

化学农药对三沙湾滩涂土壤细菌多样性及其功能的影响

汤鸣强, 吴承燕, 何爱明, 朱菡馨, 林增艳, 杨嘉宜

引用本文:

汤鸣强, 吴承燕, 何爱明, 朱菡馨, 林增艳, 杨嘉宜. 化学农药对三沙湾滩涂土壤细菌多样性及其功能的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(11): 2483–2493.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0137>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于宏基因组方法分析养猪发酵床微生物组季节性变化

陈倩倩, 刘波, 王阶平, 朱育菁, 张海峰

农业环境科学学报. 2018, 37(6): 1240–1247 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1330>

微生物强化对石油污染土壤的修复特性研究

王娣, 马闯, 高欢, 刘恒, 徐会宁, 吴蔓莉

农业环境科学学报. 2020, 39(12): 2798–2805 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0534>

铅对土细菌群落组成的影响研究

安凤秋, 吕家珑, 刁展, 李海红, 赵琪琪

农业环境科学学报. 2018, 37(2): 268–275 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0960>

磺胺二甲嘧啶对稻田土壤微生物的中长期效应

徐佳迎, 周金蓉, 吴杰, 王珏, 程粟裕, 赵鸽, 蒋静艳

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1757–1766 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0123>

微生物发酵床不同深度垫料的细菌群落多样性

陈倩倩, 刘波, 朱育菁, 刘国红, 车建美, 王阶平, 郑雪芳, 张海峰

农业环境科学学报. 2019, 38(10): 2412–2419 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0361>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

汤鸣强, 吴承燕, 何爱明, 等. 化学农药对三沙湾滩涂土壤细菌多样性及其功能的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(11): 2483-2493.

TANG M Q, WU C Y, HE A M, et al. Effects of agrochemicals on soil bacterial diversity and functions in the coastal tidal-flat area of Sansha Bay[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(11): 2483-2493.

化学农药对三沙湾滩涂土壤细菌多样性及其功能的影响

汤鸣强^{1,2}, 吴承燕¹, 何爱明¹, 朱菡馨¹, 林增艳¹, 杨嘉宜¹

(1. 福建技术师范学院食品与生物工程学院, 福建 福清 350300; 2. 现代设施农业福建省高校工程研究中心, 福建 福清 350300)

摘要:为探究除草剂草甘膦和杀虫剂毒死蜱对三沙湾滩涂土壤细菌群落结构及多样性的影响,利用五点采样法于2021年3月采集福建省霞浦县东吾洋沿岸滩涂土壤,通过模拟自然环境在室内进行农药添加试验,两种农药分别设置3个浓度,即草甘膦5、25、125 mg·kg⁻¹,毒死蜱6、30、150 mg·kg⁻¹,染毒时间分别取3 d和10 d,以未添加农药的滩涂土壤为对照。使用Illumina MiSeq PE300二代高通量测序平台对各处理及对照滩涂土壤细菌16S rRNA基因的V3~V4区进行测序,分析不同处理土壤细菌群落组成结构和功能差异及其影响因素。结果表明:草甘膦和毒死蜱显著降低了三沙湾滩涂土壤细菌α多样性($P<0.05$)。门水平上,滩涂土壤中优势菌群包括变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)和ε-变形菌门(Epsilonbacteraeota),其丰度占比分别为32.69%、20.38%、12.46%和9.14%,农药处理后其优势菌群主要由变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门(Bacteroidetes)组成。属水平上,对照土壤以深海芽孢杆菌属(*Thalassobacillus*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、硫杆菌属(*Sulfurovum*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)为主,农药处理后其优势菌群海杆菌属和芽孢杆菌属得到大量扩增,其他菌属呈现不同程度的衰退。Tax4Fun功能分析结果显示,各处理滩涂土壤的功能类群主要集中在新陈代谢方面,不同阶段细菌功能主要分布于38类代谢通路。经农药处理,滩涂土壤中氨基酸代谢、异生素降解和代谢、脂类代谢、萜类化合物和聚酮的代谢以及环境信息处理中膜运输、细胞运动和细胞运输同化作用等功能得到明显增强,而能量代谢、聚糖生物合成和代谢、遗传信息处理等功能有不同程度的削弱。由此可见,化学农药的加入降低了三沙湾滩涂土壤细菌群落多样性,微生物多样性的损失将改变生态系统的功能,降低生态系统的稳定性。

关键词:草甘膦;毒死蜱;滩涂土壤;细菌群落结构;代谢功能

中图分类号:X592;S154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2023)11-2483-11 doi:10.11654/jaes.2023-0137

Effects of agrochemicals on soil bacterial diversity and functions in the coastal tidal-flat area of Sansha Bay

TANG Mingqiang^{1,2}, WU Chengyan¹, HE Aiming¹, ZHU Hanxin¹, LIN Zengyan¹, YANG Jiayi¹

(1. School of Food and Bio-engineering, Fujian Polytechnic Normal University, Fuqing 350300, China; 2. Engineering Research Center of Modern Facility Agriculture of Fujian University, Fuqing 350300, China)

Abstract: To investigate the effects of the herbicide glyphosate and the insecticide chlorpyrifos on the bacterial community structure and diversity of Sansha Bay tidal-flat soil, a five-point sampling method was employed to collect tidal-flat soil along the coastal area of Dongwu Ocean in Xiapu County, Fujian Province in March 2021. The pesticide addition test was conducted indoors to simulate the natural environment. Three concentration gradients were used for glyphosate (5, 25 mg·kg⁻¹, and 125 mg·kg⁻¹) and chlorpyrifos (6, 30 mg·kg⁻¹, and 150 mg·kg⁻¹). The treatment duration was 3 days and 10 days, and tidal-flat soil without pesticides was utilized as a control. The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was analyzed using the Illumina MiSeq PE300 second-generation high-throughput sequencing platform to

收稿日期:2023-02-26 录用日期:2023-05-12

作者简介:汤鸣强(1966—),男,福建霞浦人,博士,教授,从事化学农药污染的生物修复研究。E-mail:mqt-1022@163.com

基金项目:福建省自然科学基金项目(2020J01309);现代设施农业福建省高校工程研究中心开放研究基金课题(G2-KF2005)

Project supported: The Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2020J01309); The Open Research Fund of Modern facility Agriculture Engineering Research Center of Fujian University (G2-KF2005)

examine differences in community structure and function among the various treated soil communities and their influencing factors. The results demonstrated that glyphosate and chlorpyrifos significantly reduced the bacterial α diversity in Sansha Bay beach soil ($P < 0.05$). At the phylum level, the dominant flora in the tidal soil included Proteobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, and ϵ -Proteobacteria (Epsilonbacteraeota), accounting for 32.69%, 20.38%, 12.46%, and 9.14%, respectively. Following pesticide treatment, the predominant bacterial flora consisted of Proteobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes. At the genus level, the control soil was primarily dominated by deep-sea *Thalassobacillus*, *Marinobacter*, *Sulfurovum*, and *Bacillus*. After pesticide treatment, the dominant bacteria *Marinobacter* and *Bacillus* exhibited significant expansion, while other genera showed varying degrees of decline. The Tax4Fun functional analysis results revealed that the functional groups in each treated tidal-flat soil were primarily concentrated in the metabolic aspect, with bacterial functions being distributed across 38 different metabolic pathways. Amino acid metabolism, isobiotic degradation and metabolism, lipid metabolism, terpenoids and the same metabolism, and environmental information processing in terms of membrane transport, cell movement, and cell transport assimilation function were significantly enhanced by pesticide treatment. Conversely, energy metabolism, glycan biosynthesis and metabolism, and genetic information processing functions weakened to varying degrees. These findings indicate that the addition of chemical pesticides reduced the diversity of soil bacterial communities in Sandanna Bay beach, and the loss of microbial diversity can alter the function of the ecosystem and reduce its stability.

Keywords: glyphosate; chlorpyrifos; coastal tidal-flat soil; bacterial community; metabolism functions

三沙湾位于福建省宁德市霞浦县、福安市、蕉城区和福州市罗源县滨岸交界处,四周群山环绕,海岸线曲折,滩涂宽阔,面积约为 303 km²,是一个半封闭港湾。该区域气候类型为中亚热带季风湿润气候,其海涂土壤底质肥沃、盐分高、生态恢复与自净能力较弱。近年来滨海经济迅速发展,三沙湾区域填海造地、大规模工业建设及滩涂养殖业方兴未艾,随之而来的工农业污染、生活污水、养殖废水及港口船舶废液等对滩涂造成了严重的生态破坏和环境污染,很多滩涂丧失了原有的生态功能。滩涂生态退化以多种形式呈现,环境污染往往是导致其退化的主要原因。

土壤微生物中细菌的种类最为丰富,数量也最多,赋予土壤以重要的生态功能,其群落结构特征与多样性反映着土壤质量的变化趋势,而群落丰富度和多样性往往具有重要的生态功能,尤其在湿地营养盐循环、有机物降解和重金属转化等方面^[1-2]。国内外围绕滩涂湿地土壤微生物的动态展开了广泛而深入的研究,测定分析了滩涂土壤理化性质,而针对滩涂土壤微生物群落结构的研究尚未得到充分的重视^[3]。草甘膦是当今世界生产量和使用量最大的农药,中国目前是全球最大的草甘膦农药生产国和出口国^[4]。近年来,随着抗草甘膦转基因作物的问世,草甘膦用量逐年递增,导致其本身及主要降解产物氨甲基磷酸 (AMPA)在土壤及其周边水域中不断积累,且检出率较高,由此带来的环境危害及健康风险引起了广泛关注^[5-6]。毒死蜱被广泛用于重要农作物如水稻、小麦、大豆、玉米等的害虫防治,但施用过程中只有不到 1% 的使用量作用于靶标生物,多数通过径流、渗漏、漂移

等途径污染土壤和水环境^[7-9]。毒死蜱在碱性条件下容易降解,但在土壤环境,由于吸附系数高,常被吸附到土壤中,导致其在土壤中的残留期较长^[10-11]。毒死蜱更容易大量积累于水体和底泥环境,并通过生物富集作用影响水体食物链的健康与安全。目前,有关除草剂草甘膦和杀虫剂毒死蜱的环境行为及其对生态系统的影响研究国内外主要关注点是耕地土壤或水体环境^[12],鲜见对滩涂环境影响的报道。

本文通过模拟自然环境在室内进行农药添加试验,以三沙湾区域的霞浦县东吾洋沿岸滩涂土壤为研究对象,利用高通量测序技术和生物信息学分析方法,通过分析受除草剂草甘膦和杀虫剂毒死蜱污染的滩涂土壤微生物群落结构差异及各功能类群,阐明污染胁迫下微生物多样性特点,探讨化学农药污染情境下,滩涂土壤微生物群落结构响应特征,为科学评价化学农药胁迫下滩涂环境微生物指标体系提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

三沙湾地理位置为福建省宁德市东南部沿海 (26°31'01.90"~26°57'52.14"N, 119°31'26.19"~120°05'15.92"E),属亚热带海洋性季风气候,为典型的封闭型港湾。水温年变化范围在 13.5~29.8 °C,平均为 23.1 °C。盐度年变化范围在 23.5‰~28.9‰,平均为 25.7‰。该湾汇集了福州市和宁德市 8 县(市) 8 700 km²流域面积的溪流,水深流畅、咸淡水交混、营养盐丰富、浮游生物繁生^[13],是我国珍稀物种中华白海豚的栖息地和大黄鱼的产卵场。该湾濒临闽东渔场,有

鱼类500多种,甲壳类60多种,贝类70多种,藻类10多种。三沙湾海涂资源底质肥沃,泥质滩涂,盐分含量高于福建省平均水平,自净和生态恢复能力较弱。

1.2 土壤样品采集与处理

试验于2021年3月在三沙湾沿岸的福建省霞浦县沙江镇沙江村沿海滩涂随机设置3个5 m×5 m的样方(26°47' N, 119°58' E),系滩涂向海延伸最外围的植被带,偶有互花米草着生。在样方内将滩涂土壤从上到下分为3个土层,即表层(0~10 cm)、中层(10~30 cm)和深层(30~60 cm)。为减少误差,各土层样本混合均匀后,用无菌自封袋装好带回实验室,测定相关指标。称取过0.42 mm筛的滩涂土壤进行染毒试验。在300 g备用土壤中添加草甘膦(G)或毒死蜱(C)母液,使土壤中前者的浓度分别为5、25 mg·kg⁻¹和125 mg·kg⁻¹(分别记作1、2、3),后者的浓度分别为6、30 mg·kg⁻¹和150 mg·kg⁻¹(分别记作1、2、3),同时设置无菌水处理为空白对照(CK),每个处理3个重复。所用草甘膦和毒死蜱标准样品纯度均为99.2%,购自北京北方伟业计量技术研究院。供试土壤含水量控制在60%并混合均匀,装入塑料盆内(容量1 kg),于(25±1)°C恒温培养,定期补水以保持恒定的水分含量。分别于第0、3、10天取土壤样品,-80 °C保存待测。处理标记举例:5 mg·kg⁻¹草甘膦处理3 d记作G-3-1。

1.3 土壤理化性质的测定

用重铬酸钾容量法(NY/T 1121.6—2006)测定土壤有机质;用碱解扩散法测定碱解氮;用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法(NY/T 1121.7—2014)测定有效磷;用乙酸铵浸提-火焰光度法(NY/T 889—2004)测定速效钾;用残渣法(NY/T 1121.16—2006)测定水溶性盐;用水提取法(水:土=2.5:1)测定pH值。测定结果为土壤有机质含量20.0 g·kg⁻¹、碱解氮41.6 mg·kg⁻¹、有效磷39.2 mg·kg⁻¹、速效钾1 338 mg·kg⁻¹、水溶性盐14.3 g·kg⁻¹、pH值8.9。

1.4 土壤细菌DNA提取

滩涂土壤细菌基因组DNA用HiPure Soil DNA Kits试剂盒提取,DNA纯度及完整性用1%琼脂糖凝胶电泳检测,DNA质量用NanoDrop2000 UV-vis分光光度计检测。PCR扩增模板为土壤样品细菌DNA,引物为V3、V4正反向通用引物,即341F(5'-CCTACGGGNGG CWGCAG-3')和806R(5'-GGACTACH-VGG GTATCTAAT-3')。PCR反应体系构成:0.2 μmol·L⁻¹正反向引物,1.5 U Pfu DNA聚合酶,4 μL

10×Pfu DNA聚合酶缓冲液,10 μmol·L⁻¹ dNTPs,100 ng DNA样品,用ddH₂O补充反应体系至50 μL。PCR反应条件:95 °C变性5 min;95 °C 1 min,60 °C 1 min,72 °C 1 min,循环30次;72 °C延伸7 min。

1.5 高通量测序与数据分析

DNA样品的高通量测序委托广州基迪奥科技服务有限公司完成。其流程包括样本准备、文库构建及Illumina HiSeq2500PE250平台测序。测序序列经处理得到有效拼接片段(Clean Tags)。Clean Tags经筛选去除嵌合体序列,得到Effective Tags。Effective Tags用Uparse在97%水平上进行聚类分析。用USEARCH对序列进行OTU主成分分析,将每个OTU代表序列与数据库比对获得物种注释信息。采用Qii-meV1.8计算细菌群落在各分类水平上的α-多样性指数(Chao1、Observed species、Goods coverage、Shannon及Simpson 5个指标)。使用R软件(Version 2.15.3)作热图分析,基于OTU丰度表对bray curtis距离算法作PCA分析。采用Origin 2015绘制各样品中OTUs(>10 sequences)三相图,分析土壤细菌群落组成。

2 结果与分析

2.1 土壤样品DNA提取与检测

土壤样品DNA提取及其电泳验证结果如图1所示。由图1可知,CK及各处理均呈现1条明晰的亮带,位置在500 bp之上,说明所提取的DNA完整无杂质。经Nano Drop检测,各样品DNA浓度为4.2 ng·L⁻¹,各样品DNA D₂₆₀/D₂₈₀为1.82,处于1.8~2.0之间,进一步说明所提取的滩涂土壤DNA纯度高、质量好。

2.2 滩涂土壤细菌DNA测序分析

对对照及染毒处理共13个样品进行高通量测序,利用Qiime生成常用多样性指数。由表1可知,原始序列为1 577 407条,质控后得到1 410 368条Effective Tags。序列经97%水平OTU聚类,获得所有样品丰度信息,共10 981个OTU。各处理测序覆盖率最低为0.995,说明所获得的细菌序列覆盖度较好,该结果符合土壤细菌群落结构组成及多样性分析的要求。

基于高通量测序结果,构建序列数与OTUs数的稀疏曲线(图2)。由图2可知,当测序深度为2 400左右时,细菌多样性指数趋于平缓,说明测序数据量足够大,对样品中大部分细菌信息的反映是客观的。CK的Shannon指数最大,其生物多样性最大,G-3-3指数最小,生物多样性最小。生物多样性从上到下依次为CK>C-3-3>G-3-1>G-3-2>C-10-2>C-10-1>



M 为 DNA Marker; G-3-1~G-3-3、G-10-1~G-10-3 为草甘膦处理滩涂土壤样品提取的 DNA; C-3-1~C-3-3、C-10-1~C-10-3 为毒死蜱处理滩涂土壤样品提取的 DNA; CK 为未加农药处理滩涂土壤样品提取的 DNA。

M indicates DNA Marker; G-3-1~G-3-3, G-10-1~G-10-3 indicate DNA extracted from glyphosate-treated tidal flat-soil samples; C-3-1~C-3-3, C-10-1~C-10-3 indicate DNA extracted from chlorpyrifos-treated tidal-flat soil samples; CK indicates DNA extracted from pesticide-free treatment tidal-flat soil samples.

图1 土壤样品提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 1 Results of DNA agarose gel electrophoresis extracted from soil samples

表1 滩涂土壤样品测序数据统计结果

Table 1 Statistical results of sequencing data of soil samples in tidal flats

组别 Group	原始序列数 Original sequence number/条	有效样本序列数 Effective sequence number/条	OTU 数 OUT number/ 个	覆盖率 Coverage	Shannon 指数 Shannon index	Chao1 指数 Chao1 index	Simpson 指数 Simpson index	系统发育多样性 Phylogenetic diversity
CK	120 776	109 749	2 988	0.997	7.74	2 996.35	0.97	391.77
G-3-1	135 756	120 039	734	0.997	5.19	847.30	0.95	102.73
G-3-2	124 686	109 876	671	0.997	4.84	785.37	0.93	92.51
G-3-3	47 360	43 590	409	0.995	2.77	534.39	0.71	65.96
G-10-1	126 832	113 032	795	0.997	4.07	883.83	0.84	107.60
G-10-2	126 025	112 806	848	0.997	4.34	961.12	0.88	115.94
G-10-3	124 233	111 618	788	0.997	4.29	893.00	0.89	108.72
C-3-1	131 238	116 418	532	0.997	3.83	632.69	0.84	73.56
C-3-2	122 790	109 821	585	0.997	4.11	723.51	0.87	78.71
C-3-3	133 079	119 123	955	0.997	5.34	1 028.21	0.95	128.28
C-10-1	128 808	114 182	832	0.997	4.44	922.71	0.89	112.81
C-10-2	135 521	120 963	904	0.997	4.61	994.55	0.91	123.66
C-10-3	120 303	109 151	855	0.997	4.24	950.42	0.87	116.11

G-10-2>G-10-3>C-10-3>C-3-2>G-10-1>C-3-1>G-3-3。与CK相比,草甘膦处理的第3天,随着处理浓度的提高,细菌群落 Chao1 指数和 Shannon 指数均呈现显著下降的变化趋势,而 Simpson 指数变化不显著。与此相反,毒死蜱处理的第3天,随着处理浓度的提高,相关指数却呈现显著升高的变化趋势。处理第10天,两种农药各处理的相关指数逐步恢复到没有显著差异的水平。总体来看,CK 的各项多样性指数均高于施加农药的处理,说明 CK 的细菌多样性最

为丰富,菌群丰富度最高,而农药染毒处理对滩涂土壤细菌群落结构稳定性及多样性造成了影响。

2.3 不同处理土壤细菌群落组成及指示物种差异

为探究不同处理土壤细菌群落组成规律,将样本与门和属分类水平上的细菌群落分布信息进行聚类并重新排布,构建物种丰度热图(图3)。由样本间细菌群落相似性发现,CK 单独聚为一类,C-10-3、G-3-3 聚为一类,其余各处理聚为一类,尤其是在属分类水平上的其余各处理中施药早期(C-3-1、C-3-2、C-

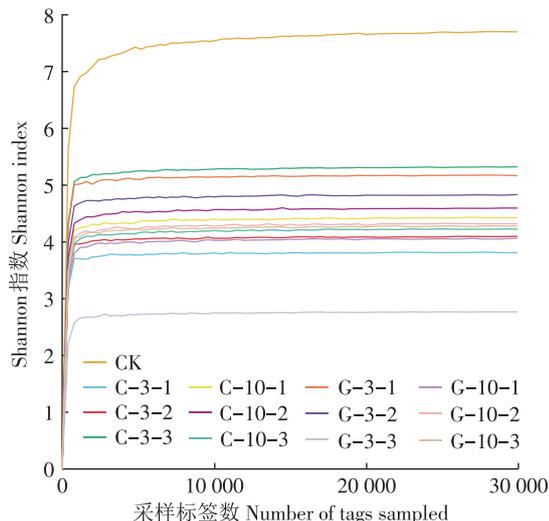


图2 对照及各处理滩涂土壤细菌群落Shannon指数稀释曲线
Figure 2 Shannon index dilution curve of bacterial community in control and each treatment of tidal flat soils

3-3、G-3-1和G-3-2)与施药后期(C-10-1、C-10-2、G-10-1、G-10-2和G-10-3)各聚为一类,表明农药处理显著影响滩涂土壤微生物的组成,且其影响因农药种类、施药浓度及处理时间的不同而有所差异。

从门水平看(图3a),13个处理土壤中共检测到241个细菌门,其中,CK处理19个门,毒死蜱处理的平均数为18.3个门,草甘膦处理的平均数为18.7个门。滩涂土壤中优势菌群包括变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)和 ϵ -变形菌门(Epsilonbacteraota),占比分别为32.69%、20.38%、12.46%和9.14%。古菌中的泉古菌门(Crenarchaeota)也有较高的丰度,其占比为2.74%。拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰度为4.22%。经过农药处理,滩涂土壤中菌群结构发生了明显的变化,其优势菌群主要由变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门构成,草甘膦处理下其相对丰度范围分别为35.39%~60.68%、8.19%~58.72%和3.35%~41.95%,毒死蜱处理下其相对丰度范围分别为42.93%~58.29%、7.14%~37.95%和3.87%~35.65%。 ϵ -变形菌门的丰度占比尽管因农药类别及处理时间的不同而不同,但其丰度和占比达到90%左右,特别是拟杆菌门的占比大幅度提高,说明农药处理对滩涂土壤微生物的构成造成了显著影响。

从属水平看(图3b),13个处理土壤中共检测到260个细菌属。未施农药处理的滩涂土壤样品中主要的菌属有深海芽孢杆菌属(*Thalassobacillus*),所占

比例为11.19%;海杆菌属(*Marinobacter*),所占比例为10.86%;硫卵菌属(*Sulfurovum*),所占比例为8.28%;芽孢杆菌属(*Bacillus*),所占比例为1.95%;以及一些未知分类地位的菌属。两种农药处理下,在CK中含量丰富的优势菌群硫卵菌属、海洋伍斯菌属(*Woeseia*)及深海芽孢杆菌属均表现出不同程度的衰退,其中,前者表现得尤为显著,相对丰度最小值下降到0.13%。两种农药处理的早期,低浓度下,两种农药对海杆菌属的影响不显著,但在中、高浓度下,两种农药的作用刚好相反,毒死蜱对海杆菌属的生长表现出明显的抑制作用,而草甘膦却能显著促进海杆菌属的生长。处理后,两种农药对海杆菌属的生长均表现为显著的促进作用,其丰度占比甚至达到总体丰度的30%以上。两种农药均能显著促进芽孢杆菌属的生长,但表现效应不一致。随着处理时间的延长,毒死蜱对芽孢杆菌属生长的促进作用愈发明显,尤其是中、高浓度的处理;而草甘膦对芽孢杆菌属生长的促进作用主要体现在前期,随着处理时间的延长,其效应逐渐减弱。

PCA分析通过PCA方差分解,分析样本中OTU组成97%相似性,反映样本差异和距离,样本越相似,图上的距离越接近。PCA分析CK及各处理滩涂土壤中细菌群落组成异同,结果如图4所示。根据PCoA图,主坐标成分PC1和PC2分别能解释49.02%和23.76%的细菌群落组成差异。毒死蜱早期处理(C-3-1、C-3-2和C-3-3)及中、低浓度草甘膦处理(G-3-2和G-3-1)与CK聚集在一象限,说明两种农药使用早期对滩涂土壤细菌群落的影响较小,可能是需要一定的时间适应化学农药的干扰。草甘膦后期处理(G-10-1、G-10-2和G-10-3)与中、低浓度毒死蜱后期处理(C-10-2和C-10-1)聚集在四象限,与CK距离较远,说明经过一定时间的农药处理,滩涂土壤中细菌群落特征发生了改变。

2.4 不同处理滩涂土壤细菌群落的功能分析

2.4.1 PICRUSt功能分析

基于KEGG数据库,采用PICRUSt软件分析不同处理滩涂土壤16S rDNA的OTU信息,在此基础上,运用Tax4Fun分析群落功能。由图5可知,一级功能层上,所有处理可分为6大类,即代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程、人类疾病和有机系统类。细菌群落相对丰度最高的功能为代谢类,遗传信息及环境信息处理类次之,而有机系统类最低。

二级功能层上,不同阶段细菌主要体现在38类

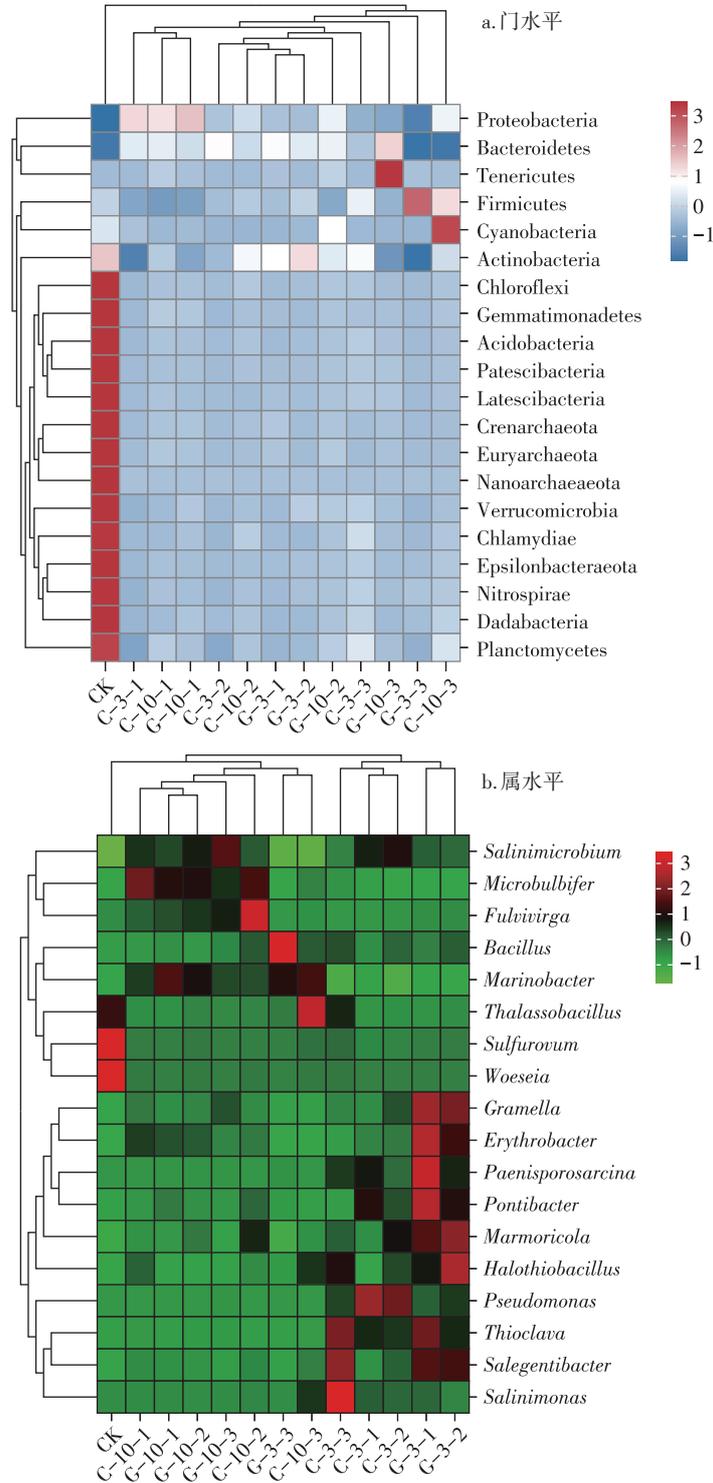


图3 滩涂土壤样品中细菌群落分布热图

Figure 3 Distribution heat map of bacterial communities in tidal flat soil samples

代谢通路上,相对丰度排名前30的细菌群落如图5所示。由图5可知,细菌种类最多的功能层为新陈代谢,其强弱顺序(>1%)为碳水化合物代谢(12.53%~14.07%)、氨基酸代谢(10.86%~12.59%)、能量代谢(6.59%~8.24%)、辅酶和维生素代谢(6.73%~7.02%)、

核苷酸代谢(4.94%~5.47%)、异生素降解和代谢(3.37%~4.35%)、脂类代谢(3.13%~3.81%)、萜类化合物和聚酮的代谢(2.52%~3.46%)、其他氨基酸代谢(2.33%~2.71%)、聚糖生物合成和代谢(2.21%~2.86%)、其他次生代谢物的合成(0.90%~0.94%)。与

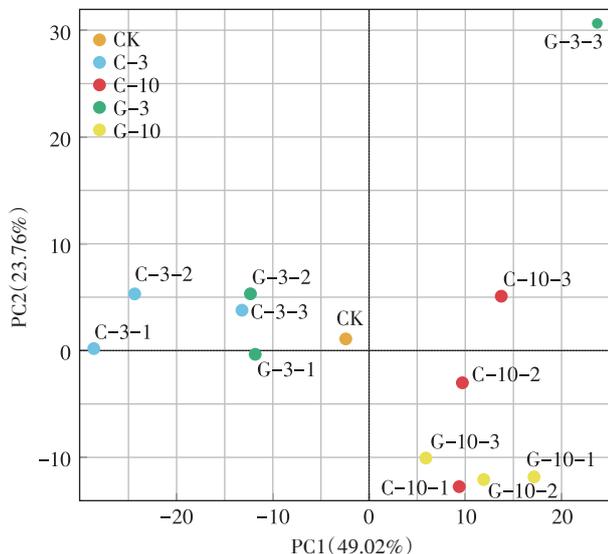


图4 不同处理土壤细菌群落结构主成分分析

Figure 4 Principal coordinate analysis of bacterial community structure under different treatments

CK相比,经毒死蜱和草甘膦处理,滩涂土壤中异生素降解和代谢、氨基酸代谢、萜类化合物和聚酮代谢、脂类代谢以及环境信息处理中膜运输、细胞运动和细胞

运输同化作用等功能明显增强,而能量代谢、聚糖生物合成和代谢、遗传信息处理等功能有不同程度的削弱。低浓度下,两种农药对氨基酸代谢、异生素降解代谢功能的增强效应尤为明显,随着浓度的提高,其效应有所减弱。这些基因功能表达存在显著差异的原因可能是CK与农药处理样本存在差异的菌群所导致的。

2.4.2 BugBase 表型预测

BugBase分析可以预测环境样本中原核微生物的表型,其中表型类型包括革兰氏阳性、革兰氏阴性、生物膜形成、致病性、移动元件含量、氧需求(包括好氧、厌氧、兼性厌氧)和胁迫耐受七大类。农药处理前后滩涂土壤微生物表型分布如图6所示。相较于CK,所有农药处理的样本表型主要是好养菌丰度显著增加、厌养菌丰度显著减少和胁迫耐受表型的显著上升。农药处理前后,多数样本的对照组和实验组革兰氏阳性、阴性及致病性表型相对丰度变化不大,但高浓度草甘膦处理的第3天(G-3-3)却呈现革兰氏阳性表型显著上升,阴性显著下降及致病性显著增加的趋势。在生物膜形成方面,两种农药处理均表现为早

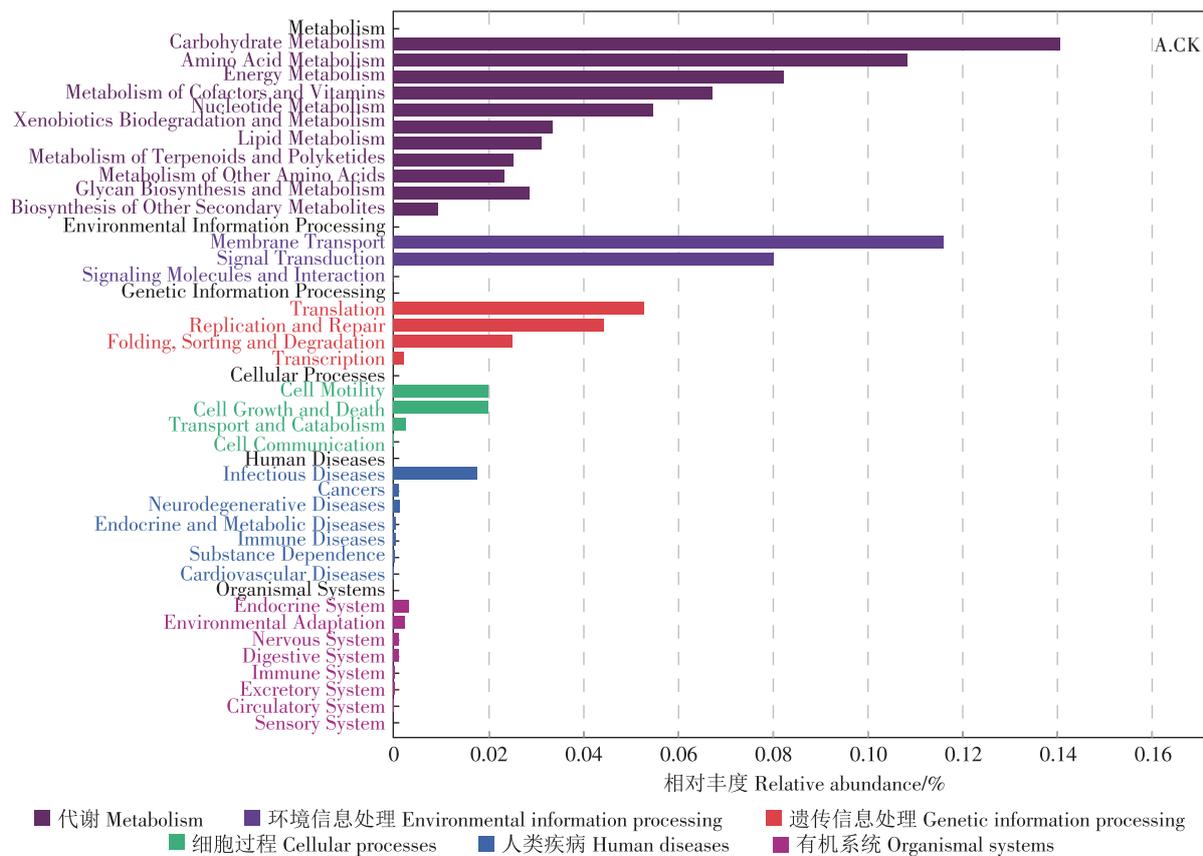
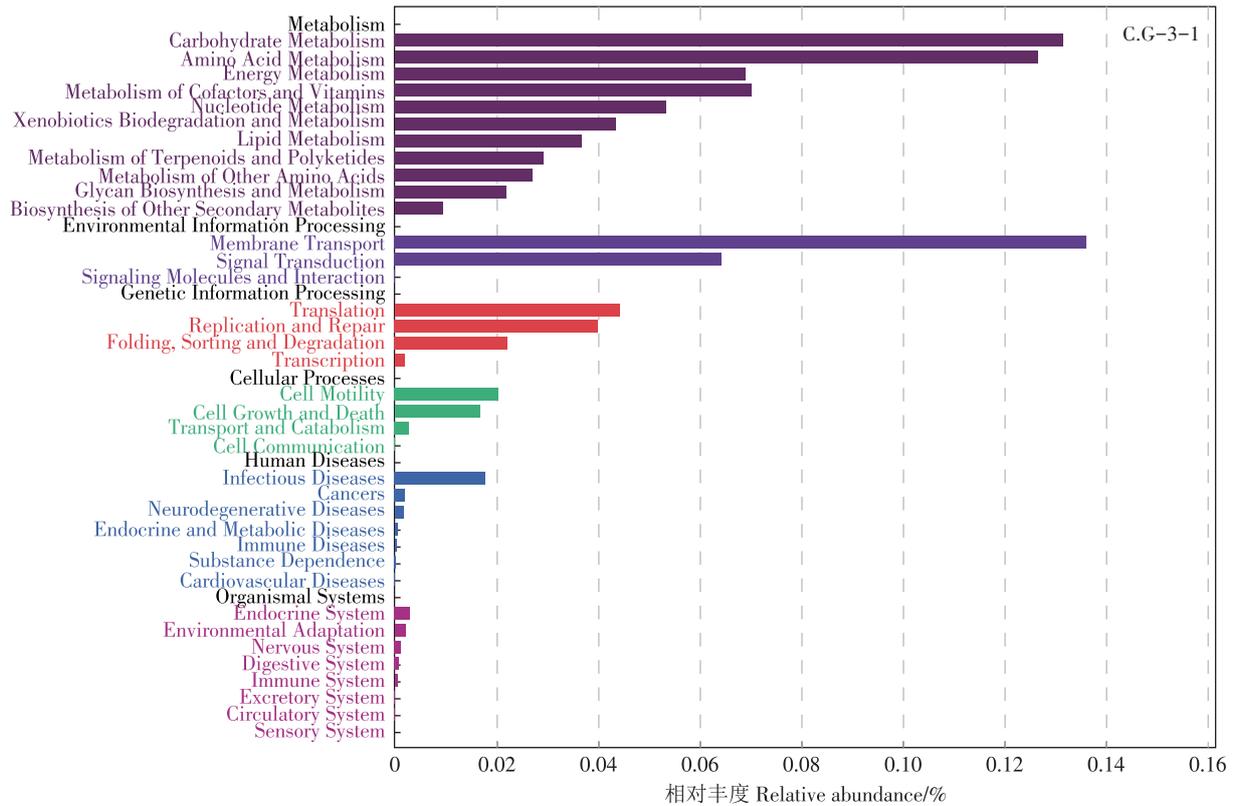
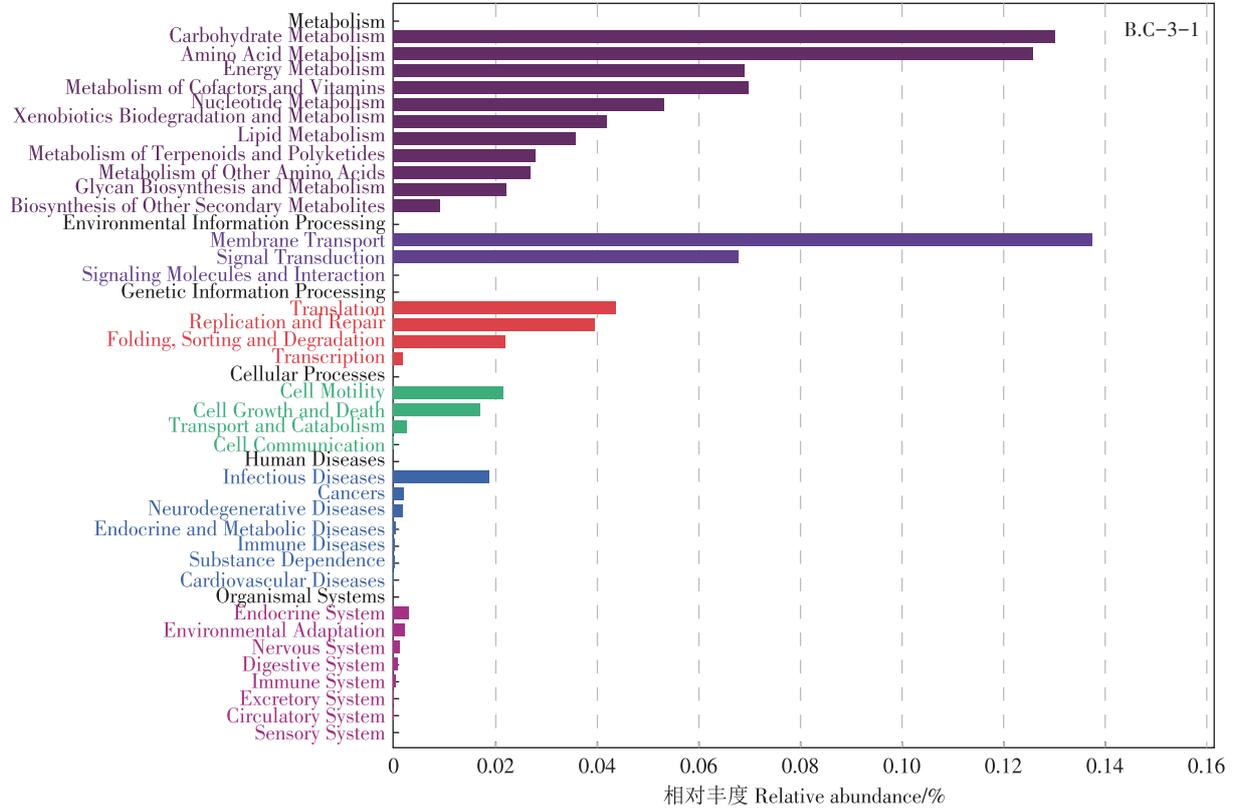


图5 不同处理滩涂土壤细菌群落的功能分析

Figure 5 Functional prediction analysis of bacterial population in tidal wetland soil under different treatments



■ 代谢 Metabolism
 ■ 环境信息处理 Environmental information processing
 ■ 遗传信息处理 Genetic information processing
■ 细胞过程 Cellular processes
 ■ 人类疾病 Human diseases
 ■ 有机系统 Organismal systems

续图5 不同处理滩涂土壤细菌群落的功能分析

Continued figure 5 Functional prediction analysis of bacterial population in tidal wetland soil under different treatments

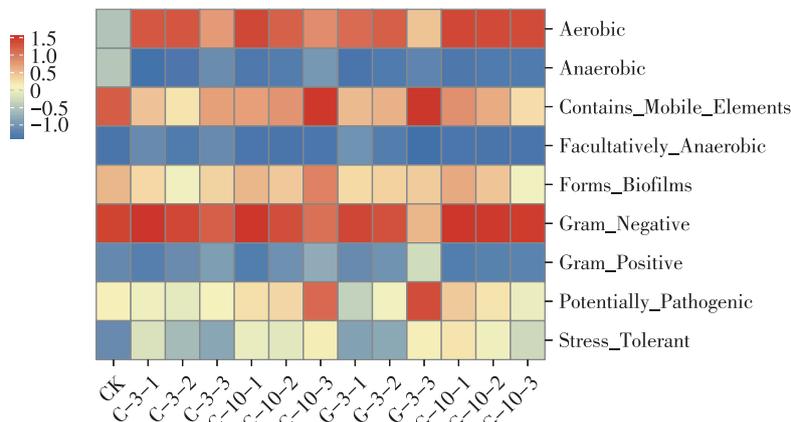


图6 不同处理滩涂土壤细菌群落 BugBase 表型预测

Figure 6 BugBase phenotype prediction of bacterial community in tidal wetland soil under different treatments

期生物膜表型下降,后期逐渐上升,且与CK差异显著的特点。

3 讨论

3.1 不同处理土壤细菌群落组成及指示物种差异

微生物群落结构与多样性越来越广泛地被用于评价因污染而受损的土壤质量。土壤细菌菌群数量和丰富度的变异程度是反映土壤群落多样性的重要指标。细菌通过各种途径直接或间接地参与土壤中各种物质的分解转化,其群落结构是生态系统变化的敏感生物指标^[14-15],通过探讨滩涂土壤细菌群落多样性特征可以反映生态系统对干扰的响应^[16],其中,土壤细菌 α -多样性指数是评价土壤细菌群落多样性的重要指标。Shannon指数和Simpon指数常被用来反映土壤细菌多样性程度的高低,而Chao1指数则被用来反映细菌物种丰富度情况。实践中应用高通量测序方法,高效率地实现土壤中微生物群落组成成分、群落结构和多样性的检测,土壤总量94%以上的OTU可被发现,尤其是许多低丰度、未分类的微生物群落。本研究中滩涂土壤细菌群落丰富度和多样性表现出较高水平。经草甘膦和毒死蜱胁迫处理,三沙湾滩涂土壤Chao1指数和Shannon指数均显著下降($P<0.05$)。这与受农药污染土壤中碳源利用微生物的均一程度受到影响密切相关^[17]。两种农药对滩涂土壤中细菌多样性和丰富度的影响主要体现在用药初期。用药初期,土壤中细菌的多样性和丰富度随着草甘膦浓度的提高而下降,却随着毒死蜱浓度的提高而上升。用药后期,不同浓度农药对滩涂土壤细菌多样性的影响明显减弱,其原因可能是多数细菌种群难以适应环境变化而死亡,其群落的多样性和丰富度也

随之下降。

土壤细菌群落结构与土壤细菌群落生态功能紧密相关,化学农药使用对滩涂土壤细菌群落多样性造成影响的同时,必然对其群落结构产生影响。本研究中,三沙湾滩涂土壤细菌的主要类群包括变形菌门、厚壁菌门、绿弯菌门和 ϵ -变形菌门。经过农药处理,其主要优势菌群转变为变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门,草甘膦胁迫下三者的相对丰度范围分别为35.39%~60.68%、8.19%~58.72%和3.35%~41.95%,毒死蜱处理下三者的相对丰度范围分别为42.93%~58.29%、7.14%~37.95%和3.87%~35.65%。其丰度和占比达到90%左右,特别是拟杆菌门的占比大幅度提高。有学者认为,土壤施用草甘膦时,随着时间的推移,土壤中细菌群落组成会逐渐转变为更耐草甘膦的物种^[18]。湿地系统中变形菌门和酸杆菌门(Acidobacteria)是去除毒死蜱的主要菌门。变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门是富营养细菌,在有机质含量较高的环境中具有较高的生长速率^[19]。作为海洋环境的主要异养菌,变形菌门耐盐碱性很强, α -变形菌纲和 γ -变形菌纲起主导作用^[20],这些细菌能利用有机物分解产生的氨气和甲烷等营养物质进行生长代谢活动^[21]。海洋环境另一重要微生物类群是拟杆菌门,其是溶解性有机物的主要消费者^[22]。厚壁菌门多数成员抗逆性和适应性极强,在极端生态环境中扮演重要角色^[23]。农药处理对滩涂土壤微生物的构成造成了显著影响,同时施用农药同样导致土壤优势菌属发生变化。对照主要菌属包括深海芽孢杆菌属、海杆菌属、硫卵菌属、芽孢杆菌属和海洋伍斯菌属等,相对丰度分别为11.19%、10.86%、8.83%、2.91%和1.95%。两种农药处理下,硫卵菌属、海洋伍斯菌属及深海芽孢

杆菌属均呈不同程度的衰退,前者尤为显著,相对丰度最小值下降到0.13%。低浓度下,两种农药对海杆菌属的影响不显著,但中、高浓度下,毒死蜱明显抑制海杆菌属的生长,而草甘膦却显著促进其生长。处理后,两种农药对海杆菌属的生长均表现为显著的促进作用,其丰度占比甚至达到总体丰度的30%以上。两种农药均能显著促进芽孢杆菌属的生长,但表现效应不一致。随着处理时间的延长,毒死蜱对芽孢杆菌属生长的促进作用愈加明显,尤其是中、高浓度的处理;而草甘膦对芽孢杆菌属生长的促进作用主要体现在前期,随着处理时间的延长,其效应日趋减弱。另外,施用早期,两种农药都明显促进 *Pseudomonas* 的生长,但随着处理时间的延长,其效应明显消失。本研究中,经草甘膦和毒死蜱染毒处理,三沙湾滩涂土壤细菌 α -多样性显著降低,说明农药胁迫对海洋滩涂细菌多样性产生影响,环境变化会导致近海环境细菌多样性的变化。

3.2 不同处理滩涂土壤细菌群落的功能分析

土壤生态系统的功能建立在土壤微生物群落基础上,健康的群落基础在调节和指示土壤功能基因变化过程中发挥着重要的作用^[24]。细菌群落结构的差异与细菌群落功能基因的差异显著正相关,土壤功能多样性和微生物多样性也存在紧密的联系^[25]。本研究经Tax4Fun功能预测,发现农药胁迫可导致细菌功能的改变,二级功能主要体现在38类代谢通路,而相对丰度最高的为代谢功能,表明代谢通路是滩涂土壤细菌的核心功能,这也验证了前人的研究结果^[26]。土壤中变形菌门、酸杆菌门、放线菌门和绿弯菌门等优势菌群的相对丰度与二级代谢功能基因丰度显著相关,以 β 多样性为指征的群落功能基因差异随细菌群落结构差异的增大而显著增加,表明细菌群落功能与结构间存在着紧密的联系。马欣等^[27]认为土壤细菌要维持生存,必须依赖于摄取碳水化合物、合适的氨基酸代谢和能量代谢,这三者成为细菌群落最主要的功能基因。Rahman等^[28]也发现保证细菌生长的代谢功能主要是通过摄取碳水化合物、氨基酸和维生素等营养物质来实现的。经农药处理,滩涂土壤中异生素、氨基酸、脂类、萜类化合物和聚酮的代谢以及环境信息处理中膜运输、细胞运动和细胞运输同化作用等功能得到明显增强,而能量代谢、聚糖生物合成和代谢、遗传信息处理等功能有不同程度的削弱。本研究中,变形菌门和绿弯菌门等优势菌群的丰度与相关功能基因,如代谢、遗传信息处理、细胞过程及环境信息

处理等基因的丰度显著相关,表明优势菌群在土壤群落功能中发挥关键作用。目前利用PICRUSt软件预测细菌的代谢功能,成本较低并且具有较高的精确度^[29],但仍存在一定的局限性,后续可利用宏基因组学测序技术及营养元素循环功能基因分析方法,综合分析农药胁迫下滩涂细菌的群落功能。

4 结论

(1)三沙湾滩涂土壤细菌群落 α -多样性随草甘膦和毒死蜱的使用呈显著降低。

(2)农药染毒使三沙湾滩涂土壤细菌群落发生显著变化。门水平上,染毒处理的优势菌群主要由变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门组成。属水平上,海杆菌属和芽孢杆菌属得到大量扩增,其他菌属呈现不同程度的衰退。

(3)经毒死蜱和草甘膦处理,滩涂土壤中氨基酸、异生素、脂类、萜类化合物和聚酮的代谢以及细胞运动、膜运输和细胞运输同化作用等功能得到增强,而能量代谢、聚糖生物合成和代谢、遗传信息处理等功能有不同程度的削弱。

参考文献:

- [1] MARTINS G, TERADA A, RIBEIRO D C, et al. Structure and activity of lacustrine sediment bacteria involved in nutrient and iron cycles[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 77(3):666-679.
- [2] 何玉实,何彤慧,冯艳琼,等.鄂尔多斯台地盐沼滩涂湿地土壤细菌群落结构及特征[J]. *生态学报*, 2022, 42(8):3345-3355. HE Y S, HE T H, FENG Y Q, et al. Characteristics and distribution of soil bacterial of salt marsh tidal wetland in Ordos Platform[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, 42(8):3345-3355.
- [3] 徐彩瑶,濮励杰,宋明.沿海滩涂围垦对生态环境的影响研究进展[J]. *生态学报*, 2018, 38(3):1148-1162. XU C Y, PU L J, ZHU M. Effect of reclamation activity on coastal ecological environment: progress and perspectives[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(3):1148-1162.
- [4] 顾安乐,柏亚罗.水稻用农药市场概况、产品开发及重点品种(II)[J]. *现代农药*, 2018, 17(6):1-5. GU A L, BAI Y L. The market profile, product development and key products of the rice pesticide(II)[J]. *Modern Agrochemicals*, 2018, 17(6):1-5.
- [5] HABERKON N, APARICIO V C, BUSCHIAZZO D E, et al. Glyphosate and AMPA concentrations in the respirable dust emitted experimentally by soil aggregates, shortly after herbicide application[J]. *Geoderma*, 2020, 369:114334.
- [6] OKADA E, ALLINSON M, BARRAL M P, et al. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) are commonly found in urban streams and wetlands of Melbourne, Australia[J]. *Water Research*, 2020, 168:115139.

- [7] 刘寒冰,王冬琦,薛南冬,等. 土壤中毒死蜱及主要代谢产物的降解与生态风险[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(10): 2446-2454. LIU H B, WANG D Q, XUE N D, et al. Degradation characteristics and ecological risk of chlorpyrifos and results of its degradation in dryland soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(10): 2446-2454.
- [8] FARHAN M, AHAMD M, KANWAL A, et al. Biodegradation of chlorpyrifos using isolates from contaminated agricultural soil, its kinetic studies[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 1-14.
- [9] TARIQ M I, AFZAL S, HUSSAIN I, et al. Pesticides exposure in Pakistan: a review[J]. *Environment International*, 2007, 33(8): 1107-1122.
- [10] 何华,杨小春,张娇. 滴灌条件下毒死蜱在土层中迁移转化规律及其对土壤微生物特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(6): 1296-1306. HE H, YANG X C, ZHANG J. Migration and transformation of chlorpyrifos in soil and its influence on soil microbial characteristics under drip irrigation[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(6): 1296-1306.
- [11] ZHANG X, SHEN Y, YU X Y, et al. Dissipation of chlorpyrifos and residue analysis in rice, soil and water under paddy field conditions [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 78(2): 276-280.
- [12] 吴静,陈岩岩,叶项宇,等. 除草剂草甘膦对板栗根际土壤微生物多样性的影响[J]. 经济林研究, 2019, 37(3): 161-167. WU J, CHEN Y Y, YE X Y, et al. Effects of herbicide glyphosate on microbial diversity in *Castanea mollissima* rhizosphere soil[J]. *Nonwood Forest Research*, 2019, 37(3): 161-167.
- [13] 陈强,阎希柱,王松,等. 福建三沙湾滩涂表层沉积物污染物特征及生态风险评价[J]. 海洋湖沼通报, 2014, 2: 37-44. CHEN Q, YAN X Z, WANG S, et al. Characteristics and ecological risk assessment of pollutants in the intertidal surface sediments of Sansha Bay, Fujian[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2014, 2: 37-44.
- [14] 林春英,李希来,张玉欣,等. 黄河源区高寒沼泽湿地土壤微生物群落结构对不同退化的响应[J]. 环境科学, 2021, 42(8): 3971-3984. LIN C Y, LI X L, ZHANG Y X, et al. Responses of different degradation stages of alpine wetland on soil microbial community in the Yellow River Source Zone[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(8): 3971-3984.
- [15] 梁文举,董元华,李英滨,等. 土壤健康的生物学表征与调控[J]. 应用生态学报, 2021, 32(2): 719-728. LIANG W J, DONG Y H, LI Y B, et al. Biological characterization and regulation of soil health[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021, 32(2): 719-728.
- [16] ZHOU Z H, WANG C K, LUO Y Q. Meta-analysis of the impacts of global change factors on soil microbial diversity and functionality[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3072.
- [17] 杨永华,姚健,华晓梅. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 23-25. YANG Y H, YAO J, HUA X M. Effect of pesticide pollution against functional microbial diversity in soil[J]. *Journal of Microbiology*, 2000, 20(2): 23-25.
- [18] JACOBSEN C S, HJELMSO M H. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27: 15-20.
- [19] WEI H, PENG C H, YANG B, et al. Contrasting soil bacterial community, diversity, and function in two forests in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1693.
- [20] WIETZ M, HALL M R, HOJ L. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(4): 266-277.
- [21] LV X F, YU J B, FU Y Q, et al. A meta-analysis of the bacterial and archaeal diversity observed in wetland soils[J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 437684.
- [22] COTTRELL M T, KIRCHMAN D L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1692-1697.
- [23] WRIGHTON K C, AGBO P, WARNECKE F, et al. A novel ecological role of the Firmicutes identified in thermophilic microbial fuel cells [J]. *The ISME Journal*, 2008, 2(11): 1146-1156.
- [24] 刘坤和,薛玉琴,竹兰萍,等. 嘉陵江滨岸带不同土地利用类型对土壤细菌群落多样性的影响[J]. 环境科学, 2022, 43(3): 1620-1629. LIU K H, XUE Y Q, ZHU L P, et al. Effect of different land use types on the diversity of soil bacterial community in the coastal zone of Jialing River[J]. *Environmental Science*, 2022, 43(3): 1620-1629.
- [25] LIANG Y T, XIAO X, NUCCIO E E, et al. Differentiation strategies of soil rare and abundant microbial taxa in response to changing climatic regimes[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22: 1327-1340.
- [26] 刘晓华,魏天兴. 高通量测序分析黄土高原退耕还林区土壤细菌群落特征[J]. 环境科学, 2021, 42(9): 4489-4499. LIU X H, WEI T X. High-throughput sequencing analysis of soil bacterial community in the grain for green project areas of the Loess Plateau[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(9): 4489-4499.
- [27] 马欣,罗珠珠,张耀全,等. 黄土高原雨养区不同种植年限紫花苜蓿土壤细菌群落特征与生态功能预测[J]. 草业学报, 2021, 30(3): 54-67. MA X, LUO Z Z, ZHANG Y Q, et al. Distribution characteristics and ecological function predictions of soil bacterial communities in rainfed alfalfa fields on the Loess Plateau[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(3): 54-67.
- [28] RAHMAN M S, QUADIR Q F, RAHMAN A, et al. Screening and characterization of phosphorus solubilizing bacteria and their effect on rice seedlings[J]. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries*, 2015, 1(1): 27-35.
- [29] 闫冰,付嘉琦,夏嵩,等. 厌氧氨氧化启动过程细菌群落多样性及PICRUSt2功能预测分析[J]. 环境科学, 2021, 42(8): 3875-3885. YAN B, FU J Q, XIA S, et al. Diversity and PICRUSt2-based predicted functional analysis of bacterial communities during the start-up of ANAMMOX[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(8): 3875-3885.