

长期不同施肥下水稻土甲烷氧化能力及 甲烷氧化菌多样性的变化

郑聚锋, 张平究, 潘根兴*, 李恋卿, 张旭辉

(南京农业大学农业资源与生态环境研究所, 南京 210095)

摘要:稻田内源甲烷的氧化是稻田甲烷减排的重要途径。而甲烷氧化菌是土壤中甲烷氧化的主要施动者,在长期不同施肥条件下,土壤微生物群落的演变是否影响到土壤甲烷氧化菌群落结构及其活性,进而影响到田土壤 CH_4 向大气的实际排放强度还不清楚。为此,选择太湖地区一个长期肥料试验的稻田土壤为研究对象,分析长期不同肥料施用对土壤甲烷氧化能力的影响及其与土壤中甲烷氧化菌群落结构变化的可能关系。结果表明,长期不同的施肥措施下稻田土壤对甲烷的氧化能力产生了明显差异,伴随着土壤中甲烷氧化菌(MOBI 和 MOBII)的基因群落多样性的显著变化。长期单一施用氮肥为主的化肥显著降低了土壤对甲烷的氧化能力,同时显著降低了稻田土壤甲烷氧化菌的多样性和丰富度;不同施肥下甲烷氧化菌多样性的变化与土壤的甲烷氧化能力的变化趋势相一致。因此,研究显示长期不同施肥处理下甲烷氧化菌群落结构的改变可能是引起水稻土甲烷氧化能力变化的一个主要因素,有机无机配合施用可以明显降低稻田土壤甲烷的大气释放潜能。但长期不同施肥处理下甲烷氧化菌活性的变化还有待于进一步研究。

关键词:水稻土;长期试验; CH_4 氧化;甲烷氧化菌;微生物多样性;温室气体减排

8 文章编号:1000-0933(2008)10-4864-09 中图分类号:Q142, Q16, Q938 文献标识码:A

Effect of long-term different fertilization on methane oxidation potential and diversity of methanotrophs of paddy soil

ZHENG Ju-Feng, ZHANG Ping-Jiu, PAN Gen-Xing*, LI Lian-Qing, Zhang Xu-Hui

Institute of Resource Ecosystem and Environment of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(10): 4864 ~ 4872.

Abstract: Oxidation of endogenous methane is an important process affecting the real flux of methane from rice paddies, which is generated and mediated by methanotrophs living in topsoil. Very few data has been available on whether the change of the overall microbial community effects on methane oxidation activity and/or community of methanotrophs, and in turn, the real methane flux from rice paddies under different long-term fertilization practices. Taking an example of a long-term different fertilization trial of a typical rice paddy from the Tai Lake region China, effects of long-term different fertilizations on methane-oxidizing activity and the linkage to possible change of methanotrophs community are studied by laboratory incubation of rice paddy topsoil. The studied long-term different fertilization plots include non-fertilized (NF), chemical fertilizers only (CF) and combine fertilization of chemical fertilizers and pig manure (CFM). Results show that both methane-oxidizing activity and methanotrophic bacterial community (MOBI and MOBII) community of the topsoil samples

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(40231016)

收稿日期:2007-06-26; 修订日期:2008-02-26

作者简介:郑聚锋(1977~),男,河北石家庄人,博士生,从事土壤碳循环与全球变化研究. E-mail: zhengjufeng7708@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: panggenxing@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 40231016)

Received date: 2007-06-26; **Accepted date:** 2008-02-06

Biography: ZHENG Ju-Feng, Ph. D., mainly engaged in soil carbon cycling and global change. E-mail: zhengjufeng7708@yahoo.com.cn

vary with the different long-term fertilization practices. Compared with the treatments of NF and CFM, methane-oxidizing activity is significantly decreased as well as methanotrophic bacteria abundance and diversity significantly reduced under CF treatment. The variation of observed methane-oxidizing activity among under different fertilizations is shown in coincidence with the change of the abundance and diversity of the methanotrophs community. Therefore, real methane emission capacity from rice paddy may be altered by different fertilization practices, which could be linked to diversity changes of the methanotrophs community under the different fertilization practices. Thus, best management of fertilizer application may be an option for mitigating methane emission from rice paddies. However, the mechanism causing such variation of methanotrophic bacterial activity in rice paddies under long-term different fertilization deserves further studies.

Key Words: rice paddy; long-term experiment; methane oxidation; methanotrophs; microbial diversity; greenhouse gases mitigation

淹水稻田被认为是大气甲烷的一个重要生物物理源,但其净排放量取决于 CH_4 产生和 CH_4 氧化的相对平衡。据估计,稻田产生的内源甲烷在排向大气之前大约有 50% ~ 90% 在根际和土水界面被重新氧化^[4~6]。甲烷氧化菌是土壤中氧化甲烷的主要微生物,同时也是大气甲烷的主要生物汇^[7],它们以甲烷为唯一的碳源和能源,每年从大气中氧化甲烷达 20 ~ 60Tg,使淡水和湿地等自然环境向大气的 CH_4 释放减少约 700Tg^[8]。

根据其生理特征,甲烷氧化菌大致分为两类,TypeI 型(MOBI) 和 TypeII 型(MOBII),TypeI 型利用单磷酸核糖途径同化甲醛为细胞组分,TypeII 型利用丝氨酸途径同化甲醛为细胞组分^[7],一些研究者采用分子生物学技术(如 FISH、PLFA、T-RFLP 等)对甲烷氧化菌在不同的生境中的分布和多样性进行了研究^[9~12]。但对于微生物群落的动态及环境变化引起的微生物多样性的改变研究来说,DGGE 方法因具有较高的分辨率而被认为是目前研究微生物多样性的一个较好的工具^[13]。

最近,已有研究者利用 DGGE 技术对稻田 MOB 的群落分布进行了研究^[14],Seghers 等也对长期施肥下旱地土壤中甲烷氧化菌群落结构变化进行了报道,研究表明长期施肥用不同肥料会改变甲烷氧化菌的多样性^[15];利用培养研究表明,不同处理产甲烷能力有明显差异^[16],但目前对于长期不同肥料施用下稻田土壤甲烷氧化能力与甲烷氧化菌的多样性的变化及其相结合的研究还相对较少,在不同的长期施肥下,土壤的生产力、土壤固碳潜力和土壤有机碳矿化均有明显改变^[17~19],这种改变伴随着养分条件的改变^[20]、微生物区系^[21]、土壤动物区系的改变^[22]。对不同施肥下表土有机碳矿化和甲烷释放潜力的厌氧培养研究表明,不同施肥措施下稻田土壤产甲烷的能力表现出明显差异,且长期单施化肥明显增加了土壤甲烷的产生量^[16]。在长期不同施肥条件下,土壤微生物群落的演变是否影响到土壤甲烷氧化菌群落结构及其活性,进而影响稻田土壤 CH_4 向大气的实际排放强度还不清楚。因此,选择一个长期不同施肥定位试验田的水稻土(太湖地区黄泥土)为研究对象,探讨长期不同肥料施用下土壤甲烷氧化能力及甲烷氧化菌多样性的变化,为认识农业经营管理下稻田甲烷的释放差异及其减排的管理途径提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验地概况

供试长期定位试验田始于 1987 年,位于江苏省苏州市吴江县金家坝镇前厅村(31°05'N, 120°46'E),土壤类型是太湖地区典型的潴育型水稻土——黄泥土(铁聚水耕人为土, Ferric-accumulic Stagnic Anthrosols),该地在过去 20a 中年平均降雨量约 1100mm,年均温 18.3℃,冬季地下水位 80cm,夏季地下水位 60cm,原土 pH 为 5.6,粘粒($<2\mu\text{m}$)含量为 302.9 g/kg,阳离子交换量为 20.5cmol(+)·kg⁻¹。供试的 3 个施肥处理分别是①不施肥区(简称无肥区, NF),②单施化肥区(简称化肥区, CF),③化肥配施猪粪区(简称常规区, CFM),各施肥试验小区的化肥使用量相同:纯氮: 427.5kg·hm⁻²·a⁻¹, P₂O₅: 45.0 kg·hm⁻²·a⁻¹, KCl: 84.0 kg·hm⁻²·a⁻¹, N:P₂O₅:KCl 是 1:0.11:0.20,常规区增施猪粪 16800 kg·hm⁻²·a⁻¹(鲜重)。小区面积 70 (10×7) m²,设置 3 个

重复。一直为稻-油轮作。试验小区的土壤基本性质如表 1。

表 1 不同施肥处理小区表层(0~5cm)土壤基本性质(2005 年测定)

Table 1 Basic properties of studied soil was measured in 2005

试验小区 Plots	WHC ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	土壤有机碳 (SOC) ($\text{Cg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	总氮 (TN) ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	MBC ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	pH (H_2O)	KCl 提取态氮 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	
						$\text{NH}_4^+ - \text{N}$	$\text{NO}_3^- - \text{N}$
无肥区(NF)	527.6	18.19	1.65	268.1	6.13	2.35	2.73
化肥区(CF)	546.8	18.32	1.78	285.3	5.74	3.26	4.51
常规区(CFM)	552.7	20.52	1.97	310.5	5.93	4.44	2.53

1.2 土壤的样品采集和处理

在上述 3 个不同施肥处理的小区采集表层(0~5cm)土壤样品,采样时间为 2005 年水稻收割之后。所采集的样品分两部分,一部分用作测定甲烷氧化菌的基因多样性,在测定之前保存于 4℃ 的冰箱中;另一部分挑出大的植物根系,过 2mm 筛,调节土壤含水量(80% WHC)后,在(25±1)℃ 的培养箱中进行甲烷氧化试验。

1.3 土壤基本性质测定

1.3.1 土壤有机碳、氮测定

CNS elemental analyzer(Vario MAX CNS, elementar, germany)测定(工作温度 900℃,热导检测器检测 CO_2 浓度)。

1.3.2 土壤 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 测定

称取土壤样品 20g 放入 250ml 三角瓶中,向其中加入 0.5mol/L KCl 100ml,在 250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的振荡机上振荡 1h,然后离心分离,过滤到塑料瓶中,提取液采用流动注射分析仪(Blanco, AutoAnalyzer3)测定^[23]。

1.3.3 土壤持水量(WHC, water holding capacity)测定

把通过 20 目筛的土样置于棉球塞住的漏斗中,加蒸馏水浸泡 2h,加盖,除去棉塞让水分自由下渗,放置过夜后,用烘干法测定土壤的重量含水量作为土壤持水量^[24]。

1.4 土壤对甲烷的氧化

1.4.1 甲烷氧化的培养试验

考虑到不同甲烷氧化菌群落对不同甲烷浓度的响应可能不同,本试验选定了两个浓度的甲烷样品进行培养试验,具体步骤如下:称取过筛的土壤样品 20g(相当于烘干土重)放入 120ml 培养瓶中,调节土壤水分含量为土壤持水量的 80%,用直径 37.5mm 的硅胶塞将瓶口密封,硅胶塞中间打上两个小孔,内插塑料管,管外再套一段硅胶塞软管,再以直径 5mm 的硅胶塞塞紧硅胶软管通气口使之密封,并以此硅胶塞作为气体取样口,然后通过取样口向培养瓶中分别注入一定体积(0.84ml 和 0.05ml)的纯甲烷,使瓶内甲烷浓度分别为 $(7000 \pm 616) \mu\text{l} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(400 \pm 46) \mu\text{l} \cdot \text{L}^{-1}$,为了保持瓶内的压力恒定,在向瓶内注射纯甲烷之前用注射器从瓶内抽出相同体积的空气^[25]。然后放入培养箱(LRH-250-S)内在(25±1)℃ 条件下对其进行培养,所有处理均设 3 次重复,根据瓶内甲烷浓度变化情况每隔一定时间用注射器采集瓶中的气体,用 Agilent 4890D 气相色谱仪测定瓶中 CH_4 浓度,仪器配备 FID 检测器和不锈钢的 Porapak Q (80/100 mesh),工作条件设定:柱温、进样口和检测器的温度分别设为 35, 130, 250℃,载气(氮气),FID 氢气和 FID 空气的流速分别设为 30、45 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 400 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$,甲烷的氧化速率用 $\mu\text{gg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 表示。

1.4.2 甲烷氧化速率计算

采用的计算式如下:

$$V = (C_{t1} - C_{t2}) \times 120 \times 10^{-3} \times 16 \times 298 / 22.4 / 273 / t$$

式中, V 为 CH_4 的平均氧化速率($\mu\text{gg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), C_{t1} 为 t_1 时刻的 CH_4 浓度; C_{t2} 为 t_2 时刻的 CH_4 浓度。而 t 是采样的时间间隔(h)。

1.5 甲烷氧化菌基因群落分析

1.5.1 DNA 提取与聚合酶链反应(PCR)扩增

土壤微生物基因组 DNA 提取采用购自 Q. BIOgene 公司(美国)的土壤 DNA 快速提取试剂盒(FastDNA® Kit for Soil)。25 μ l PCR 反应体系组分如下:25ng 的 DNA 模板、每种引物浓度为 2pmol $\cdot$ μ l⁻¹、200 μ mol/L dNTPs、2.5 μ l 的 10 $\times$ PCRbuffer、1.5mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 MgCl₂、1.5U 的 TaqDNA 聚合酶。

Type I 甲烷氧化菌引物为 533f 和 MethT1bR-GC^[26];PCR 反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 5min, 10 个循环为 94 $^{\circ}$ C 1min,每个循环变性温度降低 1 $^{\circ}$ C,从 60 $^{\circ}$ C 到 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1min,再 20 循环为 94 $^{\circ}$ C 1min,50 $^{\circ}$ C 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 2min,最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 6min。Type II 甲烷氧化菌引物为 533f 和 Am976-GC(Bodelier 等,2005);PCR 反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 2min, 33 个循环为 94 $^{\circ}$ C 1min,58 $^{\circ}$ C 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 2min,最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5min。

扩增后所有的 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。

1.5.2 梯度变性凝胶电泳(DGGE)分析

梯度变性凝胶的制备使用 Bio-Rad 公司 475 型梯度灌胶系统(model 475 gradient delivery system),变性梯度从上到下是 30% 到 60%,聚丙烯酰胺凝胶浓度是 8%;上样后,200V 的电压下 2min 后,60 $^{\circ}$ C 下,100V 电泳 14h。电泳完毕后,将凝胶在 EB 中染色 15min,洗脱 20 min;将染色后的凝胶用 Bio-RAD 的 Gel Doc-2000 凝胶影像分析系统拍照;用 Quantity One 分析软件(Bio-Rad)帮助确定样品电泳条带的多少和条带的亮度峰值,同时分析条带间相似性。

2 统计分析

种的丰富度采用数条带的方法;用 Quantity One 分析软件分析得到相似性值,香农指数计算方法采用 Hedrick 等报道的方法^[27]。

3 结果与分析

3.1 不同施肥下土壤的甲烷氧化动态

图 1 是甲烷氧化培养试验期间 3 种不同施肥处理下高浓度(7000 μ l $\cdot$ L⁻¹)和低浓度(400 μ l $\cdot$ L⁻¹)甲烷的浓度变化动态。如图所示,两种不同起始甲烷浓度条件下不同处理中甲烷的浓度变化动态格式存在差别。较高起始甲烷浓度(图 1 A)下,无肥区和单施化肥区的甲烷浓度因氧化而衰减的动态符合一级反应动力学指数方程,而化肥配施猪粪处理下更符合直线衰减,这说明该水稻土壤在有机无机配施下具有持续氧化甲烷的潜力。其中,NF 处理的甲烷氧化速率常数极显著的高于单施化肥(CF 处理)($p < 0.01$),指示单施化肥下土壤

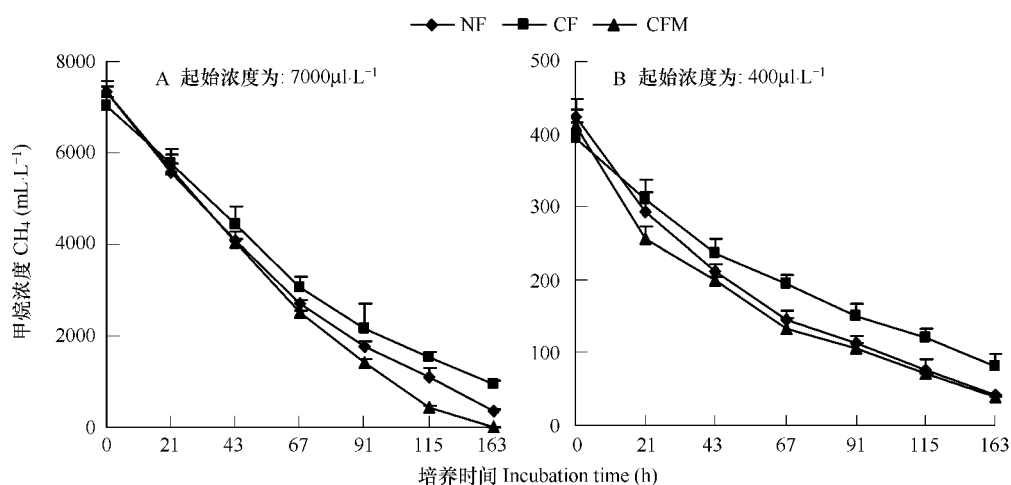


图 1 CH₄ 浓度随培养时间的变化曲线

Fig. 1 Time course of CH₄ concentration at the during incubation at the initial CH₄ concentration of 7000 μ l $\cdot$ L⁻¹ (A), 400 μ l $\cdot$ L⁻¹ (B), respectively, during the incubation at 25 $^{\circ}$ C

的甲烷氧化能力明显降低;这些意味着不同施肥处理下土壤对高浓度甲烷的氧化活性及微生物种群构成可能不同^[28],而这些差异在高浓度甲烷激发下可能表现出来。这里,培养的前 21h 可以看作是甲烷对土壤甲烷氧化菌的诱导过程,21 ~ 163h 之间是高浓度甲烷对甲烷氧化菌诱导的结果。相反,较低 CH_4 起始浓度 ($400 \mu\text{l}\cdot\text{L}^{-1}$) 条件下(图 1B),其不同处理下甲烷氧化消减动态均符合指数动力学方程,其氧化速率常数均显著低于高浓度下 ($p < 0.01$) 说明该稻田土壤对低浓度的 CH_4 氧化能力较弱。不同处理相比,单施化肥下氧化速率相当于化肥配施猪粪处理和无肥处理的 2/3,即单施化肥下稻田土壤对低浓度甲烷的氧化能力明显降低。以上结果说明在不同施肥措施条件下,土壤对高浓度和低浓度甲烷的氧化能力均出现了较大差异,但对高浓度甲烷的利用差异在甲烷的诱导下才能表现出来。

3.2 不同施肥处理对土壤甲烷氧化活性的影响

图 2 是不同施肥处理的土壤对不同浓度甲烷的氧化活性(这里用 CH_4 的平均氧化速率表示),如图所示, CH_4 浓度显著地影响了甲烷的氧化活性,就高浓度 CH_4 与低浓度甲烷相比较而言,土壤对高浓度甲烷有较高的氧化能力;施肥措施的不同显著地影响了土壤对甲烷的氧化活性,无论对于高浓度 ($(7000 \pm 616) \mu\text{l}\cdot\text{L}^{-1}$) 甲烷还是对于低浓度 ($(400 \pm 46) \mu\text{l}\cdot\text{L}^{-1}$) 的甲烷,CFM 与 NF 的土壤对甲烷的氧化活性都显著的高于单施化肥处理 ($p < 0.01$),与 NF 相比,在高浓度甲烷和低浓度甲烷下 CF 对土壤的氧化能力分别下降了 12.6% 和 15.7%,而长期化肥配施猪粪的施肥方式有增加土壤氧化甲烷能力的趋势。

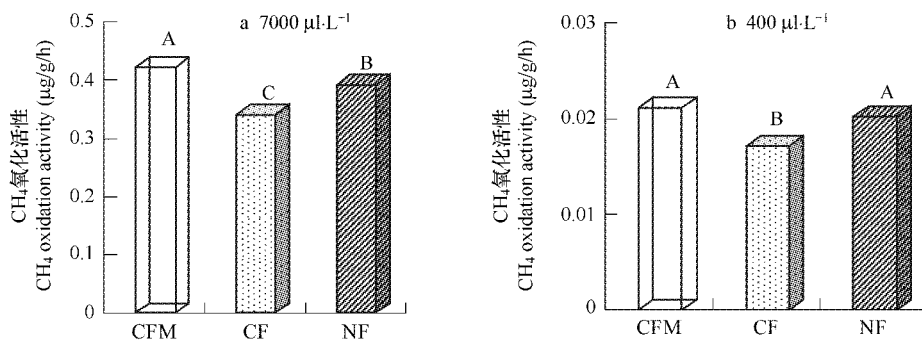


图 2 不同施肥处理下土壤甲烷氧化活性

Fig. 2 Methane oxidation activity related to initial methane concentration under different fertilization treatments

不同的大写字母表示不同施肥处理间土壤氧化甲烷能力的显著性差异 ($p < 0.01$) The different capital letters in the figure indicate significant difference at $p < 0.01$ between treatments

3.3 不同施肥处理下土壤甲烷氧化菌群多样性的变化

提取的土壤基因组经 PCR 扩增和 DGGE, 得到结果如图 3。图中可见, 无论是对 MOBI(图 3: A) 还是对 MOBII(图 3: B) 来说, CFM 的条带数都比 NF 和 CF 较多, 且不同施肥处理间有相似条带, 也有其特有条带, 由此得出结论, CFM 要比 NF 和 CF 的 MOB1 和 MOB2 的种类数多, 它们既有共种也有特有种, 而且施肥方式的不同也影响到了优势种的分布。对图 3 进一步分析表明(图 4 所示), 在 3 种不同的施肥处理当中, 与 NF 相比, CF 对 MOBI(图 4: A) 和 MOBII(图 4: B) 的丰富度和基因多样性指数都有显著降低 ($p < 0.01$), CFM 则对其有显著增加 ($p < 0.01$), 相关分析表明, 本研究中的 MOBI 和 MOBII 多样性指数与丰富度有较好的相关性 ($R^2 = 0.9978, p < 0.05$; $R^2 = 0.9985, p < 0.05$), 表明甲烷氧化菌的丰富度显著的影响了其多样性。

3.4 不同施肥处理下甲烷氧化菌相似性

微生物多样性的改变直接影响它们之间的相似性的大小, 相似性大小反映了微生物群落结构变化程度的高低。如表 2 所示, 对 MOBI 而言, NF 与 CFM 的相似性较高, 而对于 MOBII 而言, 却是 NF 与 CF 的相似性较高, 显然, 两种甲烷氧化菌对施肥方式的不同响应也显著不同, 化肥配施猪粪对 MOBII 的影响程度高于对 MOB1 的影响。

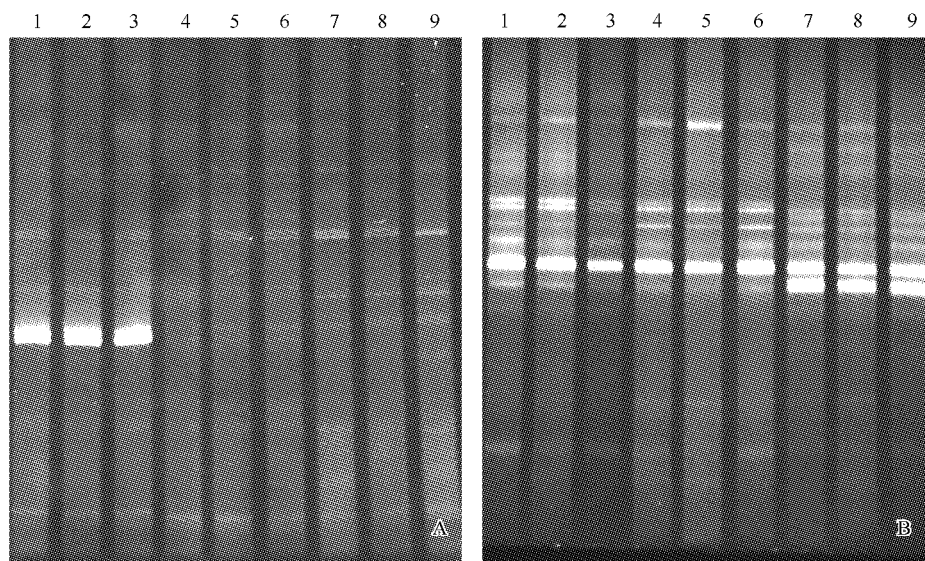


图3 不同施肥措施下的 MOBI (A) 和 MOBII(B) 的 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE profile of MOBI (A) and MOBII (B) under different fertilization treatments

1 ~ 3: CF; 4 ~ 6: CFM; 7 ~ 9: NF

4 讨论

土壤对内源甲烷氧化能力的高低对于稻田甲烷的减排有重要意义^[29]。许多基于氮肥对土壤氧化甲烷能力影响的研究结果表明,施用氮肥会显著降低土壤的氧化能力^[30~32]。Mosier 等报道^[33],施用 NH_4NO_3 $22\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的草地与不施氮肥的土壤对比,其甲烷氧化能力降低 41%; Hütsch 等利用英国洛桑实验站 1843 年开始的小麦试验田测定了无机氮肥的长期效应^[28],发现与对照处理相比,随氮肥的施用量的增加(由 44kg 增加到 80kg)土壤对甲烷的氧化能力持续降

表2 不同施肥处理间 MOBI 和 MOBII 群落相似性指数

Table 2 Similarly coefficient of MOBI and MOBII population under different treatments

处理 Treatments	NF	CF	CFM
MOBI 的相似性 Similarly coefficient of MOBI			
NF	1.000		
CF	0.593	1.000	
CFM	0.663	0.608	1.000
MOBII 的相似性 Similarly coefficient of MOBII			
NF	1.000		
CF	0.794	1.000	
CFM	0.759	0.672	1.000

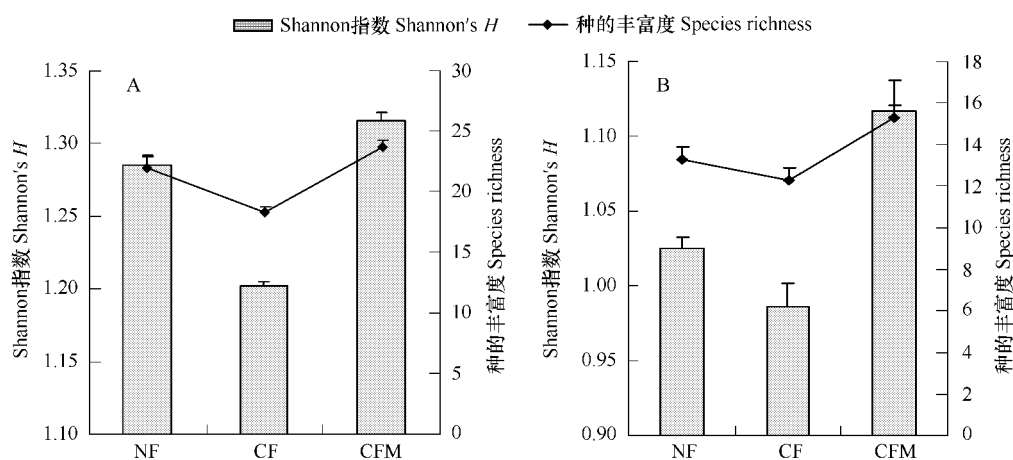


图4 不同施肥措施的 MOBI(A) 和 MOB II(B) 种的丰富度与 Shannon 指数

Fig. 4 MOB species richness and Shannon's H under different fertilizer treatments

低。采用尿素作为氮肥对农田土壤甲烷氧化能力的研究表明,尿素施用后短期内对土壤甲烷氧化的抑制率达到 80% 以上,在经过土壤硝化作用之后,这种抑制作用仍然达 20% [34];而在长期(17a)施用氮肥(NH_4NO_3 , $150\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$)的美国温带森林土壤氧化能力下降达 50% ~ 80% [35]。Powlson 等研究发在酸性森林土壤上现连续 150a 施用 NH_4^+-N ($144\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$) 得出相似结果 [36]。尽管 Bodelier 等报道在稻田中施用氮肥会刺激甲烷的氧化 [9]。但本试验结果中显示,长期(18a)单施化肥(NPK,其中氮肥为尿素)显著降低了在好气条件下土壤对甲烷的氧化。而淹水条件下同样施肥处理的土壤样品在室内培养进行的甲烷产生的培养试验结果也显示,单施化肥下土壤甲烷产生量相对其他处理显著增多 [16]。

不同的有机肥处理对土壤氧化甲烷的能力报道也不尽相同, Hüttsch 和 Sommer 等报道在旱地和草地中施用有机肥对甲烷氧化有明显的抑制作用 [28, 37],而一些研究表明水稻土中长期施用有机肥能显著促进土壤对甲烷的氧化 [38], Willison 等利用德国的一个长期肥料试验田(1902 年开始)研究发现 [39],与对照相比,而单施有机肥对土壤氧化甲烷的能力有显著提高,N 肥配施农家肥处理的土壤甲烷氧化能力显著低于单施有机肥,而高于对照处理。本试验结果与其报道相似,在本试验中,长期施用猪粪处理促进土壤氧化甲烷的能力可能与长期输入特定的 C/N 组成有机物有关 [40]。

施肥对土壤甲烷氧化能力的影响主要是通过影响甲烷氧化菌的活性或群落结构。肥料施用短期内影响甲烷氧化菌的活性 [9],而长期的作用会改变其群落结构 [32, 41]; Roslev and Iversen 报道,MOBI 对氮肥的敏感性高于 MOBII [42], Seghers 等利用 DGGE 技术研究不同施肥下甲烷氧化菌群落结构的变化结果表明,施肥方式显著地影响甲烷氧化菌的丰富度和多样性,施用有机肥(堆肥)处理的土壤比施用氮肥(NH_4NO_3)的处理有更高的丰富度,且增加了 MOBI 的多样性,然而,对于 MOBII 而言,却是施用氮肥的土壤高于施用堆肥的处理 [15],本试验结果表明,不同肥料长期施用确实改变了甲烷氧化菌的群落结构,这可能与输入肥料的 C/N 有关,如表 1 所示,不同施肥处理中的微生物量碳存在显著差异,且有机无机肥料配施处理的土壤微生物量碳的值最高。本试验中有机无机肥料配施对 MOBI 和 MOBII 的多样性和丰富度都有显著提高,且影响 MOBII 的程度高于对 MOBI 的影响(表 2),显然,在水稻土中这两种甲烷氧化菌对肥料的敏感性表现与上述结果不尽相同。土壤对甲烷的氧化能力受甲烷氧化菌多样性的显著影响,MOBI 和 MOBII 的多样性与土壤对甲烷氧化活性有一致的趋势(图 5)。Seghers 等的研究也指出,甲烷氧化菌多样性

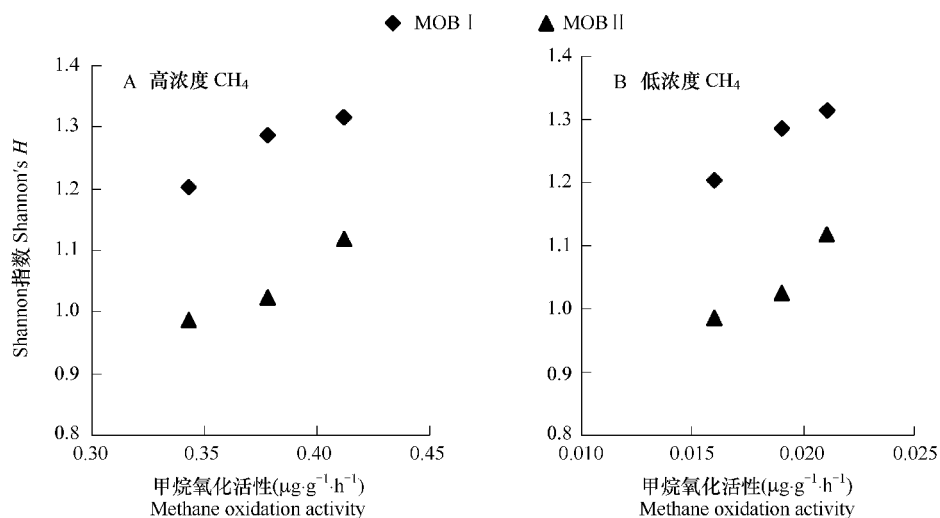


图 5 土壤对甲烷的氧化活性与香农指数的关系

Fig. 5 The relationship of methane oxidation activity and Shannon's H

5 结论

长期不同施肥处理对稻田土壤氧化甲烷能力产生了显著影响,有机无机肥料配施处理下稻田土壤对甲烷

的氧化能力显著高于单施化肥处理。不同施肥措施显著地改变了土壤甲烷氧化菌群落结构,与无肥和单施化肥处理相比,有机无机肥料配施对 MOBI 和 MOBII 的多样性有显著提高,甲烷氧化菌多样性的改变密切联系着土壤对甲烷氧化能力的变化。

References:

- [1] Sass R L, Fisher F M, Harcoabe P A, *et al.* Methane production emission in a Texas agricultural wetland. *Global Biogeochemical Cycles*, 1991, 4: 47—68.
- [2] Frenzel P, Rothfuss F, Conrad R. Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosm. *Biol. Fert. Soils*, 1992, 14: 84—89.
- [3] Cai Z C, Yan X Y. Kinetic model for methane oxidation by paddy soil as affected by temperature, moisture and N addition. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 715—725.
- [4] Hanson R S, Hanson T E, Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 1996, 60: 439—455.
- [5] 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.
- [6] Bodelier P L E, Roslev P, Henckel T, *et al.* Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature*, 2000, 403, 421—424.
- [7] Nold S C, Boschker H T S, Pel R, *et al.* Ammonium addition inhibits ¹³C-methane incorporation into methanotroph membrane lipids in a freshwater sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1999, 29: 81—89.
- [8] Henckel T, Roslev P, Conrad R. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ. Microbiol.*, 2000, 2: 666—679
- [9] Horz H P, Yimga M T, Liesack W. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of pmoA, mmoX, mxaF, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including profiling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 4177—4185.
- [10] Luo H F, Qi H Y, Xue K Z, *et al.* Hongxun. A preliminary application of PCR-DGGE to study microbial diversity in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8): 1570—1575.
- [11] Henckel T, Friedrich M, Conrad R. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate permission methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 1980—1990.
- [12] Seghers D. Top E M, Reheul D, *et al.* Long-term effects of mineral versus organic fertilizers on activity and structure of the methanotrophic community in agricultural soils. *Environmental Microbiology*, 2003, 10, 867—877.
- [13] Zheng J F, Zhang X H, Li L Q, *et al.* Effect of long-term fertilization on C mineralization and production of CH₄ and CO₂ under anaerobic incubation from bulk and PSF of a typical paddy soil from Tai Lake Region, China. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 2007, 120: 129—138.
- [14] Pan G X, Zhou P, Zhang X H, *et al.* Effect of different fertilization practices on crop carbon assimilation and soil carbon sequestration: A case of paddy under a long-term fertilization trial from the Tai Lake region, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26 (1): 3704—3710.
- [15] Zhou P, Zhang X H, Pan G X, *et al.* Effect of long-term fertilization on content of total and particulate organic carbon and their depth distribution of a paddy soil: An example of huangnitu from the Tai Lake region, China. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2006, 12 (6): 765—771.
- [16] Zheng J F, Zhang X H, Pan G X, *et al.* Diurnal variation of soil basal respiration and CO₂ emission from typical paddy soil after rice harvest under long-term different fertilizations. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2006, 12 (4): 485—494.
- [17] Qiu D H, Li L Q, Jiao S J, *et al.* Change of soil fertility under long-term different fertilization practices in a paddy soil from the Tai Lake region. *Soil and Fertilizer*, 2005 (4): 28—32.
- [18] Zhang P J, Li L Q, Pan G X, *et al.* Influence of long-term fertilizer management on topsoil biomass and genetic diversity of a paddy soil from the Tai Lake region, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24 (12): 2818—2823.
- [19] Xiang C G, Zhang P J, Pan G X, *et al.* Changes in diversity, protein content, and amino acid composition of earthworms from a paddy soil under different long-term fertilizations in the Tai Lake Region, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26 (6): 1667—1673
- [20] Lu R K ed. *Methods of soil and Agro-Chemistry Analysis*. Beijing: China Agriculture Technology Press, 2000. 256—262.
- [21] Cai Z C, Mosier A R. Effect of water status on CH₄ oxidation, N₂O and CO₂ emission. *Soils*, 1999, 31(6): 289—224.
- [22] Xu H. Effect of soil properties and soil water contents in the winter crop season on CH₄ flux during rice growth period and its mechanisms. Ph. D. Dissertation. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, 2001. 47.
- [23] Bodelier P L E, Franke M M, Zwart G, *et al.* New DGGE strategies for the analyses of methanotrophic microbial communities using different combinations of existing 16S rRNA-based primers. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52: 163—174.
- [24] Hedrick D B, Peacock A, Stephen J R, *et al.* Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 41: 235—248.
- [25] Hütsch B W, Webster C P, Powlson D S. Long-term effects of nitrogen-fertilization on methane oxidation in soil of the broad balk wheat

- experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, 1993, 25: 1307—1315.
- [26] Hütsch B W. Methane oxidation in soils of two long-term fertilization experiments in Germany. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 6: 773—782.
- [27] Cai Z C, Mosier A R. Effect of NH_4Cl addition on methane oxidation by paddy soils *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32 1537—1545.
- [28] King G M, Schnell S. Effect of increasing atmospheric methane concentration on ammonium inhibition of soil methane consumption. *Nature*, 1994, 370: 282—284.
- [29] Bender M, Conrad R. Effect of CH_4 concentrations and soil conditions on the induction of CH_4 oxidation activity. *Soil Biol. Biochem.*, 1995, 27: 1517—1527.
- [30] Wang Z P, Ineson P. Methane oxidation in a temperate coniferous forest soil: effects of inorganic N. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35: 427—433.
- [31] Mosier A, Schimel D, Valentine D, *et al.* Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. *Nature*, 1991, 350: 330—332.
- [32] Steinkamp R, Butterbach-Bahl K, Papen H. Methane oxidation by soils of an N limited and N fertilized spruce forest in the Black Forest, Germany. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 145—153.
- [33] Gullledge J, Hrywna Y, Cavanaugh C, *et al.* Effects of long-term nitrogen fertilization on the uptake kinetics of atmospheric methane in temperate forest soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49: 389—400.
- [34] Powlson D S, Goulding K W T, Willison T W, *et al.* The effect of agriculture on methane oxidation in soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1997, 49: 59—70.
- [35] Sommer S G, Sherlock R R, Khan R Z. Nitrous oxide and methane emissions from pig slurry amended soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28, 1541—1544.
- [36] Lv Q, Min H, Chen Z Y. Effect of long-term fertilization on the methane oxidation and the methane emission in paddy soil. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2004, 10(6): 608—612.
- [37] Willison T W, Cook R, Müller A, Powlson D S. CH_4 oxidation in soils fertilized with organic and inorganic-N; different effects. *Soil Biology and Soil Biochemistry*, 1996, 28(1): 135—136.
- [38] Seghers D, Siciliano S D, Top E M, Verstraete W. Combined effect of fertilizer and herbicide applications on the abundance, community structure and performance of the soil methanotrophic community. *Soil Biology and Soil Chemistry*, 2005, 37: 187—193.
- [39] Adamsen A P S, King G M. Methane consumption in temperate and subarctic forest soils: rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59, 485—490.
- [40] Roslev P, Iversen N. Radioactive fingerprinting of microorganisms that oxidize atmospheric methane in different soils. *App. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 4064—4070.

参考文献:

- [10] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用. *生态学报*, 2003, 23 (8): 1570~1575.
- [14] 潘根兴, 周萍, 张旭辉, 等. 不同施肥水稻土作物碳同化与土壤碳固定的影响——以太湖地区黄泥土肥料长期试验为例. 2006, 26 (1): 3704~3710.
- [15] 周萍, 张旭辉, 潘根兴. 长期不同施肥对太湖地区黄泥土总有机碳及颗粒态有机碳含量及深度分布的影响. *植物营养与肥料科学*, 2006, 12 (6): 765~771.
- [16] 郑聚锋, 张旭辉, 潘根兴, 等. 水稻土基底呼吸与 CO_2 排放强度的日动态及长期不同施肥下的变化. *植物营养与肥料学报*, 2006, 12 (4): 485~494.
- [17] 邱多生, 李恋卿, 焦少俊, 潘根兴, 等. 长期不同施肥下太湖地区黄泥土肥力的变化. *土壤肥料*, 2005 (4): 28~32.
- [18] 张平究, 李恋卿, 潘根兴, 等. 长期不同施肥下太湖地区黄泥土表土微生物碳氮量及基因多样性变化. *生态学报*, 2004, 24 (12): 2818~2823.
- [19] 向昌国, 张平究, 潘根兴, 等. 长期不同施肥下太湖地区黄泥土蚯蚓的多样性、蛋白质含量与氨基酸组成的变化. *生态学报*, 2006, 26 (6): 1667~1673.
- [20] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 中国农业出版社, 2000, 256~262.
- [22] 徐华. 土壤性质和冬季水分对水稻生长期 CH_4 排放的影响及机理, 博士论文. 中国科学院南京土壤研究所, 2001, 45~51.
- [36] 吕琴, 闵航, 陈中云. 长期定位试验对水稻田土壤甲烷氧化活性和甲烷排放通量的影响. *植物营养与肥料学报*, 2004, 10(6): 608~612.