



文章栏目：固体废物处理与资源化

DOI 10.12030/j.cjee.201901133

中图分类号 X705

文献标识码 A

常会庆, 郑彩杰, 李兆君, 等. 污泥施用对根际和非根际石灰性土壤中细菌多样性的影响[J]. 环境工程学报, 2019, 13(9): 2250-2261.

CHANG Huiqing, ZHENG Caijie, LI Zhaojun, et al. Effects of sludge addition on bacterial diversity in rhizosphere and non-rhizosphere calcareous soil[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2019, 13(9): 2250-2261.

污泥施用对根际和非根际石灰性土壤中细菌多样性的影响

常会庆^{1,*}, 郑彩杰¹, 李兆君², 焦常锋¹, 朱晓辉¹, 何万领³, 王启震¹, 吴杰¹

1. 河南科技大学农学院, 洛阳 471000

2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081

3. 河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471000

第一作者: 常会庆(1974—), 男, 博士, 副教授。研究方向: 固体废物资源化利用。E-mail: hqchang@126.com

*通信作者

摘要 为研究污泥施用对石灰性土壤细菌多样性的影响, 在连续 2 年种植夏玉米大田系统中, 施用不同量的腐熟污泥, 采集根际和非根际土壤进行 16S rDNA-V3-V4 区高通量测序, 分析污泥施用对石灰性土壤细菌丰富度、多样性指数、群落结构、功能基因在代谢途径的影响, 同时对细菌群落和环境因素之间的相关性进行分析。结果表明: 污泥用量分别在 $3.5 \sim 37.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和 $3.5 \sim 7.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 有利于非根际和根际土壤 OTU 数量增加; 但污泥在 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 过量施用时, 根际和非根际土壤细菌的 Shannon 多样性指数显著降低, Simpson 指数显著增加, Ace, Chao 丰富度指数显著降低。主成分和门水平物种丰度分析表明: 污泥施用量不同会造成根际和非根际细菌群落结构差异, 并且当污泥施用量为 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 明显降低了非根际土壤放线菌门的丰度; 污泥施用量在 $3.75 \sim 37.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 非根际土壤中拟杆菌门丰度会明显增加。与对照相比, 当污泥用量为 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 根际土壤拟杆菌门有明显的增加, 增加丰度达 1.45 倍, 但酸杆菌门和放线菌门丰度降低了 49.74% 和 80.57%。冗余分析 (RDA) 表明, 土壤 TN、Cd、Cu、TP 是影响土壤细菌群落最主要的因素, 其中 TN、Cd、Cu 和细菌 Shannon、Simpson 多样性指数呈现显著相关性 ($P < 0.05$)。由此可见, 连续过量施入污泥会对根际和非根际石灰性土壤中细菌多样性造成不利影响, 而且上述微生物多样性变化可作为污泥合理施用的判断依据。

关键词 污泥; 石灰性土壤; 根际; 非根际; 细菌多样性

随着我国污水处理规模的迅速发展, 污泥产量也逐年剧增。截至 2015 年底, 我国脱水污泥年产量超过 $3 \times 10^7 \text{ t}$, 预计 2020 年污泥产量将再增加 1 倍^[1-2]。因此, 污泥的处置是我国目前面临的一大难题。污泥堆肥可以杀死有害细菌, 增加和稳定其中的腐殖质, 降低所含重金属的毒性效应^[3-4]。因此, 腐熟污泥农用是一种消纳污泥的有效途径^[5-6]。我国颁布的土地改良泥质、农用泥质和园林绿化泥质标准规定了污泥使用量、污泥累计使用量、连续使用年限和施用频率的要求, 但针对腐熟污泥在具体土壤类型上如何施用并没有相关要求^[7]。石灰性土壤作为广泛分布在我国干旱和半干

收稿日期: 2019-01-20; 录用日期: 2019-04-15

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (41571319); 国家重点研发计划 (2017YFD0801300); 河南省科技公关项目 (172102310181)

旱地区的土壤类型, 其碱性特征使其容易和重金属形成难溶性氢氧化物等沉淀^[8]。因此, 该类土壤对重金属污染表现出“不敏感性”特征, 该特征极易导致污泥过量施用而造成土壤质量的降低^[9]。

土壤微生物是土壤生态系统中最活跃的成分, 污泥施用造成土壤 pH, 阳离子交换量, 电导率和团聚体稳定性等理化性质发生变化^[10-13], 这些变化又对土壤微生物活性、微生物种类、数量、分布等多样性产生影响^[14-17]。其中需要关注的根际土壤微生物多样性是表征外源物质引起土壤质量变化的敏感指标^[18], 该多样性的变化值得重视。

已有研究^[19]表明, 石灰性土壤中微生物学特征及其微生物群落结构对调节土壤养分供应有重要作用, 污泥添加同样会对石灰性土壤微生物量以及碳、氮等微生物学性质产生影响^[20], 且上述影响除与土壤性质和作物系统有关外^[20-21], 不同污泥的施用量和施用时期长短也是影响土壤微生物性质及其多样性的重要因素^[22-24]。目前, 污泥施用对根际和非根际石灰性土壤中细菌多样性差异的研究还较少, 尤其是过量施用污泥对土壤微生物特征变化的影响尚缺乏研究。因此, 开展不同用量腐熟污泥对石灰性土壤细菌多样性特征影响研究, 可为其在石灰性土壤中施用的生物学质量评价和合理施用策略提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验地点和材料

实验地点位于河南省洛阳市(北纬 34°41', 东经 112°27'), 该地区属于干旱半干旱气候, 年均气温和降雨量分别为 15.6 °C 和 460 mm, 土壤类型属于典型石灰性土壤, 其基本理化性质和重金属含量如表 1 和表 2 所示。供试作物为夏玉米(夏玉米品种为郑丹 958), 夏玉米在每年 6 月种植, 10 月收获。

供试污泥取自洛阳市某污泥处理厂, 该污泥配以秸秆等辅料, 按照秸秆与污泥重量比 1:5 均匀混合, 通过好氧高温堆肥后制得腐熟污泥, 其重金属含量与《农用污泥中污染物控制标准》(GB 4284-2018) 所规定的值相比, 除 As 符合 B 级污泥限值外, 其余重金属符合 A 级污泥限值。

表 1 土壤和腐熟污泥基本理化性质

Table 1 Basic physico-chemical properties of soil and compost sludge

供试材料	有机质/%	总氮/(g·kg ⁻¹)	总磷/(g·kg ⁻¹)	总钾/(g·kg ⁻¹)	pH	碱解氮/(g·kg ⁻¹)	有效磷/(g·kg ⁻¹)	有效钾/(g·kg ⁻¹)
土壤	0.54±0.03	0.48±0.03	0.78±0.04	1.94±0.19	8.01±0.03	0.032±0.002	0.015±0.001	0.031±0.002
污泥	41.64±3.55	20.23±2.67	10.21±0.60	2.21±0.04	8.04±0.02	2.047±0.01	0.058±0.002	0.110±0.003

注: 数据为平均数和标准差分析。

表 2 污泥和土壤中重金属的含量

Table 2 Heavy metals content of soil and compost sludge

mg·kg⁻¹

供试材料	Pb	Zn	Cu	Cr	Cd	As	Hg
土壤	2.35±0.36	53.98±2.46	52.79±1.89	76.43±0.82	0.49±0.01	28.05±1.12	0.029±0.001
污泥	5.53±0.23	269.08±9.33	206.39±9.01	173.99±10.5	1.19±0.16	48.08±2.23	0.035±0.001

注: 数据为平均数和标准差分析。

1.2 实验设计

根据污泥的施用量不同, 实验设置 5 个处理, 分别为 0、3.75、7.5、37.5、75 t·hm⁻² 等 5 个污泥施用量。其中, 5 个污泥施用量分别对应非根际土壤样品为 A01, A03, A05, A07, A09; 对应的根际土壤样品为 A02, A04, A06, A08, A10。污泥的施用量参考我国污泥土地利用标准 (GJ/

T 309-2009) 进行设计, 每个小区面积 30 m^2 , 随机排列, 并重复 3 次。实验从 2015 年 10 月开始, 连续 2 a 种植冬小麦-夏玉米, 并且在冬小麦季把污泥和 180 、 90 、 $90 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的 N 、 P_2O_5 、 K_2O 肥作为底肥一次性施入土壤, 采用人工撒施和多次翻耕的方式使污泥和土壤均匀混合。期间进行正常的灌溉和管理。2017 年 10 月, 夏玉米收获后, 采集 $0\sim 20 \text{ cm}$ 非根际土壤 (没有作物生长的 $0\sim 20 \text{ cm}$ 表层土壤) 和根际土壤 (根际土壤采用“抖根法”, 先将玉米根系从土壤中挖出, 抖掉与根系结合松散的土壤, 收集与根际紧密结合在 $0\sim 4 \text{ mm}$ 范围的土壤作为根际土壤)。采集的新鲜土样分成 2 份, 其中一份放入 50 mL 灭菌的离心管后, 于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存用于细菌多样性分析; 另一份风干用于测定土壤其他参数。

1.3 总 DNA 提取建库测序

微生物多样性分析主要是在编码核糖体 RNA 的核酸序列保守区开展研究, 其中细菌主要基于的是 16S 保守区。本研究采用细菌 16S rDNA(V3+V4) 扩增利用的引物为 338F ($5'\text{-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3}'$) 和 806R ($5'\text{-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3}'$), 通过 PCR 扩增后形成测序文库, 然后利用 Illumina HiSeq 2500 进行测序, 上述测序结果覆盖了土壤样品中 98% 以上细菌的真实组成, 而且 OTUs 丰度稀释曲线随着测序量增加趋向平坦, 说明测序数量足够, 能够反应出样品中物种组成特征。

1.4 数据处理分析

根据 PE reads 之间的 Overlap 关系, 将 Hiseq 测序得到的双端序列数据拼接 (Merge) 成一条序列 Tags, 同时对 Reads 的质量和 Merge 的效果进行质控过滤。使用 FLASHE. v1.27、Trimmomatic. v0.33 和 Uchime v4.2 等软件进行质控过滤后, 得到优化序列 (Tags); 将优化序列进行聚类, 划分 OTU, 并根据 OTU 的序列组成得到其物种分类; 通过 Alpha 多样性分析研究样品内部的物种多样性, 统计样品在 97% 相似度水平下的 Ace、Chao、Shannon 及 Simpson 指数; 根据距离矩阵获得相应距离下的样品 PCA (主成分分析); 利用 16S 功能基因和冗余分析 (RDA) 分别对样品功能基因丰度和细菌群落组成与土壤参数之间的相关关系进行分析。

1.5 污泥和土壤性质的测定

供试污泥和采集的土壤样品风干过筛后分析以下指标: 全氮, 全磷, 全钾、有机质、pH、电导率。上述指标测定方法参考文献中的方法^[25]。重金属测定: 取 0.500 g 通过 100 目筛样品, 置于聚氟坩埚中, 加入 10 mL HF , 8 mL HNO_3 和 3 mL HClO_4 后静置 12 h , 以除去有机质和硅酸, 然后在加热板上加热, 温度逐渐升高至 $200 \text{ }^\circ\text{C}$, 稳定温度加热至白烟产生且坩埚中残存少量浅白色黏稠状物质为止。完全冷却后, 加 2% 的 HNO_3 $2\sim 3 \text{ mL}$ 溶解残存物质, 用 25 mL 容量瓶定容待用, 空白和标准样品同时消化, 样品中的 Zn、Cu、Pb、Cr、Cd 利用等离子发射光谱法 (美国, PE optima5300DV) 测定。As 采用双道原子荧光光度计 (北京, 吉田 AFS-9120) 测定。每个样品重复 3 次, 使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 污泥施用对石灰性土壤化学特征影响

石灰性土壤的主要理化性质受污泥施用的影响如表 3 所示。随着污泥用量的增加, 根际和非根际土壤 pH 呈现降低趋势, 但土壤中电导率、有机质、总氮和总磷有明显增加的趋势。与对照相比, 当污泥施用量超过 $7.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 污泥施用对上述参数的影响会显著增加。污泥施用也增加了土壤中 Pb、Zn、Cu、Cr、Cd、As 等重金属的含量, 当污泥施用量为 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 土壤中 Zn、Cu、Cd 的含量与其他处理相比具有显著差异 ($P < 0.05$), 而土壤中 As 在 7.5 、 37.5 、 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的污泥施肥量条件下并没有显示出显著差异 ($P > 0.05$)。和非根际土壤相比, 根际土壤中有机质、电导率、As 含量高于对应样品中的非根际土壤含量。

2.2 污泥施用对石灰性土壤细菌 OTU 丰度的影响

把序列之间相似性高于 97% 的 Tags 进行聚类，获得 OTU。图 1 显示了各污泥施用水平下根际和非根际石灰性土壤 OTU 丰度 (图 1 中不同小写字母表示各样品平均值具有显著差异 ($P < 0.05$))。非根际土壤样品中细菌的 OTU 丰度大小依次为 $A09 < A01 < A03 < A05 < A07$ 。由此可见，当污泥施用量为 $3.75 \sim 37.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时，非根际土壤中细菌 OTU 丰度随污泥施用量增加而增加；当污泥用量为 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时，样品 A09 中 OTU 的丰度与 A03, A05, A07 相比显著降低，并且低于 A01 丰度。根际土壤中细菌 OTU 的丰度大小顺序与非根际土壤有所不同，其 OTU 丰度依次为 $A10 < A08 < A02 < A04 < A06$ 。由此可见，当污泥施用量在 $37.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时，根际土壤中 OTU 丰度便开始降低，而且 A10 样品和其他各样品之间的 OTU 丰度相比具有显著差异。这说明污泥施用对根际土壤细菌 OTU 丰度的影响更加敏感，而且当污泥用量超过一定范围内会显著降低根际-非根际土壤细菌的 OTU 丰度。

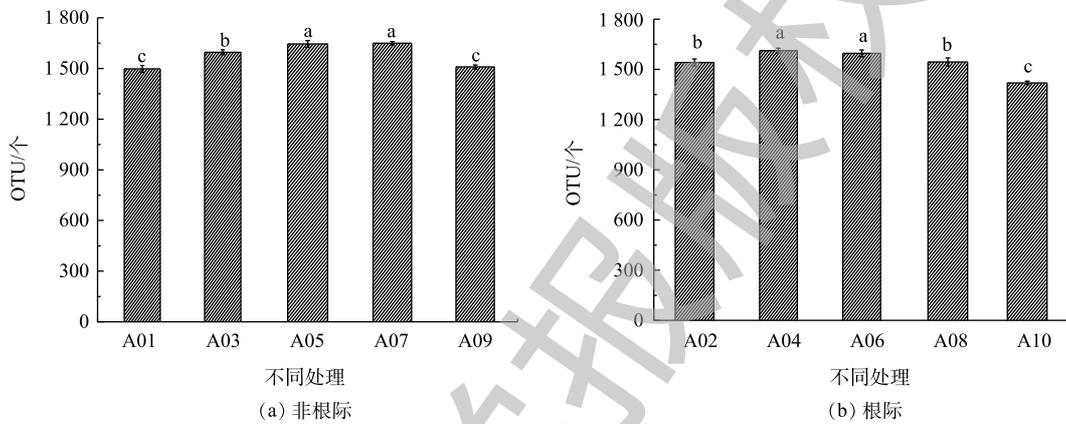


图 1 污泥施用对非根际和根际土壤 OTU 丰度影响

Fig. 1 Effects of sludge application on OTU abundance in non-rhizosphere and rhizosphere soil

Venn 图可以表示不同样品之间共有、特有的 OTU 数目，直观地表现出个样品之间 OTU 的重合情况 (图 2)。结合 OTU 所代表的物种，可以找出不同样品中的共有微生物。不同样品用不同颜

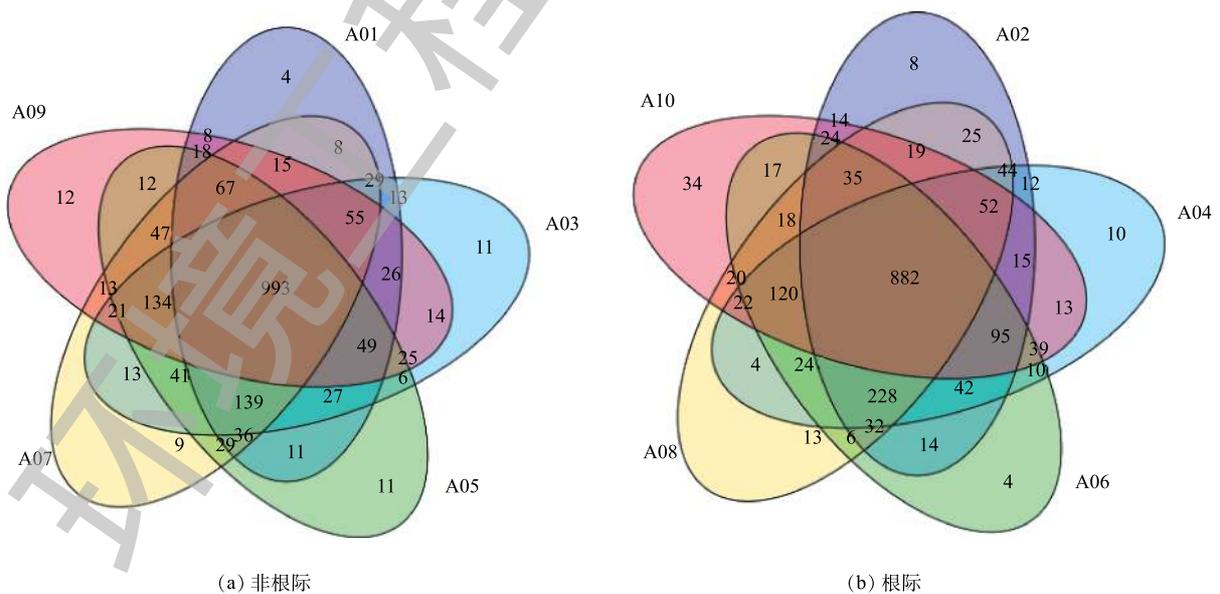


图 2 污泥施用后非根际和根际土壤细菌的 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of bacteria in non-rhizosphere and rhizosphere soil after sludge application

色表示, 交叠部分数字为 2 个样品之间共有的 OTU 个数。非根际土壤样品 A01、A03、A05、A07、A09 中总 OTU 数量为 1 896 个, 共有的数量为 993 个, 占总数 52.37%, 各样品中特有 OTU 数量分别为 4、11、11、9、12 个。这说明污泥施用于石灰性土壤中, 改变了非根际土壤中细菌 OTU 丰度, 但随着污泥用量的增加其对土壤中特有微生物的数量影响不大。根际土壤中特有的 OTU 数量为 882, 占总共 OTU 数量 1 895 比例为 46.54%, 因此, 污泥施用对根际土壤 OTU 的影响大于非根际土壤。其中 A02、A04、A06、A08、A10 样品中特有 OTU 数量分别为 8、10、4、13、34 个, 除 A08 样品外, 随着污泥用量的增加, 根际土壤中各处理特有 OTU 的数量呈增加趋势。污泥用量在 $75 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时, A10 和 A09 样品中特有微生物数量多于其他样品, 且根际土壤比非根际土壤增加了 183%。

2.3 污泥施用对石灰性土壤细菌 Alpha 多样性的影响

石灰性土壤施用不同量污泥后, 对细菌多样性指数 (Shannon、Simpson) 和丰富度指数 (Ace, Chao) 的影响如表 4 所示。在污泥施用量为 $75 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的条件下, 根际和非根际土壤的 Shannon 指数与其他各处理相比有显著差异 ($P < 0.05$), 其他各处理之间无显著差异 ($P > 0.05$)。当污泥用量为 $3.2 \sim 37.5 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时, 同一污泥施用水平下, 根际土壤的 Shannon 指数与非根际土壤无显著差异 ($P > 0.05$)。非根际和根际土壤的 Simpson 指数在污泥施用量为 $37.5 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时最低, 在污泥施用量为 $75 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时最高, 该指数值分别为 0.004 2 和 0.003 2, 0.009 4 和 0.009 8, 说明 $37.5 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的污泥施用量有利于细菌多样性指数的增加, 当污泥用量达到 $75 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时会显著降低细菌多样性。不同污泥施用量的 Ace, Chao 指数在非根际和根际土壤变化趋势一致, 都是污泥施用量为 $75 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时最小, 说明 $75 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的污泥施用量不但降低了细菌多样性指数, 而且降低细菌的丰富度指数。此外, 根际样品 A02 和 A04 的 Ace, Chao 指数比对应的非根际土壤高, 但非根际样品 A05, A07, A09 的 Ace, Chao 指数大于对应的根际土壤, 说明随着污泥施用量的增加会对根际细菌丰富度指数产生不利影响。

2.4 污泥施用对石灰性土壤细菌群落结构影响

PCA 主成分分析可将样品细菌多样性差异反映在二维坐标图上, 主成分轴用来解释差异的综合信息, 第 1 主成分轴解释最多的差异, 第 2 主成分轴解释第 2 多的差异。污泥施用后对石灰性土壤中根际和非根际土壤细菌主成分分析表明, 随着污泥施用量的增加, 土壤中各处理细菌群落结构距离越远, 说明对其群落组成造成的差异越大。对非根际土壤细菌群落结构而言, 主成分 1 的贡献率为 56.48%, 主成分 2 的贡献率为 24.08%, 两者累计为 80.56% (图 3)。在第 1 主成分轴 (PC1) 上, 污泥施用后非根际石灰性土壤上细菌群落结构差异较大, 且随着污泥用量的增加土壤中细菌群落结构差异变大。在第 2 主成分轴 (PC2) 上, 污泥用量较低的 A01 和 A03 样品细菌群落结构相近, 随着污泥用量增加 A05, A07, A09 样品之间细菌群落结构相近。

根际土壤细菌群落结构多样性的主成分 1 占 66.15%, 主成分 2 占 23.36%, 二者累计贡献率为 89.51%。在第 1 主成分轴上 A02、A04、A06、A08 之间的差异较小, 但与 A10 之间的差异最大。在第 2 主成分轴上, A02 与 A04 之间的差异最小, 与 A10 之间的差异最大。当污泥施用量增加时, 在主成分 1 对根际土壤细菌会产生较大的影响, 在主成分 2 对非根际土壤产生较大影响。

2.5 污泥施用对石灰性土壤细菌相对丰度的影响

根际和非根际土壤细菌在门水平分类上排名前 10 丰度的物种如图 4 所示。非根际土壤中细菌门类群集中于变形菌门 (*Proteobacteria*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) (相对丰度 $> 5\%$)。土壤中变形菌门和酸杆菌门细菌是土壤微生物的重要成员, 在土壤物质循环和生态环境构建过程其道非常重要作用。其中, 各处理变形菌门的丰度都超过 48%, 因为变形菌门适合养分含量高的土壤环境, 且与土壤有机质和全氮含量显著相关^[26]。污泥施用增加了土壤中有机质和养分 (表 3), 使得变形菌门的丰度增量范围为 1.63% ~ 4.05%。污泥施

表 3 污泥施用对非根际和根际土壤各参数影响
Table 3 Effects of sludge application on parameters of non-rhizosphere and rhizosphere soil

参数	非根际土壤					根际土壤				
	A01	A03	A05	A07	A09	A02	A04	A06	A08	A10
pH	8.18±0.02a	8.16±0.01a	8.13±0.01a	8.08±0.01b	7.96±0.02c	7.96±0.02a	7.95±0.01a	7.92±0.01ab	7.86±0.01b	7.76±0.02c
EC/($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	69.67±1.12d	74.00±1.00cd	76.67±1.15c	82.48±2.19b	92.33±2.31a	120.33±10.79c	124.67±3.06c	156±13.23b	175.33±13.05b	208.67±12.06a
有机质/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	5.57±0.37b	5.80±0.02b	6.33±0.20b	9.54±0.41a	10.40±0.54a	8.48±0.32b	8.55±1.01b	10.00±0.69b	12.38±0.59a	14.11±1.36a
总氮/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0.49±0.02c	0.52±0.02c	0.6±0.01b	0.66±0.02b	0.83±0.03a	0.36±0.02c	0.40±0.02c	0.52±0.01b	0.55±0.04b	0.72±0.03a
总磷/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0.77±0.03d	0.79±0.02cd	0.88±0.04bc	0.90±0.02b	1.02±0.06a	0.64±0.03c	0.66±0.02c	0.73±0.04bc	0.76±0.02b	0.88±0.05a
Pb/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	5.21±0.17c	5.51±0.12bc	5.67±0.16ab	5.89±0.14ab	6.00±0.16a	4.39±0.22c	4.65±0.14c	4.78±0.20bc	5.10±0.076ab	5.25±0.07a
Zn/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	53.86±3.35d	57.95±2.97d	68.60±1.85c	83.73±3.26b	96.30±4.57a	50.67±2.7d	55.58±5.53d	65.85±2.28c	80.16±1.44b	93.83±2.61a
Cu/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	54.19±4.03c	59.31±2.31c	84.03±4.58b	89.20±1.73b	115.7±4.51a	49.05±2.39c	52.96±2.96c	78.35±4.05b	81.72±3.17b	105.24±6.91a
Cr/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	81.28±2.23c	86.83±1.54bc	91.86±2.66ab	92.15±2.24ab	94.96±4.48a	74.59±2.13b	78.93±1.44b	85.74±2.22a	88.14±1.82a	90.70±2.29a
Cd/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0.41±0.01d	0.43±0.01d	0.49±0.02c	0.60±0.02b	0.74±0.03a	0.36±0.01d	0.39±0.01cd	0.45±0.02c	0.56±0.03b	0.69±0.04a
As/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	28.76±1.22c	32.37±1.65b	35.70±0.75a	36.17±0.39a	38.22±1.31a	33.73±5.83b	34.68±4.95b	41.05±3.76ab	43.42±2.89ab	46.94±1.76a
Hg/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：数据为平均数和标准差分析，每行根际和非根际样品中不同小写字母表示各处理平均值具有显著差异($P<0.05$)，"—"表示未检出。

表 4 污泥施用对石灰性土壤细菌多样性和丰度影响
Table 4 Effects of sludge application on bacterial diversity and abundance in calcareous soil

污泥施用量/ ($\text{t}\cdot\text{hm}^{-2}$)	Shannon		Simpson		Acc		Chao	
	非根际	根际	非根际	根际	非根际	根际	非根际	根际
0	(6.36±0.07)a	(6.41±0.12)a	(0.004 3±0.000 1)c	(0.004 5±0.000 1)c	(1 166.06±15.89)c	(1 670.20±15.53)b	(1 645.37±17.32)c	(1 700.84±21.52)b
3.5	(6.38±0.04)a	(6.39±0.07)a	(0.005 1±0.000 1)b	(0.004 8±0.000 2)c	(1 727.57±17.55)b	(1 754.11±18.59)a	(1 750.75±21.00)b	(1 759.19±20.59)a
7.5	(6.36±0.12)a	(6.37±0.10)a	(0.005 1±0.000 1)b	(0.005 7±0.000 2)b	(1 789.14±17.93)a	(1 721.38±17.62)ab	(1 785.98±18.95)ab	(1 743.80±10.00)ab
37.5	(6.42±0.09)a	(6.51±0.09)a	(0.004 2±0.000 1)c	(0.003 2±0.000 1)d	(1 825.15±26.45)a	(1 758.09±29.94)a	(1 822.54±9.85)a	(1 779.62±22.39)a
75	(6.15±0.04)b	(5.98±0.03)b	(0.009 4±0.000 1)a	(0.009 8±0.000 1)a	(1 657.49±13.80)c	(1 599.57±21.53)c	(1 657.17±17.23)c	(1 637.26±14.00)c

注：数据为平均数和标准差分析，每列中不同小写字母表示各处理平均值的显著性差异($P<0.05$)。

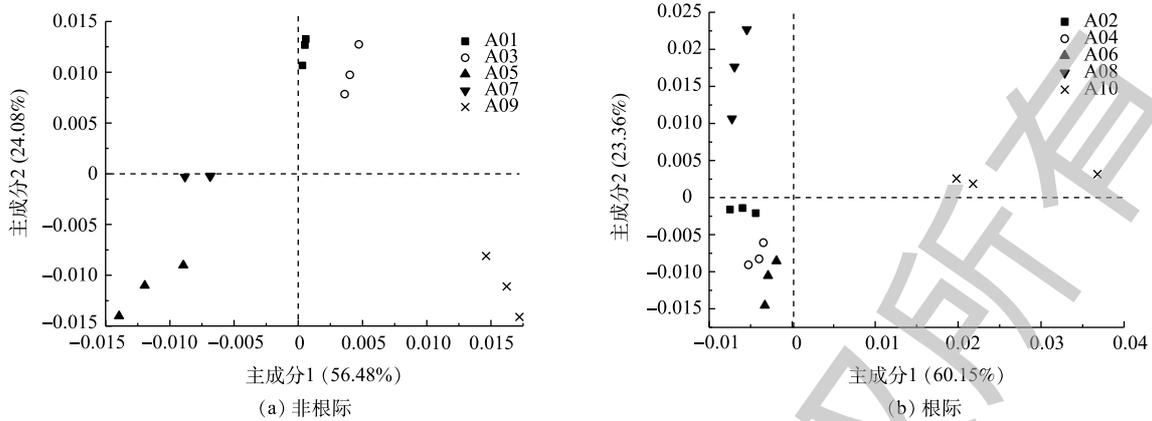


图3 非根际和根际土壤细菌的主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of bacteria in non-rhizosphere and rhizosphere soil

用量在 $3.75 \sim 37.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时拟杆菌门丰度增加明显, 但污泥施用降低了酸杆菌门丰度(降低幅度为 $31.58\% \sim 34.59\%$) 和放线菌门的丰度。同时, 当污泥施用量为 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 放线菌门的丰度降低达 51.75% , 这将不利于放线菌抵御病原菌和防治病害作用的发挥^[27]。与非根际土壤相比较, 根际土壤细菌在门水平上排名前10的种类相同, 但其丰度有所变化, 根际土壤中细菌门类群集中于变形菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)。当污泥用量增加时, 变形菌门丰度增加不明显。与对照相比, 当污泥用量为 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 拟杆菌门有明显的增加, 丰度增加达1.45倍; 酸杆菌门和放线菌门丰度降低 49.74% 和 80.57% 。其中酸杆菌门的降低不但与土壤 pH 的降低有关, 还与污泥施用导致土壤氮素增加也有密切关系^[28]。由此可见, 随着污泥用量的增加, 对根际和非根际土壤细菌门的丰度变化会产生不同影响。

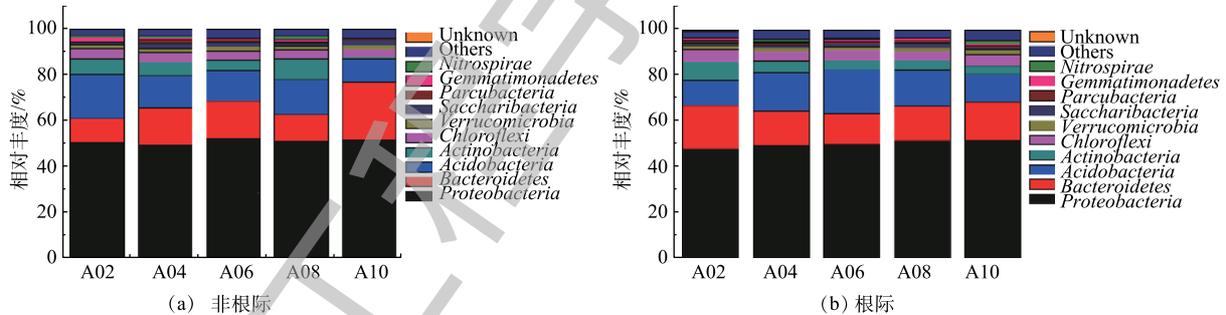


图4 门水平上非根际和根际土壤细菌的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of bacteria in non-rhizosphere and rhizosphere soil at phylum level

2.6 污泥施用对石灰性土壤细菌功能影响

由上述研究结果可知, 污泥施用量达 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时对根际和非根际土壤中细菌多样性产生较大影响。因此, 通过 KEGG(代谢途径分析数据库)分析空白对照和污泥施用量为 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的处理可知, 污泥过量施用可造成根际和非根际土壤微生物群落功能基因在代谢途径上的差异。KEGG 功能分析表明(见图5), 2个处理的前十大比例的代谢途径相同, 但污泥施用为 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 明显降低了 A09 样品中碳水化合物代谢、脂类代谢、氨基酸代谢以及膜运输代谢功能, 说明过量的污泥施用已经抑制了土壤系统中 C、N 的循环过程, 并显著增加了代谢途径有辅酶因子和维生素代谢、核苷酸代谢、翻译和信号传导功能, 而这些功能的增加可能源于放线菌门数量减少所带来的环境胁迫响应。样品 A10 的碳水化合物代谢、脂类代谢、能量代谢、外源性物质的生物降解和代谢以

及膜运输代谢显著降低，但辅酶因子和维生素的代谢、核苷酸代谢、翻译功能显著增加。不施用污泥时，样品 A02 与 A01 相比只有异源生物降解代谢，翻译，膜运输，信号传导功能增加，其余功能降低。上述代谢差异为判断污泥添加对土壤功能质量影响提供了依据。

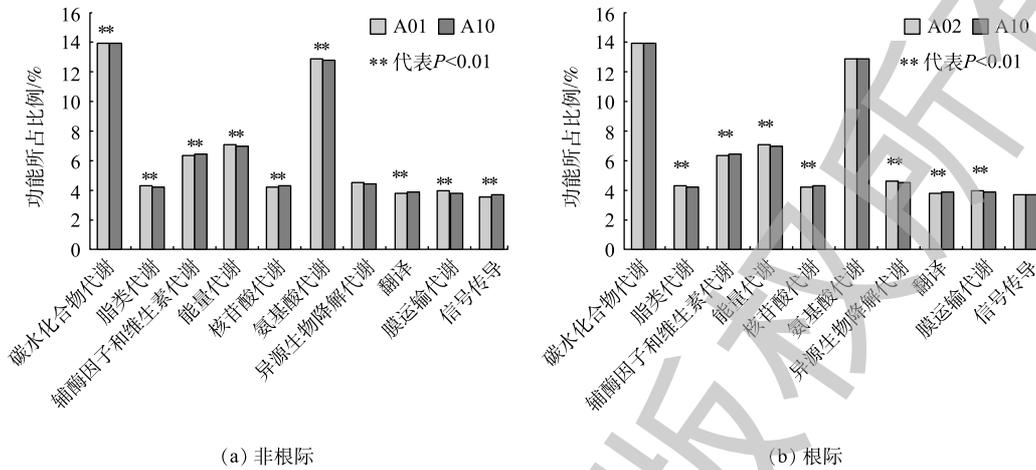
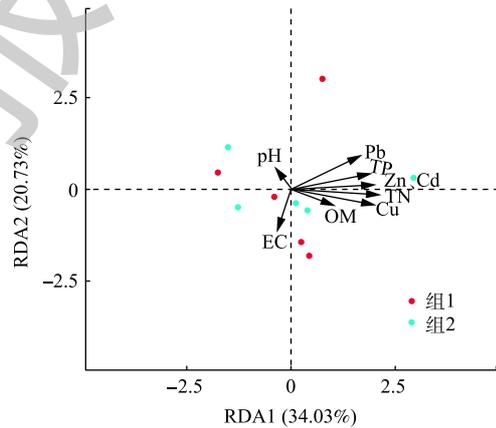


图 5 非根际和根际土壤细菌 KEGG 功能分析

Fig. 5 Analysis of KEGG function of bacteria in non-rhizosphere and rhizosphere soil

2.7 石灰性土壤性质 RDA 分析及与多样性指数相关性

污泥施用不但对土壤理化性质变化产生影响，而且会造成重金属积累。因此，为了明确上述不同参数对细菌群落组成影响大小，本研究选择土壤 pH、电导率 (EC)、有机质 (OM)、总氮 (TN)、总磷 (TP) 以及污泥添加对重金属影响较为显著的 Cd, Zn, Cu, Pb 作为环境变量，通过冗余分析 (RDA) 探查上述参数与纲分类水平下非根际土样品 (组 1) 和根际样品 (组 2) 细菌群落组成的相关性 (图 6)。第 1 排序轴解释了细菌群落变化的 34.03%，第 2 排序轴解释了细菌群落变化的 20.73%，2 个排序轴累积贡献率达 54.76%。从图中可以看出，土壤 TN、Cd、Cu、TP 与细菌群落的相关性大，其中 TN、Cd、Cu 和土壤 Shannon 和 Simpson 多样性指数达到显著相关 (表 5)，EC、Pb、Zn 与细菌群落的关系次之，而土壤中 pH 和 OM 对细菌群落组成影响较小。上述结果的原因在于，3.5 ~ 37.5 t·hm⁻² 的污泥施用量并没有对土壤 pH 和 OM 造成显著影响，但已明显影响了土壤中 TN、TP、Cd、Cu 等含量。



注：图中不同形状和颜色的符号表示污泥施用处理的细菌群落；箭头表示环境因子，箭头连线的长度带表某个环境因子与群落分布间相关程度的大小，箭头越长，说明相关性越大，反之越小；细菌群落与环境因子之间的夹角代表细菌群落与环境因子之间正负相关关系，锐角表示正相关，钝角表示负相关，直角表示不相关。

图 6 土壤细菌群落与土壤性质的 RDA 分析

Fig. 6 RDA analysis of soil bacterial community and soil properties

3 讨论

微生物多样性是土壤质量的重要参数，而且土壤微生物对其环境改变极为敏感，其多样性变化与土壤退化有密切关系 [29]。适量地投放污泥有利于土壤质量的维持，但过量或长期施用污泥会

表5 土壤参数与微生物多样性指数之间的相关分析

Table 5 Correlation coefficients between soil properties and microbial diversity index

多样性指数	pH	有机质	总氮	总磷	EC	Pb	Zn	Cu	Cd
Shannon	0.428	-0.457	-0.635*	-0.550	-0.343	-0.277	-0.591	-0.630*	-0.648*
Simpson	-0.470	0.469	0.642*	0.550	0.324	0.255	0.601	0.667*	0.654*
Ace	0.268	-0.175	-0.081	-0.029 2	-0.265	0.198	-0.052	-0.061 7	-0.134
Chao	0.244	-0.164	-0.183	-0.142	-0.195	0.098	-0.124	-0.149 7	-0.223

注: *显著相关 ($P < 0.05$)。

导致土壤质量的降低。ANDRES 等^[30] 通过向土壤中施用污泥, 初始阶段均可增加土壤微生物生物量, 但 1 a 以后污泥对土壤微生物活性已消失。长达 30 a 在大豆、生菜、芥菜上施用污泥的研究表明, 污泥长期施用对土壤微生物有负面影响^[31]。本研究连续 2 a 施用 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 污泥后, 根际和非根际土壤中细菌 OTU 丰度、多样性 Shannon 指数和丰富度 Ace, Chao 指数均会显著降低。因此, 针对不同土壤类型开展污泥施用后的微生物多样性变化研究, 并根据研究结果采取“隔年间歇式”污泥施用模式, 可做到既利用了污泥养分, 又能保证土壤质量。

有研究表明, 土壤细菌群落多样性的变化与土壤 pH、有机质、氮、磷有关, 其中 pH 的变化被认为是影响土壤微生物多样性的主要因素^[32-33]。和对照相比, 研究中污泥用量为 $37.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, pH 才有显著差异 (表 2), 但由于石灰性土壤上 pH 变幅较小, 使得其不是影响细菌多样性变化的一个重要因素, 本研究的 RDA 分析也印证了该结论。由于重金属对细菌的毒害作用, 会显著降低其多样性^[34]。较高含量的 Cu, Pb, Zn 重金属污泥, 施入土壤会造成土壤中微生物种群由细菌向真菌转化^[35]。富含 Zn 的污泥施用于沙壤土中会导致了所有微生物群落结构的变化 (即细菌, 真菌, 古生菌, 放线菌和根瘤菌), 其中真菌群落受其影响最大^[36]。本研究污泥的施用虽然增加了土壤中重金属积累, 但由于我国污泥重金属含量有降低趋势^[37], 以及石灰性土壤对重金属的“不敏感性”等原因, 使得除 Cd, Cu 外, 其他重金属和与细菌群落的相关性并不大。

选择根际土壤进行微生物多样性研究, 更能灵敏地反映出外源物质施用对土壤质量的影响^[38]。石灰性土壤上通过对细菌 OTU 丰度和 PCA 主成分分析, 也表明污泥施用对根际土壤细菌的影响更敏感。另外, 上述结果只是污泥连续施用 2 a 后的结论。为了更加全面的准确了解污泥对该类施用对该类土壤微生物多样性的影响, 选择多年根际土壤中细菌和真菌的变化研究, 才能准确评价污泥农用对微生物多样性的影响, 同时也为推荐污泥施用量提供依据。

4 结论

1) 污泥在石灰性土壤上施用会改变根际和非根际土壤中细菌丰富度和多样性指数, 而且在 2 a 连续施用量为 $37.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的条件下, 不利于根际土壤中细菌多样性增加。当污泥施用量达到 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 会显著降低根际和非根际土壤中细菌的多样性指数。因此, 考虑到根际微生物对外源物质响应的灵敏性, 此类土壤中连续 2 a 的污泥施用量宜控制在 $37.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 以下。

2) 污泥施用造成土壤理化性质的变化是影响土壤细菌群落变化的一个主要因素, 另外重金属种类对微生物群落组成的影响也存在差异。本研究在 2 a 连续施用污泥后, 土壤中 TN、Cd 和 Cu 是影响细菌群落的主要参数。

3) 污泥施用量超过 $75 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 将会抑制根际和非根际土壤中 C、N 的循环代谢功能, 降低酸杆菌门和放线菌门丰度。这说明此污泥施用量下, 土壤质量已经开始下降。

参 考 文 献

- [1] 余亚伟, 杨雨洽, 张成, 等. 施用污泥堆肥品对土壤和植物总汞及甲基汞的影响[J]. 环境科学, 2017, 38(1): 405-410.
- [2] 韩鹏, 刘和, 丁春华, 等. 蒸汽爆破对城市污泥预处理和厌氧发酵产酸的影响[J]. 中国环境科学, 2017, 37(1): 238-244.
- [3] 吴冠男, 谢震宇, 张文妍. 我国城市污泥农用的潜力浅析[J]. 广东化工, 2014, 41(16): 141-142.
- [4] ZAFARI A, KIANMEHR M H. Factors affecting mechanical properties of biomass pellet from compost[J]. *Environmental Technology*, 2014, 35(1/2/3/4): 478-486.
- [5] NOGUEIROL R C, DE MELO W J, BERTONCINI E I, et al. Concentrations of Cu, Fe, Mn, and Zn in tropical soils amended with sewage sludge and composted sewage sludge[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, 185(4): 2929-2938.
- [6] ZHAO S L, SHANG X J, DUO L. Accumulation and spatial distribution of Cd, Cr, and Pb in mulberry from municipal solid waste compost following application of EDTA and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(2): 967-975.
- [7] 魏亮亮, 孔祥娟, 辛明, 等. 国内外污泥处理处置标准指标分析及对我国相关标准研究的建议[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2014, 31(6): 790-800.
- [8] AMUNDSON R, BERHE A A, HOPMANS J W, et al. Soil and human security in the 21st century[J]. *Science*, 2015, 348(6235): 647-653.
- [9] 王海燕, 姚金玲, 武雪芳, 等. 国内外城市污水处理厂污泥标准对比研究与建议[J]. 给水排水, 2010, 36(10): 27-32.
- [10] SUNDERMEIER A P, ISLAM K R, RAUT Y, et al. Continuous no-till impacts on biophysical carbon sequestration[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2011, 75(5): 1779-1788.
- [11] LI P P, CHENG X, XUE B, et al. Evaluation of composted sewage sludge application to soil[J]. *Ieri Procedia*, 2013, 5: 202-208.
- [12] FLORENCIO I, MARIA J M, MARIA D S, et al. Influence of organic matter transformations on the bioavailability of heavy metals in a sludge based compost[J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 95(Supplement): 104-109.
- [13] CESAR N, JENNIFER N K, TERESA H, et al. Soil aggregation in a semiarid soil amended with composted and non-composted sewage sludge: A field experiment[J]. *Geoderma*, 2014, 219-220: 24-31.
- [14] 张鑫, 党岩, 冯丽娟, 等. 施用城市污泥堆肥对土壤微生物群落结构变化的影响[J]. 环境工程学报, 2014, 8(2): 716-722.
- [15] LIU X, GUO K L, HUANG L, et al. Responses of absolute and specific enzyme activity to consecutive application of composted sewage sludge in a fluventic ustochrept[J]. *Plos One*, 2017, 12(5): 1-16.
- [16] 孙玉焕, 骆永明, 杨志海. 污泥施用对土壤微生物群落结构多样性的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 5126-5127.
- [17] XIANG D H, DONG X, LIAN X. Changes in soil microbial functional diversity and biochemical characteristics of tree peony with amendment of sewage sludge compost[J]. *Environmental Science Pollution Research*, 2015, 22(15): 11617-11625.
- [18] GARCIA-GIL C, PLAZA C, SENESI N, et al. Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of semiarid Mediterranean soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2004, 39(5): 320-328.
- [19] 周然. 石灰性土壤微生物生物量C/P比的影响因素[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [20] 黄林, 乔俊辉, 郭康莉, 等. 连续施用无害化污泥对沙质潮土土壤肥力和微生物学性质的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2014, 38(4): 1-5.

- 2017(5): 80-86.
- [21] 刘恋, 张建峰, 姜慧敏, 等. 无害化污泥施用对土壤有机质、微生物量碳和氮含量的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33(5): 978-984.
- [22] SANTOS J A, NUNES L A P L, MELO W J, et al. Tannery sludge compost amendment rates on soil microbial biomass of two different soils[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(2): 146-151.
- [23] SELIVANOVSKAYA S Y, LATYPOVA V Z. Effects of composted sewage sludge on microbial biomass, activity and pine seedlings in nursery forest[J]. *Waste Management*, 2006, 26(11): 1253-1258.
- [24] SASTRE I, VICENTE M A, LOBO M C. Influence of the application of sewage sludges on soil microbial activity[J]. *Bioresource Technology*, 1996, 57(1): 19-23.
- [25] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [26] LIU J J, SU Y Y, YU Z H, et al. Soil carbon content drives the biogeographical distribution of fungal communities in the black soil zone of north-east China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 29-39.
- [27] TOKALA R K, STRAP J L, JUNG C M, et al. Novel plant-microbe-rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant(*Pisum sativum*)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5): 2161-2171.
- [28] 王光华, 刘俊杰, 于镇华, 等. 土壤酸杆菌门细菌生态学研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(2): 14-20.
- [29] 马维伟, 李广, 石万里, 等. 甘肃杂海湿地退化过程中植物生物量及物种多样性变化动态[J]. *草地学报*, 2016, 24(5): 960-966.
- [30] ANDRES P, MATEOS E, TARRASON D, et al. Effects of digested, composted and thermally dried sewage sludge on soil microbiota and meofauna[J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, 48(2): 236-242.
- [31] KATANDA Y, MUSHONGA C, BANGANGYI F, et al. Effects of heavy metals contained in soil irrigated with a mixture of sewage sludge and effluent for thirty years on soil microbial biomass and plant growth[J]. *Physics and Chemistry of the Earth*, 2007, 32(15/16/17/18): 1185-1194.
- [32] 邵颖, 曹四平, 刘长海. 基于高通量测序的南泥湾湿地土壤细菌多样性分析[J]. *干旱区资源与环境*, 2019, 33(2): 158-163.
- [33] FENG Y, GROGAN P, CAPORASO J G, et al. pH is a good predictor of the distribution of anoxygenic purple phototrophic bacteria in Arctic soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 74(6): 193-200.
- [34] BHATTACHARYA T, CHAKRABORTY S, BANERJEE D K. Heavy metal uptake and its effect on macronutrients, chlorophyll, protein, and peroxidase activity of *Paspalum distichum* grown on sludge-dosed soils[J]. *Environmental Monitoring Assessment*, 2011, 169(1/2/3/4): 15-26.
- [35] KAO P H, HUANG C C, HSEU Z Y. Response of microbial activities to heavy metals in a neutral loamy soil treated with biosolid[J]. *Chemosphere*, 2006, 64(1): 63-70.
- [36] MACDONALD C A, SINGH B K, PECK J A, et al. Long-term exposure to Zn-spiked sewage sludge alters soil community structure[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(10): 2576-2586.
- [37] 陈同斌, 黄启飞, 高定, 等. 中国城市污泥的重金属含量及其变化趋势[J]. *环境科学学报*, 2003, 23(5): 561-569.
- [38] 陈泽斌, 高熹, 王定斌, 等. 生物炭不同施用量对烟草根际土壤微生物多样性的影响[J]. *华北农学报*, 2018, 33(1): 224-232.
- (本文编辑: 王萌萌, 曲娜, 郑晓梅)

Effects of sludge addition on bacterial diversity in rhizosphere and non-rhizosphere calcareous soil

CHANG Huiqing^{1,*}, ZHENG Caijie¹, LI Zhaojun², JIAO Changfeng¹, ZHU Xiaohui¹, HE Wanling³, WANG Qizhen¹, WU Jie¹

1. School of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China

2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

3. School of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China

*Corresponding author, E-mail: hqchang@126.com

Abstract In order to study the effects of sludge application on bacterial diversity of calcareous soil, different amounts of compost sludge were applied in a 2 consecutive year-summer maize field system. The high-throughput sequencing of 16S rDNA-V3-V4 region was carried out for collected rhizosphere and non-rhizosphere soil. Effects of sludge application on bacterial richness, diversity index, community formation and functional genes were analyzed. The correlation between bacterial community and environmental factors was also determined. The results showed that the amounts of OTU in these two kinds of soil increased at sludge addition amounts of 3.5~37.5 t·hm⁻² in non-rhizosphere soil and 3.5~7.5 t·hm⁻² in rhizosphere soil, respectively. However, at sludge addition amounts above 75 t·hm⁻², Shannon index of bacterial diversity in rhizosphere and non-rhizosphere soil decreased significantly, Simpson index increased significantly, Ace and Chao indices for bacterial abundance also decreased significantly. Principal component and phylum-level species abundance analysis showed that different sludge addition amount could cause the differences in rhizosphere and non-rhizosphere bacterial community structure, and the abundance of actinobacteria in non-rhizosphere soil was significantly reduced at the sludge addition amount of 75 t·hm⁻². The abundance of *Bacteroidetes* in non-rhizosphere soil increased significantly at the sludge addition amounts of 3.75~37.5 t·hm⁻². Compared with the control, at the sludge addition amount of 75 t·hm⁻², the abundance of *Bacteroidetes* in rhizosphere soil increased by 1.45 times, but the abundances of *Acidobacteria* and *Actinobacteria* decreased by 49.74% and 80.57%, respectively. Redundancy analysis (RDA) showed that soil TN, Cd, Cu and TP were the most important factors affecting soil bacterial community, among which TN, Cd, Cu were significantly correlated with Shannon and Simpson diversity indexes ($P < 0.05$). Therefore, the continuous and excessive sludge application can adversely affect bacterial diversity in rhizosphere and non-rhizosphere calcareous soil. Moreover, the changes of microbial diversity indices mentioned above can be used as a basis for the rational sludge application.

Keywords sludge; calcareous soil; rhizosphere; non-rhizosphere; bacterial diversity