

双季稻田甲烷排放与土壤产甲烷菌群落结构和数量关系研究

李大明^{1,2}, 成艳红^{1,2}, 刘满强¹, 秦江涛³, 焦加国¹, 李辉信¹, 胡 锋^{1*}

(1.南京农业大学资源与环境科学学院土壤生态实验室, 南京 210095; 2.国家红壤改良工程技术研究中心, 江西省红壤研究所, 南昌 331717; 3.中科院南京土壤研究所, 南京 210008)

摘 要: 为揭示南方双季稻田甲烷排放与土壤产甲烷菌群落结构和数量的关系, 监测了双季稻田甲烷排放规律, 并采用 PCR-DGGE 和荧光原位杂交法(FISH)分别分析了水稻不同生育期土壤产甲烷菌群落结构和数量的变化特征。结果表明:早晚稻生育期内的甲烷排放总量分别为 $9.28 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 和 $7.78 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 。早晚稻生育期内产甲烷菌的群落结构和种群数量均存在一定的季节变化, 以水稻生长旺盛期群落结构复杂、数量多, 其中水稻移栽 20 d 左右土壤产甲烷菌数量最多, 早、晚稻分别为 1.14×10^7 个 $\cdot \text{g}^{-1}$ 干土和 6.72×10^6 个 $\cdot \text{g}^{-1}$ 干土, 均显著高于当季其他生育期。早稻生育期内产甲烷菌的群落结构多样性比晚稻复杂, 数量比晚稻多, 这与双季稻田的甲烷排放规律一致。稻田甲烷排放量与稻田土壤产甲烷菌的数量存在显著的正相关关系, 而与群落结构没有显著相关性。因此, 控制稻田产甲烷菌数量可以有效减少甲烷的排放量。

关键词: 稻田; 甲烷排放; 产甲烷菌; 群落结构; 种群数量

中图分类号: S154.36 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)04-0866-08 doi:10.11654/jaes.2013.04.030

Relationship Between Methane Emission and the Community Structure and Abundance of Methanogens Under Double Rice Cropping System

LI Da-ming^{1,2}, CHENG Yan-hong^{1,2}, LIU Man-qiang¹, QIN Jiang-tao³, JIAO Jia-guo¹, LI Hui-xin¹, HU Feng^{1*}

(1. Soil Ecology Lab, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. National Engineering and Technology Research Center for Red Soil Improvement, Jiangxi Institute of Red Soil, Nanchang 331717, China; 3. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: A field experiment was carried out to study the relationship between methane emission and the community structure and abundance of methanogens under a double rice cropping system in Southern China. Several relevant parameters were measured including methane emission determined by closed static chamber technique, community structure of methanogens by PCR denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and the population of methanogens by fluorescence in situ hybridization (FISH). The results showed that the amounts of methane emission were $9.28 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ and $7.78 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ at early and late rice growing stage, respectively. The community structure and abundance of methanogens changed greatly with rice growing period for both early and late rice, but the main methanogens species existed in paddy field sostenuto. The diversity and abundance of methanogens in vigorous rice growing stage (20 days after rice transplanting) were higher than other stages. The peak abundance of methanogens were $1.14 \times 10^7 \text{ In} \cdot \text{g}^{-1}$ dry soil and $6.72 \times 10^6 \text{ In} \cdot \text{g}^{-1}$ dry soil for early and late rice growing season, respectively; which was significantly higher than other growing stages in the same growing season. The diversity and abundance of methanogens of early rice was higher than that of late rice, consistent with the methane emission pattern. The methane emission was significantly correlated with the abundance of methanogens, however, there was no significant correlation with the diversity of methanogens. In conclusion, reducing the abundance of methanogens will be an effective way to reduce the methane emission in paddy field.

Keywords: paddy field; methane emission; methanogens; community structure; population abundance

收稿日期: 2012-10-16

基金项目: 国家自然科学基金(31170487); 公益性行业(农业)科研专项(200903011 和 201003016); 江苏省高校优势学科建设工程项目

作者简介: 李大明(1984—) 男, 江苏宿迁人, 博士, 主要从事农田碳循环、农业废弃物循环利用和植物营养方面的研究。E-mail: did_2005@126.com

* 通信作者: 胡 锋 E-mail: fenghu@njau.edu.cn

产甲烷菌在稻田甲烷产生的过程中发挥着重要作用,其群落结构和种群数量的变化历来受到研究者的关心。随着微生物分析方法和技术的发展,国外研究者开始借助分子生物学手段研究稻田产甲烷菌的群落结构和种群数量变化特征,并已经取得了初步成果^[1-3]。我国作为全球最主要的水稻栽培国家之一,对稻田产甲烷菌的研究起步很早,但主要以选择性培养基培养进行产甲烷菌数量研究为主,相应的分子生物学方法则处在起步阶段^[4-6]。因此,急需采用较为准确的分析方法对稻田产甲烷菌的数量和群落结构进行深入研究。同时,以往的研究很少将甲烷排放速率与产甲烷菌群落结构和种群数量联系起来。本研究采用PCR-DGGE法和荧光原位杂交法(FISH, Fluorescence in situ hybridization)对我国南方双季稻稻田土壤产甲烷菌群落结构和种群数量的季节变化特征进行研究;同时,结合稻田甲烷排放速率的监测结果,分析稻田甲烷排放规律与产甲烷菌群落结构和数量的关系,旨在为揭示微生物在甲烷产生和排放过程中的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验地概况及土壤样品采集

本研究采用江西省鹰潭市余江县邓家埠水稻原种场内设置的水分控制试验中常规淹水处理的3个试验小区,小区内除特殊生育期外保持淹水状态^[7]。水稻栽培制度为稻-稻-冬闲,早稻品种为金早47(籼稻),4月27日移栽,6月14日75%齐穗,7月18日收割;晚稻品种为中选10号(杂交稻),7月26日移栽,9月17日75%齐穗,11月2日收割。移栽密度 $18\text{穴}\cdot\text{m}^{-2}$,每穴2~3株。整田后施用基肥(由尿素、过磷酸钙和氯化钾混合组成),施用量分别为纯N $11.25\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ 、 P_2O_5 $9\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ 、 K_2O $7.5\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ 。在分蘖和抽穗期以前两次施用追肥,用量分别为纯N $4.5\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ 和 $6.75\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$,早晚稻的施肥措施相同。生育期内施用除草剂和有机磷农药去除杂草和控制病虫害,旱作处理辅以人工除草。

该地区多年年平均气温为 17.6℃ ,年均降雨量和蒸发量分别为 1752.1mm 和 1359mm 。试验地土壤属于河流冲积土发育而成的潴育型水稻土,土壤有机质含量 $25.5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全N $1.54\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,有效N $95.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,有效P $16.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,pH 5.5。

进行微生物指标分析的土壤样品分别采自水稻不同生育期(间隔20d左右),每个小区7~8个点,样

品采集后用保温箱保存,去除秸秆、石子等杂物后,尽快进行土壤微生物的分析,如不能及时分析则将样品保存在 -20℃ 冰箱内。

1.2 甲烷排放通量的测定

稻田甲烷排放通量采用静态箱-气相色谱法。采样箱由PVC材料制成,规格 $50\text{cm}\times 50\text{cm}\times 50\text{cm}$ (水稻生长后期用 $50\text{cm}\times 50\text{cm}\times 110\text{cm}$ 箱体),于水稻栽插前将PVC底座($60\text{cm}\times 60\text{cm}\times 15\text{cm}$)固定于土壤中,测定时注水入底槽加以密封,箱体顶部安置小风扇以充分混合箱内气体。根据试验小区处理的重复设置,采用3箱体平行采样,采样时间分别为关箱后的0、5、10、15 min,每次抽取气样20 mL,并记录密闭箱内的温度。所有气体采集在9:00—11:00之间完成^[8-9]。

田间采集的气体样品采用Agilent 7890D气相色谱仪分析 CH_4 排放通量。

CH_4 的排放通量计算式为:

$$F=60H\frac{16\times 1.013}{8.314\times(273+T)}\frac{dC}{dt} \quad (1)$$

式中: F 为 CH_4 的排放通量 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$;常数60为时间换算,将分钟转换为小时; H 为采样箱的有效高度,m; T 为采样时箱内平均气温, $^{\circ}\text{C}$; dC/dt 为 CH_4 排放速率 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ^[10]。

甲烷的排放总量采用最小二乘法累加进行计算,甲烷排放的平均速率为生育期内排放总量与生育期总天数的比值。

1.3 稻田土壤产甲烷菌群落结构的变化特征测定

土壤微生物基因组DNA提取采用SDS裂解法,并采用Axygen琼脂糖凝胶回收试剂盒回收和纯化。

产甲烷菌扩增引物为^[2]:

1106F(5'-TTW AGT CAG GCA ACG AGC-3')

1378R(5'-TGT GCA AGG AGC AGG GAC-3')

扩增条件:94℃预变性90s,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸90s,35个循环,最后72℃延伸3 mins^[2]。

DGGE条件:80 V电压下电泳16 h,变性浓度为32%~62%^[2]。

PCR-DGGE图谱采用Bio-Rad公司的Quantity One软件分析,利用Shannon-Wiener多样性指数来评价水稻不同生育期产甲烷菌的多样性水平,采用均匀度指数来评价水稻不同生育期产甲烷菌的均匀性,参数的具体计算方法参见文献^[11]。

1.4 稻田产甲烷菌数量研究

稻田产甲烷菌数量采用荧光原位杂交法进行测定。根据以往的文献报道以及产甲烷菌的系统发育树选择以下几种主要的产甲烷菌探针类型(表 1)对土壤中的产甲烷菌进行定量研究,探针购自 TakaRa 公司,采用荧光染料 Cy3 进行标记。荧光原位杂交法步骤、检测及图像处理方法详见文献[7,12-13]。

1.5 统计分析

所有数值的平均值和标准差采用 Excel 2003 计算获得。不同生育期产甲烷菌数量的差异采用单因素方差分析进行比较(Duncan 法 $P<0.05$)。甲烷排放量与产甲烷菌群落结构和数量的关系采用 SPSS 16.0 的相关分析进行分析,其中数值采用不同生育期的排放总量(与前后两次土壤样品采集时间的中间点为界限,采用最小二乘法进行累加)与这一时期的产甲烷菌群落结构多样性和数量的对应值。

2 结果与分析

2.1 双季稻田甲烷排放速率季节变化特征

双季稻稻田甲烷排放的峰值都出现在水稻移栽后的很短时间内(10~15 d),而后甲烷的排放速率迅速下降,并维持在较低水平,在早稻生长的后期,甲烷

排放有个较为明显的次峰,但是在晚稻生育后期甲烷排放始终保持在较低水平(图 1)。早稻生育期的甲烷排放总量为 $9.28\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$,而晚稻为 $7.78\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ 。早稻生育期的甲烷排放量高于晚稻,主要是由当地双季稻的栽培模式造成的,晚稻收获后会有将近 5 个月的休耕期,为下一季早稻的甲烷排放提供了充足的碳源,而经历早稻生长季之后,微生物可利用有机碳含量相应减少,最终造成甲烷产生的基质相应减少。

2.2 双季稻稻田产甲烷菌的群落结构季节变化特征

早稻不同生育期土壤产甲烷菌的 DGGE 图谱如图 2 所示,图中代表不同产甲烷菌种类的条带离散分布,在所有的泳道中箭头所示的七条条带均很明显,但是亮度有所差异。这表明七个条带所代表的产甲烷菌为主要的产甲烷菌类群,且在各个生育期均大量存在于稻田土壤中,但是不同生育期可提取的 DNA 量存在差异。除了主要的条带以外,DGGE 图谱中还有很多可见的条带,不同泳道中这些条带的数量有差异,亮度也有明显差异,这也说明在水稻的不同生育期产甲烷菌的群落结构存在一定的差异。

从基因多样性指数来看,在早稻的生育期内以移栽后 40 d 的丰富度最高为 27,以早稻收获后的丰富度最小为 16。在早稻的生育期内,水稻移栽 40 d 后,

表 1 试验中所选用的探针类群及碱基序列号^[14]
Table 1 The probe kinds and probe sequence used in this experiment

探针	专性类群	探针序列
MB310	<i>Methanobacteriales</i> 甲烷杆菌属	CTTGTCTCAGGTTCCATCTCCG
MX825	<i>Methanosaeta</i> 甲烷鬃菌属	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC
MG1200	<i>Methanogenium-related</i> 产甲烷菌相关菌	CGGATAATTCTTGGCATGCTG
MS821	<i>Methanosarcina</i> 甲烷八叠球菌属	CGCCATGCCTGACACCTAGCGAGC

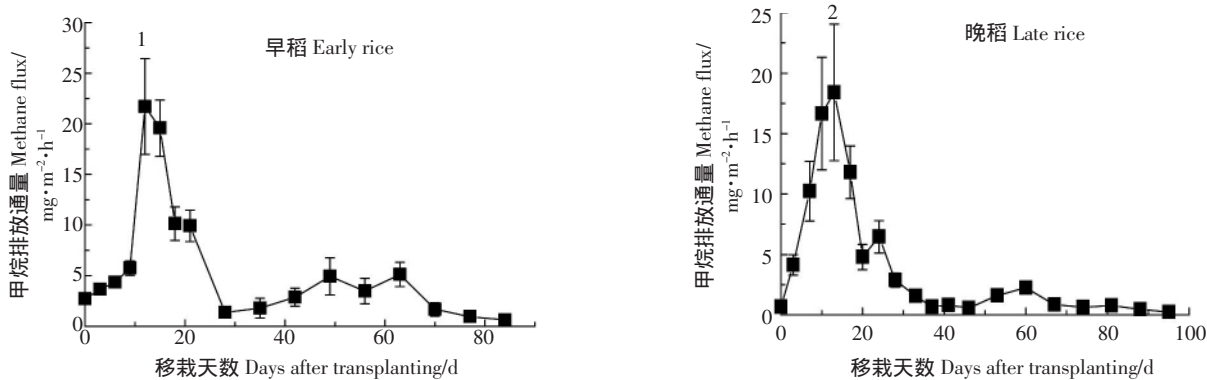
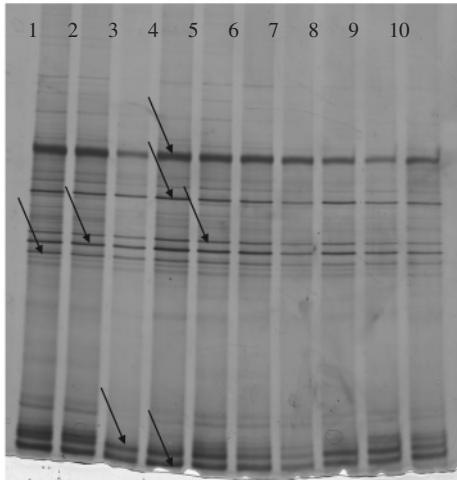


图 1 双季稻稻田甲烷排放季节动态($n=3$,平均值±标准差,下同)

Figure 1 Seasonal pattern of methane emission under double-rice cropping system($n=3$, mean $\pm$ S.D., the same below)



1-2 早稻移栽前 (Before early rice transplanting) ;
3-4 早稻移栽后 20 d (20 days after transplanting) ;
5-6 早稻移栽后 40 d (40 days after transplanting) ;
7-8 早稻移栽后 61 d (61 days after transplanting) ;
9-10 早稻收获时 (After early rice harvesting)

图 2 早稻不同生育期产甲烷菌群落结构 DGGE 图谱

Figure 2 DGGE pattern at different rice growing stage of early rice

产甲烷菌的 Shannon-Wiener 多样性指数达到最大, 而后又逐渐下降, 在水稻收获时达到最小。与多样性指数一样, 稻田产甲烷菌的均匀度也是在移栽 40 d 后达到最大, 在收获时达到最小(表 2)。

和早稻一样, 晚稻产甲烷菌的 DGGE 图谱中代

表 2 双季稻田土壤产甲烷菌群落基因多样性指数

Table 2 Genetic diversity indices of methanogens under double-rice cropping system

项目	移栽天数 Sampling times/d	丰富度 Richness	多样性指数 Shannon-Wiener Diversity index	均匀度 Evenness
早稻 Early rice	0	26a	3.09a	0.948ab
	20	23ab	2.84ab	0.912b
	40	27a	3.23a	0.979a
	61	18b	2.73b	0.954a
	84	16b	2.43b	0.876b
	平均	22	2.86	0.934
晚稻 Late rice	0	14c	2.31b	0.877b
	21	24a	2.95a	0.934a
	43	21ab	2.85a	0.936a
	66	19b	2.84a	0.964a
	91	15bc	2.35b	0.869b
	平均	19	2.66	0.916

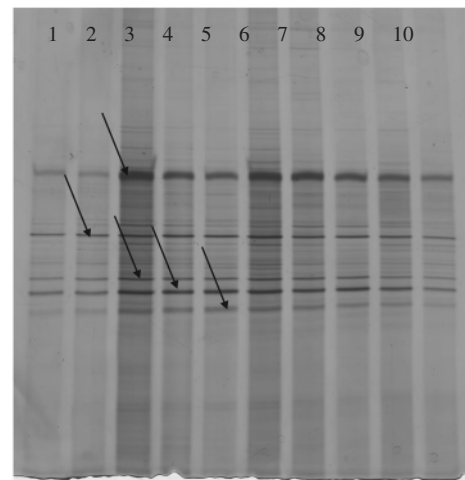
注: 不同字母代表差异达到显著性 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters indicate statistical significance at the $P = 0.05$ level (Duncan's method).

表不同产甲烷菌种类的条带也离散分布(图 3)。在胶片的中间有五条较为明显的条带, 这些条带出现的位置与早稻的基本一致, 亮度的差异要大于早稻, 但是出现在胶片下部的两个明显的条带却消失了。这说明经历了早稻的生长之后, 稻田中主要的产甲烷菌仍然大量存在于稻田中, 但是也有一部分优势种群减弱。和早稻一样, DGGE 图谱的各个泳道中也存在其他可见的条带, 不同泳道中这些条带的数量有差异, 亮度也有明显差异, 说明在晚稻的不同生育期产甲烷菌的群落结构也存在着较为明显的差异。

从基因多样性指数来看, 在晚稻的生育期内水稻移栽后 21 d 的产甲烷菌的丰富度达到最高为 24, 到收获时的丰富度最小为 15。在晚稻移栽 21 d 后, 产甲烷菌的 Shannon-Wiener 多样性指数达到最大为 2.95, 而后又逐渐下降, 在水稻收获时达到最小为 2.35。而产甲烷菌的均匀度则是在水稻移栽后 66 d 达到最高为 0.964, 在收获时达到最小为 0.869(表 2)。

早稻与晚稻相比, 早稻的丰富度最大时为 27, 最小时为 16, 平均为 22, 而晚稻的对应指标分别为 24、15 和 19, 有一定程度的下降。就 Shannon-Wiener 多样性指数来说, 早稻的最大值、最小值以及平均值分别为 3.23、2.43 和 2.86; 而晚稻相对应的值分别为 2.95、2.31 和 2.66, 也有一定程度的下降。均匀度指数也表现出相同的趋势, 说明早稻生育期内的产甲烷菌的群落结构复杂性和均匀性均要高于晚稻。



1-2 晚稻移栽前 (Before late rice transplanting) ;
3-4 晚稻移栽后 21 d (21 days after transplanting) ;
5-6 晚稻移栽后 43 d (43 days after transplanting) ;
7-8 晚稻移栽后 66 d (66 days after transplanting) ;
9-10 晚稻收获时 (After late rice harvesting)

图 3 晚稻不同生育期产甲烷菌群落结构 DGGE 图谱

Figure 3 DGGE pattern at different rice growing stage of late rice

2.3 双季稻田产甲烷菌数量季节变化特征

早稻生育期内,土壤产甲烷菌的数量在水稻移栽后迅速增加且在移栽后 20 d 时达到最大为 1.15×10^7 个 $\cdot$ g $^{-1}$ 干土,而后逐渐降低,在水稻收获时达到最少为 6.28×10^6 个 $\cdot$ g $^{-1}$ 干土(图 4)。其中在水稻移栽 20 d 时,产甲烷菌的总数显著高于水稻的其他生长时期产甲烷菌的数量,而其他生育期之间产甲烷菌的数量没有显著的差异。

晚稻生育期内产甲烷菌数量的变化如图 4 所示。晚稻生育期内,产甲烷菌的总数也是在水稻移栽 20 d 左右达到最大值 7.75×10^6 个 $\cdot$ g $^{-1}$ 干土,其他生育期数量稳定在 6.50×10^6 个 $\cdot$ g $^{-1}$ 干土左右,也表现出在水稻生长旺盛期(21 d,分蘖期)数量较多,其他时期相对较少的趋势。与早稻相比,晚稻产甲烷菌的数量相对较少,这也与本研究得到甲烷排放通量和产甲烷菌的群落结构的差异一致。

2.4 甲烷排放速率与产甲烷菌群落结构和数量的关系

双季稻稻田甲烷排放速率与稻田土壤产甲烷菌的数量存在显著的正相关关系,而与土壤中产甲烷菌群落结构的丰富度和 Shannon-Wiener 多样性指数之间的相关性不显著。土壤中产甲烷菌的数量与产甲烷菌的丰富度、多样性指数和均匀度也均存在正相关的关系,但是相关性均不显著(表 3)。

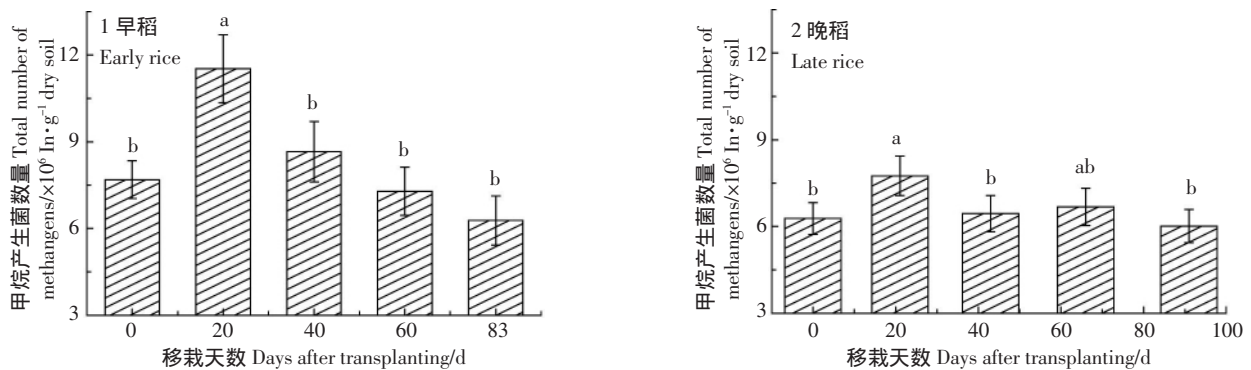
3 讨论

3.1 产甲烷菌群落结构的季节变化特征

产甲烷菌的群落结构在双季稻生育期内存在较为明显的季节差异,但主要的产甲烷菌类群基本保持稳定。这与国外报道的产甲烷菌在水稻不同生育期甚

至在旱作时其群落结构都保持一致,造成甲烷排放速率季节变化的原因是淹水条件下产甲烷菌活性增强的看法存在一定差异^[1-3]。但是,最近的研究结果又指出不同地区土壤中产甲烷菌的群落结构有明显的差异,其中主要原因是气候等宏观因子的影响^[15]。因此,在南方双季稻区温度等气候因子以及土壤中可溶性有机碳含量的明显变化很可能会导致产甲烷菌的群落结构存在季节差异。同时,稻田土壤中的产甲烷菌类群可以通过自身较强的忍耐有氧条件能力^[16-17]、寄存在土壤动物的胞囊内^[18]以及产生特定的酶来抵抗与氧化相关的有毒物质等方式长期存在于土壤中^[19-21]。以上因素共同造成了南方双季稻田产甲烷菌的群落结构存在季节变化,但是主要类群保持稳定的结果。对于稻田产甲烷菌的多样性指数、丰富度和均匀度的量化报道很少,造成本研究的结果很难在量上有一个横向的比较,我们将在以后的研究中逐步丰富研究内容,进行更多的验证。

本研究中,晚稻生育期内产甲烷菌的群落结构复杂性要低于早稻,其中的主要原因可能是:(1)早稻播种前经历了长达 5 个月的休耕期,土壤累积了大量的微生物可利用有机碳,为产甲烷菌的生存、生长和繁殖提供了充足的底物,我们在同一地块的研究显示:随着早稻的生长,土壤的可溶性有机碳逐步下降,从水稻移栽前的 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 降到早稻收获时的 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,而晚稻生育期的土壤可溶性有机碳只是在水稻生长中后期才逐步恢复到早稻生长前期的水平^[9]。(2)在早稻移栽前,试验地区经历了长时间的降雨,这也使土壤达到了产甲烷菌生存、繁殖所需的厌氧状况。(3)经历了早稻的生长季后,土壤微生物可利用有



图中不同字母代表差异达到显著性($P < 0.05$)

Different letters indicate statistical significance at the $P=0.05$ level(Duncan's method)

图 4 双季稻稻田水稻不同生育期产甲烷菌数量的变化

Figure 4 Dynamics of the abundance of methanogens at different rice growing stage under double rice cropping system.

表 3 稻田甲烷排放速率与产甲烷菌群落结构和种群数量的相关性分析结果(皮尔逊双尾显著性检验 $\alpha=10$)Table 3 Correlation between methane emission and the community structure and abundance of methanogens(Pearson two-tailed test $\alpha=10$)

指标 Parameters	甲烷排放 Methane emission	甲烷菌数量 The number of Methanogens	丰富度 Richness	多样性指数 Shannon-Wiener Diversity index	均匀度 Evenness
甲烷排放 Methane emission	1	0.681*	0.361	0.219	0.007
甲烷菌数量 The number of methanogens		1	0.628	0.489	0.173
丰富度 Richness			1	0.961**	0.726*
多样性指数 Shannon-Wiener Diversity index				1	0.885**
均匀度 Evenness					1

注 * 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上相关性显著。

*, Correlation is significant at the 0.05 level(2-tailed). **, Correlation is significant at the 0.01 level(2-tailed).

机碳含量有所下降,产甲烷菌可能受碳源供应不足的限制而形成明显的种间竞争,导致多样性有所下降。

3.2 产甲烷菌数量的季节变化特征

本研究中产甲烷菌在水稻生长旺盛期(移栽 20 d)显著偏多,其他生长阶段之间产甲烷菌的数量没有显著差异。稻田不同生育期产甲烷菌数量的研究存在两种不同的结果:(1)产甲烷菌的数量在水稻不同生育期有明显的变化。陈美慈等采用 MPN 法研究了稻田不同生育期产甲烷菌的数量变化,其研究表明水稻分蘖盛期、孕穗期和乳熟期产甲烷细菌数量最多,其他时期数量较少^[4-5]。陈中云等、王妥屹等和韩琳等的研究也得到相同的结果^[23-25]。(2)产甲烷菌的数量在水稻的生育期内保持稳定。Asakawa 和 Hayano 采用 MPN 法对日本的一个稻-麦轮作系统不同时期土壤中的产甲烷菌进行了定量化研究,结果发现产甲烷菌的数量不仅在水稻生长季的不同时期保持恒定,而且在小麦生长季也没有显著变化^[26]。Asakawa 等进一步采用古细菌醚脂分析的方法对该轮作系统土壤中的产甲烷菌的数量进行了研究,结果仍表明产甲烷菌的数量在整个稻麦生长季保持恒定^[27]。本研究得到的结果与第一种观点一致,在水稻生长旺盛期(分蘖期)产甲烷菌的数量显著高于其他时期。这主要与这一时期土壤中微生物可利用碳源的类型和数量较多有关,同时水稻分蘖期根系分泌物的大量产生也丰富了土壤有机碳的类型和总量,为产甲烷菌的增加提供了充足的反应底物^[28]。此外,水稻移栽后的持续淹水使土壤的氧化还原电位持续下降,利于产甲烷菌生存^[23-24]。而造成产甲烷菌数量无季节变化的结果可能是研究区土壤可溶性有机碳的含量基本保持稳定及采样时间间隔较长,没有监测到产甲烷菌数量产生明显变化的时刻^[26-27]。除了水稻分蘖期外,其他时期产甲烷菌的数量也没有显著的差异。对于稻田产甲烷菌的数量,王英

采用 MPN 法对本试验地的研究结果显示,水稻收获后淹水处理稻田的产甲烷菌种群的数量为 8.25×10^6 cfu·g⁻¹ 干土,而旱作稻田土壤的产甲烷菌的种群数量为 4.16×10^3 cfu·g⁻¹ 干土,略低于本研究结果中稻田大部分时间的产甲烷菌数量(6.28×10^6 个·g⁻¹ 干土)^[6]。陈中云等对不同类型水稻土模拟试验也显示双季稻早稻生育期内产甲烷菌的数量也要多于对应的晚稻生育期,且数量级也在 10^6 左右^[23]。同时需要指出的是,本研究只监测了几类主要的产甲烷菌类群,只能粗略的估算土壤产甲烷菌的数量,结果可能存在一定偏差。

与产甲烷菌的群落结构一样,晚稻生育期内产甲烷菌的数量也少于早稻,其原因与群落结构上的差异原因基本一致。

3.3 稻田产甲烷菌群落结构和数量与稻田甲烷排放量的关系

稻田甲烷的排放与产甲烷菌的数量之间存在显著的正相关关系,而与产甲烷菌群落结构的丰富度和 Shannon-Wiener 多样性指数之间不存在显著正相关关系。这一结果表明,稻田甲烷的排放受产甲烷菌的数量影响较大,而受群落结构多样性的影响较小。

本研究中早稻生育期的甲烷排放量高于晚稻,同时产甲烷菌数量也高于晚稻,二者之间存在着明显的对应关系。然而,甲烷的排放是一个复杂的生态过程,产甲烷菌只是参与该过程的一类微生物,只与甲烷的产生有密切的关系,土壤中的大部分甲烷可能在释放到大气中之前被氧化或固定在土壤颗粒中,也使得土壤结构、氧化还原状况以及植株生长状况都会对甲烷排放量产生显著的影响,这可能导致甲烷的排放量与产甲烷菌数量之间的对应关系会因环境条件的变化而产生偏离。因此,还需要进一步的研究才能揭示甲烷排放的内在影响机制。

4 结论

双季稻田早稻生育期内甲烷排放量为 $9.28 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$, 大于晚稻的 $7.78 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 。双季稻生育期内产甲烷菌的群落结构和种群数量均存在一定的季节变化, 以水稻生长旺盛期群落结构复杂、数量多, 早、晚稻生长旺盛期产甲烷菌数量分别为 $1.14 \times 10^7 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土和 $6.72 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土, 显著高于其他生长时期。与稻田甲烷排放量一致, 早稻生育期内产甲烷菌的群落结构复杂、数量多。稻田甲烷排放与稻田土壤产甲烷菌的数量存在显著的正相关关系, 而与群落结构没有显著相关性。因此, 控制稻田产甲烷菌的数量可以有效减少甲烷排放。

参考文献:

- [1] Krüger M, Frenzel P, Kemnitz D, et al. Activity, structure and dynamics of the methanogenic archaeal community in a flooded Italian rice field [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51 :323–331.
- [2] Watanabe T, Kimura M, Asakawa S. Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice–wheat) [J]. *Soil Biol Biochem*, 2006, 38 :1264–1274.
- [3] Watanabe T, Kimura M, Asakawa S. Dynamics of methanogenic archaeal communities based on rRNA analysis and their relation to methanogenic activity in Japanese paddy field soils [J]. *Soil Biol Biochem*, 2007, 39 :2877–2887.
- [4] 陈美慈, 闵航, 钱泽澎. 水稻田中占优势产甲烷细菌的分离和特性 [J]. *浙江农业大学学报*, 1992, 18(3): 79–84.
Chen M C, Min H, Qian Z P. Isolation and characterization of dominant methanogens [J]. *Acta Agricultural University Zhejiangensis*, 1992, 18 (3): 79–84.
- [5] 陈美慈, 闵航, 钱泽澎. 水稻田中产甲烷细菌数量和优势种 [J]. *土壤学报*, 1993, 30(4): 432–437.
Chen M C, Min H, Qian Z P. Amount and dominant species of MPB in submerged paddy soil [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 1993, 30(4), 432–437.
- [6] 王英. 淹水和旱作稻田土壤中微生物群落多样性的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
Wang Y. The study of soil microbial community diversity under flooded and non-flooded paddy field [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2006.
- [7] 秦江涛. 水稻不同栽培模式的节水效应、生产力特征及土壤微生物学性状研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
Qin J T. Water use efficiency, crop productivity and microbial characteristics under different water-saving rice cultivation systems [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2007.
- [8] Zou J W, Huang Y, Jiang J Y, et al. A 3-year field measurement of methane and nitrous oxide emissions from rice paddies in China: Effects of water regime, crop residue, and fertilizer application [J]. *Global Biogeochem Cycles*, 2005, 19 :2021.
- [9] LI D M, LIU M Q, CHENG Y H, et al. Methane emissions from double-rice cropping system under conventional and no tillage in southeast China [J]. *Soil & Tillage Research*, 2011, 113(2) :77–81.
- [10] 李道西. 控制灌溉稻田甲烷排放规律及其影响机理研究 [D]. 南京: 河海大学, 2007.
Li D X. Regularity of methane emission from paddy fields and its influence mechanism under rice controlled irrigation [D]. Nanjing: Hehai University, 2007.
- [11] 牟洁, 孙宝盛, 陈谊. 利用 PCR-DGGE 研究膜生物反应器中微生物的群落结构 [J]. *环境科学学报*, 2010, 30(4): 729–734.
Mou J, Sun B S, Chen Y. Microbial community structure in a membrane bioreactor determined using PCR-DGGE [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(4): 729–734.
- [12] Eickhorst T, Tippkötter R. Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and microscopical methods [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008a, 40: 1284–1293.
- [13] Eickhorst T, Tippkötter R. Improved detection of soil microorganisms using fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH) [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008b, 40: 1883–1891.
- [14] Raskin L, Poulsen L K, Noguera D R, et al. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60 :1241–1248.
- [15] Watanabe Takeshi, Canyon Vita Ratri, Murase Jun, et al. Methanogenic archaeal communities developed in paddy fields in the Kojima Bay polder, estimated by denaturing gradient gel electrophoresis, real-time PCR and sequencing analyses [J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2009, 55: 73–79.
- [16] Fetters S, Conrad R. Effect of redox potential on methaneogenesis by *Methanococcus barkeri* [J]. *Archives of Microbiology*, 1993, 26: 247–250.
- [17] Kato M T, Field J A, Lettinga G. High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 42 :1360–1366.
- [18] Finlay B J, Fenchel T. An anaerobic protozoan, with symbiotic methanogens, living in municipal landfill material [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1991, 85 :169–180.
- [19] Leadbetter J R, Breznak J A. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 :3620–3631.
- [20] Shima S, Netrusov A, Sordel M, et al. Purification, characterization, and primary structure of a mono functional catalase from *Methanosarcina barkeri* [J]. *Archives of Microbiology*, 1999, 171 :317–323.
- [21] Shima S, Sordel-Klippert M, Brioukhanov A, et al. Characterization of a heme-dependent catalase from *Methanobrevibacter arboriphilus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 :3041–3045.
- [22] Seedorf H, Dreisbach A, Hedderich R, et al. $F_{420}H_2$ oxidase (FprA) from *Methanobrevibacter arboriphilus*, a coenzyme F_{420} -dependent enzyme

- involved in O_2 detoxification[J]. *Archives of Microbiology*, 2004, 182 : 126–137.
- [23] 陈中云, 闵航, 陈美慈, 等. 不同水稻土甲烷氧化菌和产甲烷菌数量与甲烷排放量之间相关性的研究[J]. 生态学报, 2001, 21(9): 1498–1505.
- Chen Z Y, Min H, Chen M C, et al. Studies on relationships among methane emission and methane-oxidizing and methanogenic bacteria in three types of rice-field soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(9): 1498–1505.
- [24] 王受屹, 韩琳, 史奕, 等. FACE 对水稻土产甲烷菌和甲烷氧化菌种群及其活性的影响[J]. 土壤, 2006, 38(6): 768–773.
- Wang S Y, Han L, Shi Y, et al. Effects of FACE on population and activities of Methanogen and Methanotroph in paddy soil[J]. *Soils*, 2006, 38(6): 768–773.
- [25] 韩琳, 史奕, 李建东, 等. 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[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(2): 322–325.
- Han L, Shi Y, Li J D, et al. Effects of FACE (free-air carbon dioxide enrichment), different conditions of rice straw and N fertilization levels on methanogens in paddy-field[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(2): 322–325.
- [26] Asakawa S, Hayano K. Populations of methanogenic bacteria in paddy field soil under double cropping conditions (rice-wheat) [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 20: 113–117.
- [27] Asakawa S, Akagawa-Matsushita M, Koga Y, et al. Communities of methanogenic bacteria in paddy field soils with long-term application of organic matter[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30: 299–303.
- [28] 陈玉泉. 稻田甲烷的产生及其与环境的关系[J]. 江苏农业科学, 2003(3): 91–93.
- Chen Y Q. Methane emission from paddy field and its relationships to environments[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2003(3): 91–93.