

# 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

王金成<sup>1,2</sup>, 井明博<sup>1,2</sup>, 段春燕<sup>2</sup>, 王国锋<sup>3</sup>, 石国玺<sup>1,2,4</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. 陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062; 4. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008)

**摘要:** [目的] 探索石油污染与土壤生物学及非生物学特性间相互关系, 为陇东黄土高原地区石油污染土壤的综合治理提供基础数据和背景资料。[方法] 采用常规方法测定甘肃省庆阳市 5 县, 1 区, 8 个采油区油污土壤理化性质、酶活性和土壤微生物遗传多样性。[结果] 土壤总石油烃含量 (TPHs) 与碱解氮、速效磷、pH 值和脲酶呈负相关 ( $p < 0.01$ ), 与土壤多酚氧化酶、脱氢酶和过氧化氢酶呈正相关 ( $p < 0.01$ ); 样地土壤 TPHs 含量低的土壤微生物 Shannon-Wiener 指数明显高于 TPHs 含量高的样地; NMDS 排序结果显示, 石油污染对该地区土壤影响最大的因子为土壤碱解氮和速效磷, 其次为 TPHs, pH 值、脲酶、Shannon-Wiener 指数及过氧化氢酶。[结论] 陇东地区石油烃污染对土壤环境因子的影响主要表现在包括氮、磷等营养元素的有效循环、土壤脲酶活性和微生物群落多样性, 而对土壤微生物群落丰富度、均匀度和速效钾的影响未达到显著水平。

**关键词:** 陇东黄土高原; 石油烃污染; 土壤理化因子; 微生物群落

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-288X(2017)01-0009-08

**中图分类号:** X53, X172

**文献参数:** 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): 009-016. DOI: 10.13961/j.cnki.stbctb.2017.01.002; Wang Jincheng, Jing Mingbo, Duan Chunyan, et al. Impact of crude oil pollution on soil biological and abiological properties in Eastern Gansu Province [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2017, 37(1): 009-016. DOI: 10.13961/j.cnki.stbctb.2017.01.002

## Impact of Crude Oil Pollution on Soil Biological and Abiological Properties in Eastern Gansu Province

WANG Jincheng<sup>1,2</sup>, JING Mingbo<sup>1,2</sup>, DUAN Chunyan<sup>2</sup>, WANG Guofeng<sup>3</sup>, SHI Guoxi<sup>1,2,4</sup>, ZHOU Tianlin<sup>1,2</sup>

(1. Provincial Key University Laboratory for Protection and Utilization of Longdong Bioresources in Gansu Province, Qingyang, Gansu, 745000, China; 2. College of Life Science and Technology, Longdong University, Qingyang, Gansu, 745000, China; 3. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China; 4. Chinese Academy of Sciences, Northwest Institute of Plateau Biology, Xining, Qinghai 810008, China)

**Abstract:** [Objective] The objective of this study is to explain relationship between soil biology and abiological characteristics on crude-oil contaminated soil and provide basic data and background information for its comprehensive remediation in eastern Gansu Province. [Methods] The changes of soil physical and chemical properties as well as enzyme activities in crude oil-contaminated soil in Qingyang City of Gansu Province were investigated using the conventional methods, and the genetic diversity of microbial community was analyzed based on PCR-DGGE. [Results] The contents of soil available N, available P, pH value and activity of soil urease decreased with the increase of soil TPHs concentration respectively ( $p < 0.01$ ), while the activities of

收稿日期: 2016-06-21

修回日期: 2016-09-20

资助项目: 甘肃省科技支撑计划项目“陇东黄土高原地区石油污染土壤原位修复技术与示范”(1204FKCM173); 甘肃省教育厅科技计划项目“陇东黄土高原石油污染土壤微生物群落动态分析及石油降解菌的筛选”(2014B-091); 国家自然科学基金资助项目(31500427); 甘肃省庆阳市科技支撑计划项目(GC2011-16); 陇东学院青年科技创新项目(XYZK1603)

第一作者: 王金成(1985—), 男(汉族), 甘肃省两当县人, 硕士, 讲师, 主要从事环境微生物学及分子微生物生态学领域研究工作。E-mail: ldxywjc@163.com.

通讯作者: 周天林(1961—), 男(汉族), 甘肃省宁县人, 大学本科, 教授, 主要从事土壤生态学研究工作。E-mail: wensent20002.002@163.com.

soil polyphenoloxidase, dehydrogenase and catalase had a significant positive correlation with soil TPHs concentration respectively ( $p < 0.01$ ). As for the genetic diversity of soil microbial communities, Shannon-Wiener index in the studied sites with lower TPHs concentration was significantly higher than that of the sites with higher TPHs concentration ( $p < 0.05$ ). Moreover, nonmetric multidimensional scaling (NMDS) showed that petroleum-contaminated soil in Gansu Province were strongly affected by soil available N and available P, and following-affected by soil TPHs concentration, pH value, urease activity, Shannon-Wiener index of soil microbial communities and activity of soil catalase. [Conclusion] Impact of crude oil pollution on soil environmental factors in Eastern Gansu Province of Loess Plateau was mainly reflected by the nutrients effective circulation of nitrogen and phosphorus as well as soil microbial-communities diversity and soil urease activity, but there were no significant impact on available K, richness and evenness of soil microbial communities.

**Keywords:** Eastern Gansu Province of Loess Plateau; crude oil pollution; soil environmental factors; microbial community

自 20 世纪 70 年代长庆油田公司从陇东地区诞生并逐渐发展壮大,目前成为全国第一大油田,有“西部大庆”之称。陇东油区是长庆油田中心产油区,境内分布 14 个油田,63 个开发区,2 000 多口油井,正在建设成为国家级能源化工基地。然而在原油开采过程中已造成陇东地区石油污染土壤面积达  $1.02 \times 10^4 \text{ km}^2$ ,其北部地区土壤总石油烃(TPHs)含量高达  $55\ 137 \pm 3\ 076.84 \text{ mg/kg}$ <sup>[1]</sup>。

原油污染土壤生态修复已成为环保领域研究热点,而土壤理化环境因子所组成的非生物学特性和土壤微生物群落构成的生物学特性是制约石油生物降解速率和修复效果的关键因素,因而石油污染土壤环境因子会直接或间接影响生物修复技术的选择与修复效应的准确定位<sup>[2]</sup>。但目前陇东地区油污土壤相关研究多集中在修复效率、修复方式、降解效果和影响机制以及修复过程中的微生物群落变化等方面<sup>[3]</sup>,而在干旱少雨、昼夜及四季温差极大的陇东黄土高原地区土壤环境因子对石油污染如何响应则缺乏系统分析和研究,因而在该地区开展生物修复前对其土壤

理化性质及微生物生态进行前期分析显得尤为重要。

为此,本研究拟以陇东黄土高原地区甘肃省庆阳市 5 县 1 区 8 个采油区油污土壤为研究对象,分析上述区域土壤 TPHs、pH 值、碱解氮、速效钾、速效磷、土壤脲酶、脱氢酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶活性以及土壤微生物群落遗传多样性等 13 项环境因子,基于 Bray-Curtis 相异指数,将所测定的 13 项土壤环境因子拟合到 8 个石油污染样地的非度量多维尺度(NMDS)排序图上,旨在揭示石油污染与土壤生物学及非生物学特性间相互关系,对石油污染土壤的综合治理提供基础数据和背景资料,亦为陇东黄土高原特定区域下开展石油污染土壤生物修复打下基础。

## 1 研究区概况

于 2012 年 7—8 月采样,采样点分布在陇东黄土高原庆阳市 5 县 1 区,由南至北,从西向东共计 8 个乡镇的采油区。采样点土壤类型为黄绵土、黑炉土和沙土,地理坐标地处东经  $107^\circ 47' - 108^\circ 54'$ ,北纬  $35^\circ 65' - 36^\circ 63'$ ,海拔 1 098~1 581 m(表 1)。

表 1 研究区域土样采集地点概况

| 样地点  | 行政县(区) | 样地编号 | 土壤类型 | 土地利用方式     | 采样点地理信息   |
|------|--------|------|------|------------|---|
| 樊家川乡 | 环县     | FJXC | 沙土   | 采油 1 a     | $107^\circ 47' - 107^\circ 64' \text{ E}, 36^\circ 54' - 36^\circ 34' \text{ N}, 1\ 404 \text{ m}$ , 阴坡 |
| 曲字镇  |        | QZZ  | 沙土   | 采油 1 a     | $107^\circ 52' - 107^\circ 84' \text{ E}, 36^\circ 28' - 36^\circ 14' \text{ N}, 1\ 286 \text{ m}$ , 阴坡 |
| 元城镇  | 华池县    | YCZ  | 黄绵土  | 停止采油撂荒 3 a | $107^\circ 81' - 107^\circ 97' \text{ E}, 36^\circ 63' - 36^\circ 42' \text{ N}, 1\ 228 \text{ m}$ , 阴坡 |
| 城壕乡  |        | CHX  | 沙土   | 停止采油撂荒 4 a | $107^\circ 47' - 107^\circ 64' \text{ E}, 36^\circ 54' - 36^\circ 45' \text{ N}, 1\ 581 \text{ m}$ , 阴坡 |
| 固城乡  | 合水县    | GXC  | 黄绵土  | 停止采油撂荒 2 a | $107^\circ 47' - 108^\circ 07' \text{ E}, 36^\circ 54' - 36^\circ 32' \text{ N}, 1\ 147 \text{ m}$ , 阳坡 |
| 屯字镇  | 镇原县    | TZZ  | 黄绵土  | 停止采油撂荒 2 a | $108^\circ 21' - 108^\circ 54' \text{ E}, 35^\circ 83' - 35^\circ 68' \text{ N}, 1\ 456 \text{ m}$ , 阴坡 |
| 桐川乡  | 庆城县    | TCX  | 沙土   | 采油 2 a     | $107^\circ 53' - 107^\circ 83' \text{ E}, 36^\circ 01' - 35^\circ 94' \text{ N}, 1\ 228 \text{ m}$ , 阴坡 |
| 董志镇  | 庆阳市西峰区 | DZZ  | 沙土   | 采油 2 a     | $107^\circ 65' - 107^\circ 86' \text{ E}, 35^\circ 65' - 35^\circ 53' \text{ N}, 1\ 176 \text{ m}$ , 阳坡 |

上述区域属黄土高原沟壑地貌,是典型水土流失区之一,侵蚀面积  $25\ 050.5 \text{ km}^2$ ,占全区总面积的 92.4%,侵蚀模数  $6\ 383 \sim 9\ 000 \text{ t/hm}^2$ 。属暖温带半

干旱季风气候区,光、热等气候资源丰富,作物种植制度为旱地一年一熟。由于季风的强烈影响,冬季寒冷干燥,春季多风且干旱少雨,夏季温暖多雨,水热同

期,年降水量 400~600 mm,雨量分布不均,且主要集中在 7—9 月,多年平均蒸发量 1 000 mm 以上,地面蒸发量为 350~560 mm,地下水位深,土壤瘠薄,水土流失严重<sup>[3]</sup>。

## 2 研究方法

### 2.1 土壤样品采集

为保证研究区域内每个乡镇采样点代表性,每个样地设 3 个采样点,采样点均位于各县境内随机分布的采油机附近。利用取土钻,按对角线五点取样法,在每一样地中采集 5—25 cm 深度的土壤,将 5 个点采集的土壤混匀成 1 个土样,所采土样放在冷藏箱中,及时带回实验室根土分离,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<sup>[3]</sup>。

### 2.2 土壤酶活性、理化性质及土壤微生物群落遗传多样性测定

过氧化氢酶采用高锰酸钾滴定法,脲酶和多酚氧化酶采用 7230G 分光光度计比色法<sup>[4]</sup>;脱氢酶采用唐景春等的分析方法<sup>[5]</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/LNaHCO<sub>3</sub>浸提—钼锑抗比色法和火焰光度计法<sup>[6]</sup>;电位法(pHS-3 酸度计)测定土样 pH 值;采用超声—索氏萃取—重量法测定土壤中总石油烃含量<sup>[7]</sup>;采用变性凝胶梯度电泳(DGGE)技术分析微生物群落遗传多样性<sup>[3]</sup>。

### 2.3 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。

为了阐述石油污染样地与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 13 项土壤环境因子拟合到 8 个石油污染样地的非度量多维尺度(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。8 个石油污染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>。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同污染样地土壤理化性质变化情况

表 2 为不同污染样地土壤理化性质、土壤 TPHs 含量、速效钾、碱解氮、速效磷、pH 值和海拔在各样地间差异均达极显著水平( $F_{\text{TPHs}} = 112.398 > F_{0.01}$ ,  $F_{\text{速效钾}} = 24.956 > F_{0.01}$ ,  $F_{\text{碱解氮}} = 50.159 > F_{0.01}$ ,  $F_{\text{速效磷}} = 49.493 > F_{0.01}$ ,  $F_{\text{pH}} = 38.132 > F_{0.01}$ ,  $F_{\text{海拔}} = 54.02 > F_{0.01}$ ,  $p < 0.01$ )。

不同样地间土壤 TPHs 含量的高低所引起的理化环境因子的变化不尽相同( $p < 0.05$ ),进一步对不同污染土样的土壤 TPHs 含量与其他环境因子进行相关性分析显示,土壤 TPHs 含量与土壤 pH、碱解氮和速效磷含量均呈极显著负相关(表 2),而与速效钾和样地海拔间无显著相关,说明土壤 TPHs 的增加可能是制约陇东地区油污土壤氮、磷元素有效化的主要因素。

表 2 研究区不同污染样地土壤化学性质的变化

| 样地编号                | TPHs/<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 速效钾/<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 碱解氮/<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 速效磷/<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | pH 值                      | 海拔高度/m                        |
|---------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| FJCX                | 22 348.03 ± 315.76 <sup>a</sup>   | 26.42 ± 1.46 <sup>a</sup>        | 42.91 ± 1.27 <sup>a</sup>        | 43.37 ± 3.04 <sup>a</sup>        | 8.31 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 1 357.66 ± 23.46 <sup>a</sup> |
| DZZ                 | 18 633.51 ± 656.79 <sup>b</sup>   | 44.15 ± 1.12 <sup>b</sup>        | 61.52 ± 1.98 <sup>b</sup>        | 91.45 ± 2.96 <sup>c</sup>        | 8.33 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 1 253.31 ± 26.92 <sup>b</sup> |
| YCZ                 | 8 054.39 ± 146.85 <sup>c</sup>    | 36.27 ± 2.51 <sup>c</sup>        | 97.13 ± 4.15 <sup>c</sup>        | 97.86 ± 4.19 <sup>d</sup>        | 8.85 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 1 519.08 ± 30.89 <sup>c</sup> |
| CHX                 | 7 995.61 ± 425.15 <sup>cd</sup>   | 31.97 ± 1.14 <sup>c</sup>        | 101.27 ± 5.67 <sup>d</sup>       | 100.26 ± 2.94 <sup>d</sup>       | 9.05 ± 0.04 <sup>c</sup>  | 1 212.67 ± 31.79 <sup>b</sup> |
| GCX                 | 8 765.53 ± 172.92 <sup>c</sup>    | 37.04 ± 4.05 <sup>c</sup>        | 105.45 ± 4.85 <sup>d</sup>       | 102.57 ± 4.42 <sup>d</sup>       | 8.92 ± 0.06 <sup>bc</sup> | 1 116.67 ± 35.31 <sup>d</sup> |
| TZZ                 | 8 992.74 ± 386.57 <sup>c</sup>    | 35.84 ± 2.71 <sup>c</sup>        | 94.08 ± 2.64 <sup>c</sup>        | 92.48 ± 2.34 <sup>c</sup>        | 8.87 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 1 425.33 ± 20.28 <sup>c</sup> |
| TCX                 | 17 139.95 ± 383.16 <sup>b</sup>   | 50.85 ± 2.63 <sup>d</sup>        | 90.86 ± 3.98 <sup>c</sup>        | 91.94 ± 3.05 <sup>c</sup>        | 8.36 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 1 208.67 ± 30.69 <sup>b</sup> |
| QZZ                 | 17 999.05 ± 683.15 <sup>b</sup>   | 32.49 ± 3.49 <sup>c</sup>        | 57.44 ± 3.74 <sup>b</sup>        | 87.23 ± 3.19 <sup>b</sup>        | 8.38 ± 0.06 <sup>a</sup>  | 1 170.67 ± 31.16 <sup>d</sup> |
| 与 TPHs Pearson 相关系数 |                                   | 0.041                            | 0.238                            | -0.946                           | -0.905                    | -0.923                        |
| sig.                |                                   | $p > 0.05$                       | $p > 0.05$                       | $p < 0.01$                       | $p < 0.01$                | $p < 0.01$                    |

注:TPHs 为土壤总石油烃含量;数字为平均值 ± 标准误;每组同列的不同字母表示差异显著性;小写字母为 5%显著水平。下同。

### 3.2 不同污染样地土壤酶活性变化情况

表 3 为不同污染样地土壤酶活性变化情况。不

同样地间土壤脱氢酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶和脲酶差异极显著( $F_{\text{脱氢酶}} = 173.512 > F_{0.01}$ ,  $F_{\text{多酚氧化酶}} =$

89.104 >  $F_{0.01}$ ,  $F_{\text{过氧化氢酶}} = 111.041 > F_{0.01}$ ,  $F_{\text{脲酶}} = 50.023 > F_{0.01}$ ,  $p < 0.01$ )。与土壤 TPHs 含量相关性分析后发现,除与土壤脲酶呈负相关外,土壤 TPHs 与土壤多酚氧化酶、脱氢酶和过氧化氢酶均呈正相关关系(表 3),说明土壤 TPHs 可增加土壤中脱

氢酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶的活性,参与 TPHs 降解。而参与土壤养分有效化的脲酶活性与土壤 TPHs 呈负相关说明陇东地区石油污染土壤养分有效化水平低下,这一结果亦可解释土壤理化性质中解氮和速效磷含量低下的原因。

表 3 研究区不同污染样地土壤酶活性的变化

| 样地编号                | 脱氢酶/<br>[ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$ ] | 多酚氧化酶/<br>[ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (3 \text{ h})^{-1}$ ] | 过氧化氢酶/<br>( $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) | 脲酶/<br>[ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot (3 \text{ h})^{-1}$ ] |
|---------------------|---|--|---|---|
| FJCX                | 29.03 ± 0.19 <sup>a</sup>   | 283.82 ± 3.89 <sup>a</sup>   | 1.76 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 8.47 ± 0.11 <sup>a</sup>  |
| DZZ                 | 27.91 ± 1.12 <sup>b</sup>   | 242.02 ± 2.92 <sup>b</sup>   | 1.28 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 8.84 ± 0.56 <sup>a</sup>  |
| YCZ                 | 17.47 ± 2.31 <sup>c</sup>   | 189.32 ± 3.26 <sup>c</sup>   | 0.36 ± 0.03 <sup>cd</sup>   | 13.06 ± 0.43 <sup>c</sup>   |
| CHX                 | 11.84 ± 0.45 <sup>d</sup>   | 169.67 ± 2.92 <sup>d</sup>   | 0.31 ± 0.01 <sup>c</sup>  | 15.54 ± 0.27 <sup>d</sup>   |
| GCX                 | 20.69 ± 1.03 <sup>e</sup>   | 176.24 ± 4.18 <sup>d</sup>   | 0.57 ± 0.02 <sup>e</sup>  | 13.03 ± 0.05 <sup>c</sup>   |
| TZZ                 | 19.74 ± 0.43 <sup>f</sup>   | 191.06 ± 3.87 <sup>c</sup>   | 0.47 ± 0.02 <sup>de</sup>   | 12.69 ± 0.55 <sup>c</sup>   |
| TCX                 | 26.91 ± 0.33 <sup>b</sup>   | 247.29 ± 3.91 <sup>b</sup>   | 1.24 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 10.02 ± 0.53 <sup>b</sup>   |
| QZZ                 | 23.79 ± 0.23 <sup>e</sup>   | 244.45 ± 2.49 <sup>b</sup>   | 1.26 ± 0.05 <sup>b</sup>  | 9.33 ± 0.21 <sup>ab</sup>   |
| 与 TPHs Pearson 相关系数 | 0.878   | 0.948  | 0.961   | -0.901  |
| sig.                | $p < 0.01$  | $p < 0.01$   | $p < 0.01$  | $p < 0.01$  |

### 3.3 不同污染样地土壤微生物群落遗传多样性变化情况

本文采用变性凝胶梯度电泳(DGGE)技术分析微生物群落遗传多样性,利用 3 种多样性指标进行土壤微生物群落遗传多样性分析,即 Patrick 丰富度指数( $S$ ): $S$  = 物种数,即条带数;Shannon-Wiener 多样性指数( $H$ ): $H = -\sum P_i \ln P_i$ ,  $P_i$  代表土壤样品中第  $i$  个条带的吸光度占有所有条带吸光度总和的比例;Pielou 均匀度指数( $J$ ): $J = H / H_{\max}$ ,  $H_{\max}$  代表最大多样性值( $H_{\max} = \ln S$ )<sup>[3]</sup>。图 1 为不同样地油污土壤 PCR-DGGE 指纹图谱及其图谱聚类结果。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。

图 2 反映了不同样地油污土壤样品微生物群落遗传多样性指数变化情况。 $F$  检验结果显示,3 种多样性指数在各样地间差异均达极显著水平( $F_H = 25.018 > F_{0.01}$ ,  $F_J = 16.121 > F_{0.01}$ ,  $F_S = 16.121 > F_{0.01}$ ,  $p < 0.01$ ),上述结果体现了 TPHs 对土壤微生物群落结构的影响。多重比较(Duncan,  $\alpha = 0.05$ )结果显示,不同样地间土壤 TPHs 含量的高低所引起的土壤微生物群落遗传多样性的变化不尽相同( $p < 0.05$ )。

由图 2 可见,土壤 TPHs 含量介于 7 995.61 ~ 8 992.74 mg/kg 样地 Shannon-Wiener 指数( $H_{\text{YCZ}} = 2.79 \pm 0.01$ ,  $H_{\text{CHX}} = 2.77 \pm 0.02$ ,  $H_{\text{GCX}} = 2.88 \pm$

0.01,  $H_{\text{TZZ}} = 2.75 \pm 0.03$ ) 高于土壤 TPHs 含量介于 17 139.95 至 22 348.03 mg/kg 的样地( $H_{\text{FJCX}} = 2.62 \pm 0.01$ ,  $H_{\text{DZZ}} = 2.59 \pm 0.02$ ,  $H_{\text{TCX}} = 2.52 \pm 0.02$ ,  $H_{\text{QZZ}} = 2.55 \pm 0.01$ )( $p < 0.05$ )。Patrick 指数方面,除样地 DZZ 以外,其余样地均表现出与 Shannon-Wiener 指数相似的变化趋势,即 Shannon-Wiener 指数越高,物种条带数越多。此外,各样地间 Pielou 均匀度指数偏低,说明 TPHs 污染造成土壤微生物群落分布不均。

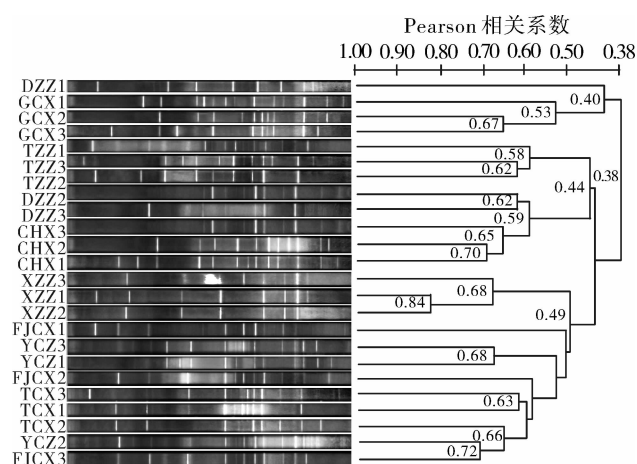


图 1 研究区不同样地油污土壤 PCR-DGGE 指纹图谱及其图谱聚类

### 3.4 不同污染样地与其环境因子的非度量多维尺度(NMDS)排序

为了阐述石油污染样地与土壤环境因子间关系,

以及环境因子在驱动不同样地分异过程中的相对重要性,基于 Bray-Curtis 相异指数,将所测定的 13 项土壤环境因子拟合到 8 个石油污染样地的非度量多维尺度(NMDS)排序图上,胁迫系数 Stress = 0.134 3,说明该二维 NMDS 分析具有一定的拟合效果,可解释样地环境因子信息量的 86.57%。

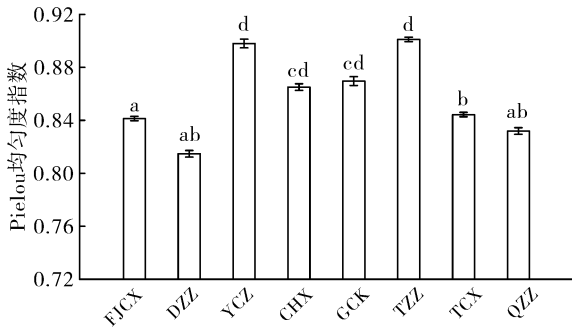
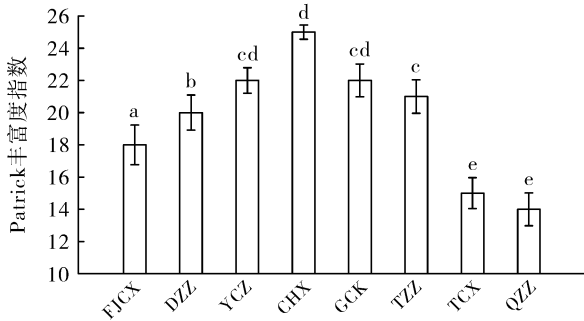
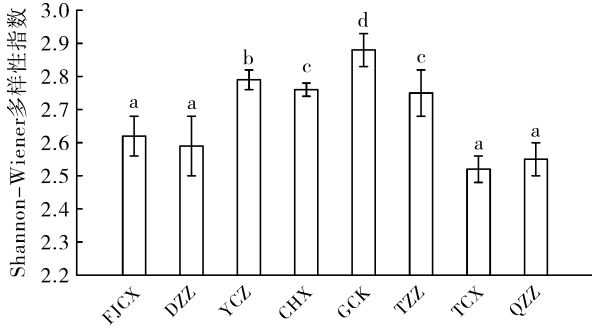
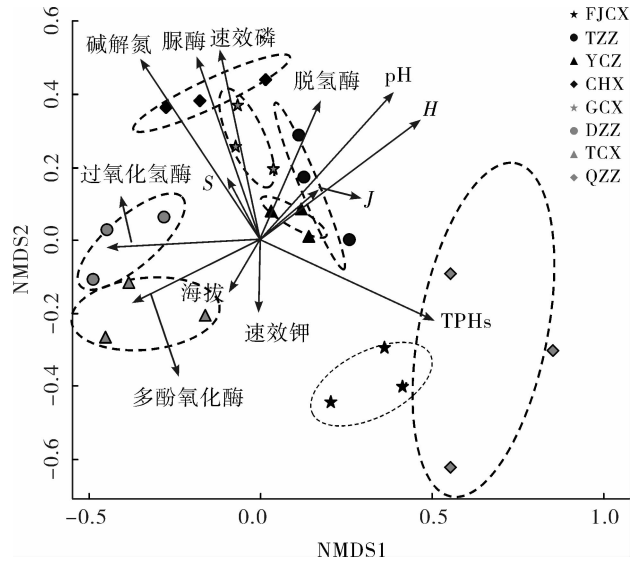


图 2 研究区不同样地油污土壤样品微生物群落遗传多样性指数变化

由图 3 及表 4 可见,基于 Bray-Curtis 相异性指数,本研究所调查的 8 个样地在 NMDS 排序图上较为分散,说明 8 个样地相似性较低,即样地间存在显著差异,表现为 8 个样地在 NMDS 排序图分异为 8 个点集,相对而言样地 YCZ,CHX,GCX 和 TZZ 之间相似性较高,位于庆阳市中部的样地 DZZ 和 TCX 与其他样地差异较大,而位于北部环县境内的样地 FJCX 和 QZZ 呈现较高的相似性(图 3,表 4)。13 个环境因子变量拟合至 NMDS 排序图的结果显示,其中有 9 个环境变量与样地 NMDS 排序结果显著相关。



注:排序图上显示了与各样地分异有关的土壤环境因子,椭圆代表平行样品间的标准差。

图 3 研究区不同污染样地的非度量多维尺度(NMDS)排序

表 4 研究区不同污染样地环境因子关系

| 环境因子                 | $r^2$   | $p$ 值 |     |
|----------------------|---------|-------|-----|
| TPHs                 | 0.544 8 | 0.002 | **  |
| 速效钾                  | 0.247 4 | 0.058 |     |
| 碱解氮                  | 0.651 5 | 0.001 | *** |
| 速效磷                  | 0.602 3 | 0.001 | *** |
| pH 值                 | 0.522 1 | 0.002 | **  |
| 脱氢酶                  | 0.314 8 | 0.029 | *   |
| 多酚氧化酶                | 0.340 7 | 0.026 | *   |
| 过氧化氢酶                | 0.402 5 | 0.003 | **  |
| 脲酶                   | 0.511 3 | 0.005 | **  |
| 海拔高度                 | 0.209 5 | 0.085 |     |
| Shannon-Wiener 多样性指数 | 0.415 4 | 0.002 | **  |
| 物种数                  | 0.208 3 | 0.064 |     |
| Pielou 均匀度指数         | 0.196 9 | 0.091 |     |

注: \* 代表与各样地分异相关的土壤环境因子显著水平; \*\*\* 表示  $p < 0.001$ , \*\* 表示  $p < 0.01$ , \* 表示  $p < 0.05$  时相关性显著。

由图 3 可见样地在 NMDS 排序图上的分异主要与土壤理化因子中的碱解氮含量( $r^2 = 0.651 5, p = 0.001$ ),速效磷( $r^2 = 0.602 3, p = 0.001$ ),土壤 TPHs 含量( $r^2 = 0.544 8, p = 0.002$ )及土壤 pH( $r^2 = 0.522 1, p = 0.002$ )显著相关,其中碱解氮和速效磷含量是导致样地分异的主要环境因子;土壤酶活性方面,与过氧化氢酶( $r^2 = 0.402 5, p = 0.003$ ),脲酶( $r^2 = 0.511 3, p = 0.005$ ),多酚氧化酶( $r^2 = 0.340 7, p = 0.003$ )以及脱氢酶( $r^2 = 0.314 8, p = 0.003$ )显著相关,其中过氧化氢酶和脲酶在样地分异过程中起主要作用;就土壤生物学特性而言,3 个土壤微生物

群落遗传多样性指数中只有 Shannon-Wiener 多样性指数( $H$ )与样地分异有关( $r^2=0.4154$ ,  $p=0.002$ )。上述结果说明,陇东黄土高原地区受石油污染影响最大的环境因子为土壤碱解氮和速效磷,其次为土壤 TPHs, pH 值、脲酶、微生物群落多样性和过氧化氢酶,而速效钾、海拔、微生物群落丰富度( $S$ )与均匀度( $J$ )所受影响较小。

## 4 讨论与结论

### 4.1 石油烃污染对陇东黄土高原土壤非生物学特性的影响

由土壤理化性质及酶活性所构成的非生物学环境因子是生物地球化学循环的主要参与者,可反映土壤环境状况<sup>[2]</sup>,是评价土壤质量及其污染程度的重要指示。本文对陇东黄土高原地区庆阳市境内 5 县 1 区石油污染土壤非生物学环境因子的分析结果显示不同浓度 TPHs 所引起的土壤理化及酶活性变化不尽相同。相关性分析结果显示土壤 TPHs 含量与土壤 pH 值、碱解氮和速效磷含量均呈极显著负相关(表 3),与土壤速效钾及样地海拔间无显著性相关。前人研究指出石油污染土壤的氮素匮乏为微生物提供了选择优势,进而引起石油污染土壤中碱解氮含量升高,而王传远等<sup>[2]</sup>研究认为石油污染可降低土壤 pH 值,但与碱解氮含量无显著相关。刘五星等<sup>[9]</sup>对南京某炼油厂的油污土壤进行理化性质分析后指出石油污染对土壤的速效氮、磷、钾含量无显著影响。上述结果与本研究结果不尽相同,说明土壤 TPHs 对陇东黄土高原地区土壤理化性质的影响具有明显的独特性和地域性。究其原因可能是由于长庆油田陇东产油区原油微量元素相对较低,而该地区土壤本身缺磷、少氮、多钾,因而石油烃污染土壤后导致外源碳源增加<sup>[10]</sup>,打破了陇东黄土高原土壤原有营养水平比例,进而改变土壤微生物群落结构,引起土著石油降解菌的大量生长,而这些土著石油降解菌在生长的同时大量消耗了土壤中原有的氮、磷等营养物质而造成土壤氮、磷含量严重不足;其次,本研究结果显示土壤 TPHs 与土壤脲酶活性呈负相关(表 3),而脲酶可加速土壤养分有效化<sup>[11]</sup>,因此土壤脲酶活性低下可能是陇东黄土高原地区碱解氮和速效磷含量低下的又一原因,而该地区油污土壤速效钾含量在不同样地间高低不一的原因有待进一步分析研究;第三,前人研究指出石油烃污染浓度也是影响土壤营养水平有效化的又一因素,张晓阳等<sup>[12]</sup>对陕北石油污染对土壤理化性质影响时发现,当土壤 TPHs 超过 5 000 mg/kg 时,土壤营养水平有效化显著降低,而

本研究 8 各样地土壤 TPHs 含量介于 7 795.61~22 348.03 mg/kg(表 1),加之该地区土壤本身营养元素水平特征,说明重度污染时土壤速效养分水平低下。

在土壤 TPHs 降解过程中氧化还原酶系占有重要地位,对土壤氧化还原酶的研究多集中在土壤脱氢酶、过氧化氢酶和多酚氧化酶。李慧等<sup>[13]</sup>通过对沈抚灌区含油污水灌溉对土壤酶活性的影响中发现,灌溉含石油烃的污水能增加上述 3 种酶活性,且随着污染程度的增加而增加。朱凡等<sup>[14]</sup>在利用植物修复 PAHs 污染土壤过程发现,土壤过氧化氢酶、多酚氧化酶活性随着修复时间增加呈先升后降的趋势。本研究结果发现,除与土壤脲酶呈负相关外,土壤 TPHs 与土壤多酚氧化酶、脱氢酶和过氧化氢酶均呈正相关关系(表 4),说明土壤 TPHs 可提高上述 3 种酶活性进而加速 TPHs 降解,这与众多学者研究结果较为一致,土壤 TPHs 对陇东黄土高原地区土壤酶活性的影响没有明显的地域性。本研究中,相对于正在采油作业的样地 FJ CX, DZZ, TCX 和 QZZ, 样地 YCZ, CHX, GCX 和 TZZ 均已停止采油废弃 2~4 a, 且样地 YCZ, CHX, GCX 和 TZZ 的 TPHs 含量明显低于在采油作业的样地,生态毒性相对较弱,使得 TPHs 的自然降解使得土壤微生物群落多样性和数量趋于稳定,而陇东黄土高原地区降雨量极低,加之 TPHs 在土壤迁移和扩散程度相对缓慢<sup>[15]</sup>,造成石油降解菌富集的局域微环境中土壤 TPHs 含量明显降低,因而样地 YCZ, CHX, GCX 和 TZZ 土壤脱氢酶活性相对偏低。过氧化氢酶活性可以反映土壤除去呼吸过程中产生的过氧化氢的能力,若过氧化氢持续积累且无法有效分解将会对土壤微生物产生不利影响。由表 4 可见,土壤 TPHs 含量的增加有助于当地适生土著石油降解菌生长繁殖,进而引起其群落结构和组成发生改变,加速了土壤 TPHs 降解,而在生物降解过程中过氧化氢的积累使得微生物及土壤生境扩大,解除了由于呼吸作用而产生的过氧化氢,进而使得过氧化氢酶活性得到提升<sup>[16]</sup>。因此,陇东黄土高原地区开展石油烃污染生态修复首先应外援添加相应的 N, P 营养元素加快对石油烃的分解,其次如何提高土壤脲酶活性,提升营养元素有效化程度是决定该地区修复效果的关键因素。

### 4.2 石油烃污染对陇东黄土高原土壤生物学特性的影响

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。通常认为石油污染导致土壤中微生物多样性降低,而刘五星等<sup>[9]</sup>对南京某炼油厂石油污染土壤微生物群落遗传多样性分析后指出,土壤 TPHs 与微生物群落多样性及均匀度指数多样性呈正相关关系;姜睿玲等<sup>[15]</sup>研究了土壤 PAHs 对桑园土壤微生物群落遗传多样性的影响,结果显示低浓度 PAHs 对土壤微生物多样性及丰富度指数具有刺激作用,而高浓度污染时可明显抑制土壤微生物多样性及丰富度指数。Li 等<sup>[17]</sup>研究指出水稻土中石油污染浓度与细菌多样性正相关。本研究中土壤 TPHs 含量介于 7 995.61~8 992.74 mg/kg 样地(YCZ, CHX, GCX 和 TZZ)土壤微生物群落 Shannon-Wiener 指数明显高于土壤 TPHs 含量介于 17 139.95~22 348.03 mg/kg 的样地(FJ CX, DZZ, TCX 和 QZZ)。Patrick 指数方面,除样地 DZZ 以外,其余样地均表现出与 Shannon-Wiener 指数相似的变化趋势,即 Shannon-Wiener 指数越高,物种条带数越多(图 1)。此外,各样地间 Pielou 均匀度指数偏低,说明 TPHs 污染造成了土壤微生物群落分布不均。上述试验结果与本研究结果不尽相同,究其原因除土壤质地和污染程度不同外,亦可能是土壤 TPHs 污染对土壤微生物群落结构产生了影响,且样地 YCZ, CHX, GCX 和 TZZ 均已废弃,因而 TPHs 在长期自然降解过程中生态毒性相对减弱,土壤微生物逐渐适应该种生态条件,驱使其群落多样性和数量趋于稳定,因而微生物群落种类和数量相对较高,表现为 Patrick 丰富度指数高于样地 FJ CX, DZZ, TCX 和 QZZ。其次,新开采油井中,土壤 TPHs 污染对土壤环境因子的改变强化了生态选择,进而改变了土壤微生物群落结构,引起多数微生物种类及数量上的下降和分布不均,但这种变化可能会随着石油烃自然降解过程的进行而逐渐缓解<sup>[18]</sup>;第三,陇东黄土高原地区生态脆弱,南低北高,气候干旱少雨,寒暑温差显著,土壤瘠薄造就了该地区土壤环境因子地域性变化,进而也造成了 TPHs 在土壤迁移和扩散程度不同,各样地间 Pielou 均匀度指数总体偏低。因此,陇东地区石油烃污染生物修复过程中应外援投加“适生”的土著石油降解菌群,强化土著降解菌在该地区油污土壤生态位亦为影响修复效果的关键因素。

#### 4.3 石油烃污染对陇东黄土高原土壤因子的影响

基于上述土壤环境因子测定结果,以 Bray-Curtis 相异性指数为基础构建陇东黄土高原地区石油污染样地间相似性矩阵,即土壤环境因子相似程度高,其样地排序距离就小,采用 NMDS 方法分析该地

区石油污染后土壤环境因子驱动样地分异的影响机制。结果表明(图 3),样地 YCZ, CHX, GCX 和 TZZ 之间相似性较高,位于庆阳市中部的样地 DZZ 和 TCX 与其他样地差异较大,而位于北部环县境内的样地 FJ CX 和 QZZ 呈现较高的相似性。不难看出样地 YCZ, CHX, GCX 和 TZZ 均为易废弃 2~4 a 油井,而这 4 各样地相似性高可能是由于废弃后土著降解菌自然降解后土壤环境因子趋同所致;而样地 DZZ 和 TCX 均位于庆阳市中部,且均为正在采油作业油井;环县境内的样地 FJ CX 和 QZZ 亦为采油作业 1 a 的新油井。根据 NMDS 排序结果看,虽然这 4 个样地均为正在采油作业的新油井但却划分为 2 个板块,说明造成这一结果的原因必然与土壤环境因子有关。为了阐述石油污染样地与土壤环境因子间关系,使用 R 语言“vegan”程序包中“envfit”程序,将所测定的 13 项土壤环境因子拟合到 8 个石油污染样地的非度量多维尺度(NMDS)排序图上(图 3),环境因子数据用 Euclidean 距离表示<sup>[8]</sup>。首先样地 YCZ, CHX, GCX 和 TZZ 之间相似性较高主要与土壤环境因子中的土壤碱解氮含量( $r^2=0.6515, p=0.001$ ),速效磷( $r^2=0.6023, p=0.001$ ),土壤脲酶活性( $r^2=0.5113, p=0.005$ ),脱氢酶活性( $r^2=0.3148, p=0.029$ ),土壤 pH 值( $r^2=0.5221, p=0.002$ )及土壤微生物群落 Shannon-Wiener 指数( $H$ )( $r^2=0.4154, p=0.002$ )有关,其中碱解氮和速效磷含量是造成上述样地相似性高的最主要环境因子。然而样地 YCZ, CHX, GCX 和 TZZ 之间相较之下,样地 CHX 和 GCX 间与样地 YCZ 和 TZZ 之间排序距离更小,究其原因,由图 3 可见,决定样地 CHX 和 GCX 相似性更高的原因与土壤碱解氮,速效磷和土壤脲酶活性有关,说明样地 CHX 和 GCX 的土壤脲酶提高了土壤营养元素的有效化水平,进而以较高的土壤碱解氮和速效磷含量使得样地 CHX 和 GCX 不同于其他样地。而样地 YCZ 和 TZZ 方面,决定这 2 个相似性更高的原因与土壤微生物群落 Shannon-Wiener 指数( $H$ ), pH 值和土壤脱氢酶活性有关,其中土壤 pH 值最为相关( $r^2=0.5221, p=0.002$ )。微生物总数与土壤脱氢酶活性成正相关关系,其活性高低可以反映微生物量对有机物的降解效果<sup>[16]</sup>。本研究结果与此一致,决定样地 YCZ 和 TZZ 不同于其他样地的环境因子主要包括土壤脱氢酶活性和微生物群落 Shannon-Wiener 指数( $H$ )以及 pH 值,说明在自然降解过程中这 2 个样地的土壤微生物群落遗传多样性较为相似,且与土壤脱氢酶活性呈正相关关系;而影响土壤微生物群落遗传多样性的环境因子中土壤

pH 值与之相关,前人研究指出认为石油污泥的 pH 值呈碱性,超过了微生物生长的最适范围,进而对土壤微生物的生长有很强的抑制作用。土壤 pH 值可能会通过影响降解过程中关键酶的酶活性来影响降解率,说明土壤 pH 值的改变有助于自然降解过程中土著石油降解菌的生长繁殖,样地 YCZ 和 TZZ 土壤 TPHs 自然降解进程优于其他样地。

就正在采油作业油井样地 FJ CX 和 QZZ 与 DZZ 和 TCX 而言,决定庆阳市中部的样地 DZZ 和 TCX 相似性更高的原因与土壤过氧化氢酶( $r^2 = 0.4025$ ,  $p = 0.003$ )与多酚氧化酶活性( $r^2 = 0.3407$ ,  $p = 0.026$ )有关,相较之下过氧化氢酶活性最为相关,而这两种酶均参与石油烃及其代谢中间产物在土壤中的降解过程,特别是多酚氧化酶能把土壤中芳香族化合物和酚类氧化成分子量不等的有机质和色素,完成土壤芳香族化合物的循环<sup>[19]</sup>。而该样地开采期均为 2 a,石油烃污染后强化了对该样地土壤微生物种群的选择,有助于石油降解菌群的生长繁殖,刺激石油降解菌产生多酚氧化酶。石油降解菌群的大量繁殖加强对该样地石油烃 TPHs 的生物降解,而降解过程中产生的过氧化氢产生使得土壤石油降解菌生境逐渐扩大,因此庆阳市中部的样地 DZZ 和 TCX 不同于其北部环县境内的样地 FJ CX 和 QZZ。图 3 中与环县境内的样地 FJ CX 和 QZZ 相似性较高有关的土壤环境因子只有土壤 TPHs ( $r^2 = 0.5448$ ,  $p = 0.002$ ),说明土壤石油烃含量是决定该样地不同于其他样地的环境因子。纵观上述结果,影响陇东黄土高原地区石油污染土壤的环境因子中,虽然土壤微生物群落丰富度(S) ( $r^2 = 0.2083$ ,  $p = 0.064$ )、均匀度(J) ( $r^2 = 0.1969$ ,  $p = 0.091$ )、速效钾含量( $r^2 = 0.2474$ ,  $p = 0.058$ )和海拔( $r^2 = 0.2095$ ,  $p = 0.085$ )并未达到显著水平,但庆阳市南低北高的地理特点和降雨量不均及昼夜温差大等因素在本次研究中并未涉及,而上述环境因子可能是解释环县境内样地 FJ CX 和 QZZ 不同于庆阳市中部的样地 DZZ 和 TCX 的原因,而这些环境因素对陇东地区石油污染土壤的影响有待后续分析研究。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 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.
- [2] 王传远,杨翠云,孙志高,等. 黄河三角洲生态区土壤石油污染及其与理化性质的关系[J]. 水土保持学报,2010,24(2):214-217.
- [3] 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.
- [4] 严昶升. 土壤肥力研究方法[M]. 北京:农业出版社,1988:263-280.
- [5] 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.
- [6] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1999:245-353.
- [7] 王如刚,王敏,牛晓伟,等. 超声—索氏萃取—重量法测定土壤中总石油烃含量[J]. 分析化学,2010,38(3):417-420.
- [8] Shi Guoxi, Liu Yongjun, Johnson N C, 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] 刘五星,骆永明,滕应,等. 石油污染土壤的生态风险评估和生物修复(II):石油污染土壤的理化性质和微生物生态变化研究[J]. 土壤学报,2007,44(5):848-853.
- [10] 王金成,井明博,肖朝霞,等. 陇东黄土高原地区石油污染土壤微生物群落及其与环境因子的关系[J]. 水土保持通报,2012,32(5):145-151.
- [11] Antonio D A, Francesca B, Massimo G, et al., Bioremediation of petroleum hydrocarbons in anoxic marine sediments; Consequences on the speciation of heavy metals [J]. Marine Pollution Bulletin, 2009,58(12):1808-1814.
- [12] 张晓阳,李凯荣,张麟君. 陕北石油污染对土壤理化性质的影响[J]. 水土保持研究,2013,20(3):32-38.
- [13] 李慧,陈冠雄,杨涛,等. 沈抚灌区含油污水灌溉对稻田土壤微生物种群及土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2005,16(7):1355-1359.
- [14] 朱凡,洪湘琦,闫文德,等. PAHs 污染土壤植物修复对酶活性的影响[J]. 生态学报,2014,34(3):581-588.
- [15] 姜睿玲,杨统一,唐玉斌,等. 多环芳烃污染对桑园土壤微生物结构及种群多样性的影响[J]. 中国环境科学,2012,32(9):1655-1661.
- [16] Gnseppe T, Maria L C. Guido G. Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives [J]. Enzyme and Microbial technology, 2003,33(1):47-54.
- [17] Li Hui, Zhang Chenggang, Cheng Guanxiong, et al., Effect of petroleum-containing wastewater irrigation on bacterial diversities and enzymatic activities in a paddy soil irrigation area [J]. Journal of Environmental Quality, 2005,34(3):1073-1080.
- [18] 杨茜,吴蔓莉,曹碧霄,等. 石油降解菌的筛选、降解特性及其与基因的相关性研究[J]. 安全与环境学报,2014,14(1):187-192.
- [19] Gnseppe T, Maria L C. Guido G. Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives[J]. Enzyme and Microbial technology, 2003,33(1):47-54.