

长江中下游两种典型水稻土微生物对砷污染的响应

汪峰^{1,2}, 类成霞³, 蒋瑀霁¹, 陈长青³, 孙波^{1*} (1.中国科学院南京土壤研究所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏南京 210008; 2.宁波市农业科学研究院, 浙江宁波 315040; 3.南京农业大学应用生态研究所, 江苏南京 210095)

摘要: 基于温室盆栽实验, 利用磷脂脂肪酸分析(PLFA)方法研究了 As 污染、土壤类型和水稻品种对水稻抽穗期土壤微生物群落的影响。结果表明, 水稻土壤中微生物生物总量(总 PLFAs)以及微生物组成均不同程度的受到了 As 污染、土壤类型及水稻品种的影响; As 污染增加了土壤总 PLFAs, 黄泥田的土壤总 PLFAs、真菌/细菌(F/B)、革兰氏阳性细菌/阴性细菌(G⁺/G⁻)、腐生真菌/丛枝菌根真菌(SF/AMF)显著高于红泥田; 在黄泥田中, 种植籼稻品种的土壤总 PLFAs 较杂交稻和粳稻品种平均减少 30.0%, 而在红泥田中平均增加 24.8%。偏 Mantel 检验和冗余分析(RDA)表明土壤 pH 值、DOC、NH₄⁺ 和 As 浓度是驱动水稻土微生物群落演变的主控因子, 其中受 As 影响较大的特征 PLFAs 包括 20:0、i17:1 ω 9c、18:1 ω 9c、cy17:0 和 18:3 ω 6c; ABT 预测模型显示水稻品种和土壤类型对总 PLFAs、F/B、G⁺/G⁻ 和 SF/AMF 指标的贡献相对较大, 而 As 处理的影响较小。

关键词: 砷; 水稻品种; 红泥田; 黄泥田; 磷脂脂肪酸

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2014)11-2931-11

Response of microbial community to arsenic contamination in two major type of paddy soils in the middle and lower reaches of the Yangtse River. WANG Feng^{1,2}, LEI Cheng-xia³, JIANG Yu-ji¹, CHEN Chang-qing³, SUN Bo¹ (1.State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2.Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China; 3.Institute of Applied Ecology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China). *China Environmental Science*, 2014,34(11): 2931~2941

Abstract: In a pot experiment, the effects of As contamination, soil type and rice cultivar on the composition of soil microbial communities in rice heading stage were analyzed using phospholipid fatty acid (PLFA) technique. The results unveiled that the amount of total PLFAs and microbial compositions were to some extent affected by arsenic contamination, soil types and rice cultivars. The As contaminated soils had a higher amount of total PLFAs than the uncontaminated soils. Yellow Paddy soils (YP) had higher total PLFAs, fungi to bacteria ratio (F/B), Gram-negative bacteria to Gram-positive bacteria ratio (G⁺/G⁻) and saprotrophic fungi to arbuscular mycorrhizal fungi ratio (SF/AMF) than in Red Paddy soils (RP). Total PLFAs associated with *indica* plants vs. those associated with *japonica* and *hybrid* plants decreased by an average of 30.0% in YP, but increased by 24.8% in RP. Partial Mantel tests and redundancy analysis (RDA) showed that soil pH, DOC, NH₄⁺ and As concentration were the dominant factors in shaping soil microbial communities. The individual PLFAs including 20:0, i17:1 ω 9c, 18:1 ω 9c, cy17:0 and 18:3 ω 6c were easily affected by As contamination. Aggregated boosted tree (ABT) analysis suggested that soil types and rice cultivars exerted more influence than As concentration on the variation of parameters of total PLFAs, F/B, G⁺/G⁻ and SF/AMF.

Key words: arsenic; rice genotype; red paddy soil; yellow paddy soil; phospholipid fatty acid (PLFA)

砷在地表系统中含量丰富并广泛分布, 影响了环境质量^[1-2]。近年来, 随着工业化、城市化和农业集约化, 大量砷污染物进入农田系统, 特别是影响了东南亚地区水稻的安全生产, 威胁了人体健康^[3-5]。与旱地作物相比, 栽种水稻的淹水厌氧环境提高了水稻籽粒对砷的吸收效率, 导致砷成为

对水稻最具威胁的有毒污染物^[6]。我国南方是水

收稿日期: 2014-02-28

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDB15030200); 国家“973”项目(2011CB100506); 农业部公益性行业科研专项(200903015)

* 责任作者, 研究员, bsun@issas.ac.cn

稻的主产区,面对日益增加的农田砷污染风险,需要提出土壤-作物系统的综合管理措施,阻控砷污染对水稻安全生产的影响。

土壤微生物参与了砷元素地球化学循环中的还原、氧化和甲基化过程,影响了土壤质量和植物健康^[7-9]。土壤微生物对砷污染的耐性不同,不同的砷污染状况可以改变土壤微生物的种群结构,从而影响其生态功能。目前,建立指示土壤砷污染的土壤微生物指标,揭示不同气候、土壤和作物条件下砷污染对土壤微生物结构和功能的影响机制已经成为国际研究热点^[10-14]。在稻田系统中,水稻品种和土壤类型一方面直接影响土壤微生物的生存环境条件,另一方面也影响了土壤砷的形态和有效性,因此对土壤微生物群落的变化产生多重交互影响。植物主要通过输入有机物质驱动了土壤微生物群落的变化,不同植物的基因型显著影响了微生物群落的结构^[15-18]。对水稻的研究也表明,根际微生物的组成显著受水稻品种的影响,不同籼稻品种的根际细菌群落结构极为相似,但在籼稻与粳稻品种之间存在显著差异^[16]。土壤类型通过影响土壤微生物的生存环境条件(如 pH 值、Eh 等)也改变了微生物群落的分布和结构^[19-20]。另一方面,水稻品种和土壤类型同时也影响了砷的生物有效性^[21]。然而土壤类型、水稻品种和砷污染三者对水稻土微生物群落变化的交互作用规律和影响机制仍不清楚,而这是预测砷污染下水稻土微生物结构变化、建立微生物功能调控措施的理论基础。

磷脂脂肪酸(PLFA)是活体微生物细胞膜的重要组分,不同类群的微生物通过不同的生化过程合成不同的 PLFAs,因此 PLFAs 可作为分析微生物量和微生物群落结构变化的标记物^[22]。PLFA 图谱已被广泛应用于研究不同污染物胁迫下微生物群落的变化^[14,23-25]。本研究针对我国长江中下游水稻主产区的两种典型水稻土(江苏的黄泥田和江西的红泥田),选择 9 个不同的水稻品种(杂交稻、粳稻和籼稻各 3 个),设置 As 污染条件下不同水稻品种的温室盆栽实验,利用 PLFA 分析方法研究 As 污染对土壤中微生物群落结构的影响,分析土壤类型、水稻品种和 As 污染对土

壤中微生物群落结构变化的交互作用,揭示驱动微生物群落变化的主控因子,为制定砷污染稻田的土壤管理对策提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

在长江下游地区的江苏常熟(31°36'N, 120°35'E)和中游地区的江西鹰潭(28°12'N, 116°57'E),分别采集了黄泥田水稻土(YP)和红泥田水稻土(RP)。黄泥田水稻土发育于湖积物,红泥田水稻土发育于第四纪红黏土母质,分别属于铁聚和筒育水耕人为土^[26]。

采集 500kg 无污染稻田的表层土壤(0~15cm),在去除石块和根系等杂质后,自然风干,磨碎过筛(5mm)后备用。供试水稻土的基本理化性质如表 1 所示,两种水稻土均为酸性土,黄泥田水稻土的有机质、阳离子交换量、全钾和全砷含量约为红泥田水稻土的 2 倍。称取 7kg 风干土壤置于外径 36cm、高 30cm 的 PVC 塑料盆钵中,按二级土壤环境质量标准(30mg/kg)的 1.5 倍加入 Na_3AsO_4 溶液^[21,27],并设空白对照,即黄泥田加 As 处理(YP-As)及对照(YP-CK)、红泥田加 As 处理(RP-As)及对照(RP-CK)4 个处理,保持 80%的田间持水量平衡 3 个月备用。水稻盆栽实验于 2010 年 6~10 月在南京中山植物园的温室大棚中进行。

供试水稻为我国南方水稻产区的常见品种,包括 3 个籼型杂交稻品种(Hybrid):德农 2000(DN)、天协 6 号(TX)、冈优 118(GY),3 个粳稻品种(Japonica):晚粳 9707(WJ)、宁粳 1 号(NJ)、南粳 32(NanJ),3 个籼稻品种(Indica):中育 1 号(ZY)、特三矮 2 号(TSA)、浙 1500(Zhe)。精选供试水稻的饱满种子,经过杀菌发芽然后在育秧盘中育秧,于三叶一心期移栽到 PVC 盆中(6 月 22 日),每种水稻重复 3 盆,每盆 3 穴,每穴 3 株。水稻移栽前一周(6 月 16 日)除草并淹水 3~5cm,施入基肥,其中 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$:0.15g/kg, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$:0.04g/kg, K_2SO_4 :0.10g/kg(相当于 150kgN/hm², 40kg P/ha², 100kgK/ha²),并于分蘖期追施尿素 0.075g/kg。移栽后全生育期保持盆钵土面上 2~3cm 左右水层^[21,27]。于 2010 年 8 月 30 日采集处于水稻抽穗

期 0~15cm 耕层土壤样品.具体方法为:在每盆 3 株水稻中间,将灭菌的 20mL 注射器(已剪去尖头)压到表层土壤中,同时抽动活塞,待注射器内形成土柱后拔出,用活塞推出注射器中土柱样品.每盆

取 3 次,混合土样并去除植物残根后分为 2 份.1 份土样风干后用于基本理化性质分析;另一份放入 4℃ 冰箱保存,在 2 周内用于测定硝态氮、铵态氮和微生物组成.

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of the studied soils

水稻土	pH 值	有机质 (g/kg)	阳离子交换量 (cmol/kg)	全氮 (g/kg)	全磷 (g/kg)	全钾 (g/kg)	全砷 (mg/kg)	有效砷 (mg/kg)
红泥田(RP)	5.07	20.75	9.39	1.86	0.53	8.88	4.29	0.22
黄泥田(YP)	6.15	46.06	17.98	1.31	0.51	15.81	9.04	0.31

1.2 环境因子的测定

土壤 pH 值采用玻璃电极测定(水土比 2.5:1)^[28];土壤有效砷的含量用 0.5mol/L 的 NaHCO₃ 震荡浸提(水土比 10:1),双道原子荧光光度计测定;土壤氨态氮和硝态氮用 1.0mol/L KCl 溶液浸提,流动分析仪测定;可溶性有机碳(DOC)和可溶性有机氮(DON)的提取和测定参考 Jones 和 Willett 法^[29],利用岛津 TOC-5050A 总有机碳仪测定滤液中的 DOC 和总氮(TN)含量,总氮减去无机氮量即为 DON 的量.根系生物量和籽粒产量在水稻收获后完成测定.

1.3 磷脂脂肪酸分析

磷脂脂肪酸的提取采用修改的 Bligh-Dyer 法^[30-31].PLFAs 组成用 MIDI Sherlock 微生物鉴定系统(MIDI, Newark, DE, USA)分析.以 19:0 脂肪酸甲酯(FAME)作为内标加入样品,按照峰面积比值定量分析 PLFA 的含量.将 i15:0、a15:0、i16:0、i17:0、a17:0 划分为革兰氏阳性细菌(G⁺),将 16:1 ω 7c、17:1 ω 8c、18:1 ω 7c、cy17:0 划分为革兰氏阴性细菌(G⁻),G⁺和 G⁻之和计为细菌生物量;以 16:1 ω 5c 作为丛枝菌根真菌(AMF)的标记,以 18:1 ω 9c 和 18:2 ω 6,9c 作为腐生真菌(SF)的标记,AMF 和 SF 之和计为真菌生物量;以 10Me16:0、10Me17:0 和 10Me18:0 作为放线菌的标记^[32].

1.4 数据处理及统计分析

在进行多元排序分析之前对土壤 PLFAs 图谱进行降噪处理.首先删除 PLFA 测定中的不确定数据,即 3 个重复样品只检出 1 次的土壤样品

的测定值;然后将 PLFAs 的含量测定值转化为相对丰度值,获得物种分布表格,在对物种和环境因子数据标准化后,进行降趋势对应分析(DCA)和冗余分析(RDA).

聚类推进树分析(ABT)分析能够较好地预测和解释不同类型的环境变量对微生物群落分布的相对贡献率^[33-34],本研究中利用 ABT 分析 3 个因子(土壤类型、水稻品种、砷污染处理)对土壤中活性微生物群落组成的相对重要性.

单因素和多因素方差分析(ANOVA)用统计软件 SPSS16.0(SPSS Inc., Chicago, Illinois)完成;DCA、RDA 和 ABT 分析在 R-2.13.2(<http://www.R-project.org>)中完成,其中 DCA 和 RDA 利用“vegan”软件包,ABT 使用“gbmplus”软件包.

2 结果

2.1 土壤微生物生物量

土壤中提取的 PLFAs 总量可以用于定量土壤微生物的生物量.本研究中不同处理下土壤总 PLFAs 的平均值为 49.88nmol/g 干土,变幅为 25.89~85.10nmol/g 干土(图 1).

As 污染、水稻品种和土壤类型显著影响了 ($P < 0.01$)土壤总 PLFAs.与对照相比,As 污染总体上增加了土壤总 PLFAs,但在不同的土壤和水稻品种条件下其增幅不同.在黄泥田(YP)和红泥田(RP)中,As 污染使土壤总 PLFAs 分别增加了 24.8%和 6.6%;在 YP 中所有水稻品种 As 污染处理中总 PLFAs 均呈增加趋势,而在 RP 中只有 4 个水稻品种(TX、NanJ、ZY、TSA)表现为上升

趋势(图 1).不同水稻土中,种植的水稻品种对总 PLFAs 的影响不同.在 YP 中,种植籼稻品种的土壤 PLFAs 总量较杂交稻和粳稻品种平均减少 30.0%,而在 RP 中平均增加 24.8%.黄泥田水稻土的 PLFAs 总量显著高于红泥田,在对照处理(无 As 污染)和 As 污染条件下,YP 的总 PLFAs 分别比 RP 高 13.3%和 34.6%.

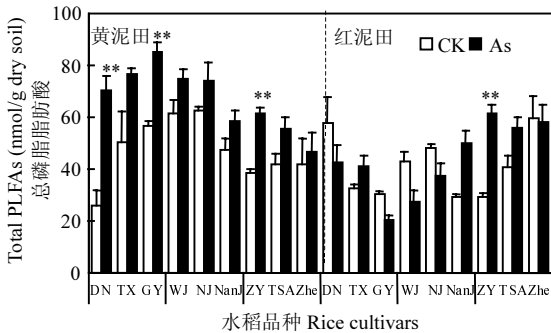


图 1 不同水稻品种、土壤类型和 As 处理中磷脂脂肪酸总量的变化

Fig.1 Total PLFAs for soil microbial biomass as affected by rice cultivar, soil type and As treatments

图中的数据为 3 次重复的平均值±标准误差表示,并采用 *t* 检验不同 As 处理的差异性,** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

不同类群微生物生物量占土壤 PLFAs 总量的比例顺序为:细菌>真菌>放线菌,细菌中革兰氏阳性细菌(G^+)比例较大.不同类群微生物生物量同样受 As 污染、水稻品种和土壤类型的影响,其变化趋势与土壤总 PLFAs 的变化相似(表 2).As 污染显著增加了黄泥田中不同微生物类群的生物量,而在红泥田中 As 污染的影响不显著.在不同的水稻品种中,对照处理下红泥田中种植杂交稻 DN 的土壤细菌和真菌生物量最高,比种植粳稻 NanJ 分别高出 1.0 和 1.6 倍(表 2).黄泥田大部分类群的微生物生物量较高,尤其是在 As 污染下,YP 的真菌和放线菌生物量比 RP 高 2 倍(表 2).在 As 污染处理下,黄泥田中种植 GY 后土壤细菌、 G^+ 和 G^- 生物量最高,而红泥田中最低,说明品种和土壤类型有交互作用.

2.2 土壤微生物群落结构

不同处理下共检测出 64 种 PLFA 类型,检测到的脂肪酸碳原子个数从 9 到 20,包括饱和的、不饱和的、分支的和环状的 PLFAs;其中有 18 种 PLFAs 在所有土壤样品中普遍存在,占 PLFAs 类型的 82.3%,但其相对丰度存在差异.土壤优势 PLFAs 主要由 16:0、18:1 ω 9c(SF)、i15:0(G^+)、18:0、16:1 ω 7c(G^-)和 a15:0(G^+)构成,占样品 PLFAs 类型的 50.0%.

As 污染、水稻品种和土壤类型显著影响了土壤 PLFAs 图谱.a14:0 和 17:0 2OH 仅在种植了 DN 的土壤中检出;a17:1 和 20:4 ω 6c 仅存在于 RP 中,而 i10:0、10Me19:0 和 9:0 仅存在于 YP 中;a17:1 ω 9c 仅存在于无砷污染的土壤,i20:0 和 9:0 3OH 仅存在于砷污染土壤.

真菌/细菌(F/B)、革兰氏阳性细菌/阴性细菌(G^+/G^-)和腐生真菌/丛枝菌根真菌(SF/AMF)可以表征土壤微生物群落的结构特征,这些比值均受 As 污染、水稻品种和土壤类型的综合影响(图 2).总体上,黄泥田的 F/B、 G^+/G^- 和 SF/AMF 显著高于红泥田.

对于黄泥田,在种植杂交稻品种处理中,As 污染提高了 F/B;但在种植籼稻的处理中,As 污染降低了 F/B.对于红泥田,在种植杂交稻和粳稻(DN 和 NanJ 除外)的处理中,As 污染使 F/B 明显下降,而在种植籼稻 ZY 的处理中,As 污染增加了 F/B.

与对照相比,As 污染处理大多降低了土壤 G^+/G^- .对于黄泥田,未污染条件下种植 DN 的土壤 G^+/G^- 明显低于其他 8 个水稻品种;As 污染条件下,种植杂交稻和粳稻(除 NanJ)比种植籼稻的 G^+/G^- 低.对于红泥田,在未污染处理中,种植 TX、GY、NanJ、ZY 的 G^+/G^- 较高;在 As 污染条件下种植 DN、TSA 和 Zhe 的 G^+/G^- 较低.

与对照相比,As 污染处理大多降低了黄泥田的 SF/AMF(ZY、Zhe 除外),但在红泥田中变化不显著.在黄泥田中,未污染处理下,种植 WJ 和 TSA 的 SF/AMF 值最高;As 污染处理下,种植 DN 和 NanJ 的 SF/AMF 相对较低.以上表明土壤微生物群落是受 As 污染、水稻品种和土壤类型等因素综合影响的结果.

表 2 不同水稻品种、土壤类型和 As 处理中细菌、真菌、放线菌、革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌的 PLFAs 量
Table 2 The amounts of bacterial PLFAs, fungal, actinobacterial, Gram-positive bacterial and Gram-negative bacterial PLFAs (nmol g⁻¹ dry weight) as affected by rice cultivar, soil type and As treatments

土壤	基因型	品种	细菌		真菌		放线菌		革兰氏阳性细菌		革兰氏阴性细菌	
			CK	As	CK	As	CK	As	CK	As	CK	As
YP	杂交稻	DN	7.6±1.9g	*18.8±2.9abc	3.1±0.5g	*10.9±1.2ab	0.7±0.1de	*2.5±0.4a	4.2±0.7e	*12±2abc	3.3±1.3c	6.9±0.9abcd
		TX	14.6±3.7abdefg	*18.4±0.9abcd	7.1±1.9bcd	12±0.9a	1.3±0.5abcd	2.1±0.1abcd	9.8±2.3abcd	12±0.7abc	4.8±1.4bc	6.4±0.2bcde
		GY	16.2±0.8abcde	22.9±1.1a	8.4±0.3abc	*13.3±0.6a	1.5±0.1abc	*2.2±0.2abc	11±0.3abc	*14.4±0.6a	5.2±0.5bc	*8.5±0.5a
	粳稻	WJ	16.8±1.6abcd	20.2±0.2ab	10.3±0.7a	10.6±1.1ab	1.6±0.2ab	*2.3±0.1ab	11.4±0.8ab	12.6±0.1ab	5.4±0.9bc	7.6±0.1ab
		NJ	17.8±0.4abc	20.2±2.1ab	9.5±0.2ab	13±1.9a	1.7±0.1a	2.1±0.3abcd	12±0.2a	12.7±1.5ab	5.8±0.2bc	*7.5±0.5abc
		NanJ	13.4±1.8cdefg	16.7±1.7bcde	7.1±0.4bcd	7.3±0.8cde	1.1±0.1abcd	1.5±0def	8.9±1.2abcd	11.3±0.8bcde	4.6±0.6bc	5.4±0.9cdef
	籼稻	ZY	10.4±0.5efg	*16±0.4bcdef	6.3±0.1cdef	*9±0.5bc	1±0bcde	*1.6±0bcde	7.1±0.4de	*10.6±0.1bcde	3.3±0.2c	*5.4±0.3cdef
		TSA	11.1±0.9defg	*16.6±1.6bcdef	6.6±0.6cde	8.1±0.6bcd	1±0.1abcde	1.6±0.2cde	7.4±0.5cde	*10.9±1bcde	3.7±0.5c	5.7±0.6bcdef
		Zhe	11.7±3defg	13.3±2.3efg	7.1±1.7bcd	6.7±1cde	0.9±0.5cde	1.3±0.3efg	8±1.9bcd	8.9±1.5def	3.7±1.1c	4.4±0.8efg
平均值		13.3±0.8	*18.1±0.7	7.3±0.5	*10.1±0.5	1.2±0.1	*1.9±0.1	8.9±0.6	*11.7±0.4	4.4±0.3	*6.4±0.3	
RP	杂交稻	DN	20.2±2.6a	*11.8±1.5fgh	7.7±1bcd	5.1±1.5efg	1±0.1abcde	1.1±0.3efgh	11.4±1ab	*6.5±0.7fg	8.8±1.8a	5.3±1def
		TX	10.7±0.5efg	*13.8±0.9defg	4.2±0.4efg	4.9±1efgh	0.8±0.1cde	0.8±0.1fgh	7±0.4de	8.6±0.5ef	3.7±0.2c	*5.3±0.5def
		GY	10.1±0.6efg	*8±0.5h	3.7±0.5fg	*2.1±0.2h	0.3±0.2e	0.4±0.1h	6.7±0.5de	5.3±0.3g	3.5±0.3c	2.7±0.2g
	粳稻	WJ	12.5±0.2cdefg	10.5±1.7gh	5.2±0.4defg	*2.5±0.5gh	0.8±0cde	0.7±0.2gh	7.8±0.2bcde	6.8±1.1fg	4.7±0.1bc	3.7±0.6fg
		NJ	14.2±0.4bcdefg	14.3±1.4cdefg	6.6±0.5cde	*3.5±0.5fgh	0.9±0cde	0.9±0.1efgh	8.2±0.2bcd	9±0.8cdef	6±0.2bc	5.3±0.6def
		NanJ	10±0.3fg	*14.3±1.4cdefg	3±0.3g	*4.7±0.6efgh	0.6±0.1de	*0.9±0.1efgh	6.7±0.2de	*9±0.6cdef	3.3±0.1c	5.3±0.8def
	籼稻	ZY	10.1±0.1efg	*17.6±1.3bcde	2.9±0.1g	*7.6±1.1cde	0.6±0de	0.9±0.5efgh	6.8±0.2de	*11.2±0.4bcde	3.3±0.2c	*6.4±0.8abcde
		TSA	14.2±2.2bcdef	19.1±1.1abc	4.3±1efg	5.8±0.4def	1±0.2abcde	1.2±0.1efg	8.9±1.4abcd	11.6±0.6abcd	5.3±1bc	7.5±0.4abc
		Zhe	19.6±3.4ab	18.5±1.3abcd	7.6±1bcd	5.8±0.5def	1.5±0.4abc	1.2±0.1efg	12.5±2.8a	11.1±0.5bcde	7.2±0.7ab	7.3±0.8abcd
平均值		13.5±0.9	14.2±0.8	5±0.4	4.7±0.4	0.8±0.1	0.9±0.1	8.4±0.5	8.8±0.5	5.1±0.4	5.4±0.3	

注:同列数值后的不同字母表示不同品种间差异显著(P<0.05);*表示不同As处理间差异显著(P<0.05)

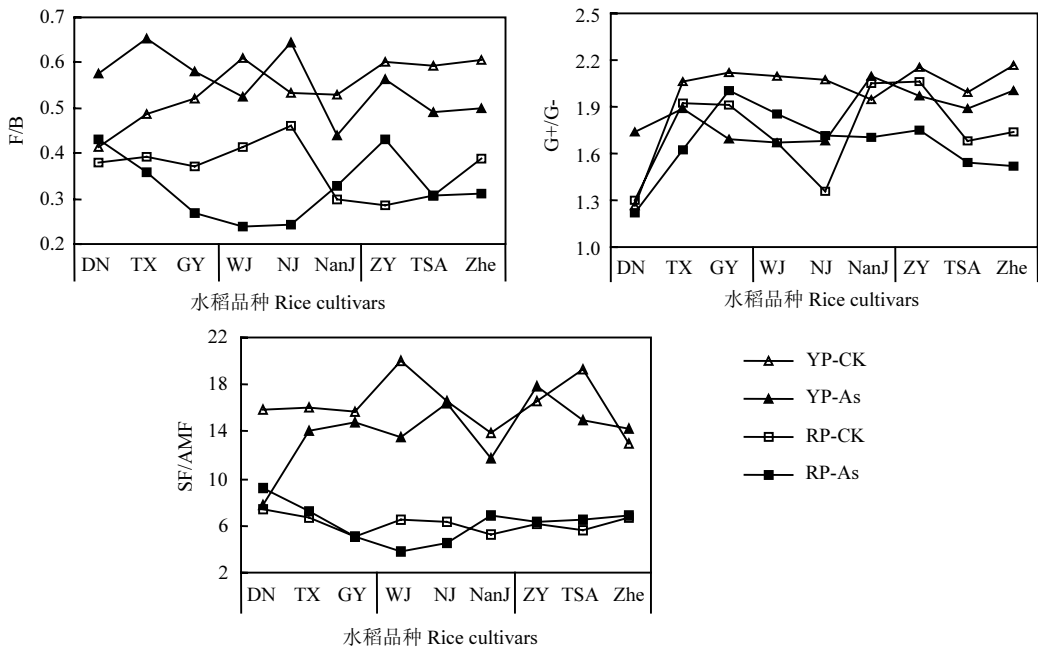


图 2 不同水稻品种、土壤类型和 As 处理中真菌/细菌(A)、革兰氏阳性细菌/革兰氏阴性细菌(B)和腐生真菌/丛枝菌根真菌(C)变化

Fig.2 Changes in ratios of F/B (A), G⁺/G⁻ bacteria (B) and SF/AMF (C) as affected by rice cultivar, soil type and As treatments

2.3 微生物群落与环境因子的关系

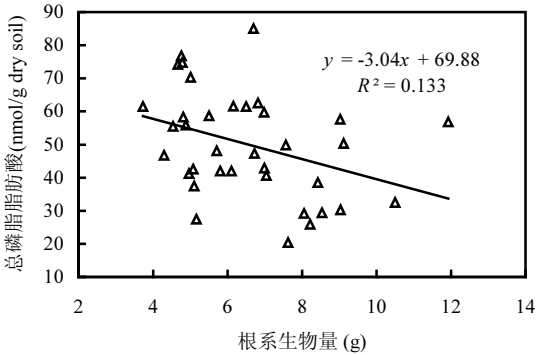


图3 水稻根系生物量与土壤微生物总磷脂脂肪酸之间的皮尔森相关性

Fig.3 Pearson correlation between rice root biomass and soil total PLFAs

相关分析表明,水稻根系生物量不仅与土壤总PLFAs呈显著线性相关(图3),也与细菌、放线菌及G⁻细菌PLFAs有显著负相关关系($P < 0.05$).偏Mantel分析表明土壤pH值、As、DOC和NH₄⁺含量对土壤中的微生物群落组成有显著的影响($P < 0.05$),而

DON、C/N、NO₃⁻和根系生物量对微生物群落的影响不显著(表3).生物与环境相关分析(BIOENV)结果也表明解释土壤微生物群落结构特征的最佳环境因子是土壤pH($r = 0.706$),余下依次为组合因子pH和NH₄⁺($r = 0.629$);pH、DOC和NH₄⁺($r = 0.604$);pH值、As、DOC和NH₄⁺($r = 0.540$).

表3 偏Mantel检验环境因子和微生物群落结构相关性的显著性

Table 3 The significance of correlations between environmental variables and microbial community structures assessed using partial Mantel test

因子 Variables	r 值	P
pH	0.635	0.000
As	0.103	0.029
DOC	0.169	0.012
NH ₄ ⁺	0.182	0.016
DON	-0.085	0.878
C/N	0.017	0.355
NO ₃ ⁻	-0.066	0.822
根系生物量	-0.134	0.994

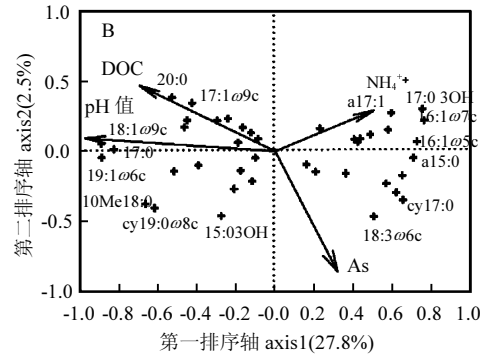
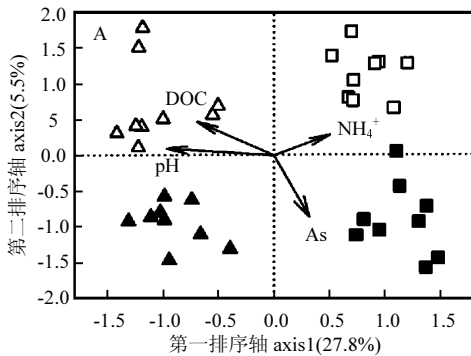


图4 不同水稻品种、土壤类型和As处理中PLFAs图谱的冗余排序分析(A)和PLFAs的载荷因子分析(B)

Fig.4 Redundancy analysis (RDA) ordination biplot of the PLFAs pattern (A) from different soil samples under rice cultivar, soil type and As treatments and loadings of the individual PLFAs (B) from the RDA of the PLFA data

环境因子的选择是基于表3中偏Mantel的结果;土壤类型和As处理的样品分别用不同的形状和填充表示:黄泥田(三角形)、红泥田(方形)、未加砷处理(白色填充)、加砷处理(黑色填充)

通过排序方法能够直观地反映出群落结构与环境因子之间关系.通过DCA分析PLFAs图谱得到每个轴的长度均 < 3 ,说明基于线性模型的冗余分析(RDA)能够较好地进行PLFAs图谱分析.第一排序轴和第二轴分别解释了27.8%和

5.5%的总变异(图4).从图中可以看出第一排序轴的正轴方向分布着红泥田的样品,负轴方向分布着黄泥田样品;As污染的土壤与对照样品按第二轴区分开来.土壤pH和DOC与第一轴呈负相关关系,而NH₄⁺与其呈正相关;As浓度与第二轴

呈负相关关系(图 4A).单一 PLFAs 载荷分析表明土壤 pH 主要影响的磷脂脂肪酸类型是 18:1 ω 9c(SF)、19:1 ω 6c、17:0、16:1 ω 5c(AMF)、a15:0(G^+)、16:1 ω 7c(G^-)和 i17:0 3OH; NH_4^+ 影响的主要类型是 a17:1、10Me 18:0(放线菌)和 cy19:0 ω 8c;As 和 DOC 影响的主要是 20:0、i17:1 ω 9c、18:1 ω 9c(SF)、cy17:0(G^-)和 18:3 ω 6c.以上结果表明土壤 pH、DOC 和 NH_4^+ 和 As 污染均显著影响土壤微生物群落结构.

2.4 土壤类型、砷污染和水稻品种对土壤微生物

群落结构的相对贡献

ABT 模型能够较好地预测不同类型环境变量对某一微生物指标的相对贡献率.ABT 分析结果(图 5)表明,水稻品种对土壤总 PLFAs 的影响最大(52%),其次是土壤类型(30%)和 As 污染(18%).影响 F/B 和 SF/AMF 变化的相对贡献率顺序均表现为:土壤类型>水稻品种>As 污染,对 G^+/G^- 变化的相对贡献率大小为:水稻品种>土壤类型>As 污染.综上所述,土壤类型和水稻品种对微生物群落结构影响较大,而 As 污染对其影响相对较小.

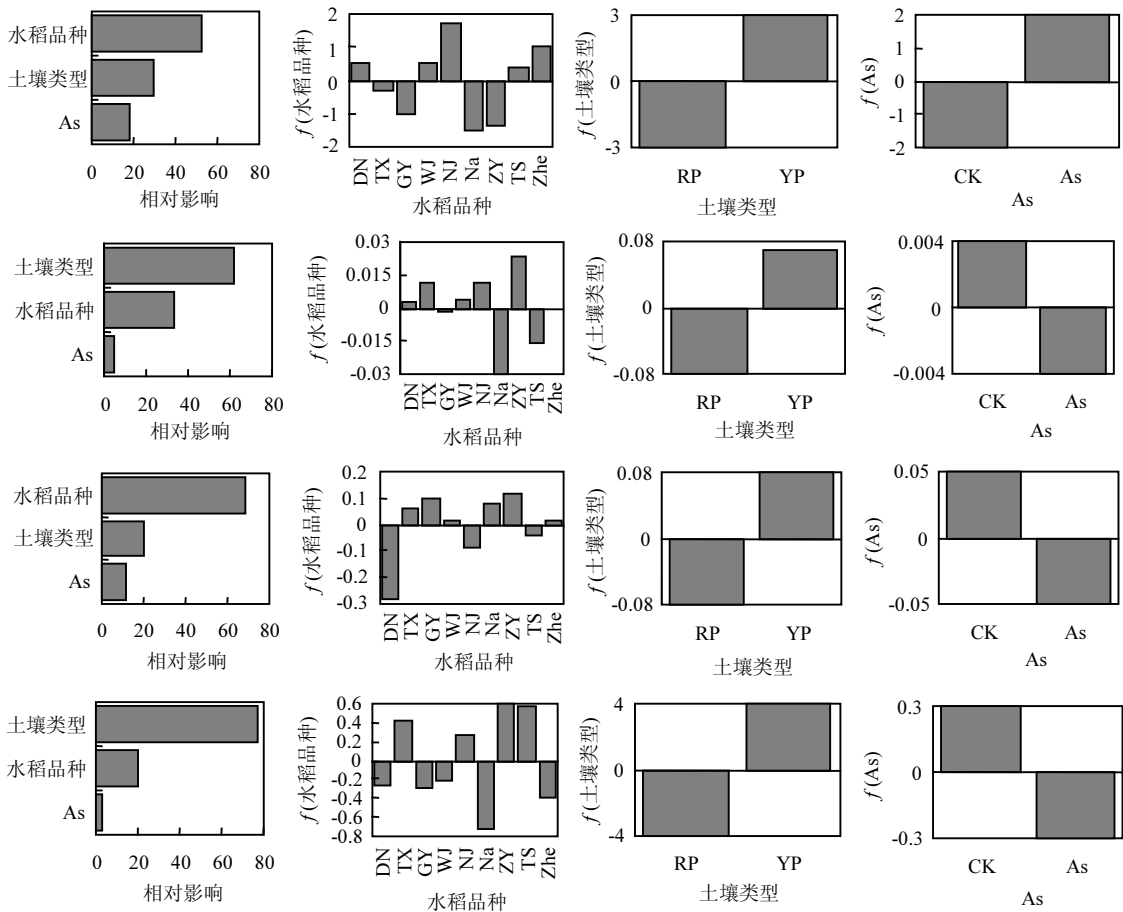


图 5 基于 ABT 模型预测水稻品种、土壤类型和 As 浓度对土壤微生物总 PLFAs (A)、F/B (B)、 G^+/G^- (C)和 SF/AMF (D)的相对重要性

Fig.5 Relative importance and partial dependency plots of predictors for total PLFAs (A), F/B (B), G^+/G^- (C) and SF/AMF (D) by aggregated boosted tree (ABT) model using rice cultivar, soil type and As concentration as predictors

ABT 预测模型显示 9 个水稻品种对总 PLFAs、F/B、 G^+/G^- 和 SF/AMF 的影响表现不一

致,例如 DN、WJ、NJ、TSA、Zhe 对微生物量表现为正向作用,其余 4 个品种表现为负向作用;

土壤类型对以上 4 种微生物指标的影响表现一致,黄泥田对土壤 PLFA 总量、F/B、 G^+/G^- 和 SF/AMF 有正向作用,而红泥田是负向作用;As 污染对微生物量具有正向作用,但对 F/B、 G^+/G^- 和 SF/AMF 均表现为负向作用。

3 讨论

3.1 土壤微生物群落对 As 污染的响应

由于不同微生物对 As 胁迫下的耐受力不同,微生物生物量、群落组成、代谢活性和生物学功能均不同程度地受到 As 污染的影响^[10-13]。本研究结果表明了土壤中的活体微生物群落结构在 As 作用下发生改变(图 4),这与以上的报道一致。然而 As 污染条件下增加了土壤 PLFAs 总量(图 1),与以往的研究结果不同。Edvantoro 等研究表明,As 污染(34~2941mg/kg)条件下微生物量碳、真菌数量及呼吸熵剧烈下降,但细菌的数量变化不大^[11];Ghosh 等^[12]发现不同提取态的 As(其中 NaHCO_3 提取态 0.5~6.1mg/kg)与微生物生物量和土壤呼吸显著负相关。重金属对微生物的抑制作用程度与土壤性质、植被、污染物浓度以及微生物类群等因素有关^[11]。本研究中导致 As 污染增加微生物量的原因可能是,As 添加量为土壤质量二级标准的 1.5 倍(45mg/kg),有效 As 含量范围为 1.77~4.01mg/kg,因此 As 污染水平较低;水稻土中部分微生物对低浓度 As 污染有较高的耐受力,甚至以 As 作为其生长的能源^[35],因此低浓度的 As 促使适应性较强的微生物迅速大量积累,致使土壤微生物量有所上升,土壤微生物群落结构发生了变化。

本文研究结果显示 7 种特定 PLFAs 与土壤中有效 As 浓度存在极显著的相关性($P < 0.01$),其中 cy17:0、18:3 ω 6c 和 i17:1 ω 9c 的含量随 As 浓度的升高而增加,而 10:0、10:0 3OH、11:0 和 17:0 随 As 浓度的升高而减少。已有的研究表明革兰氏阴性菌的典型脂肪酸 cy17:0 在重金属污染的土壤中相对含量会上升^[36];cy17:0/16:1 ω 7c 和 i17:0+i15:0/a17:0+a15:0 的值反映着外界环境条件对微生物的胁迫作用^[37-38],本研究表明了微生物在重金属污染物存在的条件下能合成更多的反式脂肪酸,使

i17:0+i15:0/a17:0+a15:0 的值下降,而促进 cy17:0 的前体 16:1 ω 7c 合成 cy17:0,使 cy17:0/16:1 ω 7c 的值上升。尽管低浓度的 As 污染促使部分耐受菌迅速积累成为优势菌群导致土壤微生物总量有所增加,但微生物群落结构的改变仍然可能给土壤养分转化等功能带来不利影响^[10]。

3.2 As 污染下土壤类型对土壤微生物群落的影响

不同类型土壤中的微生物类群有着较大的差异,由于耐受力不同导致不同类型土壤中微生物对污染物的响应不一致。对于本研究中两种不同水稻土壤,微生物指标如土壤总 PLFAs、F/B、 G^+/G^- 和 SF/AMF 对 As 污染的响应存在显著差异(图 1 和图 2);相同土壤类型的样品中 PLFAs 图谱更为相似(图 4),因此土壤类型影响微生物对 As 响应的方向。

土壤性质中的 pH 值、DOC 和 NH_4^+ 含量是驱动微生物群落结构变化的关键因子(表 3 和图 4)。土壤 pH 在区域尺度(从国家到洲际)上驱动了土壤细菌多样性的变化^[20,39]。在阔叶林系统中,土壤 F/B 随着 pH 的增加(3.0~7.2)而略微升高,归属 AMF 的 16:1 ω 5c 和归属 G^+ 的 16:1 ω 7c 与 pH 呈正相关^[40]。本文的研究结果也表明,水稻土 pH 不仅与 F/B($r^2=0.854, P < 0.01$)存在显著相关,也与 G^+/G^- ($r^2=0.366, P < 0.05$) 和 SF/AMF ($r^2=0.823, P < 0.01$) 有较高的相关性;水稻土中 19 种 PLFAs 与 pH 极显著相关($P < 0.01$),但其中的 16:1 ω 5c 和 16:1 ω 7c 与 pH 值均呈负相关,这可能是水稻土与森林土壤在其他性质(如有机质)方面的差异所致。

可溶性有机碳(DOC)主要来源于植物根系分泌物中可溶性糖、有机酸和氨基酸^[27]。前期研究表明^[27],As 污染下黄泥田中 DOC 的平均含量(39.27mg/kg)高于红泥田(33.32mg/kg),不同水稻土中 DOC 与土壤有效 As 含量呈显著负相关,但与土壤 pH 呈显著正相关。本研究发现 DOC 与真菌 PLFA ($r^2=0.371, P < 0.05$)、F/B ($r^2=0.708, P < 0.01$)、SF/AMF ($r^2=0.601, P < 0.01$) 呈显著正相关,说明在水稻土中 DOC 的变化可以预测真菌群落的变化。而在湿地土壤中,由于土壤碳含量较高导致对微生物群落结构影响不大,而土壤 pH 显著

影响了土壤微生物组成^[41]。因此,土壤 pH 和活性有机质含量在 As 污染下的变化共同影响了土壤微生物的变化。

3.3 As 污染下水稻品种对土壤微生物群落的影响

种植不同品种水稻的土壤中微生物对 As 污染的反应也存在着差异。作物通过根系向土壤中分泌大量的糖类、氨基酸、维生素等有机物质,影响了土壤微生物数量和组成;植物的选择作用也影响了土壤中与植物共生(如根瘤菌)和非共生的细菌组成^[15,42]。此外,作物基因型也影响了根际微生物群落结构^[16-18]。本研究中水稻品种影响了总 PLFAs、F/B、G⁺/G⁻和 SF/AMF(图 5),不但种植杂交稻、粳稻和籼稻的土壤微生物群落之间存在着差异,同一基因型中不同品种之间的差异也较大。这与 Hardoim 等^[16]的研究不同,他们发现不同籼稻品种的根际土壤中细菌群落相似,而籼稻与粳稻之间存在较大差异。可能原因是本研究中选择的 9 个水稻品种之间在生长状况和根系分泌物方面的差异更大,水稻籽粒产量和根茎叶的生物量结果已经表明存在显著差异^[21]。

不同水稻品种的根系分泌物数量和组成存在较大的差异。研究表明,水稻品种 PI312777 和辽粳 9 号的根系分泌物中所含的碳水化合物总量、葡萄糖、氨基酸等明显不同^[43]。耐低磷水稻品种与低磷敏感型品种根系分泌物中检出的有机酸的种类和数量均有不同^[44]。种植 9 个水稻品种后,土壤中溶解性碳氮含量存在显著差异在一定程度上反映了不同水稻品种根系分泌物的不同^[27]。作者的前期研究表明,9 个水稻品种对 As 的吸收和积累的效率差异明显^[21],因此不同水稻品种对 As 的耐受力不一致导致地上生物量存在差异。长期野外控制实验表明,植物产量和多样性共同影响了土壤微生物的生物量、活性和组成^[45]。因此,As 污染下不同品种水稻分泌物的数量和组成共同变化,这些变化同时影响了土壤微生物生物量及群落组成。

针对不同类型的水稻土,可以筛选和种植合适水稻品种,同时配合土壤性质改良,从而有效地调控土壤微生物结构,应对 As 污染对土壤微生物

物功能的影响。由于利用单一的 PLFA 法研究土壤微生物的群落变化存在一定的局限性^[46],未来需要联合高通量测序和功能基因芯片等高分辨率的微生物分子生态学方法,深入研究水稻不同生育期土壤微生物结构的变化,同时分析土壤微生物养分转化功能的变化,筛选水稻土污染的敏感监测指标。

4 结语

针对长江中下游水稻主产区的两种典型水稻土,结合温室盆栽模拟实验和 PLFA 分析方法,研究了在不同土壤类型及水稻品种条件下,土壤微生物群落对低浓度 As 污染的反应。研究表明土壤总 PLFAs、细菌、真菌、放线菌、革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌 PLFAs 均不同程度的受到了 As 污染、土壤类型及水稻品种的影响;不同样品间微生物群落结构也存在着差异,pH 值、DOC 和 NH₄⁺和 As 浓度是驱动微生物变化的主要因素;ABT 预测模型揭示了低浓度的 As 处理对微生物群落影响相对较小,而水稻品种和土壤类型的相对贡献率大。

参考文献:

- [1] Mandal B K, Suzuki K T. Arsenic round the world: a review [J]. *Talanta*, 2002,58(1):201-235.
- [2] Tamaki S, Frankenberger W T. Environmental biochemistry of arsenic [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1992,124:79-110.
- [3] Fendorf S, Michael H A, van Geen A. Spatial and temporal variations of groundwater arsenic in South and Southeast Asia [J]. *Science*, 2010,328(5982):1123-1127.
- [4] Khan M A, Stroud J L, Zhu Y G, et al. Arsenic bioavailability to rice is elevated in Bangladeshi paddy soils [J]. *Environmental Science and Technology*, 2010,44(22):8515-8521.
- [5] Zhu Y G, Williams P N, Meharg A A. Exposure to inorganic arsenic from rice: A global health issue? [J]. *Environmental Pollution*, 2008,154(2):169-171.
- [6] Su Y H, McGrath S P, Zhao F J. Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley [J]. *Plant and Soil*, 2010,328(1/2):27-34.
- [7] Cai L, Liu G H, Rensing C, et al. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils [J]. *BMC Microbiology*, 2009,9:

- [8] Ye J, Rensing C, Rosen B P, et al. Arsenic biomethylation by photosynthetic organisms [J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(3):155-162.
- [9] Jia Y, Huang H, Zhong M, et al. Microbial arsenic methylation in soil and rice rhizosphere [J]. *Environmental Science and Technology*, 2013,47(7):3141-3148.
- [10] Xiong J, Wu L, Tu S, et al. Microbial communities and functional genes associated with soil arsenic contamination and the rhizosphere of the arsenic-hyperaccumulating plant *Pteris vittata* L [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010,76(21):7277-7284.
- [11] Edvantoro B B, Naidu R, Megharaj M, et al. Changes in microbial properties associated with long-term arsenic and DDT contaminated soils at disused cattle dip sites [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003,55(3):344-351.
- [12] Ghosh A K, Bhattacharyya P, Pal R. Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India [J]. *Environment International*, 2004,30(4):491-499.
- [13] Lorenz N, Hintemann T, Kramarewa T, et al. Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006,38(6):1430-1437.
- [14] Turpeinen R, Kairesalo T, Håggbloom M M. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004,47(1):39-50.
- [15] Philippot L, Raaijmakers J M, Lemanceau P, et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013,11(11):789-799.
- [16] Hardoim P R, Andreote F D, Reinhold-Hurek B, et al. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars [J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2011,77(1):154-164.
- [17] Aira M, Gómez-Brandón M, Lazcano C, et al. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2010,42(12):2276-2281.
- [18] van Overbeek L, van Elsas J D. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008,64(2):283-296.
- [19] Ranjard L, Dequiedt S, Chemidlin Prevost-Boure N, et al. Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity [J]. *Nature Communications*, 2013,4:1434.
- [20] Griffiths R I, Thomson B C, James P, et al. The bacterial biogeography of British soils [J]. *Environ. Microbiol.*, 2011,13(6):1642-1654.
- [21] Ye X X, Sun B, Yin Y L. Variation of As concentration between soil types and rice genotypes and the selection of cultivars for reducing As in the diet [J]. *Chemosphere*, 2012,87(4):384-389.
- [22] Malik S, Beer M, Megharaj M, et al. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water [J]. *Environment International*, 2008,34(2):265-276.
- [23] Pennanen T, Frostegard A, Fritze H, et al. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996,62(2):420-428.
- [24] Feris K, Ramsey P, Frazar C, et al. Differences in hyporheic-zone microbial community structure along a heavy-metal contamination gradient [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003,69(9):5563-5573.
- [25] Frostegard A, Tunlid A, Baath E. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996,28(1):55-63.
- [26] 中国科学院南京土壤研究所土壤系统分类课题组. 中国土壤系统分类检索 [M]. 3 版.合肥:中国科学技术大学出版社 2001:1-275.
- [27] 类成霞,陈长青,蒋瑞莹,等.水稻品种和砷污染对土壤溶解性有机碳氮的影响 [J]. *土壤学报*, 2013,50(1):157-164.
- [28] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法 [M]. 北京:中国农业科技出版社, 2000.
- [29] Jones D, Willett V. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2006,38(5):991-999.
- [30] Zhong W, Gu T, Wang W, et al. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity [J]. *Plant and Soil*, 2010,326(1/2):511-522.
- [31] Brant J B, Sulzman E W, Myrold D D. Microbial community utilization of added carbon substrates in response to long-term carbon input manipulation [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2006,38(8):2219-2232.
- [32] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999,29(2):111-129.
- [33] Ge Y, He J-z, Zhu Y-g, et al. Differences in soil bacterial diversity: driven by contemporary disturbances or historical contingencies? [J]. *The ISME Journal*, 2008,2(3):254-264.
- [34] De'ath G. Boosted trees for ecological modeling and prediction [J]. *Ecology*, 2007,88(1):243-251.

- [35] Wolfe-Simon F, Blum J S, Kulp T R, et al. A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus [J]. *Science*, 2011,332(6034):1163-1166
- [36] Frostegård A, Tunlid A, Baath E. Phospholipid Fatty-Acid Composition, Biomass, and Activity of Microbial Communities from 2 Soil Types Experimentally Exposed to Different Heavy-Metals [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(11):3605-3617.
- [37] Macdonald L M, Paterson E, Dawson LA, et al. Defoliation and fertiliser influences on the soil microbial community associated with two contrasting *Lolium perenne* cultivars [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2006,38(4):674-682.
- [38] McKinley V L, Peacock A D, White D C. Microbial community PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tallgrass prairie soils [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2005,37(10):1946-1958.
- [39] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006,103(3):626-631.
- [40] Bååth E, Anderson T H. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2003,35(7):955-963.
- [41] Hartman W H, Richardson C J, Vilgalys R, et al. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008,105(46):17842-17847.
- [42] Dini-Andreote F, Elsas JD. Back to the basics: The need for ecophysiological insights to enhance our understanding of microbial behaviour in the rhizosphere [J]. *Plant and Soil*, 2013, 373(1/2):1-15.
- [43] Kong C H, Wang P, Zhao H, et al. Impact of allelochemical exuded from allelopathic rice on soil microbial community [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2008,40(7):1862-1869.
- [44] 李德华,向春雷,姜益泉,等.低磷胁迫下水稻不同品种根系有机酸分泌的差异 [J]. *中国农学通报*, 2005,21(11):186-188.
- [45] Zak D R, Holmes W E, White D C, et al. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? [J]. *Ecology*, 2003,84(8):2042-2050.
- [46] Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. Use and misuse of PLFA measurements in soils [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2011,43(8):1621-1625.

作者简介: 汪 峰(1982-),男,安徽潜山人,助理研究员,博士,研究方向为微生物分子生态学.发表论文 13 篇.

关于《中国环境科学》网上投稿的通知

《中国环境科学》编辑部为提高稿件处理的网络化水平和采编工作的效率,及时让作者了解稿件的处理情况,自 2008 年 3 月 1 日起已开通网上投稿查稿系统,请登陆网址: <http://www.zghjcx.com.cn> 点击“作者在线投稿”进行注册后再按要求投稿,点击“作者在线查稿”进行查询.本刊不再接受纸件投稿和电子版稿件的 E-mail 投稿.特此通知.

《中国环境科学》编辑部