

水稻田土壤甲烷氧化活性及其环境影响因子的研究*

闵 航 陈中云 陈美慈

(浙江大学生命科学学院, 华家池校区, 杭州 310029)

摘 要 报道环境因子土壤含水量、温度和 pH 对发育于河流沉积物母质的水稻田土黄松泥田土氧化外源甲烷活性影响的研究结果。表明土壤中存在有氧和无氧两个甲烷氧化系统。有氧甲烷氧化系统 (AMOS) 最适条件下的氧化甲烷最大活性比无氧甲烷氧化系统 (AAMOS) 最适条件下的氧化甲烷最大活性高 1 至 2 倍。在土壤通气良好的条件下, AMOS 占主导地位, 在无氧或极微氧的土壤中, AAMOS 起主要作用。影响活性的主要因子是土壤的分子氧含量、甲烷含量、水含量、温度和 pH 值。分子氧对 AAMOS 氧化甲烷的活性具有一定抑制作用, 土壤中甲烷量和含水量对 AAMOS 氧化甲烷活性的影响比对 AMOS 氧化甲烷活性的影响更为强烈。土壤氧化甲烷的活性对温度较为敏感, 其最适氧化甲烷的温度范围在 25~ 35 °C 之间。当土壤在 50 °C 培养的时间超过 6h 后, 土壤氧化外源甲烷的活性全部丧失, 且不能在 28 °C 下得到恢复。pH 是另一个影响土壤氧化甲烷的重要环境因子。其最适 pH 范围在 6~ 7 之间, pH 低于 3 或 pH 高于 9 时, 几乎完全丧失氧化外源甲烷的活性。

关键词 黄松泥田土, 甲烷氧化活性, pH, 温度, 湿度, 氧含量

中图分类号 S154

据 IPCC^[1] 估计, 目前全球甲烷排放总量为每年 540 Tg, 其中 70% 属生物起源。湿地水稻则是大气甲烷的重要生物源之一, 每年约有 20~ 100 Tg 甲烷从稻田排放到大气, 占全球总排放量 4% ~ 19%。因此, 控制和减少稻田土壤的甲烷排放量, 也即在控制和减少水稻田土壤甲烷形成量的同时, 以加强和促进土壤中的甲烷氧化速率和数量, 对降低温室效应的贡献具有同等重要性。水稻田甲烷的生物学性氧化是由甲烷氧化菌类群推动的^[2~ 4]。因此影响甲烷氧化菌的环境因子必然影响水田土壤的甲烷氧化。然而对于土壤中甲烷氧化的微生物学机理及其影响因素积累的资料不多, 国内尤其更少。

本文报道环境因子(土壤含水量、温度和 pH 等)对黄松泥田水稻土壤的甲烷氧化活性影响的研究, 以了解环境因子与黄松泥田土氧化甲烷活性之间的关系, 为提高水稻田土壤氧化甲烷活性和控制稻田土甲烷释放量提供理论依据。

* 国家自然科学基金(39870033)、中国科学院南京土壤研究所开放实验室(971531)和国家教育部留学回国人员基金项目

收稿日期: 2001- 01- 11; 收到修改稿日期: 2001- 08- 29

1 材料和方法

1.1 供试土样及其处理

土壤样品采自浙江大学华家池校区发育于河流沉积物母质的水稻田土黄松泥田土的 A 层土, 每次多点取土若干, 捣碎混匀, 除去杂质。上述土样于室温干燥若干时间, 测土样含水量^[5] (使供试土样的水重在 18% 左右)。然后用 100 目的筛子再去杂质, 置若干于 1000 ml 的试剂瓶, 在 28℃ 好氧培养二周, 除去易被微生物分解的有机质, 作为供试土使用。pH 和各种理化性质见表 1。

表 1 黄松泥田土的主要理化性状

Table 1 Some important physical and chemical properties of tested Huangsong paddy soil

土样名称 Name of soil	pH	电导率 Electric conductivity ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	水解性 N Solubility N (mg kg^{-1})	有效 P Available P (mg kg^{-1})	速效 K Available K (mg kg^{-1})	活性有机质 Active organic matter(g kg^{-1})
黄松泥田土	7.15	2.12×10^2	88.54	43.8	48.98	22.2

测定 pH 方法: 水土 = 1:3 搅拌均匀, 用 SPM 10A 数字酸度计测 pH 值; 电导测定: 采用 DDS-11A 型电导率仪测定; 有效磷测定: $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{NaHCO}_3$ 浸提, 钼锑抗比色测定; 速效钾测定: $1 \text{ mol L}^{-1} \text{NH}_4\text{OAc}$ 浸提, 火焰光度法; 水解性 N 测定: 碱解扩散法; 活性有机质测定: 稀释热法

1.2 含水量试验

取若干 100 ml 的血清瓶, 称 20 g 供试土加入血清瓶中, 再分别加入不同量的蒸馏水调不同含水量的供试土。血清瓶用异丁基橡胶塞密封, 然后加入 0.5 ml 纯甲烷, 于 28℃ 培养。在不同时间测血清瓶中的甲烷量。

1.3 温度试验

取若干 100 ml 的血清瓶, 称 20 g 供试土加入血清瓶中, 其水重控制在 23% 左右。然后血清瓶用异丁基橡胶塞密封, 再加入 0.5 ml 纯甲烷。放在不同温度的恒温箱中培养, 在不同时间测血清瓶中的甲烷量。

1.4 pH 试验

取若干 100 ml 的血清瓶, 称 20 g 供试土, 分别加不同量的 $1 \text{ mol L}^{-1} \text{NaOH}$ 和 $1 \text{ mol L}^{-1} \text{HCl}$, 调节不同 pH (供试土的水重最终控制在 23% 左右)。然后血清瓶用异丁基橡胶塞密封, 再加入 0.5 ml 纯甲烷。置 28℃ 培养, 在不同时间测血清瓶中的甲烷量, 培养 1d 后测定供试土的 pH 值。

1.5 换气培养

取若干 100 ml 的血清瓶, 称 20 g 供试土加入血清瓶中。然后血清瓶用异丁基橡胶塞密封, 用 99.999% 的氮气置换血清瓶中的空气 5 min, 于 28℃ 培养。在不同时间检测血清瓶中的甲烷量。

1.6 甲烷的气相色谱仪测定

利用 102G 型气相色谱仪氢火焰检测器检测甲烷含量。以 100% 纯甲烷气体作标准气体, 在 100 ml 血清瓶中加入不同量的标准甲烷气体, 获得不同浓度的标准气体, 然后制作甲烷含量与峰高的标准曲线。样品中甲烷含量根据标准曲线进行换算。甲烷检测条件: N_2 25 ml min^{-1} , H_2 $60 \sim 70 \text{ ml min}^{-1}$, 空气 $600 \sim 700 \text{ ml min}^{-1}$, 层析柱温 38℃, 担体 GDX-502, 出峰时间为 17s。

本文数据为多次重复结果。

2 结果

2.1 土壤含水量对有氧甲烷氧化系统(AMOS)的甲烷氧化活性的影响

图1表示不同含水量对好氧性培养的供试土氧化外源甲烷活性的影响。分析图1曲线,曲线可分成3个区域。区域I水重从0~24.29%,土壤氧化外源甲烷的活性从0到最高,达到 $1.24 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土。在此含水量区域,供试土含有充足的分子氧和甲烷,因此影响甲烷氧化活性的主要因素是含水量。水重从24.29%~77.57%范围区域II,氧化外源甲烷的活性从最高 $1.24 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土渐渐下降到 $0.08 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土。此含水量范围区域的土壤中含有充足水分,但随着土壤含水量增加,氧和甲烷的扩散进入土壤甲烷氧化微生物处的速率受到限制,使土壤中氧和甲烷含量下降,好氧性甲烷氧化菌氧化外源甲烷活性也随之下降。当水重达到77.57%时,土壤好氧性甲烷氧化菌氧化外源甲烷活性降到 $0.08 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土。表明土壤的氧和甲烷含量是影响这一含水量范围区域甲烷氧化活性的主要因素。区域III水重范围在77.57%~195.93%之间,供试土氧化外源甲烷的活性几乎没有多大变化,都在 $0.08 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土左右。此区域含水量都处在过饱和和持水状态(可见明水),分子氧和甲烷难以迅速扩散进入土壤是影响氧化外源甲烷活性的主要因素。

2.2 土壤含水量对无氧甲烷氧化系统(AAMOS)的甲烷氧化活性的影响

经统计分析表明,在血清瓶上部空间换氮气培养的2d以内,水重在18.37%以下的供试土氧化外源甲烷活性与水重为18.37%及其以上的供试土氧化外源甲烷活性之间达到极显著性差异($P < 0.01$),而水重为18.37%的供试土氧化外源甲烷活性与水重大于18.37%的供试土氧化外源甲烷活性之间未达到显著性差异($p > 0.05$),因此时土壤中都还存在微量的分子氧。但培养时间超过3d后,由于土壤的微量分子氧已经被好氧性甲烷氧化菌耗尽,而厌氧性甲烷氧化菌氧化活性开始增强,使土壤的甲烷氧化活性之间出现显著性的差异如图2。图2曲线可分成4个区域。区域I水重范围为0%~24.29%,土壤氧化外

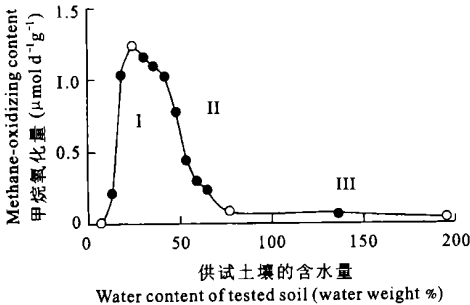


图1 不同含水量对供试土壤在28℃好氧24h培养下氧化甲烷活性的影响

Fig.1 Effect of water contents on the activity of methane oxidation in tested soil at 28℃ during aerobic incubation for 24h

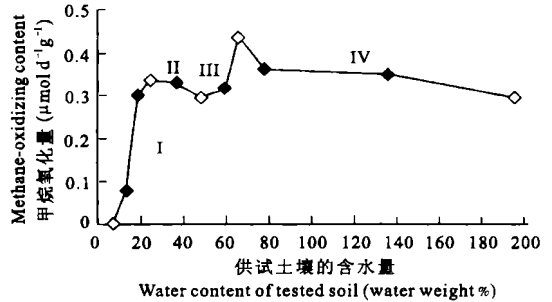


图2 不同含水量对供试土壤在28℃换氮气培养3d的甲烷氧化活性的影响

Fig.2 Effect of water contents on the activity of methane oxidation in tested soil incubated under anaerobic nitrogen gas at 28℃for 3days

源甲烷活性从 $0 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土逐渐上到 $0.34 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土。影响此含水量范围土壤氧化外源甲烷活性的主要因素是土壤中残剩的微量分子氧和含水量, 随着含水量增高, 土壤氧化甲烷的活性随之增高, 与图 1 相似。区域 II 水重在 24.29% ~ 48.28% 范围。比较图 1 和图 2 的区域 II, 可见随着含水量的升高与土壤中残留微量氧的耗尽, 好氧性甲烷氧化菌氧化甲烷的活性下降。但此时无氧甲烷氧化系统的甲烷氧化菌氧化甲烷的活性尚没有被活化, 区域 II 曲线滞留在 $0.34 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土到 $0.297 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土范围内同一水平。区域 III 水

重范围 48.28% ~ 65.72%。从图 1 可见随着含水量的进一步升高, 好氧甲烷氧化菌氧化甲烷的活性进一步下降。可图 2 区域 II 的曲线不仅没有下降, 反而从 $0.297 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土上升到 $0.44 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土。表明土壤中另存在一个有别于有氧甲烷氧化系统 (AMOS) 的无氧甲烷氧化系统 (AAMOS)。由于 AAMOS 的甲烷氧化菌氧化甲烷的活性被活化, 土壤氧化甲烷的活性不仅没有下降反而有所上升。区域 IV 水重范围在 65.72% ~ 195.93% 之间。随着含水量的进一步上升达到过饱和持水状态以上, 甲烷的扩散进一步

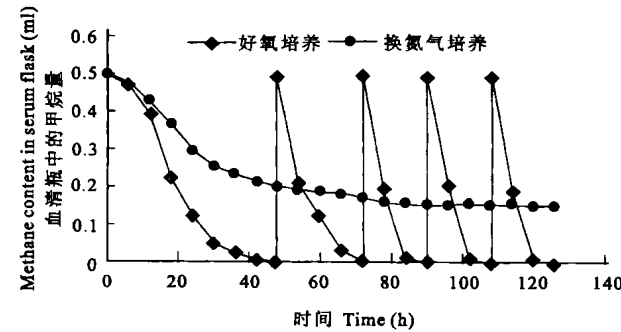


图 4 含水量为 24.29% (水重%) 的供试土壤在 28°C 培养时的甲烷氧化动力学曲线 (曲线直线上升处表示此时再次加入甲烷)

Fig. 4 Dynamic curve of methane oxidation in tested soil with 24.29% (water weight%) of water content incubated at 28°C

受阻, 土壤中的甲烷量进一步减少, 甲烷氧化活性也受到影响, 逐步从 $0.44 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土降到 $0.293 \mu\text{mol d}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土, 此含水量范围土壤内的甲烷含量是影响 AAMOS 活性的主要因素之一。水重为 65.72% 的供试土与水重为 195.93% 供试土氧化外源甲烷活性的差异见图 3。进一步的研究比较发现水重小于 24.29% 的供试土, 在置换氮气培养 7d 后, 血清瓶中甲烷量和培养 3d 时的血清瓶中甲烷量之间无显著性的差异 (图 4)。水重大于 195.93% 的供试土, 在置换氮气

培养 5d 左右, 血清瓶中原有的 0.5 ml 甲烷已完全被氧化 (图 4)。从上述可见土壤中存在有二种甲烷氧化系统, 在有氧的条件下, AMOS 占主导地位, 水重在 23% 左右的供试土氧化甲烷活性最高, 与已报道的结果相符^[6]。在无氧条件下, AAMOS 起主要作用, 水重在 65% 左右的供试土氧化甲烷的活性最高。

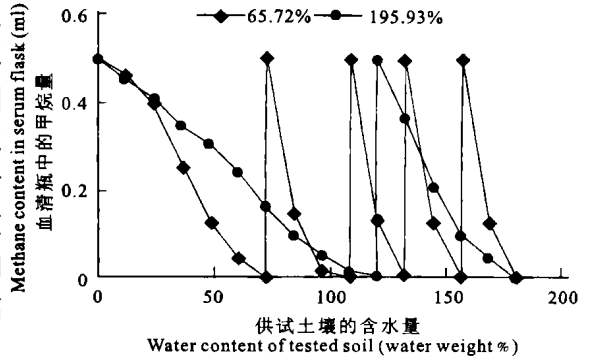


图 3 置换氮气后不同含水量的供试土壤的甲烷氧化动力学曲线 (曲线直线上升处表示此时加入甲烷)

Fig. 3 Dynamic curve of methane oxidation in tested soil incubated at 28°C under anaerobic nitrogen gas

2.3 温度与黄松泥田土氧化外源甲烷活性的关系

图5表明温度是另一个影响土壤甲烷氧化活性的重要环境因子。当土壤温度范围在25~ 35℃之间,其氧化外源甲烷速率达到最大值。当土壤温度低于10℃时,土壤氧化外源甲烷速率很低,只有最大氧化外源甲烷活性的5%至0%之间。42℃似乎是土壤甲烷氧化菌的高限生长温度,超过这一温度,土壤氧化外源甲烷活性难以检测到。当把供试土壤先分别置于4℃、10℃、42℃、45℃和50℃培养48h后,再把在各温度培养的供试土放回到28℃培养,各土壤氧化外源甲烷活性都能很快恢复。在50℃培养5h以内,再放回到28℃培养时,土壤氧化外源甲烷活性仅能部分恢复,在50℃培养的时间越短,土壤氧化外源甲烷活性恢复越快。如果在50℃培养时间超过6h时,土壤氧化外源甲烷活性就不能恢复。表明土壤中的甲烷氧化菌对高温较为敏感,土壤温度超过50℃就能使土壤中的甲烷氧化菌丧失氧化外源甲烷的能力。这一结果与现还没有发现在50℃以上能生长的甲烷氧化菌的报道相一致^[3]。也与本实验室所分离的好氧性和厌氧性甲烷氧化菌菌株的特性相一致^{[11], (1)}。

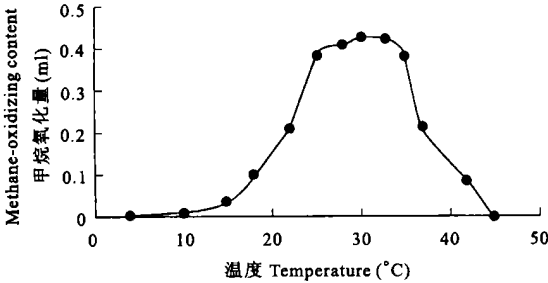


图5 不同温度对培养24h的供试土壤甲烷氧化活性的影响

Fig.5 Effect of incubation temperature on the activity of methane oxidation in tested soil incubated for 24 hours

土壤温度超过50℃就能使土壤中的甲烷氧化菌丧失氧化外源甲烷的能力。这一结果与现还没有发现在50℃以上能生长的甲烷氧化菌的报道相一致^[3]。也与本实验室所分离的好氧性和厌氧性甲烷氧化菌菌株的特性相一致^{[11], (1)}。

2.4 pH与黄松泥田土甲烷氧化活性之间的关系

从图6可见土壤pH在3.5~ 8.5之间,土壤具有氧化外源甲烷的活性。土壤pH低于3或高于9的土壤几乎都丧失氧化甲烷的能力。土壤最适氧化外源甲烷的pH范围在6~ 7之间。表明微酸性的土壤环境较微碱性的土壤环境更适合于土壤甲烷氧化菌氧化外源甲烷。

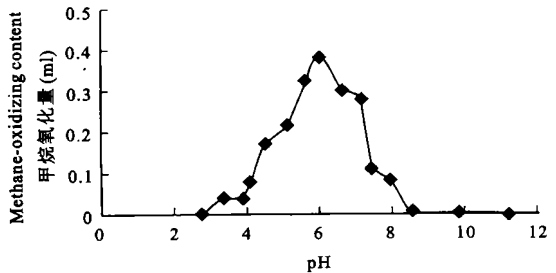


图6 不同pH对在28℃培养24h的供试土壤甲烷氧化活性的影响

Fig.6 Effect of pH on the activity of methane oxidation in tested soil incubated for 24 hours

3 讨论

图4表明,当土壤水重在小于24.29%时,在有氧条件下,土壤具有氧化外源甲烷

的能力,起主要作用的是AMOS,具有较高的氧化甲烷能力,在50h左右即可将0.5 ml 甲烷完全氧化,再加入0.5 ml 甲烷时氧化时间大大缩短,仅需20h左右即可完全氧化。以后连续加入0.5 ml 甲烷,都以更快的速度被完全氧化。而在无氧(即置换氮气)条件下,呈现出甲烷氧化活性,但相对速度较低。说明AAMOS对水分的要求比AMOS对水分需求要

(1) 谭玉龙. 一个厌氧氧化甲烷菌株的分离和特性的研究. 浙江大学硕士学位论文. 2000

高以形成一个厌氧环境。从图 1、2、3 可见, 当土壤水重在 45% ~ 80% 时, 不论是在有氧还是在无氧的条件下, 土壤都具有氧化外源甲烷的能力。图 3 表明水重在 65.72% 时, 土壤中 AAMOS 氧化外源甲烷的活性较高。最高达 $0.105 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ 干土, 比水重在 195% 左右的土壤 AAMOS 的甲烷氧化活性还要高, 氧化甲烷速率更快。这个差异可能是水重在 65.72% 时甲烷扩散入土壤的速度较之水重在 195% 时要快的缘故。表明分子氧、甲烷含量、水含量是影响土壤氧化甲烷活性的主要因素, 且分子氧对 AAMOS 氧化外源甲烷活性有明显抑制作用。土壤中甲烷和水的含量对 AAMOS 氧化甲烷活性的影响比对 AMOS 氧化甲烷活性的影响更大。因为当土壤含水量低、通气性好, 土壤中产甲烷菌的产甲烷活性就低^[7-9], 甲烷含量即低, 即产甲烷菌不能提供足够的甲烷供土壤中的甲烷氧化菌生长, 而当含水量大于土壤饱和持水量时, 土壤转为厌氧环境, 产甲烷菌的产甲烷活性就高, 产甲烷菌能产生足够的甲烷量, 提供甲烷氧化菌生长, 并有可能有多余的甲烷释放出土壤^[6,10]。

综上所述, 土壤中存在两个甲烷氧化系统: 有氧和无氧甲烷氧化系统。在通气性好、甲烷含量低的土壤中, 起主要作用的是有氧甲烷氧化系统, 影响其活性的环境因子主要是土壤的分子氧含量, 含水量、甲烷量、温度和 pH 对甲烷氧化活性也有影响; 在通气性差、甲烷含量较高的土壤中, 起主要作用的是厌氧甲烷氧化系统, 影响其活性的环境因子主要是土壤的分子氧含量、甲烷量、含水量, 温度和 pH 对其也有影响。

参 考 文 献

1. IPCC. Climate Change: The Supplementary Report to the IPCC Scientific Assessment. 1992. 5~ 19
2. Gilbert B, Frenzel P. Rice roots and CH_4 oxidation: the activity of bacteria, their distribution and the microenvironment. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30(14): 1903~ 1916
3. Robert K Poole. *Microbial Gas Metabolism*. London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: Academic Press, 1985
4. Sass R L. Methane from irrigated rice cultivation. *Current Topics in Wetland Biogeochemistry*, 1996, 2: 24~ 39
5. 土壤标准分析(日). 测定法委员会编. 秦荣大, 郑永章译. 土壤分析标准方法. 北京大学出版社, 1988
6. Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic Bacteria. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(2): 439~ 471
7. Min Hang, Chen Meichi. Effect of land use history on methane emission and methanogenic flora in flooded soils. *Pedosphere*, 1996, 6(1): 73~ 80
8. Min Hang, Zhao Yuhua, Chen Meichi, *et al.* Methanogens in paddy rice soil. *Nutrient Cycling in Agr. Ecosystems*, 1997, 49: 143~ 148
9. Rocco L Mancinelli. The regulation of methane oxidation in soil. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, 49: 581~ 605
10. Ralf Conrad. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2 , CO, CH_4 , OCS, N_2O , and NO). *Microbiological Reviews*, 1996, 60(4): 609~ 640
11. 陈中云, 吴伟祥, 闵航, 等. 两株能利用甲烷的吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 的分离和鉴定. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2000, 26(4): 384~ 388

EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON METHANE OXIDIZING ACTIVITY IN PADDY SOIL

Min Hang Chen Zhongyun Chen Meici

(*College of life Science, Zhejiang University, Hujiachi Campus, Hangzhou 310029*)

Summary

Effect of environmental factors on oxidation activity of added methane in Huangsong paddy soil developed from fluvial aquatic matrix was studied. The results indicated that there existed two methane oxidizing systems found in soil, an aerobic methane oxidizing system (AMOS), and an anaerobic methane oxidizing system (AAMOS). The maximal activity of methane oxidation of AMOS was higher than that of AAMOS. Under aerobic condition, the methane oxidizing activity of AMOS was affected mainly by the contents of oxygen, water, methane and pH, temperature in soil. The methane oxidizing activity of AAMOS, however, was mainly affected by the contents of oxygen, methane, water and also by pH, temperature in soil under anaerobic condition. Oxygen inhibited the activity of methane oxidation of methane oxidizing bacteria of AAMOS. The optimum temperature for methane oxidizing activity lied from 25 °C to 35 °C. After incubation at 50 °C for over 6 hours the tested paddy soil was unable to restore the oxidation activity of added methane when incubated again at 28 °C, indicating that oxidation activity of added methane was completely lost. The optimum pH ranged from 6 to 7 for methane oxidizing activity.

Key words Huangsong paddy soil, Activity of methane oxidation, pH, Temperature, Water content, Oxygen content