

<https://doi.org/10.3799/dqkx.2021.037>



祁连山多年冻土区甲烷通量与 甲烷微生物群落组成的关系

毛楠^{1,2}, 刘桂民^{1*}, 李莉莎¹, 李小明¹, 张博¹, 徐海燕¹, 吴晓东²

1. 兰州交通大学环境与市政工程学院, 甘肃兰州 730070

2. 中国科学院西北生态环境资源研究院冰冻圈科学国家重点实验室青藏高原冰冻圈观测研究站, 甘肃兰州 730000

摘要: 全球变暖可能导致多年冻土中的有机碳分解, 向大气释放甲烷(CH_4), 但多年冻土的甲烷释放通量与微生物群落结构以及功能基因的丰度相关性还不清楚. 于 2019 年 6 月~2020 年 1 月, 选择青藏高原北部祁连山多年冻土区, 利用静态箱-气相色谱法对不同海拔地区进行 CH_4 释放通量测定, 并分析土壤理化性质、 CH_4 功能微生物群落、功能微生物的基因丰度. 结果发现, 整体上, 甲烷通量随着海拔的上升而增加, 在 4 100 m 和 3 900 m 处表现为源, 而其他各海拔地区表现为碳汇. 土壤含水率、电导率和 *mcrA* 基因丰度与 CH_4 通量正相关. 研究表明祁连山多年冻土区不同海拔 CH_4 通量受土壤含水率和 *mcrA* 基因丰度的影响, 而有机碳含量会影响微生物的多样性.

关键词: 多年冻土; 甲烷通量; 功能基因; 微生物; 环境地质.

中图分类号: S812.2

文章编号: 1000-2383(2022)02-556-12

收稿日期: 2021-10-11

Methane Fluxes and Their Relationships with Methane-Related Microbes in Permafrost Regions of the Qilian Mountains

Mao Nan^{1,2}, Liu Guimin^{1*}, Li Lisha¹, Li Xiaoming¹, Zhang Bo¹, Xu Haiyan¹, Wu Xiaodong²

1. School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China

2. Cryosphere Research Station on the Qinghai-Tibet Plateau, State Key Laboratory of Cryospheric Science, Northwest Institute of the Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

Abstract: Global warming may cause the decomposition of organic carbon in permafrost regions and release methane (CH_4) into the atmosphere, while the correlation between methane fluxes in permafrost regions and the structure of methane-related microbes and the abundance of functional genes remains unclear. In this study, we selected the permafrost region of the Qilian Mountains in the northern Qinghai-Tibet Plateau, and the field work was conducted from June 2019 to January 2020. The CH_4 fluxes were measured at different altitudes using static chamber-gas chromatography. The soil physical and chemical variables and abundances of CH_4 function genes were analyzed. The results show that the methane fluxes largely increased with the altitude. It appeared as a source at 4 100 m and 3 900 m, while other altitude areas appear as carbon sinks. The soil moisture content, conductivity and *mcrA* gene abundance were positively correlated with CH_4 fluxes. The results showed that CH_4 flux at different altitudes in the

基金项目: 国家自然科学基金项目 (Nos. 41661013, 41871060, 41861011); 中国科学院西部之光项目.

作者简介: 毛楠 (1994—), 男, 硕士研究生, 从事土壤生态学研究. ORCID: 0000-0002-3978-1962. E-mail: 761255135@qq.com

***通讯作者:** 刘桂民, ORCID: 0000-0002-1409-189X. E-mail: liuguimin@lztu.edu.cn

引用格式: 毛楠, 刘桂民, 李莉莎, 李小明, 张博, 徐海燕, 吴晓东, 2022. 祁连山多年冻土区甲烷通量与甲烷微生物群落组成的关系. 地球科学, 47(2): 556—567.

Citation: Mao Nan, Liu Guimin, Li Lisha, Li Xiaoming, Zhang Bo, Xu Haiyan, Wu Xiaodong, 2022. Methane Fluxes and Their Relationships with Methane-Related Microbes in Permafrost Regions of the Qilian Mountains. *Earth Science*, 47(02): 556—567.

permafrost regions of Qilian Mountains were affected by soil moisture content and *mcrA* gene abundance, while organic carbon content mainly affected microbial diversity.

Key words: permafrost; methane flux; functional gene; microbes; environmental geology.

0 引言

CH₄是最重要的温室气体之一,在百年尺度上增温效应是二氧化碳(CO₂)的20~30倍(IPCC, 2014).随着全球变暖,其对温室效应的贡献以每年0.8%~1.1%的趋势递增(Watson *et al.*, 1996).大气中CH₄的排放源主要分为人为源和自然源.其中,湿地是CH₄最大的自然排放源,约占全球CH₄年排放总量的25%(IPCC, 2014).多年冻土区土壤有机碳的储量大约是大气中碳储量的两倍,且对气候变暖敏感(王宪伟等, 2010; Hugelius *et al.*, 2014).随着全球变暖,青藏高原多年冻土在过去几十年间发生了不同程度的退化,导致先前保存于低温环境下的有机质分解,释放大量的含碳温室气体如CO₂和CH₄等.这可能会加速全球变暖,并形成正反馈效应(Zhang *et al.*, 2018; 吴晓东等, 2020). Song *et al.* (2012)对东北三江平原多年冻土区春季土壤CH₄通量观测表明,最大释放通量为48.6 gC·m²·h⁻¹. Mu *et al.* (2018)通过对青藏高原北部多年冻土区土壤模拟增温实验表明,CH₄释放通量随温度增加而增加.

微生物群落结构对环境变化非常敏感(秦璐等, 2013).近几十年对CH₄的循环研究表明,大气中70%~80%的CH₄是由微生物介导的生物地球化学循环过程产生的(Le Mer *et al.*, 2001).土壤中的CH₄代谢微生物主要包括产甲烷菌(*Methanogens*)和甲烷氧化菌(*Methanotrophs*),这两类微生物分别影响着CH₄的产生和氧化过程.产甲烷菌通过甲基辅酶M还原酶催化产生CH₄(Feng *et al.*, 2019).几乎所有的产甲烷菌的基因组都可编码 α 亚基(*mcrA*)基因.甲烷氧化菌在有氧条件下通过甲烷单加氧酶(*Methane Monooxygenase*, MMO)将CH₄转化CO₂,该酶的一个存在形式是颗粒状甲烷单加氧酶(pMMO)(Lieberman *et al.*, 2004).几乎所有的甲烷氧化菌都存在pMMO.因此,编码pMMO的 α -亚基基因(*pmoA*)和编码 α 亚基(*mcrA*)基因成为检测土壤中甲烷氧化菌的常用功能基因(Li *et al.*, 2017).目前研究发现土壤理化性质如含水率、pH等都能影响土壤微生物群落结构进而影响CH₄

的排放通量.在青藏高原的CH₄排放通量引起了人们的关注(Mu *et al.*, 2017),但是微生物群落与CH₄通量的关系还不清楚(李大明等, 2013).

祁连山位于青藏高原东北部,广泛发育有多年冻土,其主要植被类型有沼泽草甸、草甸和草原.在过去的几十年中,祁连山地区的多年冻土发生了明显退化(曹斌, 2018; 吴晓东等, 2020).本研究结合不同海拔土壤微生物甲烷功能基因丰度及群落结构,通过静态气箱法对青藏高原多年冻土CH₄排放通量进行测定,揭示祁连山多年冻土区CH₄通量及其与甲烷微生物之间的关系,从而加深对多年冻土碳循环和CH₄释放的认识.

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于青藏高原东北部祁连山黑河上游野牛沟流域(98°75'E~99°78'E, 38°31'N~38°82'N),流域海拔范围2 800~4 800 m(阳勇等, 2007).1960~2009年平均年均气温-5~4℃(李丽丽, 2018).年降水量约为250~750 mm(Zhao *et al.*, 2005).降水集中在6~9月,约占年均降水量的76%(Gou *et al.*, 2012).研究区处于高海拔地区,气候干旱寒冷,具有典型的高寒半干旱气候特征.祁连山地区高山嵩草为优势种,其他草本植物有黑穗苔草(*Carex atrata*)、紫花针茅(*Stipa capillata* Linn)、矮火绒草等(*Leontopodium nanum*)(赵庆芳, 2006).土壤样地概况如表1所示.

1.2 土壤样品采集

样地设在祁连山黑河上游(3 100~4 100 m)的坡向和坡度的基本一致的区域,海拔梯度以200 m为间隔,设置研究样地,每个样地大小为10 m×10 m,于2019年7月开始采样.各采样点分别编号为:Q₁, Q₂, Q₃, Q₄, Q₅, Q₆.采样方法具体如下:首先,戴无菌手套,将各样地植被用酒精灭菌过的铲子去除;然后,用灭菌后的不锈钢土钻按“S”型采样法,分别采集0~15 cm、15~30 cm的土壤样品(李忠佩等, 2007),每个海拔的每个土层样品采集3份以做平行样,共36份.将混合均匀后的样品分成3部分,

表 1 土壤样地概况
Table 1 Environmental conditions for the sampling plots

样地编号	海拔(m)	经纬度	土壤类型	植被类型(主要组成)
Q ₁	4 100	38°78'N 98°74'E	高山沼泽土	高山嵩草 <i>Kobresiapygmaea</i> 、黑褐穗薹草 <i>Carexatrofusca</i> <i>Schkuhrsubsp.</i> 、火绒草 <i>Leontopodium leontopodioides</i> 、珠芽蓼 <i>Kobresiapygmaea</i> 等
Q ₂	3 900	38°83'N 98°83'E	高山沼泽土	高山嵩草 <i>Kobresiapygmaea</i> 、黑褐穗薹草 <i>Carexatrofusca</i> <i>Schkuhrsubsp.</i> 、西藏嵩草 <i>Kobresiatibetica</i> Maxim 等
Q ₃	3 700	38°81'N 99°03'E	高山草原土	高山嵩草 <i>Kobresiapygmaea</i> 、黑褐穗薹草 <i>Carexatrofusca</i> <i>Schkuhrsubsp.</i> 、矮嵩草 <i>Kobresia humilis</i> 、西藏嵩草 <i>Kobresiatibetica</i> 等
Q ₄	3 500	38°68'N 98°28'E	高山草原土	矮嵩草 <i>Kobresia humilis</i> 、黄花棘豆 <i>Oxytropisochrocephala</i> 等
Q ₅	3 300	38°47'N 98°54'E	高山灌丛草甸土	矮嵩草 <i>Kobresia humilis</i> 、黄花棘豆 <i>Oxytropisochrocephala</i> 、野决明 <i>Thermopsisilupinoides</i> 、紫花针茅 <i>Stipa purpurea</i> 等
Q ₆	3 100	38°31'N 98°78'E	亚高山灌丛草甸土	矮嵩草 <i>Kobresia humilis</i> 、紫花针茅 <i>Oxytropisochrocephala</i> 、野决明 <i>Stipa purpurea</i> 、冰草 <i>Agropyroncristatum</i> (L.) Gaertn 等

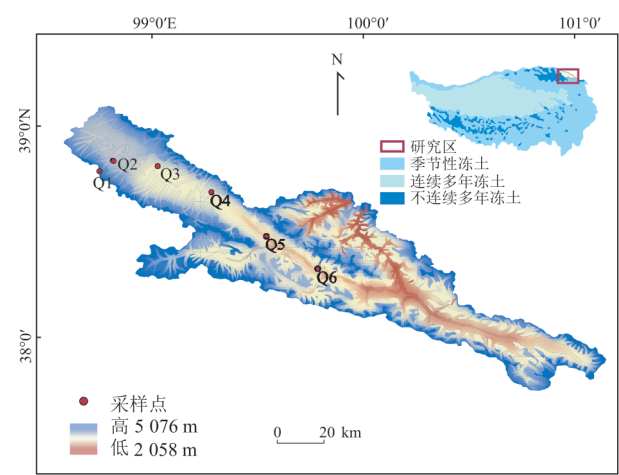


图 1 祁连山采样点分布
Fig.1 Sampling sites in the Qilian Mountains

其中用于土壤理化性质测定用自封袋带回. 用于土壤含水率测定的样品使用事先称重好的铝盒带回, 用于功能基因测序的样品用无菌采样袋带回. 运回实验室的过程中采用 4℃车载冰箱低温保存. 带回实验室后, 在超净台下用灭菌小刀将表层可能被污染的土壤样品削去, 然后装入无菌采样袋, 保存在-80℃, 用于微生物测定.

风干后的土壤去除枯叶、砾石等杂物, 研磨过 100 目筛后密封保存用于土壤理化性质测定. 土壤含水率用 105℃烘干法将野外采集的样品用铝盒带回烘干至恒重分析; pH 值用酸度计 (PHS-3C 型酸度计) 测定; 总氮 (TN) 用 KJELTECTM8400 全自动凯氏定氮仪测定; 总碳 (TC) 和有机碳由 CHNS-analyser (ElementarVario EL, Hanau, Germany) 高温燃烧法测定. 碳氮比 (C/N): 有机碳

(SOC) 和全氮 (TN) 质量比.

分析数据时, 为了区分各海拔的各土层样品, 以各采样点的海拔作为前缀, 和各土壤层深度作为后缀命名 (0~15 cm 用 F 表示, 15~30 cm 用 T 表示), 如海拔 3 100 m 处 0~15 cm 层命名为 31F; 海拔 3 100 m 处 15~30 cm 层命名为 31T, 其他各海拔以此类推.

1.3 土壤微生物组总 DNA 提取

每个土壤样品称取 0.3 g, 采用的是 Mo Bio 公司的 DNeasyPowerSoil Kit 试剂盒进行抽提, 参照试剂盒的流程来提取 DNA, 并对提取 DNA 进行检测, 每个样品 DNA 的提取做 3 组平行. 采用微量荧光分光光度计 (Nanodrop, NC2000, Thermo Scientific, USA) 检测 DNA 浓度, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量, 之后保存在-20℃冰箱待用.

1.4 目标片段 PCR 扩增与基因丰度测定

本研究采用产甲烷菌的功能基因 (*mcrA*) 引物 mlas (5'-GGTGGTGTMGDDTTCACMCARTA-3') (Steinberg *et al.*, 2008) 和 *mcrA* - rev (5'-CGTTCATBGCGTAGTTVGGRTAGT-3'); 甲烷氧化菌的功能基因 (*pmoA*) 引物 A189F (5'-GGN-GACTGGGACTTCTGG-3') 和 mb661R (5'-CC-GGMGCAACGTCYTACC-3') (Magoc *et al.*, 2011) 进行扩增. 在 PCR 扩增前, 对样本 DNA 原液稀释 10 倍以降低抑制因素对扩增效率的影响. 采用外标法构建标准曲线, 实时荧光定量 PCR (qPCR) 仪测定产甲烷菌 (*mcrA*) 和甲烷氧化菌 (*pmoA*) 功能基因丰度. Realtime PCR 仪上进行扩增 PCR 反应程序为: 95℃预变性 5 min, 1 循环; 95℃变性 15 s 和

60℃退火30 s,40循环。

1.5 测序片段的前处理

PCR扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目标片段进行切胶回收,回收采用AXY-GEN公司的凝胶回收试剂盒。参照电泳初步定量结果,将PCR扩增回收产物进行荧光定量,荧光试剂为Quant-iTPicoGreen dsDNA Assay Kit,定量仪器为Microplate reader(BioTek,FLX800)。根据荧光定量结果,按照每个样本的测序量需求,对各样本按相应比例进行混合。采用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库。

1.6 高通量测序

样品PCR扩增体系为25 μL,包括缓冲液5 μL、正向引物(10 μm)1 μL、反向引物(10 μm)1 μL、DNA模板0.25 μL。PCR扩增程序为:98℃预变性2 min,98℃变性15 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,72℃最终延伸5 min,10℃保持25~30个循环。每个样本土壤均做3组重复。用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen, AP-GX-500)试剂盒进行胶回收,得到纯化样本,用BioTek公司的(FLX800T, USA)酶标仪进行各样本定量,采用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库,最后采用Illumina Miseq PE300平台进行高通量测序。

使用MiSeq测序仪进行2×300 bp的双端测序,相应试剂为MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles)。首先对高通量测序的原始下机数据根据序列质量进行初步筛查,通过质量初筛的序列按照引物和Barcode信息,识别分配入对应样本。运用QIIME软件识别疑问序列。随后,通过QIIME软件(v1.8.0)调用USEARCH(v5.2.236)检查并剔除嵌合体序列。最后对获得的序列使用QIIME软件,调用UCLUST这一序列比对工具进行OTU归并划分,序列相似度在97%以上的为一个OTU,每个OTU的代表序列用于分类地位鉴定以及系统发育学分析。本研究在“目”水平上分析甲烷功能菌群的群落特征。

1.7 气体样品采集

气体监测日期均在每月的15号左右。气体采用50 cm×50 cm×50 cm规格的静态箱采集,该静态箱由5 mm厚度的PVC管制备而成,静态箱的底座配有U型水槽,用于采集气体时气箱与底座密封。取样期间,静态箱盖于U型水槽里,用水密封,并用

一层不透光的布遮住,以达到暗箱环境,运行时需将风扇通电,进行气体混合。静态箱的整个放置时间为15分钟,间隔5 min用5 mL真空采血管(真空度达93%)收集静态箱内气体,将3次采气量做成梯度,计算其通量(Mu *et al.*, 2017)。

在采集气体时,同步测定样地土壤温度、紫外线强度、空气温度、空气湿度、风速等环境指标。每月取样时间在其中一个高寒草原采样点进行12 h周期的全天测定,以及各个采样点的测定,利用全天测定算出的气体通量变化规律将不同采样时间的各个采样点进行计算。从2019年6月到2020年1月,取样频率为1个月一次。用气相色谱仪(GC-2010 Plus SHIMADZU, Japan)测定采集的CH₄样品的浓度。

甲烷通量计算公式见式(1):

$$F = \rho \times \frac{V}{A} \times \frac{P}{P_0} \times \frac{T_0}{T} \times \frac{dC_t}{dt}, \quad (1)$$

其中: F 为CH₄通量(mg·m⁻²·h⁻¹); ρ 为标准大气压下(mg·m⁻³)甲烷的密度; V 为箱子的空间体积(m³); A 为底面积(m²); P 为该地区大气压(hPa); T 为该地区的温度(K); P_0 是标准大气压(1 013 hPa); T_0 是标准温度(273 K); dC_t/dt 是CH₄的增长速率(10⁻⁶h⁻¹)。

1.8 数据分析

采用Microsoft Excel进行基础数据统计并求出部分数据的平均值及标准差,使用Origin2021(学习版)将处理好的数据进行绘图,使用SPSS 21.0软件运用皮尔森(Pearson)双尾检验法进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 各海拔甲烷排放通量

采样地在各海拔由高到底月平均CH₄排放通量为0.270 mg·m⁻²·h⁻¹、0.006 mg·m⁻²·h⁻¹、-0.530 mg·m⁻²·h⁻¹、-0.380 mg·m⁻²·h⁻¹、-0.490 mg·m⁻²·h⁻¹、-0.490 mg·m⁻²·h⁻¹(图2)。CH₄排放通量大体呈单峰曲线,在8、9月到达了最高顶峰。从8、9月到第2年的1月一直呈现较为平稳的下降趋势。一般1月份达到最低值。该4 100 m海拔CH₄通量整体表现为向大气排放CH₄,并无吸收CH₄情况。3 900 m、3 500 m、3 100 m海拔CH₄通量表现为先向大气排放CH₄后吸收CH₄。而海拔在3 700 m、3 300 m海拔CH₄通量表现为向大气一直吸收CH₄。整体上,甲烷排放通量随着海拔上升而增加,但在3 700 m处出现回落。只有4 100 m和3 900 m处

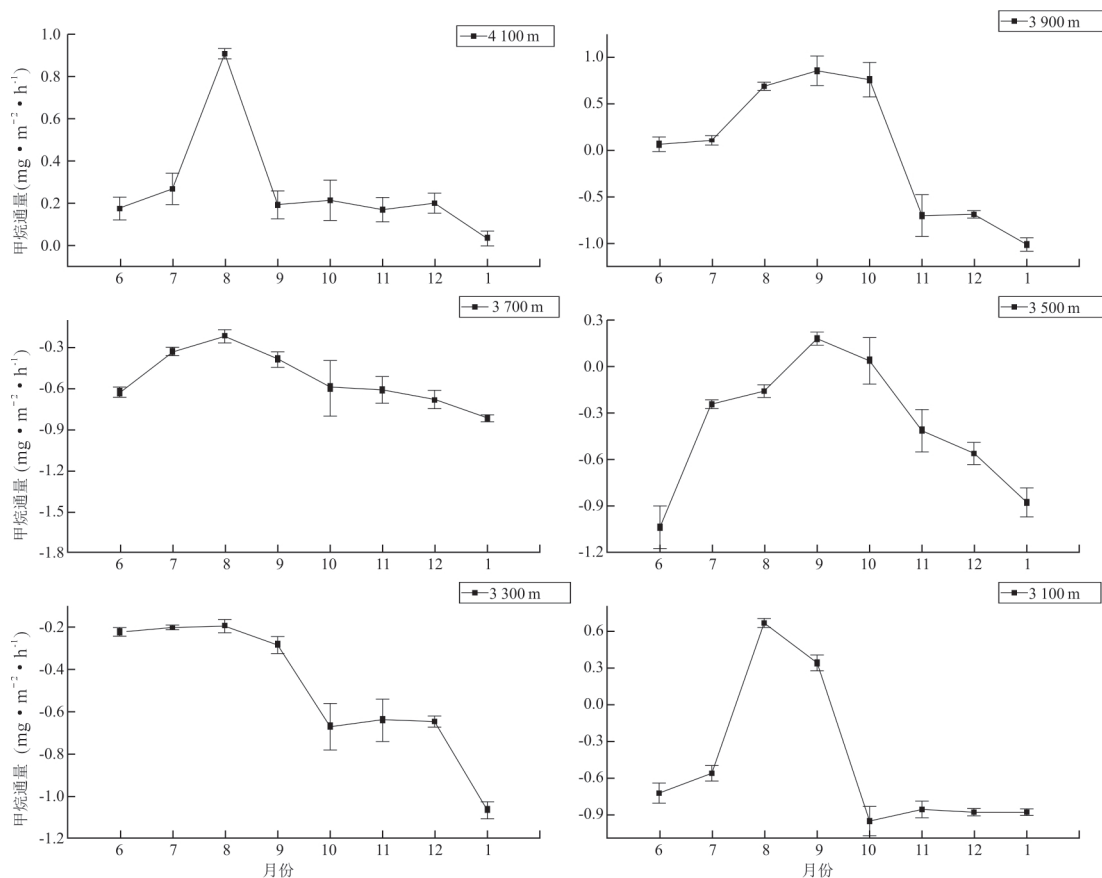


图2 各海拔CH₄通量情况
Fig.2 CH₄ flux at different altitudes

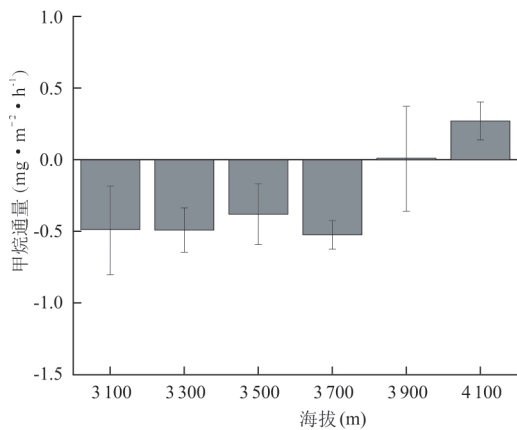


图3 各海拔甲烷通量均值
Fig.3 Mean values of CH₄ flux at different altitudes

表现为源,而其他各海拔地区表现为汇(图3)。

2.2 土壤理化性质

研究区不同海拔土壤的含水率、pH、TC、SOC、TN、C/N变化如图4,5所示。土壤含水率在0~15 cm和15~30 cm的均值27.61%和23.44%。土壤pH在7.48~8.03。土壤TC的平均值在在0~15 cm和15~30 cm分别为3.65%和3.28%。土壤电导率范

围是28.40~12.60 μs/cm,土壤SOC在0~15 cm土层范围为12.61~49.32 g·kg⁻¹、均值27.25 g·kg⁻¹,15~30 cm土层中范围为8.31~24.93 g·kg⁻¹、均值13.76 g·kg⁻¹。土壤TN的变化范围为1.67~5.13 g·kg⁻¹。土壤C/N在0~15 cm土层范围为3.60~13.13 g·kg⁻¹、均值8.13 g·kg⁻¹,15~30 cm土层中范围为2.98~8.83 g·kg⁻¹、均值5.54 g·kg⁻¹。

2.3 功能基因丰度

同深度土层产甲烷菌 *mcrA* 功能基因拷贝数随海拔降低呈下降趋势,其中海拔3300 m出现例外,比3100 m处更低, *mcrA* 功能基因拷贝数为(2.94±0.52)×10³ copies·g⁻¹,海拔4100 m处 *mcrA* 功能基因拷贝数最高为(2.19±0.61)×10⁵ copies·g⁻¹。 *mcrA* 功能基因拷贝数随深度变化规律不明显,其中,在海拔3300 m处 *mcrA* 功能基因拷贝数最低。甲烷氧化菌 *pmoA* 功能基因拷贝数随海拔变化无明显变化规律,在不同深度之间也没有规律可循,其中海拔3500 m土壤的15~30 cm层 *pmoA* 功能基因拷贝数最高,达到(1.50±0.44)×10⁶ copies·g⁻¹(图6)。

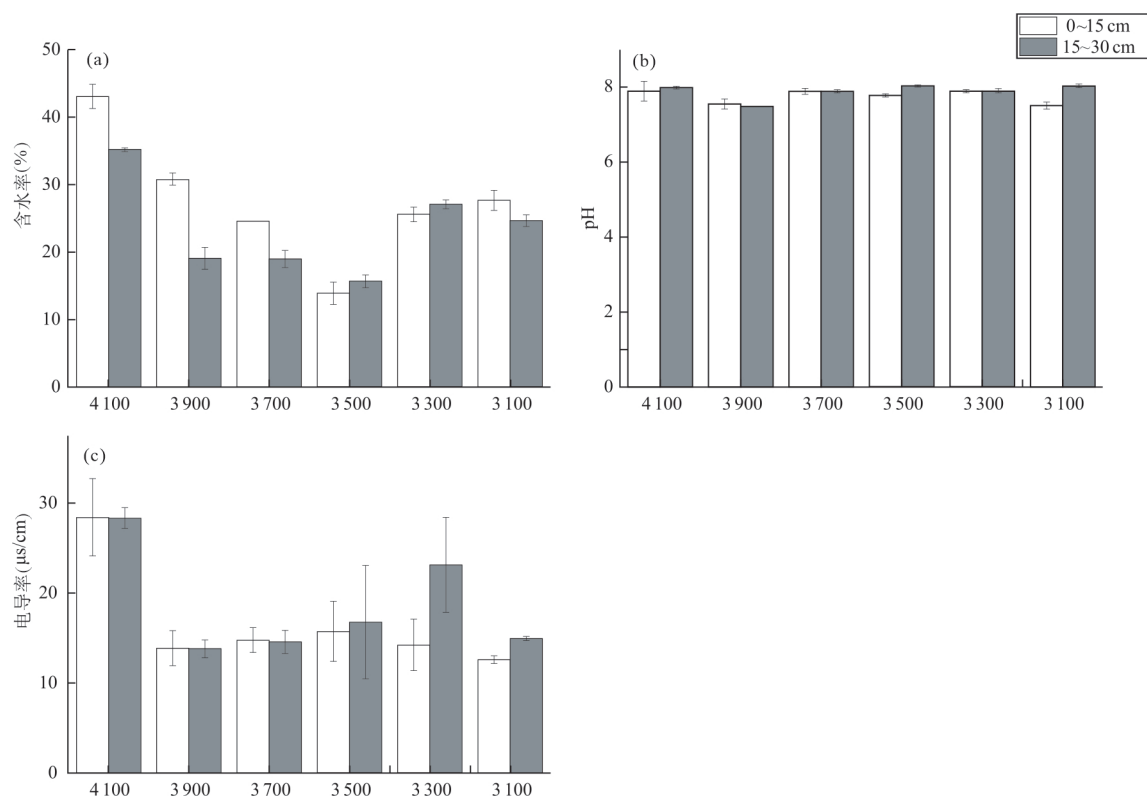


图 4 不同海拔的土壤理化性质

Fig.4 Soil physical and chemical properties at different altitudes

a. 含水率;b. pH;c. 电导率

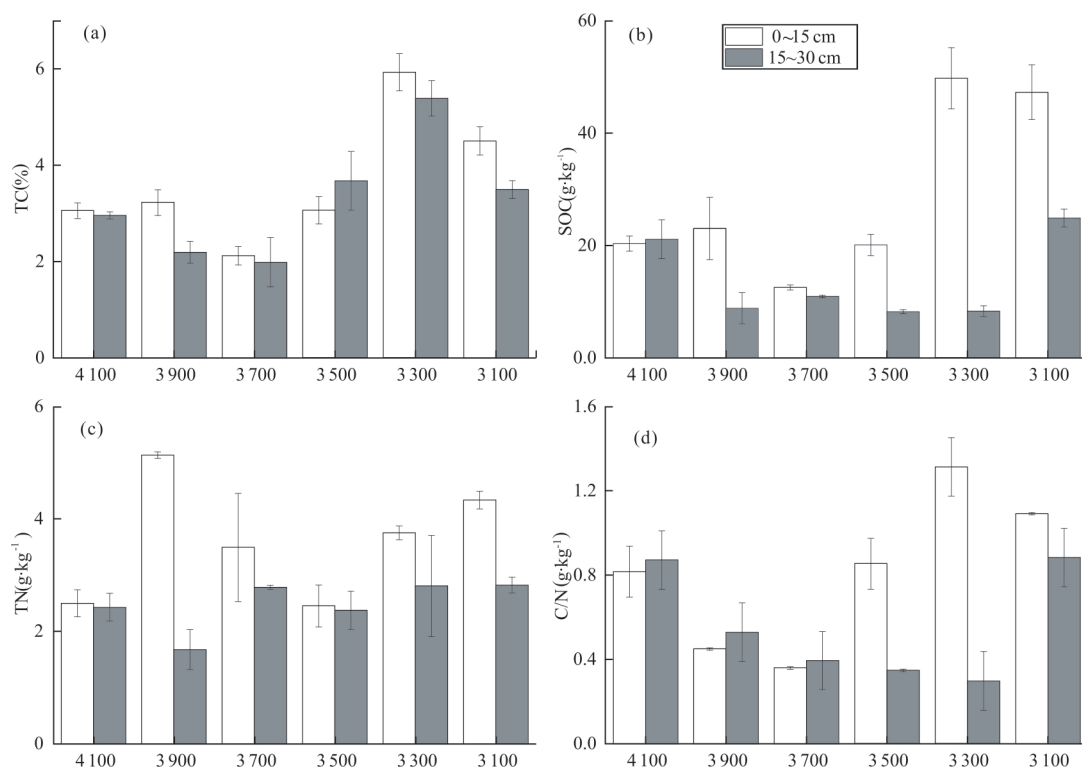


图 5 不同海拔的土壤碳氮含量

Fig.5 Soil carbon and nitrogen contents at different altitudes

a. TC;b. SOC;c. TN;d. C/N

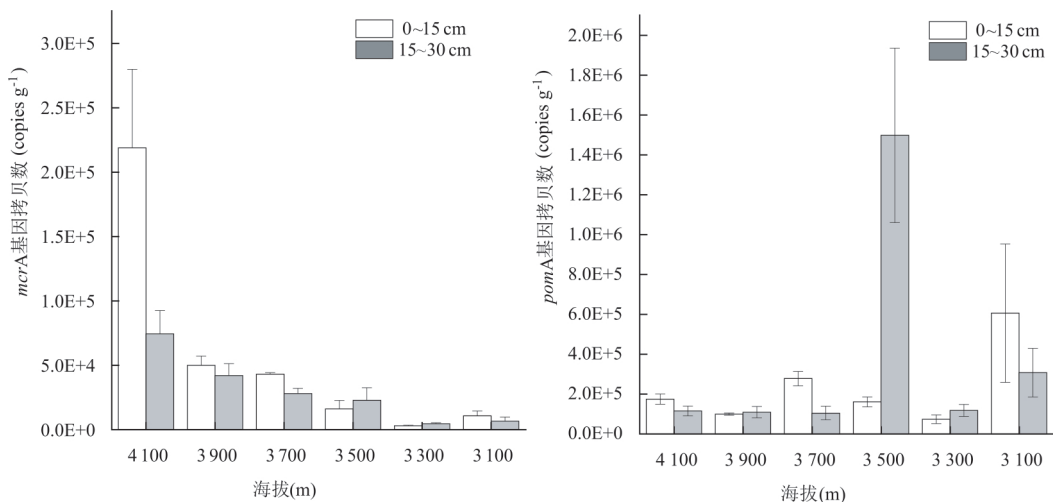


图 6 *mcrA* 和 *pmoA* 功能基因丰度
Fig.6 *mcrA* and *pmoA* gene abundance

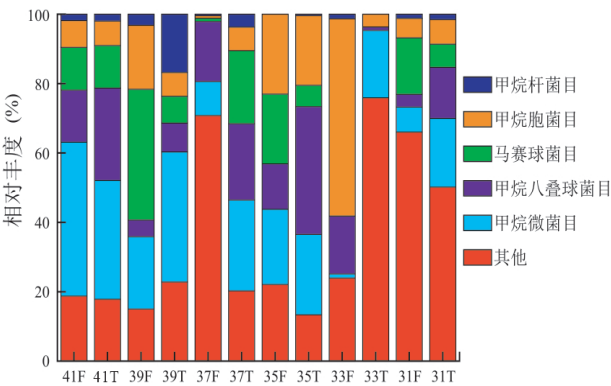


图 7 各样本产甲烷菌目水平菌群分布
Fig.7 Distribution of methanogenes at order level

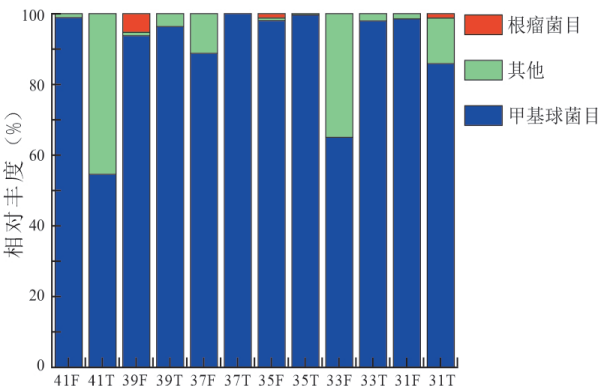


图 8 各样本甲烷氧化菌目水平菌群分布
Fig.8 *Methanotrophs* distribution at the level of order in each sample

2.4 微生物群落构成

根据研究区各土壤样品的 OTU 划分和分类地位鉴定结果,进行门、纲、目、科、属、种分类信息分析,共发现产甲烷菌 2 个门,4 个纲,7 个目,12 个科,21 个属,47 个种;甲烷氧化菌 2 个门,4 个纲,6 个目,9 个科,13 个属,25 个种。

在目水平上,各样地产甲烷菌主要包括甲烷微菌目(*Methanomicrobiales*, 21.77%)、甲烷八叠球菌目(*Methanosarcinales*, 14.71%)、马赛球菌目(*Methanomassiliicoccales*, 11.67%)、甲烷胞菌目(*Methanocellales*, 13.55%)、甲烷杆菌目(*Methanobacteriales*, 2.67%)、甲烷火菌目(*Methanopyrales*, 0.01%)、其他产甲烷菌目占 34.39%(图 7)。各样地甲烷氧化菌主要包括甲基球菌目(*Methylococcales*, 89.67%)、根瘤菌目(*Rhizobiales*, 0.71%)、其他甲烷氧化菌目占 9.52%(图 8)。

2.5 土壤样品微生物群落与土壤理化性质对 CH₄ 通量影响

含水率与电导率、呈显著正相关($p<0.05$)(表 2)。pH 与其他土壤理化性质不存在相关关系($p>0.05$)。电导率与其他土壤理化性质不存在相关关系($p>0.05$)。TC 与 SOC 呈极显著正相关($p<0.01$)。SOC 与 C/N 呈显著正相关($p<0.05$)。TN 与其他土壤理化性质不存在相关关系($p>0.05$)。C/N 与其他土壤理化性质不存在相关关系($p>0.05$)。

产甲烷菌中,Alpha 多样性指数与土壤理化性质相关性分析结果显示(表 3):产甲烷菌所有微生物指数与 TC 呈极显著正相关($p<0.01$),其中 Simpson 指数与 SOC 呈极显著正相关($P<0.01$);Chao1 指数、shannon 指数与 SOC 呈显著正相关($p<0.05$)。与其他土壤理化性质各项指标不存在相关关系($p>0.05$)。甲烷氧化菌中,Simpson 指数

表 2 土壤理化性质和甲烷通量相关性								
Table 2 Correlation coefficients amongs oil physical and chemical properties and methane emission rates								
	含水率	pH	电导率	总碳 TC	有机碳 SOC	总氮 TN	碳氮比 C/N	速率 Rate
含水率	1	0.044	0.676*	0.120	0.257	0.248	0.247	0.577*
pH		1	0.451	0.094	−0.135	−0.363	0.54	−0.187
电导率			1	0.023	−0.202	−0.389	0.051	0.592*
TC				1	0.588*	0.322	0.427	−0.036
SOC					1	0.540	0.871**	0.046
TN						1	0.094	−0.172
C/N							1	0.248
速率								1

注:**. 在 0.01 水平, Pearson 相关系数(双尾)显著相关;*. 在 0.05 水平, Pearson 相关系数(双尾)显著相关

表 3 产甲烷菌与甲烷氧化菌 α多样性指数和土壤理化性质相关性统计表								
Table 3 Correlation coefficients between alpha diversity index of methanogens and methanogenic bacteria and soil physicochemical properties								
功能基因	α多样性指数	含水率	pH	电导率	总碳 TC	有机碳 SOC	总氮 TN	碳氮比 C/N
产甲烷菌 Methanogens	Simpson	0.067	−0.023	0.165	0.827**	0.618**	−0.217	−0.515
	Chao1	−0.279	0.080	−0.078	0.792**	0.579*	−0.234	−0.502
	ACE	−0.255	0.076	−0.054	0.789**	0.575	−0.239	−0.492
	Shannon	−0.026	0.159	0.206	0.801**	0.699*	−0.324	−0.545
甲烷氧化菌 methanotrophs	Simpson	0.004	0.649*	0.284	0.300	0.136	−0.181	0.226
	Chao1	−0.305	0.181	−0.175	0.433	0.136	−0.017	0.095
	ACE	−0.297	0.179	−0.174	0.443	0.143	−0.010	0.098
	Shannon	−0.093	0.380	0.128	0.397	0.128	−0.140	0.180

注:**. 在 0.01 水平, Pearson 相关系数(双尾)显著相关;*. 在 0.05 水平, Pearson 相关系数(双尾)显著相关

表 4 CH ₄ 通量以及土壤理化性质与 CH ₄ 功能基因丰度的相关性分析								
Table 4 Correlation coefficients between CH ₄ emission and soil physical and chemical properties and CH ₄ functional gene abundance								
功能基因	总碳 TC	总氮 TN	碳氮比 C/N	有机碳 SOC	含水率	电导率	pH	速率
<i>pmoA</i>	0.084	−0.088	−0.254	−0.184	−0.335	−0.126	0.224	−0.126
<i>mcrA</i>	−0.328	−0.189	0.053	−0.120	0.729**	0.675*	0.065	0.612*

注:**. 在 0.01 水平, Pearson 相关系数(双尾)显著相关;*. 在 0.05 水平, Pearson 相关系数(双尾)显著相关

与 pH 呈显著正相关($p < 0.05$);与其他土壤理化性质各项指标不存在相关关系($p > 0.05$). 对土壤中 *pmoA* 基因和 *mcrA* 基因与土壤理化性质进行相关性分析(表 4). 结果表明: *pmoA* 功能基因丰度与其他指标性相关性不显著($p > 0.05$); *mcrA* 功能基因丰度与土壤含水率呈极显著正相关($p < 0.01$),与甲烷排放通量和土壤电导率呈显著正相关关系($p < 0.05$).

3 讨论

3.1 甲烷通量特征

整体上, CH₄排放通量随着海拔上升而增加,虽

然在 3 700 m 处出现回落日均的通量情况只有 4 100 m 和 3 900 m 处表现为源,而其他各海拔地区表现为汇. 在各个采样点中也出现明显的季节变化,在温度较高的 8、9 月份, CH₄通量明显增大.

该研究区域中甲烷通量出现吸收和排放两种情况. 造成原因可能是海拔梯度变化,导致区域之间的植被类型发生变化. 有研究表明, CH₄通量在植被类型之间差异较大(Li *et al.*, 2016). 据调查该地区高海拔(4 100~3 900 m)处为高寒沼泽草甸,中部(3 700~3 500 m)为高寒草原,低部(3 300~3 100 m)为高寒草甸,研究区植被随海拔垂直分布明显. 可见海拔可能影响植被类型进而影响 CH₄通量. 在中部高寒草甸地区表现为碳汇,这与青藏高

原高寒草地吸收 CH_4 的结果一致。但是,高海拔地区的高寒沼泽草甸仍旧表现为碳源,这与管崇帆等研究高寒沼泽是碳源的结果一致(管崇帆等, 2020)。可见,高寒沼泽草甸的 CH_4 释放情况是以后研究的重点。

CH_4 的月变化可能与月变化温度有直接关系。温度是生物地球化学过程的关键驱动力,影响着土壤的 CH_4 的产生和氧化。Yvon-Durocher *et al.* (2014) 人发现 CH_4 的通量变化依赖于微生物温度的变化。全球气候变暖导致土壤温度升高进而造成环北极地区以及青藏高原大部分地区多年冻土退化,进而导致 CH_4 排放量增加(Voigt *et al.*, 2019)。谌佳伟等人得出 CH_4 通量在夏季高于其他季节(谌佳伟等, 2020),与温度呈正相关关系与本研究结果大致相同。由于 8、9 月温度较高, CH_4 通量较大, CH_4 的峰值多出现在夏季。

3.2 土壤理化性质

本研究并未发现随海拔升高,土壤 TC、TN、SOC 等指标有明显的变化规律。与胡启武等对祁连山北坡垂直地带土壤碳氮分布的研究发现, SOC、TN 随海拔升高呈上升趋势结果不同(胡启武等, 2006)。可能是本研究中的低海拔高寒草甸地区植被相对茂盛,对大气固碳固氮能力较强,所以低海拔地区的 TC、SOC 等指标比高海拔地区高。本研究中同一海拔的 0~15 cm 土层的 TC、TN、SOC 等指标绝大多数高于 15~30 cm 土层。SOC、TN 含量在 0~15 cm 层较高主要是因为植物凋落物、动植物微生物残体多集聚于土壤表面形成有机质,与此同时,植物生长对养分吸收和富集作用使得表层 TC、TN、SOC 等含量较高。这与赵云飞等对青藏高原东部土壤研究的结果相同(赵云飞等, 2018),在土壤的垂直剖面上,表层的 C、N 含量高于下层的。

本研究中, pH 值变化范围 7.48~8.03 之间。pH 与不同土层土壤理化性质各项指标无相关关系。这与欧阳林梅等对不同海拔山地土壤的研究发现, pH 显著影响土壤 SOC、TN 含量的结果不同(欧阳林梅等, 2014)。这可能与研究区土壤特性有关。该地区的电导率与含水率显著正相关,而且与 CH_4 通量显著正相关,其原因还需进一步调查研究。

3.3 土壤微生物群落组成与甲烷通量

超过 80% 的 CH_4 来源为微生物活动,而影响 CH_4 通量的两大功能菌群是产甲烷菌、甲烷氧化菌(Aronson *et al.*, 2013),产甲烷菌是普遍存在于厌氧

环境中,有机质易形成较低的氧化还原电位进行无氧呼吸从而产生 CH_4 。所以 *mcrA* 基因丰度与 CH_4 通量密切相关(Yang *et al.*, 2018)。本研究中 *mcrA* 基因丰度与 CH_4 通量极显著正相关,表示在该地区的 CH_4 通量主要受产甲烷菌数量影响。中部(3 700~3 500 m)高寒草原地区含水率较低,使得土壤中的氧气含量增加, *mcrA* 基因丰度减少, CH_4 通量也相应减少。而且伴随着海拔梯度的上升,产甲烷菌的基因丰度也明显增加。

甲烷氧化菌在有氧的条件下将 CH_4 氧化成 CO_2 和水并生产一系列中间代谢产物(王玉芳等, 2019)。以甲烷作为能源和碳源的微生物,不仅能够减少土壤 CH_4 通量,在含水率不饱和的土壤中还能利用空气中的 CH_4 ,对减缓全球温室效应具有显著效果(蔡朝阳等, 2016)。本研究中, *pmoA* 基因丰度和 CH_4 的排放通量不存在相关性。造成这种情况原因可能是甲烷氧化菌的数量和活性在较高的土壤水分含量下显著降低。较低的土壤含水率,产甲烷菌和甲烷氧化菌的数量、活性动态平衡过程中,甲烷氧化菌占据了优势,导致土壤向大气吸收 CH_4 。本实验中含水率在各地区均未达到田间持水量,达不到严格厌氧条件。如果水分土壤含量不大,当时大气吸收 CH_4 时受其他因素影响而不稳定,这就造成了实验中甲烷氧化菌群数量不能作为排放 CH_4 通量的重要因素。

本研究中,产甲烷菌优势类群为 *Methanomicrobiales*、*Methanosarcinales*、*Methanomassiliicoccales*、*Methanocellales* (Rice cluster I)。这与王艳发等(2016)在祁连山冻土区活动层发现的优势类群为 *Rice cluster I* 和 *Methanomicrobiales* 结果类似,但比其种类更多。 CH_4 通常是由产甲烷菌无氧呼吸分解有机物产生,甲烷的底物对微生物群落结构有着较大的影响。本研究中土壤微生物群落丰富度与 TC 和 SOC 呈正相关关系。表明多年冻土中土壤的 SOC 以及 TC 是 CH_4 潜在的碳源。

4 结论与展望

对青藏高原多年冻土不同海拔研究发现,高海拔(4 100~3 900 m)高寒沼泽草甸地区为重要的 CH_4 源,而中部(3 700~3 500 m)高寒草原以及低部(3 300~3 100 m)高寒草甸是重要的 CH_4 汇。研究区各海拔都出现了明显的季节变化。该地区含水率和电导率是影响 CH_4 通量的主要因素。*mcrA* 基因

丰度与CH₄通量呈正相关关系, *pmoA* 基因丰度与CH₄通量无明显关系. *mcrA* 基因丰度随海拔有着明显的上升趋势, *pmoA* 基因丰度随海拔无明显变化. 微生物的群落多样性与土壤中的TC和SOC呈正相关. 可见, 水分、温度、有机质含量与甲烷氧化菌的基因丰度是影响草地生态系统CH₄源汇效应的主要因素.

References

- Aronson, E. L., Allison, S. D., Helliker, B. R., 2013. Environmental Impacts on the Diversity of Methane-Cycling Microbes and Their Resultant Function. *Frontiers in Microbiology*, 4:225. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00225>
- Cai, C. Y., He, Z. F., Hu, B. L., 2016. Progresses in the Classification and Mechanism of Methane-Oxidizing Bacteria. *Journal of Zhejiang University*, 42(3): 273—281(in Chinese with English abstract).
- Cao, B., 2018. Conditions and Dynamics of Permafrost in the Qilian Mountains over the Upper Reaches of Heihe River Basin(Dissertation). Lanzhou University, Lanzhou (in Chinese with English abstract).
- Chen, J. W., Ge, J. W., Feng, L., et al., 2020. Methane Flux Characteristics and Its Relationship with Soil Microbial Community Composition of Dajiuhe Peatland in Shennongjia. *Earth Science*, 45(3): 1082—1092 (in Chinese with English abstract).
- Feng, H. L., Guo, J. H., Han, M. H., et al., 2019. A Review of the Mechanisms and Controlling Factors of Methane Dynamics in Forest Ecosystems. *Forest Ecology and Management*, 455: 117702. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117702>
- Gou, X. H., Zhang, F., Deng, Y., et al., 2012. Patterns and Dynamics of Tree-Line Response to Climate Change in the Eastern Qilian Mountains, Northwestern China. *Dendrochronologia*, 30(2): 121—126. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2011.05.002>
- Guan, C. F., He, F. J., Han, H. B., et al., 2020. Effects of Environmental and Microbial Factors on Soil Methane of the Different Vegetation Types at Longbaota Natural Reserve. *Ecology and Environmental Sciences*, 29(5): 987—995 (in Chinese with English abstract).
- Hu, Q. W., Ouyang, H., Liu, X. D., 2006. Distribution Characteristics of Soil Organic Carbon and Total Nitrogen along the Altitudinal Belt in the Northern Slope of Qilian Mountains. *Journal of Mountain Science*, 24(6): 654—661 (in Chinese with English abstract).
- Hugelius, G., Strauss, J., Zubrzycki, S., et al., 2014. Estimated Stocks of Circumpolar Permafrost Carbon with Quantified Uncertainty Ranges and Identified Data Gaps. *Biogeosciences*, 11(23): 6573—6593. <https://doi.org/10.5194/bg-11-6573-2014>
- IPCC. 2014. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of IPCC the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, England.
- Le Mer, J., Roger, P., 2001. Production, Oxidation, Emission and Consumption of Methane by Soils: a Review. *European Journal of Soil Biology*, 37(1): 25—50. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01067-6](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01067-6)
- Li, D. M., Cheng, Y. H., Liu, M. Q., et al., 2013. Relationship between Methane Emission and the Community Structure and Abundance of Methanogens under Double Rice Cropping System. *Journal of Agro-Environment Science*, 32(4): 866—873(in Chinese with English abstract).
- Li, L. L., 2018. The Correlationship Between Permafrost Micro-Environment and Vegetation Succession in Upper Reaches of Heihe(Dissertation). Lanzhou University, Lanzhou(in Chinese with English abstract).
- Li, S., Song, L., Gao, X., et al., 2017. Microbial Abundances Predict Methane and Nitrous Oxide Fluxes from a Windrow Composting System. *Frontiers in Microbiology*, 8: 409. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00409>
- Li, T. T., Raivonen, M., Alekseychik, P., et al., 2016. Importance of Vegetation Classes in Modeling CH₄ Emissions from Boreal and Subarctic Wetlands in Finland. *Science of the Total Environment*, 572: 1111—1122. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.020>
- Li, Z. P., Wu, X. C., Chen, B. Y., 2007. Changes in Transformation of Soil Organic Carbon and Functional Diversity of Soil Microbial Community Under Different Land Use Patterns. *Scientia Agricultura Sinica*, 40(8): 1712—1721 (in Chinese with English abstract).
- Lieberman, R. L., Rosenzweig, A. C., 2004. Biological Methane Oxidation: Regulation, Biochemistry, and Active Site Structure of Particulate Methane Monooxygenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39(3): 147—164. <https://doi.org/10.1080/10409230490475507>
- Magoc, T., Salzberg, S. L., 2011. FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(21): 2957—2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mu, C. C., Abbott, B. W., Zhao, Q., et al., 2017. Permafrost Collapse Shifts Alpine Tundra to a Carbon Source but Reduces N₂O and CH₄ Release on the Northern Qinghai-

- Tibetan Plateau. *Geophysical Research Letters*, 44(17): 8945—8952. <https://doi.org/10.1002/2017GL074338>
- Mu, C. C., Li, L. L., Wu, X. D., et al., 2018. Greenhouse Gas Released from the Deep Permafrost in the Northern Qinghai-Tibetan Plateau. *Scientific Reports*, 8(1): 1—9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22530-3>
- Ouyang, M. L., Zeng, D. P., Min, Q. W., et al., 2014. Ecological Stoichiometry Characteristics of Soil Carbon, Nitrogen and Phosphorus in the Tea Garden of Drum Mountain. *Journal of Soil and Water Conservation*, 28(2): 297—301 (in Chinese with English abstract).
- Qin, L., Lv, G. H., He, X. M., 2013. Effects of Freezing-Thawing on Soil Microbial Quantity and Community Structure around the Ebinur Lake. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 35(6): 1590—1599 (in Chinese with English abstract).
- Song, C. C., Xu, X. F., Sun, X. X., et al., 2012. Large Methane Emission Upon Spring Thaw from Natural Wetlands in the Northern Permafrost Region. *Environmental Research Letters*, 7(3): 034009. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/7/3/034009>
- Steinberg, L. M., Regan, J. M., 2008. Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities from an Acidic, Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21): 6663—6671. <https://doi.org/10.1128/aem.00553-08>
- Voigt, C., Marushchak, M. E., Mastepanov, M., et al., 2019. Ecosystem Carbon Response of an Arctic Peatland to Simulated Permafrost Thaw. *Global Change Biology*, 25(5): 1746—1764. <https://doi.org/10.1111/gcb.14574>
- Wang, X. W., Li, X. Z., Lv, J. J., et al., 2010. Effects of Temperature on the Carbon Mineralization of Peat in The Permafrost Wetland in the Da Xing An Mountains. *Quaternary Sciences*, 30(3): 591—597 (in Chinese with English abstract).
- Wang, Y. F., Cai, Y. F., Hou, F. J., et al., 2019. Aerobic Methane Oxidation in Typical Grassland Soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 59(6): 1116—1126 (in Chinese with English abstract).
- Wang, Y. F., Wei, S., P., Cui, H. P., et al., 2016. Methane Metabolic Microbial Community Structure in the Active Layer and the Permafrost Layer of the Qilian Permafrost, China. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 22(4): 592—598 (in Chinese with English abstract).
- Watson, R. T., Zinyowera, M. C., Moss, R. H. 1996. Impacts, Adaptations and Mitigation of Climate Change: Scientific-Technical Analyses. Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, England.
- Wu, X. D., Wu, T. H., 2020. Permafrost Degradation has Important Effects on Climate and Human Society. *Chinese Journal of Nature*, 42(5): 425—431 (in Chinese with English abstract).
- Yang, G. B., Peng, Y. F., Olefeldt, D., et al., 2018. Changes in Methane Flux along a Permafrost Thaw Sequence on the Tibetan Plateau. *Environmental Science & Technology*, 52(3): 1244—1252. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04979>
- Yang, Y., Chen, R. S., Ji, X. B., 2007. Variations of Glaciers in the Yeniugou Watershed of Heihe River Basin from 1956 to 2003. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 29(1): 100—106 (in Chinese with English abstract).
- Yvon-Durocher, G., Allen, A. P., Bastviken, D., et al., 2014. Methane Fluxes Show Consistent Temperature Dependence across Microbial to Ecosystem Scales. *Nature*, 507(7493): 488—491. <https://doi.org/10.1038/nature13164>
- Zhang, Y. F., Cui, M. M., Duan, J. B., et al., 2018. Abundance, rather than Composition, of Methane-Cycling Microbes Mainly Affects Methane Emissions from Different Vegetation Soils in the Zoige Alpine Wetland. *MicrobiologyOpen*, 8(4): e00699. <https://doi.org/10.1002/mbo3.699>
- Zhao, C. Y., Nan, Z. R., Cheng, G. D., 2005. Methods for Modelling of Temporal and Spatial Distribution of Air Temperature at Landscape Scale in the Southern Qilian Mountains, China. *Ecological Modelling*, 189(1/2): 209—220. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.016>
- Zhao, Q. F., 2006. Genetic Diversity of Plants of Genus Kobresia in the East of Qinghai-Tibet Plateau (Dissertation). Lanzhou University, Lanzhou (in Chinese with English abstract).
- Zhao, Y. F., Hong, M. M., Ou, Y. S., et al., 2018. The Stoichiometric Characteristics of Soil C, N, P in Mountain Steppe of Eastern Tibetan Plateau. *Ecological Science*, 37(5): 25—32 (in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

- 蔡朝阳, 何崭飞, 胡宝兰, 2016. 甲烷氧化菌分类及代谢途径研究进展. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 42(3): 273—281.
- 曹斌, 2018. 黑河上游祁连山区多年冻土状态与动态研究(博士学位论文). 兰州: 兰州大学.
- 谌佳伟, 葛继稳, 冯亮, 等, 2020. 神农架大九湖泥炭湿地甲烷通量特征及其与土壤微生物群落组成的关系. *地球科学*, 45(3): 1082—1092.
- 管崇帆, 何方杰, 韩辉邦, 等, 2020. 环境和微生物因子对隆宝滩不同植被类型土壤甲烷通量的影响. *生态环境学报*, 29(5): 987—995.

- 胡启武,欧阳华,刘贤德,2006. 祁连山北坡垂直带土壤碳氮分布特征. 山地学报, (6): 654—661.
- 李大明,成艳红,刘满强,等,2013. 双季稻田甲烷排放与土壤产甲烷菌群落结构和数量关系研究. 农业环境科学学报, 32(4): 866—873.
- 李丽丽,2018. 黑河上游多年冻土区微环境与植被相关性研究(博士学位论文). 兰州:兰州大学.
- 李忠佩,吴晓晨,陈碧云,2007. 不同利用方式下土壤有机碳转化及微生物群落功能多样性变化. 中国农业科学, (8): 1712—1721.
- 欧阳林梅,曾冬萍,闵庆文,等,2014. 鼓山茶园土壤碳氮磷生态化学计量学特征. 水土保持学报, 28(2): 297—301.
- 秦璐,吕光辉,何学敏,2013. 艾比湖地区冻融作用对土壤微生物数量和群落结构的影响. 冰川冻土, 35(6): 1590—1599.
- 王宪伟,李秀珍,吕久俊,等,2010. 温度对大兴安岭北坡多年冻土湿地泥炭有机碳矿化的影响. 第四纪研究, 30(3): 591—597.
- 王艳发,魏士平,崔鸿鹏,等,2016. 祁连山冻土区土壤活动层与冻土层中甲烷代谢微生物群落结构特征. 应用与环境生物学报, 22(4): 592—598.
- 王玉芳,蔡元锋,侯扶江,等,2019. 典型草地土壤好氧甲烷氧化的微生物生态过程. 微生物学报, 59(6): 1116—1126.
- 吴晓东,吴通华,2020. 多年冻土退化对气候和人类产生重要影响. 自然杂志, 42(5): 425—431.
- 阳勇,陈仁升,吉喜斌,2007. 近几十年来黑河野牛沟流域的冰川变化. 冰川冻土, (1): 100—106.
- 赵庆芳,2006. 青藏高原东部嵩草属植物遗传多样性研究(博士学位论文). 兰州:兰州大学.
- 赵云飞,洪苗苗,欧延升,等,2018. 青藏高原东部山地草地土壤碳、氮、磷元素计量特征. 生态科学, 37(5): 25—32.