

## 蚯蚓肠道对重金属污染土壤微生物群落结构的影响

代金君<sup>1</sup> 张池<sup>1</sup> 周波<sup>1</sup> 孙迎韬<sup>2</sup> 黄钰婷<sup>1</sup> 任宗玲<sup>1</sup> 戴军<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学 资源环境学院/广东省土地利用与整治重点实验室/国土资源部建设用地  
再开发重点实验室/农业部华南耕地保育重点实验室, 广州 510642;  
2. 中国科学院 广州地球化学研究所, 广州 510640)

**摘要** 为研究重金属污染土壤经不同生态类型蚯蚓消化后蚓粪和消化前土壤的微生物群落结构差异, 选取 2 种不同污染特征的重金属污染水稻土, 分别接种表栖型赤子爱胜蚓 *Eisenia fetida* 和内栖型壮伟环毛蚓 *Amyntas robustus* 进行 10 d 室内盆钵培养后采集新鲜蚓粪, 通过变性梯度凝胶电泳技术和序列分析研究蚓粪和对照土壤的微生物种群特征。蚓粪微生物丰富度和 Shannon 指数均明显高于对照土壤 ( $P < 0.05$ ), 微生物群落结构发生变化, 但 2 种蚓粪间微生物多样性指数无显著差异, 群落结构具有一定的相似性。对蚓粪处理的优势条带进行序列分析发现, 主要的优势菌群有: 香味菌属 (*Myroides* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium* sp.)、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium* sp.)、假单胞杆菌属 (*Pseudomonas* sp.)、丛毛单胞菌属 (*Comamonas* sp.)、不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) 以及不可培养细菌。蚯蚓取食重金属污染土壤消化后产生的蚓粪微生物群落结构发生变化, 种群多样性更为丰富; 不同生态类型蚯蚓间的蚓粪微生物群落有一定的相似性, 其优势菌群大多为与金属迁移转化相关的菌群。

**关键词** 重金属污染; 蚯蚓; 新鲜蚓粪; 微生物种群结构; 优势菌群

中图分类号 S 154 文章编号 1007-4333(2015)05-0095-08 文献标志码 A

## Effects of earthworm gut on microbial community structure in heavy metal contaminated soils

DAI Jin-jun<sup>1</sup>, ZHANG Chi<sup>1</sup>, ZHOU Bo<sup>1</sup>, SUN Ying-tao<sup>2</sup>, HUANG Yu-ting<sup>1</sup>, REN Zong-ling<sup>1</sup>, DAI Jun<sup>1\*</sup>

(1. College of Resources and Environment/Guangdong Province Key Laboratory of Land use and consolidation/  
Key Laboratory of the Ministry of Land and Resources for Construction Land Transformation/Key Laboratory of  
Arable Land Conservation in South China of Ministry of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;  
2. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract** Microbial community structures in undigested soil and earthworm casts collected after digestion were studied by inoculating earthworms of two different ecological species in two heavy metal contaminated paddy soils. *Eisenia fetida* (epigeics) and *Amyntas robustus* (anecics) were inoculated in soils for 10 days under lab condition, and then fresh earthworm casts were sampled by gut purging at 23 °C. The microbial community structures in earthworm casts and undigested soil were analyzed by PCR-DGGE and cloning techniques. Higher microbial diversity and Shannon index were found in fresh earthworm casts than in undigested soil ( $P < 0.05$ ). But no significant difference in microbial community structure was found between the casts from different earthworms species. By gel cutting and sequencing and blast comparison, *Myroides* sp. was found in both earthworm casts in soils contaminated by acid mining drainage. *Bacillus* sp. and *Sphingobacterium* sp. were observed in the casts from *E. foetida* as its unique predominant strains, while *Chryseobacterium* sp. was only found in the casts from *A. robustus*. *Pseudomonas* sp. and *Comamonas* sp. were

收稿日期: 2015-01-14

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2012M511819); 国家自然科学基金青年科学基金项目(41201305); 广东省自然科学基金博士启动项目(S2012040007806); 高等学校博士学科点专项科研基金(20124404110022)

第一作者: 代金君, 硕士研究生, E-mail: djnannongda@126.com

通讯作者: 戴军, 教授, 主要从事土壤肥力、土壤生态研究, E-mail: jundai@scau.edu.cn

found in both earthworm casts in alkaline soil contaminated by waste water from Pb/Zn mine; *Acinetobacter* sp. was found in the casts from *E. foetida*; *Chryseobacterium* sp. and *Sphingobacterium* sp. were found in the casts from *A. robustus* as the predominant strains. All the dominant microbial species existed in casts were the bacteria with high tolerance to heavy metal. Earthworm digestion strongly affected bacterial community structure in heavy metal contaminated soils. Microbial diversity was significantly increased by earthworm digestion, but casts from different earthworm species had almost similar microbial communities. The observed dominant bacteria species are more capable of tolerating heavy metal stress.

Key words polymetals pollution; earthworm; fresh earthworm casts; microbial communities; predominant strains

水稻是我国南方粮食生产的主体,但由于金属矿开采而产生的污染物,对稻田土壤重金属污染影响较大,威胁着环境质量和粮食安全<sup>[1]</sup>。蚯蚓作为陆地生态系统中生物量最大的无脊椎动物<sup>[2]</sup>,它对重金属能表现出很高的耐性<sup>[3]</sup>和极强的生物累积能力<sup>[4]</sup>。现有研究发现蚯蚓具有活化重金属作用,然而其中涉及怎样的生物化学机制并不清楚<sup>[5]</sup>。微生物是土壤中最活跃的部分,其对重金属也具有一定的生物吸附、溶解沉淀和氧化还原等作用<sup>[6]</sup>,因此蚯蚓活化重金属机制中微生物种群变化可能是其重要原因之一。一方面,蚯蚓在土壤中的取食活动能显著影响微生物数量<sup>[7]</sup>、活性<sup>[8]</sup>和种群结构特征的变化<sup>[9]</sup>。有研究者发现蚓粪细菌生物量与活性显著增强<sup>[10-11]</sup>。然而这些研究仅局限于草原土等无污染土壤。另一方面,在重金属污染条件下,由于取食、活动和生理特征差异,不同生态类型蚯蚓对土壤微生物种群特征的影响不同<sup>[2]</sup>。聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳法(DGGE)技术能以微生物16S rDNA基因数据库为基础进行序列分析,鉴定细菌种群和检测其多样性和动态变化<sup>[12]</sup>,现已被广泛应

用于土壤微生物群落结构研究中<sup>[13]</sup>。因此,本研究选取华南地区2种不同污染特征的典型矿区水稻土,分别接种表栖型赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)和内栖型壮伟环毛蚓(*Amyntas robustus*),通过DGGE技术对蚯蚓取食前后土壤和蚓粪微生物种群结构进行分析,揭示蚯蚓取食污染土壤前后微生物种群结构变化,旨在为深入研究微生物群落特征变化和重金属形态转化之间的关系,探讨蚯蚓与微生物相互作用活化重金属机制、修复重金属污染土壤提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

#### 1.1.1 供试土壤

选取2种华南地区具有代表性的重金属污染区土壤:酸性矿区土壤(土壤I),为大宝山矿区下游水稻土(24°30'N, 113°45'E);弱碱性矿区土壤(土壤II),为乐昌市练塘村水稻土(25°7'N, 113°22'E)。采样深度0~20 cm,风干后过2.00 mm和0.15 mm筛备用。样品基本理化性质如表1所示。

表1 供试土壤的基本理化性状

Table 1 Main characteristics of the soil used for the pot experiment

项目 Item	污染源 Pollution source	
	酸性矿山废水(土壤 I) Acid mine drainage (Soil I)	铅锌矿山废水(土壤 II) Lead and zinc mine drainage (Soil II)
pH	4.5	7.9
有机质/(g/kg) Organic matter	32.0	64.0
全氮/(g/kg) Total N	1.4	3.2
黏粒含量/% Clay content	26.5	22.8
碳氮比 C/N	13.5	11.7
全量 Pb/(mg/kg) Total Pb	493.1	451.9
全量 Cd/(mg/kg) Total Cd	0.7	1.4
全量 Zn/(mg/kg) Total Zn	246.3	450.5
全量 Cu/(mg/kg) Total Cu	377.6	36.3

### 1.1.2 供试蚯蚓

赤子爱胜蚓为本实验室人工养殖品种, 壮伟环毛蚓采自华南农业大学校园内。供试蚯蚓在实验室稳定培养 1 周后, 选鲜重分别为  $(0.34 \pm 0.06)$  g/条的赤子爱胜蚓和  $(0.42 \pm 0.04)$  g/条的壮伟环毛蚓进行试验。

### 1.2 试验设计

设置 2 组单因素试验, 各组为 3 个处理, 各处理 3 个重复。a 组: DCK 为土壤 I 对照, EDC 为赤子爱胜蚓+土壤 I 处理, ADC 为壮伟环毛蚓+土壤 I 处理; b 组: LCK 为土壤 II 对照, ELC 为赤子爱胜蚓+土壤 II 处理, ALC 为壮伟环毛蚓+土壤 II 处理。

试验于 2013-08-08 开始, 具体方法如下: 称取 1 000 g 过 2 mm 筛的土壤, 装于底部有微孔并放有纱网的塑料盆 (15 cm×11 cm×13.5 cm) 中, 调节土壤水分至 60% 饱和含水量。稳定 48 h 后, 结合 Zhang<sup>[14]</sup> 研究结果及预试验蚯蚓存活情况, 根据试验设计要求向每盆接种约 16.8 g 蚯蚓进行 10 d 盆钵培养, 即赤子爱胜蚓约 50 条/盆, 壮伟环毛蚓约 39 条/盆。为避免蚯蚓逃逸, 在盆面上绑上纱网。室温控制在  $(23 \pm 2)$  °C, 每隔 1 d 采用称重法调节土壤水分含量。培养结束后, 手工分离出蚯蚓, 无菌水洗净后置于灭菌培养皿, 在 23 °C 培养箱中吞吐 24 h 后收集新鲜蚯蚓粪保存备用; 盆钵中的土壤混匀, 取一部分土壤鲜样保存备用。短时间内蚓粪和土壤样品保存于 -20 °C, 待 DNA 提取成功后置于 -80 °C 保存。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品总 DNA 的提取

按照试剂盒 Soil Master DNA Extraction Kit (Felix Biotechnology, LLC) 方法进行蚓粪和土壤样品的总 DNA 提取。使用 Thermo Nano Drop 2000 核酸蛋白定量检测仪测定样品 DNA 的浓度和检查 DNA 的纯度。

#### 1.3.2 PCR 扩增

PCR 扩增主要选取 5' 末端带 GC 夹的 338F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') 和 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') 引物扩增 16S rRNA 的 V3 区可变区, 扩增产物片段约 230 bp。50 μL 反应体系如下: 25 μL Premix Taq, 1.0 μL 上游引物 (10 μmol/μL), 1.0 μL 下游引物 (10 μmol/μL), 2.0 μL 模板 DNA, 用无菌双蒸水补足至 50 μL。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延

伸 30 s, 25 个循环; 随后, 92 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 10 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上检测其纯度。

#### 1.3.3 DGGE 分析

变性梯度从上到下是 35%~60%, DGGE 凝胶选用 8% 聚丙烯酰胺, 其运行条件为: 1×TAE 电泳缓冲液, 60 °C 电泳条件下, 80 V, 13 h。电泳结束后, 使用 SYBR green I 染色 0.5 h, 染色结果于 Gel Doc™ EQ (Bio-Rad) 凝胶成像系统拍照, 用 Quantity One 4.4 软件 (Bio-Rad) 进行图像分析。

#### 1.3.4 DGGE 图谱中部分优势条带的序列分析

对选定的优势菌进行割胶回收, PCR 扩增。再吸取 PCR 产物 50 μL 在 1.5% 琼脂糖凝胶上, 75 V 电泳 20 min, 在凝胶成像系统中观察电泳结果并切胶进行产物回收, 该产物回收纯化后, 采用 TaKaRa 公司的 pMD 18-T Vector 试剂盒将目的片段与载体连接, 反应体系为 10 μL, 再通过感受态细胞 (TaKaRa) 进行转化克隆, 将已长出蓝白斑的平板送至北京华大基因研究中心广州分公司进行克隆子的初步筛选、质粒鉴定及序列测定。序列测定采用双脱氧终止法, 测序仪器为 ABI 公司的 3730XL。运用 Mega 5.1 软件对测序结果 16SrDNA 序列进行比较分析, 再通过 NCBI Blast 进行在线比对, 找出各序列在 GenBank 中最相似的序列, 确定其所属菌属。

### 1.4 数据处理

试验数据采用 SAS 8.0 软件统计分析, 方差分析和多重比较 (Duncan) 用于比较不同处理间各指标差异显著性 ( $\alpha=0.05$ )。用 Quantity One 4.4 软件进行图谱分析时, 系统树计算主要采用加权成对算数平均法 (UPGMA) 对 DGGE 图谱进行聚类分析, 一般认为相似值高于 0.60 的 2 个群体具有较好的相似性<sup>[15]</sup>。使用基因型丰富度 (Genotypic richness,  $S$ )、Shannon 多样性指数 (Shannon-Wiener diversity index,  $H'$ ) 及 Pielou 均匀度指数 (Pielou evenness index,  $E$ ) 对土壤微生物群落多样性进行分析, 其计算公式为:

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

$$E = H' / \ln S$$

式中:  $P_i = N_i / N$ ,  $P_i$  为某个样品中某一条带的强度在该样品中所有条带总强度中所占的比率,  $N_i$  为某一泳道所有条带的强度总和,  $N$  为某一泳道里某一条带的强度,  $S$  为某个样品中所有条带数目的总和,

$H'$  为 Shannon 多样性指数。

## 2 结果与分析

### 2.1 新鲜蚓粪与土壤微生物群落变化

#### 2.1.1 蚯蚓生长及存活状况

蚯蚓在培养过程中出现部分逃逸或死亡现象。

由表 2 可知,培养结束后,所有处理的蚯蚓鲜重都显著降低( $P < 0.05$ ),EDC 处理蚯蚓鲜重较其他处理最高,为 13.96 g/pot;ALC 处理蚯蚓鲜重最低,为 7.96 g/pot。各处理蚯蚓存活率从高到低均为:EDC>ADC>ELC>ALC,其中最低为 45%,最高为 97%。

表 2 接种后各处理蚯蚓鲜重和存活率情况变化( $n=3$ )

Table 2 Changes in fresh weight of earthworm and survival rate after inoculation( $n=3$ )

项目 Item	EDC	ADC	ELC	ALC
接种前蚓鲜重/(g/pot) Fresh weight of earthworm before inoculation	16.80±0.10 a	16.74±0.08 a	16.84±0.11 a	16.88±0.11 a
培养后蚓鲜重/(g/pot) Fresh weight of earthworm after inoculation	13.96±0.09 b	8.07±2.73 c	8.79±1.02 c	7.96±0.74 c
存活率/% Survival rate	97.33	50.00	73.33	44.95

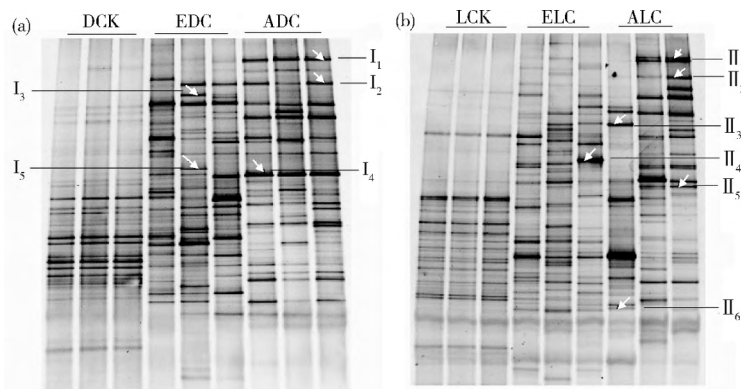
注:EDC 为赤子爱胜蚓+土壤 I 处理;ADC 为壮伟环毛蚓+土壤 I 处理;ELC 为赤子爱胜蚓+土壤 II 处理;ALC 为壮伟环毛蚓+土壤 II 处理;同行中不同字母表示处理间 Duncan 检验差异达显著水平( $P < 0.05$ )。

Note:EDC: *Eisenia fetida* + soil I treatment;ADC: *Amyntas robustus* + soil I treatment;ELC: *Eisenia fetida* + soil II treatment; ALC: *Amyntas robustus* + soil II treatment; Different small letters in the same row meant difference at 0.05 level by Duncan.

#### 2.1.2 新鲜蚓粪与土壤微生物群落 DGGE 图谱分析

对照土壤和蚓粪样品总 DNA 经过 PCR 扩增后,均获得特异性较强目标条带。应用 DGGE 技术分离 16S rDNA V3 片段 PCR 产物,可以看到各处理分离为 20 条以上的条带(图 1),对 DGGE 图谱进行初步统计可以发现:各样品条带带型有一定差别,DGGE 图谱中电泳条带数目、强度和迁移率均存在

差异,充分显示了微生物多样性在不同处理间的差异。不同蚯蚓处理间具有许多共同的条带,而这些公共条带的亮度也不相同,说明蚓粪样品之间可能存在一些共有的细菌类型,同时在丰度上蚓粪微生物有明显的改变。相比于对照土壤,蚓粪处理条带数较多且亮,表明蚓粪微生物多样性较高。



DCK 为对照土壤 I;EDC 为赤子爱胜蚓取食土壤 I 后的蚓粪;ADC 为壮伟环毛蚓取食土壤 I 后的蚓粪;LCK 为对照土壤 II;ELC 为赤子爱胜蚓取食土壤 II 后蚓粪;ALC 为壮伟环毛蚓取食土壤 II 后蚓粪样品。I<sub>1</sub>~I<sub>5</sub> 与 II<sub>1</sub>~II<sub>6</sub> 为选取的优势条带,用于后续菌种分析,详见 2.3 小节。下图同。

DCK, Control soil I;EDC, Casts from *Eisenia fetida* in soil I;ADC, Casts sample from *Amyntas robustus* in soil I;LCK, Control soil II;ELC, Casts from *Eisenia fetida* in soil II;ALC, Casts from *Amyntas robustus* in soil II;Predominant bands from I<sub>1</sub>-I<sub>5</sub> and II<sub>1</sub>-II<sub>6</sub> were selected for the sequencing and blast comparison (See 2.3 section). The same is as the following figure, below.

图 1 a 组(a)和 b 组(b)样品 16S rDNA 扩增的 DGGE 分析结果

Fig. 1 DGGE profile of amplified 16SrDNA fragments from a group (a) and b group (b)

### 2.1.3 新鲜蚓粪微生物群落相似性分析

试验组聚类分析结果均表明(图 2): 每组处理样品均聚为两类, 对照土壤处理为一类, 蚓粪处理为另一类, 说明蚯蚓取食消化作用可能会改变土壤的微生物群落结构, 不同蚯蚓取食结果对土壤微生

物群落结构影响不大。从相似性来看, a 组中, 两蚯蚓粪处理间在 0.56 相似水平上聚为一类; b 组中, 在 0.5 的相似水平上两蚯蚓粪处理聚为一类, 表明 2 种不同蚯蚓粪之间微生物群落结构相似性较低。

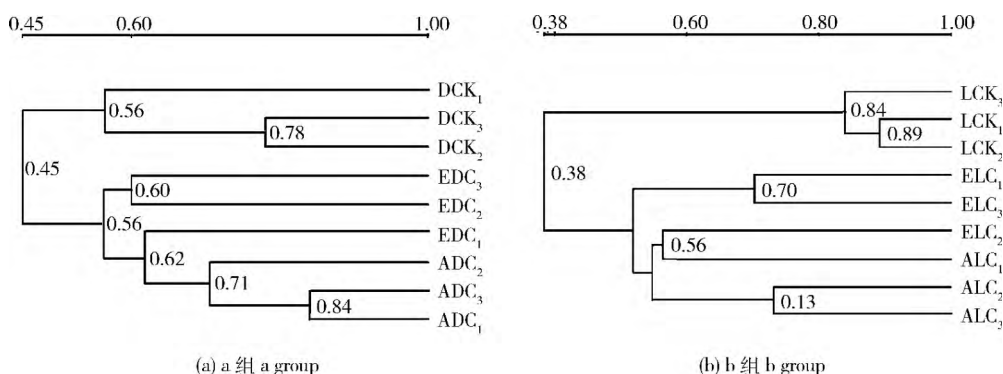


图 2 a 组(a)和 b 组(b)样品 DGGE 图谱的聚类分析

Fig. 2 Cluster dendrogram analysis of DGGE bands in a group (a) and b group (b)

### 2.2 新鲜蚓粪与土壤微生物多样性指数变化

不同处理的微生物群落多样性指数如表 3 所示。对于 2 种污染土壤, 基因型丰富度和 Shannon 多样性指数表现为新鲜蚓粪都显著高于对照土壤 ( $P < 0.05$ ), 其中, b 组中的赤子爱胜蚓粪基因型丰富度和 Shannon 多样性指数分别为 31.00 和 3.32,

达到了最高。各组蚓粪处理间基因型丰富度、Shannon 多样性指数以及均匀度指数都未达到显著性差异 ( $P > 0.05$ )。总的来说, 经蚯蚓取食排泄作用后蚓粪的微生物种类和多样性指数显著增加, 2 种不同生态类型蚯蚓间的蚓粪微生物多样性指数无显著变化。

表 3 试验组样品微生物群落多样性指数 ( $n=3$ )

Table 3 Diversity index of microbial community structures of the samples in the test groups ( $n=3$ )

试验组 Test group	处理 Treatment	基因型丰富度(S) Genotypic richness	Shannon 多样性指数( $H'$ ) Shannon diversity index	均匀度指数( $E$ ) Evenness index
a 组	DCK	22 ± 0.58 b	2.98 ± 0.08 b	0.96 ± 0.02 a
	EDC	26 ± 2.31 a	3.16 ± 0.09 a	0.97 ± 0.01 a
	ADC	26 ± 1.00 a	3.15 ± 0.06 a	0.97 ± 0.01 a
b 组	LCK	23 ± 1.15 b	3.01 ± 0.04 b	0.97 ± 0.01 a
	ELC	31 ± 2.65 a	3.32 ± 0.12 a	0.97 ± 0.01 a
	ALC	28 ± 1.15 a	3.19 ± 0.04 a	0.96 ± 0 a

注: 对 a、b 这 2 组数据分别进行方差分析, 同列中各组不同字母表示处理间 Duncan 检验差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )。

Note: Analysis of variance was used for the two test groups respectively. Different lowercase letters within the same column represent significant difference at  $P < 0.05$  level by Duncan.

### 2.3 新鲜蚓粪微生物优势菌群分析

根据 PCR-DGGE 指纹图谱, 对各处理样品优势的条带进行切胶回收, 共得到 11 个特异性条带, 所分析的条带已在图 1 标示出。对这 11 条带进行

序列测定, 将所得序列通过输入 GenBank, 以 Blast 程序进行相似性比较分析结果见表 4。所有序列与数据库中 16S rDNA 序列的相似性在 99%~100% 之间。结果表明, 在 a 组处理中, 2 种蚯蚓粪共同微

生物菌群为香味菌属(*Myroides* sp.), 赤子爱胜蚓粪中的特有优势菌群还包括芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium* sp.), 壮伟环毛蚓粪中特有优势菌群为金黄杆菌属(*Chryseobacterium* sp.); 在 b 组处理中, 2 种蚯蚓粪中共同微生物菌群均包含假单胞杆菌属

(*Pseudomonas* sp.) 和丛毛单胞菌属(*Comamonas* sp.), 赤子爱胜蚓粪特有优势菌群还包括不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.), 壮伟环毛蚓粪特有优势菌群包括金黄杆菌属(*Chryseobacterium* sp.) 和鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium* sp.)。

表 4 DGGE 条带相似菌种

Table 4 Related bacteria of DGGE bands

条带编号 Bandname	序列长度/bp Sequence size	NCBI 数据库中最相近的菌种名称(登录号) Closest relatives found in the NCBI database (Access number)	相似度/% Similarity
I <sub>1</sub>	187	金黄杆菌属 <i>Chryseobacterium</i> sp. (HM212415.1)	99
I <sub>2</sub>	187	香味菌属 <i>Myroides</i> sp. (HE575905.1)	99
I <sub>3</sub>	187	鞘氨醇杆菌属 <i>Sphingobacterium</i> sp. (JQ322881.1)	100
I <sub>4</sub>	193	不可培养菌 Uncultured bacterium (DQ980869.1)	99
I <sub>5</sub>	192	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> sp. (KC854390.1)	99
II <sub>1</sub>	187	金黄杆菌属 <i>Chryseobacterium</i> sp. (HM212415.1)	99
II <sub>2</sub>	187	鞘氨醇杆菌属 <i>Sphingobacterium</i> sp. (JF327461.1)	99
II <sub>3</sub>	192	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> sp. (CP006832.1)	100
II <sub>4</sub>	193	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> sp. (FJ816054.1)	100
II <sub>5</sub>	192	丛毛单胞菌属 <i>Comamonas</i> sp. (GU458274.1)	99
II <sub>6</sub>	167	不可培养菌 Uncultured bacterium(FN356702.1)	99

### 3 讨论

#### 3.1 蚯蚓肠道对重金属污染土壤微生物群落相似性的影响

从微生物群落相似性分析来看, 试验组中蚓粪与对照土壤的微生物群落相似性仅达到了 0.45、0.38(图 2), 蚯蚓肠道代谢作用改变了土壤的群落结构, 这与 Gómez-Brandón<sup>[16]</sup> 等报道一致。两蚯蚓粪间微生物群落相似性达到 0.5 以上(图 2), 这主要是因为两蚯蚓分别接种于同种重金属污染土壤条件下, 其生长环境和食源均一致<sup>[17]</sup>。因此, 两蚯蚓粪间微生物种群结构具有一定的相似性。Thakuria 等<sup>[18]</sup> 研究发现, 蚯蚓肠道壁的细菌均能在其栖息地发现, 且它们的相对丰度受到栖息地的食物质量和可利用性的影响。

#### 3.2 蚯蚓肠道对重金属污染土壤微生物多样性的影响

本研究表明重金属污染下, 赤子爱胜蚓和壮伟

环毛蚓粪中微生物种群基因型丰富度和 Shannon 多样性指数显著增加(表 3)。一方面, 蚯蚓在重金属污染土壤中活动, 依靠吞食大量富含微生物的土壤颗粒来维持生存所需能量<sup>[2]</sup>, 同时产生蚓粪, 这个过程可使土壤微域生境发生改变<sup>[19]</sup>, 而这些改变又会反过来刺激蚯蚓的取食活动; 另一方面, 微生物进入蚯蚓肠道后, 一些小细胞生物能对肠道液产生抗性, 并在肠道内适宜水分和湿度环境下数量大幅度提高<sup>[20]</sup>, 尽管蚯蚓肠道内磷酸酶、蛋白酶和纤维素酶可能会消化部分敏感微生物, 致使其微生物种类减少<sup>[21-22]</sup>, 但在本研究中两蚓粪中微生物数量和种类的增加量大于减少量。有研究表明, 蚓粪中增加的这部分微生物通常为耐性菌种<sup>[23]</sup>。各组两蚓粪间微生物多样性指数均无显著性差异, 但在 b 组中, 赤子爱胜蚓取食弱碱性矿区土壤后产生的蚓粪微生物基因型丰富度和 Shannon 多样性指数均高于壮伟环毛蚓粪, 在 a 组中则未表现出该现象(表 3)。这可能与蚯蚓类型和供试土壤性质有关。赤子爱胜

蚓一般活动在 0~5 cm 土壤表层,主要大量取食易利用的有机物质,而壮伟环毛蚓是华南地区本地的优势蚓种<sup>[14]</sup>,通常活动于 5~15 cm 矿质土层,以土壤颗粒和有机物的混合物为食<sup>[2]</sup>,本研究中弱碱性矿区土壤有机质含量是酸性矿区土壤的两倍(表 1),与壮伟环毛蚓相比,赤子爱胜蚓更容易获得适宜的食物,因此,其产生的蚓粪具有更高的微生物整体功能活性和丰富度。

### 3.3 蚯蚓肠道对重金属污染土壤微生物优势种群的影响

一般而言,水稻土微生物群落结构受水分条件和养分管理等因素影响而不尽相同<sup>[24-25]</sup>。矿山周边水稻土长期受重金属污染,土壤微生物群落多样性减少,重金属抗性微生物成为土壤中的优势种群<sup>[26]</sup>。Gelsomino<sup>[27]</sup>对 2 种粉沙壤土和 15 种其他土壤的研究表明相同的土壤具有更为相似的微生物种群。本研究 2 种矿区土壤在酸碱度、有机质含量以及重金属全量 Cu、Zn 和 Cd 含量上都有所不同(表 1),这也带来二者微生物种群多样性的差异。随着污染程度的升高,水稻土土壤微生物向  $C_{mic}/N_{mic}$  低的微生物优势群落转化<sup>[28]</sup>。而蚯蚓与微生物关系密切,蚯蚓特殊的肠道环境可以作为土壤微生物的选择过滤器<sup>[29]</sup>,经蚯蚓消化后排出体外的一些优势菌种常反映了其对土壤环境的重要作用。根据序列分析结果(表 4)并结合前人报道,本研究发现,蚓粪中的优势菌群大多为与金属迁移转化相关的菌群。如赤子爱胜蚓和壮伟环毛蚓取食酸性矿区土壤后产生的香味菌属(*Myroides* sp.)常与金属  $\beta$ -内酰胺酶活性密切相关<sup>[30]</sup>;2 种蚯蚓取食弱碱性矿区土壤产生的丛毛单胞菌属(*Comamonas* sp.)也被证实对多种污染物有很好的降解效果<sup>[31-32]</sup>。另外,赤子爱胜蚓取食酸性矿区土壤产生的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和 2 种蚯蚓取食弱碱性矿区土壤产生的假单胞杆菌属(*Pseudomonas* sp.)对土壤重金属  $Cu^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  具有较强的抗性<sup>[33-34]</sup>;赤子爱胜蚓取食弱碱性矿区土壤产生的不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)则对污水中的  $Zn^{2+}$  有显著的吸附作用<sup>[35]</sup>;壮伟环毛蚓取食酸性矿区和弱碱性矿区土壤产生的金黄杆菌属(*Chryseobacterium* sp.)对 Cd 有较强抗性<sup>[36]</sup>;赤子爱胜蚓取食酸性矿区土壤和壮伟环毛蚓取食弱碱性矿区土壤产生的鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium* sp.)也已被证明与超富集植物东南景天可联合有效控制污染土壤中 Cd 含量<sup>[37]</sup>。

上述经蚯蚓消化排泄产生的优势菌群进入污染土壤中,对土壤中重金属的迁移转化很可能发挥积极作用,这些需要在进一步的研究中得到证实。

## 4 结 论

与未经蚯蚓取食的污染土壤相比,新鲜蚓粪微生物种类和种群多样性增加,种群结构亦发生明显变化。表层栖和内层栖蚯蚓消化重金属污染水稻土后,蚓粪间微生物种群多样性差异不大,种群结构具有一定的相似性,其蚓粪优势菌群既具有共同的优势菌群也有自身独特的优势菌群,且这些优势菌群大多为与金属迁移转化相关的菌群。然而,蚓粪微生物群落是否会引起土壤微生物种群结构变化,且该变化与土壤重金属形态变化之间有何关联,将是本研究继续深化的方向。

## 参 考 文 献

- [1] 杨清伟,束文圣,林周,等. 铅锌矿废水重金属对土壤-水稻的复合污染及生态影响评价[J]. 农业环境科学学报,2003,22(4): 385-390
- [2] Lavelle P, Spain A V. Soil ecology [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers,2001
- [3] Reid B J, Watson R. Lead tolerance in *Aporrectodea rosea* earthworms from a clay pigeon shooting site[J]. Soil Biology and Biochemistry,2005,37:609-612
- [4] Dai J, Becquer T, Rouiller J H, et al. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils [J]. Soil Biology and Biochemistry,2004,36:91-98
- [5] Sizmur T, Hodson M E. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil-A review[J]. Environmental Pollution, 2009,157(7):1981-1989
- [6] 王新,周启星. 重金属与土壤微生物的相互作用及污染土壤修复[J]. 环境污染治理技术与设备,2004,5(11):1-4
- [7] Knapp B A, Podmirseg S M, Seeber J, et al. Diet-related composition of the gut microbiota of *Lumbricus rubellus* as revealed by a molecular fingerprinting technique and cloning [J]. Soil Biology and Biochemistry,2009,41(11):2299-2307
- [8] Shan J, Liu J, Wang Y F, et al. Digestion and residue stabilization of bacterial and fungal cells, protein, peptidoglycan, and chitin by the geophagous earthworm *Metaphire guillelmi*[J]. Soil Biology and Biochemistry,2013, 64:9-17
- [9] Jirout J, Pižl V. Effects of the endemic earthworm *Allolobophora hrabei* (Černosvitov, 1935) on soil microbial communities of steppe grasslands [J]. Soil Biology and

- Biochemistry, 2014, 76: 249-256
- [10] Wen B, Hu X, Wang W S, et al. The role of earthworms (*Eisenia foetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2004, 40: 181-187
- [11] Aira M, Lazcano C, Gómez-Brandón M, et al. Ageing effects of casts of *Aporrectodea caliginosa* on soil microbial community structure and activity[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 46(1): 143-146
- [12] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127-141
- [13] 辜运富, 张小平, 涂仕华. 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 在土壤微生物多样性研究中的应用[J]. *土壤*, 2008, 40(3): 344-350
- [14] Zhang C. Bio-remédiation de sols du Sud de la Chine contaminés par les métaux lourds (Cu, Zn, Cd et Pb: Analyse des mécanismes en conditions de laboratoire[D], Paris: Paris VI University, 2011
- [15] 张金屯. 数量生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 86-92
- [16] Gómez-Brandón M, Lazcano C, Lores M, et al. Detritivorous earthworms modify microbial community structure and accelerate plant residue decomposition [J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44(3): 237-244
- [17] 张宝贵. 蚯蚓与微生物的相互作用[J]. *生态学报*, 1997, 17(5): 556-560
- [18] Thakuria D, Schmidt O, Finan D, et al. Gut wall bacteria of earthworms: a natural selection process[J]. *The International Society for Microbial Ecology*, 2010, 4: 357-366
- [19] Bohlen P J, Scheu S, Hale C M, et al. Non-native invasive earthworms as agents of change in northern temperate forests [J]. *The Ecological Society of America*, 2004, 2(8): 427-435
- [20] Brown G G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? [J] *Plant and Soil*, 1995, 170(1): 209-231
- [21] Tiunov A V, Scheu S. Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L (Lumbricidae): A laboratory experiment[J]. *Applied Soil Ecology*, 2000, 14(1): 17-26
- [22] Scheu S, Schlitt N, Tiunov A V, et al. Effects of the presence and community composition of earthworms on microbial community functioning[J]. *Oecologia*, 2002, 133(2): 254-260
- [23] Furlong M A, Singleton D R, Coleman D C, et al. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 1265-1279
- [24] 刘岳燕, 姚槐应, 黄昌勇. 水分条件对水稻土微生物群落多样性及活性的影响[J]. *土壤学报*, 2006, 43(5): 828-834
- [25] 钟文辉, 蔡祖聪, 尹力初, 等. 用 PCR-DGGE 研究长期施用无机肥对种稻红壤微生物群落多样性的影响[J]. *生态学报*, 2007, 27(10): 4011-4018
- [26] 郭建华, 李华平, 朱红惠. 大宝山重金属污染土壤微生物群落优势种群分析[J]. *华南农业大学学报*, 2010, 31(3): 56-60
- [27] Gelsomino A, Keijzer-Wolters A C, Cacco G, et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 38(1/2): 1-15
- [28] 吴建军, 蒋艳梅, 吴愉萍, 等. 重金属复合污染对水稻土微生物生物量和群落结构的影响[J]. *土壤学报*, 2008, 45(6): 1102-1109
- [29] Byzov B A, Khomyakov N V, Kharin S A, et al. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2007, 43: S149-S156
- [30] Mammeri H, Bellais S, Nordmann P. Chromosome-encoded betalactamases TUS-1 and MUS-1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (formerly *Flavobacterium odoratum*), new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(11): 3561-3567
- [31] Wang Y X, Oyaizu H. Enhanced remediation of dioxins-spiked soil by a plant-microbe system using a dibenzofuran-degrading *Comamonas* sp and *Trifolium repens* L [J]. *Chemosphere*, 2011, 85(7): 1109-1114
- [32] 刘磊, 刘志培, 吴建峰, 等. 氯代硝基苯降解菌 *Comamonas* sp strain CNB 1 对污染土壤生物修复作用的研究[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(4): 615-621
- [33] 卞光凯, 张越己, 秦盛, 等. 南通沿海滩涂耐盐植物重金属抗性内生细菌的筛选及生物多样性[J]. *微生物学报*, 2011, 51(11): 1538-1547
- [34] Chen L, Luo S L, Chen J L, et al. Diversity of endophytic bacterial populations associated with Cd-hyperaccumulator plant *Solanum nigrum* L grown in mine tailings[J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, 62: 24-30
- [35] Tabaraki R, Ahmady-Asbchin S, Abdi O. Biosorption of Zn (II) from aqueous solutions by *Acinetobacter* sp isolated from petroleum spilled soil[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2013, 1(3): 604-608
- [36] 邵继海, 姚习文, 何绍江. 苕麻根际抗 Cd 细菌筛选及对苕麻生长和吸收 Cd 能力的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(3): 487-491
- [37] Fang H, Zhou W, Cao Z, et al. Combined remediation of DDT congeners and cadmium in soil by *Sphingobacterium* sp D-6 and *Sedum alfredii* Hance [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(6): 1036-1046

责任编辑: 苏燕