

# FACE 对水稻土产甲烷古菌丰度的影响\*

许 静<sup>1,2</sup> 严 陈<sup>3</sup> 林 毅<sup>1†</sup> 钟文辉<sup>3</sup> 林先贵<sup>2</sup> 朱建国<sup>2</sup> 贾仲君<sup>2†</sup>

(1 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

(2 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

(3 南京师范大学化学与材料科学学院, 南京 210046)

## EFFECT OF ELEVATED CO<sub>2</sub> ON ABUNDANCE OF METHANOARCHAEA IN PADDY SOIL

Xu Jing<sup>1,2</sup> Yan Chen<sup>3</sup> Lin Yi<sup>1†</sup> Zhong Wenhui<sup>3</sup> Lin Xiangui<sup>2</sup> Zhu Jianguo<sup>2</sup> Jia Zhongjun<sup>2†</sup>

(1 Life Science School, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

(2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(3 School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

关键词 FACE; 产甲烷古菌; 稻田土壤; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 Q75; Q89 文献标识码 A

全球气温逐年增高引起了人们对温室气体的关注。甲烷的增温贡献率仅次于 CO<sub>2</sub>, 是第二大温室气体, 在 100 年的时间尺度下, 甲烷的增温效应是 CO<sub>2</sub> 的 20 倍<sup>[1-3]</sup>。据报道, 大气甲烷浓度的年均增加率约为 1%<sup>[4-5]</sup>。稻田是大气甲烷的重要源, 年排放量占全球甲烷排放总量的 7% ~ 17%<sup>[6]</sup>。我国稻谷产量世界第一, 水稻种植面积仅次于印度, 占全球种植面积的 22%<sup>[7]</sup>。产甲烷古菌是稻田甲烷排放的唯一生物源, 深刻理解未来大气 CO<sub>2</sub> 浓度升高下, 稻田土壤产甲烷古菌的数量变化规律, 可能为制定合理的稻田甲烷减排措施提供一定的理论依据。

产甲烷古菌是一类利用简单物质合成甲烷并获得能量的严格厌氧古菌, 广泛分布于各种厌氧环境<sup>[6-8]</sup>。稻田淹水条件下, 随着氧气、硝酸盐、三价铁和硫酸盐等电子受体依次被还原, 产甲烷古菌以 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub> 或乙酸作为底物, 产生甲烷, 是稻田土壤中有有机微生物降解过程中的关键环节<sup>[9]</sup>。已有报道表明稻田 50% 以上的甲烷排放源于植物光合产

物所形成的甲烷<sup>[10]</sup>。大量研究表明大气 CO<sub>2</sub> 浓度升高促进植物生长, 导致植物根系分泌物增多<sup>[11-12]</sup>, 可能进一步影响土壤产甲烷古菌群落结构。然而, 原位田间条件下产甲烷古菌丰度对大气 CO<sub>2</sub> 浓度升高的响应规律仍不清楚。本文利用中国 FACE 平台, 采用实时荧光定量 PCR 技术, 研究了 2009 年和 2010 年典型水稻生长期大气 CO<sub>2</sub> 浓度升高下, 不同施肥 (高氮 HN 和低氮 LN) 处理对产甲烷古菌数量的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样地概况

中国 FACE 平台位于江苏省江都市小记镇良种场 (32°35'N, 119°02'E), 研究对象是稻-麦轮作农田生态系统。试验区域年降水量为 918 ~ 978 mm, 年平均气温约为 15℃, 年日照时间大于 2 000 h。土壤类型为下位砂姜土。FACE 圈 (CO<sub>2</sub> 浓度较对照大气升高 200 μmol mol<sup>-1</sup>) 和对照圈 (简称 Ambient 圈)

\* 中国科学院项目百人计划项目 (KZCX2 - YW - BR - 06) 资助

† 通讯作者, E-mail: linyiahau@126.com; jia@issas.ac.cn

作者简介: 许 静 (1987—), 男, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向为土壤微生物分子生态学。Tel: 13915965830, E-mail: gnijux@163.com

收稿日期: 2011 - 11 - 13; 收到修改稿日期: 2012 - 02 - 22

各设 3 个田间重复,3 个圈在田间随机分布。FACE 圈与 FACE 圈之间,FACE 圈与 Ambient 圈之间的间隔 > 90 m,以减少 CO<sub>2</sub> 释放对其他圈的影响。FACE 圈设计为直径 12.5 m 的正八角形,通过 FACE 圈周围管道向圈中心喷射高纯度 CO<sub>2</sub> 气体,田间目标 CO<sub>2</sub> 浓度控制误差为 10%。每个圈分为高施氮量(HN, N 250 kg hm<sup>-2</sup>)和低施氮量(LN, N150 kg hm<sup>-2</sup>)。2009 年与 2010 年田间管理一致,高施氮处理为 6 月 16 日施 N90 kg hm<sup>-2</sup>,6 月 24 日施 N60 kg hm<sup>-2</sup>,8 月 1 日施 N100 kg hm<sup>-2</sup>;低施氮处理为 6 月 16 日施 N90 kg hm<sup>-2</sup>,8 月 1 日施 N60 kg hm<sup>-2</sup>。水分管理为 6 月 17 日~7 月 11 日保持浅水层(约 5 cm),7 月 12 日~8 月 5 日进行多次轻搁田,8 月 6 日至收割前 10 日进行间隙灌溉,收获前 10 日断水。适时进行病虫害防治,保证作物生长发育正常。

### 1.2 样品采集与保存

分别从 3 个 FACE 圈和 3 个 Ambient 圈采集非根际土(地下 2~10 cm)和根际土,每个圈内的土壤样品直接用于下游分析。本实验中根际土的定义为距离水稻根系 0~2 cm 的土壤。采样过程中将整株水稻连根带土的挖出,抖落非根际土壤后,尽量采集靠近水稻根系 2 cm 以内的土壤作为根际土。2009 年样品采集分别在分蘖期(7 月 15 日)、扬花期(9 月 2 日)和成熟期(10 月 17 日)进行。2010 年样品采集分别在拔节期(8 月 4 日)、灌浆期(9 月 16 日)和成熟期(10 月 26 日)进行。样品采集后贮存于 4℃ 冷库中。2010 年 9 月 16 日水稻处于扬花期与灌浆期交替之间。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 土壤微生物总 DNA 提取** 称取 0.5 g 低温保存的土壤样品,根据 Fast DNA SPIN Kit For Soil 试剂盒的操作步骤,在 Fast-Prep FP120 核酸提取仪快速垂直振荡裂解细胞,提取土壤微生物基因组总 DNA,土壤微生物基因组总 DNA 贮存于零下 20℃ 冰箱备用。

**1.3.2 实时荧光定量 PCR 扩增** 稻田土壤产甲烷古菌利用 *mcrA* 功能基因引物定量,上游引物为 MLf (5'-GGTGGTGTMGATTACACARTAYGCWACAGC-3') 下游引物为 MLr (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3')<sup>[13]</sup>。荧光实时定量 PCR 的反应体系为 20 μl,包括 2 μl DNA 模板、10 μl SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>,上、下游引物各 0.2 μl (20 μmol L<sup>-1</sup>) 和 7.6 μl 的灭菌双蒸水。荧光实时定量 PCR 扩增反应程序为:首先

95℃ 变性 30 s;然后 95℃ 变性 10 s、55℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 30 s、80℃ 采集荧光信号 5 s 共 40 个循环;随后进行溶解曲线分析,以 65℃ 为起点,以 0.5℃ 循环递增,每个循环 5 s,至最终温度达到 95℃ 结束,每个样品设置 3 个重复。荧光定量 PCR 标准曲线的绘制:产甲烷古菌 *mcrA* 基因的 PCR 产物纯化后,连接于 pEASY-T3 载体上,转化至大肠杆菌中,挑选出白色阳性克隆提取质粒,并测序确定插入片段为 *mcrA* 基因。对含有目的片段的质粒进行浓度测定和梯度稀释,观察不同浓度的质粒模板 DNA 对扩增效率及荧光吸收强度的影响,最终测得相关系数 R<sup>2</sup> 为 0.999,扩增效率 E 为 83.0%,满足绝对定量要求。

### 1.4 数据统计分析

采用 SPSS 16.0 进行多因素方差分析和成对 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 FACE 处理对产甲烷古菌数量的影响

大气 CO<sub>2</sub> 浓度升高条件下,水稻根际和非根际土壤中产甲烷古菌丰度变化规律与氮肥施用水平相关。在 2009 年水稻生长季,对于非根际土壤,如图 1A 所示,HN-FACE 条件下,产甲烷古菌在扬花期和成熟期分别达到最大和最小值,相对于 Ambient 处理分别下降了 24.3% 和 2.4%;LN-FACE 条件下,产甲烷古菌在分蘖期和成熟期分别达到最大和最小值,相对于 Ambient 处理分别上升了 86.6% 和 5.9%。对于根际土壤,如图 1B 所示,HN-FACE 条件下,产甲烷古菌在成熟期和扬花期分别达到最大和最小值,相对于 Ambient 处理分别下降了 9.6% 和 9.4%;LN-FACE 条件下,产甲烷古菌在成熟期和分蘖期分别达到最大和最小值,相对于 Ambient 分别上升了 22.9% 和 25.6%。

根际与非根际土壤中产甲烷古菌数量表现出了一定的季节性变化规律。对于非根际土壤,2009 年无论高氮或低氮 Ambient 处理,扬花期产甲烷古菌数量最高,但 FACE 处理下,高氮和低氮的产甲烷古菌数量最高分别为扬花期和分蘖期。对于根际土壤,除低氮 Ambient 处理外,其他所有条件下产甲烷古菌的丰度在水稻成熟期达到最高值。

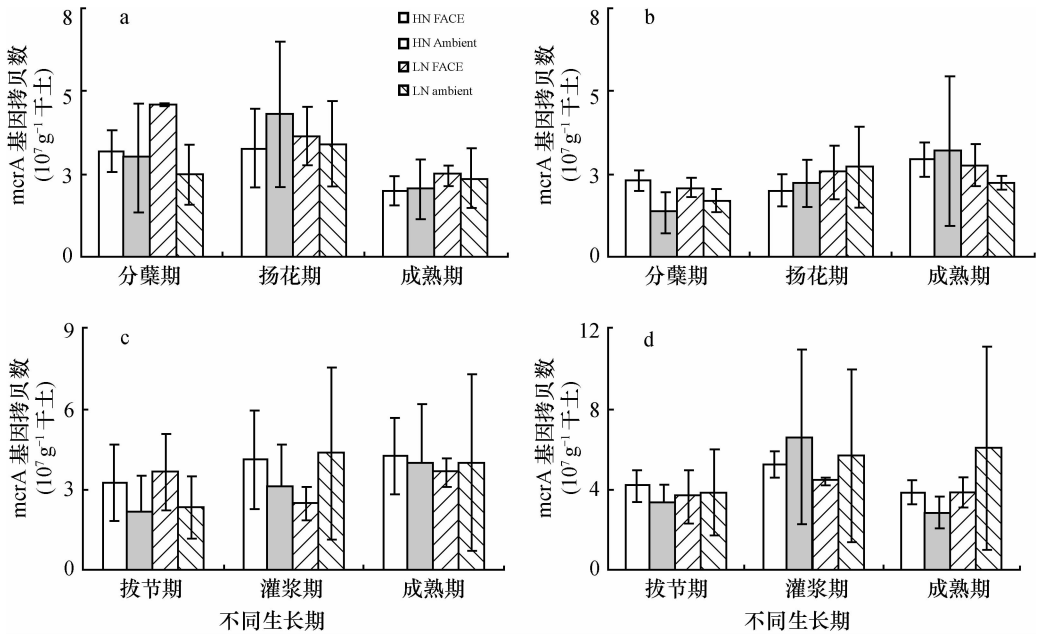


图1 稻田土壤产甲烷古菌功能基因(*mcrA*)拷贝数随水稻生长期的变化

注:A和B分别为2009年非根际土和根际土;C和D分别为2010年非根际土和根际土;HN和LN分别表示高施氮量( $250 \text{ kg hm}^{-2}$ )和低施氮量( $150 \text{ kg hm}^{-2}$ )处理

在2010年水稻生长季,对于非根际土壤,如图1C所示,HN-FACE条件下,产甲烷古菌在成熟期和拔节期分别达到最大值和最小值,相对于Ambient处理分别上升了6.4%和51.4%;LN-FACE条件下,产甲烷古菌在拔节期和灌浆期分别达到最大值和最小值,相对于Ambient处理分别上升55.2%和下降42.9%。对于根际土壤,如图1D所示,HN-FACE条件下,产甲烷古菌在灌浆期和成熟期分别达到最大值和最小值,相对于Ambient处理分别下降20%和上升35.4%;LN-FACE条件下,产甲烷古菌在灌浆期和拔节期分别达到最大值和最小值,相对于Ambient处理分别下降了22.3%和5.1%。

对于非根际土壤,2010年无论高氮或低氮Ambient处理,灌浆期产甲烷古菌数量最高,但FACE处理下,高氮和低氮的产甲烷古菌数量最高分别为成熟期和灌浆期。对于根际土壤,除低氮Ambient处理外,其他所有条件下产甲烷古菌丰度在水稻灌浆期达到最高值。

多因子方差分析表明,2009年的分蘖期根际土壤中, $\text{CO}_2$ 的浓度对产甲烷古菌的丰度有显著影响( $F = 8.581, p < 0.05$ )。其他水稻生长时期 $\text{CO}_2$ 、氮肥、以及氮肥和 $\text{CO}_2$ 的相互作用对产甲烷古菌的丰度无显著影响。

## 2.2 2009年和2010年FACE处理后产甲烷古菌百分比的变化趋势

与Ambient处理相比,大气 $\text{CO}_2$ 浓度升高条件下土壤产甲烷古菌在不同水稻生长期的变化趋势不同,而且受氮肥施用量的影响。如图2A所示,2009年水稻分蘖期根际土壤与非根际土壤中产甲烷古菌丰度均有所增加,LN-FACE处理条件下的非根际土壤产甲烷古菌的丰度增幅高达86.6%。成对 $t$ 检验表明,在LN-FACE处理和HN-FACE处理条件下,产甲烷古菌百分比数有极显著差异(LN-FACE,  $p < 0.01$ ; HN-FACE,  $p < 0.01$ ),但是LN-FACE处理对非根际土壤中产甲烷古菌的丰度有较强的促进作用,HN-FACE处理似乎对根际土的促进作用更显著。尽管其他所有处理对产甲烷古菌丰度的影响均未达到统计显著性,但施用不同浓度氮肥后产甲烷古菌丰度出现了一个规律性的变化趋势。在2009年和2010年FACE条件下,如图2所示,LN处理促进了产甲烷古菌的丰度,而HN处理对产甲烷古菌有一定的抑制作用。

从整个百分比变化趋势图来看,非根际土壤中的产甲烷古菌丰度增加趋势较稳定。根际土壤中产甲烷古菌的丰度变化浮动大,例如,2009年和2010年成熟期的高低氮处理,两年的处理结果相反。同时,水稻生长可能对产甲烷古菌丰度也产生了一定的影响,FACE条件下分蘖期对产甲烷古菌的丰度有

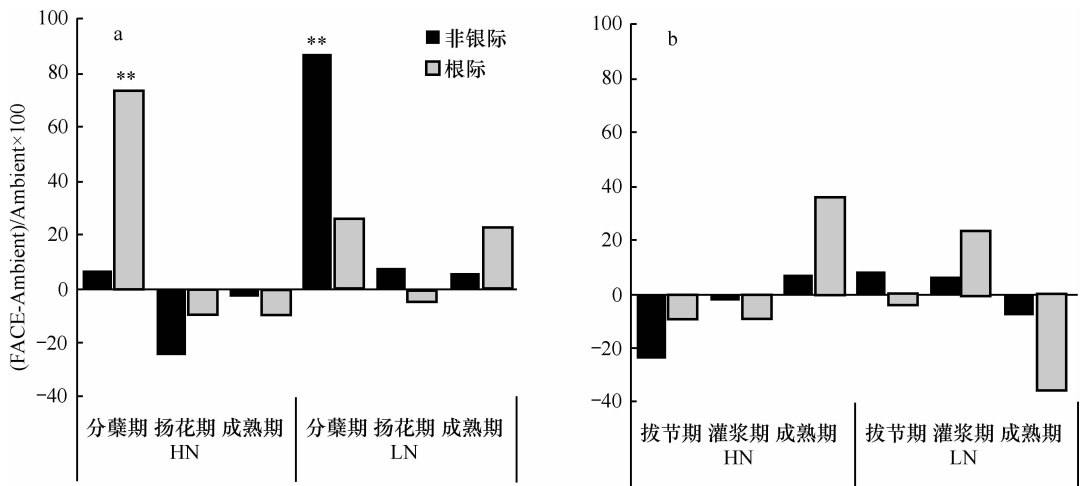


图2 产甲烷古菌的百分比变化趋势

注:1) A 和 B 分别表示 2009 年和 2010 年的百分比结果, 2)  $(FACE-Ambient)/Ambient \times 100$ ; FACE 与 Ambient 处理的产甲烷古菌拷贝数之差占 Ambient 处理产甲烷古菌拷贝数的百分比。2010 年灌浆期与扬花期较接近。\*\* 表示  $p < 0.01$ ; HN 和 LN 分别表示高施氮量 ( $250 \text{ kg hm}^{-2}$ ) 和低施氮量 ( $150 \text{ kg hm}^{-2}$ ) 处理

较明显的促进,而在成熟期的变化规律不一。此外,同一处理的土壤中,产甲烷古菌的丰度表现出一定的变化规律,如 LN 处理下的非根际土壤中,产甲烷古菌丰度随着水稻生长期呈现降低的趋势。

### 3 讨 论

大气  $\text{CO}_2$  浓度升高条件下,水稻植株的根系分泌物相应增加,其降解产物如  $\text{CO}_2$  和乙酸作为底物可能促进产甲烷古菌的生长,进而影响土壤产甲烷古菌的丰度。本实验表明,FACE 条件下可能促进分蘖期产甲烷古菌的丰度。大量研究表明大气  $\text{CO}_2$  浓度升高促进植物生长,导致植物根系分泌物增多<sup>[11-12]</sup>,这些易分解的有机物可能作为底物前体刺激了产甲烷古菌的生长,并可能进一步影响土壤产甲烷古菌群落结构。然而,影响稻田土壤产甲烷古菌生理生态功能的因素较多,如温度<sup>[14-16]</sup>,土壤电子受体铁、锰、硝酸盐含量<sup>[17-20]</sup>和土壤通气状况<sup>[21-22]</sup>等。本实验的结果表明 FACE 对扬花期、灌浆期和成熟期的产甲烷古菌有一定的抑制作用。这可能是由于分蘖期的淹水管理为产甲烷古菌创造了一个厌氧的环境,有利于产甲烷古菌的生长,而灌浆期和成熟期土壤含水量远低于分蘖期淹水稻田土壤,导致土壤通透性增加,氧气浓度上升,大量的根系分泌物和易分解有机质刺激了异氧微生物的生长,可能间接抑制了产甲烷古菌的生理活性及其丰度。此外,有研究表明土壤的活性有机碳含

量和 C/N 决定土壤产甲烷的能力<sup>[23]</sup>。在水稻生长后期,水稻受到大气  $\text{CO}_2$  浓度升高的促进,吸收了土壤中大量的 C、N、P,同时根系的分泌物有所减少,这些均可能抑制了产甲烷古菌的生长<sup>[24]</sup>。与根际土壤相比,非根际土壤受到的抑制作用较小,其原因可能是非根际土一直处于氧气亏缺状态,产甲烷古菌受水稻根系泌氧的影响较小<sup>[24]</sup>。LN 条件下 FACE 对产甲烷古菌促进作用高于 Ambient,而 HN 条件下这种促进作用较弱<sup>[25]</sup>,这可能是 FACE-LN 条件下稻田中的 C/N 变大,为产甲烷古菌提供了更多的碳源。

也有报道表明 FACE 对稻田甲烷排放没有促进作用,原因是稻田覆水将大气  $\text{CO}_2$  浓度与产甲烷古菌隔绝,不能直接影响产甲烷古菌微生物群落,且土壤中的  $\text{CO}_2$  浓度通常高于大气  $\text{CO}_2$  浓度<sup>[26-27]</sup>。然而,大气  $\text{CO}_2$  浓度升高对稻田生态系统的影响大多通过间接途径完成。日本和中国的 FACE 实验数据表明, $\text{CO}_2$  浓度增高 15% 会显著提高水稻的产量和生物量,水稻生物量增加将会直接或间接影响土壤中养分的供应和元素循环,以及与其相关的各种功能微生物<sup>[28-30]</sup>。例如,本实验表明高氮肥施用在一定程度上可能抑制产甲烷古菌的生长,降低产甲烷古菌的数量。已有大量研究表明氮肥施用可能促进甲烷氧化细菌的生长,降低稻田甲烷排放量,但氮肥施用影响甲烷氧化细菌的机理仍不清楚<sup>[24]</sup>。氮肥施用后通过硝化作用产生硝态氮,可能提升了土壤氧化还原电位,间接抑制了产甲烷古菌的生

长,降低了稻田甲烷排放量。已有的田间试验数据表明稻田产甲烷古菌丰度具有较大的季节性变化规律<sup>[31]</sup>,在一定程度上与本试验的年际变化规律一致。复杂土壤环境中影响产甲烷古菌丰度的因素较多,未来随着技术手段的不断进步,将有可能进一步准确揭示稻田土壤产甲烷过程对全球变化的适应与响应。

## 参考文献

- [ 1 ] 王大力,朱立民. CO<sub>2</sub>倍增对稻田 CH<sub>4</sub>排放的影响. 植物生态学报, 1999, 23(5):451—457
- [ 2 ] Galand P E, Saarnio S, Fritze H, et al. Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 42(3):441—449
- [ 3 ] Shindell D T, Faluvegi G, Koch D M, et al. Improved attribution of climate forcing to emissions. Science, 2009, 326: 716—718
- [ 4 ] Cheng W, Chander K, Inubushi K. Effects of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on methane production and emission from submerged soil microcosm. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2000, 58(1):339—347
- [ 5 ] Wahlen M. The global methane cycle. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 1993, 21:407—426
- [ 6 ] Liu Y C, Whitman W B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1125: 171—189
- [ 7 ] 陶站. 我国不同地区稻田甲烷排放量及控制措施研究. 农业环境保护, 1998, 17(1):1—7
- [ 8 ] Whitman W B, Bowen T L, Boone D R. The methanogenic bacteria. The Prokaryotes, 2006, 3:165—207
- [ 9 ] Banning N, Brock F, Fry J C, et al. Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. Environmental Microbiology, 2005, 7(7):947—960
- [ 10 ] Watanabe A, Takeda T, Kimura M. Evaluation of origins of CH<sub>4</sub> carbon emitted from rice paddies. Journal of Geophysical Research, 1999, 104: 23 623—23 629
- [ 11 ] Kim H Y, Lieffering M, Miura S, et al. Growth and nitrogen uptake of CO<sub>2</sub>-enriched rice under field conditions. New Phytologist, 2001, 150(2):223—229
- [ 12 ] Li Z, Yagi K, Sakai H, et al. Influence of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen nutrition on rice plant growth, soil microbial biomass, dissolved organic carbon and dissolved CH<sub>4</sub>. Plant and Soil, 2004, 258(1):81—90
- [ 13 ] Juottonen H, Galand P, Yrjala K. Detection of methanogenic Archaea in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene. Research in Microbiology, 2006, 157(10):914—921
- [ 14 ] Sass R, Fisher F, Turner F, et al. Methane emission from rice fields as influenced by solar radiation, temperature and straw incorporation. Global Biogeochemical Cycles, 1991, 5(4): 335—350
- [ 15 ] Schütz H, Seiler W, Conrad R. Influence of soil temperature on methane emission from rice paddy fields. Biogeochemistry, 1990, 11(2):77—95
- [ 16 ] Wang B, Neue H, Samonte H. Factors controlling diel patterns of methane emission via rice. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 1999, 53(3):229—235
- [ 17 ] Furukawa Y, Inubushi K. Feasible suppression technique of methane emission from paddy soil by iron amendment. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2002, 64(1):193—201
- [ 18 ] Corton T, Bajita J, Grospe F, et al. Methane emission from irrigated and intensively managed rice fields in Central Luzon (Philippines). Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2000, 58(1): 37—53
- [ 19 ] Klüber H D, Conrad R. Effects of nitrate, nitrite, NO and N<sub>2</sub>O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 25(3):301—318
- [ 20 ] Scheid D, Stubner S, Conrad R. Effects of nitrate and sulfate amendment on the methanogenic populations in rice root incubations. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(3):309—315
- [ 21 ] Yan X, Yagi K, Akiyama H, et al. Statistical analysis of the major variables controlling methane emission from rice fields. Global Change Biology, 2005, 11(7):1 131—1 141
- [ 22 ] Lu W, Chen W, Duan B, et al. Methane emissions and mitigation options in irrigated rice fields in southeast China. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2000, 58(1):65—73
- [ 23 ] 丁维新,蔡祖聪. 氮肥对土壤甲烷产生的影响. 农业环境科学学报, 2003, 22(3):380—383
- [ 24 ] Conrad R. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs advances in agronomy, Advances in Agronomy, 2007, 96:1—63
- [ 25 ] 王友屹,韩琳,史奕,等. FACE 对水稻土产甲烷古菌和甲烷氧化菌种群及其活性的影响. 土壤, 2006, 38(6):768—773
- [ 26 ] Cheng W, Inubushi K, Hoque M M, et al. Effect of elevated CO<sub>2</sub> on soil bubble and CH<sub>4</sub> emission from a rice paddy: A test by <sup>13</sup>C pulse-labeling under free-air CO<sub>2</sub> enrichment. Geomicrobiology Journal, 2008, 25:396—403
- [ 27 ] Cheng W, Yagi K, Xu H, et al. Influence of elevated concentrations of atmospheric CO<sub>2</sub> on CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> entrapped in rice-paddy soil. Chemical Geology, 2005, 218(1/2):15—24
- [ 28 ] Yang L, Huang J, Yang H, et al. Seasonal changes in the effects of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) on dry matter production and distribution of rice (*Oryza sativa* L.). Field Crops Research, 2006, 98(1):12—19
- [ 29 ] Kim H, Lieffering M, Kobayashi K, et al. Seasonal changes in the effects of elevated CO<sub>2</sub> on rice at three levels of nitrogen supply: A free air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) experiment. Global Change Biology, 2003, 9(6): 826—837
- [ 30 ] Shimono H, Okada M, Yamakawa Y, et al. Rice yield enhancement by elevated CO<sub>2</sub> is reduced in cool weather. Global Change Biology, 2008, 14(2): 276—284
- [ 31 ] Watanabe T, Kimura M, Asakawa S. Dynamics of methanogenic archaeal communities based on rRNA analysis and their relation to methanogenic activity in Japanese paddy field soils. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(11): 2 877—2 887