

不同温度下尿素对水稻土甲烷产生及相关古菌群落的影响^①

胡越航, 韦 梦, 徐建刚, 裘琼芬*

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘 要: 水稻田是大气甲烷的重要排放源。尿素氮肥施用是提升水稻产量和品质的重要措施, 但其对稻田土壤中产甲烷古菌的影响规律仍不清楚。通过模拟水稻生长季节可能的田间温度变化, 本研究设置水稻土施加尿素(N, 400 mg/kg 干土)与未施加尿素两个处理, 在 15℃、25℃、37℃以及 50℃下进行为期 100 天的厌氧培养, 定期测定了培养过程中甲烷累积量以及土壤理化因子如 pH、NH₄⁺-N 以及有机碳的变化, 并运用基于 16S rRNA 基因的 T-RFLP(末端限制性片段多态性分析)技术分析了产甲烷过程中古菌群落结构随时间的变化情况。结果表明: 在中低温范围内(15~37℃), 尿素对水稻土产甲烷有抑制作用, 但在 50℃高温下尿素对水稻土产甲烷量没有显著影响。尿素可能通过改变产甲烷古菌群落结构来影响甲烷的产生, 在 15~37℃范围内, 尿素降低了水稻土产甲烷古菌群落的稳定性, 增大了其在不同时间的差异性; 而在 50℃高温时, 尿素对水稻土产甲烷古菌稳定性和差异性的影响不明显。不同温度下, 尿素均降低了甲烷八叠球菌(*Methanosarcinaceae*)的丰度, 且随着温度的变化, 尿素对水稻土产甲烷机制的改变可能没有影响。

关键词: 水稻土; 尿素; 甲烷; 古菌; T-RFLP

中图分类号: X511

甲烷(CH₄)被认为是仅次于 CO₂ 的第二大温室气体^[1]。甲烷的产生和排放对全球气候变暖和生态系统碳循环有着重要的影响。水稻田是甲烷产生的主要来源之一, 其排放量占全球甲烷排放总量的 5%~19%^[2]。甲烷是产甲烷菌在严格厌氧条件下作用于产甲烷底物的结果。目前认为产甲烷古菌通过氢营养型(CO₂/H₂)、乙酸营养型和甲基营养型 3 种途径产生甲烷^[3]。温度是影响稻田产甲烷的重要环境因子之一^[4]。根据其对于最适温度的需求不同, 产甲烷古菌又可分为嗜冷菌(psychrophiles)、嗜温菌(mesophiles)、嗜热菌(thermophiles)和极端嗜热菌(hyperthermophile) 4 种类型^[5]。这 4 种类群的最适温度分别为: 低于 25℃、35℃左右、55℃左右以及高于 80℃。已有的研究表明, 在不同的尺度下, 如微生物个体水平或生态系统水平, 水稻土甲烷排放通量对温度具有相似的依赖性^[6]。温度不仅影响产甲烷菌的群落结构, 也影响其底物基质的分解代谢, 从而影响产甲烷代谢途径, 导致甲烷产生速率的差异。低温条件下, 主要由甲烷鬃菌(*Methanosaetaceae*)利用乙酸型产甲

烷途径产甲烷, 温度较高时, 则以甲烷八叠球菌(*Methanosarcinaceae*)同时利用氢营养型途径和乙酸营养型途径为主产甲烷, 在高温条件下, 则以氢营养型产甲烷为主^[7-8]。

水稻是世界最主要的粮食作物之一。在农业生态系统中, 氮肥是影响水稻产量的重要因子。施用氮肥是提高农作物产量和品质的必要措施, 然而氮肥也是影响水稻土甲烷排放的重要因素之一^[9-10]。尿素对水稻土产甲烷影响的研究结果并不一致。有报道表明尿素促进水稻土产甲烷^[11], 但也有尿素抑制水稻土产甲烷的报道^[12-13], 并且这些研究大都在一个温度下进行, 很难推测各种环境因子如土壤类型和温度对产甲烷过程的影响。目前, 关于尿素对水稻土产甲烷的研究报道较少, 尤其是尿素对水稻土产甲烷相关微生物的影响鲜有报道。植物对氮肥的吸收主要是以无机氮为主。氮肥尤其是尿素水解后生成 NH₄⁺-N, 该形态的无机氮是植物可以吸收的氮素形态, 同时也是微生物可利用的有效氮素形态之一^[14], 因此尿素可影响水稻土植物以及微生物的生长。而尿素的水解在不同

①基金项目: 国家自然科学基金项目(41101234)资助。

* 通讯作者(qiuqiongfen@nbu.edu.cn)

作者简介: 胡越航(1995—), 男, 浙江杭州人, 本科在读, 主要从事环境微生物分子生态的研究。E-mail: 546264457@qq.com

温度下有差异,从而导致 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度的差异,这种差异直接影响了植物以及微生物的生长。因此研究不同温度下尿素对水稻土甲烷产生以及产甲烷相关微生物的影响具有重要意义。目前,针对这一问题的研究尚未见报道,因此,本研究设置了水稻土施加尿素与未施加尿素两个处理,在 15°C 、 25°C 、 37°C 以及 50°C 四个温度下进行了为期 100 天的厌氧培养,定期测定了不同温度下施加尿素与未施加尿素水稻土甲烷累积量,同时测定了土壤理化因子(pH 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、有机碳),并利用 T-RFLP 技术分析了培养过程中不同温度下施氮土壤与未施氮土壤古菌群落的变化,结合各个处理下土壤甲烷产生量以及古菌群落结构的差异,初步探讨了不同温度下尿素对水稻土产甲烷以及产甲烷相关微生物的影响。

1 材料与方法

1.1 土样采集和培养

供试土壤采自浙江省宁波市洋沙山水稻种植区($121^\circ54'36.9''\text{E}$, $29^\circ45'3.9''\text{N}$),为海滨湿地改良的黏质水稻土。土样自然风干,过 2 mm 筛,备用。土壤理化性质为: $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})7.88$,有机质 27.3 g/kg,全氮 1.77 g/kg,全磷 0.552 g/kg,速效磷 3.20 mg/kg,速效钾 234 mg/kg。

为比较不同温度下尿素对水稻土甲烷产生及相关微生物群落的影响,本试验设置 2 个尿素浓度处理: S1(N, 0 mg/kg 干土)和 SN(N, 400 mg/kg 干土),选择在 15°C 、 25°C 、 37°C 和 50°C 四个温度进行淹水密闭培养试验。称取过 10.0 g 干土于 125 ml 的模制瓶中,加入 20 ml 不同浓度尿素溶液(使水土比为 2:1),呈淹水状态,丁基胶塞封口。反复 3 次抽真空、充高纯氮(99.99%)5 min,使培养体系处于厌氧状态。稍微震荡后,分别置于 15°C 、 25°C 、 37°C 或 50°C 的恒温生化培养箱中进行为期 100 天的黑暗静置培养。每个温度设置 27 个平行体系以开展破坏性采样,其中每个温度固定的 3 个平行体系用于测定培养过程中瓶内的甲烷浓度。剩下的平行体系用于不同时期土壤及上清液样品的采集。培养过程中,分别采集 2、5、12、36、50、70 和 100 天的土样及上清液,每个温度随机采集 3 个平行样品。采集的样品于 -20°C 冷冻保存,用于后续分析。

1.2 甲烷累积量的测定

根据不同时期不同频率采集培养体系上空甲烷气体(前 10 天内每日 1 次,之后每 5 ~ 10 天 1 次)。气体采集之前,震荡培养体系以达气液平衡。根据气

相色谱法测定甲烷的浓度:用注射器抽取震荡后的培养体系上空 100 μl 气体,进样到带有火焰离子化检测器的气相色谱中,测定不同时期各个处理下甲烷浓度的变化。

1.3 土壤及上清液的理化分析

土壤上清液酸碱度值采用 pH 计进行测定。参考《中华人民共和国国家环境保护标准》(HJ615-2011),以重铬酸钾氧化法^[15]测定各个采集时期土样中的有机碳含量(g/kg)。采集的土样立即以 10:1 的水土比用 2 mol/L 的 KCl 溶液进行土壤 NH_4^+ 的浸提,浸提液及上清液中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 均采用 Murase 等^[16]的荧光法测定。

1.4 土壤总 DNA 的提取和古菌 16S rRNA 基因的扩增

称取采集的泥浆土壤 0.5 g 用于总 DNA 的提取,具体步骤参考 Qiu 等^[17]方法进行。所提取的总 DNA 溶于 100 μl 灭菌水中,用于古菌 16S rRNA 基因的 PCR 分析。PCR 引物采用 FAM 荧光标记的古菌通用引物 Ar109 f (5'-AC (GT) GCT CAG TAA CAC GT-3')和 Ar934r-FAM (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3')。反应体系(50 μl)如下:5 μl 10 $\times$ buffer, 4 μl 2.5 mmol/L dNTP, 1 μl 10 mmol/L 古菌引物, 1 μl 2.5U rTaq DNA 聚合酶, 1 μl DNA 模板,加灭菌水至 50 μl 混匀。扩增条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 53°C 45 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测产量和特异性后,用 DNA 纯化试剂盒(北京天根生化科技有限公司)纯化。

1.5 古菌 16S rRNA 基因的 T-RFLP 分析

纯化后 PCR 产物用内切酶 *TaqI*(TaKaRa 公司)进行酶切。酶切反应体系(50 μl)如下:5 μl 10 $\times$ buffer, 5 μl 0.1% BSA, 1 μl *TaqI*, 39 μl PCR 纯化产物,加灭菌水至 50 μl 并混匀,置于 65°C 水浴酶切 3 h。酶切产物用乙醇醋酸钠沉淀法进行纯化。纯化后的酶切产物取 2 μl ,加 10 μl HiDi-甲酰胺和 0.2 μl 内标, 95°C 变性 3 min,立即放置冰上。通过 ABI 3730 Genetic Analyzer 进行限制性片段的基因扫描,并由 ABI GeneMap 分析软件获取 T-RFLP 结果。

1.6 数据分析

根据 T-RFLP 结果,剔除相对丰度低于 0.5% 的末端限制性片段(T-RF)。剩余的各个末端限制性片段(T-RF)用于分析不同温度下尿素对水稻土产甲烷相关微生物群落的影响。同时运用 Past 软件对 T-RFLP 结果进行了主成分分析(PCA, principal component analysis)。理化数据的处理均在 Excel 2003 中进行。

2 结果与分析

2.1 稻田土壤的产甲烷过程

图1表明,温度显著影响水稻土甲烷排放。无论施加尿素与否,温度越高,培养体系上空的甲烷浓度越高。在覆水厌氧后,水稻土需要一个恢复期才开始产甲烷。不同温度下的恢复期长短不同,温度越高,恢复期越短;而施加尿素并没有影响这种规律。15℃下,S1与SN处理土壤均在15天后开始产甲烷,但甲烷浓度增加缓慢,30天后甲烷浓度明显增加。而25℃、37℃以及50℃培养时,两种处理土壤均在培养2天后发生甲烷累积,并且37℃条件下甲烷累积量最大,50℃条件下次之。通过观察甲烷累积曲线的平缓可了解甲烷产生速率的变化。可见,15℃时甲烷累积量的变化最缓慢,曲线最平缓,因而15℃的低温使水稻土甲烷产生速率明显变慢。至100天培养结束时,甲烷的总产量仅为25℃下的1/5~1/3。而37℃以及50℃处理时,无论是否施加尿素,在培养前50天,水稻土甲烷累积量几乎呈线性增加,而在培养后期,甲烷累积量增加开始缓慢,进入相对稳定期。与37℃下相比,50℃下的水稻土甲烷产生虽然滞后,但在线性增长后期,其产甲烷速率要远远高于37℃,培养30天后,其甲烷产生量已超过37℃。比较不同温度下尿素对甲烷产生的影响,发现15℃、25℃以及37℃下,尿素的施加使甲烷累积量明显降低;而50℃时,施加尿素对甲烷累积量并没有明显影响。在整个培养过程中,无论施加尿素与否,水稻土甲烷产生量对温度以及培养时间的响应规律均一致,但尿素对水稻土甲烷产生量的影响因温度而异。

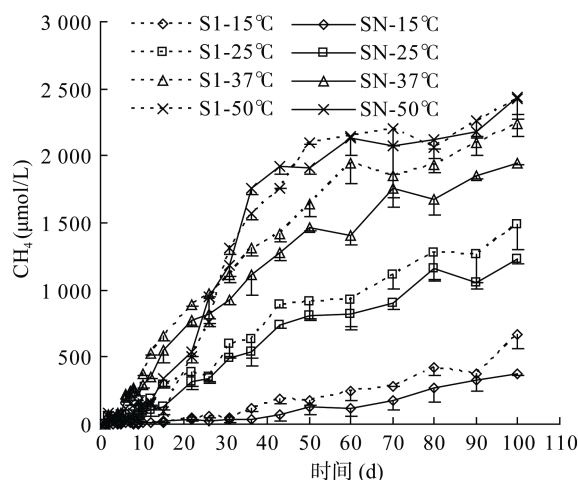


图1 培养期间不同处理水稻土的甲烷产生量

Fig. 1 Methane emission from paddy soil in different treatments during incubation

2.2 土壤及上清液的理化分析

对于不施加尿素的土壤处理S1,在整个厌氧培养过程中pH变化较为稳定(图2)。土壤pH在5天内由7.88上升到8.5左右,之后,波动不大,且不同培养温度之间差异不大。施加尿素的水稻土(SN)在厌氧培养过程中pH的波动较S1处理大。尿素水解产生铵,使得水稻土在培养10天后的pH升高达8.52~9.00;15~37℃下土壤pH的波动差异不大,但50℃时,pH的波动幅度有所降低。

从图3可以看出,尿素的加入和甲烷的产生并没有显著影响土壤的有机碳含量,其在整个培养过程中土壤有机碳保持相对稳定。与土壤初始有机碳含量(27.28 g/kg)相比,培养2天后,各个温度下,S1和SN处理土壤有机碳含量均显著降低至15.90 g/kg左右;且在之后的培养过程中,几乎没有变化。说明温度和尿素对土壤有机碳的影响均不明显。

从图4可以看出,施加尿素后,SN处理土壤上清液以及土壤浸提液的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度在整个培养周期中始终大于S1处理。S1处理在培养过程中,不同温度下上清液以及土壤浸提液的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度的变化规律较统一,均在培养12天内, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度上升,而培养12天后, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度均保持稳定状态。无论是上清液还是土壤浸提液,随着培养温度的增加, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度略有增加。尿素的施加(SN),使得土壤上清液以及浸提液的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度显著增加。尿素的水解使得4个温度下SN处理上清液以及浸提液 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度在培养12天内,分别迅速增加至45~60 mg/L以及140~180 mg/L,明显高于不施加尿素的土壤。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 累积量与温度呈正相关。培养后期,SN处理 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度变化较为稳定。说明无论是否添加尿素,温度的增加,均会提高土壤上清液以及浸提液 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的浓度。但是施加尿素,能明显提高土壤上清液以及浸提液的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度。

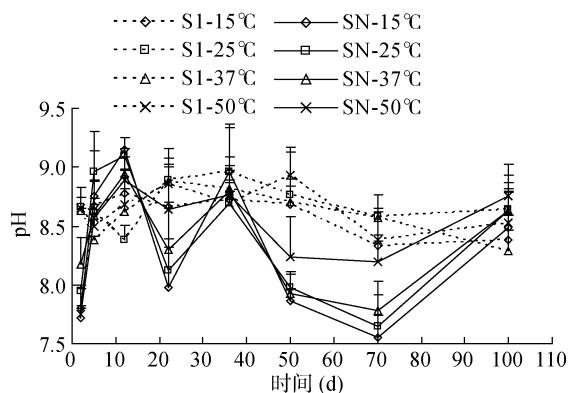


图2 不同处理下培养体系上清液pH的变化

Fig. 2 pH changes in supernatants of incubation systems in different treatments

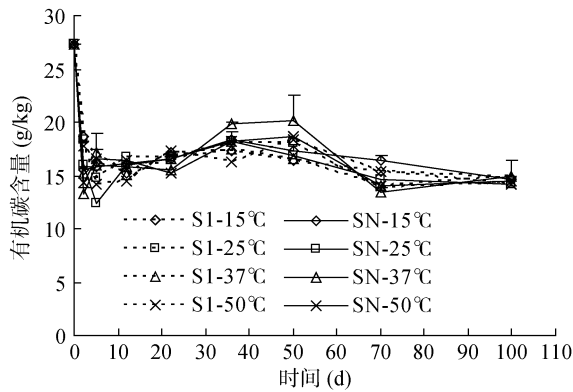


图 3 不同处理下土壤有机碳含量的变化

Fig. 3 Organic carbon changes in supernatants of incubation systems in different treatments

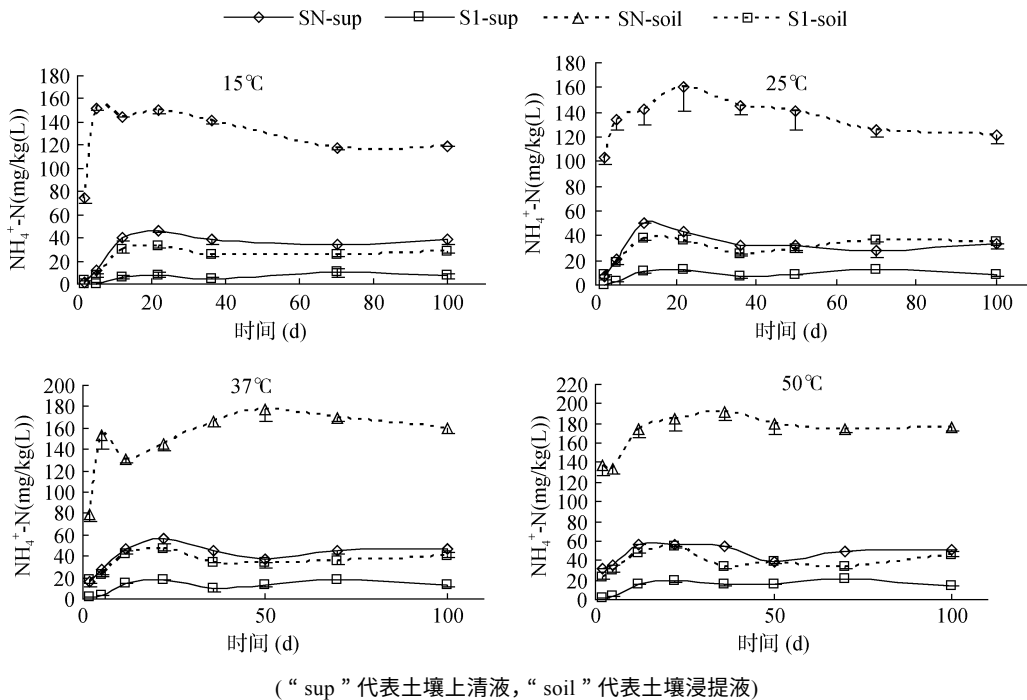


图 4 培养期间不同处理下水稻土上清液以及土壤浸提液 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度的变化

Fig. 4 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration changes in supernatants and soils during incubation in different treatments

各个 T-RF 比例在整个培养过程中随时间变化不大；而对于施加尿素的土壤处理 SN，主要成分仍为 T-RF 188 bp，但同一温度下其丰度均小于 S1 土壤处理，且随着培养时间的推移，各个 T-RF 相对丰度变化不一，整个群落的稳定性明显下降。37 °C 时，无论是 S1 还是 SN 处理，各个 T-RF 相对丰度变化随时间变化较大，古菌群落结构随时间变化不稳定；但 SN 处理土壤的变化较 S1 处理土壤更为紊乱。50 °C 时，尿素的施加对水稻土中古菌的群落结构影响较小，SN 与 S1 处理具有相似的群落变化规律；在培养后期，无论施加尿素与否，T-RF 286 bp 相对丰度明显小于其他 3 个温度。总之，不同温度下尿素的施加，均使 T-RF 188 bp 的丰度减少；且

2.3 土壤的古菌群落分析

本试验提取了 2、5、12、22、36、70 天 6 个采样时间点的土壤样品 DNA，并利用古菌 16S rRNA 基因的 T-RFLP 图谱研究不同温度下尿素对水稻土产甲烷相关古菌的影响。结果如图 5 所示，在整个培养过程中，无论施加尿素与否，土壤均以 T-RF 188 bp 为优势菌，T-RF 395 次之，T-RF 94 bp 也占比较显著的比例。施加尿素后，各个温度下 T-RF 188 bp 的相对丰度有所下降，且尿素的施加影响了水稻土古菌群落的稳定性。15 °C 和 25 °C 中低温时，未施加尿素的土壤处理 S1 古菌群落在培养过程中皆保持相对稳定的状态，T-RF 188 bp 占整个群落的 54% 以上，

在 15 ~ 37 °C，尿素的施加降低了土壤古菌群落的稳定性，而 50 °C 下，尿素对水稻土中古菌群落的稳定性影响较小。

为了进一步分析不同温度下尿素对水稻土古菌群落演替的影响，本文对 16S rRNA 基因的 T-RFLP 结果进行主成分分析，结果如图 6 所示。15 °C、25 °C、37 °C 以及 50 °C 下，施加尿素(SN)与未施加尿素(S1)处理土壤古菌群落组成都较为相似。在 15 °C、25 °C 以及 37 °C 下，S1 处理土壤在不同的培养时间下古菌分布比较集中，而 SN 处理土壤在不同培养时间下古菌分布较散，说明 S1 处理土壤在不同的培养时间下古菌群落结构差异均明显小于 SN 处理。而 50 °C 时，SN 与 S1 处理土壤在不同培

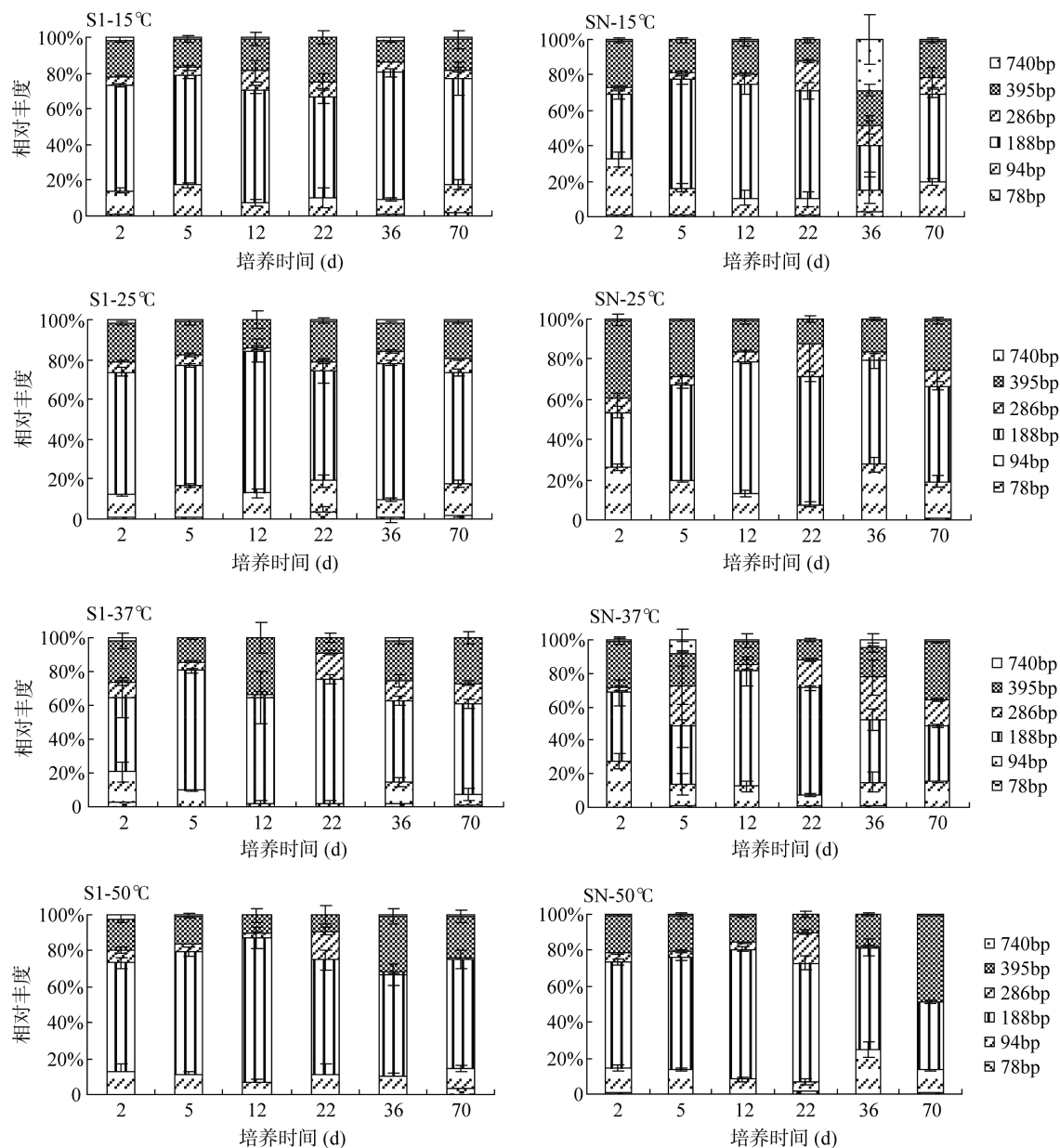


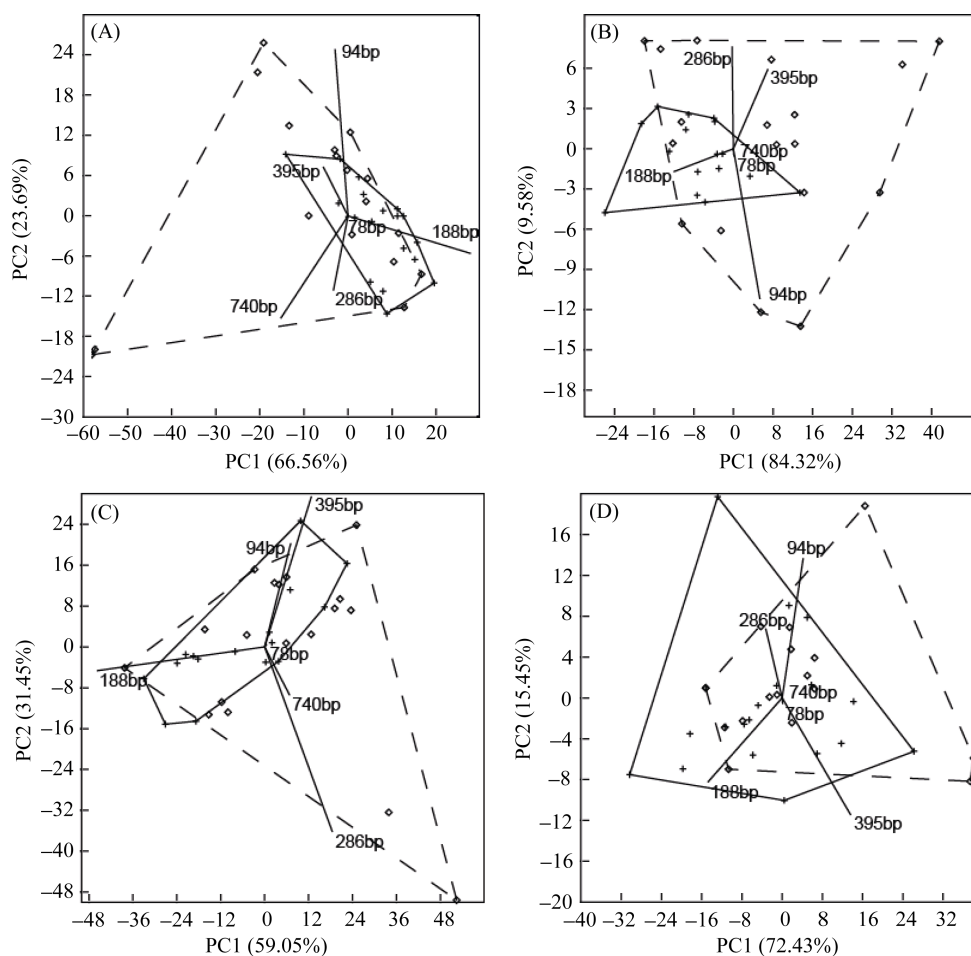
图 5 不同处理下古菌 16S rRNA 基因的 T-RFLP 分析
Fig. 5 T-RFLP analysis of archaeal 16S rRNA gene at different treatments

养时间下古菌分散广度较相似,且在不同培养时间下 SN 处理土壤古菌群落结构差异与 S1 处理比较,差异不显著。说明在 15 ~ 37℃ 范围内,施加尿素增大了不同时间下水稻土古菌群落结构的差异性,而 50℃ 高温下,施加尿素对不同时间水稻土古菌群落结果的差异性无明显影响。通过图 7 可以看出,无论施加尿素与否,37℃ 古菌分散程度均大于其他 3 个温度,说明 37℃ 下水稻土古菌群落结构差异性均大于其他 3 个温度。尿素的施加没有影响群落结构对温度变化所产生的变化。

3 讨论

本研究结果表明,不同温度下尿素对水稻土甲

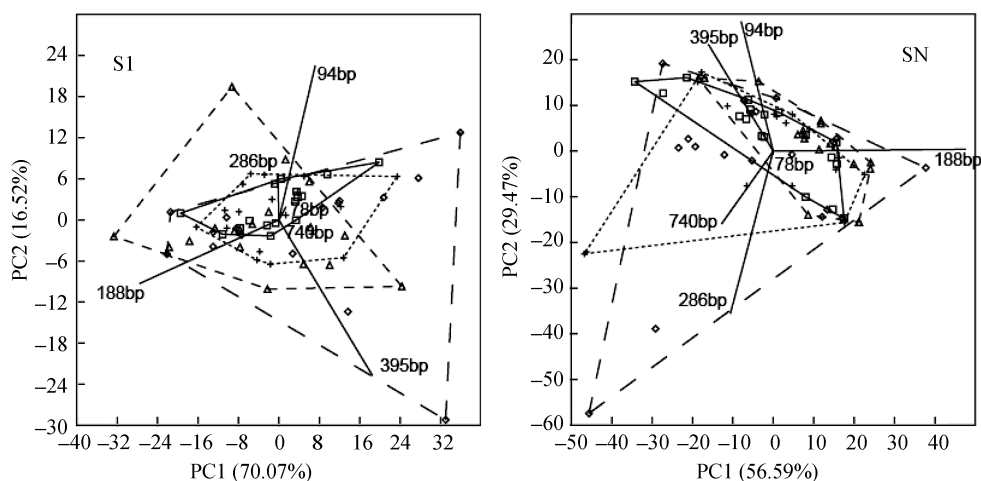
烷产生量的影响不一致。在中低温范围内(15 ~ 37℃),尿素对水稻土产甲烷有抑制作用,高温下(50℃)尿素对水稻土产甲烷无明显影响。这与前人的研究结果不一致。Wang 等^[11]研究表明尿素施用增加了甲烷的产生量,因为尿素水解使得土壤 pH 上升,通过提供更加合适的 pH 条件或者氧化还原电位(Eh)来刺激产甲烷菌的活性(或许是尿素刺激了植物生物量,进而产生更多的根系分泌物和根系残体作为产甲烷前体)。但 Yang 和 Chang^[12]研究表明尿素对甲烷的产生有抑制作用,在尿素浓度为 0 和 N 200 mg/kg 干土时,甲烷产生量没有明显差异,而当尿素浓度增加到 N 300 mg/kg 干土以上时,甲烷产生量明显下降。本



(实线和虚线分别代表为未施加尿素(S1)和施加尿素(SN)两种处理；A、B、C、D 分别代表 15℃、25℃、37℃、50℃处理)

图 6 不同温度下 S1 和 SN 处理土壤古菌 16S rRNA 基因 T-RFLP 的主成分对比图

Fig. 6 The comparison of the principal component based on the T-RFLP profile of archaeal 16S rRNA gene between S1 and SN at different temperatures



(十字形、方形、菱形、三角形坐标点分别代表 15℃、25℃、37℃、50℃)

图 7 同一土壤不同温度下古菌 16S rRNA 基因 T-RFLP 的主成分对比图

Fig. 7 The comparison of the principal component based on the T-RFLP profile of archaeal 16S rRNA gene among different temperatures in the same soil

研究所用的尿素浓度为 $N\ 400\ \text{mg/kg}$ 干土, 在中低温下该浓度对甲烷产生有抑制作用。有研究表明氮肥对

甲烷产生的影响受控于有机质尤其是有机碳的影响, 有机质含量越高, 土壤的产甲烷潜能就越强^[18]。本

研究中,土壤有机碳的含量均比较稳定,有机碳对各个处理甲烷产生量变化无直接关系。另外,无机氮肥(铵盐或者硝酸盐),可通过刺激植物的生长,促进植株凋落物和根系分泌物的增加为甲烷产生提供更多的前体机质,从而提高甲烷产生量^[19]。但本研究中,在整个培养过程中,各个温度下土壤上清液以及浸提液的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度在施加尿素后有明显增加,并没有促进甲烷的产生。其原因可能是本研究是在没有植物参与的情况下进行,尽管尿素的施加提高了土壤无机氮的浓度,但是这些无机氮并没有被植物吸收,尿素的施加对甲烷产生的前体机质影响并不大。而在有机碳含量差异不大的情况下,当温度升高时,产甲烷量增大,可能与产甲烷微生物对温度的依赖性有关。研究表明水稻土甲烷的产生和排放在微生物以及生态系统的尺度上对温度都表现出相一致的依赖性^[6]。温度上升使产甲烷微生物活性加大,从而导致产甲烷量增大。

水稻土甲烷排放受生物因子以及非生物因子共同影响^[20]。温度是影响厌氧水稻土产甲烷的重要环境因子之一。在本研究中,无论施加尿素与否,当温度升高时,甲烷产量也增大。不同温度下,施加尿素与不施加尿素水稻土与产甲烷相关的古菌群落结构有明显差异。土壤 pH 是影响微生物群落和活性的重要环境因子。甲烷产生的最适合 pH 为中性^[21],本研究中尿素水解使土壤 pH 有一定的波动,这种波动可能是影响甲烷产生量的因素之一,同时 pH 波动影响了产甲烷古菌群落结构。不同的产甲烷古菌有不同的 pH 范围和最适 pH^[22]。从直观角度来看,本研究中在 15~37℃ 范围内,施加尿素后土壤 pH 的不稳定可能是水稻土古菌群落不稳定以及群落结构差异性增大的直接原因。当温度升高到 50℃ 时,尿素的施加,不会引起土壤古菌群落结构稳定性下降以及差异性增大等现象,除了与其 pH 的波动幅度变小有关外,还需综合多因素考虑。从生态学角度来分析,在 15~37℃ 范围内,尿素对水稻土古菌群落结构稳定性的影响,可能与产甲烷菌生态位的改变有关。产甲烷古菌生态位的改变,是由于微生物的新陈代谢、与基质的亲和力、对环境的忍耐力以及对微生物生长速率的适应性等因素有关^[23]。尿素的施加,直接引起土壤 pH 以及 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度等环境因子的改变。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 是微生物可利用的有效氮素形态之一,影响微生物的生长繁殖^[14]。这些因素的改变很可能影响了产甲烷古菌在土壤中的生态位,使得施加尿素后土壤古菌群落的稳定性下降,从而影响了产甲烷量。从微生物学角度出发,尿素施用可能是通过降低产甲烷

菌的活性来抑制甲烷产生。本研究中施加尿素,使培养过程中土壤 pH 波动较大,并在培养过程中均有下降。Liu 等^[24]研究表明,长期施用氮肥,显著降低土壤 pH,导致土壤微生物量和活性显著降低。同时,尿素水解产生 $\text{NH}_4^+\text{-N}$,当 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度过高时,产甲烷活性受到抑制。何世钧等^[25]在研究 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 对厌氧颗粒污泥产甲烷活性的影响时发现,适量的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度可促进甲烷产生,当 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度过高时,明显抑制产甲烷活性。本研究结果表明,尿素的施加,抑制了甲烷的产生还可能与尿素施用引起 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 挥发成 NH_3 , NH_3 导致产甲烷活性下降等有关。曹金留等^[26]研究表明,稻田施用尿素后,施氮量的 40% 通过 NH_3 挥发损失。关于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 对产甲烷菌活性的影响,研究表明高浓度的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 NH_3 对产甲烷菌均有抑制作用。Lay 等^[27]研究结果显示,在良好驯化的微生物系统中,在 pH 6.5~8.5 范围内,产甲烷菌的活性随 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度增大而降低;在未经驯化的微生物系统中,产甲烷菌的活性主要受 NH_3 影响,游离 NH_3 有毒,对产甲烷菌有毒害作用。在本研究中,施加尿素后,水稻土 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度或者 NH_3 浓度均高于未施加尿素处理,这可能是导致产甲烷菌活性降低,从而抑制甲烷产生的原因之一。而 50℃ 高温施加尿素下,虽然 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度高于其他温度,但对甲烷产生的影响不明显,可能与高温微生物对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 NH_3 的耐受能力有关。Lay 等^[27]研究还发现,高温微生物耐受 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 NH_3 的能力是中低温微生物的两倍。在水稻全生育期内,施用尿素对甲烷的产生有抑制作用,并推迟了产甲烷达最大值的时间,且其试验土壤的 pH 与本研究土壤 pH 较为接近,均在 7~8,因此可能是高浓度 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 降低了产甲烷菌的活性导致^[13]。而 Wang 等^[11]研究发现,尿素通过提高 pH,提供更加合适的 pH 条件或者氧化还原电位(Eh)来刺激产甲烷菌的活性从而促进甲烷的产生。其试验土壤 pH 为 5.7,施加尿素后使 pH 上升,而本研究土壤 pH 为 7.8,培养过程中施加尿素后土壤 pH 的变化与之有差异,pH 的差异有可能是导致研究差异的因素之一。因此尿素对水稻土产甲烷的影响因土质而异。

在 37℃ 下,即使不施加尿素,土壤古菌群落稳定性也有所下降,可能与 37℃ 条件下水稻土产甲烷途径的改变相呼应。在低温条件下,产甲烷菌以利用乙酸代谢途径产生甲烷,中温条件下,产甲烷菌同时利用乙酸代谢和 H_2/CO_2 还原两种途径产生甲烷,高温条件下,产甲烷途径以只利用 CO_2 还原途径为主^[3]。在 Conrad 等^[28]研究中也表明,温度从中温向高温转变时(35~46℃),产甲烷途径由氢营养型

和乙酸代谢两条途径同时存在转化为只通过氢营养型产甲烷的唯一途径。在较高温度下,嗜热型产甲烷古菌对 H_2 的亲合力增加^[29],从而抑制同型产乙酸菌的代谢,有利于氢营养型方式产甲烷。Lu 和 Conrad^[30]研究发现,在 50℃ 条件下,几乎所有的甲烷均产生于氢型产甲烷途径。因此在 50℃ 高温下,随着培养时间的延长,氢营养型方式产甲烷可能成为唯一的产甲烷方式^[28,31-32]。本研究中 37℃ 下,无论施加尿素与否,水稻土产甲烷古菌群落结构变化较大响应了此时产甲烷代谢途径的变化。50℃ 高温下,产甲烷代谢途径唯一性的结论与水稻土古菌群落结构较稳定相呼应,而尿素的施加,对这种稳定性并没有多大影响。比较 37℃ 和 50℃ 产甲烷情况发现,培养前期 37℃ 产甲烷量大于 50℃,培养后期这种局势明显逆转,其原因可能是嗜热型产甲烷古菌需要一定时间来激活^[31]。尿素的施加并没有影响这种机制。

将本研究中 T-RFLP 结果与微生物种类联系起来,参考相关文献^[33-34]得出 T-RF 78 bp 与古菌 RC-V 相关, T-RF 94 bp 属于甲烷杆菌科(Methanobacteriaceae), T-RF 188 bp 则可能属于甲烷八叠球菌科(Methanosarcinaceae), T-RF 286 bp 属于甲烷鬃毛菌科(Methanosaetaceae), T-RF 395 bp 属于 Methanocellaceae, T-RF 740 bp 也与泉菌门(Crenarchaeota)相关。本研究水稻土古菌群落以常见的产甲烷菌属如甲烷八叠球菌(Methanosarcinaceae)、甲烷杆菌(Methanobacteriaceae)、甲烷鬃菌(Methanosaetaceae)和 Methanocellaceae 为主。无论施加尿素与否,在整个试验培养周期中,水稻土都以甲烷八叠球菌(Methanosarcinaceae)为优势菌。甲烷八叠球菌(Methanosarcinaceae)既能利用乙酸途径又能利用 H_2/CO_2 途径产甲烷^[7]。因此在整个培养过程中,随着温度的改变,其优势性并没有改变。但尿素施加后,降低了甲烷八叠球菌(Methanosarcinaceae)的丰度,这可能是引起甲烷产生量减少的原因之一。甲烷鬃菌(Methanosaetaceae)只利用乙酸型途径产甲烷^[35],本研究中培养后期,无论是否施加尿素,50℃ 下甲烷鬃菌(Methanosaetaceae)的丰度明显小于其他 3 个温度,其丰度几乎降到 0。这结果说明高温下乙酸型途径渐渐被氢营养型途径取代,而尿素的施加并没有影响这种代谢途径的转变,同时说明微生物群落结构的变化与产甲烷代谢途径的改变密切相关。据本研究在较高温度(37~50℃)下 S1 和 SN 处理水稻土群落结构的差异情况得出,尿素的施加,对产甲烷代谢途径的改变并没有多大影响。

4 结论

本研究结果表明,尿素对水稻土产甲烷的影响因温度而异。在中低温(15~37℃)下,尿素抑制水稻土产甲烷,而在高温(50℃)条件下,尿素对水稻土产甲烷无影响。尿素可能通过影响水稻土产甲烷古菌群落结构的稳定性来影响产甲烷。尿素的施加,降低了水稻土中甲烷八叠球菌(Methanosarcinaceae)的丰度,且尿素对水稻土产甲烷古菌群落结构影响因温度而异。在 15~37℃ 下,尿素降低了水稻土产甲烷古菌群落的稳定性,增大了不同培养时间产甲烷古菌群落结构的差异性,而 50℃ 高温时,尿素对水稻土产甲烷古菌群落结构影响不大;且随着温度的改变,尿素对水稻土产甲烷途径的转变可能没有影响。

参考文献:

- [1] IPCC. Climate Change 2007—the Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the FOURTH ASSESSMENT Report of the IPCC[M]. Cambridge University Press, 2007
- [2] IPCC. Climate Change 2007: Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry[M]. Cambridge University Press, 2007
- [3] 吴美容, 张瑞, 周俊, 谢欣欣, 雍晓雨, 闫志英, 葛明民, 郑涛. 温度对产甲烷菌代谢途径和优势菌群结构的影响[J]. 化工学报, 2014, 65(5): 1 602–1 606
- [4] Khalil MAK, Rasmussen RA, Shearer MJ, Dalluge RW, Ren L, Duan CL. Factors affecting methane emissions from rice fields[J]. Journal of Geophysical Research: Atmospheres (1984–2012), 1998, 103(D19): 25 219–25 231
- [5] 左剑恶, 邢薇. 嗜冷产甲烷菌及其在废水厌氧处理中的应用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(9): 2 127–2 132
- [6] Yvon-Durocher G, Allen AP, Bastviken D, Bastviken D, Conrad R, Gudas C, St-Pierre A, Del-Giorgio PA. Methane fluxes show consistent temperature dependence across microbial to ecosystem scales[J]. Nature, 2014, 507(7493): 488–491
- [7] Chin KJ, Lukow T, Stubner S, Conrad R. Structure and function of the methanogenic archaeal community in stable cellulose degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30℃)[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30(4): 313–326
- [8] Calli B, Mertoglu B, Roest K, Inanc B. Comparison of long-term performances and final microbial compositions of anaerobic reactors treating landfill leachate[J]. Biore-source Technology, 2006, 97(4): 641–647
- [9] Kruger M, Frenzel P. Effects of N-fertilisation on CH_4 oxidation and production, and consequences for CH_4 emissions from microcosms and rice fields[J]. Global Change Biology, 2003, 9(5): 773–784
- [10] Bodelier PLE, Hahn AP, Arth IR, Frenzel P. Effects of ammonium-based fertilisation on microbial processes involved in methane emission from soils planted with rice[J]. Biogeochemistry, 2000, 51(3): 225–257

- [11] Wang Z, Delaune RD, Lindau CW, Patrick JWH. Methane production from anaerobic soil amended with rice straw and nitrogen fertilizers[J]. *Fertilizer Research*, 1992, 33(2): 115–121
- [12] Yang SS, Chang HL. Effect of environmental conditions on methane production and emission from paddy soil[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 1998, 69(1): 69–80
- [13] 张广斌, 马静, 马二登, 徐华, 蔡祖聪. 尿素施用对稻田土壤甲烷产生、氧化及排放的影响[J]. *土壤*, 2010, 42(2): 178–183
- [14] Schimel J. Global change: Rice, microbes and methane. *Nature*, 2000, 403(6768): 375–377
- [15] 李志鹏, 潘根兴, 李恋卿, 张旭辉, 林凡. 水稻土和湿地土壤有机碳测定的 CNS 元素分析法与湿消化容量法之比较[J]. *土壤*, 2008, 40(4): 580–585
- [16] Murase J, Noll M, Frenzel P. Impact of protists on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72(8): 5 436–5 444
- [17] Qiu QF, Noll M, Abraham WR, Lu YH and Conrad R. Applying stable isotope probing of phospholipid fatty acids and rRNA in a Chinese rice field to study activity and composition of the methanotrophic bacterial communities in situ[J]. *ISME Journal*, 2008, 2: 602–614
- [18] 丁维新, 蔡祖聪. 氮肥对土壤甲烷产生的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(3): 380–383
- [19] Bodelier PLE. Interactions between nitrogenous fertilizers and methane cycling in wetland and upland soils[J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2011, 3(5): 379–388
- [20] Bao QL, Xiao KQ, Chen Z, Yao HY, Zhu YG. Methane production and methanogenic archaeal communities in two types of paddy soil amended with different amounts of rice straw[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 88(2): 372–385
- [21] Wang ZP, Delaune RD, Patrick WH, Masscheleyn PH. Soil redox and pH effects on methane production in a flooded rice soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1993, 57(2): 382–385
- [22] Lü Z, Lu Y. *Methanocella conradii* sp. nov., a thermophilic, obligate hydrogenotrophic methanogen, isolated from Chinese rice field soil[J]. *PloS One*, 2012, 7(4): e35279
- [23] Conrad R. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs[J]. *Advances in Agronomy*, 2007, 96: 1–63
- [24] Liu E, Yan C, Mei X, He W, Bing SH, Ding L, Fan T. Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in northwest China[J]. *Geoderma*, 2010, 158(3): 173–180
- [25] 何仕均, 王建龙, 赵璇. 氨氮对厌氧颗粒污泥产甲烷活性的影响[J]. *清华大学学报: 自然科学版*, 2005, 45(9): 1 294–1 296
- [26] 曹金留, 田光明, 任立涛, 蔡祖聪, 何任红. 江苏南部地区稻麦两熟土壤中尿素的氨挥发损失[J]. *南京农业大学学报*, 2000, 23(4): 51–54
- [27] Lay JJ, Li YY, Noike T, Endo J, Ishimoto S. Analysis of environmental factors affecting methane production from high-solids organic waste[J]. *Water Science and Technology*, 1997, 36(6): 493–500
- [28] Conrad R, Klose M, Noll M. Functional and structural response of the methanogenic microbial community in rice field soil to temperature change[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1 844–1 853
- [29] Conrad R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 28: 193–202
- [30] Lu Y, Conrad R. In situ stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere[J]. *Science*, 2005, 309(5737): 1 088–1 090
- [31] 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[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2004, 68(2): 293–306
- [32] Wu XL, Friedrich MW, Conrad R. Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic archaea in temperate anoxic soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8: 394–404
- [33] Peng J, Lü Z, Rui J, Lu Y. Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2008, 74(9): 2 894–2 901
- [34] Chin KJ, Lueders T, Friedrich MW, Klose M, Conrad R. Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 47(1): 59–67
- [35] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Syutsubo K, Ohashi A, Harada H, Nakamura K. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis[J]. *Microbiology*, 1998, 144(9): 2 655–2 656

Effect of Urea Fertilizer on Methane Production and Methanogenic Archaeal Community Structure in Paddy Soil at Different Temperatures

HU Yue-hang, WEI Meng, XU Jian-gang, QIU Qiong-fen*

(School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

Abstract: As the second largest greenhouse gas, methane production and emission have great effect on global warming and carbon cycle in the ecosystem. Paddy soil is one of the main sources of atmospheric methane. Urea fertilizer which affects yield and quality of rice plays an important role in regulation methane emission flux. In order to study the effect of urea fertilizer on methane production and methanogenic archaeal community structure at different temperatures, the neutral paddy soils were incubated under anaerobic condition with urea of 0 and N 400 mg/kg at 15°C, 25°C, 37°C and 50°C for 100 days. The cumulant of methane-production and soil characteristics such as pH, organic carbon and nitrogen of ammonium were detected during the incubation. The shifts of methanogenic archaeal community structure with incubation time in different treatments were analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis based on archaeal 16S ribosomal RNA gene. The results showed that urea fertilizer inhibited methane production in paddy soil at low or medium temperature (15°C – 37°C), while had no effect on the accumulated methane production at high temperature (50°C). Urea may influence methane production by altering the community structure of methane-producing archaea. Urea fertilizer decreased the stability and increased the diversity of methanogenic archaeal community structure with incubation time in the range from 15°C to 37°C. But there was un conspicuous influence of urea fertilizer on methanogenic archaeal community structure at 50°C. The result of T-RFLP indicated that urea reduced the relative abundance of *Methanosarcinaceae* under these four experimental temperatures. Urea possibly had nothing to do with the changes of methane-producing mechanism as temperature changed.

Key words: Paddy soil; Urea; Methane; Archaea; T-RFLP