

戴蕾, 王艳萍, 白亚南, 沈李东. 稻田根际与非根际亚硝酸盐型厌氧甲烷氧化过程研究[J]. 土壤学报, 2025,

DAI Lei, WANG Yanping, BAI Yanan, SHEN Lidong. Study on the Process of Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation in Rhizosphere and Bulk Soils of Paddy Fields[J]. Acta Pedologica Sinica, 2025,

# 稻田根际与非根际亚硝酸盐型厌氧甲烷氧化过程研究 \*

戴 蕾, 王艳萍, 白亚南<sup>†</sup>, 沈李东

(南京信息工程大学生态与应用气象学院, 中国气象局生态系统碳源汇重点开放实验室, 南京 210044)

**摘要:** 稻田是重要的人为甲烷排放源, 厌氧甲烷氧化 (Anaerobic oxidation of methane, AOM) 是减少稻田甲烷排放的重要途径。氮肥施用使得亚硝酸盐成为稻田 AOM 过程的主要电子受体, 然而有关根际土亚硝酸盐型 AOM 活性大小和功能微生物群落特征尚不清楚。本研究通过室内泥浆培养结合  $^{13}\text{CH}_4$  稳定性同位素示踪技术、定量 PCR 和高通量测序技术, 系统探究不同施肥处理下 (CF: 无机肥, OF: 有机肥配施无机肥, SF: 粪秆还田配施无机肥) 稻田根际土和不同深度非根际土 (0~10、10~20 和 20~30 cm) 亚硝酸盐型 AOM 活性、NC10 细菌基因丰度及群落结构特征。结果表明, 根际土亚硝酸盐型 AOM 活性为  $1.03\text{--}2.42 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 显著高于 0~10、10~20 和 20~30 cm 非根际土 AOM 活性, pH、有机碳和亚硝态氮含量是影响 AOM 活性的主要环境因子。并且, 根际土和 0~10 cm 非根际土 NC10 细菌基因丰度 ( $4.49\times 10^6\text{--}2.37\times 10^7 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 显著高于 10~20 和 20~30 cm 非根际土 ( $1.31\times 10^6\text{--}1.25\times 10^7 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ )。此外, 高通量测序发现 NC10 细菌群落结构在根际土和非根际土之间表现出显著差异, 土壤含水量、pH 以及硝态氮含量是影响 NC10 细菌群落结构的主要环境因子。研究结果揭示了不同施肥处理下稻田根际土和非根际土亚硝酸盐型 AOM 活性及微生物群落结构差异, 表明根际是亚硝酸盐型 AOM 的活性热区, 该发现有助于深入理解稻田 AOM 过程, 为稻田甲烷减排提供理论依据。

**关键词:** 稻田; 根际和非根际土; 亚硝酸盐型厌氧甲烷氧化; 活性; 群落结构

中图分类号: Q938.1; S154.36 文献标志码: A

## Study on the Process of Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation in Rhizosphere and Bulk Soils of Paddy Fields

DAI Lei, WANG Yanping, BAI Yanan<sup>†</sup>, SHEN Lidong

(Key Laboratory of Ecosystem Carbon Source and Sink, China Meteorological Administration (ECSS-CMA), School of Ecology and Applied Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China)

**Abstract:** 【Objective】Paddy fields are significant anthropogenic sources of methane emissions, and anaerobic oxidation of methane (AOM) is an important pathway for mitigating methane emissions from paddy fields. The application of nitrogen

\* 国家自然科学基金青年基金项目 (42207270) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 42207270)

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

作者简介: 戴 蕾 (1998—), 女, 浙江安吉人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: daily0808@163.com

收稿日期: 2025-03-25; 收到修改稿日期: 2025-08-22; 网络首发日期 (www.cnki.net) : 2025-09-24

fertilizers in paddy fields makes nitrite a primary electron acceptor for AOM. However, existing studies have focused on nitrite-dependent AOM in bulk soils of paddy fields, leaving the activity and functional microbial community characteristics of nitrite-dependent AOM in rhizosphere soils poorly understood. 【Method】 Through indoor slurry incubation experiments combined with  $^{13}\text{CH}_4$  stable isotope tracing, quantitative PCR, and high-throughput sequencing, this study systematically investigated the nitrite-dependent AOM activity, NC10 bacterial gene abundance, and community structure in rhizosphere soils and bulk soils at different depths (0-10, 10-20 and 20-30 cm) under different fertilization treatments (CF: chemical fertilizer; OF: organic fertilizer combined with chemical fertilizer; SF: straw return combined with chemical fertilizer). 【Result】 The results showed that the nitrite-dependent AOM activity in rhizosphere soils ranged from 1.03 to 2.42  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , which was significantly higher than that in 0-10 cm, 10-20 cm, and 20-30 cm bulk soils, respectively. The pH, soil organic carbon (SOC), and nitrite contents were identified as the main environmental factors influencing nitrite-dependent AOM activity. The NC10 bacterial gene abundance in 0-10 cm bulk soils ranged from  $7.44\times 10^6$  to  $2.39\times 10^7$  copies  $\cdot\text{g}^{-1}$ , which was significantly higher than that in rhizosphere soils, 10-20 cm, and 20-30 cm bulk soils, respectively. Correlation analysis revealed that SOC was the primary factor affecting NC10 bacterial abundance. Additionally, high-throughput sequencing revealed significant differences in NC10 bacterial community structure between rhizosphere and bulk soils. PCoA analysis indicated that soil water content, pH, and nitrate content were the main environmental factors influencing NC10 bacterial community structure. 【Conclusion】 These findings demonstrate significant differences in nitrite-dependent AOM activity, NC10 bacterial abundance and community structure between rhizosphere and bulk soils under different fertilization treatments. The findings demonstrate that the rhizosphere serves as an active hotspot for nitrite-driven AOM, providing a deeper understanding of the AOM process and offering theoretical basis for mitigating methane emission from paddy fields.

**Key words:** Paddy fields; Rhizosphere and bulk soils; Nitrite-dependent AOM; Activity; Community structure

自 1750 年以来，大气中的甲烷 ( $\text{CH}_4$ ) 浓度持续增加，目前已达到  $1940 \text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，其对全球变暖的贡献率高达 30%<sup>[1]</sup>。稻田是重要的  $\text{CH}_4$  排放源，占人为  $\text{CH}_4$  排放量的 38%<sup>[2]</sup>。厌氧甲烷氧化 (Anaerobic oxidation of methane, AOM) 是控制稻田甲烷排放的重要过程。AOM 可与多种电子受体的还原相耦合<sup>[3]</sup>，其中以亚硝酸盐作为电子受体的 AOM 途径每年能消耗  $0.91\text{Tg}\text{CH}_4$ ，相当于年  $\text{CH}_4$  排放量的 11.2%<sup>[4]</sup>。因此，亚硝酸盐型 AOM 被认为是稻田  $\text{CH}_4$  减排的关键途径。

根际作为植物根系与土壤互作的微域界面<sup>[5]</sup>，在淹水稻田生态系统中，水稻通过通气组织向根际释放氧气，根际微区呈现相对富氧状态，而其外围的非根际土则是厌氧环境<sup>[6]</sup>。研究表明，根系分泌物显著提高了根际土中碳源可利用性和养分有效性，促进了微生物的生长繁殖，使得根际微生物数量明显高于非根际土<sup>[7]</sup>。值得注意的是，尽管传统上认为产甲烷古菌严格局限于厌氧环境，但有研究发现部分氧气耐受型产甲烷古菌在水稻根际保持较高活性，使得水稻根际的  $\text{CH}_4$  排放通量及产甲烷菌数量均显著高于非根际土<sup>[8-9]</sup>。此外，根际区域还具有更高的  $\text{NO}_x$ -含量<sup>[10]</sup>。上述特征表明，特殊的根际微环境可能为亚硝酸盐型 AOM 的发生提供充足的底物。然而，现有关于稻田亚硝酸盐型 AOM 的研究主要集中于非根际土<sup>[11-13]</sup>，对于根际土中亚硝酸盐型 AOM 活性及其功能微生物群落特征仍缺乏系统认识。

施肥是重要的农田管理措施，同时其对 AOM 过程的影响已引起广泛关注<sup>[14-16]</sup>。氮肥通过促进硝化作用，导致氧气消耗和  $\text{NO}_2^-$  的可利用性增加<sup>[17]</sup>，从而有利于提高亚硝酸盐型 AOM 活性<sup>[14]</sup>。最近有研究表明，有机粪肥施用通过提高土壤硝态氮含量显著促进了稻田 AOM 活性<sup>[15]</sup>。Yang 等<sup>[16]</sup>进一步研究发现长期秸秆还田能够通过增加土壤有机碳和无机氮含量显著提高稻田亚硝酸盐型 AOM 活性和功能微生物丰度。然而，虽然已有多项研究证实施肥能够调控亚硝酸盐型 AOM 活性，但多局限于稻田非根际土，缺乏不同施肥处理下根际土亚硝酸盐型 AOM 过程研究。

基于上述研究背景，本研究提出以下科学假设：根际微环境和微生物群落显著区别于非根际，而亚硝酸盐型 AOM 活性受土壤理化性质和微生物共同调控，推测其在根际和非根际土之间存在显

著差异。根据以上假设,拟以不同施肥处理下的稻田根际和非根际土作为研究对象,通过室内泥浆培养实验结合<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>稳定性同位素示踪技术、高通量测序和定量PCR等分子生物学技术,对比研究不同施肥处理下稻田根际土与非根际土亚硝酸盐型AOM活性、功能微生物群落结构和丰度特征,研究结果有助于深入理解稻田AOM过程,为稻田甲烷减排提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

研究区位于中国江苏省扬州市江都区(32°25'N, 119°43'E),属于亚热带季风气候,年平均降水量1596 mm,年平均气温17.0 °C。试验区实行稻麦轮作,设置3种施肥处理:无机肥(CF)、有机肥配施无机肥(OF)和秸秆还田配施无机肥(SF)。各处理3个小区重复,共计9个试验小区。CF组施肥量为N 270 kg·hm<sup>2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 108 kg·hm<sup>2</sup>、K<sub>2</sub>O 108 kg·hm<sup>2</sup>;OF组用鸡粪代替30%无机氮肥;SF组除与CF组保持相同无机肥施用量外,额外施加小麦秸秆2 400 kg·hm<sup>2</sup>。

### 1.2 样品采集与分析

于2023年10月水稻成熟期采集土壤样品。每个小区随机挑选3株水稻,收集附着在水稻根系上的土壤样品,并将其进行混合作为根际土。对于非根际土,使用直径5 cm的土钻以五点取样法采集0~10、10~20、20~30 cm深度土壤样品,同小区同深度样品混合均匀,分装存放在无菌密封袋中。其中一部分用于测定AOM活性,一部分4 °C冷藏用于测定土壤理化性质,一部分-20 °C低温冷冻用于分子生物学实验。

土壤含水量(SWC)通过将新鲜土壤在105 °C烘箱中烘干至恒重后测得。土壤pH由风干土和去离子水按1:2.5(m/v)比例混合后,用pH计(Carlsbad,美国)测定。土壤有机碳(SOC)含量用K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>氧化法测定。土壤溶解性有机碳(DOC)用新鲜土壤与去离子水1:5(m/v)混合震荡1 h提取,提取液过滤膜后用TOC仪(multi N/C 3100)测定。土壤NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N和NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N用2 mol·L<sup>-1</sup>的KCl溶液浸提,分光光度法测定浸提液中各形态无机氮含量。每个样品各指标测定均进行3次重复。

### 1.3 亚硝酸盐型AOM活性测定

采用<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>稳定性同位素示踪法测定亚硝酸盐型厌氧甲烷氧化活性。将3 g新鲜土壤与5 mL去离子水放置于12 mL玻璃瓶中(Labco,英国),用橡胶塞密封摇匀形成泥浆。为保证厌氧环境,用高纯氩气进行脱氧处理(真空泵抽空气5 min)、复氩气2次)。将脱氧处理后的玻璃瓶置于摇床中预培养3 d(30 °C, 120 r·min<sup>-1</sup>),以进一步释放和消耗土样中残留的氧气和相关电子受体。预培养结束后取出0.6 mL玻璃瓶顶空气体,加入等量<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>置换。泥浆培养实验设置分为两组,每组3个重复:(a)<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>(作为对照组),(b)<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>+NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(实验组)。在b组加入0.05 mL NO<sub>2</sub><sup>-</sup>浓缩液,使玻璃瓶中NO<sub>2</sub><sup>-</sup>初始浓度保持在0.5 mmol·L<sup>-1</sup>。将添加底物后的玻璃瓶置于摇床进行正式培养(30 °C, 120 r·min<sup>-1</sup>),培养周期为30 d。在培养0 d和30 d分别加入0.5 mL 50% ZnCl<sub>2</sub>终止实验。首先使用气相色谱仪(安捷伦7890B型,美国)测定顶空空气相中CO<sub>2</sub>(包括<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>和<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>)的浓度,然后利用稳定同位素比率质谱仪(Isoprime100 IRMS型,德国)分析顶空中<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>与<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>的比值,进一步结合亨利定律根据He等<sup>[18]</sup>报道的公式计算气相和液相中<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>的总生成量。最后,通过实验组减去对照组<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>值得到亚硝酸作为电子受体驱动厌氧甲烷氧化产生的<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>总量,然后根据培养时间(30 d)计算亚硝酸盐型厌氧甲烷氧化活性。

### 1.4 DNA提取及 Illumina测序

使用FastDNA® Spin Kit for 178 Soil (MP Biomedicals,美国)试剂盒提取原位土壤样品DNA,使用超微量分光光度计NanoDrop2000 (Thermo Scientific,美国)对DNA浓度和纯度进行检测。利

用 PCR 仪 (ABI GeneAmp&reg, 9700 型), 选取特异性引物 202F-1545R & qp1f-qp1r 对 NC10 细菌 16S rRNA 基因进行巢式 PCR 扩增, 反应体系和反应条件按照 Shen 等<sup>[19]</sup>报道的方法执行。

使用 AxyPrepDNA 试剂盒 (AXYGEN 公司) 纯化扩增产物, 以确保其纯度和质量。随后利用 QuantiFluor<sup>TM</sup>-ST 系统对纯化后的 PCR 产物进行精确的定量和均一化处理。将纯化后的扩增片段上传 Illumina Mi Seq 平台进行测序, 构建 PE 2×300 文库。使用 UPARSE 软件, 基于 97% 序列相似度对 NC10 细菌 16S rRNA 基因进行 OTU 聚类。利用 RDP Classifier 工具对 OTU 序列进行分类注释。为验证 OTU 序列的可靠性, 将其与 NCBI 数据库中的已知序列进行比对, 仅保留与已知序列相似度大于 80% 的 OTU 序列, 以确保结果的准确性和可靠性。

### 1.5 定量 PCR

利用 ABI7300 型荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国), 使用特异性引物 qp1f-qp1r (5'-GGGCTTGACATC-CCACGAACCTG-3'/5'-CTCAGCGACTTCGAGTACAG-3') 对 NC10 细菌 16S rRNA 基因进行扩增。基于质粒标准曲线, 准确计算出土壤样品中 NC10 细菌 16S rRNA 基因的拷贝数。qPCR 反应体系为 20 μL: 10 μL Premix, 0.8 μL 正向引物, 0.8 μL 反向引物, 1 μL DNA 模板, 7.4 μL ddH<sub>2</sub>O。qPCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 1 min。

### 1.6 数据处理

采用单因素和双因素方差分析不同施肥处理下土壤理化性质、根际土和非根际土亚硝酸盐型 AOM 活性、NC10 细菌基因丰度和群落组成的差异。通过 R 语言构建微生物群落共现网络, 并保留显著相关的 OTUs, 通过 Gephi 0.9 对共现网络进行可视化。采用皮尔逊相关性分析揭示亚硝酸盐厌氧甲烷氧化活性和 NC10 细菌丰度与环境因子之间的关系。采用典范对应分析 (CCA 分析) 探究根际土和不同深度非根际土 NC10 细菌群落组成与环境因子间的关系, 揭示影响 NC10 细菌群落组成的主要环境因子。最后通过偏最小二乘路径模型 (PLS-PM) 分析施肥处理如何通过影响土壤理化和 NC10 细菌群落, 进而对根际和非根际土亚硝酸盐型 AOM 活性产生影响。

## 2 结果

### 2.1 根际土与不同深度非根际土的理化性质

不同施肥处理根际土及非根际土的理化性质见表 1。3 种施肥处理根际土 SWC 与 0~10 cm 非根际土相当, 且显著高于 10~20 cm 和 20~30 cm 非根际土, 根际土和 0~10 cm 非根际土的 pH 则显著低于 10~20 cm 和 20~30 cm 非根际土。CF 处理根际土 SOC 含量显著高于 3 个深度的非根际土, OF 处理根际土 SOC 含量与 0~10 cm 非根际土无显著差异, 但显著高于 10~20 cm 和 20~30 cm 非根际土, 而 SF 处理 0~10 cm 非根际土 SOC 含量显著高于根际土。CF 处理根际土 DOC 含量显著高于 3 个深度非根际土, 另两种施肥则没有显著差异。CF 和 SF 处理根际土硝态氮含量显著高于 10~20 cm 和 20~30 cm 非根际土, OF 处理根际土硝态氮含量仅显著高于 20~30 cm 非根际土。

表 1 不同施肥处理根际土和不同深度非根际土的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of rhizosphere soil and different depths of bulk soil under different fertilization treatments

处理 Treatment	根际/非根际 Rhizosphere/ Bulk soil	土壤含水量 SWC/%	pH	有机碳 SOC/ (g·kg <sup>-1</sup> )	可溶性有机碳 DOC/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	亚硝态氮 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/ (mg·kg <sup>-1</sup> )
CF	根际	23.64±0.01a	6.03±0.04c	8.9±1.4a	25.6±4.6a	6.7±2.7a	0.05±0.01b	15.1±0.9a
	非根际 0~10 cm	23.23±0.01a	6.10±0.08c	5.7±0.2b	14.4±2.2b	8.5±1.7a	0.06±0.00a	12.7±0.6a

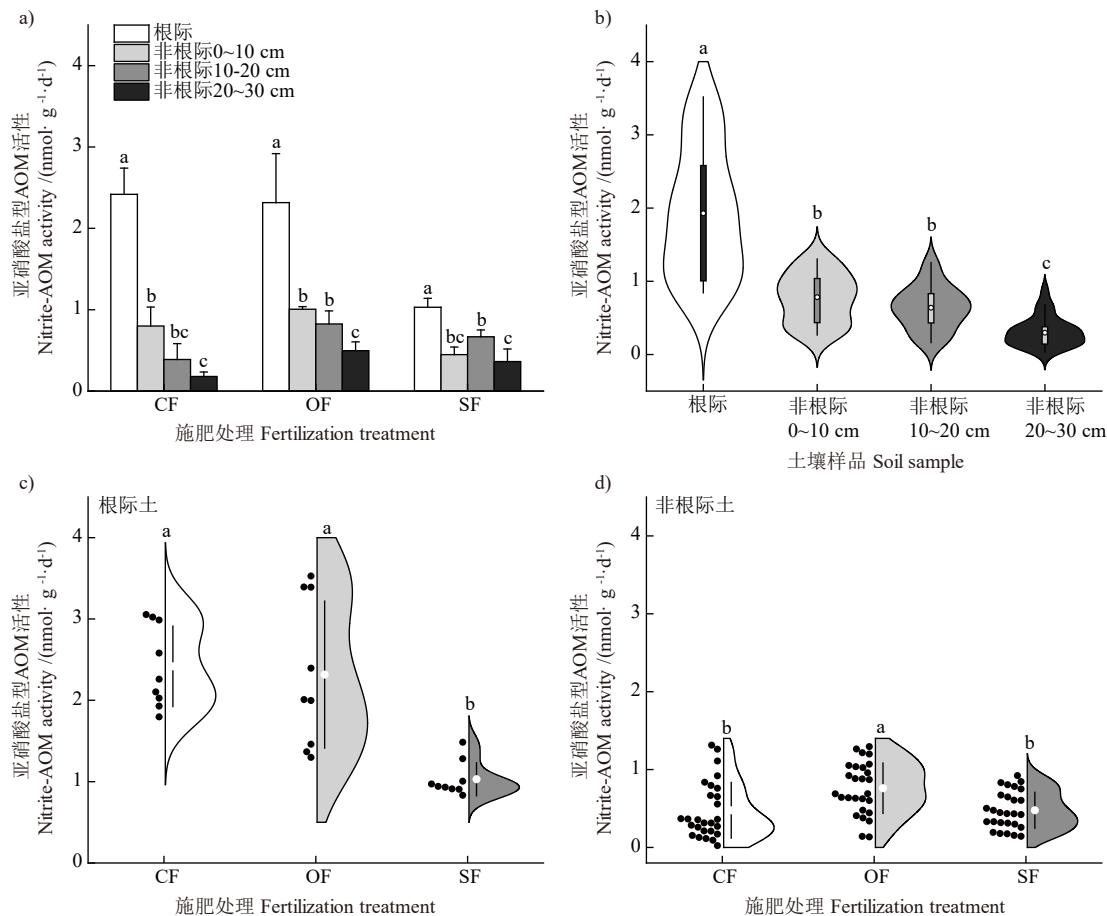
处理 Treatment	根际/非根际 Rhizosphere/ Bulk soil	土壤含水量 SWC/%	pH	有机碳 SOC/ (g·kg <sup>-1</sup> )	可溶性有机碳 DOC/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	亚硝态氮 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/ (mg·kg <sup>-1</sup> )
OF	非根际 10~20 cm	17.41±0.01b	7.24±0.22b	4.5±0.4b	7.9±2.4b	5.9±1.8a	0.05±0.00ab	5.8±0.9b
	非根际 20~30 cm	17.77±0.01b	7.90±0.10a	5.1±0.3b	10.6±1.2b	6.5±1.8a	0.04±0.00b	5.1±0.7b
	根际	25.40±0.02a	6.61±0.09b	20.6±1.4a	21.9±7.0a	8.9±1.6a	0.05±0.00bc	7.9±0.8a
	非根际 0~10 cm	25.21±0.01a	6.60±0.13b	19.5±1.1a	16.8±4.2a	9.6±2.0a	0.07±0.01a	7.3±0.9a
	非根际 10~20 cm	18.97±0.01b	7.11±0.27ab	8.3±1.0b	13.9±5.2a	8.4±2.2a	0.06±0.01ab	6.6±1.1ab
	非根际 20~30 cm	17.20±0.01b	7.75±0.15a	9.0±0.9b	14.8±1.5a	6.8±2.4a	0.04±0.01c	4.2±0.8b
	根际	25.02±0.02a	5.65±0.07b	16.0±0.3b	23.8±5.4a	8.9±1.6a	0.06±0.01a	12.3±1.8a
	非根际 0~10 cm	25.05±0.02a	5.66±0.10b	20.2±0.9a	12.4±1.7a	10.8±1.9a	0.05±0.01a	12.7±2.2a
SF	非根际 10~20 cm	19.00±0.01b	7.01±0.40a	19.1±0.8a	22.4±6.2a	8.7±2.1a	0.06±0.01a	6.1±1.1b
	非根际 20~30 cm	18.08±0.01b	7.72±0.13a	17.5±0.6ab	11.5±1.2a	5.1±2.1a	0.06±0.00a	3.9±0.7b

注: 1) CF: 无机肥处理, OF: 有机肥处理, SF: 秸秆还田处理。2) 表中数据为平均值±标准误。不同字母表示同一施肥处理下根际土和不同深度非根际土间差异显著( $P<0.05$ )。Note: 1) CF: Chemical fertilizer treatment; OF: Organic fertilizer treatment; SF: Straw returning treatment.

2) Data are presented as mean ± SE. Different lowercase letters indicate significant differences between rhizosphere and different depths of bulk soil under the same fertilization treatment ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 根际土与不同深度非根际土的亚硝酸盐型 AOM 活性

3 种施肥处理根际土的亚硝酸盐型 AOM 活性范围为  $1.03\sim2.42 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 均显著高于非根际土 ( $0.18\sim1.01 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) (图 1a)。CF 处理非根际土的亚硝酸盐型 AOM 活性在 0~10 cm 显著高于 20~30 cm; OF 和 SF 处理 10~20 cm 显著高于 20~30 cm (图 1a)。根际土的亚硝酸盐型 AOM 平均活性 ( $1.92 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 显著高于非根际土; 非根际土 0~10 cm ( $0.77 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 和 10~20 cm ( $0.64 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 显著高于 20~30 cm ( $0.31 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) (图 1b)。SF 处理根际土亚硝酸盐型 AOM 平均活性较 CF 和 OF 显著降低 125%~135% (图 1c); OF 处理非根际土亚硝酸盐型 AOM 平均活性显著较 CF 和 SF 增加 59% (图 1d)。



注: 图中误差线为标准误; 不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。Note: Error bars in the figures mean standard errors. Different letters indicate significant difference at 0.05 level.

图 1 土壤亚硝酸盐型 AOM 活性 (a) 以及平均 AOM 活性 (b, c 和 d)

Fig. 1 The nitrite-AOM activity (a) and the average nitrite-AOM activity (b, c, and d)

### 2.3 根际土与不同深度非根际土的 NC10 细菌 16S rRNA 基因丰度

NC10 细菌 16S rRNA 基因丰度在根际土与不同深度非根际土中存在显著差异。在 CF 处理, 根际土和 0~10 cm 非根际土 NC10 细菌基因丰度 ( $1.24\times10^7\sim1.40\times10^7$  copies·g<sup>-1</sup>) 显著高于 10~20 cm 和 20~30 cm 非根际土, 而在 OF 和 SF 处理, 0~10 cm 非根际土的 NC10 细菌基因丰度显著高于根际土以及 10~20、20~30 cm 非根际土 (图 2a)。0~10 cm 非根际土的 NC10 细菌平均基因丰度 ( $1.54\times10^7$  copies·g<sup>-1</sup>) 最高, 其次为根际土 ( $1.21\times10^7$  copies·g<sup>-1</sup>)、10~20 cm ( $7.64\times10^6$  copies·g<sup>-1</sup>) 和 20~30 cm ( $2.95\times10^6$  copies·g<sup>-1</sup>) 非根际土 (图 2b)。CF 处理 ( $1.40\times10^7$  copies·g<sup>-1</sup>) 根际土的 NC10 细菌平均基因丰度高于 OF 处理 ( $1.12\times10^7$  copies·g<sup>-1</sup>) 和 SF 处理 ( $1.12\times10^7$  copies·g<sup>-1</sup>), 在非根际土 ( $7.10\times10^6$  copies·g<sup>-1</sup>) 则低于 OF 处理 ( $9.51\times10^6$  copies·g<sup>-1</sup>) 和 SF 处理 ( $9.35\times10^6$  copies·g<sup>-1</sup>), 但差异均未达显著水平 (图 2c、图 2d)。

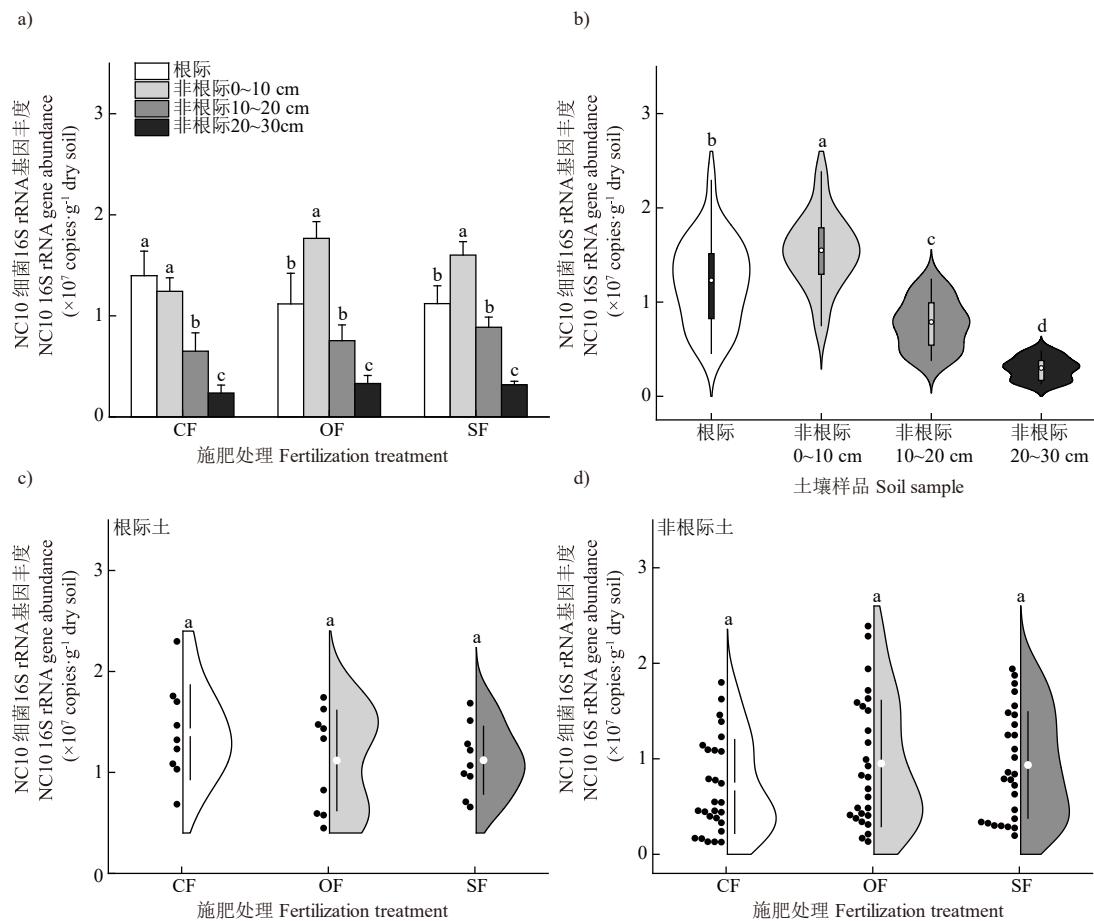


图 2 土壤 NC10 细菌 16S rRNA 基因丰度 (a) 以及平均丰度 (b, c 和 d)

Fig. 2 The gene abundances of NC10 bacterial 16S rRNA (a) and the average gene abundances of NC10 bacteria (b, c, and d)

## 2.4 根际土与不同深度非根际土中 NC10 细菌的群落组成与多样性

将 NC10 细菌 16S rRNA 基因的高通量测序结果进行抽平除杂后, 单个样本中的序列数为 29 504, 共获得 48 个 OTUs。NC10 细菌在土壤中的微生物群落组成如图 3a 所示。在 3 种施肥处理下, OTU54 和 OTU221 在根际土和 0~10 cm 非根际土中占优势, OTU41 在 10~20 cm 非根际土中占优势, OTU41 和 OTU43 在 20~30 cm 非根际土中占优势 (图 3a)。其中, OTU54 在根际土和 0~10 cm 非根际土中平均相对丰度分别为 37% 和 44%, 而 OTU41 在 10~20 cm 和 20~30 cm 非根际中的平均相对丰度分别为 31% 和 39% (图 3b)。此外, 3 种施肥处理 OTU54 的平均相对丰度最高, 范围为 24%~26%, 其次是 OTU41 和 OTU221, 范围分别为 16%~21% 和 13%~19% (图 3b)。

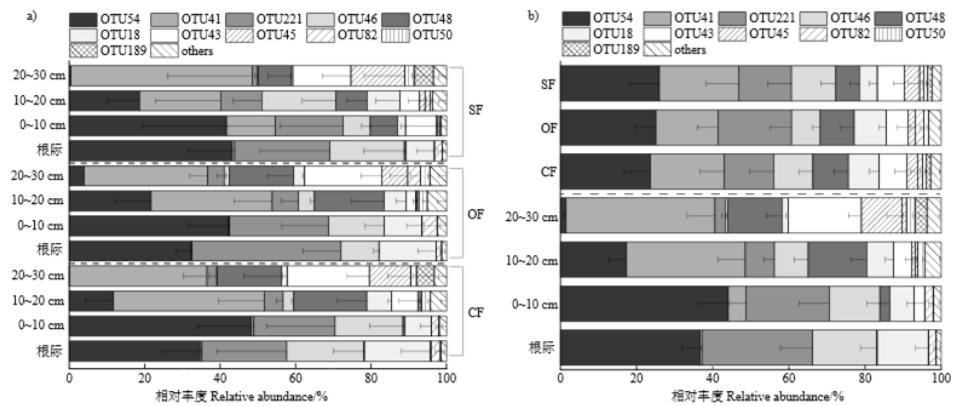


图 3 土壤 NC10 细菌 11 个优势 OTUs 的相对丰度 (a) 及平均相对丰度 (b)

Fig. 3 Relative abundance (a) and average relative abundance (b) of the top 11 OTUs of NC10 bacteria in soil

PCoA 结果表明, 3 种施肥处理 NC10 细菌的群落组成无显著差异 (图 4a), 但根际土和不同深度非根际土中的 NC10 细菌群落结构存在显著差异 (图 4b)。共现网络分析将 NC10 细菌的 OTUs 划分为四个模块 (图 4c)。在模块 0 中, 57.1% 的 OTUs 来自 20~30 cm 非根际土, 在模块 1 中, 64.4% 的 OTUs 来自 10~20 cm 非根际土, 而在模块 2 和 3 中, 大部分 OTUs 来自根际土 (39.5%~45.0%) 和 0~10 cm 非根际土 (34.0%~38.0%) (图 4d)。模块组分在不同施肥处理间无显著差异 (图 4d)。

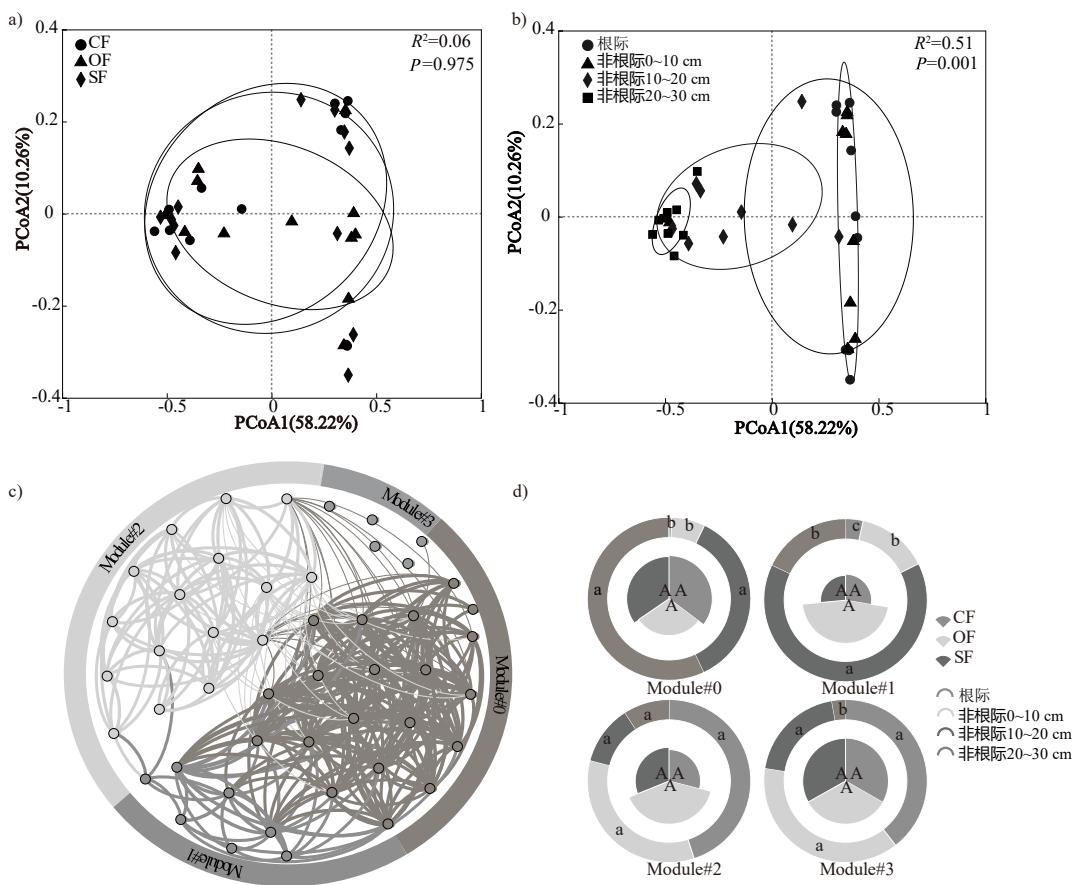


图 4 土壤 NC10 细菌群落组成的主坐标分析 (a, b)、共现网络分析 (c) 及优势模块分布 (d)

Fig. 4 Principal coordinate analysis (a, b), co-occurrence network analysis (c), and abundance of the dominant modules (d) of soil NC10 bacterial community composition

在3种施肥处理下, OTU数、Shannon指数和Chao1指数的范围分别为13~44、0.41~2.16和17~60, 无显著差异(图5a)。10~20 cm非根际土的OTU数、Shannon指数和Chao1指数均显著高于根际土, 然而, 根际土的OTU数显著高于20~30 cm非根际土(图5b)。

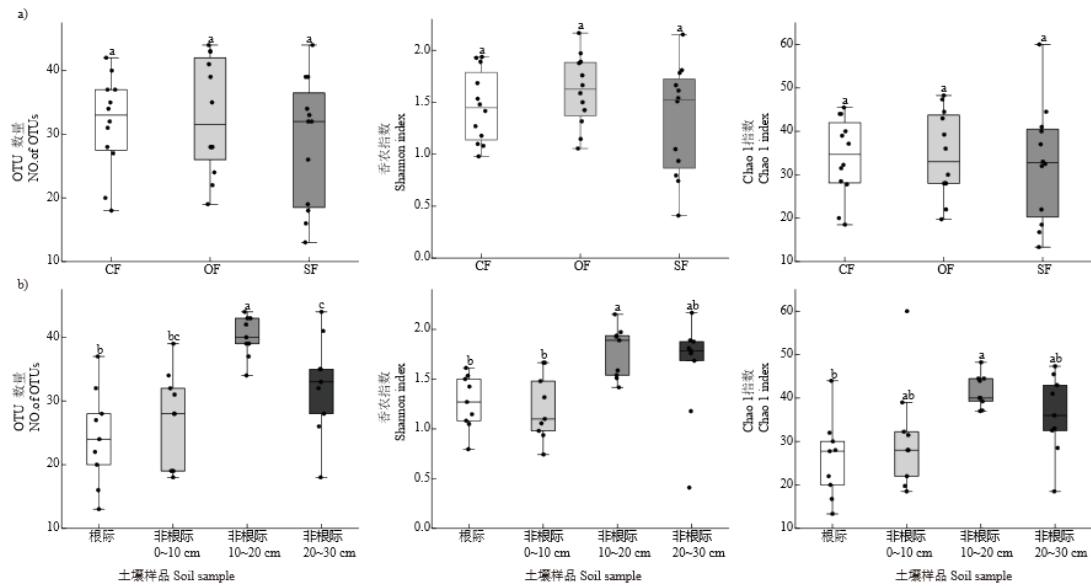
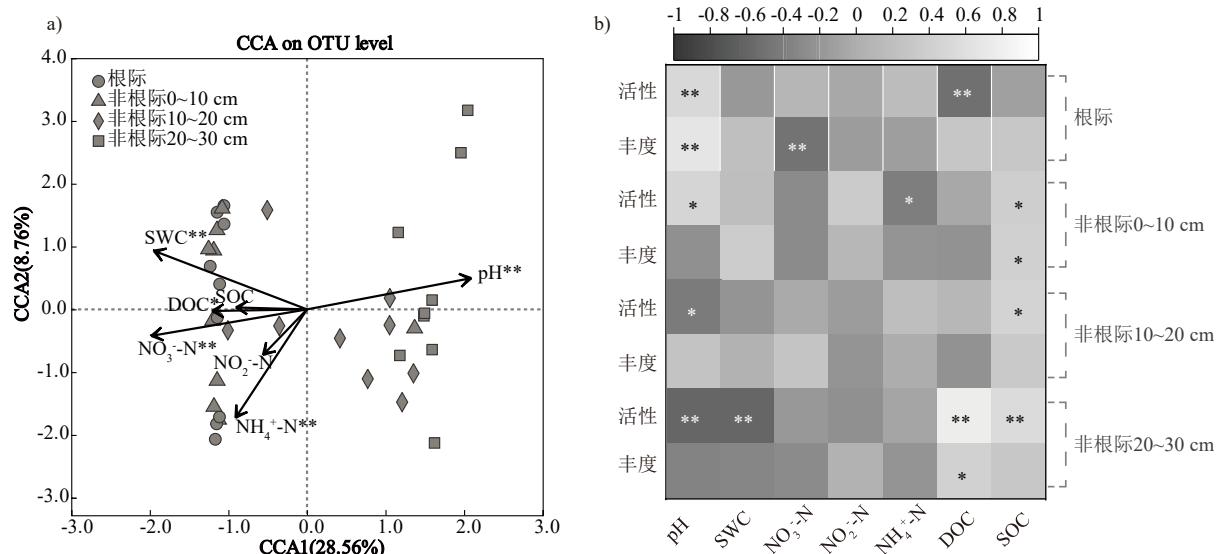


图5 土壤NC10细菌的OTU数量、Shannon指数和Chao1指数

Fig. 5 Number of OTUs, Shannon index, Chao 1 index of NC10 bacteria

## 2.5 亚硝酸盐型AOM活性、丰度、组成与环境因子间的相关性

CCA分析结果表明, SWC、DOC、pH、铵态氮含量和硝态氮含量是影响NC10细菌群落结构的主要环境因子( $P<0.05$ )(图6a)。皮尔逊相关分析表明, 在根际土中, pH与亚硝酸盐型AOM活性和NC10细菌丰度均呈显著正相关, DOC含量与亚硝酸盐型AOM活性呈显著负相关。在0~10 cm非根际土中, pH和SOC含量与亚硝酸盐型AOM活性呈显著正相关, SOC含量与NC10细菌丰度也呈显著正相关。10~20 cm非根际土中, pH与亚硝酸盐型AOM活性呈显著负相关, SOC含量与亚硝酸盐型AOM活性呈显著正相关。20~30 cm非根际土中, pH和SWC与亚硝酸盐型AOM活性呈显著负相关, DOC和SOC含量与亚硝酸盐型AOM活性呈显著正相关(图6b)。

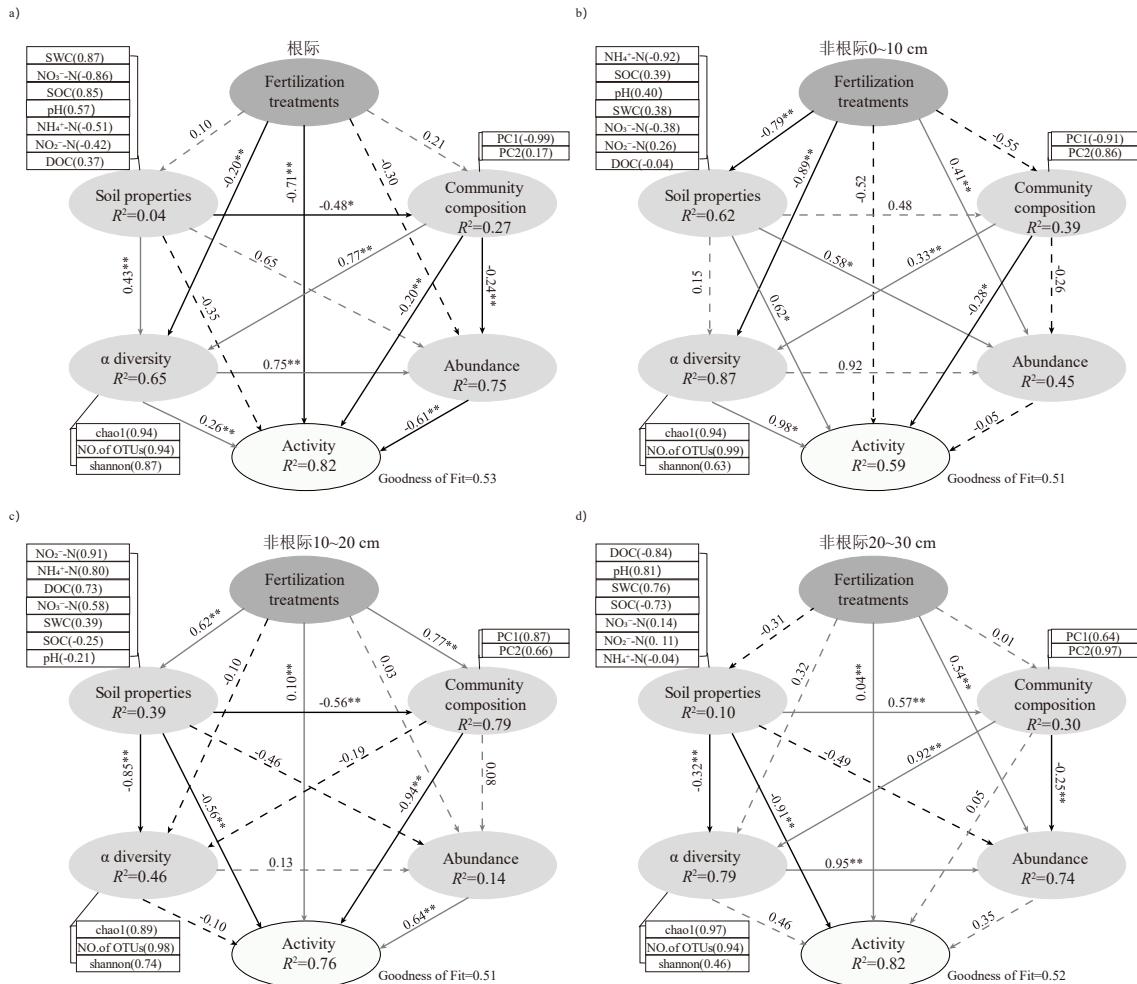


注: b 图中白色为正相关, 黑色为负相关; \*和\*\*分别表示在  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  水平上差异显著。Note: The white represents positive correlation while the black represents negative correlation.; \* and \*\* indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively.

图 6 土壤 NC10 细菌群落组成与环境因子关系分析 (a, CCA 分析; b, 相关性热图)

Fig. 6 Analysis of the relationship between soil NC10 bacterial community composition and environmental factors (a, CCA analysis; b, correlation heatmap)

偏最小二乘路径模型 (PLS-PM) 分析表明, 在根际土中, 施肥处理对亚硝酸盐型 AOM 活性有直接影响, 同时也通过影响 NC10 细菌  $\alpha$  多样性而间接影响亚硝酸盐型 AOM 活性, 土壤理化性质通过影响 NC10 细菌群落组成和  $\alpha$  多样性而间接影响亚硝酸盐型 AOM 活性。在根际土中, 引起土壤理化性质变化的主要指标是 SWC, 其次是硝态氮和 SOC 含量, 群落组成变化主要由 PC1 引起 (图 7a)。在 0~10 cm 非根际土中, 施肥处理通过影响土壤理化性质和 NC10 细菌  $\alpha$  多样性而间接影响亚硝酸盐 AOM 活性, 同时, 土壤理化性质和 NC10 细菌群落组成对亚硝酸盐型 AOM 活性有直接影响, 此外, 在 0~10 cm, 引起土壤理化性质变化的主要指标是铵态氮含量, 其次是 pH 和 SOC, 群落组成变化主要由 PC1 引起 (图 7b)。在 10~20 cm 非根际土中, 施肥处理对亚硝酸盐型 AOM 活性有直接影响, 同时施肥处理也通过影响土壤理化性质和 NC10 细菌群落组成而间接影响亚硝酸盐型 AOM 活性, NC10 细菌丰度对亚硝酸盐型 AOM 活性也有直接影响。此外, 在 10~20 cm 非根际土中, 引起土壤理化性质变化的主要指标是亚硝态氮含量, 其次是铵态氮和 DOC 含量, 群落组成变化主要由 PC1 引起 (图 7c)。在 20~30 cm 非根际土中, 施肥处理和土壤理化性质均对亚硝酸盐型 AOM 活性有直接影响, 引起土壤理化性质变化的主要指标是 DOC, 其次是 pH 和 SWC, 群落组成变化主要由 PC2 引起 (图 7d)。



注: \* 和 \*\* 分别表示在  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  水平上差异显著。Note: \* and \*\* indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively.

图 7 土壤亚硝酸盐型 AOM 活性相关因素的偏最小二乘路径模型分析

Fig. 7 The partial least squares path model of factors associated with nitrite-AOM activity in soil

### 3 讨 论

本研究发现 3 种施肥处理下根际土的亚硝酸盐型 AOM 活性均显著高于非根际土。其中, 根际土中亚硝酸盐型 AOM 活性范围为  $1.03\sim2.42 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (图 1c), 非根际土中亚硝酸盐型 AOM 活性范围为  $0.18\sim1.01 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (图 1d)。本研究根际土亚硝酸盐 AOM 活性也高于报道的稻田非根际土 ( $0.69\sim1.45 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) [13, 20]。值得注意的是, 尽管相关报道指出根际土呈现相对富氧状态 [6], 但本研究发现其 AOM 活性反而更高, 这可能与根际土中充足的底物供应密切相关。已有研究表明, 根际土的  $\text{CH}_4$  产量显著高于非根际土 [8-9], 为亚硝酸盐型 AOM 提供了充足底物。事实上, 亚硝酸盐型 AOM 过程的活性受多因素协同调控。已有研究证实, 有机碳、无机氮及溶解性有机碳含量对该过程具有显著促进作用 [21-22]。本研究中, 根际土检测到较高的有机碳含量和亚硝态氮含量 (表 1), 这可能是其 AOM 活性较高的重要原因: 一方面, 根际土中根系分泌物为微生物提供了丰富的有机碳源, 可刺激产甲烷微生物的生长与代谢活动, 通过增加  $\text{CH}_4$  底物供应间接刺激亚硝酸盐型 AOM

活性<sup>[7]</sup>；另一方面，根际土中更高的  $\text{NO}_x^-$  含量<sup>[10]</sup>，直接为亚硝酸盐型 AOM 过程提供充足的电子受体  $\text{NO}_2^-$ 。上述结果表明先前基于稻田非根际土的大量研究可能低估了亚硝酸盐型 AOM 过程的作用。

在根际土中，SF 处理下的亚硝酸盐型 AOM 活性显著低于 CF 和 OF 处理（图 1c）。这可能与秸秆还田导致的土壤酸化有关<sup>[23]</sup>，因为先前研究表明亚硝酸盐型 AOM 活性适宜中性 pH<sup>[24]</sup>。此外，相关性分析结果也表明根际土中 pH 与亚硝酸盐型 AOM 活性呈显著正相关（图 6b）。相比之下，在非根际土中，OF 处理下的亚硝酸盐型 AOM 活性显著高于 CF 和 SF 处理（图 1d）。这可能是由于有机肥的施用还增加了有机碳含量（表 1），刺激甲烷生成，为亚硝酸盐型 AOM 提供更多的底物，从而提高亚硝酸盐型 AOM 活性<sup>[25]</sup>。此外，PLS-PM 分析表明，在根际土、10~20 cm 和 20~30 cm 非根际土中，施肥处理对亚硝酸盐型 AOM 活性有直接影响（图 7a）。而在 0~10 cm 非根际土中，施肥处理则主要通过影响土壤理化和 NC10 细菌的  $\alpha$  多样性，间接影响亚硝酸盐型 AOM 活性（图 7b）。这可能是由于一方面，施肥处理通过促进植物生长和根系分泌物的释放，导致根际土中的微生物活性较高，碳氮转化速率较快<sup>[26]</sup>。另一方面，施肥对表层非根际土的 pH、有机质含量影响较大（表 1），从而通过改变土壤理化影响其活性<sup>[27]</sup>。而深层非根际土的厌氧环境为 NC10 细菌的生长和代谢提供了更适宜的条件，进一步促进了 NC10 细菌的活性<sup>[28]</sup>。

本研究中 NC10 细菌的 16S rRNA 基因丰度范围为  $1.30 \times 10^6 \sim 4.05 \times 10^7 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ （图 2），与先前报道结果一致（ $1.7 \times 10^5 \sim 5.5 \times 10^7 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ ）<sup>[12, 21, 29]</sup>。NC10 细菌丰度在根际土和不同深度非根际土间存在显著差异。其中，0~10 cm 非根际土 NC10 细菌丰度显著高于根际土，这可能是由于非根际 0~10 cm 土层 SOC 含量高于根际土（表 1），SOC 含量的增加可以为产甲烷菌提供额外的底物来源，并促进  $\text{CH}_4$  的产生<sup>[8-9]</sup>，为亚硝酸盐型 AOM 过程提供充足底物，从而刺激 NC10 细菌丰度。此外，相关性分析也表明在非根际 0~10 cm 土层 SOC 含量与 NC10 细菌丰度呈显著正相关（图 7b），与 Yang 等<sup>[13]</sup>的相关性分析结果一致。

本研究还发现 NC10 群落组成和多样性在根际和不同深度非根际土间存在显著差异（图 4b 和图 5b）。这可能是因为稻田根际选择效应的存在，即植物根系可以选择性吸引和招募非根际土中的微生物<sup>[30]</sup>，导致根际土的微生物群落多样性普遍低于非根际土<sup>[31]</sup>。本研究结果也证实了这一点（图 5b），根际土的 OTU 数均低于不同深度非根际土且均为非根际土共有 OTU（图 3b），这表明根际土的群落结构是不同深度非根际土的一个子集。共线网络分析结果显示根际土和非根际 0~10 cm 土层群落结构较相似，而非根际 10~20 cm 和 20~30 cm 群落结构较相似（图 4d）。这可能是因为根际土和非根际 0~10 cm 土 SWC、pH 以及硝态氮含量显著高于非根际 10~20 cm 和 20~30 cm（表 1），且 CCA 分析结果表明 SWC、pH 以及硝态氮含量对 NC10 细菌群落均有显著影响（图 7a），与本课题组<sup>[21, 32]</sup>之前的分析结果一致。

本研究结果表明不同施肥处理下稻田根际土亚硝酸盐 AOM 活性显著高于非根际土，表明先前针对于非根际土亚硝酸盐型 AOM 过程的研究低估了亚硝酸盐型 AOM 在稻田甲烷减排中的贡献。此外，根际土和非根际土 NC10 细菌丰度和群落结构也存在显著差异。然而，本研究是基于小范围区域土壤进行的，有关 AOM 过程对全球甲烷减排的贡献仍然需要扩大研究尺度，以准确评估其在甲烷减排中的贡献。

## 4 结 论

不同施肥处理下稻田根际土亚硝酸盐 AOM 活性显著高于非根际土，pH、有机碳和亚硝态氮含量是影响 AOM 活性的主要因素。NC10 细菌丰度和群落结构在根际土和不同深度非根际土间均存在显著差异。其中，0~10 cm 非根际土的 NC10 细菌基因丰度显著高于根际土，有机碳含量是影响 NC10 细菌丰度的主要因素。此外，SWC、pH 和硝态氮含量是影响 NC10 细菌群落结构的主要因素。

## 参考文献 (References)

- [1] Peng S S. Challenges and opportunities in the global methane cycle[J]. *iScience*, 2023, 26(6): 106878.
- [2] Xu Y, Liang L Q, Wang B R, et al. Conversion from double-season rice to ratoon rice paddy fields reduces carbon footprint and enhances net ecosystem economic benefit[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 813: 152550.
- [3] Zhao Y W, Liu Y C, Cao S W, et al. Anaerobic oxidation of methane driven by different electron acceptors: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 946: 174287.
- [4] Yang W T, Wang W Q, Shen L D, et al. Potential role of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation in methane consumption and nitrogen removal in Chinese paddy fields[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 838: 156534.
- [5] Philippot L, Raaijmakers J M, Lemanceau P, et al. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11: 789-799.
- [6] Ding L J, Cui H L, Nie S N, et al. Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(5): fiz040.
- [7] Kuzyakov Y, Blagodatskaya E. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 83: 184-199.
- [8] 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.
- [9] Mao T T, Yin R, Deng H. Effects of copper on methane emission, methanogens and methanotrophs in the rhizosphere and bulk soil of rice paddy[J]. *Catena*, 2015, 133: 233-240.
- [10] Li H, Yang X R, Weng B S, et al. The phenological stage of rice growth determines anaerobic ammonium oxidation activity in rhizosphere soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 100: 59-65.
- [11] Tian M H, Shen L D, Liu X, et al. Response of nitrite-dependent anaerobic methanotrophs to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration in paddy fields[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 801: 149785.
- [12] Shen L D, Liu J Q, Yang Y L, et al. Activity, abundance and community composition of nitrite-dependent methanotrophs in response to fertilization in paddy soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 166: 103987.
- [13] Yang Y L, Shen L D, Bai Y N, et al. Response of potential activity, abundance and community composition of nitrite-dependent anaerobic methanotrophs to long-term fertilization in paddy soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2022, 24(11): 5005-5018.
- [14] Shi Y, Ma Q X, Kuzyakov Y, et al. Nitrite-dependent anaerobic oxidation decreases methane emissions from peatlands[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2022, 169: 108658.
- [15] Fan L C, Dippold M A, Ge T D, et al. Anaerobic oxidation of methane in paddy soil: Role of electron acceptors and fertilization in mitigating CH<sub>4</sub> fluxes[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2020, 141: 107685.
- [16] Yang Y L, Shen L D, Zhao X, et al. Long-term fertilization enhances the activity of anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction and associated microbial abundance in paddy soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2023, 185: 109130.
- [17] Hernández-Guzmán M, Pérez-Hernández V, Navarro-Noya Y E, et al. Application of ammonium to a N limited arable soil enriches a succession of bacteria typically found in the rhizosphere[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 4110.
- [18] He Z F, Wang J Q, Hu J J, et al. Improved PCR primers to amplify 16S rRNA genes from NC10 bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(11): 5099-5108.
- [19] Shen L D, Tian M H, Cheng H X, et al. Different responses of nitrite- and nitrate-dependent anaerobic methanotrophs to increasing nitrogen loading in a freshwater reservoir[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 263: 114623.
- [20] Zhang Y H, Wang F Y. Different impacts of an electron shuttle on nitrate- and nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane in paddy soil[J]. *Plant, Soil and Environment*, 2021, 67(5): 264-269.
- [21] Jin J H, Huang H C, Shen L D, et al. Response of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation in paddy fields to slow increase of atmospheric CO<sub>2</sub> concentration[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2023, 60(6): 1776-1787. [金靖昊, 黄鹤宸, 沈李东, 等. 稻田亚硝酸盐型甲烷厌氧氧化对大气 CO<sub>2</sub>浓度缓增的响应[J]. 土壤学报, 2023, 60(6): 1776-1787.]
- [22] Geng C Y, Shen L D, Ren B J, et al. Vertical and temporal variations in activity, abundance, and composition of nitrite-driven anaerobic

- methanotrophs in a paddy field[J]. *Applied Soil Ecology*, 2024, 197: 105342.
- [23] Liang F, Li B Z, Vogt R D, et al. Straw return exacerbates soil acidification in major Chinese croplands[J]. *Resources, Conservation and Recycling*, 2023, 198: 107176.
- [24] He Z F, Geng S, Shen L D, et al. The short- and long-term effects of environmental conditions on anaerobic methane oxidation coupled to nitrite reduction[J]. *Water Research*, 2015, 68: 554-562.
- [25] Shen L D, Wu H S, Gao Z Q. Distribution and environmental significance of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidising bacteria in natural ecosystems[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1): 133-142.
- [26] Zhang Y, Li J G, Zhang W J. Advance in rice root exudates research[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2024, 30(10): 1987-1999. [张怡, 李建国, 张文君. 水稻根系分泌物研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2024, 30(10): 1987-1999.]
- [27] Huang Y P, Wang Q Q, Zhang W J, et al. Stoichiometric imbalance of soil carbon and nutrients drives microbial community structure under long-term fertilization[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 168: 104119.
- [28] Hui C, Guo X X, Sun P F, et al. Depth-specific distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in upland-cropping soil under different fertilizer treatments[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 113: 117-126.
- [29] Wang Y, Zhu G B, Harhangi H R, et al. Co-occurrence and distribution of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in a paddy soil[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 336(2): 79-88.
- [30] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, et al. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(8): E911-E920.
- [31] Hester E R, Vaksmaa A, Valè G, et al. Effect of water management on microbial diversity and composition in an Italian rice field system[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2022, 98(3): fiac018.
- [32] Bai Y N, Yang W T, Zhu H L, et al. Positive response of nitrite-dependent anaerobic methane oxidation to both gradual and abrupt increases of atmospheric CO<sub>2</sub> concentration in paddy soils[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2023, 343: 108291.

(责任编辑: 卢萍)