

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2022100301

王琪, 吴蔓莉, 高敬华, 等. 硝酸钾和有机肥添加对土壤中十六烷的降解效果及微生物类群活性变化研究[J]. 环境化学, 2024, 43(4): 1282-1291.

WANG Qi, WU Manli, GAO Jinghua, et al. Effects of potassium nitrate and organic fertilizer on microbial activity in hexadecane-contaminated soil[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43 (4): 1282-1291.

## 硝酸钾和有机肥添加对土壤中十六烷的降解效果及微生物类群活性变化研究\*

王琪 吴蔓莉\*\* 高敬华 张俞 许殷瑞 徐会宁

(陕西省环境工程重点实验室, 西北水资源与环境生态教育部重点实验室,  
西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安, 710055)

**摘要** 向污染土壤中加入外源氮进行生物刺激修复是目前广为采用的土壤有机污染修复技术. 然而, 目前对于修复过程中土壤微生物类群对组分烃的代谢特征尚不清楚. 本文以<sup>13</sup>C标记的十六烷污染土壤为研究对象, 利用稳定同位素标记-磷脂脂肪酸技术(stable isotope labeling-phospholipid fatty acid technology, <sup>13</sup>C-SIP-PLFA)研究了加入硝酸钾和有机肥对石油污染土壤进行修复时, 不同微生物类群对十六烷的利用特征. 结果表明, 与自然降解(CC)相比, 加入KNO<sub>3</sub>(CN)和施入有机肥(CY)的处理均可提高土壤中十六烷的去除效率. 修复30 d时, 土壤中十六烷的去除率由6.14%(CC)提高至13.6%(CN)和15.0%(CY). 加入硝酸钾修复使得土壤微生物总量略有降低(总PLFAs由82.8 nmol·g<sup>-1</sup>(CC)降低至79.7 nmol·g<sup>-1</sup>(CN)), 但被微生物同化为细胞组分的十六烷含量(<sup>13</sup>C-PLFA)由81.12 ng·g<sup>-1</sup>(CC)增加至92.84 ng·g<sup>-1</sup>(CN), 硝酸钾生物刺激修复提高了革兰氏阳性菌和真菌对十六烷的同化代谢作用. 加入有机肥修复的土壤中, 微生物总量(总PLFAs为99.3 nmol·g<sup>-1</sup>)和微生物同化代谢十六烷的含量均明显增加(<sup>13</sup>C-PLFA为142.67 ng·g<sup>-1</sup>), 土壤革兰氏阳性菌和放线菌对十六烷的同化代谢作用明显增强. 在不同修复处理的土壤中, 可利用十六烷的主要微生物有G<sup>+</sup>菌 i15: 0和 a15: 0、G<sup>+</sup>菌 16: 1ω5c和 16: 1ω7c、真菌 18: 1ω9c、放线菌 16: 0(10Me)和 Unspecific 菌 16: 00. 结果表明, 革兰氏阳性菌是不同修复处理中最主要的十六烷降解菌, 两种修复剂对土壤不同微生物类群的代谢激活作用存在差异.

**关键词** 烷烃污染土壤, 生物刺激, 微生物类群, PLFA-SIP, 烃利用特征.

## Effects of potassium nitrate and organic fertilizer on microbial activity in hexadecane-contaminated soil

WANG Qi WU Manli\*\* GAO Jinghua ZHANG Yu XU Yinrui XU Huining

(Shaanxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Key Laboratory of Northwest Water Resource, Environment and Ecology, School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an, 710055, China)

**Abstract** Biostimulation by adding exogenous nitrogen to the soil is a common application technology for soil organic pollution. However, the metabolic characteristics of soil microbial communities towards the contaminants during the remediation are still not clear. In this study, two

2022年10月3日收稿(Received: October 3, 2022).

\* 国家自然科学基金(52070154, 21577109)和陕西省科技厅重点研发计划项目(2023-YBNY-251)资助.

**Supported by** the National Natural Science Foundation of China (52070154, 21577109) and the Key R&D Plan Project of Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (2023-YBNY-251).

\*\* 通信联系人 Corresponding author, E-mail:447005853@qq.com

stimulants,  $\text{KNO}_3$  and compost, were applied to  $^{13}\text{C}$ -labeled hexadecane-contaminated soil for 30 days of remediation. The removal rates of hexadecane were determined using GC-MS, and the phospholipid fatty acid (PLFA) contents and the  $^{13}\text{C}$  incorporated into PLFA was quantified using  $^{13}\text{C}$ -PLFA-SIP technique. Results showed that the removal rates of hexadecane was higher in the  $\text{KNO}_3$  (CN) and compost (CY) amendment soils than that in the natural attenuation(CC). After 30 days of incubations, the removal rates of hexadecane enhanced from 6.14% (CC) to 13.6% (CN) and 15.0% (CY), respectively. Although  $\text{KNO}_3$  amendment slightly decreased the total microbial biomass (the total PLFAs changed from  $82.8 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  in CC to  $79.7 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  in CN), the  $^{13}\text{C}$ -PLFA increased from  $81.12 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  to  $92.84 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .  $\text{KNO}_3$  amendment improved the hexadecane assimilation utilization by Gram-positive bacteria and fungi. In the compost treated soil (CY), the total PLFAs and  $^{13}\text{C}$ -PLFA increased to  $99.3 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $142.67 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively, and the assimilation utilization of hexadecane by Gram-positive bacteria and actinomycetes were significantly enhanced. In the different treatments, the microorganisms that can use hexadecane mainly included gram-positive bacteria i15:0 and a15:0, gram-negative bacteria 16:1 $\omega$ 5c and 16:1 $\omega$ 7c, fungus 18:1 $\omega$ 9c, actinomycetes 16:0 (10Me), and unspecified bacteria 16:00. The results indicated that gram-positive bacteria were the most dominant hydrocarbon-degrading bacteria in the different treatments, and the remediation characteristics of  $\text{KNO}_3$  or compost addition toward hydrocarbon-polluted soil were different.

**Keywords** hexadecane-contaminated soil, biostimulation, microbial community, PLFA-SIP, hydrocarbon utilization characteristics.

在石油的开采、冶炼和加工中,不可避免地存在由于石油泄漏而带来的土壤污染问题.石油烃外碳源向土壤的大量输入,引起土壤氮源相对不足是导致土壤微生物活性降低、抑制土著微生物降解石油烃的主要因素.因此,向污染土壤中加入外氮源进行生物刺激修复可对石油烃降解起到促进作用.许多研究对利用生物刺激剂修复石油污染土壤进行了详细报道.所用氮源类型包括无机氮源  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 有机氮源尿素和有机肥等<sup>[1-3]</sup>.研究认为,当土壤 C/N 比接近 10 时,土壤微生物的活性最好,对石油烃的去除能力最强<sup>[4]</sup>.

土壤菌群结构多样性和功能菌群活性对于生物技术的实施至关重要.目前多是利用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)、高通量测序 (high throughput sequencing)、宏基因组学 (metagenomics) 等技术对土壤菌群结构和功能代谢基因表达进行研究<sup>[5-7]</sup>.修复过程中可降解石油烃的功能菌属主要有细菌芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、铜绿假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、不动细菌属 (*Acinetobacter*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*), 以及真菌的担子菌门 (Basidiomycota) 和子囊菌门 (Ascomycota) 等<sup>[8-10]</sup>.生物刺激修复可较好地保持土壤微生物菌群结构多样性和稳定性,有利于石油烃的持续降解<sup>[11-12]</sup>.现有研究阐明了石油烃降解功能菌属类别以及土壤菌群稳定性对生物修复的影响作用,但是对于不同功能类群参与石油烃降解的作用强度和利用特征尚不清楚.

磷脂脂肪酸 (Phospholipid fatty acids, PLFA) 是几乎所有活体细胞膜的主要成分,周转速率极快且随细胞死亡而迅速降解.不同类群的微生物 PLFA 组成具有一定差异,因而磷脂脂肪酸可作为生物标识物用以描述微生物类群对不同碳源的利用特征<sup>[13-14]</sup>.目前 PLFA 技术主要用于研究农业上施肥、植物残体及植被种植等因素对土壤微生物群落活性的影响<sup>[15-17]</sup>,较少用于研究污染土壤生物修复过程中功能微生物类群对石油烃组分的利用特征.

烷烃是石油烃的重要组成部分之一,本文以  $^{13}\text{C}$ -十六烷标记的污染土壤为研究对象,通过向污染土壤中加入硝酸钾和有机肥进行生物刺激修复处理,利用稳定同位素标记-磷脂脂肪酸技术 ( $^{13}\text{C}$ -SIP-PLFA) 探究十六烷中碳组分被不同土壤微生物类群的利用情况,本研究可为深入理解石油烃的生物降解代谢过程提供参考.

# 1 材料与方法(Materials and methods)

## 1.1 供试土壤及有机肥

实验所用土壤为取自陕西省延安市安塞县未受石油污染的黄绵土. 土壤基本理化性质采用常规方法进行分析<sup>[18]</sup>(表 1). 土壤经剔除可见杂质、自然风干、研磨粉碎后将其铺平摊薄, 去除土壤中残留的细微植物残体和根须, 随后过 100 目筛并充分混匀后, 装于自封袋中,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下储存备用.

表 1 土壤基本性质

Table 1 Basic physicochemical properties of soil

pH	含水率/% Humanity	有机碳/( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Organic carbon	总氮/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Total nitrogen	铵氮/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) $\text{NH}_4^+\text{-N}$	硝氮/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) $\text{NO}_3^-\text{-N}$	全硫/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Total sulfur	碳氮比 C/N
8.20±0.04	0.12±0.01	17.1±1.27	400.1±12.5	4.11±0.16	4.01±0.15	120.0±8.9	42.5

所用腐熟有机肥取自西北农林科技大学, 是以干质量比 1:2 的猪粪:稻壳加入 5.0% 的木炭渣经堆制腐解而成. 有机肥中的主要元素含量为 C、N、P、K、Na、Ca、Mg、Al、S、Cu、Fe、Mn、Mo、Zn 分别为 185600、20400、6500、36200、3810、2130、2420、1330、1575、400、1615、284、4.46、140  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

## 1.2 样品配制及试验方案设计

$^{13}\text{C}$ -十六烷配制: 0.2500 g 丰度 99% atom 的标记十六烷(十六烷-1,2- $^{13}\text{C}_2$ , Sigma 公司)与 4.7500 g 丰度 1.108% atom 的分析纯十六烷(Sigma 公司)充分混合, 计算其  $^{13}\text{C}$  丰度为 5.976% atom.

实验方案设计如表 2 所示. 取 9 份 100 g 晾干磨碎并过 100 目筛的土壤分 3 组(每组 3 个平行), 分别加入 5000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$   $^{13}\text{C}$ -十六烷标记物、5000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$   $^{13}\text{C}$ -十六烷标记物和硝酸钾(调节土壤碳氮比为 10/1)、5000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$   $^{13}\text{C}$ -十六烷标记物和有机肥(添加量 150  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 将各组土壤充分混合均匀. 3 组处理编号分别为: CC、CN 和 CY. 室温条件下在 0、3、30 d 采集各组土壤样品, 于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存待测.

表 2 实验方案设计

Table 2 Experimental scheme design

编号 Code	处理 Treatment
CC	100 g 洁净土壤+0.5 g $^{13}\text{C}$ -十六烷
CN	100 g 洁净土壤+0.5 g $^{13}\text{C}$ -十六烷+0.3066 g $\text{KNO}_3$ (C/N=10/1)
CY	100 g 洁净土壤+ 0.5 g $^{13}\text{C}$ -十六烷+15 g 有机肥(C/N=10/1)

## 1.3 样品分析

土壤中正十六烷利用超声萃取提取-GC/MS 测定. 超声提取和 GC/MS 测定方法详见文献 [19].

土壤 PLFA 的提取 微生物群落结构用土壤磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)表示. 土壤 PLFA 的提取方法见文献 [19]. 基本步骤为: 利用氯仿:甲醇:柠檬酸=1:2:0.8 作为提取剂提取土壤中的磷脂、糖脂和中性脂, 以氯仿和丙酮作为洗脱剂, 利用 SPE 柱(Supelco 公司)分离去除糖脂和中性脂, 向提取获得的磷脂中加入甲醇:甲苯(1:1)的混合液和 0.2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KOH 甲醇溶液进行甲酯化后, 加入蒸馏水和冰醋酸, 再用正己烷萃取获得磷脂脂肪酸甲酯, 用氮气吹干后, 在酯化的样品中加入 19:0 甲基酯作内标, 将磷脂脂肪酸甲酯溶解于 60  $\mu\text{L}$  正己烷中.

土壤 PLFA 碳同位素的测定 用气相色谱仪(Trace GC 1310 +GC IsoLink II 连 ConFlo IV(测可气有机物中的 CNHO))进行检测, 利用 MIDI SHERLOCSS 微生物鉴定系统进行脂肪酸的比对鉴定. 脂肪酸的定量采用峰面积和内标曲线法. 单个 PLFA 的  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  用气相色谱-燃烧法-稳定同位素质谱仪(GC-C-IRMS)进行测定, 测定方法详见文献 [19].

共检测出含有  $^{13}\text{C}$ -同位素的 18 种 PLFA 单体, 以 18:1 $\omega$ 9c 指示真菌; 以 16:0(10Me)、17:0(10Me)、18:0(10Me)、17:1 $\omega$ 7c(10Me)指示放线菌; 以 i15:0、i16:0、i17:0、a15:0、a17:0 指示革兰氏阳性菌( $G^+$ ); 以 16:1 $\omega$ 5c、16:1 $\omega$ 7c、18:1 $\omega$ 5c、18:1 $\omega$ 7c、cy17:0 $\omega$ 7c、cy19:0 $\omega$ 7c 指示革兰氏阴性菌( $G^-$ ); 以 16:0、18:0 指示 Unspecific 菌<sup>[20]</sup>. 将所有微生物 PLFAs 总和表征为总微生物量.

## 1.4 计算方法

土壤中各磷脂脂肪酸单体含量为:

$$P_F = \frac{A_F \times W_{STD}}{A_{STD} \times W \times M} \times 1000 \quad (1)$$

式中,  $P_F$  为土壤中磷脂脂肪酸单体的含量,  $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $A_F$  和  $A_{STD}$  为样品和内标物(甲基酯 19:00)的峰面积;  $W_{STD}$  为内标物(甲基酯 19:00)的质量,  $\mu\text{g}$ ;  $W$  为干土重量,  $\text{g}$ ;  $M$  为各磷脂脂肪酸单体的相对分子质量,  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

稳定同位素比率计算:

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (2)$$

$$\text{atom}\%^{13}\text{C} = \frac{(\delta^{13}\text{C} + 1000) \times R_{\text{sample}}}{(\delta^{13}\text{C} + 1000) \times R_{\text{sample}} + 1000} \times 1000\% \quad (3)$$

式中,  $R_{\text{sample}}$  为样品  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  原子比值;  $R_{\text{standard}}$  为标准品(美国卡罗莱纳州白垩纪皮狄组层位中的拟箭石化石, PDB)原子比值, 数值为 0.011802.

PLFA 单体中  $^{13}\text{C}$  的量:

$$^{13}\text{C} - \text{P}_F = [(\text{atom}\%^{13}\text{C})_{\text{LP}} - (\text{atom}\%^{13}\text{C})_{\text{ULP}}] \times L_{\text{PC}} \quad (4)$$

式中,  $^{13}\text{C} - \text{P}_F$  为 PLFA 单体中的  $^{13}\text{C}$  的量,  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $(\text{atom}\%^{13}\text{C})_{\text{LP}}$  和  $(\text{atom}\%^{13}\text{C})_{\text{ULP}}$  分别为标记样品 PLFA 和未标记样品 PLFA 单体中的  $\text{atom}\%^{13}\text{C}$ ,  $L_{\text{PC}}$  为标记样品 PLFA 单体中碳含量,  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ .

## 1.5 统计分析

采用 Excel2010 和 SPSS 25.0 进行数据正态性和方差齐性检验, 同一时期不同处理、同一处理不同时期差异显著性用 One-way ANOVA(单因素方差分析)检验, 利用 LSD,  $P < 0.05$ (最小显著差数法)进行多重比较, 采用 Origin 2021 绘制图表, 数据表示为平均值  $\pm$  标准差.

# 2 结果与讨论(Results and discussion)

## 2.1 土壤中十六烷的去除效率

向十六烷污染土壤中分别加入  $\text{KNO}_3$ 、有机肥进行生物刺激修复, 比较了自然降解(CC)、 $\text{KNO}_3$  生物刺激修复(CN)、有机肥生物刺激修复(CY)对十六烷的去除效果(图 1).

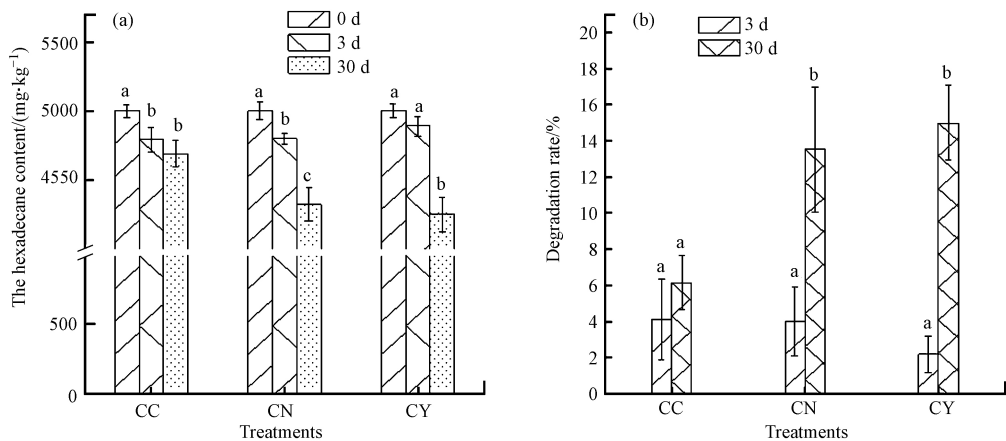


图 1 不同修复处理下土壤中十六烷含量(a)及降解率(b)

CC 表示  $^{13}\text{C}$ -十六烷在土壤中的自然消减, CN 表示添加  $\text{KNO}_3$  的修复处理, CY 表示添加有机肥的修复处理; 不同小写字母表示同一处理在不同修复时间的差异显著 ( $P < 0.05$ )

Fig.1 Soil hexadecane contents(a) and degradation rates(b) in different treatments

CC: Hexadecane natural attenuation in the soil; CN: Biostimulation of hexadecane-polluted soil using  $\text{KNO}_3$ ; CY: Biostimulation of hexadecane-polluted soil using compost. Different lowercase letters indicated that the same treatment had significant difference in different treated time ( $P < 0.05$ )



修复初期(修复 3 d),十六烷在自然降解和加入  $\text{KNO}_3$  修复处理的土壤中降解较为迅速,烷烃含量由  $5000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  降低至  $4793 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $4800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,加入有机肥修复处理的土壤中烷烃含量为  $4891 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . 修复 30 d 时,加入两种修复剂处理的土壤中烷烃去除效率显著提高,十六烷含量降低至  $4323 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (CN)和  $4250 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (CY)(图 1a). 与未经修复处理的土壤相比,烷烃降解率分别提高为自然条件下的 2.21 倍和 2.44 倍,说明加入外源氮进行生物刺激修复可有效提高土壤微生物对烷烃的降解效率(图 1b).

## 2.2 土壤微生物群落组成

修复期间,自然降解(CC)的土壤中 PLFA 总量变化不明显,为  $80.82\text{--}82.83 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ . 各微生物类群 PLFA 含量由高到低依次为:  $\text{G}^-$  ( $30.30 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) >  $\text{G}^+$  ( $16.96 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) > 放线菌 ( $14.76 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) > Unspecific 菌 ( $11.44 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) > 真菌 ( $7.36 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ). 土壤中含量较多的 9 种 PLFA 单体(大于  $3 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 包括 Unspecific 菌 16:00,  $\text{G}^+$  菌 i15:0、a15:0,  $\text{G}^-$  菌 16:1 $\omega$ 5c、16:1 $\omega$ 7c、18:1 $\omega$ 7c、cy19:0 $\omega$ 7c, 真菌 18:1 $\omega$ 9c 和放线菌 16:0(10Me)(图 2, 图 3), 其 PLFA 单体的含量分别为 9.42、6.55、3.96、4.91、6.45、11.05、4.11、7.36、9.70  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ .

向污染土壤中加入  $\text{KNO}_3$  修复处理 3 d, PLFA 总量略有降低; 修复 30 d 时, PLFA 总量为  $79.70 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ . 5 种微生物类群  $\text{G}^-$ 、 $\text{G}^+$ 、放线菌、Unspecific 菌、真菌的 PLFA 含量分别为 30.36、15.98、14.60、11.20、7.56  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , 各微生物类群和 9 种 PLFA 单体在修复期间含量变化不大. 加入有机肥修复处理初期(修复 3 d)的各微生物类群 PLFA 含量和总 PLFA 含量增加, 修复至 30 d 时显著降低, 土壤中总 PLFA 为  $99.33 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , 5 种微生物类群 PLFA 含量为 36.26、21.97、14.41、9.57、17.12  $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ .

十六烷污染和修复处理的土壤样品中不同微生物类群特征脂肪酸含量由高到低依次为:  $\text{G}^-$  细菌 >  $\text{G}^+$  细菌 > 放线菌 > Unspecific 菌 > 真菌. 与未经修复处理的土壤(CC)相比, 加入  $\text{KNO}_3$  修复处理(CN)对土壤中的总 PLFA 和各生物类群 PLFA 影响较小, 有机肥施入(CY)显著增加了土壤中总 PLFA 含量, 其中 Unspecific 菌、 $\text{G}^+$ 、 $\text{G}^-$  菌 PLFA 的增量最大(图 2).

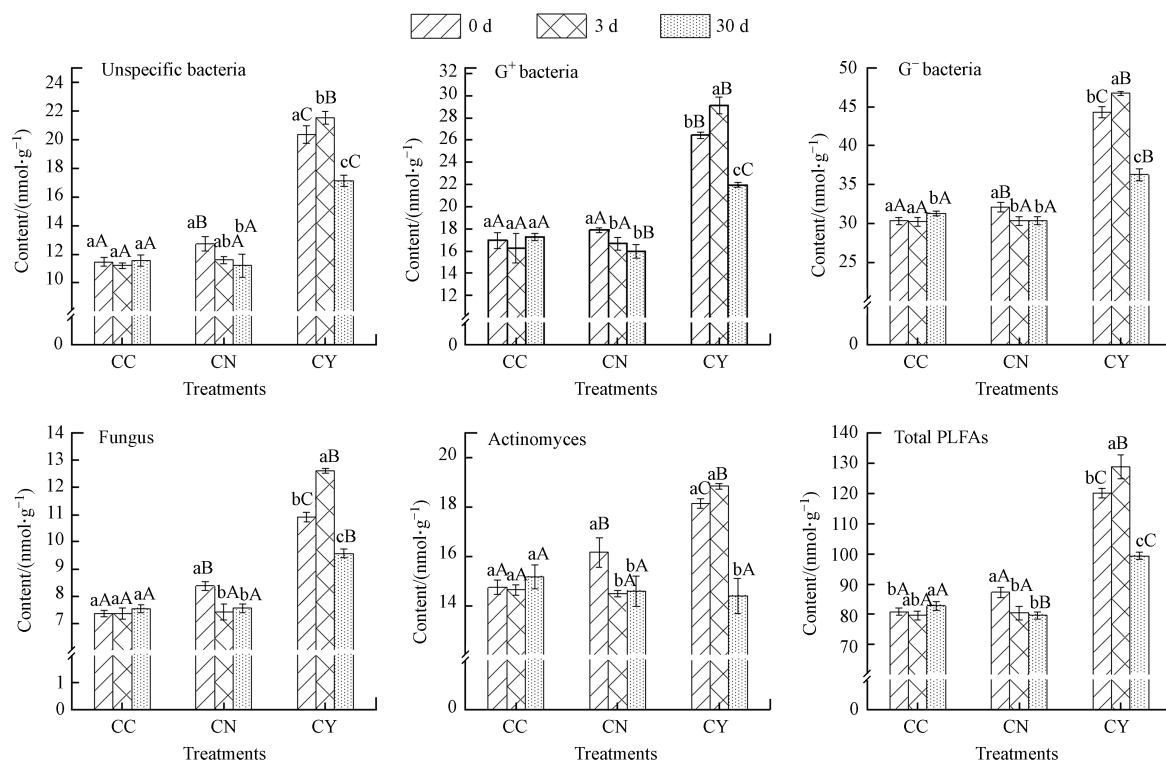


图 2 不同修复处理土壤微生物的特征 PLFAs 含量

(不同小写字母表示同一处理不同时期的 PLFAs 含量差异显著( $P<0.05$ ), 不同大写字母表示同一时期不同处理的 PLFAs 含量差异显著( $P<0.05$ ))

Fig.2 The content of microbial PLFAs in different treatments

(Different lowercase letters indicated significant differences in the PLFAs contents in different time ( $P<0.05$ ); different uppercase letters represent significant differences in the PLFAs contents in different treatments at the same period ( $P<0.05$ ))

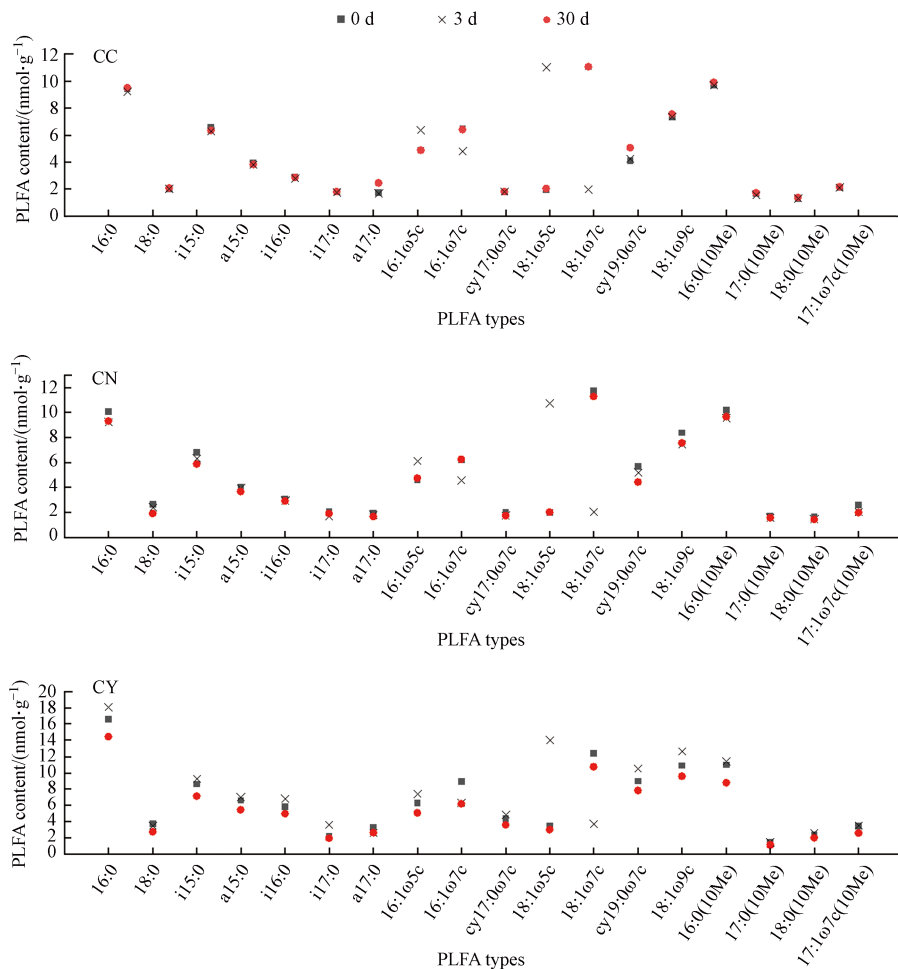


图3 不同处理下土壤 PLFA 单体含量

Fig.3 The contents of microbial PLFA monomer in different treatments

总体而言,加入修复剂处理的  $G^+/G^-$  的 PLFA 比值随时间变化不显著,但对细菌/真菌的 PLFA 比值影响较显著(表3).加入有机肥进行修复对  $G^+/G^-$  的 PLFA 比值有显著影响,对细菌/真菌的 PLFA 比值影响不显著.加入有机肥进行修复  $G^+/G^-$  比值高于自然降解和加入硝酸钾进行修复处理的土壤.加入有机肥进行修复对  $G^+/G^-$  的 PLFA 比值有显著影响,对细菌/真菌的 PLFA 比值影响不显著.加入有机肥进行修复  $G^+/G^-$  比值高于自然降解和加入硝酸钾进行修复处理的土壤.

表3 不同修复处理土壤细菌/真菌、革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌 PLFA 比值的变化

Table 3 The ratios of bacteria to fungi and gram-positive to gram-negative bacteria under different treatments

处理 Treatment	细菌/真菌 Bacteria/Fungi			革兰氏阳性菌/革兰氏阴性菌 $G^+/G^-$		
	0 d	3 d	30 d	0 d	3 d	30 d
CC	7.97±0.02aA	7.82±0.03aA	7.97±0.01aA	0.56±0.01aA	0.54±0.03aA	0.55±0.04aA
CN	7.49±0.11bA	7.89±0.04aB	7.61±0.05aAB	0.56±0.04aA	0.55±0.02aA	0.53±0.06aA
CY	8.35±0.16cA	7.72±0.21aB	7.87±0.07aC	0.60±0.05bA	0.62±0.02bA	0.61±0.04bA

注:小写字母为同一时期不同修复之间差异性,大写字母表示同一处理不同时期差异性,字母不同表示差异显著( $P<0.05$ ).

Different lowercase letters indicated significant differences among different treatments ( $P<0.05$ ); different uppercase letters represent significant differences in different remediation periods in the same treatments( $P<0.05$ )

### 2.3 可利用十六烷的微生物群落组成及变化

通过测定不同修复处理土壤微生物 PLFA 单体中  $^{13}C$  含量可以了解各微生物类群对十六烷的利用情况.根据图4可知,在不同修复处理的土壤中,可利用十六烷的微生物主要有  $G^+$  菌 i15:0、a15:0,  $G^-$  菌 16:1ω5c、16:1ω7c, 真菌 18:1ω9c、放线菌 16:0(10Me) 和 Unspecific 菌 16:00.土壤中烷烃的降解代谢需要 5 种不同微生物类群的协同作用.在 3 种修复处理进行至 3 d 时,各微生物类群 PLFA 中  $^{13}C$  含量较

低. 修复至 30 d 时, 3 种修复处理的土壤微生物类群中的 $^{13}\text{C}$  含量显著增加, 说明修复 30 d 时土壤微生物已适应了十六烷的污染, 并以十六烷作为碳源底物进行同化代谢.

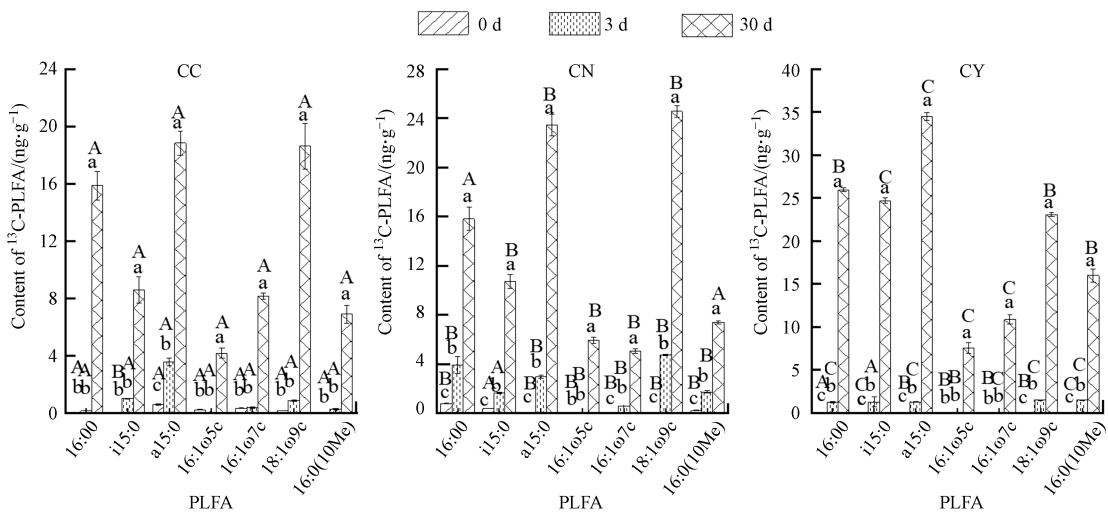


图 4 不同处理下土壤 PLFA 单体中 $^{13}\text{C}$  含量

(不同小写字母表示 PLFA 不同时期的 $^{13}\text{C}$ -PLFA 含量差异显著( $P<0.05$ ), 不同大写字母表示同一时期不同处理的 $^{13}\text{C}$ -PLFA 含量差异显著( $P<0.05$ ))

Fig.4 The amount of  $^{13}\text{C}$ -PLFA in microbial monomers PLFA in different treatments (Different lowercase letters represent significant differences in  $^{13}\text{C}$ -PLFA content in different time ( $P<0.05$ ); different uppercase letters represent significant differences in  $^{13}\text{C}$ -PLFA content in different treatments at the same period ( $P<0.05$ ))

自然降解 30 d 的土壤(CC)中, i15:0、a15:0、16:1 $\omega$ 5c、16:1 $\omega$ 7c、18:1 $\omega$ 9c、16:0(10Me)和 16:007 种 PLFA 单体中的 $^{13}\text{C}$  总量为  $81.12 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , 其中  $G^+$ (i15:0、a15:0)和真菌(18:1 $\omega$ 9c)中 $^{13}\text{C}$  含量最高, 分别为  $27.41 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  和  $18.61 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , 占 7 种 PLFA 单体中 $^{13}\text{C}$  总量的 33.8% 和 22.9%.

加入硝酸钾作为生物刺激剂修复 30 d 时, 上述 7 种 PLFA 单体中 $^{13}\text{C}$  总量增加至  $92.84 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , 5 种可同化代谢十六烷的微生物类群中,  $G^+$ 菌(i15:0+a15:0)和真菌(18:1 $\omega$ 9c)PLFA 中 $^{13}\text{C}$  含量分别增加了  $6.72 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  和  $5.94 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , Unspecific 菌、 $G$ 菌、放线菌 PLFA 中 $^{13}\text{C}$  含量变化不大.

加入有机肥进行修复处理 30 d, 7 种 PLFA 单体中 $^{13}\text{C}$  总量增加至  $142.67 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , 5 种微生物类群 PLFA 中 $^{13}\text{C}$  含量均增加, 其中  $G^+$ 菌(i15:0+a15:0)、Unspecific 菌(16:00)、放线菌(6:0(10Me))PLFA 中的 $^{13}\text{C}$  含量增加最明显, 增量分别为 31.77、10.19、9.11  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . 说明向十六烷污染土壤中加入硝酸钾或者有机肥进行修复处理, 可以提高土壤微生物类群对十六烷的同化利用, 但是两种修复剂对土壤中不同微生物类群代谢十六烷的激活作用上存在差异, 加入有机肥修复处理对微生物同化代谢污染物的激活作用更为显著.

图 5 为不同生物类群 PLFA 单体中的 $^{13}\text{C}$  含量, 图 6 为不同处理土壤中各类群 PLFA 利用 $^{13}\text{C}$  的相对丰度. 根据图 5 和图 6, 在加入硝酸钾修复的土壤中, 各微生物类群 PLFA 中 $^{13}\text{C}$  含量由高到低顺序为:  $G^+$ 菌>真菌> Unspecific 菌>  $G$ 菌>放线菌; 加入有机肥修复的土壤中各微生物类群的 $^{13}\text{C}$  含量由高到低的顺序为:  $G^+$ 菌>Unspecific 菌>真菌>  $G$ 菌>放线菌. 总体上, 两种修复处理的土壤中革兰氏阳性菌对十六烷的利用率最高, 放线菌对十六烷的利用率最低. 加入有机肥修复处理可显著促进  $G^+$ 菌和 Unspecific 菌对十六烷的同化代谢.

不同类群微生物的磷脂脂肪酸(PLFA)组成具有一定差异, 因此 PLFA 可用于表征土壤中各微生物类群的活性. PLFA 单体中的碳主要来源于土壤有机质以及添加的外源碳(该文中为 $^{13}\text{C}$ -十六烷中的碳), 因此可利用 $^{13}\text{C}$ -SIP-PLFA 技术研究可利用十六烷进行同化代谢作用的微生物群落变化情况. 土壤中外碳源的大量引入导致了土壤中氮素的相对不足. 在对石油烃污染土壤进行修复时, 根据石油烃中碳素含量(一般按石油烃含量的 85% 计), 加入硝酸钾等外源氮调节土壤 C/N 比(一般为 10/1)是常用的污染土壤修复方式. 有研究认为外源氮的加入可提高土壤中石油烃降解功能菌的活性<sup>[21]</sup>, 也有研究认为在加入硝态氮修复柴油污染土壤时, 从亚硝酸盐到铵的转化受到低丰度亚硝酸盐还原酶

的限制,进而降低了石油烃的降解速率<sup>[22]</sup>。本文利用硝酸钾作为生物刺激剂对污染土壤修复 30 d,可有效提高土壤中十六烷的去除效率。PLFA 分析结果表明,加入硝酸钾进行生物刺激修复使得土壤中活性微生物数量略有降低(土壤 PLFA 总量由  $82.8 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$  降低至  $79.7 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ),但是 PLFA 中的<sup>13</sup>C 含量、尤其是 G<sup>+</sup>菌和真菌 PLFA 中<sup>13</sup>C 含量明显增加,说明在加入硝酸钾修复的土壤中,尽管烷烃降解功能类群对十六烷同化代谢作用的增强与烷烃降解效率存在一定的相关关系,但土壤中总微生物活性并不能指示功能类群对十六烷的同化代谢作用。

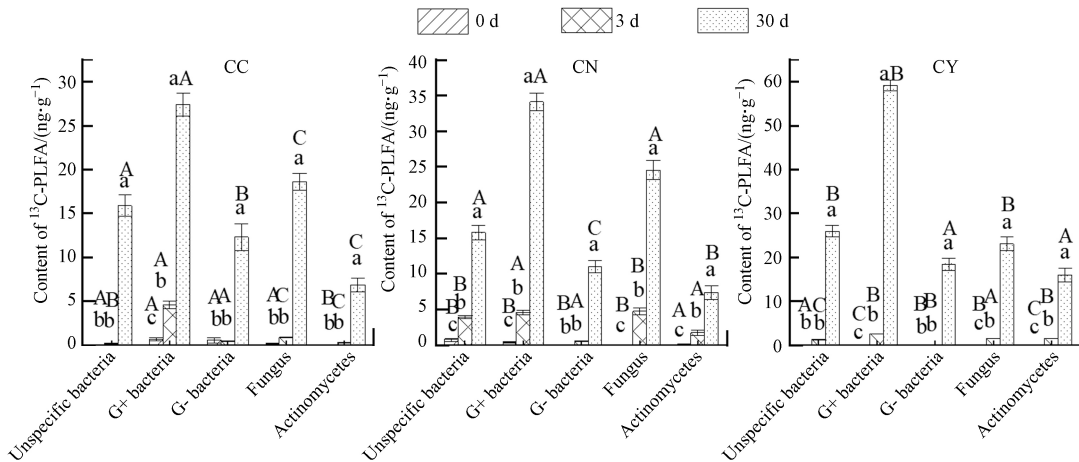


图 5 不同处理下土壤微生物类群中<sup>13</sup>C 含量

(不同小写字母表示相同处理下不同时期<sup>13</sup>C-PLFA 含量差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示同一微生物类群不同处理下<sup>13</sup>C-PLFA 含量差异显著( $P < 0.05$ ))

Fig.5 The amount of <sup>13</sup>C-PLFA in microbiota in different treatments

(Different lowercase letters indicated a significant difference of <sup>13</sup>C-PLFA content in different periods under the same treatment ( $P < 0.05$ ), and different uppercase letters indicate that a significant difference of <sup>13</sup>C-PLFA content in different treatments of the same microbial group ( $P < 0.05$ ))

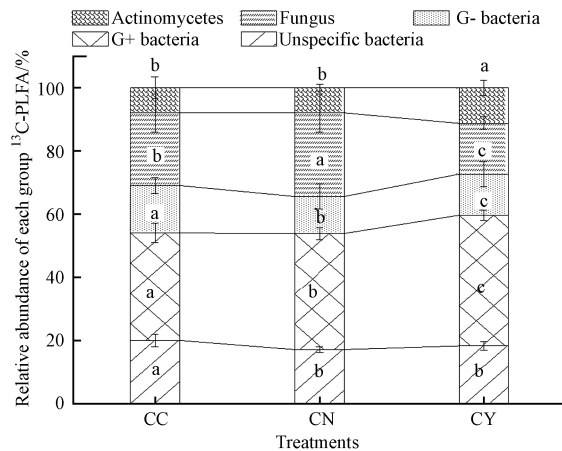


图 6 修复 30 d 时不同处理土壤中各微生物类群 PLFA 利用<sup>13</sup>C 的相对丰度

(不同小写字母表示不同处理土壤中相同类群微生物的<sup>13</sup>C-PLFA 差异显著( $P < 0.05$ ))

Fig.6 The relative abundance of <sup>13</sup>C incorporated in microbial PLFAs in different treatments

(Different lowercase letters indicated a significant difference of <sup>13</sup>C-PLFA contents in different treatments of the same microbial group ( $P < 0.05$ ))

有机肥中含有丰富的微生物和养分.农业上向种植作物的土壤中施入有机肥能改善作物根际微生物菌群,提高植物的抗病虫能力<sup>[23]</sup>。在环境领域,用有机肥作为生物刺激剂修复污染土壤,可促进石油烃污染物的降解<sup>[24-25]</sup>。本文中,有机肥的施入显著提高了土壤微生物的总 PLFA 含量,并且各微生物类群 PLFA 中的<sup>13</sup>C 含量也明显增加,说明有机肥的施入同时提高了土壤总微生物和烷烃代谢功能类群的活性.这与施入硝酸钾修复对土壤总微生物活性的影响作用存在差异.多数农田中革兰氏阳性菌数量多于阴性菌<sup>[16]</sup>。本文中 3 种修复处理土壤中 G<sup>+</sup>/G<sup>-</sup>的 PLFA 比值约为 0.55—0.60,可能是由于重度烃污染改变了土壤中 G<sup>+</sup>/G<sup>-</sup>微生物的类群分布,使得土壤中革兰氏阴性菌数量多于阳性菌.一些文献报道



了在石油烃污染的土壤中,大量的革兰氏阴性菌(主要是变形菌)得以富集<sup>[26-27]</sup>,论文的研究结果和文献报道一致. Atlas 和 Bartha<sup>[28]</sup> 利用 r-K 繁殖策略对土壤受到石油烃污染后革兰氏阴性菌的富集进行解释,认为革兰氏阴性菌多是 r-繁殖策略者,增殖速率快且种群增长率大,因此能够在重度污染的土壤环境中短时间内快速繁殖.

尽管在重度烃污染的土壤中富集生长了大量的革兰氏阴性菌,然而,污染土壤中革兰氏阳性菌的<sup>13</sup>C-PLFA 含量却高于革兰氏阴性菌,革兰氏阳性菌是对十六烷同化代谢能力最强的微生物类群. 加入两种不同生物刺激剂进行修复处理时,G<sup>+</sup>菌 PLFA 中的<sup>13</sup>C 增量最多,说明生物刺激修复对 G<sup>+</sup>菌同化代谢十六烷的激活效应最强. 可能是由于 G<sup>+</sup>菌具有较厚而致密的肽聚糖层(20—80 nm),对于外部环境变化具有更强的适应特性,使得许多革兰氏阳性菌在污染环境条件下产生的芽孢对于生物刺激剂具有更好的应激效应<sup>[29-30]</sup>. 另一方面,加入硝酸钾进行修复处理使得 G<sup>+</sup>菌和真菌 PLFA 中<sup>13</sup>C 含量增加显著(增量为 6.72 ng·g<sup>-1</sup> 和 5.94 ng·g<sup>-1</sup>),而加入有机肥修复处理显著增加了 G<sup>+</sup>菌、Unspecific 菌、放线菌 PLFA 中的<sup>13</sup>C 含量(增量分别为 31.77、10.19、9.11 ng·g<sup>-1</sup>),两种修复处理对烷烃代谢功能类群的激活效应存在差异,进一步说明两种修复剂对土壤中十六烷同化代谢菌的激活机制上存在差异.

根据文献报道,有机肥对土壤中有机污染物的去除作用,一方面是由于堆肥的保水、保温能力及堆肥中丰富的营养可提高土著微生物的活性. 另一方面,堆肥中的腐殖质可以降低土壤有机质对有机污染物的吸附锁定作用. 此外,有机肥中蕴含的微生物与土壤中土著微生物存在一定的作用关系(种间共处或者互生),进而促进了十六烷的降解<sup>[31]</sup>.

课题组的前期研究表明,加入有机肥对石油污染土壤进行修复处理,土壤微生物多样性增加,土著优势菌属的生长则受到抑制,非优势菌的生长得以促进,同时出现了一些新的降解菌属<sup>[31]</sup>. 本文中,加入有机肥修复的土壤中微生物 PLFA 含量和<sup>13</sup>C-PLFA 含量显著增加,说明有机肥的加入促进了土壤微生物活性和对烷烃的代谢,有机肥中的微生物和土壤土著微生物之间可能存在协同作用关系.

### 3 结论(Conclusion)

十六烷污染的土壤中,各微生物类群 PLFA 含量由高到低依次为: G<sup>+</sup>菌>G<sup>-</sup>菌>放线菌>Unspecific 菌>真菌. 向十六烷重度污染的土壤中加入硝酸钾和有机肥均能促进十六烷的降解. 加入 KNO<sub>3</sub> 修复处理降低了总 PLFA 含量,但是使得 G<sup>+</sup>菌和真菌 PLFA 中<sup>13</sup>C 含量增加显著. 施入有机肥可显著增加土壤中总 PLFA 含量,同时使得 G<sup>+</sup>菌和放线菌 PLFA 中的<sup>13</sup>C 含量增加显著. 土壤总微生物活性并不能指示烷烃的生物降解效率,烷烃降解功能类群对烷烃同化代谢作用的增强与石油烃的降解效率存在一定的相关关系. 不同生物刺激剂对土壤中的十六烷同化代谢菌的激活机制上存在差异.

#### 参考文献 (References)

- [1] SAFDARI M S, KARIMINIA H R. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 342: 270-278.
- [2] NIKOLOPOULOU M, PASADAKIS N, NORF H, et al. Enhanced *ex situ* bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 77(1/2): 37-44.
- [3] WU M L, WU J L, ZHANG X H, et al. Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil[J]. *Chemosphere*, 2019, 237: 124456.
- [4] VARJANI S, UPASANI V N. Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 245: 358-366.
- [5] BAO Y J, XU Z X, LI Y, 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.
- [6] IQBAL A, MUKHERJEE M, RASHID J, et al. Development of plant-microbe phytoremediation system for petroleum hydrocarbon degradation: An insight from alkb gene expression and phytotoxicity analysis[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 671: 696-704.
- [7] TARTAGLIA M, SCIARRILLO, ZUZOLO D, et al. Exploring an enhanced rhizospheric phenomenon for pluricontaminated soil remediation: Insights from tripartite metatranscriptome analyses[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 428: 128246.
- [8] 吴蔓莉,陈凯丽,叶茜琼,等.堆肥-生物强化对重度石油污染土壤的修复作用[J].*环境科学*, 2017, 38(10): 4412-4419.  
WU M L, CHEN K L, YE X Q, et al. Remediation of petroleum-contaminated soil using a bioaugmented compost technique[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(10): 4412-4419(in Chinese).

- [9] LI Q Q, LI J B, JIANG L F, et al. Diversity and structure of phenanthrene degrading bacterial communities associated with fungal bioremediation in petroleum contaminated soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 403: 123895.
- [10] AMBUST S, DAS A J, KUMAR R. Bioremediation of petroleum contaminated soil through biosurfactant and *Pseudomonas* sp. SA3 amended design treatments[J]. *Current Research in Microbial Sciences*, 2021, 2: 100031.
- [11] LI Q, HUANG Y, WEN D, et al. Application of alkyl polyglycosides for enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil using *Sphingomonas changbaiensis* and *Pseudomonas stutzeri*[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 719: 137456.
- [12] 祁燕云, 吴蔓莉, 祝长成, 等. 基于高通量测序分析的生物修复石油污染土壤菌群结构变化[J]. *环境科学*, 2019, 40(2): 869-875. QI Y Y, WU M L, ZHU C C, et al. Microbial community structure shift during bioremediation of petroleum contaminated soil using high throughput sequencing[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(2): 869-875(in Chinese).
- [13] 高士杰, 王春梅, 王鹏, 等. 多形态多水平氮添加对温带森林土壤根系呼吸和微生物呼吸的影响[J]. *环境化学*, 2020, 39(6): 1568-1577. GAO S J, WANG C M, WANG P, et al. Effects of multi-form and multi-level nitrogen addition on root respiration and microbial respiration in temperate forest soil[J]. *Environmental Chemistry*, 2020, 39(6): 1568-1577(in Chinese).
- [14] 任慧琴, 赵念席, 陈磊, 等. 土壤微生物群落结构分析中磷脂脂肪酸法和温和碱性甲酯化法的比较及定量优化[J]. *环境化学*, 2014, 33(5): 760-764. REN H Q, ZHAO N X, CHEN L, et al. Comparison of phospholipid fatty acid method and mild alkaline methylesterification method in characterizing soil microbial communities and quantitative optimization[J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(5): 760-764(in Chinese).
- [15] 陈展, 王效科, 尚鹤.  $^{13}\text{CO}_2$  示踪臭氧胁迫对水稻土壤微生物的影响[J]. *环境科学*, 2014, 35(10): 3911-3917. CHEN Z, WANG X K, SHANG H. Ozone effects on soil microbial community of rice investigated by  $^{13}\text{C}$  isotope labeling[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(10): 3911-3917(in Chinese).
- [16] 邓少虹, 郑小东, 毛婉琼, 等. 稻田与旱地土壤中真菌和细菌对秸秆碳的利用特征[J]. *环境科学*, 2022, 43(2): 1069-1076. DENG S H, ZHENG X D, MAO W Q, et al. Characteristics of microbial utilization for crop residue-derived C in paddy and upland soils[J]. *Environmental Science*, 2022, 43(2): 1069-1076(in Chinese).
- [17] 王伟华, 刘毅, 唐海明, 等. 长期施肥对稻田土壤微生物量、群落结构和活性的影响[J]. *环境科学*, 2018, 39(1): 430-437. WANG W H, LIU Y, TANG H M, et al. Effects of long-term fertilization regimes on microbial biomass, community structure and activity in a paddy soil[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(1): 430-437(in Chinese).
- [18] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000. BAO S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3<sup>rd</sup> edition. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2000(in Chinese).
- [19] 许殿瑞. 陕北采油区土壤微生物群落结构及对石油烃组分的利用机制[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2021. XU Y R. Soil microbial community structure and utilization mechanism of petroleum hydrocarbon components in oil production area of northern Shaanxi[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2021(in Chinese).
- [20] LIU L, ESTIARTE M, BENGTON P, et al. Drought legacies on soil respiration and microbial community in a Mediterranean forest soil under different soil moisture and carbon inputs[J]. *Geoderma*, 2022, 405: 115425.
- [21] MAIR J, SCHINNER F, MARGESIN R. A feasibility study on the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site: Effects of temperature and biostimulation[J]. *Cold Regions Science and Technology*, 2013, 96: 122-128.
- [22] GAO Y C, DU J, BAHAR M M, et al. Metagenomics analysis identifies nitrogen metabolic pathway in bioremediation of diesel contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2021, 271: 129566.
- [23] 刘春柱, 侯萌, 张晴, 等. 长期施入不同量有机肥对农田黑土土壤养分、产量的影响[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(8): 68-71. LIU C Z, HOU M, ZHANG Q, et al. Effect of long-term application of different amounts of organic fertilizer on black soil nutrients and yield[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, 33(8): 68-71(in Chinese).
- [24] VENTORINO V, PASCALE A, FAGNANO M, et al. Soil tillage and compost amendment promote bioremediation and biofertility of polluted area[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 239: 118087.
- [25] WU M L, GUO X Q, WU J L, et al. Effect of compost amendment and bioaugmentation on PAH degradation and microbial community shifting in petroleum-contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2020, 256: 126998.
- [26] ZHANG D C, MORTELMAIER C, MARGESIN R. Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 421/422: 184-196.
- [27] MARGESIN R, HÄMMERLE M, TSCHERKO D. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: Effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(2): 259-269.
- [28] ATLAS R M, BARTHA R. Microbial ecology: Fundamentals and applications[M]. Pearson Education India, 1998.
- [29] 顾夏生, 胡洪营, 王慧等. 水处理生物学[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2010. GU X S, HU H Y, WANG H, et al. Biology for water and wastewater treatment[M]. Beijing: China Architecture & Building Press, 2010(in Chinese).
- [30] LAMONACA F, PIZZUTI G, ARCURI N, et al. Monitoring of environmental parameters and pollution by fungal spores in the National Gallery of Cosenza: A case of study[J]. *Measurement*, 2014, 47: 1001-1007.
- [31] 吴蔓莉, 祁燕云, 祝长成, 等. 堆肥对土壤中石油烃的去除及微生物群落的影响[J]. *中国环境科学*, 2018, 38(8): 3042-3048. WU M L, QI Y Y, ZHU C C, et al. Influence of compost amendment on hydrocarbon degradation and microbial communities in petroleum contaminated soil[J]. *China Environmental Science*, 2018, 38(8): 3042-3048(in Chinese).