

方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心

■ 出版 科学出版社



2019

Vol.40 No.9

第40卷 第9期

目次

气溶胶中不同类型碳组分粒径分布特征	杜翔, 赵普生, 董群, 苏捷 (3849)
郑州市 2014~2017 年大气污染特征及气象条件影响分析	郭蒙蒙, 姜楠, 王申博, 段时光, 张瑞芹 (3856)
济南市背景区域大气 PM _{2.5} 污染特征及其对能见度的影响	别淑君, 杨凌霄, 高颖, 姜盼, 李岩岩, 杨雨蒙, 赵彤, 王文兴 (3868)
聊城市冬季 PM _{2.5} 中多环芳烃来源解析及健康风险评估	刘晓迪, 侯战方, 孟静静, 燕丽, 周贝贝, 刘子亭, 衣雅男, 李静, 魏本杰, 伏梦璇 (3875)
2001~2017 年全国气溶胶光学厚度时空分布及变化趋势	刘海知, 郭海燕, 马振峰, 徐辉, 包红军, 徐成鹏 (3886)
长三角地区吸收性气溶胶时空分布特征	赵楠, 曹梵诗, 田晴, 陈勇航, 刘琼, 黄艺伟, 王羽佳 (3898)
燃煤锅炉颗粒物化学组成排放特征	杨艳蓉, 周雪明, 秦娟娟, 谭吉华, 胡京南, 陈荣志, 段菁春, 李艳 (3908)
高速公路沿线 PM _{2.5} 中重金属污染特征	李晓宝, 廖祖文, 赵红, 彭成辉, 谭腾飞, 黄萍 (3916)
北京市道路扬尘重金属污染特征及潜在生态风险	胡月琪, 郭建辉, 张超, 王铮, 颜旭, 杨懂艳, 刘兆莹 (3924)
风蚀扬尘抑尘剂效率测试方法与应用	秦建平, 李贝贝, 杨涛, 宋博, 黄玉虎, 张春荣 (3935)
京津冀地区典型印刷企业 VOCs 排放特征及臭氧生成潜势分析	刘文文, 方莉, 郭秀锐, 聂磊, 王敏燕 (3942)
成都市典型工艺过程源挥发性有机物源成分谱	周子航, 邓也, 吴柯颖, 谭钦文, 周小玲, 宋丹林, 黄凤霞, 曾文斌 (3949)
工业园区恶臭污染源排放特征和健康风险评估	孟洁, 翟增秀, 荆博宇, 崔焕文, 王亘 (3962)
典型华北农村地区冬季 HONO 的浓度水平及来源分析	王玉征, 薛朝阳, 张成龙, 刘鹏飞, 张圆圆, 陈晖, 陈建民, 牟玉静, 刘俊峰 (3973)
不同方法制备 Co ₃ O ₄ 催化剂 CO-SCR 性能及机制	仲雪梅, 张涛, 李佳萌, 秦萱, 王亚洲, 曾洁, 张光明, 常化振 (3982)
全氟烷基物质在胶州湾海水、沉积物及生物中污染特征	崔杰文, 彭吉星, 谭志军, 翟毓秀, 郭萌萌, 李兆新, 牟海津 (3990)
江苏水源地型水库异味物质发生风险及影响因素	史鹏程, 朱广伟, 杨文斌, 许海, 朱梦圆, 邹伟, 胡林娜, 笪文怡, 季鹏飞 (4000)
城镇流域水体-沉积物中溶解性有机质的荧光特性及影响因素: 以宁波市小浞江为例	高凤, 邵美玲, 唐剑锋, 曹昌丽, 易辉 (4009)
水华对沉积物中氮的转化和去除的影响	肖琳, 杨佳怡 (4018)
沉积物有效态磷对湖库富营养化的指示及适用性	刘辉, 胡林娜, 朱梦圆, 赵林林, 许海, 邹伟, 史鹏程, 韩慧洁, 季鹏飞, 朱广伟 (4023)
汾河下游雨季硝酸盐污染源解析	汪银龙, 冯民权, 董向前 (4033)
新疆喀什三角洲地下水化学特征及演化规律	魏兴, 周金龙, 乃尉华, 曾妍妍, 范薇, 李斌 (4042)
基于多个扩增子的 DNA metabarcoding 技术探究黄海微型真核浮游植物多样性	张莉, 张远, 林佳宁, 王书平 (4052)
FG、MFG 和 MBFG 浮游植物功能群的比较: 以贵州三座水库为例	陈倩, 李秋华, 马欣洋, 熊梅君, 何应, 韩孟书 (4061)
天然含铁矿物对砷的吸附效果及机制	邵金秋, 温其谦, 阎秀兰, 申俊峰, 杨林生, 杨硕 (4072)
镁-钙羟基磷灰石吸附剂对水中 Pb ²⁺ 的去除	何豪, 朱宗强, 刘杰, 朱义年, 阎起明, 刘阳, 莫南, 玄惠灵, 魏婉莹 (4081)
2,6-二氨基蒽醌/石墨烯复合电极强化电吸附 Pb ²⁺	晋圣兆, 向阳, 张隽琦, 张凯, 吉庆华 (4091)
钙掺杂四氧化三铁回收水中磷的实验	白润英, 刘建明, 郝俊峰, 徐慧, 胡文斌, 宋蕾, 刘宇红, 李会东, 周琦善 (4098)
大型城市污水处理厂处理工艺对微塑料的去除	贾其隆, 陈浩, 赵昕, 李磊, 聂云汉, 叶建峰 (4105)
A ² /O 流量分配处理低 C/N 污水性能与微生物结构优化	荣懿, 刘小钗, 何音旋, 章武首, 金鹏康 (4113)
上向流厌氧滤池 (UAF) 处理城市生活污水的运行效能	杨忠启, 刘秀红, 李海鑫, 刘智斌, 刘润雨, 杨庆 (4121)
微氧条件下自养-异养联合反硝化工艺的电子平衡分析	张若晨, 陈川, 邵博, 王威, 徐熙俊, 任南琪 (4128)
基于反硝化除磷的低温启动与稳定运行的中试试验	张帆, 于德爽, 刘杰, 王晓霞, 宋新新, 李传举, 赵峰辉 (4136)
聚己内酯与聚羟基丁酸戊酸酯的脱氮性能对比	易成豪, 秦伟, 陈湛, 文湘华 (4143)
厌氧氨氧化颗粒污泥快速培养及其抑制动力学	唐鹏, 于德爽, 陈光辉, 张培玉, 王晓霞, 吕廷廷, 黄硕, 刘诚诚 (4152)
Ca ²⁺ 对污泥硝化活性和絮凝沉降性能的影响	张兰河, 赵倩男, 张海丰, 贾艳萍, 李正, 陈子成, 郭静波, 赵天鹏 (4160)
从剩余污泥厌氧发酵上清液中以鸟粪石形式回收磷	畅萧, 曾薇, 王保贵, 许欢欢 (4169)
信号分子联合脱氮硫杆菌对同步脱氮除硫的影响	徐金兰, 陈紫薇, 张少枫, 魏清旋 (4177)
海水养殖尾水直排对河道沉积物细菌群落的影响	胡越航, 宣丽霞, 裴琼芬 (4185)
耦合短程硝化反硝化的垃圾渗滤液厌氧氨氧化处理系统构建及微生物群落分析	赵晴, 刘梦莹, 吕慧, 梁俊宇, 刁兴兴, 张鑫, 孟了 (4195)
稻秸添加对两种水稻土产甲烷古菌及细菌的影响	保琼莉, 王凤花, 保万魁, 黄益宗 (4202)
地膜覆盖对稻-油轮作农田温室气体排放的影响	陈世杰, 江长胜, 倪雪, 李晓茜, 郝庆菊 (4213)
氮肥深施及间种白三叶草对茶园 N ₂ O 排放的影响	吕天新, 伍延正, 沈健林, 陈丹, 姜文倩, 王娟, 李勇, 吴金水 (4221)
三峡库区及其下游溶解氧化亚氮 (N ₂ O) 分布和释放	程芳, 丁帅, 刘素美, 宋国栋, 张桂玲 (4230)
沉降除藻协同沉积物覆盖对藻华水体甲烷释放的影响	朱琳, 于江华, 施文卿, 易齐涛, 曹华勇, 蒲寅羽 (4238)
新建铅蓄电池集聚区对周边土壤环境的影响: 基于重金属空间特征	丁亚丽, 廖敏, 方至萍, 陈树森, 张云, 郭佳雯, 梁雨琦 (4244)
不同碳氮磷源改良剂对铅锌尾矿废弃地植被与土壤性质的影响	杨胜香, 李凤梅, 彭禧柱, 曹建兵, 高智席 (4253)
基于农产品安全的土壤重金属有效态含量限值推定方法	张云慧, 杜平, 何赢, 仲小飞, 罗会龙, 秦晓鹏, 徐刚 (4262)
缙云山不同土地利用方式下土壤植硅体碳的含量特征	罗东海, 王子芳, 陆畅, 黄容, 王富华, 李娇, 高明 (4270)
西南喀斯特土地利用变化对植物凋落物-土壤 C、N、P 化学计量特征和土壤酶活性的影响	田静, 盛茂银, 汪攀, 温培才 (4278)
调理剂+淹水措施对 Cd 污染稻田控 Cd 效果分析	彭鸥, 刘玉玲, 铁柏清, 何钟响, 杨蕊嘉, 李丹阳, 刘寿涛, 罗海艳 (4287)
海螺沟植物和积雪中有机磷酸酯的分布及来源	陈阳, 印红玲, 吴迪, 罗怡, 邓旭, 徐维新, 柳锦宝 (4295)
《环境科学》征订启事 (3923) 《环境科学》征稿简则 (3941) 信息 (4041, 4051, 4229)	

稻秸添加对两种水稻土产甲烷古菌及细菌的影响

保琼莉¹, 王凤花², 保万魁^{3*}, 黄益宗^{1*}

(1. 农业部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 石家庄 100101; 3. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要: 稻秸还田对水稻土 CH_4 排放有重要影响。本研究通过微宇宙厌氧培养, 研究了两种水稻土[江西(JX)和广东雷州半岛(GD)]在稻秸(RS)添加条件下经相对较长时间的厌氧培养后产甲烷古菌及细菌菌群的响应。结果表明, 不同 RS 添加量对 JX 水稻土产甲烷古菌群落结构有一定的影响, 而对 GD 水稻土产甲烷古菌群落的影响不大。RS 添加量与 *mcrA* 基因拷贝数之间存在显著正相关关系, JX 水稻土的 *mcrA* 基因拷贝数变化对 RS 添加量的响应更敏感。相同 RS 添加条件下, JX 水稻土 *mcrA* 基因拷贝数大于 GD 水稻土。相同稻秸量添加条件下两种水稻土的产甲烷古菌群落结构也有差异。JX 水稻土共检测到 16 种产甲烷古菌, 分别为 Methanosarcinaceae、Methanocellaceae、Methanomicrobiaceae、Methanobacteriaceae 以及未知菌群(494 bp)。GD 水稻土中仅有 3 大类产甲烷古菌, 分别为 Methanobacteriaceae、Methanosarcinaceae 和 Methanocellaceae。对 2% RS 处理培养第 270 d 的细菌菌群进行了测序, 发现两种水稻土的细菌菌群明显不同, GD 水稻土的细菌多样性高于 JX 水稻土, 而其优势细菌数量(共有 *Longilinea*、*Acidobacteria/Gp6*、*Bellilinea* 及 *Thermosporothrix*) 低于 JX 水稻土(共有 *Bacillus*、*Desulfovibrio*、*Thermosporothrix*、*Acidobacteria/Gp1*、*Acidobacteria/Gp3* 及 *Ktedonobacter*)。RS 作为底物促进产甲烷古菌的生长。不同类型的水稻土经相对较长时间的厌氧培养后其产甲烷古菌及细菌菌群结构也不同。

关键词: 稻秸; 水稻土; 微宇宙厌氧培养; 产甲烷古菌; 细菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2019)09-4202-11 DOI: 10.13227/j.hjxx.201901195

Effects of Rice Straw Addition on Methanogenic Archaea and Bacteria in Two Paddy Soils

BAO Qiong-li¹, WANG Feng-hua², BAO Wan-kui^{3*}, HUANG Yi-zong^{1*}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjing 300191, China; 2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 100101, China; 3. Institute of Agricultural Resource and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Rice straw (RS) returning has an important effect on CH_4 emission in rice paddy soil. In the present study, two paddy soil types from Jiangxi (JX) and Guangdong (GD), respectively, with different amounts of added RS were incubated through microcosmic anaerobic incubation experiments to investigate the responses of methanogenic archaea and bacteria communities after relatively long-term incubation. The different amounts of added RS affected methanogenic archaea community structures in the JX soil to some extent but did not affect the GD soil. The *mcrA* gene copy number increased with an increase in RS amount in both soils. Under the same amount of RS, the copy number of this gene in the JX soil was greater than that in the GD soil. In addition, significant positive correlations were shown between the RS amount and the copy number of the *mcrA* gene, and the response of the copy number was more sensitive to the RS amount in the JX soil. Obvious differences in methanogenic archaea community structures were shown between two soils. Methanosarcinaceae, Methanocellaceae, Methanomicrobiaceae, Methanobacteriaceae, and unknown microorganism (494 bp) were detected in the JX soil, and Methanobacteriaceae, Methanosarcinaceae, and Methanocellaceae were observed in the GD soil. The bacterial communities exhibited obvious differences between the two soil types after 180 days of incubation. The bacterial diversity in the GD soil was higher than that in the JX soil, although the amounts of dominant bacteria in the JX soil, including *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Thermosporothrix*, *Acidobacteria/Gp1*, *Acidobacteria/Gp3*, and *Ktedonobacter*, were higher than those of the GD soil, including *Longilinea*, *Acidobacteria/Gp6*, *Bellilinea*, and *Thermosporothrix*. RS application promoted the growth of methanogenic archaea as important substrates. Moreover, different structures of methanogens and bacteria were shown between the two soil types after relatively long-term incubation.

Key words: rice straw; paddy soil; microcosmic anaerobic culture; methanogenic archaea; bacteria

作物秸秆是农业生产中很普遍的有机物料, 秸秆还田是土壤养分管理中的常用措施, 能够提供植物生长所需的 C、N 以及其他营养元素; 提高土壤的供肥保肥能力; 还能改善土壤的物理性状。水稻秸秆及根是稻田的主要碳源, 据估计每年输入稻田的有机质约有 $1\,700 \sim 3\,470 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ [1, 2], 其中约有 65% 的有机碳来自水稻残体。然而稻秸还田显著促

收稿日期: 2019-01-23; 修订日期: 2019-03-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(41807334); 天津市自然科学基金青年项目(16JCQNJC08100); 农业部环境保护科研监测所基本科研业务费专项(2018-jbkyywfbql)

作者简介: 保琼莉(1982~), 女, 博士, 助理研究员, 主要研究方向土壤 C、N 循环及环境效应, E-mail: qiongliobao1982@163.com

* 通信作者, E-mail: baowankui@caas.cn; yizonghuang@126.com

进稻田甲烷的产生和排放^[3]。稻田土壤系统是研究厌氧系统微生物学的模式体系。稻田土壤的微生物菌群降解水稻残体。稻秸主要由纤维素、半纤维素和木质素组成。稻秸厌氧降解是稻田土壤有机碳的主要来源^[4]。有研究证明添加稻秸的水稻土泥浆是研究植物残体厌氧降解代谢过程的模式体系^[5~7]。

土壤微生物在维持土壤生态功能及元素循环中起着非常重要的作用。土壤微生物对环境变化很敏感,其群落结构的改变在一定程度上能够反映土壤生态功能的变化^[8]。有研究发现稻秸还田会显著改变土壤微生物学特性,如微生物数量、群落结构、活性以及微生物功能多样性等^[9~11]。土壤微生物在保持生态系统稳定性方面也具有重要作用,不同微生物具有不同的生态位,如细菌多样性降低会导致其生态功能的缺失,对生态系统产生不利的影响。Weber 等^[7]的研究发现,在水稻土厌氧培养的早期和晚期,土壤细菌群落结构不同。在稻秸降解过程中,稻秸的不同部位由不同的细菌菌群所降解。稻秸还田后,稻田土壤养分发生短期空间梯度变化,参与稻秸降解的细菌菌群在稻秸整个降解过程中存在演替规律。Rui 等^[12]的研究发现 *Clostridium* (clusters I and III) 在稻秸早期降解过程中成为优势菌群,它们以易降解有机质为底物。*Bacteroidetes* 和 *Chlorobi* 在稻秸降解的后期阶段占主导地位,以难降解的有机质为底物。有研究称长期稻秸还田对细菌群落产生影响是因为增加了土壤的 C 营养^[13]。有报道也称土壤中如果投入大量的营养元素,则会抑制一些寡营养型细菌的生长,进而影响细菌群落^[14]。另有报道称稻秸还田配合化肥施用对细菌群落结构和多样性没有显著影响,但能够提高一些特定细菌的数量,如氨化细菌、硝化细菌、反硝化细菌和纤维分解菌等^[9]。因此,研究稻秸对土壤细菌菌群的影响,在评价稻秸还田对土壤生态的影响方面具有重要意义。

产甲烷古菌是一类以甲烷为代谢终产物的微生物,稻田甲烷是产甲烷古菌在严格厌氧条件下有机质降解的最终产物。产甲烷古菌是目前已知的地球上对氧极其敏感的生物类群,在系统发育学上隶属于古菌域广古菌门(*Euryarchaeota*),是已知的唯一能够代谢产甲烷的一种微生物,只能利用 CO_2/H_2 、乙酸和甲基类化合物等简单物质产生甲烷并合成自身生长所需的物质^[15]。大量培养实验研究发现秸秆降解过程中产甲烷古菌群落结构表现出较高的动态变化,不同产甲烷古菌对秸秆类型、培养温度及培养时间的响应是不同的^[16~22]。有研究认为在稻秸降解过程中产生的乙酸和氢气浓度是调控产甲烷

古菌群落变化的关键因素^[23]在稻秸添加处理中一些特定产甲烷古菌如 *Methanosarcinaceae* 和 *Methanobacteriales* 的相对丰度增加,但抑制了 RC-I 及 *Methanomicrobiales* 的生长^[18, 19]。水稻土厌氧培养中添加稻秸使产甲烷古菌菌群的数量增加^[21]。稻秸降解过程中发现有大量 *Methanosarcina*、*Methanobacterium* 和 RC-I 附着在稻秸上^[6]。

稻秸添加对水稻土细菌和产甲烷古菌菌群的影响已有较多研究^[10, 19, 21],然而这些研究均基于水稻土的短期厌氧培养,稻秸添加后水稻土经过相对较长时间的厌氧培养后细菌和产甲烷古菌的响应研究仍较缺乏。本研究基于细菌 16S rDNA 及产甲烷古菌功能基因 *mcrA*,运用 T-RFLP 及 q-PCR 微生物分子技术,对两种典型水稻土在添加不同量稻秸并经相对较长时间厌氧培养后的细菌及产甲烷古菌的响应进行分析,以期为评价稻秸还田对土壤微生物生态的影响及寻找环境友好型农业措施提供依据。

1 材料与方法

1.1 水稻土预处理及厌氧培养过程

实验土壤分别采自江西鹰潭(JX)和广东雷州半岛(GD)水稻田 0~20 cm 的耕层土, JX 和 GD 土壤类型分别为粉砂壤土和粉质黏壤土、pH 分别为 6.42 和 5.24、总 C 分别为 $10.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $11.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、总 N 分别为 $0.54 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.38 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。土样风干后储存在室温,培养开始前,将土样过 2 mm 筛且搅拌均匀,土壤样品进行预培养两周以活化土壤微生物。稻秸施用前将其粉碎至粉末状。灭菌的 100 mL 模制瓶中装入 30 g 干土,稻秸以 0.5%、1% 和 2% 干土重的量加入模制瓶并与土壤充分混匀。灭菌去氧的去离子水以水土比 1.5:1 的量加入模制瓶。盖上丁基胶塞,用压盖钳压上铝盖密封,充入 5 min 的高纯氮气后抽真空,反复 3 次,最后充入氮气后剧烈振荡培养瓶 30 s,之后放在 30℃ 培养箱中黑暗静置培养 9 个月。每处理设置 3 个重复。所有处理分别命名为 JX/GD-Ctrl、JX/GD-0.5% RS、JX/GD-1% RS 和 JX/GD-2% RS。培养的第 0 d、第 180 d 和第 270 d 以破坏性取样的方式进行取样,分析产甲烷古菌及细菌群落结构和数量的变化。

1.2 土壤微生物 DNA 的提取

采用 FastDNA® SPIN Kit for Soil (Q Bio gene) 试剂盒方法,称取 -20℃ 保存的土样 0.5 g,按试剂盒实验操作说明进行土壤微生物总 DNA 提取。提取的 DNA 用 1% (质量分数) 琼脂糖电泳 EB (Ethidium Bromide, 溴化乙锭) 染色检查 DNA 提取效果,90 V, 40 min 电泳检测,在 Alpbalmager 2200

成像系统拍照。

1.3 产甲烷古菌功能基因 *mcrA* 的 PCR 扩增

产甲烷古菌功能基因 *mcrA* 的 PCR 扩增采用引物对 ME1/ME2, T-RFLP 分析的 PCR 前引物 ME1 的 5' 端有 6-carboxyfluorescein 标记。50 μL PCR 反应体系为: 10 $\times$ PCR 反应缓冲液; 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 ; 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP; 各引物 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 5U *Taq* DNA 聚合酶和 1 μL 的 DNA 模板, 用灭菌高纯水补足到 50 μL 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s; 49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 运行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物取 3 μL 用 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照, 样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 PCR 扩增产物 DNA 凝胶回收及纯化

采用蓝罡普通 PCR 产物凝胶回收试剂盒方法对 PCR 产物进行凝胶回收, 并用 1% (质量分数) 琼脂糖电泳 EB (Ethidium Bromide, 溴化乙锭) 染色检查纯化效果。

1.5 产甲烷古菌 T-RFLP (末端限制性片段多态性) 分析

(1) PCR 产物的酶切 纯化后的 PCR 产物使用限制性内切酶 *Sau96I* (Fermentas, Canada) 对 *mcrA* 基因进行酶切。酶切反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下酶切 3 h。酶切反应体系 (20 μL): 灭菌高纯水 0 ~ 5 μL ; 10 $\times$ 缓冲液 2 μL ; 0.1% BSA 2 μL ; *Sau96I* 0.5 μL ; 纯化后的 PCR 产物 10 ~ 15 μL 。酶切完后用 2% (质量分数) 琼脂糖电泳 EB (Ethidium Bromide, 溴化乙锭) 染色检查酶切效果。

(2) 乙醇沉淀法纯化酶切产物 在酶切产物中加入 1/10 体积的 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAC 溶液和 2 倍体积的无水乙醇, 混匀离心后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。然后将冷冻过夜的酶切产物在 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 15 min, 去上清; 加入 200 μL 70% 乙醇, 然后 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 5 min, 去上清, 通风橱中风干 10 min 或在室温放置 20 min 左右; 最后加入 10 μL 灭菌高纯水溶解 DNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(3) T-RFLP 上机 酶切产物在 Applied Biosystems 3730 测序仪上进行聚丙烯酰胺凝胶电泳自动测序仪进行检测, 末端带荧光标记的片段能被检测到, 而其它没有带荧光标记的片段则检测不到, T-RFLP 图谱用 Genemapper 4.0 (ABI) 软件进行分析。

1.6 产甲烷古菌 *mcrA* 基因的克隆文库构建及序列分析

利用不加荧光标记的引物进行 *mcrA* 基因的 PCR 扩增; PCR 扩增产物凝胶回收及纯化 (同上); PCR 产物通过 pMD 19-T vector 进行连接, 连接产物进行

质粒 (JM109 感受态细胞) 载体的转化。转化产物在 SOC 培养基中培养 1 h (37 $^{\circ}\text{C}$)。然后取一定量的细胞液涂在 LB 平板培养基上培养 12 h (37 $^{\circ}\text{C}$)。形成单菌落。利用引物 M13-47/RV-M 对单菌落进行 PCR 检验阳性克隆, 将筛选好的阳性克隆送至测序公司进行测序, 采用 MEGA (4.0) 软件的 N-J 法 (Neighbor-Joining) 建立系统发育树。JX 水稻土产甲烷古菌克隆序列在 NCBI 数据库的序列号为 KX233727 ~ KX233778; GD 水稻土产甲烷古菌克隆序列在 NCBI 数据库的序列号为 KX233779 ~ KX233832。

1.7 实时荧光定量 PCR

(1) 质粒 DNA 的提取 根据定量的目标基因在克隆文库中选取适合的单克隆, 使用 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒 DNA, 具体步骤参照试剂盒使用说明。使用 Quant-iT PicoGreen DsDNA Reagent and Kits (Invitrogen) 试剂盒, 用酶标仪测定质粒 DNA 浓度。具体操作参照试剂盒。

(2) 标准曲线的制备 将已知浓度的质粒 DNA 进行 10 倍的系列梯度稀释, 质粒 DNA 标准在 10^9 ~ 10^1 拷贝数之间选择 6 个不同数量级的拷贝数作为定量 PCR 的标准。

(3) 反应体系及反应程序 样品实时荧光定量 PCR 产甲烷古菌功能基因 *mcrA* 的定量引物为 ME1f/ME3r。25 μL 反应体系为: 12.5 μL 的 2 $\times$ Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ BSA, DNA 模板 5 μL , 加灭菌高纯水补足到 25 μL 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s; 49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 83 $^{\circ}\text{C}$ 收集荧光信号 10 s; 运行 40 个循环; 溶解曲线, 从 55 $^{\circ}\text{C}$ 开始, 每个循环的温度以 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 递增, 每个循环进行 10 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 结束。单个 DNA 样品和标准在进行定量 PCR 时做 3 个重复, 定量的结果用 7500 System SDS Software (ABI) 分析。

1.8 统计分析

Excel 2007 计算数据的平均值和标准误。末端标记限制性片段 T-RFs 由 PeakScan 1.0 软件分析计算。选择片段大小 > 50 bp 且相对丰度 > 1% 的片段进行 Cluster 分析。细菌序列相似度 > 97% 的被认为是同一个 OTU, R 语言绘制细菌 OTU 热图及维恩图。CANOCO 4.5 软件对 T-RFLP 数据进行主成分分析 (PCA analysis)。

2 结果与分析

2.1 两种水稻土在添加稻秸后产甲烷古菌群落结构的变化

由图 1 所示, JX 水稻土中共检测到 8 个不同片

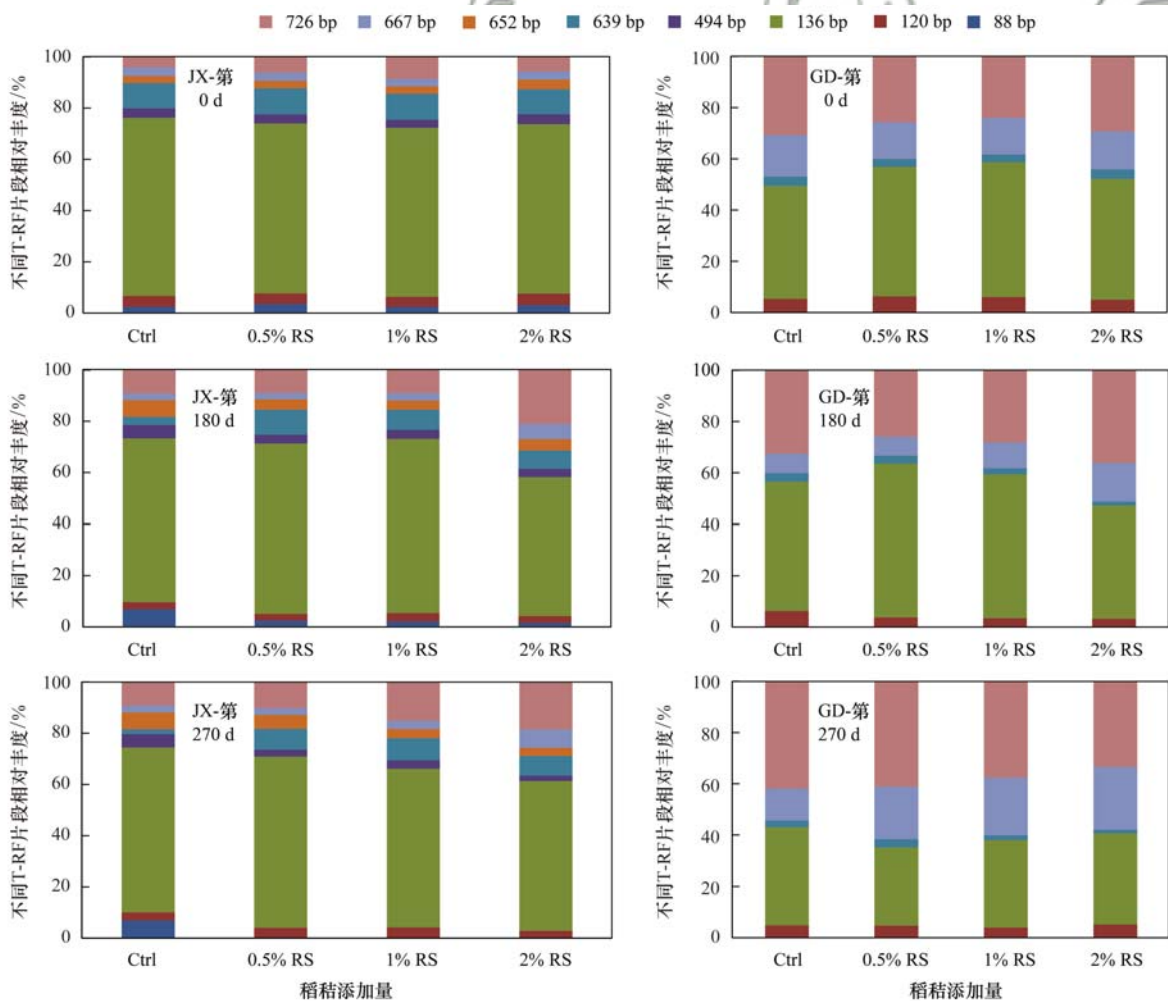
段长度的 T-RF(88、120、136、494、639、652、667 和 726 bp), 其中片段长度为 136 bp 的产甲烷古菌为优势菌, 其次是片段长度为 639 bp 和 726 bp 的产甲烷古菌. 该水稻土在厌氧培养的第 180 d 和第 270 d, 726 bp 的产甲烷古菌相对丰度随着稻秸添加量的增加而有所增加, 而 88 bp 和 136 bp 的产甲烷古菌相对丰度随着稻秸添加量的增加略有降低. 对于 GD 水稻土, 产甲烷古菌群落结构与 JX 水稻土相比有明显的不同, 仅检测到 5 个不同片段长度的 T-RF(120、136、639、667 和 726 bp), 其中 136 bp 的产甲烷古菌仍为优势菌群, 以 726 bp 的产甲烷古菌为第二大优势菌群, 120 bp 和 639 bp 的产甲烷古菌的相对丰度最低. 在培养的第 270 d, 片段长度为 667 bp 和 726 bp 的产甲烷古菌相对丰度在对照及各个稻秸处理中均明显增加, 而 136 bp 的产甲烷古菌相对丰度明显降低. 120 bp 和 639 bp 的产

甲烷古菌的相对丰度均无变化.

对两种水稻土不同处理 *mcrA* 基因的 T-RFLP 图谱进行了主成分分析(PCA), 结果表明两种水稻土的产甲烷古菌群落结构明显不同. 不同稻秸添加量对 JX 水稻土产甲烷古菌群落结构有一定的影响, 而对 GD 水稻土的产甲烷古菌群落结构的影响不大(图 2).

2.2 两种水稻土的产甲烷古菌 *mcrA* 基因序列的系统发育分析

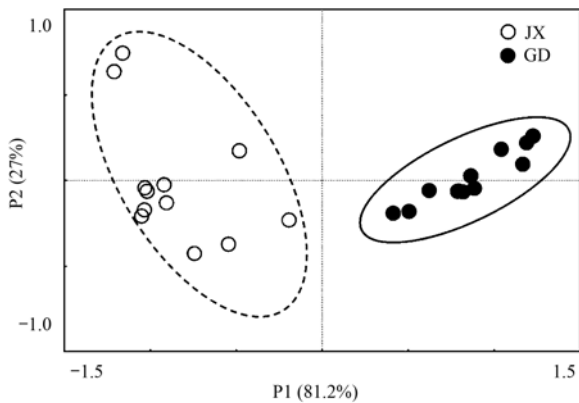
对 2% RS 处理的两种水稻土培养第 270 d 的产甲烷古菌 *mcrA* 基因进行了克隆测序, 并与 NCBI 数据库中的相似序列进行了比对, 系统发育分析结果见图 3. 从中可知, GD 和 JX 水稻土中均检测到 3 种不同科的产甲烷古菌, 为 Methanosarcinaceae、Methanobacteriaceae 及 Methanocellaceae. 不同科的产甲烷古菌在两种水稻土中所占的比例不同. 对系



JX 表示江西鹰潭水稻土, GD 表示广东雷州半岛水稻土; Ctrl、0.5% RS、1% RS 及 2% RS 分别表示对照、添加 0.5% (质量分数) 稻秸、添加 1% 稻秸和添加 2% 稻秸, 下同

图 1 两种水稻土在不同培养时间下稻秸添加量对产甲烷古菌群落结构的影响(基于 *mcrA* 基因的 T-RFLP 分析)

Fig. 1 Community structures of methanogenic archaea based on T-RFLP analysis targeting *mcrA* genes in different added RS amounts and sampling time in the two soil types



双轴上的数值表示每轴能够解释总变异的百分比

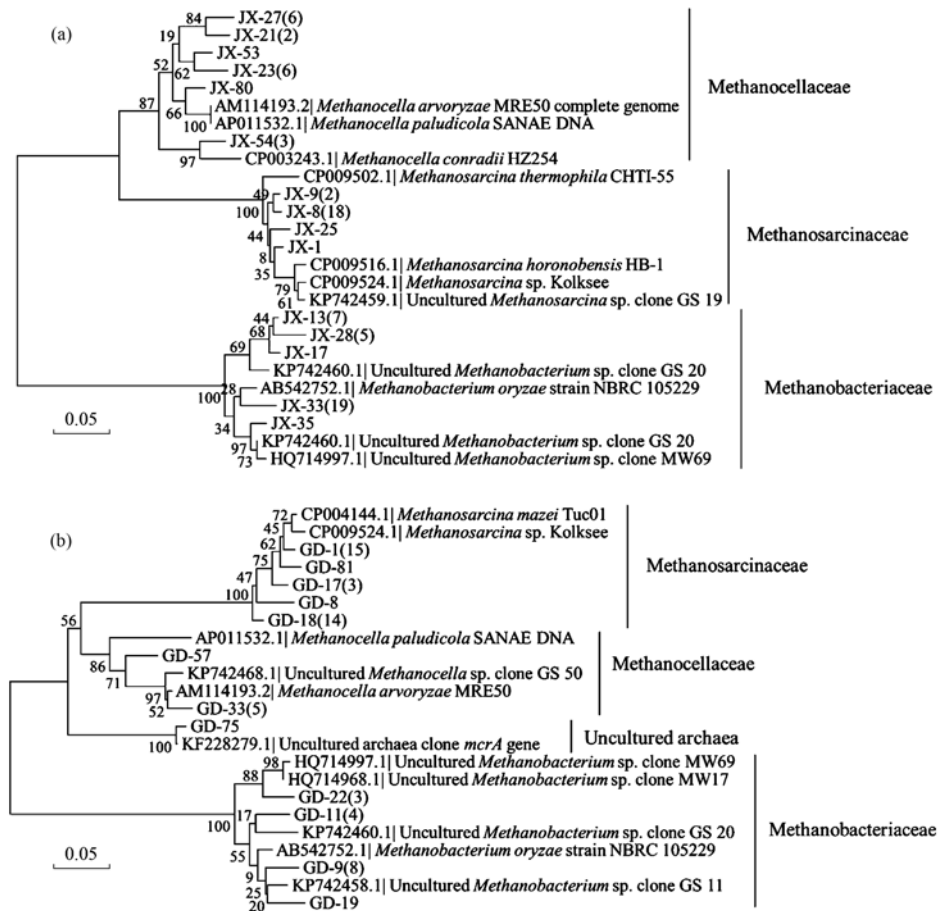
图2 不同处理 *mcrA* 基因的 T-RFLP 图谱主成分分析 (PCA)

Fig. 2 Principal component analysis of T-RFLP profiles for *mcrA* genes retrieved from different treatments

统发育分析结果进行的分类统计表明(表1), JX 水稻土的优势菌为 *Methanobacteriaceae*, 占总测序列的 44.59%; *Methanosarcinaceae* 为第二优势菌, 占总测序列的 29.73%; *Methanocellaceae* 占总测序列的 25.68%。而 GD 水稻土中以 *Methanosarcinaceae*

为优势菌, 占总测序列的 59.65%; *Methanobacteriaceae* 为次之, 占总测序列的 28.07%; *Methanocellaceae* 为第三, 占总测序列的 10.52%; 检测到的未知古菌仅有一例。

对序列进行 *In silico* 分析得到的片段与 T-RFLP 数据中片段结合比较, 以及根据前人已发表的数据信息, 得出 T-RFs 的系统分支归类。本研究中产甲烷古菌 *mcrA* 基因的 T-RFs 多数都能归类于特定的产甲烷古菌类群。一些 T-RFs 能够归类于多个不同的产甲烷古菌类群。如末端限制片段为 120、136 及 652 bp 的 T-RFs 可以归类为 *Methanosarcinales*; 667 及 726 bp 的 T-RFs 归类于 *Methanobacteriaceae*; 88 bp 的 T-RF 归类于 *Methanomicrobiales*; 639bp 的 T-RFs 归类于 *Methanocellaceae*。在 JX 水稻土中的 494 bp 的 T-RFs 未归类于特定的产甲烷古菌类群的系统分支。另外, 本研究中由测序得到的各产甲烷古菌类群在总测序列中所占的比例与 T-RFLP 分析得到的各 T-RFs 的相对丰度结果基本一致。



(a) 和 (b) 分别是 JX 和 GD 水稻土基于 2% RS 处理的第 270 d 土壤样品构建; 以“JX-27(6)”为例: JX 表示江西鹰潭水稻土, 27 表示该条序列在克隆文库中的序号, (6) 表示在所有序列中与 JX-27 这条序列相似度 >95% 的一共有 6 条; 克隆序列相似度 >95% 的所有序列被认为是同一操作分类单元 (OTU)

图3 N-J 法构建的产甲烷古菌系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of methanogenic archaea constructed through the neighbor-joining method

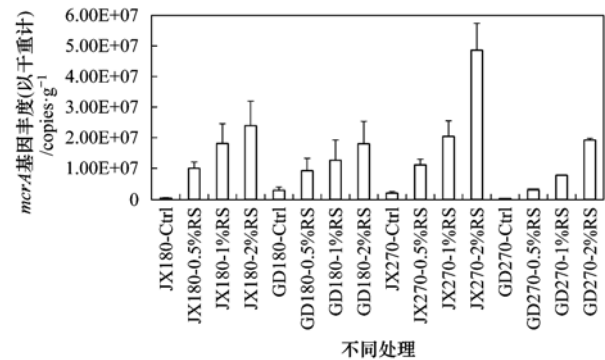
表 1 2% RS 处理的两种水稻土中产甲烷古菌 *mcrA* 基因序列在系统发育归类中的数量及所占百分含量¹⁾

项目	JX		GD	
	with 2% treatment in the two soil types			
	<i>n</i>	含量/%	<i>n</i>	含量/%
Methanosarcinaceae	22	29.73	34	59.65
Methanobacteriaceae	33	44.59	16	28.07
Methanocellaceae	19	25.68	6	10.52
未知古菌	0	0	1	1.75
总克隆子数	74		57	

1) *n* 代表 *mcrA* 基因序列在各个系统发育归类中的数量

2.3 不同稻秸添加量对两种水稻土产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数的影响

对于产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数, 本研究对培养第 180 d 和 270 d 的土样进行了测定(图 4)。分析结果表明, 在培养第 180 d, 两种水稻土的产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数随稻秸添加量的增加而增加。相同稻秸量添加条件下, JX 水稻土产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数大于 GD 水稻土。JX-2% RS 处理中产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数显著大于 JX-Ctrl。在培养第 270 d, 两种水稻土的产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数同样随稻秸添加量的增加而增加。2% RS 处理的两种水稻土产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数显著大于其他 RS 处理。相同稻秸量添加条件下, JX 水稻土产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数明显大于 GD 水稻土。对稻秸添加量与产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数之间进行的相关性分析表明, 稻秸添加量与 *mcrA* 基因拷贝数之间呈显著正相关关系(图 5)。其中 JX 水稻土的产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数变化与稻秸量添加之间线性关系的斜率更高, 表明 JX 水

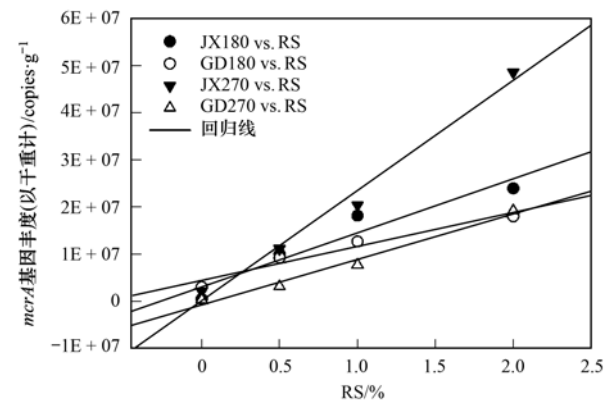


以 JX180-2% RS 为例: JX180 表示 JX 水稻土培养第 180 d, 2% RS 表示添加 2% 稻秸处理; 图内数值为平均值 $\pm$ 标准误, $n=3$; 方差分析仅在同一土壤在相同培养时间下的不同 RS 处理之间进行 ($P<0.05$)

图 4 两种水稻土在培养第 180 d 和第 270 d 时不同 RS 处理的 *mcrA* 基因丰度

Fig. 4 Abundance of *mcrA* genes in all RS treatments over sampling times of 180 days and 270 days in the two paddy soils

稻土的产甲烷古菌 *mcrA* 基因丰度对不同稻秸量添加的响应更敏感。



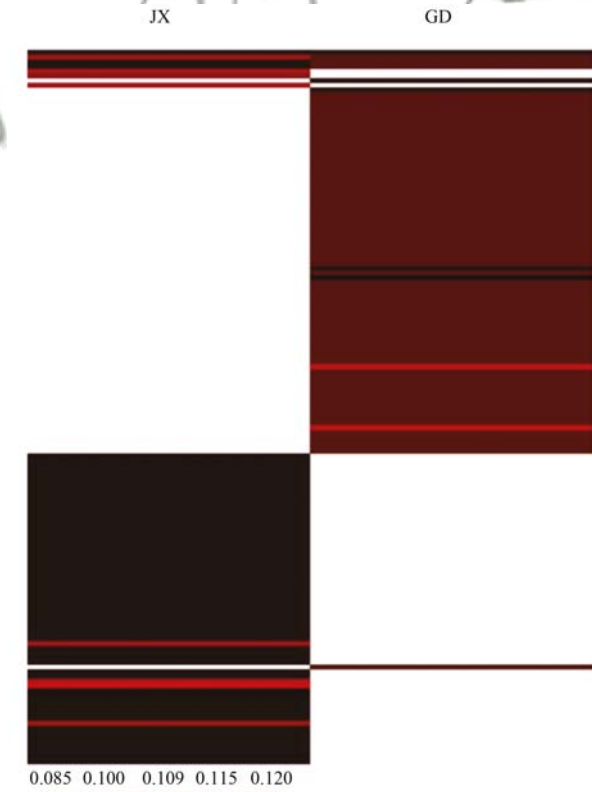
以 JX180 vs. RS 为例: 表示 JX 水稻土培养第 180 d 的 *mcrA* 基因丰度与稻秸量的线性回归

图 5 *mcrA* 基因丰度与稻秸添加量之间的相关性分析

Fig. 5 Analysis of correlation between *mcrA* gene abundance and RS addition

2.4 两种水稻土细菌菌群的差异分析

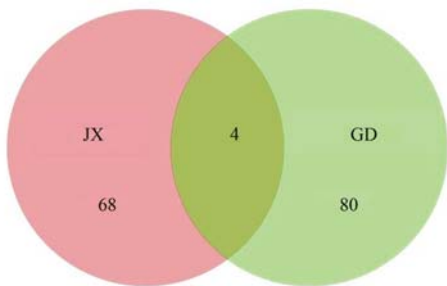
对两种水稻土培养第 270 d 时 2% RS 处理的细菌群落结构差异进行了分析(如图 6 和 7)。由图 6 可知两种水稻土的细菌 OTU 数明显不同。JX 和



人为定义 97% 水平为属的序列差异阈值, 每条横线代表一个 OTU, 将相似度 $\geq 97\%$ 的序列被认为是同一个 OTU

图 6 2% RS 处理的两种水稻土培养第 270 d 的细菌多样性在 0.03 水平的热图

Fig. 6 Heat map showing the bacteria diversity with 2% RS treatment at the 270th day of incubation in the two soils



人为定义 97% 水平为属的序列差异阈值；图内数值 OTU 数量

图 7 2% RS 处理的两种水稻土培养第 270 d 时细菌

OTU 在 0.03 水平下的维恩图

Fig. 7 Venn diagram showing the bacteria OTU at a 0.03 level with 2% RS treatment at the 270th day of incubation in the two soils

GD 水稻土细菌 OTU 数分别为 72 和 84 个，其中特有的 OUT 数分别为 68 和 80 个，两者共有的 OUT 数为 4 (图 7). 表明两种水稻土细菌群落结构有很大差异，且 GD 水稻土细菌多样性高于 JX 水稻土.

对两种水稻土培养第 270 d 的细菌 16S rRNA 基因进行了克隆测序，所测的 JX 和 GD 水稻土细菌 16S rRNA 基因序列分别有 100 条和 96 条. 对所测序列进行了系统归类统计 (表 2). 由表 2 结果显示，两种水稻土细菌在属水平上有很大差异. JX 水稻土的优势细菌 (同一属的序列数 ≥ 5 被认为是优势菌) 有 *Bacillus*、*Desulfoviregula*、*Thermosporothrix*、*Acidobacteria/Gp1*、*Acidobacteria/Gp3* 及

表 2 2% RS 处理培养第 270 d 水稻土细菌 16S rRNA 基因序列的系统归类

Table 2 Systematic classification of bacteria 16S rRNA gene sequences with 2% RS treatment at the 270th day of incubation in the two soils

细菌归类	JX	GD	细菌归类	JX	GD
Acidobacteria/Gp1	6	3	Hyphomicrobiaceae/ <i>Rhodomicrobium</i>	1	0
Acidobacteria/Gp3	6	2	Methylocystaceae/ <i>Methylosinus</i>	1	0
Acidobacteria/ <i>Bryobacter</i>	1	0	Xanthobacteraceae/ <i>Pseudolabrys</i>	0	3
Acidobacteria/Gp4	0	2	Acetobacteraceae/ <i>Stella</i>	1	0
Acidobacteria/Gp6	0	5	Sphingomonadaceae/ <i>Sphingomonas</i>	1	0
Acidobacteria/Gp7	0	3	Comamonadaceae/ <i>Schlegelella</i>	1	0
Acidimicrobiineae/ <i>Aciditerrimonas</i>	0	1	Neisseriaceae/ <i>Jeongeupia</i>	1	0
Intrasporangiaceae/ <i>Terrabacter</i>	0	2	Nitrosomonadaceae/ <i>Nitrosospora</i>	3	0
Micromonosporaceae/ <i>Micromonospora</i>	0	1	Rhodocyclaceae/ <i>Azonexus</i>	1	1
Mycobacteriaceae/ <i>Mycobacterium</i>	0	1	Desulfobacteraceae/ <i>Desulfobacterium</i>	0	1
Nocardioideae/ <i>Nocardioides</i>	0	2	Cystobacteraceae/ <i>Cystobacter</i>	1	0
Nocardioideae/ <i>Pimelobacter</i>	0	1	Myxococcaceae/ <i>Pyxidicoccus</i>	2	0
Propionibacteriaceae/ <i>Micropuina</i>	0	1	Nannocystaceae/ <i>Enhygromyxa</i>	0	1
Streptomycetaceae/ <i>Kitasatospora</i>	3	0	Polyangiaceae/ <i>Chondromyces</i>	0	1
Streptomycetaceae/ <i>Streptomyces</i>	1	2	Syntrophaceae/ <i>Desulfomonile</i>	1	0
Nitriliruptoraceae/ <i>Nitriliruptor</i>	0	1	Syntrophaceae/ <i>Smithella</i>	0	1
Thermoleophilaceae/ <i>Thermoleophilum</i>	0	1	Chromatiaceae/ <i>Thioflavicoccus</i>	0	1
Armatimonadetes/gp2	0	1	Ectothiorhodospiraceae/ <i>Nitrococcus</i>	0	1
Chitinophagaceae/ <i>Ferruginibacter</i>	1	0	Legionellaceae/ <i>Legionella</i>	0	1
Chitinophagaceae/ <i>Flavisolibacter</i>	2	0	Thiotrichales/ <i>Fangia</i>	0	1
Chitinophagaceae/ <i>Flavitalea</i>	0	1	Sinobacteraceae/ <i>Steroidobacter</i>	1	1
Sphingobacteriaceae/ <i>Mucilagibacter</i>	0	1	Xanthomonadaceae/ <i>Lysobacter</i>	0	2
Chloroflexaceae/ <i>Heliothrix</i>	0	1	Spirochaetaceae/ <i>Spirochaeta</i>	1	0
Chloroflexaceae/ <i>Roseiflexus</i>	0	1	Synergistaceae/ <i>Aminiphilus</i>	0	1
Dehalococcoidetes/ <i>Dehalogenimonas</i>	0	1	Synergistaceae/ <i>Thermovirga</i>	0	1
Anaerolineaceae/ <i>Bellilinea</i>	1	5	Verrucomicrobia/Subdivision 3 incertae sedis	1	0
Anaerolineaceae/ <i>Longilinea</i>	3	12	Chloroplast/Bacillariophyta	1	0
Caldilineaceae/ <i>Caldilinea</i>	0	3	Bacillaceae-1/ <i>Bacillus</i>	13	2
Ktedonobacteraceae/ <i>Ktedonobacter</i>	5	3	Bacillaceae-2/ <i>Paucisolibacillus</i>	1	0
Thermosporotrichaceae/ <i>Thermosporothrix</i>	7	5	Paenibacillaceae-1/ <i>Paenibacillus</i>	0	1
Gemmatimonadaceae/ <i>Gemmatimonas</i>	3	3	Planococcaceae/ <i>Lysinibacillus</i>	1	0
Nitrospiraceae/ <i>Nitrospira</i>	0	2	Clostridiaceae-1/ <i>Clostridium sensu stricto</i>	1	0
Planctomycetaceae/ <i>Gemmata</i>	0	1	Clostridiales incertae sedis III/ <i>Tepidanaerobacter</i>	1	0
Planctomycetaceae/ <i>Singulisphaera</i>	4	0	Peptococcaceae-1/ <i>Desulfotibacter</i>	1	0
Planctomycetaceae/ <i>Zavarzinella</i>	0	1	Peptococcaceae-1/ <i>Desulfonispore</i>	1	0
Phycisphaeraceae/ <i>Phycisphaera</i>	2	2	Ruminococcaceae/ <i>Clostridium</i> III	1	0
Alphaproteobacteria/ <i>Rhizomicrobium</i>	0	1	Thermoanaerobacteraceae/ <i>Desulfoviregula</i>	11	0
Caulobacteraceae/ <i>Phenyllobacterium</i>	1	1	Veillonellaceae/ <i>Acetonea</i>	0	1
Bradyrhizobiaceae/ <i>Agromonas</i>	1	0	Veillonellaceae/ <i>Sporolituus</i>	1	0
Bradyrhizobiaceae/ <i>Bradyrhizobium</i>	2	1	OP11/OP11 order/family/genus incertae sedis	0	1
Bradyrhizobiaceae/ <i>Rhodopseudomonas</i>	1	0			

Ktedonobacter; 而 GD 水稻土的优势细菌为 *Longilinea*、*Acidobacteria/Gp6*、*Bellilinea* 及 *Thermosporothrix*。

3 讨论

3.1 稻秸添加对两种水稻土产甲烷古菌群落结构及丰度的影响

本研究发现添加不同稻秸量对 JX 水稻土的产甲烷古菌群落结构有一定的影响。比如在培养第 180 d 和第 270 d, 添加 2% 稻秸量使 *Methanobacteriaceae* 和 *Methanocellaceae* 的相对丰度增加, 但降低了 *Methanosarcinaceae* 的相对丰度。而对于 GD 水稻土, 不同稻秸量添加对产甲烷古菌群落结构的影响不明显。由此可见, 不同水稻土类型中添加不同稻秸量对产甲烷古菌群落结构的影响不尽相同, 这可能与土壤特性有关, 本研究中的 JX 水稻土属于粉砂壤土, GD 水稻土属于粉质黏壤土, 其土壤黏粒含量高于 JX 水稻土。有研究表明土壤微生物活性与土壤黏粒含量之间存在负相关关系^[24], 这些微生物包括有机质降解菌, GD 水稻土黏粒含量高, 对该类菌群的活性不利, 因此可能影响了稻秸的降解程度或降解速度, 使得稻秸降解的终产物如 H_2 和乙酸等(也是产甲烷古菌能量底物)也较低, 底物不充足可能影响产甲烷古菌的生长, 最终表现为 GD 水稻土中产甲烷古菌群落结构对稻秸添加的响应不明显。另外, JX 和 GD 水稻土中的 K 含量、pH 及 C/N 等都存在差异, 这可能也是造成两种水稻土的产甲烷古菌群落结构对稻秸添加有不同响应的原因之一。Peng 等^[19]及 Conrad 等^[21]研究了不同类型秸秆对产甲烷古菌群落结构的影响, 结果表明秸秆类型对产甲烷古菌群落结构产生不同的影响, 而这些研究中并未设置不同稻秸量的处理。

本研究中两种水稻土的产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数均随稻秸添加量的增加而增加, 2% RS 处理的产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数显著高于其他 RS 处理(图 4)。相同稻秸量添加条件下, JX 水稻土产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数大于 GD 水稻土。研究发现秸秆降解产生的乙酸、 H_2 等为产甲烷古菌提供底物, 从而促进其生长^[17, 20]。表明底物作为能量物质是微生物生长的限制因子。稻秸添加量与产甲烷古菌丰度(*mcrA* 基因拷贝数)之间存在显著正相关关系, JX 水稻土的产甲烷古菌丰度变化对不同稻秸量的响应更敏感(图 5), 这可能与土壤特性及土著菌群降解稻秸的能力等因素有关。

另外, 本研究发现产甲烷古菌群落结构在两种

水稻土之间也存在明显差异(图 1 和图 2)。JX 水稻土产甲烷古菌多样性高于 GD 水稻土。JX 水稻土共检测到的产甲烷古菌有 *Methanosarcinaceae* (120 bp 和 136 bp)、*Methanocellaceae* (639 bp)、*Methanomicrobiaceae* (88 bp)、*Methanobacteriaceae* (667 bp 及 726 bp) 以及未知菌群 (494 bp)。GD 水稻土中仅有 3 大类产甲烷古菌, 分别为 *Methanobacteriaceae*、*Methanosarcinaceae* 和 *Methanocellaceae*。Peng 等^[19]的研究中也检测到以上的产甲烷古菌, 且为优势菌群。JX 水稻土中 *Methanosarcinaceae* 始终为绝对优势菌群, *Methanobacteriaceae* 为第二大优势菌群。而在 GD 水稻土中, 产甲烷古菌群落存在演替现象, 随着培养时间的延长, 优势菌群由 *Methanosarcinaceae* 转变为 *Methanobacteriaceae*。另外, *Methanosarcinaceae* 和 *Methanocellaceae* 的相对丰度在 JX 水稻土中较高, 而 *Methanobacteriaceae* 的相对丰度在 GD 水稻土中较高。这种群落结构的差异反映了水稻土土壤类型对产甲烷古菌具有重要影响。研究发现 *Methanosarcinaceae* 是一类生长快且底物多样化的一类产甲烷古菌, 不仅能利用高浓度的乙酸 ($0.2 \sim 1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 也能利用 H_2 - CO_2 或甲酸^[23, 25]。在前期的类似研究中发现, 稻秸添加后的培养体系中产生大量乙酸等小分子有机酸和 H_2 ^[26], 这为 *Methanosarcinaceae* 的生长提供充足底物。Conrad 等^[18]的研究也发现 *Methanosarcinaceae* 在秸秆降解过程中利用 H_2 - CO_2 进行繁殖。*Methanobacteriaceae* 是一类使用 H_2 - CO_2 的产甲烷古菌, 在水稻土中可以较容易地富集得到^[27]。有研究发现稻秸添加的厌氧体系中 *Methanobacteriaceae* 的响应归因于 H_2 浓度的变化^[19, 28]。*Methanocellaceae* 是一类新发现的氢营养型的产甲烷古菌, 广泛分布在甲烷生成的环境中, 属于 RC-I, 该类菌在水稻根际区域 CH_4 产生过程中起非常关键的作用^[28]。低 H_2 浓度的环境有利于 *Methanocellaceae* 的生长, 另外 *Methanocellaceae* 也是具有潜在的抗 O_2 毒的一类产甲烷古菌, 它们在厌氧和好氧条件下均能生存。有研究发现在 CH_4 大量产生阶段之后, 体系中的优势菌群为 *Methanosarcinaceae* 和 *Methanocellales*^[29]。

3.2 两种水稻土的细菌菌群对稻秸添加的响应

本研究发现两种水稻土的细菌群落结构明显不同, 二者之间相同的 OTU 数仅有 4 个(图 7)。GD 水稻土的多样性 (OTU 数为 80) 高于 JX 水稻土 (OTU 数为 68)。细菌多样性影响其生态功能, 在细菌多样性低的生态体系中, 细菌的生态功能也相

对缺乏,不利于生态系统的稳定.以往的研究发现,土壤 pH 是影响土壤细菌群落地理分布的主要因素,在农田生态系统中,也有学者发现 pH 对细菌群落的改变起主要作用.孙瑞波等^[13]的研究发现,长期秸秆还田导致土壤 pH 降低,使细菌多样性降低.本研究的 JX 水稻土本底 pH 值 (pH = 6.42) 高于 GD 水稻土 (pH = 5.24),而在培养过程中其细菌多样性低于 GD 水稻土,这可能是由于在 JX 水稻土中稻秸添加后相对较长时间的厌氧培养造成大量有机酸的生成,使 JX 水稻土培养体系中的 pH 降低,因此降低了 JX 水稻土细菌多样性.同时,有研究表明秸秆还田增加土壤碳含量,进而影响细菌群落^[13].本研究 GD 水稻土的总 C (11.68 g·kg⁻¹) 高于 JX 水稻土的总 C 含量 (10.27 g·kg⁻¹),这为土壤细菌提供了更多的本底生长底物碳源,这也可能是两种水稻土细菌群落结构存在差异的原因之一.有研究发现营养物质丰富会促进富营养型的细菌群落生长,而寡营养型细菌生长受到抑制,细菌群落受到影响^[11].

本研究对两种水稻土培养第 180 d 的细菌菌群进行了测序分析,发现两种水稻土在属水平上有很大差异. JX 水稻土的优势细菌共有 6 种: *Bacillus*、*Desulfotomaculum*、*Thermosporothrix*、*Acidobacteria*/Gp1、*Acidobacteria*/Gp3 和 *Ktedonobacter*; 而 GD 水稻土的优势细菌共有 4 种: *Longilinea*、*Acidobacteria*/Gp6、*Bellilinea* 和 *Thermosporothrix*. Rui 等^[12]的研究发现水稻土厌氧培养体系中细菌以 *Clostridium* 为优势菌,尤其在培养早期.培养后期则以 *Bacteroidetes* 和 *Chlorobi* 为优势菌.本研究仅在 JX 水稻土中发现 *Clostridium*, 且只占所测序列的 2%. *Bacteroidetes* 在两种水稻土中也仅发现 2% 的比例. *Chlorobi* 在两种水稻土中均未发现. *Acidobacteria* 在 JX 水稻土中占 11%, 在 GD 水稻土中占 15%. 另外,本研究的两种水稻土的优势细菌 *Acidobacteria*, 在 Rui 等^[12]的研究中仅在高温 (45℃) 培养体系中作为优势菌存在,这种差异可能与水稻土的土壤类型及土壤特性有关.

Clostridia 属革兰氏阳性菌,是孢子形成的细菌.研究表明它是水稻土细菌菌群普遍存在的优势菌^[6,30~32].通过细菌 16S rRNA 基因检测到 *Bacteroidetes* 和 *Acidobacteria* 普遍存在于各种环境中. *Bacteroidetes* 能够在各种复杂底物上消化和生长,如纤维素、木质素和糖等.另有研究发现 *Bacteroidetes* 能够在底物有效性很低时也能够生长得很好^[33,34]. *Acidobacteria* 由于很难进行培养,目前其生态功能未知.有研究表明这类微生物生长缓

慢,且一般适宜在寡营养的环境中生存^[35,36]. 本研究的两种水稻土中均仅有两条序列属于 *Bacteroidetes*, 而 *Acidobacteria* 在 JX 水稻土中有 11 条, GD 水稻土中有 10 条.这可能与本研究测定的序列相对较少,未能覆盖体系中所有的细菌也有关系. Wegner 等^[37]对秸秆降解早期的水稻土细菌菌群进行了分析,发现 *Clostridiaceae*、*Lachnospiraceae*、*Ruminococcaceae*、*Veillonellaceae* 和 *Pseudomonadaceae* 是丰度最高且最活跃的菌群,这些细菌对秸秆早期降解贡献很大.而在本研究中,这些细菌群的丰度非常低,仅占总序列的 0~2%,这可能与本研究培养时间相对较长有关. Wegner 等^[37]的研究也发现 *Firmicutes* 参与纤维素和几丁质的降解,而 *Acidobacteria*、*Bacteroidetes* 及 *Chloroflexi* 参与半纤维素的降解.本研究中 *Firmicutes* 在 GD 水稻土中占所测序列的 26%,而在 JX 水稻土中占 7%,表明在 GD 水稻土中更多的 *Firmicutes* 与稻秸的后期降解有关. Cahyani 等^[38]的研究结果表明, α -*Proteobacteria* 参与稻秸初始的降解, *Thermophilic Bacillus* spp. 和 *Actinomycetes* 参与稻秸降解的嗜热阶段, *Cytophaga* 和 *Clostridial* members 参与稻秸降解的固化阶段,而 *Mesophilic Bacillus* spp. 一直参与稻秸降解的整个阶段. Weber 等^[6,7]的研究发现稻秸厌氧降解的优势细菌属于 *Clostridium* spp.. 日本水稻土秸秆降解中分离培养出了 *Actinobacteria*, 尤其有 *Cellulomonas* spp.^[39]. 另有学者发现日本水稻土中参与稻秸降解的主要细菌有 *Proteobacteria*、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* [CFB] 群及 *Spirochaetes*^[40]. 可以看出,不同的研究得到了不同的结果,表明秸秆添加在不同类型的水稻土时,参与秸秆降解的细菌及土壤中的细菌菌群不尽相同.

4 结论

不同稻秸添加量对 JX 水稻土产甲烷古菌群落结构有一定的影响,而对 GD 水稻土的产甲烷古菌群落结构的影响不大.两种水稻土的产甲烷古菌 *mcrA* 基因拷贝数均随稻秸添加量的增加而增加.在相同稻秸量添加条件下两种水稻土产甲烷古菌群落不同. JX 水稻土中的产甲烷古菌有 *Methanosarcinaceae*、*Methanocellaceae*、*Methanomicrobiaceae*、*Methanobacteriaceae* 以及未知菌群 (494 bp). GD 水稻土中的产甲烷古菌为 *Methanobacteriaceae*、*Methanosarcinaceae* 和 *Methanocellaceae*. 细菌群落结构在两种水稻土之间也有明显差异, GD 水稻土的细菌多样性高于 JX 水

稻土. 综上表明, 稻秸量添加对不同水稻土产甲烷古菌群落结构的影响有差异, 但均能促进产甲烷古菌的生长. 不同类型的水稻土经相对较长时间的厌氧培养后其产甲烷古菌及细菌菌群结构不同.

参考文献:

- [1] Kimura M, Murase J, Lu Y H. Carbon cycling in rice field ecosystems in the context of input, decomposition and translocation of organic materials and the fates of their end products (CO_2 and CH_4) [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, **36**(9): 1399-1416.
- [2] Lu Y H, Watanabe A, Kimura M. Input and distribution of photosynthesized carbon in a flooded rice soil [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2002, **16**(4): 1085.
- [3] Watanabe A, Yoshida M, Kimura M. Contribution of rice straw carbon to CH_4 emission from rice paddies using ^{13}C -enriched rice straw [J]. *Journal of Geophysical Research*, 1998, **103**(D7): 8237-8242.
- [4] Liesack W, Schnell S, Revsbech N P. Microbiology of flooded rice paddies [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, **24**(5): 625-645.
- [5] Glissmann K, Weber S, Conrad R. Localization of processes involved in methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil [J]. *Environmental Microbiology*, 2001, **3**(8): 502-511.
- [6] Weber S, Lueders T, Friedrich M W, *et al.* Methanogenic populations involved in the degradation of rice straw in anoxic paddy soil [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **38**(1): 11-20.
- [7] Weber S, Stubner S, Conrad R. Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(3): 1318-1327.
- [8] Kennedy A C, Smith K L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils [J]. *Plant and Soil*, 1995, **170**(1): 75-86.
- [9] 李秀英, 赵秉强, 李絮花, 等. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系 [J]. *中国农业科学*, 2005, **38**(8): 1591-1599.
Li X Y, Zhao B Q, Li X H, *et al.* Effects of different fertilization systems on soil microbe and its relation to soil fertility [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, **38**(8): 1591-1599.
- [10] 杨滨娟, 黄国勤, 钱海燕. 秸秆还田配施化肥对土壤温度、根际微生物及酶活性的影响 [J]. *土壤学报*, 2014, **51**(1): 150-157.
Yang B J, Huang G Q, Qian H Y. Effects of straw incorporation plus chemical fertilizer on soil temperature, root micro-organisms and enzyme activities [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2014, **51**(1): 150-157.
- [11] 伍玉鹏, 彭其安, Shaaban M, 等. 秸秆还田对土壤微生物影响的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2014, **30**(29): 175-183.
Wu Y P, Peng Q A, Shaaban M, *et al.* Research progress of effect of straw returning on soil microorganism [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, **30**(29): 175-183.
- [12] Rui J P, Peng J J, Lu Y H. Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(14): 4879-4886.
- [13] 孙瑞波, 郭熙盛, 王道中, 等. 长期施用化肥及秸秆还田对砂姜黑土细菌群落的影响 [J]. *微生物学通报*, 2015, **42**(10): 2049-2057.
Sun R B, Guo X S, Wang D Z, *et al.* The impact of long-term application of chemical fertilizers and straw returning on soil bacterial community [J]. *Microbiology China*, 2015, **42**(10): 2049-2057.
- [14] Shen C C, Xiong J B, Zhang H Y, *et al.* Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, **57**: 204-211.
- [15] 李煜珊, 李耀明, 欧阳志云. 产甲烷微生物研究概况 [J]. *环境科学*, 2014, **35**(5): 2025-2030.
Li Y S, Li Y M, Ouyang Z Y. A research overview of methanogens [J]. *Environmental Science*, 2014, **35**(5): 2025-2030.
- [16] Tanahashi T, Murase J, Matsuya K, *et al.* Bacterial communities responsible for the decomposition of rice straw compost in a Japanese rice paddy field estimated by DGGE analysis of amplified 16s rDNA and 16s rRNA fragments [J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2005, **51**(3): 351-360.
- [17] 卜元卿, 黄为一. 稻秸对土壤细菌群落分子多态性的影响 [J]. *土壤学报*, 2005, **42**(2): 270-277.
Bu Y Q, Huang W Y. Effect of rice straw on molecular phylogenetic diversity of soil bacterial communities [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, **42**(2): 270-277.
- [18] Conrad R, Klose M. Dynamics of the methanogenic archaeal community in anoxic rice soil upon addition of straw [J]. *European Journal of Soil Science*, 2006, **57**(4): 476-484.
- [19] Peng J J, Lü Z, Rui J P, *et al.* Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**(9): 2894-2901.
- [20] Shrestha M, Shrestha P M, Conrad R. Bacterial and archaeal communities involved in the *in situ* degradation of ^{13}C -labelled straw in the rice rhizosphere [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, **3**(5): 587-596.
- [21] Conrad R, Klose M, Lu Y H, *et al.* Methanogenic pathway and archaeal communities in three different anoxic soils amended with rice straw and maize straw [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, **3**: 4.
- [22] Lu Y, Fu L, Lu Y H, *et al.* Effect of temperature on the structure and activity of a methanogenic archaeal community during rice straw decomposition [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, **81**: 17-27.
- [23] Conrad R. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs [J]. *Advances in Agronomy*, 2007, **96**: 1-63.
- [24] Müller T, Höper H. Soil organic matter turnover as a function of the soil clay content: consequences for model applications [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, **36**(6): 877-888.
- [25] Jetten M S M, Stams A J M, Zehnder A J B. Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, **73**(4): 339-344.
- [26] Bao Q L, Xiao K Q, Chen Z, *et al.* 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.
- [27] Asakawa S, Morii H, Akagawa-Matsushita M, *et al.* Characterization of *Methanobrevibacter arboriphilicus* SA isolated from a paddy field soil and DNA-DNA hybridization among *M. arboriphilicus* strains [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1993, **43**(4): 683-686.
- [28] Lu Y H, Conrad R. In situ stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere [J]. *Science*, 2005, **309**(5737): 1088-1090.

- [29] Angel R, Claus P, Conrad R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions[J]. The ISME Journal, 2012, **6**(4): 847-862.
- [30] Hengstmann U, Chin K J, Janssen P H, *et al.* Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(11): 5050-5058.
- [31] Lüdemann H, Arth I, Liesack W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(2): 754-762.
- [32] Stackebrandt E, Kramer I, Swiderski J, *et al.* Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1999, **24**(3): 253-258.
- [33] Kirchman D L. The ecology of *Cytophaga-flavobacteria* in aquatic environments[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, **39**(2): 91-100.
- [34] Sharp R, Macfarlane G T. Chemostat enrichments of human feces with resistant starch are selective for adherent butyrate-producing clostridia at high dilution rates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(10): 4212-4221.
- [35] Eichorst S A, Breznak J A, Schmidt T M. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum *Acidobacteria* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(8): 2708-2717.
- [36] Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. Toward an ecological classification of soil bacteria[J]. Ecology, 2007, **88**(6): 1354-1364.
- [37] Wegner C E, Liesack W. Microbial community dynamics during the early stages of plant polymer breakdown in paddy soil[J]. Environmental Microbiology, 2016, **18**(9): 2825-2842.
- [38] Cahyani V R, Matsuya K, Asakawa S, *et al.* Succession and phylogenetic composition of bacterial communities responsible for the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2003, **49**(4): 619-630.
- [39] Hiroshi A, Izawa T, Ueki K, *et al.* Phylogeny of numerically abundant culturable anaerobic bacteria associated with degradation of rice plant residue in Japanese paddy field soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, **43**(2): 149-161.
- [40] Sugano A, Tsuchimoto H, Tun C C, *et al.* Succession and phylogenetic profile of eubacterial communities in rice straw incorporated into a rice field: estimation by PCR-DGGE analysis [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2005, **51**(1): 51-60.

CONTENTS

Size Distributions of Different Carbonaceous Components in Ambient Aerosols	DU Xiang, ZHAO Pu-sheng, DONG Qun, <i>et al.</i> (3849)
Analysis of Air Pollution Characteristics and Meteorological Conditions in Zhengzhou from 2014 to 2017	GUO Meng-meng, JIANG Nan, WANG Shen-bo, <i>et al.</i> (3856)
Characteristics of Atmospheric PM _{2.5} Pollution and Its Influence on Visibility in Background Areas of Ji'nan	BIE Shu-jun, YANG Ling-xiao, GAO Ying, <i>et al.</i> (3868)
Source Analysis and Health Risk Assessment of PAHs in PM _{2.5} During Winter in Liaohe City	LIU Xiao-di, HOU Zhan-fang, MENG Jing-jing, <i>et al.</i> (3875)
Temporal-Spatial Characteristics and Variability in Aerosol Optical Depth over China During 2001-2017	LIU Hai-zhi, GUO Hai-yan, MA Zhen-feng, <i>et al.</i> (3886)
Spatial-Temporal Distribution of Absorptive Aerosols in the Yangtze River Delta	ZHAO Nan, CAO Fan-shi, TIAN Qing, <i>et al.</i> (3898)
Emission Characteristics of Chemical Composition of Particulate Matter from Coal-fired Boilers	YANG Yan-rong, ZHOU Xue-ming, QIN Juan-juan, <i>et al.</i> (3908)
Pollution Characteristics of Heavy Metals in PM _{2.5} Near Highway	LI Xiao-bao, LIAO Zu-wen, ZHAO Hong, <i>et al.</i> (3916)
Pollution Characteristics and Potential Ecological Risks of Heavy Metals in Road Dust in Beijing	HU Yue-qi, GUO Jian-hui, ZHANG Chao, <i>et al.</i> (3924)
Application of Test Method for Dust Suppression Efficiency of Wind Erosion Dust Suppressant	QIN Jian-ping, LI Bei-bei, YANG Tao, <i>et al.</i> (3935)
Emission Characteristics and Ozone Formation Potential of VOCs in Printing Enterprises in Beijing-Tianjin-Hebei	LIU Wen-wen, FANG Li, GUO Xiu-rui, <i>et al.</i> (3942)
Source Profiles of VOCs Associated with Typical Industrial Processes in Chengdu	ZHOU Zi-hang, DENG Ye, WU Ke-ying, <i>et al.</i> (3949)
Characterization and Health Risk Assessment of Exposure to Odorous Pollutants Emitted from Industrial Odor Sources	MENG Jie, ZHAI Zeng-xiu, JING Bo-yu, <i>et al.</i> (3962)
Analysis of HONO Concentration and Source in Typical Rural Area of North China	WANG Yu-zheng, XUE Chao-yang, ZHANG Cheng-long, <i>et al.</i> (3973)
CO-SCR Performance and Mechanism over Co ₃ O ₄ Catalysts	ZHONG Xue-mei, ZHANG Tao, LI Jia-yin, <i>et al.</i> (3982)
Pollution Characteristics of Perfluorinated Alkyl Substances (PFASs) in Seawater, Sediments, and Biological Samples from Jiaozhou Bay, China	 CUI Wen-jie, PENG Ji-xing, TAN Zhi-jun, <i>et al.</i> (3990)
Occurrence and Influencing Factors of Odorous Compounds in Reservoirs Used as Drinking Water Resources in Jiangsu Province	 SHI Peng-cheng, ZHU Guang-wei, YANG Wen-bin, <i>et al.</i> (4000)
Fluorescence Characteristics and Influencing Factors of Dissolved Organic Matter (DOM) in Water and Sediment of Urban Watershed: A Case Study of Xiaojia River in Ningbo City	 GAO Feng, SHAO Mei-ling, TANG Jian-feng, <i>et al.</i> (4009)
Water Bloom Modified Sediment Nitrogen Transformation and Removal	 XIAO Lin, YANG Jia-yi (4018)
Applicability of Bioavailable Phosphorus in Sediments to Indicating Trophic Levels of Lakes and Reservoirs	LIU Hui, HU Lin-na, ZHU Meng-yuan, <i>et al.</i> (4023)
Analysis of Nitrate Pollution Sources in the Rainy Season of the Lower Fenhe River	WANG Yin-long, FENG Min-quan, DONG Xiang-qian (4033)
Hydrochemical Characteristics and Evolution of Groundwater in the Kashgar Delta Area in Xinjiang	WEI Xing, ZHOU Jin-long, NAI Wei-hua, <i>et al.</i> (4042)
Community Diversity of Eukaryotic Nano-phytoplankton in Yellow Sea Using DNA Metabarcoding Technology Based on Multiple Amplicons	 ZHANG Li, ZHANG Yuan, LIN Jia-ning, <i>et al.</i> (4052)
Comparison of Functional Groups of Phytoplankton in FG, MFG, and MBFG; Taking Three Reservoirs as an Example in Guizhou Plateau	CHEN Qian, LI Qiu-hua, MA Xin-yang, <i>et al.</i> (4061)
Adsorption and Mechanism of Arsenic by Natural Iron-containing Minerals	SHAO Jin-qiu, WEN Qi-qian, YAN Xiu-lan, <i>et al.</i> (4072)
Removal of Pb ²⁺ from Aqueous Solution by Magnesium-Calcium Hydroxyapatite Adsorbent	HE Hao, ZHU Zong-qiang, LIU Jie, <i>et al.</i> (4081)
Intensified Electrosorption of Pb ²⁺ by 2,6-diaminoanthraquinone/Graphene Composite Electrode	JIN Sheng-yao, XIANG Yang, ZHANG Jun-yu, <i>et al.</i> (4091)
Experiment on Recovery of Phosphorus from Aqueous Solution by Calcium Doped Fe ₃ O ₄	BAI Run-ying, LIU Jian-ming, HAO Jian-feng, <i>et al.</i> (4098)
Removal of Microplastics by Different Treatment Processes in Shanghai Large Municipal Wastewater Treatment Plants	JIA Qi-long, CHEN Hao, ZHAO Xin, <i>et al.</i> (4105)
Enhanced Nutrient Removal and Microbial Community Structure in a Step-feed A ² /O Process Treating Low-C/N Municipal Wastewater	RONG Yi, LIU Xiao-chai, HE Yin-xuan, <i>et al.</i> (4113)
Performances Analysis of an Upflow Anaerobic Filter for Domestic Sewage Treatment	YANG Zhong-qi, LIU Xiu-hong, LI Hai-xin, <i>et al.</i> (4121)
Electron Equilibrium Analysis of Integrated Autotrophic and Heterotrophic Denitrification Process Under Micro-aerobic Conditions	ZHANG Ruo-chen, CHEN Chuan, SHAO Bo, <i>et al.</i> (4128)
Pilot Study on Start-up and Stable Operation at Low Temperature Based on Denitrifying Phosphorus Removal	ZHANG Fan, YU De-shuang, LIU Jie, <i>et al.</i> (4136)
Comparison of Polycaprolactone and Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate for Nitrogen Removal	YI Cheng-hao, QIN Wei, CHEN Zhan, <i>et al.</i> (4143)
Rapid Cultivation of Anaerobic Ammonium Oxidation Granular Sludge and Inhibition Kinetics of Granular Sludge	TANG Peng, YU De-shuang, CHEN Guang-hui, <i>et al.</i> (4152)
Effect of Ca ²⁺ on the Nitrification Activity and the Flocculation and Sedimentation Performances of the Activated Sludge	ZHANG Lan-he, ZHAO Qian-nan, ZHANG Hai-feng, <i>et al.</i> (4160)
Recovery of Phosphorus in the Form of Struvite from the Anaerobic Fermentation Supernatant of Excess Sludge	CHANG Xiao, ZENG Wei, WANG Bao-gui, <i>et al.</i> (4169)
Effect of Signal Molecule Combined with <i>Thiobacillus denitrificans</i> on Simultaneous Removal of Nitrogen and Sulfur	XU Jin-lan, CHEN Zi-wei, ZHANG Shao-feng, <i>et al.</i> (4177)
Bacterial Community Composition in Channel Sediment in Response to Mariculture Wastewater Drainage	HU Yue-hang, XUAN Li-xia, QIU Qiong-fen (4185)
Setup and Microbial Community Analysis of ANAMMOX System for Landfill Leachate Treatment Coupling Partial Nitrification-Denitrification Process	 ZHAO Qing, LIU Meng-ying, LÜ Hui, <i>et al.</i> (4195)
Effects of Rice Straw Addition on Methanogenic Archaea and Bacteria in Two Paddy Soils	BAO Qiong-li, WANG Feng-hua, BAO Wan-kui, <i>et al.</i> (4202)
Effect of Plastic Film Mulching on Greenhouse Gas Emissions from Rice-Rapeseed Rotation in Cropland	CHEN Shi-jie, JIANG Chang-sheng, NI Xue, <i>et al.</i> (4213)
N ₂ O Emissions from a Tea Field with Deep Application of Nitrogen Fertilizer and Intercropping with White Clover	LÜ Tian-xin, WU Yan-zheng, SHEN Jian-lin, <i>et al.</i> (4221)
Distribution and Emission of Nitrous Oxide (N ₂ O) in Three Gorges Reservoir and Downstream River	CHENG Fang, DING Shuai, LIU Su-mei, <i>et al.</i> (4230)
Synergy of Algal Sedimentation and Sediment Capping for Methane Emission Control in Bloom Waters	ZHU Lin, YU Jiang-hua, SHI Wen-qing, <i>et al.</i> (4238)
Impact of Newly Build Lead-Acid Battery Agglomeration Area on the Surrounding Soil Environment: A Study Based on the Spatial Characteristics of Heavy Metals	 DING Ya-li, LIAO Min, FANG Zhi-ping, <i>et al.</i> (4244)
Effects of Amendments with Different C/N/P Ratios on Plant and Soil Properties of a Pb-Zn Mine Tailings	YANG Sheng-xiang, LI Feng-mei, PENG Xi-zhu, <i>et al.</i> (4253)
Derivation of the Thresholds of Available Concentrations of Heavy Metals in Soil Based on Agricultural Product Safety	ZHANG Yun-hui, DU Ping, HE Ying, <i>et al.</i> (4262)
Content of Soil Phytolith-Occcluded Organic Carbon in Different Land Use Patterns at Jinyun Mountain	LUO Dong-hai, WANG Zi-fang, LU Chang, <i>et al.</i> (4270)
Influence of Land Use Change on Litter and Soil C, N, P Stoichiometric Characteristics and Soil Enzyme Activity in Karst Ecosystem, Southwest China	 TIAN Jing, SHENG Mao-yin, WANG Pan, <i>et al.</i> (4278)
Effect of Conditioning Agent Combined with Flooding Measures on Absorption and Accumulation of Cadmium in Rice	PENG Ou, LIU Yu-ling, TIE Bai-qing, <i>et al.</i> (4287)
Distribution and Sources of OPEs in Plants and Snow in Hailuoguo	CHEN Yang, YIN Hong-ling, WU Di, <i>et al.</i> (4295)