

水稻田中产甲烷菌数量和优势种*

陈美慈 闵航 钱泽澍

(浙江农业大学环保系, 310029)

摘 要

采用改良的亨格特(Hungate)厌氧技术,用 MPN 法和滚管法同时测定水稻不同生育期土壤中的产甲烷菌数量有明显差异,在混合基质中生长的产甲烷菌数量,早稻在分蘖末期数量最高,可达 3.6×10^{10} 个/克干土;在 H_2 和 CO_2 生长的产甲烷菌数量,晚稻在分蘖盛期明显增高,到乳熟期可高达 3.1×10^{11} 个/克干土;在甲酸钠和乙酸钠基质中生长的产甲烷菌数量,晚稻在分蘖盛期较高,分别达 3.7×10^8 个/克干土和 1.2×10^8 个/克干土;在甲醇基质中生长的产甲烷菌数量,晚稻在各生育期差异不显著。不同深度土壤中产甲烷菌数量无显著差异。施用有机肥料在一定程度上可促进产甲烷菌数量的递增。水稻土中占优势的产甲烷菌群为甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium formicicum*)、马氏甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina mazei*) 和巴氏甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina barkeri*)。

关键词 产甲烷菌,亨格特厌氧技术,优势种

水稻田与其它产甲烷的生态环境(如水生沉积物、污泥、湿树木、瘤胃等)比较,具有它的独特性。在淹水厌氧的生态环境条件下,稻田中复杂的有机物质,如植物残体或腐殖质、或水稻根系的脱落物或分泌物,被各类细菌组成的复杂链将它们转化成较简单的基质—— H_2 、 CO_2 、乙酸、甲酸、甲醇、甲胺等,这些基质供甲烷菌生长,并由其转化成甲烷^[3-5]。因此,水稻与产甲烷菌及甲烷释放量之间有着密切的关系^[6]。为了探究淹水稻田中甲烷释放的生物学机理,本文报道在水稻不同生育期、不同土壤深度及不同施肥种类土壤中的产甲烷菌数量变化趋势和占优势的产甲烷菌。

一、材料和方法

(一) 土壤样品的采集

土壤样品取自本校实验农场,试验田种植面积为 $266.7m^2$,平均分隔成 4 个小区,早稻种植前亩施 625kg 紫云英作基肥,插秧前 1 和 3 小区(简称 1+3 小区)各施牛粪 200kg,2 和 4 小区不施牛粪,供试品种为早莲 31 号,于 1989 年 5 月 3 日插秧;晚稻在同样面积的田块中进行,插秧前 1 和 3 小区各施牛粪 125kg,2 小区施 KCl 2kg,4 小区施菜籽饼 7.5kg,供试品种为秀水 15,并于同年 8 月 2 日插秧。早晚稻田中始终处于淹水状态。采用 5 点取样法,分别在早、晚稻不同的生长发育时期,在植株间用采土器取 20cm 长的土柱,切除土柱两端 2—3cm 的土壤,立即将土柱转移到厌氧培养箱中混合均匀,同时用 MPN 法和滚筒法培养计数(均为 3 次重复的平均值),早、晚稻不同生育期土壤的一些基本状况见表 1。

* 本研究为浙江省自然科学基金资助项目。

(二) 产甲烷菌基础培养基组成

NH_4Cl 1g; 酵母膏 1g; MgCl_2 0.1g; 半胱氨酸 0.5g; KH_2PO_4 0.4g; 刃天青 0.001g; K_2HPO_4 0.4g; 微量元素液 10ml; 水 1000ml; 土壤浸出液(水土比例为 1:1, 充分搅拌, 静止过夜后过滤, 滤液置 4℃ 冰箱保存备用) 100ml; pH 7.0—7.2。

表 1 早、晚稻不同生育期土壤的一些基本状况

Table 1 Some basic properties of the soil at different growing stages of early and late rice

采样日期 Sampling date (1989)	土温 Soil temp. (°C)	$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/100g soil)				pH				
		小区(1+3) Plot (1+3)	小区(2+4) Plot (2+4)	2小区 Plot (2)	4小区 Plot (4)	小区(1+3) Plot (1+3)	小区(2+4) Plot (2+4)	2小区 Plot (2)	4小区 Plot (4)	
早稻	苗后期 (5月14日)	20.0	1.67	1.20	—	—	7.74	7.67	—	—
	分蘖盛期 (5月25日)	19.5	—	—	—	—	7.44	7.64	—	—
	分蘖末期 (6月12日)	22.0	2.57	1.85	—	—	7.33	7.15	—	—
	孕穗末期 (6月23日)	22.0	1.50	0.78	—	—	7.51	7.39	—	—
	乳熟期 (7月5日)	22.0	4.09	1.35	—	—	7.38	7.32	—	—
	收获期 (7月25日)	25.0	1.09	0.92	—	—	7.40	7.63	—	—
晚稻	苗期 (8月7日)	26.0	2.57	—	2.02	2.32	7.38	—	7.30	7.26
	分蘖期 (8月28日)	26.0	1.49	—	1.17	1.16	7.43	—	7.44	7.31
	孕穗期 (9月21日)	22.5	1.67	—	1.87	1.33	7.43	—	7.41	7.41
	乳熟期 (10月5日)	22.5	2.09	—	1.82	1.31	7.40	—	7.45	7.41
	收获期 (10月31日)	18.5	1.65	—	1.30	1.16	7.56	—	7.62	7.61

培养基按亨格特厌氧操作技术配制^[1], 15×150mm 培养管中每支分装 4.5ml, 121℃ 灭菌30min。固体培养基再加 2% 琼脂, 土壤样品稀释前, 每支培养管的培养基中先后加入灭菌无氧的 1% Na_2S , 5% NaHCO_3 混合液 0.1ml, 16 万单位的无氧青霉素液 0.1ml 和所需的各种无菌无氧的产甲烷菌基质。

(三) 培养方法

采用亨格特严格厌氧技术, 测定水稻不同生育期、不同土壤深度及不同施肥种类土壤中的产甲烷菌数量, 将混合均匀的土样以 10 倍系列稀释, 接入不同的产甲烷菌基质的培养管中, 以 H_2 和 CO_2 为产甲烷菌基质的培养管中加入 80% H_2 、20% CO_2 , 即在含有基础培养基的培养管中, 用 H_2 置换 N_2 1 min, 然后注入无氧 CO_2 3ml。以乙酸钠、甲酸钠、甲醇为产甲烷菌基质的培养管中, 每管基础培养基中分别加入 2.5mol/L 乙酸钠、25% 甲酸钠、50% 甲醇各 0.1ml。混合基质即在含有基础培养基的培养管中同时注入 80% H_2 、20% CO_2 , 及乙酸钠、甲酸钠和甲醇各 0.1ml。处理重复 3 次, 35℃ 培养一个月^[2]。

(四) 检测方法

用 MPN 法测定产甲烷菌的数量, 以 CH_4 形成作生长指标。采用上海分析仪器厂 102G 型气相色谱

谱仪测定 CH_4 。滚管法计数则以日产 Olympus BH-2 型荧光显微镜下直接计有荧光的菌落数。

土壤 $\text{NH}_4\text{-N}$ 测定采用康威皿扩散法。土壤含水量测定是在 105°C 烘 8 小时至恒重。

(五) 产甲烷菌纯培养物的分离

为了获得占优势产甲烷菌的纯培养,在计数滚管中出现形态上占优势的单菌落,并经荧光显微镜检查能产生荧光,然后将产荧光的菌落挑入相应的产甲烷菌培养液中培养,并测定能产生 CH_4 。重复上述过程,直至获得纯培养。然后根据形态及培养特性进行鉴定。

(六) 电镜照相

将分离纯化的产甲烷菌细胞悬浮液离心沉淀(8000 转/分,15 分钟),而后用生理盐水将沉淀的细菌细胞分散在生理盐水中,上述过程重复 2 次,将洗净并适当浓缩的细菌悬液进行电镜观察并照相,球状产甲烷菌用日立 S-450 扫描电子显微镜观察并照相。

二、结果与讨论

(一) 水稻不同生育期对土壤中的产甲烷菌数量的影响

表 2 表明,早稻各个不同生育期土壤中的产甲烷菌数量有明显的差异。用 MPN 法测定在混合基质中生长的产甲烷菌数量,在早稻分蘖末期达到最高,为 3.6×10^{10} 个/克干土;用滚管法计数,产甲烷菌数量的变化趋势类似于 MPN 法测定的结果,只是测得的菌数低于 MPN 法。

用 MPN 法测定晚稻不同生育期土壤中的产甲烷菌数量(表 3),在 H_2 和 CO_2 基质中生长的产甲烷菌数量,在分蘖盛期明显增高,到乳熟期可高达 3.1×10^{11} 个/克干土;在甲酸钠和乙酸钠基质中生长的产甲烷菌数量,在分蘖盛期最高,分别达 3.7×10^9 个/克干土和 1.2×10^8 个/克干土,土壤中能利用乙酸钠的产甲烷菌约占利用 H_2 和 CO_2 的产甲烷菌的 0.1%;在甲醇基质中生长的产甲烷菌数量,在晚稻各生育期却无明显差异,高的达 3.5×10^5 个/克干土,数量较少,这可能由于土壤中甲醇含量较低,利用甲醇为基质时一下不能适应之故。用滚管法测得的菌数也低于 MPN 法测得的菌数(表 3)。

表 2 早稻不同生育期土壤在混合基质中的产甲烷菌数量(个/克干土)

Table 2 Amount of MPB in the soil at different growing stages of early rice (No. /g dry soil)

取样日期 Sampling date (1989)	混合基质 Mixed substrates	
	MPN 法 MPN method	滚管法 Roll tube method
苗后期 (5月14日)	3.1×10^6	2.0×10^5
分蘖盛期 (5月25日)	3.4×10^6	2.4×10^5
分蘖末期 (6月12日)	3.6×10^{10}	9.6×10^5
孕穗末期 (6月23日)	2.9×10^7	1.8×10^5
乳熟期 (7月5日)	3.9×10^6	9.8×10^4
收获期 (7月25日)	1.0×10^4	7.1×10^4

试验结果表明, 水稻不同生育期对产甲烷菌的生长发育有很大的影响。淹水稻田中产甲烷的微生物学原理与厌氧反应器中有机物质厌氧发酵的微生物学原理相似, 是通过四大类群微生物的协同联合作用, 最后将土壤中复杂的有机物质降解成 CH_4 和 CO_2 , 而产甲烷菌则是厌氧发酵食物链中的最后一个成员, 是产甲烷作用的关键者^[1]。在水稻田这一独特的厌氧生态环境中, 水稻在各个不同的生长发育阶段, 其根系的分泌物和脱落物的质和量不一样, 对根系周围土壤中微生物的发育提供的营养源也不同, 也就间接地影响了厌氧发酵食物链中的最后成员——产甲烷菌的生长发育。

表 3 晚稻不同生育期土壤在不同基质上的产甲烷菌数量(个/克干土)

Table 3 Amounts of MPB grown on different substrates in the soil at different growing stages of late rice (No. /g dry soil)

取样日期 Sampling date (1989)	H_2/CO_2		甲酸钠 Sodium formate		甲醇 Methanol		乙酸钠 Sodium acetate	
	MPN 法 MPN method	滚管法 Roll tube method	MPN 法 MPN method	滚管法 Roll tube method	MPN 法 MPN method	滚管法 Roll tube method	MPN 法 MPN method	滚管法 Roll tube method
苗期 (8月7日)	4.5×10^7	1.0×10^7	8.5×10^6	3.0×10^6	3.2×10^5	2.7×10^3	1.3×10^5	3.3×10^4
分蘖盛期 (8月28日)	1.2×10^9	7.8×10^7	3.7×10^8	3.7×10^8	2.4×10^4	1.9×10^4	1.2×10^8	1.3×10^5
孕穗期 (9月21日)	1.1×10^{11}	1.3×10^{10}	3.7×10^7	3.7×10^7	1.7×10^5	4.4×10^4	1.0×10^6	9.0×10^4
乳熟期 (10月5日)	3.1×10^{11}	1.1×10^{10}	4.5×10^7	4.5×10^7	3.5×10^5	1.5×10^5	1.5×10^7	7.8×10^4
收获期 (10月31日)	1.6×10^{10}	1.8×10^{10}	7.0×10^7	7.0×10^7	2.2×10^5	1.3×10^3	1.2×10^6	2.1×10^5

本试验计甲烷菌数量时, 用滚管法和 MPN 法同时进行, 这样可以直接比较两种方法的优缺点。滚管法的优点是可以直接从稀释样品的滚管中选取占优势的产甲烷菌菌落进行分离纯化, 但缺点是计数较麻烦, 需在荧光显微镜下逐个检查有荧光的菌落, 且制备滚管较费时; MPN 法的优点是计数较简便, 只要测定 CH_4 有否形成作生长指标, 但缺点是不能直接观察到占优势的产甲烷菌菌落。因此, 我们认为, 应根据研究的目的来选取何种方法, 如既要计数, 又要分离纯化占优势产甲烷菌, 还是以滚管法为好; 如只要计甲烷菌数量, 则以 MPN 法为好, 但这二种方法计数得出的甲烷菌数量以 MPN 法高于滚管法。

(二) 晚稻不同土壤深度对产甲烷菌数量的影响

表 4 表明, 在以 H_2 和 CO_2 为基质, 3 次测定早稻田不同深度土壤中的产甲烷菌数量差异并不显著。这一现象可解释为在始终处于淹水状态的早稻田中, 从表层到 18cm 深之间的土壤其氧化还原电位均可适应产甲烷菌的生长发育^[2]。

(三) 施肥种类对稻田土壤产甲烷菌数量的影响

4 次测定结果表明, 施牛粪小区高于不施牛粪小区中的产甲烷菌数量(表 5)。施牛粪小区和施菜饼小区的产甲烷菌数量明显高于施氯化钾小区中的产甲烷菌数量(表 6)。试验结果表明, 施用有机肥料(腐熟牛粪或菜饼)能促进土壤中产甲烷菌数量的递增。

表 4 早稻田不同深度土壤中的产甲烷菌数量 (个/克干土)

Table 4 Amounts of MPB in the early rice field at different soil depths (No. /g dry soil)

采样日期 Sampling date (1990)	产甲烷基质 MPB Substrates	土壤深度 Depth of soil (cm)		
		0—5	5—13	13—18
5月25日	H ₂ /CO ₂	2.7×10 ¹⁰	3.3×10 ¹⁰	4.8×10 ¹⁰
6月13日	H ₂ /CO ₂	4.7×10 ⁶	4.7×10 ⁷	1.4×10 ⁶
6月25日	H ₂ /CO ₂	5.8×10 ⁹	7.4×10 ⁹	5.6×10 ⁹

表 5 施牛粪对早稻土壤中产甲烷菌数量的影响(个/克干土)

Table 5 Effect of cow dung application on the amounts of MPB in early rice soils (No. /g dry soil)

采样日期 Sampling date (1989)	混合基质 Mixed substrates	
	施牛粪 With cow dung	不施牛粪 Without cow dung
5月14日	5.3×10 ⁶	9.4×10 ⁵
5月25日	6.3×10 ⁶	3.7×10 ⁵
6月23日	5.7×10 ⁷	4.3×10 ⁵
7月25日	1.4×10 ⁴	5.7×10 ³

表 6 不同施肥种类对晚稻土壤中的产甲烷菌数量的影响

Table 6 Effect of different fertilizers on the amounts of MPB in late rice soils (No. /g dry soil)

采样日期 Sampling date (1989)	H ₂ /CO ₂		
	施牛粪 Cow dung	施 KCl KCl	施菜饼 Cake fertilizer
8月7日	6.0×10 ⁷	7.9×10 ⁶	6.8×10 ⁷
8月28日	1.4×10 ⁹	5.0×10 ⁵	2.1×10 ⁹
9月21日	8.5×10 ¹⁰	6.1×10 ⁸	2.4×10 ¹¹
10月5日	5.3×10 ¹¹	6.0×10 ⁹	3.9×10 ¹¹
10月31日	4.3×10 ¹⁰	4.0×10 ⁸	4.3×10 ⁹

(四) 水稻土中占优势的产甲烷菌群

水稻土中占优势的产甲烷菌群有：(1)甲酸甲烷杆菌(图版 I, 照片 1), 在以甲酸钠为基质的滚管中, 单个菌落呈圆形, 放射丝状, 边缘整齐, 灰白色, 菌落直径为 1—1.5mm 左右, 在 420nm 紫外光激发下产生强蓝绿色荧光, 持续时间较长。单个菌体不运动和不形成芽孢, 细胞大小为 0.4—0.5×2—6μm, 培养后期, 单个细胞排列成长丝状, 以 H₂ 和 CO₂、甲酸钠为生长和产甲烷基质。(2)马氏甲烷八叠球菌(图版 I, 照片 2), 在以甲醇为基质的滚管中, 单个菌落圆形, 直径为 1mm 左右或更大, 并可出现囊状气泡, 使菌落呈不规则图案形, 淡黄色, 半透明粘液状, 蓝绿色荧光强, 液体培养后期颗粒体分散。(3)巴氏甲烷八叠球菌, 在以甲醇为基质的滚管中出现的单个菌落为不规则的圆形, 菌落表面呈砂粒状堆

积, 淡褐色, 直径为 2—3mm 左右, 在 420 nm 紫外光激发下产生强蓝绿色荧光。菌体形态见图版 1, 照片 3。

参 考 文 献

1. 钱泽澍、闵 航, 1986: 沼气发酵微生物学。201—229页, 浙江科技出版社。
2. 闵 航、赵字华、陈美慈、钱泽澍, 1987: 管道厌氧消化器处理柠檬酸生产废水中的微生物学特性 II、产甲烷菌区系分析。中国沼气, 第 4 期, 1—5页。
3. Cicerone, R. J. and Shetter, J. D., 1983: Seasonal variation of methane flux from a California rice paddy. Journal of Geophysical Research. (88): 11022—11024.
4. Cicerone, R. J. and Shetter, J. D., 1981: Sources of atmospheric methane: Measurements in rice paddies and a discussion. Journal of Geophysical Research. (86):7203—7209.
5. Holzapfel-Pschorn, A., Conrad R. and Seiler, W., 1986: Effect of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. Plant and Soil. (92):223—233.
6. Schutz, H., Seiler, W. and Conrad, R., 1989: Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. Biogeochemistry. (7):33—53.

AMOUNT AND DOMINANT SPECIES OF MPB IN SUBMERGED PADDY SOIL

Chen Meici, Min Hang and Qian Zeshu

(Zhejiang Agricultural University, 310029)

Summary

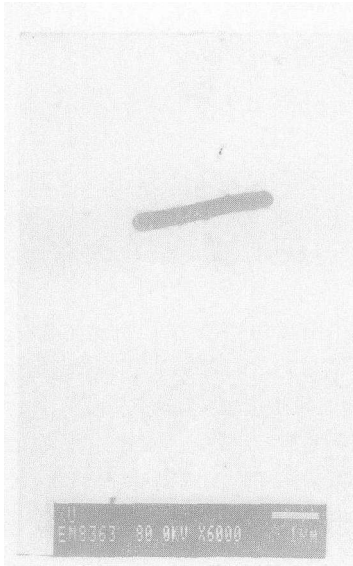
With improved Hungate anaerobic technique, the amounts of methane — producing bacteria (MPB) in the submerged paddy soil planting rice crop were determined by the MPN (The Most Probable Number) method and the roll tube method at the same time. The results obtained showed that the amounts of MPB during different growing periods of rice were significantly different, the amount of MPB grown on mixed substrate was the highest at the late tillering stage of early rice, up to $3.6 \times 10^{10}/g$ dry soil; that on H_2/CO_2 increased significantly at the vigorously tillering stage of late rice, reaching $3.1 \times 10^{11}/g$ dry soil at milk ripening stage; the amounts of MPB grown on formate and acetate were higher, about $3.7 \times 10^8/g$ dry soil and $1.2 \times 10^8/g$ dry soil respectively at the vigorously tillering stage of late rice; and that of MPB grown on methanol had no significant difference during the different growing periods being, about $3.5 \times 10^5/g$ dry soil.

The amounts of MPB had no marked difference in soil at different depths.

A certain difference was found in the number of MPB under conditions of different kinds of fertilizers applied, and addition of organic manure stimulated methane production.

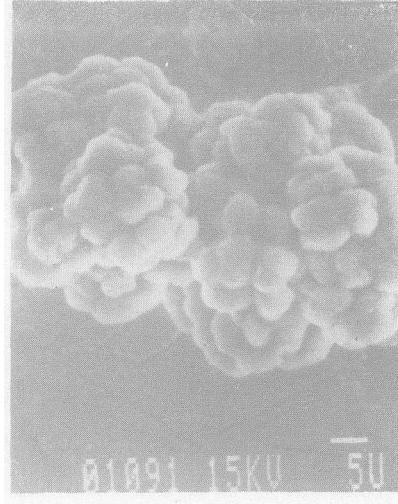
The dominant species of methanogenic bacteria in the paddy soil were *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri* and *Methanosarcina mazei*.

Key words Methane—Producing Bacteria (MPB), Hungate anaerobic technique, Dominant species



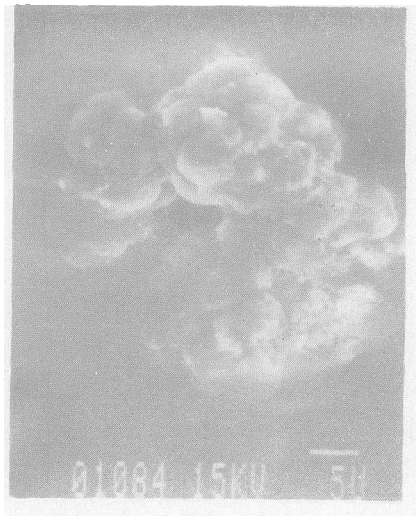
照片 1 甲酸甲烷杆菌电镜照片(×6000)

Fig. 1 Electron micrograph of (×6000)
Methanobacterium formicicum



照片 2 马氏甲烷八叠球菌扫描电
镜片(×1500)

Fig. 2 Scanning electron micrograph of
Methanosarcina mazei (×1500)



照片 3 巴氏甲烷八叠球菌扫描电镜照片(×2000)

Fig. 3 Scanning electron micrograph of *Methanosarcina barkeri* (×2000)