

DOI: 10.5846/stxb201902120252

张晓曦, 张玲玲, 雷航宇, 王思好, 董玉, 米皓皓, 刘增文. 草本凋落物与尿素联合修复对油污土壤生物化学性质的影响. 生态学报, 2020, 40(8):

Zhang X X, Zhang L L, Lei H Y, Wang S Y, Dong Y, Mi H H, Liu Z W. Effects of combined remediation using grass litters and urea on the biochemical properties of petroleum-contaminated soil. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(8):

草本凋落物与尿素联合修复对油污土壤生物化学性质的影响

张晓曦^{1,2}, 张玲玲¹, 雷航宇¹, 王思好¹, 董玉¹, 米皓皓¹, 刘增文^{3,*}

1 延安大学生命科学学院 陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 延安 716100

2 西北农林科技大学水土保持研究所, 杨凌 712100

3 西北农林科技大学资源环境学院, 杨凌 712100

摘要:为研究植物残体配合施氮对石油污染土壤生物学和化学性质的综合修复能力,以紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、铁杆蒿(*Artemisia gmelinii*)和小冠花(*Coronilla varia*)3种广泛分布于陕北石油污染区的草本植物凋落物为对象,分别在配合施氮调节土壤 C:N 为 25:1 和不配合施氮的条件下,将其与 45.37 g/kg 的重度石油污染土壤混合,在 20—25℃、恒湿条件下进行为期 180 d 的室内修复试验,检测上述处理对油污土壤微生物数量、11 种土壤水解酶和氧化还原酶活性以及速效 N、P 和 K 含量的影响。结果表明:(1)3 种凋落物处理均可显著提高污染土壤中放线菌和真菌数量,蔗糖酶、淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、脲酶、蛋白酶、磷酸酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶活性以及速效养分含量,并显著降低土壤总石油烃含量。(2)配合施氮总体上显著强化了凋落物对污染土壤生化性质的修复作用,但对凋落物处理下木聚糖酶、脲酶、蛋白酶和脱氢酶活性和微生物数量的恢复可能产生不利影响。(3)单纯使用凋落物作为调理剂可以更为全面的修复油污土壤受损生化性质,具有高 N 和 P 含量、较低 C/N、C/P 比以及较低多酚和木质素含量的凋落物修复效果更好。在急需迅速修复土壤的条件下,配合适量施氮可作为强化凋落物修复效果的可选途径,但应注意其导致的部分土壤生化指标修复效果的降低。

关键词:原油污染;生物刺激;土壤功能;植物残体;修复

Effects of combined remediation using grass litters and urea on the biochemical properties of petroleum-contaminated soil

ZHANG Xiaoxi^{1,2}, ZHANG Lingling¹, LEI Hangyu¹, WANG Siyu¹, DONG Yu¹, MI Haohao¹, LIU Zengwen^{3,*}

1 Shaanxi Engineering and Technological Research Center for Conservation and Utilization of Regional Biological Resources, College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, China

2 Institute of Soil and Water Conservation, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

3 College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: Litters of 3 types of grasses including *Medicago sativa*, *Artemisia gmelinii*, and *Coronilla varia* were mixed with 45.37 g/kg petroleum-contaminated soil with or without urea fertilization (the C:N of soil was adjusted to approximately 25:1) in the study. We aim to investigate the effects of plant litters and nitrogen fertilization combination on remediation of petroleum-contaminated soils. The mixtures were incubated at 20—25℃ with consistent soil moisture for 180 days. The microbial populations, the activities of 11 types of hydrolases and oxidoreductases, and contents of available N, P and K in

基金项目:国家自然科学基金项目(31800370);陕西省高校科协青年人才托举计划项目(20170704);陕西省自然科学基金项目(2018JQ4047);延安大学博士科研启动项目(YDBK2017-26);国家/延安大学大学生创新创业训练计划项目(201910719027; D2017076)

收稿日期:2019-02-12; 网络出版日期:2019-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zengwenliu2003@aliyun.com

soils were determined to analyze the individual or the combined effects of plant litter and urea on the bio-chemical properties of petroleum-contaminated soils. The results indicated that (1) all types of grass litters tested here significantly increased the populations of actinomycetes and fungi, the activities of sucrase, amylase, carboxymethyl cellulase, xylanase, urease, protease, alkaline phosphatase, polyphenol oxidase, catalase and peroxidase, and the contents of available N, P and K in petroleum-contaminated soils, while they significantly accelerated the degradation of total petroleum hydrocarbons. (2) Generally, urea application facilitated the remediation of grass litters on petroleum-contaminated soils. However, it might impair the positive effects of litter treatments on the activities of xylanase, urease, protease and dehydrogenase, and the microbial populations in petroleum-contaminated soils. (3) Sole litter treatment could remarkably improve the biochemical properties of petroleum-contaminated soils, especially with high N and P contents, lower C/N, C/P ratios, low lignin and polyphenols contents litters. In the case that the remediation was exigent, appropriate urea fertilization could be a feasible approach to accelerate the remediation effects of grass litters on petroleum-contaminated soils, whereas taking its negative effects on above-mentioned biochemical soil properties in account.

Key Words: crude oil contamination; biostimulation; soil functions; plant residues; remediation

石油是全球最为重要的矿产资源之一,可为人类提供能源、材料、化工产品等,在推动工业和农业发展以及经济增长方面起到了不可替代的作用。然而,随石油需求量的不断增加,供需矛盾迫使更多陆地储量被动用,而在上述开发过程中因不当操作或事故产生的原油泄漏则对石油产区产生了日趋严重的环境危害^[1-3]。石油污染物进入土壤后往往将堵塞土壤孔隙、恶化土壤水分特征,诱发土壤养分失衡,并因其选择性胁迫导致微生物多样性和多种酶活性降低^[4-7]。上述影响将显著破坏土壤的生态功能,导致其为生物提供生长环境和生产介质、调节养分循环和物质转化的能力降低,最终引发污染区生态退化和其他环境问题。

自然状况下,土壤中石油污染物可在微生物的作用下自行缓慢降解,其主要的限制在于养分供应、电子受体/供体和污染物生物可利用性较低。因此采用生物刺激方式,针对性的添加适当的刺激物促进土著微生物的繁殖和对污染物的利用,可能是一种成本更低、高效且环境友好的修复途径^[3, 8],并可调动土壤本身具备的储存和消除污染物的能力,促进其整体生态功能的恢复^[9]。目前已有众多关于利用生物刺激进行石油污染修复的研究,包括添加植物残体^[10-11]、堆肥^[12-13]、禽畜粪便^[14]和化学肥料^[3, 15]等。其中,植物残体是受到广泛关注的一类刺激物和土壤调理剂。研究表明,添加植物残体(如小麦秸秆、麦麸和玉米棒等)可以显著增加油污土壤孔隙度,刺激好气石油降解微生物的生长并提高其活性,从而促进污染物的降解^[16]。多种粮食作物(如玉米、小麦和木薯)、经济作物(如核桃、甘蔗、大豆、油棕榈、棉花、可可和大蕉)以及绿化植物(如各种行道树和园林树种)的残体也可补充速效氮磷,提高磷酸酶和脲酶活性,从而减轻养分限制,促进降解微生物生长^[12, 13, 16-22]。同时,添加上述残体可诱导微生物氧化还原酶的分泌,从而加速石油烃、特别是毒性较大的芳香烃的去除^[11, 16-17, 21]。然而,鉴于石油烃的降解和植物残体自身分解均需要适量的养分供应,单纯添加植物残体修复油污土壤难以迅速刺激土著微生物生长,其有限的养分含量则可能导致其刺激作用随养分消耗削弱,难以维持至绝大部分石油污染物降解和土壤功能恢复。因此,在使用植物残体促进石油污染土壤修复时,有必要配合额外的养分输入^[23-24],以在最大程度上发挥植物残体的生物刺激作用,强化其修复效果。目前,植物残体与化学肥料联合修复石油污染土壤的研究尚少报道,且多数集中于测定修复后石油污染物的降解率以及上述处理对石油降解微生物和少数相关酶的影响,而较少考虑到与土壤功能密切相关的其他土壤生物学指标的整体恢复。考虑到油污土壤修复的最终目的是恢复土壤受损生态功能^[9, 25],而单纯的石油烃降解指标难以反映土壤功能的恢复情况,因此有必要对植物残体-化肥联合处理后土壤酶、微生物数量和结构以及土壤养分供给能力的恢复程度进行全面研究,以评价联合修复的效果。

陕北地区是我国重要的石油基地之一。较之其他石油产区,陕北地区油气资源分布相对分散,单井产量较低,导致产生了大量钻井,加之由于历史上的粗放管理,产生了大面积的严重石油污染,急需对污染土壤进

行修复以保护和恢复受损生态环境。因此,本文以当地广泛分布的紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、铁杆蒿(*Artemisia gmelinii*)和小冠花(*Coronilla varia*)3种草本植物为对象(其凋落物已被前期研究证明可显著降低土壤石油烃含量),研究上述植物凋落物或凋落物-尿素联合使用对严重石油污染土壤的生物学(11种酶和微生物数量)和化学性质(速效养分含量)的全面恢复能力,以期为合理利用当地生物资源,选择适宜的凋落物或凋落物-施氮联合形式加速当地污染土壤的生态功能恢复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试样品采集及处理

试验用凋落物和土壤样品均采集自延安市余家坪油田。具体方法是在油田附近未污染区采集紫花苜蓿、铁杆蒿和小冠花的凋落物(紫花苜蓿和小冠花采集立枯体,铁杆蒿采集其自然凋落的叶片和小枝)在60℃下烘干至恒备用,其初始基质质量参照前期已发表数据(表1)。同时,采集未污染土壤用于分析石油污染对土壤生物化学性质的影响,该土壤为黄绵土,有机质含量8.97 g/kg,pH为8.6,其余初始生化性质见图1—3。同时,在不同油井附近选择严重污染区域,收集0—20 cm表层污染土壤,统一过5 mm筛剔除杂物后混合均匀(经实验室实测其污染物浓度为45.37 g/kg石油/干土),测定其生化性质指标用于初始污染对照,同时测定其含水率和田间饱和持水量后适当风干,用于后续调控实验过程中的土壤湿度。试验用尿素(分析纯)购自西陇科学股份有限公司。

表1 凋落物初始质量^[26]

Table 1 Initial litter quality

凋落物 Litter	N 含量 N contents c/(g/kg)	P 含量 P contents c/(g/kg)	多酚含量 Polyphenols contents c/(g/kg)	木质素含量 Lignin contents c/(g/kg)	碳氮比 C/N ratio	碳磷比 C/P ratio
紫花苜蓿 <i>M. sativa</i>	40.25(0.71) a	3.43(0.10) a	10.24(0.05) b	235.13(5.43) a	12.20(0.87) b	143.18(8.79) a
铁杆蒿 <i>A. gmelinii</i>	26.25(0.15) b	3.16(0.13) a	22.26(2.48) a	49.90(0.75) c	16.80(0.03) a	140.01(4.75) a
小冠花 <i>C. varia</i>	39.40(0.36) a	3.20(0.22) a	9.89(0.42) b	102.97(2.09) b	11.52(0.67) b	142.14(3.11) a

数据采用平均值(标准误)表示,同列不同字母表示差异显著, $P<0.05$

1.2 油污土壤修复试验及指标测定

称量4.0 kg的污染土壤18份平铺至于规格为20 cm×30 cm×7 cm搪瓷盘内,按照凋落物/土壤2%的比例分别添加紫花苜蓿、铁杆蒿和小冠花凋落物,混合均匀后形成微缩系统,每种凋落物处理6盘。处理完成后,每种凋落物处理中的3盘使用喷雾器均匀喷施灭菌蒸馏水,调节土壤湿度至预先测定的田间饱和持水量的50%,其余3盘喷施含有尿素的灭菌蒸馏水,调节土壤湿度至于前述相同,土壤碳氮比约为25:1。上述处理后,在搪瓷盘口覆盖扎有30个2 mm通气孔的保鲜膜以控制水分的剧烈蒸发,并保证系统内外气体交换通畅。采用上述方法,将微缩系统在20—25℃条件下培养180 d。在此期间,定期通过称量微缩系统质量根据质量损失补水,以维持土壤湿度基本恒定。试验结束后,将土壤过筛除去未分解的凋落物,根据关松荫^[27]、南京土壤研究所^[28]和鲍士旦^[29]的方法处理土样,并用于土壤生化指标测定。其中:蛋白酶采用茚三酮比色法;脲酶采用靛酚比色法;碱性磷酸酶采用磷酸苯二钠比色法;蔗糖酶、淀粉酶和羧甲基纤维素酶采用3,5-二硝基水杨酸比色法;木聚糖酶采用碘量滴定法;过氧化氢酶活性采用滴定法;过氧化物酶和多酚氧化酶采用焦性没食子酸比色法;脱氢酶采用三苯基四唑氯化物比色法测定^[27]。微生物数量测定采用稀释平板涂布法测定。其中细菌使用牛肉膏-蛋白胨培养基,放线菌使用高氏一号培养基(含1%重铬酸钾抑制细菌生长),真菌使用马铃薯葡萄糖琼脂培养基^[28]。碱解N、有效P和速效K分别采用碱解扩散法、磷钼蓝比色法和火焰光度法测定^[29]。处理后土壤总石油烃含量采用重量法测定^[22],并据此计算降解率。考虑到实验进行短期内石油烃的降解率较低,生化性质恢复有限(本试验前期研究中仅可达到5—6%^[22]),本研究仅测定了处理180 d后的生

物理学和化学指标,不再另行考虑自然降解 180 d 的情况。

1.3 数据处理

使用 SPSS 21.0 软件对数据进行单因素方差分析,多重比较采用 Tukey's Test,显著性检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。使用 SPSS 21.0 对所有处理下土壤指标较污染对照的提高率和石油烃降解率提高倍数做主成分分析,以获得的综合主成分值 F 作为修复能力排序的参考标准。其数值越大,表明对应处理的综合修复效果越强。使用 SIMCA-P 14.0 软件对各处理特征(凋落物基质质量指标以及是否配合施氮)与修复后土壤生化指标的提高率做偏最小二成回归分析,根据各种凋落物性质和施氮指标对每种土壤生化指标的变量投影重要值判定影响特定土壤指标的主要因素。一般要求选取的因素的 VIP 值大于 1,鉴于本研究影响因素中含有两类,因此选取 VIP 值明显高于其他的因素作为主要因素。绘图采用 SigmaPlot 12.5 软件完成。

2 结果与分析

2.1 各处理对土壤生物学和化学性质以及石油烃降解的影响

研究结果表明,重度石油污染将显著降低土壤可培养细菌(含放线菌)和真菌数量($P < 0.05$,图 1)。凋落物单独处理 6 个月使油污土壤细菌再次显著降低,但均显著提高放线菌和真菌数量,甚至使放线菌数量较未污染土壤显著提高($P < 0.05$)。其中,紫花苜蓿凋落物对放线菌生长的促进效果最显著,而小冠花凋落物对真菌生长的促进效果最显著。绝大多数情况下,配合施氮对凋落物处理的效果无显著影响,其仅显著削弱了紫花苜蓿凋落物对放线菌生长的刺激作用($P < 0.05$)。

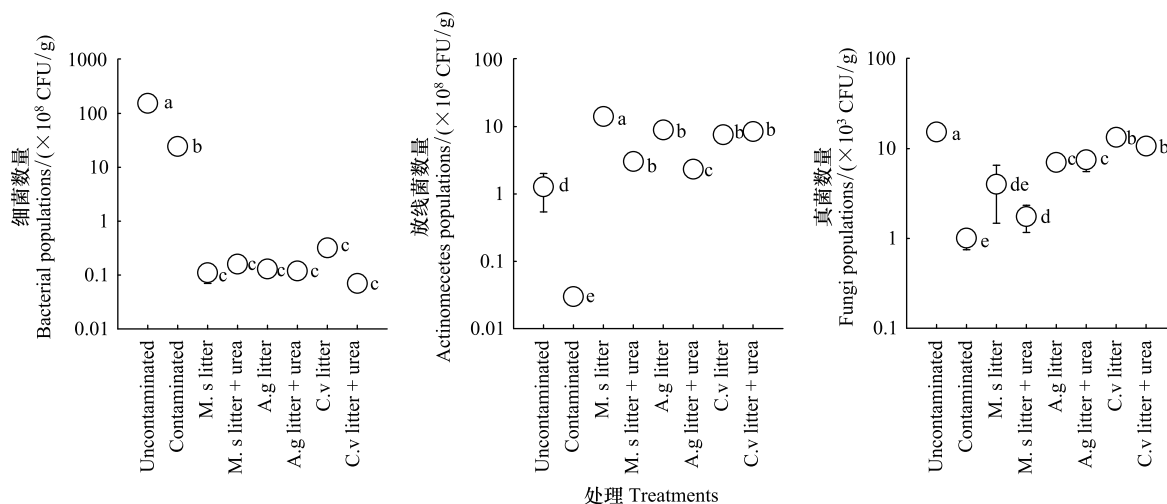


图 1 草本凋落物与尿素处理后土壤可培养微生物数量

Fig.1 Soil culturable microbial populations in petroleum-contaminated soils treated with grass litters with or without urea application

数据采用平均值/标准误(误差线)表示,同列不同字母表示差异显著, $P < 0.05$; $p < 0.05$. Uncontaminated: 未污染; Contaminated: 污染土壤; M. s litter: 苜蓿凋落物; M. s litter+urea: 苜蓿凋落物+尿素; A. g litter: 铁杆蒿凋落物; A. g litter+urea: 铁杆蒿凋落物+尿素; C. v litter: 小冠花凋落物; C. v litter+urea: 小冠花凋落物+尿素

研究结果表明,重度石油污染将显著抑制除碱性磷酸酶、过氧化氢酶和脱氢酶外的 8 种酶的活性(图 2)。凋落物单独处理 6 个月后,除对脱氢酶活性均产生抑制外,对蔗糖酶、淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、脲酶、蛋白酶、磷酸酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶活性均有显著刺激作用($P < 0.05$),3 种凋落物中,铁杆蒿凋落物对受抑土壤酶活性的刺激效果,特别是对淀粉酶、磷酸酶和多酚氧化酶活性的提高效果相对较差。一些情况下,配合施氮可显著增强凋落物对蔗糖酶、纤维素酶、磷酸酶、多酚氧化酶和过氧化物酶活性的恢复,但对木聚糖酶、脲酶、蛋白酶和脱氢酶等酶则产生显著抑制($P < 0.05$)。

重度石油污染将显著降低土壤速效 N、P 和 K 含量(图 3)。凋落物单独处理 6 个月后,土壤速效养分含

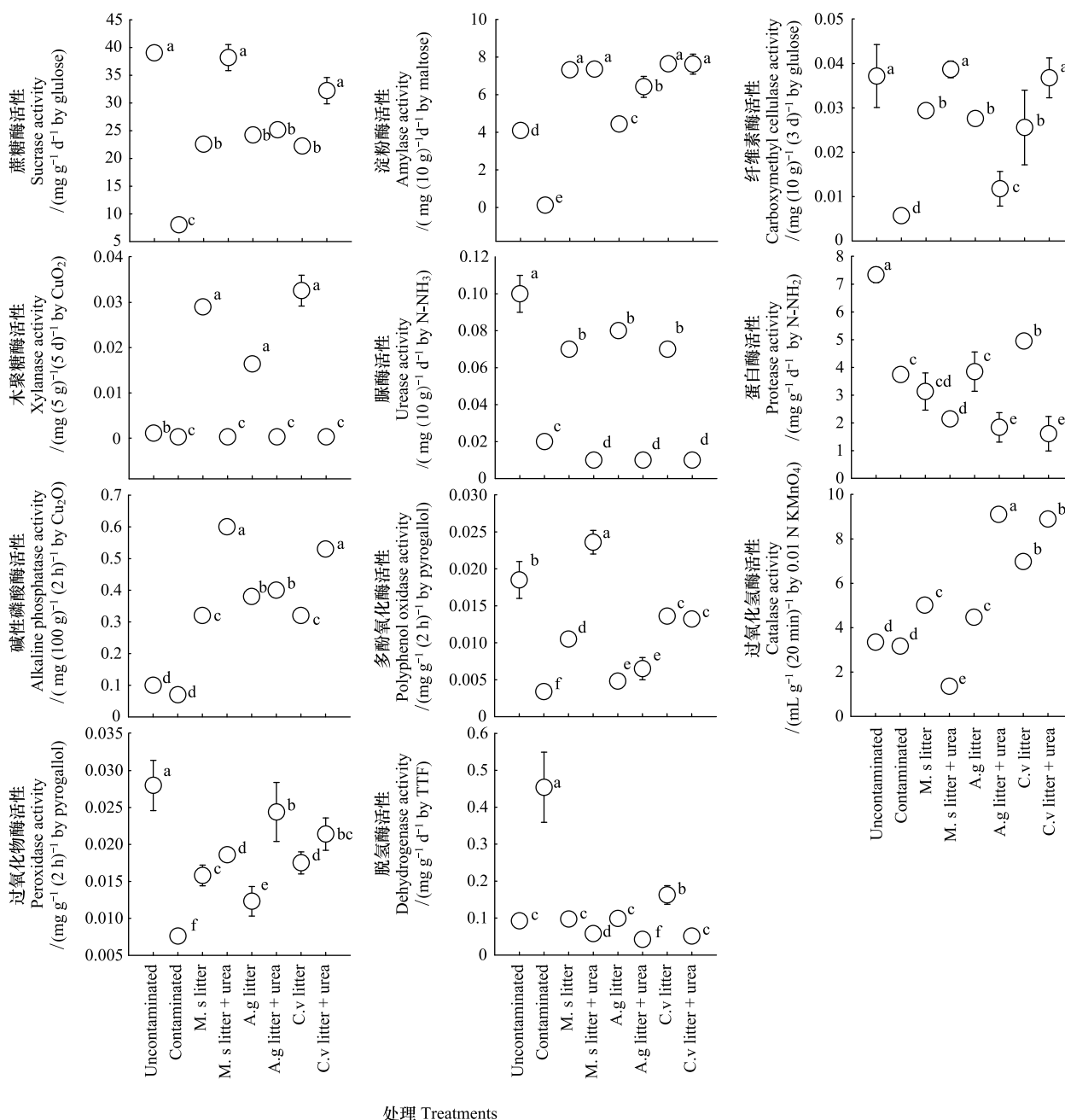


图2 草本凋落物与尿素处理后土壤酶活性

Fig.2 Enzymes activities of petroleum-contaminated soils treated with grass litters with or without urea application

数据采用平均值/标准误(误差线)表示,同列不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。Data were presented as mean (SE), different letters after the data in the same column indicate significant differences, $P < 0.05$. SUC: 蔗糖酶 Sucrase; AMY: 淀粉酶 Amylase; CMC: 羧甲基纤维素酶 Carboxymethyl cellulase; XYL: 木聚糖酶 Xylanase; URE: 脲酶 Urease; PRO: 蛋白酶 Protease; AP: 碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase; PPO: 多酚氧化酶 Polyphenol oxidase; CAT: 过氧化氢酶 Catalase; POD: 过氧化物酶 Peroxidase; DEH: 脱氢酶 Dehydrogenase

量均有显著提高($P < 0.05$),其中两种豆科植物凋落物的修复效果相似,而铁杆蒿凋落物对土壤碱解 N 和速效 K 的恢复效果显著低于豆科凋落物($P < 0.05$)。配合施氮均可显著增强凋落物对土壤速效养分的修复能力($P < 0.05$)。

经 180 d 处理后,较之自然降解,3 种凋落物处理均大幅降低了污染土壤的总石油烃含量,其中铁杆蒿凋落物处理降解石油烃的能力显著($p < 0.05$)强于紫花苜蓿和小冠花凋落物(表 2)。配合施氮可增强凋落物对

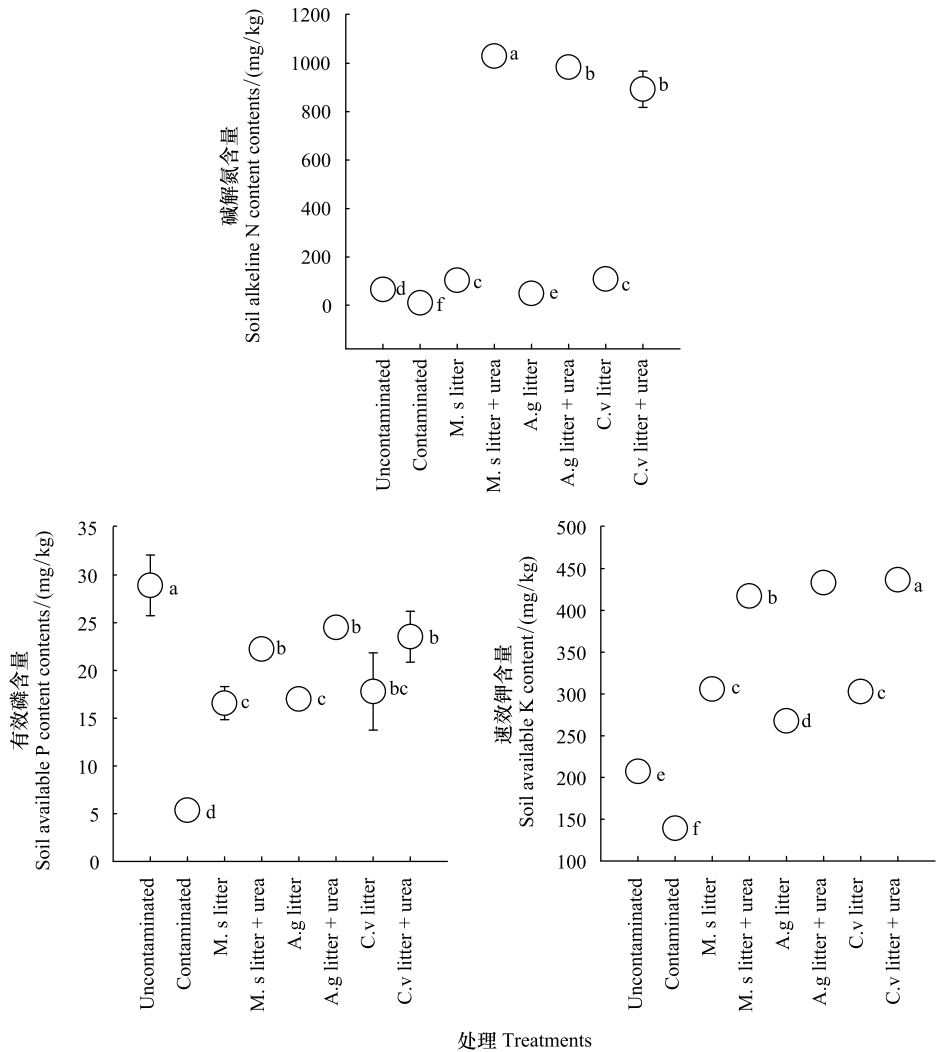


图3 草本凋落物与尿素处理后土壤养分含量

Fig.3 Nutrient contents of petroleum-contaminated soils treated with grass litters with or without urea application

数据采用平均值/标准误(误差线)表示,同列不同字母表示差异显著, $p<0.05$; SAK: 土壤碱解氮 Soil alkaline N content; SAP: 土壤有效磷 Soil available P content; SAK: 土壤速效钾 Soil available K content

石油烃的去除能力(表2),使其降解率显著提高了11.27%—17.31%.

表2 处理后土壤总石油烃含量

Table 2 Total petroleum hydrocarbon contents of petroleum-contaminated soils treated with grass litters with or without urea application							
处理 Treatments	自然降解 180 d Natural degradation for 180 d	紫花苜蓿 凋落物 <i>M. sativa</i> litter	紫花苜蓿 凋落物+尿素 <i>M. sativa</i> litter + urea	铁杆蒿 凋落物 <i>A. gmelinii</i> litter	铁杆蒿凋 落物+尿素 <i>A. gmelinii</i> litter + urea	小冠花 凋落物 <i>C. varia</i> litter	小冠花凋 落物+尿素 <i>C. varia</i> litter + urea
降解率 Degradation rate/%	7.66(0.29)d	59.37(3.75)c	76.68(0.75)a	65.60(1.71)b	81.14(1.06)a	56.03(0.86)c	67.30(0.98)b

数据采用平均值(标准误)表示,同行不同字母表示差异显著, $P<0.05$ 各处理综合改良作用及处理因素对土壤指标的影响

综合主成分分析结果表明(图4),基质质量较高的凋落物对油污土壤的修复能力更好,配合施氮均可显著提高凋落物的修复能力。对多数土壤指标而言,是否配合外源N添加是影响其较对照提高率的最重要因素(图5),配合施氮对于污染土壤中蔗糖酶、淀粉酶、纤维素酶、磷酸酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶和过氧化物

酶活性以及碱解 N、有效 P 和速效 K 含量的恢复均具有积极效果,且有利于总石油烃的降解,而对木聚糖酶、脲酶、脱氢酶活性以及放线菌和真菌的数量恢复均产生不利影响。凋落物基质质量中,较高的叶源 N 或 P 绝对含量更有利于蔗糖酶、淀粉酶、纤维素酶活性和真菌数量的恢复以及石油烃的降解,较好的分解和养分供应特性(低 C/N 和 C/P)更有利于脲酶、磷酸酶等养分循环酶,多酚氧化酶和脱氢酶等石油降解酶活性以及真菌数量的恢复,较低的木质素和多酚含量也有利于土壤细菌和真菌数量的恢复以及石油烃的降解。

3 讨论与结论

本研究表明,重度石油污染将显著降低可培养土壤微生物数量,这与 Eze 等^[4]的研究结果相符。产生上述现象的原因除石油污染物对微生物的直接毒性作用外,也与石油进入土壤后微生物生存环境的恶化,如通气性和持水能力的下降和氮磷养分的相对匮乏^[30-33]有关。大量研究表明,添加生物刺激物往往可以通过补充养分、增加电子受体和提高污染物的生物可利用性促进污染物的降解和微生物的生长^[3, 8, 34-35]。本研究中,凋落物处理显著提高了油污土壤中可培养细菌中的放线菌类群以及真菌的数量,这与于齐等^[22]和 Zhang 等^[36]关于凋落物处理促进油污土壤微生物生长的研究结果相似。此外,利用 16SrDNA 和 16SrRNA 鉴定等技术的研究^[10, 18]也表明植物残体处理可显著提高污染土壤的细菌总丰度和放线菌门丰度。凋落物提高土壤微生物数量原因可能是其分解可以快速释放出易于微生物利用的氮磷养分^[20, 37],从而解除养分限制促进微生物的生长。

本研究中两种含氮较高的豆科凋落物较之铁杆蒿凋落物促进微生物生长的效果更好也支持了上述假设。同时,凋落物中含有大量的纤维木质素成分,使得其在分解过程中能够维持一定形状,且凋落物具有一定的吸水能力^[38],上述特征使其与土壤混合后,可以在一定程度上改善土壤的孔隙状况和保水能力^[11, 16],从而改善微生物的生存环境使其数量得以恢复。此外,上述作用均可促进石油污染物的降解(表 2),从而降低其毒性和对土壤理化性质的干扰,使微生物数量反馈增加^[8, 10]。然而,与其他研究^[10, 18-19]相反,本研究中凋落物处理 6 个月后,土壤细菌数量并未恢复,甚至较油污土壤降低了 3 个数量级。其原因可能是凋落物分解后养分供给能力显著降低,因此大量石油污染物引起的养分限制在试验后期重新出现。支持上述假设的依据是前期研究表明在修复试验进行 1 个月时细菌、放线菌和真菌数量均有显著提高(未发表数据),而至试验后期凋落物已经无法提供更多有效养分(铁杆蒿凋落物 N 释放已达约 50%,豆科凋落物可达 88%左右,3 种凋落物的 P 释放均已达 90%以上,未发表数据)。其次,修复过程中土著降解菌的活动将显著降解大量石油烃,然而石油烃的某些降解产物仍具有强烈的生物毒性^[9],除放线菌外细菌类群对这些中间产物的耐受能力可能相对较差,导致其数量显著降低。与单纯使用凋落物处理相比,配合施氮对微生物数量的恢复并无更佳效果,这与 Roy 等^[15]和 Ramirez 等^[39]的研究结果不符。一般认为施氮可以提供大量养分,有利于微生物数量的恢复,因

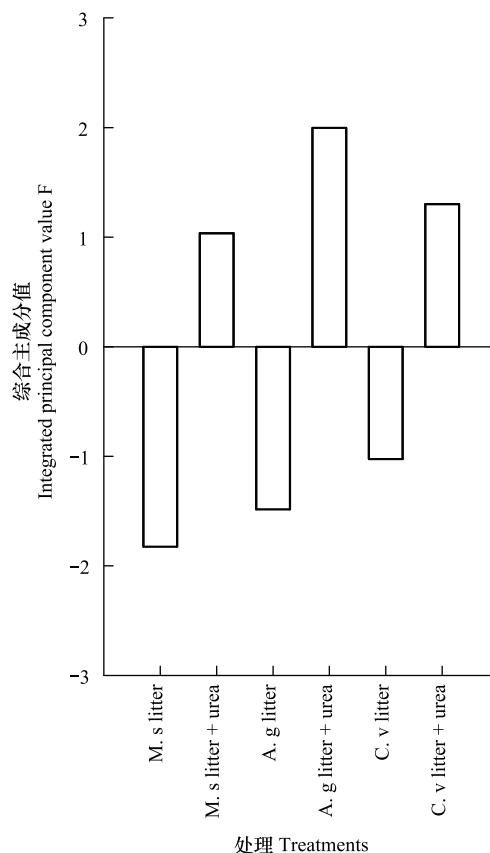


图 4 不同处理对污染土壤生物化学性质的综合影响

Fig.4 The integrated remediation effects of different treatments on the biochemical properties of contaminated soil

Uncontaminated: 未污染; Contaminated: 污染土壤; M. s litter: 苜蓿凋落物; M. s litter+urea: 苜蓿凋落物+尿素; A. g litter: 铁杆蒿凋落物; A. g litter+urea: 铁杆蒿凋落物+尿素; C. v litter: 小冠花凋落物; C. v litter+urea: 小冠花凋落物+尿素

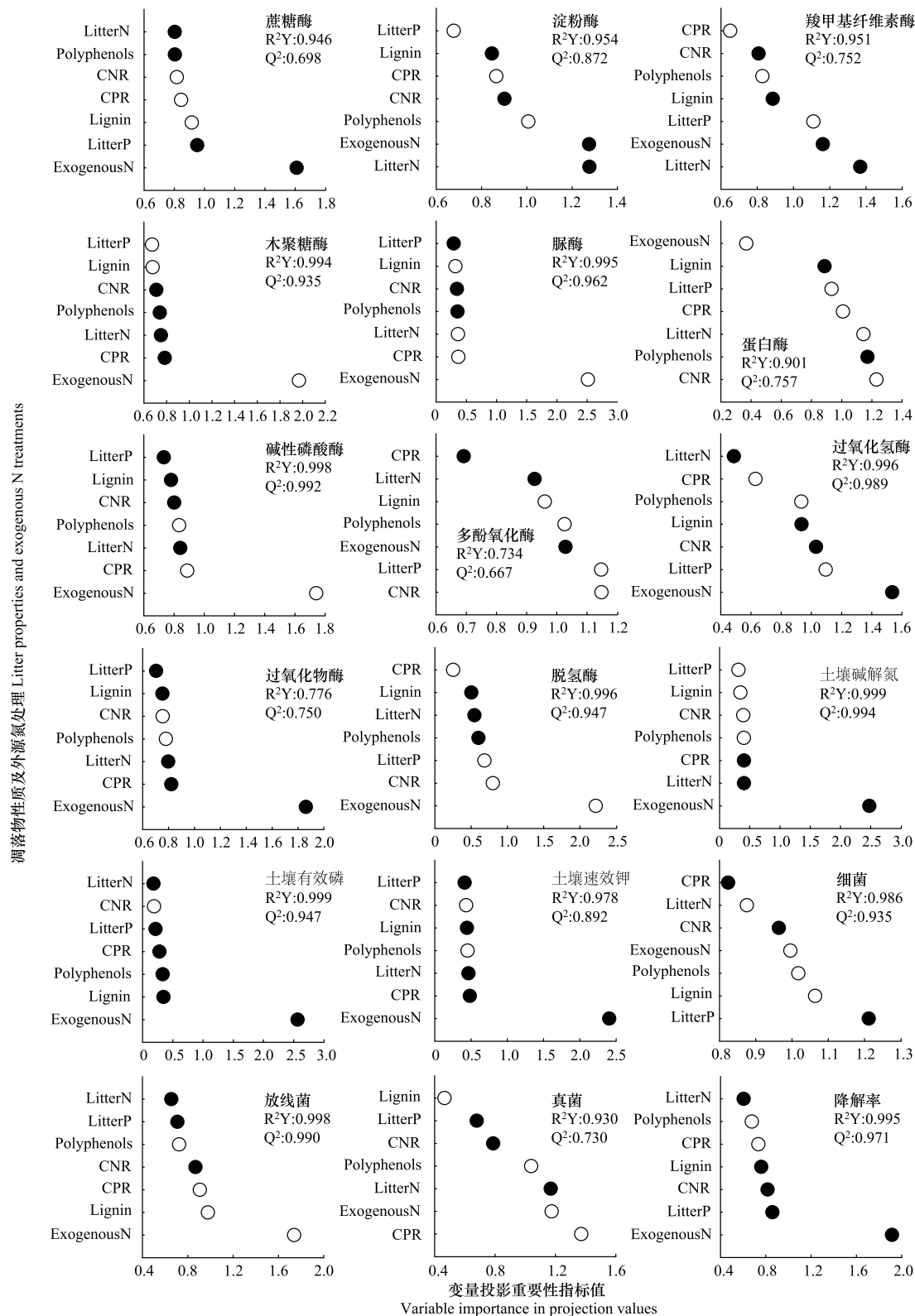


图5 凋落物性质和外源氮(尿素)对土壤性质改良程度的变量投影重要性指标

Fig.5 The variable importance in projection (VIP) values as affected by litter characteristics and exogenous N (urea) in petroleum-contaminated soils

实心点代表正效应,空心点代表负效应;LitterN:凋落物氮含量 Content of litter N; LitterP:凋落物氮含量 Content of litter P; CNR:凋落物碳氮比 C/N ratio of litter; CPR:凋落物碳磷比 C/P ratio of litter; Polyphenols:多酚含量 Contents of polyphenols; Lignin:木质素含量 Contents of lignin; ExogenousN:外源 N; Degradation:石油烃降解率,其余缩写同图1—3.

此本研究中配合施氮对微生物无影响的原因可能是施用的尿素量较小,未能调节土壤到适宜的养分比例(本研究中为 25:1,而适宜量约为 10:1,Varjani 和 Upasani^[1]),因此其促进作用相对有限。需要说明的是,受限平板计数技术中可培养微生物种类的限制,本研究在一定程度上对处理后微生物丰度存在低估(如本研究中凋落物处理对细菌数量影响不显著但其他研究中细菌总丰度有小幅上升^[10, 18]),且单纯考虑各处理对可培养微生物数量的影响对评价土壤功能的恢复尚不足够,在后续研究中,尚需采用高通量测序和 Biolog 等^[35]技术进一步研究凋落物及其与尿素联合使用对细菌/真菌丰度、活性、功能多样性、代谢特征和群落结构的影响,以深入分析上述处理对土壤功能恢复的具体作用。当然,从本研究中在可培养微生物数量恢复有限甚至有所降低的情况下,仍检测到多种执行不同土壤功能的酶的活性普遍显著提高而总石油烃含量降低的现象推测(图 2 和表 2),凋落物处理和凋落物-尿素联合处理应该在一定程度上增加了油污土壤中微生物的多样性和活性,并可能增加了其中石油烃降解菌的比例。Shahsavari 等^[10]关于豌豆秸秆处理显著增加油污土壤细菌多样性,Al-Kindi 和 Abed^[18]关于豆粕和麦秸等植物残体对污染土壤细菌丰度影响不显著但使厚壁菌门、 γ 和 δ 变形菌纲的比例显著增加,以及 Roy 等^[15]关于氮素添加显著提高细菌 α 多样性和细胞活力以及厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门和绿弯菌门等降解菌比例的结果均支持了上述推测。此外,长期处理后土壤微生物数量、群落结构和功能多样性是否可以恢复到近似未污染土壤的水平也尚需进一步研究加以验证。

除抑制微生物生长外,石油污染也将显著抑制土壤酶活性^[6-7, 40]。本研究中,除碱性磷酸酶、过氧化氢酶和脱氢酶外的 8 种酶的活性均受到显著抑制,这与上述研究结果相同。其原因可能是石油污染显著抑制了微生物的生长,导致酶活性因微生物死亡下降,同时污染物覆盖于酶或酶-矿物质复合体表面,阻止其与底物接触或直接改变其分子结构破坏其功能^[41-42]。凋落物添加可显著恢复土壤酶活性,这与前人研究结果类似^[22-23, 36]。其恢复途径可能有以下几种:首先,促进微生物的生长,从而增加胞内酶数量和胞外酶分泌,或在微生物死亡后增加酶的释放量,因而提高土壤酶活性。其次,通过促进石油污染物的降解逐渐恢复微生物的群落结构,恢复多种土壤酶的分泌。此外,凋落物可提供较易分解的有机质(糖类、氨基酸、纤维素等)或石油烃共代谢底物(木质素分解中间产物和酚类)等,诱导相应酶的产生和活性提高^[8, 21]。最后,凋落物自身分解和转化过程中产生的腐殖酸类物质或其促进放线菌类微生物生长产生的生物表面活性剂可增加石油污染物的移动性^[18, 34-35],减少其对酶的覆盖增加其与底物的接触,从而表现出酶活性的提高。配合施氮对油污土壤酶活性的影响较为多样,对不同酶活性表现为显著促进和显著抑制,这与 Burns 等^[43]、Kim 和 Kang^[44]、Song 等^[45]和 Smith 等^[46]关于氮输入对土壤酶活性的影响的研究结果相一致。其原因可能是施氮一方面提供了大量氮素促进了微生物的生长,但另一方面则导致新的养分平衡改变(N 过剩而 P 相对匮乏),诱导产生微生物群落结构或功能特性的改变^[47-49]。例如,大量易获得的 N 的添加促进了微生物生长及其对易分解 C 源和石油组分的利用,并迫使微生物分泌磷酸酶以获取 P 素,表现为蔗糖酶、纤维素酶、磷酸酶、多酚氧化酶和过氧化物酶等活性的显著提高,而其 N 素供应的充足和易于利用则导致土壤脲酶和蛋白酶等活性的降低。

与前人研究结果一致^[32-33],石油污染将显著降低土壤速效养分含量,而凋落物添加将显著提高油污土壤的碱解 N、有效 P 和速效 K 含量^[22-23, 36]。凋落物分解直接释放养分对土壤养分的补充可以部分解释上述现象,但鉴于凋落物所含有的 N、P 和 K 都相对有限,因此凋落物处理对土壤速效养分含量的补充可能主要是通过恢复微生物群落结构,从而恢复受到抑制的氨化、硝化作用和脱磷酸作用等生物转化过程^[32-33],增加土壤速效养分含量。此外,石油降解过程中的 pH 降低可能也是土壤养分有效性提高的原因之一^[50-51]。配合施氮显著提高了凋落物添加对土壤速效养分的补充能力,其对碱解氮含量的显著提高绝大部分归因于其直接补充作用,而其对有效磷和速效钾含量的提高作用可能是由于其如前所述,能显著提高石油烃降解率和土壤微生物的活性,并改变土壤生化环境,促进难利用养分的活化和释出。

实测结果(图 1—3)以及后续综合主成分分析(图 4)和偏最小二乘回归(图 5)结果表明,添加凋落物配合施氮较之单独使用凋落物对土壤生化指标的总恢复效果更明显,与凋落物基质质量相比,是否配施外源氮是各处理中对石油烃降解、7 种酶、速效养分含量和放线菌影响最大的因素,说明 N 的供应可能是限制油污

土壤生化性质自行恢复主要限制因素之一。然而,虽然配合施氮的总体修复能力更好,其仍然存在对若干土壤酶活性和微生物数量产生不利影响的可能性,其较好的整体修复效果可能更多来自于对少数指标的大幅提高(图 1—3)。实测结果(图 1—3)和 PAC 分析(图 4)表明 3 种凋落物中,两种豆科植物凋落物的总体修复效果较之铁杆蒿凋落物更好。PLSR 结果(图 5)也表明,凋落物性质中较高 N、P 绝对含量、较好的分解和养分释放潜力以及较低的酚类和木质素含量有利于土壤易分解有机质降解、养分循环和难分解有机质和石油烃降解、以及支持微生物生长等土壤功能的恢复,也即基质质量更好的凋落物可以较为全面的恢复,这与前人研究结果相似^[8]。基于上述分析,本文建议在采用生物刺激方式修复重度污染土壤时,应尽量采用基质质量较高的凋落物作为调理剂,以更为全面地修复土壤功能。在急需迅速修复土壤的条件下,配合适量施氮是提高凋落物修复效果的有效手段之一,但应注意其导致的部分土壤生化指标修复能力的降低。

参考文献 (References):

- [1] Varjani S J, Upasani V N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 120(5): 71-83.
- [2] Wang Y J, Li F Y, Rong X M, Song H X, Chen J B. Remediation of petroleum-contaminated soil using bulrush straw powder, biochar and nutrients. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 98(5): 690-697.
- [3] Shahi A, Aydin S, Ince B, Ince O. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 125(3): 153-160.
- [4] Eze C N, Ogbonna J C, Anyanwu C U, Eze E A. Determination of the relative abundance and distribution of bacteria and fungi in Bonny light crude oil-contaminated sandy loam soil. *Scientific Research and Essays*, 2013, 8(9): 375-381.
- [5] Guo H, Yao J, Cai M M, Qian Y G, Guo Y, Richnow H H, Blake R E, Doni S, Ceccanti B. Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. *Chemosphere*, 2012, 87(11): 1273-1280.
- [6] Labud V, Garcia C, Hernandez T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 2007, 66(10): 1863-1871.
- [7] Ma J, Shen J L, Liu Q X, Fang F, Cai H S, Guo C H. Risk assessment of petroleum-contaminated soil using soil enzyme activities and genotoxicity to *Vicia faba*. *Ecotoxicology*, 2014, 23(4): 665-673.
- [8] Han X M, Hu H W, Shi X Z, Zhang L M, He J Z. Effects of different agricultural wastes on the dissipation of PAHs and the PAH-degrading genes in a PAH-contaminated soil. *Chemosphere*, 2017, 172(4): 286-293.
- [9] O'Brien P L, DeSutter T M, Casey F X M, Wick A F, Khan E. Evaluation of soil function following remediation of petroleum hydrocarbons—a review of current remediation techniques. *Current Pollution Reports*, 2017, 3(3): 192-205.
- [10] Shahsavari E, Adetutu E M, Anderson P A, Ball A S. Plant residues—a low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 2013, 443(6): 766-774.
- [11] Shahsavari E, Adetutu E M, Ball A S. Phytoremediation and necrophytoremediation of petrogenic hydrocarbon-contaminated soils//Ansari A A, Gill S S, Gill R, Lanza G R, Newman L, eds. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, Volume 2. Cham: Springer, 2015: 321-334.
- [12] 丁正, 梁晶, 方海兰. 绿化植物废弃物强化草坪修复石油烃污染土壤研究. *环境科学与技术*, 2016, 39(5): 85-89, 139-139.
- [13] 梁晶, 彭喜玲, 方海兰, 南蓬. 污泥堆腐过程中多环芳烃(PAHs)的降解. *环境科学与技术*, 2011, 34(1): 114-116, 175-175.
- [14] Adams F V, Niyomugabo A, Sylvester O P. Bioremediation of crude oil contaminated soil using agricultural wastes. *Procedia Manufacturing*, 2017, 7: 459-464.
- [15] Roy A, Dutta A, Pal S, Gupta A, Sarkar J, Chatterjee A, Saha A, Sarkar P, Sar P, Kazy S K. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresource Technology*, 2018, 253(4): 22-32.
- [16] Wu Z J, Dong H J, Zou L D, Lu D N, Liu Z. Enriched microbial community in bioaugmentation of petroleum-contaminated soil in the presence of wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 164(7): 1071-1082.
- [17] Han Z Y, Lu D, Qi B C, Zhang D X. Study on the improvement effects of the petroleum hydrocarbon contaminated loess by common agricultural wastes//Proceedings of the 3rd International Conference on Green Materials and Environmental Engineering. Beijing: DEStech Transactions on Environment, Energy and Earth Sciences, 2017: 81-87.
- [18] Al-Kindi S, Abed R M M. Effect of biostimulation using sewage sludge, soybean meal, and wheat straw on oil degradation and bacterial community composition in a contaminated desert soil. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(3): 240.
- [19] Agbor R B, Antai S P, Nkanang A J. Microbial degradation of total petroleum hydrocarbon in crude oil polluted soil ameliorated with agro-wastes. *Global Journal of Earth and Environmental Science*, 2018, 3(4): 1-7.
- [20] Agbor R B, Ekpo I A, Osuagwu A N, Udofia U U, Okpako E C, Antai S P. Biostimulation of microbial degradation of crude oil polluted soil using cocoa pod husk and plantain peels. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2012, 2(3): 464-469.
- [21] De Nicola F, Baldantoni D, Alfani A. PAHs in decaying *Quercus ilex* leaf litter: mutual effects on litter decomposition and PAH dynamics. *Chemosphere*, 2014, 114(11): 35-39.

- [22] 于齐, 张晓曦, 刘增文, 王文轩, 张桢尧, 王宁. 陕北石油区城市绿化树木枯落叶对油污土壤的修复效应. 农业环境科学学报, 2015, 34(1): 50-57.
- [23] 王国保, 刘增文, 时腾飞, 于齐, 张权威. 陕北采油区灌木枯落叶对油污土壤环境的改良效应. 中国环境科学, 2014, 34(3): 688-696.
- [24] 王国保, 刘增文, 张晓曦, 于齐, 张桢尧. 陕北石油区牧草秸秆对油污土壤生物化学性质的修复效应. 草地学报, 2013, 21(6): 1101-1108.
- [25] 王华金, 朱能武, 杨崇, 党志, 吴平霄. 石油污染土壤生物修复对土壤酶活性的影响. 农业环境科学学报, 2013, 32(6): 1178-1184.
- [26] Zhang X X, Liu Z W, Yu Q, Luc N T, Bing Y H, Zhu B C, Wang W X. Effect of petroleum on decomposition of shrub-grass litters in soil in Northern Shaanxi of China. Journal of Environmental Sciences, 2015, 33: 245-253.
- [27] 关松荫. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986.
- [28] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985.
- [29] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [30] Andrade M L, Covelo E F, Vega F A, Marcet P. Effect of the *Prestige* oil spill on salt marsh soils on the Coast of Galicia (Northwestern Spain). Journal of Environmental Quality, 2004, 33(6): 2103-2110.
- [31] 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. 水土保持研究, 2013, 20(3): 32-38.
- [32] Wang X Y, Feng J, Zhao J M. Effects of crude oil residuals on soil chemical properties in oil sites, Momoge Wetland, China. Environmental Monitoring and Assessment, 2010, 161(1/4): 271-280.
- [33] Ogboghodo I A, Iruaga E K, Osemwota I O, Chokor J U. An assessment of the effects of crude oil pollution on soil properties, germination and growth of maize (*Zea Mays*) using two crude types-Forcados Light and Escravos Light. Environmental Monitoring and Assessment, 2004, 96(1/3): 143-152.
- [34] 乔俊, 陈威, 张承东. 添加不同营养助剂对石油污染土壤生物修复的影响. 环境化学, 2010, 29(1): 6-11.
- [35] Wang S J, Wang X, Zhang C, Li F S, Guo G L. Bioremediation of oil sludge contaminated soil by landfarming with added cotton stalks. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 106(1): 150-156.
- [36] Zhang X X, Yu Q, Liu Z W, Luc N T, Liu X B, Liang X. Remediation of petroleum contaminated soil using litter from afforestation plant species in Northern Shaanxi, China. Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences, 2016, 11(1): 197-206.
- [37] Zhang X X, Liu Z W, Hu W. Response of nutrient release of *Periploca sepium* litter to soil petroleum contamination. Clean-Soil, Air, Water, 2016, 44(12): 1709-1716.
- [38] 寇萌, 焦菊英, 尹秋龙, 杜华栋, 王东丽. 黄土丘陵沟壑区主要草种枯落物的持水能力与养分潜在归还能力. 生态学报, 2015, 35(5): 1337-1349.
- [39] Ramirez K S, Craine J M, Fierer Noah. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. Global Change Biology, 2012, 18(6): 1918-1927.
- [40] 吕桂芬, 赵吉, 赵利, 廖仰南. 应用土壤酶活性评价草原石油污染的初步研究. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1997, 28(5): 687-691.
- [41] Serrano A, Tejada M, Gallego M, Gonzalez J L. Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill. Science of the Total Environment, 2009, 407(13): 4056-4061.
- [42] Wyszowska J, Wyszowski M. Activity of soil dehydrogenases, urease, and acid and alkaline phosphatases in soil polluted with petroleum. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2010, 73(17/18): 1202-1210.
- [43] Burns R G, DeForest J L, Marxsen J, Sinsabaugh R L, Stromberger M E, Wallenstein M D, Weintraub M N, Zoppini A. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 58(3): 216-234.
- [44] Kim H, Kang H. The impacts of excessive nitrogen additions on enzyme activities and nutrient leaching in two contrasting forest soils. The Journal of Microbiology, 2011, 49(3): 369-375.
- [45] Song Y Y, Song C C, Li Y C, Hou C C, Yang G S, Zhu X Y. Short-term effect of nitrogen addition on litter and soil properties in *Calamagrostis angustifolia* freshwater marshes of northeast China. Wetlands, 2013, 33(3): 505-513.
- [46] Janssens I A, Dieleman W, Luyssaert S, Subke J A, Reichstein M, Ceulemans R, Ciais P, Dolman A J, Grace J, Matteucci G, Papale D, Piao S L, Schulze E D, Tang J, Law B E. Reduction of forest soil respiration in response to nitrogen deposition. Nature Geoscience, 2010, 3(5): 315-322.
- [47] Tu L H, Hu T X, Zhang J, Li X W, Hu H L, Liu L, Xiao Y L. Nitrogen addition stimulates different components of soil respiration in a subtropical bamboo ecosystem. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 58(3): 255-264.
- [48] 洪丕征, 刘世荣, 于浩龙, 郝建. 模拟氮沉降对红椎人工幼龄林土壤微生物生物量和微生物群落结构的影响. 山东大学学报: 理学版, 2016, 51(5): 18-28.
- [49] Ribeiro H, Mucha A P, Almeida C M R, Bordalo A A. Bacterial community response to petroleum contamination and nutrient addition in sediments from a temperate salt marsh. Science of the Total Environment, 2013, 458: 568-576.
- [50] Fernández-Calviño D, Bååth E. Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 73(1): 149-156.
- [51] Dell'Anno A, Beolchini F, Gabellini M, Rocchetti L, Pusceddu A, Danovaro R. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in anoxic marine sediments: consequences on the speciation of heavy metals. Marine Pollution Bulletin, 2009, 58(12): 1808-1814.