

DOI: 10.11766/trxb202011190629

刘心, 沈李东, 田茂辉, 杨王挺, 金靖昊, 王昊宇, 胡正华. 大气 CO₂ 浓度缓增对稻田土壤甲烷氧化过程的影响[J]. 土壤学报, 2022, 59 (2): 568–579.

LIU Xin, SHEN Lidong, TIAN Maohui, YANG Wangting, JIN Jinghao, WANG Haoyu, HU Zhenghua. Effects of Slow Increase of Atmospheric CO₂ Concentration on Methane Oxidation in Paddy Soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59 (2): 568–579.

大气 CO₂ 浓度缓增对稻田土壤甲烷氧化过程的影响*

刘心, 沈李东[†], 田茂辉, 杨王挺, 金靖昊, 王昊宇, 胡正华

(南京信息工程大学生态系, 南京 210044)

摘要: 微生物介导的甲烷好氧氧化, 对控制稻田甲烷排放起着重要作用。本文从基因、群落、活性等多个层次上解析 CO₂ 浓度缓增对稻田土壤甲烷好氧氧化过程的影响及其作用机理。依托于田间 CO₂ 浓度自动调控平台, 在背景 CO₂ 浓度 (AC) 基础上, 设置了 CO₂ 浓度缓增处理 (每年增加 40 μL·L⁻¹, 持续 4 年) (EC)。采用室内泥浆培养以及高通量测序和定量 PCR 技术, 对不同 CO₂ 处理下水稻关键生育期 (分蘖期、拔节期、扬花期和乳熟期) 土壤中的甲烷氧化潜势及其功能微生物的丰度和群落结构进行了系统研究。结果表明: 大气 CO₂ 浓度升高促进了稻田甲烷氧化潜势和甲烷氧化菌丰度的增加; CO₂ 浓度升高还使得土壤中甲烷氧化菌的群落结构发生了显著变化, 其优势菌从 II 型菌转变为 I 型菌。CO₂ 浓度升高所致的土壤中甲烷、氧气浓度以及氮素水平等的改变很可能对稻田甲烷氧化过程产生了重要影响。综合本研究发现, 稻田甲烷氧化过程对大气 CO₂ 浓度缓增具有积极的响应作用, 这对全球气候变暖有一定的缓解作用。

关键词: 大气 CO₂ 浓度缓增; 稻田土壤; 甲烷好氧氧化; 甲烷氧化菌; 群落结构

中图分类号: Q938.1; S154.36 **文献标志码:** A

Effects of Slow Increase of Atmospheric CO₂ Concentration on Methane Oxidation in Paddy Soils

LIU Xin, SHEN Lidong[†], TIAN Maohui, YANG Wangting, JIN Jinghao, WANG Haoyu, HU Zhenghua

(Department of Ecology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China)

Abstract: [Objective] Microbial-mediated methane oxidation plays an important role in controlling methane emissions from paddy fields. Atmospheric CO₂ enrichment could change the potential activity, abundance, and community composition of methanotrophs in paddy rhizosphere soil, and consequently, affect their role in controlling greenhouse gas emission. Currently, there are still controversies about the effect of elevated atmospheric CO₂ concentration on methane oxidation potential and methanotrophic communities in paddy fields. Moreover, the atmospheric CO₂ concentration is a slow increase process, rather than a sharp increase to certain concentrations. However, there is still no relevant research on the effect of the slow increase of CO₂ concentration on methanotrophs. Therefore, it is necessary to study the effects and mechanism of slow increase of CO₂

* 国家自然科学基金项目 (41977037, 41775152) 和江苏省自然科学基金项目 (BK20190092) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 41977037, 41775152) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20190092)

[†] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shenld@nuist.edu.cn

作者简介: 刘心 (1995—), 女, 安徽宿州人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: axin9592@163.com

收稿日期: 2020-11-19; 收到修改日期: 2021-02-23; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2021-04-27

concentration on methane oxidation in paddy soils. 【 Method 】 In this study, a slow increase of atmospheric CO₂ concentration (an increase of 40 μL·L⁻¹ per year with 4 years) (EC) was set up based on the atmospheric CO₂ concentration (AC) automatic control platform. Slurry incubation, high-throughput sequencing, and quantitative PCR on *pmoA* genes were used to systematically investigate the methane oxidation potential, and the abundance and community structure of methanotrophs in paddy soils under different CO₂ concentrations. This study was carried out during key growth stages (e.g. tillering, jointing, flowering and milky) of rice. 【 Result 】 Results show that the variation trend of methane oxidation potential and methanotrophic abundance was consistent, and both were increased with the elevated atmospheric CO₂ during flowering and milky stages but decreased during tillering and jointing stages. Based on the data obtained from all four growth stages, the atmospheric CO₂ enrichment enhanced the methane oxidation potential by 11.7% and increased the abundance of methanotrophs by 53%. Further, the community structure of methanotrophs in soil was changed significantly, with the dominant methanotrophs shifting from type II under AC to type I under EC. There was no single environmental factor that was found to have a significant impact on methane oxidation potential, *pmoA* gene abundance or diversity. Also, the content of soil inorganic nitrogen (NH₄⁺-N, NO₂⁻-N and NO₃⁻-N) was decreased under EC compared with the control. The relatively lower inorganic nitrogen content in paddy soils under EC could alleviate the inhibition of nitrogen on methane oxidation in the paddy field. By stimulating the growth of rice roots and increasing soil carbon input, elevated atmospheric CO₂ can indirectly enhance the production of methane in soils, which in turn increased the methane oxidation potential and abundance of *pmoA* genes. The increase of rice root exudates and aerenchyma volume under EC might provide a more suitable living environment for type I methanotrophs. 【 Conclusion 】 Elevated atmospheric CO₂ promotes the growth of crops, which can subsequently increase both CH₄ and O₂ concentrations in paddy rhizosphere soil, and decrease soil nitrogen level. The combined effects of the above environmental factors could affect the methane oxidation potential, methanotrophic abundance and community structure in our paddy soils. Taken together, our results indicate a positive response of methane oxidation to the slow increase of atmospheric CO₂ concentration in paddy ecosystems, which could help alleviate global warming.

Key words: Slow increase of CO₂ concentration; Paddy soil; Aerobic methane oxidation; Methanotrophs; Community structure

甲烷 (CH₄) 是仅次于二氧化碳 (CO₂) 的长寿温室气体, 对全球温室效应的贡献率约为 17%。甲烷在 100 年尺度的全球增温潜势是等质量 CO₂ 的 28 倍^[1-3]。自工业革命以来, 大气中甲烷浓度增加了 150%, 其排放量仍以每年 1.0% 的速度在递增^[4]。稻田是重要的甲烷排放源之一, 其每年甲烷排放量约占全球排放总量的 10%~20%^[5]。微生物介导的甲烷好氧氧化被认为是控制稻田甲烷排放的重要途径, 可氧化产甲烷菌产生的 40%~90% 的甲烷^[6-7]。

根据细胞结构和功能及系统进化发育关系, 甲烷氧化菌可分为三大类^[8]。第一类包括 I 型和 X 型甲烷氧化菌, 属于 γ 变形菌纲, 主要有甲基杆菌 (*Methylobacter*)、甲基球菌 (*Methylococcus*)、甲基单胞菌 (*Methylomonas*)、甲基微菌 (*Methylomicrobium*) 和甲基八叠球菌 (*Methylosarcina*) 等 10 个属。第二类为 II 型甲烷氧化菌, 属于 α 变形菌纲, 主要包括甲基弯曲菌 (*Methylosinus*) 和甲基包囊菌 (*Methylocystis*) 等 5

个属。第三类甲烷氧化菌属于疣微菌门 (*Verrucomicrobia*), 主要由嗜热嗜酸菌组成^[9]。有研究发现, 稻田土壤中甲烷氧化菌的主要类型是 II 型菌^[10-11]。但也有研究表明, I 型菌主要分布在水稻的根际和水土交界面的表层土壤中, 而 II 型菌则更适应低氧环境^[12], 其在下层缺氧区占优势地位^[13]。

CO₂ 作为最重要的温室气体, 对气候变暖的贡献最大。气候模型预测表明, 至 21 世纪末大气中 CO₂ 浓度可能会翻一番^[14]。大气 CO₂ 浓度升高会极大地影响陆地生态系统的性质和功能^[15]。在水稻不同生长期, 土壤环境因子会发生改变, 并与大气 CO₂ 协同作用后对土壤甲烷氧化过程产生影响。土壤中的 CO₂ 浓度是大气中的 10 倍~15 倍, 因此大气 CO₂ 浓度升高几百 μL·L⁻¹ 很难直接改变土壤微生物群落结构^[16]。但有证据表明, 高浓度的 CO₂ 能够促进植物生长发育, 并通过增加植物向土壤的碳输入以及改变其他相关土壤理化性质 (如氮素水平、氧气含量) 等影响土壤微生物群落结构和活性^[17-19]。可见, 大气

CO₂ 浓度升高可能会对稻田甲烷氧化菌的活性、丰度和群落结构产生间接影响,进而改变稻田甲烷排放量。有研究表明,较高的大气 CO₂ 浓度会使土壤中甲烷的氧化量减少,进一步加剧气候变化^[20-22]。然而也有研究发现,大气 CO₂ 浓度升高能够促进稻田土壤甲烷氧化菌的生长^[16, 23-24]。因此,当前关于大气 CO₂ 浓度升高对稻田甲烷氧化过程的影响结论仍存在争议,其影响机理尚不明确。

大气 CO₂ 浓度是长时间缓慢增加的过程,而不是短期内增至某一浓度后固定不变。目前尚少见 CO₂ 浓度缓增对土壤甲烷氧化菌影响的相关研究。本研究在背景 CO₂ 浓度基础上设置了 CO₂ 浓度缓增处理,更加真实地模拟大气 CO₂ 浓度升高的情境。此外,高通量测序方法(如 Illumina MiSeq)在研究土壤微生物群落中更具有优势,能够对微生物群落特征提供更全面的解释^[25-26]。然而该方法较少应用于研究稻田土壤甲烷氧化菌群落的动态变化。本研究采用 Illumina MiSeq 测序技术以及定量 PCR 等手段,从基因、群落、活性等多个层次上解析 CO₂ 浓度缓增对稻田土壤甲烷好氧氧化过程的影响及其作用机理。

1 材料与方 法

1.1 试验区概况

试验区设置在江苏省农业气象重点实验室的稻田试验地(32.16°N, 118.86°E),属亚热带湿润气候区,年平均降水量 1 100 mm,多年平均气温 15.6 °C。供试土壤为潜育型水稻土,灰马肝土属,耕层土壤质地为壤质黏土。供试水稻品种为南粳 9108,全生育期为 149~153 d。稻田土壤的氮肥年施用量为 250 kg·hm⁻²。水分管理方式为生育前期淹水、中期烤田、后期干湿交替。

1.2 土壤样品采集与分析

本研究依托于开顶气室(Open Top Chambers, OTC)组成的 CO₂ 浓度升高自动调控平台,该平台于 2016 年建成并运行,包括 OTC、CO₂ 传感器、自动控制系统及通气装置。每个 OTC 内配置 CO₂ 传感器(GMM222 传感器,芬兰)及温湿度自动记录仪。通过计算机程序实现 OTC 内 CO₂ 浓度的自动监测和调节,以确保 OTC 内 CO₂ 浓度维持在目标浓度值。

CO₂ 气源为高纯 CO₂ 钢瓶。

以大气 CO₂ 浓度为对照(Ambient CO₂, AC),设置 CO₂ 浓度缓增处理(Elevated CO₂, EC),每个处理各 3 个重复。EC 处理为在背景 CO₂ 浓度基础上,自 2016 年起每年增加 40 μL·L⁻¹。于 2019 年采集水稻 4 个关键生育期即:分蘖期、拔节期、扬花期和乳熟期 0~5 cm 的根际土壤。该年 EC 处理的 CO₂ 浓度为 AC+160 μL·L⁻¹。采用烘干法测定土壤含水率;以玻璃电极法测定土壤 pH;以比色法测定土壤无机氮(NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N)^[27];土壤有机质含量的测定方法参考《土壤农化分析》^[28]。

1.3 甲烷氧化潜势测定

取约 3 g 新鲜土样置于 12 mL 玻璃瓶(Labco, 英国)中,并向瓶内加入 5 mL 去离子水后,用橡胶塞密封。随后,用纯甲烷进行等体积置换,使甲烷含量占比约 10%(体积比)。将玻璃瓶置于摇床以 35 °C, 120 r·min⁻¹ 振荡培养。期间,每隔 12 h 用 50% ZnCl₂ 溶液终止一批反应,直至最后一批样品于第 72 h 培养结束。用气相色谱仪(Agilent 7890B, 美国)测定玻璃瓶中顶空甲烷浓度。最后,根据甲烷浓度随时间减少进行线性拟合,计算甲烷氧化潜势。

1.4 DNA 提取和 PCR 扩增

根据 Power Soil DNA Isolation kit 试剂盒(MoBio, 美国)说明书对不同处理下稻田土壤样品的总 DNA 进行抽提。DNA 浓度和纯度利用超微量分光光度计(NanoDrop2000, 美国)进行测定,并利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。利用特异性引物 A189F(5'-GGNGACTGGGACTTC TGG-3')和 mb661R(5'-CCGGMGCAACGTCYTTAC C-3')^[17]对甲烷氧化菌 *pmoA* 基因进行 PCR 扩增。扩增程序如下:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环;最后以 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应体系为 20 μL:4 μL 5×astPfu 缓冲液,2 μL 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs, 0.8 μL 正向引物(5 μmol·L⁻¹), 0.8 μL 反向引物(5 μmol·L⁻¹), 0.4 μL FastPfu 聚合酶, 0.2 μL BSA(牛血清蛋白),以及 10 ng DNA 模板。

1.5 Illumina Miseq 测序

利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen Biosciences, USA)进行 PCR 产物纯化;利用 QuantiFluor™-ST(Promega, USA)进行产物检测

定量。根据 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, USA) 标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2×300 的文库 (上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.6 序列分析

原始序列使用 Trimmomatic 软件质控, 以 FLASH 软件进行拼接, 具体步骤如下: (1) 设置 50 bp 的窗口, 若窗口内的平均质量值低于 20, 从窗口前端位置截去该碱基后端所有序列, 之后再去除质控后长度低于 50 bp 的序列; (2) 根据重叠碱基 overlap 将两端序列进行拼接 (最大错配率为 0.2, 长度需大于 10 bp); (3) 根据序列首尾两端的 barcode 和引物将序列拆分至每个样本并精确匹配。使用 UPARSE 软件 (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>) 以 86% 的相似度对序列进行 OTU 聚类^[29], 同时去除单序列和嵌合体。最终通过对比 *pmoA* 数据库, 利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对每条序列进行物种分类注释。甲烷氧化菌的 *pmoA* 基因序列已上传至美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI), 序列登录号为 PRJNA612131。

1.7 定量 PCR

使用特异性引物 A189F 和 mb661R, 通过定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 测定甲烷氧化菌 *pmoA* 基因的丰度 (PCR 反应体系和反应条件参见 1.4 部分)。利用质粒标准样品稀释 7 个浓度梯度, 绘制标

准曲线。根据标准曲线得到每个样品的 *pmoA* 基因拷贝数 (每个样品 3 个重复)。

1.8 数据处理

采用美吉生物云平台对测序数据进行分析。使用 SPSS 25.0 软件的 *t* 检验分析不同处理间各指标 (甲烷氧化活性、甲烷氧化菌数量、多样性等) 的差异及其显著性。使用 SPSS 25.0 软件对各理化指标和微生物指标之间的关系进行 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 大气 CO₂ 浓度缓增对稻田土壤理化因子的影响

不同 CO₂ 浓度处理下各生育期稻田土壤的理化性质见表 1。结果显示, 在不同 CO₂ 浓度处理下, 四个关键生育期的土壤含水率和 pH 在较小的范围内波动。在分蘖期, AC 和 EC 处理下土壤中 DOC 含量未见明显变化, 但 EC 处理下土壤中 NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 含量均显著低于 AC 处理。在拔节期, EC 处理的 NO₂⁻-N 含量显著高于 ($P < 0.05$) AC 处理, 而其他土壤理化因子未见有显著变化。在扬花期, 与 AC 相比, EC 处理的土壤有机碳与 DOC 含量显著提高 ($P < 0.05$), 但 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 含量

表 1 不同 CO₂ 浓度处理下各生育期稻田土壤的理化性质

Table 1 Physiochemical properties of paddy soils during different rice growth stages under different CO₂ treatments

生育期 Growth stage	处理 Treatment	含水率 Soil moisture	pH	有机碳 Organic carbon/ (g·kg ⁻¹)	可溶性有机碳 DOC/ (mg kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N/ (mg·kg ⁻¹)	NO ₂ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹)
分蘖期 Tillering stage	AC	0.41±0.06a	6.21±0.50a	9.33±0.30a	154.4±2.3a	37.09±3.96a	1.64±0.71a	19.30±5.31a
拔节期 Jointing stage	EC	0.41±0.16a	6.12±0.62a	7.80±2.04a	152.2±7.4a	10.10±6.25b	0.86±0.61b	8.53±0.59b
扬花期 Flowering stage	AC	0.44±0.04a	6.21±0.19a	9.47±1.02a	74.9±18.8a	17.73±1.91a	0.44±0.12a	9.00±1.39a
乳熟期 Milky stage	EC	0.40±0.02a	6.13±0.08a	13.19±6.16a	75.3±3.7a	15.11±6.23a	0.30±0.12b	7.69±0.39a
	AC	0.45±0.04a	6.27±0.14a	10.44±1.10a	150.5±3.1a	14.12±5.00a	0.77±0.35a	4.93±1.59a
	EC	0.47±0.07a	6.12±0.12a	11.94±0.88b	217.9±43.1b	10.55±3.86b	0.34±0.09b	5.58±0.93a
	AC	0.40±0.05a	6.10±0.09a	10.79±1.01a	107.6±54.7a	14.77±2.75a	0.28±0.06a	12.87±6.21a
	EC	0.39±0.03a	6.12±0.12a	9.89±0.69a	115.5±35.4a	15.27±2.88a	0.27±0.06a	11.4±4.79a

注: AC, CO₂ 浓度对照处理; EC, CO₂ 浓度缓增处理。不同字母表示该生育期不同处理间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。下同。
Note: AC, Ambient CO₂ treatment; EC, Elevated CO₂ treatment. Different letters indicate a significant difference between treatments at the same growth stage ($P < 0.05$). The same below.

显著降低 ($P < 0.05$)。在乳熟期, EC 处理下土壤中 DOC 含量较 AC 有所增加, 但未达到显著性水平。

2.2 大气 CO₂ 浓度缓增对稻田土壤甲烷氧化潜势及甲烷氧化菌丰度的影响

土壤泥浆培养试验结果显示, 该稻田土壤的甲烷氧化潜势在分蘖期达到最高值, 并随着水稻的生

长, 甲烷氧化潜势呈下降趋势 (图 1a)。除分蘖期外, EC 处理促进了土壤甲烷氧化潜势, 且在拔节期和乳熟期达到显著性水平 ($P < 0.05$)。分蘖期的土壤甲烷氧化潜势随 CO₂ 浓度的升高显著降低 ($P < 0.05$)。综合每个生育期的数据, EC 处理使得稻田整体甲烷氧化潜势增加 11.7%。

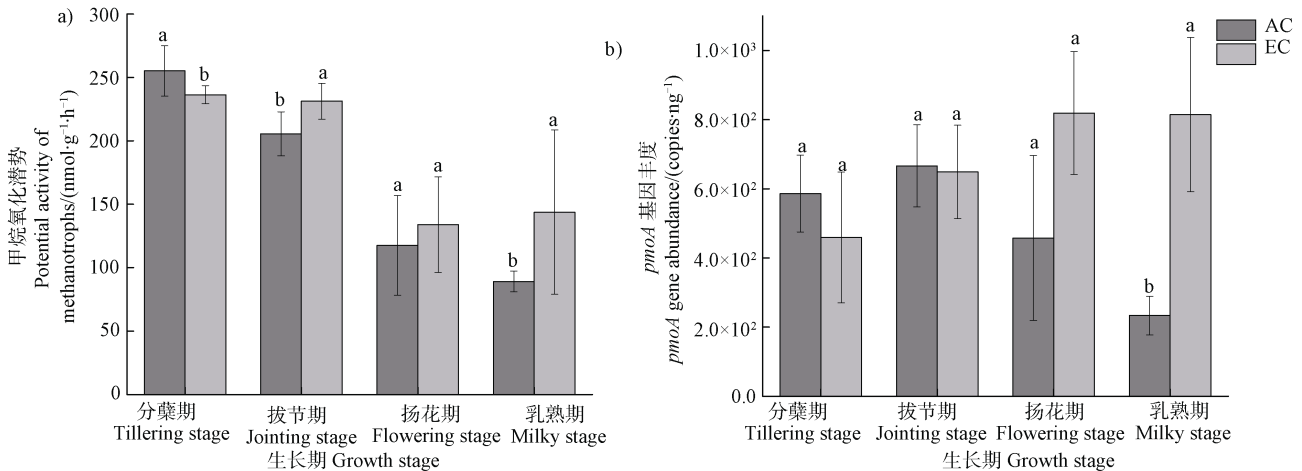


图 1 不同 CO₂ 浓度处理下各生育期稻田土壤的甲烷氧化潜势 (a) 及甲烷氧化菌 *pmoA* 基因丰度 (b)

Fig. 1 Potential activity (a) and *pmoA* gene abundance (b) of methanotrophs in paddy soils during different rice growth stages under different CO₂ treatments

甲烷氧化菌 *pmoA* 基因的定量结果显示, AC 处理在拔节期达到峰值, 而 EC 处理在扬花期和乳熟期达到峰值 (图 1b)。在乳熟期, 甲烷氧化菌丰度随大气 CO₂ 浓度升高显著增加 ($P < 0.05$)。这与同时期不同 CO₂ 处理下甲烷氧化潜势的变化趋势一致。相较于 AC 处理, EC 处理下扬花期的 *pmoA* 基因丰度增加了 79.0%; 乳熟期的丰度增幅则高达 348.2%。在分蘖期和拔节期, EC 处理降低了甲烷氧化菌的丰度, 分别低于 AC 处理的 21.7% 和 2.6%, 但均未达到显著性水平。综合每个生育期的数据, EC 处理的甲烷氧化菌丰度高于 AC 处理的 53%。

2.3 大气 CO₂ 浓度缓增对稻田土壤甲烷氧化菌 *pmoA* 基因多样性的影响

利用 OTU 水平上的 Sobs 指数、香农指数和 Chao 1 指数, 评估不同 CO₂ 浓度处理下土壤中甲烷氧化菌丰富度和多样性的变化。数据分析结果显示, 单个样品中 OTU 数介于 40~189 之间。所有样品 OTU 的稀释曲线均接近饱和状态, 表明本研究的测序深度足以描述甲烷氧化菌 *pmoA* 基因的多样性。研究发现, 各时期的甲烷氧化菌 *pmoA* 基因多样性随大气 CO₂ 浓度升高呈降低趋势。其中在乳熟期,

EC 处理下土壤中甲烷氧化菌的多样性显著低于 ($P < 0.05$) AC 处理。但在其他三个生育期, 不同处理下土壤中 *pmoA* 基因多样性差异不显著 (图 2)。

2.4 大气 CO₂ 浓度缓增对稻田土壤甲烷氧化菌群落结构的影响

以属为水平对不同 CO₂ 浓度处理下稻田土壤中甲烷氧化菌的群落组成进行分析。结果发现已知菌属主要包括 I 型的甲基八叠球菌 (*Methylosarcina*)、甲基单胞菌 (*Methylomonas*)、甲基球菌 (*Methylococcus*)、甲基杆菌 (*Methylobacter*) 和 II 型的甲基包囊菌 (*Methylocystis*) (图 3)。在 AC 处理下, 土壤中 I 型甲烷氧化菌占比 37.23%, II 型菌占比 39.95%; 在 EC 处理下, I 型占比 50.2%, 高于占比 30.43% 的 II 型菌。因此, 大气 CO₂ 浓度升高改变了甲烷氧化菌的优势菌群, 使得 II 型菌占比明显提高。甲基包囊菌属、甲基八叠球菌属和甲基单胞菌属始终是该稻田土壤中的优势菌属。在 AC 处理下, 土壤中这三类优势甲烷氧化菌属的相对丰度分别为 39.95%、17.86% 和 8.69%; 而在 EC 处理下, 这三种菌属的相对丰度则分别为 30.43%、20.62% 和 18.77%。此外, 土壤中还存在甲基球菌和甲基杆菌, 以及其他未被分类的菌属, 但其相对丰度较低 (图 3)。

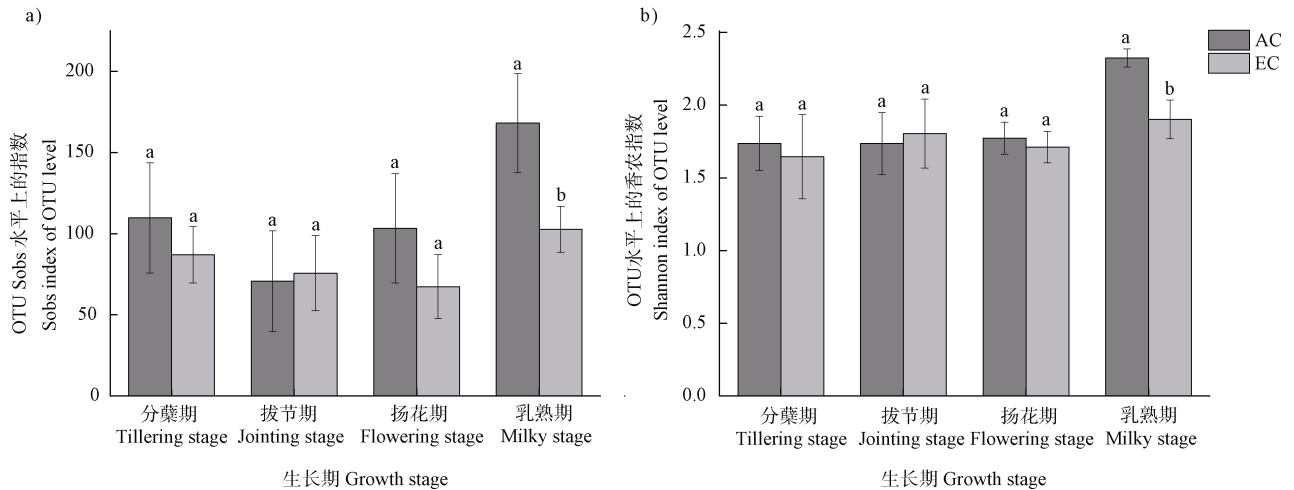
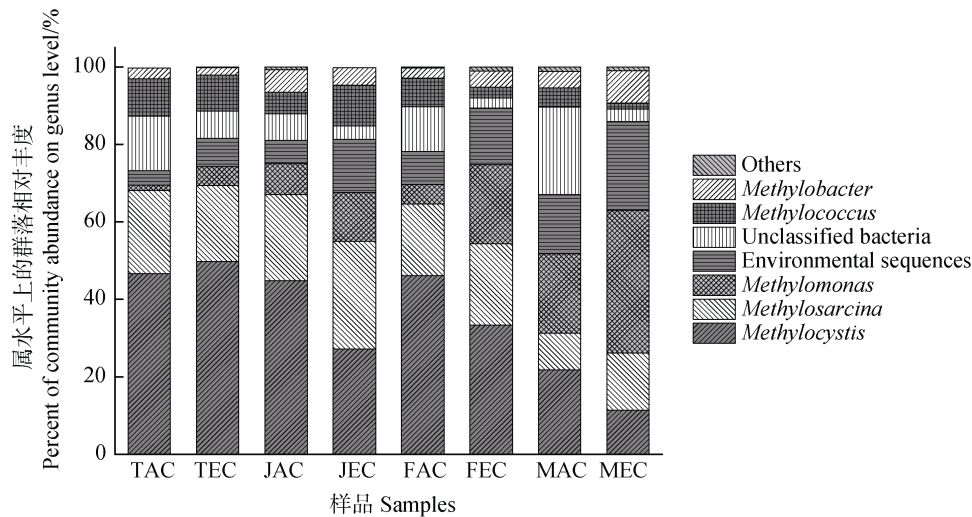


图 2 不同 CO₂ 浓度处理下各生育期稻田土壤中 *pmoA* 基因的 Sobs 指数 (a) 和香农指数 (b)

Fig. 2 The Sobs index (a) and Shannon index (b) of *pmoA* genes in paddy soils during different rice growth stages under different CO₂ treatments



注：TAC, 分蘖期 AC 处理；TEC, 分蘖期 EC 处理；JAC, 拔节期 AC 处理；JEC, 拔节期 EC 处理；FAC, 扬花期 AC 处理；FEC, 扬花期 EC 处理；MAC, 乳熟期 AC 处理；MEC, 乳熟期 EC 处理。Note: TAC, AC treatment at the tillering stage; TEC, EC treatment at the tillering stage; JAC, AC treatment at the jointing stage; JEC, EC treatment at the jointing stage; FAC, AC treatment at the flowering stage; FEC, EC treatment at the flowering stage; MAC, AC treatment at the milky stage; MEC, EC treatment at the milky stage.

图 3 不同 CO₂ 浓度处理下各生育期稻田土壤甲烷氧化菌的群落组成

Fig. 3 Community composition of methanotrophs in paddy soils during different rice growth stages under different CO₂ treatments

对不同 CO₂ 处理下土壤中甲烷氧化菌群落组成进行组间差异显著性检验 (图 4 a), 发现某些环境序列和未被分类的菌属的相对丰度存在显著性差异 ($P < 0.05$)。但在乳熟期, EC 处理下使得甲基单胞菌的相对丰度显著高于 ($P < 0.05$) AC 处理, 而甲基包囊菌的相对丰度则显著低于 ($P < 0.05$) AC 处理 (图 4b)。总体而言, 甲烷氧化菌群落在两种 CO₂ 浓度处理间, 存在显著差异 (图 5, $P = 0.039$)。

2.5 影响稻田甲烷氧化菌群落及其活性的主要环境因子

RDA 结果显示, 土壤 pH 和 NO₂-N 含量对甲烷氧化菌的群落结构有显著影响 ($P < 0.05$) (图 5)。不同 CO₂ 浓度处理下土壤的甲烷氧化潜势和 *pmoA* 基因丰度与 DOC 含量、NH₄⁺-N 含量呈正相关, 而甲烷氧化潜势又与 pH 呈负相关, 但均未达到显著性水平 (表 2)。本研究未发现单一的环境因子对甲

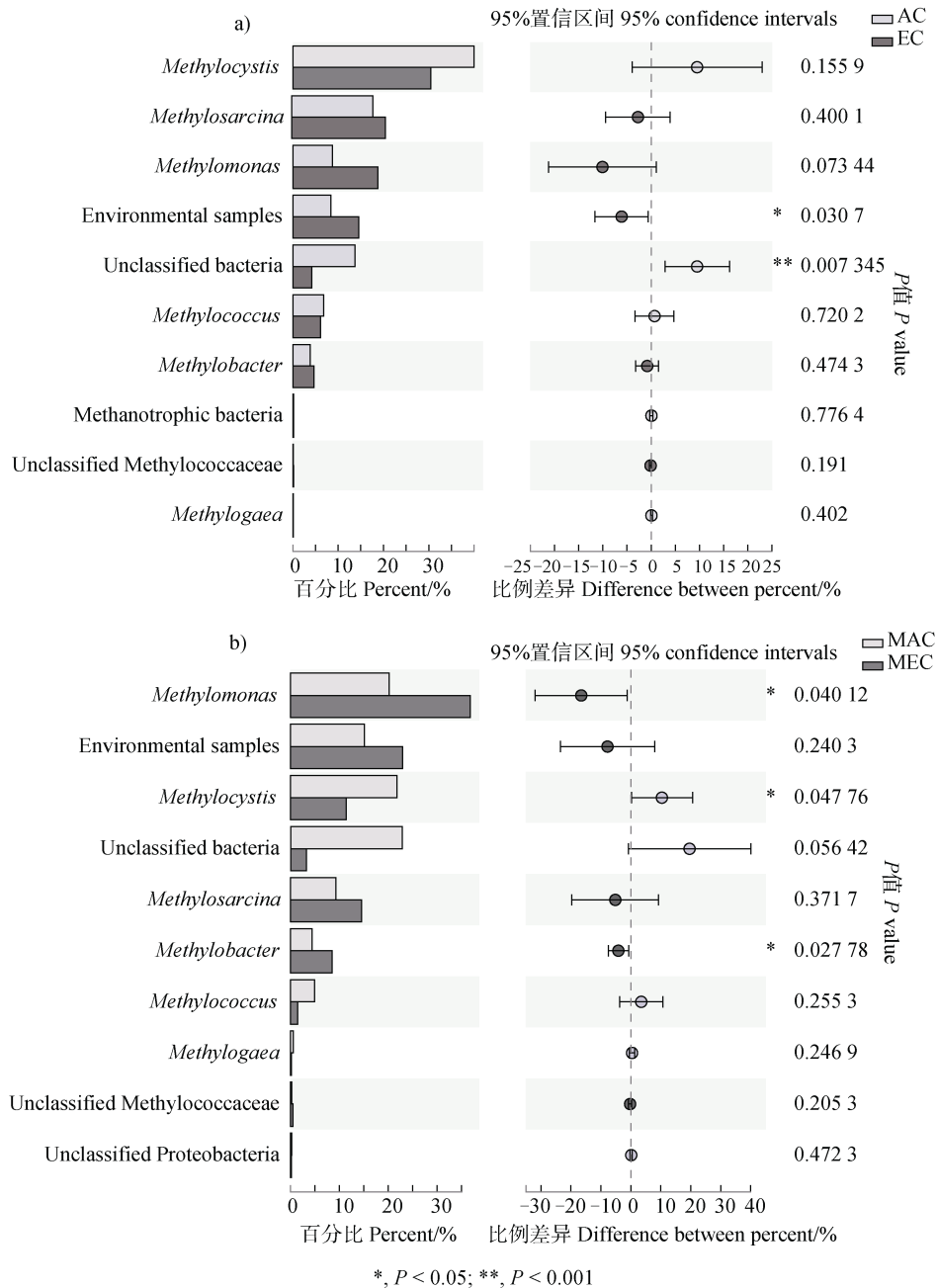


图4 不同 CO₂ 浓度处理下稻田土壤中甲烷氧化菌在属水平上的总体群落结构差异 (a) 以及在和乳熟期的群落结构差异 (b)
Fig. 4 Variation of methanotrophic community composition at genus level in paddy soils during rice growth period (a) and at milky stage (b) under different CO₂ treatments

烷氧化潜势和 *pmoA* 基因丰度、多样性的变化有显著影响。此外, 甲烷氧化潜势和 *pmoA* 基因多样性存在显著正相关 ($P < 0.05$)。

3 讨论

甲烷是甲烷氧化菌唯一的碳源和能源。据报道, 土壤中甲烷浓度是影响稻田甲烷氧化潜势和甲烷氧

化菌群落的重要因素。大量研究表明, 土壤中甲烷氧化速率随甲烷浓度的升高而增加^[30-32]。大气 CO₂ 浓度升高会促进稻田中甲烷的产生量^[33-36]。这主要是由于 CO₂ 浓度升高刺激了水稻的生长发育, 增加了其根系生物量和分泌物^[37-38], 导致向土壤中释放更多的含碳物质。这给产甲烷菌提供了更多的底物来源^[36]。本研究发现, 大气 CO₂ 浓度缓增增加了某些生长期稻田根际土壤甲烷氧化菌的丰度以及甲烷

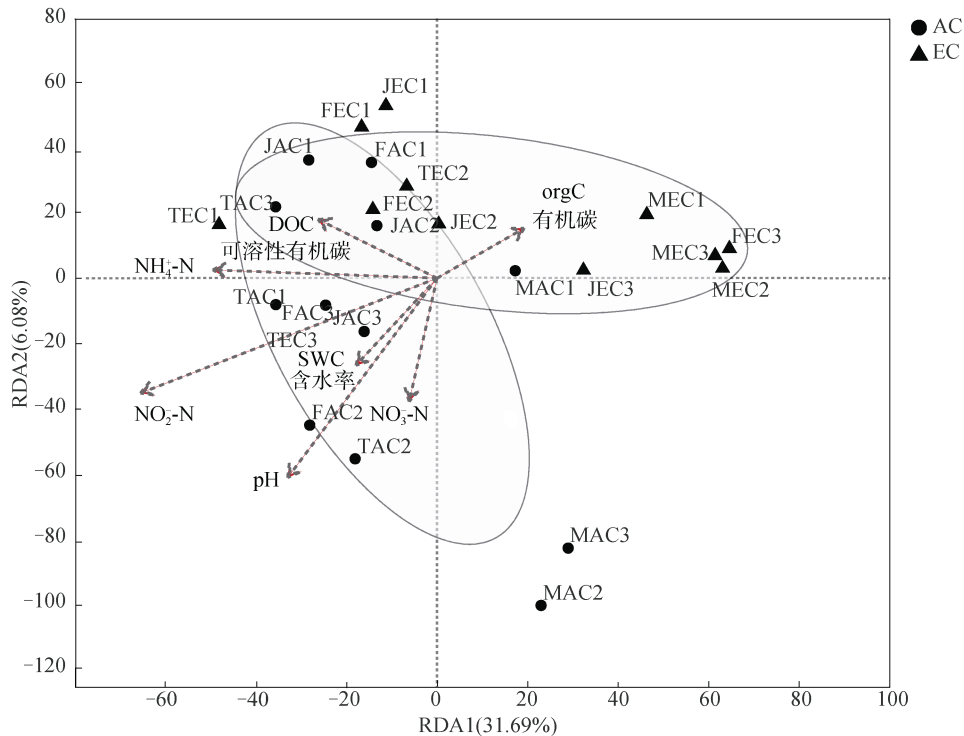


图 5 不同 CO₂ 浓度处理下稻田土壤中甲烷氧化菌群落结构与环境因子关系的 RDA 图

Fig. 5 Redundancy analysis (RDA) ordination plots showing the relationship between the community structures of methanotrophs and environmental factors in paddy soils under different CO₂ treatments

表 2 不同 CO₂ 浓度处理下稻田土壤的甲烷氧化潜势及 *pmoA* 基因丰度、多样性与环境因子的相关性

Table 2 Potential correlations between the potential activity of methanotrophs, *pmoA* gene diversity and abundance and different environmental factors in paddy soils under different CO₂ treatments

环境因子 Environmental factor	Pearson 相关系数 Pearson correlation coefficients (<i>r</i>)				
	甲烷氧化潜势 Methane oxidation potential	<i>pmoA</i> 丰度 <i>pmoA</i> abundance	OTU 数量 Number of OTU	香农指数 Shannon index	Chao 1 指数 Chao 1 index
土壤含水率 ^①	0.020	-0.139	-0.231	-0.284	-0.029
pH	-0.308	-0.095	0.303	0.093	0.340
NH ₄ ⁺ -N	0.176	0.127	0.110	-0.216	0.159
NO ₂ ⁻ -N	0.235	-0.06	0.076	-0.216	0.169
NO ₃ ⁻ -N	-0.590	-0.020	0.355	0.201	0.221
有机碳 ^②	-0.044	-0.008	-0.043	0.074	-0.06
DOC ^③	0.218	0.202	-0.182	-0.416	0.046

注：①Soil water content; ②Organic carbon ③Dissolved organic carbon

氧化潜势 (图 1)。相关性分析显示, 甲烷氧化潜势和 *pmoA* 基因丰度均与 DOC 含量呈正相关关系 (表 2)。这说明大气 CO₂ 浓度升高间接导致土壤 DOC 含

量增加, 使产甲烷潜势增强, 进而给甲烷氧化菌提供了更多底物甲烷来源。土壤中相对较高浓度的甲烷有利于甲烷氧化潜势和甲烷氧化菌丰度的增加。

与此同时,氧气的可获得性是甲烷氧化的重要限制因子^[39]。大气 CO₂ 浓度升高可使水稻根系的通气组织愈加发达,继而增加大气向水稻根际 O₂ 的输送。这在一定程度上可以提高水稻根际的甲烷氧化潜势。早期,王义琴等^[40]利用微根窗技术对植物进行观测,发现在大气 CO₂ 浓度倍增条件下,植物的根长和根数量与自然环境生长的植物相比,分别增加了 16%和 34%。本研究结果发现,在扬花期和乳熟期的土壤中,甲烷氧化菌丰度与同时期的甲烷氧化潜势呈相同的变化趋势:均随大气 CO₂ 浓度的升高而显著增加 ($P < 0.05$) (图 1)。该结果很可能是由于在水稻生长的中后期,大气 CO₂ 浓度升高下水稻根系生长更加发达,使得根际区域 O₂ 含量增加,从而刺激了甲烷氧化菌的生长与活性。先前的相关研究也发现,大气 CO₂ 浓度升高会促进稻田土壤甲烷氧化菌活性及其 *pmoA* 基因丰度的增加^[16, 24, 41]。然而也有研究发现,大气 CO₂ 浓度升高会增强叶片的水分利用效率,使得土壤水分增加,进而通过影响土壤中 O₂ 扩散速率抑制甲烷氧化活性^[20, 34, 42]。但这种情况多发生于森林、草地等生态系统中。稻田土壤长时间处于淹水条件,水分较为充足。大气 CO₂ 浓度升高所引起的土壤含水量的微小增加,可能不足以改变稻田中的气体扩散速率。本研究中稻田表层土壤的含水率较高,且并未随 CO₂ 浓度升高发生明显改变(表 1)。

氮素含量是影响稻田甲烷氧化的另一重要环境因子。本研究发现,大气 CO₂ 浓度升高导致了土壤中 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 含量的减少(表 1)。有研究表明,通过长达 15 年的 CO₂ 富集试验,大气 CO₂ 浓度升高会造成稻田生态系统中 NH₄⁺-N 的大量损失,这可能是由于 NH₄⁺ 的厌氧氧化和铁的还原增强所致^[43]。土壤中 NH₄⁺-N 的减少还可能与作物根系生长对铵态氮的吸收增强有关^[44]。同时,大气 CO₂ 浓度升高会降低土壤 NO₃⁻-N 的积累^[45],这是因为稻田根系生物量和分泌物的增加促进了反硝化活性的增强^[46]。稻田土壤中较高浓度的 NH₄⁺ 会通过增加硝化作用来抑制甲烷氧化菌的生长及活性^[47-49]。Adamsen 和 King^[50]在土壤培养实验中发现,较高浓度的 NO₃⁻-N 也会抑制土壤甲烷氧化活性。但其抑制作用的机理尚不明确,可能是由于 NO₃⁻ 本身或通过 NO₃⁻ 还原产生 NO₂⁻ 对甲烷氧化菌的毒害作用^[51]。通

常情况下,稻田土壤的本底 NH₄⁺-N 含量较高(氮肥施用所致)^[52]。为此,本研究中大气 CO₂ 浓度升高所致土壤 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 积累的减少,可能有助于缓解氮素对稻田甲烷氧化的抑制作用。

随着大气 CO₂ 浓度的升高,甲烷氧化菌的优势菌群发生了改变:从 II 型菌(相对丰度为 39.95%)转变为 I 型菌属(相对丰度为 50.2%)。因此,大气 CO₂ 浓度升高促使了土壤中 II 型菌向 I 型菌的演替。AC 处理的优势菌属为甲基包囊菌(II 型)、甲基八叠球菌和甲基单胞菌(均为 I 型)(图 3)。这与先前稻田土壤中甲烷氧化菌的主要类型是 II 型菌的结果一致^[10, 53-54]。据报道,甲基弯曲菌和甲基包囊菌(均为 II 型)的相对丰度会随大气 CO₂ 浓度升高而降低^[32]。研究表明,在高 NH₄⁺ 条件下,甲基孢囊菌(II 型)的竞争力高于 I 型菌^[55]。大气 CO₂ 浓度升高所导致 NH₄⁺-N 含量的减少,很可能削弱了甲基孢囊菌的竞争力,使其丰度下降(图 4 a)。除氮素含量外,稻田土壤中的 O₂ 浓度和营养条件的变化亦可能会改变甲烷氧化菌的群落结构。以往的研究表明, I 型菌在高氧^[56]和营养充足的环境中有较强的竞争优势^[10],而 II 型菌更适应在低氧和寡营养的环境下生长^[12]。如前所述,大气 CO₂ 浓度升高会促进水稻根系分泌物和通气组织容积的增加,这为 I 型菌的生长提供了更为合适的生存环境。

4 结 论

大气 CO₂ 浓度缓增促进了稻田土壤甲烷氧化潜势的增加,以及甲烷氧化菌的生长。同时,大气 CO₂ 浓度升高显著改变了土壤中甲烷氧化菌的群落结构,使得优势菌属由起初的 II 型菌转变为 I 型菌。大气 CO₂ 浓度升高会促进作物的生长,导致稻田土壤中甲烷浓度和根际环境通气性的增加,并调节土壤中的氮素水平。以上多个环境因子的综合作用很可能是稻田甲烷氧化潜势、甲烷氧化菌丰度与群落结构发生改变的重要原因。

参考文献 (References)

- [1] Wuebbles D J, Hayhoe K. Atmospheric methane and global change[J]. *Earth-Science Reviews*, 2002, 57 (3/4): 177—210.
- [2] Cao M K, Gregson K, Marshall S. Global methane emission from wetlands and its sensitivity to climate

- change[J]. *Atmospheric Environment*, 1998, 32 (19): 3293—3299.
- [3] Bridgham S D, Cadillo-Quiroz H, Keller J K, et al. Methane emissions from wetlands: Biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales[J]. *Global Change Biology*, 2013, 19 (5): 1325—1346.
- [4] Schwietzke S, Sherwood O A, Bruhwiler L M P, et al. Upward revision of global fossil fuel methane emissions based on isotope database[J]. *Nature*, 2016, 538(7623): 88—91.
- [5] Kirschke S, Bousquet P, Ciais P, et al. Three decades of global methane sources and sinks[J]. *Nature Geoscience*, 2013, 6 (10): 813—823.
- [6] Krüger M, Frenzel P, Conrad R. Microbial processes influencing methane emission from rice fields[J]. *Global Change Biology*, 2001, 7 (1): 49—63.
- [7] Le Mer J, Roger P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2001, 37 (1): 25—50.
- [8] Cai C Y, He Z F, Hu B L. Progresses in the classification and mechanism of methane-oxidizing bacteria[J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences*, 2016, 42 (3): 273—281. [蔡朝阳, 何翊飞, 胡宝兰. 甲烷氧化菌分类及代谢途径研究进展[J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2016, 42 (3): 273—281.]
- [9] Op den Camp H J M, Islam T, Stott M B, et al. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1 (5): 293—306.
- [10] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria[J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60 (2): 439—471.
- [11] Shiau Y J, Cai Y F, Jia Z J, et al. Phylogenetically distinct methanotrophs modulate methane oxidation in rice paddies across Taiwan[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 124: 59—69.
- [12] Macalady J L, McMillan A M S, Dickens A F, et al. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4 (3): 148—157.
- [13] Ma K, Qiu Q F, Lu Y H. Microbial mechanism for rice variety control on methane emission from rice field soil[J]. *Global Change Biology*, 2010, 16 (11): 3085—3095.
- [14] IPCC. Summary for policymakers[M]//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.
- [15] Pugnaire F I, Morillo J A, Peñuelas J, et al. Climate change effects on plant-soil feedbacks and consequences for biodiversity and functioning of terrestrial ecosystems[J]. *Science Advances*, 2019, 5 (11): eaaz1834.
- [16] Yan C, Xu J, Zhong W H, et al. Effect of elevated CO₂ on methanotrophs in the rhizosphere of rice plant[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33 (6): 1881—1888. [严陈, 许静, 钟文辉, 等. 大气 CO₂ 浓度升高对稻田根际土壤甲烷氧化细菌丰度的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33 (6): 1881—1888.]
- [17] Deng Y, He Z L, Xu M Y, et al. Elevated carbon dioxide alters the structure of soil microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(8): 2991—2995.
- [18] Butterly C R, Phillips L A, Wiltshire J L, et al. Long-term effects of elevated CO₂ on carbon and nitrogen functional capacity of microbial communities in three contrasting soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 97: 157—167.
- [19] He Z L, Xu M Y, Deng Y, et al. Metagenomic analysis reveals a marked divergence in the structure of belowground microbial communities at elevated CO₂[J]. *Ecology Letters*, 2010, 13 (5): 564—575.
- [20] McLain J E T, Ahmann D M. Increased moisture and methanogenesis contribute to reduced methane oxidation in elevated CO₂ soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2008, 44 (4): 623—631.
- [21] Phillips R L, Whalen S C, Schlesinger W H. Response of soil methanotrophic activity to carbon dioxide enrichment in a North Carolina coniferous forest[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33 (6): 793—800.
- [22] Dubbs L L, Whalen S C. Reduced net atmospheric CH₄ consumption is a sustained response to elevated CO₂ in a temperate forest[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2010, 46 (6): 597—606.
- [23] Inubushi K, Cheng W G, Aonuma S, et al. Effects of free-air CO₂ enrichment (FACE) on CH₄ emission from a rice paddy field[J]. *Global Change Biology*, 2003, 9 (10): 1458—1464.
- [24] Han X G, Sun X, Wang C, et al. Mitigating methane emission from paddy soil with rice-straw biochar amendment under projected climate change[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24731.
- [25] Cao S Z, Shen Y Y, Wang F Q, et al. Research advance in soil methanotrophs community structure[J]. *Journal of Biology*, 2017, 34 (6): 78—82. [曹淑贞, 沈媛媛, 王凤芹, 等. 土壤甲烷氧化菌群落结构研究进展[J]. *生物学杂志*, 2017, 34 (6): 78—82.]
- [26] Ravi R K, Walton K, Khosroheidari M. MiSeq: A next generation sequencing platform for genomic analysis[M]//Disease gene identification. New York: Humana Press, 2018: 223—232.
- [27] Shen L D, Liu S, Lou L P, et al. Broad distribution of diverse anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in

- Chinese agricultural soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79 (19): 6167—6172.
- [28] Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.]
- [29] Wen X, Yang S Z, Liebner S. Evaluation and update of cutoff values for methanotrophic *pmoA* gene sequences[J]. Archives of Microbiology, 2016, 198 (7): 629—636.
- [30] Yan X Y, Cai Z C. Advances in the study of roles of soil in methane oxidation[J]. Rural Eco-Environment, 1996, 12 (2): 33—38. [颜晓元, 蔡祖聪. 土壤对甲烷氧化作用的研究进展[J]. 农村生态环境, 1996, 12 (2): 33—38.]
- [31] Chen Z Y, Min H, Wu W X, et al. Studies on the population of methane-oxidizing bacteria and methane-oxidizing activity in Huangsong rice field soil[J]. Journal of Zhejiang Agricultural University: Agriculture and Life Sciences, 2001, 27 (5): 546—550. [陈中云, 闵航, 吴伟祥, 等. 土壤中甲烷氧化菌种群数量及其与甲烷氧化活性的关系[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2001, 27 (5): 546—550.]
- [32] Okubo T, Tokida T, Ikeda S, et al. Effects of elevated carbon dioxide, elevated temperature, and rice growth stage on the community structure of rice root-associated bacteria[J]. Microbes and Environments, 2014, 29 (2): 184—190.
- [33] Liu Y, Liu X Y, Cheng K, et al. Responses of methanogenic and methanotrophic communities to elevated atmospheric CO₂ and temperature in a paddy field[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1895.
- [34] Das S, Adhya T K. Dynamics of methanogenesis and methanotrophy in tropical paddy soils as influenced by elevated CO₂ and temperature interaction[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2012, 47: 36—45.
- [35] Tokida T, Fumoto T, Cheng W, et al. Effects of free-air CO₂ enrichment (FACE) and soil warming on CH₄ emission from a rice paddy field: Impact assessment and stoichiometric evaluation[J]. Biogeosciences, 2010, 7 (9): 2639—2653.
- [36] Lou Y S, Mizuno T, Kobayashi K, et al. CH₄ production potential in a paddy soil exposed to atmospheric CO₂ enrichment[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2006, 52 (6): 769—773.
- [37] Yang L X, Wang Y L, Huang J Y, et al. Seasonal changes in the effects of free-air CO₂ enrichment (FACE) on phosphorus uptake and utilization of rice at three levels of nitrogen fertilization[J]. Field Crops Research, 2007, 102 (2): 141—150.
- [38] Li Z, Yagi K, Sakai H, et al. Influence of elevated CO₂ and nitrogen nutrition on rice plant growth, soil microbial biomass, dissolved organic carbon and dissolved CH₄[J]. Plant and Soil, 2004, 258 (1): 81—90.
- [39] Wang W Q, Zeng C S, Tong C. Review on the measurement and controlling factors of methane oxidation in wetlands[J]. Journal of Subtropical Resources and Environment, 2007, 2 (3): 55—62. [王维奇, 曾从盛, 全川. 湿地甲烷氧化测定方法及主要控制因子研究综述[J]. 亚热带资源与环境学报, 2007, 2 (3): 55—62.]
- [40] Wang Y Q, Zhang H J, Yang D A, et al. Fractal analysis of the effect of doubled atmospheric CO₂ concentration on root growth of plant seedlings[J]. Chinese Science Bulletin, 1998, 43 (16): 1736—1738. [王义琴, 张慧娟, 杨奠安, 等. 大气 CO₂ 浓度倍增对植物幼苗根系生长影响的分形分析[J]. 科学通报, 1998, 43 (16): 1736—1738.]
- [41] Carini S, Bano N, LeClerc G, et al. Aerobic methane oxidation and methanotroph community composition during seasonal stratification in Mono Lake, California (USA) [J]. Environmental Microbiology, 2005, 7 (8): 1127—1138.
- [42] Dijkstra F A, Morgan J A, LeCain D R, et al. Microbially mediated CH₄ consumption and N₂O emission is affected by elevated CO₂, soil water content, and composition of semi-arid grassland species[J]. Plant and Soil, 2010, 329 (1/2): 269—281.
- [43] Xu C C, Zhang K H, Zhu W Y, et al. Large losses of ammonium-nitrogen from a rice ecosystem under elevated CO₂[J]. Science Advances, 2020, 6 (42): eabb7433.
- [44] Macalady J L, McMillan A M S, Dickens A F, et al. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4 (3): 148—157.
- [45] Liu S W, Ji C, Wang C, et al. Climatic role of terrestrial ecosystem under elevated CO₂: A bottom-up greenhouse gases budget[J]. Ecology Letters, 2018, 21 (7): 1108—1118.
- [46] van Groenigen K J, Osenberg C W, Hungate B A. Increased soil emissions of potent greenhouse gases under increased atmospheric CO₂[J]. Nature, 2011, 475 (7355): 214—216.
- [47] Gu H, Xiao F S, He Z L, et al. Microbial driven methane emission mechanisms in wetland ecosystems[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58 (4): 618—632. [顾航, 肖凡书, 贺志理, 等. 湿地微生物介导的甲烷排放机制[J]. 微生物学报, 2018, 58 (4): 618—632.]
- [48] Alam M S, Jia Z J. Inhibition of methane oxidation by nitrogenous fertilizers in a paddy soil[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 246.
- [49] Zheng J F, Zhang P J, Pan G X, et al. Effect of long-term different fertilization on methane oxidation potential and diversity of methanotrophs of paddy soil[J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28 (10): 4864—4872. [郑聚

- 锋, 张平究, 潘根兴, 等. 长期不同施肥下水稻土甲烷氧化能力及甲烷氧化菌多样性的变化[J]. 生态学报, 2008, 28 (10): 4864—4872.]
- [50] Adamsen A P, King G M. Methane consumption in temperate and subarctic forest soils: Rates, vertical zonation, and responses to water and nitrogen[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59 (2): 485—490.
- [51] Shukla P N, Pandey K D, Mishra V K. Environmental determinants of soil methane oxidation and methanotrophs[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2013, 43 (18): 1945—2011.
- [52] Xie Z B, Zhang Y H, Wang H. Advances and perspectives in paddy biological nitrogen fixation[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57 (3): 540—546. [谢祖彬, 张燕辉, 王慧. 稻田生物固氮研究进展及方向[J]. 土壤学报, 2020, 57 (3): 540—546.]
- [53] Mohanty S R, Bodelier P L E, Floris V, et al. Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1346—1354.
- [54] Shiau Y J, Cai Y F, Jia Z J, et al. Phylogenetically distinct methanotrophs modulate methane oxidation in rice paddies across Taiwan[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2018, 124: 59—69.
- [55] Nyerges G, Han S K, Stein L Y. Effects of ammonium and nitrite on growth and competitive fitness of cultivated methanotrophic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76 (16): 5648—5651.
- [56] Lee H J, Jeong S E, Kim P J, et al. High resolution depth distribution of *Bacteria*, *Archaea*, methanotrophs, and methanogens in the bulk and rhizosphere soils of a flooded rice paddy[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 639.

(责任编辑: 卢 萍)