

蚯蚓对新烟碱类杀虫剂吡虫啉、啉虫脒污染红壤中细菌群落结构的影响

王娇娇^{1,2}, 武春媛^{2,3}, 谭华东^{2,3}, 李 怡^{2,3*}

1. 海南大学生态与环境学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南海口 571101;
3. 农业农村部热区高效农业绿色低碳重点实验室, 海南海口 571101

摘要: 新烟碱类杀虫剂 (neonicotinoids, NEOs) 吡虫啉 (imidacloprid, IMI)、啉虫脒 (acetamiprid, ACE) 是目前世界上使用较为广泛的杀虫剂。本研究以赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 为土壤动物, 采用生物学模拟方法, 通过高通量测序、土壤理化性质测定, 分析 IMI、ACE 污染红壤 (BCK、DCK) 和引入蚯蚓后红壤 (B、D) 中细菌群落结构变化及其与环境因子之间的关系, 探究污染红壤的动物修复机制。结果表明: 与自然红壤 (CK) 相比, 加入 IMI、ACE 降低了红壤的微生物丰富度和多样性, 显著改变了土壤原有的细菌群落结构, 使土壤有机质 (SOM) 和全氮 (TN) 含量下降; 而蚯蚓的加入, 增加了土壤中具有杀虫剂耐药性和降解杀虫剂能力的放线菌门 (Actinobacteriota)、变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidota) 等的相对丰度, 提高了污染土壤 pH、TN、全磷 (TP)、全钾 (TK) 含量; 结合土壤理化性质的相关性分析可知, 在属水平上, pH、TN、TK 和 SOM 对各处理组细菌群落结构的影响较大。研究表明, IMI、ACE 污染降低了土壤 TN 和 SOM 含量, 破坏了土壤中原有的细菌群落结构; 蚯蚓活动提高了污染红壤的土壤肥力, 缓解了 IMI、ACE 对土壤中微生物菌群的不利影响, 在一定程度上修复和丰富了 NEOs 污染土壤的微生物群落物种多样性, 进而加速了土壤中 NEOs 的降解。该研究结果为从蚯蚓圈中筛选出高效 IMI、ACE 降解菌提供可行性, 可为蚯蚓对 IMI、ACE 污染土壤的修复提供理论基础。

关键词: 蚯蚓; 细菌群落; 吡虫啉; 啉虫脒; 红壤; 环境因子

中图分类号: X53 文献标识码: A

Effects of Earthworms on Bacterial Community Structure in Red Soil Contaminated by Neonicotinic Insecticides Imidacloprid and Acetamiprid

WANG Jiaojiao^{1,2}, WU Chunyuan^{2,3}, TAN Huadong^{2,3}, LI Yi^{2,3*}

1. College of Ecology and Environment, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Key Laboratory of Green and Low Carbon Green Agriculture in Tropical China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Neonicotinoids (NEOs) contain imidacloprid (IMI) and acetamiprid (ACE), which are widely used in the world. In this study, earthworms (*Eisenia foetida*) were used as soil animal. Through high-throughput sequencing and measurement of soil physical and chemical properties, the changes of bacterial communities between IMI and ACE contaminated red soil (BCK, DCK) and soil after earthworm introduction (B, D), and the relationship with environmental factors were analyzed to explore the animal remediation mechanism of contaminated red soil. The introduction of IMI and ACE reduced the diversity of microbial population, significantly changed the composition of soil bacterial community structure, and decreased the content of soil organic matter (SOM) and total nitrogen (TN), compared with the natural red soil (CK). The addition of earthworms increased the relative abundance of Actinobacteriota, Proteobac-

收稿日期 2022-10-19; 修回日期 2023-02-02

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 2019RC266)。

作者简介 王娇娇 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物。*通信作者 (Corresponding author): 李 怡 (LI Yi), E-mail: liyi@catas.cn。

teria and Bacteroidota, which have the ability of insecticide resistance and degrading. pH value, TN, total phosphorus (TP) and total potassium (TK) contents of contaminated soil increased. Combined with the correlation analysis of soil physiochemical properties, it was found that pH, TN, TK and SOM had a great influence on the bacterial community structure among the treatment groups at the genus level. The study showed that IMI and ACE pollution reduced the contents of SOM and soil TN, and destructed the original bacterial community structure in the soil. Earthworm activity improved soil fertility of contaminated red soil, alleviated the adverse effects of IMI and ACE on soil microbial flora, restored and enriched the diversity of microbial species in NEOs-contaminated soil to a certain extent, and then accelerated the degradation of NEOs in soil. This study showed the feasibility to screen the efficiently IMI and ACE-degrading bacteria from drilosphere, and would provide theoretical basis for the earthworm remediation of IMI and ACE-contaminated soil.

Keywords: earthworm; bacterial community; imidacloprid; acetamiprid; red soil; environmental factor

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.09.014

新烟碱类杀虫剂 (neonicotinoids, NEOs) 是在烟碱结构基础上开发出来的一类新型杀虫剂,也是目前世界上应用最广泛的杀虫剂之一^[1],广泛应用于农业、景观、动物领域的害虫防治,主要包括吡虫啉 (imidacloprid, IMI)、啶虫脒 (acetamiprid, ACE)、噻虫胺 (clothianidin, CLO)、噻虫啉 (thiacloprid, THD)、噻虫嗪 (thiamethoxam, THM)、烯啶虫胺 (nitenpyram, NIT) 和呋虫胺 (dinotefuran, DIN) 等^[2]。NEOs 是烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 的激动剂,主要通过选择性控制昆虫神经系统中烟碱型乙酰胆碱酯酶受体,阻断昆虫中枢神经系统的正常传导,达到杀虫目的^[3]。NEOs 具有水溶性和持久性,在土壤当中的半衰期从几十到几百天不等;其较高的淋溶和径流潜力,能在土壤中连续积累并随地表径流或渗透进入地表水和地下水^[4],世界上大多河流水体中都可监测到新烟碱类杀虫剂残留^[5]。其频繁使用可在土壤、水体中累积毒性,使 NEOs 在土壤、水体和生物中成为一个持续存在的环境问题^[6-7]。多项研究发现,NEOs 残留会对非靶标有益生物蜜蜂、鸟类、蚯蚓等构成伤害^[8-10];水体中的 NEOs 残留会对鱼类、蝌蚪等水生生物造成不同程度的损伤^[11-13],除此之外,NEOs 可通过食物链致使人体中枢神经系统紊乱,严重会导致呼吸系统和心血管系统损伤,甚至死亡^[14]。鉴于 NEOs 的危害,作为欧盟农业大国,法国已于 2018 年开始全面禁止 NEOs 用于植物虫害防控^[15]。

常见农田土壤污染修复技术主要为生物修复^[16]。目前,生物修复的研究大多集中于微生物修复和植物修复,利用动物修复土壤的研究相对较少^[17]。蚯蚓作为生物量最大的土壤动物,对土

壤生态系统和环境质量影响深远^[4]。蚯蚓吸食污染物后,其作穴、排泄等行为可促进微生物活性、提高有益微生物数量,从而改变土壤养分转化情况^[18];土壤微生物的群落结构及其平衡对土壤有重要的影响。而细菌作为微生物中含量最多、丰度最高的类群,能够参与土壤中多数养分的转化,在能量流动和信息传递上发挥着重要功能,因此常被认为是土壤生态系统质量变化的早期指标^[19]。

南方红壤区人口稠密,人均耕地面积少,农田开发强度大^[20];IMI、ACE 是使用较广的 2 种 NEOs,它们普遍残留在土壤和水体环境中;目前,已经有越来越多的研究关注到 NEOs 在土壤当中的环境行为,但较少有关蚯蚓作用于 IMI、ACE 污染红壤的修复机制研究。本研究以赤子爱胜蚯蚓 (*Eisenia foetida*) 为土壤修复动物,选取 IMI、ACE 两种常用新烟碱类杀虫剂,利用 16S rRNA 高通量测序、冗余分析 (RDA) 等方法,研究蚯蚓对 NEOs 污染红壤的理化性质及细菌群落结构的影响,探究潜在的降解微生物类群及蚯蚓对农田红壤 NEOs 的去除能力,为 NEOs 污染农田红壤修复提供科学依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

试验土壤采自海南省澄迈县 (110°2'25"E, 19°44'5"N) 无吡虫啉、啶虫脒污染的土地。采集 0~20 cm 深度土样,自然风干后,研磨过 20 目尼龙筛,经测定,土壤基本理化性质为:pH 为 6.14,土壤有机质 (SOM) 25.41 g/kg,全氮 (TN) 1.21 g/kg,全磷 (TP) 1.32 g/kg,全钾 (TK) 1.38 g/kg。供试蚯蚓品种为赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*),来自中国热带农业科学院热带生态农业

基地。试验前,选择健康、具有相似长度和体重,且有环带的成熟蚯蚓^[21],用无菌水清洗,并置于湿滤纸上,25℃,黑暗中清肠 48 h,在试验土壤中适应 2 周。吡虫啉和啶虫脒为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 在开展试验前,了解蚯蚓在不同浓度吡虫啉、啶虫脒污染红壤中的存活情况。分别在农药浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、5.0 mg/kg 的试验红壤中加入蚯蚓,进行为期 30 d 的预试验,每日观察记录蚯蚓的存活情况。预试验结果显示,在低于吡虫啉 2.5 mg/kg、啶虫脒 2.0 mg/kg 浓度农药处理组中蚯蚓存活情况良好,从而确定试验农药浓度为吡虫啉 2.0 mg/kg、啶虫脒 1.5 mg/kg。

称取 200 g 过 2 mm 筛的风干土样至 500 mL 烧杯中,分别将相应浓度的吡虫啉(2.0 mg/kg)、啶虫脒(1.5 mg/kg)充分混匀至土样中,每个烧杯中加入 10 条大小、长度和体重相似的蚯蚓,放于避光处培养。共设置 5 组:自然土壤(CK),土壤中添加吡虫啉(BCK),土壤中添加啶虫脒(DCK),土壤中添加吡虫啉与蚯蚓(B),土壤中添加啶虫脒与蚯蚓(D)。每处理设置 3 个重复。培养条件为:持续黑暗,温度控制在 25℃,每天对蚯蚓进行生物学观察,定期向土壤中加入无菌超纯水,控制含水量在 30%左右。待试验结束(第 28 天),将蚯蚓取出后,采土样保存于-80℃冰箱,备用。

1.2.2 土壤养分含量测定 土壤理化性质测定参照《土壤农化分析》^[22]。pH 采用电极法测定,全氮(TN)采用凯氏定氮法测定,全磷(TP)采用钼锑显色法测定,全钾(TK)采用原子吸收分光光度法测定,土壤有机质(SOM)采用重铬酸钾容量法测定。

1.2.3 16S rRNA 高通量测序 根据 E.Z.N.A.[®] soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 说明书进行土壤总 DNA 抽提,使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量,使用 NanoDrop2000 测定 DNA 浓度和纯度;使用 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增,每个样本设置 3 个重复。将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA,

USA) 进行回收产物纯化,2%琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Quantus™ Fluorometer (Promega, USA) 对回收产物进行检测定量,利用 Illumina 公司的 Miseq PE300/NovaSeq PE250 平台进行测序,委托上海美吉生物医药科技有限公司完成测序,通过比对 Sliva 数据库(版本 138)分析不同样品的细菌群落结构组成。

1.3 数据处理

采用 JMP Pro14.3.0、Origin 2019b 软件进行数据处理和分析,采用 Qiime 1.9.1、美吉生物云平台、Gephi 0.9、RStudio 等软件完成生物信息学分析。

α 多样性指数采用以下公式进行计算^[23]。

$$\text{Chao1 指数: } S_{\text{chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

式中, S_{chao1} 是估计的 OTU 数, S_{obs} 是实际观测到的 OTU 数, n_1 是只含有 1 条序列的 OTU 数目, n_2 是只含有 2 条序列的 OTU 数。

$$\text{Shannon 指数: } H_{\text{shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

式中, S_{obs} 是实际观测到的 OTU 数, n_i 是第 i 个 OTU 所含的序列数, N 是所有的序列数。

2 结果与分析

2.1 样品中所含 OTUs 数目分析

对 5 个处理,共 15 个样品进行高通量测序,按照 97%的相似水平对有效序列进行 OTU (operational taxonomic unit, OTU) 聚类,共获得 3501 个 OTUs。对各组样品的独有 OTUs 和组间样品的重叠 OTUs 进行 Venn 图分析(图 1)。自然土壤(CK)、土壤中添加吡虫啉(BCK)、土壤中添加啶虫脒(DCK)、土壤中添加吡虫啉与蚯蚓(B)、土壤中添加啶虫脒与蚯蚓(D)5 个处理的 OTUs 总数分别为 2598、1766、1903、2199 和 2021,自然土壤的 OTUs 数量最多,吡虫啉农药处理土壤的 OTUs 数量最少;各处理组中特有的 OTUs 按数量高低排序为:CK>B>D>DCK>BCK,特有的 OTUs 数目分别是 247、135、80、45、27(表 1)。

2.2 不同处理下土壤细菌 α 多样性的变化

α 多样性可以确定微生物群落中物种丰富度及多样性的变化。通过分别计算 α 多样性指数中 Chao1 和 Shannon 指数,对微生物群落中物种的丰富度和多样性进行分析。土壤细菌 α 多样性的统计结果显示(表 2),Chao1 和 Shannon 指数在

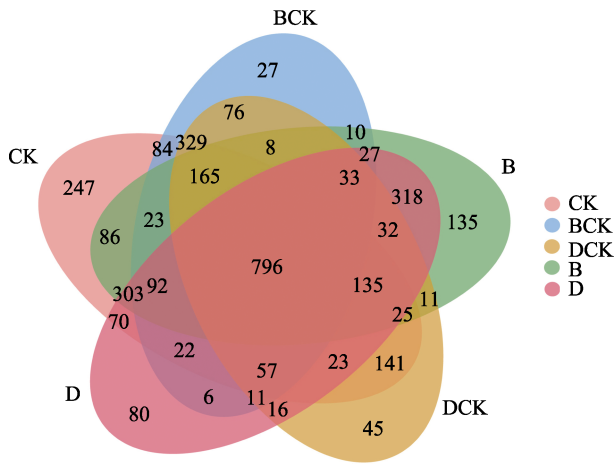


图 1 不同处理下土壤细菌群落的 OTUs 数量 Venn 图
Fig. 1 Venn diagram of OTUs numbers of bacterial communities of soils in different treatments

表 1 不同处理下土壤细菌群落的 OTUs 数量

Tab. 1 OTU numbers of bacterial communities of soils in different treatments

处理 Treatment	OTUs 总数 Total OTUs number	特有 OTUs 数 Specific OTUs number	共有 OTUs 数 Shared OTU number
CK	2598	247	796
BCK	1766	27	
DCK	1903	45	
B	2199	135	
D	2021	80	

表 2 不同处理对土壤细菌群落 α 多样性的影响

Tab. 2 Effects of different treatment groups on α impact of diversity of soil bacterial community

处理 Treatment	Chao1 指数 Chao1 index	Shannon 指数 Shannon index
CK	2540.24±66.91 ^a	6.09±0.09 ^a
BCK	1742.46±53.30 ^c	4.05±0.26 ^d
DCK	1851.15±25.89 ^{bc}	4.64±0.26 ^c
B	2065.66±44.65 ^b	5.83±0.07 ^{ab}
D	1965.64±190.53 ^{bc}	5.52±0.12 ^b

注：同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

CK 与 BCK、DCK 处理间存在显著差异 ($P < 0.05$), 在所有处理中 CK 的 Chao1 和 Shannon 指数最高; 分别添加 IMI、ACE 的 BCK 和 DCK 处理的 Chao1 和 Shannon 指数最低; 在引入蚯蚓之后的 B 和 D 处理中, Chao1 和 Shannon 指数有所提升。结果表明, 自然土壤中的细菌群落物种丰富度和多样性最高; IMI、ACE 暴露降低了土壤细菌群落的

丰富度和多样性, 而添加蚯蚓提升了土壤细菌群落的丰富度和多样性, 说明蚯蚓在 IMI、ACE 污染土壤中的生长活动能够在一定程度上稳定土壤细菌群落结构。

2.3 不同处理对门、属水平下土壤细菌群落结构的影响

不同处理下土壤细菌群落物种门水平的相对丰度变化如图 2 所示。将相对丰度大于 1% 的细菌门视为优势细菌门, 从图 2 中可以看出, 在 BCK 和 DCK 处理中, NEOs 对放线菌门 (Actinobacteriota)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidota) 的相对丰度有显著影响。与 CK 相比, BCK 和 DCK 处理的放线菌门 (相对丰度分别为 21.5% 和 29.5%)、变形菌门 (7.7% 和 10.1%)、拟杆菌门 (1.6% 和 1.8%)、骸骨细菌门 (Patescibacteria) (1.5% 和 1.8%), 菌群丰度显著下降; 加入农药前后, 细菌优势菌门由 CK 的放线菌门 (39.5%) 转变为 BCK 和 DCK 处理的厚壁菌门 (55.8% 和 41.2%); BCK 和 DCK 处理的丰度变化基本相似。B、D 处理与 BCK、DCK 处理相比较发现, 加入蚯蚓显著提高了放线菌门、变形菌门、绿弯菌门和拟杆菌门的丰度, 厚壁菌门的丰度则有所下降。

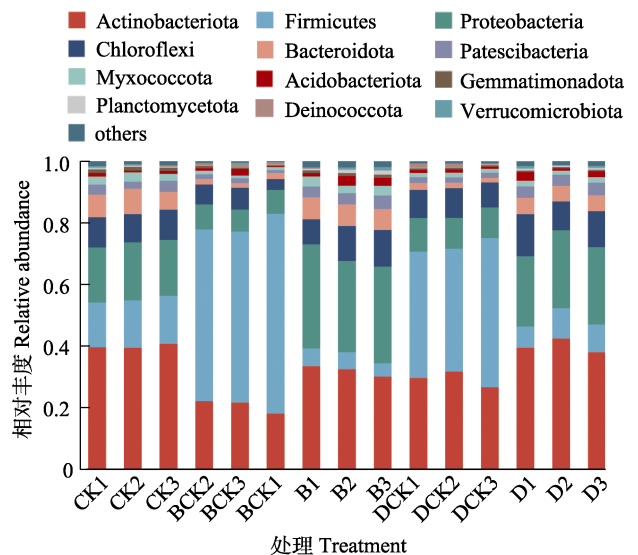


图 2 不同处理下细菌群落门水平相对丰度
Fig. 2 Relative abundance of bacterial community phylum levels under different treatments

属水平上, 对相对丰度大于 2% 的菌属变化进行分析 (图 3)。与 CK 相比, BCK 和 DCK 处理组中的芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 丰度明显增加,

弱酸杆菌属 (*Ilumatobacter* sp.)、甲基醯菌属 (*Demequina* sp.)、微杆菌属 (*Microbacterium* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 等菌属丰度减少; 假芽孢杆菌属 (*Fictibacillus* sp.) 只存在于农药处理组; 在加入蚯蚓的 B 和 D 处理中, 芽孢杆菌属的丰度显著降低, 而弱酸杆菌属、假单胞菌属和微杆菌属的丰度均有所提升。结果表明, IMI、ACE 暴露显著改变了土壤原有细菌群落结构组成, 而蚯蚓的引入, 在一定程度上恢复了 IMI、ACE 暴露土壤的细菌群落结构。

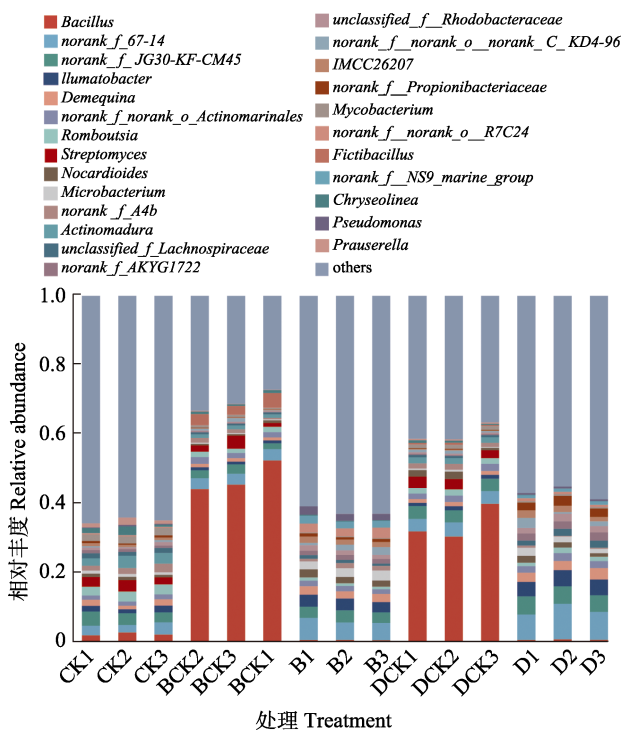


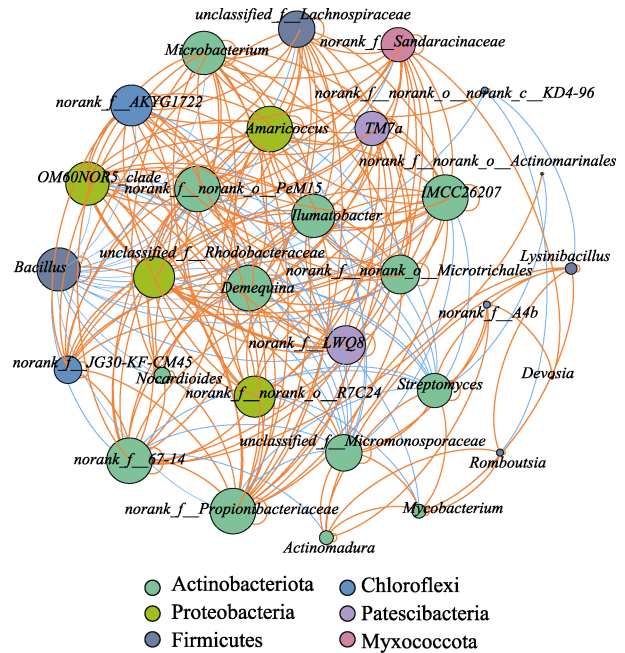
图 3 不同处理下细菌群落属水平相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of bacterial community genera under different treatments

为进一步了解细菌群落之间的相互关系, 将所有处理后的细菌丰度前 30 的菌属进行了相关性网络分析 ($R \geq 0.6, P < 0.05$) (图 4)。结果表明, 由于正相关的边数量 (421) 大于负相关的边数量 (46), 可以推断细菌菌群的协作关系大于竞争关系; 从图中可以看出, 大多数菌属属于放线菌门和变形菌门, 放线菌门的链霉菌属、厚壁菌门中的芽孢杆菌属与各菌属之间的负相关关系较为明显。

2.4 土壤细菌群落结构变化与土壤理化性质的关系

不同处理 28 d 后的土壤理化性质如表 3 所



共 30 个菌属节点, 节点的大小代表菌属的丰富度, 节点越大其相应菌属的丰富度越高, 反之则越小; 不同颜色的节点代表不同菌门, 不同菌属之间的连线代表彼此间的相关性, 黄色代表正相关, 蓝色代表负相关。

There are a total of 30 nodes of bacterial genera. The size of nodes represents the richness of bacterial genera. The larger the node, the higher the richness of corresponding bacterial genera, and the smaller the vice versa. Different colored nodes represent different phyla, and lines between different genera represent correlations, with yellow representing positive correlations and blue representing negative correlations.

图 4 微生物属间共现性关系网络图

Fig. 4 Network diagram of co-occurrence relationship among microbial genera

表 3 不同处理的土壤理化性质

Tab. 3 Soil physical and chemical properties under different treatments

处理 Treatment	pH	土壤有机质 SOM/ (g·kg ⁻¹)	全氮 TN/ (g·kg ⁻¹)	全磷 TP/ (g·kg ⁻¹)	全钾 TK/ (g·kg ⁻¹)
CK	6.11±0.03 ^b	24.66±0.07 ^a	1.18±0.04 ^{abc}	1.29±0.07 ^b	1.42±0.03 ^c
BCK	6.09±0.03 ^b	24.27±0.10 ^b	1.14±0.03 ^{bc}	1.30±0.04 ^b	1.45±0.03 ^{bc}
DCK	6.12±0.02 ^b	24.35±0.04 ^b	1.11±0.03 ^c	1.27±0.05 ^b	1.43±0.04 ^{bc}
B	6.24±0.03 ^a	22.39±0.11 ^c	1.21±0.05 ^{ab}	1.42±0.02 ^a	1.51±0.03 ^{ab}
D	6.22±0.02 ^a	21.84±0.04 ^d	1.24±0.04 ^a	1.38±0.04 ^{ab}	1.55±0.02 ^a

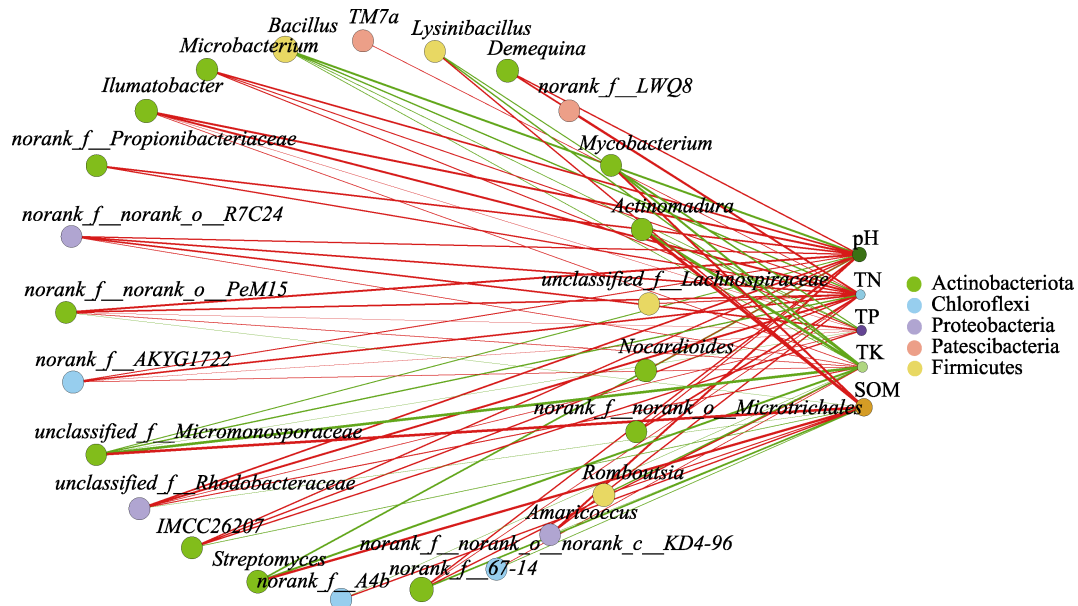
注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

示。与 CK 相比, BCK 和 DCK 处理的 SOM、TN 含量显著降低, TK 含量变化不明显, TP 和 pH 的变化不显著。添加蚯蚓后, 与 BCK 和 DCK 处理相比, B 和 D 处理中的 TN、TK、TP 和 pH 均有提高, SOM 含量显著降低。将所有土壤细菌分

类属水平总丰度前 30 ($R \geq 0.6, P < 0.05$) 与 5 个土壤环境因子之间的共现模式可视化为一个关联网络图 (图 5)。由图 5 可以看出, 占比最多的菌门是放线菌门 (Actinobacteriota); 骸骨细菌门 (Patescibacteria) 与环境因子呈正相关; 放线菌门、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和变形菌门 (Proteobacteria) 的大部分菌属与环境因子呈正相关; 厚壁菌门 (Firmicutes) 中的多数菌属均与环境因子呈负相关。放线菌门中的大部分菌属与环境因子呈正相关, 小部分菌属与环境因子呈负相关, 如, 微杆菌属 (*Microbacterium* sp.) 与 TN、TP、pH 呈正相关; 微酸菌属 (*Ilumatobacter* sp.) 与 TN、TP、TK、pH 呈正相关; 类诺卡氏菌属 (*Nocardioides* sp.) 与 pH 呈正相关; 链霉菌属

(*Streptomyces* sp.) 与 SOM 呈正相关, 与 TK、pH 呈负相关; 马杜拉放线菌属 (*Actinomadura* sp.) 与 SOM、pH 呈正相关, 与 TK 呈负相关。绿弯菌门 (Chloroflexi) 的大部分菌属与 TK 等环境因子呈正相关; 变形菌门 (Proteobacteria) 在与环境因子相关的 3 个菌属中, 2 个菌属与 TN、TP、TK、pH 等环境因子均呈较强正向关联, 1 个菌属与 TN、pH 呈正相关, 2 个菌属与 SOM 呈负相关。在厚壁菌门 (Firmicutes) 中, 多数菌属与 TK 呈负相关, 与 SOM 呈正相关, 如, 芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 与 TN、TP、TK、pH 等环境因子均呈负相关, 且关联性较强, 赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus* sp.) 与 TP、TK 呈负相关, 与 SOM 呈正相关。



网络图中不同节点代表不同菌属, 节点大小代表菌属的丰度, 相同节点颜色代表为同一菌门; 细菌和土壤环境因子之间的连线, 红色代表正相关, 绿色代表负相关, 颜色越深代表二者之间的相关性越强。

Different nodes in the network diagram represent different bacterial genera, the size of nodes represents the abundance of bacterial genera, and the color of the same node represents the same bacterial phylum; The line between bacteria and soil environmental factors shows a positive correlation in red and a negative correlation in green, with a darker color indicating a stronger correlation.

图 5 不同处理下细菌属水平与土壤理化性质的关联网络图

Fig. 5 Correlation network diagram of bacterial genus level and soil physical and chemical properties in different treatments

在各处理的属水平上进行冗余分析 (图 6)。RDA 的 2 个轴累积解释了 68.49% 的总变量, 第 1 个轴和第 2 个轴分别解释了 65.64% 和 2.85% 的变异度。其中, pH、TN、TK 和 SOM 的箭头连线较长, TN 和 pH 与第一轴的夹角比较小, SOM 相对于 TP 和 TK 夹角和线长都有优势。说明在属水平上, 土壤 pH、TN、TK 和 SOM 能较好地解释土壤细菌群落结构差异性。

3 讨论

3.1 蚯蚓处理对吡虫啉、啮虫脒污染土壤细菌群落结构的影响

土壤微生物是生态系统中主要的分解者, 土壤微生物种群结构是评价土壤质量的重要指标, 较高的微生物多样性对于维持健康的农业生态系统至关重要^[24]。

本研究在预试验蚯蚓生存情况良好的基础

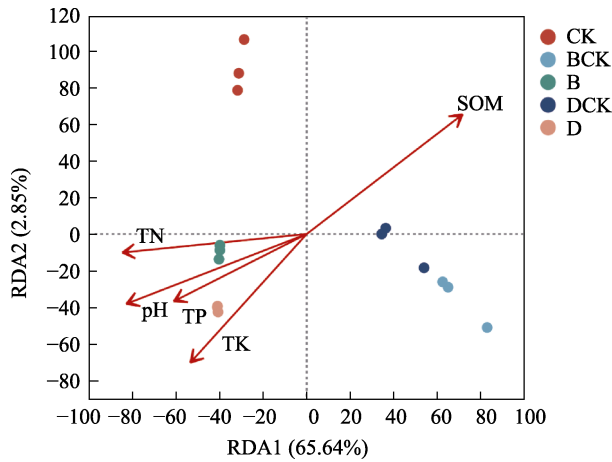


图 6 不同处理与土壤理化性质之间的冗余分析

Fig. 6 Redundancy analysis between different treatments and soil physiochemical properties

上, 确定了土壤中吡虫啉 (IMI)、啶虫脒 (ACE) 的浓度; 试验中, 为减少其他因素的干扰, 每天观察记录红壤中蚯蚓的存活情况, 及时将死亡蚯蚓挑出 (用牙签刺激蚯蚓尾部查看有无反应判断蚯蚓是否死亡), 因此, 可基本排除蚯蚓死亡带来的试验干扰因素。高通量测序结果表明, 加入 IMI、ACE 显著降低了土壤细菌群落的物种丰富度和多样性; 而添加蚯蚓, 一定程度上稳定了受 IMI、ACE 污染土壤的微生物群落结构。对门水平细菌群落结构进行分析发现, 与 CK 相比, BCK 和 DCK 处理的放线菌门、变形菌门、拟杆菌门和酸杆菌门的丰度均降低, 优势菌门由 CK 的放线菌门转变为 BCK、DCK 处理的厚壁菌门。厚壁菌门细菌均为革兰氏阳性菌, 细胞壁中的肽聚糖结构使其具有较强的抗冲击能力^[25]; 在 BCK 和 DCK 处理中, 厚壁菌门作为优势菌门, 可能是由于 IMI、ACE 的加入, 对土壤微生物造成毒害, 导致土壤中不耐受 IMI、ACE 的细菌失活死亡, 促使厚壁菌门细菌逐渐成为优势菌并大量繁殖, 以此应对土壤中的污染。添加蚯蚓后, B、D 处理土壤中的厚壁菌门的丰度明显下降, 变形菌门、放线菌门、拟杆菌门和酸杆菌门的丰度有所提升。变形菌门是富营养菌, 在营养充足的情况下丰度会增加^[26], 其外膜可抵抗外界环境的侵害, 使细菌具有较好的环境适应能力^[27]; 其丰度增加, 可能是由于蚯蚓的添加, 在土壤中挖孔取食增加了土壤养分和微生物活性, 提升了微生物数量; 放线菌门丰度有所提升, 可能是蚯蚓在土壤中生长的过程中, 其排泄物产生的放线菌含量较高导致

的^[28]。放线菌门、变形菌门、拟杆菌门是土壤中具有杀虫剂耐药性和大分子有机物的主要降解者, 这些降解和耐受菌门丰度的提升, 可能加速了土壤中新烟碱类杀虫剂的生物降解, 减轻了其对土壤中微生物的毒害作用^[29]。BCK 和 DCK 处理中高丰度的厚壁菌门, 暗示在其处理中可能存在有机污染物未被降解; B、D 处理中, 蚯蚓引入后厚壁菌门的丰度明显下降, 推测在蚯蚓的生长活动过程中, 土壤中部分有机污染物可能被降解。由此可得, 与 CK 相比, NEOs 的加入改变了土壤细菌群落结构, 且对大部分细菌有毒副作用, 导致细菌丰度下降; 与未添加蚯蚓的处理相比, 加入蚯蚓的处理细菌群落结构发生了显著变化, 土壤优势菌门组成也发生了改变, 一定程度上恢复了土壤细菌群落结构。

3.2 蚯蚓与吡虫啉、啶虫脒污染土壤理化性质之间的关系

与 CK 相比, 随着 IMI、ACE 的添加, BCK 和 DCK 处理的 SOM 和 TN 降低。这可能是由于 IMI、ACE 的添加致使土壤微生物遭受胁迫, 改变了微生物群落结构。厚壁菌门菌群具有较强的代谢活性, 能够耐受大分子有机物的胁迫; 作为 BCK 和 DCK 处理中的优势菌门, 增加了部分重要氮循环过程所需微生物的丰度, 导致土壤中的养分减少, 这种变化与 ZHANG 等^[30]的研究结果一致。加入蚯蚓的 B、D 处理的土壤 pH 升高, 说明蚯蚓的活动中和了土壤 pH。土壤 pH 作为影响土壤微生物多样性的重要因子, 土壤酸化会导致农作物产量和质量降低, 也会对生态环境产生负面影响, 是土壤退化的重要表现。本研究在 IMI、ACE 污染土壤中添加蚯蚓, 蚯蚓可能在生活、取食、挖孔过程中, 肠道及体腔分泌物呈中性, 生成了大量含碳酸钙或含氮类的碱性排泄物, 从而提高了 IMI、ACE 污染土壤的 pH, 对土壤酸碱进行了调节^[31]。添加蚯蚓提高了土壤 TN、TP、TK, 这可能是由于蚯蚓吸食污染物后, 其作穴、排泄等行为还可促进微生物活性、提高有益微生物数量, 从而增加了土壤中的有效养分, 改变了土壤养分的转化情况^[18]。与 CK 相比, 加入蚯蚓后土壤 SOM 含量降低, 其原因可能是: 一方面, 蚯蚓钻孔掘穴可以增加孔隙度, 加速土壤中有有机物的分解; 另一方面, 蚯蚓在吞食土壤的过程中, 加速了土壤 SOM 的分解转化^[32]。

土壤环境因子对微生物的生长活动有着重要影响, 土壤理化性质不同, 微生物群落组成也不同^[33]。在本研究中, 添加 NEOs 后, SOM 和 TN 含量降低, 说明施用 NEOs 在一定程度上影响了土壤理化性质, 改变了土壤细菌的群落结构; 而加入蚯蚓在一定程度上提高了土壤肥力, 恢复了污染土壤的细菌群落结构。

4 结论

吡虫啉、啉虫脒的暴露使土壤中原有微生物种群的丰富度和多样性降低, 改变了细菌群落的结构组成; 吡虫啉、啉虫脒的加入导致土壤中的有机质和全氮养分含量下降; 蚯蚓的引入提高了受吡虫啉、啉虫脒污染土壤的 pH 和土壤肥力, 改善了吡虫啉、啉虫脒污染土壤中的细菌群落结构, 提高了土壤中具有杀虫剂耐药性和降解杀虫剂能力的放线菌门、变形菌门、拟杆菌门等的丰度, 研究结果为从蚯蚓圈中筛选出高效吡虫啉、啉虫脒降解菌提供了可行性。

参考文献

- [1] BARON G L, JANSEN V A A, BROWN M J F, RAINE N E. Pesticide reduces bumblebee colony initiation and increases probability of population extinction[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(9): 1308-1316.
- [2] THOMPSON D A, LEHMLER H J, KOLPIN D W, HLADIK M L, VARGO J D, SCHILLING K E, LEFEVRE G H, PEEPLES T L, POCH M C, LADUCA L E, CWIERTNY D M, FIELD R W. A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health[J]. *Environmental Science-Processes & Impacts*, 2020, 22(6): 1315-1346.
- [3] 张琪, 赵成, 卢晓霞, 于波, 黄钰婷. 新烟碱类杀虫剂对非靶标生物毒性效应的研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(1): 56-71.
ZHANG Q, ZHAO C, LU X X, YU B, HUANG Y T. Advances in research on toxic effects of neonicotinoid insecticides on non-target organisms[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15(1): 56-71. (in Chinese)
- [4] GOULSON D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2013, 50(4): 977-987.
- [5] VIJVER M G, VAN DEN BRINK P J. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid: a rebuttal and some new analyses[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89837.
- [6] BARTLETT A J, HEDGES A M, INTINI K D, BROWN L R, MAISONNEUVE F J, ROBINSON S A, GILLIS P L, SOLLA S R. Acute and chronic toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the freshwater amphipod, *Hyalella azteca*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 175: 215-223.
- [7] WANG Y, ZHANG Y, LI W, HAN Y T, GUO B Y. Study on neurotoxicity of dinotefuran, thiamethoxam and imidacloprid against Chinese lizards (*Eremias argus*)[J]. *Chemosphere*, 2019, 217: 150-157.
- [8] PISA L W, AMARAL-ROGERS V, BELZUNCES L P, BONMATIN J M, DOWNS C A, GOULSON D, KREUTZWEISER D P, KRUPKE C, LIESS M, MCFIELD M, MORRISSEY C A, NOOME D A, SETTELE J, SIMO-DELSON, STARK J D, VANDER SLUIJS J P, DYCK H V, WIEMERS M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(1): 68-102.
- [9] LU C, CHANG C H, PALMER C, ZHAO M, ZHANG Q. Neonicotinoid residues in fruits and vegetables: an integrated dietary exposure assessment approach[J]. *Environmental science & Technology*, 2018, 52(5): 3175-3184.
- [10] HALLMANN C A, FOPPEN R P B, VAN TURNHOUT C A M, KROON H D, JONGEJANS E. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations[J]. *Nature*, 2014, 511(7509): 341-343.
- [11] VIGNET C, CAPPELLO T, FU Q, LAJOIE K, MARCO G D, CLÉRANDEAU C, MOTTAZ H, MAISANO M, HOLLENDER J, SCHIRMER K, CACHOT J. Imidacloprid induces adverse effects on fish early life stages that are more severe in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) than in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*, 2019, 225: 470-478.
- [12] TIAN X, YANG W J, WANG D, ZHAO Y, YAO R H, MA L K, GE C Z, LI X L, HUANG Z Y, HE L, JIAO W T, LIN A J. Chronic brain toxicity response of juvenile Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) to the neonicotinoid insecticides imidacloprid and nitenpyram[J]. *Chemosphere*, 2018, 210: 1006-1012.
- [13] 陈姣姣, 陈晓芳, 郑书梅, 张秋金, 耿宝荣. 噻虫嗪对中华蟾蜍蝌蚪抗氧化系统及丙二醛含量的影响[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 35(5): 67-72.
CHEN J J, CHEN X F, ZHENG S M, ZHANG Q J, GENG B R. Effects of thiamethoxam on antioxidant system activity and malondialdehyd content in *Bufo gargarizans* tadpoles[J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 35(5): 67-72. (in Chinese)
- [14] LIN P C, LIN H J, LIAO Y Y, GUO H R, CHEN K T. Acute poisoning with neonicotinoid insecticides: a case report and literature review[J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2013, 112(4): 282-286.
- [15] 法国将全面禁止新烟碱类农药[J]. *农药*, 2016, 55(4): 249.

- France to ban all neonicotinoid pesticides[J]. *Agrochemicals*, 2016, 55(4): 249. (in Chinese)
- [16] SHI Z M, LIU J H, TANG Z W, ZHAO Y H, WANG C Y. Vermiremediation of organically contaminated soils: concepts, current status, and future perspectives[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 147: 103377.
- [17] LIANG L C, LIU W T, SUN Y B, HUO X H, LI S, ZHOU Q X. Phytoremediation of heavy metal contaminated saline soils using halophytes: current progress and future perspectives[J]. *Environmental Reviews*, 2017, 25(3): 269-281.
- [18] BANERJEE A, BISWAS J K, Pant D, SARKAR B, CHAUDHURI P, RAI M, MEERS E. Enteric bacteria from the earthworm (*Metaphire posthuma*) promote plant growth and remediate toxic trace elements[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 250: 109530.
- [19] PANKE-BUISSÉ K, POOLE A C, GOODRICH J K, LEY R E, KAO-KNIFFIN J. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(4): 980-989.
- [20] 胡晓倩, 李忠武, 陈佳, 聂小东. 南方红壤丘陵区退耕还林还草工程土壤保持效应评估[J]. *水土保持学报*, 2020, 34(6): 95-100.
HU X Q, LI Z W, CHEN J, NIE X D. Soil conservation benefits of the Grain for Green Program in the hilly red soil region of southern China[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2020, 34(6): 95-100. (in Chinese)
- [21] 罗舒文, 甄珍, 李文清, 张伟健, 吴伟健, 任磊, 蔺中. 两种生态型蚯蚓对四环素污染土壤中酶活性和细菌群落结构的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(2): 321-330.
LUO S W, ZHEN Z, LI W Q, ZHANG W J, WU W J, REN L, LIN Z. Ecological effects of two earthworms on the enzymic activity and bacterial community structure in tetracycline-contaminated soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(2): 321-330. (in Chinese)
- [22] 鲍士旦, 秦怀英, 劳家桢. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 1988.
BAO S D, QIN H Y, LAO J C. Soil agro-chemical analysis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1988. (in Chinese)
- [23] 庄康, 胡晓娟, 曹煜成, 许云娜, 张建设, 文国樑. 不同寡营养培养条件下南海水体细菌群落结构及其对碳源的利用特征[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 2697-2710.
ZHUANG K, HU X J, CAO Y C, XU Y N, ZHANG J S, WEN G L. Bacterial community structure and its utilization characteristics of carbon sources in water of South China Sea under different low-nutrient culture conditions[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(9): 2697-2710. (in Chinese)
- [24] LU X M, LU P Z, YANG K. Restoration using *Azolla imbricata* increases nitrogen functional bacterial groups and genes in soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(9): 3849-3859.
- [25] 宋兆齐, 王莉, 刘秀花, 梁峰. 云南和西藏四处热泉中的厚壁菌门多样性[J]. *生物技术*, 2015, 25(5): 481-486.
SONG Z Q, WANG L, LIU X H, LIANG F. Diversities of *Firmicutes* in four hot springs in Yunnan and Tibet[J]. *Biotechnology*, 2015, 25(5): 481-486. (in Chinese)
- [26] 王丹, 赵亚光, 马蕊, 杨鹏, 张成, 周东姣, 孙福新, 张风华. 微生物菌肥对盐碱地枸杞土壤改良及细菌群落的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(8): 1499-1510.
WANG D, ZHAO Y G, MA R, YANG P, ZHANG C, ZHOU D J, SUN F X, ZHANG F H. Effects of microbial fertilizers on soil improvement and bacterial communities in saline-alkali soils of *Lycium barbarum*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(8): 1499-1510. (in Chinese)
- [27] 罗洋, 孙丽, 刘方, 任军, 郭金梅, 闫修民. DA-6 和 EDDS 施用对龙葵生长、Cd 吸收和土壤细菌群落结构的影响[J]. *环境科学*, 2022, 43(3): 1641-1648.
LUO Y, SUN L, LIU F, REN J, GUO J M, YAN X M. Effects of DA-6 and EDDS on growth and Cd uptake by *Solanum nigrum* L. and on the soil bacterial community structure[J]. *Environmental Science*, 2022, 43(3): 1641-1648. (in Chinese)
- [28] KNAPP B A, PODMIRSEG S M, SEEGER J, MEYER E, INSAM H. 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.
- [29] DE GANNES V, EUDOXIE G, HICKEY W J. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 573-580.
- [30] ZHANG P, REN C, SUN H, MIN L J. Sorption, desorption and degradation of neonicotinoids in four agricultural soils and their effects on soil microorganisms[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 615: 59-69.
- [31] 鲁艳红, 廖育林, 聂军, 周兴, 谢坚, 杨曾平, 吴浩杰. 我国南方红壤酸化问题及改良修复技术研究进展[J]. *湖南农业科学*, 2015 (3): 148-151.
LU Y H, LIAO Y L, NIE J, ZHOU X, XIE J, YANG Z P, WU H J. Status of red soil acidification and its amelioration technologies in South China [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2015(3): 148-151. (in Chinese)
- [32] HICKMAN Z A, REID B J. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants[J]. *Environment International*, 2008, 34(7): 1072-1081.
- [33] DE CARVALHO T S, JESUS E C, BARLOW J, GARDNER T A, SOARES I C, TIEDJE J M, DE SOUZA MOREIRA F M. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria[J]. *Ecology*, 2016, 97(10): 2760-2771.