

围垦植稻对崇明东滩湿地产甲烷微生物的影响

张鑫磊, 宋怡轩, 张洁, 汪方圆, 张耀鸿, 贾仲君

引用本文:

张鑫磊, 宋怡轩, 张洁, 等. 围垦植稻对崇明东滩湿地产甲烷微生物的影响[J]. [农业环境科学学报](#), 2020, 39(2): 411-417.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0909>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[pH调控对瘤胃液接种稻秸厌氧消化中水解菌及产甲烷菌的影响](#)

邓玉营, 阮文权, 郁莉, 黄一波

[农业环境科学学报](#). 2018, 37(4): 813-819 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1599>

[氨胁迫对猪粪厌氧消化性能的影响](#)

高文萱, 张克强, 梁军锋, 宋香育, 韩冰雅, 杜连柱

[农业环境科学学报](#). 2015(10): 1997-2003 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.10.023>

[猪粪厌氧发酵消化液回流体系微生物群落结构特征与产气关系研究](#)

孔德望, 张克强, 房芳, 高文萱, 梁军锋, 梁雨, 杜连柱

[农业环境科学学报](#). 2018, 37(3): 559-566 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1241>

[不同加入方式下金霉素对猪场污水厌氧消化系统的影响](#)

曹俊超, 王小庆, 马保华, 邹永德, 廖新倮, 庞燕玲, 吴银宝

[农业环境科学学报](#). 2019, 38(3): 680-687 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0555>

[三种湿地植物厌氧发酵产甲烷特性及产物稳定性研究](#)

夏嵩, 付嘉琦, 付尹宣, 晏恒, 陈小平, 吴九九

[农业环境科学学报](#). 2018, 37(9): 2061-2066 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0003>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张鑫磊, 宋怡轩, 张洁, 等. 围垦植稻对崇明东滩湿地产甲烷微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(2): 411-417.

ZHANG Xin-lei, SONG Yi-xuan, ZHANG Jie, et al. Effects of reclamation and cultivating rice on CH₄-producing microorganisms in Chongming Dongtan Wetland, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(2): 411-417.

围垦植稻对崇明东滩湿地产甲烷微生物的影响

张鑫磊^{1,2,3}, 宋怡轩^{1,2}, 张洁^{1,2}, 汪方圆^{1,2}, 张耀鸿^{1*}, 贾仲君²

(1. 南京信息工程大学, 气象灾害预报预警与评估协同创新中心/江苏省农业气象重点实验室, 南京 210044; 2. 中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008; 3. 山西省气候中心, 太原 030006)

摘要:滨海湿地是CH₄排放的重要自然源, 受人类活动的影响较为强烈。本研究选择长江入海口崇明东滩自然湿地(光滩湿地和芦苇湿地)为对照, 以空间代替时间变化, 比较研究不同围垦年限(27、51、86年)的稻田耕作土壤产甲烷速率演替规律及其微生物数量变异特征。结果表明, 围垦稻田的产甲烷速率平均值为13.8 ng CH₄·g⁻¹·d⁻¹, 是自然滩涂湿地的3.3倍, 且随着围垦年限增加而显著增加。围垦稻田中产甲烷菌的*mcrA*基因拷贝数为1.101×10⁸~1.443×10⁸ copies·g⁻¹, 也随围垦年限增长而增加, 比光滩湿地中的基因拷贝数高出一个数量级。光滩湿地产甲烷菌的相对丰度显著低于芦苇湿地和围垦稻田, 围垦稻田中相对丰度值随围垦年限增长而显著增加。其中, H₂/CO₂营养型产甲烷菌的相对丰度随内陆方向和围垦年限增长而数量级水平增加, 而甲基营养型产甲烷菌的相对丰度在光滩中最高, 随内陆方向和围垦年限增长而数量级水平减小。各采样点中的乙酸营养型产甲烷菌相对丰度同处于一个数量级, 其在3个围垦稻田中没有显著差异。相关性分析表明, 产甲烷速率与H₂/CO₂营养型产甲烷菌丰度值呈显著正相关, 而与甲基营养型产甲烷菌呈显著负相关。因此, 围垦种稻的熟土作用促进了滨海湿地甲烷产生过程, H₂/CO₂营养型产甲烷菌数量的大幅增加是产甲烷速率升高的主控因素之一。

关键词:围垦; 稻田; 产甲烷速率; H₂/CO₂营养型产甲烷菌

中图分类号: S181 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2020)02-0411-07 doi:10.11654/jaes.2019-0909

Effects of reclamation and cultivating rice on CH₄-producing microorganisms in Chongming Dongtan Wetland, China

ZHANG Xin-lei^{1,2,3}, SONG Yi-xuan^{1,2}, ZHANG Jie^{1,2}, WANG Fang-yuan^{1,2}, ZHANG Yao-hong^{1*}, JIA Zhong-jun²

(1. Collaborative Innovation Center for Forecast and Evaluation of Meteorological Disasters/Jiangsu Provincial Key Laboratory of Agricultural Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3. Shanxi Climate Center, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Coastal wetlands are an important natural source of CH₄ emission, which is strongly influenced by human activities. In this study, Chongming Dongtan Natural Wetland (bare, flat wetland and reed-vegetated wetland) in the estuary of Yangtze River was selected as the control, and CH₄ production potential and the related microbial quantity and characteristics were investigated in the paddy field soils with different reclamation years (27, 51, 86 years). The results showed that the average rate of CH₄ production in reclaimed paddy fields was 13.8 ng CH₄·g⁻¹·d⁻¹, which was 3.3 times higher than that in natural wetlands and increased significantly with the increase in reclamation years. The average copy number of *mcrA* gene in the methanogens was 1.101×10⁸~1.443×10⁸ copies·g⁻¹ in reclaimed paddy fields, which was an order of magnitude higher than that in bare, flat wetland and increased with the increase in reclamation years. The relative abundance of the methanogens (as a percentage of the whole archaea) was significantly lower in bare, flat wetland than in reed wetland and re-

收稿日期: 2019-08-18 录用日期: 2019-11-29

作者简介: 张鑫磊(1992—), 男, 山西太原人, 硕士研究生, 主要从事土壤温室气体排放研究。E-mail: 550442249@qq.com

*通信作者: 张耀鸿 E-mail: yhzhang@nuist.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(41671247, 41103039); 江苏省自然科学基金项目(BK20171455); 中国国家留学基金(201908320185)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (41671247, 41103039); The National Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20171455); China State Scholarship Fund (201908320185)

claimed paddy field, and the relative abundance in reclaimed paddy field increased significantly with the increase in reclamation years. More importantly, the relative abundance of H_2/CO_2 trophic methanogens increased in order of magnitude with the increase in reclamation years, whereas the relative abundance of methylamine trophic methanogens decreased in order of magnitude with the increase in reclamation years. In addition, the relative abundance of acetic acid trophic methanogens was in the same order of magnitude in the five sampling sites, and there was no significant difference among the three reclaimed paddy fields. The correlation analysis showed that the production rate of CH_4 was positively correlated with the abundance of H_2/CO_2 trophic methanogens, but negatively correlated with methylamine trophic methanogens. Therefore, mellowing the soil using reclamation and cultivating rice promote the production of CH_4 in coastal wetlands, and the significant increase in the number of H_2/CO_2 trophic methanogens is one of the main factors controlling the increased CH_4 production rate.

Keywords: reclamation; paddy field; CH_4 production potential; H_2/CO_2 trophic methanogens

由温室气体甲烷(CH_4)增加导致的全球气候变暖是当前威胁人类生存和发展的环境问题之一。根据 IPCC 的评估报告,大气 CH_4 浓度已达到近百年来最高水平^[1],对全球气候变暖的增温贡献已达 15%^[2-3]。滨海湿地是介于海洋与陆地之间的一种特殊生态系统^[4]。研究表明,滨海湿地 CH_4 排放量占到全球海洋 CH_4 排放总量的 20%~39%^[5]。因此,研究滨海湿地生态系统 CH_4 排放特征及其影响要素不仅可以深入了解湿地碳循环的生物地球化学行为,还可为合理预测全球气候变化提供重要科学依据^[6]。

崇明岛东滩是中国长江口规模最大、发育最完善的河口型滩涂湿地,强烈受到人类活动的影响^[7]。随着区域经济的发展,人类对土地的需求越来越迫切,滩涂围垦改农田成为解决土地问题的有效途径^[8]。围垦后的湿地不再受潮汐影响,与近海间的物质能量交换基本消失。随后的农作物种植、翻耕、施肥等农业管理措施,使围垦区生境发生显著变化^[6],形成了独特的湿地类型——围垦区稻田湿地,与海堤以外的自然滩涂湿地形成了明显的差别^[9]。这种土地利用变化改变了土壤生物地球化学过程^[10-11],对土壤 CH_4 产生过程会造成深刻的影响。已有研究表明,围垦稻田的甲烷排放通量与滨海滩涂湿地^[12]、内陆淡水稻田^[13]存在着明显的差异。对其与环境要素之间的相互关系已进行了一些初步研究^[12],但是从功能微生物角度,尤其是结合分子生物学方法探索该区域中甲烷产生过程的微生物机理的研究报道较少。

尽管自然界中产甲烷菌分布十分广泛,但是仅能以乙酸、甲酸、 H_2/CO_2 、甲醇、甲硫醇类和甲胺类等 C1 甲基化合物作为产甲烷的底物^[14]。根据其利用底物特点可将产甲烷菌分为 H_2/CO_2 营养型、乙酸营养型和甲基类营养型产甲烷菌。受到植被、土壤性质、底物类型和硫酸盐含量等环境因素影响,不同类型滨海湿地之间产甲烷菌种类和产甲烷途径存在着很大的变

异性^[15-18]。那么,围垦改稻田后土壤中各类营养型产甲烷菌的种类如何变化,其对甲烷产生过程的相对贡献如何? 这些问题的探索对于深入了解围垦区稻田甲烷排放通量至关重要。

基于此,本试验选取长江口崇明岛东滩自然滩涂湿地和围垦区稻田为研究对象,以空间代替时间变化的方法,研究不同围垦年限情景下土壤产甲烷速率的空间变异特征,分析功能微生物的群落及数量特征,探索其与产甲烷速率之间的相互关系,从而合理评估围垦这一典型的人类干扰方式对区域甲烷排放通量的影响,以期为合理评价我国东部沿海地区围垦造田的生态效应提供理论指导和参考依据。

1 材料与方 法

1.1 土壤样品采集

本研究采样地点为上海市崇明岛东滩自然湿地和围垦区稻田(121°09'~121°54' E, 31°27'~31°51' N),该区域属于典型的亚热带季风气候,终年温热,降水充沛,年均温 15.3 °C,年降水量 1 003.7 mm。在东滩湿地保护区中,选取低滩位的裸地光滩湿地(BF)和高滩位生长芦苇植被的芦苇湿地(PA),作为围垦 0 年的样点。在围垦区内选取种稻 27、51、86 年的稻田(分别记为 W-27、W-51、W-86)作为不同围垦年限的稻田样点。围垦植稻不同年限的试验样点根据 Cui 等^[19]的参考文献选取。为了使采样点能更准确反映不同的土壤发育年限,更具代表性,在每个样区内以 S 形设置 6 个采样点,各采样点间距约为 10~15 m,用土钻取表层 0~20 cm 鲜土,并将该 6 个采样点的土壤均匀混合成 1 个混合样本,作为一个重复,重复 3 次。放入冰盒中迅速运回实验室冷冻保存备用。

1.2 土壤理化性质测定

土壤理化性质的分析测定主要参考《土壤农业化学分析方法》^[20]。土壤总有机碳采用浓硫酸-重铬酸

钾消煮-硫酸亚铁滴定法测定。土壤全氮含量采用半微量凯氏定氮法测定。土壤铵态氮和硝态氮用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 溶液浸提后,采用 AA3 流动分析仪测定。土壤 pH 采用水土比为 2.5:1 提取后,用数字酸度计测定;土壤硫酸根含量采用离子色谱法测定。

1.3 CH_4 产生潜力测定

将 5 g 新鲜土壤样品放入 40 mL 的厌氧培养瓶中,加入 10 mL 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜的超纯水,用胶塞密封后抽真空-充氩气重复 3 次,以去除瓶中的氧气,达到严格厌氧状态。室温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光条件下预培养 7 d,以尽可能去除瓶中残余 O_2 分子。预培养结束后,再抽真空-充氩气 3 次,进行正式培养 14 d。培养期间每 2 d 从培养瓶顶部抽取 $500 \mu\text{L}$ 气体测定 CH_4 浓度。每次采气前用力摇晃培养瓶 60 s,使瓶内气-液相甲烷浓度平衡;采气后补充等量的氩气以保证培养瓶中气压不变,且在计算 CH_4 浓度变化率时需将采气引起的 CH_4 损耗量考虑在内。采用安捷伦气相色谱仪 (7890N 型) 测定 CH_4 浓度。土壤产甲烷速率通过分析培养期间瓶内 CH_4 浓度的变化情况进行计算,公式如下:

$$P = \frac{dc}{dt} \times \frac{V}{W} \times \frac{MW}{MV} \times \frac{T_{st}}{T_{st} + T}$$

式中: P 是产 CH_4 速率, $\text{ng CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; dc/dt 为培养期间培养瓶上部气相 CH_4 浓度变化率, $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; V 为培养瓶上部气体体积, L; W 为培养的干土质量, g; MW 为甲烷摩尔质量, $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$; MV 为标准状态下气体摩尔体积, $22.4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; T_{st} 为标准温度, K; T 为培养温度, $^\circ\text{C}$ 。

1.4 土壤 DNA 提取

取 0.5 g 土壤样品,用 Fast DNA Spin kit for soil 试剂盒 (MP Biomedicals, USA) 提取土壤样品中的总 DNA。用分光光度计 (NanoDrop-1000 UV-Vis) 测定土壤 DNA 浓度和纯度。土壤 DNA 保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱待用。

1.5 定量 PCR 扩增

采用 C1000™ Real-Time System 扩增仪定量扩增产甲烷菌的 *mcrA* 基因拷贝数。PCR 扩增所用引物为 ME1/ME2。反应体系为 $20 \mu\text{L}$: 包括 DNA 样品 $1 \mu\text{L}$ 、Taq DNA 聚合酶 $10 \mu\text{L}$ 、前后引物各 $0.5 \mu\text{L}$ 、无菌水 $8 \mu\text{L}$ 。

提取产甲烷菌 *mcrA* 基因的重组质粒,先测序验证,再用分光光度计测定质粒浓度,并用无菌水将质粒稀释 6~8 个梯度,用于制作定量 PCR 的标准曲线,

根据该曲线计算目的基因的拷贝数。

1.6 高通量测序

使用古菌通用引物 Arc519/Arc806 对古菌的 16S rRNA 基因的 V4 区序列进行扩增。扩增体系为:稀释后的 DNA $2 \mu\text{L}$ 、Premix Taq™ $25 \mu\text{L}$ 、上游引物 $1 \mu\text{L}$ 、下游引物 $1 \mu\text{L}$ 、用灭菌后的去离子水补至 $50 \mu\text{L}$ 。519F/806R 的扩增条件为:预变性 $95.0 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min; 变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 s; 退火 $55 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 s; 延伸, $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 s; 40 个循环。PCR 扩增产物使用 1.2% (m/V) 的琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增出特异条带,使用的 Marker 为 DL2000™,电泳电压设置为 180 V。

用 OMEGA D6492 试剂盒对 PCR 产物进行纯化,然后用 AxyPrep DNA 试剂盒回收凝胶后测定 DNA 的浓度和纯度。

将切胶回收的产物送到中国科学院南京土壤研究所测试分析中心进行建库,并在 Illumina MiSeq 测序仪上进行 16S rRNA 基因的高通量测序,获得下机数据后利用 QIIME 1.9.1 软件进行处理。

1.7 数据统计分析

用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,通过单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Pearson 分析土壤理化性质、微生物丰度的差异性以及相关检验,显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同湿地土壤的理化性质变化特征

崇明岛湿地不同围垦年限土壤理化性质如表 1 所示。围垦稻田的土壤总有机碳 (TOC) 在 $15.29 \sim 18.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 显著高于未围垦的自然滩涂湿地,且随围垦年限增加有逐渐增加的趋势。土壤总氮 (TN) 含量介于 $0.84 \sim 1.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 围垦稻田与自然湿地之间没有明显差异。围垦稻田土壤 NH_4^+ 和 NO_3^- 含量分别为 $14.48 \sim 23.37 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $11.79 \sim 18.67 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 比光滩湿地 (BF) 土壤分别高出 1.2~2.7 倍和 0.8~1.9 倍。未围垦滩涂湿地 (BF 和 PA) 土壤的 pH 值介于 7.67~7.86, 显著高于围垦稻田。围垦稻田的土壤 SO_4^{2-} 浓度范围是 $196 \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 显著低于光滩湿地 (BF) 和芦苇湿地 (PA)。围垦稻田的土壤 EC 值显著低于自然湿地,且随围垦年限增加而显著降低。

2.2 不同湿地土壤的甲烷产生潜力差异

如图 1 所示,光滩湿地的甲烷产生潜力最低,仅为 $3.36 \text{ ng CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 芦苇湿地的甲烷产生潜力为 $4.95 \text{ ng CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 比光滩湿地高出 32%。围垦稻田

表1 不同围垦年限土壤的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of soils with different reclamation years

采样点 Sites	有机碳 TOC/g·kg ⁻¹	总氮 TN/g·kg ⁻¹	氨氮 NH ₄ /mg·kg ⁻¹	硝氮 NO ₃ /mg·kg ⁻¹	酸碱度 pH	硫酸盐 SO ₄ ²⁻ /mg·kg ⁻¹	EC/ mS·cm ⁻¹
BF	7.95±0.46d	0.86±0.09b	6.38±3.53d	6.39±0.45d	7.86±0.08a	797.40±23.92a	5.07±0.15a
PA	13.53±0.21c	1.20±0.03a	15.77±1.13c	10.83±0.79c	7.67±0.02a	578.01±16.75b	4.80±0.18b
W-27	15.29±0.06b	1.00±0.06a	14.48±5.59c	11.79±0.07c	7.38±0.11b	299.91±35.43c	1.59±0.03c
W-51	16.89±0.42ab	0.84±0.03b	23.37±2.37a	18.67±6.59a	7.32±0.06b	226.03±20.55d	1.31±0.04d
W-86	18.34±0.22a	1.12±0.04a	16.25±0.09b	14.11±0.55b	7.25±0.07b	196.07±18.64d	0.74±0.04e

注:同一列不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。

Note: Values followed by different small letters within a column are significantly different at the $P<0.05$ level. The same below.

的甲烷产生潜力速率范围为8.3~23.2 ng CH₄·g⁻¹·d⁻¹,且随着围垦年限增加而显著增加。围垦稻田甲烷产生潜力速率均值是自然滩涂湿地的3.3倍。

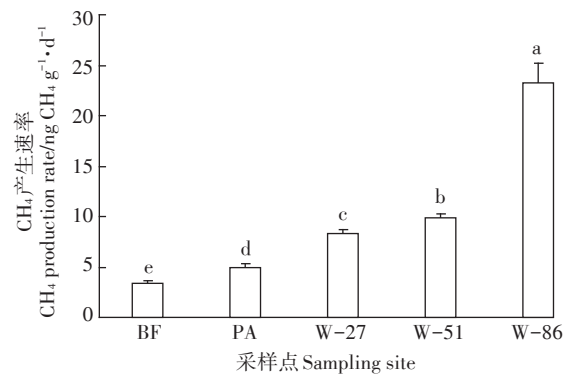
2.3 不同湿地土壤产甲烷菌的绝对丰度和相对丰度

光滩湿地中产甲烷菌的*mcrA*基因拷贝数为 2.4×10^6 copies·g⁻¹,比芦苇湿地中低一个数量级(表2)。围垦稻田中*mcrA*基因拷贝数为 $1.101 \times 10^8 \sim 1.443 \times 10^8$ copies·g⁻¹,随着围垦年限增长而增加。根据高通量测序结果计算出产甲烷菌占整个古菌的百分比表征其相对丰度值。可以看出,光滩湿地的产甲烷菌相对丰度显著低于芦苇湿地和围垦稻田,在围垦稻田中随围垦年限增长而相对丰度增加;其中,围垦51年和86年的稻田中相对丰度比滩涂自然湿地高出一个数量级。H₂/CO₂营养型产甲烷菌的丰度值随趋内陆方向和围垦年限增长而数量级水平增加,其中围垦86年稻田的相对丰度比光滩湿地增加了近100倍。乙酸营养型产甲烷菌的丰度值在各采样点中处于一个数量级,其中围垦稻田中没有显著差异。甲基营养型产甲烷菌的丰度值在光滩中最高,随着趋内陆方向和围垦年限增长而数量级水平减小,其中围垦86年稻田中的丰度值不足光滩湿地的1%。高通量测序分析土壤古菌16S rRNA多样性发现,H₂/CO₂营养型产甲烷菌主要包括甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)、甲烷砾菌属(*Methanoregula*)和*Methanocella*属。其中,甲烷杆菌

属(*Methanobacterium*)是优势属,比其他两个属的相对丰度高出两个数量级。各样点湿地土壤中均检测到乙酸型产甲烷菌,为甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*),相对丰度变异较小。甲基型产甲烷菌只检测到两个属,是甲烷叶菌属(*Methanolobus*, *Methanimicrococcus*)和甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*),其中甲烷叶菌属*Methanolobus*是优势属。

2.4 产甲烷速率与土壤性质和产甲烷菌丰度之间的相关性分析

产甲烷速率与土壤TOC的回归方程达到极显著水平,说明土壤TOC是影响产甲烷速率非常重要的



Different letters indicate significantly differences among treatments

图1 不同采样点土壤甲烷产生速率

Figure 1 CH₄ production rate表2 产甲烷菌功能基因*mcrA*的拷贝数及不同营养型产甲烷菌16S rRNA基因的相对丰度Table 2 Absolute abundance of *mcrA* gene copies and relative abundance of 16S rRNA gene copies

采样点 Sites	拷贝数 Copy number/ $\times 10^7$ copies·g ⁻¹	相对丰度 Relative abundance/%			
		总量	H ₂ /CO ₂ 营养型	乙酸营养型	甲基营养型
BF	0.24±0.03d	0.438±0.038d	0.039±0.002e	0.042±0.003b	0.357±0.041a
PA	5.42±0.51c	0.564±0.047c	0.166±0.012d	0.073±0.011a	0.325±0.031a
W-27	11.01±0.89b	0.549±0.053c	0.426±0.038c	0.037±0.004b	0.086±0.009b
W-51	12.52±1.03ab	2.065±0.194b	2.012±0.211b	0.036±0.004b	0.017±0.002c
W-86	14.43±1.35a	3.370±0.312a	3.330±0.302a	0.037±0.010b	0.003±0.001d

环境要素(表3)。产甲烷速率与土壤TN的回归方程没有达到显著水平,而活性氮(NH_4^+ + NO_3^-)含量与产甲烷速率的回归方程达到显著水平,说明土壤活性氮在一定程度上影响土壤的甲烷产生过程。相反,产甲烷速率与土壤 SO_4^{2-} 含量之间的相关性表现为负对数回归方程,且达到极显著水平。说明随着围垦年限增加土壤 SO_4^{2-} 含量降低,是产甲烷速率显著增加的主控因素之一。产甲烷速率与土壤中 $mcrA$ 基因拷贝数表现为极显著的线性关系,说明产甲烷菌功能基因 $mcrA$ 数量的增加是产甲烷速率增加的重要因素。

对各营养型产甲烷菌相对丰度与土壤TOC和 SO_4^{2-} 含量进行了回归分析(图2)。结果发现, H_2/CO_2 营养型产甲烷菌的丰度值与土壤TOC之间存在极显著正相关关系,而与土壤 SO_4^{2-} 含量之间存在极显著负相关关系。乙酸营养型产甲烷菌丰度值与TOC和 SO_4^{2-} 含量之间的回归方程均未达到显著水平。甲基营养型产甲烷菌丰度值与土壤TOC之间存在显著负相关关系,而与土壤 SO_4^{2-} 含量之间存在显著正相关关系。

将各营养型产甲烷菌丰度值取自然对数后,分析其与产甲烷速率之间的相互关系(图3)。结果发现,产甲烷速率与 H_2/CO_2 营养型产甲烷菌丰度值存在显著的正线性关系,与乙酸营养型产甲烷菌丰度值之

的线性方程没有达到显著水平;而与甲基营养型产甲烷菌丰度值之间存在极显著的负相关。

3 讨论

人工围垦造田的土地利用方式促使滨海土壤的理化性质发生了显著改变^[10-11],这种利用方式会深刻影响该地区湿地土壤的产甲烷过程。本试验结果表明,围垦稻田中产甲烷速率均值达到 $13.8 \text{ ng CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,是自然滩涂湿地的3.3倍,说明围垦造田工程诱发了土壤甲烷的大量排放,这可能与土壤理化性质的变化密切相关。其中,围垦促使土壤的电导率和 SO_4^{2-} 离子浓度显著下降以及围垦后农耕种稻导致土壤TOC含量增加,是导致滨海湿地甲烷产生速率增加的主要原因。一般认为,滨海湿地土壤环境中存在的高浓度 SO_4^{2-} 离子会强烈抑制产甲烷过程^[21],其原因是土壤中的硫酸盐还原菌在与产甲烷菌竞争电子供体时具有明显优势^[22];且滨海湿地表层土壤受到潮汐冲

表3 产甲烷速率与土壤理化性质之间的回归方程
Table 3 Regression relationship between CH_4 production potential(y) and soil characteristics(x)

土壤性质 Soil properties	回归方程 Regression equation	决定系数 R^2	P值 PValue
TOC	$y=4.9771\ln x+4.08$	0.826	<0.01
TN	$y=0.001x^2-0.026x+1.089$	0.175	0.52
NH_4^+ + NO_3^-	$y=0.116x^2+3.486x-1.278$	0.718	<0.05
SO_4^{2-}	$y=-317.7\ln x+1078.1$	0.810	<0.01
$mcrA$ 拷贝数	$y=0.154x-0.133$	0.877	<0.01

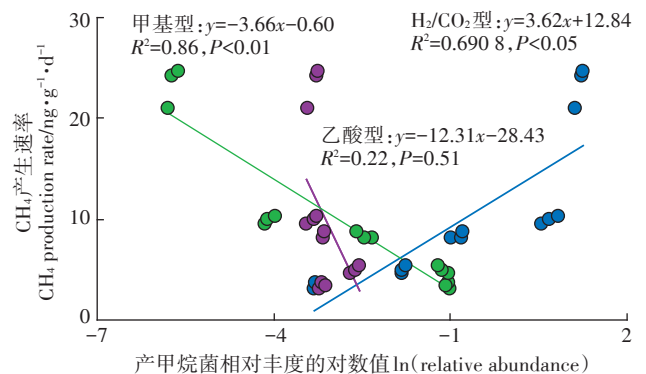


图3 产甲烷速率与各营养型产甲烷菌相对丰度自然对数值的相关性

Figure 3 Relationships between the CH_4 production rate and $\ln(\text{relative abundance of acetotrophic, hydrogenotrophic and facultative methanogens})$

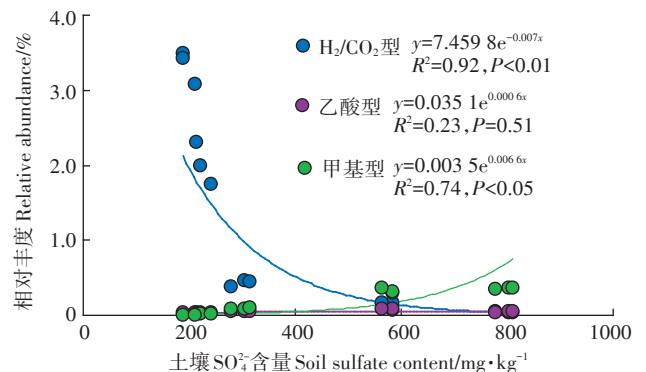
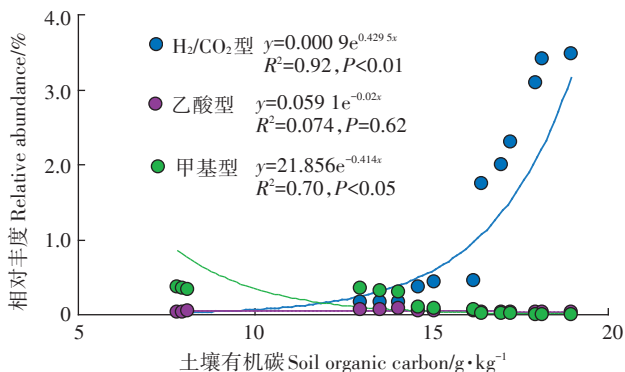


图2 不同营养型产甲烷菌丰度与土壤理化性质的相关性分析

Figure 2 Relationship between the relative abundance of three methanogen groups and soil characteristics

外力作用的影响,土壤有机物及电子供体普遍缺乏,这更加剧了硫酸盐还原菌对产甲烷菌的底物竞争性抑制。另一方面,围垦稻田位于海堤之内,不再受海水潮汐作用的影响,土壤盐分总浓度和 SO_4^{2-} 离子显著下降;并且受种稻、施肥、耕作等农业措施的强烈影响,土壤性质发生显著改变,表现为TOC、TN和活性氮显著增加,对产甲烷过程具有重要的促进作用。

本试验定量PCR结果发现,产甲烷菌功能基因 $mcrA$ 拷贝数为 $2.4 \times 10^6 \sim 1.443 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$,随着趋陆方向和围垦年限增长而显著增加,说明功能基因 $mcrA$ 数量增加是产甲烷速率增大的微生物学机理之一。Yuan等^[23]报道,在苏北滨海湿地中产甲烷速率与产甲烷菌的16S rRNA基因拷贝数呈显著正相关,与本试验结果一致。高通量测序结果发现,产甲烷菌16S rRNA基因的相对丰度随着趋陆方向和围垦年限增长而数量级水平增加,其与功能基因 $mcrA$ 的变化趋势完全相同,且与产甲烷速率显著正相关。可见,滩涂湿地围垦改造为稻田后,提高了产甲烷菌的绝对数量和相对丰度,这可能与土壤TOC增加、 SO_4^{2-} 离子下降密切相关。

根据电子底物利用和代谢途径的差异,产甲烷过程分为 H_2/CO_2 营养型、乙酸营养型和甲基营养型途径,它们对产甲烷速率的贡献随着环境因素的变化而各异^[15-18]。已有研究发现, H_2/CO_2 和乙酸营养型途径是淡水湿地产甲烷过程的两种主要途径,理论上对总甲烷产生量的贡献达到90%以上^[24]。本试验发现,乙酸营养型产甲烷菌的相对丰度在不同采样点中处于同一数量级,差异不大;而 H_2/CO_2 营养型产甲烷菌相对丰度随着趋陆方向而数量级水平增加,是产甲烷菌总相对丰度值发生分异的主要贡献者。在滨海湿地中 H_2/CO_2 和乙酸等底物更多地被硫酸盐还原菌利用,而不是产甲烷菌。所以这两类营养型产甲烷菌被强烈抑制,不是光滩湿地和芦苇湿地的主要产甲烷过程。而在围垦稻田中,耕作层在人工施肥、水稻根系生长等因素影响下,土壤TOC及活性有机碳含量明显增加,为 H_2/CO_2 营养型和乙酸营养型产甲烷菌提供了丰富的电子底物,促进了产甲烷过程。在本试验区域内,主要表现为对 H_2/CO_2 营养型产甲烷菌的刺激作用。进一步分析发现, H_2/CO_2 营养型产甲烷菌主要包括3个属,其中以甲烷细菌属(*Methanobacterium*)为主,是 H_2/CO_2 营养型产甲烷菌相对丰度发生分异的主要贡献者。各采样点中甲基营养型产甲烷菌的相对丰度以光滩湿地为最高,且占产甲烷菌总相对丰度的

81%。说明近岸滨海湿地中甲基营养型产甲烷菌是产甲烷过程的主要贡献者。已有研究发现,甲基营养型产甲烷菌可以利用甲胺类、甲硫醇类和甲醇等C1甲基化合物产生甲烷,而硫酸盐还原菌不能利用这类甲基化合物,对甲基营养型产甲烷菌不会产生底物性抑制作用^[14]。因而在 SO_4^{2-} 含量丰富的滨海湿地中,C1甲基化合物歧化作用是产甲烷过程的主要途径^[25]。进一步分析发现,本试验中甲基营养型产甲烷菌主要包括2个属,其中以甲烷叶菌属(*Methanolobus*)为主,是甲基营养型产甲烷菌相对丰度发生分异的主要贡献者。

综上所述,围垦种稻的土地利用方式改变了土壤的理化性质,促进了产甲烷过程。围垦稻田中产甲烷菌的数量大幅度增加,是产甲烷速率增加的主要原因。其中 H_2/CO_2 营养型产甲烷菌是产甲烷菌总量发生变异的主要贡献者。

4 结论

(1)滨海滩涂湿地围垦改造为稻田的土地利用方式,显著降低了土壤盐分总浓度和 SO_4^{2-} 离子浓度,促进了耕层土壤的产甲烷速率。

(2)滩涂湿地围垦为稻田后,产甲烷菌的数量大幅度增加,且随着种稻年限的增长而显著增加;其中, H_2/CO_2 营养型产甲烷菌相对丰度大幅增加是产甲烷菌总量发生变异的主要原因。

致谢:在本试验的野外采样过程中,上海崇明东滩湿地自然保护区给予了大力支持和协助,在此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] IPCC. Summary for policymakers[R]//Climate change 2014: Impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: Global and sectoral aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2014: 1-32.
- [2] 宋文质, 王少彬, 苏维瀚, 等. 我国农田土壤的主要温室气体 CO_2 , CH_4 , N_2O 排放研究[J]. 环境科学, 1996, 17(1): 85-88.
SONG Wen-zhi, WANG Shao-bin, SU Wei-han, et al. Agricultural activities and emissions of greenhouse gases in China region[J]. *Environmental Science*, 1996, 17(1): 85-88.
- [3] Rodhe H. A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect[J]. *Science*, 1990, 248(4960): 1217-1219.
- [4] Sun Z, Sun W, Tong C, et al. China's coastal wetlands: Conservation history, implementation efforts, existing issues and strategies for future improvement[J]. *Environment International*, 2015, 79: 25-41.
- [5] 许鑫王豪, 赵一飞, 邹欣庆, 等. 中国滨海湿地 CH_4 通量研究进展[J]. 自然资源学报, 2015, 30(9): 1594-1605.

- XU Xin-wang-hao, ZHAO Yi-fei, ZOU Xin-qing, et al. Advances in the research on methane emission of coastal saline wetlands in China [J]. *Journal of Natural Resources*, 2015, 30(9):1594-1605.
- [6] 宫健, 崔育倩, 谢文霞, 等. 滨海湿地CH₄排放的研究进展[J]. 资源科学, 2018, 40(1):173-184.
- GONG Jian, CUI Yu-qian, XIE Wen-xia, et al. Advances in research on methane emissions of coastal wetlands[J]. *Resources Science*, 2018, 40(1):173-184.
- [7] 杨红霞, 王东启, 陈振楼, 等. 长江口潮滩湿地-大气界面碳通量特征[J]. 环境科学学报, 2006, 26(4):667-673.
- YANG Hong-xia, WANG Dong-qi, CHEN Zhen-lou, et al. Characteristics of carbon fluxes through intertidal flat wetland-atmosphere interface of Yangtze estuary[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(4):667-673.
- [8] 侯颖, 李红, 赵敏, 等. 从湿地到农田: 围垦对生态系统碳排放的影响[J]. 应用生态学报, 2017, 28(8):2517-2526.
- HOU Ying, LI Hong, ZHAO Min, et al. Effects of reclamation on ecosystem carbon emission: Wetland conversion to cropland[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(8):2517-2526.
- [9] 林黎, 崔军, 陈学萍, 等. 滩涂围垦和土地利用对土壤微生物群落的影响[J]. 生态学报, 2014, 34(4):899-906.
- LIN Li, CUI Jun, CHEN Xue-ping, et al. Effects of reclamation on tidal flat and land use on soil microbial community[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(4):899-906.
- [10] Laudicina V A, Hurtado M D, Badalucco L, et al. Soil chemical and biochemical properties of a salt-marsh alluvial Spanish area after long-term reclamation[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2009, 45:691-700.
- [11] Agboola J I, Ndimele P E, Odunuga S, et al. Ecological health status of the Lagos wetland ecosystems: Implications for coastal risk reduction[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2016, 183:73-81.
- [12] 汪青, 刘敏, 侯立军, 等. 崇明东滩湿地CO₂、CH₄和N₂O排放的时空差异[J]. 地理研究, 2010, 29(5):935-946.
- WANG Qing, LIU Min, HOU Li-jun, et al. Characteristics and influencing factors of CO₂, CH₄ and N₂O emissions from Chongming eastern tidal flat wetland[J]. *Geographical Research*, 2010, 29(5):935-946.
- [13] 刘少文, 殷敏, 褚光, 等. 长江中下游稻区不同水旱轮作模式和氮肥水平对稻田CH₄排放的影响[J]. 中国农业科学, 2019, 52(14):2484-2499.
- LIU Shao-wen, YIN Min, CHU Guang, et al. Effects of various paddy-upland crop rotations and nitrogen fertilizer levels on CH₄ emission in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(14):2484-2499.
- [14] 王洁, 袁俊吉, 刘德燕, 等. 滨海湿地甲烷产生途径和产甲烷菌研究进展[J]. 应用生态学报, 2016, 27(3):993-1001.
- WANG Jie, YUAN Jun-jie, LIU De-yan, et al. Research progresses on methanogenesis pathway and methanogens in coastal wetlands[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(3):993-1001.
- [15] Parkes R J, Brock F, Banning N, et al. Changes in methanogenic substrate utilization and communities with depth in a salt-marsh, creek sediment in southern England[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2012, 96:170-178.
- [16] García-Maldonado J Q, Bebout B M, Celis L B, et al. Phylogenetic diversity of methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*) gene and methanogenesis from trimethylamine in hypersaline environments[J]. *International Microbiology*, 2012, 15:33-41.
- [17] Zeleke J, Sheng Q, Wang J G, et al. Effects of *Spartina alterniflora* invasion on the communities of methanogens and sulfate-reducing bacteria in estuarine marsh sediments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4:1-13.
- [18] SHE Chen-xing, TONG Cuan. Vertical distribution of methanogen community structures in *Phragmites australis* marsh soil in the Min River estuary[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(17):5299-5308.
- [19] Cui J, Liu C, Li Z L, et al. Long-term changes in topsoil chemical properties under centuries of cultivation after reclamation of coastal wetlands in the Yangtze Estuary, China[J]. *Soil and Tillage Research*, 2012, 123:50-60.
- [20] 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, 2000.
- LU Ru-kun. Methods of soil agricultural chemistry analysis[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [21] 全川, 柳铮铮, 曾从盛, 等. 模拟SO₄²⁻沉降对河口潮汐湿地甲烷排放通量的影响[J]. 中国环境科学, 2010, 30(3):302-308.
- TONG Chuan, LIU Zheng-zheng, ZENG Cong-sheng, et al. Effects of simulated sulfate deposition on CH₄ fluxes from tidal wetland in the Min River estuary[J]. *China Environmental Science*, 2010, 30(3):302-308.
- [22] Gauci V, Matthews E, Dise N, et al. Sulfur pollution suppression of the wetland methane source in the 20th and 21st centuries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(34):12583-12587.
- [23] Yuan J J, Ding W X, Liu D Y, et al. Shifts in methanogen community structure and function across a coastal marsh transect: Effects of exotic *Spartina alterniflora* invasion[J]. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep18777
- [24] Conrad R, Claus P. Contribution of methanol to the production of methane and its ¹³C-isotopic signature in anoxic rice field soil[J]. *Biogeochemistry*, 2005, 73:381-393.
- [25] 曾从盛, 王维奇, 全川. 不同电子受体及盐分输入对河口湿地土壤甲烷产生潜力的影响[J]. 地理研究, 2008, 27(6):1321-1330.
- ZENG Cong-sheng, WANG Wei-qi, TONG Chuan, et al. Effects of different exogenous electron acceptors and salt import on methane production potential of estuarine marsh soil[J]. *Geographical Research*, 2008, 27(6):1321-1330.