

# 油污胁迫下土壤微生物群落结构对外源施用玉米秸秆生物质炭的响应

王金成<sup>1,2,3</sup>, 井明博<sup>1,2</sup>, 张绍鹏<sup>4</sup>, 周天林<sup>1,2</sup>, 刘光琇<sup>3</sup>, 陈拓<sup>3</sup>, 吴胜伟<sup>5</sup>

(1. 陇东学院 生命科学与技术学院, 甘肃 庆阳 745000; 2. 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; 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. 中国石油天然气股份

有限公司长庆油田分公司第十一采油厂, 甘肃 庆阳 745000; 5. 西安环发生物科技有限公司, 陕西 西安 710068)

**摘要:** [目的] 分析外源施用玉米秸秆生物质炭对石油污染土壤酶活性和微生物群落结构的影响方式, 旨在为黄土高原陇东地区油污土壤生态修复提供新的土壤调理剂。[方法] 对轻度(5%)和重度(20%)油污土壤分别实施了玉米秸秆生物炭(B)、金盏菊(J)和金盏菊+玉米秸秆生物炭(JB)3种处理方式, 采用常规方法测定了不同处理组间土壤总石油烃(TPH)去除率、酶活性和土壤微生物群落结构。[结果] ① 轻度污染时土壤总石油烃(TPH)去除率为 JB<sub>5</sub> (61.95±1.39%)最高, 重度污染时为 JB<sub>20</sub> (56.44±1.89%)最高( $p < 0.05$ ); ② 外源施用玉米秸秆生物质炭能有效增加轻重两种油污浓度的土壤脱氢酶和多酚氧化酶活性; ③ 油污浓度由 5%增至 20%, 两种生物质炭参与的处理组(JB<sub>20</sub>和 B<sub>20</sub>)土壤微生物群落结构组成差异相对较小( $p < 0.05$ ); ④ 非度量多维尺度(NMDS)分析结果显示, 土壤脱氢酶、多酚氧化酶、Chao1 指数和 Shannon 指数是驱动 J<sub>5</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>20</sub>, JB<sub>5</sub> 和 JB<sub>20</sub> 处理组土壤微生物群落结构分异于 CK<sub>5</sub>, CK<sub>20</sub> 和 J<sub>20</sub> 处理组的主要环境因子。[结论] 轻重两种油污浓度胁迫时外源施用玉米秸秆生物质炭可显著增加土壤脱氢酶和多酚氧化酶活性, 驱动土壤微生物群落结构变化, 从而提高了土壤 TPH 去除率, 因此陇东黄土高原地区油污土壤场地生态修复时可选用玉米秸秆生物质炭作为土壤调理剂。

**关键词:** 油污土壤; 金盏菊; 油污浓度; 生物质炭; 微生物群落结构

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-288X(2020)03-0064-11

**中图分类号:** S154.3, X53

**文献参数:** 王金成, 井明博, 张绍鹏, 等. 油污胁迫下土壤微生物群落结构对外源施用玉米秸秆生物质炭的响应[J]. 水土保持通报, 2020, 40(3): 64-74. DOI: 10.13961/j.cnki.stbctb.2020.03.010; Wang Jincheng, Jing Mingbo, Zhang Shaopeng, et al. Response of soil microbial community structure to application of corn straw biochar under crude-oil pollution concentration stress [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2020, 40(3): 64-74.

## Response of Soil Microbial Community Structure to Application of Corn Straw Biochar Under Crude-Oil Pollution Concentration Stress

Wang Jincheng<sup>1,2,3</sup>, Jing Mingbo<sup>1,2</sup>, Zhang Shaopeng<sup>4</sup>,

Zhou Tianlin<sup>1,2</sup>, Liu Guangxiu<sup>3</sup>, Chen Tuo<sup>3</sup>, Wu Shengwei<sup>5</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Longdong University, Qingyang, Gansu 745000, China;

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

Gansu Province, 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. The 11th Oil Production Plant of PCOC, Qingyang,

Gansu 745000, China; 5. Xi'an H&F Environment Protection Engineering Company Limited, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

**Abstract:** [Objective] The effects of exogenous application of corn straw biochar on the soil enzyme activity

收稿日期: 2019-11-19

修回日期: 2020-01-05

资助项目: 国家自然科学基金项目“陇东黄土高原植物微生物组合联合修复石油污染土壤降解机制研究”(31860148); 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); 陇东学院博士基金项目(XYBY1909); 甘肃省青年科技基金计划项目(17JR5RM354); 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室开放基金(EEMRE201601)。

第一作者: 王金成(1982—), 男(汉族), 甘肃省陇南市人, 博士, 副教授, 主要从事污染生态学领域研究工作。Email: wensent20002002@163.com。

and microbial community structure were studied to provide soil conditioner for ecological restoration of crude-oil-contaminated soil in Longdong area of the Loess Plateau. [Methods] Three treatments, namely corn straw biochar treatment (B), *Calendula officinalis* treatment (J), and *Calendula officinalis* plus corn straw biochar treatment (JB) were applied to the low-concentration (5%) and high-concentration (20%) crude-oil-polluted soil. The change of the soil total petroleum hydrocarbon (TPH) removal rate, the soil enzyme activity, and the soil microbial community structure was investigated by the conventional method. [Results] ① The maximum soil TPH removal rates for the low-pollution-concentration group (TPH = 5%) were observed in JB<sub>5</sub> treatment (61.95% ± 1.39%), whereas the JB<sub>20</sub> treatment (56.44% ± 1.89%) demonstrated the maximum soil TPH removal rate, in the high-pollution-concentration (TPH = 20%) group ( $p < 0.05$ ). ② Soil dehydrogenase and polyphenol oxidase activity significantly improved after the application of corn straw biochar. ③ When the crude-oil concentration increased from 5% to 20%, the difference in soil microbial community structure between JB<sub>20</sub> and B<sub>20</sub> treatments was relatively small. ④ Nonmetric multidimensional scaling analysis revealed that the difference in soil microbial community structure between the treatments of J<sub>5</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>20</sub>, JB<sub>5</sub>, and JB<sub>20</sub> and the treatments of CK<sub>5</sub>, CK<sub>20</sub>, and J<sub>20</sub> was caused by the changes of soil dehydrogenase activity, soil polyphenol oxidase activity, Chao1 index, and Shannon-Wiener index of the soil microbial community. [Conclusion] Application of corn straw biochar to crude-oil-polluted soil with low and high concentrations significantly improved the soil dehydrogenase and polyphenol oxidase activity, causing changes in the soil microbial community structure. Consequently, the soil TPH removal rate improved. Therefore, corn straw biochar can be used as a soil conditioner for ecological restoration of crude-oil-contaminated soil in Longdong area of the Loess Plateau.

**Keywords:** crude-oil-contaminated soil; *Calendula officinalis*; pollutant concentration; biochar; microbial community structure

当今环保领域石油污染土壤修复技术可采用物理法、化学法和生物法,其中生物法以其环境友好、成本低和面积原位操作等特点因此受到环境科学工作者的广泛关注<sup>[1]</sup>。然而,油污土壤场地生态修复效果易受土壤生物学及非生物学环境因素的影响<sup>[2]</sup>,其中土壤酶活性和微生物学特性等生物学环境因子是决定油污土壤场地生态修复效果的关键因素<sup>[3]</sup>。目前,中国北方油污土壤生态修复对象主要包括落地原油和清罐原油,由于土壤油污含量高低不一且无法人为控制,因此土壤初始油污浓度高低则成为限制生物修复效果的主要环境因素之一。

近年来,生物炭作为一种新型功能性土壤调理剂,以其高比表面积、强电子交换性和强大的吸附作用等特点能有效改善土壤理化性质、酶活性和微生物生长环境,从而提升土壤污染物降解速率因此受到国内外污染土壤修复领域科研人员的广泛应用<sup>[4-5]</sup>。但目前有关生物修复时外源施用生物质炭的相关研究主要集中在重金属污染土壤方面<sup>[6-8]</sup>,但有关利用生物质炭实施石油污染土壤生物修复技术的研究报道相对较少,且研究内容主要集中在不同生物质炭原材料、不同的裂解温度和施用量对土壤石油污染物生物修复效果的影响等方面<sup>[6,9-10]</sup>。而有关轻重两种油污浓度胁迫时植物修复过程中外源施用生物质炭的相

关报道则相对较少。

为此,本研究利用陇东黄土高原地区资源极为丰富的玉米秸秆制备生物质炭,以本研究团队之前报道的金盏菊(*Calendula officinalis*)为供试植物<sup>[2]</sup>,在长庆油田公司第二采油厂陇东污泥处理站进行了为期4个月的油污土壤场地修复试验。研究了在轻重两种油污浓度胁迫下外源施用玉米秸秆生物质炭土壤总石油烃(total petroleum hydrocarbons, TPH)去除率、酶活性及微生物群落结构的变化情况,目的在于:①分析探讨重度污染时植物修复过程中外源施用玉米秸秆生物质炭能否有效增加土壤TPH去除率;②明确轻重两种油污浓度胁迫时植物修复过程中土壤微生物群落结构和酶活性对外源施用玉米秸秆生物质炭的响应情况。本研究旨在为陇东黄土高原地区开展油污土壤场地生态修复工作提供新的技术方案和基础数据资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试油污土样来源和试验设置

场地修复地点位于甘肃省庆阳市马岭镇长庆油田公司采油二厂陇东污泥处理站(东经 107°22'19", 北纬 30°36'15")。本次试验设置了轻度(5%)和重度(20%)两种油污浓度污染土壤,轻度污染土壤为处理

站在各井场所收集的落地原油污染土壤 (TPH =  $5.08 \pm 0.39\%$ ), 而重度污染土壤则通过向 TPH 含量为  $40.75 \pm 2.86\%$  清罐原油中添加落地原油污染土壤的方式配置而成。其中石油烃密度为  $0.926 \text{ g/cm}^3$ , 烷烃含量  $58.67\%$ , 芳烃含量  $19.86\%$ , 胶质和沥青质含量  $11.94\%$ , 其他组分占  $9.53\%$ 。浇水平衡 2 周后测得 TPH 含量分别为  $4.87 \pm 1.15\%$  和  $21.94 \pm 1.06\%$ , 文中以设置浓度为标识。

试验设置如表 1 所示, 共计包括 6 个处理组, 分别为轻度 (TPH =  $5\%$ ) 污染胁迫组 ( $B_5, J_5, JB_5$ ) 和重度 (TPH =  $20\%$ ) 污染胁迫组 ( $B_{20}, J_{20}, JB_{20}$ ) 以及 2 个对照组 ( $CK_5$  和  $CK_{20}$ )。由西安环发生物科技有限公司负责修建束沿, 深度为  $50 \text{ cm}$ , 大小为  $6 \text{ m} \times 2 \text{ m}$ , 土层铺设厚度为  $25\text{--}30 \text{ cm}$ 。轻度污染土壤容重和 pH 值分别为  $1.34 \pm 0.28 \text{ g/cm}^3$  和  $8.78 \pm 0.11$ , 重度污染土壤容重和 pH 值则分别为  $1.63 \pm 0.52 \text{ g/cm}^3$  和  $9.05 \pm 0.15$ 。包括对照组 (CK) 在内, 每个油污浓度设置 3 个重复, 共计 24 个束沿修复池。试验开始于 2018 年 5 月 1 日, 结束于 2018 年 9 月 1 日, 试验周期为 4 个月, 生物质炭施用量为  $5\%$ , 其中植物修复组 ( $J_5, JB_5, J_{20}$  和  $JB_{20}$ ) 播撒金盏菊种子 500 粒, 覆土厚度约为  $1 \text{ cm}$ , 每 3 d 浇水一次, 使土壤田间持水量保持在  $65\%$  左右。

## 1.2 测定指标及方法

1.2.1 生物质炭制备 玉米秸秆清洗后  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  烘干 ( $24 \text{ h}$ ), 粉碎至  $1\text{--}2 \text{ cm}$  长的小段后在马弗炉中  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  下缺氧裂解  $4.5 \text{ h}$ , 冷却后过 60 目筛备用<sup>[10]</sup>。灰分含量和 pH 值分别为  $35.74 \pm 1.71\%$  和  $7.07 \pm 0.05$ , 将制备好的玉米秸秆生物质炭通过搅拌机与油污土样进行充分搅拌以确保均一性。

1.2.2 土壤酶活性测定 土壤脱氢酶采用氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法测定, 多酚氧化酶采用邻苯三酚比色法测定, 多酚氧化酶活性以  $1 \text{ g}$  土壤中紫色没食子素的毫克数表示<sup>[2-3]</sup>。

$$\text{土壤 TPH 去除率} = \frac{\text{修复前土壤 TPH 含量}(\text{mg/kg}) - \text{修复后土壤 TPH 含量}(\text{mg/kg})}{\text{修复前土壤 TPH 含量}(\text{mg/kg})} \times 100\%$$

## 1.3 数据处理与计算

利用 SPSS 19.0 和 R2.15.2 对数据进行分析, 用 Origin 8.0 和 R 2.15.2 作图。对土壤 TPH 去除率、根际土壤酶活性、微生物群落多样性及其相对丰度等指标的测定值进行单因素方差分析, 多重比较采用 Duncan 法, 在  $95\%$  水平分析差异显著性。为了解析轻重两种油污浓度胁迫时上述指标对金盏菊修复时外源施用玉米秸秆生物质炭的响应情况。基于

表 1 不同处理组设置

土壤 TPH 浓度	处理组编号	处理组试验设置
5%	CK <sub>5</sub>	5%油污土壤+无任何处理
	B <sub>5</sub>	5%油污土壤+5%玉米秸秆生物炭
	J <sub>5</sub>	5%油污土壤+金盏菊
	JB <sub>5</sub>	5%油污土壤+金盏菊+5%玉米秸秆生物炭
20%	CK <sub>20</sub>	20%油污土壤+无任何处理
	B <sub>20</sub>	20%油污土壤+5%玉米秸秆生物炭
	J <sub>20</sub>	20%油污土壤+金盏菊
	JB <sub>20</sub>	20%油污土壤+金盏菊+5%玉米秸秆生物炭

1.2.3 土壤微生物群落结构分析 委托北京百迈客生物科技有限公司。利用试剂盒 (D5625-01, Soil DNA Kit, OMEGA, USA) 提取土壤微生物总 DNA。以 341F/805R (341F 引物:  $5' \text{-CCCTACAC-GACGCTCTTCCGATCTG-3'}$ ; 805R 引物:  $5' \text{-GACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA-3'}$ ) 对总 DNA 进行 PCR 扩增<sup>[7]</sup>。扩增步骤:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性  $3 \text{ min}$ ,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  退火  $20 \text{ s}$ ,  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $30 \text{ s}$ , 重复 5 个循环;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $20 \text{ s}$ ,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  退火  $20 \text{ s}$ ,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $30 \text{ s}$ , 重复 20 个循环; 引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性  $30 \text{ s}$ ,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $15 \text{ s}$ ,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  退火  $15 \text{ s}$ ,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $30 \text{ s}$ , 重复 5 个循环。将 PCR 产物回收纯化后, 利用 Illumina HiSeq 2500 平台进行土壤微生物高通量分析。

## 1.2.4 土壤 TPH 残留量测定及 TPH 去除率计算

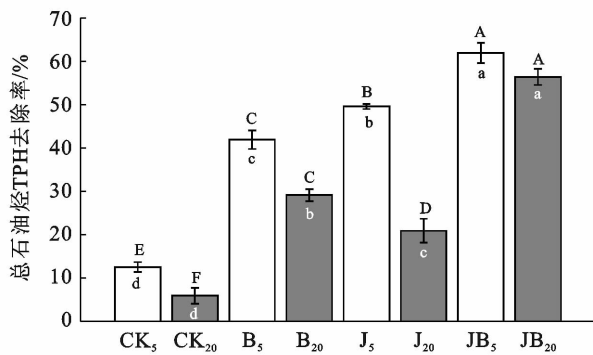
土壤 TPH 含量采用超声-索氏萃取-重量法测定<sup>[10]</sup>。称取  $5 \text{ g}$  风干土样于  $50 \text{ ml}$  离心管中, 加  $20 \text{ ml}$  二氯甲烷后  $60 \text{ W}$  功率下超声萃取  $15 \text{ min}$ ,  $4000 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ , 收集上清液至已恒重的烧瓶中, 重复萃取 3 次后将全部上清液  $54 \text{ }^\circ\text{C}$  旋转蒸发至干, 称重。前后重量差即为土壤 TPH 含量。TPH 去除率计算公式如下:

Bray-Curtis 相异指数, 使用 “envfit” 函数, 经 Mantel 检验与不同处理组土壤微生物群落结构显著相关的上述土壤环境指标拟合不同处理组菌群结构的非度量多维尺度 (NMDS) 排序图。为防止样点在各象限的分布发生移位, 在拟合时对 NMDS 的排序轴进行旋转, 以确保 NMDS 第一轴能够最大程度表征群落相异性的变异。不同处理组矩阵及矢量数据集分别用 Bray-Curtis 与 Euclidean 距离表示<sup>[3]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 轻重两种油污浓度胁迫下金盏菊根际土壤 TPH 去除率对施用玉米秸秆生物质炭的响应

图 1 为轻重两种油污浓度胁迫下不同处理组土壤 TPH 去除率变化情况。 $F$  检验结果显示,轻重两种油污浓度胁迫下不同处理组土壤 TPH 去除率差异极显著( $p < 0.01$ )。多重比较(Duncan,  $\alpha = 0.05$ )结果显示进一步显示,轻度污染时(TPH=5%)土壤 TPH 去除率依次为  $JB_5 (61.95 \pm 1.39\%) > J_5 (49.59 \pm 2.14\%) > B_5 (41.94 \pm 1.83\%) > CK_5 (12.52 \pm 1.16\%)$  ( $p < 0.05$ ),其中  $JB_5$ ,  $J_5$  和  $B_5$  处理组与  $CK_5$  相比土壤 TPH 去除率分别增加了 4.95, 3.96, 3.35 倍,表明轻度污染时 3 种处理方式均可有效增加土壤 TPH 去除率。重度污染胁迫时(TPH=20%),土壤 TPH 去除率依次为  $JB_{20} (56.44 \pm 1.89\%) > B_{20} (29.13 \pm 2.77\%) > J_{20} (20.90 \pm 2.36\%) > CK_{20} (5.91 \pm 1.05\%)$  ( $p < 0.05$ ),与  $CK_{20}$  相比,  $JB_{20}$ ,  $B_{20}$  和  $J_{20}$  处理方式土壤 TPH 去除率分别增加了 9.54, 4.93, 3.54 倍,说明在重度油污时 3 种处理方式亦能显著增加土壤 TPH 去除率,其中金盏菊+玉米秸秆生物质炭处理方式( $JB_5$  和  $JB_{20}$ )在轻重两种油污浓度胁迫时土壤 TPH 去除率均显著高于其他处理组( $p < 0.05$ )。



注:不同黑色和白色小写字母分别表示轻度和重度油污浓度胁迫下土壤 TPH 去除率在不同处理组间差异显著(Duncan,  $\alpha = 0.05$ );不同大写字母表示轻重两种油污浓度胁迫下土壤 TPH 去除率在不同处理组间差异显著(Duncan,  $\alpha = 0.05$ );横坐标上不同处理的具体意思详见表 1。下同。

图 1 轻重两种油污浓度胁迫下不同处理组土壤总石油烃(TPH)去除率变化情况

其次,就相同处理方式在轻重两种油污浓度胁迫时土壤 TPH 去除率变化情况而言(见图 1),重度污染时玉米秸秆生物质炭处理组( $B_{20}$ )和金盏菊单独处理组( $J_{20}$ )土壤 TPH 去除率与其轻度污染时相比分别下降了 30.54% 和 57.85%,原因可能是由于重度

污染会增加土壤黏度、阻碍土壤呼吸,从而限制了生物质炭吸附作用和金盏菊的生长,进而引起了玉米秸秆生物质炭和单独金盏菊处理方式土壤 TPH 去除率的显著降低。此外,  $JB_5$  和  $JB_{20}$  处理组土壤 TPH 去除率在轻重两种油污浓度胁迫时无显著差异,说明油污浓度在一定范围内的变化对金盏菊+玉米秸秆生物质炭处理方式土壤 TPH 去除率的影响相对较小。

### 2.2 轻重两种油污浓度胁迫下金盏菊根际土壤酶活性对施用玉米秸秆生物质炭的响应

如图 2 所示,不同处理组土壤脱氢酶和多酚氧化酶存在极显著差异( $p < 0.01$ )。就轻重两种油污浓度胁迫时 CK 组土壤脱氢酶活性而言,  $CK_{20}$  组该酶活性与  $CK_5$  组相比显著降低了 1.91 倍,说明油污浓度增加对土壤脱氢酶活性存在显著抑制作用。而本研究所设置的 3 个处理组而言,  $B_5$ ,  $J_5$ ,  $JB_5$  处理组土壤脱氢酶活性在轻度污染时与  $CK_5$  相比依次增加了 1.90, 2.47, 4.59 倍( $p < 0.05$ ),重度污染组  $B_{20}$ ,  $J_{20}$ ,  $JB_{20}$  与  $CK_{20}$  相比依次增加了 3.12, 2.25, 8.87 倍( $p < 0.05$ ),表明 3 个处理组在轻重两种油污浓度胁迫下均能有效提高土壤脱氢酶活性。其中金盏菊+玉米秸秆生物质炭( $JB$ )处理方式的土壤脱氢酶酶活性增加量在轻重两种油污浓度胁迫时均显著高于金盏菊单独处理组( $J$ )和生物质炭单独处理组( $B$ )( $p < 0.05$ ),说明金盏菊+玉米秸秆生物质炭处理方式在增加土壤脱氢酶活性方面明显优于金盏菊和玉米秸秆生物质炭两种单独处理方式。

土壤多酚氧化酶活性方面,与  $CK_5$  相比,  $JB_5$  处理组土壤多酚氧化酶活性增加了 5.97 倍,而  $B_5$  和  $J_5$  处理组分别增加了 2.45 倍和 2.66 倍,说明金盏菊+玉米秸秆生物质炭处理方式在轻度污染组对土壤多酚氧化酶活性的促进作用相对较大。而重度污染时该酶活性高低依次为:  $JB_{20} > B_{20} > J_{20} > CK_{20}$  ( $p < 0.05$ ),表明重度污染对金盏菊单独处理组( $J_{20}$ )土壤多酚氧化酶活性有明显抑制作用,这可能与重度污染对金盏菊生长产生了抑制作用有关。此外,重度污染时  $B_{20}$  处理组土壤多酚氧化酶活性与轻度污染时  $B_5$  和  $J_5$  处理组无显著差异则体现出生物质炭在改善土壤酶活性方面优势明显。综上所述,金盏菊+玉米秸秆生物质炭( $JB$ )处理组土壤脱氢酶和多酚氧化酶活性在两种油污浓度胁迫下均远高于其他处理组(见图 2),因此陇东黄土高原地区实施油污土壤植物修复时可通过外源施用玉米秸秆生物质炭的来提高土壤脱氢酶和多酚氧化酶活性,进而加速土壤 TPH 的生物降解效率。

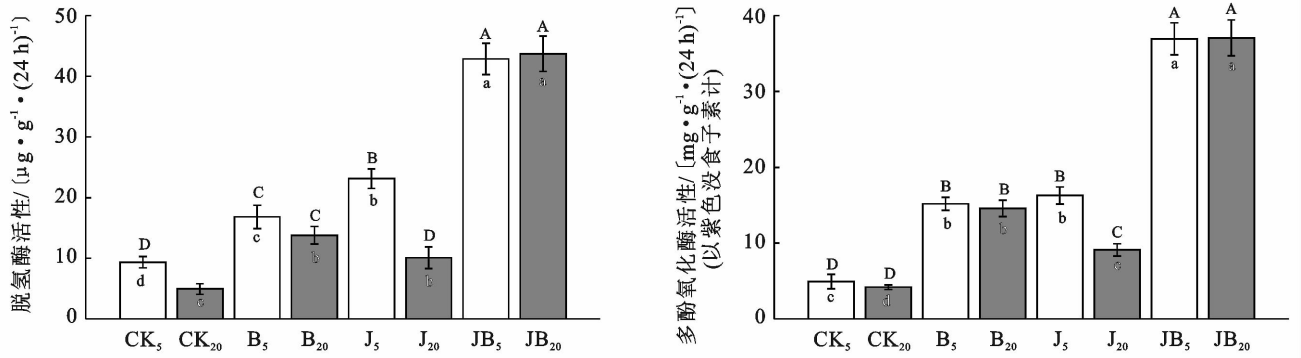


图 2 轻重两种油污浓度胁迫下不同处理组土壤脱氢酶和多酚氧化酶活性变化情况

### 2.3 轻重两种油污浓度胁迫下金盏菊根际土壤微生物群落多样性对施用玉米秸秆生物质炭的响应

利用 Illumina HiSeq 2500 平台对本研究所设置的不同处理组土壤样品进行了细菌基因组 DNA 高通量分析测定,结果如表 2 所示。不同处理组土壤样品测得有效序列数介于 41 941.97~56 192.65 之间,其中 JB<sub>20</sub> 和 JB<sub>5</sub> 处理组最高,B<sub>20</sub>,J<sub>5</sub> 和 B<sub>5</sub> 处理组次之,两个对照组(CK<sub>20</sub> 和 CK<sub>5</sub>)相对较低( $p < 0.05$ ),而不同处理组土壤样品的测序覆盖率均大于 98%,说明本次 HiSeq 测序深度足够。可操作分类单元(OTU)数量方

面,轻度污染时不同处理组土壤微生物 OTU 数量高低依次为 JB<sub>5</sub> > J<sub>5</sub> > B<sub>5</sub> > CK<sub>5</sub> ( $p < 0.05$ ),而重度污染时则依次为 JB<sub>20</sub> > B<sub>20</sub> > J<sub>20</sub> > CK<sub>20</sub> ( $p < 0.05$ )。两种油污浓度相较而言,重度污染组 JB<sub>20</sub>, B<sub>20</sub>, J<sub>20</sub>, CK<sub>20</sub> 与轻度污染组 JB<sub>5</sub>, B<sub>5</sub>, J<sub>5</sub>, CK<sub>5</sub> 相比土壤微生物 OTU 数量分别降低了 3.06%, 4.03%, 32.67% 和 9.44%,表明重度污染对金盏菊处理组土壤微生物 OTU 数量的影响相对较高,而 JB<sub>20</sub> 和 J<sub>5</sub> 之间、B<sub>20</sub> 和 B<sub>5</sub> 之间无显著差异则说明外源施用玉米秸秆生物质炭可能是上述处理组土壤微生物 OTU 数量依然保持相对较高的原因之一。

表 2 轻重两种油污浓度胁迫下不同处理组土壤细菌基因组 DNA 测序数据统计及多样性变化情况

油污浓度	处理	覆盖率	OTU 数量	有效序列数	Shannon 指数	Chao1 指数
轻度污染 (TPH=5%)	CK <sub>5</sub>	0.99±0.05	989.73±7.28 <sup>d/E</sup>	45 299.65±990.25 <sup>c/C</sup>	3.98±0.02 <sup>d/E</sup>	915.69±5.16 <sup>d/E</sup>
	B <sub>5</sub>	0.98±0.04	1 429.32±40.84 <sup>c/C</sup>	48 032.37±840.81 <sup>b/B</sup>	4.65±0.04 <sup>c/C</sup>	1 284.65±10.82 <sup>c/C</sup>
	J <sub>5</sub>	0.98±0.06	1 737.52±25.18 <sup>b/B</sup>	49 561.56±444.57 <sup>b/B</sup>	5.65±0.13 <sup>a/A</sup>	1 683.10±14.45 <sup>a/A</sup>
	JB <sub>5</sub>	0.98±0.01	1 876.95±12.69 <sup>a/A</sup>	55 348.84±620.54 <sup>a/A</sup>	5.73±0.11 <sup>a/A</sup>	1 545.24±30.11 <sup>b/B</sup>
	F 值		245.699	28.795	72.433	361.828
	sig.		$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$
重度污染 (TPH=20%)	CK <sub>20</sub>	0.98±0.06	959.49±9.48 <sup>d/</sup>	41 941.97±658.97 <sup>d/D</sup>	3.75±0.05 <sup>d/F</sup>	718.77±19.01 <sup>d/F</sup>
	B <sub>20</sub>	0.98±0.09	1 371.75±16.76 <sup>b/C</sup>	48 605.33±327.35 <sup>b/B</sup>	4.39±0.01 <sup>b/D</sup>	1 250.29±26.81 <sup>b/C</sup>
	J <sub>20</sub>	0.99±0.08	1 169.88±23.35 <sup>c/D</sup>	45 751.59±560.75 <sup>c/C</sup>	4.02±0.03 <sup>c/E</sup>	962.46±11.47 <sup>c/D</sup>
	JB <sub>20</sub>	0.99±0.04	1 699.83±34.25 <sup>a/B</sup>	56 192.65±975.62 <sup>a/A</sup>	5.17±0.05 <sup>a/B</sup>	1 494.32±74.13 <sup>a/B</sup>
	F 值		209.834	211.532	276.77	133.27
	sig.		$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$
轻重两种 油污浓度	F 值		219.862	88.276	109.109	278.931
	sig.		$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$

注:平均值±标准误;同列不同小写字母表示分别在轻度(TPH=5%)和重度(TPH=20%)污染水平各处理组上述指标间差异显著,不同大写字母表示轻重两种油污浓度胁迫时各处理组间差异显著,(Duncan, $\alpha=0.05$ );对 97%相似度水平的 OTU 代表序列进行分类学比对。

其次,供试油污土壤微生物群落多样性分析结果如表 2 所示。重度污染组 JB<sub>20</sub>, B<sub>20</sub>, J<sub>20</sub> 和 CK<sub>20</sub> 与轻度污染组 JB<sub>5</sub>, B<sub>5</sub>, J<sub>5</sub> 和 CK<sub>5</sub> 相比土壤微生物 Shannon 指数分别降低了 5.78%, 5.59%, 28.85%, 9.77%,说明与轻度污染相比重度污染对土壤微生物多样性均不同程度产生了抑制作用,其中金盏菊(J)处理组下

降程度尤为明显( $p < 0.05$ )。微生物丰度方面,重度污染组 JB<sub>20</sub>, B<sub>20</sub>, J<sub>20</sub> 和 CK<sub>20</sub> 与轻度污染对应的不同处理组相比土壤微生物 Chao1 指数依次降低了 21.51%, 2.67%, 42.82%, 3.30%,说明重度污染后金盏菊处理组(J)和 CK 组的土壤微生物丰度明显受到抑制。此外,B<sub>5</sub> 与 B<sub>20</sub> 之间以及 JB<sub>5</sub> 和 JB<sub>20</sub> 之间土壤微生物

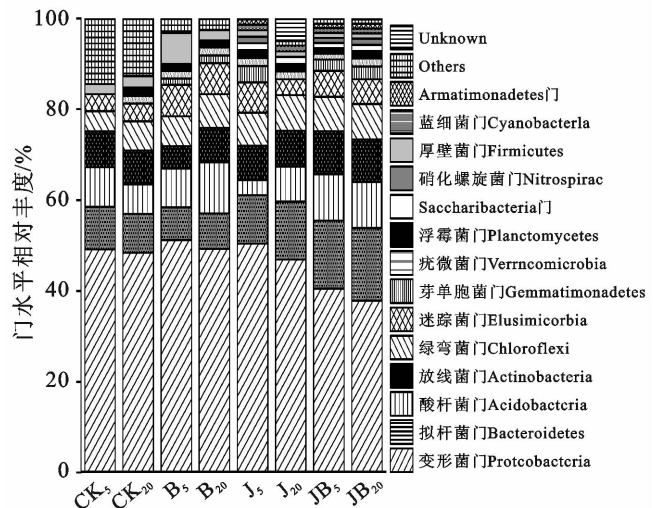
丰度则无显著变化,这可能与外源施用玉米秸秆生物质炭可有效吸附了土壤石油烃,进而减缓了石油污染物的毒害作用有关。

## 2.4 轻重两种油污浓度胁迫下土壤微生物群落结构对外源施用玉米秸秆生物质炭的响应

在门分类水平上,供试油污土样细菌归属于 22 个门,其中相对丰度 $>1\%$ 的优势菌群主要包括变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和绿弯菌门(Chloroflexi)等 14 个门(见图 3),上述 14 种优势菌门在  $J_5$ 、 $JB_{20}$  和  $JB_5$  处理组的相对丰度均 $>1\%$ ,而  $J_{20}$  处理组的芽单胞菌门、Saccharibacteria 门和 Armatimonadetes 门相对丰度均 $<1\%$ ,说明重度污染对金盏菊单独处理组上述 3 种优势菌门存在明显抑制作用,而  $B_5$  和  $B_{20}$  处理组 Saccharibacteria 门、硝化螺旋菌门、蓝细菌门和 Armatimonadetes 门相对丰度均 $<1\%$ ,推测硝化螺旋菌门和蓝细菌门相对丰度的降低可能与未种植金盏菊有关。上述结果说明不同处理方式下油污土壤微生物群落组成在门分类水平上存在明显差异,而金盏菊根际分泌物和玉米秸秆生物质炭有效改善土壤养分可能是金盏菊+生物质炭处理组方式土壤优势菌门数量最多的主要原因。

此外, $F$  检验结果显示,上述 14 个优势菌门相对丰度在不同处理间均存在极显著差异( $F_{\text{变形菌门}}=35.184$ ,  $F_{\text{拟杆菌门}}=621.831$ ,  $F_{\text{酸杆菌门}}=453.569$ ,  $F_{\text{放线菌门}}=856.196$ ,  $F_{\text{绿弯菌门}}=922.821$ ,  $F_{\text{迷踪菌门}}=17\,040.240$ ,  $F_{\text{芽单胞菌门}}=6\,083.961$ ,  $F_{\text{疣微菌门}}=6\,384.355$ ,  $F_{\text{浮霉菌门}}=9\,767.236$ ,  $F_{\text{Saccharibacteria门}}=4\,251.712$ ,  $F_{\text{硝化螺旋菌门}}=31\,698.331$ ,  $F_{\text{厚壁菌门}}=7\,593.169$ ,  $F_{\text{蓝细菌门}}=16\,264.231$ ,  $F_{\text{Armatimonadetes门}}=187\,653.106$ ,  $p<0.01$ )。当油污浓度由轻度(5%)增至重度(20%)时,生物质炭处理方式(B)的变形菌门和厚壁菌门相对丰度分别降低了 1.94% 和 4.51% ( $p<0.05$ ),但酸杆菌门和放线菌门相对丰度却显著增加了 2.83% 和 2.56% ( $p<0.05$ );金盏菊处理组(J)的变形菌门、迷踪菌门、芽单胞菌门、硝化螺旋菌门和 Armatimonadetes 门分别降低了 3.48%, 3.17%, 3.61%, 1.45% 和 1.16% ( $p<0.05$ ),而拟杆菌门和酸杆菌门相对丰度却显著增加了 2.10% 和 4.33% ( $p<0.05$ );金盏菊+生物质炭处理组(JB)中仅变形菌门相对丰度下降了 2.70% ( $p<0.05$ ),而拟杆菌门则显著增加了 1.08% ( $p<0.05$ )。上述结果中,除  $J_{20}$  处理组与  $J_5$  相比有 5 个优势菌门相对丰度显著降低外,生物质炭处理组的变形菌门和厚壁菌门以及金盏菊+生物质炭处理组的变形菌门相对丰度显著降低,而酸杆菌门、放线菌门和拟杆菌门的相对丰度也随之增

加,且上述优势菌门中存在大量的原油降解功能菌<sup>[11]</sup>,结合土壤 TPH 去除率变化情况来看(见图 1),油污浓度的增加土壤微生物在门分类水平的相对丰度并不能简单的理解为抑制作用,即随着油污浓度增加土壤微生物群落结构会做出响应,各处理方式通过群落结构组成和数量变化来适应和消除土壤 TPH 的生态毒性,由此推测外源施用玉米秸秆生物质炭削弱了重度污染土壤石油污染物的生态毒性,进而驱动了土壤微生物群落结构发生改变,促进土壤石油污染物的生物降解。



注:相对丰度数值由相应优势菌门 3 个重复的相对丰度平均值计算得出。

图 3 轻重两种油污浓度胁迫下不同处理组土壤微生物在门分类水平相对丰度变化情况

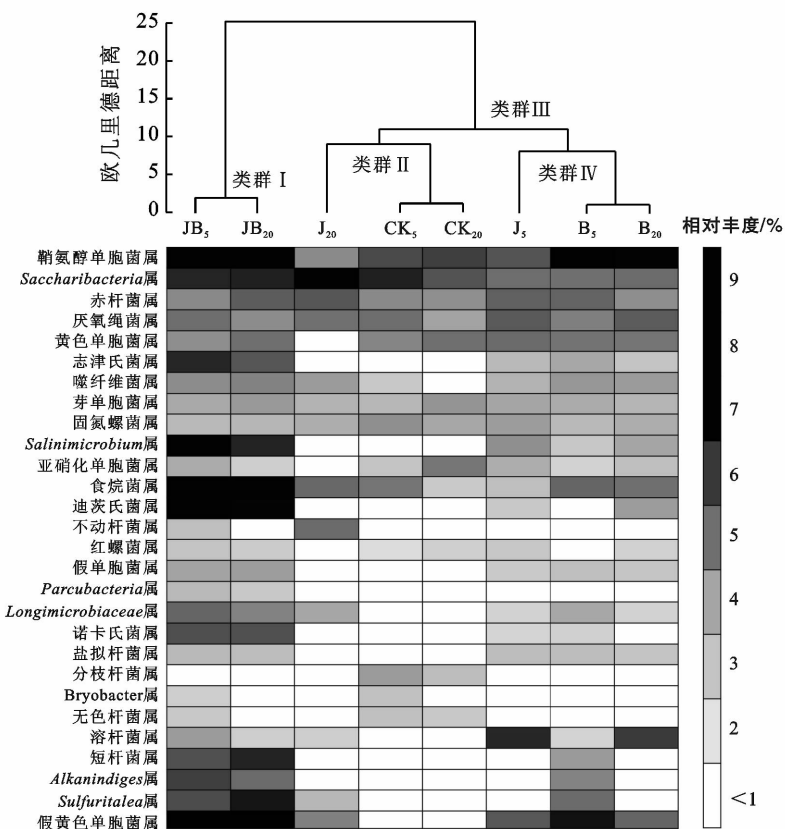
在属分类水平上,对所有供试土壤样品相对丰度 $>1\%$ 的优势菌属分析结果如图 4 所示,其中主要包括鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*), *Saccharibacteria* 属,赤杆菌属(*Erythrobacter*),厌氧绳菌属(*Anaerolineaceae*),黄色单胞菌属(*Xanthomonadales*)和志津氏菌属(*Simidiua*)等 28 种优势菌群。

为了明确轻重两种油污浓度胁迫下不同处理组土壤微生物群落结构在属分类水平的响应情况,采用 Euclidean 距离法对供试油污土壤微生物优势菌属进行分类系统聚类,结果如图 4 所示。若在 25.00 至 11.93 相似水平截取,供试土壤可划分为 2 个类群,其中类群 I 为  $JB_5$  和  $JB_{20}$  处理组,而其他处理组则划分为类群 II,说明在属分类水平上金盏菊+生物质炭处理组( $JB_5$ ,  $JB_{20}$ )群落结构相似性相对较高;若相似水平在 8.67 至 11.93 截取,类群 II 则进一步划分为类群 III ( $J_{20}$ ,  $CK_5$ ,  $CK_{20}$ )和类群 IV ( $J_5$ ,  $B_5$ ,  $B_{20}$ ),表明轻度污染对金盏菊处理组的影响相对较小,其土壤微生物群落结构在此相似水平与两个生物质炭处理组相似

性相对较高,而重度污染对其影响相对较大因此其土壤微生物群落结构与两个 CK 组较为相似。当相似水平进一步在 2.15 至 8.67 截取,类群 III ( $J_{20}$ ,  $CK_5$  和  $CK_{20}$ ) 的进一步划分结果则反映出  $J_{20}$  处理组和两个 CK 组之间土壤微生物结构亦存在显著差异,表明虽然重度污染对金盏菊生物存在可能存在抑制作用,但与未做任何处理的 CK 组相比土壤微生物群落结构在属分类水平的响应方式依然不尽相同。

当油污浓度由轻度(5%)增至重度(20%)时,生物质炭处理组(B)的鞘氨醇单胞菌属、食烷菌属和迪茨氏菌属相对丰度显著降低了 1.91%, 1.86% 和 1.04% ( $p < 0.05$ ), 赤杆菌属和诺卡氏菌属相对丰度显著增加了 1.11% 和 1.01% ( $p < 0.05$ ); 金盏菊+生物质炭处理组(JB)的赤杆菌属、食烷菌属、短杆菌属和 Sulfuritalea 属相对丰度显著降低了 1.06%, 1.12%, 1.06% 和 1.28% ( $p < 0.05$ ), 志津氏菌属、Salinimicrobium 属、迪茨氏菌属、不动杆菌属、Bryobacter 属、无色杆菌属、溶杆菌属和 Alkanindiges 属相对丰度显著增加了 1.12%, 1.43%, 1.04%, 1.56%, 1.20%, 1.31%, 1.18% 和 1.02% ( $p < 0.05$ ), 不难发现生物质炭处理组(B)和金盏菊+生物质炭处理组(JB)优势菌属变化趋势与门分类水平较为相似,即优势菌属的相对丰度做出响应,微生物群落结构发生改变,从而削弱土壤石油污染物的生态毒性。但与生物质炭处理组(B)和金盏菊+生物质炭处理组(JB)优势菌属变化趋势不同的是金盏菊单独处理组(J)中鞘氨醇单胞菌属、黄色单胞菌属、志津氏菌属、Salinimicrobium 属、亚硝化单胞菌属、假单胞菌属、诺卡氏菌属、盐拟杆菌属、短杆菌属、Alkanindiges 属、Sulfuritalea 属和假黄色单胞菌属受重污染影响其相对丰度分别显著降低了 3.42%, 3.34%, 2.06%, 1.32%, 1.09%, 1.55%, 1.11%, 1.57%, 2.39%, 2.91%, 1.85% 和 2.66% ( $p < 0.05$ ), 仅有 Saccharibacteria 属和不动杆菌属相对丰度显著降低了 3.55 和 3.64%。综上所述,轻重两种油污浓度胁迫时  $B_5$  和  $B_{20}$  土壤微生物群落结构相似性相对较高

原因在于 28 个优势菌属中仅有 5 个属相对丰度发生了显著变化 ( $p < 0.05$ ), 而重度污染胁迫后  $JB_{20}$  处理组中有 4 属相对丰度降低 8 属相对丰度增加 ( $p < 0.05$ ), 这可能是生物质炭参与的不同处理方式土壤微生物群落结构相似性相对较高的原因之一, 而重度污染后金盏菊处理组土壤微生物中仅有 2 个属相对丰度显著增加, 却有 12 个属相对丰度显著降低 ( $p < 0.05$ ), 原因可能是由于重度污染通过抑制金盏菊生长的方式影响了土壤微生物群落结构和组成。此外查阅文献报道可见,  $J_{20}$  处理组中 12 个相对丰度显著降低的优势菌属存在大量的原油降解菌<sup>[11-12]</sup>, 这可能是决定重度污染时金盏菊单独处理组土壤 TPH 去除率相对较低的关键因素之一。



注:热图中颜色深浅代表土壤微生物优势菌属的相对丰度大小,其数值大小由相应优势菌属 3 个重复的相对丰度平均值计算得出。

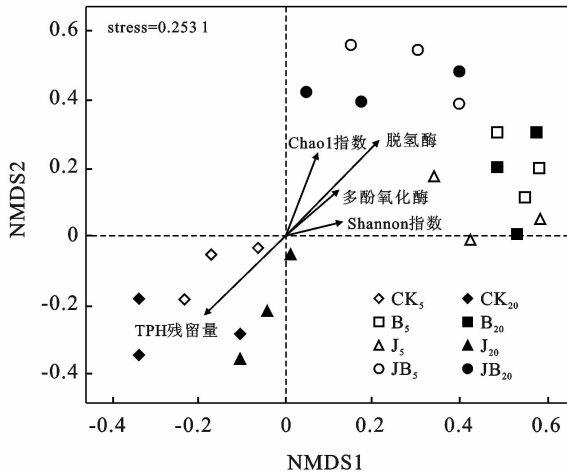
图 4 轻重两种油污浓度胁迫下不同处理组土壤

微生物优势菌群在属分类水平的相对丰度热图

## 2.5 不同处理组在轻重油污浓度胁迫时土壤环境因子与土壤微生物群落结构的非度量多维尺度(NMDS)分析

为了解析轻重油污浓度胁迫时油污土壤生物学及非生物学环境因子对不同处理方式的响应情况。即本研究所测定 7 项石油污染土壤生物学环境指标在驱动不同处理组土壤微生物群落结构(属分类水平)分异过程中的相对重要性。将 Mantel 检验与不同处理组土壤微生物群落结构显著相关 ( $p = 0.05$ ) 的 5 项土壤环境指标拟合于不同处理组菌群结构的非度量多维尺度(NMDS)排序

图上(见图 5),胁迫系数(stress)为 0.253 1。由图 5 可见,本研究所设置的两个对照组(CK<sub>5</sub>,CK<sub>20</sub>和 J<sub>20</sub>)相对集中,主要分布在 NMDS1 和 NMDS2 的负半轴,而其余处理组则主要集中在 NMDS1 正半轴上,上述 NMDS 点集分布方式体现了轻重两种油污浓度胁迫下不同处理方式土壤微生物群落结构在属分类水平的差异。



注:仅有 95%置信水平与不同处理组土壤微生物群落结构显著相关的环境变量( $p < 0.05$ )拟合在 NMDS 排序图上。

图 5 不同处理组土壤微生物群落结构非度量多维尺度(NMDS)排序

由拟合结果可见(图 5),土壤脱氢酶( $R^2 = 0.8214$ ,  $p = 0.007$ )、Chao1 指数( $R^2 = 0.7233$ ,  $p = 0.018$ )、多酚氧化酶( $R^2 = 0.6857$ ,  $p = 0.024$ )和 Shannon 指数( $R^2 = 0.5913$ ,  $p = 0.041$ )是决定 J<sub>5</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>20</sub>, JB<sub>5</sub> 和 JB<sub>20</sub> 土壤微生物群落结构分异于其他处理组的主要环境因子,而土壤 TPH 残留量( $R^2 = 0.8064$ ,  $p = 0.009$ )则是引起 CK<sub>5</sub>, CK<sub>20</sub> 和 J<sub>20</sub> 处理组土壤微生物群落结构不同于其他处理组的主要环境因子。对上述 5 项与不同处理组土壤微生物群落结构显著相关的环境变量进行 Pearson 相关性分析结果显示,土壤 TPH 残留量分别与土壤脱氢酶( $r = -0.906$ ),多酚氧化酶( $r = -0.867$ ),Chao1 指数( $r = -0.906$ )和 Shannon 指数( $r = -0.918$ )呈极显著负相关关系( $p < 0.001$ ),表明 CK<sub>5</sub>, CK<sub>20</sub> 和 J<sub>20</sub> 处理组相对较高土壤油污含量是决定其土壤微生物群落结构不同于其他处理组。结合轻重两种油污浓度胁迫下不同处理组土壤微生物  $\alpha$  多样性和酶活性变化情况来看, J<sub>5</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>20</sub>, JB<sub>5</sub> 和 JB<sub>20</sub> 处理组以其相对较高的土壤脱氢酶、多酚氧化酶、Chao1 指数和 Shannon 指数是驱动土壤微生物群落结构分异于其他处理组的主要环境因子。

### 3 讨论

#### 3.1 轻重两种油污浓度胁迫下土壤 TPH 去除率对外源施用玉米秸秆生物质炭的响应

油污土壤场地生态修复过程中土壤 TPH 去除率是直接评价修复效果的重要指标之一<sup>[1]</sup>。Saum 等<sup>[13]</sup>利用牧豆树(*Prosopis juliflora*)对轻度油污土壤(TPH=2%)实施为期 5 个月的植物修复试验时外源施用了玉米秸秆生物质炭,结果显示牧豆树单独修复组( $48.15 \pm 6.11\%$ )和牧豆树+5%玉米秸秆生物质炭处理组( $51.82 \pm 6.52\%$ )土壤 TPH 去除率并无显著差异; Han 等<sup>[14]</sup>利用黑麦草(*Lolium perenne*)和小麦秸秆生物炭在天津大港油田 7.17%油污土壤实施了为期 3 个月的植物修复试验,结果显示黑麦草+5%小麦秸秆生物炭处理组土壤 TPH 去除率为 36.08%,而黑麦草处理组则高达 55.13%。上述试验结果说明中低油污浓度时外源施用生物质炭处理方式与植物修复相比土壤 TPH 去除率并未表现出明显促进作用,甚至略低于植物修复方式,这与本研究 5%油污浓度胁迫时 J<sub>5</sub>( $49.59 \pm 2.14\%$ )处理组土壤 TPH 去除率显著高于 B<sub>5</sub>( $41.94 \pm 1.83\%$ )的试验结果基本一致(见图 1)。而 Wang 等<sup>[15]</sup>分析探讨芦苇秸秆生物质炭对 9.62%油污土壤修复效果时指出土壤 TPH 去除率为 46.92%,且辅以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  营养物质后土壤 TPH 去除率高达 51.35%; Zhen 等<sup>[16]</sup>利用稻壳生物质炭联合大米草(*Spartina anglica*)对大港油田重度油污土壤(TPH=30%)实施为期 40 d 的生态修复试验时指出,大米草单独处理组土壤 TPH 去除率仅为  $19.11 \pm 2.14\%$ ,而大米草+5%谷壳生物质炭修复方式土壤 TPH 去除率为  $39.71 \pm 3.85\%$ ,这与本研究重度污染时(TPH=20%)金盏菊+玉米秸秆生物质炭处理组土壤 TPH 去除率  $56.44 \pm 1.89\%$ ,而金盏菊处理组仅为  $20.90 \pm 2.36\%$  试验结果的变化趋势基本一致(见图 1)。究其原因在于轻度污染对植物生长的抑制作用相对较小,因此植物可充分发挥其根际降解或吸收富集特性进而有效提升土壤 TPH 的降解和转化效率<sup>[17]</sup>,但重度污染时植物生长受到抑制后其根际效应则明显减弱,故而 TPH 去除率也随之降低<sup>[18]</sup>。前人研究指出油污土壤外源施用生物质炭可有效改善土壤理化性质、调控土壤营养元素、优化微生物生长环境,加速石油污染物的生物降解<sup>[16]</sup>。但就本研究试验结果来看,轻度污染时金盏菊处理组(J<sub>5</sub>)土壤 TPH 去除率明显高于玉米秸秆生物质炭处理组(B<sub>5</sub>),说明轻度污染时植物修复效果明显优于生物质炭的处理效果,而



重度污染时生物质炭调控油污土壤营养元素,改善土壤结构的特性则逐步显现,表现为重度污染时玉米秸秆生物质炭处理组(B<sub>20</sub>)土壤 TPH 去除率明显高于金盏菊处理组(J<sub>20</sub>)。此外,本研究所设置的金盏菊+玉米秸秆生物质炭处理组土壤 TPH 去除率在轻重两种油污浓度胁迫时无显著差异,原因可能是由于重度污染时外源施用生物质炭有效吸收了土壤石油污染物<sup>[19]</sup>,从而降低石油烃的生态毒性从而缓解重度污染对植物生长的抑制作用,进而有助于植物发挥其根际降解或吸收富集特性<sup>[16]</sup>,因此在重度污染时依然保持相对较高的土壤 TPH 去除率。

### 3.2 轻重两种油污浓度胁迫下土壤酶活性对外源施用玉米秸秆生物质炭的响应

土壤石油污染物的生物降解需要多种土壤酶的参与,而氧化还原酶是决定土壤 TPH 生物降解的关键功能酶系,其中土壤脱氢酶和多酚氧化酶则是直接参与土壤烷烃和芳烃生物降解的主要关键限速酶<sup>[3]</sup>。Cao 等<sup>[4]</sup>单独利用小麦秸秆生物质炭实施 1% 多环芳烃污染土壤修复试验时指出,土壤多酚氧化酶和脱氢酶活性分别显著下降 14.55% 和 5.15%;而 Zhen 等<sup>[16]</sup>研究结果显示,稻壳生物质炭+大米草联合处理组分别在 10%、30% 和 50% 油污浓度胁迫时与大米草单独修复组相比土壤脱氢酶活性分别显著增加了 21.57%、25.35% 和 11.48%,但随着油污浓度增加该酶活性总体上则逐步受到抑制。上述试验结果与本研究结果基本一致,说明单纯利用金盏菊或施用生物质炭对土壤脱氢酶和多酚氧化酶活性的促进作用相对有限,而金盏菊+玉米秸秆生物质炭处理方式对其酶活性的刺激作用相对较大。究其原因在于生物质炭主要通过吸附作用来降低土壤有机污染物浓度,进而间接刺激植物和微生物的活性实施生物降解<sup>[20]</sup>,因此在某种程度以一种保护作用的方式促进了植物根系和微生物生长、增加土壤肥力、稳定土壤结构,进而形成植物根系-生物质炭-微生物协同修复体系<sup>[21]</sup>,从而大幅增加土壤脱氢酶和多酚氧化酶活性来加速土壤 TPH 的生物降解<sup>[22]</sup>。此外,本研究所设置的轻重两种油污浓度生物质炭处理组(B<sub>5</sub>和 B<sub>20</sub>)土壤脱氢酶活性无显著差异,这与 Zhen 等<sup>[16]</sup>研究结论不尽相同,这可能是油污浓度高低有关,即在生物质炭处理方式在一定浓度范围内土壤脱氢酶活性受油污浓度的影响相对较少,而当油污浓度过高时该酶活性可能会受到抑制,而这一推测有待进一步验证。

### 3.3 轻重两种油污浓度胁迫下土壤微生物群落结构对外源施用玉米秸秆生物质炭的响应

石油污染物对土壤生态环境的影响首先表现为

改变土壤微生物群落结构组成<sup>[23]</sup>,而处理方式不同和油污浓度差异可驱动土壤微生物群落结构发生改变<sup>[24]</sup>。Sutton 等<sup>[25]</sup>研究指出油污土壤中优势菌门主要包括变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、酸杆菌门和绿弯菌门,而本研究 CK<sub>5</sub> 和 CK<sub>20</sub> 土壤微生物群落结构也印证了上述试验结论(图 3)。Li 等<sup>[26]</sup>分别采用鸡粪生物质炭、小麦秸秆生物质炭和木材生物质炭实施油污土壤生态修复研究时指出,上述 3 种生物质炭可有效增加绿弯菌门、酸杆菌门、硝化螺旋菌门和厚壁菌门相对丰度,而变形菌门、热微菌门(*Thermomicrobia*)和放线菌门相对丰度则显著降低。而 Zhen 等<sup>[16]</sup>研究表明油污土壤单独施用稻壳生物质炭后鞘氨醇单胞菌属、芽单胞菌属、假单胞菌属、*Ohtaekwangia* 属相对丰度显著增加,联合大米草后 *Aquihabitans* 属、*Solimonas* 属、*Arenimonas* 属、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)、小梨形菌属(*Pirellula*)、丰祐菌属(*Opitutus*)和硫杆状菌属(*Thiobacillus*)相对丰度亦得到了显著提升,说明土壤微生物群落结构对生物质炭和植物修复的响应方式不尽相同,究其原因在于植物根际分泌物的化感作用和生物质炭改善土壤理化特性的作用机理不尽相同<sup>[27]</sup>。本研究中供试油污土样细菌归属于 22 个门,而相对丰度 > 1% 的优势菌群共有 14 个门,其中 J<sub>5</sub>、JB<sub>20</sub> 和 JB<sub>5</sub> 处理组上述 14 个门的相对丰度均 > 1%,而 B<sub>5</sub> 和 B<sub>20</sub> 处理组 Saccharibacteria 门、硝化螺旋菌门、蓝细菌门和 Armatimonadetes 门相对丰度均 < 1%,表明硝化螺旋菌门和蓝细菌门相对丰度的降低可能与未种植金盏菊有关,这与 Zhen 等<sup>[16]</sup>和 Visioli 等<sup>[27]</sup>研究结论基本一致。而 J<sub>20</sub> 处理组的芽单胞菌门、Saccharibacteria 门和 Armatimonadetes 门相对丰度均 < 1% 则说明重度污染可能对金盏菊生长产生抑制作用进而影响了土壤微生物群落结构和组成。

在属分类水平上,所有供试土壤样品相对丰度 > 1% 的优势菌属共 28 个,且轻重两种油污浓度胁迫时不同处理方式包括 CK 组在内土壤微生物优势菌属相对丰度存在极显著差异,表明土壤微生物群落结构对油污浓度变化的响应方式存在明显差异。由图 4 可见,轻重两种油污浓度胁迫时生物质炭处理组(B<sub>5</sub>和 B<sub>20</sub>)土壤微生物群落结构相对稳定,表现为 28 个优势菌属中仅有 5 个属相对丰度发生了显著变化,而重度污染胁迫后金盏菊处理组(J<sub>20</sub>)与轻度污染组相比(J<sub>5</sub>),鞘氨醇单胞菌属、黄色单胞菌属、志津氏菌属 *Salinimicrobium* 属、亚硝化单胞菌属、假单胞菌属、诺卡氏菌属、盐拟杆菌属、短杆菌属、*Alkanindiges*

属、*Sulfuritalea* 属和假黄色单胞菌属均显著降低,说明重度污染对生物质炭处理方式土壤微生物群落结构的影响相对有限,但对植物根际效应的抑制作用尤为明显,这可能是 NMDS 排序结果中  $J_{20}$  处理组土壤微生物群落结构显著分异于其他处理组的主要原因(见图 5)。而金盏菊+生物质炭处理方式(JB)应对油污浓度由 5%增至 20%,22 个优势菌属中,仅赤杆菌属、食烷菌属、短杆菌属和 *Sulfuritalea* 属 4 个优势菌属相对丰度显著降低,但志津氏菌属、*Salinimicrobium* 属、迪茨氏菌属、不动杆菌属、*Bryobacter* 属、无色杆菌属、溶杆菌属和 *Alkanindiges* 属 8 个属相对丰度显著增加,加之上述优势菌属中包括了大量原油降解功能菌属<sup>[11-12,28-29]</sup>,体现了植物+生物质炭处理方式通过改变土壤微生物群落结构和数量,通过增加原油降解功能微生物种类和数量的方式来加速重度污染是土壤 TPH 的生物降解效率。

此外,本研究发现轻重两种油污浓度胁迫下生物质炭处理组( $B_5$  和  $B_{20}$ )土壤微生物群落结构组成差异相对较小,而金盏菊处理组( $J_5$  和  $J_{20}$ )土壤微生物群落结构却发生较大变化,且多数功能性微生物相对丰度均显著降低。结合 NMDS 拟合结果(见图 5)可见,土壤脱氢酶、Chao1 指数、多酚氧化酶和 Shannon 指数是决定  $J_5$ 、 $B_5$ 、 $B_{20}$ 、 $JB_5$  和  $JB_{20}$  处理组土壤微生物群落结构分异于其他处理组的主要环境因子,表明与生物质炭优化土壤结构和理化特性来改善土壤微生物群落结构的作用方式相比,重度污染时植物根际化感作用对土壤微生物群落的影响极其有限。

## 4 结论

(1) 轻重两种油污浓度胁迫时分别单独施用玉米秸秆生物质炭和种植金盏菊处理方式土壤 TPH 去除率、土壤脱氢酶和多酚氧化酶活性相对较低,而金盏菊+玉米秸秆生物质炭处理方式上述指标在轻重两种油污浓度胁迫时土壤 TPH 去除率分别高达  $61.95 \pm 1.39\%$  和  $56.44 \pm 1.89\%$ ;与重度污染时金盏菊和玉米秸秆生物质炭单独处理组相较而言,金盏菊+玉米秸秆生物质炭处理方式可显著增加重度污染土壤 TPH 去除率。

(2) 重度污染对单纯植物修复方式的抑制作用进而导致土壤微生物优势菌门的结构组成和数量亦受到显著影响。本研究所设置的金盏菊+生物质炭处理组和生物质炭单独处理组在轻重两种油污浓度胁迫下土壤微生物群落结构组成差异相对较小,但上述两种处理方式间土壤微生物群落结构存在显著差异,而金盏菊单独处理组土壤微生物群落结构则发生

较大变化,且多数功能性微生物相对丰度显著降低。

(3) 黄土高原陇东地区油污土壤实施场地生态修复时,轻度污染时金盏菊单独处理方式和金盏菊+玉米秸秆生物质炭联合处理方式均可有效增加土壤 TPH 去除率,但在重度污染时建议采用金盏菊+玉米秸秆生物质炭联合处理方式,即应对轻重两种油污浓度胁迫时玉米秸秆生物质炭均可作为土壤调理剂来提升修复效果。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] Barati M, Bakhtiari F, Mowla D, et al. Total petroleum hydrocarbon degradation in contaminated soil as affected by plants growth and biochar [J]. *Environmental Earth Sciences*, 2017,76(20):688-699.
- [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] 王金成,井明博,段春燕,等. 石油烃污染对陇东黄土高原土壤生物学及非生物学特性的影响[J]. *水土保持通报*, 2017,37(1):9-16.
- [4] Cao Yanan, Yang Baoshan, Song Ziheng, et al. Wheat straw biochar amendments on the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soil [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 130: 248-255.
- [5] Zeng Guangming, Wu Haipeng, Liang Jie, et al. Efficiency of biochar and compost (or composting) combined amendments for reducing Cd, Cu, Zn and Pb bioavailability, mobility and ecological risk in wetland soil [J]. *RSC Advances*, 2015,5(44):34541-34548.
- [6] González-Chávez M C A, Carrillo-González R, Hernández Godínez M I, et al. *Jatropha curcas* and assisted phytoremediation of a mine tailing with biochar and a mycorrhizal fungus [J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2017,19(2):174-182.
- [7] Zhang Manyun, Wang Jun, Bai S H, et al. Assisted phytoremediation of a co-contaminated soil with biochar amendment: Contaminant removals and bacterial community properties [J]. *Geoderma*, 2019,348:115-123.
- [8] Ni N, Wang Fang, Song Yang, et al. Mechanisms of biochar reducing the bioaccumulation of PAHs in rice from soil: Degradation stimulation vs immobilization [J]. *Chemosphere*, 2018,196:288-296.
- [9] Herrmann L, Lesueur D, Robin A, et al. Impact of biochar application dose on soil microbial communities associated with rubber trees in North East Thailand [J]. *Science of the Total Environment*, 2019,689:970-979.

- [10] 朱文英,唐景春. 小麦秸秆生物炭对石油烃污染土壤的修复作用[J]. 农业资源与环境学报, 2014, 31(3): 259-264.
- [11] Bao Yunjuan, Xu Zixiang, Li Yang, et al. High-throughput metagenomic analysis of petroleum-contaminated soil microbiome reveals the versatility in xenobiotic aromatics metabolism [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 56:25-35.
- [12] Jiao Shuo, Liu Zhenshan, Lin Yanbing, et al. Bacterial communities in oil contaminated soils: Biogeography and co-occurrence patterns [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 98:64-73.
- [13] Saum L, Jiménez M B, Crowley D. Influence of biochar and compost on phytoremediation of oil-contaminated soil [J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2018, 20(1):54-60.
- [14] Han Tao, Zhao Zhipeng, Bartlam M, et al. Combination of biochar amendment and phytoremediation for hydrocarbon removal in petroleum-contaminated soil [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(21):21219-21228.
- [15] Wang Yanjie, Li Fayun, Rong Xiangmin, et al. Remediation of petroleum-contaminated soil using bulrush straw powder, biochar and nutrients [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 98(5):690-697.
- [16] Zhen Meinan, Chen Hongkun, Liu Qinglong, et al. Combination of rhamnolipid and biochar in assisting phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil using *Spartina anglica* [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2019, 85:107-118.
- [17] Al-Baldawi I A, Abdullah S R S, Anuar N, et al. Phytodegradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in diesel-contaminated water using *Scirpus grossus* [J]. *Ecological Engineering*, 2015, 74:463-473.
- [18] Moubasher H A, Hegazy A K, Mohamed N H, et al. Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 98:113-120.
- [19] Chintala R, Mollinedo J, Schumacher T E, et al. Effect of biochar on chemical properties of acidic soil [J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2014, 60(3):393-404.
- [20] Ameloot N, Graber E R, Verheijen F G A, et al. Interactions between biochar stability and soil organisms: Review and research needs [J]. *European Journal of Soil Science*, 2013, 64(4):379-390.
- [21] 王忠强,刘婷婷,孟宪民,等. 泥炭保护紫花苜蓿根系对柴油污染土壤修复的研究[J]. 环境科学学报, 2007, 27(3):421-425.
- [22] Oliveira F R, Patel A K, Jaisi D P, et al. Environmental application of biochar: Current status and perspectives [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 246:110-122.
- [23] 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.
- [24] Lee D W, Lee H, Lee A H, et al. Microbial community composition and PAHs removal potential of indigenous bacteria in oil contaminated sediment of Taean Coast, Korea [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 234:503-512.
- [25] Sutton N B, Maphosa F, Morillo J A, et al. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(2):619-630.
- [26] Li Xiaojing, Li Yue, Zhang Xiaolin, et al. Long-term effect of biochar amendment on the biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil microbial fuel cells [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 651:796-806.
- [27] Visioli G, Sanangelantoni A M, Vamerali T, et al. 16S rDNA profiling to reveal the influence of seed-applied biostimulants on the rhizosphere of young maize plants [J]. *Molecules*, 2018, 23(6):1461.
- [28] Obafemi Y D, Taiwo O S, Omodara O J, et al. Biodegradation of crude petroleum by bacterial consortia from oil-contaminated soils in Ota, Ogun State, South-Western, Nigeria [J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2018, 12:230-242.
- [29] 王宝山,温成成,孙秦川,等. 石油烃类污染对青藏高原北麓河地区冻区土壤微生物多样性的影响[J]. 环境工程学报, 2018, 12(10):2917-2928.