

安凤秋, 吕家珑, 刁展, 等. 铅对壤土细菌群落组成的影响研究[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(2): 268–275.

AN Feng-qiu, LÜ Jia-long, DIAO Zhan, et al. Influence of lead on bacterial community composition in Lou soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(2): 268–275.

铅对壤土细菌群落组成的影响研究

安凤秋^{1,2}, 吕家珑^{1*}, 刁展¹, 李海红², 赵琪琪²

(1.西北农林科技大学资源环境学院, 农业部西北植物营养与农业环境重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2.西安工程大学环境与化学工程学院, 西安 710048)

摘要:为了研究外源铅污染和土壤性质对壤土细菌群落组成的影响,本研究对铅处理3年的农田壤土细菌群落组成进行分析,采用高通量技术研究铅对壤土细菌群落组成的影响。结果表明,不同铅处理土壤中变形菌门(Proteobacteria,平均相对丰度为25%)和放线菌门(Actinobacteria,平均相对丰度为18.60%)均为优势菌群,相对丰度较高的菌群还有酸杆菌门(Acidobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)等;放线菌纲(Actinobacteria)、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)和蓝藻菌纲(Cytophagia)在高铅处理中相对丰度最高。在属分类水平上有9个相对丰度具显著差异的菌群($P<0.05$),除单胞菌属(*Pseudomonas*)和红弧菌属(*Skemanella*)外,壤霉菌属(*Agromyces*)、*Balneimonas*、水栖菌属(*Enhydrobacter*)、*Devosia*、贪噬菌属(*Variovorax*)、*Flaviumibacter*和*Lacibacter*均为低丰度菌群(相对丰度 $<0.3\%$)。方差分析显示,低铅处理菌群丰富度指数(Chao和ACE)大于高铅处理($P<0.05$);对照和低铅处理的OTU组成较相似,而高铅处理的OTU与前二者差异较大。冗余分析(RDA)和相关分析表明,有效铅和总铅含量与高铅处理细菌OTU水平群落组成正相关,与低铅处理和对照的细菌OTU水平群落组成负相关;厚壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、绿弯菌门(Chloroflexi)和硝化螺旋菌门(Nitrospirae)的相对丰度与土壤环境因素显著相关($P<0.05$)。以上研究表明,长期铅处理对壤土土壤细菌群落产生了明显影响,改变了土壤中细菌群落组成。

关键词:16S rDNA 基因测序;细菌;壤土;铅;细菌群落

中图分类号:X171.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2018)02-0268-08 **doi:**10.11654/jaes.2017-0960

Influence of lead on bacterial community composition in Lou soil

AN Feng-qiu^{1,2}, LÜ Jia-long^{1*}, DIAO Zhan¹, LI Hai-hong², ZHAO Qi-qi²

(1.College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Plant Nutrition and Agri-environment in Northwest China, Yangling 712100, China; 2.College of Environmental and Chemical Engineering, Xi'an Polytechnic University, Xi'an 710048, China)

Abstract: To research the soil bacteria microbial community composition influenced by lead, while examining its relationship with the physicochemical properties of Pb-contaminated Lou soils, the Illumina platform Miseq high-throughput sequencing technique was used to analyze the agricultural soil treated with various concentrations of Pb²⁺. Three treatments, namely high concentration treatment (WHIGH), low concentration treatment (WLOW), and control (WCK), were used. The results showed that Proteobacteria (with an average relative abundance of 25%) and Actinobacteria (with an average relative abundance of 18.6%) were the most abundant phyla among the three treatments. The other dominant phyla were Acidobacteria, Bacteroidetes, etc. Actinobacteria, Betaproteobacteria, and Cytophagi were the most abundant classes in WHIGH among the three treatments. At the genus level, the relative abundance of 9 genera were significantly different among the three treatments ($P<0.05$), namely *Pseudomonas*, *Skemanella*, *Balneimona*, *Agromyces*, *Enhydrobacter*, *Devosia*, *Variovorax*, *Flaviumibacter* and *Lacibacter*. Moreover, the relative abundance of 7 genera were below 0.3%, except for *Pseudomonas* and *Skemanella* in

收稿日期:2017-07-08 录用日期:2017-11-15

作者简介:安凤秋(1980—),女,陕西西安人,工程师,主要从事环境微生物相关方面的研究。E-mail:anfengqiu1980@163.com

*通信作者:吕家珑 E-mail:ljll@nwfau.edu.cn

基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项(200903015);陕西省农业厅环保站项目;陕西省“三秦学者”项目

Project supported: Special-research for Ministry of Agriculture China(200903015); Project for Environmental Protection Station of Ministry of Agriculture in Shaanxi Province; Project for “Sanqin Scholar” of Shannxi Province

both treatments. The variance analysis showed that the richness index of the community (Chao and ACE) had significant differences between the WHIGH and WLOW treatments ($P < 0.05$). The bacteria community structure of OTU was fairly similar in the WCK and WLOW treatments, while it was different in the WHIGH treatment. The redundancy analysis and correlation analysis showed that the content of available Pb and total Pb were positively correlated with WHIGH's bacterial community structure of OTU, while being negatively correlated with those of WLOW and WCK. Firmicutes, Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia, Chloroflexi, and Nitrospirae correlated closely with the physico-chemical properties of soil ($P < 0.05$). The results of the present study indicated that bacterial community of Lou soil has been greatly influenced by long-term Pb contamination, which changed the bacterial community composition of the soil.

Keywords: 16S rDNA gene sequence; bacteria; Lou soil; lead; bacterial community

土壤是人类赖以生存的重要资源,近年来,我国土壤重金属污染问题日趋突出。大量研究表明,重金属进入土壤可改变土壤的微生物活性,使群落结构及多样性发生变化^[2-5]。阎姝等^[5]报道了重金属污染的稻田土壤微生物量显著下降,细菌和真菌脂肪酸(PLFA)变化幅度达到30%以上。Gough等^[6]报道长期受不同浓度重金属污染的淡水沉积物中,土壤微生物群落结构发生了改变和重建。Deng等^[7]研究表明,重金属污染可对农田土壤根际微生物的群落结构和多样性产生显著影响。

研究微生物群落结构的方法主要有 Biolog 微平板法^[10]、脂肪酸法^[4,7]和 PCR 变性梯度凝胶电泳(DGGE)^[9-10]等,这些方法在灵敏度和精确度方面有一定的局限性。高通量 DNA 测序技术用于研究土壤微生物群落结构在精确度和灵敏度方面较上述方法均有大幅度提高。Ye等^[11]采用高通量测序技术研究了活性污泥和污水中的微生物群落结构,结果显示变形菌纲和热孢菌纲相对丰度较高,污水中分支杆菌属和弧菌属是优势菌群。目前高通量测序技术大多用于研究污泥、废水、尾矿及森林等生态系统的微生物群落组成变化^[11-13],对重金属污染土壤的细菌群落组成相关内容的报道较少,有少数研究以重金属复合污染和实验室模拟污染土壤为研究对象^[14-15],探讨了重金属污染对土壤微生物群落的影响。目前,采用高通量技术对铅污染的壤土农田土壤细菌群落组成变化的研究还很有限。

鉴于此,本试验采用高通量技术研究铅对壤土细菌群落组成的影响,揭示土壤理化性质与细菌群落组成之间的关系,为重金属污染土壤的早期预警和生物修复提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究地点及试验设计

田间试验地位于陕西省杨凌示范区五泉镇(34°17'51" N, 108°00'48" E)国家黄土肥力和肥料效益监

测基地,该基地海拔 524.7 m,年平均气温约 13℃,年平均降水量为 585 mm。供试土壤属褐土类壤土亚类,红油土属,厚层红油土种(土垫旱耕人为土),黄土母质。该试验地周围为农田,无工业企业分布。

试验设 3 个处理,每处理 3 个重复,分别为对照(WCK)、低铅处理(WLOW)、高铅处理(WHIGH)。低铅处理添加 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 浓度为 $175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;高铅处理添加 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 浓度为 $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;对照不添加 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液。共 9 个小区,每个小区长 2 m,宽 1 m,小区之间设宽度为 0.5 m 的隔离行,并在每个小区四周埋设深度为 0.5 m 水泥隔板。于 2010 年 6 月 3 日将对应浓度 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液添加至相应小区耕层中,对照组添加等体积的水,通过人工耕翻使 0~20 cm 表层土壤混合均匀;土壤含水量为田间持水量的 80%,老化。之后,在小区实施小麦-玉米轮作。小麦、玉米品种分别为小偃 22 和陕单 16。试验前在小区土壤中施氮磷钾底肥,底肥用量:尿素 $0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ $0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; K_2SO_4 $0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2013 年 12 月,采用“梅花”5 点取样法,用土钻采集土壤样品,取样深度为 0~20 cm,每个小区采集土样约 0.5 kg,将土样充分混匀后去除植物残体及石砾,取其中约 0.1 kg 装入灭菌的自封袋中,置冰盒中迅速带回实验室,过 2 mm 筛后保存于 -80℃ 冰箱中进行分子生物学分析;其余土样装入自封袋中带回实验室,室温下自然风干,过筛后测定土壤基本理化性质及重金属含量。

1.2 样品分析

土壤 pH 值测定的土水比(质量:体积)为 1:2.5;土壤有机质的测定采用重铬酸钾外加热法;速效钾的测定用火焰光度法;速效磷采用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaHCO_3 浸提、钼锑抗比色分光光度法测定;碱解氮采用碱解扩散法测定,上述方法均参照鲍士旦^[16]的分析方法。

铅含量采用 $\text{HNO}_3\text{-HCl-HClO}_4$ 消解火焰原子吸

收(PE, AA800, 美国)光谱法测定^[16], 有效态铅(APb)采用 EDTA 浸提^[17]ICP-MS(Thermo, Xseries II, 美国)测定, 每个样品设置 3 个重复, 取其平均值计算每个处理的相关指标。

1.3 DNA 提取、PCR 扩增和测序

采用 DNA 试剂盒提取土壤总 DNA, 型号为 FastDNA[®] spin kit(MP bio, Santa Ana, 美国)。DNA 浓度和质量采用超微量核酸蛋白测定仪检测(Thermo, NanoDrop ND 2000, 美国), 将符合试验要求的 DNA 送深圳华大基因公司扩增, 通过 Illumina MiSeq 平台完成高通量测序。PCR 扩增采用 16S rDNA 基因 V4 区的通用引物 515F(5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTAA-3')和 806R(5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3')。PCR 反应条件如下, 预变性: 95 ℃保持 3 min; 变性: 95 ℃保持 30 s; 退火: 56 ℃保持 30 s; 延伸: 72 ℃保持 45 s, 共 30 个循环; 72 ℃延伸 20 min。序列平均长度 253 bp, 已提交 NCBI 数据库, 序列号 SRP075183。

1.4 数据分析

采用 Mothur(V.1.36.1)过滤数据, 获得高质量的优化序列, 利用软件 USEARCH(v7.0.1090)在 97% 相似度下进行聚类得到可操作分类单元(OTU)的代表序列; 通过 RDP classifier(v2.2)软件将 OTU 代表序列与数据库比对进行物种注释, 统计每个样品在每个 OTU 中的丰度信息。

采用 SPSS 22.0 软件对样品的土壤基本理化性质、细菌丰度与多样性指数、组间差异物种进行单因素方差分析(LSD 法)和斯皮尔曼(Spearman)相关性

分析。应用 CANOCO 4.5 软件对环境因素和细菌群落结构进行冗余分析(RDA)。

2 结果与分析

2.1 土壤性质

土壤理化性质和铅含量见表 1。3 个处理的土壤含水量、有机质、速效磷、速效钾、有效态铅和总铅含量有显著差异($P<0.05$), pH 和碱解氮含量无显著差异($P>0.05$)。

2.2 土壤细菌群落组成

9 个土壤样品高通量测序共得到 153 653 条高质量序列, 平均每个样品获得 17 073 条序列。以 97% 相似度划分共得到 14 414 个 OTU, 样品中 OTU 数目范围为 1574~1652, 平均每个样品中有 1601 个 OTU。

表 2 为 3 个处理的序列数及多样性指数。方差分析结果显示: WCK 与 WHIGH 处理的序列数有显著性差异($P<0.05$); WLOW 和 WHIGH 处理的丰富度指数(Chao 和 ACE)具有显著性差异($P<0.05$), 且 WLOW 处理的丰富度指数大于 WHIGH 处理的相应值, 说明 WLOW 处理的细菌群落丰富度高于 WHIGH; 比较多样性指数(Shannon 和 Simpson), WCK、WLOW 和 WHIGH 处理之间均无显著性差异($P>0.05$)。

在 97% 的 OTU 相似度下, 3 个处理共得到 2582 个 OTU(图 1), 其中 WCK 和 WLOW 处理共有 1822 个 OTU, WCK 和 WHIGH 处理共有 1796 个 OTU, WLOW 和 WHIGH 处理共有 1814 个 OTU, 其中 1697 个 OTU 为 3 个处理共有, 且 WHIGH 处理特有 OTU 数为 204 个, 高于 WCK 和 WLOW 处理。

表 1 土壤理化性质和铅含量
Table 1 Characteristics of soil samples and lead content

处理 Treatments	pH 值	含水量 Moisture/%	有机质 SOM/ g·kg ⁻¹	速效磷 AP/ mg·kg ⁻¹	速效钾 AK/ mg·kg ⁻¹	碱解氮 AN/ mg·kg ⁻¹	有效态铅 APb/ mg·kg ⁻¹	总铅 TPb/ mg·kg ⁻¹
WCK	7.62±0.10a	2.95±0.16a	14.91±0.27a	23.67±0.95b	149.73±4.21b	63.56±2.69a	8.13±0.08c	23.41±0.29c
WLOW	7.65±0.06a	2.38±0.23b	12.47±0.18c	23.36±3.31b	160.89±4.22a	60.53±2.70a	80.61±8.38b	165.83±4.48b
WHIGH	7.59±0.04a	2.22±0.25b	13.14±0.33b	29.26±2.04a	158.32±4.07a	61.72±3.68a	161.22±5.87a	331.13±8.51a

注: 数值为平均值±标准差($n=3$), 同列不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$), LSD 法。下同。

Note: The values are mean±SD($n=3$). Different letters in the same column mean significant difference between treatments at $P<0.05$ of LSD's test. The same below.

表 2 不同处理间土壤细菌丰度与多样性指数
Table 2 Soil bacterial abundance and diversity indices between different treatments

处理 Treatments	序列数 Tag number	97%相似水平 97% similarity			
		Chao	ACE	Shannon	Simpson
WCK	17 488.00±432.78a	1 780.26±22.83ab	1 830.85±5.81ab	6.23±0.02a	0.005 9±0.000 4a
WLOW	16 996.3±248.23ab	1 809.57±10.35a	1 859.08±22.78a	6.24±0.09a	0.005 6±0.001 1a
WHIGH	16 733.33±375.16b	1 772.92±9.68b	1 824.31±9.51b	6.25±0.01a	0.005 2±0.000 2a

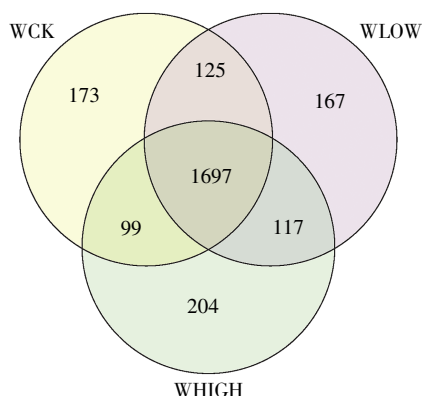
图 1 3 个处理的 Venn 图(OTU_{S0.03})

Figure 1 Venn diagram shared bacterial OTU among three treatments(OTU_{S0.03})

2.3 细菌群落组成

2.3.1 门水平上的群落组成

3 个处理的细菌群落组成大体相似, 分别属于 27 个门, 31 个纲, 39 个目, 43 个科, 13 个属, 但各种细菌所占比例略有差异。如图 2 所示: 变形菌门(Proteobacteria, 平均相对丰度为 25%)为最主要优势菌群, 第二优势菌为放线菌门(Actinobacteria, 平均相对丰度为 18.60%), 其他相对丰度较高的菌群有: 酸杆菌门(Acidobacteria, 平均相对丰度为 17.82%), 拟杆菌门(Bacteroidetes, 平均相对丰度为 12.04%), 绿弯菌门(Chloroflexi, 平均相对丰度为 5.84%), 浮霉菌门(Planctomycetes, 平均相对丰度为 5.27%), 厚壁菌门(Firmicutes, 平均相对丰度为 5.22%)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes, 平均相对丰度达 3.59%)。放线菌门(Actinobacteria)在 WHIGH 处理中含量略高于 WLOW 和 WCK 处理, 酸杆菌门(Acidobacteria)在 WLOW 处理中的含量略高于 WCK 和 WHIGH 处理, 其余菌群在 3 个处理中差别不大。

2.3.2 纲水平上的群落组成

放线菌纲(Actinobacteria)为优势菌群, 相对丰度大于 5% 的菌群还有: Chloracidobacteria, α -变形菌纲(Alphaproteobacteria), 酸杆菌纲(Acidobacteria-6), β -变形菌纲(Betaproteobacteria), 蓝藻菌纲(Cytophagia), δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)。WHIGH 处理中的放线菌纲(Actinobacteria)、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)和蓝藻菌纲(Cytophagia)相对丰度在 3 个处理中最高。

2.3.3 目水平上的群落组成

目分类水平上共得到 39 个菌群, 放线菌目(Actinomycetales, 平均相对丰度为 9.74%)是优势菌群, 相

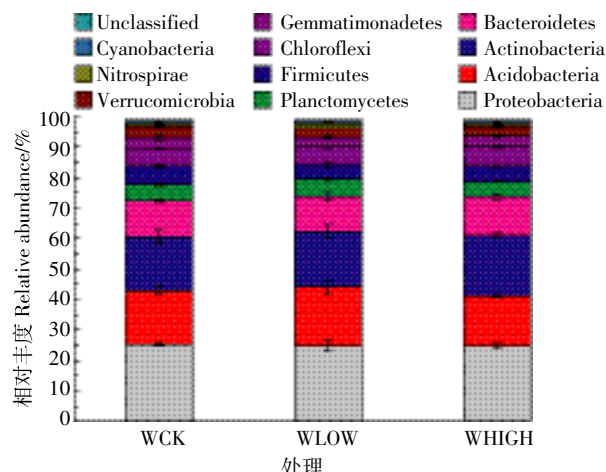


图 2 细菌在门水平上的群落结构组成

Figure 2 The taxonomic composition distribution in samples of phylum-level

对丰度大于 3% 的菌群还有: 蓝藻菌目(Cytophagales), Saprospirales 目, 乳酸杆菌目(Lactobacillales), 鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)。WHIGH 处理中的放线菌目(Actinomycetales)和蓝藻菌目(Cytophagales)相对丰度在 3 个处理中最高。

2.3.4 属水平上的群落组成

属分类水平上共得到 15 个菌群(图 3), 未分类菌群平均相对丰度达 77%, 表明土壤中存在大量新类群。相对丰度小于 0.5% 归为其他种类的菌群达 8.65%。乳球菌属(Lactococcus)是优势菌群, 且在 WCK 处理中的相对丰度居 3 个处理之首。

对 3 个处理的 OTU 进行 PCA 分析(图 4), 第一主轴和第二主轴的贡献率分别为 15.64% 和 15.09%。

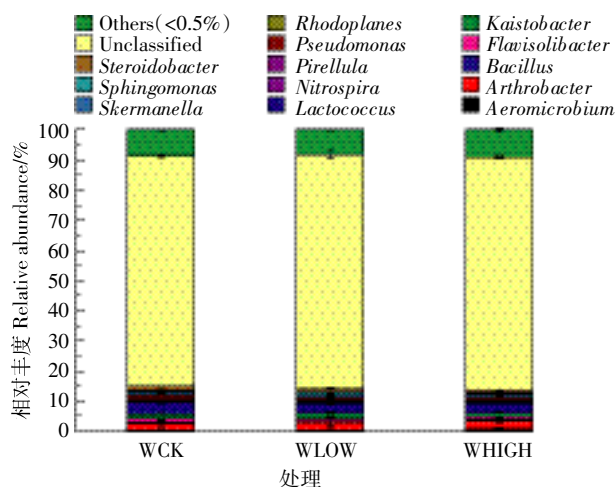


图 3 细菌在属水平上的群落组成结构

Figure 3 The taxonomic composition distribution in samples of genus-level

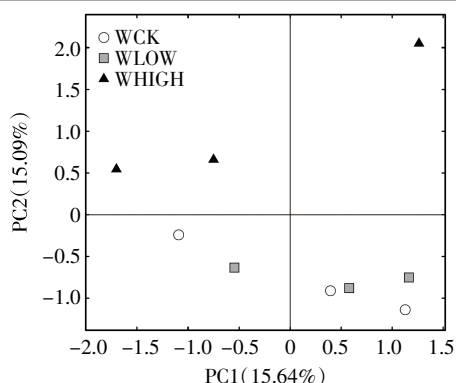


图 4 不同浓度处理下的土壤细菌 OTU 主成分分析

Figure 4 Principal component analysis(PCA) of OUT in soil bacterial among three treatments

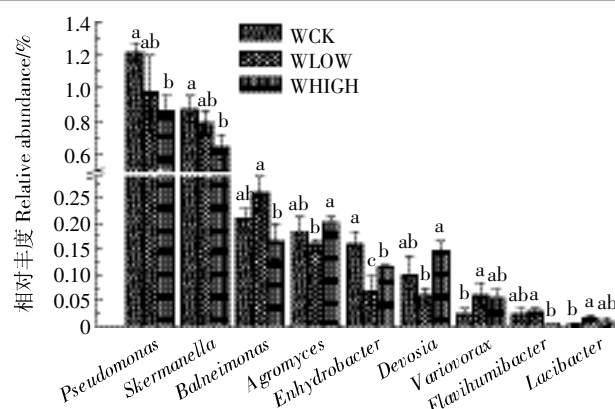
WCK 和 WLOW 处理均处于主轴下方, 距离较近, 表明两者土壤中细菌的 OTU 组成相近, WHIGH 距 WCK 和 WLOW 处理较远, 表明其细菌在 OTU 水平上的群落组成与 WCK 和 WLOW 处理差异较大。

2.4 组间差异物种分析

在属分类水平上对 3 个处理进行一维方差分析, 结果如图 5 所示。3 个处理间共有 9 个属具有显著性差异 ($P < 0.05$), 除假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和红弧菌属 (*Skemanella*) 相对丰度较高外, 其余 7 个属的相对丰度较低 ($< 0.3\%$); WHIGH 和 WCK 处理相比, 3 个属有显著差异 ($P < 0.05$), 分别是: 假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 红弧菌属 (*Skemanella*) 和水栖菌属 (*Enhydrobacter*); WLOW 和 WCK 处理相比, 水栖菌属 (*Enhydrobacter*)、*Lacibacter* 和贪噬菌属 (*Variovorax*) 具有显著差异 ($P < 0.05$); WHIGH 与 WLOW 处理之间有 5 个属具有显著差异 ($P < 0.05$), 分别是: *Balneimonas*、壤霉菌属 (*Agromyces*)、水栖菌属 (*Enhydrobacter*)、*Devosia* 和 *Flaviumibacter*。水栖菌属 (*Enhydrobacter*) 在 3 个处理间差异均显著; 壤霉菌属 (*Agromyces*) 和 *Devosia* 在 WHIGH 处理中的相对丰度大于 WLOW 和 WCK 处理, 这两个属分别属于放线菌门 (*Actinobacteria*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*)。3 个处理在属分类水平上呈现较多的低丰度差异显著物种, WHIGH 和 WCK 处理差异物种较多。

2.5 细菌群落与土壤性质的关系

细菌 OTU 水平群落组成与土壤性质冗余分析 (RDA) 如图 6 所示。不同处理下第一主轴和第二主轴对细菌群落相对丰度方差的解释比例分别为 14.5% 和 14.4%, 两者共解释 28.9% 的方差变化。有效态铅和总铅含量、土壤有机质、速效磷和含水量与土壤细



不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$, LSD 法)

Different letters mean significant difference between treatments at $P < 0.05$ of LSD's test

图 5 属分类水平上具有显著性差异的物种分析

Figure 5 Analysis of significant differences at the genus-level

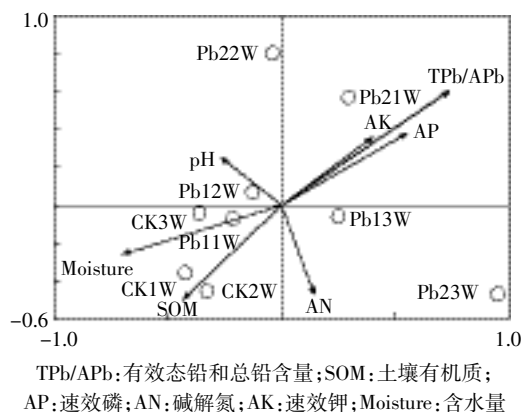


图 6 不同铅浓度处理下土壤细菌群落与土壤理化指标的冗余分析

Figure 6 Redundancy analysis(RDA) of the relationship between the structure of soil microbial communities(relative abundances of OTUs) and environmental variables

菌 OTU 水平群落组成相关性较大。其中, 有效态铅和总铅含量与 WHIGH (Pb21W/Pb22W) 处理的细菌 OTU 水平群落组成具有较强的正相关性, 而与 WCK (CK1W/CK2W/CK3W) 和 WLOW (Pb11W/Pb12W) 处理的细菌 OTU 水平群落组成呈较强负相关, WCK (CK1W/CK2W) 处理的细菌 OTU 水平群落组成还与土壤有机质含量呈正相关。

在门分类上对菌群 (相对丰度 $> 5\%$) 进行 Spearman 相关性分析, 结果如表 3 所示。有 5 种细菌与环境因素显著相关, 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 与含水量显著正相关, 与速效钾、有效态铅和总铅含量显著负相关, 芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*) 与速效钾含量显著负相关, 疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 与 pH 显著负相关; 速效磷、有效态铅和总铅含量与绿弯菌

表 3 门分类水平上细菌群落与土壤性质的 Spearman 分析(相对丰度>0.5%)

Table 3 Spearman's rank correlations between abundant taxa of phylum-level(RA>0.5% in all samples combined) and soil properties

门 Phylum	pH 值	含水量 Moisture	有机质 SOM	速效磷 AP	速效钾 AK	碱解氮 AN	有效态铅 APb	总铅 TPb
Acidobacteria	-0.118	0.200	-0.267	-0.517	0.167	-0.500	-0.267	-0.467
Actinobacteria	0.277	-0.167	-0.117	0.333	-0.067	0.067	0.267	0.483
Bacteroidetes	-0.420	-0.283	0.083	0.083	-0.083	0.050	0.417	0.183
Chloroflexi	0.143	-0.583	-0.100	0.883**	0.450	0.167	0.750*	0.833**
Firmicutes	-0.059	0.750*	0.500	-0.550	-0.717*	0.300	-0.750*	-0.817**
Gemmatimonadetes	0.345	0.533	0.467	-0.100	-0.667*	0.200	-0.300	-0.067
Planctomycetes	-0.303	0.117	0.117	-0.200	0.083	0.017	-0.517	-0.483
Proteobacteria	0.118	-0.067	0.333	0.400	0.167	0.633	-0.167	0
Verrucomicrobia	-0.689*	0.367	0.517	-0.350	-0.567	-0.050	-0.333	-0.533
Armatimonadetes	-0.487	0.117	0.617	0.150	-0.100	0.383	-0.350	-0.317
Cyanobacteria	0.109	0.200	0.350	-0.050	-0.317	0.033	0.033	0.117
Nitrospirae	-0.227	-0.833**	-0.167	0.667*	0.617	0.200	0.700*	0.700*

注:* 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$ 。Note: ** indicates $P<0.01$; * indicates $P<0.05$.

门(Chloroflexi)和硝化螺旋菌门(Nitrospirae)显著正相关,而硝化螺旋菌门(Nitrospirae)与含水量显著负相关。

3 讨论

3.1 土壤铅处理对细菌群落组成的影响

土壤受重金属污染后,微生物群落组成可发生明显变化^[2,5,18],但这种影响因土壤类型、重金属污染剂量和污染周期长短而异^[10,14,19]。Niklińska 等^[19]报道长期受重金属污染的森林土壤微生物群落组成变化不大。本研究的 PCA 分析显示 WCK 和 WLOW 处理的细菌群落结构主成分相似,但 WHIGH 处理与二者有差异;通过对比丰富度指数(Chao 和 ACE),也显示出 WLOW 和 WCK 处理之间无显著差异,但 WLOW 与 WHIGH 处理之间呈显著差异;WHIGH 处理的 Shannons 指数略高于 WLOW 和 WCK 处理的相应值,其特有的 OTU 数为 204 个(图 1),因此 WHIGH 处理细菌群落多样性略高于 WLOW 和 WCK 处理。Golebiewski 等^[14]报道重金属污染的土壤样品在门和纲的分类水平上不能充分表现出微生物群落变化,需要更低的分类单元描述微生物群落变化,本文在门分类水平上,细菌群落组成除放线菌门(Actinobacteria)和酸杆菌门(Acidobacteria)在三个处理间略有差异外,其余类群在 3 个处理间大体相似,这与 Golebiewski 等结论相似;而在属分类水平上,不同处理间才呈现出较多的差异显著物种(图 5);且 WHIGH 与 WLOW 具有显著差异的属达 5 种($P<0.05$),均为低丰度物种(相

对丰度 $<0.3\%$),可见本文细菌群落组成的变化主要体现在低丰度菌群发生了显著改变。这也表明高通量技术比常规方法具有更高的灵敏度,能够探测到微生物群落结构的细微变化。

一定程度的重金属污染能改变原有群落内部种群之间的竞争关系,导致优势种群的变更或者产生一部分对重金属有抗性的微生物,从而使土壤微生物群落多样性增加^[20]。有文献报道放线菌是 PAHs 和重金属 Pb、Cu 和 Zn 污染土壤中的优势菌群^[21]。本文在门、纲和目的分类单元下,放线菌均为优势菌群,其在 WHIGH 处理的相对丰度高于 WLOW 和 WCK 处理,该结果与前人研究结论一致。本文 WHIGH 处理的 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)和蓝藻菌纲(Cytophagia)相对丰度均高于 WLOW 和 WCK 处理。变形菌门(Proteobacteria)是重金属污染土壤中的优势细菌,可能与其降解代谢及生境广泛有关^[15,22-23],蓝藻菌纲(Cytophagia)通常用于处理重金属污染的水体,其可在细胞壁外分泌胞外多糖,从而螯合污染物中的重金属离子^[24-25]。WHIGH 比 WLOW 和 WCK 处理中含有更多的抗性菌,这也可能是 WHIGH 处理多样性丰富的原因之一。本文抗性菌群的解毒机制有待于今后深入研究。

3.2 细菌群落结构与土壤性质之间的关系

RDA 结果显示,有效态铅和总铅含量与 WHIGH 处理的细菌 OTU 水平群落组成具有较强的正相关性,与 WCK 和 WLOW 处理的细菌 OTU 水平群落组成呈负相关,此结果进一步印证了 WHIGH 处理含有较

多的抗逆菌群。WCK处理的细菌 OTU 水平群落组成与有机质正相关,有机质可改变土壤孔隙度、通气度与土壤团粒,具有显著的缓冲作用和持水力,可为土壤细菌提供适宜的生长环境^[26]。Spearman 分析结果显示,土壤 pH 值、含水量、重金属含量及速效磷、有效钾均与相应的微生物类群有相关性。土壤 pH 值和含水量主要影响土壤理化反应,从而影响微生物的微生物生存环境,微生物的生长代谢产生一定的化学物质反过来又影响了土壤中化学物质的存在形态和浓度^[27-28]。

外源铅进入土壤后受各种物理、化学作用的影响,总体上是由不稳定态向稳定态转变,活性和毒性呈降低趋势^[29]。与严重重金属污染土壤,如矿区土壤相比,本试验所添加的重金属含量属于中低等水平,且添加铅已长达3年,虽然3个处理间的铅用量有差异,但并未引起土壤中的细菌群落组成发生显著的剂量效应,此结论与夏月等^[20]结论较一致。本文细菌群落组成未发生显著的剂量效应,可能是由于地上部分有作物种植,依据本实验室前期的研究结果,地上部分种植的作物对土壤中的重金属有不同程度的吸收作用^[30];还有可能是因为重金属影响下,根际环境中的 pH 值、Eh 值、根系分泌物也发生了变化,根分泌的粘胶物质与根际中的 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 等重金属离子络合,形成稳定的螯合体,将污染物固定在土壤中,进而影响到重金属在土壤-植物-微生物中的迁移转化行为^[7,31],使重金属生物可利用毒性降低,从而对土壤微生物群落多样性的影响减小,但具体机制还有待于今后更加深入地研究。本文3个处理间的土壤细菌群落组成有差异,重金属铅应该是造成这个差异的主要因素,土壤环境因素对细菌菌群的改变也产生了一定程度的影响。由于本文添加外源铅浓度较低且经过了较长的周期,土壤微生物可通过改变其群落组成来修复自然界中较低浓度的重金属污染,为今后深入研究微生物修复提供了理论依据。

4 结论

(1)对照和低铅处理的 OTU 组成较相似,而高铅处理的 OTU 与前二者差异较大。变形菌门(Proteobacteria, 25%)和放线菌门(Actinobacteria, 18.60%)在3个处理中均为优势菌群,相对丰度较高的菌群还有酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)和浮霉菌门(Planctomycetes);放线菌纲(Actinobacteria)、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)

和蓝藻菌纲(Cytophagia)在高铅处理中相对丰度最高。

(2)在属分类水平上具显著差异的菌群有9个($P<0.05$),除假单胞菌属(*Pseudomonas*)和红弧菌属(*Skemanella*)外(相对丰度 $>0.6\%$),*Balneimonas*、壤霉菌属(*Agromyces*)、水栖菌属(*Enhydrobacter*)、*Devosia*、贪噬菌属(*Variovorax*)、*Flaviumibacter* 和 *Lacibacter* 均为低丰度菌群(相对丰度 $<0.3\%$)。

(3)土壤有效铅和总铅含量与高铅处理的细菌 OTU 水平群落组呈正相关,而与对照和低铅处理的细菌 OTU 水平群落组呈负相关;对照的细菌 OTU 水平群落组成与土壤有机质含量正相关。在门分类水平上,厚壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、绿弯菌门(Chloroflexi)和硝化螺旋菌门(Nitrospirae)与土壤环境因素显著相关($P<0.05$)。

参考文献:

- [1] 陈兴兰, 杨成波. 土壤重金属污染、生态效应及植物修复技术[J]. 农业环境与发展, 2010, 27(3): 58-62.
CHEN Xing-lan, YANG Cheng-bo. The study of ecological benefits, soil contamination by heavy metals and the phytoremediation technique [J]. *Agro-Environment & Development*, 2010, 27(3): 58-62.
- [2] 吴建军, 蒋艳梅, 吴愉萍, 等. 重金属复合污染对水稻土微生物生物量和群落结构的影响[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1102-1109.
WU Jian-jun, JIANG Yan-mei, WU Yu-ping, et al. Effect of complex heavy metal pollution on biomass and community structure of soil microbes in paddy soil [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(6): 1102-1109.
- [3] 陈承利. 重金属 Cd、Pb、Hg 污染对土壤微生物及其活性影响研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006: 2-3.
CHEN Cheng-li. Effects of cadmium, lead and mercury pollution on soil microorganisms and their activities [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006: 2-3.
- [4] 曾路生, 廖敏, 黄昌勇, 等. 外源铅对水稻土微生物量、微生物活性及水稻生长的影响[J]. 生态环境, 2008, 17(3): 993-998.
ZENG Lu-sheng, LIAO Min, HUANG Chang-yong, et al. Effects of lead contamination on soil microbial biomass, microbial activities and rice growth in paddy soils [J]. *Ecology and Environment*, 2008, 17(3): 993-998.
- [5] 阎姝, 潘根兴, 李恋卿. 重金属污染降低水稻土微生物商并改变 PLFA 群落结构: 苏南某地污染稻田的案例研究[J]. 生态环境, 2008, 17(5): 1828-1832.
YAN Shu, PAN Gen-xing, LI Lian-qing. Decline of microbial biomass quotient and change in microbial PLFA community structure of a rice paddy soil under heavy metal pollution: A case study of a polluted rice paddy from southern Jiangsu, China [J]. *Ecology and Environment*, 2008, 17(5): 1828-1832.
- [6] Gough H L, Stahl D A. Microbial community structures in anoxic fresh-

- water lake sediment along a metal contamination gradient[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(3):543–558.
- [7] Deng L J, Zeng G M, Fan C Z, et al. Response of rhizosphere microbial community structure and diversity to heavy metal co-pollution in arable soil[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99(19):8259–8269.
- [8] 张红, 吕家珑, 曹莹菲, 等. 不同植物秸秆腐解特性与土壤微生物功能多样性研究[J]. 土壤学报, 2014, 51(4):743–752.
ZHANG Hong, LÜ Jia-long, CAO Ying-fei, et al. Decomposition characteristics of different plants straws and soil microbial functional diversity[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51(4):743–752.
- [9] Pan J, Yu L. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure[J]. *Ecological Engineering*, 2011, 37(11):1889–1894.
- [10] Shi W, Becker J, Bischoff M, et al. Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8):3859–3866.
- [11] Ye L, Zhang T. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(6):2681–2690.
- [12] Epelde L, Lanzén A, Blanco F, et al. Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb–Zn mine[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2015, 91(1):1–11.
- [13] Frey B, Stemmer M, Widmer F, et al. Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(7):1745–1756.
- [14] Golebiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, et al. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 67(3):635–647.
- [15] 丁传雨, 郑远, 任学敏, 等. 能源植物修复土壤镉污染过程中细菌群落分析[J]. 环境科学学报, 2016, 36(8):3009–3016.
DING Chuan-yu, ZHENG Yuan, REN Xue-min, et al. Changes in bacterial community composition during the remediation of Cd contaminated soils of bioenergy crops[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(8):3009–3016.
- [16] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 三版. 北京:中国农业出版社, 2000:22–107.
BAO Shi-dan. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd Edition. Beijing: Agriculture Publication, 2000:22–107.
- [17] Smith C J, Hopmans P, Cook F J. Accumulation of Cr, Pb, Cu, Ni, Zn and Cd in soil following irrigation with treated urban effluent in Australia[J]. *Environmental Pollution*, 1996, 94(3):317–323.
- [18] Chen J, He F, Zhang X, et al. Heavy metal pollution decreases microbial abundance, diversity and activity within particle-size fractions of a paddy soil[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2014, 87(1):164–181.
- [19] Niklińska M, Chodak M, Laskowski R. Characterization of the forest humus microbial community in a heavy metal polluted area[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37(12):2185–2194.
- [20] 夏月, Sardar Khan, 贺纪正, 等. 限制性片段长度多态性分析(ARDRA)方法对重金属污染土壤中细菌群落多样性的研究[J]. 环境科学学报, 2007, 27(6):953–960.
XIA Yue, Sardar Khan, HE Ji-zheng, et al. Use of amplified ribosomal DNA restriction analysis to study microbial diversity in soils impacted by heavy metals[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(6):953–960.
- [21] Bamborough L, Cummings S P. The impact of increasing heavy metal stress on the diversity and structure of the bacterial and actinobacterial communities of metallophytic grassland soil[J]. *Biology & Fertility of Soils*, 2009, 45(3):273–280.
- [22] Kuppusamy S, Thavamani P, Megharaj M, et al. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in soils contaminated long-term with PAHs and heavy metals: Implications to bioremediation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 317:169–179.
- [23] 江玉梅, 张晨, 黄小兰, 等. 重金属污染对鄱阳湖底泥微生物群落结构的影响[J]. 中国环境科学, 2016, 36(11):3475–3486.
JIANG Yu-mei, ZHANG Chen, HUANG Xiao-lan, et al. Effect of heavy metals in the sediment of Poyang Lake estuary on microbial communities structure base on Mi-seq sequencing[J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(11):3475–3486.
- [24] El-Enany A E, Issa A A. Cyanobacteria as a biosorbent of heavy metals in sewage water[J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2000, 8(2):95–101.
- [25] Philippis R D, Colica G, Micheletti E. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: Molecular basis and practical applicability of the biosorption process[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2011, 92(4):697–708.
- [26] 王佩雯, 朱金峰, 陈征, 等. 高通量测序技术下连作植烟土壤细菌群落与土壤环境因子的耦合分析[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(11):1754–1763.
WANG Pei-wen, ZHU Jin-feng, CHEN Zheng, et al. Coupling analysis based on high throughput sequencing technology of soil bacterial community and soil environmental factors in continuous cropping tobacco soil[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(11):1754–1763.
- [27] Lauber C L, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2009, 75(15):5111–5120.
- [28] Kemmitt S J, Lanyon C V, Waite I S, et al. Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass: A new perspective[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(1):61–73.
- [29] 徐明岗, 吴曼, 武海雯, 等. 土壤外源铅的稳定化特征及其对土壤性质的响应[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(9):1702–1709.
XU Ming-gang, WU Man, WU Hai-wen, et al. External lead stabilization characteristics in soils and responses to soil properties[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(9):1702–1709.
- [30] Liu K, Lv J L, Dai Y C, et al. Cross-species extrapolation of models for predicting lead transfer from soil to wheat grain[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8):e0160552.
- [31] 徐卫红, 黄河, 王爱华, 等. 根系分泌物对土壤重金属活化及其机理研究进展[J]. 生态环境, 2006, 15(1):184–189.
XU Wei-hong, HUANG He, WANG Ai-hua, et al. Advance in studies on activation of heavy metal by root exudates and mechanism[J]. *Ecology and Environment*, 2006, 15(1):184–189.