DOI:10.13758/j.cnki.tr.2007.02.001

土 壤 (Soils), 2007, 39 (2): 153~156

稻田甲烷氧化研究方法进展①

马 静[1, 2], 徐 华[1*], 蔡祖聪[1]

（1 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； 2 中国科学院研究生院, 北京 100049）

摘 要： 土壤厌氧培养、添加 CH_4 氧化抑制剂和稳定性 C 同位素方法是 3 种主要的稻田 CH_4 氧化研究方法。采用土壤厌氧培养方法估算的 CH_4 氧化率偏高，其大部分研究结果中 CH_4 氧化率均＞50%，高于其他方法的研究结果。添加 CH_4 氧化抑制剂不仅会抑制 CH_4 的氧化，同时也会减少或促进 CH_4 的生成，这与添加的 CH_4 氧化抑制剂的浓度有关。稳定性 C 同位素方法可在自然条件下测定 CH_4 氧化率，无破坏性、灵敏度高，但计算 CH_4 氧化率输入的 $\delta_{initial}$、δ_{final} 和 α 值还需要进一步研究。

关键词： 甲烷氧化；厌氧培养；甲烷氧化抑制剂；稳定性碳同位素方法

中图分类号： S131；X511

甲烷（CH_4）是仅次于 CO_2 的最重要的温室气体，稻田排放的 CH_4 约占全球排放的 15% ~ 20%[1]。稻田 CH_4 排放是稻田土壤中 CH_4 的产生、氧化以及向大气传输这 3 个过程相互作用的结果。尽管稻田土壤以淹水还原条件为主，但在土水界面及根土界面也存在氧化区域，导致土壤中产生的 CH_4 在排放至大气前相当一部分被土壤中的 CH_4 氧化菌所氧化。稻田土壤的 CH_4 排放量不仅取决于 CH_4 的生成能力，而且还决定于土壤对内源 CH_4 的氧化能力。目前，测定土壤 CH_4 氧化比率的方法有：厌氧培养试验；添加 CH_4 氧化抑制剂；稳定性 C 同位素方法。运用不同研究方法得出的 CH_4 氧化率有很大差别。

1 土壤厌氧培养

土壤厌氧培养方法是将土样在实验室完全厌氧条件下培养得到的 CH_4 产生量减去田间条件下测定的 CH_4 排放量，以此推算出稻田土壤氧化 CH_4 的量。具体操作为：从田间采回土样后，将其置于密封培养器中，先用 N_2 反复多次冲洗，以除去培养器中残留的空气，再充入 N_2 到一定压力，然后将样品放在恒温箱中（通常为25℃）培养，培养完毕后，抽取培养器中的气样，在 GC 上测定 CH_4 浓度[2-4]。CH_4 产生率 Rp 用以下公式进行计算[5]：

$$Rp = \frac{V}{V_0} \times \frac{P}{P_0} \times \frac{T_0}{T} \times \frac{\mu}{M} \times \rho \times \frac{dC}{dt} \qquad (1)$$

式中，V 为培养器中的气室体积（L）；V_0 为理想气体摩尔体积（22.4 l/mol）；P 为培养器中的气压（atm）；P_0 为标准状态的气压（1atm）；T_0 为标准状态的温度（273K）；T 为恒温培养时的温度（K）；μ 为CH_4 的摩尔质量（16 g/mol）；M 为培养土壤样品的干重（g）；ρ 为 CH_4 的密度 (kg/m^3)；$\frac{dC}{dt}$ 为培养器中 CH_4 浓度的变化率。

早期的研究中，土壤厌氧培养方法运用较多。Holzapfel-Pschorn等[6]认为稻田 CH_4 氧化的比率可高达 80%；Schütz等[3]实验结果表示，CH_4 产生率最高能达到 300 ml/(m^2•h)，其中只有 6% 被排放至大气中；上官行健等[4]测得土壤中产生的 CH_4 最多只有 28% 被排放到大气中，而其余多于 71.2% 的 CH_4 则被氧化在土壤中；王明星等[7]的研究也认为有 69% ~ 90% 的 CH_4 在传输入大气之前被氧化。大部分运用土壤厌氧培养方法测得的 CH_4 氧化率均＞50%，高于其他方法的研究结果 (表 1)。实际上，由于完全厌氧条件更有利于CH_4的产生，该条件下测定的土壤 CH_4 产生率要高于田间原位测定结果，因而使稻田 CH_4 氧化率的计算结果偏高。

2 添加甲烷氧化抑制剂

氟甲烷 (CH_3F)、乙炔 (C_2H_2)、二氟甲烷 (CH_2F_2) 和氮气 (N_2) 均能抑制 CH_4 的氧化，通过比较 CH_4 氧化被抑制和未被抑制条件下 CH_4 排放量的差异即可得到土壤氧化 CH_4 的量。此类研究方法运用在田间原位试验中[8]，需先把土壤连同生长在其上的水稻植株置于一个密闭箱中，向密闭箱内加入一定浓度的 CH_4 氧化抑制剂，通过测定箱内 CH_4 浓度的变化，即可得到CH_4 产生率，从而进一步计算出 CH_4 氧化率。同样，也可进行盆栽试验[9]，操作与田间试验类似。Banker

①基金项目：国家自然科学基金课题（40371068）和中国科学院全国优秀博士学位论文专项基金课题资助。

* 通讯作者（hxu@issas.ac.cn）

作者简介：马静（1974—），女，四川南充人，博士研究生，主要从事农田温室气体排放研究。Email: jma@issas.ac.cn

表 1 采用不同研究方法测得的 CH_4 氧化率

Table 1 Methane oxidation ratio obtained by different methods

研究方法	CH_4 氧化率	参考文献
土壤厌氧培养	80%	Holzapfel-Pschorn等[6]
	77%	Holzapfel-Pschorn等[2]
	44%～97%	Schütz等[3]
	71.2%	上官行健等[4]
	69%～90%	王明星等[7]
添加 CH_4 氧化抑制剂	30%（加入 CH_3F）	Banker等[10]
	30%（加入 C_2H_2）	Watanabe等[11]
	14.5%～23.9%（加入 N_2）	Gilbert 和 Frenzel[13]
	0～40%（加入 CH_2F_2）	Krüger等[12]
稳定性 C 同位素方法	19%～56%	Tyler等[19]
	39%～71%	Bilek等[22]
	4%～45%	Krüger 和 Frenzel[23]
	0.02%～6.8%	Groot等[21]
	5%～27%	Conrad 和 Klose[24]

等[10]在培养试验中采用 CH_3F来抑制 CH_4 氧化，测得约 30%的CH_4在水稻根际被CH_4氧化菌所氧化。Watanabe等[11]在盆栽试验中采用C_2H_2作为 CH_4 氧化抑制剂，发现水稻分蘖盛期约 30% 的 CH_4 被氧化。Krüger等[12]采用 CH_2F_2 进行田间原位试验，发现 CH_4 氧化率从水稻生长前期的 40% 下降到末期接近于零。Gilbert 和 Frenzel[13]采用 N_2 进行培养试验，得到 CH_4 的氧化比率为 14.5%～23.9%。

添加 CH_4 氧化抑制剂不仅会抑制 CH_4 的氧化，也会同时减少或促进 CH_4 的生成，这与添加的 CH_4 氧化抑制剂的浓度有关。CH_3F是一种常用的 CH_4 氧化抑制剂，Frenzel 和 Bosse[14] 的培养试验发现，添加 0.1%的 CH_3F，土壤 CH_4 的产生量比对照减少约 75%；Janssen 和 Frenzel[15] 研究发现，添加 1% 的 CH_3F 会限制 CH_4 的产生。C_2H_2 是一种有效的 CH_4 氧化抑制剂，添加0.01% 和1% 的C_2H_2 即可分别减少 89% 和 98% 的CH_4 氧化率[16]。Oremland 和 Taylor [17] 的研究表明低浓度的 C_2H_2 对 CH_4 产生的影响不大，而 Watanabe 等 [11] 的培养试验发现添加 0.05% 的 C_2H_2，培养一周后会显著地抑制CH_4生成。与CH_3F 和 C_2H_2 相反，N_2 在抑制 CH_4 氧化的同时，也促进了根际 CH_4 的产生[2, 9]。

3 稳定性 C 同位素方法

自然界中 C 的同位素有 7 种 (^{10}C、^{11}C、^{12}C、^{13}C、^{14}C、^{15}C、^{16}C)，其中 ^{12}C、^{13}C 为稳定性同位素，它们的自然丰度分别为 98.89% 和 1.11%。通常使用 $\delta^{13}C$(‰) 来表示物质的同位素组成，定义为:

$$\delta^{13}C = \left(\frac{R_p}{R_s} - 1\right) \times 1000 \quad (2)$$

式中，R_p为样品中 C 元素的重轻同位素丰度之比；R_s为国际通用标准物的重轻同位素丰度之比，即：

$$R_p = \left(\frac{^{13}C_P}{^{12}C_p}\right) \quad R_s = \left(\frac{^{13}C_s}{^{12}C_s}\right)$$

CH_4氧化细菌因更为喜好轻 C 同位素 CH_4而不同程度上优先氧化 $^{12}CH_4$，导致未被氧化的排向大气的 CH_4 的同位素组成发生变化[18]，即发生同位素分异作用。稳定性 C 同位素方法就是通过测定 CH_4氧化过程中 $\delta^{13}C$ 的变化，计算出 CH_4氧化率。通常用下式计算 CH_4氧化率f_{ox}[19-20]：

$$\delta_{initial} = \delta_{final} + \left[f_{ox}\left(\frac{1}{\alpha} - 1\right)\left(1 + \frac{\delta_{final}}{1000}\right)\right] \times 1000 \quad (3)$$

式中，$\delta_{initial}$ 是土壤产生的 CH_4的 $\delta^{13}C$；δ_{final}是土壤产生的 CH_4被氧化后的 $\delta^{13}C$；α 为 CH_4氧化过程的同位素分异系数。也有用添加 ^{13}C 标记的 CH_4的方法测得 CH_4氧化率的[21]。

采用稳定性 C 同位素方法，Bilek等[22]比较了Mars和Lemont 两种水稻品种的 CH_4 氧化率，发现前者的 CH_4氧化率达到 71%±10%，而后者的CH_4 氧化率只有 39%±10%；Krüger和 Frenzel[23]的研究结果表明，水稻播种后的 28 ～ 84 天内，CH_4 氧化率从 45% 下降到 4%，且大部分时间均低于 20%；Conrad 和 Klose[24] 计算出稻田 CH_4 氧化率不超过27%。此外，Groot 等[21] 用添加^{13}C 标记的 CH_4 的方法测得土壤 CH_4 氧化比

率＜7%。

稳定性C 同位素方法可在自然条件下测定 CH_4 氧化率，无破坏性、灵敏度高，但计算 CH_4 氧化率输入的$\delta_{initial}$、δ_{final} 和 α 值还需要进一步研究。$\delta_{initial}$ 可以采用相同水稻土实验室厌氧培养产生 CH_4 的 $\delta^{13}C$，而 Fey等[25]的研究表明温度会影响土壤厌氧培养产生的 CH_4 的 $\delta^{13}C$。Conrad 等[26]研究认为，同位素分异系数 α 会随环境和时间而发生变化，有必要对其开展更详细的研究。

参考文献：

[1] Sass RL, Fisher MF. Methane emissions from rice paddies: A process study summary. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 1997, 49: 119−127

[2] Holzapfel-Pschorn A, Conrad R, Seiler W. Effects of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. Plant and Soil, 1986, 92: 223−233

[3] Schütz H, Seiler W, Conrad R. Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. Biogeochemistry, 1989, 7: 33−53

[4] 上官行健，王明星，Wassmann R，Rennenberg H, Seiler W. 稻田土壤中甲烷产生率的实验研究. 大气科学，1993, 17 (5)：604−610

[5] 王明星. 中国稻田甲烷排放. 北京: 科学出版社，2001：84

[6] Holzapfel-Pschorn A, Conrad R, Seiler W. Production, oxidation and emission of methane in rice paddies. FEMS Microbiology Letters, 1985, 31 (6): 343−351

[7] 王明星，李晶，郑循华. 稻田甲烷排放及产生、转化、输送机理. 大气科学，1998，22 (4): 600−612

[8] Dan JG, Krüger M, Frenzel P, Conrad R. Effect of late season urea fertilization on methane emission from a rice field in Italy. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2001, 83: 191−199

[9] Denier van der Gon HAC, Neue HU. 1996. Oxidation of methane in the rhizosphere of rice plants. Biology and Fertility of Soils, 1996, 22: 359−366

[10] Banker BC, Kludze HK, Alford DP, Delaune RD, Lindau CW. Methane sources and sinks in paddy rice soils: Relationship to emissions. Agriculture, Ecosystems and Environment, 1995, 53 (3): 243−251

[11] Watanabe I, Hashimoto T, Shimoyama A. Methane-oxidizing activities and methanotrophic populations associated with wetland rice plants. Biology and Fertility of Soils, 1997, 24: 261−265

[12] Krüger M, Frenzel P, Conrad R. Microbial processes influencing methane emission from rice fields. Global Change Biology, 2001, 7: 49−63

[13] Gilbert B, Frenzel P. Rice roots and CH_4 oxidation: The activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30 (14): 1903−1916

[14] Frenzel P, Bosse U. Methylfluoride, an inhibitor of methane oxidation and methane production. FEMS Microbiology Ecology, 1996, 21: 25−36

[15] Janssen PH, Frenzel P. Inhibition of Methanogenesis by methylfluoride: Studies of pure and defined mixed cultures of anaerobic bacteria and archaea. Applied and Environmental Microbioloby, 1997, 63 (11): 4552−4557

[16] King GM. In situ analyses of methane oxidation associated with the roots and rhizomes of a bur reed, spargainium eurycarpum, in a Maine wetland. Applied and Environmental Microbioloby, 1996, 62 (12): 4548−4555

[17] Oremland RS, Taylor BF. Inhibition of methanogenesis in marine sediments by acetylene and ethylene: Validity of the acetylene reduction assay for anaerobic microcosms. Applied Microbiology, 1975, 30 (4): 707−709

[18] Coleman DD, Risatti JB, Schoell M. Fractionation of carbon and hydrogen isotopes by methane-oxidizing bacteria. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1981, 45 (7): 1033−1037

[19] Tyler SC, Bilek RS, Sass RL, Fisher FM. Methane oxidation and pathways of production in a Texas paddy field deduced from measurements of flux, $\delta^{13}C$, and δD of CH_4. Global Biogeochemical Cycles, 1997, 11 (3): 323−348

[20] Krüger M, Eller G, Conrad R, Frenzel P. Seasonal variation in pathways of CH_4 production and in CH_4 oxidation in rice fields determined by stable carbon isotopes and specific inhibitors. Global Change Biology, 2002, 8: 1−16

[21] Groot TT, Bodegom PM van, Harren FJM, Meijer HAJ. Quantification of methane oxidation in the rice rhizosphere using ^{13}C-labelled methane. Biogeochemistry, 2003, 64: 355−372

[22] Bilek RS, Tyler SC, Sass RL, Fisher FM. Differences in CH_4 oxidation and pathways of production between rice cultivars deduced from measurements of CH_4 flux and $\delta^{13}C$ of CH_4 and CO_2. Global Biogeochemical Cycles, 1999, 13 (4): 1029−1044

[23] Krüger M, Frenzel P. Effects of N-fertilisation on CH_4 oxidation and production, and consequences for CH_4 emissions from microcosms and rice fields. Global Change Biology, 2003, 9: 773−784

[24] Conrad R, Klose M. Effect of potassium phosphate fertilization on production and emission of methane and its ^{13}C-stable isotope composition in rice microcosms. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37: 2099−2108

[25] Fey A, Claus P, Conrad R. Temporal change of ^{13}C-isotope signatures and methanogenic pathways in rice field soil incubated anoxically at different temperatures. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2004, 68 (2): 293−306

[26] Conrad R, Klose M, Claus P. Pathway of CH_4 formation in anoxic rice field soil and rice roots determined by ^{13}C-stable isotope fractionation. Chemosphere, 2002, 47 (8): 797−806

Advances on Methods to Quantify Methane Oxidation in Paddy Fields

MA Jing[1,2], XU Hua[1], CAI Zu-cong[1]

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

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

Abstract: Three methods have been mainly used to quantify methane oxidation in paddy fields, namely, soil anaerobic incubation, the use of methane oxidation inhibitors and stable carbon isotopes. Methane oxidation ratios measured by soil anaerobic incubation were overestimated, and most of the values obtained by this method were above 50%, higher than the values obtained by other methods. In the inhibition studies, methanogenesis was reduced or stimulated while methane oxidation was blocked, depending on the inhibitor's concentration. Stable carbon isotopes used to quantify methane oxidation was nondestructive and more sensitive than other methods, but further studies on $\delta_{initial}$、δ_{final} and α were still necessary.

Key words: Methane oxidation, Soil anaerobic incubation, Inhibitor of methane oxidation, Stable carbon isotopes