

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017.02.2016062401

陈欣瑶, 杨惠子, 陈楸健, 等. 重金属胁迫下不同区域土壤的生态功能稳定性与其微生物群落结构的相关性[J]. 环境化学, 2017, 36(2): 356-364.

CHEN Xinyao, YANG Huizi, CHEN Qiujian, et al. Correlation between microbial community structure and soil ecosystem functional stability under heavy metal stress[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(2): 356-364.

## 重金属胁迫下不同区域土壤的生态功能稳定性 与其微生物群落结构的相关性\*

陈欣瑶 杨惠子 陈楸健 王丽娜 王贵鑫 张园\*\*

(苏州科技大学环境科学与工程学院, 苏州, 215009)

**摘 要** 本文选取了理化性质差异较大的 3 个区域的土壤作为研究对象, 采用底物诱导呼吸实验进行土壤微生物活性测定, 并通过磷脂脂肪酸(PLFA)方法进行微生物群落结构检测分析. 结果表明, AM 真菌可作为土壤微生物活性的指示性菌种; 主成分分析表明, 重金属对不同区域土壤的微生物群落结构、分布和疏密度的影响有一定差异性, 即对于受污染胁迫后稳定性较好的土壤, 其微生物群落结构基本会保持整体上的相似和不变性, 而对稳定性较差的土壤, 受重金属污染前后其微生物多样性、均匀度和丰度均会表现出明显的差异性; 聚类分析则显示, 土壤微生物群落的聚类会随时间增加趋于统一, 但重金属胁迫会阻碍这一趋势. 本研究探讨了重金属污染与土壤微生物的内在关系, 有助于提早构建土壤重金属污染微生物预警体系.

**关键词** 土壤, 重金属, 呼吸强度, 微生物群落, 生态功能稳定性.

## Correlation between microbial community structure and soil ecosystem functional stability under heavy metal stress

CHEN Xinyao YANG Huizi CHEN Qiujian WANG Lina WANG Guixin ZHANG Yuan\*\*

(School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou, 215009, China)

**Abstract:** In this study, soil samples were selected from 3 regions in China with obvious variation of physico-chemical properties. The soil incubation with a measurement of respiration was performed to observe the soil microbial activities, and the method of phospholipid fatty acids (PLFA) was applied for analyzing the microbial community structure. The results show that AM fungi could be used as indicative bacteria of soil microbial activity; and the principal component analysis shows that heavy metal stress would have certain influence on microbial PLFA's species, distribution and density. For the soil with high stability, its microbial community structure remained the overall similarities and invariance; while for the soil with poor stability, the microbial diversity and evenness showed obvious differences. Clustering analysis shows that the diversity of soil microbial communities over time tends to be uniform, and heavy metals stress will hinder this trend. This study discussed the

2016 年 6 月 24 日收稿(Received: June 24, 2016).

\* 苏州市分离净化材料与技术重点实验室项目(SZS201512), 国家教育部留学人员科研启动基金项目(教外司留[2012]1792号), 江苏省环境科学与工程重点实验室开放课题项目(Zd131201), 苏州市科技计划项目(SNG201613)资助.

**Supported by** the Project of Suzhou Separation Purification Materials and Technology Key Laboratory (SZS201512), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (2012-1792), the Key Laboratory Open Projects of Environmental Science and Engineering in Jiangsu Province (Zd131201), Suzhou Science and Technology Plan Projects (SNG201613).

\*\* 通讯联系人, Email: yuanzhang\_1001@mail.usts.edu.cn

**Corresponding author**, E-mail: yuanzhang\_1001@mail.usts.edu.cn

relationship between heavy metal pollution and soil microorganism, which can be contributed to the early warning system of heavy metal pollution for soil ecosystem.

**Keywords:** soil, heavy metal, respiration, microbial community, eco-functional stability.

土壤作为人类生存所必须的自然资源之一,同时担负着为人类提供食物和其他再生资源的重担.但随着工农业生产的发展和现代化技术的进步,重金属污染尤其是土壤重金属污染已成为危害全球环境质量以及人类生存和发展的主要问题之一.近年来,重金属污染土壤的修复研究已经成为国内外研究的热点<sup>[1]</sup>.土壤生态系统的稳定性与其结构、功能和进化特征均相关,并可通过在微生物生态学领域已有应用先例的两个定量指标——抵抗力和恢复力<sup>[2-3]</sup>来比较群落间环境胁迫的响应差异.

土壤作为一个有独特生态结构体系的生态系统,对外来污染物质具有一定的环境容量,但土壤是很复杂的多相体系,故土壤污染必须由敏感代表者来进行判定.有研究报道指出,重金属污染能明显影响微生物的生物量、活性及结构<sup>[3-5]</sup>,李晶等<sup>[6]</sup>研究也表明,土壤微生物对重金属胁迫非常敏感,微生物群落结构的变化可以反映出土壤质量和健康状况.而微生物群落多样性与群落的功能及稳定性之间的关系非常复杂,表征多样性的不同指标(丰富度和均匀度)均与微生物群落的抵抗力和恢复力有关<sup>[7]</sup>,因此,度量微生物群落多样性对生态系统稳定性影响时应综合考虑各种指标.目前大多数关于土壤微生物群落多样性及其变化的研究以描述为主,尚未建立土壤微生物多样性与土壤生态系统过程和功能之间的有机联系,也未充分吸收已有的宏观生态学理论发展微观生态学理论体系<sup>[7]</sup>.

本文为探究重金属胁迫下土壤微生物变化对土壤生态系统稳定性的影响,对多样性-稳定性关系在土壤微生物生态学中的应用进行了较为深入和全面的思考.本研究选取铜(Cu)作为重金属胁迫物质,分别对理化性质差异较大的3个区域的土壤进行微生物呼吸的测定,以判别其稳定性高低.并借助PLFA(磷脂脂肪酸)鉴定微生物种类和识别微生物类群,意图从微生物群落结构及多样性、均匀性方面揭示土壤功能稳定性的关键影响因素及作用机制,以便能够更加深刻地阐明土壤微生物对于重金属胁迫的敏感程度及其变化趋势,为改进土壤微生物修复重金属污染提供理论依据.

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 土壤样品的采集与制备

本研究选取南京、郑州、厦门无污染林地区域进行土壤取样(表1).取样时,随机选择周边彼此相距10 m的3个地块(范围0.5 m×0.5 m)采集土壤,除去表层1 cm左右的浮土,采集表层1—20 cm深度的洁净土壤样品,收集混合后风干并研磨过2 mm筛网于4℃冷藏备用.此外不同区域土壤其理化性质均有一定差异性,测定结果见表1,所选土壤具有广泛性和代表性.

表1 土壤样品采集的基本信息表

Table 1 The basic information of soil samples

土壤类型 Soil types	分组 Grouping		取样地点 Location		pH	沙粒含量 Sand/%	CEC/ (mmol·kg <sup>-1</sup> )	C/N
	A	B	纬度 Latitude	经度 Longitude				
江苏南京	NJ-1	NJ-2	32.0531°	118.7661°	5.47	0.27	23.12	21.48
河南郑州	ZZ-1	ZZ-2	34.7514°	113.6369°	7.54	0.47	22.29	12.38
福建厦门	XM-1	XM-2	24.4856°	118.0922°	5.35	0.55	34.33	10.5

注: A:处理组,加入铜作为污染物;B:对照组,不加污染物.

Note: A: The experimental group, added copper as contaminant; B: The control group.

### 1.2 底物诱导呼吸速率实验

本研究以重金属铜Cu作为胁迫物质,在正式实验前,将每份土样的含水率调整到15%,在28℃恒温恒湿条件下活化7 d,之后将土壤充分混合,并等量分为处理组和对照组,每组各设置3个重复.其中,处理组A:(铜Cu)污染胁迫,土壤样品中均匀喷洒适量CuCl<sub>2</sub>溶液至土壤Cu浓度为100 mg·kg<sup>-1</sup>;对照组B:无(铜Cu)污染胁迫,等量土壤样品中均匀喷洒等量去离子灭菌水.将土壤含水率均调至18%,并

在 25 °C 恒温条件下保持 18% 的含水率培养 30 d.

研究定义加入胁迫的当天为第 0 天,并分别测定加入胁迫后的第 1、3、7、15、30 天(T1、T3、T7、T15、T30)测定底物诱导呼吸速率(SIR)<sup>[8]</sup>.为量化土壤微生物对抗胁迫的抵抗力(Rt, Resistance)即呼吸量计算中对应的数值 $f(1)$ 、恢复力(RI, Resilience)即 $f(30)$ ,从而确定添加胁迫后所测得第 1 天至第 30 天的抵抗力和恢复力.本研究定义反应第 1—30 天的弹性曲线面积为稳定性(Sb).具体计算见公式(1)—(2)<sup>[9]</sup>.

$$f(t) = \frac{CO_{2\text{-stressed}}(t)}{CO_{2\text{-control}}(t)} \quad (1)$$

$$Sb = \int_0^{30} f(t) dt \quad (2)$$

式中, $f(t)$  为添加胁迫后第  $t$  天处理组与对照组土壤呼吸产生  $CO_2$  的浓度比值;Sb 为土壤稳定性.

### 1.3 PLFA 的提取与样品检测分析

#### 1.3.1 提取与检测方法

称取定量干重土壤,置于离心管,向离心管中加入 1:1.2:2.4 的磷酸缓冲液、 $CHCl_3$ 、 $CH_3OH$ ,振荡后离心,取上清液;加提取液于离心管中继续振荡离心,转移上清液.在所取上清液中加入磷酸缓冲液和  $CHCl_3$  后摇动,封口静置过夜.保留下层溶液 30 °C 水浴加热,氮吹浓缩.调节萃取小柱,此后向萃取小柱中加入  $CH_3OH$  并收集淋洗液,32 °C 水浴,氮吹浓缩,加 1:1 (V/V) 甲醇:甲苯混合液和 KOH 溶液,摇匀,37 °C 水浴加热,加 0.15:1:1 的  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $CH_3COOH$  溶液、己烷和超纯水,振荡,取上层液;下层溶液继续加己烷,振荡,取上层液.将收集上层溶液氮吹至干.加己烷于干燥样品中,摇动,检测前转入色谱仪专用内衬管.

PLFA 的提取与样品检测分析过程均采用美国 MIDI 公司所开发的 Sherlock 微生物鉴定系统 (Sherlock MIS 6.2)<sup>[10]</sup>, Sherlock 的菌库为:嗜氧菌库-1500;厌氧菌库-800;多酵母菌库包含酵母菌、放线菌、真菌-300,此外 PLFA 群落分析中可准确鉴定的 PLFA 有 165 种.实验测定均设置 3 组平行.

#### 1.3.2 PLFA 生物标记的生态学参数计算方法

本研究根据 PLFA 测得结果来计算不同处理样本中的 PLFA 生物标记的几种指标性生态学参数——Simpson 优势度( $D$ )、Shannon-Wiener 多样性( $H$ )、Pielou 均匀度( $J$ )指数<sup>[11-12]</sup>,计算方法见公式(3)—(5)<sup>[12]</sup>.

$$H = - \sum P_i \ln P_i \quad (3)$$

$$J = - \sum P_i \ln P_i / \ln S \quad (4)$$

$$D = 1 - \sum P_i^2 \quad (5)$$

式中, $P_i$  指第  $i$  种特征磷脂脂肪酸占该试验中总的特征磷脂脂肪酸个数比例; $S$  为微生物群落中 PLFA 生物标记出现的频次,即丰富度.

### 1.4 数据分析

本研究的试验数据结果经初步分类整理计算后,采用 OriginPro 8.0 和 SigmaPlot 12.5 进行数据模拟制图,并通过 SPSS 22.0 对 PLFA 的数据进行主成分分析和聚类分析.

## 2 结果与讨论 (Results and discussion)

### 2.1 土壤底物诱导呼吸速率实验结果——抵抗力、恢复力及其功能稳定性

研究发现在重金属胁迫下,土壤样品呼吸曲线 XM 呈完全递减趋势(图 1),表明土壤在受到 Cu 胁迫后会出现功能稳定性下降的现象.土样 NJ 的呼吸曲线呈始终上升的趋势,表明低浓度的铜会促进土壤微生物的呼吸<sup>[13]</sup>,NJ 土样对铜胁迫的环境容纳力较强.而 ZZ 呈先降低后升高的趋势,表明自身恢复力较好,在污染后期会修复 Cu 胁迫带来的毒性危害.但土壤生态功能稳定性并不能只通过土壤微生物活性来衡量,表征指标多样性及丰富度和均匀度也与微生物群落的稳定性有关<sup>[14]</sup>.因此,本研究通过提

取土壤微生物的 PLFA 进一步对土壤功能稳定性进行定性定量描述。

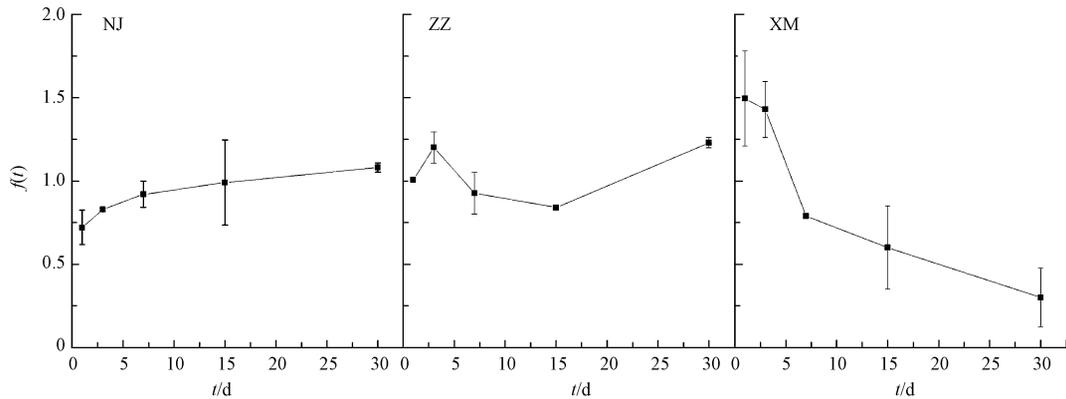


图 1 土壤微生物的呼吸曲线

Fig.1 The respiration curves of soil microbes

## 2.2 PLFA 磷脂脂肪酸测定结果

本研究基于底物诱导呼吸速率(SIR)实验测定结果,对土壤样品进行 PLFA 提取与检测分析.为探究受到胁迫后土壤微生物在培养期内存在状态的变化情况,借助 MIDI 提取磷脂脂肪酸的方法,选取加入胁迫后的 T0、T7、T15、T30 等 4 个采样时间的样品,检测不同区域土壤的微生物群落结构,并计算出各土壤应对铜胁迫的抵抗力、恢复力及稳定性(表 2),以便能够阐明重金属胁迫下土壤微生物对于土壤质量修复的影响程度及土壤生态功能修复的研究机制。

### 2.2.1 重金属胁迫与土壤各微生物菌群含量的关系

土壤磷脂脂肪酸的含量即表示土壤中菌群的生物量,实验室中人为添加污染物的处理方式的不同会对土壤中 PLFA 的含量产生了一定程度的影响<sup>[15]</sup>.分别对实验测得 PLFA 按照革兰氏阳性菌(G<sup>+</sup>)、革兰氏阴性菌(G<sup>-</sup>)、AM 真菌(AM Fungi)、真菌(Fungi)、放线菌(Actinomycete)以及真核生物(Eukaryote)进行分类,并计算出不同菌群在土壤微生物总量中所占的比例。

由表 2 和图 2 可知,NJ 土壤样品的抵抗力偏小,而恢复力较大,说明该土壤样品应对环境胁迫的初始适应能力并不强,但对污染物的容纳能力很强.此外呼吸曲线处于一直上升趋势表明土壤中所添加污染物的浓度处于对土壤微生物呼吸起促进和刺激作用的状态,而通过 PLFA 检测分析发现 NJ 土壤在 T7、T15、T30 等 3 个取样点时,NJ-1 的 G<sup>+</sup>和 G<sup>-</sup>含量分别呈低于、基本持平、高于 NJ-2 的状态,这表明 NJ 土壤中的 G<sup>+</sup>和 G<sup>-</sup>菌群在 30 d 内均能够基本修复铜胁迫带来的影响;此外 NJ-1 中的 AM 真菌、真菌、放线菌在 30 d 内也呈现一定的衰减趋势,而真核生物则明显高于 NJ-2,这说明重金属胁迫对 NJ 土壤中真核生物的呼吸起主导作用,也说明铜对土壤中 AM 真菌、真菌、放线菌起到抑制作用。

表 2 不同土壤的生态功能抵抗力、恢复力以及稳定性

Table 2 Soil ecological functional resistance, resilience and stability in different areas

表征变量 Variable	NJ	ZZ	XM
Rt-f(1)	0.72	1.01	1.50
Rl-f(30)	1.08	1.23	0.30
Sb	28.22	29.06	19.67

ZZ 土样在培养期内其呼吸曲线呈先下降再上升的趋势,转折点为 T15,即在 T15 土壤呼吸强度达到了最低值,也间接说明 ZZ 土样 T15 对 AM 真菌、真菌、放线菌及真核生物的抑制作用要大于对 G<sup>+</sup>和 G<sup>-</sup>生长繁殖的刺激作用.此外从图 2 中还可发现,加入重金属第 30 天后,ZZ-1 和 ZZ-2 的差异性并不明显,说明 ZZ 在 30 d 内已经基本恢复土壤所承受的重金属胁迫,恢复力较强。

对于 XM 土壤而言,T7 时 XM-1 中 G<sup>+</sup>要远小于 XM-2,即该土样在添加铜胁迫 7 d 后有很大一部分 G<sup>+</sup>被 G<sup>-</sup>、AM 真菌及放线菌所取代.XM 土壤在加入胁迫后的 15 d 后,重金属导致土壤中的部分真菌及

真核生物被破坏,且 AM 真菌、G-及放线菌的菌群均未表现出数量上的明显变化,从而导致 G+所占比例上升.而在 T30 时则显示 AM 真菌、放线菌及 G-会被 G+和真核生物菌群所代替,与 NJ 在 T30 时 G-占绝对比重的情况相反,故导致 XM 在受到  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的铜污染时并没有及时恢复到正常状况,这说明不同种类的土壤在遭受同等浓度的重金属胁迫后其微生物群落结构会发生与其生态功能稳定性一致的变化.这与微生物群落结构变化导致了该微生物群落所执行的生态功能发生了变化<sup>[16]</sup>的研究结论一致.

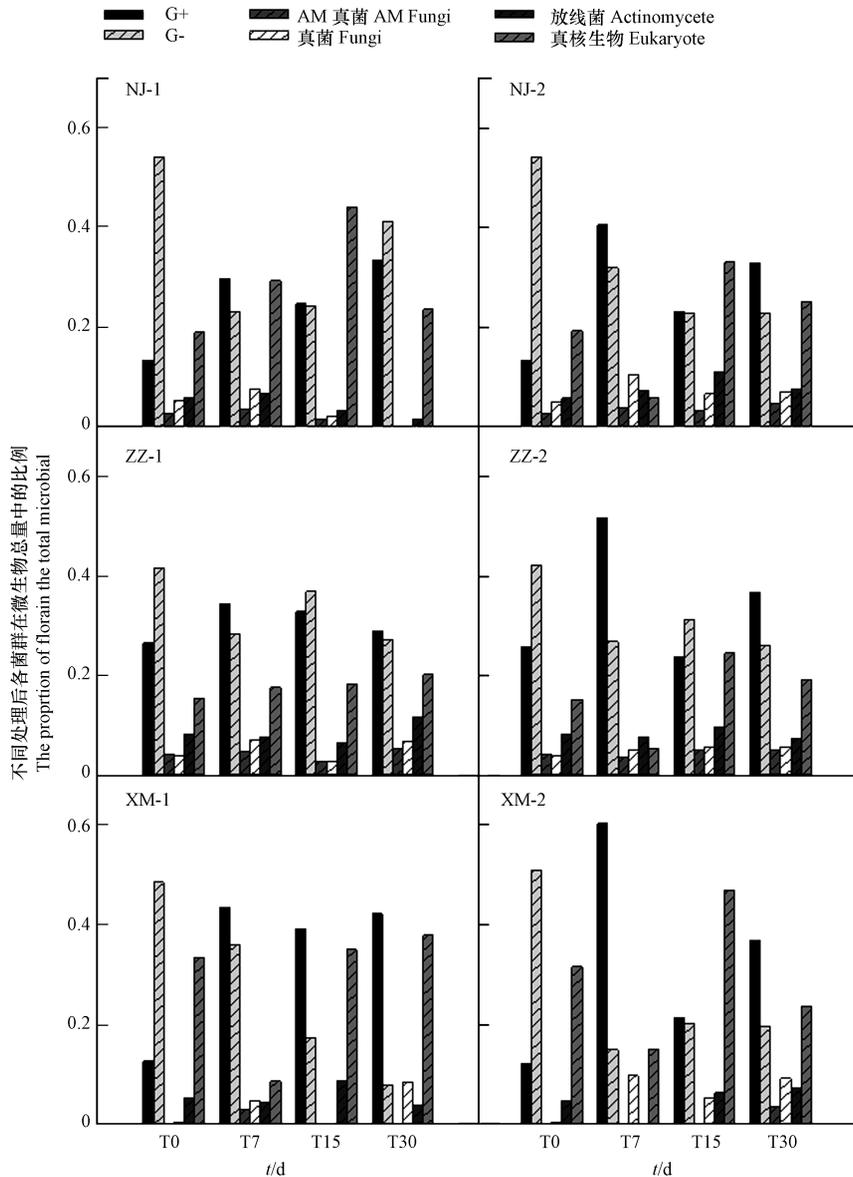


图 2 不同处理方式下各菌群在微生物总量中的比例

Fig.2 The proportion of flora in the total microbial under different treatment

从上述说明可得出,污染物在土壤中扩散完全后,会对土壤中的不同的微生物菌群产生或刺激或抑制的作用,从而对微生物呼吸强弱产生直接影响,故需探究重金属胁迫下不同土壤稳定性高低,以此来判断不同土壤环境对重金属的容纳力.此外研究还发现对不同土壤样品,AM 真菌在添加重金属污染胁迫 15 d 后总会出现一定程度的下降,而在处理组中可检测到 AM 真菌的土壤类型其恢复能力较强,所以 AM 真菌的存在对土壤呼吸起到一定的促进作用,且土壤中 AM 真菌含量高低与微生物呼吸强度随培养时间的变化趋势一致,即 AM 真菌可作为土壤微生物活性的指示性菌种,从而有效判断土壤的稳定性.有相关研究也表明,AM 真菌是一种能够显著提升土壤中宿主植物对重金属污染的耐受能力的真菌<sup>[17-20]</sup>,它可减轻重金属对植物生长造成的危害,这说明在加入重金属污染物质以后,可通过适当提高

土壤中 AM 真菌的相对含量来提高土壤应对抵抗外界添加重金属污染的能力,从而提高土壤生态系统抵抗重金属污染的稳定性,使其在重金属胁迫下能保持相对稳定。

### 2.2.2 土壤微生物 PLFA 主成分分析

磷脂脂肪酸是几乎所有活体细胞膜的主要成分,脂肪酸结构与种类多样,对环境变化极为敏感,因此分析土壤微生物群落 PLFAs 组成可反映出土壤修复过程中各时期的细微差异<sup>[21]</sup>。通过 SPSS 22.0 对测得 PLFA 的种类进行主成分分析,结果表明,NJ-1、NJ-2、ZZ-1、ZZ-2、XM-1、XM-2 处理中前两个主成分分别可以解释总变异的 75.460%、86.770%、87.380%、79.747%、80.934%、83.932%。相较而言,NJ 和 XM 在人为添加重金属后,前两个主成分的总变异程度反而降低,说明土壤微生物菌群在受到重金属胁迫后发生了不可逆的变化,导致总变异程度与未加胁迫组产生较为明显的差异。而与此相反,ZZ 土壤在加入重金属后其总变异程度升高,这可能是由于重金属诱导土壤中的优势微生物产生耐性机制,从而促使其微生物种群发生了更大程度上的变异。

本研究选用 18:2 w6 指示真菌,18:1 w9 指示革兰氏阴性菌,而 i 15:0/i 16:0/i 17:0 则用来指示革兰氏阳性菌<sup>[22]</sup>。研究通过测定不同培养时间不同 PLFA 种类的情况发现,NJ 土壤处理组和对照组中 5 种菌随着时间均呈先升高后降低的趋势,转折点在 T7。ZZ-1 中 5 种菌含量呈先升高再下降随后上升的趋势,转折点分别是 T7/T15;而在 ZZ-2 中波动幅度均不大,保持较平稳的状态。XM-1 中 i 15:0/18:2 w6/18:1 w9 呈先升高后降低再升高的趋势,转折点是 T7/T15,而 i 16:0/i 17:0 则呈先升高后降低的趋势;XM-2 中 i 15:0/i 16:0/i 17:0 检测含量均较低,而 18:1 w9/18:2 w6 呈先升高后降低再升高。

本研究通过 PLFA 的提取来探究土壤生态系统的微生物群落结构,研究发现无论是否加入胁迫物质,土壤中均会形成 G+ 菌群,但铜胁迫会对 G+ 所在的位置造成一定的影响。重金属胁迫对 PLFA 种类及 G+ 菌群所含的菌种丰度有一定的抑制作用,并促使 PLFA 的整体分布较为分散,故对于抵抗外界重金属胁迫,土壤的微生物多样性、均匀度和丰度均会发生明显变化。Hinojosa 等<sup>[23]</sup>研究重金属污染对土壤生态系统的影响,显示真菌标志脂肪酸、菌根真菌标志脂肪酸、革兰氏阳性菌标志脂肪酸随污染程度升高而降低,未污染土壤总脂肪酸的丰富度和分散度均高于污染土壤,支持了上述结论。此外在 NJ-2 和 ZZ-2 中均提取到分布较为集中的放线菌菌群,而处理组的放线菌则离散在不同区域,由于放线菌是土壤微生物的重要组成部分,对不同重金属具有吸附作用<sup>[24]</sup>,故重金属胁迫使放线菌分布逐渐分散的现象说明一定量的重金属对放线菌的聚集有抑制作用。

### 2.2.3 土壤微生物群落 PLFA 生物标记生态学参数

本研究对 NJ/ZZ/XM 的土壤在 T0、T7、T15、T30 所获得的各 PLFA 计算出样本中的分布频次(S)及 Simpson 优势度(D)、Shannon-Wiener 多样性(H)、PieLou 均匀度(J)指数等参数,本节选取以下 6 种菌 16:3 w6/18:2 w6/18:1 w9/i 15:0/i 16:0/i 17:0 作为指示性菌种,其计算结果见表 3。实验中共检测到土壤微生物群落 PLFAs 生物标记 65 个,各生物标记在各处理中出现的频次 1—12,3 个生态学参数 D、H 和 J 指数变化范围分别为 0.6162—1.0000、0—2.6168、0.0666—1.0531。

研究发现经过铜胁迫培养 30 d 后,不同 PLFA 的优势度指数整体值均较大,但仍有小幅度的上升或下降,说明铜胁迫对微生物中的优势度影响较小。其中 3 种土壤的 16:3 w6 的优势度均远低于其他种类的 PLFA,说明 16:3 w6(真核生物)在土壤微生物菌群中的优势种地位并不突出,在群落中的数量分布并不均匀。PieLou 均匀度是和物种丰富度有关的均匀度指数,在研究生物群落多样性对功能的作用时通常会考虑物种丰富度的变化,本研究分别对 18:1 w9、18:2 w6、i 15:0/i 16:0/i 17:0 5 个菌种在 3 种土壤(处理组和对照组)中的均匀度进行比较,发现 NJ/ZZ 土壤处理组中 5 个指示菌种的均匀度均低于对照组,说明铜胁迫对这 2 种土壤的真菌、G- 和 G+ 的均匀度(丰富度)均有抑制作用,且其抵抗力均会有一定程度的下降,这与抵抗力与群落的物种丰富度显著相关的结论一致<sup>[25]</sup>。而 XM 土壤中的 i 16:0/i 17:0 在处理组的均匀度高于对照组,这可能与 XM 土壤的生态功能稳定性(见表 2)过低有关,这两种指示菌种的均匀分布会抑制土壤修复铜胁迫的过程。

本研究发现 NJ/ZZ 的 Shannon-Wiener 指数处理组相对对照组 18:1 w9、18:2 w6、i 15:0/i 16:0/i 17:0 均下降;而 XM 的 18:1 w9、18:2 w6、i 15:0 呈下降趋势,而 i 16:0/i 17:0 呈上升趋势,将其与土壤微生物的呼吸曲线进行比较,且有文章指出生物多样性与某种特定生态系统功能之间存在正相关关系,表明生

物多样性大的土壤其生态功能稳定性好<sup>[26]</sup>,这说明对于稳定性好的土壤,其真菌、G-和 G+并非导致土壤呼吸强度大幅度升高的优势菌群;而稳定性较差的土壤中总会有更多种类 PLFA 其多样性降低,导致其呼吸作用减弱.这与滕应等<sup>[27]</sup>在研究铅锌银尾矿污染区土壤微生物时发现,细菌、放线菌及真菌的数量均出现了显著降低,且细菌对重金属污染的敏感性要大于真菌的结果基本一致.

表 3 土壤微生物群落 PLFA 生物标记各多样性指数

Table 3 The diversity index of PLFA biomarkers in various soil microbial community

处理方式 Treatment	生态学参数* Ecological parameters	PLFA 种类 Species of PLFA					
		16:3 w6	i 15:0	i 16:0	i 17:0	18:2 w6	18:1 w9
NJ-1	S	12	12	6	6	9	9
	H	2.6168	1.0223	0.2541	0.2319	1.0366	0.9037
	J	1.0531	0.4114	0.1418	0.1294	0.4718	0.4113
	D	0.7417	0.9926	0.9995	0.9995	0.9849	0.9911
NJ-2	S	12	12	8	7	12	12
	H	2.5426	1.3513	0.5289	0.3034	1.9163	1.4998
	J	1.0232	0.5438	0.2543	0.1559	0.7712	0.6036
	D	0.7428	0.9855	0.9973	0.9993	0.9571	0.9802
ZZ-1	S	12	12	11	10	12	12
	H	2.2214	1.4759	0.6987	0.5589	1.4980	1.5895
	J	0.894	0.5940	0.2914	0.2427	0.6028	0.6397
	D	0.8976	0.9804	0.9968	0.9982	0.9770	0.9764
ZZ-2	S	12	12	12	12	12	12
	H	2.1339	1.6030	0.8721	0.6344	1.4990	1.7307
	J	0.8587	0.6451	0.3510	0.2553	0.6032	0.6965
	D	0.8725	0.9768	0.9959	0.9980	0.9816	0.9696
XM-1	S	12	6	3	3	7	7
	H	1.8175	0.5400	0.3247	0.3625	0.9540	0.5443
	J	0.7314	0.3014	0.2955	0.3300	0.4902	0.2797
	D	0.8741	0.9954	0.9969	0.9947	0.9799	0.9956
XM-2	S	12	6	3	0	10	10
	H	2.5325	0.5630	0.1941	0.0000	1.6490	1.0310
	J	1.0192	0.3142	0.1767	0.0000	0.7162	0.4477
	D	0.6162	0.9944	0.9993	1.0000	0.9560	0.9887

注:S 指分布频次;D 指 Simpson 优势度指数;H 指 Shannon-Wiener 多样性指数;J 指 Pielou 均匀度指数.

Note: S refers to distribution frequency; D refers to Simpson dominance index; H refers to Shannon-Wiener diversity index; J refers to Pielou evenness index.

#### 2.2.4 土壤微生物 PLFA 生物标记聚类分析

本研究以分布频次、优势度、Shannon-Wiener 指数、均匀度等参数为指示指标,以 PLFA 生物标记为样本,构建分析矩阵.用平均距离法对矩阵进行系统聚类分析,阐明不同种类 PLFA 的相似程度.所得结果见图 3(以 NJ 为例).

研究发现,NJ/ZZ/XM 的处理组和对照组在 T30 的 PLFA 聚类分析分类结果相似,但每一类中具体存在的 PLFA 种类略有差别.但将 T0 和 T30 的聚类分析结果作比较则差异性比较大,T0 的聚类结果在同一相似水平下会将不同种类的 PLFA 分成更多类,例如在最小分类等级上看,NJ 土壤在第 0 天可分为 8 类,而在处理组的第 30 天则可分为 5 类,对照组第 30 天可分为 4 类,而 ZZ 和 XM 的聚类情况也呈现相同的变化,即 PLFA 的聚类数  $T0 \geq$  处理组 T30  $\geq$  对照组 T30,说明在培养过程中,同一培养环境下土壤中的 PLFA 种类会随时间增加趋于统一,且该趋势要比添加胁迫的土壤还要剧烈,也间接反映了铜胁迫

会促使土壤中发生阻碍其微生物均匀性和多样性趋于统一的反应。

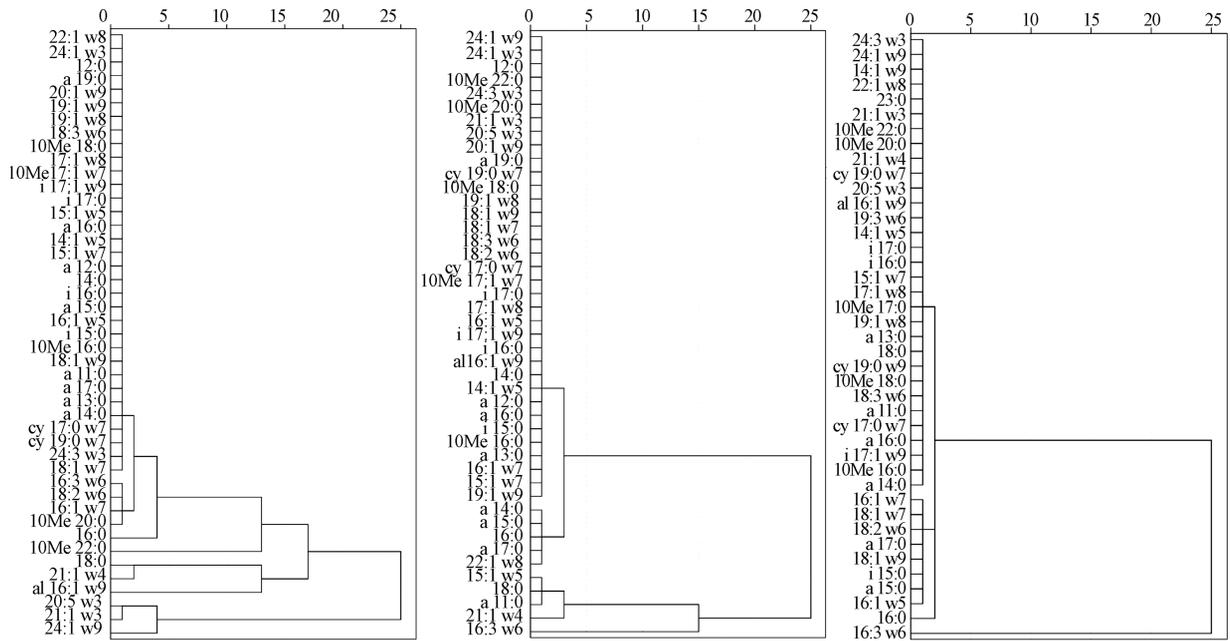


图3 NJ土壤微生物群落PLFA的聚类分析(从左至右分别是NJ-T0,NJ1-T30,NJ2-T30)

Fig.3 Clustering analysis of PLFA for NJ soil (from left to right are NJ-T0, NJ1-T30, NJ2-T30)

有相关研究表明在我国东部的地带性土壤中,土壤微生物的群落结构分布情况明显是有一定差异的,所以不同类型的土壤在聚类分析时也会呈现不同的分类结果,而对于具体的微生物种类在地带性土壤上的分布规律有待于进一步探讨<sup>[23]</sup>。

### 3 结论(Conclusion)

(1) 重金属胁迫对AM真菌的多样性和均匀性有明显抑制作用,减弱了其抵抗外界胁迫的能力,且AM真菌可作为土壤微生物活性的指示性菌种,从而有效判断土壤的稳定性。

(2) 重金属胁迫对PLFA种类及G+菌群所含的菌种丰度有一定的抑制作用,且会促使PLFA的整体分布趋于分散。

(3) 在培养过程中,同一培养环境下时间增加会让土壤中的PLFA种类趋于统一,而重金属胁迫会发生阻碍该趋势的反应。

致谢:感谢南京师范大学邓欢老师及其团队对本项目实验的技术支持。

#### 参考文献(References)

- [1] 徐磊,周静,崔红标,等. 重金属污染土壤的修复与修复效果评价研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(20): 161-167.  
XU L, ZHOU J, CUI H B, et al. Research progress in remediation and its effect evaluation of heavy metal contaminated soil[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(20): 161-167 (in Chinese).
- [2] DENG H. A review of diversity-stability relationship of soil microbial community: What do we not know? [J]. Journal of Environmental Sciences, 2012, 24(6): 1027-1035.
- [3] YU Z Q. Microbial remediation of heavy metal (loid) contaminated soil: A review[J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(1): 85-91.
- [4] XIE X, LIAO M, MA A, et al. Effects of contamination of single and combined cadmium and mercury on the soil microbial community structural diversity and functional diversity[J]. Chinese Journal of Geochemistry, 2011, 30(3): 366-374.
- [5] 李小林,颜森,张小平,等. 铅锌矿区重金属污染对微生物数量及放线菌群落结构的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(3): 468-475.  
LI X L, YAN S, ZHANG X P, et al. Response of microbe quantity and actinomycetes community of heavy metal contaminated soils in

- leadzinc mine[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(3): 468-475(in Chinese).
- [ 6 ] 李晶, 刘玉荣, 贺纪正, 等. 土壤微生物对环境胁迫的响应机制[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(4): 959-967.  
LI J, LIU Y R, HE J Z, et al. Insights into the responses of soil microbial community to the environmental disturbances[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(4): 959-967(in Chinese).
- [ 7 ] 贺纪正, 李晶, 郑袁明. 土壤生态系统微生物多样性-稳定性关系的思考[J]. *生物多样性*, 2013, 21(4): 411-420.  
HE J Z, LI J, ZHENG Y M. Thoughts on the microbial diversity-stability relationship in soil ecosystems[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 411-420(in Chinese).
- [ 8 ] 陈欣瑶, 陈楸健, 李敏, 等. 农业土壤生态功能稳定性的影响因素及其相关性分析[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2015, 46(6): 838-846.  
CHEN X Y, CHEN Q J, LI M, et al. Influence factors of ecological function stability of soil and their correlation[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2015, 46(6): 838-846(in Chinese).
- [ 9 ] ZHANG B, DENG H, WANG H L et al. Does microbial habitat or community structure drive the functional stability of microbes to stresses following re-vegetation of a severely degraded soil? [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42(5): 850-859.
- [ 10 ] TRÖGL J, JIRKOVÁ I, ZEMÁNKOVÁ P, et al. Estimation of the quantity of bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst via phospholipid fatty acids content: A preliminary study[J]. *Folia Microbiologica*, 2013, 58(2): 135-140.
- [ 11 ] 林营志, 刘波, 张秋芳, 等. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸生物标记分析程序 PLFAEco[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(14): 286-290.  
LIN Y Z, LIU B, ZHANG Q F, et al. The development of the program plfaeco for analysis of the phospholipid fatty acids (PLFAs) biomarkers detected from the microbial community in soil samples[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(14): 286-290(in Chinese).
- [ 12 ] 张秋芳, 刘波, 林营志, 等. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸 PLFA 生物标记多样性[J]. *生态学报*, 2009, 29(8): 4127-4137.  
ZHANG Q F, LIU B, LIN Y Z, et al. The diversity of phospholipid fatty acid (PLFA) biomarker for the microbial community in soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(8): 4127-4137(in Chinese).
- [ 13 ] FLIEPBACH A, MARTENS R, REBER H. Soil microbial biomass and activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge [J]. *Soil Biol Bio Chem*, 1994, 26(9): 1201-1205.
- [ 14 ] WITTEBOLLE L, MARZORATI M, CLEMENT L, et al. Initial community evenness favours functionality under selective stress [J]. *Nature*, 2009, 458(7238): 623-626.
- [ 15 ] BOSSIO D A, SCOW K M, GUNAPALA N, et al. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipids fatty acid profiles[J]. *Microbial Ecology*, 1998, 36(1): 1-12.
- [ 16 ] GRIFFITHS B S, PHILIPPOT L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community [J]. *FEMS Microbiology Review*, 2013, 37(2): 112-129.
- [ 17 ] HILDEBRANDT U, REGVAR M, BOTHE H. Arbuscularmycorrhiza and heavy metal tolerance [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(1): 139-146.
- [ 18 ] GHRE V, PASZKOWSKI U. Contribution of the arbuscularmycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation [J]. *Planta*, 2006, 223(6): 1115-1122.
- [ 19 ] FEDDERMANN N, FINLAY R, BOLLER T, et al. Functional diversity in arbuscularmycorrhiza the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency[J]. *Fungal Ecology*, 2010, 3(1): 1-8.
- [ 20 ] MIRANSARI M. Hyperaccumulators, arbuscularmycorrhizal fungi and stress of heavy metals[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 645-653.
- [ 21 ] 白震, 何红波, 张威, 等. 磷脂脂肪酸技术及其在土壤微生物研究中的应用[J]. *生态学报*, 2006, 26(7): 2387-2394.  
BAI Z, HE H B, ZHANG W, et al. PLFAs technique and its application in the study of soil microbiology[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(7): 2387-2394(in Chinese).
- [ 22 ] MARTA A P, AMOROSO M J, ABATE C M. Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(4): 660-667.
- [ 23 ] HINOJOSA M B, CARREIRA J A, GARCIA-RUIZ R, et al. Microbial response to heavy metal-polluted soils: Community analysis from phospholipid-linked fatty acids and ester-linked fatty acids extracts[J]. *J Environ Qual*, 2005, 34(5): 1789-1800.
- [ 24 ] 吴愉萍. 基于磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析技术的土壤微生物群落结构多样性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.  
WU Y P. Studies on soil microbial community structure based on phospholipid fatty acid (PLFA) acid analysis[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009(in Chinese).
- [ 25 ] VAN ELSAS J D, CHIURAZZI M, MALLON C A, et al. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2012, 109(4): 1159-1164.
- [ 26 ] WORM B, BARBIER E B, BEAUMONT N, et al. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services [J]. *Science*, 2006, 314(5800): 787-790.
- [ 27 ] 滕应, 黄昌勇, 龙健, 等. 铅锌银尾矿污染区土壤微生物区系及主要生理类群研究[J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(4): 408-411.  
TENG Y, HUANG C Y, LONG J, et al. Microbial pollutions and major physiological groups in soils contaminated by tailing from Pb, Zn and Ag mine[J]. *Journal of Agro-environment Science*, 2003, 22(4): 408-411(in Chinese).