kerkamns and I. Stanley. 2007. Improving wheat production with deep banded oil mallee charcoal in Western Australia. In: *The First Asia-Pacific Biochar Conference*. Terrigal, Australia.
- Blagodatskaya, E., N. Khomyakov, O. Myachina, I. Bogomolova, S. Blagodatsky and Y. Kuzyakov. 2014. Microbial interactions affect sources of priming induced by cellulose. *Soil Biology and Biochemistry*, 74: 39-49.
- Blissett, R. S. and N. A. 2012. Rowson. A review of the multi-component utilisation of coal fly ash. *Fuel*, 97:1-23.
- Borchard, N., B. Ladd, S. Eschemann, D. Hegenberg, B. M. Mösel, and W. Amelung. 2014. Black carbon and soil properties at historical charcoal production sites in Germany. *Geoderma*, 232-234: 236-242.
- Bossio, D. A., K. M. Scow, N. Gunapala and K. J. Graham. 1998. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, 36: 1-12.
- Brady, N. C. and R. R. Weil. 2008. The colloidal fraction: seat of soil chemical and physical activity. In: *The Nature and Properties of Soils*. V. R. Anthony (editor), Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen, inorganic forms of nitrogen, organic forms of nitrogen. In: *Methods of soil analysis. Part 2. Mineralogical Methods-Agronomy Monograph*. Black, C. A. (editor). Madison, Wisconsin, USA.
- Bremner, J. M. and C. S. Mulvaney. 1982. Salicy acid-thiosulfate modification on Kjeldahl method to include nitrite and nitrate. In: *Methods of Soil Analysis. Part 2*. Black, C. A. (editor), pp. 1149-1178. Madison, Wisconsin, USA.
- Bruun, E. W., P. Ambus, H. Egsgaard and H. Hauggaard-Nielsen. 2012, Effects of slow and fast pyrolysis biochar on soil C and N turnover dynamics, *Soil Biology and Biochemistry*, 46: 73-79.
- Burns, R. G. 1982. Enzyme-activity in soil - location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*. 14: 423-427.
- Carlson, J., J. Saxena, N. Basta, L. Hundal, D. Busalacchi and R. P. Dick. 2015.

Application of organic amendments to restore degraded soil: Effects on soil microbial properties. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 10.1007/s10661-015-4293-0.

- Chakrabarti, K., B. Sarkar, A. Chakraborti, P. Banik, D. K. Bakchi. 2000. Organic recycling for soil quality conservation in a sub-tropical plateau region. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 184: 137-142.
- Chan, K. Y., L. Van Zwieten, I. Meszaros, A. Dawnie and S. Joseph. 2007. Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendments. *Australian Journal of Soil Research*, 45: 629-634.
- Chander, K., J. Dyckmans, R. G. Joergensen, B. Meyer and M. Raubuch. 2001. Different sources of heavy metals and their long-term effects on soil microbial properties. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 241-247.
- Chen, M. N., X. Li, Q. L. Yang, X. Y. Chi, L. J. Pan, N. Chen, Z. Yang, T. Wang, M. A. Wang and S. L. Yu. 2014. Dynamic succession of soil bacterial community during continuous cropping of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *PLoS One*, 9 (11).
- Cheng, C. H. and J. Lehmann. 2009. Ageing of black carbon along a temperature gradient. *Chemosphere*, 75: 1021-1027.
- Choi, G. G., S. J. Oh, S. J. Lee and J. S. Kim. 2015. Production of bio-based phenolic resin and activated carbon from bio-oil and biochar derived from fast pyrolysis of palm kernel shells. *Bioresource Technology*, 178: 99-107.
- Cui, H. J., M. K. Wang, M. L. Fu and E. Ci. 2011. Enhancing phosphorus availability in phosphorus-fertilized zones by reducing phosphate adsorbed on ferrihydrite using rice straw-derived biochar. *Journal of Soils and Sediments*, 11: 1135-1141.
- Dalal, R. C. 1998. Soil microbial biomass - What do the numbers really mean? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38: 649-665.
- Demisie, W., Z. Liua, and M. Zhang. 2014. Effect of biochar on carbon fractions and enzyme activity of red soil. *Catena*, 121:214-221.
- Dempster, D. N., D. B. Gleeson, Z. M. Solaiman, D. L. Jones and D. V. Murphy. 2012. Decreased soil microbial biomass and nitrogen mineralisation with Eucalyptus biochar addition to a coarse textured soil. *Plant and Soil*, 354: 311-324.
- Dias, B. O., C. A. Silva, F. S. Higashikawa, A. Roig and M. A. Sánchez-Monedero, 2010. Use of biochar as bulking agent for the composting of poultry manure: Effect on organic matter degradation and humification. *Bioresource Technology*, 101: 1239-1246.

- Dick, R. P., P. E. Rasmussen and E. A. Kerle. 1988. Influence of long-term residue management on soil enzyme-activities in relation to soil chemical properties of a wheat-fallow system. *Biology and Fertility of Soils*, 6: 159-164.
- Dick, R. P. 2011. The Collodial Fraction : Surfur cycle enzymes and carbohydrate hydrolases. In: *Methods of soil enzymology*. Madison: Soil Science Society of America. Dick, R. P. (editor), pp.133-137. Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Drissner, D. and H. Blum, D. Tschenko and E. Kandeler. 2007. Nine years of enriched CO<sub>2</sub> changes the function and structural diversity of soil microorganisms in a grassland. *European Journal of Soil Science*, 58: 260-269.
- Farrell, M., T. K. Kuhn, L. M. Macdonald, T. M. Maddern, D. V. Murphy, P. A. Hall, B. P. Singh, K. and E. S. Krull. 2013. Microbial utilisation of biochar-derived carbon. *Science of the total Environment*, 465: 288-297.
- Gaskin, J. W., C. Steiner, K. Harris, K. C. Das and B. Bibens. 2008. Effect of low-temperature pyrolysis conditions on biochar for agricultural use. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 51: 2061-2069.
- Giardina, C. P., R. L. Sanford, I. C. Dockersmith and V. J. Jaramillo. 2000. The effects of slash burning on ecosystem nutrients during the land preparation phase of shifting cultivation. *Plant and Soil*, 220: 247-260.
- Glaser, B., K. Wiedner, S. Seelig, H. P. Schmidt and H. Gerber. 2015. Biochar organic fertilizers from natural resources as substitute for mineral fertilizers. *Agronomy for Sustainable Development*, 35: 667-678.
- Glaser, B., J. Lehmann and W. Zech. 2002. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal - A review. *Biology and Fertility of Soils*, 35: 219-230.
- Glaser, B., L. Haumaier, G. Guggenberger and W. Zech. 2001. The 'terra preta' phenomenon: A model for sustainable agriculture in the humid tropics. *Naturwissenschaften*, 88: 37-41.
- Grabera, E. R., L. Tschanskya, B. Lewb and E. Cohena. 2014. Reducing capacity of water extracts of biochars and their solubilization of soil Mn and Fe. *European Journal of Soil Science*, 65:162-172.
- Haefelea, S. M., Y. Konboonc, W. Wongboonc, S. Amarantea, A. A. Maarifatb, E. M. Pfeiffer, and C. Knoblauch. 2011. Effects and fate of biochar from rice residues in rice-based systems. *Field Crops Research*, 121: 430-440.
- Haefelea, S.M., Y. Konboonc, W. Wongboonc, S. Amarantea, A. A. Maarifatb, E. M.

- Pfeiffer and C. Knoblauch. 2011. Effects and fate of biochar from rice residues in rice-based systems. *Field Crops Research*, 121:430–440.
- Hagerty, S. B., K. J. van Groenigen, S. D. Allison, B. A. Hungate, E. Schwartz, G. W. Koch, R. K. Kolka and P. Dijkstra. 2014. Accelerated microbial turnover but constant growth efficiency with warming in soil. *Nature Climate Change*, 4: 903-906.
- Hao, C., J. Wang, M. Kuang, Fu. Ming and E. L. Ci. 2011. Enhancing phosphorus availability in phosphorus-fertilized zones by reducing phosphate adsorbed on ferrihydrite using rice straw derived biochar. *Journal of Soils and Sediments*, 11: 1135-1141.
- Heitkötter, J. and B. Marschner. 2015. Interactive effects of biochar ageing in soils related to feedstock, pyrolysis temperature, and historic charcoal production. *Geoderma*, 245-246: 56-64.
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla and E. M. H. Wellington. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16s rrna and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3233-3241.
- Higashi, T., M. Yunghui, M. Komatsuzaki, S. Miura, T. Hirata, H. Araki, N. Kaneko and H. Ohta. 2014. Tillage and cover crop species affect soil organic carbon in andosol, kanto, japan. *Soil and Tillage Research*, 138: 64-72.
- Hossain, M. K., V. Strezov, K. Y. Chan, A. Ziolkowski and P. F. Nelson. 2011. Influence of pyrolysis temperature on production and nutrient properties of wastewater sludge biochar. *Journal of Environmental Management*, 92:223-228.
- Houben, D., L. Evrard, and P. Sonnet. 2013. Beneficial effects of biochar application to contaminated soils on the bioavailability of Cd, Pb and Zn and the biomass production of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Biomass and Bioenergy*, 57:196-204.
- Jaggi, I. K., R. K. Gupta and M. B. Russell. 1976. Seasonal-changes in soil-water content and water-potential profiles in fallow land and in fields under irrigated and rainfed wheat. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 46: 493-502.
- Jala, S. and D. Goyal. 2006. Fly ash as a soil ameliorant for improving crop production—a review. *Bioresource Technology*, 97: 1136-1147.
- Joergensen, R. G. and P. C. Brookes. 1990. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 22: 1023-1027.

- Jones, D. L., J. Rousk, G. Edwards-Jones, T. H. DeLuca, and D.V. Murphy. 2011. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. *Soil Biology and Biochemistry*, 45: 113-124.
- Jordan, D., R. J. Kremer, A. Bergfield, K. Y. Kim and V. N. Cacio. 1995. Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 297-302.
- Kalembas, S. J. and Jenkinso D. S. 1973. Comparative study of titrimetric and gravimetric methods for determination of organic carbon in soil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24: 1085-1090.
- Kandeler, E. and H. Gerner. 1988 Short-term assay of soil urease using chlorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 8: 199-202.
- Karhu, K., Mattila, T., Bergström, I. and Regina, K. 2011. Biochar addition to agricultural soil increased CH<sub>4</sub> uptake and water holding capacity – Results from a short-term pilot field study. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140: 309-313.
- Kaur, A., A. Chaudhary, R. Choudhary and R. Kaushik. 2005. Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, 89: 1103-1112.
- Kim, K. H., T. S. Kim, S. M. Lee, D. Choi, H. Yeo, I. G. Choi and J. W. Choi. 2013. Comparison of physicochemical features of biooils and biochars produced from various woody biomasses by fast pyrolysis. *Renewable Energy*. 50: 188-195.
- Klose, S. and M. A. Tabatabai. 2002. Response of phosphomonoesterases in soils to chloroform fumigation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165: 429-434.
- Kolton, M., Y. M. Harel, Z. Pasternak, E. R. Graber. Y. Elad, and E. Cytryn. 2011. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 4924–4930.
- Lai, W. Y., C. M. Lai, G. R. Ke, R. S. Chung, C. T. Chen, C. H. Cheng, C. W. Pai, S. Y. Chen and C. C. Chen. 2013. The effects of woodchip biochar application on crop yield, carbon sequestration and greenhouse gas emissions from soils planted with rice or leaf beet. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44: 1039-1044.
- Laird, D. A., P. Fleming, D. D. Davis, R. Horton, B. Wang and D. L. Karlen. 2010. Impact of biochar amendments on the quality of a typical Midwestern agricultural soil. *Geoderma*, 158: 443–449.



- Lee, Y., J. Park, C. Ryu, K. S. Gang, W. Yang, Y. K. Park, J. Jung and S. Hyun. 2013. Comparison of biochar properties from biomass residues produced by slow pyrolysis at 500°C. *Bioresource Technology*, 148: 196-201.
- Lehmann, J, M. J. Rillig, J. Thies, C. A. Maseillo, W. C. Hockaday and D. Crowley. 2011. Biochar effect on soil biota—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1812-1836.
- Lehmann, J., J. Gaunt and M. Rondon. 2006. Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems – a review. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 11: 403-427.
- Lehmann, J., J. P. da Silva, C. Steiner, T. Nehls, W. Zech, and B. Glaser. 2003b. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol, manure and charcoal amendments. *Plant and Soil*, 249: 343-357.
- Lehmann, J. and S. Joseph. 2009. Biochar for environmental management : Science and technology. In: Earthscan, London, UK.
- Li X., Q. Shen, D. Zhang, X. Mei and W. Ran. 2013. Functional groups determine biochar properties (pH and EC) as studied by two-dimensional <sup>13</sup>C NMR correlation spectroscopy. *PLoS ONE*, 8 (6).
- Lin, Y. L., J. A. Fu and X. Song. 2010. Purification and characterization of an extracellular cholesterol oxidase from a bordetella species. *Process Biochemistry*, 45: 1563-1569.
- Liu, X. H., X. C. Zhang. 2012. Effect of biochar on pH of alkaline soils in the loess plateau: results from incubation experiments. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14: 745-750.
- Masto, R. E., S. Kumar, T. K. Rout, P. Sarkar, J. George, L.C. Ram. 2013. Biochar from water hyacinth (*Eichornia crassipes*) and its impact on soil biological activity. *Catena*, 111: 64-71.
- Mehlich, A. 1985. Melish 3 soil test extractant: extractant: Amodification of Melish 2 extractant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 15: 1409-1416.
- Moeskops, B., D. Sukristiyonubowo, S. Buchan, L. Sleutel, E. Herawaty, R. Husen, D. Saraswati, Setyorini and S. D. Neve. 2010. Soil microbial communities and activities under intensive organic and conventional vegetable farming in west java. Indonesia. *Applied Soil Ecology*, 45: 112-120.
- Muhammad, N., Z. Dai, K. Xiao, J. Meng, P. C. Brookes, X. Liu, H. Wang, J. Wu, and J. Xu. 2014. Changes in microbial community structure due to biochars generated

- from different feedstocks and their relationships with soil chemical properties. *Geoderma*, 226-227:270-278.
- Murphy, J. and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in nature waters. *Analytica Chimica Acta*, 27: 31-46.
- Muyzer, G., E. C. Dewaal and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- Ngosong, C., M. Jarosch, J. Raupp, E. Neumann and L. Ruess. 2010. The impact of farming practice on soil microorganisms and arbuscular mycorrhizal fungi: crop type versus long-term mineral and organic fertilization. *Applied Soil Ecology*, 46: 134-142.
- Nubel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig and H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178: 5636-5643.
- O'Neill, B., J. Grossman, M. T. Tsai, J. E. Gomes, J. Lehmann, J. Peterson, E. Neves and J. E. Thies. 2009. Bacterial community composition in brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. *Microbial Ecology*, 58: 23-35.
- Oguntunde, P. G., B. J. Abiodun, A. E. Ajayi and N. V. D. Giesen. 2008. Effects of charcoal production on soil physical properties in Ghana. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171: 591–596.
- Oleszczuk, P., I. Joško, B. Futa, S. Pasiieczna-Patkowska, E. Pałys and P. Kraska. 2014. Effect of pesticides on microorganisms, enzymatic activity and plant in biochar-amended soil. *Geoderma*, 214-215: 10-18.
- Olmo, M., J. A. Albuquerque, V. Barrón, M. C. del Campillo, A. Gallardo, M. Fuentes and R. Villar. 2014. Wheat growth and yield responses to biochar addition under Mediterranean climate conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 50: 1177-1187.
- Parvage, M. M., B. E. Ulén, S. Jan and K. H. Jeffery. 2013. Phosphorus availability in soils amended with wheat residue char. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 245-250.
- Paz-Ferreiro, J., G. Gascó, B. Gutiérrez and A. Méndez. 2012. Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil. *Biology and Fertility of Soils*, 48: 511-517.

- Perucci, P. and L. Scarponi. 1983. Effect of crop residue addition on arylsulphatase activity in soils. *Plant and Soil*, 73: 323-326.
- Pietikainen, J., O. Kiikkila and H. Fritze. 2000. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. *Oikos*, 89: 231-242.
- Plank, C. O. and D. C. Martens. 1974. Boron availability as influenced by application of fly ash to soil. *Soil Science Society of America, Proceedings*, 38: 974-977.
- Prabha, S. V., R. Renuka, P. Sreekanth N., B. Padmakumar and A. P. Thomas. 2013. A study of the fertility and carbon sequestration potential of rice soil with respect to the application of biochar and selected amendments. *Annals of Environmental Science*, 7: 17-30.
- Purakayastha, T. J., S. Kumari and H. Pathak. 2015. Characterisation, stability, and microbial effects of four biochars produced from crop residues. *Geoderma*, 239-240: 293-303.
- Purcena, L. L. A., M. C. B. Di Medeiros, W. M. Leandro and K. F. Fernandes. 2014. Effects of organic and conventional management of sugar cane crop on soil physicochemical characteristics and phosphomonoesterase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 1456-1463.
- Rajkovich, S., A. Enders, K. Hanley, C. Hyland, A.R. Zimmerman, J. Lehmann. Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. *Biology and Fertility of Soils*, 48: 271-284.
- Raubuch, M., K. Behr, K. Roose and R. G. Joergensen. 2010. Specific respiration rates, adenylates, and energy budgets of soil microorganisms after addition of transgenic bt-maize straw. *Pedobiologia*, 53: 191-196.
- Rhoades, J. D. 1996. Salinity : Electrical conductivity and total dissolved solids. In: *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. Sparks, D. L. (editor), pp. 419-420. Soil Science Society of America, Wisconsin, USA.
- Salazar, S., L. E. Sanchez, J. Alvarez, A. Valverde, P. Galindo, J. M. Igual, A. Peix and I. Santa-Regina. 2011. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. *Ecological Engineering*, 37: 1123-1131.
- Schlesinger, W. H. and J. A. Andrews. 2000. Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry*, 48: 7-20.
- Schomberg, H. H., J. W. Gaskin, K. Harris, K. C. Das, J. M. Novak, W. J. Busscher, D. W. Watts, R. H. Woodroof, I. M. Lima, M. Ahmedna, D. Rehad and B. S. Xing. 2012. Influence of biochar on nitrogen fraction in a coastal plain soil (special issue:

- environmental benefits of biochar.). *Journal of Environmental Quality*. 41: 1087-1095.
- Senesi, N. and C. Plaza, 2007. Role of humification processes in recycling organic wastes of various nature and sources as soil amendments. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 35: 26–41.
- Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman and R. M. Myers. 1989. Attachment of a 40-base-pair GC-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain-reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 232-236.
- Shi, Y., R. Lalande, C. Hamel, N. Ziadi, B. Gagnon and Z. Hu. 2013. Seasonal variation of microbial biomass, activity, and community structure in soil under different tillage and phosphorus management practices. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 803-818.
- Sohi, S. P., E. Krull, E. Lopez-Capel and R. Bol. 2010. A review of biochar and its use and function in soil. *Advances in Agronomy*, 105: 47-82.
- Sopeña, F. and G. D. Bending. 2013. Impacts of biochar on bioavailability of the fungicide azoxystrobin: a comparison of the effect on biodegradation rate and toxicity to the fungal community. *Chemosphere*, 91: 1525-1533.
- Spokas, K. A., J. M. Novak, and R. T. Ventere. 2012. Biochar's role as an alternative N-fertilizer: ammonia capture. *Plant and Soil*, 350: 35-42.
- Stark, C., L. M. Condon, A. Stewart, H. J. Di and M. O'Callaghan. 2007. Effects of past and current crop management on soil microbial biomass and activity. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 531-540.
- Steinbeiss, S., G. Gleixner and M. Antonietti. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1301–1310.
- Steiner, C., W.G. Teixeira, J. Lehmann, T. Nehls, J. L. V. de Macêdo and E. H. Winfried . 2007. 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*, 291: 275-290.
- Sun, Z., E.W. Bruun, E. Arthur, L. W. de Jonge, P. Moldrup, H. Hauggaard-Nielsen and L. Elsgaard. 2014. Effect of biochar on aerobic processes, enzyme activity and crop yields in two sandy loam soils. *Biology and Fertility of Soils*, 50: 1087-1097.
- Tabatabai, M. A. 1982. Soil enzymes. In: *Methods of Soil Part 2 Chemical and*

- Microbiological Properties. A. L. (editor), pp. 903-947. Academic Press, New York, USA.
- Tabatabai, M. A. 1994. Soil enzyme . In: Methods of Soil Analysis. Weaver, R. W. (editor), pp. 775-833. Madison, Wisconsin, USA.
- Tabatabai, M. A. and J. M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1: 301-307.
- Tabatabai, M. A. and J. M. Bremner. 1970. Factors affecting soil arylsulfatase activity. *Soil Science Society of America Proceedings*, 34: 427-429.
- Thalman, A. 1968. Zur Methodil der Bestimmung der DehydrogenaseaktivitAt im Boden mettels triphenytetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch*, 21: 249-258.
- Thomas, T. D. and R. D. Batt. 1969. Degradation of cell constituents by starved *Streptococcus lactis* in relation to survival. *Journal of General Microbiology*, 58: 347-362.
- Titiladunayo, I. F., A. G. McDonald and O. P. Fapetu. 2012. Effect of temperature on biochar product yield from selected lignocellulosic biomass in a pyrolysis process. *Waste Biomass Valor*, 3: 311-318.
- Tsai, C. C., Y. F. Chang, G. S. Hwang and Z. Y. Hseu. 2013. Impact of wood biochar addition on nutrient leaching and fertility in a rural ultisols of Taiwan. *Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science*, 51: 80-93.
- Vance, E. D., P. C. Brookes and D. S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Biology and Biochemistry*. 19: 703-707.
- Walter, R. and B. K. R. Rao. 2015. Biochars influence sweet-potato yield and nutrient uptake in tropical Papua New Guinea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178: 393-400.
- Wang, Y., Y. Hu, X. Zhao, S. Wang and G. Xing. 2013. Comparisons of biochar properties from wood material and crop. *Energy and Fuels*, 27: 5890-5899.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271.
- Wu, F., Z. Jia, S. Wang, S. X. Chang and A. Startsev. 2013. Contrasting effects of wheat straw and its biochar on greenhouse gas emissions and enzyme activities in a Chernozemic soil. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 555-565.
- Wu, Y., G. Xu and Y. Lu. 2014. Effects of biochar amendment on soil physical and chemical properties: current status and knowledge. *Advances in Earth Science*, 29: 68-79.

- Wu, F., Z. Jia, S. Wang, S. X. Chang and A. Startsev. 2013. Contrasting effects of wheat straw and its biochar on greenhouse gas emissions and enzyme activities in a Chernozemic soil. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 555-565.
- Xu, Z. W., G. R. Yu, X. Y. Zhang, J. P. Ge, N. P. He, Q. F. Wang and D. Wang. 2015. The variations in soil microbial communities, enzyme activities and their relationships with soil organic matter decomposition along the northern slope of Changbai mountain. *Applied Soil Ecology*, 86: 19-29.
- Yanai, Y., K. Toyota and M. Okazaki. 2007. Effect of charcoal addition on N<sub>2</sub>O emissions from soil resulting from rewetting air-dried soil in short-term laboratory experiments. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53: 181-188.
- Yeates, G. W., D. A. Wardle and R. N. Watson. 1999. Responses of soil nematode populations, community structure, diversity and temporal variability to agricultural intensification over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1721-1733.
- Yuan, B. C. and D. X. Yue. 2012. Soil microbial and enzymatic activities across a chronosequence of Chinese pine plantation development on the loess plateau of China. *Pedosphere*, 22: 1-12.
- Yuan, J. H., R. K. Xu and H. Zhang. 2011. The forms of alkalis in the biochar produced from crop residues at different temperatures. *Bioresource Technology*, 102: 3488-3497.
- Zelles, L., Q. Y. Bai, R. X. Ma, R. Rackwitz, K. Winter and F. Beese. 1994. Microbial biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and poly hydroxybutyrate in agriculturally managed soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 439-446.
- Zheng, R. L., C. Cai, J. H. Liang, Q. Huang, Z. Chen, Y. Z. Huang, H. P. H. Arp and G. X. Sun. 2012. The effects of biochars from rice residue on the formation of iron plaque and the accumulation of Cd, Zn, Pb, As in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 89: 856-862.
- Zimmerman, A. R., B. Gao and M. Y. Ahn. 2011. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1169-1179.
- Zwieten, L. V., S. Kimber, S. Morris, K. Y. Chan, A. Downie, J. Rust, S. Joseph and A. Cowie. 2010. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. *Plant and Soil*, 327: 235-246.

## 附錄



附錄一、不同生物炭處理下土壤 Mehlich III 可萃取陽離子含量 (孵育第 90 天)

Appendix 1. Melich III extractable nutrients of the soils under different biochar addition (90 days)

Treatment	Mehlich III extractable ( mg kg <sup>-1</sup> )									
	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu		
RH <sup>1</sup>	173 ± 6 <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	57 ± 3 a	284 ± 59 a	395 ± 41 c	230 ± 19 ab	355 ± 12 c	21 ± 1 b	1.7 ± 0.0 c		
JC	132 ± 8 cd	53 ± 1 b	274 ± 29 a	333 ± 20 c	211 ± 0 b	320 ± 0 c	19 ± 3 b	1.7 ± 0.0 c		
PKS	150 ± 5 b	35 ± 2 c	846 ± 29 a	537 ± 35 ab	237 ± 11 a	355 ± 32 c	24 ± 8 b	0.0 ± 0.0 d		
SC	130 ± 4 cd	19 ± 2 e	741 ± 907 a	422 ± 89 bc	224 ± 11 ab	431 ± 32 b	23 ± 1 b	3.4 ± 0.0 b		
LC	125 ± 3 d	20 ± 1 e	484 ± 259 a	404 ± 13 c	224 ± 11 ab	445 ± 21 b	49 ± 1 a	5.1 ± 0.0 a		
BK	135 ± 3 c	23 ± 1 d	493 ± 207 a	573 ± 119 a	243 ± 11 a	535 ± 32 a	25 ± 2 b	5.1 ± 0.0 a		
RHM	1528 ± 48 ab	112 ± 1 a	1274 ± 57 c	3259 ± 277 b	501 ± 19 ab	445 ± 36 ab	42 ± 7 d	5.1 ± 0.0 a		
JCM	1465 ± 75 bc	112 ± 2 a	1189 ± 103 c	3348 ± 335 b	456 ± 11 c	410 ± 24 b	54 ± 4 c	5.7 ± 0.0 a		
PKSM	1595 ± 37 a	106 ± 2 a	2331 ± 151 a	3569 ± 133 b	507 ± 11 ab	480 ± 48 a	60 ± 4 bc	5.1 ± 0.0 a		
SCM	1451 ± 90 bc	95 ± 6 b	1465 ± 286 bc	3658 ± 277 ab	514 ± 30 a	306 ± 12 c	58 ± 4 bc	3.4 ± 0.0 b		
LCM	1391 ± 55 c	91 ± 7 b	1408 ± 286 c	3702 ± 352 ab	475 ± 11 bc	285 ± 32 c	100 ± 0 a	5.1 ± 0.0 a		
BKM	1566 ± 86 ab	90 ± 2 b	1960 ± 597 ab	4057 ± 1512 a	494 ± 30 ab	438 ± 12 ab	63 ± 6 b	5.1 ± 0.0 a		

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applied organic matter.

<sup>2</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>3</sup> Average followed by the same capital letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.



附錄二、不同生物炭處理下土壤 Mehlich III 可萃取陽離子含量 (孵育第 180 天)

Appendix 2. Melich III extractable nutrients of the soils under different biochar addition (180 days)

Treatment	Mehlich III extractable ( mg kg <sup>-1</sup> )									
	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu		
RH <sup>1</sup>	165 ± 8 <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	66 ± 3 a	281 ± 16 b	404 ± 13 ab	260 ± 11 b	341 ± 42 b	23 ± 0 cd	5.1 ± 0.0 ab		
JC	129 ± 5 c	52 ± 3 b	195 ± 66 bc	302 ± 20 b	228 ± 19 c	341 ± 0 b	19 ± 2 e	5.1 ± 0.0 ab		
PKS	143 ± 3 b	36 ± 1 c	805 ± 115 a	511 ± 114 a	299 ± 11 a	396 ± 12 a	21 ± 1 d	5.1 ± 0.0 ab		
SC	127 ± 3 c	21 ± 1 d	157 ± 0 c	369 ± 135 b	280 ± 11 ab	403 ± 21 a	25 ± 0 bc	3.4 ± 0.0 b		
LC	115 ± 4 d	20 ± 2 d	167 ± 44 c	298 ± 13 b	215 ± 11 c	403 ± 21 a	51 ± 1 a	5.1 ± 0.0 ab		
BK	122 ± 10 cd	22 ± 2 d	167 ± 16 c	302 ± 28 b	267 ± 19 b	424 ± 21 a	26 ± 1 b	6.8 ± 0.0 a		
RHM	1600 ± 49 a	117 ± 1 a	1348 ± 175 b	2461 ± 756 a	402 ± 77 b	403 ± 42 b	47 ± 4 b	5.1 ± 0.0 a		
JCM	1444 ± 113 b	113 ± 2 a	1233 ± 92 b	2594 ± 656 a	447 ± 45 b	341 ± 36 bc	41 ± 4 bc	5.1 ± 0.0 a		
PKSM	1590 ± 54 a	102 ± 7 b	2081 ± 364 a	2461 ± 203 a	447 ± 49 b	389 ± 24 b	35 ± 4 c	5.1 ± 0.0 a		
SCM	1430 ± 24 b	87 ± 2 c	1129 ± 131 b	2461 ± 628 a	563 ± 49 a	250 ± 43 d	37 ± 0 c	3.4 ± 0.0 b		
LCM	1360 ± 88 b	87 ± 5 c	1195 ± 115 b	1885 ± 77 a	415 ± 30 b	313 ± 60 cd	79 ± 10 a	5.1 ± 0.0 a		
BKM	1616 ± 71 a	96 ± 3 b	1471 ± 187 b	2284 ± 77 a	486 ± 30 ab	486 ± 21 a	41 ± 7 bc	5.1 ± 0.0 a		

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applied organic matter.

<sup>2</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>3</sup> Average followed by the same capital letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.



附錄三、不同生物炭處理下之土壤酵素活性 (孵育第 0 天)

Appendix 3. Soil enzyme of the soils under different biochar addition (0 days)

Treatment	Dehydrogenase	$\beta$ -glucosidase	Urease	Acid	Alkaline	Arylsulphatase
	mg TPF kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	phosphomonoesterase	phosphomonoesterase	mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
RH <sup>1</sup>	3.8 ± 1.8 <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	133.1 ± 11.5 a	3.7 ± 3.2 a	98.8 ± 3.5 c	37.5 ± 29.4 ab	1.4 ± 1.5 a
JC	3.3 ± 3.9 a	74.9 ± 13.3 bc	0.3 ± 0.7 b	163.8 ± 10.1 ab	68.6 ± 10.6 ab	1.1 ± 1.9 a
PKS	0.6 ± 0.3 a	59.2 ± 2.2 c	1.0 ± 1.6 ab	168.4 ± 11.3 ab	36.8 ± 5.3 ab	2.1 ± 1.8 a
SC	1.1 ± 0.3 a	65.5 ± 3.5 bc	1.9 ± 0.7 ab	171.2 ± 42.7 ab	54.3 ± 7.0 a	0.5 ± 0.6 a
LC	2.3 ± 2.3 a	68.9 ± 2.7 bc	0.3 ± 0.9 b	179.8 ± 11.6 a	10.1 ± 10.1 b	0.0 ± 0.0 a
BK	1.1 ± 1.0 a	83.6 ± 18.7 b	1.1 ± 2.0 ab	140.9 ± 11.9 b	48.1 ± 28.3 a	2.6 ± 2.7 a
RHM	3.6 ± 2.4 abc	62.6 ± 4.7 ab	3.1 ± 2.1 a	289.2 ± 49.0 b	52.7 ± 12.1 a	1.3 ± 0.8 a
JCM	7.6 ± 1.1 a	56.6 ± 18.1 ab	2.5 ± 0.9 a	257.8 ± 32.6 b	56.5 ± 44.2 a	3.1 ± 5.4 a
PKSM	1.5 ± 1.7 c	42.9 ± 13.4 b	2.4 ± 1.2 a	132.6 ± 43.0 c	39.1 ± 19.1 a	2.5 ± 1.9 a
SCM	2.9 ± 3.3 bc	47.3 ± 6.6 b	2.5 ± 0.3 a	293.6 ± 4.3 b	52.0 ± 10.4 a	1.8 ± 1.7 a
LCM	3.1 ± 1.3 ab	57.8 ± 20.6 ab	2.8 ± 1.4 a	276.9 ± 32.6 b	73.1 ± 28.6 a	2.3 ± 1.9 a
BKM	6.3 ± 2.8 ab	74.8 ± 4.1 a	2.4 ± 0.7 a	390.7 ± 25.9 a	63.6 ± 7.6 a	0.5 ± 0.9 a

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter.

<sup>2</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>3</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.

附錄四、不同生物炭處理下之土壤酵素活性 (孵育第 90 天)

Appendix 4. Soil enzyme of the soils under different biochar addition (90 days)

Treatment	Dehydrogenase		$\beta$ -glucosidase		Urease		Acid phosphomonoesterase		Alkaline phosphomonoesterase		Arylsulphatase	
	mg TPF kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>		mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
RH <sup>1</sup>	1.9 ± 1.7 <sup>2</sup>	ab <sup>3</sup>	11.2 ± 4.8	b	0.9 ± 1.0	b	159.9 ± 3.7	bc	94.8 ± 19.2	abc	4.2 ± 0.9	c
JC	0.1 ± 0.2	ab	9.7 ± 4.4	b	1.7 ± 0.6	b	154.4 ± 9.9	c	84.3 ± 15.1	bc	6.9 ± 0.8	b
PKS	0.0 ± 0.0	b	5.3 ± 3.0	b	1.8 ± 0.3	b	75.3 ± 11.1	d	70.7 ± 5.8	c	10.0 ± 1.6	a
SC	0.1 ± 0.2	ab	18.3 ± 2.7	a	1.1 ± 0.3	b	149.3 ± 9.1	c	113.8 ± 9.1	a	1.9 ± 0.8	de
LC	2.2 ± 0.7	a	8.4 ± 3.5	b	2.0 ± 0.6	b	185.3 ± 4.4	a	107.6 ± 14.4	ab	2.7 ± 1.1	cd
BK	2.1 ± 2.3	a	18.5 ± 2.3	a	3.8 ± 1.7	a	175.7 ± 14.7	ab	98.3 ± 14.1	ab	0.8 ± 0.5	e
RHM	3.4 ± 2.0	a	25.7 ± 4.3	bc	1.4 ± 0.2	b	584.7 ± 37.5	b	302.6 ± 59.3	b	4.7 ± 0.1	a
JCM	2.9 ± 1.2	ab	44.3 ± 17.3	a	2.5 ± 2.2	ab	627.0 ± 33.7	ab	340.6 ± 36.3	ab	4.6 ± 1.9	a
PKSM	0.0 ± 0.0	c	18.3 ± 5.8	c	3.8 ± 0.4	a	422.0 ± 37.8	c	322.3 ± 26.4	ab	5.5 ± 0.7	a
SCM	0.9 ± 1.3	bc	20.9 ± 5.0	c	3.9 ± 1.7	a	461.4 ± 31.2	c	240.3 ± 8.0	c	0.0 ± 0.7	c
LCM	3.3 ± 1.0	a	18.5 ± 2.9	c	2.9 ± 1.2	ab	472.2 ± 66.8	c	363.0 ± 23.8	a	0.7 ± 0.7	c
BKM	2.5 ± 1.0	ab	38.1 ± 2.7	ab	1.8 ± 0.5	ab	692.5 ± 27.5	a	345.2 ± 5.7	ab	2.4 ± 0.4	b

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter.

<sup>2</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>3</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.

附錄五、不同生物炭處理下之土壤酵素活性 (孵育第 180 天)

Appendix 5. Soil enzyme of the soils under different biochar addition (180 days)

Treatment	Dehydrogenase		$\beta$ -glucosidase		Urease		Acid phosphomonoesterase		Alkaline phosphomonoesterase		Arylsulphatase	
	mg TPF kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>		mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>		mg p-nitrophenol kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
RH <sup>1</sup>	5.8 ± 1.1 <sup>2</sup>	ab <sup>3</sup>	2.9 ± 1.5	bc	2.9 ± 0.8	a	43.8 ± 15.1	a	53.6 ± 3.4	b	10.9 ± 0.9	bc
JC	11.9 ± 13.4	a	5.5 ± 1.2	ab	1.7 ± 1.0	a	31.9 ± 1.7	ab	52.0 ± 2.1	b	10.4 ± 1.6	c
PKS	0.0 ± 0.0	b	3.5 ± 1.2	abc	1.1 ± 1.0	a	27.4 ± 6.4	b	34.0 ± 3.0	c	5.0 ± 1.2	d
SC	0.0 ± 0.0	b	7.3 ± 0.9	ab	1.9 ± 1.4	a	29.7 ± 6.4	b	69.3 ± 2.7	a	12.9 ± 0.9	b
LC	2.4 ± 4.1	ab	0.0 ± 4.2	c	1.9 ± 0.9	a	35.7 ± 1.1	ab	64.5 ± 11.7	a	11.7 ± 1.3	bc
BK	2.0 ± 1.8	ab	8.1 ± 5.0	a	1.8 ± 1.8	a	39.0 ± 1.1	ab	72.0 ± 3.6	a	16.0 ± 0.3	a
RHM	10.3 ± 3.5	a	21.9 ± 4.8	ab	1.9 ± 1.6	a	105.4 ± 7.2	ab	114.1 ± 16.7	ab	10.3 ± 2.0	b
JCM	7.4 ± 1.0	ab	28.1 ± 2.5	a	1.3 ± 0.3	ab	118.0 ± 5.4	a	142.1 ± 31.3	a	11.7 ± 0.6	b
PKSM	2.3 ± 3.0	b	7.2 ± 5.1	c	1.9 ± 1.0	a	94.2 ± 21.0	bc	70.8 ± 15.5	b	5.7 ± 1.3	c
SCM	8.2 ± 8.3	ab	17.5 ± 5.0	bc	0.0 ± 0.0	b	91.7 ± 9.5	bc	105.5 ± 29.1	ab	14.7 ± 1.2	a
LCM	6.2 ± 2.0	ab	15.9 ± 8.6	bc	0.4 ± 0.5	ab	82.0 ± 7.8	c	107.8 ± 33.8	ab	11.9 ± 0.5	b
BKM	4.6 ± 4.7	ab	24.7 ± 5.3	ab	1.3 ± 1.4	ab	113.9 ± 16.9	ab	100.5 ± 21.1	ab	15.7 ± 0.4	a

<sup>1</sup> Treatment : RH, Rice husk biochar ; JC, Japanese cedar biochar ; PKS, Palm fernel shell biochar ; SC, Small particle size of coal ash ; LC, large particle size of coal ash ; BK, without applying biochar and organic matter ; M, applying organic matter.

<sup>2</sup> Within columns, values are means ± standard deviation (n = 3).

<sup>3</sup> Average followed by the same letter means there is no significant difference (p < 0.05) between the treatments according to LSD.