

DOI: 10.5846/stxb202009062313

李大乐, 陈建文, 张红, 李君剑. Pb 和 Cd 对森林土壤细菌功能多样性及群落结构的影响. 生态学报, 2021, 41(21): 8472-8483.

Li D L, Chen J W, Zhang H, Li J J. Effects of Pb and Cd on forest soil bacterial functional diversity and community structure. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(21): 8472-8483.

Pb 和 Cd 对森林土壤细菌功能多样性及群落结构的影响

李大乐, 陈建文, 张红, 李君剑*

山西大学黄土高原研究所, 太原 030006

摘要: 重金属的毒性系数(The Toxic Factor, TF)是评价重金属潜在生态风险指数(potential ecological risk index, RI)的关键参数。为了探究基于 Hakanson 提出的 TF 值是否适用于重金属对土壤微生物的生态风险评估,以 TF 值为 5 和 30 的铅(Pb)和镉(Cd)构建土壤微宇宙试验,构建不同的 RI 水平(100、200 和 400),通过 Biolog-ECO 板和高通量测序技术分析了 Pb 和 Cd 分别对细菌功能多样性及群落结构的影响。结果表明,对照处理(CK)的细菌丰度、功能多样性(Shannon 指数, Simpson 指数和 McIntosh 指数)和基因多样性(ACE 和 Chao1 指数)均大于 Pb、Cd 污染的土壤,随着 RI 水平的升高, Pb 和 Cd 污染土壤中细菌的丰度、功能多样性(Shannon 指数和 McIntosh 指数)和基因多样性(Chao1 指数和 ACE 指数)呈下降趋势。相同 RI 水平下, Pb 污染土壤中细菌群落的丰度、平均颜色变化率(AWCD)、功能多样性指数、OTUs 数和基因多样性指数均显著大于 Cd 污染($P < 0.05$); 6 大类碳源利用率及主成分(PCA)分析表明, Pb 污染土壤中细菌对糖类和羧酸的利用率均显著大于 Cd 污染($P < 0.05$),在不同 RI 水平和重金属比例下,碳源利用模式而有所不同。同一 RI 水平下,相对于 Pb 污染, Cd 污染土壤中变形菌门的相对丰度较为丰富,而绿弯菌门的相对丰度稀少; Pb 和 Cd 污染土壤中慢生根瘤菌属、鞘脂单胞菌属、链霉菌属和 *norank_f__Roseiflexaceae* 等不同属细菌相对丰度表现出差异性。上述结果表明 Hakanson 提出的 TF 值并不适用于评估重金属 Pb 和 Cd 对土壤微生物的潜在生态风险。

关键词: 潜在生态风险评价; 毒性系数; Pb 污染; Cd 污染; 细菌功能多样性; 细菌群落结构

Effects of Pb and Cd on forest soil bacterial functional diversity and community structure

LI Dale, CHEN Jianwen, ZHANG Hong, LI Junjian*

Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: The toxic factor (TF) is a key parameter commonly used to evaluate the potential ecological risk index (RI) of heavy metals. It is still unclear whether it is suitable to assess the risk on soil microorganisms by heavy metals. Here, we established soil microcosms with a gradient of RI levels (100, 200 and 400) by different combinations of lead (Pb) and cadmium (Cd) concentrations based on the TF values of 5 and 30 for Pb and Cd, respectively. Biolog-ECO microplate and high-throughput sequencing technologies were used to analyze soil bacterial functional diversity and community structure, respectively. The results showed that the abundance, functional diversity (Shannon index, Simpson index and McIntosh index), and gene diversity (Chao1 index and ACE index) of bacterial community in control soil were higher than those in the three risk levels. The bacterial abundance, functional diversity index (Shannon index and McIntosh index) and gene diversity index (Chao1 index and ACE index) significantly decreased with the increasing RI levels. At the same RI level,

基金项目: 山西省重点研发计划(201903D321071); 国家自然科学基金项目(41771548); 山西省 1331 工程土壤修复学科群项目(20181401)

收稿日期: 2020-09-06; 网络出版日期: 2021-07-05

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lijunjian@sxu.edu.cn

the abundance, average well color development, functional diversity index, OTUs (Operational taxonomic units) numbers and gene diversity index (Chao1 index and ACE index) of bacterial community in Pb contaminated soil were significantly higher than those in Cd contaminated soil ($P < 0.05$). However, the bacterial Simpson indices in Pb contaminated soil showed no significant differences with ones in Cd contaminated soil ($P > 0.05$) at the same level. The utilization rate of carbohydrate and carboxylic acid compounds by bacteria in Pb contaminated soil were significantly higher than those in Cd contaminated soil at the same *RI* level. The principal component analysis (PCA) showed that the carbon source utilization efficiencies significantly correlated with the *RI* levels, and the efficiencies were significantly different between Pb and Cd contaminated soils at the same level. Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria and Chloroflexi were dominant in all treatments. The bacterial community composition varied under different *RI* levels. At the same level, we found the relative abundance of Proteobacteria were higher in Pb contaminated soils than in Cd contaminated soils, while the relative abundance of Chloroflexi were higher in Cd contaminated soil. There were also significant differences between the relative abundance of *Brachyryhizobium*, *Sphingomonas*, *Streptomyces* and *norank_f__Roseiflexaceae*, respectively, in Pb and Cd contaminated soil. Our results indicated that the TF values proposed by Hakanson should be adjusted during the process of evaluating the potential ecological risks of Pb and Cd to soil microorganisms. This paper underlied a new exploration to mediate the TF values.

Key Words: potential ecological risk index; the toxic factor; lead contamination; cadmium contamination; bacterial functional diversity; bacterial community structure

在 2014 年的全国土壤污染调查报告中显示,重金属 Cd、Pb 严重超标^[1]。Cd 以移动性大、毒性高、污染面积大被称为“五毒之首”,并且被国际癌症研究机构列为第一类致癌物^[2]。Pb 可通过空气、水、土壤和食物等多种途径进入人体,严重影响人体的中枢神经系统、肾脏和血压^[3]。为了评估 Pb、Cd 对生物的生态风险,必须建立一套生态有效的指标体系,从而准确量化重金属在环境污染治理中的毒性^[4]。瑞典科学家 Hakanson 提出的潜在生态危害指数法(The Potential Ecological Rick Index, *RI*)^[5]是目前最常用的评价重金属污染程度的方法之一,它可以用来表征生态系统所面临的由多种重金属引起的整体生态风险。因此,被广泛应用在生物毒理学、环境化学和生态学等多个研究领域^[6]。

毒性系数(The Toxic Factor, TF)作为 *RI* 中的关键参数,是 Hakanson 利用工业化前火成岩、土壤、淡水和陆生动植物中重金属的浓度所建立。但由于微生物中重金属浓度难以获取,Hakanson 并没有将其考虑其中。微生物作为土壤的重要组成部分,在分解有机质、养分循环和改变养分对植物的可利用性方面发挥着至关重要的作用^[7]。许多研究表明土壤中 Cd 和 Pb 含量达到一定浓度时,会导致微生物群落的变异性增大,降低群落稳定性^[8-9]。Schneider 等^[10]研究结果表明随着土壤 Pb 浓度升高疣微菌门的丰度降低,Li 等^[11]研究结果表明硫杆菌属、Bellilinea 和 Gp16 与土壤 Cd 含量呈显著正相关,而 Longilinea、Gp2 和 Gp4 呈显著负相关。并且在 Pb 和 Cd 复合污染下细菌丰富度和多样性均显著低于未污染土壤^[12]。因此,探究 Pb、Cd 的 TF 值是否适用于评估重金属对微生物的生态风险具有重要的意义。

本研究在相同生态风险水平下设计 Pb 污染和 Cd 污染,构建微宇宙实验,利用 Biolog-ECO 板和高通量测序技术分析 Pb 和 Cd 对微生物功能多样性和群落结构的影响,对比两者之间的差异性,探究 Pb 和 Cd 的 TF 值是否适用于评估重金属污染微生物的潜在生态风险,为重金属生态风险评价提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集及理化性质的测定

土壤样品采集地位于山西省天龙山自然保护区的一处油松林(37°42'N, 112°27'E),清除表面覆盖物,采集 0—10 cm 处表层土壤,类型为褐土。土壤去除根系、枯落物,过 2 mm 筛后分为两份,一份用于微宇宙实验,

一份自然风干后用于理化性质的测定。土壤总氮(TN)、总碳(TC)和总硫(TS)由元素分析仪(vario macro cube, elementar, Germany)测定,采用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, Thermo Elemental, X7 系列)测定砷(As)、镉(Cd)、铬(Cr)、铜(Cu)、镍(Ni)、铅(Pb)和锌(Zn)的浓度(表 1)。

表 1 土壤理化性质

Table 1 Soil Physicochemical Properties

TN/ (g/kg)	TC/ (g/kg)	TS/ (g/kg)	As/ (mg/kg)	Cd/ (mg/kg)	Cr/ (mg/kg)	Cu/ (mg/kg)	Ni/ (mg/kg)	Pb/ (mg/kg)	Zn/ (mg/kg)
79.43	14.47	0.32	26.11	0.07	102.79	42.26	36.79	28.81	97.74

TN:总氮 Total Nitrogen;TC:总碳 Total Carbon;TS:总硫 Total Sulphur

1.2 潜在生态危害指数法(RI)

潜在生态危害指数法(RI)的计算公式:

$$RI = \sum_i^n E_r^i = \sum_i^n \left(T_r^i \times \frac{c_D^i}{c_R^i} \right)$$

式中, c_D^i 和 c_R^i 分别表示重金属 i 在测定样品中的浓度及其背景参考值(mg/kg)。 T_r^i 表示重金属 i 的毒性系数,反映重金属的毒性强度,根据 Hakanson(1980)^[5] 估算,各重金属的毒性系数分别为 Zn=1<Cr=2<Cu=Pb=Ni=5<As=10<Cd=30。 E_r^i 表示重金属 i 的潜在生态风险系数。潜在生态危害指数(RI)描述某一点多个污染物潜在生态危害系数的综合值可分为 4 个等级^[13],分别为轻微($RI < 150$)、中等($150 \leq RI < 300$)、强($300 \leq RI < 600$)和很强($RI \geq 600$)。

1.3 微宇宙实验

微宇宙实验的建立:称取相当于 40 g 干重的土壤置于 150 mL 的培养杯中,以原始土壤中的重金属含量为背景值,根据上述的潜在生态危害指数(RI),通过向培养杯中添加不同浓度的 Pb(CH₃COO)₂和 CdCl₂ 获得强(H, RI=400)、中等(M, RI=200)和轻微(L, RI=100)3 种生态风险水平,原始土壤作为空白对照(CK),分别记作 H-Pb、H-Cd、M-Pb、M-Cd、L-Pb、L-Cd 和 CK,各 3 个重复。土壤样品中 Pb 和 Cd 的含量及生态风险如表 2 所示,由于 Pb 和 Cd 的毒性系数分别为 5 和 30,所以 CK 的 RI 水平为 35。调节土壤样品的充水孔隙度(WFPS)为 60%,置于恒温培养箱中 25℃ 黑暗条件下培养,每 2 d 打开一次保证其有氧条件,45 d 后破坏性取样进行后续分析。

表 2 微宇宙培养土壤处理

Table 2 Treatments in the soil microcosm

RI 水平 RI level	样品 Simple	生态风险系数 The toxic factor	Pb/Cd 含量/(mg/kg) The content of Pb/Cd
CK	CK	Pb(5)/Cd(30)	28.81/0.07
RI=100	L-Pb	Pb(70)/Cd(30)	403.34/0.07
	L-Cd	Pb(5)/Cd(95)	28.81/0.21
RI=200	M-Pb	Pb(170)/Cd(30)	979.54/0.07
	M-Cd	Pb(5)/Cd(195)	28.81/0.44
RI=400	H-Pb	Pb(370)/Cd(30)	2131.94/0.07
	H-Cd	Pb(5)/Cd(395)	28.81/0.88

RI:潜在生态风险指数 Potential ecological risk index;CK:空白对照 Control check;L:轻微生态风险水平 Low ecological risk level;M:中等生态风险水平 Moderate ecological risk level;H:强生态风险水平 Hight ecological risk level;Pb:Pb 处理 Lead treatment;Cd:Cd 处理 Cadmium treatment

1.4 土壤微生物功能多样性的测定

利用 Biolog-ECO 板对微生物群落功能多样性进行分析。称取相当于 5 g 干重的土壤置于三角瓶中,加入 45 mL 无菌 0.9% NaCl 溶液,振荡 30 min(转速 200 r/min)后,静置 30 min 后吸取土壤样品上清液并稀释到

0.1%,再用 8 通道加样器将稀释液接种到 Biolog-ECO 生态测试板上,接种量为 150 μL ,每样 1 板,每板 3 个重复。将接种好的测试板加盖,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下连续培养 10 d,每隔 24 h 用 Infinite 200 PRO (TECAN, Sweden) 在 590 nm 下测定其吸光度。土壤细菌群落利用碳源的整体能力用平均颜色变化率(Average well color development, AWCD)表示,选择细菌群落生长平台初期的 AWCD 值进行碳源利用功能多样性分析,土壤细菌群落功能多样性指数分析采用 Shannon 指数(H)、Simpson 指数(D)和 McIntosh 指数(U),AWCD 值和指数的计算公式详见文献^[14]。

Biolog-ECO 平板技术测定的群落功能多样性指数是利用不同种类的微生物对碳源的利用能力不同而产生的不同碳源利用模式来表征微生物群落差异。其中,Shannon 指数(H)可以表征土壤中细菌群落丰富度,McIntosh 指数(U)则可反映土壤中细菌群落均匀度,Simpson 指数(D)可以评估土壤中细菌群落优势度(指数越高,微生物多样性越低),以上 3 种指数表征细菌群落的功能多样性。

1.5 DNA 提取、定量 PCR 及高通量测序

使用 Ultra-cleanTM 土壤 DNA 分离试剂盒(MoBio Laboratory, USA)从 0.25 g 土壤中提取各生态风险水平下土壤的 DNA。通过定量 PCR 测定土壤细菌丰度,引物为 338F(5'-ACTCCTACGAGGAGCA-3')和 534R(5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'),反应体系为 20 μL :7.6 μL ddH₂O,10 μL SYBR[®] Premix Ex TaqTM II,2.0 μL 样本 DNA,条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,35 个循环。

采用 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTW-TCTAAT-3')引物对 16S rRNA 基因的 V3—V4 可变区域进行 PCR 扩增。扩增体系为 20 μL ,扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,循环条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,29 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。扩增产物纯化并利用 NanoDrop 2000 测定 DNA 纯度和浓度。在 Illumina 公司的 MiSeq PE300 平台上进行测序。

1.6 生信分析

首先使用 fastp 软件对原始测序序列进行质控,过滤去除低质量序列。使用 Uparse 软件根据 97%的相似度对序列进行 OTUs 聚类,在聚类过程中去除嵌合体。在 Silva 16S rRNA 数据库(v138)中对基因序列进行比对,采用 RDP classifier 方法(置信阈值为 0.7)对每条序列进行物种分类注释,得到的 OUTs 数据按最小样本序列数抽平进行后续统计分析。通过计算获得每个土壤样品中细菌群落的基因多样性指数(ACE、Chao1、Shannon)与上述的功能多样性指数不同,此处的多样性指数是指基于分类学的多样性指标(taxonomic diversity),这些指标在一定程度上反映了群落或生态系统的某些特性,其中,Chao1 和 ACE 指数反应细菌群落的丰富度,指数越大,群落的丰富度越高;Shannon 指数综合反应细菌群落的丰富度和均匀度,指数越大,群落的多样性越高。高通量测序和生信分析在美吉生物医药科技有限公司(上海)完成。

1.7 数据分析

采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较相同生态风险水平下土壤的细菌丰度、孔平均颜色变化率(AWCD)、碳源代谢强度、功能多样性指数和基因多样性指数的差异。采用主成分分析(PCA)对土壤细菌群落 31 种碳源的 AWCD 值进行分析。数据通过 Excel 2013 和 SPSS 24.0 进行处理和分析,作图采用 Excel 2018、R 3.5.1 及 Canoco 5 等完成。

2 结果与分析

2.1 土壤细菌丰度的差异

本研究采用定量 PCR 来定量所有土壤样品中细菌群落的 DNA 拷贝数,用其表征土壤样品中的细菌丰度(图 1)。随着 RI 水平的升高,细菌丰度呈下降的趋势,CK 为最大值(3.79×10^9)拷贝数/g 干土。在相同的 RI 水平下,Pb 污染土壤的细菌丰度均显著大于 Cd 污染($P < 0.05$)。

2.2 土壤细菌碳源利用的差异性

AWCD 值可以判断土壤中细菌群落对碳源的利用能力,是细菌功能性的一项重要指标。随时间的变化

不同处理土壤样品的 AWCD 值逐渐增加,在第 168 h 时各样品的 AWCD 值基本达到平台期,因此采用第 168 h 的 AWCD 值进行分析(图 2)。3 种生态风险水平下土壤样品的 AWCD 值均小于 CK,且随着 RI 水平的升高而降低(图 3)。表明重金属污染会对细菌群落的碳源利用率造成不利的影响。在相同 RI 水平下,不同重金属处理之间的 AWCD 值也表现出显著差异,无论是轻微、中等还是强风险水平下,Pb 污染土壤样品的 AWCD 值均显著大于 Cd 污染($P<0.05$)(图 3)。

功能多样性指数可以反映土壤细菌群落利用碳源类型的差异性。与 AWCD 值相似,在所有处理中,CK 的功能多样性指数均为最大(图 4),表明 CK 土壤细菌种类最多、分布较均匀且对碳源利用程度最高。对比相同 RI 水平下的 Pb 污染和 Cd 污染我们发现,功能多样性指数 Shannon 指数和 McIntash 指数均存在显著差异($P<0.05$),Pb 处理显著高于 Cd 处理($P<0.05$)。而对于 Simpson 指数则无显著差异,表明相同 RI 水平下不同重金属处理对土壤细菌群落中的优势种影响不大。

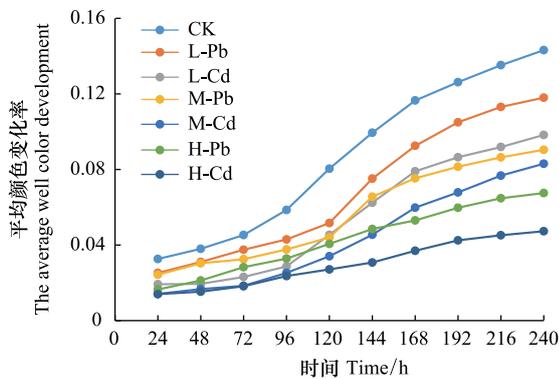


图 2 不同处理下细菌培养过程中平均颜色变化率(AWCD)

Fig.2 AWCD changes of bacterial communities in different treatments

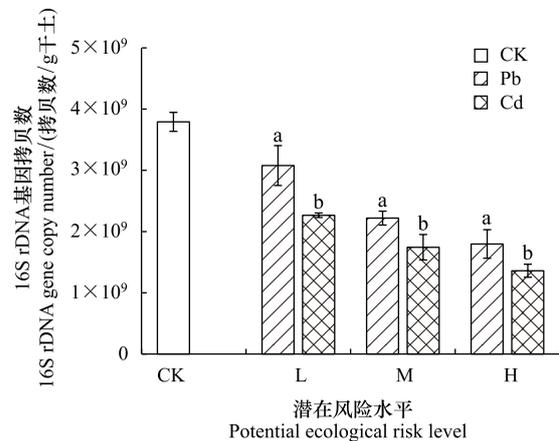


图 1 不同处理下的细菌丰度

Fig.1 The bacterial abundance in different treatment

不同的小写字母表示有显著差异($P<0.05$);L:轻微生态风险水平 Low ecological risk level;M:中等生态风险水平 Moderate ecological risk level;H:强生态风险水平 High ecological risk level

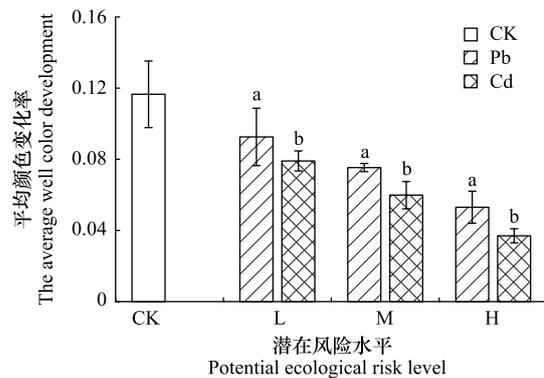


图 3 168h 平均颜色变化率(AWCD)

Fig.3 Average color change rate (AWCD) at 168h

为了更全面的了解不同处理之间细菌对碳源利用率的差异性,将 31 种碳源分为 6 类(糖类、羧酸、氨基酸、酯类、醇类和胺类)进行分析比较(图 5)。所有土壤样品对糖类和羧酸的利用率较高。与 CK 相比,重金属污染土壤样品对 6 类碳源的利用率均小于 CK。在 3 种相同 RI 水平下,Pb 污染对糖类和羧酸的利用强度均显著大于 Cd 污染($P<0.05$),而对其余 4 类碳源的利用强度无明显差异。

2.3 土壤细菌群落代谢功能分析

应用主成分分析,在 31 个碳源中共提取 7 个主成分因子(表 3),累积贡献率达到 92.27%,从中选取累积贡献率达到 49.40%的前两个主成分 PC1 和 PC2(特征根分别为 9.20 和 6.11)来分析细菌群落功能的综合差异和相似状况。如图 6 所示,不同处理在 PC 轴出现了明显的分异,在相同 RI 水平下 Pb 污染和 Cd 污染各为一类,可见 PC1 和 PC2 能区分不同处理细菌微生物的群落特征。

考虑到各个主成分反应的变异问题,本研究进一步计算了 PC1 与 PC2 的综合得分(表 4)。CK 与其余样

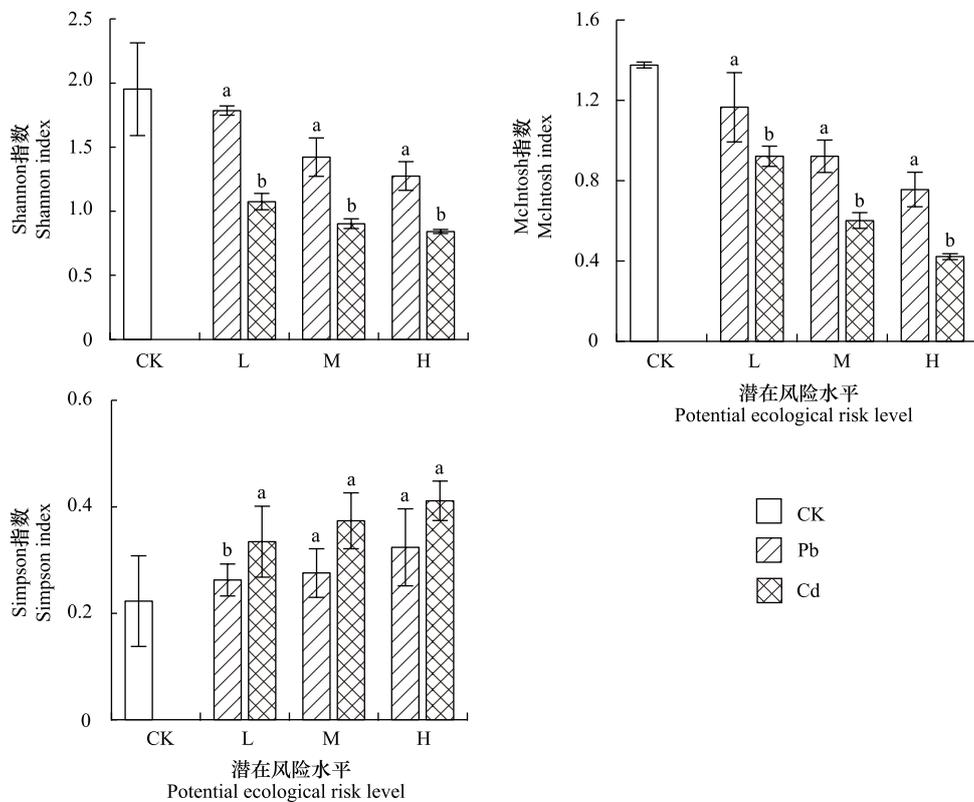


图 4 不同处理下细菌的功能多样性指数

Fig.4 Functional diversity indices of bacterial communities in different treatments

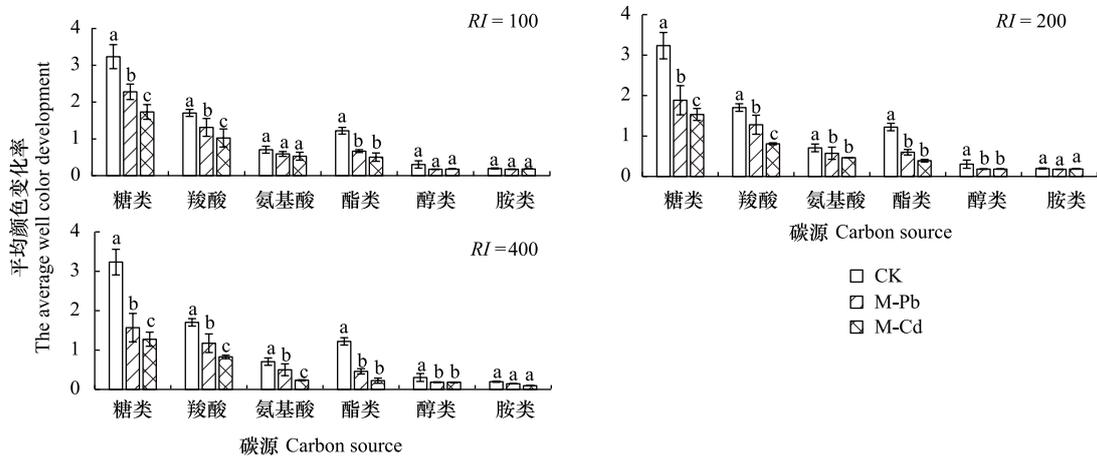


图 5 不同处理下细菌群落的碳源代谢强度

Fig.5 The carbon utilization intensity of bacterial communities among different treatments

RI: 潜在生态风险指数

品在 PC1 和 PC2 上得分系数均表现出显著差异 ($P < 0.05$)。在相同 RI 水平下, Pb 污染和 Cd 污染在 PC1 轴上得分系数均表现出显著差异 ($P < 0.05$)。在 PC2 轴上, 只有强危害水平下的 Pb 污染和 Cd 污染之间表现出差异性 ($P < 0.05$)。从第一主成分和第二主成分的综合得分来看, 不同处理间均有显著性差异 ($P < 0.05$)。表明不同处理土壤样品中细菌群落具有不同的碳源利用模式。

表 3 主成分特征根

Table 3 Eigenvalues of principal components

主成分 Principal component(PC)	特征根 Eigenvalues	方差贡献率/% Percent of variance	累计贡献率/% Percent of total variance
PC1	9.20	29.69	29.69
PC2	6.11	19.71	49.40
PC3	4.32	13.95	63.34
PC4	3.14	10.15	73.49
PC5	2.77	8.93	82.42
PC6	1.71	5.51	87.93
PC7	1.33	4.30	92.23

表 4 不同处理下主成分得分系数

Table 4 Principal component scores in different treatments

样品 Simple	第一主成分 PC1	第二主成分 PC2	综合主成分 Comprehensive principal components
CK	5.1±0.37a	0.52±0.80b	3.04±0.17a
L-Pb	3.50±0.20b	0.18±0.02bc	2.01±0.18b
L-Cd	-3.59±0.32e	-0.91±0.07c	-2.39±0.26g
M-Pb	-2.24±0.64d	-1.46±0.29c	-1.89±0.25f
M-Cd	-0.41±0.01c	-1.63±0.53c	-1.27±0.23e
H-Pb	-1.99±0.21d	5.38±0.39a	1.32±0.29c
H-Cd	-0.15±0.17c	-4.02±0.51d	-1.01±0.16d

平均值±标准差($n=3$),不同的小写字母表示有显著差异($P<0.05$)

2.4 土壤细菌群落多样性及群落结构

对所有土壤样品的 16s rDNA V3—V4 可变区域测序,每个样品得到 29974 个序列,以 97% 相似度划分,得到 4308 个 OTUs,共 30 个门,85 个纲,230 个目,383 个科,641 个属和 1417 个种。

通过 Venn 图可以直观地表现不同土壤样品中 OTUs 数目组成的相似性及重叠情况(图 7)。在 $RI=100$ 时,OTUs 数量为 L-Pb (2527) > CK (2497) > L-Cd (1356); $RI=200$ 时,CK (2479) > M-Pb (2486) > M-Cd (1711); $RI=400$ 时,CK (2479) > H-Pb (1895) > H-Cd (1496)。除了在 $RI=100$ 时,L-Pb 的 OUTs 数量大于 CK,其他 RI 水平下 CK 的 OUTs 数均为最大,在所有 RI 水平下 Pb 污染的 OUTs 数量均大于 Cd 污染。同时,图 8 的基因多样性指数 ACE 指数和 Chan1 指数也验证了上述物种丰富度的排名,Pb 污染均显著大于 Cd 污染($P<0.05$)。而在物种多样性和均匀性上,由 Shannon 指数可以看出相同 RI 水平下 Pb 污染和 Cd 污染之间无显著差异。

从细菌群落结构来看,相同 RI 水平下的 Pb 污染和 Cd 污染之间也存在差异性。在门分类水平上,相对丰度大于 1% 的细菌门共有 11 个(图 9)。变形菌门(Proteobacteria)为主要菌门,在 7 组样品中占比均在 42% 以上。其他优势菌门分别为放线菌门(Actinobacteria, 12.96%—17.76%)、酸杆菌门(Acidobacteria, 8.49%—17.94%)和绿弯菌门(Chloroflexi, 2.14%—12.87%),大约占总菌数 81% 以上。在相同 RI 水平下,Pb 污染土壤样品中变形菌门的相对丰度均小于 Cd 污染,分别为 L-Pb (44.96%)、L-Cd (55.57%)、M-Pb (42.77%)、M-Cd

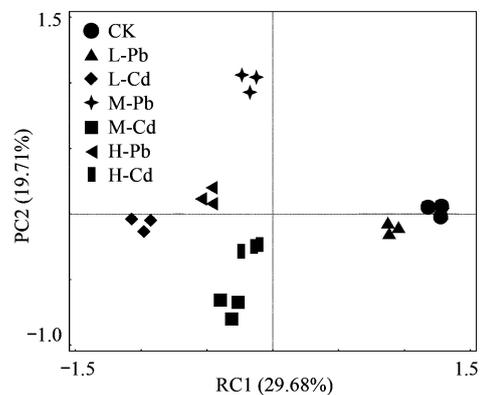


图 6 不同处理下细菌碳源利用特性的主成分分析(PCA)
Fig.6 Principal component analysis for carbon utilization of soil bacterial community among different treatments

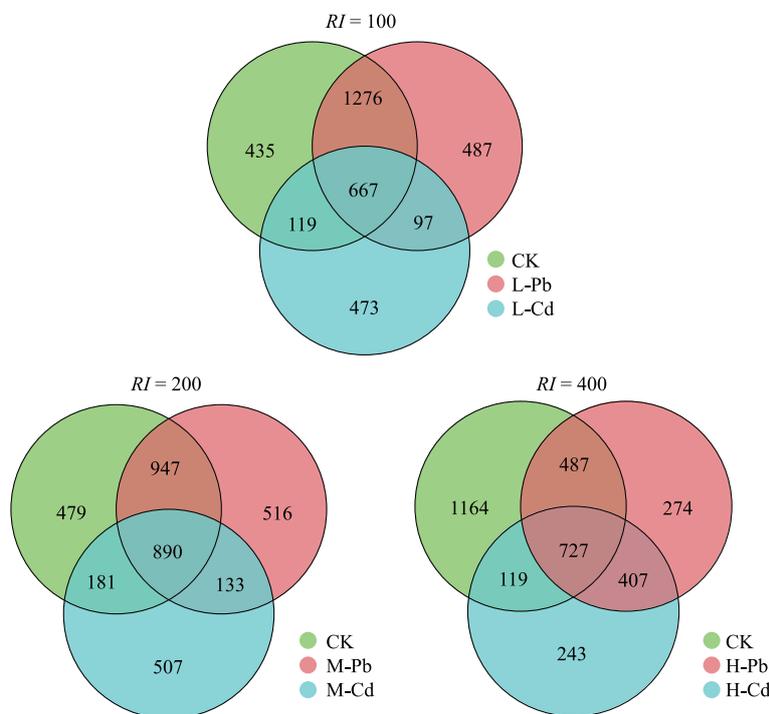


图 7 不同 RI 水平下不同处理 OTUs 的韦恩图

Fig.7 The Venn diagram of OTUs under different treatments at the different RI levels

(52.91%)、H-Pb(36.87%)和 H-Cd(51.29%)。而绿弯菌门的相对丰度则表现相反的趋势,Pb 污染均大于 Cd 污染,L-Pb 是 L-Cd 的 3.6 倍,M-Pb 是 M-Cd 的 4.8 倍,H-Pb 是 H-Cd 的 4.5 倍。

将相对丰度前 30 的属以热图的形式呈现,通过颜色的深浅将数据的大小直观表现出来(图 10)。变形菌门有 14 个属,酸杆菌门有 7 个属,放线菌门和绿弯菌门各有 3 个属,芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、Patensibacteria 和 Rokubacteria 各有 1 个属。在相同 RI 水平下,大部分属在 Pb 处理和 Cd 处理之间也具有不同的相对丰度,如慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和 *norank_f_Roseiflexaceae* 等。

3 讨论

细菌对重金属的胁迫响应有多种方式,如群落数量的减少、功能多样性的降低以及群落结构的改变等,这些细菌参数通常被用作重金属污染的指示^[15]。Pb、Cd 污染土壤样品中的细菌丰度均小于 CK(图 1),并且随着 RI 水平的升高,细菌丰度呈下降趋势。这表明 Pb、Cd 污染会降低土壤细菌丰度,污染程度越高对细菌丰度的影响越大,这与李勇等人^[8]的研究结果相似。在相同 RI 水平下,Cd 污染土壤中的细菌丰度显著小于 Pb 污染($P < 0.05$),表明 Cd 对细菌丰度的毒害作用大于 Pb。这可能是由于 Cd 对土壤胶体亲和力和力低,移动性很大^[16],重金属对细菌的可利用性大。而 Pb 在土壤中受各种物理、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^[17]。

AWCD 值是反映土壤微生物代谢活性的一个重要指标,AWCD 值越大,表明土壤微生物的活性越高,对碳源利用率越高^[18]。CK 的 AWCD 值和功能多样性指数均大于重金属 Pb、Cd 污染的土壤,表明土壤重金属污染会降低细菌的碳源利用率及功能多样性,Mkhini 等^[19]的研究结果也证实了这一点。CK 对 6 大类碳源的利用率均大于 Pb、Cd 污染的土壤样品,并且在糖类、羧酸和酯类的利用率上存在显著差异($P < 0.05$)。Gremion 等^[20]研究表明,重金属污染下的土壤微生物对氨基酸类、胺类以及氨基化合物碳源利用低。张涪平

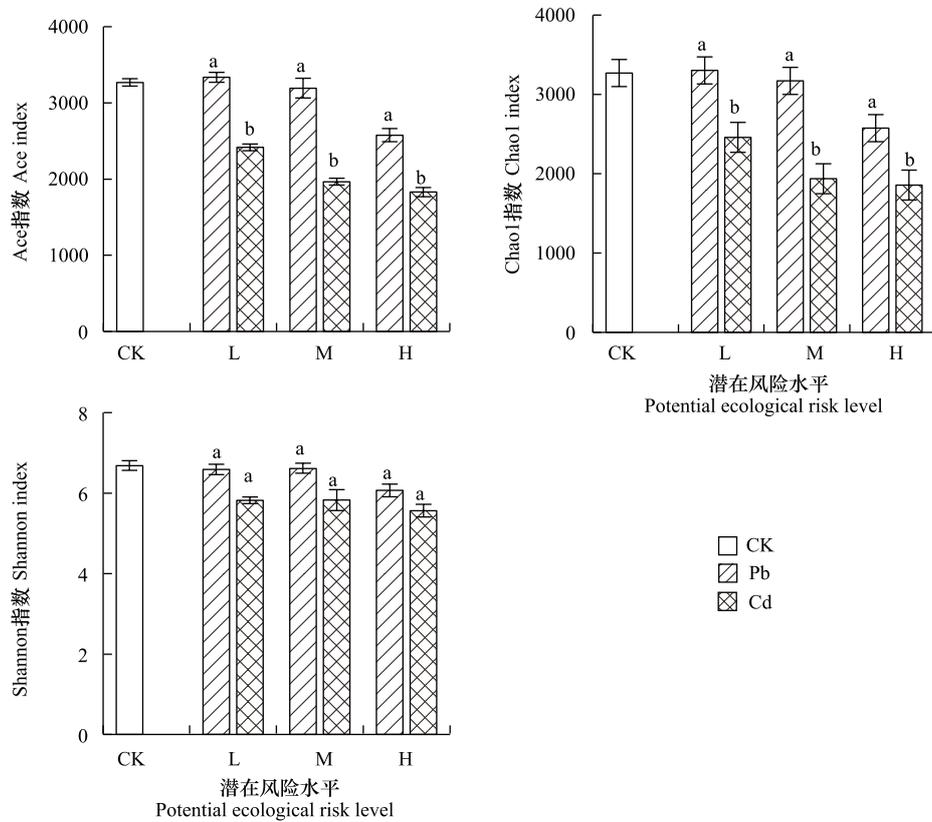


图 8 不同处理下细菌的基因多样性指数

Fig.8 The gene diversity index of bacteria in different treatments

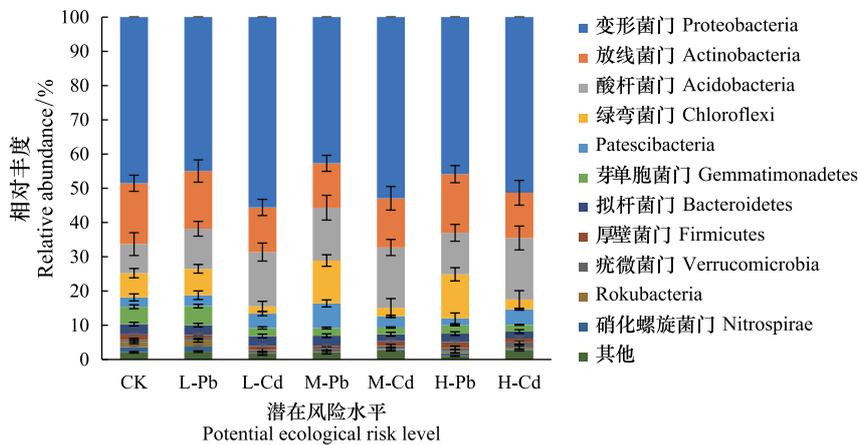


图 9 不同处理门水平土壤细菌群落的相对丰度

Fig.9 The relative abundance of soil bacterial communities at phylum level in different treatments

等^[21]研究也表明,与对照土壤相比,矿区土壤受重金属污染区的土壤酶活性、基础呼吸和代谢商均受到了一定程度的抑制。因此对比相同 *RI* 水平下 Pb 污染和 Cd 污染的 AWCD 值、Shannon 指数和 McIntosh 指数我们发现,Cd 污染均显著小于 Pb 污染($P < 0.05$),在糖类和羧酸的利用率上存在显著差异($P < 0.05$),并且主成分分析结果也表示,Pb 污染和 Cd 污染具有不同的碳源利用模式,这表明 Cd 对细菌功能多样性的胁迫作用大于 Pb。

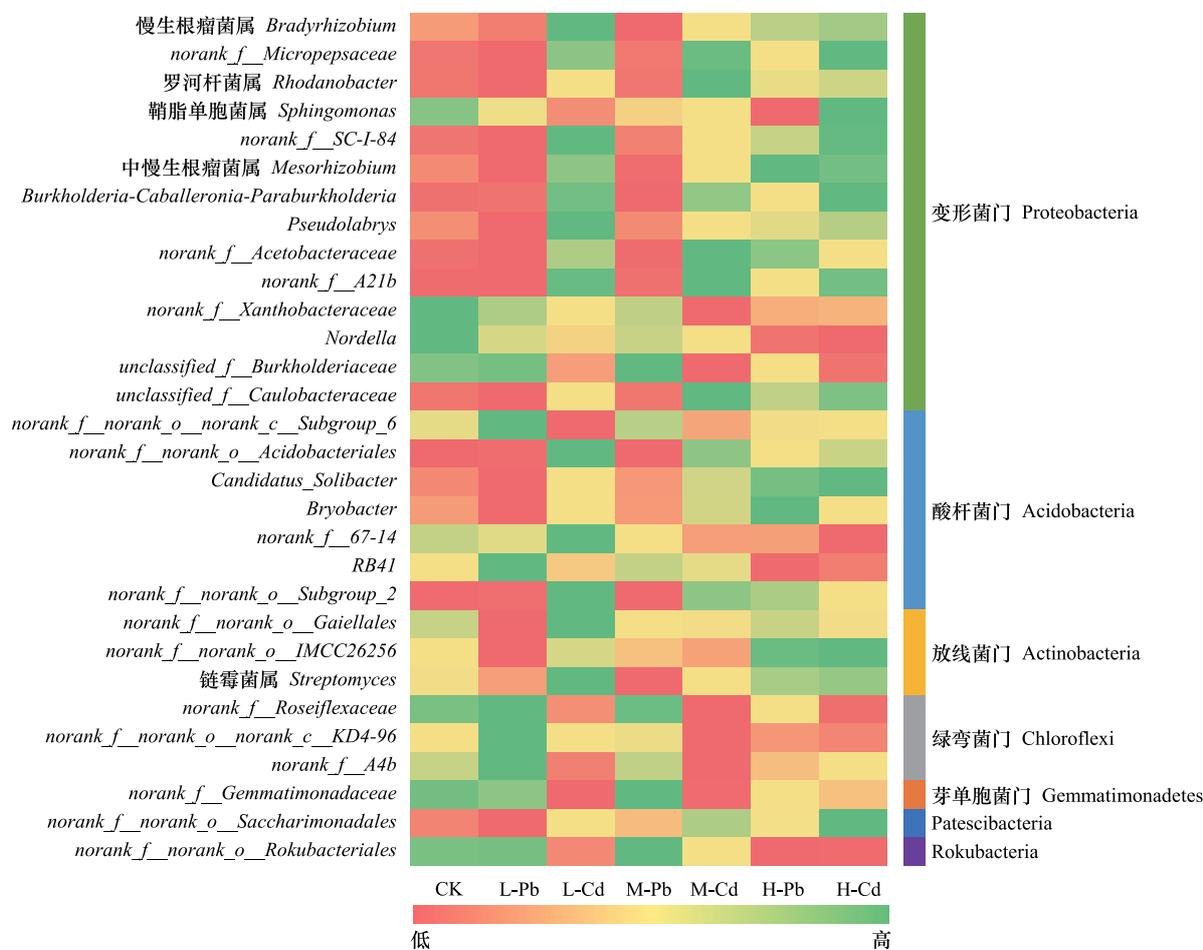


图 10 不同处理属水平土壤细菌群落的相对丰度

Fig.10 The relative abundance of soil bacterial communities at genus level in different treatments

土壤中重金属污染会导致微生物多样性的下降^[22]。除了 L-Pb, CK 的 OTUs 值均大于 Pb、Cd 处理的土壤, Chao1 指数和 ACE 指数随着 RI 水平呈下降的趋势, 说明重金属污染降低细菌多样性, 污染程度的越高对细菌多样性的影响越大。而 L-Pb 大于 CK 可能与中度干扰理论有关, Wakelin 等^[23] 研究表明微生物多样性最初随着重金属浓度的升高而增加, 直到达到临界值后多样性急剧下降, Jia 等^[24] 研究也得到相似的结果。相同 RI 水平下, Pb 污染的 OTUs 数和群落丰富度指数(ACE 指数和 Chao1 指数)均大于 Cd 污染, 而 Shannon 指数无显著差异($P < 0.05$), 功能多样性的 Simpson 指数也表现出相同结果, 这表明 Cd 污染对细菌多样性的影响大于 Pb 污染, 而对优势种的影响较小。这是由于重金属污染能降低原有群落的种间竞争关系, 具有耐受性的抗性菌种具有更好竞争力而迅速增长成为优势菌种^[25], 优势菌种可能对 Pb 和 Cd 具有相同的耐受性, 从而导致优势种无显著差异。重金属污染对微生物群落结构产生较显著的影响, 因此我们可以通过对比细菌的相对丰度分析 Pb、Cd 对细菌群落结构影响的大小。所有土壤样品中的优势菌门均为变形菌门、放线菌门、酸杆菌门和绿弯菌门, 这与大部分研究结果相似^[26-27]。相同 RI 水平下, Pb 污染土壤中变形菌门的相对丰度小于 Cd 污染, 而绿弯菌门表现出相反的趋势, 属水平上不同菌属也表现出差异性, 例如慢生根瘤菌属在 Pb 污染中相对丰度均大于 Cd 污染。相关研究表明变形菌门在重金属污染土壤中为最丰富菌门, 其相对丰度随重金属污染程度的升高而增加^[26], 属于变形菌门的慢生根瘤菌属也是在中度和重度重金属污染土壤中比较丰富^[28], 对比本研究结果说明相对于 Pb 污染, Cd 的污染程度更高。而绿弯菌门的差异可能是其对 Pb、Cd 耐受性的不同造成的, 安凤秋等^[29] 研究表明土壤中绿弯菌门的相对丰度与 Pb 浓度呈显著正相关, Feng 等^[30] 研

究表明 Cd 污染土壤中绿弯菌门的相对丰度较低。相同 *RI* 水平下细菌群落结构的变化,体现了 Pb 和 Cd 对不同细菌菌种的毒性作用不同。腾应等^[31]研究也表明在复合重金属污染的土壤中,Cd 对细菌群落结构的毒性影响较为明显,Pb 的影响最小。

本研究结果显示在相同 *RI* 水平下,Pb 污染与 Cd 污染之间的细菌丰度、功能多样性和群落组成结构存在明显差异,可见相对于 Cd,Pb 的 TF 值可能被高估。Pb 与 Cu 具有相同的 TF 值($Pb = Cu = 5$),而在 Chen 等^[32]研究中发现相同 *RI* 水平下,相对于 Cd,Cu 的 TF 值可能被低估。因此,在评价重金属对微生物的生态风险时,Pb 和 Cd 的 TF 值应当进行适当的调整。

4 结论

(1)随着 *RI* 水平的升高,Pb 污染和 Cd 污染土壤中细菌的丰度、功能多样性和群落多样性呈下降的趋势。

(2)相同 *RI* 水平下,Pb 污染土壤中细菌的丰度、AWCD 值、Shannon 指数、McIntosh 指数以及对糖类和羧酸的利用率均显著大于 Cd 污染($P < 0.05$),主成分分析也表明 Pb 污染和 Cd 污染具有不同的碳源利用模式。

(3)相同 *RI* 水平下,Pb 污染土壤中细菌的 OTUs 数、ACE 指数和 Chao1 指数均大于 Cd 污染,而两者之间的 Simpson 指数无显著差异($P < 0.05$)。Pb 污染土壤中变形菌门的相对丰度大于 Cd 污染,绿弯菌门则表现出相反的趋势,在属水平上各细菌的相对丰度也表现出差异性,如慢生根瘤菌属、鞘脂单胞菌属、链霉菌属和 *norank_f_Roseiflexaceae* 等。

(4)Hakanson 提出的 TF 值不适用于重金属对微生物的生态风险评价,因此为了更全面评估重金属的生态潜在风险,有必要深入研究重金属对土壤微生物毒性效应特征。

参考文献(References):

- [1] 陈能场, 郑煜基, 何晓峰, 李小飞, 张晓霞. 《全国土壤污染状况调查公报》探析. 农业环境科学学报, 2017, 36(9): 1689-1692.
- [2] Wang P, Chen H P, Kopittke P M, Zhao F J. Cadmium contamination in agricultural soils of China and the impact on food safety. Environmental Pollution, 2019, 249: 1038-1048.
- [3] Qin G W, Niu Z D, Yu J D, Li Z H, Ma J Y, Xiang P. Soil heavy metal pollution and food safety in China: effects, sources and removing technology. Chemosphere, 2021, 267: 129205.
- [4] Accolla C, Forbes V E. Temperature dependence of population responses to competition and metabolic stress: an agent-based model to inform ecological risk assessment in a changing climate. Science of the Total Environment, 2021, 763: 144096.
- [5] Hakanson L. An ecological risk index for aquatic pollution control. a sedimentological approach. Pergamon, 1980, 14(8): 975-1001.
- [6] Yakovlev E, Malov A, Druzhinin S, Zykova E, Malkov A, Bedrina D. Distribution of trace metals and an environmental risk assessment of the river sediments in the area of the Lomonosov diamond deposit (NW Russia). Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(28): 35392-35415.
- [7] Cavicchioli R, Ripple W J, Timmis K N, Azam F, Bakken L R, Baylis M, Behrenfeld M J, Boetius A, Boyd P W, Classen A T, Crowther T W, Danovaro R, Foreman C M, Huisman J, Hutchins D A, Jansson J K, Karl D M, Koskella B, Welch D B M, Martiny J B H, Moran M A, Orphan V J, Reay D S, Remais J V, Rich V I, Singh B K, Stein L Y, Stewart F J, Sullivan M B, van Oppen M J H, Weaver S C, Webb E A, Webster N S. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(9): 569-586.
- [8] 贾夏, 董岁明, 周春娟. Cd、低 Pb/Cd 下冬小麦幼苗根系分泌物酚酸、糖类及与根际土壤微生物活性的关系. 生态学报, 2012, 32(13): 4052-4061.
- [9] Kok K H, Karim M I A, Ariff A. Bioremoval of cadmium, lead and zinc using non-living biomass of *Aspergillus flavus*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2001, 4(7): 849-853.
- [10] Schneider A R, Gommeaux M, Duclercq J, Fanin N, Conreux A, Alahmad A, Lacoux J, Roger D, Spicher F, Ponthieu M, Cancès B, Morvan X, Marin B. Response of bacterial communities to Pb smelter pollution in contrasting soils. Science of the Total Environment, 2017, 605-606: 436-444.
- [11] Li X Q, Meng D L, Li J, Yin H Q, Liu H W, Liu X D, Cheng C, Xiao Y H, Liu Z H, Yan M L. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. Environmental Pollution, 2017, 231: 908-917.
- [12] Li S, Wu J L, Huo Y L, Zhao X, Xue L G. Profiling multiple heavy metal contamination and bacterial communities surrounding an iron tailing

- pond in Northwest China. *Science of the Total Environment*, 2021, 752: 141827.
- [13] 徐争启, 倪师军, 虞先国, 张成江. 潜在生态危害指数法评价中重金属毒性系数计算. *环境科学与技术*, 2008, 31(2): 112-115.
- [14] 王强, 戴九兰, 吴大千, 余悦, 申天琳, 王仁卿. 微生物生态研究中基于 BIOLOG 方法的数据分析. *生态学报*, 2010, 30(3): 817-823.
- [15] Pardo T, Clemente R, Epelde L, Garbisu C, Bernal M P. Evaluation of the phytostabilisation efficiency in a trace elements contaminated soil using soil health indicators. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 268: 68-76.
- [16] Alloway B J. *Heavy Metals in Soils*. New York: Springer, 2013.
- [17] 徐明岗, 吴曼, 武海雯, 张文菊. 土壤外源铅的稳定化特征及其对土壤性质的响应. *农业环境科学学报*, 2012, 31(9): 1702-1709.
- [18] Li C, Liu X, Meng M J, Zhai L, Zhang B, Jia Z H, Gu Z Y, Liu Q Q, Zhang Y L, Zhang J C. The use of Biolog Eco microplates to compare the effects of sulfuric and nitric acid rain on the metabolic functions of soil microbial communities in a subtropical plantation within the Yangtze River Delta region. *CATENA*, 2021, 198: 105039.
- [19] Mkhinini M, Boughattas I, Alphonse V, Livet A, Gustu-Muller S, Banni M, Bousserhine N. Heavy metal accumulation and changes in soil enzymes activities and bacterial functional diversity under long-term treated wastewater irrigation in East Central region of Tunisia (Monastir governorate). *Agricultural Water Management*, 2020, 235: 106150.
- [20] Gremion F, Chatzinotas A, Kaufmann K, Von Sigler W, Harms H. Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48(2): 273-283.
- [21] 张涪平, 曹凑贵, 李苹, 次仁央金, 高超, 通乐嘎, 李成芳. 藏中矿区重金属污染土壤的微生物活性变化. *生态学报*, 2010, 30(16): 4452-4459.
- [22] Hemmat-Jou M H, Safari-Sinegani A A, Mirzaie-Asl A, Tahmourespour A. Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology*, 2018, 27(9): 1281-1291.
- [23] Wakelin S A, Chu G X, Lardner R, Liang Y C, McLaughlin M. A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil processes. *Pedobiologia*, 2010, 53(2): 149-158.
- [24] Jia X, Zhang N J, Zhao Y H, Wang L, Zhang C Y, Li X D, Cao K M, Gao Y F. A consecutive 4-year elevated air temperature shaped soil bacterial community structure and metabolic functional groups in the rhizosphere of black locust seedlings exposed to lead pollution. *Science of the Total Environment*, 2020, 732: 139273.
- [25] Hu H W, Wang J T, Li J, Li J J, Ma Y B, Chen D L, He J Z. Field - based evidence for copper contamination induced changes of antibiotic resistance in agricultural soils. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11): 3896-3909.
- [26] Verma S, Bhatt P, Verma A, Mudila H, Prasher P, Rene E R. Microbial technologies for heavy metal remediation: effect of process conditions and current practices. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 2021: 1-23. DOI: 10.1007/s10098-021-02029-8.
- [27] Shar S, Reith F, Ball A S, Shahsavari E. Long-term impact of gold and platinum on microbial diversity in Australian soils. *Microbial Ecology*, 2021: 1-13. DOI: 10.1007/s00248-020-01663-x.
- [28] Navas M, Pérez-Esteban J, Torres M A, Hontoria C, Moliner A. Taxonomic and functional analysis of soil microbial communities in a mining site across a metal(loid) contamination gradient. *European Journal of Soil Science*, 2020: 1-16. DOI: 10.1111/ejss.12979.
- [29] 安凤秋, 吕家珑, 刁展, 李海红, 赵琪琪. 铅对壤土细菌群落组成的影响研究. *农业环境科学学报*, 2018, 37(2): 268-275.
- [30] Feng G, Xie T, Wang X, Bai J Y, Tang L, Zhao H, Wei W, Wang M L, Zhao Y. Metagenomic analysis of microbial community and function involved in Cd-contaminated soil. *BMC Microbiology*, 2018, 18(1): 11.
- [31] 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 李振高. 重金属复合污染下红壤微生物活性及其群落结构的变化. *土壤学报*, 2005, 42(5): 819-126828.
- [32] Chen J W, Zhang H, Li J J, Liu Y, Shi W, Hu H W. The toxic factor of copper should be adjusted during the ecological risk assessment for soil bacterial community. *Ecological Indicators*, 2020, 111: 106072.