

不同年份及季節人工濕地土壤好氧甲烷氧化菌 之研究

Changes of Aerobic Methanotrophs in Constructed Wetlands of Different Ages and Seasons

國立台灣大學生物環境系統工程研究所

碩士班學生

陳亭愷

Ting-Kai Chen

助理教授

蕭友晉

Yo-Jin Shiau

摘要

人工濕地是近幾十年來廣泛應用之生態工程技術，具有調節洪水、淨化水質以及營造生態多樣性等生態系服務，而由於其高初級生產力與環境特性，被認為是潛在的碳匯。然而其厭氧之土壤條件，也同時使其成為高熱吸存溫室氣體－甲烷之排放大宗。在自然的濕地生態系統中，土壤深層所產生的甲烷，約有五到九成會在擴散到大氣之前，被濕地土壤表面好氧層中存在的甲烷氧化菌經一系列生化作用氧化為熱吸存較低之二氧化碳，降低濕地甲烷的淨排放。因為甲烷氧化菌在濕地生態系中，作為消耗甲烷之重要微生物，因此，確保其微生物族群變化與活性，對於增進濕地的淨碳匯效益具有很重要的價值。

過去對於活性甲烷氧化菌生物地理分布之研究多著重於稻田濕地、天然濕地，較缺乏人工濕地之資料，且熱帶、亞熱帶地區之濕地資料尤其稀少。本研究以臺灣不同年份完工之人工濕地作為實驗地點，在夏、冬兩季對其進行土壤採樣，利用次世代定序與即時螢光定量探討甲烷氧化菌在不同年份之人工濕地中和季節差異。研究中表明了不同年份濕地在兩季節好氧甲烷氧化動力學，並比較了不同年份人工濕地之微生物群落變化與主要之甲烷氧化菌群落。利用統計分析甲烷氧化菌對不同土壤理化性質之相關性，以利於未來在現地環境研究中土壤條件之調整。期望在未來能透過不同分子生物方法闡釋人工濕地中之甲烷微生物相，以生態工程領域角度提出相對應之改良及管理方法。

關鍵詞：人工濕地、甲烷氧化菌、顆粒甲烷單加氧酶、甲烷

Abstract

Constructed wetland is an ecological engineering technique that has been widely used in

recent decades, because of the ecosystem services it provides such as stormwater management, wastewater treatment and creating ecological diversity. Because the high primary productivity and anaerobic environmental characteristics wetland provides, it is also considered an important ecosystem for its carbon storage. However, the anaerobic soil conditions make it a major source for global CH₄ emission. In natural wetlands, about 50 to 90 % of produced CH₄ can be reoxidised by methanotrophs in the soil surface before it diffuses into the atmosphere. Thus, it is important to manage the changes of methanotrophic composition and activity in wetland ecosystems to maximize the C storage potential.

However, most of the previous studies have been focused on the ecosystems such as rice paddy, natural wetlands, and thus, we tried to conduct a comprehensive study of methanotrophic compositions in sub-tropical constructed wetlands. In this study, soil samples were collected from 3 constructed wetlands of different ages in Taiwan in both summer and winter seasons. Next-generation sequencing and real-time fluorescence quantification polymerase chain reaction were used to explore the seasonal differences of methanotrophs in constructed wetlands of different ages. The results of this study showed the oxidation kinetics of CH₄, and compared the changes of microbial communities in constructed wetlands. The correlation between methanotrophs on different soil physicochemical properties was analyzed in several statistical analyses to facilitate the adjustment of soil conditions in future in situ environmental studies. It is expected that different molecular biology methods will be used to explain the methanotrophs in constructed wetlands and management methods can be proposed from the perspective of ecological engineering.

Keywords: Constructed wetland; Methanotroph; pmoA; Methane

一、前言

甲烷為目前第二大溫室氣體，熱吸存潛力是二氧化碳的 25 倍 [4]，根據估算每年全球甲烷排放量約等同於 80 億公噸 (50-110 億) 二氧化碳當量 [5]。另外，NOAA 在全球各地的空氣採樣點中測量甲烷，發現近年甲烷濃度表現出無法解釋的加速成長，現月平均值已達到 1908.74 ppb [1]，並且 IPCC 氣候變遷第六次評估報告 (AR6 Climate Change 2022: Mitigation of Climate Change) 也提及甲烷對於全球暖化的巨大影響，因此了解其排放的動態至關重要 (IPCC, 2021)。根據自下而上 (Bottom-up) 和自上而下 (Top-down) 的研究顯示甲烷總排放量約 60% 歸因於人為活動 (55%-70%) 和 40% 為自然排放，濕地約占總排放的 20-50 %，其中又以亞熱帶、熱帶地區濕地貢獻最多且被認為主導著全球甲烷年際變化的增加 [[5][10][11]]。

濕地作為影響全球碳循環的關鍵，通常被定義為土壤或泥炭水飽和的生態系統，或

者表面淹沒（永久或非永久性）主導土壤生物地球化學並決定物種組成的生態系統，其中深層區的厭氧條件會導致大量甲烷產生 [8]。當甲烷從深層缺氧土壤和水進入大氣前，約有 50-90% 被淺層區中稱為甲烷氧化菌的細菌消耗 [7]，從而大大減少甲烷的排放，因此也被認為是濕地及一般厭氧生態系統的關鍵生物過濾器。

好氧甲烷氧化細菌包括系統發育不同的微生物群，能夠利用甲烷作為唯一的碳和能源 [2]。好氧甲烷氧化菌主要分為 I 型 (Gammaproteobacteria)、II 型 (Alphaproteobacteria)、Verrucomicrobia 和 NC10。I 型利用核酮糖磷酸循環 (RuMP cycle)，II 型利用絲氨酸循環 (Serine cycle)，其餘利用卡爾文循環 (CBB cycle) 進行碳同化 [6]。甲烷的有氧氧化是依賴於好氧甲烷氧化菌具有的顆粒甲烷單加氧酶 (pMMO)，而 pMMO β 亞基的 pmoA 基因普遍存在於甲烷氧化菌，已被廣泛用於檢測不同生態系統的分離標記 [6]。通過使用 pmoA 功能性基因的標記，許多研究得以揭示甲烷氧化菌的多樣性、生態位分化和棲息地偏好。環境因素影響微生物群落組成，例如含水量、溫度、甲烷濃度、有機碳含量與氮的可用性等 [[12][13][14]]。過往研究顯示 I 型與 II 型呈現截然不同的生存策略，I 型長期被視為 r 策略物種，具有高繁殖率但在不利環境下的存活率低；而 II 型則被視為 k 策略物種，適應貧脊和波動大的環境，但在不斷變化的環境中生長速度低 [3]。

人工濕地，其設計和建造是為了模仿自然濕地系統來處理廢水。這些系統主要由植被、基質、土壤、微生物和水組成，利用涉及物理、化學和生物機制的複雜過程來去除各種污染物或改善水質 [[15][16]]。一般工程上透過常見的表面流人工濕地 (SFCW) 或水平/垂直地下流人工濕地 (HS/VS SFCW) 輔以不同植物及微生物群落的淨化功能，對生活、工業、農業廢水及垃圾場滲濾液進行現地處理。人工濕地因不同的設計特徵極具動態和異質性，除了使養分和碳平衡存在高度不確定性，微生物群落結構、空間分布的理解也較為缺乏。相較於過去多數研究著重於檢測天然濕地、稻田之甲烷氧化菌，人工濕地的甲烷氧化受到較少關注。根據調查，人工濕地具有高於天然濕地的碳匯潛力 [9]，並且也存在甲烷氧化菌的蹤跡 [17]。本研究利用次世代定序與即時螢光定量探討甲烷氧化菌在臺灣不同年份之人工濕地中以及夏冬季節差異，目的在更好地了解濕地構建後好氧甲烷氧化菌群落的發育情況和影響其主要的環境驅動因素等等。本研究之研究結果期望能有助於評估人工濕地在調整及管理面之參考，並透過分子生物之方法加深對人工濕地甲烷氧化菌群的理解。

二、研究方法

2.1 樣品採集

研究場域選定於新北市板橋區新海橋至大漢橋間之新海橋人工濕地。該人工濕地使用三段式表面流設計與不同微生物及植栽等生態工法，目的為推動河灘地之現地處理系統，以達到降低大漢溪污染量及河廊棲地營造。研究採樣樣品包含了一期（民 93）、二期（民 95 年 11 月）、三期（民 99 年 4 月）不同完工年份之人工濕地作為對照，同時採集了夏季（7 月）與冬季（2 月）的土壤樣品，以探討不同時空人工濕地土壤中甲烷氧化微生物之群落結構變化。

每期濕地各選定 3 處樣區，樣區每 20 公尺採集一次，共 15 個土壤樣品。土壤樣

品之採集方式是以直徑 10 cm 與長 25 cm 之半開口鐵管直接壓入土壤中至 15 cm 深，之後以 70%酒精消毒過之刀片從鐵管側邊將土樣切分為 0-2 cm、2-5 cm 與 5-10 cm，分別均質化為混合土壤樣品，帶回實驗室保存於 4°C 的環境，以供進行後續實驗分析。現場亦使用攜帶式 pH 計、EC 計、鹽度計以及氧化還原電位計，對現地土壤進行理化參數測量。採集回來之土壤樣品分別測定含水率、使用總有機碳分析儀測定 TOC 及 TIC、以 2M KCl 萃取與離子層析儀測定氨氮、硝酸氮、亞硝酸氮等營養鹽濃度。

2.2 土壤甲烷氧化微生物活性與群落分析

濕地土壤甲烷氧化潛力之估算，研究中每一組取 3 重複之 5 克 0-2 cm 土壤樣品，放入體積 100 ml 的血清瓶中，以矽膠塞與鋁蓋進行封口後，放置培養箱以 25°C 預培養三天。三天過後，進行頂空之甲烷氣體置換，首先抽取血清瓶頂空 1% 空氣，再灌入 1% 的甲烷（約 10000 ppm）進行培養。製備完成之樣品放入培養箱以 25°C 培養，並每隔一定時間透過配有火焰離子偵測器之氣相層析儀（GC-FID）分析瓶內甲烷消耗量，待瓶內甲烷氧化反應完全即結束培養，將培養之樣品保存於 -20°C。萃取其 DNA，進行 16S rRNA 與 *pmoA* 功能基因的次世代定序。

2.3 DNA 萃取與分析

土壤微生物之 DNA 以 PowerSoil DNA Isolation kit 進行萃取，以引子對 515F/806R 與 A189F/mb661R 經 PCR 反應增幅 16S rRNA 與 *pmoA* 功能基因後進行次世代定序。同時，即時螢光定量（real-time qPCR）分析 *pmoA* 基因之絕對豐度，以闡釋培養前後甲烷氧化微生物之總量變化。

定序後所得序列資料將長度小於 200 bp 者刪除，以 Mothur 軟體序列分析，篩選出品質較好的序列並移除嵌合體，*pmoA* 序列資料以 7% 截止值對序列資料分群以定義分類運算單位（OTU），而 16S rDNA 透過 Ribosomal Database Project (RDP) pyrosequencing pipeline 進行分類。分析結果透過 MEGA X 軟體將序列以 Neighbor-joining 方法，進行 1000 次 bootstrap 建構親緣關係樹。

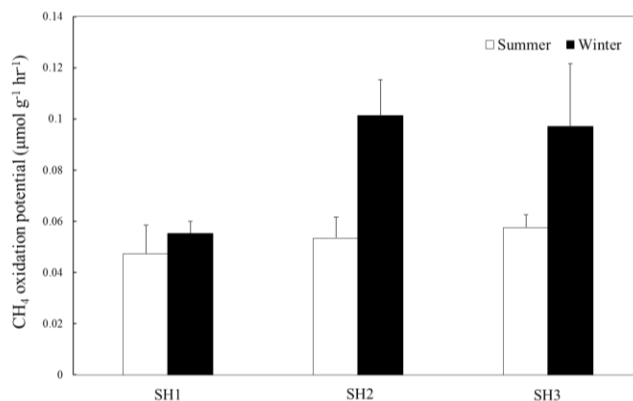
2.4 統計分析

單向方差分析（One-way ANOVA）用於測試三期不同濕地之間的甲烷氧化潛力和 *pmoA* 基因拷貝數，並以 Tukey's 誠實差異檢定（Tukey's HSD test）進一步比較各樣點之變量均值。應用典型對應分析（CCA）用於建立現地新鮮土壤中甲烷氧化菌組成與土壤理化性質之間的相關性，並評估可能在塑造人工濕地甲烷氧化菌群落結構中發揮作用的環境因素。Spearman 相關分析用於檢驗甲烷氧化菌群對環境因素、交互作用之相關性。

三、結果與討論

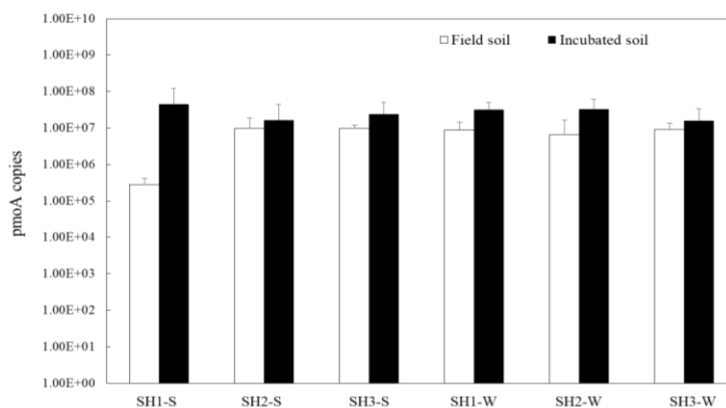
在本研究中，新海橋二期濕地冬天的甲烷氧化率最高（ $0.101 \mu\text{mol g}^{-1}\text{hr}^{-1}$ ， $p < 0.001$ ）。ANOVA 分析顯示季節對甲烷氧化率的影響顯著（ $p < 0.001$ ），在夏季三不同濕地間甲烷氧化率並無顯著差異（ $p = 0.159$ ），冬季則以新海橋一期顯著較低（ 0.0474

$\mu\text{mol g}^{-1}\text{hr}^{-1}$, $p < 0.001$)。季節對甲烷氧化率的影響在新海一期濕地無顯著差異，而在二、三期則明顯不同 ($p < 0.001$) (圖一)。



圖一：夏冬兩季新海橋一、二、三期人工濕地甲烷氧化率 ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{hr}^{-1}$)。

根據即時螢光定量 PCR 結果，現地土壤之 pmoA 拷貝數在二、三期較高，在經過 1% 甲烷培養過後一期最高。而新海橋一、二、三期濕地在不同季節下，pmoA 拷貝數在現地土壤與培養後有顯著差異 ($p < 0.01$)，但在季節與濕地之間無顯著不同 (圖二)。雖然新海一期在培養過後有最多的拷貝數，氧化速率卻是三濕地間最低，表示豐度並不完全是影響甲烷氧化的主因，土壤性質與活性微生物群落的組成可能更為重要。

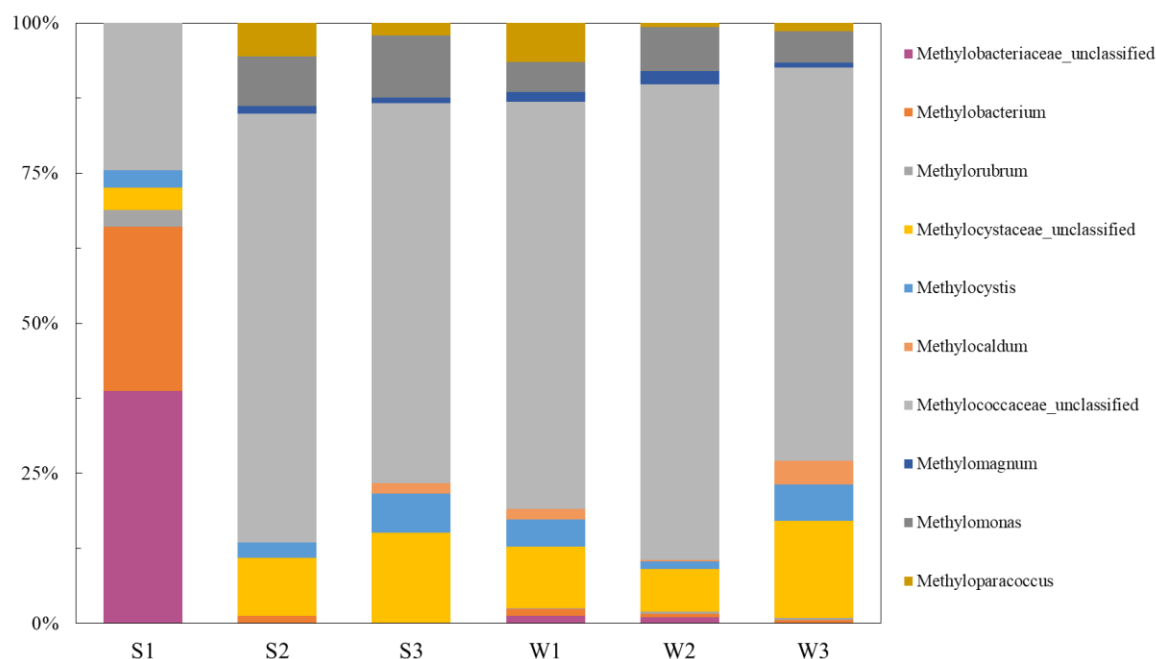


圖二；新海橋一、二、三期濕地現地與培養後土壤之 pmoA 基因拷貝數。

新海橋濕地 0-2cm 現地土壤之甲烷氧化菌群落結構，可從 16S rRNA 之 1355497 條序列讀數資料檢視 (圖三)。結果顯示，除新海一期夏季以 II 型甲烷氧化菌相對豐度較高，其他兩位點在夏季及冬季都以 I 型甲烷氧化菌為主。新海橋一期濕地在夏季 (S1) 相對豐度最高之甲烷氧化菌群以 *Methylobacteriaceae unclassified* (II)、*Methylobacterium* (II)、*Methylococcaceae unclassified* (I) 為主，分別各佔 33.9%、24% 以及 21.5%。而二期和三期濕地不論夏冬皆以 *Methylococcaceae unclassified* (I) 為最豐富族群 (相對豐度 61.1-70.1%)。再來則是 *Methylocystaceae unclassified* (II) (相對豐度 6.3-15.6%)、*Methylomonas* (Ia) (相對豐度 4.6-10.1%)。

以上結果顯示，新海橋一期在群落結構差異大，但甲烷氧化率在季節上無顯著差

異（圖一），推測此狀況和參與甲烷氧化反應之活性物種有關，並且年份和季節可能並非影響甲烷氧化群落結構組成之關鍵原因。另外，以 I 型甲烷氧化菌為主的群落結構，推測可能與人工濕地較為擾動且富營養的環境變化有關。



圖三：新海橋濕地現地土壤甲烷氧化菌群落結構相對豐富度

四、結論

1. 新海橋二、三期人工濕地之甲烷氧化率季節上呈現顯著差異。
2. 甲烷氧化微生物之絕對豐富度不完全影響甲烷氧化，土壤理化性質與群落組成可能更為重要。
3. I 型甲烷氧化菌佔最高比例，完工年份的不同和季節似乎對群落結構的影響不大。

五、參考文獻

- [1] Ed Dlugokencky, NOAA/GML (gml.noaa.gov/ccgg/trends_ch4/)
- [2] Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews*, 60(2), 439-471. <https://doi.org/doi:10.1128/mr.60.2.439-471.1996>
- [3] Ho, A., Kerckhof, F. M., Luke, C., Reim, A., Krause, S., Boon, N., & Bodelier, P. L. (2013). Conceptualizing functional traits and ecological characteristics of methane-oxidizing bacteria as life strategies. *Environmental Microbiology Reports*, 5(3), 335-345. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00370.x>
- [4] IPCC, 2013: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental*. <https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/>
- [5] IPCC, 2021: *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of*

- Working Group I to the Sixth.* <https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/>
- [6] Knief, C. (2015). Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. *Frontiers in microbiology*, 6, 1346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01346>
- [7] 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01067-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01067-6)
- [8] Matthews, E., & Fung, I. (1987). Methane emission from natural wetlands: Global distribution, area, and environmental characteristics of sources. *Global biogeochemical cycles*, 1(1), 61-86. <https://doi.org/10.1029/GB001i001p00061>
- [9] Rosli, F. A., Lee, K. E., Goh, C. T., Mokhtar, M., Latif, M. T., Goh, T. L., & Simon, N. (2017). The Use of Constructed Wetlands in Sequestering Carbon: An Overview. *Nature Environment & Pollution Technology*, 16(3).
- [10] Saunio, M., Bousquet, P., Poulter, B., Peregón, A., Ciais, P., Canadell, J. G., Dlugokencky, E. J., Etiope, G., Bastviken, D., Houweling, S., Janssens-Maenhout, G., Tubiello, F. N., Castaldi, S., Jackson, R. B., Alexe, M., Arora, V. K., Beerling, D. J., Bergamaschi, P., Blake, D. R., Brailsford, G., Brovkin, V., Bruhwiler, L., Crevoisier, C., Crill, P., Covey, K., Curry, C., Frankenberg, C., Gedney, N., Höglund-Isaksson, L., Ishizawa, M., Ito, A., Joos, F., Kim, H. S., Kleinen, T., Krummel, P., Lamarque, J. F., Langenfelds, R., Locatelli, R., Machida, T., Maksyutov, S., McDonald, K. C., Marshall, J., Melton, J. R., Morino, I., Naik, V., O'Doherty, S., Parmentier, F. J. W., Patra, P. K., Peng, C., Peng, S., Peters, G. P., Pison, I., Prigent, C., Prinn, R., Ramonet, M., Riley, W. J., Saito, M., Santini, M., Schroeder, R., Simpson, I. J., Spahni, R., Steele, P., Takizawa, A., Thornton, B. F., Tian, H., Tohjima, Y., Viovy, N., Voulgarakis, A., van Weele, M., van der Werf, G. R., Weiss, R., Wiedinmyer, C., Wilton, D. J., Wiltshire, A., Worthy, D., Wunch, D., Xu, X., Yoshida, Y., Zhang, B., Zhang, Z., & Zhu, Q. (2016). The global methane budget 2000–2012. *Earth Syst. Sci. Data*, 8(2), 697-751. <https://doi.org/10.5194/essd-8-697-2016>
- [11] Saunio, M., Stavert, A. R., Poulter, B., Bousquet, P., Canadell, J. G., Jackson, R. B., Raymond, P. A., Dlugokencky, E. J., Houweling, S., Patra, P. K., Ciais, P., Arora, V. K., Bastviken, D., Bergamaschi, P., Blake, D. R., Brailsford, G., Bruhwiler, L., Carlson, K. M., Carrol, M., Castaldi, S., Chandra, N., Crevoisier, C., Crill, P. M., Covey, K., Curry, C. L., Etiope, G., Frankenberg, C., Gedney, N., Hegglin, M. I., Höglund-Isaksson, L., Hugelius, G., Ishizawa, M., Ito, A., Janssens-Maenhout, G., Jensen, K. M., Joos, F., Kleinen, T., Krummel, P. B., Langenfelds, R. L., Laruelle, G. G., Liu, L., Machida, T., Maksyutov, S., McDonald, K. C., McNorton, J., Miller, P. A., Melton, J. R., Morino, I., Müller, J., Murguía-Flores, F., Naik, V., Niwa, Y., Noce, S., O'Doherty, S., Parker, R. J., Peng, C., Peng, S., Peters, G. P., Prigent, C., Prinn, R., Ramonet, M., Regnier, P., Riley, W. J., Rosentreter, J. A., Segers, A., Simpson, I. J., Shi, H., Smith, S. J., Steele, L. P.,

- Thornton, B. F., Tian, H., Tohjima, Y., Tubiello, F. N., Tsuruta, A., Viovy, N., Voulgarakis, A., Weber, T. S., van Weele, M., van der Werf, G. R., Weiss, R. F., Worthy, D., Wunch, D., Yin, Y., Yoshida, Y., Zhang, W., Zhang, Z., Zhao, Y., Zheng, B., Zhu, Q., Zhu, Q., & Zhuang, Q. (2020). The Global Methane Budget 2000–2017. *Earth Syst. Sci. Data*, 12(3), 1561-1623. <https://doi.org/10.5194/essd-12-1561-2020>
- [12] Shiau, Y.-J., Lin, C.-W., Cai, Y., Jia, Z., Lin, Y.-T., & Chiu, C.-Y. (2020). Niche differentiation of active methane-oxidizing bacteria in estuarine mangrove forest soils in Taiwan. *Microorganisms*, 8(8), 1248. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081248>
- [13] Shiau, Y.-J., & Chang, E.-H. (2022). Microbial community development in tropical constructed wetland soils in Taiwan. *Science of The Total Environment*, 812, 152563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152563>
- [14] Shiau, Y.-J., Cai, Y., Jia, Z., Chen, C.-L., & Chiu, C.-Y. (2018). Phylogenetically distinct methanotrophs modulate methane oxidation in rice paddies across Taiwan. *Soil Biology and Biochemistry*, 124, 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.025>
- [15] Saeed, T., & Sun, G. (2012). A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of environmental management*, 112, 429-448. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.011>
- [16] Vymazal, J. (2011). Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review. *Hydrobiologia*, 674(1), 133-156.
- [17] Zhu, N., An, P., Krishnakumar, B., Zhao, L., Sun, L., Mizuochi, M., & Inamori, Y. (2007). Effect of plant harvest on methane emission from two constructed wetlands designed for the treatment of wastewater. *Journal of environmental management*, 85(4), 936-943. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.11.004>