

\*\*\*\*\*  
试验研究  
\*\*\*\*\*

# 陇东黄土高原油污土壤环境因子对场地生态修复的季节响应

王金成<sup>1,2,3</sup>, 井明博<sup>1,2</sup>, 陈拓<sup>3</sup>, 杨蕊琪<sup>3</sup>, 王国锋<sup>4</sup>, 周天林<sup>1,2</sup>

(1. 甘肃省高校陇东生物资源保护与利用省级重点实验室, 甘肃 庆阳 745000;

2. 陇东学院 生命科学与技术学院, 甘肃 庆阳 745000; 3. 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室  
中国科学院 西北生态环境资源研究院, 甘肃 兰州 730000; 4. 陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

**摘要:** [目的] 探讨陇东黄土高原地区油污土壤场地修复过程中土壤环境因子对季节变化的响应机制, 为油污土壤植物微生物联合生态修复的推广应用提供参考。[方法] 利用陇东适生植物“金盏菊”联合土著石油降解菌剂开展为期 285 d 的场地原位修复试验, 采用常规方法测定不同季节土壤理化特性、酶活性和微生物群落特性等环境指标。[结果] (1) 场地修复过程中土壤 TPHs 降解率在夏(24.62%±3.96%)秋(29.93%±1.94%)两季明显高于春(3.82%±0.91%)冬(9.24%±0.87%)两季; (2) 季节变化和强化处理对油污土壤酶活性和理化特性存在显著交互效应( $p < 0.05$ )。土壤 pH 值、含盐率和有机质含量在秋季明显降低( $p < 0.05$ ), 而土壤速效养分均在夏秋含量最高( $p < 0.05$ ); (3) 春季土壤微生物群落 Evenness 指数偏低( $p < 0.05$ ), 夏季 Richness 指数明显增加( $p < 0.05$ ), Shannon-Wiener 指数在夏秋两季明显高于其他季节( $p < 0.05$ ); (4) NMDS 排序结果显示, 夏秋两季分异于其他季节主要与土壤微生物群落 Richness 指数( $r^2 = 0.7063, p = 0.002$ )和速效磷( $r^2 = 0.6157, p = 0.005$ )有关; (5) 低温季节影响土壤 TPHs 降解率的因素主要是土壤理化特性和土壤酶活性的叠加效应(54%), 而夏秋两季土壤理化特性、土壤酶活性和土壤微生物特性三者的共同作用可解释土壤 TPHs 降解率变异的 74%。[结论] 土壤微生物群落 Evenness 指数和土壤酶活性偏低是造成春冬两季土壤 TPHs 降解率偏低, 而土壤微生物群落 Shannon-Wiener 指数、Richness 指数、速效磷含量和生物强化处理有效化水平是陇东地区夏秋两季土壤 TPHs 降解率明显增加的主要环境因素。

**关键词:** 陇东黄土高原; 油污土壤; 环境因子; 季节响应; 原位修复

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-288X(2017)05-0001-09

**中图分类号:** X53, Q938.1<sup>+</sup>3

**文献参数:** 王金成, 井明博, 陈拓, 等. 陇东黄土高原油污土壤环境因子对场地生态修复的季节响应[J]. 水土保持通报, 2017, 37(5): 1-9. DOI: 10.13961/j.cnki.stbctb.2017.05.001; Wang Jincheng, Jing Mingbo, Chen Tuo, et al. Seasonal responses of soil environmental factors to In-situ ecological remediation of crude-oil contaminated soil in eastern Gansu Province of Loess Plateau[J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2017, 37(5): 1-9. DOI: 10.13961/j.cnki.stbctb.2017.05.001

## Seasonal Responses of Soil Environmental Factors to In-Situ Ecological Remediation of Crude-Oil Contaminated Soil in Eastern Gansu Province of Loess Plateau

WANG Jincheng<sup>1,2,3</sup>, JING Mingbo<sup>1,2</sup>, Chen Tuo<sup>3</sup>,

YANG Ruiqi<sup>3</sup>, WANG Guofeng<sup>4</sup>, ZHOU Tianlin<sup>1,2</sup>

(1. University Provincial Key Laboratory for Protection and Utilization of Longdong Bio-resources in

Gansu Province, Qingyang, Gansu 745000, China; 2. College of Life Science and Technology, Longdong

University, Qingyang, Gansu 745000, China; 3. Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering of Gansu Province, Northwest Institute of ECO-Environment and Resource, Chinese Academy of

Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China; 4. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

收稿日期: 2017-02-20

修回日期: 2017-03-14

资助项目: 科技部国家国际合作专项“青藏高原冻土中原油降解微生物的筛选及耐冷工程菌构建”(2014DFA30330); 甘肃省青年科技基金计划项目(17JR5RM354); 甘肃省高等学校科研项目(2014B-091); 陇东学院青年资助项目(XYZK1605)

第一作者: 王金成(1985—), 男(汉族), 甘肃省庆阳市人, 在读博士, 主要从事土壤持久性有机污染物生态修复研究工作。E-mail: wensent20002002@163.com.

**Abstract:** [Objective] To explore the mechanism of seasonal responses of soil environmental factors to in-situ ecological remediation of crude-oil contaminated soil in Eastern Gansu Province of the loess plateau, in order to provide reference for the popularization and application of ecological restoration of soil plant microorganisms. [Methods] A combined remediation experiment using the indigenous crude-oil degradation bacteria agent and the native plant (*Calendula officinalis*) as materials had been conducted for in-situ ecological remediation of crude-oil contaminated soil for 285 days. The changes and seasonal responses to the in-situ ecological remediation of soil physicochemical property, enzyme activity and microbial-community property were investigated using conventional methods. [Results] (1) Soil TPHs degradation rate in summer ( $24.62\% \pm 3.96\%$ ) and fall ( $29.93\% \pm 1.94\%$ ) were higher than those in spring ( $3.82\% \pm 0.91\%$ ) and winter ( $9.24\% \pm 0.87\%$ ) during the process of in-situ ecological remediation. (2) There were obvious interactions between remediation treatment and seasonal variation with regard to soil physicochemical property and enzyme activity ( $p < 0.05$ ). Soil pH value, salt content and organic content were lower and soil nutrient were higher in fall in comparison with that of other seasons ( $p < 0.05$ ), respectively. (3) Evenness index of soil microbial community was less in spring ( $p < 0.05$ ), and its richness index was higher in summer ( $p < 0.05$ ), as well as the Shannon-Wiener index was higher in summer and fall ( $p < 0.05$ ). (4) Nonmetric multidimensional scaling analysis suggested that the seasonal difference of soil TPHs degradation rate was strongly affected by the richness index ( $r^2 = 0.7063$ ,  $p = 0.002$ ) and soil available phosphorus ( $r^2 = 0.6157$ ,  $p = 0.005$ ). (5) Variation partitioning analysis revealed that the most important combined environmental factor to determine the degradation rate of soil TPHs in cold season (spring and winter) was the interaction between soil physicochemical properties and enzyme activity (54%). However, 74% of the soil TPHs variation in warm season was explained by soil physicochemical property, enzyme activity and soil microbial community property. [Conclusion] The low soil TPHs degradation rates in spring and winter were resulted from the low evenness index of soil microbial community and low soil enzymes activity; while richness index and the Shannon-Wiener index of soil microbial community, soil available P and ecological remediation effectiveness all resulted to the high soil TPHs degradation rate in summer and fall.

**Keywords:** Eastern Gansu Province of loess plateau; crude-oil contaminated soil; environmental factor; season response; in-situ ecological remediation

土壤石油烃污染是世界性环境问题之一,如何经济有效且环境友好的实现其生态恢复即是当今环保领域研究热点,亦为土壤修复领域的难点<sup>[1]</sup>。相比物理和化学修复,生物修复是一种成本低、生态可承受的修复技术。但在实际场地修复中土壤微生物和植物发挥活性的条件相对苛刻,易受多种环境因子的影响<sup>[2]</sup>,其中包括季节因素影响下的土壤非生物学及生物学特性<sup>[3]</sup>。

有“西部大庆”之称的陇东黄土高原地区生态脆弱,干旱少雨,昼夜及寒暑温差极大,因此在陇东黄土高原地区开展油污土壤的生态修复所需周期相对较长且易受季节因素的制约<sup>[4]</sup>,而该地区不同季节影响下土壤环境因子对生态修复的响应机制尚不明确,极大地限制了对陇东地区生态修复机制的理解,进而影响了修复效果。

为此,本研究拟采取陇东地区土著石油降解菌剂联合当地适生植物金盏菊的修复方式,在甘肃省庆阳市马岭镇长庆油田采油二厂“陇东油泥处理站”开展

为期 285 d 的原位修复试验,分析不同处理方式下油污土样酶活性和理化性质等 14 项土壤生物学和非生物学环境因子在不同季节的变化;基于 Bray-Curtis 相异指数,将所测定的土壤环境因子拟合到油污样地在 4 个季节的非度量多维尺度(NMDS)排序图上,旨在揭示陇东地区场地原位修复过程中土壤环境因子对季节变化的响应机制,以期通过分析环境因子的季节响应,优化场地修复降解条件、加速生物降解速率,为陇东地区油污土壤植物微生物联合生态修复的推广应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试样地的选择

原位修复样地位于甘肃省庆阳市马岭镇长庆油田采油二厂“陇东油泥处理站”(东经  $107^{\circ}22'19''$ ,北纬  $36^{\circ}36'15''$ )。束沿深度 45 cm,土层厚度为 0—25 cm,土样湿容重为  $1.776\% \pm 0.36 \text{ g/cm}^3$ ,自然含水量  $8.59\% \pm 0.27\%$ ,pH 值  $8.82\% \pm 0.32$ ;供试油污

土样的初始含油量为 3.84% (密度 0.902 g/cm<sup>3</sup>, 饱和烃含量 51.24%, 芳烃含量 20.43%, 胶质和沥青质含量 10.13%, 其他组分占 18.20%)。

## 1.2 供试植物及菌剂的分离和筛选

本研究所采用的供试植物为金盏菊 (*Calendula officinalis*), 为陇东地区常见适生植物, 具有耐旱、耐寒等特性, 品种为德国椰椰。供试菌剂源自甘肃省高校陇东生物资源保护与利用省级重点实验室通过选择性培养基和富集培养基自主筛选构建的石油降解菌剂 (一级种)<sup>[4]</sup>。初步鉴定为: 假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、线菌属 (*Actinomayces*)、红球菌属 (*Rhodococcus*) 和盐单胞菌属 (*Natronococcus*)。

## 1.3 试验场地设置及原位修复试验

试验场地分空白区和试验区, 束沿成正方形 (3 m×3 m), 空白区未做任何处理 (CK), 试验区为金盏菊与微生物菌剂修复区 (JZJ), 试验区设 3 个重复。通过计算将扩大培养的菌液按 3% 比例接入已翻耕均匀的试验区<sup>[2]</sup>, 由陕西西安环发环保工程有限公司负责二、三级菌种发酵和场地修复区维护。

自然降雨提供水分 (图 1 数据资料由甘肃省庆阳市气象局提供)。试验开始于 2015 年 3 月 14 日, 结束于 2016 年 1 月 25 日, 试验周期为 285 d, 于 2015 年 3 月 14 日投加菌剂, 一周后种植供试植物幼苗。本研究根据陇东黄土高原地区季节变化规律 (图 1) 将每年 3—5 月划分为春季、6—8 月为夏季、9—11 月为秋季、12 月至来年 2 月为冬季, 为了体现该区季节特性分别在 2015 年 4 月 24 日, 7 月 5 日, 10 月 10 日和 2016 年 1 月 25 日用四分法取样, 除利用鲜土提取土壤微生物细菌基因组总 DNA 外, 其余土样在室温背阴处风干, 过 2 mm 筛备用。

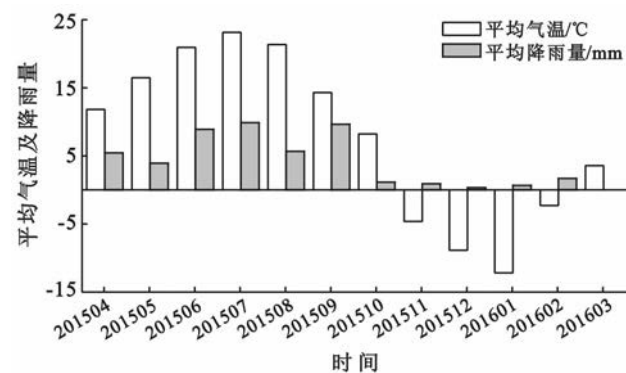


图 1 场地修复过程中平均气温与降水量的季节变化趋势

## 1.4 土壤理化性质测定

过氧化氢酶采用高锰酸钾滴定法, 脲酶和多酚氧化酶采用 7230 G 分光光度计比色法<sup>[5]</sup>; 脱氢酶和含

盐率采用唐景春的分析方法<sup>[6]</sup>。土壤碱解氮采用碱解扩散法; 土壤速效磷、速效钾分别采用 0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 浸提—钼锑抗比色法和火焰光度计法<sup>[7]</sup>; 电位法 (pHS-3 酸度计) 测定土样 pH 值; 采用超声—索氏萃取—重量法测定土壤总石油烃含量 (total petroleum hydrocarbons, TPHs)<sup>[2]</sup>; 采用变性凝胶梯度电泳 (DGGE) 技术分析微生物群落多样性<sup>[2]</sup>。

## 1.5 数据处理与计算

利用 SPSS 16.0 和 R2.15.2 (<http://www.r-project.org/>) 对数据进行处理分析, 用 Origin 8.0 和 R 2.15.2 作图。为了阐述植物—微生物强化修复在不同季节影响下土壤环境因子间关系, 基于 Bray-Curtis 相异指数, 使用 R 语言“vegan”程序包中“envfit”程序, 将所测定的 14 项土壤环境因子拟合到供试油污样地在 4 个季节的非度量多维尺度 (NMDS) 排序图上, 为防止样点在各象限的分布发生移位, 在拟合时对 NMDS 的排序轴进行了旋转, 以确保 NMDS 第一轴能够最大程度地代表群落相异性的变异。供试油污样地矩阵及环境因子数据集分别用 Bray-Curtis 与 Euclidean 距离表示<sup>[8]</sup>。方差分解运用“Vegan”数据包里的“Vapart”功能对供试油污样地中 14 个环境因子进行分析, 所有数据均经过 Hellinger 转换, 用 Venn 图表示土壤理化特性、酶活性及土壤微生物群落特性对土壤 TPHs 降解率的纯效应以及共同效应, 图中的数字代表上述环境变量对供试油污样地土壤 TPHs 降解率的解释信息量<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与分析

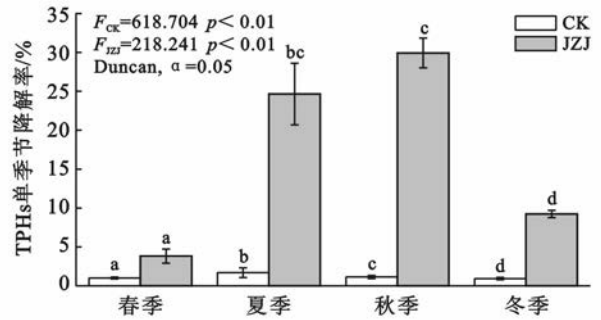
### 2.1 场地修复过程中土壤 TPHs 降解率季节性变化

图 2 为场地修复过程中土壤 TPHs 降解率的四季变化情况。由图 2 可见, 夏 (24.62%±3.96%) 秋 (29.93%±1.94%) 两季土壤 TPHs 降解率明显高于春 (3.82%±0.91%) 冬 (9.24%±0.87%) 两季 ( $p < 0.05$ ); 就整个修复期而言, 季节变化对 CK 组油污土壤 TPHs 降解率产生显著影响 ( $p < 0.05$ ), 但其累计 TPHs 降解率仅为 4.77%±0.76%, 而金盏菊与微生物菌剂修复 (JZJ) 组为 67.24%±4.47%。上述结果说明陇东地区利用金盏菊进行场地修复夏秋两季为土壤 TPHs 生物降解的主要季节, 累计降解率占总石油烃去除率的 81.17%±0.37%。

### 2.2 场地修复过程中油污土壤酶活性及理化性质的季节性变化

本研究中不同季节对油污土壤脱氢酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶和脲酶活性的影响差异显著 ( $p < 0.01$ , 表 1)。处理和季节对上述酶活性的影响也存在显著的交互效应。从酶活性的变化看, JZJ 处理组

4 种供试土壤酶活性均在秋季最高 ( $p < 0.05$ ), 但土壤多酚氧化酶、过氧化氢酶和脲酶活性在夏秋两季间无显著差异。多重比较结果显示 (Duncan,  $\alpha = 0.05$ ), 就 JZJ 处理组而言, 除土壤脱氢酶, 其余 3 种酶活性在冬季高于春季 ( $p < 0.05$ ), 说明陇东地区油污土壤酶活性变化趋势与适生植物金盏菊的生长密切相关, 究其原因为季节变化驱动植物生长过程中有效增加了土壤根际微环境土壤养分有效化水平和植物微生物间共代谢水平, 因而在夏秋两季表现出较高的土壤酶活性且两季间无显著性差异。



注: JZJ 表示金盏菊与微生物菌剂处理; 不同小写字母表示不同处理间差异显著。下同。

图 2 场地过程中土壤 TPHs 降解率的季节性变化

表 1 场地修复过程中油污土样酶活性的季节变化

项目	处理方式	脱氢酶/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 24 \text{h}^{-1}$ )	多酚氧化酶/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 3 \text{h}^{-1}$ )	过氧化氢酶/ ( $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	脲酶/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 3 \text{h}^{-1}$ )	
季节	CK	春季	14.91 $\pm$ 0.31 <sup>a*</sup>	112.64 $\pm$ 14.87 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	15.16 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>
		夏季	16.01 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	116.37 $\pm$ 16.37 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	16.66 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>
		秋季	16.15 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	117.61 $\pm$ 12.24 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	16.94 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>
		冬季	12.94 $\pm$ 0.37 <sup>c</sup>	98.37 $\pm$ 12.81 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	12.37 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>
季节	JZJ	春季	15.51 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	121.42 $\pm$ 11.63 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	15.35 $\pm$ 1.43 <sup>a</sup>
		夏季	21.66 $\pm$ 3.19 <sup>b</sup>	283.32 $\pm$ 25.48 <sup>b</sup>	1.33 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	34.65 $\pm$ 1.45 <sup>b</sup>
		秋季	53.38 $\pm$ 4.16 <sup>c</sup>	295.92 $\pm$ 35.87 <sup>b</sup>	1.77 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	36.33 $\pm$ 2.61 <sup>b</sup>
		冬季	16.99 $\pm$ 3.15 <sup>a</sup>	187.67 $\pm$ 14.67 <sup>c</sup>	0.93 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	17.42 $\pm$ 1.95 <sup>c</sup>
处理影响	F-value	176.562	2218.132	466.926	71.429	
	p-value	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	
季节影响	F-value	13.878	335.724	137.137	143.539	
	p-value	0.034	<0.001	<0.001	<0.001	
处理影响 $\times$ 季节影响	F-value	9.725	33.73	74.366	11.238	
	p-value	0.039	<0.001	<0.001	0.029	

注: \* 平均值 $\pm$ 标准误。每组同列不同字母表示多重比较差异显著 (Duncan,  $\alpha = 0.05$ )。下同。

就土壤理化特性而言, 双因素方差分析结果显示处理和季节对油污土样理化性质亦存在明显交互影响。从季节变化情况看, 土壤 pH 值、含盐率和有机质含量在秋季明显降低 ( $p < 0.05$ ), 但与冬季却无显著差异, 这可能与年度修复累计效应有关 (表 2); 从速效养分含量来看, 土壤速效钾、碱解氮和速效磷含量

均在夏秋含量最高 ( $p < 0.05$ )。上述结果说明利用金盏菊在陇东地区进行测定修复后油污土壤理化性质和酶活性响应模式呈季节性差异, 而夏秋两季土壤速效养分含量较高可能由于夏秋两季土壤微生物群落多样性的增加有效增加了土壤脲酶和多酚氧化酶活性, 从而有利于土壤速效养分的有效化水平。

表 2 场地修复过程中油污土壤理化性质的季节变化

项目	处理方式	pH 值	含盐率/ %	有机质/ ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	速效钾/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	碱解氮/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	速效磷/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	
季节	CK	春季	8.82 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.01	216.29 $\pm$ 12.53	32.89 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	45.64 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	9.56 $\pm$ 0.34
		夏季	8.84 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.94 $\pm$ 0.02	221.37 $\pm$ 15.26	31.46 $\pm$ 0.27	45.29 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	9.61 $\pm$ 1.04
		秋季	8.76 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	0.94 $\pm$ 0.06	221.61 $\pm$ 22.48	32.16 $\pm$ 0.44	46.19 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	9.58 $\pm$ 0.47
		冬季	8.82 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.04	219.68 $\pm$ 34.16	31.29 $\pm$ 0.18	41.91 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	9.51 $\pm$ 1.05
季节	JZJ	春季	8.64 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	208.58 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	32.13 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	44.90 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	10.97 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>
		夏季	8.17 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.81 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	200.46 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	56.20 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	69.25 $\pm$ 1.91 <sup>b</sup>	17.88 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>
		秋季	8.11 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.72 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	122.91 $\pm$ 4.14 <sup>b</sup>	54.60 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	70.69 $\pm$ 4.60 <sup>b</sup>	19.34 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>
		冬季	8.08 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.71 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	115.60 $\pm$ 3.53 <sup>b</sup>	45.40 $\pm$ 1.09 <sup>c</sup>	58.32 $\pm$ 2.62 <sup>c</sup>	12.71 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup>
处理影响	F-value	105.592	213.132	466.926	171.429	167.751	36.825	
	p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.037	
季节影响	F-value	23.878	4.724	457.137	43.539	17.923	190.422	
	p-value	0.034	0.042	<0.001	0.014	0.014	<0.001	
处理影响 $\times$ 季节影响	F-value	12.725	3.73	74.366	11.238	22.691	89.504	
	p-value	0.038	0.043	<0.001	0.009	0.007	0.003	

### 2.3 联合修复过程中各处理间油污土壤微生物群落多样性季节变化

图 3 为场地修复过程中油污土壤微生物群落多样性随季节变化的 PCR-DGGE 指纹图谱,通过 Quantity One 4.6.2 软件对图谱条带信息分析计算土壤微生物群落 Richness 丰富度指数、Shannon-Wiener 多样性指数、Margalef 丰富度指数和 Evenness 均匀度指数;采用 UPGAMA 方法对电泳图谱进行聚类分析,以明确土壤微生物群落对不同季节的响应情况。图谱上条带信息反映了土壤微生物群落多样性变化情况,其中电泳条带的多少反映出土壤中细菌群落多样性;条带的粗细则反映了种群密度的差异,条带亮度表征种群分布频率高低。UPGAMA 聚类分析结果显示,24 条 PCR-DGGE 指纹图谱可划分为 3 个类群,其中类群 1 主要为金盏菊和微生物菌剂强化处理组,但未包括冬季处理组;而类群 2 若在 63%~78%相似水平截取,则主要包括的是春冬两季的对照组;若在 52%~72%相似水平截取,夏季(SU CK1-2)与秋季(FA CK1-3)处理组出

现明显交错现象(图 3)。F 检验结果显示,4 种多样性指数在四季变化明显,上述结果体现了采用金盏菊实施场地修复可对陇东地区油污土壤微生物群落结构和组成产生影响的同时又季节变化做出了不同响应(图 4)。

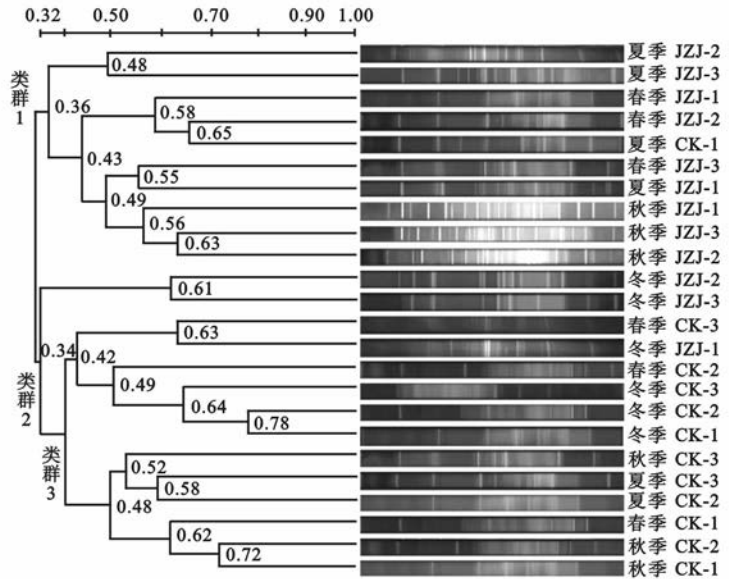


图 3 场地修复过程中四季间土壤微生物群落的 PCR-DGGE 指纹图谱及其图谱聚类

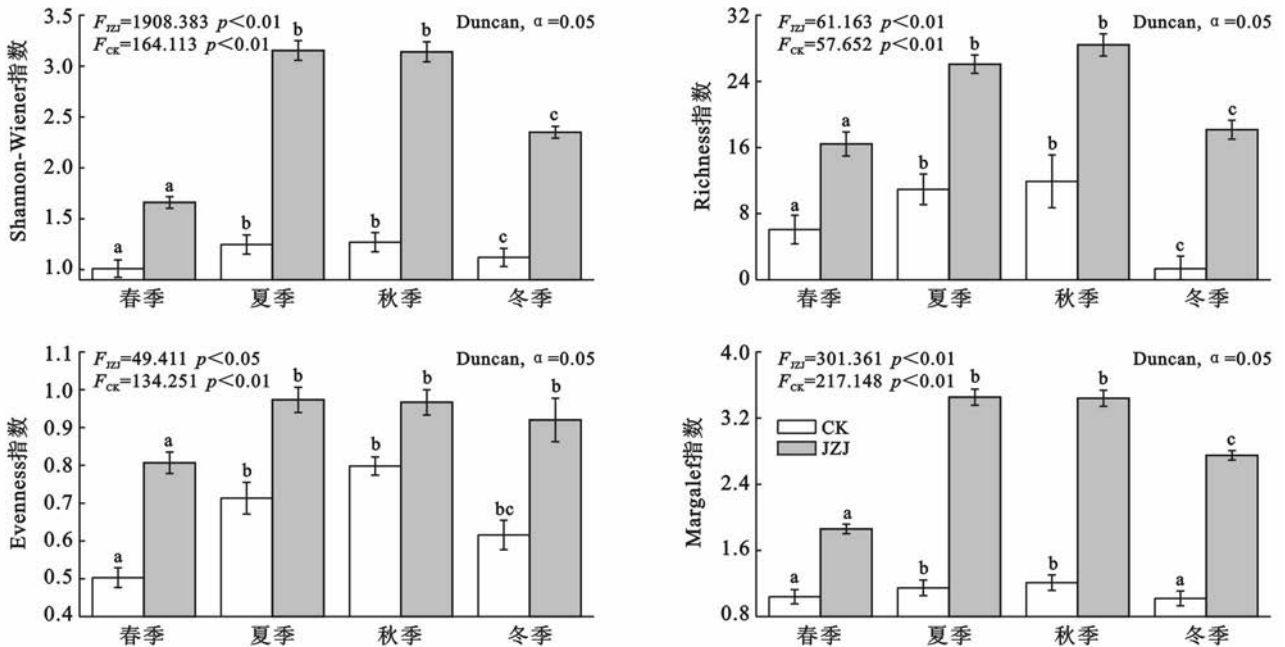


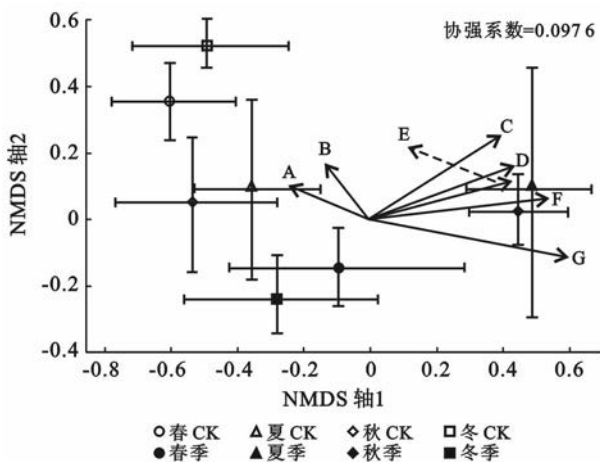
图 4 场地修复过程中四季间油污土壤样品微生物群落多样性指数变化

由图 4 可见春季 JZJ 处理组根际微生物群落 Evenness 均匀度指数偏低可能是由于春季供试植物生长引起的土壤有效氮匮乏进而造成土壤微生物分布不均;而夏季金盏菊迎来生长旺期的同时土壤微生物群落随之做出响应, Richness 丰富度指数与春季相

比明显增加;从 Shannon-Wiener 多样性指数来看, JZJ 处理组在夏秋季土壤微生物群落多样性显著高于其他季节,且根际微生物群落均匀度指数从春季的  $0.71 \pm 0.011$  上升至  $0.97 \pm 0.008$ ,说明土壤微生物群落结构和组成开始趋于稳定,分布相对均匀。

## 2.4 场地修复过程中油污土壤环境因子的非度量多维尺度(NMDS)排序季节性变化

纵观土壤酶活性、理化性质及微生物群落遗传多样性的试验结果,对于季节差异极大的陇东地区采用金盏菊开展场地修复可有效改善油污土壤生物学及非生物学特性,有助于土壤 TPHs 生物降解,但金盏菊处理组在不同季节亦表现出不同的响应模式。为了明确不同季节影响下土壤环境因子间有何内在联系,以及环境因子在驱动其分异过程中的相对重要性,基于 Bray-Curtis 相异指数,将所测定的 14 项土壤环境因子拟合到 4 个季节的非度量多维尺度(NMDS)排序图上,由胁强系数(Stress=0.097 6)可见该 NMDS 分析结果可解释四季更替时环境变量 90.24%的信息量(图 5)。



注:仅有 95%置信水平与季节分异显著相关的环境变量拟合在 NMDS 排序图上,其中 A 为含盐率;B 为 TPH;C 为 Shannon-Wiener 指数;D 为 Evenness 指数;E 为多酚氧化酶;F 为速效磷;G 为 Richness 指数。

图 5 场地修复过程中土壤环境因子的非度量多维尺度(NMDS)排序季节性变化

由图 5 可见,夏秋和春冬两季分别在 NMDS 排序图上相对集中,且两者与 CK 间分异明显,说明金盏菊联合修复对陇东地区季节变化呈不同的响应模式。为了阐明何种环境变量与该分异模式有关,将 14 个环境因子变量拟合至 NMDS 排序图的结果显示,其中有 7 个环境变量与 NMDS 排序结果显著相关( $p < 0.05$ )。由图 5 可见,与夏秋两季在 NMDS 排序图上的分异与土壤微生物群落 Richness 丰富度指数( $r^2 = 0.7063$ ,  $p = 0.002$ ),速效磷( $r^2 = 0.6157$ ,  $p = 0.005$ ),Shannon-Wiener 指数( $r^2 = 0.5380$ ,  $p = 0.013$ ),Evenness 均匀度( $r^2 = 0.5086$ ,  $p = 0.0150$ )和多酚氧化酶活性( $r^2 = 0.5012$ ,  $p = 0.0190$ )有关,这一结果说明导致夏秋两季明显分异于春冬和 CK

的主要环境因素为土壤微生物群落,说明陇东地区夏秋季节较高土壤温度和相对充裕的降雨量可加速土壤微生物数量及多样性的增加,进而提高土壤有机碳的矿化速率和植物根际土壤微环境共代谢水平,有效提升了土壤养分有效循环。而图 4 中与 CK 组分异有关的土壤环境变量为土壤含盐率( $r^2 = 0.4037$ ,  $p = 0.029$ )和 TPHs( $r^2 = 0.3984$ ,  $p = 0.037$ ),说明土壤含盐率和 TPHs 居高不下是导致 CK 组在 NMDS 排序图上分异与其他处理的最主要的环境因子。

## 2.5 油污土壤环境因子对场地修复过程中季节响应的方差分解

为了解析夏秋与冬春两季在 NMDS 排序图上的分异结果,以衡量不同季节场地修复效果的土壤 TPHs 降解率,利用方差分解揭示场地修复过程中油污土壤环境因子对夏秋与冬春两季响应机制。图 6 为油污土壤环境因子对场地修复过程中春冬和夏秋两季响应模式的方差分解 Venn 图,结果显示,本研究涉及的 14 项环境变量可划分为 3 类环境因子(土壤微生物学特性、土壤酶活性及土壤理化特性)。根据方差分解残差(Residuals)可知,3 类环境因子总叠加效应共同解释了土壤 TPHs 降解率在春冬和夏秋两季分异的 88%和 96%(图 6)。

就春冬低温季节而言,3 类环境因子独立效应分析结果显示,仅有土壤酶活性与微生物群落分别解释了 4%和 3%;从 3 类环境因子交互作用来看,影响低温季节土壤 TPHs 降解率的因素主要来自土壤理化特性和土壤酶活性(54%),而三者的共同作用可解释土壤 TPHs 降解率变异的 31%(图 6a),说明低温季节土壤养分水平和酶活性的低下是限制土壤 TPHs 降解率的主要因素(图 2),但究其原因土壤微生物受低温限制是导致土壤养分有效化水平低下的主要原因之一。

从夏秋常温季节来看,3 类环境因子独立效应分析结果显示,土壤理化特性、酶活性与微生物群落分别解释了 9%,13%和 24%;从 3 类环境因子交互作用来看,影响常温季节土壤 TPHs 降解率的因素主要来自土壤理化特性和土壤酶活性(61%)以及土壤微生物特性和土壤酶活性(43%),而三者的共同作用可解释土壤 TPHs 降解率变异的 74%(图 6b),上述结果说明土壤温度和含水量是决定陇东地区场地修复的主要环境因素,而常温季节土壤微生物特性是决定土壤 TPHs 降解率的决定性因素,因此如何提高陇东地区油污土壤微生物数量和多样性以及与植物根际土壤微环境共代谢水平是决定陇东地区油污染场地修复效果的主要环境因素。

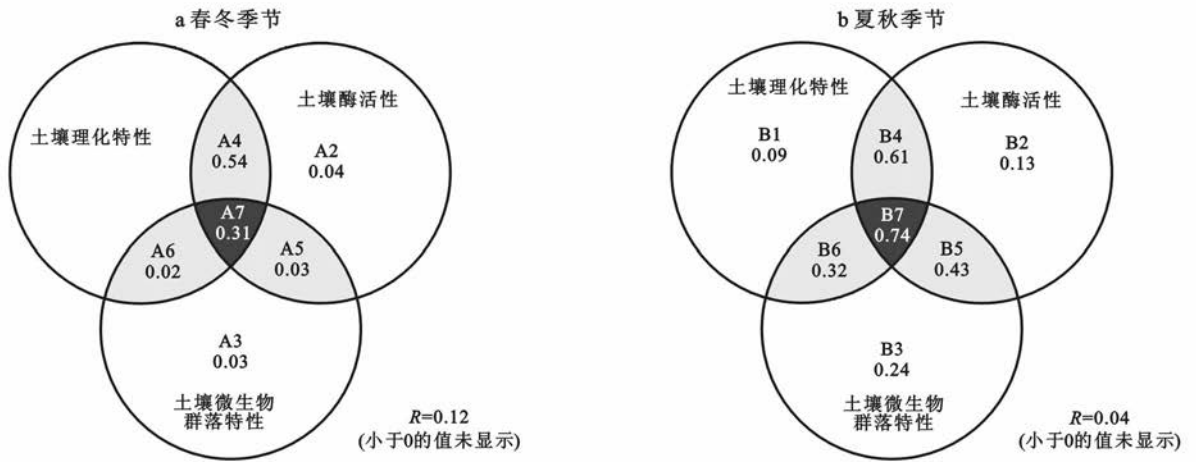


图 6 方差分解土壤理化因子、酶活性和微生物群落分别对不同季节影响下油污土壤 TPHs 降解率的纯效应和共同效应

## 3 讨论

### 3.1 场地修复过程中油污土壤非生物学环境因子的季节响应机制

植物—微生物联合修复体系可有效促进土壤石油烃的快速降解和矿化,因此 TPHs 降解率高低可反映植物—微生物系统的吸收和代谢能力<sup>[10]</sup>。焦海华等<sup>[10]</sup>在 2015 年分析研究了紫茉莉对石油污染盐碱土壤石油烃降解的影响,结果显示与 CK 相比,TPHs 降解率在春、夏、秋季分别提高了 47.6%,28.3%,18.9%;而在 2013 年焦海华等<sup>[12]</sup>又研究了牵牛花对石油污染盐碱土壤石油烃降解的影响中发现与 CK 相比,土壤中石油烃降解率明显在春、夏、秋季分别提高了 7.5%,34.2%和 19.7%。上述结果与本试验结果基本一致,说明陇东地区利用金盏菊进行场地修复夏秋两季为土壤 TPHs 生物降解的主要季节,累计降解率占总石油烃去除率的  $81.17 \pm 0.37\%$ ,究其原因可能与土壤温度和降雨量有关,适宜的土壤温度及含水量可有效催化土壤酶活性和微生物群落正常繁殖<sup>[2]</sup>,加速土壤养分有效化速率,进而刺激石油降解菌和适生植物的生长,提高土壤 TPHs 降解率。

本研究利用陇东地区土著石油降解菌剂联合当地适生植物金盏菊进行油污土壤生态修复试验,所涉及的众多非生物特性环境因子中土壤温度变化是季节更替的主要体现形式。前人研究指出低温可导致石油烃黏度增加、固化程度加剧、蒸发缓慢、扩散能力下降,从而限制石油烃的降解速率<sup>[13]</sup>。张树栋等<sup>[14]</sup>研究了崇明西沙湿地土壤石油类污染物含量随季节变化的情况,结果表明该区土壤 TPHs 含量呈季节性变化,且温度越低,酶活性越低,降解速率越慢。谯兴国等<sup>[14]</sup>研究了冻融作用对石油污染土壤酶活性的影

响,结果表明冻融作用可使油污土壤过氧化氢酶和脲酶的活性增强。王华金等<sup>[16]</sup>利用土著石油降解菌剂开展了油污土壤模拟生物修复试验,结果表明降解试验初期土壤过氧化氢酶和脱氢酶活性明显增加。上述结果与本研究结果基本一致,但本研究中利用金盏菊生态修复过程中土壤非生物学性质对季节变化的响应模式不尽相同。①由表 1 可见,夏秋两季对油污土壤酶活性起决定性作用,说明陇东地区春季低温环境一定程度上限制了金盏菊的生长。②3.84%初始含油量可造成土壤 C/N 失衡,导致其幼苗养分失衡和生理脱水,阻碍了金盏菊的生长。③由图 2 可见, JZJ 组在夏秋两季 TPHs 降解率分别达  $24.62 \pm 3.96\%$ 和  $29.93 \pm 1.94\%$ ,说明金盏菊在夏秋两季石油烃吸收和转化速率相对较高,而这种情况在某种程度上也说明本研究所投加土著石油降解菌剂与金盏菊根际分泌物间共代谢水平相对较高<sup>[2]</sup>,且优先利用了易于降解的烷烃类物质<sup>[17]</sup>,进而加速了土壤 TPHs 生物降解速率的同时刺激过氧化氢酶活性,有效解除降解过程中过氧化氢的积累的同时也有助于土壤微生物的生长繁殖<sup>[13]</sup>。④金盏菊在夏秋两季可显著影响对 4 种石油烃降解反应参与酶的活性,说明金盏菊生长度温度要求相对苛刻,夏秋两季的累计修复效应可以看出 JZJ 处理组可大幅提升土壤脲酶、多酚氧化酶和土壤脱氢酶活性,夏秋两季较高的土壤温度有利于金盏菊生长的同时扩大了土壤根际微环境中土著石油降解菌生境从而亦有助于其根际微生物群落生长繁殖,其结果可由图 4 微生物群落多样性指数变化予以印证。上述土壤酶活性的变化可引起土壤微生物群落结构和组成变化,其中土壤微生物数量的增加将加大对土壤有机碳和无机盐的需求程度,进而使得油污土壤有机质和含盐率在夏秋两季明显降低(表 2)。

前人研究指出石油烃中多环芳烃含量与脲酶活性呈负相关与多酚氧化酶呈正相关<sup>[16]</sup>。由表 1 可见, JZJ 组处理在夏秋两季脲酶和多酚氧化酶活性最高则有利于土壤速效 N, P, K 的有效化水平, 因此夏秋两季土壤速效养分含量明显高于春冬两季。此外, 其活性在夏季提升幅度极大则说明土壤脲酶和多酚氧化酶活性易受土壤温度限制<sup>[15]</sup>, 且石油降解菌在石油烃降解过程中优先利用易于降解的烷烃类物质, 而芳烃类物质的降解相对滞后, 加之夏季土壤温度的回升引起了土壤多酚氧化酶活性在夏秋二季的增加, 同时也说明金盏菊根际微生物群落结构和组成的改变可有效增加土壤多酚氧化酶活性, 加速多环芳烃的生物降解, 在一定程度上消除其对土壤脲酶活性的限制, 因此引发了土壤脲酶活性在修复后期逐渐提升, 进而改善了土壤氮素有效循环, 增加了土壤微生物与植物根际分泌物共代谢水平。上述分析结果说明陇东地区开展石油烃污染的生物降解采用金盏菊联合土著石油降解菌剂的修复模式对石油烃中烷烃及芳烃类物质降解具有明显的针对性和季节性。

### 3.2 场地修复过程中各处理间油污土壤生物环境因子的季节响应机制

微生物种群结构与多样性都是表征生态系统群落结构的重要参数, 其对环境污染物的反应表现为多种形式。TPHs 进入土壤后对生态环境的影响首先表现为土壤微生物群落结构组成、数量及多样性的改变。Frank 等<sup>[18]</sup>利用菌根真菌和链霉菌对德国龙讷堡地区油污土壤进行了年度修复试验, 并利用生物技术分析了油污土壤微生物群落多样性季节性变化情况, 结果显示土壤微生物可培养微生物数量呈季节性变化趋势且有效提高了植物修复效果。焦海华等<sup>[12]</sup>利用磷脂脂肪酸(PLFAs)生物标记法分析野生牵牛花的生长对石油烃污染土壤微生物群落与石油烃降解的影响, 结果表明牵牛花生长对其根际土壤微生物群落影响显著, 微生物多样性在春季增加 83%、夏季增加 140%、秋季增 50%; 微生物的生物量在春季增加 97.6%, 夏季增加 116.3%, 秋季增加 60.3%。朱鸣鹤等<sup>[19]</sup>研究了海三棱藎草对石油污染滩涂根际沉积物中微生物种群特点的影响, 结果显示无论植物是否存在, 细菌数量均在春夏两季达最高, 且呈季节性微生物种属差异性。焦海华等研究了紫茉莉对石油污染盐碱土壤微生物群落的影响中发现与 CK 相比, 根际土壤微生物 PLFAs 种类变异率在春、夏、秋季分别为 71.4%, 69.2% 和 33.3%; 而牵牛花生长可使其根际微生物多样性在春、夏和秋季分别增加了 83%, 140% 和 50%<sup>[11]</sup>。上述结果与本研究结果不尽相同,

本研究中春季金盏菊根际微生物群落 Evenness 均匀度指数均偏低, 除地域性差异外, 可能是外援投加石油烃降解菌剂在某种程度改变了原初油污土样微生物群落结构和组成, 加之春季供试植物生长引起的土壤有效氮匮乏进而造成土壤微生物分布不均; 上述情况随着夏季到来则略有缓解, 在夏季金盏菊迎来生长旺期的同时土壤微生物群落随之做出响应, Richness 丰富度指数与春季相比明显增加 ( $p < 0.05$ ); 从 Shannon-Wiener 多样性指数来看, JZJ 处理组在夏秋季土壤微生物群落多样性显著高于其他季节 ( $p < 0.05$ ), 且根际微生物群落均匀度指数从春季的  $0.71 \pm 0.011$  上升至  $0.97 \pm 0.008$ , 说明土壤微生物群落结构和组成开始趋于稳定, 分布相对均匀 ( $p < 0.05$ )。值得注意的是 3 种多样性指数中, 冬季 Evenness 均匀度和 Shannon-Wiener 多样性指数明显高于春季, 可能与夏秋两季中土壤微生物群落结构和组成的改变和冬季低温环境的胁迫下土壤耐冷石油降解菌的数量和分布有关<sup>[20]</sup>。夏秋两季在 NMDS 排序图上的分异与土壤微生物群落 Richness 丰富度指数, 速效磷, Shannon-Wiener 指数, Evenness 均匀度和多酚氧化酶活性有关, 说明导致夏秋两季明显分异于春冬和 CK 的主要环境因素为土壤微生物群落, 说明陇东地区夏秋季节较高土壤温度和相对充裕的降雨量可加速土壤微生物数量及多样性的增加, 进而提高土壤有机碳的矿化速率和植物根际土壤微环境共代谢水平, 有效提升了土壤养分有效循环, 而图 4 中与 CK 组分异有关的土壤环境变量为土壤含盐率 ( $r^2 = 0.4037$ ,  $p = 0.029$ ) 和 TPHs ( $r^2 = 0.3984$ ,  $p = 0.037$ ), 说明土壤含盐率和 TPHs 居高不下是导致 CK 组在 NMDS 排序图上分异与其他处理的最主要的环境因子。

## 4 结论

(1) 场地修复过程中土壤 TPHs 降解率呈季节性变化, 夏秋两季土壤 TPHs 降解率明显高于春冬两季, 且夏秋两季累计降解率占总石油烃去除率的  $81.17 \pm 0.37\%$ , 说明陇东地区利用金盏菊进行场地修复夏秋两季为土壤 TPHs 生物降解的主要季节。

(2) 不同季节对油污土壤酶活性和理化特性的影响差异显著, 且处理和季节对其存在显著的交互效应; JZJ 处理组 4 种供试土壤酶活性均在秋季最高。土壤 pH 值、含盐率和有机质含量在秋季明显降低, 但与冬季却无显著差异, 而土壤速效养分均在夏秋含量最高。

(3) 春季金盏菊根际微生物群落 Evenness 均匀



度指数偏低,而夏季 Richness 丰富度指数明显增加; Shannon-Wiener 多样性指数在夏秋季显著高于其他季节。上述结果体现了采用金盏菊实施场地修复可对土壤微生物群落结构产生影响的同时又在不同季节做出了不同响应,夏秋两季土壤微生物群落结构和组成趋于稳定,数量增加,分布均匀。

(4) 夏秋和春冬两季分别在 NMDS 排序图上相对集中,且夏秋两季的集中主要与土壤微生物群落 Richness 丰富度指数和速效磷有关;而与 CK 组分异的有关的土壤环境变量为土壤含盐率和 TPHs,说明土壤含盐率和 TPHs 居高不下是导致 CK 组在 NMDS 排序图上分异与其他处理的最主要的环境因子。

(5) 影响低温季节土壤 TPHs 降解率的因素主要来自土壤理化特性和土壤酶活性的叠加效应(54%),而影响常温季节土壤 TPHs 降解率的因素主要来自土壤理化特性和土壤酶活性(61%)以及土壤微生物特性和土壤酶活性(43%)的交互效应,说明土壤温度和含水量是决定陇东地区场地修复的主要环境因素,低温季节土壤养分水平和酶活性的低下是限制土壤 TPHs 降解率的主要因素,而常温季节土壤微生物特性是影响土壤 TPHs 降解率的决定性因素。

#### [参 考 文 献]

- [1] Chen Ming, Xu Piao, Zeng Guangming, et al. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(6): 745-755.
- [2] 王金成,井明博,段春艳,等. 陇东黄土高原石油污染土壤环境因子对金盏菊(*Calendula officinalis*)—微生物联合修复的响应[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(9): 2971-2981.
- [3] Grant R J, Muckian L M, Clipson N J W, et al. Microbial community changes during the bioremediation of creosote-contaminated soil [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44(3): 293-300.
- [4] 王金成,周天林,井明博,等. 陇东黄土高原地区石油污泥原位修复过程中土壤主要肥力指标动态变化分析[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(1): 280-287.
- [5] 严昶升. 土壤肥力研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1988: 263-280.
- [6] 唐景春,王斐,褚洪蕊,等. 玉米草(*Zea mexicana*)与海藻寡糖联合修复石油烃污染土壤的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(11): 2107-2113.
- [7] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1999: 245-353.
- [8] Shi G, Liu Y, Johnson N, et al. Interactive influence of light intensity and soil fertility on root-associated arbuscular mycorrhizal fungi. [J]. *Plant and Soil*, 2014, 378(1/2): 173-188.
- [9] Peres-Neto P R, Legendre P, Dray S, et al. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions [J]. *Ecology*, 2006, 87(10): 2614-2625.
- [10] Tang Jingchun, Wang Rugang, Niu Xiaowei, et al. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass(*Lolium perenne*) and different microorganisms [J]. *Soil & Tillage Research*, 2009, 110: 87-93.
- [11] 焦海华,崔丙健,吴尚华,等. 紫茉莉对石油污染盐碱土壤微生物群落与石油烃降解的影响[J]. *环境科学*, 2015, 36(9): 3471-3477.
- [12] 焦海华,刘颖,金德才,等. 牵牛花对石油污染盐碱土壤微生物群落与石油烃降解的影响[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(12): 3350-3358.
- [13] Margesin R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, 46: 3-10.
- [14] 张树栋,翁辰,黄慧琴,等. 崇明西沙湿地土壤石油类污染物季节变化特征及其对植被类型的影响[J]. *生态环境学报*, 2010, 25(2): 300-306.
- [15] 谯兴国,李法,王效举,等. 冻融作用对石油污染土壤微生物修复的影响[J]. *气象与环境学报*, 2006, 22(6): 56-60.
- [16] 王华金,朱能武,杨崇,等. 石油污染土壤生物修复对土壤酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(6): 1178-1184.
- [17] 岳冰冰,李鑫,任芳菲,等. 石油污染对紫花苜蓿部分生理指标的影响[J]. *草业科学*, 2011, 28(2): 236-240.
- [18] Frank S, Lutz M, Stefan K. Seasonal change of microbial activity in microbially aided bioremediation [J]. *Journal of Geochemical Exploration*, 2017, 174: 4-9.
- [19] 朱鸣鹤,朱文材,庞艳华,等. 盐沼植物对石油污染滩涂微生物群落特性的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(6): 874-879.
- [20] Mikael E, Jong-Ok K, William W M. Effects of low temperature and freeze-thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in arctic tundra soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(11): 5107.