

DOI: 10.11766/trxb202302160061

曹伟伟, 严陈, 钟文辉, 朱春梧, 朱建国, 贾仲君. 水稻土好氧甲烷氧化菌对大气 CO₂ 浓度升高的适应规律[J]. 土壤学报, 2024, CAO Weiwei, YAN Chen, ZHONG Wenhui, ZHU Chunwu, ZHU Jianguo, JIA Zhongjun. The adaptative mechanisms of methane-oxidizing bacteria for elevated atmospheric CO₂ in paddy soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024,

水稻土好氧甲烷氧化菌对大气 CO₂ 浓度升高的适应规律*

曹伟伟^{1,2}, 严陈^{1,3}, 钟文辉³, 朱春梧¹, 朱建国¹, 贾仲君^{1,2†}

(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; 3. 南京师范大学地理科学学院, 南京 210046)

摘要: CH₄ 是仅次于 CO₂ 的第二大温室气体, 而稻田是 CH₄ 的主要排放源, 但未来大气 CO₂ 浓度升高情景下(elevated CO₂, eCO₂), 水稻土好氧甲烷氧化过程及其功能微生物群落适应规律尚不清楚。依托中国 FACE (Free Air CO₂ Enrichment) 水稻田试验平台, 通过 ¹³C-CH₄ 示踪的室内微宇宙培养实验, 采用稳定性同位素核酸探针 (DNA-SIP) 和高通量测序技术, 研究未来大气 CO₂ 浓度升高对水稻土甲烷氧化活性及其功能微生物的影响规律。结果表明: 与常规大气 CO₂ 浓度 (ambient CO₂, aCO₂) 相比, eCO₂ 条件下的甲烷氧化活性显著增加, 从 243 nmol·g⁻¹ d.w.s·h⁻¹ 增加至 302 nmol·g⁻¹ d.w.s·h⁻¹, 增幅高达 24.3%, 甲烷氧化菌数量则增加了 1.1 倍~1.2 倍。通过超高速离心获得活性甲烷氧化菌同化 ¹³CH₄ 后合成的 ¹³C-DNA, 高通量测序发现, 未来大气 CO₂ 升高情景下水稻土活性好氧甲烷氧化微生物群落极可能发生明显演替, 与对照相比, 类型 I 甲烷氧化菌甲基杆菌属 *Methylobacter* 的相对丰度增加 16.2%~17.0%, 而甲基八叠球菌属 *Methylosarcina* 的相对丰度下降 4.7%~11.1%; 同时刺激了食酸菌属 *Acidovorax* 和假单胞菌属 *Pseudomonas* 等非甲烷氧化菌的活性。综上所述: 未来大气 CO₂ 升高情景下, 水稻土好氧甲烷氧化微生物群落结构发生分异, 促进了甲烷氧化通量, 而甲烷氧化的代谢产物可能引发土壤中微生物食物网的级联反应, 是土壤碳储存和周转的重要功能微生物群。

关键词: 大气 CO₂ 浓度升高; 水稻土; 甲烷氧化菌; 稳定性同位素核酸探针 (DNA-SIP); 高通量测序
中图分类号: Q938; S154.36 **文献标志码:** A

The Adaptative Mechanisms of Methane-Oxidizing Bacteria for Elevated Atmospheric CO₂ in Paddy Soil

CAO Weiwei^{1,2}, YAN Chen^{1,3}, ZHONG Wenhui³, ZHU Chunwu¹, ZHU Jianguo¹, JIA Zhongjun^{1,2†}

(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; 3. School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: 【Objective】CH₄ is the second most potent greenhouse gas only next to CO₂. Continued CH₄ and CO₂ emissions by human activities pose a major challenge to the mitigation of global climate change. Rice paddy, a main

* 国家自然科学基金项目 (92251305) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 92251305)

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

作者简介: 曹伟伟 (1992—), 女, 内蒙古乌兰察布人, 博士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: wwcao@issas.ac.cn
收稿日期: 2023-02-16; 收到修改稿日期: 2023-06-18; 网络首发日期 (www.cnki.net):

form of artificial wetland, accounts for ~ 8% of anthropogenic sources of CH₄. The elevated atmospheric CO₂ (eCO₂) affect the cycling of nutrients and elements in paddy fields mainly through the changes in plant-soil-microbe interactions, which also influence net CH₄ flux associated with both the methanogenic and methanotrophic processes. However, how eCO₂ affects aerobic methane oxidation in paddy soils has rarely been examined, and the adaptative mechanisms of active methane-oxidizing bacteria (MOB) for eCO₂ remain unclear. This study aimed to explore the changes in methane-oxidizing rates and identify the active MOB phylotypes in paddy soil under the eCO₂ treatment.

【Method】 We collected paddy soil samples from China's FACE (Free Air CO₂ Enrichment) experiment station, with FACE treatment and ambient CO₂ concentration treatment (aCO₂). The CH₄-feeding microcosm incubation was applied to learn the methane-oxidizing rates in the two soils. DNA-based stable isotope probing (DNA-SIP) combined with quantitative polymerase chain reaction (qPCR) of methane-oxidizing functional gene *pmoA* was used to identify the ¹³C-labeled DNA. High-throughput sequencing and phylogenetic analysis for the 16S rRNA gene amplicons of the ¹³C-DNA were used to identify the active microbiomes during methane oxidation. **【Result】** The results showed that eCO₂ significantly stimulated aerobic methane-oxidizing rate when compared to the ambient CO₂ treatment, with 302 and 243 nmol CH₄·g⁻¹ d.w.s·h⁻¹, respectively. The abundance of MOB increased by 1.1 folds -1.2 folds under eCO₂. A group of MOB assimilated ¹³CH₄ and synthesized ¹³C-DNA, which were separated into heavy fractions during DNA-SIP. The result of high-throughput sequencing for ¹³C-DNA showed that *Methylobacter* and *Methylosarcina* predominated the active MOB phylotypes. The relative abundance of *Methylobacter* increased by 16.2%-17.0% while the relative abundance of *Methylosarcina* decreased under eCO₂. eCO₂ also stimulated the activity of non-methanotrophic bacteria, such as *Acidovorax* and *Pseudomonas*, which implies a methanotrophy-induced microbial community response to eCO₂. **【Conclusion】** This study reveals positive effects of elevated atmospheric CO₂ on aerobic methane oxidation in paddy soil, with the predominant and active MOB of *Methylobacter* playing crucial roles, indicating an improved potential of methane oxidation under the scenarios of global climate change.

Key words: Elevated CO₂; Paddy soil; Methane-oxidizing bacteria; DNA-based stable isotope probing; High-throughput sequencing

尽管全球变暖的驱动力仍然存在一定的争议,但全球变暖的事实已经成为世界各国政府和学术界的共识。例如,CO₂作为最重要的温室气体,其浓度从工业革命前 280 ppm 增加至目前的 408 ppm,被认为对全球气候变暖的贡献率高达 66%^[1]。CH₄是仅次于 CO₂的全球第二大温室气体,尽管大气 CH₄浓度远低于 CO₂,但其增温潜势却是 CO₂的近 28 倍^[2],非 CO₂温室气体 CH₄减排计划是各国政府应对全球气候变化的重要战略,也是我国 2030 年前实现碳达峰、2060 年前实现碳中和的重要研究内容。

全球每年排放 CH₄约 550~594 Tg^[3],稻田是重要的 CH₄排放源,占人为 CH₄排放量的 8%^[2]。然而,已有研究表明,稻田厌氧层产生的 CH₄在进入大气之前,约 30%~80%已经被微生物氧化^[4],而好氧甲烷氧化菌被认为是减少稻田 CH₄排放、缓减全球变暖的唯一生物过滤器。事实上,甲烷氧化细菌(Methane-Oxidizing Bacteria, MOB)的研究历史已有上百年,是一类以 CH₄为唯一碳源和能源的微生物^[5]。根据其细胞形态、内膜结构、代谢途径差异可分为类型 I (type I) 和类型 II (type II) 两大类群,分别属于 γ-变形菌纲和 α-变形菌纲^[6],并且均广泛分布于水稻土中^[7-8]。然而,甲烷氧化菌分离过程中极易被污染,特别是可培养菌株在很大程度上难以反映原位土壤真实环境。据此,基于靶基因的分子生态技术成为甲烷氧化菌研究的重要策略。目前已知的甲烷氧化细菌几乎均含有甲烷单加氧酶编码基因 *pmoA*^[9],基于 *pmoA* 基因的甲烷氧化细菌分类与经典的 16S rRNA 基因系统发育进化关系基本一致,因此, *pmoA* 基因结合 16S rRNA 基因高通量测序被广泛应用于甲烷氧化菌的分子生态学研究^[10-11]。

未来大气 CO₂ 浓度升高 (eCO₂) 可能通过影响水稻生长和土壤微生物过程而影响稻田 CH₄ 排放通量。一般认为, eCO₂ 导致稻田 CH₄ 排放量最高可提升约 40%^[12-13]。然而, 最近的研究发现 eCO₂ 的正反馈效应随着处理年限的增加呈下降趋势。例如, FACE 实验 (Free Air CO₂ Enrichment) 第一年增加了 69.4% 的 CH₄ 排放量, 而第二、第三年则分别降至 44.0% 和 25.6%^[14]; FACE 处理 13 ~ 15 年之后, CH₄ 排放量较对照处理减少了 11% ~ 54%^[15]。产生这些不一致结果的主要原因可能是: CH₄ 排放通量由产生与氧化两个过程决定, 分别由产甲烷菌和甲烷氧化菌两种功能微生物主导。eCO₂ 一方面促进植物光合作用, 增加土壤有机碳输入, 为产甲烷菌提供更多碳源, 从而促进 CH₄ 产生; 另一方面, eCO₂ 也可能通过增加植物根系生物量和通气组织, 使得根系泌氧能力增强, 促进好氧甲烷氧化菌活性而增加甲烷氧化量^[16]。因此, 土壤类型、水稻品种、秸秆还田、灌溉管理和施肥等环境因子均有可能影响产甲烷菌或甲烷氧化菌^[17-21], 进而导致大气 CO₂ 升高对 CH₄ 排放的影响规律不同。通过定量分析土壤中产甲烷菌和甲烷氧化菌的数量, 有研究发现 eCO₂ 处理可以同时提高产甲烷菌和甲烷氧化菌数量, 而随着处理时间增加, eCO₂ 对甲烷氧化菌的促进效应增强, 从而逐步加强了 CH₄ 的氧化消耗, 降低了 eCO₂ 对 CH₄ 的增排效应^[14]。然而, 有关 eCO₂ 影响甲烷氧化的微生物过程机制报道较少, 甲烷氧化微生物组成和活性的变化规律仍然没有明确的结论。尽管有研究结果显示 eCO₂ 使得水稻土中的主导甲烷氧化菌类群由类型 II 转变为类型 I^[22], eCO₂ 对类型 II 甲烷氧化菌的相对丰度有显著影响^[23], 但是单一的微生物群落结构变化与环境因素之间的相关性分析, 可能无法真实反映其中的内在联系。而稳定性同位素示踪甲烷氧化菌核酸 DNA 则能够在微生物分类地位与功能之间建立直接的联系, 在一定程度上更加准确地反映甲烷氧化菌及其功能对大气 CO₂ 浓度升高的适应规律。

本研究依托中国 FACE 水稻田实验平台, 以好氧甲烷氧化功能基因 *pmoA* 以及细菌 16S rRNA 基因为靶标, 通过实时荧光定量 PCR、稳定性同位素核酸探针 DNA-SIP 结合高通量测序技术, 研究大气 CO₂ 浓度升高条件下水稻土甲烷氧化速率和活性微生物的变化规律, 期望为合理制定 CH₄ 减排措施、有效应对全球气候变化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样本采集

水稻土样本采集于中国 FACE 水稻田实验平台, 该实验平台建于 2004 年, 位于江苏省扬州市宗村良种场 (32°35'5"N, 119°42'0"E)。当地典型耕作方式为单季稻-麦轮作方式。FACE 田间实验区由六个对边距为 12.5 m 的八角形实验圈构成, 其中三个圈中的大气 CO₂ 浓度较大气 CO₂ 浓度升高 $200 \pm 40 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ (在本研究中称为 FACE 圈), 另三个圈为正常大气条件下的 CO₂ 浓度 (对照圈 Ambient) ^[18, 24]。

本研究于 2008 年水稻收获后, 分别采集 FACE 圈和对照圈表层 0 ~ 10 cm 土壤样本。在实验室对土壤进行晾干处理, 研磨过 2 mm 筛, 混合均匀, 调节水分含量为田间持水量的 60% (即 25% 左右), 用于甲烷氧化微宇宙培养实验。

1.2 ¹³C-CH₄ 稳定性同位素核酸探针 (DNA-SIP)

基于 ¹³C-CH₄ 的稳定性同位素核酸探针 DNA-SIP 实验流程如下图所示 (图 1)。准确称取混合均匀的土样 (FACE 圈和对照圈 Ambient) 5.0 g, 均匀铺置于 120 mL 血清瓶底部, 血清瓶用丁基橡胶塞密封并用铝盖锁紧, 从每个瓶中抽出 1.2 mL 空气后注入 1.2 mL 高纯 CH₄, 使瓶内 CH₄ 浓度为 1% ($10\,000 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) 左右。设置 ¹³CH₄ 标记组和非标记 ¹²CH₄ 对照组, 分别注入 ¹³CH₄ (99% ¹³C 原子丰度, Cambridge Isotope Laboratory) 或 ¹²CH₄, 并在瓶内气体平衡后测定初始 CH₄ 浓度 (GC, Agilent 7890, USA)。将所有处理在 30 °C 条件下避光静置

培养, 每隔 12 h 抽取顶空气体 1 mL 测定 CH_4 浓度。每个处理设置两组平行, 一组样品在甲烷氧化活性最强 (消耗 60%~70%, 36 h) 结束培养, 另一组在 CH_4 被全部消耗后 ($100 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下, 72 h) 结束培养。培养结束后打开瓶塞, 将土样全部取出并保存于 -20°C , 用于 DNA 提取和分子生物学分析。

分别称取培养后的水稻土各 0.5 g, 包括 36 h 和 72 h 两个时间点的标记组和非标记组土壤样本, 共计 24 个, 使用 FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) 试剂盒, 根据说明书提供的操作步骤提取土壤微生物基因组 DNA, 并将其溶解于 $100 \mu\text{L}$ 无菌水。通过微量紫外分光光度计 (NanoDrop ND-1000) 测定 DNA 浓度和纯度。

将上述得到的总 DNA 样品进行超高速密度梯度离心, 实验操作参考已有研究^[25-26]。关键步骤包括: 将 $2.0 \mu\text{g}$ DNA 与 CsCl 溶液均匀混合形成初始浮力密度为 $1.725 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的离心液, 并转移至 5.1 mL 的超高速离心管中, 随后置于贝克曼超高速离心机中, 20°C 条件下 $45000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ($190000 \times g$) 离心 44 h。离心结束后将离心管中的溶液由下至上均分为 15 个不同浮力密度的 DNA 溶液, 分别收集至 1.5 mL 无菌离心管中, 并通过 PEG-6000 将 DNA 与溶液中的氯化铯介质分离, 进一步采用 70% 乙醇清洗 DNA, 最后将其溶于 $30 \mu\text{L}$ 无菌水中, -20°C 保存, 用于标记 DNA (^{13}C -DNA) 的鉴定和活性微生物组成分析。

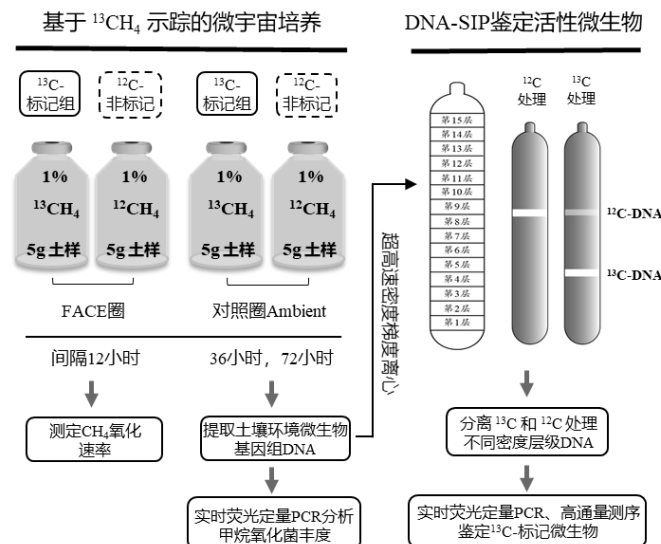


图 1 $^{13}\text{CH}_4$ 稳定性同位素核酸探针 (DNA-SIP) 研究大气 CO_2 浓度升高影响水稻土好氧甲烷氧化的实验设计与流程

Fig. 1 Experimental design of DNA-based stable isotope probing (DNA-SIP) of methane-oxidizing bacteria under elevated atmospheric CO_2 in paddy soil

1.3 实时荧光定量 PCR 与高通量测序

针对超高速离心后得到的不同浮力密度层级的 DNA 样本, 使用引物 A189f/mb661r^[11] 定量甲烷氧化功能基因 *pmoA* 的丰度。定量 PCR 反应体系 $20 \mu\text{L}$ 包括: $10 \mu\text{L}$ SYBR Premix Ex Taq (Takara), 上游和下游引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $0.5 \mu\text{L}$, $1 \mu\text{L}$ DNA 模版 (DNA-SIP 获得的各浮力密度层级的 DNA 浓度范围在 $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 以下, 直接用于 PCR 反应) 和 $8 \mu\text{L}$ 无菌水。*pmoA* 基因扩增的反应条件: 95°C , 3 min; $30 \times (94^\circ\text{C}, 30 \text{ s}; 54.5^\circ\text{C}, 30 \text{ s}; 72^\circ\text{C}, 45 \text{ s})$; 72°C , 10 min。PCR 产物经熔解曲线和琼脂糖电泳验证, 确认其专一性和有效性。所有扩增效率在 80%~100% 范围之内, R^2 为 0.990~0.999 (CFX96 Optical Real-Time Detection System, Bio-Rad, Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)。最后通过分析 *pmoA* 基因绝对量在不同浮力密度 DNA 中的分布规律来鉴别甲烷氧化菌的 ^{13}C -DNA。

对 ^{13}C -DNA 样品进行高通量测序, 分析其中的微生物组成。首先使用带有不同标签 (Tag)

的细菌 16S rRNA 基因通用引物 515F/907R (Tag-GTGCCAGCMGCCGCGG /Tag-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) 进行 PCR 扩增^[27], PCR 产物经试剂盒 (DNA Fragment Purification Kit) 纯化后溶解在适量的 Tris-EDTA 缓冲液中, 并且测定 DNA 浓度。最后将 DNA 样品等质量混合后进行 454 高通量测序 (Roche GS-FLX)。下机数据首先使用 mothur (<http://www.mothur.org/>) 进行质控, 以 25 分为质量控制阈值, 保留长度为 200 ~ 600 的序列, 质控不允许有模糊碱基; 根据扩增时所用的标签提取样品信息, 获得每个样品的高质量序列。用 RDP Multi-Classifer (<https://rdp.cme.msu.edu/>) 对序列进行物种分类注释, cutoff 设置为 0.5。

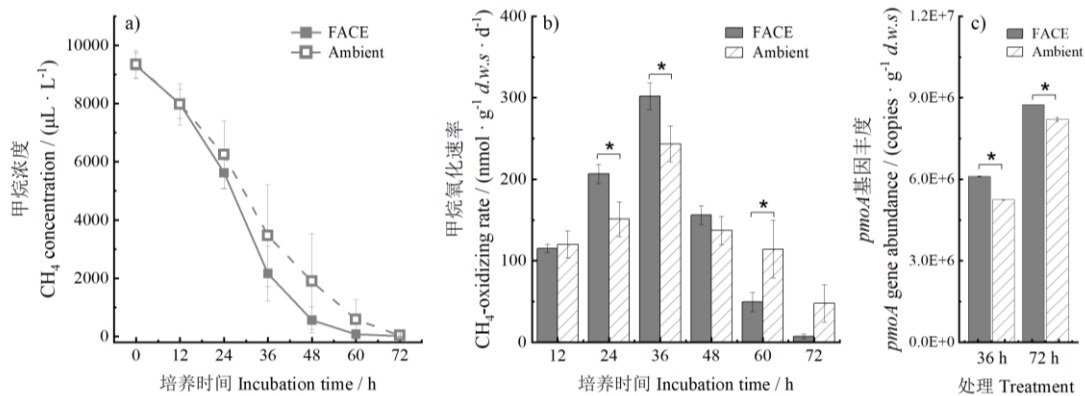
1.4 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS Inc., Cary, NC, USA) 统计软件进行数据分析, 采用单因素方差 (One-way ANOVA) 法对 FACE 圈和对照圈 Ambient 的甲烷氧化速率、甲烷氧化菌丰度进行统计显著性差异检验, $P < 0.05$ 为统计显著性。采用 Origin 2021 进行图表绘制。

2 结果

2.1 大气 CO₂ 浓度升高对水稻土甲烷氧化速率的影响

在初始 CH₄ 浓度 10 000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下培养水稻土, 通过测定 CH₄ 氧化曲线发现, FACE 圈土壤在前 36 h 消耗了瓶中 77% 的 CH₄, 对照圈 Ambient 土壤仅消耗了 63% 的 CH₄。尽管两种土壤均能在 72 h 内将初始添加的 CH₄ 几乎全部消耗完 (最终浓度小于 100 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$), 但 FACE 圈土壤的 CH₄ 下降速率高于对照圈 (图 2a)。FACE 圈在前 36 h 的甲烷氧化速率最高达 301.8 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d.w.s}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 显著高于对照圈 Ambient 土壤 (图 2b)。实时荧光定量 *pmoA* 基因发现, FACE 圈土壤的甲烷氧化菌丰度为 $6.1\times 10^6\sim 8.8\times 10^6\text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d.w.s}^{-1}$, 而且在 CH₄ 氧化 36 h 和 72 h 后均高于对照圈 Ambient, 增幅约为 1.1 倍 ~ 1.2 倍 (图 2c)。这些结果表明大气 CO₂ 浓度升高可能刺激了甲烷氧化菌生长并提升了甲烷氧化速率。



注: FACE 指 CO₂ 浓度较正常大气条件升高(200±40) $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 的实验处理, Ambient 指 CO₂ 浓度为正常大气条件的实验处理, 下同。*表示 FACE 和 Ambient 处理之间具有显著性差异, $P < 0.05$ 。Note: FACE indicates the treatment under elevated atmospheric CO₂ (200±40) $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$, Ambient indicates the treatment under ambient CO₂. * indicates significant differences between the FACE and Ambient treatment, $P < 0.05$.

图 2 大气 CO₂ 浓度升高对水稻土甲烷氧化速率和 MOB 数量的影响

Fig. 2 Methane-oxidizing rates and MOB abundances under elevated atmospheric CO₂ (FACE) and ambient CO₂ (Ambient) in paddy soil

2.2 大气 CO₂ 浓度升高对水稻土活性甲烷氧化菌的影响

经过 36 h 和 72 h 甲烷氧化后, 分别提取土壤总 DNA 样本进行 DNA-SIP 超高速离心, 获得不同 CsCl 密度层级 DNA 后, 对甲烷氧化菌的 *pmoA* 基因定量。以每个处理中 *pmoA* 基因拷贝数最大的层级为参照, 求得每一层拷贝数与参照的比值, 并以此为纵坐标, 同时以超高速密度梯度离心后不同 DNA 层级的浮力密度值为横坐标, 得到 *pmoA* 基因在不同 DNA 层的比例分布图 (图 3)。结果表明: 与 ¹²CH₄ 对照处理相比, 所有 ¹³C-CH₄ 标记处理中的 *pmoA* 基因均集中分布在浮力密度较大的层级 (重层, 第 5~8 层), 而 ¹²C-CH₄ 对照处理中的 *pmoA* 基因集中分布在轻层 (第 12~13 层), 在重层的丰度非常低。表明土壤甲烷氧化过程, 甲烷氧化菌同化了大量 ¹³C-CH₄ 并且合成 ¹³C-DNA, 在超高速离心过程中被分离至重层。

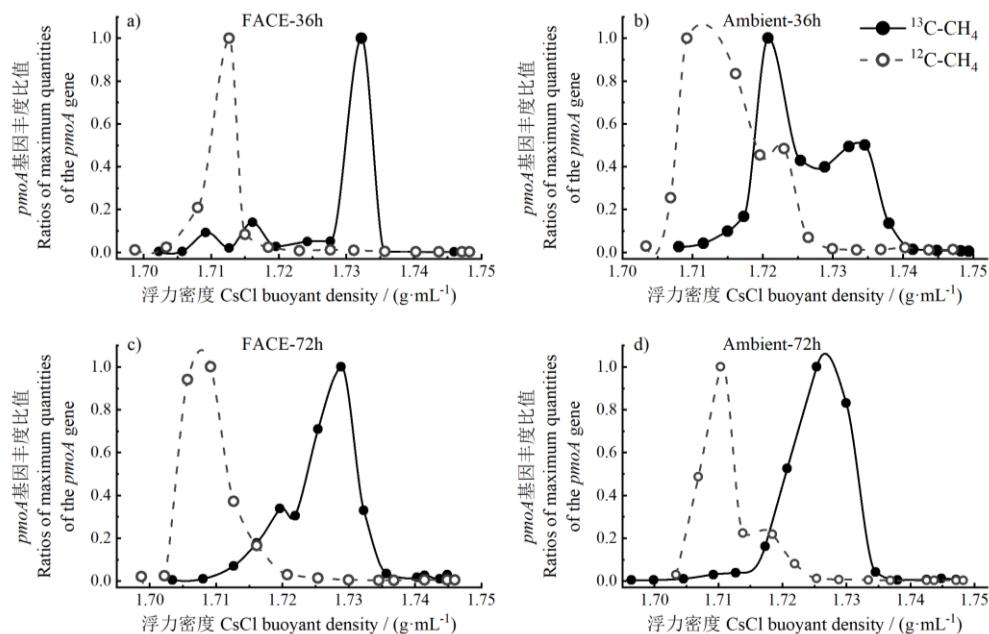


图 3 甲烷氧化功能基因 *pmoA* 在不同浮力密度 DNA 层级中的分布规律

Fig. 3 Quantitative distribution of *pmoA* gene copy numbers across the entire buoyant density gradients of the fractionated DNA from FACE and Ambient treatments incubated with ¹³CH₄ or ¹²CH₄

针对 FACE 圈和对照圈土壤重层 DNA 进行高通量测序分析, 得到 222 753 条有效序列, 其中包括 77 936 条甲烷氧化菌序列, 占比 35.0% (表 1)。甲烷氧化菌在重层 ¹³C-DNA 中的相对丰度较高, 表明甲烷氧化菌细胞分裂繁殖并同化了大量 ¹³C-CH₄。FACE 圈 ¹³C-CH₄ 标记处理 36 h 后, 甲烷氧化菌在第 5 层 DNA (F5) 中的相对丰度达到 57.3%, 72 h 后最高达到 64.8% (F6), Ambient 处理 36 h 和 72 h 后最高达到 60.3% 和 62.8%。此外, 甲烷氧化菌在重层 DNA 中的相对丰度高低与其标记程度以及其他微生物的丰度有关, 甲烷氧化菌之外的其他微生物通过同化 ¹³C-CH₄ 氧化过程中的中间代谢产物被标记, 也可能与甲烷氧化过程紧密关联。

表 1 ¹³C-DNA 的 16S rRNA 基因高通量测序结果汇总

Table 1 Summary of pyrosequencing results using a universal primer of 515F-907R targeting the 16S rRNA genes of the microbial community in ¹³C-DNA fractions

处理	层级	浮力密度	<i>pmoA</i> 基因丰度	16S rRNA 基	MOB 序列数	MOB 丰度
		CsCl buoyant	<i>pmoA</i> gene	因序列数	MOB-like	MOB-like
Treatment	Fraction	density	abundance	Total	sequence number	sequence
		/(g·mL ⁻¹)	/(copies·g ⁻¹ d.w.s)	reads		frequency

						/%
FACE- ¹³ CH ₄ (36 h)	F5	1.736	1.7E+02	4 358	2 498	57.3
	F6	1.732	5.6E+04	4 978	2 213	44.5
	F7	1.728	3.0E+03	20 098	4 703	23.4
Ambient- ¹³ CH ₄ (36 h)	F5	1.738	3.7E+03	25 788	7 011	27.2
	F6	1.735	1.4E+04	15 172	9 149	60.3
	F7	1.732	1.4E+04	14 531	2 313	15.9
FACE- ¹³ CH ₄ (72 h)	F5	1.736	3.1E+02	16 439	1 652	10.0
	F6	1.732	3.0E+03	15 311	9 916	64.8
	F7	1.729	9.1E+03	31 738	14 278	45.0
Ambient- ¹³ CH ₄ (72 h)	F5	1.735	3.1E+02	30 425	19 104	62.8
	F7	1.725	7.3E+03	15 187	2 277	15.0

针对重层 DNA 中的甲烷氧化菌进行物种组成分析结果表明:经过 36 h 和 72 h 培养后, FACE 圈和对照圈 Ambient 土壤中绝大多数活性的 ¹³C-甲烷氧化菌均属于类型 I, 其相对丰度占总甲烷氧化菌比例高于 88%, 主导类群为甲基杆菌属 *Methylobacter* 和甲基八叠球菌属 *Methylosarcina* (图 4)。进一步分析表明:甲烷氧化 36 h 后, FACE 圈土壤中的 *Methylobacter* 属相对丰度超过 62%, 高于对照圈 Ambient (图 4a); 甲烷氧化 72 h 后, FACE 土壤中 *Methylobacter* 属相对丰度为 56.8% ~ 65.5%, 仍然高于 Ambient (图 4b)。相反, 对照圈 Ambient 土壤中 *Methylosarcina* 属的相对丰度较 FACE 圈明显增加, 在培养 36 h 和 72 h 后分别增加 11.1%和 4.7%。因此, 大气 CO₂ 浓度升高极可能刺激了 *Methylobacter* 属的活性, 一定程度上抑制了 *Methylosarcina* 属的活性。

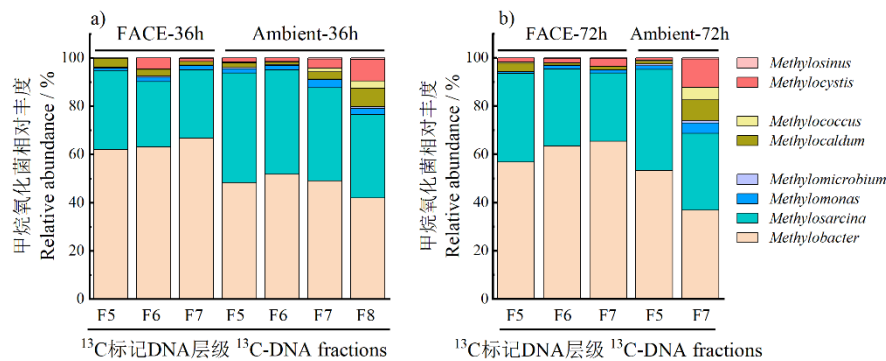
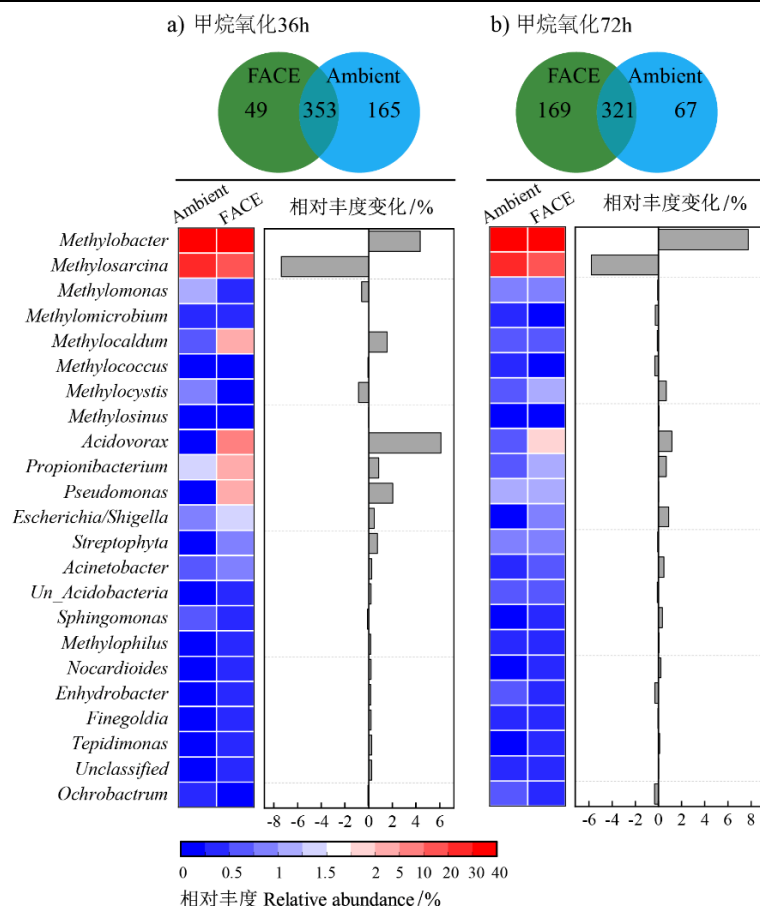


图 4 ¹³C-CH₄ 标记处理中重层 DNA (¹³C-DNA) 的甲烷氧化菌组成

Fig. 4 Phylogenetic affiliation of MOB in ¹³C-DNA fractions of ¹³C-CH₄-labeled treatments

2.3 大气 CO₂ 浓度升高对水稻土非甲烷氧化微生物的影响

CO₂ 浓度升高不仅影响了活性甲烷氧化菌, 也可能通过甲烷氧化代谢产物, 如甲醇、甲醛和甲酸等影响其他微生物。土壤培养 36 h 后, FACE 圈 ¹³C-DNA 中共检测到 402 个细菌属, 其中有 353 个属和对照圈 Ambient 相同, 而 49 个属是 FACE 圈特有的细菌属 (图 5a); 甲烷氧化 72 h 后, FACE 圈特有的细菌属增至 169 个 (图 5b)。此外, FACE 圈显著刺激了食酸菌属 *Acidovorax*、丙酸杆菌属 *Propionibacterium* 和假单胞菌属 *Pseudomonas* 的生长活性, 其相对丰度在 36 h 后分别较对照圈 Ambient 增加了 6.1%、0.8%和 2.0%。这些微生物在大气 CO₂ 浓度升高条件下具有更高的生长活性, 可能优先利用 ¹³C-CH₄ 甲烷氧化过程中产生的中间代谢产物, 因此在 FACE 圈 ¹³C-DNA 中的比例增加。



注: Venn 图表示甲烷氧化 36 h 和 72 h 后, FACE 圈和对照 Ambient 圈 ^{13}C -DNA 中共有、特有的活性微生物数量(属水平); 热图表示 FACE 圈和 Ambient 圈 ^{13}C -DNA 中活性 MOB 和其他主导细菌的相对丰度; 柱状图表示这些微生物丰度在 FACE 和 Ambient 之间的差值。Note: Venn diagrams show the taxa distribution (genus level) in ^{13}C -DNA of FACE and Ambient treatments after 36 and 72 hours of methane oxidation, respectively. The heat map displays the relative abundance of MOB and other abundant genera in ^{13}C -DNA. The bar graph displays the changes in bacterial relative abundance in FACE than Ambient treatment.

图 5 大气 CO_2 浓度升高条件下甲烷氧化 36 h (a) 和 72 h (b) 后活性甲烷氧化菌和其他主导细菌的相对丰度变化

Fig. 5 Changes in the relative abundance of active MOB and other abundant bacteria between FACE and Ambient treatments. (a) and (b) represents the changes in 36 h and 72 h of methane oxidation, respectively

3 讨论

利用 ^{13}C - CH_4 稳定性同位素核酸探针技术和高通量测序, 本研究发现大气 CO_2 浓度升高情景下, 水稻土甲烷氧化潜力增强, 甲烷氧化菌 *Methylobacter* 属活性增加, 而 *Methylosarcina* 属活性减弱。这一研究结果规避了以往研究单纯相关性分析的内在缺陷^[19, 22-23]。例如, 由于环境中微生物可能处于休眠状态以及游离 DNA 的存在, DNA 水平的物种相对丰度或者数量改变并不能完全代表功能活性的变化。然而, 稳定性同位素核酸探针技术完全依赖于细胞的分离繁殖, 能够在关键生态过程与微生物物种之间建立直接联系。本研究通过 DNA-SIP 证明了 eCO_2 对水稻土中类型 I 甲烷氧化菌 *Methylobacter* 属生长繁殖的刺激作用, 为研究大气 CO_2 浓度升高情景下微生物的适应规律提供了明确证据。值得注意的是, 不同生态系统和环境条件下, eCO_2 对甲烷氧化菌的影响可能不尽相同。例如, 有研究报道 eCO_2 降低了水

稻根系中类型 II 甲烷氧化菌甲基孢囊菌属 *Methylosinus* 的相对丰度^[23], 而增加了沼泽湿地类型 II 甲烷氧化菌的丰度^[28]。此外, 甲烷氧化速率在不同生境中对大气 CO₂ 浓度升高的响应规律也有不同。本研究中, FACE 圈水稻土甲烷氧化速率显著高于对照圈 Ambient 土壤, 而在一些草地^[29]和森林^[30]等旱地土壤中, eCO₂ 会导致 CH₄ 吸收潜力降低。其原因可能是受到水分、温度等环境条件的影响, 而且由于旱地土壤中存在高亲和力大气甲烷氧化微生物类群, 它们对 eCO₂ 的响应可能与传统甲烷氧化菌(类型 I、类型 II)不同, 但其内在的适应机制, 仍需整合分析甲烷氧化菌的遗传进化规律并深入研究。

大气 CO₂ 浓度升高可能通过影响土壤性质, 进而改变甲烷氧化菌生态位并影响其群落结构。已有大量研究报道分析了大气 eCO₂ 升高条件下水稻土的碳、氮、磷、钾以及微量元素的含量变化规律, 发现 CO₂ 浓度升高可提升土壤有机质含量^[31-32]、降低可溶性氮含量^[33], 同时, 碳、氮、磷、微量元素等的固存或活化还会受到养分之间的协助关系、生态化学计量比及植物生长等复杂因素的影响^[34-35]。甲烷氧化菌是一类特异的功能微生物, 几乎所有甲烷氧化菌都以 CH₄ 为唯一碳源和能源, 因此, 一般认为 CH₄ 和 O₂ 浓度是影响甲烷氧化过程的关键因素。然而, 近年来其他营养元素或金属元素对甲烷氧化菌生理生态过程的影响也得到广泛关注。例如, 最近的研究发现 eCO₂ 条件下甲烷氧化菌组成的变化与土壤溶解性有机碳和无机氮的含量有关^[22]。在森林土壤中, 土壤有机碳也可能通过改变土壤团聚体、孔隙度等改变土壤微域中 CH₄ 和 O₂ 浓度, 进而影响微生物甲烷氧化潜力^[36]。此外, 不同类型甲烷氧化菌的生理特征存在显著差异^[37], 类型 I 甲烷氧化菌在底物(如 CH₄ 和 O₂ 浓度, 氮素营养)充分的条件下更容易获得生长优势, 而类型 II 甲烷氧化菌更能在环境胁迫条件下保持生长活性。在水稻土中, eCO₂ 很可能导致了更多的有机碳输入, 促进土壤厌氧微域形成并产生更多 CH₄, 然而, eCO₂ 也可能促进植物根系生长并分泌更多氧气, 刺激类型 I 甲烷氧化菌生长。本研究中发现 FACE 圈 95% 以上的活性 MOB 均属于类型 I, 而对照圈 Ambient 水稻土中则栖息了一部分类型 II 甲烷氧化菌。例如, 土壤培养 72 h 后的 ¹³C-DNA 中类型 II 甲烷氧化菌占比 13% (图 4)。值得注意的是, eCO₂ 促进类型 I 甲烷氧化菌 *Methylobacter* 属的活性, 然而降低了 *Methylosarcina* 属的活性。这可能与氮素条件有关, eCO₂ 增加土壤有机碳输入的同时减少了可溶性氮含量, 使得土壤 C/N 比升高, 使微生物处于氮素限制条件下, 此时具有固氮潜力的微生物类群即可获得生长优势。前人研究发现, *Methylobacter* 属的甲烷氧化菌株具有固氮潜力, 而目前已知的 *Methylosarcina* 属的菌株均不具备固氮功能基因^[38]。未来通过 DNA 和 RNA 水平的稳定性同位素探针技术分析, 有可能准确解析 *Methylosarcina* 属与 *Methylobacter* 属对大气 CO₂ 浓度升高的生理代谢差异以及碳、氮耦合机制。

水稻土甲烷氧化过程极有可能激发了系列微生物级联反应, 并在土壤有机碳周转过程中发挥了重要作用。每克水稻土中蕴藏的微生物细胞可高达 10 亿, 其微生物多样性和功能极为复杂, 单一功能微生物的变化通常耦合其他相关类群的共同响应。甲烷氧化菌作为一类专性自养微生物, 通过碳源利用或者其他营养元素的摄取而与其他异养微生物类群产生联系^[39], 促进整体微生物群的功能发挥。本研究通过稳定性同位素示踪复杂微生物群落 ¹³C-DNA 得到了明确证据。例如大气 CO₂ 浓度升高显著刺激了非甲烷氧化菌 *Acidovorax* 和 *Pseudomonas* 的生长活性(图 5)。这些微生物在生长过程中利用了更多的 ¹³C-CH₄ 来源有机碳, 与甲烷氧化菌的生长繁殖密切相关。因此, 在研究温室气体 CH₄ 减排过程中, 甲烷氧化菌与其他微生物之间的偶联关系是一个亟需关注的重要内容。并且, 随着基因组、转录组等先进技术的快速发展, 将为更精细的分类学和时空变异尺度下研究微观尺度的生命过程及其对宏观层的全球变化影响提供技术支撑。

4 结 论

大气 CO₂ 浓度升高刺激了水稻土好氧甲烷氧化活性。类型 I 甲烷氧化菌 *Methylobacter* 属和 *Methylosarcina* 属是水稻土的主导活性甲烷氧化菌类群,前者在大气 CO₂ 浓度升高条件下生长繁殖活性增强,而后的生长活性减弱。大气 CO₂ 浓度升高同时刺激了多种非甲烷氧化微生物生长活性,与 CH₄ 转化过程密切相关。

参考文献 (References)

- [1] WMO. Greenhouse gas bulletin-No.15: The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2018[R]. WMO Greenhouse Gas Bulletin, Switzerland, 2019. https://library.wmo.int/doc_num.php?explnum_id=10100.
- [2] IPCC. Climate change 2014: Synthesis report. Pachauri R K, Meyer L A. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change[R]. Geneva, Switzerland: IPCC, 2014, 151.
- [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] Conrad R. Importance of hydrogenotrophic, acetoclastic and methylotrophic methanogenesis for methane production in terrestrial, aquatic and other anoxic environments: A mini review[J]. Pedosphere, 2020, 30(1): 25-39.
- [5] Dedys S N, Knief C, Dunfield P F. *Methylocella* species are facultatively methanotrophic[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(13): 4665-4670.
- [6] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria[J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(2): 439-471.
- [7] Stein L Y. The long-term relationship between microbial metabolism and greenhouse gases[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(6): 500-511.
- [8] Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1346.
- [9] Murrell J C, McDonald I R, Bourne D G. Molecular methods for the study of methanotroph ecology[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 27(2): 103-114.
- [10] McDonald I R, Bodrossy L, Chen Y, et al. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1305-1315.
- [11] Costello A M, Lidstrom M E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 5066-5074.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Qian H Y, Jin Y G, Chen J, et al. Acclimation of CH₄ emissions from paddy soil to atmospheric CO₂ enrichment in a growth chamber experiment[J]. The Crop Journal, 2022, 10(1): 140-146.
- [15] Yu H Y, Zhang G B, Xia L L, et al. Elevated CO₂ does not necessarily enhance greenhouse gas emissions from rice paddies[J]. Science of the Total Environment, 2022, 810: 152363.
- [16] Schroppe M K, Chanton J P, Allen L H, et al. Effect of CO₂ enrichment and elevated temperature on methane emissions from rice, *Oryza sativa*[J]. Global Change Biology, 1999, 5(5): 587-599.
- [17] Yue J, Shi Y, Zheng X H, et al. The influence of free-air CO₂ enrichment on microorganisms of a paddy soil in the rice-growing season[J]. Applied Soil Ecology, 2007, 35(1): 154-162.
- [18] Wang S Y, Han L, Shi Y, et al. Effects of FACE on population and activities of methanogen and methanotroph in paddy soil[J]. Soils, 2006, 38(6): 768-773. [王屹屹, 韩琳, 史奕, 等. FACE 对水稻土产甲烷菌和甲烷氧化菌种群及其活性的影响[J]. 土壤, 2006, 38(6): 768-773.]
- [19] 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.]

- [20] Qian H Y, Chen J, Zhu X C, et al. Intermittent flooding lowers the impact of elevated atmospheric CO₂ on CH₄ emissions from rice paddies[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2022, 329: 107872.
- [21] Qian H Y, Huang S, Chen J, et al. Lower-than-expected CH₄ emissions from rice paddies with rising CO₂ concentrations[J]. Global Change Biology, 2020, 26(4): 2368-2376.
- [22] Liu X, Shen L D, Yang W T, et al. Effect of elevated atmospheric CO₂ concentration on the activity, abundance and community composition of aerobic methanotrophs in paddy soils[J]. Applied Soil Ecology, 2022, 170: 104301.
- [23] Liu J M, Han J J, Zhu C W, et al. Elevated atmospheric CO₂ and nitrogen fertilization affect the abundance and community structure of rice root-associated nitrogen-fixing bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 628108.
- [24] Liu G, Han Y, Zhu J G, et al. Rice-wheat rotational FACE platform I. System structure and control[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(10): 1253-1258. [刘钢, 韩勇, 朱建国, 等. 稻麦轮作 FACE 系统平台 I. 系统结构与控制[J]. 应用生态学报, 2002, 13(10): 1253-1258.]
- [25] Jia Z J, Conrad R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(7): 1658-1671.
- [26] Jia Z J. Principle and application of DNA-based stable isotope probing-A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(12): 1585-1594. [贾仲君. 稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP 原理与应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(12): 1585-1594.]
- [27] Stubner S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreenTM detection[J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 50(2): 155-164.
- [28] Lee S H, Megonigal P J, Kang H. How do elevated CO₂ and nitrogen addition affect functional microbial community involved in greenhouse gas flux in salt marsh system[J]. Microbial Ecology, 2017, 74(3): 670-680.
- [29] Dijkstra F A, Morgan J A, Follett R F, et al. Climate change reduces the net sink of CH₄ and N₂O in a semiarid grassland[J]. Global Change Biology, 2013, 19(6): 1816-1826.
- [30] 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.
- [31] Chen D, Yu H Y, Zou L Y, et al. Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration on the stability of soil organic carbon in different layers of a paddy soil[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2018, 29(8): 2559-2565. [陈栋, 郁红艳, 邹路易, 等. 大气 CO₂ 浓度升高对不同层次水稻土有机碳稳定性的影响[J]. 应用生态学报, 2018, 29(8): 2559-2565.]
- [32] Hu Z K, Chen X Y, Yao J N, et al. Plant-mediated effects of elevated CO₂ and rice cultivars on soil carbon dynamics in a paddy soil[J]. New Phytologist, 2020, 225(6): 2368-2379.
- [33] Ma H L, Zhu J G, Xie Z B, et al. Effect of FACE(free air carbon-dioxide enrichment) on soluble C, N and P in soil during rice growing[J]. Soils, 2004, 36(4): 392-397. [马红亮, 朱建国, 谢祖彬, 等. 开放式空气 CO₂ 浓度升高对水稻土壤可溶性 C、N 和 P 的影响[J]. 土壤, 2004, 36(4): 392-397.]
- [34] Wang X Z, Zhang H J, Sun W, et al. Effect of elevated atmospheric CO₂ on paddy soil nitrogen content during rice season[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(8): 2161-2165. [王小治, 张海进, 孙伟, 等. 大气 CO₂ 浓度升高对稻田土壤氮素的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(8): 2161-2165.]
- [35] Ren S R, Zhu J G, Li H X, et al. Effect of free-air CO₂ enrichment (FACE) on microelements in paddy soil[J]. Ecology and Environment, 2007, 16(3): 982-986. [任思荣, 朱建国, 李辉信, 等. 大气 CO₂ 浓度升高对稻田土壤中微量元素的影响[J]. 生态环境, 2007, 16(3): 982-986.]
- [36] Lee J, Oh Y, Lee S T, et al. Soil organic carbon is a key determinant of CH₄ sink in global forest soils[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 3110.
- [37] Ho A, Kerckhof F M, Luke C, et al. Conceptualizing functional traits and ecological characteristics of methane-oxidizing bacteria as life strategies[J]. Environmental Microbiology Reports, 2013, 5(3): 335-345.
- [38] Kalyuzhnaya M G, Stolyar S M, Auman A J, et al. *Methylosarcina lacus* sp. nov., a methanotroph from Lake Washington, Seattle, USA, and emended description of the genus *Methylosarcina*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(6): 2345-2350.

- [39] Oshkin I Y, Beck D A, Lamb A E, et al. Methane-fed microbial microcosms show differential community dynamics and pinpoint taxa involved in communal response[J]. The ISME Journal, 2015, 9(5): 1119-1129.

（责任编辑：卢 萍）