

长期不同 H 对暗棕壤甲烷氧化菌群落特征与功能的影响

杨芊葆¹, 范分良², 王万雄¹, 梁永超^{2*}, 李兆君², 崔喜安³, 魏丹⁴

(1. 甘肃农业大学资源与环境学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业部作物营养与施肥重点实验室, 北京 100081; 3. 黑龙江省农业科学院黑河分院, 黑河 164300; 4. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086)

摘要:不同施肥方式对我国旱地农田土壤甲烷氧化影响的微生物机制尚不明确. 本研究利用 PCR-DGGE 和实时荧光定量 PCR 技术, 结合甲烷氧化速率和土壤性质测定, 探索了长期不同施肥条件下暗棕壤的“土壤性质-甲烷氧化菌群落特征-土壤甲烷氧化速率”关系. 结果表明, 有机肥和无机肥配施处理显著降低了土壤甲烷氧化速率, 降幅为 61.2%, 而单独施用有机肥或无机肥对暗棕壤甲烷氧化速率的影响不显著; 与对照相比, 有机肥处理土壤甲烷氧化菌多样性指数增加 91.9%, 有机肥和无机肥配施处理增加 102.5%, 而单施无机肥后土壤甲烷氧化菌多样性指数变化不明显; 有机肥处理土壤的 *pmoA* 基因丰度显著增加, 平均 *pmoA* 基因丰度为不施用有机肥的 12.7 倍; 土壤甲烷氧化速率与甲烷氧化菌的群落结构和比活性呈显著正相关, 相关系数分别为 0.363 和 0.684, 但与甲烷氧化菌群落丰度和多样性不相关; 甲烷氧化菌的群落结构和比活性与土壤 pH 值、全氮和有机质含量呈显著正相关. 上述结果说明, 长期不同施肥可以通过改变暗棕壤的 pH 值、全氮和有机质含量等土壤性质, 改变甲烷氧化菌群落结构和比活性, 进而影响土壤甲烷氧化速率; 有机肥和无机肥配施土壤甲烷氧化菌多样性和丰度大幅度增加, 而甲烷氧化速率却显著降低, 说明有机肥和无机肥配施土壤中只有部分微生物发挥了甲烷氧化活性, 但有待进一步研究.

关键词:暗棕壤; 甲烷氧化菌; *pmoA* 基因; 实时定量 PCR; 甲烷氧化速率; 冗余分析; Monte Carlo 检验; PCR-DGGE

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)11-2756-07

Effects of Different Long-Term Fertilizations on Community Properties and Functions of Methanotrophs in Dark Brown Soil

YANG Qian-bao¹, FAN Fen-liang², WANG Wan-xiong¹, LIANG Yong-chao², LI Zhao-jun², CUI Xi-an³, WEI Dan⁴

(1. Institute of Resources and Environment, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. The Ministry of Agriculture Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Heihe Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heihe 164300, China; 4. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: The microbial mechanisms of how different long-term fertilizations change methane oxidation of Chinese upland arable soil is unclear so far. In the present study, we attempted to investigate the “soil properties-community properties of methanotrophs-methane oxidation” relation of dark brown soil in Northeastern China under different long-term fertilization regimes. Community structure and abundance were monitored with PCR-DGGE and real time PCR, respectively. Methane oxidizing rate and soil properties were measured as well. The results show that combined use of mineral fertilizer and compost (MNP) reduce soil methane oxidation by 61.2%, whereas either mineral fertilizer (NP) or compost (M) shows no effect. Comparing with no fertilizer (CK), M and MNP increase the Shannon index of methanotrophs by 91.9% and 102.5%, respectively, whereas NP has no effect. Similarly, M (M or MNP) significantly increases *pmoA* gene abundance by up to 12.7 folds compared with no M addition (CK or NP). Methane oxidizing rates are significantly correlated with community structure and specific activity of methanotrophs, with correlation coefficients of 0.363 and 0.684, respectively. However, methane oxidizing rates do not correlate with abundance and diversity of methanotrophs. In addition, community structures and specific activity of methanotrophs are significantly correlated with soil pH and content of total nitrogen and organic matter. Our results suggest that long-term different fertilizations may change soil properties (such as pH and content of total nitrogen and organic matter) and thereafter the community structure and specific activity of soil methanotrophs, by which long-term different fertilizations influence soil methane oxidizing rate. The opposite change of methane oxidation to methanotrophs diversity and abundance in MNP suggests that only parts of the methanotrophs are active, which needs further research.

Key words: dark brown soil; methanotrophs; *pmoA* gene; real time PCR; methane oxidation rate; redundancy analysis; Monte Carlo test; PCR-DGGE

收稿日期: 2009-12-31; 修订日期: 2010-03-19

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2005CB121105); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD05B05); 国家自然科学基金项目 (40901119)

作者简介: 杨芊葆 (1984 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤微生物分子生态学, E-mail: yang_qb@126.com

* 通讯联系人, E-mail: ycliang@caas.ac.cn

大气中甲烷(CH_4)浓度为 $1.75 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 目前还在以每年 1% 的速度增加. 根据 IPCC 的报告, 1 kg CH_4 的辐射增温效益是 CO_2 的 21 倍, CH_4 占大气增温潜势的 15% ~ 20%, 是第二大温室气体^[1]. 在陆地生态系统中, 土壤中甲烷氧化菌的氧化约占大气甲烷汇的 10%, 是目前已知的唯一生物汇^[1]. 研究土壤甲烷氧化的调控机制, 对减缓气温增加有重大意义.

甲烷氧化菌的群落特征(如群落多样性与群落结构等)主要由土壤类型决定, 不同类型的土壤往往具有不同种类的甲烷氧化菌^[2,3]; 由于不同甲烷氧化菌生理特征不同, 不同的甲烷氧化菌群落对外界环境因子的响应也表现出较大的差异^[4]. 因此, 甲烷氧化菌的群落特征往往能用来解释土壤甲烷氧化速率的差异及其对环境因子变化的响应^[4,5]; 但环境因子与土壤甲烷氧化速率的对应性较差, 如森林土壤中甲烷氧化速率主要受土壤含水量和无机氮浓度影响^[6], 而草原和农田土壤的甲烷氧化速率则受 pH 值影响较大^[7,8]. 所以, 明确环境因子如何影响甲烷氧化菌群落特征, 进而改变甲烷氧化速率的过程, 对阐明土壤甲烷氧化的影响机制有重要意义. 最近已有研究证实: 放牧和退草还林等人类活动通过改变 pH 值和无机氮形态等性质改变草原生态甲烷氧化菌的群落特征, 从而改变土壤甲烷氧化速率^[8,9]. 但目前对旱地农田土壤“土壤性质-甲烷氧化菌群落特征-甲烷氧化速率”三者关系的研究很少.

在国内, 多位学者深入探讨了我国稻田系统甲烷氧化的微生物机制. 如 Qiu 等^[10] 和 Wu 等^[11] 发现短期施用尿素对杭州稻田的甲烷氧化速率和群落结构的影响较小; Zheng 等^[12] 和郑聚锋等^[13] 发现长期不同施肥改变了我国南方稻田甲烷氧化菌的群落结构和甲烷氧化速率. 最近 Zhou 等^[14] 探索了我国旱地土壤甲烷氧化的微生物机制, 他们发现: 放牧强度对我国北方草原甲烷氧化菌的群落结构影响大, 而对土壤甲烷氧化速率影响小. 但是, 迄今对我国旱地农田土壤甲烷氧化微生物机制的研究还鲜有报道.

本研究利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)和实时荧光定量 PCR 技术(QPCR), 结合土壤性质和甲烷氧化速率测定, 旨在探索长期不同施肥条件下暗棕壤的“土壤性质-甲烷氧化菌群落特征-土壤甲烷氧化速率”关系, 以期为加深理解不同农业管理措施对土壤甲烷氧化影响的微生物机制提供理论参考.

1 材料与方法

1.1 长期定位施肥实验概况

研究地点位于黑龙江省农科院黑河分院, 地处北纬 $50^{\circ}15'$, 东经 $127^{\circ}29'$, 属高纬寒地, 年平均气温 $-2.0 \sim 1.0^{\circ}\text{C}$, 无霜期 80 ~ 130 d, 降雨 350 ~ 450 mm, 5 ~ 9 月占年降雨量 75%, 土壤类型为草甸暗棕壤. 田间试验于 1980 年开始设立, 开始时的耕层土壤(0 ~ 20 cm)基础养分为: 土壤有机质 $42.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全氮 $2.23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全磷 $1.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 水解氮 $55.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效磷 $8.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH 6.12. 试验共设 12 个处理, 小区面积为 220 m^2 , 种植体系为小麦-大豆轮作. 本研究选取代表低投入(不施肥, CK)、有机肥(M)、无机肥(NP)和常规施肥(有机肥 + 无机肥, MNP)研究长期不同施肥方式对土壤甲烷氧化微生物过程的影响. M 处理为每 3a 施用一次鲜粪堆肥, 施用量为 $22.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$; NP 处理为春秋施用氮(N)和磷肥(P_2O_5)各 $37.5 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$; MNP 处理施肥量和施肥方式为 M 处理和 NP 处理的总和.

1.2 样品采集及预处理

土壤样品于 2008 年 8 月 3 日采集, 此时大豆处于盛花期. 采用五点法取样, 取样深度为 0 ~ 20 cm, 将 5 个点混合均匀作为一个土样, 重复 3 次. 采集好的土样尽快带回实验室, 鲜土在一个工作日内去除植物残体和石头等杂质, 过 2 mm 筛, 用于测定土壤含水量及甲烷氧化速率; 用于微生物分子试验的土样保存于 -80°C 冰箱; 部分土样自然风干处理, 用于测定基本理化性质.

1.3 土壤理化性质测定

土壤含水量采用烘干法测定; 土壤 pH 值采用电位法(水土比为 2.5:1)测定; 土壤有机质(organic matter, OM)采用重铬酸钾容量法(外加热法)测定; 土壤全氮(total nitrogen, TN)采用开氏消煮法测定; 土壤全磷(total phosphorous, TP)采用酸溶-钼锑抗比色法测定^[15].

1.4 土壤微生物总 DNA 提取和 PCR 扩增

采用 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒和 MP FastPrep-24 核酸提取仪, 称取 0.5 g 存于 -80°C 的鲜土样品, 根据试剂盒的提取步骤提取土壤微生物总 DNA, 纯化后的 DNA 用 1% 琼脂糖电泳验证, 存放于 -20°C 备用.

本研究使用巢式 PCR 扩增甲烷氧化菌的 *pmoA* 基因, 第一轮引物为 A189f 和 A682r; 第二轮引物为 A189fgc 和 Mb661^[16]. 两轮 PCR 扩增均采用 $25 \mu\text{L}$

体系: $10 \times \text{Ex Taq Buffer}$ (Takara, 大连) $2.5 \mu\text{L}$, dNTP Mixture ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Takara, 大连) $2 \mu\text{L}$, 前后引物各 $0.5 \mu\text{L}$ ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 生工, 上海), Ex Taq ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.125 \mu\text{L}$, 牛血清蛋白 $0.625 \mu\text{L}$ ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 只在第一轮加, 第二轮不加), 模板 DNA (稀释 10 倍) $2 \mu\text{L}$, 最后用适量无菌超纯水补足至 $25 \mu\text{L}$.

扩增反应在 BIO-RAD 公司的 DNA Engine Peltier Thermal Cycler 中进行, 反应程序为: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 1 min, $62 \sim 52^\circ\text{C}$ 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 前 20 个循环每个循环退火温度降低 0.5°C , 后 13 个循环退火温度为 52°C , 最后 72°C 延伸 10 min. 第二轮 PCR 为 31 个循环. 每组 PCR 扩增过程中都设立一个不加模板 DNA 的阴性对照, PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检验.

1.5 变性梯度凝胶电泳 DGGE

DGGE 凝胶电泳采用 BIO-RAD 公司的 Dcode TM 基因突变检测系统. 使用浓度为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 厚度为 1 mm, 变性梯度从上到下为 40% ~ 55%, 上样量为 $20 \mu\text{L}$. 其运行条件是在 $1 \times \text{TAE}$ 电泳缓冲液中 75V 60°C 下电泳 16 h. 电泳完毕后, 用 10 mL SyBR green I (Sigma) ($1 \times \text{TAE}$ 稀释 10 000 倍) 核酸染料染色 30 min, 然后用 BIO-RAD 紫外凝胶成像系统拍照.

1.6 实时荧光定量 PCR

标准曲线的制作: 将琼脂糖胶纯化后的 PCR 产物 (引物为不带 GC 夹的 A189f 和 Mb661) 用载体 pmD19-T 和感受态细胞 JM 109 进行克隆, 采用 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒提取过夜培养后的阳性克隆质粒, 从 $10^8 \sim 10^1$ 进行 10 倍浓度梯度稀释, 存于 -80°C 待用.

实时荧光定量 PCR 在 Bio-Rad IQ5 上进行. 反应体系为: $1 \mu\text{L}$ 50 倍稀释的模板 DNA, $10 \mu\text{L}$ $2 \times \text{Bio-Rad Supermix}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A189f 和 Mb661 引物各 $0.4 \mu\text{L}$, 加无菌水至 $20 \mu\text{L}$. PCR 反应为 40 个循环, 除加入一个 85°C 的荧光信号收集步骤, 其它步骤与前述普通 PCR 相同. 实时荧光定量 PCR 的结果用 IQ5 2.0 进行分析.

1.7 土壤甲烷气体氧化速率测定

称取 10.0 g 鲜土到 50 mL 血清瓶中, 然后将血清瓶用异丁基橡胶塞密封 (不加入标准气体 CH_4). 同时准备 3 个规格相同, 不装土的 血清瓶, 用于测定土壤装瓶时空气中的 CH_4 浓度. 将瓶子置于 25°C 条件下进行培养, 培养 4 d 后用注射器采集瓶中的气

体 5 mL . 气体样品分析采用 HP7890A 气相色谱仪, 测定 CH_4 分析柱均为 Porapak. Q 填充柱, 柱箱温度为 70°C , 载气为 N_2 , 检测器为氢火焰离子检测器 FID, 工作温度 200°C ; 气相色谱仪在每次测试时使用国家标准计量中心的标准气体进行标定, 测定的相对误差控制在 CH_4 为 1% 以内. 以单位时间内相对于土壤装瓶时空气中 CH_4 的减量评价土壤甲烷氧化速率.

1.8 数据分析

土壤甲烷氧化比活性按公式 (1) 计算:

$$\text{比活性} = \frac{\text{单位土壤甲烷氧化速率}}{\text{该土中的 } pmoA \text{ 基因拷贝数}} \quad (1)$$

DGGE 图谱用 Quantity One 软件进行数字化处理, 根据样品条带位置和亮度的峰密度值, 转化为与 DGGE 条带相对应的二维数据阵列, 用以计算多样性指数和相关性分析.

甲烷氧化菌 Shannon 多样性指数^[17] 按公式 (2) 计算:

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i = - \sum_{i=1}^s (N_i/N) \ln (N_i/N) \quad (2)$$

用 Canoco 软件 (Canoco for Windows 4.5, USA) 中的冗余法 (redundancy analysis) 分析甲烷氧化菌群落结构与理化性质, 以及甲烷氧化菌群落结构与土壤甲烷氧化速率的相关性, 相关性的显著性用 Monte Carlo 法进行检验.

长期不同施肥对土壤物理和化学性质、甲烷氧化速率、比活性、*pmoA* 基因丰度和甲烷氧化菌影响的显著性用单因素方差分析 (SAS 8.0) 检验, 并进行多重比较.

2 结果与分析

2.1 土壤甲烷氧化速率

28 a 不施肥后供试黑河暗棕壤的甲烷氧化速率为 $26.8 \text{ pmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ [图 1(a)], 相比之下, 长期单施有机肥和 NP 处理的土壤甲烷氧化速率略有下降, 差异不显著; 有机肥和 NP 配施处理 (MNP) 土壤甲烷氧化速率下降剧烈, 仅为 CK 的 38.8%, 且差异显著. 将土壤甲烷氧化速率除以甲烷氧化菌群落丰度得到甲烷氧化菌的比活性, 如图 1(b) 所示, 长期不同施肥条件下土壤甲烷氧化菌的比活性存在显著差异, 施用有机肥的土 (M 和 MNP) 甲烷氧化菌的比活性显著低于不施有机肥的土 (CK 和 NP).

2.2 甲烷氧化菌的群落特征

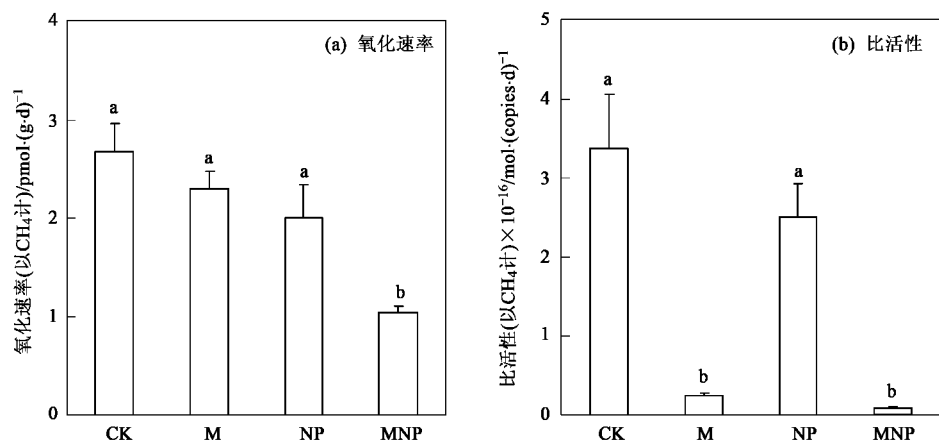


图 1 长期不同 H 对土壤甲烷氧化速率 / 活性的影响

Fig. 1 Effects of different long-term fertilizations on soil methane oxidizing activity and specific methane oxidizing activity

甲烷氧化菌 *pmoA* 基因的 DGGE 图谱如图 2 所示. CK 处理的泳道中有 5 条较明显的条带,重复性较好, M 处理的条带数比 CK 处理多 21 条,且平均亮度显著增强. NP 处理的 2 个泳道中条带数量和位置与 CK 相同,但另一重复较其它 2 个重复多出 6 条条带,使整个泳道条带的数量和位置介于 NP 和 M 之间. M 和 MNP 处理间的差异体现在:条带数增加了 1 条,而位置有 2 条不同.

长期不同施肥处理卜 的甲烷氧化菌 Shannon 指数差异非常明显(表 1),CK 和 NP 处理土壤甲烷氧化菌多样性指数分别为 1.60 和 1.64, M 和 MNP 处理的多样性指数分别为 3.07 和 3.24. 与 CK 处理相比, M 处理土壤甲烷氧化菌多样性指数增加 91.88%, MNP 处理增加 102.50%, 二者平均增加 97.19%, 而施 NP 后土壤甲烷氧化菌多样性指数仅增加 2.50%. 不施有机肥处理与施有机肥处理卜 之间甲烷氧化菌多样性指数差异非常显著.

长期不同施肥土壤的甲烷氧化菌群落丰度(*pmoA* 基因丰度)也存在显著差异(表 1),变化规律与 Shannon 指数类似:CK 和 NP 处理卜 的 *pmoA* 基因丰度分别为 0.83×10^7 copies·g⁻¹ 和 0.80×10^7 copies·g⁻¹,施用有机肥的 M 和 MNP 处理卜 的 *pmoA* 基因丰度显著增加,分别为 9.04×10^7 copies·g⁻¹ 和 11.68×10^7 copies·g⁻¹;施用有机肥处理的平均 *pmoA* 基因丰度为不施用有机肥的 12.7 倍;CK 和 NP 之间以及 M 和 MNP 之间差异不显著.

2.3 甲烷氧化速率与甲烷氧化菌群落特征的相关性

为了进一步探讨甲烷氧化菌的功能与甲烷氧化菌群落特征的关系,对两者进行了相关分析,结果表

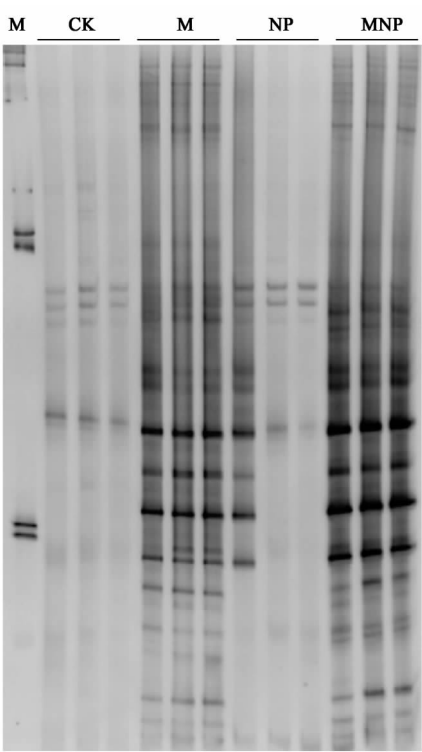


图 2 长期不同 H 下土壤甲烷氧化菌的 DGGE 图谱

Fig. 2 Effects of different long-term fertilizations on DGGE profiles of soil methanotrophs

表 1 长期不同 H 对土壤甲烷氧化菌群落丰度和多样性的影响

Table 1 Effects of different long-term fertilizations on community abundance and diversity

处理	<i>pmoA</i> 基因丰度 × 10 ⁷ / copies·g ⁻¹	香农指数
CK	0.83 b	1.60 b
M	9.04 a	3.07 a
NP	0.80 b	1.64 b
MNP	11.68 a	3.24 a

明(表2),甲烷氧化菌群落结构与甲烷氧化速率呈正相关,且达显著水平. 甲烷氧化菌的比活性与甲烷氧化菌群落结构呈显著正相关,而与甲烷氧化菌丰度和甲烷氧化菌多样性呈显著负相关.

表 2 土壤甲烷氧化速率与甲烷氧化菌群落特征(群落丰度、多样性和群落结构)的相关系数和显著性(*p* 值)

Table 2 Correlation and its significance (*p* value) of soil methane oxidizing activity and community properties (abundance, diversity and community structure) of methanotrophs

群落特征	甲烷氧化速率		甲烷氧化比活性	
	相关系数 <i>r</i>	<i>p</i> 值	相关系数 <i>r</i>	<i>p</i> 值
<i>pmoA</i> 基因丰度	-0.567	0.055	-0.850	< 0.001
香农指数	-0.509	0.091	-0.867	< 0.001
群落结构	0.363	0.030	0.646	0.004

表 3 长期不同 H 对土壤部分物理和化学性质的影响

Table 3 Effects of different long-term fertilizations on soil physic-chemical properties

处理	含水量/%	pH	有机质/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	全氮/%	全磷/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	C/N	C/P
CK	36.41 ab	5.24 c	39.03 b	0.22 c	0.58 a	17.59 a	70.72 a
M	37.65 a	5.77 b	39.71 b	0.23 b	0.62 a	17.44 a	66.75 a
NP	34.81 bc	5.12 d	38.60 b	0.22 c	0.53 a	17.94 a	72.89 a
MNP	33.28 c	6.05 a	45.02 a	0.26 a	0.79 a	17.43 a	58.92 a

2.5 甲烷氧化菌群落结构与 卜 性质的相关性

采用冗余分析法分析了甲烷氧化菌群落结构与 卜 性质的相关性(图3). 图3显示,甲烷氧化菌群落结构的变异主要反应性 X 轴上,能解释 卜 异的 84.6%,而 Y 轴仅能解释 卜 异的 8.3%;pH、TP、TN、OM、C/N 矢量箭头与 X 轴的方向比较接近,但

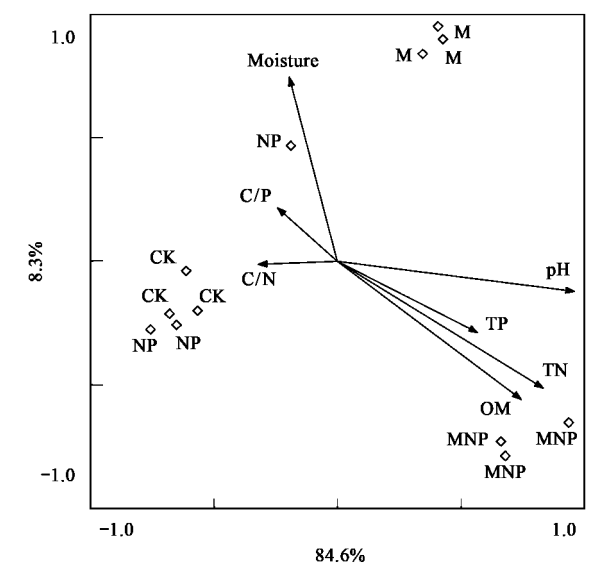


图 3 长期不同 H 下甲烷氧化菌群落结构与环境因子相关性的冗余分析

Fig. 3 Redundancy analyses of the correlation of soil properties and community structure of methanotrophs under long term different fertilizations

2.4 卜 物理和化学性质

长期不同施肥显著改变了 卜 的部分物理和化学性质(表3). 单施有机肥的土壤含水量最高,有机无机配施的含水量最低,CK 和 NP 处理的介于两者之间. 与 CK 处理相比,无机肥处理显著降低了 卜 pH;相反,有机肥在施用和不施用无机肥 2 种情况下都显著提高了 卜 pH. 有机和无机肥同时施用后,土壤有机质含量高于 CK, M 和 NP 处理的 卜 有机质含量与 CK 处理差异不明显. M 和 MNP 处理的 卜 全氮含量高于 CK 处理,而 NP 处理对土壤全氮含量影响不明显. 4 种施肥处理没有改变 卜 全磷、C/N 和 C/P.

以 pH、TN、OM 的矢量箭头在 X 轴的投影较长;用 Monte Carlo 法检验后表明,pH、TN、OM 与甲烷氧化菌群落结构的相关系数依次为 0.78 ($F = 35.8, p = 0.002$) > 0.61 ($F = 15.7, p = 0.002$) > 0.49 ($F = 9.8, p = 0.006$),而 TP、C/N、C/P 和土壤含水量与甲烷氧化菌群落结构的相关性较小,且没有达到显著性($p > 0.05$).

甲烷氧化菌的比活性与 卜 性质的相关性分析如表 4 所示. 甲烷氧化菌的比活性与 卜 pH、全氮和有机质含量呈显著负相关,而与土壤含水量、全磷、C/N 和 C/P 不相关.

3 讨论

一般认为,氮肥是对土壤甲烷氧化速率影响最大的肥料种类. 最近, Liu 等^[18] 综述了不同生态系统中氮肥对甲烷氧化速率的影响,得出氮肥对土壤甲烷氧化的平均抑制率为 38%. 本研究结果表明,同时施用有机和无机肥 28 a 后,暗棕壤甲烷氧化速率下降了 61.2%. 此结果一方面说明施肥方式对我国旱地土壤甲烷氧化速率的影响巨大,另一方面也表明通过设计合理的施肥方案促进 卜 吸收甲烷的空间很大.

同种施肥措施在不同地区对土壤甲烷氧化速率的影响存在很大的差异. 长期施用含氮无机肥后,本

表 4 甲烷氧化菌比活性与土壤性质的相关性系数(*r*)及显著性(*p* 值)

Table 4 Correlation coefficients (<i>r</i>) and their significance (<i>p</i> value) between the specific activity methanotrophs and soil properties							
项目	含水量/%	pH	有机质/g·kg ⁻¹	全氮/%	全磷/g·kg ⁻¹	C/N	C/P
<i>r</i>	0.199	-0.855	-0.604	-0.658	-0.478	0.202	0.363
<i>p</i>	0.535	< 0.001	0.037	0.020	0.116	0.530	0.246

研究的参试土壤甲烷氧化速率下降不明显,但在其它地区则多表现抑制效应,如 Hüetsch 等^[19]发现,长期施用无机肥后 卜 的甲烷氧化速率显著下降;稻田生态系统中,甲烷氧化对氮肥响应也存在地区差异,如氮肥促进了意大利稻田的甲烷氧化^[20],而在我国杭州稻田则没有效果^[11]. 与此类似,有机肥在不同系统的作用也不同,有机肥对本研究中的土壤甲烷氧化速率表现出细微的抑制作用,而提高了比利时 卜 的甲烷氧化速率^[2]. 此外,作者还发现,含氮无机肥和有机肥对土壤甲烷氧化速率抑制有加和效应. 综上所述,用施肥方式难以预测土壤甲烷氧化速率的变化.

与施肥方式相反,作者发现黑河暗棕壤甲烷氧化速率与甲烷氧化菌群落结构显著相关,说明改变甲烷氧化菌群落结构是施肥影响土壤甲烷氧化速率的一种机制,该结果与国外的研究结论一致^[8,21]. 但是,尽管本研究中施用有机肥后土壤甲烷氧化菌群落丰度增加为原来的 10 倍以上,但 卜 的甲烷氧化速率并未相应增加,说明群落丰度不是改变本试验土壤甲烷氧化速率的因素,该结果与 Seghers 等^[2]的结果不一致,他们发现施用堆肥的玉米地里甲烷氧化菌群落丰度和速率同时增加,而施用除草剂的土壤甲烷氧化菌群落丰度和速率同时不变. 同样,本研究 卜 的甲烷氧化菌的多样性也发生了显著改变,但此改变与甲烷氧化速率没有相关性. 值得注意的是,本研究中甲烷氧化菌群落结构与甲烷氧化速率的相关系数仅为 0.363,说明还有其它控制因子. 通过计算发现,甲烷氧化菌的比活性与群落氧化速率呈显著正相关($r = 0.684, p = 0.014$),说明改变甲烷氧化菌的平均氧化能力是长期不同施肥影响我国东北暗棕壤甲烷氧化速率的另一种机制. 与此类似,Menyailo 等^[9]发现比活性在俄罗斯草原种植人工林后土壤甲烷氧化速率变化中也扮演重要角色.

从长远看,土壤微生物群落特征主要受 卜 性质的调控. 近几年一些大尺度的调查也证实,卜 性质如 pH 和盐碱度是调控细菌多样性和群落结构的关键因子^[22, 23]. 本研究中,作者通过 Monte Carlo 检验发现,暗棕壤甲烷氧化菌群落结构主要受 卜

pH、全氮和有机质含量的影响. 另外,相关分析表明,甲烷氧化菌的比活性与 pH、全氮和有机质含量也呈显著相关. 因此,卜 性质调控了影响暗棕壤甲烷氧化速率的 2 个甲烷氧化菌群落特征,这与 Menyailo 等^[9]在草原系统中的研究结果类似,他们发现无机氮通过改变甲烷氧化菌的比活性影响土壤甲烷氧化速率. 由此看来,长期不同施肥可以通过改变 卜 物理和化学性质影响甲烷氧化菌群落特征和比活性,进而改变土壤甲烷氧化速率.

群落结构变化后甲烷氧化速率发生改变,说明不同甲烷氧化菌对甲烷的氧化能力及活性不同^[24],部分甲烷氧化菌甚至并不氧化甲烷^[21]. 本研究中,MNP 处理土壤甲烷氧化菌种类(DGGE 条带数量)与 CK 和 NP 处理相比大幅度增加,但甲烷氧化速率却显著降低,说明 MNP 处理 卜 中也只有部分微生物发挥了甲烷氧化活性,这也是群落结构只能部分解释甲烷氧化速率变化和比活性降低的主要原因. 此外,发挥氧化功能的甲烷菌可能更容易受 卜 性质的影响,如添加尿素后意大利水稻土中只有 I 型甲烷氧化菌中甲基微菌属(*Methylobacterium*)和甲基暖菌属(*Methylocaldum*)的生长受到促进,而 II 型甲烷氧化菌变化不明显^[21]. 因此,进一步有针对性地研究这些“活跃”的甲烷氧化菌,探讨“农业管理措施-卜 性质-活跃甲烷菌群落特征-土壤甲烷氧化速率”的关系将是深入理解农业措施改变我国旱地农田土壤甲烷氧化速率需要研究的重要内容.

4 结论

(1) 单独施用有机肥或无机肥对暗棕壤甲烷氧化速率的抑制作用较小,而有机肥和无机肥配施处理显著降低了土壤甲烷氧化速率,仅为不施肥处理 卜 的 38.8%.

(2) 土壤甲烷氧化速率与甲烷氧化菌群落丰度和多样性没有相关关系,与甲烷氧化菌群落结构呈显著正相关,相关系数为 0.363,与甲烷氧化菌平均甲烷氧化速率呈显著正相关,相关系数为 0.684,表明通过改变甲烷氧化菌的群落结构和平均甲烷氧化速率是长期不同施肥影响暗棕壤土壤甲烷氧化速率的主要机制.

(3) 暗棕壤甲烷氧化菌群落结构和比活性与土壤 pH、全氮和有机质含量呈显著正相关关系,表明不同施肥可以通过改变土壤 pH、全氮和有机质含量等土壤性质影响甲烷氧化菌群落特征,进而改变土壤甲烷氧化速率。

(4) MNP 处理土壤甲烷氧化菌多样性和丰度大幅度增加,而甲烷氧化速率却显著降低,说明 MNP 处理土壤中只有部分微生物发挥了甲烷氧化活性。因此,必须进一步研究这些“活跃”的甲烷氧化菌,探讨“农业管理措施-土壤性质-活跃甲烷菌群落特征-土壤甲烷氧化速率”的关系。

参考文献:

- [1] Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Emissions scenarios, special report of the intergovernmental panel on climate change [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- [2] Seghers D, Siciliano S D, Top E M, *et al.* Combined effect of fertilizer and herbicide applications on the abundance, community structure and performance of the soil methanotrophic community[J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, **37**(2): 187-193.
- [3] Knief C, Lipski A, Dunfield P F. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(11): 6703-6714.
- [4] Mohanty S R, Bodelier P L E, Floris V, *et al.* Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(2): 1346-1354.
- [5] Guldge J, Doyle A P, Schimel J P. Different NH_4^+ -inhibition patterns of soil CH_4 consumption: a result of distinct CH_4 -oxidizer populations across sites[J]. *Soil Biol Biochem*, 1997, **29**(1): 13-21.
- [6] Jang I, Lee S, Hong J H, *et al.* Methane oxidation rates in forest soils and their controlling variables: a review and a case study in Korea[J]. *Ecol Res*, 2006, **21**(6): 849-854.
- [7] Powlson D S, Goulding K W T, Willison T W, *et al.* The effect of agriculture on methane oxidation in soil [J]. *Nutr Cycl Agroecosys*, 1997, **49**(1): 59-70.
- [8] Abell G C J, Stralis-Pavese N, Sessitsch A, *et al.* Grazing affects methanotroph activity and diversity in an alpine meadow soil[J]. *Environ Microbiol Rep*, 2009, **1**: 457-465.
- [9] Menyailo O V, Hungate B A, Abraham W R, *et al.* Changing land use reduces soil CH_4 uptake by altering biomass and activity but not composition of high-affinity methanotrophs [J]. *Glob Change Biol*, 2008, **14**(10): 2405-2419.
- [10] Qiu Q, Noll M, Abraham W R, *et al.* 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**(6): 602-614.
- [11] Wu L, Ma K, Lu Y. Rice roots select for type I methanotrophs in rice field soil [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2009, **32**(6): 421-428.
- [12] Zheng Y, Zhang L M, Zheng Y M, *et al.* Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices [J]. *J Soils Sediments*, 2008, **8**(6): 406-414.
- [13] 郑聚峰, 张平究, 潘根兴, 等. 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[J]. *生态学报*, 2008, **28**(10): 4864-4872.
- [14] Zhou X Q, Wang Y F, Huang X Z, *et al.* Effect of grazing intensities on the activity and community structure of methane-oxidizing bacteria of grassland soil in Inner Mongolia [J]. *Nutr Cycl Agroecosys*, 2008, **80**(2): 145-152.
- [15] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
- [16] McDonald I R, Bodrossy L, Chen Y, *et al.* Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(5): 1305-1315.
- [17] Shannon C E. A mathematical theory of communication[J]. *Bell Syst Tech J*, 1948, **27**: 379-423.
- [18] Liu L, Greaver T L. A review of nitrogen enrichment effects on three biogenic GHGs: the CO_2 sink may be largely offset by stimulated N_2O and CH_4 emission [J]. *Ecol Lett*, 2009, **12**: 1103-1117.
- [19] Hütsch B W, Webster C P, Powlson D S. Long-term effects of nitrogen fertilization on methane oxidation in soil of the Broadbalk wheat experiment [J]. *Soil Biol Biochem*, 1993, **25**(10): 1307-1315.
- [20] Bodelier P L E, Roslev P, Henckel T, *et al.* Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots [J]. *Nature*, 2000, **403**(6768): 421-424.
- [21] Noll M, Frenzel P, Conrad R. Selective stimulation of type I methanotrophs in a rice paddy soil by urea fertilization revealed by RNA-based stable isotope probing [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, **65**(1): 125-132.
- [22] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities [J]. *PNAS*, 2006, **103**(3): 626-631.
- [23] Lozupone C A, Knight R. Global patterns in bacterial diversity [J]. *PNAS*, 2007, **104**(27): 11436-11440.
- [24] Knief C, Dunfield P F. Response and adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane mixing ratios [J]. *Environ Microbiol*, 2005, **7**(9): 1307-1317.