

DOI: 10.5846/stxb202010132612

王洪涛, 丁晶, 邵元虎, 张卫信, 傅声雷. 4 种蚯蚓肠道微生物对砷毒性的响应差异研究. 生态学报, 2022, 42(1): 379-389.

Wang H T, Ding J, Shao Y H, Zhang W X, Fu S L. Comparative study on the responses of gut microbiota of four species of earthworms to arsenic toxicity. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(1): 379-389.

4 种蚯蚓肠道微生物对砷毒性的响应差异研究

王洪涛¹, 丁晶², 邵元虎¹, 张卫信¹, 傅声雷^{1,*}

¹ 黄河中下游数字地理技术教育部重点实验室; 河南大学地理与环境学院, 开封 475004

² 烟台大学环境与材料工程学院, 烟台 264005

摘要: 蚯蚓肠道是微生物多样性的一个潜在存储库。砷对蚯蚓肠道微生物群落的影响已被证实, 但砷在不同蚯蚓肠道菌群中生物转化的差异仍不清楚。为了进一步阐述土壤中广泛存在的低浓度砷(浓度为 5, 15, 25 mg/kg) 对不同种类蚯蚓肠道微生物影响的差异, 将 4 种典型蚯蚓暴露于砷污染土壤后, 测定其肠道微生物组成变化, 并分析砷对不同蚯蚓肠道内砷富集、形态和砷生物转化基因的影响。结果显示, 所有蚯蚓组织内均存在明显的砷富集, 其富集系数由高到低依次为: 安德爱胜蚓(1.93) > 加州腔蚓(0.80) > 通俗腔蚓(0.78) > 湖北远盲蚓(0.52), 蚯蚓组织和肠道内砷形态主要以无机砷为主, 其中 As(III) 含量比例 > 80%, 部分蚯蚓组织内还发现少量有机砷。4 种蚯蚓肠道微生物群落在门水平上主要以变形菌、厚壁菌和放线菌为主, 并与周围土壤细菌群落组成存在显著差异。同时, 在土壤和肠道内共检测到 17 个砷转化基因, 其中蚯蚓肠道内 As(V) 还原和砷转运相关基因相对丰度较高, 而砷(去)甲基化基因丰度较低。此外, 低浓度砷污染对蚯蚓生长无显著影响, 却能引起蚯蚓肠道微生物群落的紊乱。蚯蚓种类和砷污染是引起蚯蚓肠道微生物群落组成变化的主要因素。综上, 蚯蚓肠道是一个微生物介导的砷生物转化的重要热区, 本研究拓展了我们对土壤动物肠道内砷生物地球化学行为的认知。

关键词: 土壤动物; 肠道微生物; 多样性; 砷形态; 砷生物转化

Comparative study on the responses of gut microbiota of four species of earthworms to arsenic toxicity

WANG Hongtao¹, DING Jing², SHAO Yuanhu¹, ZHANG Weixin¹, FU Shenglei^{1,*}

¹ Key Laboratory of Geospatial Technology for the Middle and Lower Yellow River Regions, Ministry of Education; College of Geography and Environmental Science, Henan University, Kaifeng 475004, China

² School of Environmental and Material Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: Earthworm guts are thought as a potential reservoir of microbial diversity. Low concentrations of arsenic are widespread in soil and the effect of arsenic contaminant on earthworm gut microbiota has been confirmed. However, shifts of arsenic biotransformation in different earthworm gut are largely unknown. In this study, four species of earthworms were exposed to arsenic-contaminated soils to explore the difference and universality of the effects of low concentrations of arsenic (i.e., concentrations of 5, 15, and 25 mg/kg) on the gut microbiota characteristics using Illumina high-throughput sequencing, and to examine the relationships between arsenic enrichments, arsenic species and arsenic biotransformation genes in different earthworm gut. Our results demonstrated that significant arsenic bioaccumulations in all earthworm body tissues were observed. *Eisenia Andrei* had the highest arsenic bioaccumulation, in which the bioconcentration factor of arsenic was 1.93, followed by *Metaphire californica* (0.80), *Metaphire vulgaris* (0.78), and *Amyntas hupeiensis* (0.52). Inorganic arsenic (As(V) and As(III)) was predominant in earthworm body tissues and guts, where the percentage of As(III) was more than 80%. A few of organic arsenic was also observed in *E. Andrei* and *A. hupeiensis* body tissues. Gut

基金项目: 国家自然科学基金河南联合基金重点项目(U1904204)

收稿日期: 2020-10-13; 网络出版日期: 2021-08-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: fsl@henu.edu.cn

microbial communities in four species of earthworms were dominated by Proteobacteria (22.7%), Firmicutes (25.9%), and Actinobacteria (28.0%) at the phylum level, and were significantly different from those in the surrounding soil. In addition, a total of 17 ABGs were quantified in soil and earthworm gut samples by high throughput quantitative polymerase chain reaction (HT-qPCR), a higher relative abundance of genes involved in As (V) reduction and arsenic transport, and a lower abundance of genes involved in arsenic methylation and demethylation were observed in all earthworm gut samples. The earthworm gut can be a reservoir of microbes with the capability of reducing As (V) and extruding As (III), but with little methylation and demethylation of arsenic, suggesting that ABGs played important roles in the biotransformation and bioaccumulation of arsenic. Moreover, low concentrations of arsenic did not significantly alter the survival and growth of earthworms, but it could disturb the bacterial community of earthworm gut. Changes of microbial community in the earthworm gut were mainly influenced by earthworm species and arsenic contamination. In short, this study suggested that earthworm gut was an important hotspot for the microbe-mediated arsenic biotransformation, and the findings of this study could broaden our understanding of the biogeochemical behavior of arsenic in the gut of soil animals.

Key Words: soil fauna; gut microbiota; diversity; arsenic species; arsenic biotransformation

土壤动物广泛分布在世界各地,是土壤生态系统的重要组成部分。它们参与了众多土壤生态过程,如土壤有机质分解及营养元素生物地球化学循环等,在土壤健康和生物多样性中发挥了关键作用^[1-3]。其中蚯蚓是土壤中最大的无脊椎动物,被称为土壤的“生态系统工程师”和“基石物种”。蚯蚓不仅可以改善土壤结构和肥力,还可以影响土壤有机质分解和养分循环,并促进植物生长^[4-5]。此外,越来越多的研究表明,大量微生物定植在蚯蚓肠道内,这些肠道菌群直接参与了碳氮元素代谢转化,在促进宿主健康方面也起着至关重要的作用^[6-8]。然而,我们对土壤动物肠道微生物菌群的研究才刚刚开始,对于蚯蚓肠道菌群的组成多样性和生态功能的了解还很缺乏。

砷是环境中广泛存在的天然有毒类金属元素。由于矿山开采、金属冶炼等工业活动,以及畜粪、含砷农药等农业活动将大量砷排放入土壤中,从而引起土壤砷污染问题。当前土壤砷污染已引起全球公众的广泛关注^[9]。土壤中的砷元素可对植物、动物产生不利影响,还可通过食物链在人体富集,对人类健康构成严重威胁。同时,砷在土壤环境中的行为归宿和生物毒性均与其化学形态有密切关系^[10]。而环境中微生物在和砷的长期共存过程中,进化出多种砷代谢转化机制,能够调节砷的形态和迁移转化,在砷的生物地球化学循环中起到关键作用^[11]。此外,进入农田土壤的污染物砷严重影响蚯蚓的生长和繁殖,砷对蚯蚓生态毒理危害的研究已引起了广泛关注^[12-13]。微生物介导的砷转化影响着砷的生物毒性,对于砷的迁移转化过程具有重要作用。然而蚯蚓肠道内微生物介导下砷的生物转化过程还不清楚。因此,研究蚯蚓肠道微生物群落介导下的砷生物转化过程,对于了解蚯蚓肠道在砷的土壤地球化学循环中所起的作用具有重要意义。

蚯蚓种类丰富,目前发现已达 6000 多种。不同类型的蚯蚓拥有大量的生物多样性,共同维持着土壤生态系统的稳定^[14]。根据蚯蚓的生活习性及其生态功能间的差异,研究者将蚯蚓分为 3 种生态型种类,即表栖类、内栖类和深栖类^[15]。不同种类的蚯蚓,它们的生理构造和代谢能力存在差异,而且这些差异有助于在蚯蚓生态群落中建立各自独特的细菌群落,维持着土壤动物的生物多样性。因此,我们推测不同蚯蚓肠道微生物也存在显著差异,且对砷毒性的响应机制也存在一定差异,肠道内的砷形态和生物转化关键基因也存在不同。Button 等^[16]发现砷污染土壤中,蚯蚓 *Lumbricus rubellus* 和 *Dendrodrillus rubidus* 组织和肠道内砷形态主要有三价砷(As(III)),五价砷(As(V))以及有机砷等多种形态。Wang 等^[17]研究了高浓度砷污染对单一蚯蚓 *Metaphire sieboldii* 肠道微生物的影响。然而该研究仅局限于单一生物物种,且砷浓度设置较高,与土壤环境中普遍存在砷浓度不相符合。因此,开展广泛砷浓度条件下对不同蚯蚓肠道微生物影响的差异性研究,对于完善砷在地下动物的生物化学循环多样性等方面的知识具有重要意义。因此,本研究设定了一个较低浓度砷的土壤环境,且选取土壤系统中常见的 4 种蚯蚓为目标物种,测定蚯蚓组织内砷的含量,肠道微生物与砷转化基因,并分析它们之间的联系。研究结果将有助于我们理解砷在地下土壤动物肠道内生物多样性的转化过程。

1 材料与方法

1.1 材料准备与实验设计

土壤采自浙江宁波某块废弃菜地,同时在该地附近农田采集蚯蚓。采集完成后,将土壤和蚯蚓一并运回实验室。野外采集土壤风干过筛后备用,蚯蚓则进行实验室内驯化及种类鉴定^[17]。最后从中选取 4 种常见蚯蚓种类,分别是安德爱胜蚓(*Eisenia andrei*),湖北远盲蚓(*Amyntas hupeiensis*),加州腔蚓(*Metaphire californica*)和通俗腔蚓(*Metaphire vulgaris*)。

称取过 10 目筛的风干土样加到聚乙烯塑料保鲜盒中,充分混匀,用超纯水配置 As(V)母液(溶解固体含砷化合物 $\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),分别将对应浓度 As(V)溶液,均匀加入到保鲜盒中,溶液充分淹没土壤并混匀,放在实验室老化半个月,从而得到一系列处理土壤样品。本次实验共设四个处理,即空白(砷的背景浓度为 5 mg/kg)无蚯蚓,空白(砷的背景浓度为 5 mg/kg)有蚯蚓,砷浓度分别为 15 mg/kg 和 25 mg/kg 的蚯蚓处理组,每个处理设置 5 个重复,其中空白无蚯蚓处理是为了探讨蚯蚓活动对土壤背景值下砷生物转化行为的影响。同时每个保鲜盒容器内放入 10 条大小和重量相似的同一种蚯蚓,即每个保鲜盒内一共 40 条蚯蚓。最后保鲜盒放入培养箱内(光照/黑暗循环时间各一半,相对湿度 75%,温度 20—22℃)培养 28 d。实验期间,定期向土壤中加入无菌超纯水,保证土壤含水率保持在 30%左右。

1.2 样品分析方法

1.2.1 样品 DNA 提取

每份土壤样品充分混匀,装入无菌自封袋中,多余土壤样品风干测理化性质。用无菌镊子将蚯蚓从土壤样品取出,同时去除体表土壤残余物,并在无菌超纯水中漂洗五次,然后在无菌操作台上使用无菌镊子和无菌剪刀将蚯蚓解剖,取出其肠道内含物。提 DNA 的土样和蚯蚓肠道样品,均放在-20℃冰箱备用。测砷形态的土壤、肠道和蚯蚓组织样品,存于-80℃冰箱备用。本实验使用 Fast DNA[®] Spin Kit for Soil(MP Biomedical, 美国)规格提取试剂盒提取土样和肠道样品 DNA。使用紫外分光光度计 ND-1000 测定所提 DNA 浓度,最后将 DNA 样品储存于-20℃冰箱备用。

1.2.2 细菌 16S rRNA 基因扩增,高通量测序和微生物群落生物分析

以提取 DNA 为模板,并对细菌 16S rRNA 基因的可变 V4 区进行扩增。上游引物为 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'),而下游引物为 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),其下游引物含有 6 个碱基片段的 barcode。PCR 的扩增条件如下:95℃预变性 2 min;然后 30 个循环扩增,每个循环含 95℃变性 20 s,55℃退火 15 s,72℃延伸 1 min;最终 72℃延伸 10 min。PCR 产物经过纯化回收并混库后,送测序公司(诺禾致源,中国)进行 Illumina 测序。使用服务器 QIIME 1 对测序数据进行下游分析^[18]。其中,原始序列需要进行分类,然后去除低质量或模糊序列,从而得到高品质目标序列。随后用 Uclust 聚类法(97%的相似度水平)将高质量序列进一步聚类为操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)^[19-20]。接着通过稀有化分析获得样品序列的多样性,其中通过不同测序深度下细菌群落多样性可得到每个样品内在多样性(即 Alpha 多样性,如 Chao1 指数和香农(Shannon)指数等),通过计算相同测序深度来比较不同样品间的多样性(即 Beta 多样性,如基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析)。

1.2.3 高通量定量 PCR

我们采用 SmartChip Real-time PCR Systems(WaferGen, 美国)高通量荧光定量系统对所有样品中砷生物转化基因进行定量测序。引物一共有 80 对,包含 79 对砷转化基因和 16S rRNA gene,引物具体信息以及定量 PCR 体系温度时间条件设定参数参考 Zhao 等^[21]的研究。根据砷转化基因的功能特征,将其分为四类,即五价砷还原(As(V) reduction),三价砷氧化(As(III) oxidation),砷(去)甲基化(As(de)methylation),和砷转运(As transport)。一个基因检测阈值(C_T , 31)被用来作为有效扩增基因的主要依据,同时每个样品包含 3 个技术重复(三次技术重复都扩增出来时,才认定该样品检测出来)。此外,通过公式(1)计算每个样品的基因拷

贝数,当 C_T 值超出 31 或为 0 时,认定该基因没有检测出来,其对应的 C_T 值被替换为 31。为降低样品间 DNA 提取效率差异,使用公式(2)将公式(1)转换为归一化的基因丰度,即每个细菌细胞基因的拷贝数,在这里计为其相对丰度。

$$\text{Relative Gene Copy Number} = 10^{(31 - C_T) / (\frac{10}{3})}$$

(1)

$$\text{Relative abundance} = 4.1 \times (\text{Relative ABG Copy Number} / \text{Relative 16S rRNA Copy Number})$$

(2)

1.2.4 样品理化分析

土壤 pH 值采用 pH 仪进行测定(水土比为 2.5:1),土壤 TC 和 TN 使用 C/N 分析仪(Vario MAX C/N,德国)燃烧法进行测定,TOC 分析仪(Vario TOC cube,德国)测定土壤总有机碳 TOC。采用微波消解仪(CEM Microwave Technology Ltd.,英国)进行土壤重金属预消解,具体消解体系及消解程序参照我们之前的方法^[17]。土壤中 As、Cd、Cr、Cu、Ni、Pb 和 Zn 含量由电感耦合等离子体质谱(ICP-MS, Agilent 7500 ce, Agilent Technologies, 美国)测定。每批消解样品都有 3 个空白对照,以及两个样品技术平行,样品平行重复的相对偏差均在 10% 以内,其中使用标准物质黄棕壤 GBW07403 和扇贝 GBW07403 来进行校准验证,回收率均在 91.1%—109.3% 之间,达到要求。此外,土壤、蚯蚓肠道及组织样品砷形态的提取方法同样参照之前方法,后续使用高效液相色谱(HPLC, Agilent 1200, Agilent Technologies, 美国)和 ICP-MS 联用测定样品的砷形态^[17]。

1.3 数据分析

本研究中均值,百分比,变异系数,标准差和热图等均采用 Excel 2016(Microsoft,美国)完成。各个样品间显著性分析采用 SPSS V18.0(IBM,美国),其中本文使用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)比较数据在 0.05 水平上的显著性,显著性检验的方法用 Tukey HSD 进行检验包括数据前期正态分布检验。微生物数据分析主要基于 R(version 3.4.3)软件绘制,如使用 R vegan2.3-1 工具进行了主坐标分析,Adonis test 算法检验不同样品间的微生物群落分布显著性。柱状图和箱线图等由 Origin Pro8.5(OriginLab,美国)完成。

2 结果与分析

2.1 不同蚯蚓间体重,存活率,砷总量和形态的响应差异

经 28 天污染土壤暴露后,3 个处理组间所有蚯蚓的体重(湿重)和数目(存活率)均无显著差异变化(ANOVA, $P>0.05$;表 1),土壤中低浓度砷对蚯蚓存活数及生长影响不大。此外,这 4 种蚯蚓的体重之间存在较大差异,如通俗腔蚓的体重为 4.67 g,是安德爱胜蚓体重的 12.4 倍($P<0.05$)。

表 1 蚯蚓体重和数量变化特征
Table 1 The characterization of changes in earthworm weight and numbers

处理 Treatment	As5	As15	As25	As5	As15	As25
蚯蚓种类 Earthworm species	存活数 Survival number			生物量 Biomass/g		
<i>Ea</i>	10.0±0a	9.8±0.4a	9.6±0.5a	0.39±0.02a	0.41±0.02a	0.33±0.02a
<i>Ah</i>	9.8±0.4a	9.8±0.4a	9.6±0.5a	0.68±0.03a	0.70±0.03a	0.59±0.02a
<i>Mc</i>	9.8±0.4a	9.6±0.8a	9.8±0.4a	1.3±0.1a	1.4±0.1a	1.4±0.1a
<i>Mv</i>	9.8±0.4a	9.8±0.4a	9.4±0.5a	4.8±0.2a	4.9±0.2a	4.4±0.2a

数据以“均值±标准差”(n=5)表示;相同字母(a)表示不同处理间的数据不存在显著差异(在 0.05 水平上,ANOVA);As5:砷浓度为 5 mg/kg 的处理组 Treatment with arsenic concentration of 5 mg/kg;As15:砷浓度为 15 mg/kg 的处理组 Treatment with arsenic concentration of 15 mg/kg;As25:砷浓度为 25 mg/kg 的处理组 Treatment with arsenic concentration of 25 mg/kg;*Ea*:安德爱胜蚓 *Eisenia andrei*; *Ah*:湖北远盲蚓 *Amyntas hupeiensis*; *Mc*:加州腔蚓 *Metaphire californica*; *Mv*:通俗腔蚓 *Metaphire vulgaris*

随着土壤中砷浓度的增加,所有蚯蚓肠道和组织中砷含量均呈现一个增加的趋势($P<0.05$;图 1)。如 As5 处理中安德爱胜蚓组织砷浓度为 11.8 mg/kg,但在 As25 处理中其砷浓度富集至 38.1 mg/kg。加州腔蚓肠

道在 As25 处理中砷含量 (28.9 mg/kg) 是其 As5 处理中 (7.01 mg/kg) 的 4.1 倍。同时,不同蚯蚓在同一土壤处理组中的砷富集浓度存在较大差异。4 种蚯蚓富集系数由高到低依次为:安德爱胜蚓 (1.93) > 安德爱胜蚓 (0.80) > 通俗腔蚓 (0.78) > 湖北远盲蚓 (0.52)。如处理 As25 中加州腔蚓组织砷含量为 21.3 mg/kg,而相同处理下湖北远盲蚓砷浓度仅为 10.8 mg/kg。从图 1 中,我们可以看到土壤中砷形态主要以 As(V) 为主,As(III) 仅占 17.0%。而在各个蚯蚓肠道或组织内,砷形态均以 As(III) 为主,占总砷含量高达 80.7%。同时在安德爱胜蚓肠道组织中,检测到部分有机砷,主要以砷甜菜碱 (Arsenobetaine, AsB) 为主,占比 11.7%。湖北远盲蚓仅组织内发现了部分有机砷 AsB。

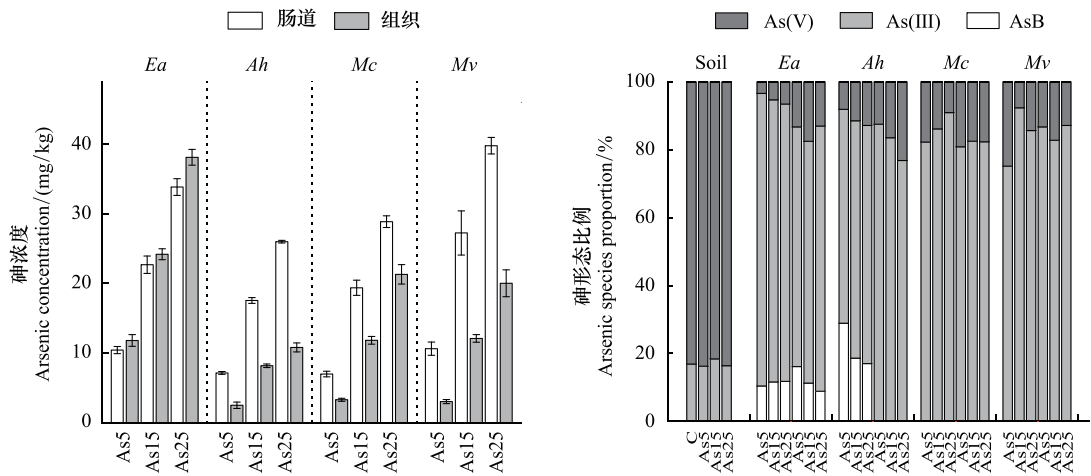


图 1 蚯蚓组织和肠道内砷富集浓度和砷形态所占百分比

Fig.1 Arsenic concentrations and proportion of arsenic species in the soil, earthworm body tissues and gut

图中右侧 C:对照无蚯蚓组;As(V):五价砷 Pentavalent arsenic;As(III):三价砷 Trivalent arsenic;AsB:砷甜菜碱 Arsenobetaine;数据以“均值±标准差”(n=5)表示;Ea:安德爱胜蚓 *Eisenia andrei*;Ah:湖北远盲蚓 *Amyntas hupeiensis*;Mc:加州腔蚓 *Metaphire californica*;Mv:通俗腔蚓 *Metaphire vulgaris*

2.2 土壤和各种蚯蚓肠道细菌群落结构差异

从基本理化性质来看,土壤和蚯蚓肠道之间存在较大差异(表 2)。蚯蚓肠道 pH 值为 6.74,较高于周围土壤的 pH 值(6.11)。蚯蚓肠道内总碳(125 mg/g)和总可溶性碳(56.2 mg/g)含量显著高于土壤含量(分别为 33.3 mg/g 和 0.48 mg/g, $P<0.01$)。此外,蚯蚓肠道内重金属镉(Cd)含量(2.73 mg/kg)显著高于土壤中镉含量(0.2 mg/kg, $P<0.01$)。

表 2 本研究中土壤和蚯蚓肠道原位性质

Table 2 In situ conditions of the soil and earthworm gut in this study

参数 Parameters	pH	TC/ (mg/g)	TN/ (mg/g)	C/N	TOC/ (mg/g)	Cd/ (mg/g)	Cu/ (mg/g)	Zn/ (mg/g)
土壤 Soil	6.11±0.2a	33.3±0.5b	4.40±0.1b	7.65±0.1a	0.48±0.1b	0.2±0.0b	28.3±2.7a	116±6.2a
肠道 Gut	6.74±0.1a	125±13.5a	28.2±4.5a	4.47±0.5b	56.2±7.4a	2.73±0.9a	25.3±3.6a	147±28.7a

TC:总碳 Total Carbon;TN:总氮 Total nitrogen;C/N:碳氮比 Carbon/Nitrogen;TOC:总有机碳 Total Organic Carbon。数据以“均值±标准差”(n=5)表示;字母(ab)表示不同处理间的数据存在显著差异(在 0.05 水平上,ANOVA)

所有样品经过微生物群落高通量测序和下游分析后,一共获得高质量 9 903 591 个高质量序列,这些序列根据 97%的相似性原则进行 OTUs 聚类,共得到 95 900 个 OTUs。其中土壤的 OTUs 数目(36 294)显著高于蚯蚓肠道 OTUs 数目($P<0.01$)。同时,土壤和蚯蚓肠道细菌群落组成成分间存在差异。变形菌门(Proteobacteria),厚壁菌门(Firmicutes),绿弯菌门(Chloroflexi),放线菌门(Actinobacteria),和酸杆菌门(Acidobacteria)是土壤中的优势菌群,它们在总菌群中占据的比例高达 73.4%。而各个蚯蚓肠道内的优势菌

基本一致,主要是放线菌,厚壁菌和变形菌等,它们的相对丰度总和比例为 76.6%(图 2)。其中土壤酸杆菌门(9.3%)的丰度显著高于各个蚯蚓肠道内(0.7%)的丰度($P<0.01$),而土壤放线菌门(11.0%)丰度显著低于各个蚯蚓肠道内(28.0%)的丰度($P<0.01$)。

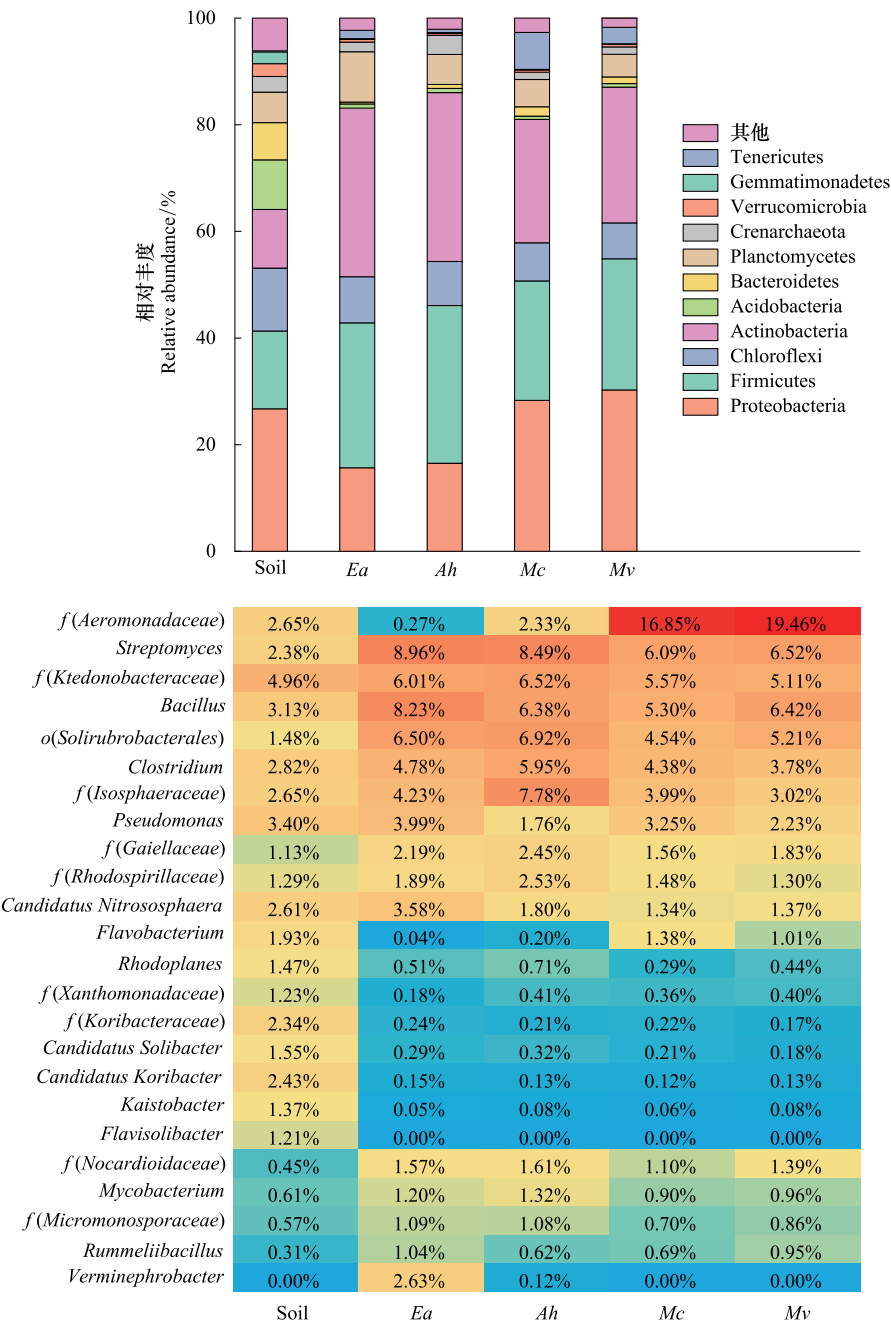


图 2 土壤和蚯蚓肠道细菌群落在门和属水平上的物种组成和相对丰度

Fig.2 Composition and abundance of bacterial community of soil and gut at the phylum and genus level

图中仅显示了前 11 个高丰度的细菌组成,其他均归为“Other”类别;图例中文注释,变形菌门:Proteobacteria;厚壁菌门:Firmicutes;绿弯菌门:Chloroflexi;放线菌门:Actinobacteria;酸杆菌门:Acidobacteria;拟杆菌门:Bacteroidetes;浮霉菌门:Planctomycetes;泉古菌门:Crenarchaeota;疣微菌门:Verrucomicrobia;芽单胞菌门:Gemmatimonadetes;软壁菌门:Tenericutes。热图显示了丰度最高的前 24 种属水平上的物种组成。如属水平上物种不确定,则使用该水平上一级(科或目水平)的物种组成,颜色越红表示丰度越高,颜色越蓝表示丰度越低。图例中文注释,鲁梅尔芽胞杆菌属:*Rummeliibacillus*;微单孢菌科:*Micromonosporaceae*;分支杆菌属:*Mycobacterium*;类诺卡氏菌科:*Nocardioideaceae*;黄色土源菌:*Flavisolibacter*;凯氏杆菌属:*Kaistobacter*;科里氏菌科:*Koribacteraceae*;黄单胞菌科:*Xanthomonadaceae*;红游动菌属:*Rhodoplanes*;黄杆菌属:*Flavobacterium*;红螺菌科:*Rhodospirillaceae*;假单胞菌属:*Pseudomonas*;伊索菌科:*Isosphaeraceae*;梭菌属:*Clostridium*;红杆菌目:*Solirubrobacterales*;芽孢杆菌属:*Bacillus*;纤维杆菌科:*Ktedonobacteraceae*;链霉菌属:*Streptomyces*;气单胞菌科:*Aeromonadaceae*

热图(图 2)显示了土壤和各个蚯蚓肠道间在属水平上细菌群落组成差异。土壤各组成成分丰度变化不大,丰度最高细菌 *Ktedonobacteraceae* 所占序列也仅为 5.0%,而肠道内微生物群落组成则较集中,如加州腔蚓和通俗腔蚓肠道内 *Aeromonadaceae* 丰度分别高达 16.9%和 19.5%。此外,土壤中 *Candidatus Koribacter* 的丰度为 2.4%,远远高于其在蚯蚓肠道内的丰度(0.1%, $P<0.05$)。

除了微生物组成成分存在差异以外,土壤和各个蚯蚓肠道细菌群落分布模式也存在显著差异。图 3 中主坐标分析结果显示,土壤菌群模式聚集在一起,分布在坐标轴右侧,沿着第一轴与分布在左侧的各个蚯蚓肠道细菌群落模式显著隔开(Adonis test, $R=0.94$, $P<0.005$)。同时安德爱胜蚓和湖北远盲蚓肠道细菌群落聚集在左侧下方,而加州腔蚓和通俗腔蚓聚集在左侧上方,这两类肠道菌群主要沿第二轴显著分开(Adonis test, $P=0.001$)。此外,土壤细菌多样性显著高于各个蚯蚓肠道内多样性($P<0.01$,图 3)。其中 Shannon 指数表明加州腔蚓肠道细菌多样性显著低于安德爱胜蚓和湖北远盲蚓。

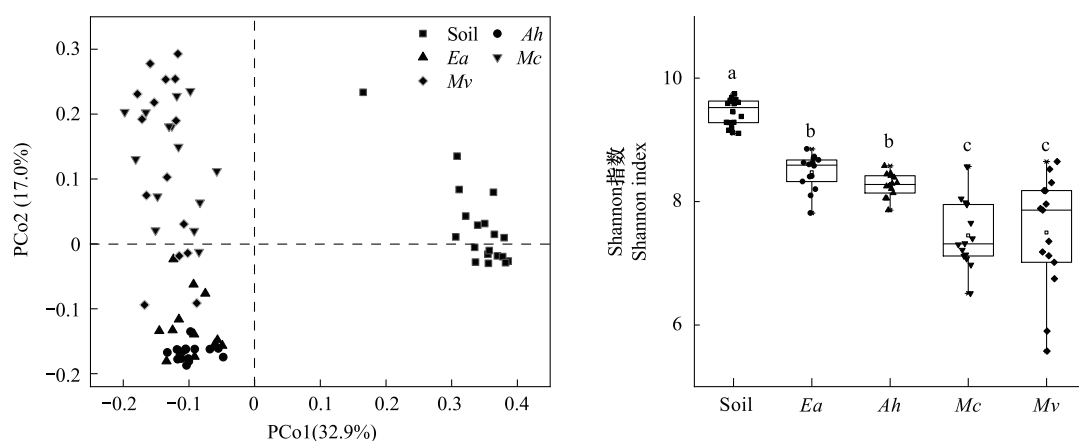


图 3 土壤和蚯蚓肠道细菌群落 beta 多样性和 alpha 多样性

Fig.3 Beta diversity and alpha diversity of bacterial communities in soil and earthworm gut

图中土壤和蚯蚓肠道细菌群落 beta 多样性分布图是基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析绘制的;箱线图显示土壤和肠道细菌群落 Shannon 指数的差异。不同字母(abc)显示土壤和各个蚯蚓间的细菌多样性在 0.05 水平上存在显著差异(ANOVA)

2.3 各种蚯蚓肠道微生物对砷污染的不同响应

土壤中低浓度砷改变 4 种蚯蚓肠道内群落组成,且各种蚯蚓肠道微生物对砷响应存在较大差异。如对照组中安德爱胜蚓肠道变形菌门丰度为 22.7%,而 As25 处理中其肠道内变形菌门的丰度下降到 13.7% ($P<0.05$)。图 4 展示了 4 种蚯蚓肠内科水平细菌群落主要组成成分的变化。所有蚯蚓肠道内假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)的丰度随着土壤砷浓度的增加而显著减少($P<0.05$),芽胞杆菌科(*Bacillaceae*),动性球菌科(*Planococcaceae*)在湖北远盲蚓,安德爱胜蚓和加州腔蚓肠道内呈现相反的趋势,即显著增加($P<0.05$)。相对于其他 3 种蚯蚓,通俗腔蚓内细菌群落变化较少。此外,低浓度砷暴露还能改变肠道细菌群落多样性。如 As25 处理组湖北远盲蚓肠道内细菌多样性 Chao1 指数显著高于对照处理组,而 As25 处理组通俗腔蚓肠道内细菌多样性 Chao1 指数显著低于对照处理组($P<0.05$)。通过 Adonis test 统计分析,发现低浓度砷显著改变 4 种蚯蚓肠道微生物结构模式($P<0.05$,图 3)。

2.4 砷生物转化基因多样性与丰度分布特征

土壤和蚯蚓肠道样品内一共检测到 17 种砷的生物转化基因(图 5),并且土壤中的砷转化基因数目显著高于肠道内基因数目($P<0.05$)。其中土壤中检测到的砷转化基因数目最多为 17 个,在湖北远盲蚓肠道内检测到的基因数目最少为 7 个。外源砷的添加没有显著改变土壤或肠道内砷转化基因的数量($P>0.05$)。此外样品中砷转化基因相对丰度的检测范围为 0.56—0.63 拷贝数/每细胞,外源砷的添加也没有明显改变土壤中砷转化基因的丰度,但蚯蚓肠道内基因的丰度变化范围较大,最低为 0.05 拷贝数/每细胞(As25 处理-湖北远

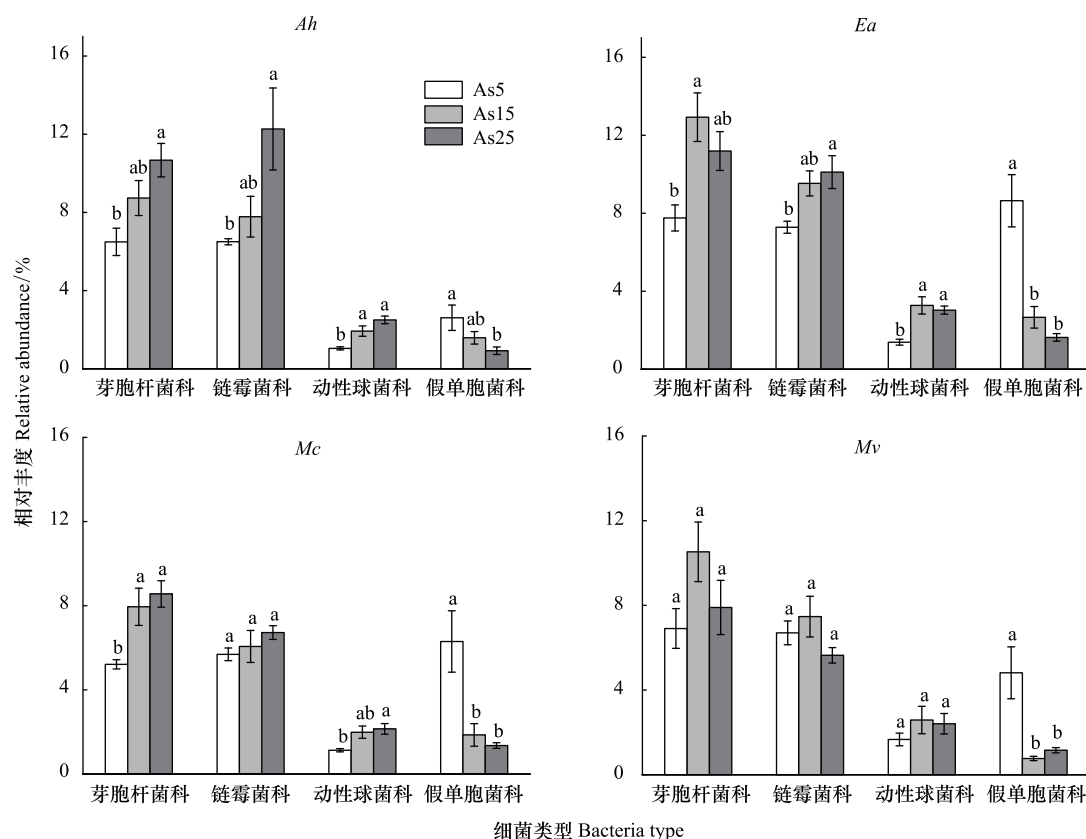


图4 各个蚯蚓肠道内砷处理下科水平细菌的差异性变化

Fig.4 Different changes of bacterial families among arsenic treatments in different earthworm gut

Bacillaceae: 芽胞杆菌科; Streptomycetaceae: 链霉菌科; Planococcaceae: 动性球菌科; Pseudomonadaceae: 假单胞菌科; 图中不同字母表示肠道细菌群落多样性在3个处理间存在显著差异 (在0.05水平上, ANOVA)

盲蚓肠道内), 最高丰度则达到 0.47 拷贝数/每细胞 (As15 处理-通俗腔蚓肠道内)。土壤中砷转化基因的丰度显著高于各个蚯蚓肠道 ($P < 0.05$, 图 5)。4 种蚯蚓肠道内砷基因随着外源砷的增加, 其丰度均呈现一个先增加后减少的趋势。如空白处理下湖北远盲蚓肠道内砷丰度为 0.11 拷贝数/每细胞, As15 处理下其丰度增加到 0.13 拷贝数/每细胞, 最后在 As25 处理中丰度显著下降到 0.05 拷贝数/每细胞 ($P < 0.05$)。根据砷生物转化基因的功能分类, 土壤中砷转化基因主要以 As(III) 氧化和 As(V) 还原为主, 而在肠道内主要以 As(V) 还原和砷转运基因为主 (图 5)。

3 讨论

本研究发现低浓度砷对蚯蚓体重和生长变化无显著影响, 但能显著改变蚯蚓肠道微生物群落。土壤砷浓度最高仅为 25 mg/kg, 明显低于很多研究报道的蚯蚓半致死浓度^[22-23]。同时 Šrut 等^[24]发现微生物对污染物响应较敏感, 蚯蚓肠道微生物可用来作为重金属污染的生物指示物。因此我们可以推测蚯蚓肠道微生物群落的扰动可作为对土壤污染物前期监测的重要生物指标。同时 4 种蚯蚓组织内砷浓度会随着土壤中砷浓度的增加而增加, 即砷污染会引起蚯蚓体内砷的生物富集。这是容易理解的, 蚯蚓长期生活在土壤圈内, 砷元素可通过皮肤接触或蚯蚓摄食行为, 进入蚯蚓体内从而不断富集^[25]。但不同种类蚯蚓的富集系数存在较大差异, 这与各种蚯蚓的生态习性有很大联系^[26]。其中安德爱胜蚓属表栖类, 主要以枯枝碎屑为食。而其它种蚯蚓属内栖类, 主要以矿质土壤为食。食物来源不同, 其进入各种蚯蚓体内的砷含量自然存在较大差异。此外, 这也和蚯蚓自身生理结构和肠道微生物也有一点关系^[8]。如加州腔蚓和通俗腔蚓属同种生态型和同种分属,

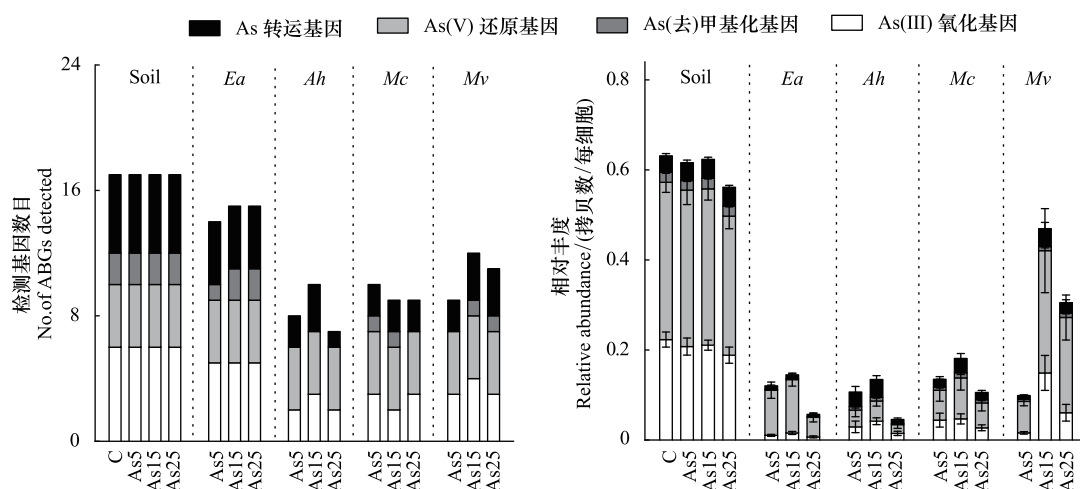


图 5 土壤和蚯蚓肠道内砷转化基因的检测数目和相对丰度

Fig.5 The detected number and relative abundance of arsenic biotransformation genes (ABGs) in microbiome of soil and earthworm gut

As (III) oxidation; 三价砷氧化基因; As (V) reduction; 五价砷还原基因; As (de) methylation; 砷 (去) 甲基化基因; As Transport; 砷转运基因; 图中数据为平均值 \pm 标准差 ($n=5$)

且它们个体大小,肠道构造和肠道微生物群落组成最为相似,因此这两种蚯蚓砷富集系数也基本相同。

本研究表明土壤中砷形态以 As(V) 为主,而蚯蚓肠道主要以 As(III) 为主。土壤为好氧条件,其氧化还原电位为正。而蚯蚓肠道是一个厌氧环境,包括厌氧菌在内的大量微生物参与了砷的生物化学形态转化,As(V) 将被还原为 As(III),当然肠道内高有机质和中性 pH 等独特微环境可能也是引起砷形态转化的重要因素^[6-7,17]。此外,各种蚯蚓肠道内砷转化基因以 As(V) 还原基因为主,这与肠道内砷形态结果相一致。As(V) 被还原为 As(III) 是微生物代谢最为关键的一个过程,As(III) 将进行甲基化反应生成甲基砷等低毒有机砷,这些毒性较小的砷形态经砷转运基因外排出体外,从而达到解毒目的^[16-17,27]。我们在蚯蚓肠道微生物内均检测到砷甲基化的关键转化酶 AsM 和部分有机砷 AsB,这和大部分研究结果一致^[16,27],也验证了关于蚯蚓肠道内微生物参与下砷形态转化的猜想。同时,4 种蚯蚓体内砷转化基因丰度会随着土壤中砷浓度增加,呈现出一个先增加后减少的趋势。研究表明土壤中金属浓度较低时能刺激微生物的生长,增加微生物活性。但当金属浓度升高时,会出现明显抑制效应,使微生物生物量出现一个减少趋势^[28]。据此推测,低浓度砷可以刺激并提高肠道内微生物的活性,而较高浓度砷则抑制其肠道内微生物的活性,从而影响肠道内生物代谢速率,进而间接影响到微生物介导下的砷生物转化基因的丰度。

本研究结果进一步显示 4 种蚯蚓肠道微生物均与土壤微生物群落存在显著差异,这与土壤和肠道所处微环境有直接关系^[7,17,29-30]。从表 2 看出蚯蚓肠道缺氧,pH 偏中性,可溶性碳氮含量远高于好氧的土壤。同时各种蚯蚓肠道微生物群落间也存在很大差异。可能原因主要有两个,第一不同生态型的蚯蚓自身生理构造存在差异,特别是肠道内的结构存在不同。当然各个蚯蚓摄食习惯的不同也会引起肠道菌群的差异。Knapp 等^[31]发现蚯蚓肠道微生物组对所摄取的食物来源有很强的依赖性。加州腔蚓和通俗腔蚓肠道内气单胞菌科 (Aeromonadaceae) 的相对丰度高达 16%,而在安德爱胜蚓肠道内仅为 0.3%。该菌在水体和淤泥中被大量发现,是动物体内常见的致病菌^[32-33]。加州腔蚓和通俗腔蚓可能吞食大量含砷土壤,且长期生活在土壤内部,可能会接触较多的致病菌,从而引发蚯蚓肠道微生物出现紊乱。而安德爱胜蚓主要生活在土壤表层,主要以富含有机质枯枝落叶为食。第二,进入蚯蚓肠道内的砷以毒性更高的 As(III) 存在,同时蚯蚓肠道细菌群落较土壤菌群敏感,因此进入蚯蚓组织肠道内砷对肠道菌群产生不同差异毒害。如假单胞菌科 (Pseudomonadaceae) 内很多细菌具有分解营养元素的能力^[34]。和空白处理组相比,As25 处理中 4 种蚯蚓肠道内假单胞菌科的丰度均显著降低,这表明污染物砷的添加能够破坏蚯蚓肠道微生物分解蛋白质和脂肪的能

力,从而抑制蚯蚓正常代谢。

4 结论

土壤中广泛存在的砷元素对蚯蚓生态毒理无显著影响,但显著改变其肠道微生物群落结构,这表明蚯蚓肠道微生物组的变化可能比蚯蚓毒理指标更适合做土壤污染的指示性指标。同时蚯蚓肠道菌群和土壤群落显著不同,且蚯蚓肠道细菌多样性显著低于土壤。蚯蚓组织和肠道内砷形态主要以 As(III) 为主,其次是少量 As(V) 和有机砷,这和肠道内 As(V) 还原和转运为主的砷转化基因分布特征一致,显示蚯蚓肠道是一个微生物介导下砷形态转化多样性的潜在热区。然而本文关于蚯蚓肠道内砷还原和转运解毒的机制和原理尚不清楚,有待深入发掘。

参考文献 (References):

- [1] Petersen H, Luxton M. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos*, 1982, 39(3): 288-388.
- [2] 邵元虎, 张卫信, 刘胜杰, 王晓丽, 傅声雷. 土壤动物多样性及其生态功能. *生态学报*, 2015, 35(20): 6614-6625.
- [3] Bardgett R D, Van Der Putten W H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 2014, 515(7528): 505-511.
- [4] Bertrand M, Barot S, Blouin M, Whalen J, De Oliveira T, Roger-Estrade J. Earthworm services for cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2015, 35(2): 553-567.
- [5] 王斌, 李根, 陈欢, 焦加国, 刘满强, 蒋洋杨, 胡锋, 李辉信. 蚯蚓作用下土壤化学组成和性状的动态变化. *水土保持学报*, 2013, 27(3): 273-277.
- [6] Drake H L, Horn M A. As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 169-189.
- [7] Ding J, Zhu D, Hong B, Wang H T, Li G, Ma Y B, Tang Y T, Chen Q L. Long-term application of organic fertilization causes the accumulation of antibiotic resistome in earthworm gut microbiota. *Environment International*, 2019, 124: 145-152.
- [8] Thakuria D, Schmidt O, Finan D, Egan D, Doohan F M. Gut wall bacteria of earthworms: a natural selection process. *The ISME Journal*, 2010, 4(3): 357-366.
- [9] Zhao F J, McGrath S P, Meharg A A. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 535-559.
- [10] Zhu Y G, Xue X M, Kappler A, Rosen B P, Meharg A A. Linking genes to microbial biogeochemical cycling: lessons from arsenic. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(13): 7326-7339.
- [11] Zhu Y G, Yoshinaga M, Zhao F J, Rosen B P. Earth abides arsenic biotransformations. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 2014, 42: 443-467.
- [12] Fischer E, Koschorz L. Sublethal effects, accumulation capacities and elimination rates of As, Hg and Se in the manure worm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedobiologia*, 1992, 36(3): 172-178.
- [13] Langdon C J, Pearce T G, Meharg A A, Semple K T. Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review. *Environmental Pollution*, 2003, 124(3): 361-373.
- [14] Csuzdi C. Earthworm species, a searchable database. *Opuscula Zoologica*, 2012, 43(1): 97-99.
- [15] 张卫信, 陈迪马, 赵灿灿. 蚯蚓在生态系统中的作用. *生物多样性*, 2007, 15(2): 142-153.
- [16] Button M, Jenkin G R T, Harrington C F, Watts M J. Arsenic biotransformation in earthworms from contaminated soils. *Journal of Environmental Monitoring*, 2009, 11(8): 1484-1491.
- [17] Wang H T, Zhu D, Li G, Zheng F, Ding J, O'Connor P J, Zhu Y G, Xue X M. Effects of arsenic on gut microbiota and its biotransformation genes in earthworm *Metaphire sieboldi*. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(7): 3841-3849.
- [18] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Peña A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh P J, Walters W A, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [19] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [20] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, DeSantis T Z, Andersen G L, Knight R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, 2010, 26(2): 266-267.

- [21] Zhao Y, Su J Q, Ye J, Rensing C, Tardif S, Zhu Y G, Brandt K K. AsChip: a high-throughput qPCR chip for comprehensive profiling of genes linked to microbial cycling of arsenic. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(2): 798-804.
- [22] Wang Z F, Cui Z J. Accumulation, biotransformation, and multi-biomarker responses after exposure to arsenic species in the earthworm *Eisenia fetida*. *Toxicology Research*, 2016, 5(2): 500-510.
- [23] 李淳, 朱江. 砷对赤子爱胜蚓的急性毒性效应研究. *上海环境科学*, 2018, (2): 51-54.
- [24] Šrut M, Menke S, Höckner M, Sommer S. Earthworms and cadmium – Heavy metal resistant gut bacteria as indicators for heavy metal pollution in soils? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171: 843-853.
- [25] Wang Z F, Cui Z J, Liu L, Ma Q C, Xu X M. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to contaminated soil: effects of arsenic species. *Chemosphere*, 2016, 154: 161-170.
- [26] Yang F, Xie S W, Wei C Y, Liu J X, Zhang H Z, Chen T, Zhang J. Arsenic characteristics in the terrestrial environment in the vicinity of the Shimen realgar mine, China. *Science of the Total Environment*, 2018, 626: 77-86.
- [27] Langdon C J, Meharg A A, Feldmann J, Balgar T, Charnock J, Farquhar M, Pearce T G, Semple K T, Cotter-Howells J. Arsenic-speciation in arsenate-resistant and non-resistant populations of the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Journal of Environmental Monitoring*, 2002, 4(4): 603-608.
- [28] 夏立江, 王宏康. 土壤污染及其防治. 上海: 华东理工大学出版社, 2001: 75-77.
- [29] Zhu D, Chen Q L, An X L, Yang X R, Christie P, Ke X, Wu L H, Zhu Y G. Exposure of soil collembolans to microplastics perturbs their gut microbiota and alters their isotopic composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 116: 302-310.
- [30] 晁会珍, 孙明明, 朱国繁, 叶茂, 张胜田, 刘满强, 胡锋. 蚯蚓肠道细菌生态功能及毒理学研究进展. *生态毒理学报*, 2020, 15(5): 35-48.
- [31] Knapp B A, Podmirseg S M, Seeber J, Meyer E, Insam H. Diet-related composition of the gut microbiota of *Lumbricus rubellus* as revealed by a molecular fingerprinting technique and cloning. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(11): 2299-2307.
- [32] Huys G. The family *Aeromonadaceae*//Rosenberg E, DeLong E F, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, eds. *The Prokaryotes*. Berlin: Springer, 2014: 27-57.
- [33] Aravena-Román M, Inglis T J J, Henderson B, Riley T V, Chang B J. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(2): 1110-1112.
- [34] Palleroni N J. Introduction to the family *Pseudomonadaceae*//Starr M P, Stolp H, Trüper H G, Balows A, Schlegel H G, eds. *The Prokaryotes*. Berlin: Springer, 1981: 655-665.