

DOI: 10.11766/trxb202107050347

朱小莉, 黄琼, 宋开付, 马静, 张广斌, 徐华. 常年淹水稻田甲烷产生潜力和产生途径的季节变化[J]. 土壤学报, 2023, 60(2): 503–511.
ZHU Xiaoli, HUANG Qiong, SONG Kaifu, MA Jing, ZHANG Guangbin, XU Hua. Seasonal Variations in Methane Production Potential and Methanogenic Pathway in a Permanently Flooded Rice Field[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(2): 503–511.

常年淹水稻田甲烷产生潜力和产生途径的季节变化*

朱小莉^{1, 2}, 黄琼^{1, 2}, 宋开付^{1, 2}, 马静¹, 张广斌^{1†}, 徐华¹

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 甲烷的减排问题已成为各国政府和科研人员关注的焦点。稻田是温室气体甲烷的重要排放源, 甲烷产生是排放的前提条件, 主要有乙酸发酵和 CO₂/H₂ 还原两条途径。常年淹水稻田甲烷排放高, 减排潜力大, 但关于这类稻田甲烷产生途径的季节变化规律尚少见报道。于四川省资阳市的常年淹水稻田, 采集水稻 4 个重要生育期(分蘖期、孕穗期、抽穗期、成熟期)的新鲜土样, 通过室内厌氧培养试验观测了甲烷产生潜力, 并采用稳定性碳同位素方法和氟甲烷(CH₃F, 2%)抑制法, 量化 CO₂/H₂ 产甲烷的碳同位素分馏系数($\alpha_{\text{CO}_2/\text{CH}_4}$), 从而定量评估乙酸产甲烷途径的相对贡献率($f_{\text{乙酸}}$)。结果表明: 添加 CH₃F 显著降低甲烷产生, 甲烷产生潜力在成熟期最大, 变化范围为 3.22~12.71 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; 产生 CH₄ 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值($\delta^{13}\text{CH}_4$) 为 -66.83‰~-59.62‰, 较添加 CH₃F 的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 显著偏正(-90.83‰~-82.26‰); $\alpha_{\text{CO}_2/\text{CH}_4}$ 在分蘖期最大, 孕穗期最小, 变化范围为 1.064~1.076; $f_{\text{乙酸}}$ 由分蘖期的 54%~61%急剧下降至孕穗期的 30%~35%, 在成熟期又上升至 54%~61%。进一步分析发现: 甲烷产生潜力的季节变化与土壤溶解性有机碳(DOC)含量的季节变化显著正相关, $f_{\text{乙酸}}$ 的季节变化与土壤乙酸含量的季节变化显著正相关。综上, 常年淹水稻田的甲烷产生潜力和产生途径均存在明显的季节变化, 且分别主要受土壤 DOC 和乙酸含量的影响。

关键词: 常年淹水稻田; 碳同位素分馏; 抑制剂氟甲烷; 乙酸产甲烷; 溶解性有机碳

中图分类号: S153 **文献标志码:** A

Seasonal Variations in Methane Production Potential and Methanogenic Pathway in a Permanently Flooded Rice Field

ZHU Xiaoli^{1, 2}, HUANG Qiong^{1, 2}, SONG Kaifu^{1, 2}, MA Jing¹, ZHANG Guangbin^{1†}, XU Hua¹

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] The mitigation of methane (CH₄) emission has long been the focus of governments and researchers worldwide. Rice fields are an important source of CH₄ emission, and CH₄ production is the precondition of CH₄ emission. It is mainly produced by acetate fermentation and CO₂/H₂ reduction. Substantial CH₄ emissions are observed from the permanently

* 国家自然科学基金项目(41877325)、中国科学院青年创新促进会项目(2018349)和国家重点研发计划项目(2017YFD0300105)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41877325), the Youth Innovation Promotion Association of the Chinese Academy of Sciences (No. 2018349) and the National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0300105)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: gbzhang@issas.ac.cn

作者简介: 朱小莉(1994—), 女, 四川达州人, 博士研究生, 主要从事稻田甲烷产生机理的研究。E-mail: xlzhu@issas.ac.cn

收稿日期: 2021-07-05; 收到修改稿日期: 2021-09-30; 网络首发日期(www.cnki.net): 2022-01-07

flooded rice fields, thus leaving a high mitigation potential of emission. However, reports on the seasonal variation of the methanogenic pathway in these rice fields are limited. 【 Method 】 Fresh soil samples from four rice growth stages (tillering stage, booting stage, heading stage, and ripening stage) were collected from a permanently flooded rice field in Ziyang City, Sichuan Province, China. The CH₄ production potential (MPP) was observed through anaerobic incubation experiments. Both stable carbon isotope technique and methyl fluoride (CH₃F, 2%) inhibition method were used to quantify the carbon isotopic fractionation factor for the conversion of CO₂ to CH₄ ($\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$), as well as to quantitatively estimate the relative contribution of acetate-dependent methanogenesis (f_{acetate}). 【 Result 】 The addition of CH₃F significantly decreased the CH₄ production, and the MPP reached the highest value at the ripening stage, ranging from 3.22 to 12.71 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. The $\delta^{13}\text{C}$ -value of produced CH₄ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$) varied from -66.83‰ to -59.62‰, which was much more positive than that of produced CH₄ with CH₃F addition (from -90.83‰ to -82.26‰). The $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ reached its maximum and minimum values at tillering and booting stages, respectively, which was between 1.064 and 1.076. The f_{acetate} (30%–61%) decreased sharply from 54%–61% at the tillering stage to 30%–35% at the booting stage and then increased to 54%–61% at the ripening stage. Further analysis showed that the seasonal variation of MPP was positively correlated with the variation of soil dissolved organic carbon (DOC) content, and the seasonal variation of f_{acetate} was significantly related to variations of acetate content. 【 Conclusion 】 Distinct seasonal variations were observed in both MPP and methanogenic pathways of the permanently flooded rice fields, which was mainly affected by soil DOC content and acetate content, respectively.

Key words: Permanently flooded rice field; Carbon isotopic fractionation; Inhibitor methyl fluoride; Acetate-dependent methanogenesis; Dissolved organic carbon

甲烷是一种重要的温室气体，它在百年尺度上的全球增温潜能是二氧化碳的 28 倍^[1]。2019 年全球大气甲烷平均浓度已经达到 1.877 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ，较人类工业化以前的水平增加了 160%^[2]。稻田是大气甲烷重要的人为排放源，全球稻田每年约排放 30 Tg 甲烷，贡献了人为排放总量的 8%^[3]。稻田甲烷的排放是甲烷产生、氧化和传输三个过程共同作用的结果。产生是排放的基础，稻田甲烷主要由乙酸发酵和 CO₂/H₂ 还原产生^[4-5]，由于它们几乎同时发生且影响因素复杂，有关精准量化这两个主要产生途径的相对贡献率的深入研究尚值得进一步探索。

已有研究结果表明，稻田甲烷产生途径存在明显的季节变化^[6]，并受水分管理^[7-8]、秸秆施用^[9-10]、水稻种植^[11-12]、土壤类型^[13-14]、温度^[15-16]等诸多因素的影响。例如，Zhang 等^[7]研究了我国江苏稻麦轮作系统甲烷产生途径的季节变化及其对田间水分管理的响应，发现在水稻生长初期，乙酸产甲烷途径占主导地位，而在水稻生长后期，CO₂/H₂ 还原产甲烷途径变得更重要；与持续淹水相比，间歇灌溉使乙酸产甲烷途径的相对贡献率 $f_{\text{乙酸}}$ 降低了 8%~10%；Conrad 等^[9]研究了秸秆施用类型对中国浙江单季稻田土壤甲烷产生途径的影响，发现施用不同秸秆不会显著改变甲烷产生途径的时间变化模式：

无论是往土壤中添加水稻（C3 植物）秸秆还是玉米（C4 植物）秸秆，一开始主要是 CO₂/H₂ 还原产甲烷的相对贡献率更大，随后乙酸发酵产甲烷变得越来越重要，最后 CO₂/H₂ 还原产甲烷途径的相对贡献率再次增大；Liu 等^[16]报道了温度对意大利稻田土壤甲烷产生途径的影响，发现在 25 °C 和 35 °C 时，甲烷总是由乙酸发酵和 CO₂/H₂ 还原两种途径结合产生；而在更高的温度（45 °C）条件下，甲烷仅通过 CO₂/H₂ 还原途径产生。

常年淹水稻田不同于稻麦轮作和常规单季稻田，它不仅在水稻生长季有淹水层，在非水稻生长季也保持淹水状态。全年淹水为其产甲烷创造了良好的厌氧条件，它在稻季大部分时期都有非常可观的甲烷排放^[17]，其甲烷排放通量远远高于其他类型稻田^[18]，且冬季休闲期的甲烷排放通量也较高^[19]。在我国，常年淹水稻田主要分布在西南地区，其面积只占全国稻田面积的 12%，但甲烷排放量却高达全国稻田甲烷排放总量的 45%^[20]。常年淹水稻田的甲烷产生途径可能不同于其他类型的稻田，但目前还缺乏这方面的报道。因此，通过观测常年淹水稻田的甲烷产生潜力和产生途径，旨在更加全面地理解其甲烷排放过程，从而为全球稻田甲烷减排提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验区概况

试验田位于四川省资阳市雁江区雁江镇响水村 (30°05'N, 104°34'E), 该区域年平均气温 16.8 °C, 年平均降水量 965.8 mm。种植模式为单季稻+冬休闲, 水分管理方式为全年淹水。土壤类型为侏罗纪遂宁组母质发育红棕紫泥, 有机碳含量 21.67 g·kg⁻¹, 全氮含量 1.98 g·kg⁻¹, pH 7.90, 土壤有机碳同位素组成值-21.23‰。

1.2 试验设计

供试水稻品种川优 6203, 于 2019 年 3 月 30 日育秧、4 月 25 日移栽、9 月 15 日收割。稻季所施氮肥为尿素, 按照基追肥 2 : 1 : 1 的比例分成 3 次施入, 施用时间分别为 4 月 21 日、5 月 4 日和 5 月 23 日, 总施肥量为 283 kg·hm⁻²。磷肥 (过磷酸钙: 600 kg·hm⁻²)、钾肥 (氯化钾: 63 kg·hm⁻²)、锌肥 (一水合硫酸锌: 15 kg·hm⁻²) 均作为基肥一次性施用。水稻收割后秸秆全部移除。

于水稻分蘖期 (5 月 30 日)、孕穗期 (6 月 27 日)、抽穗期 (8 月 5 日) 和成熟期 (8 月 19 日) 采集稻田新鲜土壤进行厌氧培养试验, 并在培养前测定土壤溶解性有机碳 (DOC) 和乙酸含量。每次培养试验均设置 CH₃F (添加乙酸产甲烷抑制剂氟甲烷) 和 CK (不添加抑制剂) 2 个处理, 每处理 5 个重复。首先称取 20 g 新鲜土壤于 100 mL 培养瓶中, 加入无菌无氧去离子水将其制成泥浆 (水土质量比 1 : 1), 密封瓶口。将所有装有泥浆的培养瓶抽真空之后用高纯氮气冲洗, 重复此过程至少 6 次以排尽瓶内残留的 CH₄ 和 O₂。随后往培养瓶中注射 2% 浓度 CH₃F 作为 CH₃F 处理^[9-10]; 其余不添加 CH₃F, 作为 CK 处理。将所有培养瓶密封, 放入 25 °C 培养箱中暗箱培养。于培养后 1 h 和 50 h 收集培养瓶中的气体测定 CH₄ 和 CO₂ 浓度, 以计算甲烷产生潜力。于培养结束 (144 h) 时测定 CH₄ 和 CO₂ 的稳定性碳同位素组成, 用于计算乙酸发酵和 CO₂/H₂ 还原产甲烷途径的相对贡献率。每次取气结束均重新密封瓶口。

1.3 样品测定分析

CH₄ 和 CO₂ 气体浓度用带有火焰离子检测器 (FID) 的安捷伦气相色谱仪 (Agilent 7890B) 测定,

柱箱温度为 60 °C, 检测器温度为 300 °C, 以氮气为载气, 以流速 45 mL·min⁻¹ 的氢气为燃气, 以流速 400 mL·min⁻¹ 的空气作为助燃气体。CH₄ 和 CO₂ 气体的稳定性碳同位素组成用带有全自动预 GC 浓缩接口 (PreCon) 的同位素质谱仪 (MAT253plus, Thermo Fisher Scientific.) 分析^[21]。土壤 DOC 用 0.5 mol·L⁻¹ K₂SO₄ 溶液提取, 水土比 4 : 1, 浸提液用总有机碳/总氮分析仪 (multi N/C 3100, Analytik Jena) 进行分析。土壤乙酸用超纯水提取, 水土比 4 : 1, 浸提液用安捷伦高效液相色谱仪 (Agilent HPLC 1260) 测定。土壤有机碳的稳定性碳同位素组成用元素分析-同位素质谱分析联用仪 (Flash- 2000 Delta V ADVANTAGE, Thermo Fisher Scientific.) 测定。

1.4 数据处理

土壤甲烷产生潜力用以下公式进行计算^[6]:

$$P = dc / dt \times V / MV \times MW / W \times 273 / T \quad (1)$$

式中, P 为土壤甲烷产生潜力, 单位 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; dc/dt 为单位时间内培养瓶中 CH₄ 浓度发生的变化, 单位 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 本研究以培养后 1 h 和 50 h 作为始末时间点; V 为培养瓶内的气体体积, 单位 L; MV 为标准状态下气体的摩尔体积, 单位 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$; MW 为 CH₄ 的摩尔质量, 单位 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; W 为干土质量, 单位 g; T 为培养温度, 单位 K。

$\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 的获得采用氟甲烷抑制法, 可通过添加 CH₃F 的土壤厌氧培养产生的 CO₂ 和 CH₄ 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值进行推算:

$$\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)} = (\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} + 1000) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4(\text{CO}_2)} + 1000) \quad (2)$$

土壤甲烷产生途径相对贡献的量化建立在其稳定性碳同位素组成精准观测的基础上。首先, 它假设甲烷产生总量 (CH₄(总)) 为乙酸发酵产生的甲烷 (CH₄(乙酸)) 和 CO₂/H₂ 还原产生的甲烷 (CH₄(CO₂)) 之和, 即:

$$\text{CH}_4(\text{总}) = \text{CH}_4(\text{乙酸}) + \text{CH}_4(\text{CO}_2) \quad (3)$$

那么, 乙酸对稻田土壤甲烷产生总量的相对贡献 ($f_{\text{乙酸}}$) 为^[11]:

$$f_{\text{乙酸}} = \text{CH}_4(\text{乙酸}) / (\text{CH}_4(\text{乙酸}) + \text{CH}_4(\text{CO}_2)) \times 100\% \quad (4)$$

根据碳同位素质量守恒, 可得^[11]:

$$\delta^{13}\text{CH}_4(\text{总}) = \delta^{13}\text{CH}_4(\text{乙酸}) \times f_{\text{乙酸}} + \delta^{13}\text{CH}_4(\text{CO}_2) \times (1 - f_{\text{乙酸}}) \quad (5)$$

式中, $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{总})$ 为土壤总体产生的 CH_4 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{乙酸})$ 为乙酸发酵途径产生的 CH_4 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{CO}_2)$ 为 CO_2/H_2 还原途径产生的 CH_4 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值。

其中, $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{总})$ 可以通过测定土壤厌氧培养产生的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 获得; $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{乙酸})$ 本研究尚未测定, 参考以往结果, 取 $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{乙酸}) = -43\text{‰} \sim -37\text{‰}$ ^[22-23]; $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{CO}_2)$ 可根据土壤厌氧培养产生的 CO_2 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值 ($\delta^{13}\text{CO}_2$) 进行推算^[22-23]:

$$\delta^{13}\text{CH}_4(\text{CO}_2) = (\delta^{13}\text{CO}_2 + 1000) / \alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)} - 1000 \quad (6)$$

平均值和标准差的计算用 Microsoft Excel 2013 完成。用 SPSS 20 软件对数据进行方差分析和相关性分析, 差异显著性比较采用 Duncan 法。图表绘制用 Origin 2017 软件完成。

2 结果

2.1 甲烷产生潜力的季节变化

常年淹水稻田甲烷产生潜力的季节变化如图 1 所示。甲烷产生潜力随着水稻 4 个生育期的进行总体呈上升趋势。CK 处理的土壤甲烷产生潜力的变化范围为 $3.22 \sim 12.71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。其中, 成熟期土壤的甲烷产生潜力显著高于分蘖期、孕穗期、抽穗期土壤的甲烷产生潜力 ($P < 0.05$), 分别约为它们的 4 倍、3 倍和 5 倍; 而分蘖期、孕穗期、抽穗期 3 个生育期的土壤甲烷产生潜力之间无显著差异。 CH_3F 处理的土壤甲烷产生潜力为 $0.10 \sim 2.48 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 4 个生育期的甲烷产生潜力之间均存在显著差异 ($P < 0.05$)。 CH_3F 处理的土壤甲烷产生潜力显著低于 CK 处理 ($P < 0.05$), 说明 CH_3F 抑制了土壤甲烷的产生。

2.2 土壤厌氧培养产生的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 和 $\delta^{13}\text{CO}_2$

水稻 4 个生育期土壤厌氧培养产生的 CH_4 和 CO_2 的 $\delta^{13}\text{C}$ 如图 2 所示。CK 和 CH_3F 的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 变

化范围分别为 $-66.83\text{‰} \sim -59.62\text{‰}$ 和 $-90.83\text{‰} \sim -82.26\text{‰}$ (图 2a)。CK 处理的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 在 4 个生育期均无显著差异; CH_3F 处理的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 只在分蘖期和孕穗期有显著差异 ($P < 0.05$)。CK 和 CH_3F 的 $\delta^{13}\text{CO}_2$ 季节变化趋势相似(图 2b), 总体上 $\delta^{13}\text{CO}_2$ 值逐渐增大, 至抽穗期达到最大, 随后减小, 变幅范围分别为 $-21.52\text{‰} \sim -17.09\text{‰}$ (平均值为 -19.90‰) 和 $-23.16\text{‰} \sim -19.56\text{‰}$ (平均值为 -21.78‰)。

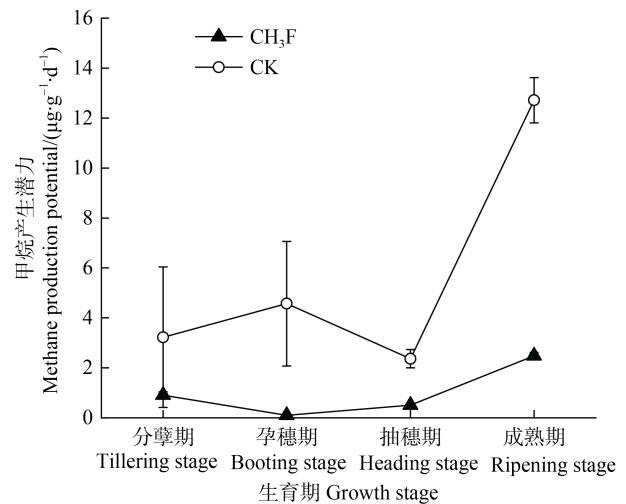


图 1 甲烷产生潜力的季节变化

Fig. 1 Seasonal variation of methane production potential

2.3 $\alpha(\text{CO}_2/\text{CH}_4)$ 和 $f_{\text{乙酸}}$ 的季节变化

常年淹水稻田 $\alpha(\text{CO}_2/\text{CH}_4)$ 和 $f_{\text{乙酸}}$ 的季节变化如图 2 所示。随着水稻生育期的进行, $\alpha(\text{CO}_2/\text{CH}_4)$ 总体呈减小趋势, 在分蘖期最大, 孕穗期最小; 分蘖期、抽穗期、成熟期土壤 $\alpha(\text{CO}_2/\text{CH}_4)$ 之间的差异不大, 在统计学上没有达到显著水平。4 个生育期的 $\alpha(\text{CO}_2/\text{CH}_4)$ 变化范围为 $1.064 \sim 1.076$ (图 2c)。而 $f_{\text{乙酸}}$ 则随着水稻生育期的进行呈现出先降低后升高的季节变化(图 2d)。当 $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{乙酸}) = -37\text{‰}$ 时, 4 个生育期的 $f_{\text{乙酸}}$ 变化范围为 $30\% \sim 54\%$; 当 $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{乙酸}) = -43\text{‰}$ 时, 4 个生育期的 $f_{\text{乙酸}}$ 变化范围为 $35\% \sim 61\%$ 。 $f_{\text{乙酸}}$ 在分蘖期和成熟期最大, 这两个生育期土壤的 $f_{\text{乙酸}}$ 没有显著差异。而在孕穗期和抽穗期, 土壤 $f_{\text{乙酸}}$ 较小, 其中孕穗期 $f_{\text{乙酸}} (< 40\%)$ 显著低于分蘖期和成熟期 ($P < 0.05$)。分蘖期和成熟期土壤 $f_{\text{乙酸}}$ 较孕穗期土壤 $f_{\text{乙酸}}$ 大 $24\% \sim 27\%$, 而较抽穗期土壤 $f_{\text{乙酸}}$ 大 $10\% \sim 11\%$ 。

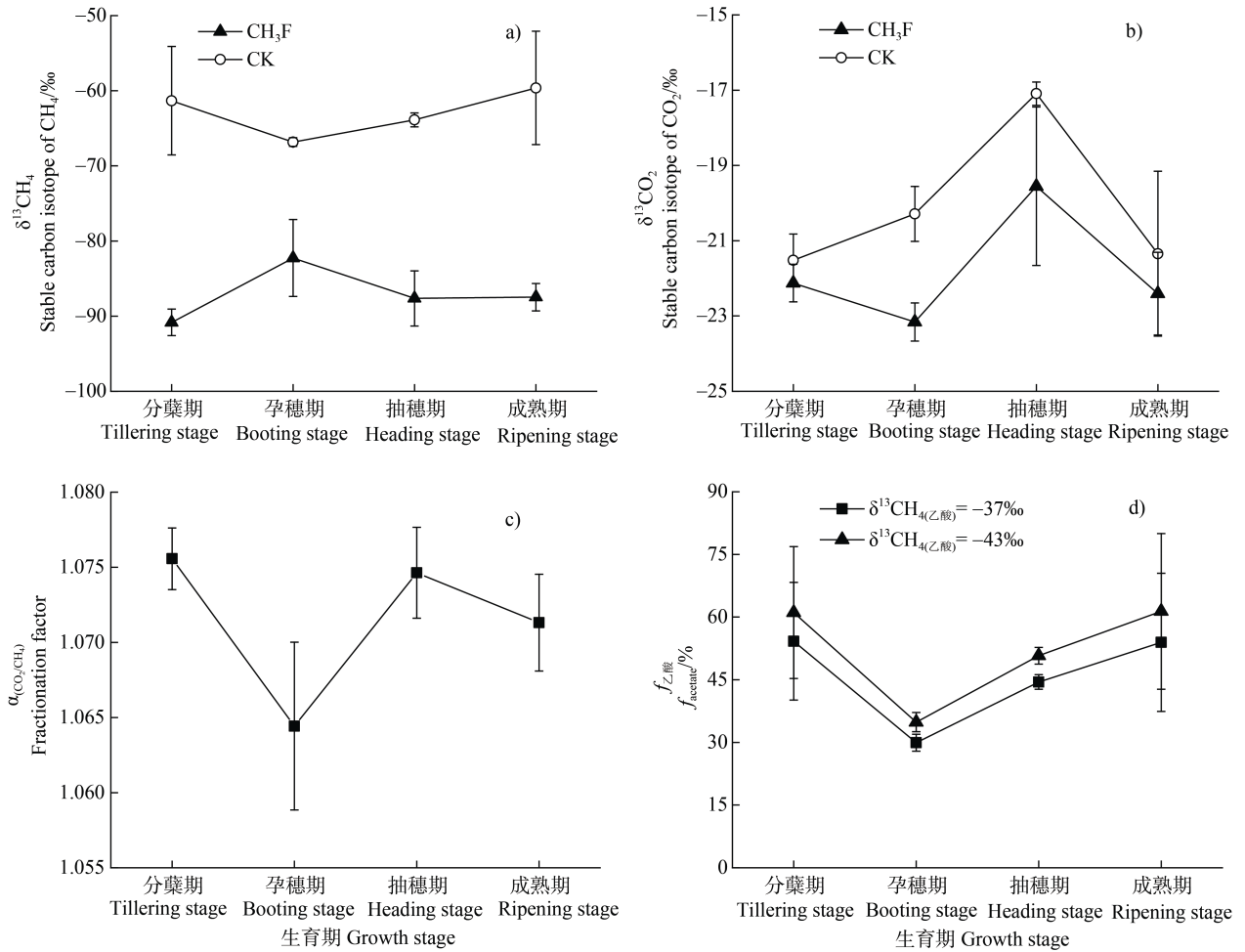


图2 土壤厌氧培养产生的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 、 $\delta^{13}\text{CO}_2$ 、 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 和 $f_{\text{乙酸}}$ 的季节变化

Fig. 2 The $\delta^{13}\text{CH}_4$ and $\delta^{13}\text{CO}_2$ produced in soil anaerobic incubation and seasonal variation of $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ and f_{acetate}

2.4 DOC 和乙酸的季节变化及其与甲烷产生潜力、 $f_{\text{乙酸}}$ 的关系

常年淹水稻田土壤 DOC 和乙酸含量的季节变化如图 3 所示。土壤 DOC 含量随水稻生育期的进行呈升高的趋势，变化范围为 $224.4 \sim 315.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。4 个生育期的土壤 DOC 含量之间均存在显著差异，成熟期土壤 DOC 含量显著高于其他生育期 ($P < 0.05$)。而土壤乙酸含量随水稻生育期的进行呈先下降后上升的变化模式，变化范围为 $56.40 \sim 160.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。4 个生育期的土壤乙酸含量之间均存在显著差异，分蘖期和成熟期的乙酸含量显著高于孕穗期和抽穗期 ($P < 0.05$)。相关分析结果表明 (表 1)，资阳常年淹水稻田在稻季的甲烷产生潜力与土壤 DOC 含量呈显著正相关 ($P < 0.01$)，但与乙酸含量无显著相关性； $f_{\text{乙酸}}$ 与土壤 DOC 含量无显著相关性，但与乙酸含量呈显著正相关 ($P < 0.01$)。

3 讨论

稻田甲烷的产生是在严格厌氧的条件下，土壤中的产甲烷古菌利用主要的产甲烷基质 CO_2/H_2 、乙酸产生甲烷的过程^[24]。它受到土壤理化性质^[25]、微生物^[26]、水分管理^[8]、肥料施用^[27]、温度^[16]等诸多因素的影响。随着水稻的生长，常年淹水稻田的甲烷产生潜力总体上趋于增大，成熟期产生的甲烷显著多于其他生育期 (图 1)。这主要与水稻生长过程中根系分泌物、脱落物的增加有关。根系分泌物、脱落物是土壤 DOC 的重要来源^[28]。它们越来越多地被释放到土壤中，使得土壤 DOC 含量也随之呈现增加的趋势 (图 3)，为产甲烷提供了丰富的基质。研究表明，湿地土壤的甲烷产生潜力与土壤 DOC 含量之间存在显著的正相关关系^[29]。此外，早稻生长

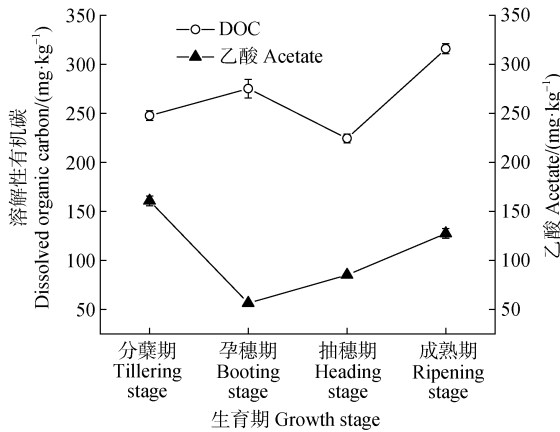


图3 土壤 DOC 和乙酸含量的季节变化

Fig. 3 Seasonal variation of DOC and acetate content in the soil

表1 DOC、乙酸含量与甲烷产生潜力、 $f_{\text{乙酸}}$ 间的相关系数Table 1 Correlation coefficients between DOC content, acetate content, methane production potential and f_{acetate}

	甲烷产生潜力 Methane production potential	$f_{\text{乙酸}} (\delta^{13}\text{C}_{\text{乙酸}} = -37\text{‰})$ $f_{\text{acetate}} (\delta^{13}\text{C}_{\text{acetate}} = -37\text{‰})$	$f_{\text{乙酸}} (\delta^{13}\text{C}_{\text{乙酸}} = -43\text{‰})$ $f_{\text{acetate}} (\delta^{13}\text{C}_{\text{acetate}} = -43\text{‰})$
溶解性有机碳 Dissolved organic carbon	0.910 **	0.135	0.141
乙酸 Acetate	0.295	0.681 **	0.669 **

注: **表示 1% 显著水平。Note: ** represents a significance at 1% level.

甲烷产生的过程中会发生碳同位素分馏^[23]。通常用同位素分馏系数来表征分馏程度的大小。乙酸转化为甲烷的分馏程度 ($\epsilon_{(\text{乙酸}/\text{CH}_4)}$) 和 CO_2 转化为甲烷的分馏程度 ($\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$) 存在明显差异。在应用稳定性碳同位素自然丰度法研究稻田甲烷产生途径时, $\epsilon_{(\text{乙酸}/\text{CH}_4)}$ 相对比较稳定, 一般为 -21‰ ^[32], 而 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 波动较大, 常见的取值为 1.045 和 1.060^[33]。 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 会受到土壤类型、产甲烷菌、 H_2 浓度、温度等因素的影响。例如: Sugimoto 和 Wada^[5] 发现日本稻田土壤的 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 为 1.049, Chidthaisong 等^[34] 测得美国稻田土壤的 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 为 1.052, 而 Conrad^[35] 测得意大利稻田土壤的 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 为 1.072; Games 等^[33] 通过纯培养试验发现巴氏甲烷八叠球菌的 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 为 1.045, 而相同条件下甲烷杆菌 M.o.H. 菌株的 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 为 1.061; Valentine 等^[36] 发现在 H_2 供应浓度降低时, 马尔堡甲烷嗜热杆菌纯培养物的 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 相对增大: H_2 分压为 80 000 Pa 和 310 Pa 时的 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 分别为 1.031 和 1.064; Fey 等^[15] 发现

季的甲烷产生速率与土壤 DOC 浓度显著正相关^[30]。相似地, 本研究也发现常年淹水稻田在水稻 4 个生育期的甲烷产生潜力与土壤 DOC 含量的季节变化模式高度一致 (表 1)。另一方面, 水稻栽培期间田间温度的升高也可能使甲烷产生潜力趋于增大。丁维新和蔡祖聪^[31] 认为在温度较高时, 土壤中的产甲烷菌优势菌为能够同时利用乙酸和 CO_2/H_2 的甲烷八叠球菌, 因而土壤具有较高的产甲烷能力; 而温度较低时土壤中的产甲烷菌优势菌则变成只能利用乙酸这一种产甲烷基质的甲烷毛菌, 所以土壤产甲烷能力相对变弱。遗憾的是, 本研究并未进行产甲烷菌相关的分析。

意大利稻田土壤的 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 随厌氧培养温度的增加而减小: 10 °C 时为 1.083, 25 °C 时为 1.079, 37 °C 时为 1.076, 50 °C 时为 1.073。本研究通过添加 2% 浓度的 CH_3F 来抑制乙酸产甲烷^[9-10], 根据式 (2) 求得常年淹水稻田 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 在稻季的变化范围为 1.064~1.076, 与以往报道的 $\alpha_{(\text{CO}_2/\text{CH}_4)}$ 结果类似。

在自然生态系统中, 产甲烷基质乙酸的浓度往往可能会很低而无法对其进行同位素分析^[37]。而在我们的研究中, 未添加 CH_3F 的土样在厌氧培养结束时的乙酸浓度也基本上低于检测限, 因而无法测定乙酸的碳同位素组成。Krüger 等^[22] 测定出意大利稻田孔隙水的 $\delta^{13}\text{C}_{\text{乙酸}} = (-20.70\text{‰} \pm 2.31\text{‰}) \sim (-16.17\text{‰} \pm 0.30\text{‰})$, 通过假定 $\epsilon_{(\text{乙酸}/\text{CH}_4)} = -21\text{‰}$ ^[32] 得到 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4(\text{乙酸})} = -43\text{‰} \sim -37\text{‰}$ 。尽管本研究的土壤有机碳 $\delta^{13}\text{C}$ 值 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{有机碳}} = -21.23\text{‰}$) 较 Krüger 等^[22] ($\delta^{13}\text{C}_{\text{有机碳}} = -26.7\text{‰}$) 的大 5‰, 但仍假设 $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4(\text{乙酸})} = -43\text{‰} \sim -37\text{‰}$ 以定量估算 $f_{\text{乙酸}}$, 主要出于以下两方面考虑。一方面, $-43\text{‰} \sim -37\text{‰}$ 已被诸多研究引用^[5, 7, 11-12, 15, 23], 获得的 $f_{\text{乙酸}}$ 结果便于与以往的进

行比较。另一方面, Sugimoto 和 Wada^[5]发现, 尽管他们的稻田土壤 $\delta^{13}\text{C}_{\text{有机碳}}$ 与 Blair 和 Carter^[38]的海洋沉积物 $\delta^{13}\text{C}_{\text{有机碳}}$ 相差 19%, 但由二者得到的乙酸产生的 $\delta^{13}\text{CH}_4$ 值却非常一致, 这表明土壤 $\delta^{13}\text{C}_{\text{有机碳}}$ 值本身对 $\delta^{13}\text{CH}_4(\text{乙酸})$ 的影响可能较小。

总体而言, 常年淹水稻田乙酸对甲烷产生的相对贡献 $f_{\text{乙酸}}$ 为 30%~54% ($\delta^{13}\text{CH}_4(\text{乙酸}) = -37\text{‰}$) 和 35%~61% ($\delta^{13}\text{CH}_4(\text{乙酸}) = -43\text{‰}$) (图 2d), 这与以往稻麦轮作稻田的结果类似。在季节变化趋势上, Krüger 等^[22, 39]的研究认为, 意大利稻田(水稻收获前排水)的乙酸产甲烷主要在水稻生长后期占主导地位, Zhang 等^[8, 40]发现中国稻麦轮作稻田也有相同趋势; Tyler 等^[11]发现美国稻田(水稻收获前排水)的乙酸产甲烷在水稻生长初期更重要; 而本研究的 $f_{\text{乙酸}}$ 在水稻分蘖期和成熟期都较大(图 2d), 这可能与特殊的水分管理有关。常年淹水稻田在水稻休闲期也保持淹水, 使得稻田一直处于严格厌氧条件, 有机质分解积累的乙酸足够满足分蘖期的乙酸产甲烷过程。而成熟期水稻根系分泌物以及衰老和死亡组织脱落物的增加也可能为乙酸产甲烷过程提供丰富的碳源^[41], 导致乙酸的供应水平是影响甲烷产生途径的关键因素^[6]。深入分析发现, 常年淹水稻田乙酸含量在分蘖期和成熟期最大, $f_{\text{乙酸}}$ 的季节变化与相应的乙酸含量的季节变化呈显著正相关(表 1)。此外, 产甲烷途径的相对贡献应该与产甲烷菌群落组成也有一定关系。由于乙酸营养型产甲烷菌利用乙酸产甲烷, 而氢营养型产甲烷菌利用 CO_2 和 H_2 产生甲烷^[24], 因此, 理论上若乙酸营养型产甲烷菌相对丰度及活性比氢营养型产甲烷菌高, 则乙酸对甲烷产生的相对贡献就可能更大, 但相关推测仍需通过后续研究来验证。

4 结 论

常年淹水稻田的甲烷产生潜力和产生途径存在明显的季节变化: 甲烷产生潜力随水稻生育期的进行呈上升趋势, 总体表现为成熟期的显著高于分蘖期、孕穗期和抽穗期; 乙酸产甲烷途径的相对贡献率随水稻生育期的进行呈先降低后升高的变化模式, 即在分蘖期和成熟期较大, 而在孕穗期最小。常年淹水稻田的甲烷产生潜力主要受土壤 DOC 含量的影响, 而土壤乙酸含量显著影响其产甲烷的贡献。

参考文献 (References)

- [1] IPCC. Climate change 2013: The physical science basis[R]. Cambridge, United Kingdom and New York, USA: Cambridge University Press, 2013.
- [2] WMO. Greenhouse gas bulletin: The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2019[R]. <https://library.wmo.int/>, 2020.
- [3] Saunio M, Stavert A R, Poulter B, et al. The global methane budget 2000—2017[J]. Earth System Science Data, 2020, 12 (3): 1561—1623.
- [4] Takai Y. The mechanism of methane fermentation in flooded paddy soil[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1970, 16 (6): 238—244.
- [5] Sugimoto A, Wada E. Carbon isotopic composition of bacterial methane in a soil incubation experiment: Contributions of acetate and CO_2/H_2 [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1993, 57 (16): 4015—4027.
- [6] Cai Z C, Xu H, Ma J. Methane and nitrous oxide emissions from rice-based ecosystems[M]. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 2009. [蔡祖聪, 徐华, 马静. 稻田生态系统 CH_4 和 N_2O 排放[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2009.]
- [7] Zhang G B, Ji Y, Ma J, et al. Intermittent irrigation changes production, oxidation, and emission of CH_4 in paddy fields determined with stable carbon isotope technique[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2012, 52: 108—116.
- [8] Zhang G B, Liu G, Zhang Y, et al. Methanogenic pathway and fraction of CH_4 oxidized in paddy fields: Seasonal variation and effect of water management in winter fallow season[J]. PLoS One, 2013, 8 (9): e73982.
- [9] 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. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00004.
- [10] Ji Y, Liu P F, Conrad R. Change of the pathway of methane production with progressing anoxic incubation of paddy soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2018, 121: 177—184.
- [11] Tyler S C, Bilek R S, Sass R L, et al. Methane oxidation and pathways of production in a Texas paddy field deduced from measurements of flux, $\delta^{13}\text{C}$, and δD of CH_4 [J]. Global Biogeochemical Cycles, 1997, 11 (3): 323—348.
- [12] Bilek R S, Tyler S C, Sass R L, et al. Differences in CH_4 oxidation and pathways of production between rice cultivars deduced from measurements of CH_4 flux and $\delta^{13}\text{C}$ of CH_4 and CO_2 [J]. Global Biogeochemical Cycles, 1999, 13 (4): 1029—1044.
- [13] Yao H, Conrad R. Electron balance during steady-state

- production of CH₄ and CO₂ in anoxic rice soil[J]. *European Journal of Soil Science*, 2000, 51 (3): 369—378.
- [14] Nakagawa F, Yoshida N, Sugimoto A, et al. Stable isotope and radiocarbon compositions of methane emitted from tropical rice paddies and swamps in Southern Thailand[J]. *Biogeochemistry*, 2002, 61 (1): 1—19.
- [15] Fey A, Claus P, Conrad R. Temporal change of ¹³C-isotope signatures and methanogenic pathways in rice field soil incubated anoxically at different temperatures[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2004, 68 (2): 293—306.
- [16] Liu P F, Klose M, Conrad R. Temperature effects on structure and function of the methanogenic microbial communities in two paddy soils and one desert soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, 124: 236—244.
- [17] Jiang C S, Wang Y S, Zheng X H, et al. CH₄ and N₂O emission from a winter-time flooded paddy field in a hilly area of Southwest China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16 (3): 539—544. [江长胜, 王跃思, 郑循华, 等. 川中丘陵区冬灌田甲烷和氧化亚氮排放研究[J]. *应用生态学报*, 2005, 16 (3): 539—544.]
- [18] Zhang G B, Ma J, Yang Y T, et al. Variations of stable carbon isotopes of CH₄ emission from three typical rice fields in China[J]. *Pedosphere*, 2017, 27 (1): 52—64.
- [19] Ma X M, Zhu B, Du Z L, et al. CH₄, CO₂ and N₂O emissions from the year-round flooded paddy field at fallow season[J]. *Journal of Agro-Environmental Science*, 2005, 24 (6): 1199—1202. [马秀梅, 朱波, 杜泽林, 等. 冬水田休闲期温室气体排放通量的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24 (6): 1199—1202.]
- [20] Cai Z C. Research progress on methane emission from rice field in China[J]. *Soils*, 1999, 31 (5): 266—269. [蔡祖聪. 中国稻田甲烷排放研究进展[J]. *土壤*, 1999, 31 (5): 266—269.]
- [21] Cao Y C, Sun G Q, Han Y, et al. Determination of nitrogen, carbon and oxygen stable isotope ratios in N₂O, CH₄, and CO₂ at natural abundance levels by mass spectrometer[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45 (2): 249—258. [曹亚澄, 孙国庆, 韩勇, 等. 大气浓度下 N₂O、CH₄ 和 CO₂ 中氮、碳和氧稳定同位素比值的质谱测定[J]. *土壤学报*, 2008, 45 (2): 249—258.]
- [22] Krüger M, Eller G, Conrad R, et al. Seasonal variation in pathways of CH₄ production and in CH₄ oxidation in rice fields determined by stable carbon isotopes and specific inhibitors[J]. *Global Change Biology*, 2002, 8 (3): 265—280.
- [23] Conrad R, Klose M, Claus P. Pathway of CH₄ formation in anoxic rice field soil and rice roots determined by ¹³C-stable isotope fractionation[J]. *Chemosphere*, 2002, 47 (8): 797—806.
- [24] Conrad R. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs[J]. *Advances in Agronomy*, 2007, 96: 1—63.
- [25] Xu H, Cai Z C, Yagi K. Methane production potentials of rice paddy soils and its affecting factors[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45 (1): 98—104. [徐华, 蔡祖聪, 八木一行. 水稻土 CH₄ 产生潜力及其影响因素[J]. *土壤学报*, 2008, 45 (1): 98—104.]
- [26] Dubey S K, Singh A, Singh R S, et al. Changes in methanogenic population size and CH₄ production potential in response to crop phenology in tropical rice field[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 57: 972—978.
- [27] Xu X, Chen C, Xiong Z Q. Effects of biochar and nitrogen fertilizer amendment on abundance and potential activity of methanotrophs and methanogens in paddy field[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (6): 1517—1527. [许欣, 陈晨, 熊正琴. 生物炭与氮肥对稻田甲烷产生与氧化菌数量和潜在活性的影响[J]. *土壤学报*, 2016, 53 (6): 1517—1527.]
- [28] Kalbitz K, Solinger S, Park J H, et al. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: A review[J]. *Soil Science*, 2000, 165 (4): 277—304.
- [29] Liu D Y, Ding W X, Yuan J J, et al. Substrate and/or substrate-driven changes in the abundance of methanogenic archaea cause seasonal variation of methane production potential in species-specific freshwater wetlands[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (10): 4711—4721.
- [30] Wang C, Lai D Y F, Sardans J, et al. Factors related with CH₄ and N₂O emissions from a paddy field: Clues for management implications[J]. *PLoS One*, 2017, 12 (1): e0169254.
- [31] Ding W X, Cai Z C. Effect of temperature on methane production and oxidation in soils[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14 (4): 604—608. [丁维新, 蔡祖聪. 温度对甲烷产生和氧化的影响[J]. *应用生态学报*, 2003, 14 (4): 604—608.]
- [32] Gelwicks J T, Risatti J B, Hayes J M. Carbon isotope effects associated with acetoclastic methanogenesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60 (2): 467—472.
- [33] Games L M, Hayes J M, Gunsalus R P. Methane-producing bacteria: Natural fractionations of the stable carbon isotopes[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1978, 42 (8): 1295—1297.
- [34] Chidthaisong A, Chin K J, Valentine D L, et al. A comparison of isotope fractionation of carbon and hydrogen from paddy field rice roots and soil bacterial enrichments during CO₂/H₂ methanogenesis[J]. *Geochimica*

- et *Cosmochimica Acta*, 2002, 66 (6): 983—995.
- [35] Conrad R. Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: A review and a proposal[J]. *Organic Geochemistry*, 2005, 36 (5): 739—752.
- [36] Valentine D L, Chidthaisong A, Rice A, et al. Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2004, 68 (7): 1571—1590.
- [37] Whiticar M J. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane[J]. *Chemical Geology*, 1999, 161 (1/2/3): 291—314.
- [38] Blair N E, Carter W D Jr. The carbon isotope biogeochemistry of acetate from a methanogenic marine sediment[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1992, 56 (3): 1247—1258.
- [39] Krüger M, Frenzel P, Conrad R. Microbial processes influencing methane emission from rice fields[J]. *Global Change Biology*, 2001, 7 (1): 49—63.
- [40] Zhang G B, Ji Y, Ma J, et al. Pathway of CH₄ production, fraction of CH₄ oxidized, and ¹³C isotope fractionation in a straw-incorporated rice field[J]. *Biogeosciences*, 2013, 10 (5): 3375—3389.
- [41] Jia Z J, Cai Z C, Xu H, et al. Effect of rice plants on CH₄ production, transport, oxidation and emission in rice paddy soil[J]. *Plant and Soil*, 2001, 230 (2): 211—221.

(责任编辑：卢 萍)