

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第39卷 第5期

Vol.39 No.5

2018

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

餐饮行业细颗粒物(PM _{2.5})排放测算方法:以上海市为例	王红丽, 景盛翱, 楼晟荣, 陶士康, 乔利平, 李莉, 黄成, 林立, 陈长虹 (1971)
上海夏季PM _{2.5} 中有机物的组分特征、空间分布和来源	高雅琴, 王红丽, 景盛翱, 乔利平, 李莉, 朱书慧, 楼晟荣, 陶士康, 冯加良, 李想, 陈长虹 (1978)
北京南郊区PM _{2.5} 中水溶性无机盐季节变化及来源分析	高韩钰, 魏静, 王跃思 (1987)
基于样方法的天津市春季道路扬尘PM ₁₀ 中水溶性离子特征及来源解析	赵静琦, 姬亚芹, 张蕾, 王士宝, 李越洋 (1994)
广州秋季HONO污染特征及夜间来源分析	田智林, 杨闻达, 虞小芳, 张曼曼, 张贺伟, 程丁, 程鹏, 王伯光 (2000)
基于硫氧同位素研究南京北郊夏季大气中硫酸盐来源及氧化途径	韩珣, 任杰, 陈善莉, 王瑾瑾, 沈潇雨, 魏英, 郭照冰, 朱彬 (2010)
区县尺度机动车高分辨率排放清单建立方法及应用	樊守彬, 郭津津, 李雪峰 (2015)
典型工业生物质锅炉多环芳烃排放特征	林玉君, 白莉, 王焕香, 肖文, 刘军, 向运荣, 张春林 (2023)
多时间尺度HSPF模型参数不确定性研究	庞树江, 王晓燕, 马文静 (2030)
氮氧同位素联合稳定同位素模型解析水源地氮源	金赞芳, 张文辽, 郑奇, 朱晨阳, 李非里 (2039)
白洋淀水体挥发性有机物污染特征与风险评价	高秋生, 赵永辉, 焦立新, 田自强, 杨柳, 杨苏文, 崔志丹, 郝子峰 (2048)
太湖颗粒态有机质的荧光特征及环境指示意义	吕伟伟, 姚昕, 张保华, 刘延龙, 李元鹏 (2056)
长江口滩涂表层沉积物中微塑料的分布及沉降特点	朱晓桐, 衣俊, 强丽媛, 程金平 (2067)
桂林五里峡水库丰水期溶解有机碳特征	卢晓漩, 李强, 靳振江, 彭文杰, 房君佳, 黄炳惠, 宋昂 (2075)
青藏高原多年冻土区典型植被下河流溶解性有机碳的生物可利用性	马小亮, 刘桂民, 吴晓东, 徐海燕, 叶琳琳, 张晓兰, 白炜 (2086)
城郊与城镇河流中溶解性有机质与重金属的相关性	梁梦琦, 邵美玲, 曹昌丽, 纵亚男, 唐剑锋 (2095)
溶解性有机质在岩溶水系统中的迁移转化及影响因素分析	张连凯, 刘朋雨, 覃小群, 单晓静, 刘文, 赵振华, 姚昕, 邵明玉 (2104)
三峡库区澎溪河回水区溶解态金属离子来源和时空分布特征分析	赵晓松, 蔚建军, 付莉, 姜伟, 周川, 李波, Douglas Haffner, Christopher Weisener, 张磊 (2117)
澜沧江流域沉积物间隙水-上覆水营养盐特征与交换通量分析	望雪, 程豹, 杨正健, 刘德富, 徐雅倩 (2126)
蓄水期三峡水库香溪河沉积物-水系统营养盐分布特征	苏青青, 刘德富, 纪道斌, 宋林旭, 崔玉洁, 李欣, 陈秀秀, 刘心愿 (2135)
两种沉水植物对上覆水和间隙水中各形态磷的影响	杨文斌, 高顺峰, 万锐, 孙祥, 王赢 (2145)
于桥水库沉积物-水界面氮磷剖面特征及交换通量	文帅龙, 龚琬晴, 吴涛, 郑小兰, 江雪, 李鑫, 钟继承 (2154)
岷江干流表层沉积物中磷形态空间分布特征	杨耿, 秦延文, 韩超南, 马迎群, 刘志超, 杨晨晨 (2165)
农业排水沟渠硝态氮吸收动力学特征及相关性分析	李如忠, 殷齐贺, 高苏蒂, 陈广洲 (2174)
不同合成条件对ZnAl-LDHs覆膜改性生物陶粒除磷效果的影响	向洋, 张翔凌, 雷雨, 方晨佳, 袁野, 姜应和, 徐舟影 (2184)
真空紫外/过二硫酸盐去除饮用水中嗅味物质	孙昕, 史路肖, 张燧, 杨煜, 唐晓 (2195)
石墨烯负载铁锰氧化物活化过一硫酸盐降解金橙G	夏文君, 刘峰, 郝尚斌, 黄天寅, 王忠明, 陈家斌 (2202)
载钼或铈生物炭吸附水体中As(V)的作用机制	李锦, 祖艳群, 李刚, 孙国新 (2211)
DOM不同相对分子质量组分在无机矿物上的吸附及其对卡马西平吸附的影响实验	梁雨, 何江涛, 张思 (2219)
污水处理厂中有机磷阻燃剂的污染特征	孙佳薇, 丁炜楠, 张占恩, 王俊霞, 顾海东 (2230)
低温污水前置强化混凝	刘海龙, 任宇霞, 张忠民 (2239)
印染废水反渗透脱盐系统运行性能及膜污堵特性	谭玉琨, 张泽田, 吴乾元, 姚颖, 胡洪营, 丘培文 (2249)
生物膜CANON反应器性能的优化:从FBBR到MBBR	付昆明, 李慧, 周厚田, 仇付国 (2256)
两次污泥颗粒化过程中微生物群落的动态变化	高景峰, 张丽芳, 张树军, 高永青, 王时杰, 樊晓燕, 潘凯玲 (2265)
铝、铁、钛3种金属盐基混凝剂调理污泥的性能比较	王晓萌, 王鑫, 杨明辉, 张淑娟 (2274)
热、热碱处理对污泥溶胞和溶解性有机物的影响	代勤, 张文哲, 于潘芬, 易皓, 刘俊新, 肖本益 (2283)
曝气时间比对亚硝化颗粒污泥形成的影响	李冬, 郭跃洲, 曹美忠, 劳会妹, 李帅, 张杰 (2289)
中国城市污泥中汞含量的时空分布特征	王宁, 刘清伟, 职音, 程柳, 麻冰涓, 毛宇翔 (2296)
夏季太湖湖/藻型湖区N ₂ O生成与迁移特征及其影响因素	郑小兰, 文帅龙, 李鑫, 龚琬晴, 刘德鸿, 钟继承 (2306)
太湖藻型湖区CH ₄ 、CO ₂ 排放特征及其影响因素分析	贾磊, 蒲旖旎, 杨诗俊, 苏荣明珠, 秦志昊, 张弥 (2316)
内蒙古典型草原季节性冻土区土壤剖面CO ₂ 、N ₂ O特征	李晋波, 姚楠, 李秀, 赵英, 张阿凤, 兰志龙, 范庭 (2330)
黄土高原成龄苹果园生态系统CO ₂ 通量特征	杨剑锋, 杨小妮, 王俊花, 段宇敏, 祁香宁, 张林森 (2339)
生物炭施用对紫色水稻土温室气体排放的影响	祁乐, 高明, 郭晓敏, 牛海东, 李婷, 孙涛, 曹群岭, 汤铭豪 (2351)
不同施肥处理对东北黑土温室气体排放的短期影响	李平, 郎漫, 李森, 魏玮, 李凯凯 (2360)
ITS高通量测序研究黄海微型真核浮游生物多样性及分布特征	张莉, 林佳宁, 张远, 王书平, 张晓娇 (2368)
不同排海方式城市尾水微生物扩散规律	郎秀璐, 宋志文, 徐爱玲, 牛成洁, 郭明月 (2380)
旅游活动对岩溶洞穴地下水中细菌群落的影响:以重庆丰都两个洞穴为例	吕现福, 贺秋芳, 王凤康, 赵瑞一, 张弘 (2389)
不同沼灌年限稻田土壤微生物群落分析	朱金山, 张慧, 马连杰, 廖敦秀, 杨星勇, 王龙昌, 王定勇 (2400)
生物炭对褐土理化特性及真菌群落结构的影响	阎海涛, 殷金玉, 丁松爽, 任天宝, 许家来, 宗浩, 高强, 刘国顺 (2412)
铅锌尾矿砂污染下的岩溶土壤微生物群落碳源代谢特征	房君佳, 李强, 刘畅, 靳振江, 梁月明, 黄炳惠, 卢晓漩, 彭文杰 (2420)
湖库沉积物好氧反硝化菌群脱氮特性及种群结构	康鹏亮, 张海涵, 黄廷林, 陈胜男, 商潘路, 冯稷, 贾亮宇 (2431)
反硝化菌群的氮代谢与反硝化偶联机制	张泽宇, 王明霞, 程永毅, 周志峰 (2438)
广西西江流域土壤铅空间分布与污染评价	张云霞, 宋波, 陈同斌, 伏凤艳, 黄飞, 庞瑞, 潘惠妹 (2446)
三峡库区消落带农业活动对土壤汞变化的影响	陈秋禹, 孙松, 尹德良, 王永敏, 张成, 王定勇 (2456)
水稻不同生长时期不同组织中抗砷内生菌的筛选与鉴定	王伯勋, 王学东, 段桂兰 (2464)
汞在酸性紫色水稻土的转化与水稻汞富集特征	李雨岑, 孙涛, 邓晗, 张成, 王永敏, 王定勇 (2472)
华北平原不同生产模式设施蔬菜生命周期环境影响评价	徐强, 胡克林, 李季, 韩卉, 杨合法 (2480)
基于细菌毒性测试与小鼠肺基因转录分析的PM _{2.5} 健康效应	宋鹏程, 陆书玉, 魏永杰, 陈倩倩, 罗丽娟 (2489)
中国PM _{2.5} 污染空间分布的社会经济影响因素分析	段杰雄, 翟卫欣, 程承旗, 陈波 (2498)

旅游活动对岩溶洞穴地下水中细菌群落的影响：以重庆丰都两个洞穴为例

吕现福, 贺秋芳*, 王凤康, 赵瑞一, 张弘

(西南大学地理科学学院, 岩溶环境重庆市重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 为了深入了解岩溶洞穴地下水中细菌群落结构特征以及评估旅游活动对细菌群落的影响, 对重庆丰都雪玉洞(旅游洞穴)和水鸣洞(未开发洞穴)洞穴地下水进行了采样, 利用 16S rDNA 高通量测序技术对地下水样品中的细菌进行了定性和定量分析. 结果表明, 两个洞穴地下水中细菌群落以变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)为主, 但细菌群落组成存在差异. 雪玉洞地下水上游和下游的变形菌门分别占总群落的 62% 和 64%, 拟杆菌门分别占 11% 和 16%; 水鸣洞地下水中细菌优势群落除变形菌门(38%)和拟杆菌门(19%)外, 绿菌门(Chlorobi)占 24%, 两个洞穴地下水中变形菌门的纲分类均为 γ -变形菌纲. γ -变形菌纲(γ -Proteobacterium)和拟杆菌为两个洞穴地下水的优势种类但其主要细菌存在差异: 雪玉洞主要细菌是不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和黄杆菌科(Flavobacteriaceae), 属于致病菌; 水鸣洞主要细菌是未培养的甲基球菌科(Methylococcaceae-uncultured)、甲基单胞菌属(*Methylomonas*)以及甲基杆菌属(*Methylobacter*), 属于甲烷氧化细菌. 多样性指数分析结果显示: 受旅游活动的强烈影响, 雪玉洞群落多样性明显高于水鸣洞并且存在更多的致病菌群落, 地下水细菌群落与环境因子多元直接梯度分析(RDA)证明群落分布规律受游客数量与洞穴空气 CO_2 影响且呈正相关, 两种环境因子的 Spearman 相关性分析进一步表明游客数量对地下水细菌群落结构的影响更明显并导致大量原生细菌消失.

关键词: 细菌群落; 岩溶; 地下水; 旅游洞穴; 未开发洞穴

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2018)05-2389-11 DOI: 10.13227/j.hjks.201709005

Impact of Tourism on Bacterial Communities of Karst Underground River: A Case Study from Two Caves in Fengdu, Chongqing

LÜ Xian-fu, HE Qiu-fang*, WANG Feng-kang, ZHAO Rui-yi, ZHANG Hong

(Chongqing Key Laboratory of Karst Environment, School of Geographical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: In this research, the bacterial community compositions of underground water in a tourist and pristine cave were studied. Xueyu Cave and Shuiming Cave are tourist and pristine caves, respectively, in the same karst cave system located in Chongqing, southwest China. To understand the impact of tourism on bacterial community compositions in underground water that flows through the caves, filtered materials from water were collected, and 16S rDNA gene sequences were obtained by high-throughput sequencing. The Shuiming Cave (the pristine cave) had less diversity than Xueyu Cave (the tourist cave) based on the Shannon's diversity index according to Illumina operational taxonomic units (OTUs). Proteobacteria, represented mostly by γ -Proteobacterium and Bacteroidetes, dominated both systems. OTUs from Shuiming Cave were dominated by 38% Proteobacteria, 24% Chlorobi, and 19% Bacteroidetes. In the Xueyu Cave, OTUs from upstream samples were comprised of 62% Proteobacteria but comprised 64% in the downstream samples. In the Xueyu Cave, Bacteroidetes accounted for 11% of the total OTUs in the upstream sample and 16% in the downstream. Among the γ -Proteobacterium and Bacteroidetes, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* spp., and Flavobacteriaceae, which are related to potentially pathogenic species, were prevalent in the Xueyu Cave, while Methylococcaceae-uncultured, *Methylomonas* spp., and *Methylobacter*, all methane-oxidizing bacteria, had high relative abundances in the Shuiming Cave. These results revealed that potentially more pathogenic bacteria are present in the stream waters from the tourist cave, which has important implications for the protection of tourist caves. The RDA analysis of the environmental factor and bacteria community in groundwater showed that the distribution of pathogenic bacteria was positively correlated with the cave air CO_2 , and the Spearman correlation analysis of the two environmental factors indicated that the influence of the number of tourists on the structure of the bacterial community in the groundwater was more obvious and led to the disappearance of a large number of native bacteria. We proposed that tourist caves control the number of daily tourists and that they enter in batches and increase the import and export of closed devices to avoid the cave air exchange inside and outside. In addition, it was recommended that they increase the import and export of sterilization devices to reduce tourists with bacteria and organic matter, and avoid leaving garbage in the hole to avoid cave microbial exchange inside and outside. A

收稿日期: 2017-09-01; 修订日期: 2017-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(41301541); 重庆市院士专项(cstc2016jcyjys0003); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20130182110017)

作者简介: 吕现福(1988~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为岩溶环境与地质生态, E-mail: athena_lily@163.com

* 通信作者, E-mail: hqfeddy@swu.edu.cn

reduction in the fixed lighting inside caves should be required to reduce long exposure, since the tourists can bring individual source lighting.

Key words: bacterial community; karst; underground river; tourist cave; pristine cave

洞穴是人类探知地下世界的窗口,在不同学科领域,包括自然科学(地质、古生物、气候学、物理、化学和生物)、医学和工程以及社会学(如考古、神学和人类的文化历史)都具有重要价值^[1]. 洞穴为研究古气候和古环境^[2~4]、极端环境下的微生物^[5,6]、岩溶洞穴系统发育^[7,8]、岩石形成等^[9,10]具有重大意义,同时也为探索地下极端生态系统的演化奠定了基础,提高了大众对地球历史的理解,引发了社会大众对洞穴的好奇和关注,也带动了各地的洞穴旅游热. 截止到2014年10月,我国旅游洞穴景点的总数已达到743个,除了宁夏和上海外,其余省份均有旅游洞穴景点. 据统计,2008年旅游洞穴年游客接待量约4 000万人次,直接旅游收入数十亿元,在我国旅游业中占重要地位,给各地社会经济发展带来巨大的效益^[11].

岩溶洞穴常年封闭、贫营养、无光的特殊环境,形成了一种高度特异性的生态系统,从洞穴中分离得到的许多微生物新种极大地拓展了微生物资源. 作为一种开放而独立的生态系统,洞穴理化性质稳定,通过不同洞穴微生物组的比较能够评估特定因素对微生物群落结构的影响,追踪区域环境演变过程中微生物群落结构的演替,研究洞穴历史演化过程中微生物的作用. 由于缺少光照,光合微生物作为初级生产者的作用受限,诸多化能自养微生物(营养方式包括硫氧化作用、硝化作用和甲烷氧化作用等)和异养微生物构成了洞穴生态系统的支撑基础. 对洞穴微生物组的研究表明,在这种贫营养的环境中存在着数量众多、种类丰富的微生物类群,是洞穴生态链的主要成分,是洞穴生态系统的营养基础,洞穴微生物以互相协作、合作共赢的方式,构成洞穴微生物群体^[12,13].

洞穴旅游的经久不衰也给洞穴环境带来了不利影响,人类进入洞穴,改变了洞穴原本的封闭环境,影响洞穴的温度、湿度、空气组成、微生物分布和来源及其沉积物景观等. Cigna^[14]对意大利 Grotta di Castellana 洞研究发现,游客会对洞穴温度及湿度产生影响,一个由105人的组成的旅游团进入洞穴停留10 min会使洞穴温度上升0.3℃. Hoyos等^[15]对西班牙北部 Candamo 洞研究发现,游客活动除会影响洞穴温湿度之外,还会使洞穴空气

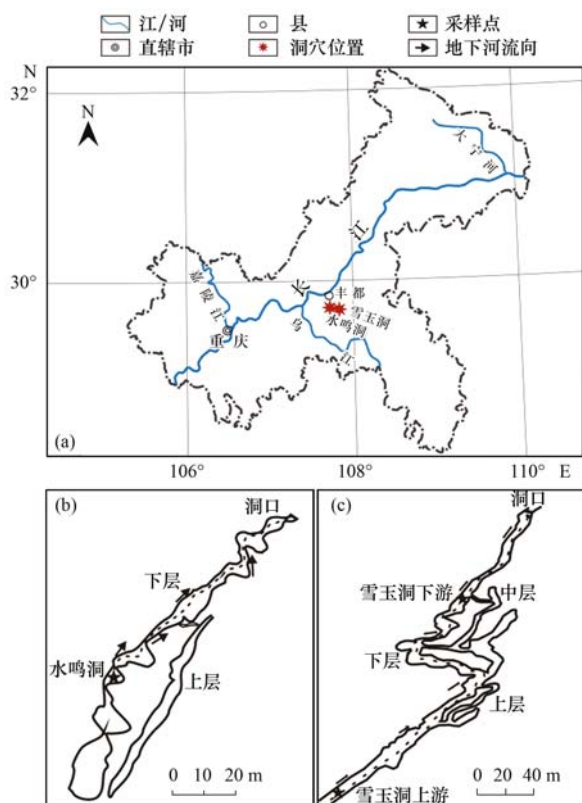
CO₂ 浓度上升 $100 \times 10^{-6} \sim 110 \times 10^{-6}$, 并指出游客容量应控制在 29 人·d⁻¹. Baker等^[16]认为游客呼吸作用使洞穴空气 CO₂ 浓度上升,同时洞穴 CO₂ 浓度及温度的改变会使洞穴滴水中 Ca²⁺ 浓度减少从而对石笋等洞穴沉积物产生溶蚀. Ikner等^[17]通过研究美国亚利桑那州 Kartchner 洞穴人类影响区域的微生物群落,结果发现微生物丰度最大的变形菌门的出现指示游客携带棉质衣物和其他有机物使地下河水中有有机质增加. Bastian等^[18]对法国 Lascaux 洞的研究发现,游客呼吸作用和灯光的扰动使洞穴细菌及藻类大量繁殖,洞穴壁画遭受大面积绿色生物膜破坏. 人类活动的进入,带来了外源的微生物和营养物质,改变了洞穴的营养基础和微生物群落结构,将给洞穴生态系统带来巨大的改变. 探究洞穴的微生物群落,能够为有效抑制微生物、保护洞穴沉积物及壁画提供方法指导.

雪玉洞是重庆著名的旅游景点,2015年和2016年游客接待量约17万人次,直接旅游收入约1 300万元,给当地经济发展带来巨大收益. 但是,旅游活动不同程度也影响到了雪玉洞洞穴环境与洞穴景观. 本文选取旅游洞穴雪玉洞及其临近未开发的水鸣洞作为研究点,采集地下水样品,运用16S rDNA高通量测序的方法,研究洞穴地下水中的细菌群落结构,对比旅游和未开放洞穴地下水中细菌群落结构的差异,以分析人类活动给洞穴微生物带来的改变. 通过了解旅游洞穴和未开放洞穴中主导微生物及其相关的代谢特征,以期对洞穴微生物研究以及洞穴保护提供科学信息.

1 研究区概况

雪玉洞(29°47'00"N, 107°47'13"E)位于重庆市丰都县长江南岸的龙河下游峡谷内,距丰都新县城12 km(图1). 洞口海拔233 m,高出龙河水平面55.5 m,因洞内次生沉积物种类丰富且色泽雪白如玉而得名. 研究区内多年平均气温16.5℃,多年平均降水量1 072 mm,属于典型亚热带湿润性季风气候. 雪玉洞发育在川东平行岭谷方斗山背斜北西翼的三叠系飞仙关组(T_{1f})薄至中厚层灰岩中,岩层产状为310°∠43°. 洞穴顶板岩层厚150~250 m,上覆植被以常绿阔叶林和灌丛为主,土壤厚度0~

50 cm. 大气降水是洞内地下河唯一补给源, 受西南季风和东南季风的双重影响, 降水主要集中在每年的 4~10 月. 雪玉洞属峡谷型洞穴, 洞道狭窄, 没有发育大的洞厅, 空间较小, 其中下层发育地下河, 地下河年流量 $88\,821\text{ m}^3 \cdot \text{a}^{-1}$, 使得洞内相对湿度较高(一般 $\geq 100\%$). 洞内气温较稳定, 但受灯光和游客的影响, 各层略有差异, 上层 $17.7 \sim 18.3^\circ\text{C}$, 中层 $17.4 \sim 18.1^\circ\text{C}$, 下层 $16.6 \sim 17.6^\circ\text{C}$, 地下河水温 $16.3 \sim 16.7^\circ\text{C}$. 为便于洞穴管理, 当地工作人员在洞口安装两扇门, 减少洞内外气流交换^[19,20].



(a) 研究点位置; (b) 雪玉洞洞穴形态及采样点位置;
(c) 水鸣洞洞穴形态及采样点位置

图 1 雪玉洞和水鸣洞地理位置及采样点位置示意

Fig. 1 Location of Xueyu Cave and Shuiming Cave and sampling sites

水鸣洞($29^\circ 47' 00''\text{N}$, $107^\circ 47' 00''\text{E}$)高出龙河水面十余米, 洞内次生沉积物种类、规模及色泽都次于雪玉洞, 但地质、地层、植被、气候等条件与雪玉洞相似(图 1). 地下河流量大于雪玉洞, 洞口有一泉华堆积平台. 洞穴末端为大厅, 并集成水塘, 地下水从池边涌出, 有砂层堆积. 因洞道多通过薄层灰岩分布段, 故洞顶崩塌现象普遍, 且稳定性差, 洞内相对湿度较高(一般 $\geq 95\%$). 洞内气温上下层有差异, 上层 $16.6 \sim 23.3^\circ\text{C}$, 下层 $17.8 \sim 19.7^\circ\text{C}$, 洞口 $17.4 \sim 21.2^\circ\text{C}$, 地下河水温 $16.4 \sim$

16.7°C . 洞口呈半封闭, 与洞外气流有交换.

2 材料与方法

2.1 样品采集

本研究于 2014 年 3 月, 分别在雪玉洞内的地下河的主要入口处(上游: 位于雪玉洞最深处)和地下河出口处(下游: 位于雪玉洞入口处)水中进行样品采集[图 1(c)]. 此外, 还在水鸣洞内[图 1(b)]的地下河水中里采集了样品. 采样时, 使用连接有真空泵的灭菌抽滤器及装有 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤膜(Millipore, 美国)过滤地下水 $5 \sim 6\text{ L}$, 过滤后将滤膜取出放入灭菌离心管(50 mL)内密封, 低温保存(冰包), 运回实验室冷冻保存(-20°C).

2.2 环境因子理化性质测定

利用德国 Testo 公司生产的 Testo535 CO_2 测量仪(检测范围为 $1 \times 10^{-6} \sim 9\,999 \times 10^{-6}$)进行洞穴空气 CO_2 体积分数的监测. 洞外气温和降雨量数据来自安放在距雪玉洞洞口 1 km 的美国 Davis 公司生产的 BS28-VP2 型野外小型气象站, 其中温度记录范围为 $(40 \sim 65)^\circ\text{C}$ ($\pm 0.5^\circ\text{C}$), 降雨量记录范围为 $0 \sim 819\text{ mm}$ ($\pm 4\%$), 记录时间间隔为 30 min . 现场测试水样水温、pH 值、电导率以及 HCO_3^- 浓度. 水温、pH 值、电导率采用德国 WTW 公司生产的 Multi350i 测定, 精度分别为 0.1°C 、 0.01 和 $1\text{ }\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. HCO_3^- 浓度用德国产 Merck 碱度计测定, 精度为 $0.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 用于测试阳离子浓度的水样用 50 mL 聚乙烯塑料瓶采集, 并加入 $1:1$ 优级纯硝酸酸化至 $\text{pH} < 2$, 以防止阳离子附着在瓶壁上. 用 500 mL 聚乙烯塑料瓶收集地下水测试阴离子浓度. 阳离子浓度的测试工作在西南大学地理科学学院地球化学与同位素实验室完成, 使用仪器为美国 Perkin-Elmer 公司生产的 Optima-2100DV 电感耦合等离子发射光谱仪(ICP-OES), 测量相对误差 $< 5\%$. 阴离子浓度测试在西南大学地理科学学院水化学分析室和有机污染分析室进行. 使用的仪器为日本岛津公司生产的 UV2450 紫外分光光度计, 检测精度优于 $0.01\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3 样品 DNA 提取

根据基因组 DNA 提取试剂盒 Water DNA Kit D5525 (OMEGA, USA) 标准方法提取 DNA: ①水体样品经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后, 滤膜直接在经 Buffer SLX 重悬后, 70°C 处理 10 min 裂解细菌; ②加入 Buffer SP2 离心去除杂质, 加入异丙醇沉淀基因组 DNA; ③加入 Elution buffer 溶解 DNA, 加入

HTR Reagent 吸附去除腐殖酸; ④加入 Binding Buffer 调节结合条件, 离心过柱进一步纯化基因组 DNA; ⑤经过两步快速洗涤后, 最后用 Elution buffer 洗脱 DNA, -20°C 保存 DNA 模板。

2.4 PCR 扩增与 16S rDNA 高通量测序

将基因组 DNA 利用细菌通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行荧光定量扩增。PCR 扩增反应体系 (20 μL) 为 5 $\times$ FastPfu Buffer 4 μL , dNTPs (2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL , 338F (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.8 μL , 806R (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.8 μL , FastPfu Polymerase 2 μL , DNA 模板 10ng, 用无菌水补至 20 μL 。PCR 扩增条件为: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 27 个循环; 72°C 10 min。获得的 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 AXYGEN 公司的 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物, Tris-HCl 洗脱, 将 PCR 产物用 QuantiFluorTM-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司) 进行定量检测, 按照每个样品的测序量要求, 进行相应比例的混合, 测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

使用软件 QIIME (版本 1.9.1) 对测序数据去杂: ①过滤 reads 尾部质量值 20 以下的碱基, 设置 50bp 的窗口, 如果窗口内的平均质量值低于 20, 从窗口开始截去后端碱基, 过滤质控后 50bp 以下的 reads, 去除含 N 碱基的 reads; ②根据 PE reads 之间的 overlap 关系, 将成对 reads 拼接 (merge) 成一条序列, 最小 overlap 长度为 10 bp; ③拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2, 筛选不符合序列; ④根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品, 并调整序列方向, barcode 允许的错配数为 0, 最大引物错配数为 2。数据库被进一步分类以除去类似于叶绿体或蓝细菌的序列, 最终获得了 3 个样品的 60 247 个序列数。

通过归类操作 (cluster), 将序列按照彼此的相似性分归为许多小组, 一个小组就是一个操作分类单元 OTU (Operational Taxonomic Units)。根据不同的相似度水平, 对所有序列进行 OTU 划分, 使用 Uparse^[21] (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>) 方法软件, 按照 97% 相似性对非重复序列 (不含单序列) 进行 OTU 聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 的代表序列。为了得到每个 OTU 对应的物种分类信息, 采用 RDP classifier (版本 2.2 <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) 贝叶

斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 置信度阈值为 0.7。

2.5 数据分析

对 97% 相似水平下的 OTU 进行多样性统计分析, 多样性指数包括香农维纳指数 (Shannon Wiener)、辛普森指数 (Simpson) 和 Chao1 指数。香农维纳指数反映样品中微生物多样性的指数。Shannon 值越大, 说明群落多样性越高。辛普森指数用来估算样品中微生物多样性指数, 在生态学中常用来定量描述一个区域的生物多样性。Simpson 指数值越大, 说明群落多样性越低。Chao 是用 chao1 算法估计样品中所含 OTU 数目的指数, chao1 在生态学中常用来估计物种总数。稀释性曲线^[22] (Rarefaction curve) 用来比较测序数据量不同的样本中物种的丰富度, 也用来说明样本的测序数据量是否合理, 利用 mothur 软件做 Rarefaction 分析, 利用 R 语言工具制作曲线图。群落柱形图基于 tax_summary_a 文件夹中的数据表, 使用 R 语言工具作图。

RDA/CCA 又称多元直接梯度分析, 主要用来反映菌群与环境因子之间的相互作用关系, 将对应分析与多元回归分析相结合, 每一步计算均与环境因子进行回归。RDA 是基于线性模型, CCA 是基于单峰模型。分析可以检测环境因子、样本、菌群三者间的关系或者两两之间的关系^[6, 23]。RDA 或 CCA 模型的选择原则: 先用 species-sample 数据 (97% 相似性的样本 OTU 表) 做 DCA 分析, 看分析结果中 Lengths of gradient 第一轴的大小, 如果大于 4.0, 就应该选 CCA, 如果在 3.0 ~ 4.0 之间, 选 RDA 和 CCA 均可, 如果小于 3.0, RDA 的结果要好于 CCA; 通过 bioenv 函数判断环境因子与样本群落分布差异的最大 Pearson 相关系数, 通过最大相关系数得到环境因子子集; 将样本物种分布表与环境因子或环境因子子集分别做 CCA 或者 RDA 分析; 通过类似于 ANOVA 的 permutest 分析来判断 CCA 或者 RDA 分析的显著性。利用软件 R 语言 vegan 包中 RDA 或者 CCA 分析和作图。相关性 Heatmap 图表示的是微生物分类与环境变量比较, 评估微生物分类与环境变量之间的相关性 (Spearman 相关)。基本输出是一个距离矩阵, 表示群落中每个微生物分类与每个环境因子变量之间的相关系数, 可以用热图直观的展现数值矩阵。分析软件为 R (pheatmap package)。

3 结果与分析

3.1 细菌群落多样性

细菌群落多样性指数(图 2)结果表明, 3 个样品的细菌群落多样性很高, 雪玉洞上游、下游以及水鸣洞 3 个地下水样品的覆盖度为 99%, 98% 和

98%. 当香农维纳指数曲线趋向平坦, 测序数据量足够大, 可以反映样本中绝大多数的微生物信息. 从香农维纳指数和辛普森指数(表 1)来看, 雪玉洞地下水细菌多样性较高, 香农维纳指数都大于 4.7, Chao1 指数都大于 400, 水鸣洞地下水细菌多样性较雪玉洞低.

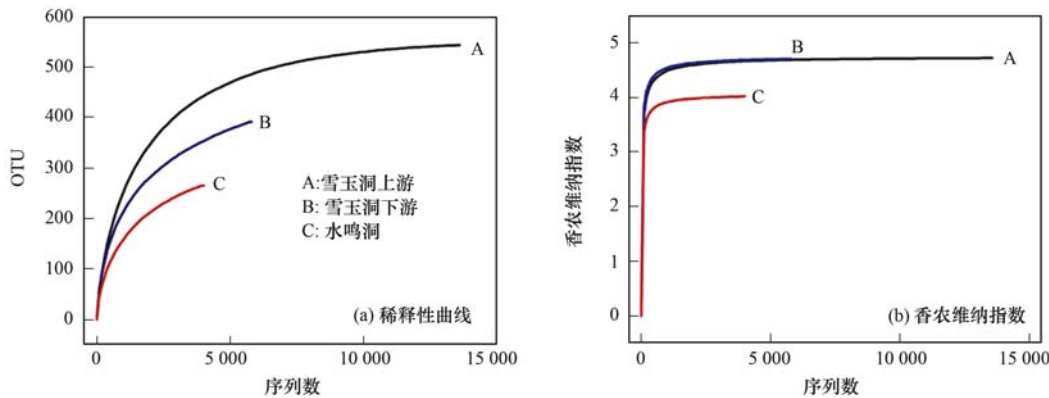


图 2 地下水细菌的多样性指数
Fig. 2 Bacteria diversity index in the underground streams

表 1 细菌 16S rDNA 的多样性指数
Table 1 Diversity index of bacterial 16S rDNA

采样点	测序数据量	OTUs	香农维纳指数	辛普森指数	Chao1
雪玉洞上游	13 589	543	4.72	0.029 6	548
雪玉洞下游	5 728	391	4.7	0.024 6	498
水鸣洞	3 928	265	4.02	0.046 5	327

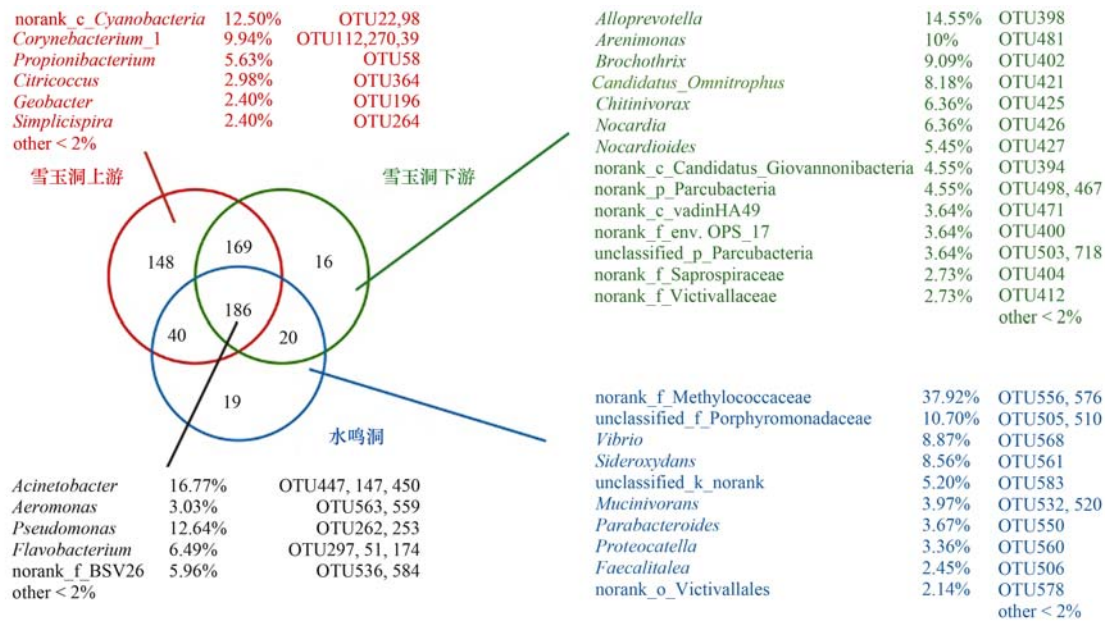
3.2 细菌群落组成

从 3 个地下水样品细菌 OTU 分布 Venn 图来看(图 3), 地下水中细菌种类繁多, 每个地下水样品中都存在的 OTU 数量为 186, 占雪玉洞地下水中细菌 OTU 的 20%, 占水鸣洞地下水中 OTU 总量的 70% 左右. 雪玉洞上游地下水中独有 OTU 最多, 共计 148 种独有 OTU, 而雪玉洞下游和水鸣洞分别只有 16 种、19 种独有 OTU. 其中雪玉洞上游地下水中独有 OTU 主要的属有蓝藻细菌(*norank_c_Cyanobacteria*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium_1*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、柠檬球菌属(*Citricoccus*)、地杆菌(*Geobacter*)和*Simplicispira*; 雪玉洞下游地下水中独有 OTU 主要有*Alloprevotella*、*Arenimonas*、*Brochothrix*、*Candidatus_Omnitrophus*和*Chitinivorax*; 水鸣洞地下水中独有 OTU 主要有甲基球菌科(*norank_f_Methylococcaceae*)、紫单胞菌科(*unclassified_f_Porphyrimonadaceae*)、弧菌属细菌(*Vibrio*)和*Sideroxydans*; 3 个地下水样品中共有 OTU 中大于 2% 的属主要有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、假单胞

菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和*norank_f_BSV26*.

所获得序列共分属于 19 个门类[图 4(a)], 其中变形菌门(*Proteobacteria*)是最多的门类, 所占比例在 35% 以上, 其次是拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 所占比例在 10% 以上. 除绿菌门(*Chlorobi*)以外, 其他类群所占比例较小, 包括酸杆菌门(*Acidobacteria*)、衣原体门(*Chlamydiae*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)、异常球菌属-栖热菌属(*Deinococcus-Thermus*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、黏胶球形菌门(*Lentisphaerae*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、*Bacteria_norank*、*Bacteria_unclassified*、*Candidate_division_OP3*、*BD1-5*和*CKC4*, 这些类群所占比例在 2% 以下.

两个洞穴地下水中的细菌群落组成[图 4(a)]存在差异, 以变形菌门和拟杆菌门为主, 变形菌门所占比例超过 30% (水鸣洞样品为 38%, 雪玉洞样品都超过 60%), 拟杆菌门所占比例大于 10%. 两



红色表示雪玉洞上游；绿色表示雪玉洞下游；天蓝色表示水鸣洞；黑色表示3个地下水样品共有 OTU 中的属

图 3 地下河样品细菌 OTU Venn 图

Fig. 3 OTU Venn diagram of bacteria in the underground river samples

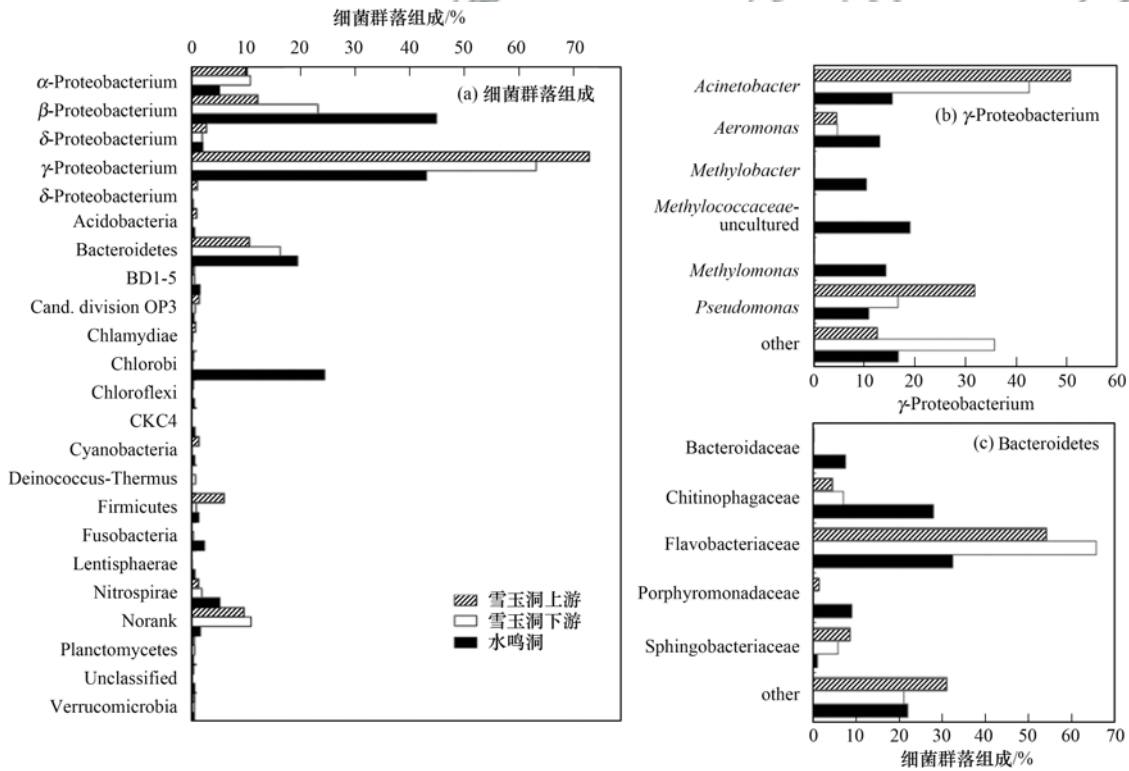


图 4 地下水细菌群落组成 (>1%)

Fig. 4 Distribution of bacterial 16S rDNA gene sequence clones from each underground river sample (>1%)

个洞穴地下水中的优势种类存在差异， γ -变形菌纲 (γ -Proteobacterium) 和拟杆菌门为雪玉洞的优势种类，但水鸣洞中除优势菌落 γ -变形菌纲和拟杆菌门外，出现雪玉洞中未发现的绿菌门 (Chlorobi)，所占比例 24%。

γ -变形菌纲占了变形菌门的绝大部分， β -其次， α -、 δ -和 ε -变形菌门占变形菌门的比例较小。而 γ -变形菌纲在两个洞穴地下水中的主导细菌种类存在差异 [图 4(b)]。不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 为雪玉洞样品中的主

要细菌, 上游地下水分别占 γ -变形菌纲的 51% 和 32%, 下游地下水分别占 γ -变形菌纲的 43% 和 17%, 水鸣洞中除不动杆菌属和假单胞菌属分别占 γ -变形菌纲的 16% 和 11% 外, 未培养的甲基球菌科 (Methylococcaceae-uncultured)、甲基单胞菌属 (*Methylomonas*) 以及甲基杆菌属 (*Methylobacter*) 分别占水鸣洞中主要的 γ -变形菌纲类群的 19%、14% 和 10%。此外, 地下水中仅次于变形菌门的拟杆菌门主导菌群[图 4(c)]也有所不同。雪玉洞两个洞穴地下水样品中黄杆菌科 (Flavobacteriaceae) 为主, 所占比例分别为 54% 和 66%; 而水鸣洞中黄杆菌科占 32%, 另有 Chitinophagaceae 科占 28%。

4 讨论

4.1 与其他洞穴细菌群落结构的比较

雪玉洞和水鸣洞细菌群落结构以 γ -变形菌纲和拟杆菌门为主, 与其他碳酸盐洞穴与硫酸岩洞穴中的细菌群落结构存在显著差异(表 2)。如罗马尼亚 Movile 洞微生物席中 β -和 γ -变形菌相对丰度接

近, 均在 20% 以上, 而 α -变形菌、 δ -变形菌及拟杆菌门相对丰度都在 10% 以上^[24], 与雪玉洞和水鸣洞地下河水中的细菌组成类似。美国维吉尼亚 Cesspool 洞优势群落为 γ -变形菌, 所占比例大于 40%, ε -变形菌大于 20%^[24]; 意大利 Frasassi 洞穴地下河生物薄膜中 γ -变形菌为优势群落, 所占比例大于 50%, 其次为 δ -和 ε -变形菌纲, δ -变形菌为 34%, ε -变形菌纲大于 20%^[25]; 以上两个洞穴水的细菌优势群落均为 γ -变形菌, 但与雪玉洞和水鸣洞相比 ε -变形菌在 20% 以上。美国俄怀明州 Lower Kane 洞微生物席优势种群为 ε -变形菌, 所占比例为 68%, γ -变形菌和 β -变形菌占 12.2% 和 11.7%^[26, 27]; 美国 Glenwood Springs 的优势群落为 ε -变形菌, 所占比例为 60%, γ -变形菌不到 10%, 放线菌门 (Actinobacteria) 占 14.1%^[28]; 这两个洞穴水的细菌优势群落均为 ε -变形菌, 与雪玉洞和水鸣洞不同的是, ε -变形菌都大于 60%。 ε -变形菌的大量存在说明与硫循环有关, 雪玉洞、水鸣洞地下水的细菌群落结构 ε -变形菌所占比例小而以 γ -变形菌为主, 可能与游客活动有关。

表 2 其他碳酸盐洞穴与硫酸岩洞穴优势群落¹⁾ / %

优势群落	雪玉洞 (上游/下游)	水鸣洞	Movile 洞 ^[24]	Cesspool 洞群 ^[24]	Frasassi 洞 ^[25]	Lower Kane 洞 ^[26, 27]	Glenwood 洞 ^[28]
	地下水	地下水	微生物席	洞穴水	地下水	微生物席	热泉水
Proteobacteria	62/64	38				Y	
α -Proteobacterium	6/7	2	<5			Y	
β -Proteobacterium	8/15	17	>25	<5	>5	11.7	
δ -Proteobacterium	2/1	1	>10	<10	34	0.8	1.2
γ -Proteobacterium	46/40	17	>20	>40	>50	12.2	9.4
ε -Proteobacterium	0.7/Y	0.1	>15	>20	>20	68	60
Actinobacteria	10/11	2				Y	14.1
Bacteroidetes	11/16	19	>15	Y	Y	1.7	Y
Chlorobi	Y/Y	24					

1) Y 表示 1% < OUT < 2%

4.2 旅游活动对地下水细菌群落结构的影响

可能受游客带入微生物所致, 数据显示雪玉洞内部有大量的外来细菌如不动杆菌属^[29]和假单胞菌属^[30, 31]。此外, 雪玉洞上游发现存在一定含量的 ε -变形菌纲, 一般认为 ε -变形菌纲为参与硫循环的化能自养细菌, 适宜于贫营养环境, 广泛存在于未受人类影响的洞穴中^[26, 27]。本研究, 雪玉洞上游位于洞穴最深处, 相对洞内其他部分, 微生物群落最原始, 因此含有较多洞穴原生细菌; 在地下河下游, 由于洞穴环境和微生物群落发生改变, 大量原生洞穴细菌消失。如表 2 所示, 与其他洞穴样品相

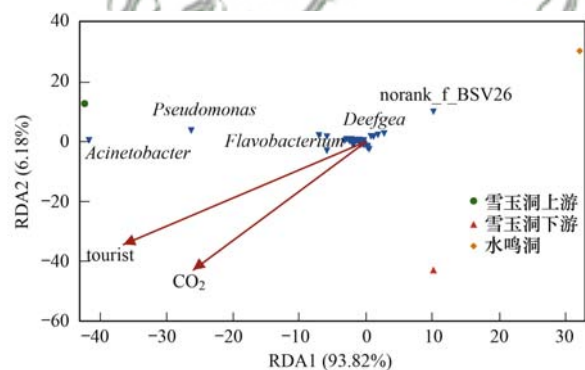
比, 除土壤样品^[32, 33]外, 雪玉洞和水鸣洞地下河中细菌群落相对丰度较高。从洞穴地下水中所含细菌种类和数量来看, 游客众多的雪玉洞高于水鸣洞(图 3)和其他洞穴。对于雪玉洞而言, 雪玉洞上游地下河水中可能同时含有洞内原生微生物和人类活动带入的微生物, 导致微生物种类和数量远高于下游。因此, 人类旅游活动影响导致洞穴地下水细菌种类与数量发生变化。

地下水中细菌类型也反映了游客活动和洞穴环境影响。雪玉洞两个地下水样品中主要细菌种类为变形菌门、拟杆菌门而水鸣洞中还含有一定量的绿

菌门[图 4(a)]. 绿菌门为绿硫细菌的一种, 属于光能自养细菌. 由于水鸣洞洞道较短, 洞内有微弱光照, 导致光能自养微生物的存在. 水鸣洞中 *Ignavibacteriales* 目的存在, 与硫氧化细菌功能相似, 有利于硫循环^[34]. 另外, 水鸣洞中主要为甲基球菌科、甲基单胞菌属以及甲基杆菌属^[35, 36] [图 4(c)], 这类细菌是利用甲烷作为碳源获得能量的化能自养菌, 被称为甲烷氧化菌, 广泛存在于陆地、海洋环境中, 总体而言能适应比较贫瘠的环境, 属于受洞穴本身环境影响的原生微生物群落组分. 大量的人类旅游活动带来了足量的外来碳、氮源, 改变了洞穴中原本的贫营养环境, 使原本洞穴中比较重要的化能自养细菌如 ϵ -变形菌纲、甲基球菌科等在洞穴微生物群落中的营养优势降低, 反之原本不适应贫营养环境的化能异养细菌在竞争中更具有优势. 大量游客进入洞穴, 改变了洞穴气流; 洞穴内的养分主要来自垃圾、灰尘、动物粪便、植物腐殖质和风化形成的泥土, 游客随身携带的尘土和有机物会改变洞内微生物养分获取方式; 开发洞穴中固定灯具照明和游客进入游览拍摄时增加的辅助闪光灯, 使洞内的灯光植物消减. 另外, 人类活动也带来了大量的外来细菌不动杆菌属、假单胞菌属等, 这类细菌对环境的适应性极强, 在获得充足营养物质来源的基础上, 在洞穴中停留繁殖, 从而占据有利地位, 成为洞穴中的优势群落. 不动杆菌属和假单胞菌属都是自然界广泛存在的细菌种类, 在土壤和自然水域等都大量存在, 两类细菌都属于异养菌, 包含大量致病菌种类, 需要在营养相对较多的环境中生存. 假单胞菌属是受人类影响较大的开放洞穴中的主要细菌之一, 其存在可能破坏洞穴的环境, 对洞穴及其保护不利^[37, 38]. 雪玉洞中 *Chitinophagaceae* 科的缺失也能证实以上结论[图 4(c)], *Chitinophagaceae* 科和黄杆菌科都是广泛存在于土壤中的拟杆菌门细菌^[39], 但是 *Chitinophagaceae* 科能分解利用木质素, 营养受限制时更有利于其生长繁殖.

为探讨游客活动对地下水细菌群落的影响程度, 采用 RDA/CCA 分析, 对 3 个地下水样品的环境因子(游客数量、降雨量、洞穴空气温度、洞穴空气 CO_2 、地下河流量、水温、电导率、pH、 HCO_3^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 F^- 、 Cl^- 、Si、K、Na、Mg、Ca、Ba 和 Sr 等)与地下水细菌群落属分类水平总丰度前 30 的物种进行回归分析, 验证不同细菌类群地理分布与环境因子之间的关系. 由于环境因子多于样品个

数, 为更准确地分析环境因子与细菌群落的分布关系, 结合 RDA/CCA 分析方法的自身特点, 对环境因子进行两两分组逐一分析. 选取一组影响最显著的环境因子进行论述, 结果作图分析, 如图 5 所示, 其中箭头表示环境因子, 倒三角表示物种, 圆圈、正三角、菱形代表样本, 物种与环境因子之间的夹角代表两者之间的正相关(锐角)、负相关(钝角)、不相关(直角), 由不同样品向环境因子做垂线, 投影点间的远近代表该环境因子对样品的影响程度^[40]. 不动杆菌属、假单胞菌属等菌属与游客数量(tourist)和洞穴空气(CO_2)呈正相关而某些菌属与游客数量之间呈现出负相关(图 5), 从而再次表明人类旅游活动对洞穴菌种具有明显的影响作用, 对某些菌落的消亡起到了积极的作用. 通过雪玉洞上游(up)与下游(down)样品点对环境因子 tourist 和 CO_2 投影点距离分析发现: 无论是洞穴空气 CO_2 还是游客数量对雪玉洞上游与下游的影响程度存在着明显的差异, 其中游客数量相比洞穴空气 CO_2 具有更高的影响程度. 导致该种状况的原因, 可能是由于雪玉洞上游的生态相较下游而言更加地敏感脆弱, 环境因子的变化对洞穴内部的影响更大.



箭头代表环境因子, 倒三角代表物种

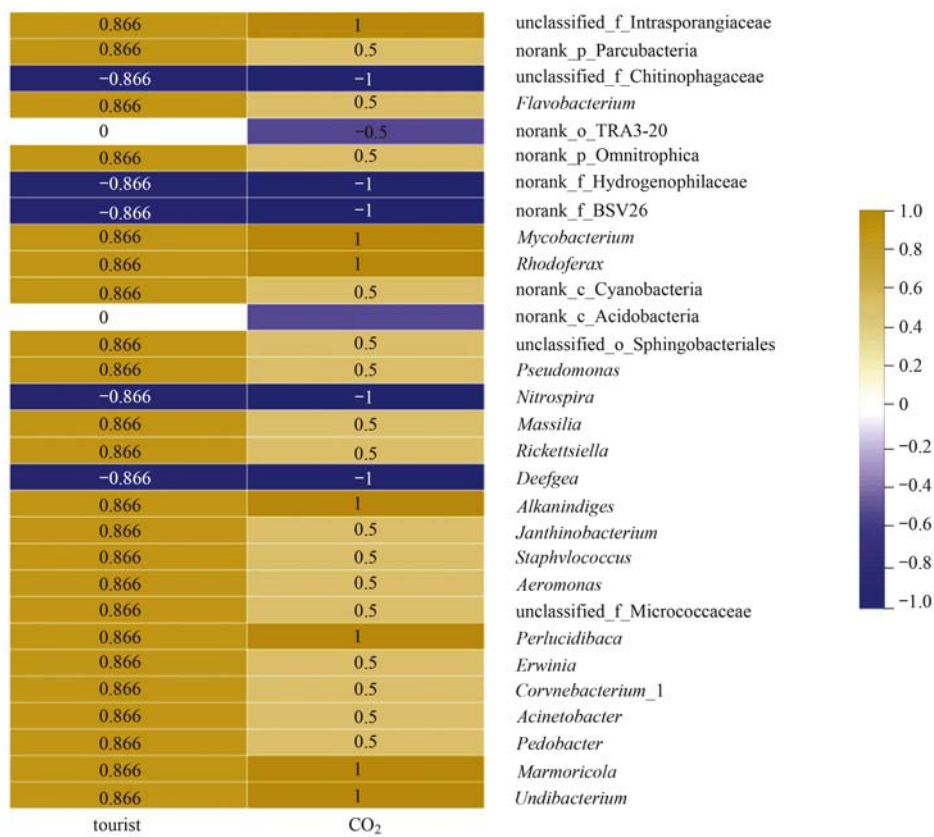
图 5 地下水细菌群落与环境因子 RDA/CCA 分析

Fig. 5 RDA/CCA analysis results showing the relationship between environmental factors and the bacterial community

为进一步探讨游客数量和洞穴空气 CO_2 对地下水细菌群落结构的影响程度, 通过环境因子相关性 Heatmap 图来评估微生物分类与环境变量之间的相关性^[41], 影响因子及细菌群落的选取与 RDA/CCA 分析中一致, 如图 6 所示, 该方法在某一置信区间(P)内将每个微生物与每个环境因子变量之间的相关系数(R)输出一个距离矩阵, 其中相关系数的大小以热图表示, 颜色的深浅表示相关系数绝对值的大小(图 6). 结果显示, 致病菌属(不动杆菌属、假单胞菌属、黄杆菌属等)与游客数量之间呈

现高度正相关 ($R = 0.866 > 0.8$, $P = 0.033$) 与洞穴空气 CO_2 呈现正相关 ($R = 0.5$, $P = 0.067$)。因此, 某些细菌菌属的群落组成随着游客数量的增加而丰富。此外, 人类旅游活动会增加洞内空气 CO_2 浓度^[15]进而对细菌菌属起到更加积极的作用。对于硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*)、unclassified-Chitinophagaceae、norank-Hydrogenophilaceae、norank-BSV26 和 *Deefgea* (图 6), 表现为高度负相关

($|R| = -0.866| > 0.8$, $P = 0.033$) 而与洞穴空气 CO_2 则具有完全的线性关系 ($|R| = -1| = 1$, $P = 0$), 对于上述菌属而言, 人类旅游活动对该类细菌菌属结构的影响是致命的, 如图 7 所示, 水鸣洞中丰度高的原生细菌 unclassified-Chitinophagaceae、norank-Hydrogenophilaceae 和 norank-BSV26 在雪玉洞几乎不存在, 由此可见, 雪玉洞受游客活动影响, 导致大量原生细菌消失。



X轴和Y轴分别为环境因子和物种, 通过计算获得R值, R值在图中以不同颜色展示, 右侧色卡是不同R值的颜色分区; tourist表示游客数量, CO₂表示洞穴空气CO₂

图 6 地下水细菌群落与环境因子相关性 Heatmap 图

Fig. 6 Spearman Correlation Heatmap between environmental factors and the bacterial community in groundwater

4.3 建议

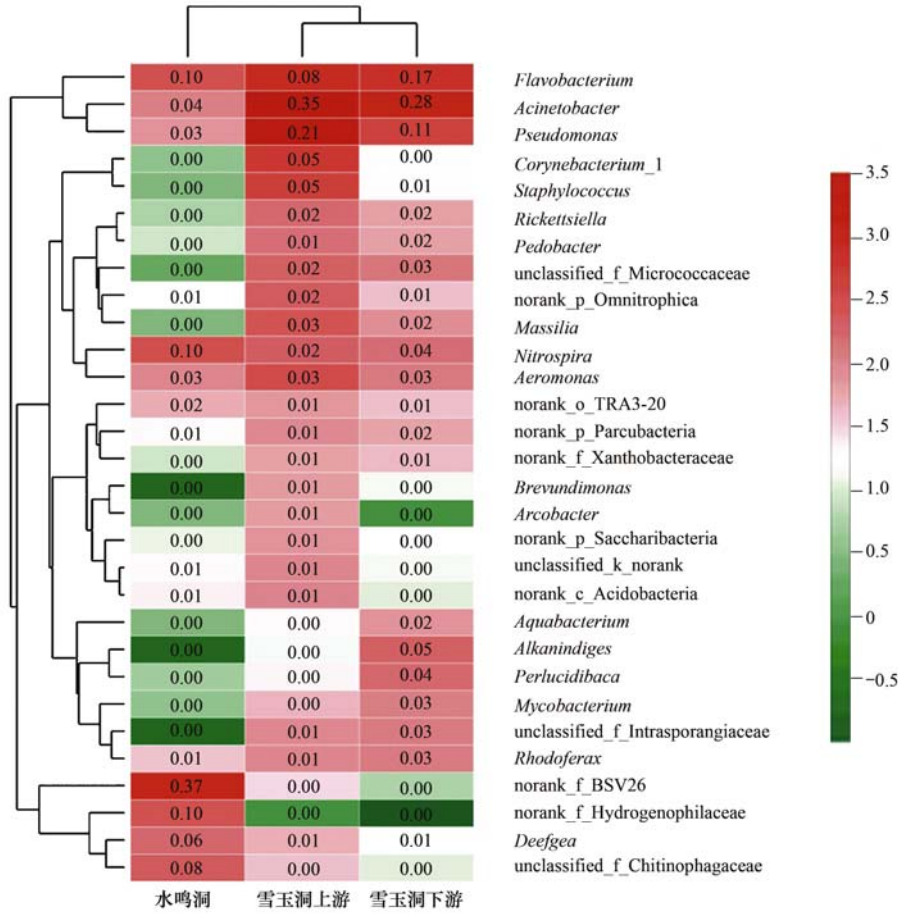
建议旅游洞穴控制每日游客量并分批进入, 增加进出口密闭装置, 避免洞穴气流内外交换; 在进出口增加除菌装置, 减少游客随身携带细菌和有机物, 同时避免将垃圾留于洞内, 减少洞内外微生物交换; 减少洞内固定灯具照明, 通过游客携带冷光源照明灯具, 实现人走灯灭, 减少长时间照射。

5 结论

(1) 地下水中细菌群落组成显示, 两个洞穴地下水样品细菌以变形菌门和拟杆菌门为主, 变形菌

门所占比例超过 30%, 拟杆菌门所占比例大于 10%。γ-变形菌纲和拟杆菌门为两个洞穴地下水中的优势种群但其主导细菌种类存在差异: 不动杆菌属、假单胞菌属和黄杆菌科为雪玉洞样品中的主要细菌, 属于致病菌; 水鸣洞中主要的 γ-变形菌纲细菌是未培养的甲基球菌科、甲基单胞菌属以及甲基杆菌属, 属于甲烷氧化菌。

(2) 多样性指数分析结果显示受旅游活动强烈影响的雪玉洞的群落多样性较未开发的水鸣洞丰富且旅游洞穴相对未开发的洞穴存在更多的致病菌群落。地下水细菌群落与环境因子的多元直接梯度分



热图下侧和右侧分别为样本名称和物种名称，左侧和上侧分别为物种聚类树和样本聚类树，热图中颜色的深浅分别代表物种丰度的高低

图 7 地下水细菌群落 Heatmap 图

Fig. 7 Heatmap of bacterial communities in groundwater

析(RDA)结果表明细菌群落分布规律与游客数量和洞穴空气 CO₂ 两种环境因子呈正相关, 游客数量对地下水细菌群落结构的影响更为明显并导致大量原生细菌消失.

致谢:感谢中国地质科学院岩溶地质研究所汪智军博士、西南大学地理科学学院曹敏博士在论文完成过程中给予的指导和帮助, 感谢西南大学地理科学学院胡刘婵、雷佳琪、曾思博、曾泽等在野外工作中给予的大力支持.

参考文献:

[1] Lee N M, Meisinger D B, Aubrecht R, *et al.* Caves and karst environments [A]. In: Bell E M (Ed). Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival [M]. Wallingford: CAB International, 2012. 320-344.

[2] Yuan D X, Cheng H, Edwards R L, *et al.* Timing, duration, and transitions of the last interglacial asian monsoon [J]. Science, 2004, **304**(5670): 575-578.

[3] Wang Y J, Cheng H, Edwards R L, *et al.* The holocene asian monsoon: links to solar changes and north atlantic climate [J]. Science, 2005, **308**(5723): 854-857.

[4] Cheng H, Edwards R L, Sinha A, *et al.* The Asian monsoon over the past 640,000 years and ice age terminations [J].

Nature, 2016, **534**(7609): 640-646.

[5] Gray C J, Engel A S. Microbial diversity and impact on carbonate geochemistry across a changing geochemical gradient in a karst aquifer [J]. The ISME Journal, 2013, **7**(2): 325-337.

[6] Headd B, Engel A S. Biogeographic congruency among bacterial communities from terrestrial sulfidic springs [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, **5**: 473.

[7] Tisato N, Sauro F, Bernasconi S M, *et al.* Hypogenic contribution to speleogenesis in a predominant epigenic karst system: a case study from the Venetian Alps, Italy [J]. Geomorphology, 2012, **151-152**: 156-163.

[8] Sauro F, Zampieri D, Filipponi M. Development of a deep karst system within a transpressional structure of the Dolomites in North-East Italy [J]. Geomorphology, 2013, **184**: 51-63.

[9] Krklec K, Domínguez-Villar D, Carrasco R M, *et al.* Current denudation rates in dolostone karst from central Spain: implications for the formation of unroofed caves [J]. Geomorphology, 2016, **264**: 1-11.

[10] Spötl C, Desch A, Dublyansky Y, *et al.* Hypogene speleogenesis in dolomite host rock by CO₂-rich fluids, Kozak Cave (southern Austria) [J]. Geomorphology, 2016, **255**: 39-48.

[11] 李溪. 我国旅游洞穴的统计分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2015. 15-19.

Li X. Statistical analysis of show caves in China [D]. Chongqing: Southwest University, 2015. 15-19.

- [12] Opsahl S P, Chanton J P. Isotopic evidence for methane-based chemosynthesis in the Upper Floridan aquifer food web [J]. *Oecologia*, 2006, **150**(1): 89-96.
- [13] Engel A S. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats[J]. *Journal of Cave and Karst Studies*, 2007, **69**(1): 187-206.
- [14] Cigna A A. Environmental management of tourist caves [J]. *Environmental Geology*, 1993, **21**(3): 173-180.
- [15] Hoyos M, Soler V, Cañaveras J C, *et al.* Microclimatic characterization of a karstic cave: human impact on microenvironmental parameters of a prehistoric rock art cave (Candamo Cave, northern Spain) [J]. *Environmental Geology*, 1998, **33**(4): 231-242.
- [16] Baske A, Genty D. Environmental pressures on conserving cave speleothems: effects of changing surface land use and increased cave tourism[J]. *Journal of Environmental Management*, 1998, **53**(2): 165-175.
- [17] Ikner L A, Toomey R S, Nolan G, *et al.* Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona [J]. *Microbial Ecology*, 2007, **53**(1): 30-42.
- [18] Bastian F, Alabouvette C. Lights and shadows on the conservation of a rock art cave: the case of Lascaux Cave [J]. *International Journal of Speleology*, 2009, **38**(1): 55-60.
- [19] Pu J B, Wang A Y, Shen L C, *et al.* Factors controlling the growth rate, carbon and oxygen isotope variation in modern calcite precipitation in a subtropical cave, Southwest China [J]. *Journal of Asian Earth Sciences*, 2016, **119**: 167-178.
- [20] Pu J B, Wang A Y, Yin J J, *et al.* Processes controlling dripwater hydrochemistry variations in Xueyu Cave, SW China: implications for speleothem palaeoclimate signal interpretations [J]. *Boreas*, 2015, **44**(3): 603-617.
- [21] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. *Bioinformatics*, 2011, **27**(16): 2194-2200.
- [22] Amato K R, Yeoman C J, Kent A, *et al.* Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes [J]. *The ISME Journal*, 2013, **7**(7): 1344-1353.
- [23] Headd B, Engel A S. Evidence for niche partitioning revealed by the distribution of sulfur oxidation genes collected from areas of a terrestrial sulfidic spring with differing geochemical conditions [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, **79**(4): 1171-1182.
- [24] Porter M L, Engel A S, Kane T C, *et al.* Productivity-diversity relationships from chemolithoautotrophically based sulfidic karst systems [J]. *International Journal of Speleology*, 2009, **38**(1): 27-40.
- [25] Macalady J L, Jones D S, Lyon E H. Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**(6): 1402-1414.
- [26] Engel A S, Lee N, Porter M L, *et al.* Filamentous “*Epsilonproteobacteria*” dominate microbial mats from sulfidic cave springs [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(9): 5503-5511.
- [27] Engel A S, Porter M L, Stern L A, *et al.* Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “*Epsilonproteobacteria*” [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **51**(1): 31-53.
- [28] Barton H A, Luiszer F. Microbial metabolic structure in a sulfidic cave hot spring: potential mechanisms of biospeleogenesis [J]. *Journal of Cave and Karst Studies*, 2005, **67**(1): 28-38.
- [29] Nkem B M, Halimoon N, Yusoff F M, *et al.* Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach, Malaysia [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, **107**(1): 261-268.
- [30] Garbi C, Casasús L, Martínez-Gilvare R, *et al.* Biodegradation of oxadiazon by a soil isolated *Pseudomonas fluorescens* strain CG5: implementation in an herbicide removal reactor and modelling [J]. *Water Research*, 2006, **40**(6): 1217-1223.
- [31] Kurzbaum E, Kirzhner F, Sela S, *et al.* Efficiency of phenol biodegradation by planktonic *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (a constructed wetland isolate) vs. Root and gravel biofilm [J]. *Water Research*, 2010, **44**(17): 5021-5031.
- [32] Bailey V L, Fansler S J, Stegen J C, *et al.* Linking microbial community structure to β -glucosidic function in soil aggregates [J]. *The ISME Journal*, 2013, **7**(10): 2044-2053.
- [33] Janssen P H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(3): 1719-1728.
- [34] Ontiveros-Valencia A, Tang Y N, Krajmalnik-Brown R, *et al.* Managing the interactions between sulfate- and perchlorate-reducing bacteria when using hydrogen-fed biofilms to treat a groundwater with a high perchlorate concentration [J]. *Water Research*, 2014, **55**: 215-224.
- [35] Hutchens E, Radajewski S, Dumont M G, *et al.* Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, **6**(2): 111-120.
- [36] Wischer D, Kumaresan D, Johnston A, *et al.* Bacterial metabolism of methylated amines and identification of novel methylotrophs in Movile Cave [J]. *The ISME Journal*, 2015, **9**(1): 195-206.
- [37] Dussart-Baptista L, Bodilis J, Barray S, *et al.* Recurrent recovery of *Pseudomonas oryzihabitans* strains in a karstified chalk aquifer [J]. *Water Research*, 2007, **41**(1): 111-117.
- [38] Zhao W Q, Walker S L, Huang Q Y, *et al.* Adhesion of bacterial pathogens to soil colloidal particles: influences of cell type, natural organic matter, and solution chemistry [J]. *Water Research*, 2014, **53**: 35-46.
- [39] Zhang L, Wang Y, Wei L F, *et al.* *Taibaiella smilacinae* gen. nov., sp. nov., an endophytic member of the family *Chitinophagaceae* isolated from the stem of *Smilacina japonica*, and emended description of *Flaviumibacter petaseus* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, **63**(10): 3769-3776.
- [40] Zhang J Y, Chen M X, Sui Q W, *et al.* Impacts of addition of natural zeolite or a nitrification inhibitor on antibiotic resistance genes during sludge composting [J]. *Water Research*, 2016, **91**: 339-349.
- [41] Ortiz M, Legatzki A, Neilson J W, *et al.* Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave [J]. *The ISME Journal*, 2014, **8**(2): 478-491.

CONTENTS

Estimation of Fine Particle ($PM_{2.5}$) Emission Inventory from Cooking: Case Study for Shanghai	WANG Hong-li, JING Sheng-ao, LOU Sheng-rong, <i>et al.</i> (1971)
Chemical Characterization, Spatial Distribution, and Source Identification of Organic Matter in $PM_{2.5}$ in summertime Shanghai, China	GAO Ya-qin, WANG Hong-li, JING Sheng-ao, <i>et al.</i> (1978)
Seasonal Variation and Source Analysis of Water-soluble Inorganic Salts in $PM_{2.5}$ in the Southern Suburbs of Beijing	GAO Han-yu, WEI Jing, WANG Yue-si (1987)
Characteristics and Source Apportionment of Water-soluble Inorganic Ions in Road Dust $PM_{2.5}$ During Spring in Tianjin Using the Quadrat Sampling Method	ZHAO Jing-qi, JI Ya-qin, ZHANG Lei, <i>et al.</i> (1994)
HONO Pollution Characteristics and Nighttime Sources During Autumn in Guangzhou, China	TIAN Zhi-lin, YANG Wen-da, YU Xiao-fang, <i>et al.</i> (2000)
Sulfur Sources and Oxidation Pathways in Summer Aerosols from Nanjing Northern Suburbs Using S and O Isotopes	HAN Xun, REN Jie, CHEN Shan-li, <i>et al.</i> (2010)
Methods for Determining and Applications of High-Resolution Vehicle Emission Inventory at County Scale	FAN Shou-bin, GUO Jin-jin, LI Xue-feng (2015)
Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Emitted from Typical Industrial Biomass Boilers	LIN Yu-jun, BAI Li, WANG Huan-xiang, <i>et al.</i> (2023)
Research of Parameter Uncertainty for the HSPF Model Under Different Temporal Scales	PANG Shu-jiang, WANG Xiao-yan, MA Wen-jing (2030)
Contribution of Nitrogen Sources in Water Sources by Combining Nitrogen and Oxygen Isotopes and SIAR	JIN Zan-fang, ZHANG Wen-liao, ZHENG Qi, <i>et al.</i> (2039)
Pollution Characteristics and Health Risk Assessment of Volatile Organic Compounds in Baiyangdian Lake	GAO Qiu-sheng, ZHAO Yong-hui, JIAO Li-xin, <i>et al.</i> (2048)
Fluorescent Characteristics and Environmental Significance of Particulate Organic Matter in Lake Taihu, China	LÜ Wei-wei, YAO Xin, ZHANG Bao-hua, <i>et al.</i> (2056)
Distribution and Settlement of Microplastics in the Surface Sediment of Yangtze Estuary	ZHU Xiao-tong, YI Jun, QIANG Li-yuan, <i>et al.</i> (2067)
Water Chemistry and Characteristics of Dissolved Organic Carbon During the Wet Season in Wulixia Reservoir, SW China	LU Xiao-xuan, LI Qiang, JIN Zhen-jiang, <i>et al.</i> (2075)
Bioavailability of Dissolved Organic Carbon in Rivers for Typical Vegetation Types in the Permafrost Regions on the Qinghai-Tibet Plateau	MA Xiao-liang, LIU Gui-min, WU Xiao-dong, <i>et al.</i> (2086)
Characteristics of Dissolved Organic Matter (DOM) and Relationship with Dissolved Heavy Metals in a Peri-urban and an Urban River	LIANG Meng-qi, SHAO Mei-ling, CAO Chang-li, <i>et al.</i> (2095)
Migration and Transformation of Dissolved Organic Matter in Karst Water Systems and an Analysis of Their Influencing Factors	ZHANG Lian-kai, LIU Peng-yu, QIN Xiao-qun, <i>et al.</i> (2104)
Source and Distribution of Dissolved Metal Ions in the Backwater Area of Pengxi River in Three Gorges Reservoir	ZHAO Xiao-song, YU Jian-jun, FU Li, <i>et al.</i> (2117)
Differences in Diffusive Fluxes of Nutrients from Sediment Between the Natural River Areas and Reservoirs in the Lancang River Basin	WANG Xue, CHENG Bao, YANG Zheng-jian, <i>et al.</i> (2126)
Nutrient Distribution Characteristics of the Sediment-water System in the Xiangxi River During the Impoundment of TGR	SU Qing-qing, LIU De-fu, JI Dao-bin, <i>et al.</i> (2135)
Effects of Submerged Macrophytes on Different Phosphorus Fractions in Overlying Water and Interstitial Water	YANG Wen-bin, GAO Shun-feng, WAN Rui, <i>et al.</i> (2145)
Distribution Characteristics and Fluxes of Nitrogen and Phosphorus at the Sediment-water Interface of Yuqiao Reservoir	WEN Shuai-long, GONG Wan-qing, WU Tao, <i>et al.</i> (2154)
Distribution of Phosphorus Fractions in Surface Sediments of Minjiang Mainstreams	YANG Geng, QIN Yan-wen, HAN Chao-nan, <i>et al.</i> (2165)
Nitrate Uptake Kinetics and Correlation Analysis in an Agricultural Drainage Ditch	LI Ru-zhong, YIN Qi-he, GAO Su-di, <i>et al.</i> (2174)
Influencing Factors for Phosphorus Removal by Modified Bio-ceramic Substrates Coated with ZnAl-LDHs Synthesized by Different Modification Conditions	XIANG Yang, ZHANG Xiang-ling, LEI Yu, <i>et al.</i> (2184)
Removal of Odorants in Drinking Water Using VUV/Persulfate	SUN Xin, SHI Lu-xiao, ZHANG Yi, <i>et al.</i> (2195)
Degradation of OG with Peroxymonosulfate Activated by a $MnFe_2O_4$ -graphene Hybrid	XIA Wen-jun, LIU Feng, HAO Shang-bin, <i>et al.</i> (2202)
Mechanism of As(V) Removal from Water by Lanthanum and Cerium Modified Biochars	LI Jin, ZU Yan-qun, LI Gang, <i>et al.</i> (2211)
Adsorption of Dissolved Organic Matter with Different Relative Molecular Masses on Inorganic Minerals and Its Influence on Carbamazepine Adsorption Behavior	LIANG Yu, HE Jiang-tao, ZHANG Si (2219)
Pollution Characteristics of Organophosphorus Flame Retardants in a Wastewater Treatment Plant	SUN Jia-wei, DING Wei-nan, ZHANG Zhan-en, <i>et al.</i> (2230)
Enhanced Coagulation as a Pretreatment for Low Temperature Wastewater	LIU Hai-long, REN Yu-xia, ZHANG Zhong-min (2239)
Operating Characteristics and Fouling Characteristics of a RO Membrane System for Desalination of Dyeing Wastewater	TAN Yu-jun, ZHANG Ze-tian, WU Qian-yuan, <i>et al.</i> (2249)
Optimization of the Nitrogen Removal Performance on the CANON Process in a Biofilm Reactor: From FBBR to MBBR	FU Kun-ming, LI Hui, ZHOU Hou-tian, <i>et al.</i> (2256)
Microbial Community Dynamics During Two Sludge Granulation Processes	GAO Jing-feng, ZHANG Li-fang, ZHANG Shu-jun, <i>et al.</i> (2265)
Sludge Conditioning Performance of Polyaluminum, Polyferric, and Titanium Xerogel Coagulants	WANG Xiao-meng, WANG Xin, YANG Ming-hui, <i>et al.</i> (2274)
Effects of Heat and Heat-alkaline Treatments on Disintegration and Dissolved Organic Matter in Sludge	DAI Qin, ZHANG Wen-zhe, YU Pan-fen, <i>et al.</i> (2283)
Effect of Different Ratios of Anaerobic Time and Aeration Time on the Formation of Partial Nitrification Granules	LI Dong, GUO Yue-zhou, CAO Mei-zhong, <i>et al.</i> (2289)
Spatial and Temporal Variation of Mercury in Municipal Sewage Sludge in China	WANG Ning, LIU Qing-wei, ZHI Yin, <i>et al.</i> (2296)
Characteristics of N_2O Release and Influencing Factors in Grass-type and Algae-type Zones of Taihu Lake During Summer	ZHENG Xiao-lan, WEN Shuai-long, LI Xin, <i>et al.</i> (2306)
Analysis of Greenhouse Gas Emission Characteristics and Their Influencing Factors in the Algae Zone of Lake Taihu	JIA Lei, PU Yi-ni, YANG Shi-jun, <i>et al.</i> (2316)
Dynamics of CO_2 and N_2O in Seasonal Frozen Soil Profiles for a Typical Steppe in Inner Mongolia	LI Jin-bo, YAO Nan, LI Xiu, <i>et al.</i> (2330)
Characteristics of CO_2 Flux in a Mature Apple (<i>Malus domestica</i>) Orchard Ecosystem on the Loess Plateau	YANG Jian-feng, YANG Xiao-ni, WANG Jun-hua, <i>et al.</i> (2339)
Effects of Biochar Application Rates on Greenhouse Gas Emissions in the Purple Paddy Soil	QI Le, GAO Ming, GUO Xiao-min, <i>et al.</i> (2351)
Short-Term Effects of Different Fertilization Treatments on Greenhouse Gas Emissions from Northeast Black Soil	LI Ping, LANG Man, LI Miao, <i>et al.</i> (2360)
Eukaryotic Micro-plankton Community Diversity and Characteristics of Regional Distribution in the Yellow Sea by ITS High-throughput Sequencing	ZHANG Li, LIN Jia-ning, ZHANG Yuan, <i>et al.</i> (2368)
Influence of Different Patterns of Discharge on Microbial Diffusion in Municipal Treated Wastewater	LANG Xiu-lu, SONG Zhi-wen, XU Ai-ling, <i>et al.</i> (2380)
Impact of Tourism on Bacterial Communities of Karst Underground River: A Case Study from Two Caves in Fengdu, Chongqing	LÜ Xian-fu, HE Qiu-fang, WANG Feng-kang, <i>et al.</i> (2389)
Diversity of the Microbial Community in Rice Paddy Soil with Biogas Slurry Irrigation Analyzed by Illumina Sequencing Technology	ZHU Jin-shan, ZHANG Hui, MA Lian-jie, <i>et al.</i> (2400)
Effect of Biochar Amendment on Physicochemical Properties and Fungal Community Structures of Cinnamon Soil	YAN Hai-tao, YIN Quan-yu, DING Song-shuang, <i>et al.</i> (2412)
Carbon Metabolism Characteristics of the Karst Soil Microbial Community for Pb-Zn Mine Tailings	FANG Jun-jia, LI Qiang, LIU Chang, <i>et al.</i> (2420)
Denitrification Characteristics and Community Structure of Aerobic Denitrifiers from Lake and Reservoir Sediments	KANG Peng-liang, ZHANG Hai-nan, HUANG Ting-lin, <i>et al.</i> (2431)
Investigation of the Coupling Mechanism between Naphthalene Degradation and Denitrification of a Naphthalene Degraded Bacterial Consortium Under Denitrification	ZHANG Ze-yu, WANG Ming-xia, CHENG Yong-yi, <i>et al.</i> (2438)
Spatial Distribution Study and Pollution Assessment of Pb in Soils in the Xijiang River Drainage of Guangxi	ZHANG Yun-xia, SONG Bo, CHEN Tong-bin, <i>et al.</i> (2446)
Effects of Agricultural Activities on Soil Mercury Changes in the Water-Level-Fluctuating Zone of the Three Gorges Reservoir	CHEN Qiu-yu, SUN Song, YIN De-liang, <i>et al.</i> (2456)
Screening and Identification of Arsenic-resistant Endophytic Bacteria from Different Rice Tissues (<i>Oryza sativa</i> L.) in Different Growth Stages	WANG Bo-xun, WANG Xue-dong, DUAN Gui-lan (2464)
Characteristics of Mercury Transformation in Soil and Accumulation in Rice Plants in an Acidic Purple Paddy Soil Area	LI Yu-qin, SUN Tao, DENG Han, <i>et al.</i> (2472)
Life Cycle Environmental Impact Assessment on Different Modes of Greenhouse Vegetable Production in the North China Plain	XU Qiang, HU Ke-lin, LI Ji, <i>et al.</i> (2480)
Health Effects of $PM_{2.5}$ Based on Bacterial Toxicity Test and Transcriptional Analysis in Lungs of Mice	SONG Peng-cheng, LU Shu-yu, WEI Yong-jie, <i>et al.</i> (2489)
Socio-economic Factors Influencing the Spatial Distribution of $PM_{2.5}$ Concentrations in China: An Exploratory Analysis	DUAN Jie-xiong, ZHAI Wei-xin, CHENG Cheng-qi, <i>et al.</i> (2498)