

DOI: 10.11766/trxb202008200416

唐凯迪, 高乃征, 刘娟, 凌婉婷. 六六六对红壤和紫色土中细菌群落多样性及结构的影响[J]. 土壤学报, 2022, 59 (3): 844–853.

TANG Kaidi, GAO Naizheng, LIU Juan, LING Wanting. Effects of Hexachlorocyclohexane on Bacterial Community in Red and Purple Soils in Terms of Variaty and Structure[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59 (3): 844–853.

六六六对红壤和紫色土中细菌群落多样性及结构的影响*

唐凯迪¹, 高乃征², 刘娟¹, 凌婉婷^{1†}

(1.南京农业大学土壤有机污染物控制与修复研究所, 南京 210095; 2.山东省沂南县第三中学, 山东临沂 276300)

摘要: 尽管六六六已被禁用多年, 但由于难降解、易滞留的特性, 其在土壤中检出率仍较高。残存的六六六对土壤细菌群落多样性和组成结构的影响一直备受关注, 相关认识仍待深化。采用小麦盆栽试验, 借助高通量测序技术, 模拟研究了不同施药浓度 (0、600、1 500 g·hm⁻²) 下六六六对旱地红壤和紫色土中细菌群落多样性和结构的影响。 α 指数分析结果表明, 在培养初期, 施用六六六显著提高红壤细菌群落多样性, 而对紫色土无显著影响; 但随培养时间延长, 在第 42 天时细菌群落多样性均恢复至对照组 (CK) 水平。细菌群落组成分析显示, 红壤中优势菌门为变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria)。分析 OTUs (可执行分类操作单元) 丰度发现, 六六六提高了红壤放线菌门和酸杆菌门 (Acidobacteria) 的多样性和丰度, 从而导致红壤细菌群落多样性指数上升; 紫色土中优势菌门为变形菌门和酸杆菌门。六六六增加了红壤中固氮菌 *Bradyrhizbium* (慢生根瘤菌) 丰度, 600 和 1 500 g·hm⁻² 六六六处理组较对照分别增长了 150% 和 180%; 紫色土中, 随六六六处理浓度增大, 固氮菌相对丰度降低。六六六引起土壤细菌群落和结构的变化, 对红壤细菌群落的影响要强于紫色土。研究结果为明确六六六污染土壤的微生态效应提供理论依据。

关键词: 六六六; 小麦; 优势菌门; 高通量测序

中图分类号: X53 **文献标志码:** A

Effects of Hexachlorocyclohexane on Bacterial Community in Red and Purple Soils in Terms of Diversity and Structure

TANG Kaidi¹, GAO Naizheng², LIU Juan¹, LING Wanting^{1†}

(1. Institute of Organic Contaminant Control and Soil Remediation, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. The Third Middle School of Yinan, Linyi, Shandong 276300, China)

Abstract: 【Objective】 Although hexachlorocyclohexane (HCH) has been banned as pesticide in agriculture for decades, its residue, still high in concentration, has been frequently observed in soil due to its property of persistentcet, So it remains to be an important task to well elucidate how HCH affects soil microbial communities in diversity and structure, and a topic of great significance to ecological health of the agro-environment systems. 【Method】 In this work, a greenhouse experiment was conducted, in red and purple soils grown with wheat, spiked with HCH at a rate of 0, 600, or 1 500 g·hm⁻². Soil bacterial

* 国家自然科学基金项目 (41771523, 41977121) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 41771523 and 41977121)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lingwanting@njau.edu.cn

作者简介: 唐凯迪 (1994—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤污染生态学。E-mail: 2018103036@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-08-20; 收到修改稿日期: 2020-10-11; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2022-02-14

community structure and diversity in the soils were determined using the high throughput sequencing technique. Total DNA in the soil samples were extracted using the Power Soil DNA Isolation Kit, a product of from MOBIO and tested with 1% agarose gel electrophoresis for quality. Compositions of the soil microbial communities were characterized with the sequencing technique.

【Result】Alpha index analysis revealed that HCH significantly increased diversity of the bacterial community in the red soil, while no significant effect was observed in the purple soil at the beginning of the wheat cultivation. However, after 42 days of cultivation, no significant differences were found between the soils spiked with HCH and CK in soil bacterial community diversity in the soils. Analysis of bacterial community compositions showed that Proteobacteria and Actinobacteria were the dominant phyla at the phylum level, and HCH increased the diversity of Actinobacteria and Acidobacteria in the red soil, while Proteobacteria and Acidobacteria were the dominant ones in the purple soil. Relative abundance of *Bradyrhizobium* in red the soil increased with the spiking rate of HCH, and its abundance did about 150% and 180% in the soils spiked with 600 and 1 500 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ HCH, as compared with that in the control treatment. However, in the purple soil, relative abundance of the nitrogen-fixing bacteria decreased with the addition of HCH. 【Conclusion】The residue of HCH obviously induced the changes in diversity and structure of the soil bacterial community in the soils, and the impact was more obvious in the red soil than in the purple soil. The findings provide a basis for understanding of the micro-ecological effects and safety assessment of HCH in the soil environments.

Key words: Hexachlorocyclohexane; Wheat; Dominant phylum; High throughput sequencing

六六六 (hexachlorocyclohexane, HCH; 化学式为 $\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$) 化学名为六氯环己烷, 是一种持久性有机氯杀虫剂 (OCPs), 1825 年由 Michael Faraday 首先合成, 因其廉价、广谱、长效和出色杀虫效果等优点, 20 世纪后半叶被广泛用作商业杀虫剂, 在防治病虫害、发展农业生产中发挥了重要作用^[1-3]。商品化六六六产品中 α 、 β 、 γ 、 δ -HCH 异构体为主要成分, 分别占 60%~70%、5%~12%、10%~12%、6%~10%^[4]。 γ -HCH 又称为林丹, 仅有林丹具有杀虫效力, 因此 HCH 生物活性主要取决于 γ -HCH 的含量^[5]。HCH 在高温、日光、酸性条件下均较稳定, 碱性条件下容易脱氯, 其中 β -HCH 降解最慢、半衰期长, 加上各异构体之间生物转化, 导致 HCH 持久积累, 在环境中长期存留^[6]。虽然我国在 20 世纪 80 年代已禁用 HCH, 但由于其在我国有长期生产和使用历史, 其残留时间长且毒性高, 目前一些土壤环境中仍有较高 HCH 残留^[7-8]。2014 年《全国土壤污染状况调查公报》^[9]中指出, 我国土壤中 HCH 点位超标率为 0.5%。

进入土壤中的 HCH 对土壤细菌群落数量和多样性产生影响, 从而间接地影响土壤中各种生物化学过程^[10]。不同细菌群落对 HCH 耐受性不同, 一些敏感性菌群会受到不同程度抑制^[11]。有研究显示, γ -HCH 对土壤中淀粉分解菌具有抑制作用^[12]。在

γ -HCH 污染的芦苇根际土壤中, 发现 α 、 β 和 γ 变形杆菌数量较多, 而 *Arcicella*、*Hevizibacter* (肝杆菌) 和 *Flavobacterium* (黄杆菌属) 则对 γ -HCH 较敏感^[13]。即使在推荐剂量下, HCH 还是会抑制甲烷氧化作用^[14]。借助甲烷氧化测定法和 PCR-DGGE (变性梯度凝胶电泳) 技术评估 HCH 对土壤中甲烷营养菌群落的影响, 发现 I 型甲烷营养菌群落分布不均匀, 且仅有 γ 和 δ 异构体对其有抑制作用^[15]。有研究发现, 向土壤中加入 HCH 异构体混合物后, 土壤微生物生物量增加^[16]。Viñas 等^[17]证明, 施加了 OCPs 的土壤中参与 OCPs 降解的细菌丰度升高。HCH 本身也能为土壤细菌提供碳源, 刺激 *Sphingomonas* (鞘氨醇单胞菌) 等细菌群落生长。这表明有机氯农药能够影响微生物菌群, 反之菌群也能够加速农药降解。然而, 以往研究中仅考虑了 HCH 自身对细菌群落的影响, 大多忽略了土壤理化性质等因素的作用。在各种环境变量中, 土壤类型也影响细菌群落的多样性及组成, 不同理化性质土壤的细菌群落对农药响应应该存在差异^[18-20]。

为了研究不同类型土壤中 HCH 对细菌群落的影响, 本文采用小麦盆栽试验, 结合高通量测序技术, 探讨了红壤和紫色土细菌群落对 HCH 污染的响应, 试图明确 HCH 对土壤微生态系统的影响, 并为土壤环境安全评价提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试红壤采集于江西鹰潭市中国科学院红壤生态试验站周围农田,紫色土采自四川盐亭县中国科学院盐亭紫色土生态试验站,红壤和紫色土的基本理化性质见表 1。

小麦(徐麦 856)种子购于江苏省农业科学院, HCH 混合异构体标准品(纯度 99%)购于 Dr. Ehrenstorfer 公司,异构体 α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH、 ϵ -HCH 含量分别为 $70 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $14 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.2 盆栽试验设计

在温室中进行盆栽试验。将采集的新鲜红壤和紫色土去除石块等杂物后,装入直径和高度分别为 20 cm 和 30 cm 的陶瓷花盆中,每盆装土 8 kg,同

时一次性施入 10 g 氮磷钾复合肥作为基肥。一周后,将小麦种子播种于盆中,进行正常水肥管理,待小麦生长至分蘖期时施药,用喷壶将 HCH 溶液均匀喷洒于土壤表层。本试验设置了 3 个 HCH 浓度处理,分别为不施加 HCH 对照(C)、 $600 \text{ g}\cdot\text{hm}^{-2}$ HCH 处理(M)、 $1500 \text{ g}\cdot\text{hm}^{-2}$ HCH 处理(H),每个处理 3 次重复。采用五点采样法,分别在施药后第 1、7、42 天采集各盆中表层土壤,将每盆中采集的土壤剔除植物残体和石块后混合,作为一个样品。将所有采集的土壤鲜样放置 -80°C 冰箱保存。

1.3 土壤 DNA 提取与测序

土壤样品全基因组的提取采用 MOBIO 公司的 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,按表 2 进行 PCR 扩增,检查样品的提取效果。引物选取 341F(5'-CCTACGG GAGGCAGCAG-3')、518R(5'-ATTACCGCGGCTG CTGG-3')。

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Some physicochemical properties of the test soils

土壤类型	采样地	pH	有机质	黏粒	粉粒	砂粒
Soil type	Location		Organic matter/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Clay/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Silt/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Sand/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
红壤 ^①	江西鹰潭 ^②	4.78	6.08	32.10	24.70	43.20
紫色土 ^③	四川盐亭 ^④	7.89	5.81	44.25	34.51	21.24

① Red soil, ② Yingtan, Jiangxi, ③ Purple soil, ④ Yanting, Sichuan

表 2 16S rDNA PCR 反应条件

Table 2 16S rDNA PCR reaction conditions

预变性	变性	退火	延伸	再延伸	循环数
Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	Cycles
95 $^\circ\text{C}$	95 $^\circ\text{C}$	55 $^\circ\text{C}$	72 $^\circ\text{C}$	72 $^\circ\text{C}$	20
5 min	35 s	40 s	50 s	1 min	

对 DNA 样品进行高通量测序,对细菌 16S V3~V4 区域进行扩增,引物选取 341F(5'-CCTACGGGA GGCAGCAG-3') 和 805R(5'-GACTACHVGGGT ATCTAATCC-3')。

对所有样品的有效序列进行聚类,将这些序列按照 97% 相似性聚类为 OTUs(操作分类单元, operational taxonomic units)。采用 Excel 2013 和 SPSS 22.0、Origin 2017 和测序数据处理平台进行数据处理及相关图表绘制,其他部分则采用单因素方

差分析进行显著性分析,显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结 果

2.1 土壤细菌群落 α 多样性

通过 16S rRNA 测序数据计算出 Chao1 和香农(Shannon)指数,以此进行群落结构 α 多样性分析^[21]。Chao1 指数用于估计样品中物种丰富度,数值越大表示细菌群落丰富度越高。香农指数综合反映样品

物种多样性, 数值越大表示细菌群落多样性越高。覆盖率 (Coverage) 主要反映测序结果对某些低丰度 OTUs 的覆盖。本次测序样本覆盖率均在 99% 以上, 表明测序结果反映了各个处理土壤细菌群落真实情况。

红壤和紫色土细菌群落的 Chao1 和香农指数见表 3。添加 HCH 后, 红壤中两种指数显著增加, 表明其细菌群落多样性升高, 且 HCH 施用浓度越高, 变化越大。HCH 对紫色土细菌群落多样性的影响不显著。高通量测序发现紫色土 Chao1 指数均大于红壤, 表明紫色土中细菌群落丰富度高于红壤。细菌群落丰富度越高, 抵抗微生态环境变化能力越强, 这可能是 HCH 对紫色土细菌群落多样性影响较小的主要原因。

HCH 对红壤细菌群落多样性的影响与残留时间密切相关。由图 1a 看出, 处理前期 HCH 作用下红壤细菌群落多样性指数显著提高。第 1 天时, 对照组香农指数为 7.62, 600 和 1 500 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ HCH 处理组则分别为 8.31 和 8.93, 不同处理组间差异显著, 表明高浓度 HCH 促使红壤细菌群落多样性提高。推测某些细菌群落会利用该农药为碳源, 从而刺激生长。第 7 天时, 各处理组细菌群落多样性最高, 1 500 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 处理组香农指数为 10.03。随着培养时间延长, HCH 对细菌群落的影响逐渐减弱, 第 42 天时,

各处理组基本恢复至对照水平。红壤样品 Chao1 指数为 1 088~2 146, 且随 HCH 处理浓度增大而提高, 表明 HCH 可提高红壤细菌群落丰富度。

与红壤相比, 紫色土中细菌群落多样性受 HCH 影响不显著 (图 1b)。第 1 天时, CK 处理、600 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 处理、1 500 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 处理的土壤香农指数分别为 10.41、9.98 和 9.89, 之间差异不显著。仅在第 7 天时, 1 500 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 处理组细菌群落多样性受到显著抑制, 香农指数为 9.64。然而第 42 天时其细菌群落多样性又完全恢复至 CK 水平。紫色土样品 Chao1 指数为 2 377~3 052, 远大于红壤, 表明其细菌群落丰富度高于红壤。丰富度越大, 土壤细菌群落自身的调节能力越强, 这可能也是 HCH 对紫色土细菌群落影响较小的主要原因。

2.2 土壤细菌群落结构组成

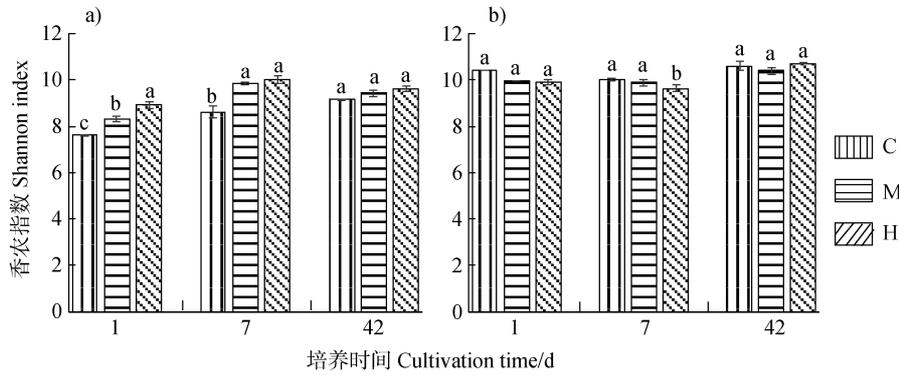
土壤细菌群落结构分析结果如图 2 所示。HCH 对红壤细菌群落组成结构的影响大于紫色土。HCH 降低了红壤中变形菌门 (Proteobacteria) 相对丰度, 显著提高了绿弯菌门 (Chloroflexi)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 的相对丰度和放线菌门 (Actinobacteria)、酸杆菌门的多样性。处理前期, 高浓度 HCH 处理组显著提高了紫色土中变形菌门的相对丰度, 但降低了酸杆菌门、拟杆菌门、绿弯菌门的相对丰度。

表 3 六六六处理下土壤中细菌群落丰富度及多样性指数

Table 3 Richness and diversity indices of the bacterial communities in the soils spiked with HCH

土壤类型	土样编号	香农指数	Chao1	覆盖率	土壤类型	土样编号	香农指数	Chao1	覆盖率
Soil type	Soil No.	Shannon	Chao1	Coverage	Soil type	Soil No.	Shannon	Chao1	Coverage
红壤	d1.C	7.62±0.01c	1088±67b	1.00a	紫色土	d1.C	10.41±0.01a	2866 ±11a	0.99a
Red soi	d1.M	8.31±0.12b	1262±90b	1.00a	Purple soil	d1.M	9.98±0.00a	2458 ±17a	1.00a
	d1.H	8.93±0.15a	1630±245a	1.00a		d1.H	9.89±0.11a	2402 ±162a	1.00a
	d7.C	8.62±0.25b	1287±73b	1.00a		d7.C	10.04±0.06a	2533 ±128a	1.00a
	d7.M	9.84±0.05a	2146±124a	1.00a		d7.M	9.89±0.16a	2551 ±200a	1.00a
	d7.H	10.03±0.18a	2072±360a	1.00a		d7.H	9.64±0.14b	2377 ±242a	1.00a
	d42.C	9.17±0.03a	1290±107a	1.00a		d42.C	10.61±0.21a	2867 ±337a	1.00a
	d42.M	9.44±0.15a	1759±167a	1.00a		d42.M	10.40±0.16a	2687 ±294a	1.00a
	d42.H	9.64±0.10a	1985±231a	1.00a		d42.H	10.72±0.04a	3052 ±31a	0.99a

注: d1: 第 1 天, d7: 第 7 天, d42: 第 42 天; C: 对照组, M: 600 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 六六六处理, H: 1500 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 六六六处理。表中同列不同小写字母表示同种土壤不同处理间差异显著 ($P<0.05$)。下同。Note: d1: 1 days, d7: 7 days, d42: 42 days; C: control, M: 600 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$, H: 1500 $\text{g}\cdot\text{hm}^{-2}$. Different lowercase letters of the same column meant significant differences at 0.05 level between different treatments of the same soil. The same below.



注: C: 对照组, M: 600 g·hm⁻²六六六处理, H: 1 500 g·hm⁻²六六六处理。图中不同小字母表示同一时间不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。C: control, M: 600 g·hm⁻², H: 1 500 g·hm⁻². Different letters meant significant differences at 0.05 level between different treatments. The same below.

图 1 六六六处理下土壤细菌香农指数变化 (a 红壤, b 紫色土)

Fig. 1 Changes in Shannon index of the bacteria in the soils spiked with HCH (a Red soil and b Purple soil)

第 1 天时, 与对照相比, 600 g·hm⁻² 和 1 500 g·hm⁻² HCH 处理的土壤中变形菌门相对丰度分别下降了 13.88% 和 19.63%, 呈现出随 HCH 处理浓度增大相对丰度降低的趋势。随着培养时间延长, 这种差异逐渐减小; 第 42 天时, 1 500 g·hm⁻² 处理组的相对丰度已超过对照水平。由图 3 可见, HCH 对红壤酸杆菌门、绿弯菌门的相对丰度有显著影响。第 7 天时, 与对照相比, 600 和 1 500 g·hm⁻² 处理组红壤放线菌门相对丰度增加了 3.69% 和 10.98%, 绿弯菌门相对丰度增加了 2.78% 和 6.23%。第 1 天时, 对照、600 和 1 500 g·hm⁻² 处理组中放线菌门的 OTUs 数目分别为 106、190 和 179, 酸杆菌门 OTUs 数目分别为 37、40 和 90, 表明 HCH 提高了放线菌门、酸杆菌门的多样性, 这可能是红壤中细菌群落多样性提高的主要原因。

与红壤不同, 高浓度 HCH 促使紫色土变形菌门相对丰度升高。由图 4 可见, 第 7 天时, 与对照相比, 1 500 g·hm⁻² 处理组变形菌门相对丰度显著增大了 5.53%; 第 42 天时, 两个 HCH 处理组基本恢复至对照水平。处理前期, HCH 降低了紫色土酸杆菌门、绿弯菌门、拟杆菌门的相对丰度。第 1 天时, 600 和 1 500 g·hm⁻² 处理组酸杆菌门相对丰度较对照下降了 0.25% 和 0.47%, 绿弯菌门相对丰度下降 0.98% 和 0.71%, 拟杆菌门下降 1.84% 和 2.69%; 但第 7 天时均有所恢复。

HCH 处理下两种土壤中变形菌门丰度最高。红壤优势菌门为变形菌门和放线菌门, HCH 提高了放线菌门、酸杆菌门的多样性。紫色土优势菌门为变形菌门、酸杆菌门, 与红壤相比, 处理前期 HCH 降低了紫色土酸杆菌门、拟杆菌门、绿弯菌门的相对丰度。

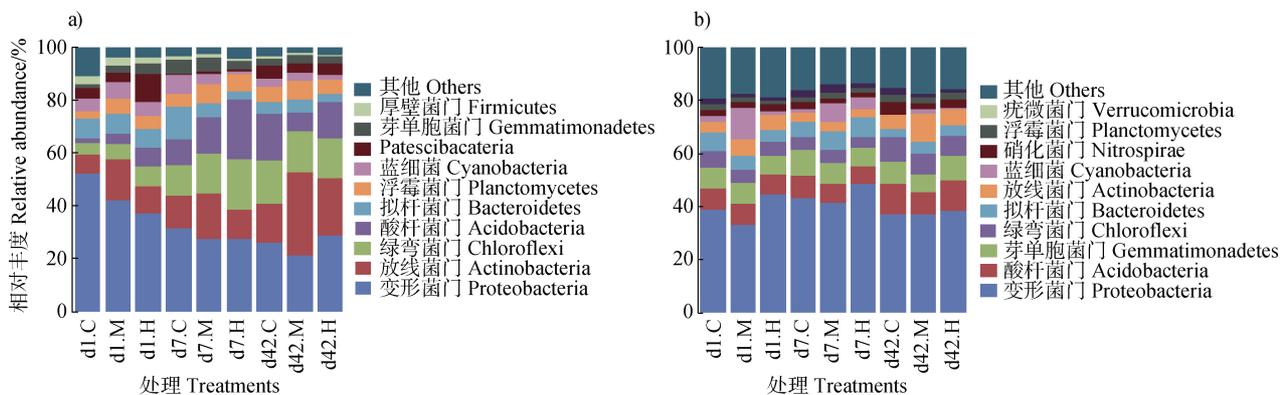


图 2 六六六处理下土壤细菌群落组成 (a 红壤, b 紫色土)

Fig. 2 Community composition of the bacteria in the soils spiked with HCH (a Red soil and b Purple soil)

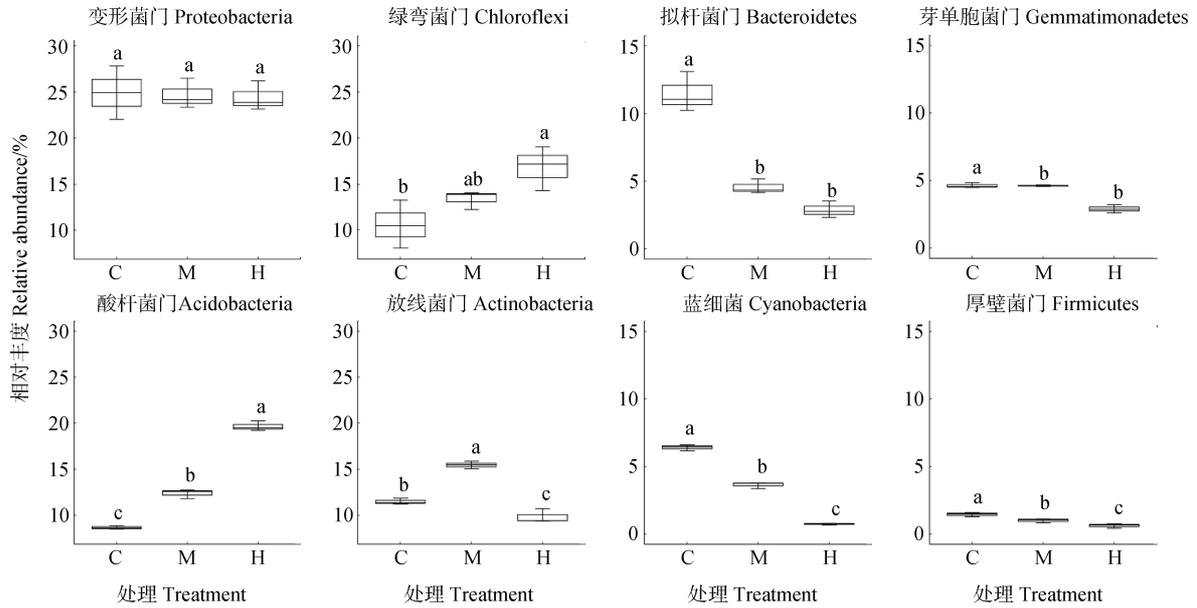


图 3 第 7 天时红壤优势菌门相对丰度随处理浓度的变化

Fig. 3 Changes in abundance of the dominant bacteria in the red soil spiked with HCH at Day 7

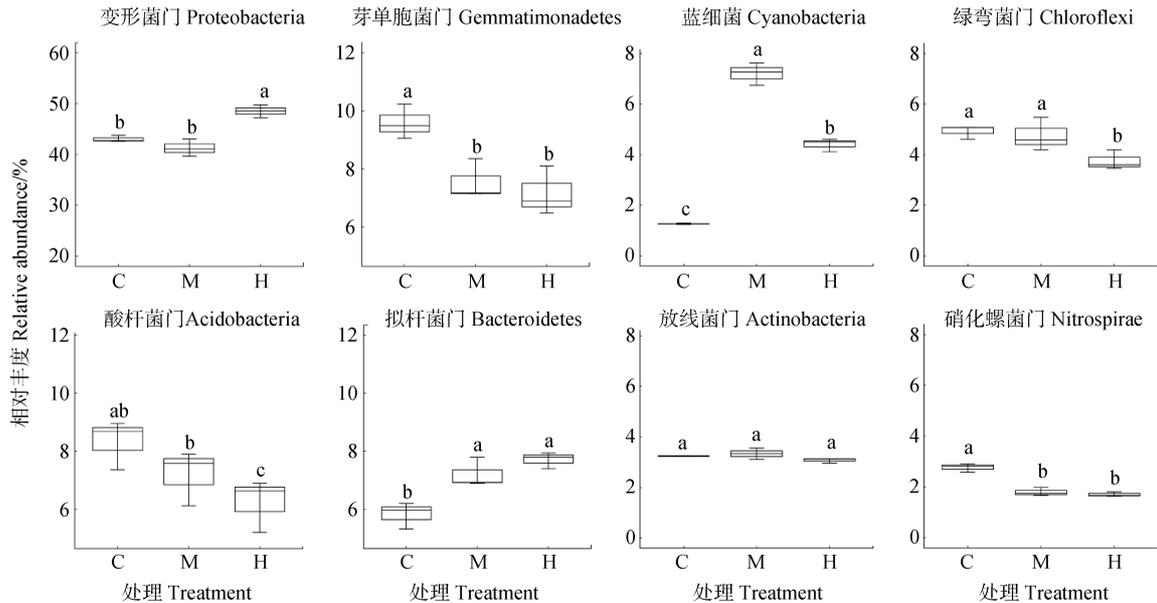


图 4 第 7 天时紫色土优势菌门相对丰度随处理浓度的变化

Fig. 4 Changes in abundance of the dominant bacteria in the purple soil spiked with HCH at Day 7

两种土壤中细菌前 100 优势菌属的相对丰度与 HCH 浓度间存在相关性。红壤中来自绿弯菌门的 *KD4-96_unclassified*、变形菌门的 *Elsterales_unclassified* 相对丰度与 HCH 浓度呈极显著正相关 ($P < 0.01$), HCH 加强了菌属所在生态位中同其他菌株的竞争, 推测这两种菌属对 HCH 具有耐受性。紫色土中 *Steroidobacteraceae_unclassified*、*Defluviococcus* 相对丰度与 HCH 浓度呈显著负相关, 拟杆菌门的

Flaviumibacter 相对丰度与 HCH 浓度呈显著性正相关(表 4)。

2.3 土壤中固氮菌丰度变化

红壤中, 高浓度 HCH 处理的土壤中慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizbium*) 相对丰度显著增加。紫色土中固氮菌种类和相对丰度大于红壤, 厌氧杆菌 (*Anaeromyxobacter*)、地杆菌属 (*Geobacter*)、脱硫球菌菌属 (*Desulfuromonas*) 受到 HCH 抑制,

相对丰度均下降,且施药浓度越高,抑制作用越大。

红壤中检测到 3 种丰度较高的固氮菌。结果显示, HCH 可提高 *Geobacter*、*Bradyrhizbium* 的相对丰度。由图 5 看出, *Geobacter*、*Bradyrhizbium* 相对丰度随施药浓度增大而提高;第 7 天时, 1 500 g·hm⁻²

处理组的 *Geobacter* 相对丰度较对照上升了 0.05%, 600 和 1 500 g·hm⁻² 处理组中 *Bradyrhizbium* 相对丰度较对照提高 0.15%和 0.18%。表明 HCH 能促进这两种固氮菌的生长。第 42 天时, 固氮菌总相对丰度有所下降, 但总体水平仍高于对照组。

表 4 六六六浓度与土壤优势菌属间的相关性

Table 4 Correlation between HCH concentration and dominant genera of bacteria in the soils

土壤类型 Soil type	菌属 Genus	相关系数 Correlation coefficient	土壤类型 Soil type	菌属 Genus	相关系数 Correlation coefficient
红壤 Red soil	<i>KD4-96_unclassified</i>	1.000**	紫色土 Purple soil	<i>Flaviumibacter</i>	0.999*
	<i>Elsterales_unclassified</i>	1.000**		<i>SC-I-84_unclassified</i>	-0.998**
	<i>Gemmatimonadaceae_unclassified</i>	0.998*		<i>Steroidobacteraceae_unclassified</i>	-1.000*

注: *显著相关 $P < 0.05$, **极显著相关 $P < 0.01$ 。Note: * represents significant correlation $P < 0.05$. ** represents extremely significant correlation $P < 0.01$.

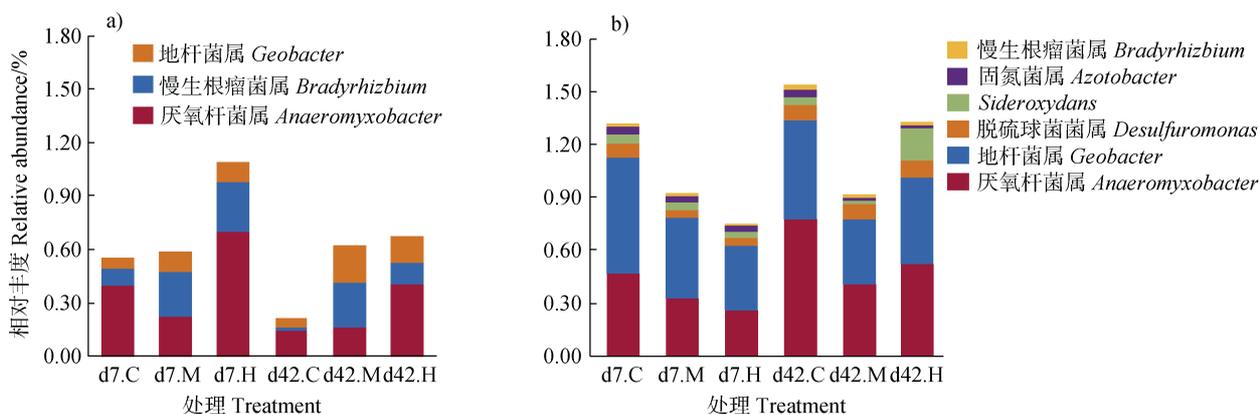


图 5 六六六处理下土壤中固氮菌丰度图 (a 红壤, b 紫色土)

Fig. 5 Abundance map of nitrogen-fixing bacteria in the soils spiked with HCH (a Red soil and b Purple soil)

供试污染强度下, HCH 降低了紫色土中 *Anaeromyxobacter*、*Geobacter*、*Desulfuromonas* 的相对丰度。紫色土中检测到 6 种丰度较高的固氮菌, 分别为 *Anaeromyxobacter*、*Geobacter*、*Desulfuromonas*、固氮菌属 (*Azotobacter*)、*Sideroxydans*、*Bradyrhizobium*。培养第 7 天, 1 500 g·hm⁻² HCH 处理下 *Anaeromyxobacter* 相对丰度较对照下降 0.21%, *Geobacter* 相对丰度下降 0.28%, *Desulfuromonas* 相对丰度下降 0.03%; 施药浓度越大, 抑制作用越强。培养至第 42 天, 各处理组固氮菌丰度较第 7 天时均有所恢复。

3 讨论

3.1 六六六对红壤细菌群落的影响

土壤细菌群落多样性是指菌群在数量和相对丰富度方面的复杂变异程度, 是土壤生态机制和土壤胁迫影响细菌群落的内在表现^[22-23]。农药对微生物生长的影响大致分为两种情况: 一是抑制微生物生长, 二是作为碳源被微生物利用。本试验中, HCH 对红壤细菌群落多样性有促进作用。据报道, 放线菌在红壤中丰度高, 作为土壤优势

菌群，可产生胞外水解酶，降解各种不溶性有机物质从而获得代谢所需营养，对有机物矿化起重要作用^[24]。已有研究证实，放线菌可利用难降解有机物生长，如链霉菌 (*Streptomyces*) 是有机氯农药的主要降解菌，能利用林丹作为碳源并促进自身生长，使其在污染土壤中成为优势种群^[25]。汪小勇^[26]发现，HCH 可促进土壤中放线菌数量增长。因此，农药污染可促使细菌群落向着降解或耐受农药的方向转化，减少了与敏感菌群的空间竞争，导致本研究中可降解 HCH 的菌群优势度增加。此外，在 HCH 作用下，优势菌绿弯菌门和酸杆菌门的相对丰度显著增加。张红等^[27]研究发现，在施加少量 HCH ($0.5\sim 1.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的土壤中，菌群利用碳源的能力高于空白土样，细菌群落代谢加强、数量增加。郑丽萍等^[28]分析了有机氯农药污染土壤的细菌群落结构，证实低负荷有机氯农药污染对土壤菌群生理活性有促进作用，高水平的 ($451.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 有机氯农药污染能显著抑制土壤微生物活性，抑制微生物对碳源的利用。因此，较低负荷 HCH 等农药污染可刺激土壤细菌群落生长，增加土壤微生物的整体活性。

固氮主要依靠土壤中固氮微生物群落来完成^[29]。受 HCH 影响最大的是慢生根瘤菌，其相对丰度提高了一倍多，这可加快土壤氮素转化，促进作物生长。丁柳屹^[30]在研究 γ -HCH 对土壤中固氮菌影响时也发现， γ -HCH 可导致慢生根瘤菌丰度升高。

3.2 六六六对紫色土细菌群落的影响

培养前期，紫色土中变形菌门相对丰度显著提高。据报道，变形菌门是五氯苯酚 (PCP) 降解过程的主要细菌门类，参与土壤中 PCP 降解，主要降解菌属有黄单胞菌属 (*Xanthomonadaceae*) 和伯克氏菌属 (*Burkholderiaceae*) 等^[31]。华健等^[32]研究表明，与对照组相比，添加一定浓度 PCP 在 $4\sim 17\text{ d}$ 可提高土壤中 *Proteobacteria* (变形菌) 的相对丰度。因此，细菌结构的动态变化伴随着农药生物降解过程，大量参与降解的微生物丰度得以提高。

土壤理化性质与细菌群落的变化具有相关性。本试验中，紫色土细菌群落变化不明显 (图 2)，推测可能原因是紫色土呈微碱性，细菌群落多样性高于红壤，群落关系复杂，抵抗环境变化的能力较强。此外，拟杆菌门的 *Flavihumibacter* 相对丰度与 HCH 浓度呈

显著正相关，可能受农药刺激后，菌株变异、耐受力增强，但是否为 HCH 耐受菌或降解菌，仍有待验证。本研究发现，紫色土中硝化螺旋菌门 (*Nitrospirae*) 相对丰度高于红壤 (图 2)，主要与土壤 pH 有关。微碱性的紫色土中 *Nitrospirae* 百分比高于酸性土，随 pH 升高，紫色土中硝化作用增强^[33-34]。硝化作用增强会使土壤中硝酸盐含量增加，对植物生长提供氮素养料有重要意义。此外，紫色土中厌氧杆菌属 (*Anaeromyxobacter*)、地杆菌属 (*Geobacter*)、脱硫球菌属 (*Desulfuromonas*) 对 HCH 较为敏感，而固氮菌属 (*Azotobacter*) 受 HCH 影响不明显，其耐受性较强。有报道表明，浓度在 $2.0\sim 15.0\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时， γ -HCH 对固氮菌数量并无显著影响，浓度为 $3.5\sim 15.0\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时， γ -HCH 能显著降低硝化细菌数量，影响土壤氮循环^[35]。HCH 浓度为 $250\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时，共生固氮菌根瘤菌 (*Rhizobium*) 数量下降约 40%，影响固氮效果^[36]。HCH 会降低联合固氮菌 *Azospirillum* (固氮螺菌) 的固氮酶和吸氢酶活性，这可能与 HCH 含氯有关^[37]。HCH 对土壤中不同固氮细菌的影响存在差异。大多数农药在田间推荐施用剂量下，不会影响细菌固氮作用；超过田间推荐用量，则会降低固氮菌活性和数量，影响土壤氮素转化，进而影响作物生长，给农业生产带来负面影响。

总体而言，HCH 对红壤微生态环境的影响相对较大。本文研究结果为明确 HCH 污染土壤的微生态效应提供了理论依据。但本文仅借助高通量测序手段明确了 HCH 对细菌群落的影响，而 HCH 改变关键菌群的机制仍不清楚，因此土壤 HCH 污染水平及环境因子对菌群的调控机理仍待进一步研究。

4 结 论

六六六 (HCH) 能够影响土壤细菌群落多样性及结构，总体表现为对红壤细菌群落的影响要强于紫色土。HCH 作用下，红壤细菌群落多样性提高，引起细菌群落结构组成变化，且 HCH 浓度越高，红壤细菌群落结构与不施加 HCH 对照组差异越大。在盆栽实验后期，随着 HCH 降解，这种影响逐渐消失。紫色土细菌群落丰富度远大于红壤，HCH 胁迫下紫色土细菌群落多样性和组成结构较为稳定。HCH 对红壤和紫色土中固氮细菌的影响也不同，HCH 污染

导致红壤中固氮细菌丰度上升, 而紫色土中则呈现下降趋势。

参考文献 (References)

- [1] Bai Q Y. The isomerization of hexachlorocyclohexane in the environment[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 1983, 3 (2): 20—22. [白清云. 六六六在环境中的异构化作用[J]. *农业环境科学学报*, 1983, 3 (2): 20—22.]
- [2] Phillips T M, Seech A G, Lee H, et al. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms[J]. *Biodegradation*, 2005, 16 (4): 363—392.
- [3] Quintero J C, Moreira M T, Feijoo G, et al. Screening of white rot fungal species for their capacity to degrade lindane and other isomers of hexachlorocyclohexane (HCH) [J]. *Ciencia e Investigación Agraria*, 2008, 35 (2): 159—167.
- [4] Lal R, Pandey G, Sharma P, et al. Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74 (1): 58—80.
- [5] Byzov B A, Tretyakova E B, Zvyagintsev D G, et al. Effects of soil invertebrates on the survival of some genetically engineered bacteria in leaf litter and soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 23 (3): 221—228.
- [6] Yu J Q. Determination and research on daminozide, hexachlorocyclohexane, acetochlor and their metabolites in peanuts and soil[D]. Jinan: Shandong University, 2008. [于军强. 花生及土壤中丁酰肼、六六六、乙草胺及其代谢产物的测定与研究[D]. 济南: 山东大学, 2008.]
- [7] Zhao L, Teng Y, Luo Y M. Status of organochlorine pesticide contaminated sites in China and advances in site remediation[J]. *Soils*, 2018, 50 (3): 435—445. [赵玲, 滕应, 骆永明. 我国有机氯农药场地污染现状与修复技术研究进展[J]. *土壤*, 2018, 50 (3): 435—445.]
- [8] Vijgen J, Abhilash P C, Li Y F, et al. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—A global perspective on the management of Lindane and its waste isomers[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 18 (2): 152—162.
- [9] Ministry of Environmental Protection, Ministry of Land and Resources of the People's Republic of China. Report on the national general survey of soil contamination[R]. [2014—04—17]. http://www.mee.gov.cn/gkml/sthjbgw/qt/201404/t20140417_270670.htm. [生态环境部, 国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报[R]. [2014—04—17]. http://www.mee.gov.cn/gkml/sthjbgw/qt/201404/t20140417_270670.htm.]
- [10] Johnsen K, Jacobsen C S, Torsvik V, et al. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – A review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 33 (6): 443—453.
- [11] Dadhwal M, Singh A, Prakash O, et al. Proposal of biostimulation for hexachlorocyclohexane (HCH) - decontamination and characterization of culturable bacterial community from high-dose point HCH-contaminated soils[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(2): 381—392.
- [12] Zargar M Y, Johri B N. Effect of *Gamma*-hexachlorocyclohexane on amylolytic microorganisms of soil and amylase activity[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1995, 55(3): 426—430.
- [13] San Miguel A, Roy J, Gury J, et al. Effects of organochlorines on microbial diversity and community structure in *Phragmites australis* rhizosphere[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (9): 4257—4266.
- [14] Kumaraswamy S, Rath A K, Bharati K, et al. Influence of pesticides on methane oxidation in a flooded tropical rice soil[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997, 59 (2): 222—229.
- [15] Mertens B, Boon N, Verstraete W. Stereospecific effect of hexachlorocyclohexane on activity and structure of soil methanotrophic communities[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7 (5): 660—669.
- [16] Rath A K, Ramakrishnan B, Rath A K, et al. Effect of pesticides on microbial biomass of flooded soil[J]. *Chemosphere*, 1998, 37 (4): 661—671.
- [17] Viñas M, Sabaté J, Espuny M J, et al. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (11): 7008—7018.
- [18] Delmont T O, Francioli D, Jacquesson S, et al. Microbial community development and unseen diversity recovery in inoculated sterile soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50 (7): 1069—1076.
- [19] Tian Y H, Feng Y L. Application of microbial research in evaluation of soil quality[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2008, 14(1): 132—137. [田耀华, 冯玉龙. 微生物研究在土壤质量评估中的应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14 (1): 132—137.]
- [20] Bossio D A, Scow K M, Gunapala N, et al. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles[J]. *Microbial Ecology*, 1998, 36 (1): 1—12.
- [21] Chen M Q, Ma L, Zhao B Z, et al. Effects of woody peat on quick improvement of soil organic matter and bacterial community composition in newly reclaimed red-yellow paddy soils[J]. *Soils*, 2020, 52(2): 279—286. [陈美淇, 马垒, 赵炳梓, 等. 木本泥炭对红黄壤性水田土壤有机质提升和细菌群落组成的影响[J]. *土壤*, 2020, 52 (2): 279—286.]
- [22] Donnison L M, Griffith G S, Hedger J N, et al. Management influences on soil microbial communities

- and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32 (2): 253—263.
- [23] Xia W J, Liu K L, Zhang L F, et al. Effect of long-term fertilization on soil microbial biomass and enzyme activities in reddish paddy soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58 (3): 628—637. [夏文建, 柳开楼, 张丽芳, 等. 长期施肥对红壤稻田土壤微生物生物量和酶活性的影响[J]. *土壤学报*, 2021, 58 (3): 628—637.]
- [24] Wang W L, Li J, Zhao X. Effects of biological organic fertilizer on rhizosphere soil bacteria community and root rot diseases of continuous cropping *Angelica sinensis*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30 (8): 2813—2821. [王文丽, 李娟, 赵旭. 生物有机肥对连作当归根际土壤细菌群落结构和根腐病的影响[J]. *应用生态学报*, 2019, 30 (8): 2813—2821.]
- [25] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. *Practical Streptomyces genetics*[M]. The John Innes Foundation, United Kingdom: Norwich, 2000.
- [26] Wang X Y. Research on phytoremediation technology of organochlorine pesticides (hexachlorocyclohexane) contaminated soil[D]. Nanning: Guangxi University, 2006. [汪小勇. 有机氯农药(六六六)污染土壤植物修复技术研究[D]. 南宁: 广西大学, 2006.]
- [27] Zhang H, Lü Y L, Xin X Y, et al. Effects of organochlorine pesticides on soil microbial community functional diversity[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25 (4): 937—942. [张红, 吕永龙, 辛晓云, 等. 杀虫剂类 POPs 对土壤中微生物群落多样性的影响[J]. *生态学报*, 2005, 25 (4): 937—942.]
- [28] Zheng L P, Long T, Lin Y S, et al. Biolog-ECO analysis of microbial community functional diversity in organochlorine contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2013, 19 (5): 759—765. [郑丽萍, 龙涛, 林玉锁, 等. Biolog-ECO 解析有机氯农药污染场地土壤微生物群落功能多样性特征[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19 (5): 759—765.]
- [29] Han B, Kong J J, Zou X M, et al. The evolution and expectation of biological nitrogen fixation[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2009, 37 (10): 86—89, 85. [韩斌, 孔继君, 邹晓明, 等. 生物固氮研究现状及展望[J]. *山西农业科学*, 2009, 37 (10): 86—89, 85.]
- [30] Ding L Y. Effect of γ -HCH on bacterial community structure in rhizosphere soil of covered alfalfa[D]. Xi'an: Northwest University, 2019. [丁柳屹. γ -HCH 对覆膜苜蓿根际土壤细菌群落结构的影响[D]. 西安: 西北大学, 2019.]
- [31] Cea M, Jorquera M, Rubilar O, et al. Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol by *Anthracythium discolor* and its effect on soil microbial community[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 181 (1/2/3): 315—323.
- [32] Hua J, Chen M J, Li F B, et al. Transformation dynamic of pentachlorophenol and its effects on microbial communities in a paddy soil[J]. *Earth and Environment*, 2018, 46 (3): 225—230. [华健, 陈曼佳, 李芳柏, 等. 水稻土中五氯酚的降解转化动态及其对微生物群落的影响[J]. *地球与环境*, 2018, 46 (3): 225—230.]
- [33] Cao Y Q, Yan X J, Luo H Y, et al. Nitrification activity and microbial community structure in purple soils with different pH[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2018, 55 (1): 194—202. [曹彦强, 闫小娟, 罗红燕, 等. 不同酸碱性紫色土的硝化活性及微生物群落组成[J]. *土壤学报*, 2018, 55 (1): 194—202.]
- [34] Jiang X J, Hou X Y, Zhou X, et al. pH regulates key players of nitrification in paddy soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 81: 9—16.
- [35] Martinez-Toledo M V, Salmeron V, Rodelas B, et al. Studies on the effects of a chlorinated hydrocarbon insecticide, lindane, on soil microorganisms[J]. *Chemosphere*, 1993, 27 (11): 2261—2270.
- [36] Lu J Z, Luo Q X, Cheng F Q, et al. The effect of hexachlorocyclohexane on nitrogen-fixing microorganisms[J]. *Environmental Science*, 1984, 9 (3): 35—38. [陆娟子, 罗清修, 成放晴, 等. 有机氯农药六六六对固氮微生物的影响[J]. *环境科学*, 1984, 9 (3): 35—38.]
- [37] Zeng K R, Wang Z F. Effects of six pesticides on the activities of nitrogenase and hydrogenase of *Azospirillum brasilense*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1986, 6 (3): 353—357. [曾宽容, 王子芳. 六种农药对固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 固氮酶和吸氢酶活性的影响[J]. *环境科学学报*, 1986, 6 (3): 353—357.]

(责任编辑: 陈荣府)