

FACE 对水稻土产甲烷菌和甲烷氧化菌种群及其活性的影响

王旻屹^{1,2}, 韩琳¹, 史奕^{1*}, 梅宝玲³, 朱建国⁴

(1 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3 中国科学院大气物理研究所, 北京 100029;

4 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

摘要: 利用江都市小记镇的稻-麦轮作 FACE 平台, 采用最大可能 (MPN) 法, 在 2005 年水稻生长季研究了不同施肥 (常规 N 量和低 N 量)、不同秸秆还田 (秸秆全还田和秸秆不还田) 处理土壤中的产甲烷菌和甲烷氧化菌数量在大气 CO₂ 浓度升高 (FACE) 条件下随时间的变化情况, 并且借助气相色谱测定了土壤的产甲烷潜力和甲烷氧化潜力。结果表明: 在秸秆全还田情况下, FACE 对于产甲烷菌在分蘖期具有促进作用, 而在抽穗期与收获期具有抑制作用, 这种作用在低 N 条件下达到显著性 ($P < 0.05$) 水平。而秸秆不还田情况下, FACE 对产甲烷菌无明显促进作用; 在低量 N 的施用情况下, FACE 对于土壤甲烷氧化菌的活性具有刺激作用, 在水稻抽穗期土壤甲烷氧化菌数量明显地高于对照, 达到显著性水平 ($P < 0.05$); 而常规施 N 量秸秆全还田的情况下, 在水稻的分蘖期、拔节期和收获期 FACE 土壤中的甲烷氧化菌数量却受到一定程度的抑制。土壤的产甲烷潜力测定结果表明, FACE 能促进土壤的 CH₄ 释放, 尤其是在常规 N 量施用条件下。当底物 (加入外源 CH₄) 充足时, FACE 条件下能使土壤具有较高的氧化 CH₄ 的能力, 其 CH₄ 氧化潜力明显大于对照土壤, 并且这种作用在常规 N 肥施用条件下尤为明显, 达极显著性水平 ($P < 0.01$)。

关键词: FACE; 产甲烷菌; 甲烷氧化菌; 产甲烷潜力; 甲烷氧化潜力**中图分类号:** S154.3; X16

温室气体在大气中浓度的增加越来越受到人们的关注。在所有温室气体中, 甲烷 (CH₄) 对温室气体效应的功效仅次于 CO₂, 但其增温潜势却为 CO₂ 的 23 倍^[1]。近 200 年来 CH₄ 在大气中的含量以每年 1% 的速度急剧增加^[2], 主要是由于 CH₄ 排放源的增加和 CH₄ 汇的减少^[3]。

稻田是大气 CH₄ 最为重要的生物源, 全球每年由稻田等生物源排放的 CH₄ 占 CH₄ 排放总量的 20% 以上^[4]。研究发现水稻土产生的 CH₄, 平均有 80% 在排放到大气之前已被土壤的甲烷氧化细菌所氧化^[5]。大气 CO₂ 浓度升高对植物的生理代谢过程产生影响, 从而影响土壤中与 CH₄ 排放相关的微生物群落活性, 最终导致土壤向大气中排放的 CH₄ 的总量发生变化^[6]。本实验室的研究表明, FACE 可以间接促进土壤中产甲烷菌的活性^[7]。但是 CH₄ 排放是水稻土中 CH₄ 产生和氧化的综合结果。为了更深

入地了解 FACE 对水稻土 CH₄ 产生的影响, 利用位于江都市的 FACE 系统平台 (首次在低纬度地区进行的稻-麦轮作 FACE 平台), 对水稻几个重要生长时期的产甲烷菌数量和甲烷氧化菌数量及水稻土的产 CH₄ 和 CH₄ 氧化能力进行分析测定。

1 材料与方法

1.1 样地概况及试验设计

FACE 平台位于中国江苏省江都市小记镇良种场 (32°35'N, 119°02'E) (2004—), 研究对象是稻-麦轮作农田生态系统。试验地土壤类型为下位砂姜土; 气候条件为年降水量 918~978 mm, 年平均气温约为 15°C, 年日照时间 >2000 h, 年无霜期天数 220 天。试验地土壤基本理化性质见表 1。

试验处理采用裂区设计, CO₂ 浓度为主处理, N 肥处理为副处理, 每个 N 肥水平下又分设 2 个

①基金项目: 国家自然科学基金 (40271111, 40231003, 40110817) 和中国科学院创新方向项目 (KZCX3-SW-440, KZCX2-SW-133) 资助。

* 通讯作者 (shiy@iae.ac.cn)

作者简介: 王旻屹 (1981—), 女, 浙江嘉兴人, 硕士研究生, 主要从事大气 CO₂ 浓度升高对土壤微生物及其过程的影响研究。E-mail: shuyi1981@126.com

表1 试验地土壤基本理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of studied soil

有机质 (g/kg)	全 N (g/kg)	全 P (g/kg)	全 K (g/kg)	pH	黏粒 (<0.002 mm) 含量 (g/kg)	体积质量 (容重) (g/cm ³)
18.39	1.45	0.63	14.02	7.9	136	1.16

秸秆还田方式。大气 CO₂ 浓度设 2 个水平, 分别为对照 (自由空气 CO₂ 浓度, CK) 和 550 μmol/mol (FACE)。施 N 量分为常规 N 量 (UN, 250 kg/hm², 以纯 N 计, 下同) 和低 N 量 (LN, 150 kg/hm²)。不同 N 肥处理水平下又有 2 种不同的秸秆还田方式: 秸秆全还田 (HR, C 2000 kg/hm²) 秸秆不还田 (NR, C 0 kg/hm²)。其中 UN 处理 6 月 12 日施 N 肥 90 kg/hm², 6 月 18 日施 N 肥 60 kg/hm², 7 月 30 日施 N 肥 100 kg/hm²; LN 处理为 6 月 18 日不施 N 肥, 7 月 30 日施 N 肥 60 kg/hm²。

本试验供试水稻品种为武香粳 14。2005 年 5 月播种, 利用大田早育秧, 6 月 12 日人工移栽, 行距为 25 cm, 株距为 16.7 cm, 24 穴/m², 3 株苗/穴。自移栽之日起, 水分管理: 6 月 13 日—7 月 10 日保持浅水层 (约 5 cm), 7 月 11 日—8 月 4 日进行多次轻搁田, 8 月 5 日至收割前 7 日进行间隙灌溉, 然后停止灌溉至收割。适时进行病虫害防治, 保证作物生长发育正常。2005 年 10 月收割。

水稻生长过程中, 按水稻生长阶段, 用直径 2 cm 土钻采集 0~10 cm 土层土壤样品, 每个小区取 5 个点土样组成 1 个混合样品, 进行相关试验分析。各次采样时间分别为: 2005 年 7 月 9 日, 代表分蘖期; 8 月 9 日, 代表拔节期; 9 月 8 日, 代表抽穗期; 10 月 22 日, 代表收获期。

1.2 测定项目及方法

1.2.1 产甲烷菌数量的测定 采用改良的 Hungate 厌氧技术将土样制成 10 倍系列稀释液。按钱泽澍等人^[8]的方法, 但用土壤浸出液而不用沼气发酵液^[9], 基质用混合培养基, 以 CH₄ 形成作为生长指标, MPN 法计算产甲烷菌数量。

1.2.2 甲烷氧化菌的数量测定 采用滚管法^[9]测定甲烷氧化菌数量, 将好氧性配制的培养基^[10]分装于可密封的厌氧试管中, 每管 4.5 ml, 塞上异丁基胶塞, 灭菌后加入一定稀释度的土壤稀释液 0.5 ml, 滚管, 然后每管注入 3 ml 纯 CH₄, 置 30℃ 培养 7 天后计数。

1.2.3 土壤产 CH₄ 潜力的测定 称取 15 g 鲜土, 置于 300 ml 血清瓶中, 调至水土比为 2:1, 通入惰性气体进行稀释, 使之处于严格厌氧条件下,

置于 30℃ 培养, 于不同时间测定瓶内 CH₄ 浓度。

1.2.4 土壤 CH₄ 氧化潜力的测定 300 ml 的血清瓶中, 加入 12 g 供试土壤, 然后血清瓶用异丁基橡胶塞密封, 再注入 1.5 ml 纯 CH₄, 28℃ 培养, 在培养的不同时间测血清瓶中 CH₄ 的量。

1.2.5 数据统计分析 采用 SPSS 12.0, 方差分析—F 检验方法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 FACE 对土壤产甲烷菌数量的影响

从图 1 可以看出, FACE 和 CK 的产甲烷菌数均在拔节期达到最大值, 抽穗期菌数略有下降, 收获期又有所回升。这与闵航等^[9]对水稻田 CH₄ 释放的研究结果相一致。这是由于水稻插秧后至分蘖前、中期, 水田始终保持稳定的淹水状态, 土壤中氧化还原电位逐渐下降并趋于一种比较稳定的低氧化还原电位势, 这给产甲烷菌的生长创造了一个有利的环境条件^[11]; 而抽穗期采样前几天正处于搁田状态, 由于干湿交替处理产甲烷菌的活性有所降低; 到水稻的生长后期, 由于气温的降低, 改变了产甲烷菌种群的组成, 从而使得收获期产甲烷菌的数量又有所回升。

在 HR 情况下, FACE 处理对分蘖期土壤中产甲烷菌数量有促进作用, LN 条件下差异显著 (P<0.05)。FACE 处理对于抽穗期和收获期的产甲烷菌数量具有一定的抑制作用, LN 的施用条件也促使这种抑制效果显著 (P<0.01)。从本研究结果来看, 土壤的活性有机 C 含量及 C/N 比是决定土壤产 CH₄ 能力的核心因素^[13]。在分蘖期, 由于稻田中前茬的小麦秸秆迅速分解, 为土壤中的产甲烷菌提供了充足的 C 源^[14], 产甲烷菌有充足的底物, 活性较高; 在生长后期, 由于水稻生长受到大气 CO₂ 浓度升高的促进, 使得土壤中的可溶性 C、N、P 被水稻吸收而减少^[15], 水稻的根系分泌物也较生长前期少, 从而抑制了产甲烷菌的生长。由于同样原因, FACE 施秸秆条件下, UN 处理土壤产甲烷菌数量也没有明显高于 CK。

在 NR 情况下, FACE 和 CK 的产甲烷菌数在水稻不同生长时期的变化趋势与 HR 情况下相一

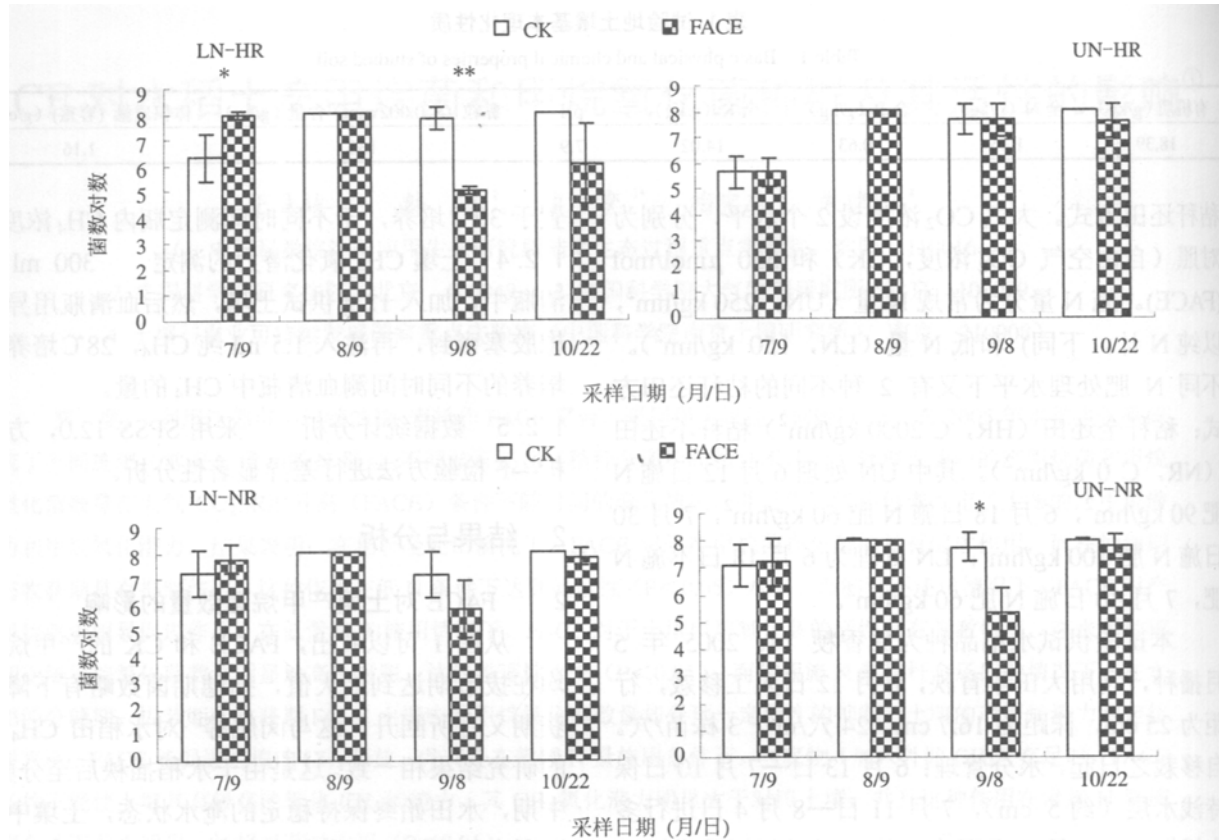


图 1 FACE 对土壤产甲烷菌数量的影响

Fig. 1 Effects of FACE on methanogen population of different rice-straw-returning-back-to-field treatments

*表示 FACE 与 CK 在 $P < 0.05$ 水平显著差异; **表示 FACE 与 CK 在 $P < 0.01$ 水平显著差异; 下同。

致。FACE 对分蘖期土壤中产甲烷菌数量有一定的促进作用; 而除 UN 处理抽穗期, FACE 土壤中的产甲烷菌数明显减少外, 其他时期差异均不显著。

2.2 FACE 对土壤甲烷氧化菌数量的影响

图 2 显示, FACE 与 CK 的土壤随着水稻生长时间推移其甲烷氧化菌数量呈先升高后降低的趋势, 在拔节期和抽穗期达到最大值, 其均值分布在 $10^5 \sim 10^7$ cfu/g 干土之间。这主要是因为当地 8 月的土温是水稻生长期中最高, 这时产甲烷菌迅速繁殖^[7], 为甲烷氧化菌提供了充足的 CH_4 底物, 使其菌群在 8 月份达到高峰。并且通过 8、9 月份的间歇灌溉为甲烷氧化菌提供了合适的生长条件, 使其活性达到最强。

在 HR 情况下, LN 处理中水稻的各个生长时期 FACE 土壤中的甲烷氧化菌数量均高于 CK 土壤, 并在抽穗期差异达显著水平 ($P < 0.05$)。UN 处理土壤出现相反的趋势, 在水稻的分蘖期、拔节期和收获期 FACE 土壤中的甲烷氧化菌数量均受到一定程度的抑制, 尤其是在分蘖期与拔节期, 分别比 CK 土

壤中的甲烷氧化菌数量减少了 9.14% 和 9.87%, 且达到了极显著水平 ($P < 0.01$)。这可能是由于稻田的 CH_4 氧化和氨氧化具有强烈的交互作用^[16], N 肥施用后, NH_4^+ 抑制了甲烷氧化菌的生长^[17]。虽然甲烷氧化菌是在好氧条件下利用 CH_4 作为唯一的 C 源和能源, 但有研究显示不同的作物残留对 CH_4 氧化有不同的影响^[18]。

在 NR 情况下, 不同的 N 肥处理中, 除了在 LN 处理的水稻抽穗期, FACE 土壤的甲烷氧化菌数量明显高于 CK 土壤外, 其余各生长期 FACE 处理对甲烷氧化菌没有明显的促进作用, 不同 N 肥处理之间甲烷氧化菌的数量差异也不明显。

2.3 FACE 对土壤产 CH_4 潜力的影响

对两种施 N 处理下的土壤在水稻抽穗期的产 CH_4 潜力进行测定。结果显示 (图 3), 在两种 N 肥施用条件下, FACE 均能促进土壤产甲烷菌的生物活性, 尤其是在 UN 条件下, FACE 土壤明显比 CK 土壤具有更高的 CH_4 产生能力 ($P < 0.05$)。这与水稻抽穗期土壤中的产甲烷菌数恰恰相反, 说明水稻

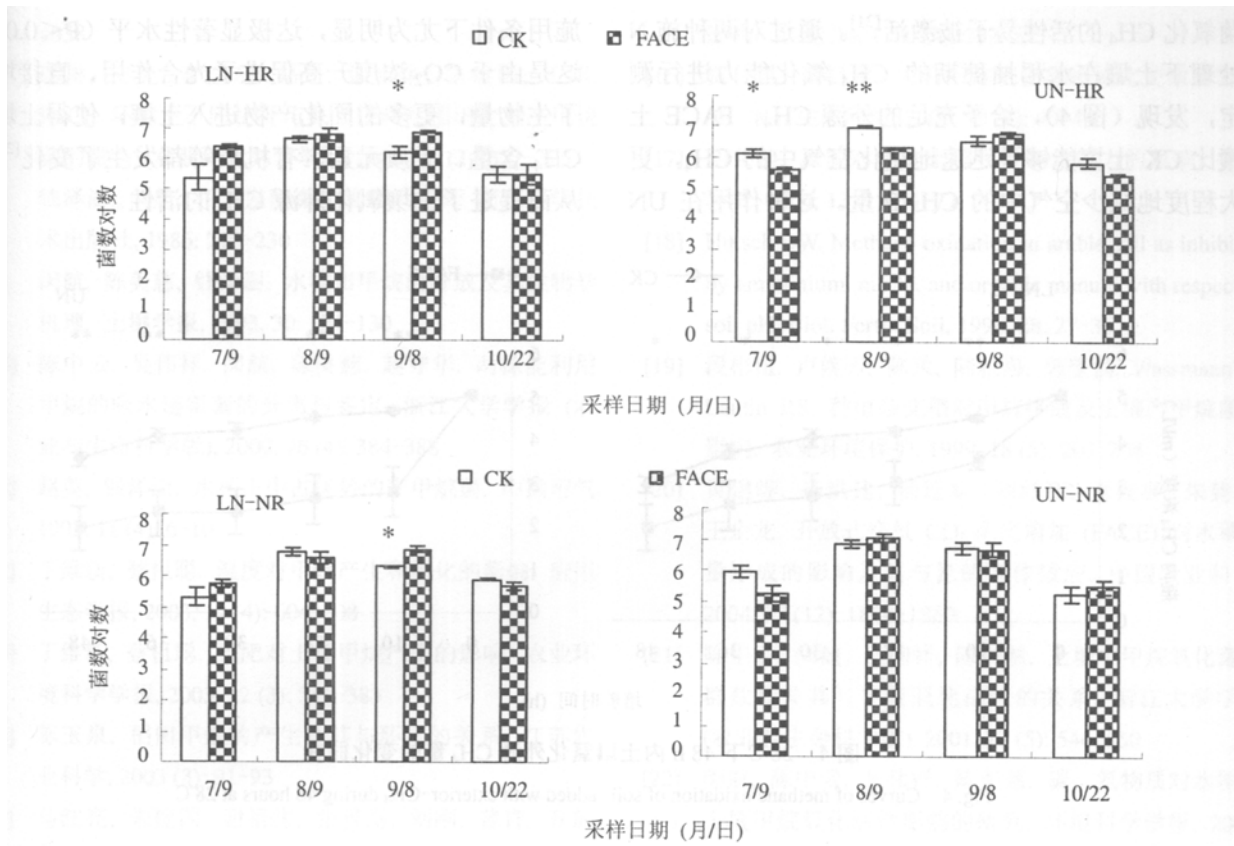


图 2 FACE 对土壤甲烷氧化菌数量的影响

Fig. 2 Effects of FACE on methanotroph population of different rice-straw-returning-back-to-field treatments

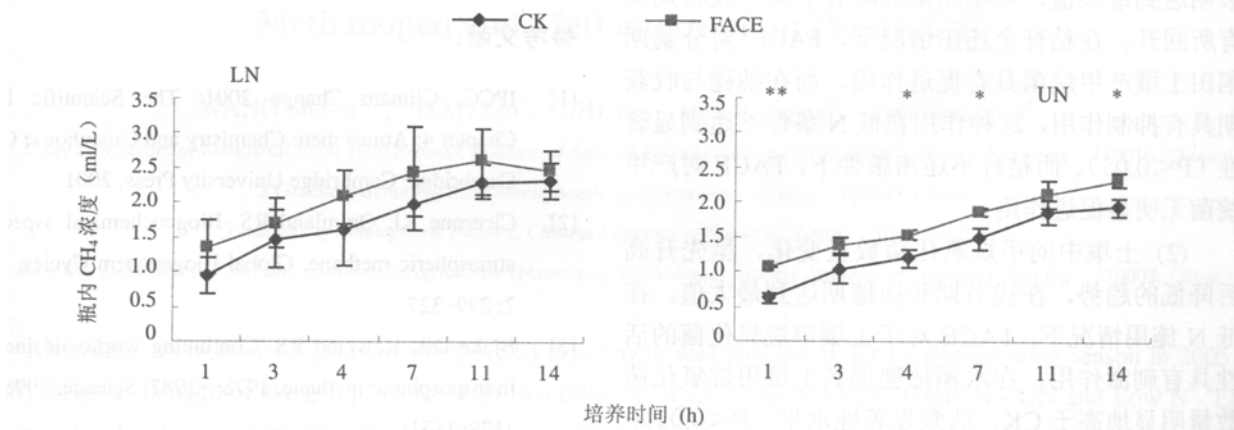


图 3 30°C 下 14 天内土壤产 CH₄ 量的变化曲线

Fig. 3 Curves of methane production of soils during 14 days at 30°C

田中的产甲烷菌数量的变化与稻田 CH₄ 释放关系不太明显, 还有其他的因素影响 CH₄ 的形成与释放^[19]。

另外, 从图 3 可以看出, LN 处理的土壤比 UN 处理具有较高 CH₄ 产生量, 由于 FACE 条件下, UN 处理土壤中可供微生物利用的有效态 N 并不充足^[15,20], 不至于对甲烷氧化菌产生竞争抑制而促进

CH₄ 排放增加, 使其产生 CH₄ 的能力受到一定程度的影响。

2.4 FACE 对土壤 CH₄ 氧化潜力的影响

土壤的 CH₄ 含量是影响土壤氧化 CH₄ 速率高低的重要因素。因此, 当土壤中 CH₄ 浓度充足时, 有利于甲烷氧化菌的生存、增殖和维持, 使甲烷氧化

菌氧化 CH_4 的活性易于被激活^[21]。通过对两种施 N 处理下土壤在水稻抽穗期的 CH_4 氧化能力进行测定, 发现 (图 4), 给予充足的外源 CH_4 , FACE 土壤比 CK 土壤能够更迅速地氧化空气中的 CH_4 , 更大程度地减少空气中的 CH_4 含量。这种作用在 UN

施用条件下尤为明显, 达极显著性水平 ($P < 0.01$)。这是由于 CO_2 浓度升高促进了光合作用, 直接增加了生物量, 更多的同化产物进入土壤, 使得土壤的 CH_4 含量、矿质元素、有机质等都发生了变化^[22], 从而促进了土壤氧化外源 CH_4 的活性。

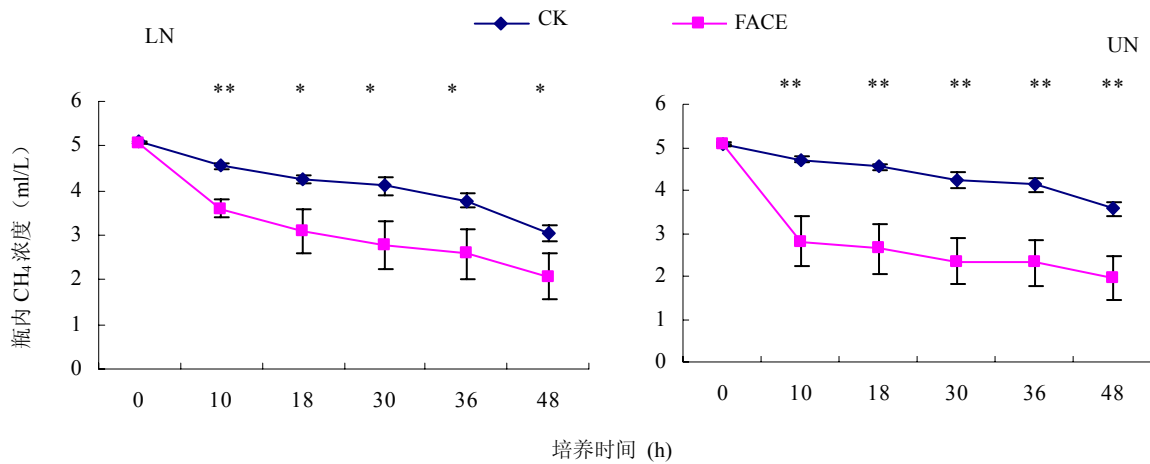


图 4 28°C 下 48 h 内土壤氧化外源 CH_4 量的变化曲线

Fig. 4 Curves of methane oxidation of soils added with exterior- CH_4 during 48 hours at 28°C

3 初步结论

(1) FACE 和 CK 处理土壤的产甲烷菌数均在拔节期达到最大值, 抽穗期菌数略有下降, 收获期又有所回升。在秸秆全还田情况下, FACE 对分蘖期稻田土壤产甲烷菌具有促进作用, 而在抽穗与收获期具有抑制作用, 这种作用在低 N 条件下达到显著性 ($P < 0.05$)。而秸秆不还田条件下, FACE 对产甲烷菌无明显促进作用。

(2) 土壤中的甲烷氧化菌数量变化, 呈先升高后降低的趋势, 在拔节期和抽穗期达到最大值。在低 N 施用情况下, FACE 对于土壤甲烷氧化菌的活性具有刺激作用, 在水稻抽穗期其土壤甲烷氧化菌数量明显地高于 CK, 达到显著性水平 ($P < 0.05$); 而常规施 N 量秸秆全还田的情况下, 除了抽穗期, FACE 土壤中的甲烷氧化菌数量都受到一定程度的抑制。

(3) 土壤的产 CH_4 潜力测定的结果表明, FACE 条件促进了土壤的 CH_4 释放, 尤其是在常规 N 量施用条件下, FACE 土壤的产 CH_4 能力明显地高于 CK 土壤。而在低 N 条件下, 土壤较常规 N 量施用条件下产 CH_4 能力高。

(4) 土壤的 CH_4 氧化能力测定的结果显示, 当底物 (加入外源 CH_4) 充足时, FACE 土壤具有较

高的氧化 CH_4 能力, 其 CH_4 氧化潜力明显大于 CK 土壤, 并且这种作用在常规的 N 肥施用条件下尤为明显, 达极显著性水平 ($P < 0.01$)。

参考文献:

- [1] IPCC. Climate Change 2001: The Scientific Basis: Chapter 4: Atmosphere Chemistry and Greenhouse Gases. Cambridge: Cambridge University Press, 2001
- [2] Cicerone RJ, Oremland RS. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochem Cycles*, 1998, 2: 299-327
- [3] Blake DR, Rowland RS. Continuing worldwilde increase in tropospheric methane, 1978-1987. *Science*, 1998, 239: 1129-1131
- [4] Rennenberg H, Wassman R, Papen H, Seiler W. Trace gas exchange in rice cultivation. *Ecological Bulletin*, 1992, 42: 164-173
- [5] Holzapfel-Pschorn A, Conrad R, Seiler W. Production, oxidation and emission of methane in rice paddies. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1985, 31: 343-351
- [6] Xu ZJ, Zheng XH, Wang YS, Han S, Huang Y, Zhu J, Butterbach-Bahl K. Effects of elevated CO_2 and N fertilization on CH_4 emissions from paddy rice fields. *Global Biogeochemical Cycles*, 2004, 18 (10): 1029-

- 1038
- [7] 韩琳, 史奕, 李建东, 岳进, 谢宝华, 朱建国, 王鸽. FACE 环境下不同秸秆与氮肥管理对稻田土壤产甲烷菌的影响. 农业环境科学学报, 2006, 25 (2): 322-325
- [8] 钱泽澍, 闵航. 沼气发酵微生物学. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1986: 210-230
- [9] 闵航, 陈美慈, 钱泽澍. 水稻田甲烷的排放及其生物学机理. 土壤学报, 1993, 30: 125-130
- [10] 陈中云, 吴伟祥, 闵航, 陈美慈, 赵守华. 两株能利用甲烷的吸水链霉菌的分离与鉴定. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2000, 26 (4): 384-388
- [11] 赵英, 钱泽澍. 水稻田中占优势的产甲烷菌. 中国沼气, 1993, 11 (4): 6-10
- [12] 丁维新, 蔡祖聪. 温度对甲烷产生和氧化的影响. 应用生态学报, 2003, 14 (4): 604-608
- [13] 丁维新, 蔡祖聪. 氮肥对土壤甲烷产生的影响. 农业环境科学学报, 2003, 22 (3): 380-383
- [14] 陈玉泉. 稻田甲烷的产生及其与环境的关系. 江苏农业科学, 2003 (3): 91-93
- [15] 马红亮, 朱建国, 谢祖彬, 张雅丽, 刘刚, 曾青. 开放式空气 CO₂ 浓度升高对水稻土壤可溶性 C、N 和 P 的影响, 土壤, 2004, 36 (4): 392-397
- [16] 贾仲君, 蔡祖聪. 稻田甲烷氧化与铵氧化关系研究进展. 农村生态环境, 2003, 19 (4): 40-44
- [17] 胡荣桂. 氮肥对旱地土壤甲烷氧化能力的影响. 生态环境, 2004, 13 (1): 74-77
- [18] Hutsch BW. Methane oxidation in arable soil as inhibited by ammonium, nitrite, and organic manure with respect to soil pH. Biol. Fertil. Soil, 1998, 28: 27-35.
- [19] 段彬伍, 卢婉芳, 陈茱, 陆雅海, 郭望模, Wassmann R, Lantin RS. 种植杂交稻对甲烷排放及土壤产甲烷菌的影响. 农业环境保护, 1999, 18 (5): 203-208
- [20] 黄建晔, 杨洪建, 杨连新, 刘红江, 董桂春, 朱建国, 王余龙. 开放式空气 CO₂ 浓度增加 (FACE) 对水稻产量形成的影响及其与氮的互作效应. 中国农业科学, 2004, 37 (12): 1824-1830
- [21] 陈中云, 闵航, 吴伟祥, 陈美慈. 土壤中甲烷氧化菌种群数量及其与甲烷氧化活性的关系. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2001, 27 (5): 546-550
- [22] 闵航, 陈中云, 吴伟祥, 陈美慈. 碳、氮物质对水稻田土壤甲烷氧化活性影响的研究. 环境科学学报, 2002, 22 (1): 70-75

Effects of FACE on Population and Activities of Methanogen and Methanotroph in Paddy Soil

WANG Shu-yi^{1,2}, HAN Lin¹, SHI Yi¹, MEI Bao-ling³, ZHU Jian-guo⁴

(¹ Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

² Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³ Institute of Atmospheric Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China;

⁴ State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China)

Abstract: A free-air CO₂ enrichment (FACE) experiment was conducted during rice-growing season in 2005 in paddy fields at Jiangdu of Jiangsu province with two different N fertilization levels (Usual N - UN and Low N - LN) and two levels of rice-straw-returning-back-to-field (HR, NR) to evaluate population changes of methanogens and methanotrophs by the most-probable-number (MPN) method as well as methane production and oxidizing potential by gas chromatography. Results showed that elevated atmospheric CO₂ concentrations increased methanogens population at tillering stage, but restrained methanogens activity at heading and harvest stages under HR condition. Rising atmospheric CO₂ concentrations increased methanotrophs activity under LN condition, and methanotrophs population in FACE condition was significantly higher than that of Ambient in heading stage. But methanotrophs activities under UN and HR conditions were restrained except at heading stage. Methane production potential showed that FACE promoted methane release, especially under UN condition. High methane oxidizing activity was found under UN condition with enough exterior-CH₄ and rising atmospheric CO₂ concentrations.

Key words: FACE, Methanogens, Methanotrophs, Methane production potential, Methane oxidization potential