

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2015.0577

樊诗亮,何丽芝,秦华,等.2016.生物质炭对邻苯二甲酸二丁酯污染土壤微生物群落结构多样性的影响[J].环境科学学报,36(5):1800-1809

Fan S L, He L Z, Qin H, et al. 2016. Effect of biochar on diversity of microbial community in soils contaminated with dibutyl phthalate[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 36(5): 1800-1809

生物质炭对邻苯二甲酸二丁酯污染土壤微生物群落结构多样性的影响

樊诗亮^{1,2}, 何丽芝^{1,2}, 秦华^{1,2}, 杨兴¹, 王海龙^{1,2,*}

1. 浙江省土壤污染生物修复重点实验室, 临安 311300

2. 浙江农林大学环境与资源学院, 临安 311300

收稿日期: 2015-06-24

修回日期: 2015-07-21

录用日期: 2015-07-21

摘要:在邻苯二甲酸二丁酯(DBP)污染的不同类型土壤(有机质含量低的新垦红壤、有机质含量高的熟化红壤)中添加不同种类(稻草炭、毛竹炭)以及不同用量(0%、0.5%和2%)的生物质炭,温室种植上海青并在56 d后采集土样,采用磷脂脂肪酸法(PLFA)考察了土壤类型、生物质炭种类以及用量对土壤微生物群落结构多样性的影响。结果表明:对细菌、真菌及微生物总 PLFA 这三者的含量而言,熟化红壤显著($p < 0.05$)高于新垦红壤,熟化红壤中添加2%稻草炭使其显著($p < 0.05$)增加,新垦红壤中添加毛竹炭使其显著($p < 0.05$)降低。新垦红壤中添加2%稻草炭对革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌比值的增加效果最显著($p < 0.05$),添加2%毛竹炭对土壤微生物群落 Shannon 指数的降低效果最显著($p < 0.05$)。添加2%稻草炭对 DBP 污染土壤中微生物压力指数降低效果最显著($p < 0.05$)。生物质炭对熟化红壤中真菌/细菌、革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌及微生物群落 Shannon 指数均无显著影响。PCA 分析表明,土壤有机质含量以及生物质炭的种类和用量均会对土壤微生物群落结构产生一定影响,且生物质炭的影响与土壤有机质含量密切相关。

关键词:生物质炭;邻苯二甲酸二丁酯;土壤微生物群落结构;磷脂脂肪酸

文章编号:0253-2468(2016)05-1800-10

中图分类号:X172

文献标识码:A

Effect of biochar on diversity of microbial community in soils contaminated with dibutyl phthalate

FAN Shiliang^{1,2}, HE Lizhi^{1,2}, QIN Hua^{1,2}, YANG Xing¹, WANG Hailong^{1,2,*}

1. Key Laboratory of Soil Contamination Bioremediation of Zhejiang Province, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300

2. School of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300

Received 24 June 2015;

received in revised form 21 July 2015;

accepted 21 July 2015

Abstract: A 56-day incubation experiment was conducted to evaluate the effects of biochar types (bamboo biochar and straw biochar) and application rates (0%, 0.5% and 2%) on the diversity of microbial community in two soils contaminated with dibutyl phthalate (DBP). Diversity of microbial community was analyzed by the phospholipid fatty acids (PLFA) method. The results showed that the bacterial PLFA, fungal PLFA and microbial community's total PLFA of the high organic matter content soil was significantly ($p < 0.05$) higher than those of the low organic matter soil. Bacterial PLFA, fungal PLFA and microbial community's total PLFA of the high organic matter soil showed a significant ($p < 0.05$) increase in the 2% straw biochar treatment, whereas a significant ($p < 0.05$) reduction in the PLFA values of the low organic matter soil was observed in the bamboo biochar treatments. In the low organic matter soil, the ratio of Gram-negative bacteria/Gram-positive bacteria reached the highest level in the 2% straw biochar treatment, whereas the soil microbial community Shannon Index reached the lowest level in the 2% bamboo biochar treatment. The soil microbial stress level reached the lowest level in the 2% straw biochar treatment. The biochar type and application rate had no significant influence on the fungi-to-bacteria ratio, Gram-negative bacteria-to-Gram-positive bacteria ratio, and the microbial community Shannon Index in the soil with high organic matter content. Based on principal component analysis, biochar type and application rate could influence soil microbial community structure, which was closely related to the soil organic matter content.

基金项目:国家自然科学基金项目(No.41271337);浙江省自然科学基金重点项目(No.LZ15D010001)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.41271337) and the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No. LZ15D010001)

作者简介:樊诗亮(1989—),男,E-mail:fanshiliang@163.com; *通讯作者(责任作者),E-mail:hailong@zafu.edu.cn

Biography: FAN Shiliang (1989—), male, E-mail:fanshiliang@163.com; * Corresponding author, E-mail:hailong@zafu.edu.cn

Keywords: biochar; dibutyl phthalate; soil microbial community structure; phospholipid fatty acids

1 引言 (Introduction)

邻苯二甲酸酯 (Phthalic Acid Esters, PAEs) 也称为酞酸酯,是目前使用量最大、范围最广的一类增塑剂,被广泛应用于农田地膜、温室大棚及农药等生产中 (He *et al.*, 2015). 邻苯二甲酸二丁酯 (Dibutyl phthalate, DBP) 作为其中一种最常见的塑化剂,可通过淋溶、迁移等方式进入土壤中被土壤颗粒吸附,如鸡西的蔬菜设施栽培基地土壤中的 DBP 含量达到 $16.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (杨影州, 2010), 山东寿光设施蔬菜地土壤中 DBP 含量在 $2.27 \sim 20.54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 之间 (王丽霞, 2007), 已远远超过美国土壤 DBP 化合物控制标准 ($\text{DBP } 0.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) (刘玲玲等, 2010). 土壤中高浓度的 DBP 会抑制土壤过氧化氢酶的活性,减少土壤微生物量,降低土壤微生物群落结构多样性,威胁土壤微生物生态系统的稳定性 (高军等, 2008). 土壤微生物作为土壤圈极为重要的组成部分,在促进能量流动、推动生物地球化学循环方面发挥着重要作用 (李晶等, 2013). 此外,土壤微生物能敏锐地反映出土壤环境条件的变化,是土壤污染最有潜力的敏感指标 (Manickam *et al.*, 2010; 黄昌勇等, 2007). 因此,如何降低 DBP 对土壤微生物的危害成为研究的重点.

生物质炭 (biochar) 是由生物质如农林废弃物、动物残体等在无氧或厌氧的条件下,经过高温热裂解炭化而形成的一种富含碳素的、稳定的、高度芳香化的黑色固体物质 (李力等, 2011; Wang *et al.*, 2010). 生物质炭作为一种绿色能源产物,其化学性质稳定,具有较大的比表面积和微孔结构以及丰富的官能团,能吸附土壤中的有机污染物,降低有机污染物的生物有效性和环境风险 (Song *et al.*, 2013), 是理想的土壤改良剂和修复剂. 生物质炭本

身含有的多种矿质营养元素,不仅可以提高土壤肥力 (Zwieten *et al.*, 2010), 增加土壤有机质含量,还可为土壤微生物提供新的碳源、繁衍栖息场所以及营养元素,对特定微生物的发育具有促进作用 (Steiner *et al.*, 2007; 王晓辉等, 2013). 近几年已有许多研究指出,生物质炭可改善土壤微生物群落结构多样性 (Grossman *et al.*, 2010; Lehmann *et al.*, 2011). 然而,生物质炭对有机污染土壤,尤其是 DBP 污染土壤中微生物群落结构多样性的影响目前尚未见报道.

本实验采用磷脂脂肪酸 (Phospholipid Fatty Acids, PLFA) 分析技术,从微生物学的角度研究生物质炭种类、用量以及土壤有机质含量对 DBP 污染土壤微生物群落结构多样性的影响,以期利用生物质炭改善土壤微生物学特性和修复 DBP 污染土壤提供理论依据.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 供试土壤样品

土壤样品采集自浙江省临安市胡塘下村两块相邻蔬菜种植基地上,地块一是经过长期种植的菜园土 (熟化红壤), 地块二是新垦空置土壤 (新垦红壤), 两种土壤成土过程相同,但有机质含量差异大 (表 1). 采集表层土 ($0 \sim 20 \text{ cm}$), 剔除土壤样品中的杂质物, 风干过 2 mm 筛后备培养实验所用, 参考《土壤农业化学分析方法》测定供试土壤的基本理化性质 (鲁如坤, 2000), 详见表 1. 其中,土壤有机质含量采用重铬酸钾容量法测定; 土壤 pH 值是在水土比为 $5:1$ 时,利用 FE20 型酸度计 (梅特勒-托利多仪器有限公司) 测定; 土壤阳离子交换量采用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵提取法测定; 土壤全氮采用半微量凯氏法测定.

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties

土壤类型	有机质碳/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	pH(H_2O)	阳离子交换量/ ($\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全氮	矿物类型	粘粒	粉粒	沙粒
熟化红壤	65.51	6.04	5.09	0.20%	高岭石	16.9%	44.4%	38.7%
新垦红壤	10.34	5.83	4.13	0.03%	高岭石	16.4%	45.0%	38.6%

2.2 供试生物质炭

通过高温热解炉在 $500 \text{ }^\circ\text{C}$ 的无氧条件下将稻草和毛竹热解 3 h 后得到本实验所需的稻草炭和毛竹

炭,将两种生物质炭研磨后过 40 目筛并测定其基本理化性质,结果如表 2 所示. 生物质炭的比表面积利用表面分析仪 (ASPA 2020M, 美国美克公司) 测定;

pH 值根据 GBT12496.7—1999 方法测定;碳(C)、氢(H)和氮(N)含量采用元素分析仪(Flash EA1112, Thermo Finnigan, Italy)测定;灰分含量根据

GBT12496.3—1999 方法测定;有机碳含量测定采用 IBI(2013)标准方法,即用全碳含量减去无机碳含量计算。

表 2 供试生物质炭的基本理化性质

Table 2 Basic physical and chemical properties of tested biochar

生物质炭类型	比表面积/ ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	pH	C	H	N	H/C	灰分含量	有机碳含量
稻草炭(S)	2.89	10.05	56.94%	1.93%	1.02%	0.41	27.71%	51.81%
毛竹炭(B)	0.0018	9.38	85.20%	2.69%	0.82%	0.39	2.91%	82.37%

2.3 试验设置

将 8 g DBP 溶于甲醇溶液中,得到浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DBP 溶液.以熟化红壤(H)和新垦红壤(L)为供试土壤,取 850 mL 的上述溶液喷施到 850 g 过 2 mm 筛的供试土壤中混合均匀,制备浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的污染土壤,多次翻动以使甲醇完全挥发.每种土壤类型设置如下处理:①对照(CK):不添加生物质炭的 DBP 污染土壤处理;②在 DBP 污染的土壤中分别添加 0.5%、2% 稻草炭(S 0.5%、S 2%)以及添加 0.5%、2% 毛竹炭(B 0.5%、B 2%).共计 10 个处理,每个处理设置 3 个重复.取 3.5 kg

配制好的土样放入白瓷盆中,并按照 $\text{N } 0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ } 0.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\text{K}_2\text{O } 0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例添加肥料,从盆底部吸水至表面湿润后种植上海青,每周 2~3 次浇水,保持土壤湿度为田间最大持水量 60% 左右.所有盆钵随机摆放在玻璃温室中,培养 56 d 后收获,采集新鲜土样,去除植物根系后过 2 mm 筛,冷冻干燥,将土壤样品保存于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中待测。

2.4 土壤微生物磷脂脂肪酸分析

PLFA 提取及分析参照 Qin 等(2014)方法.根据已有文献对土壤微生物 PLFA 进行分类,详见表 3。

表 3 主要表征微生物的特征磷脂脂肪酸(PLFA)

Table 3 Main phospholipid fatty acids(PLFA) to characterize microbes

微生物类型	特征 PLFA 标记	参考文献
细菌	i14:0、i15:0、i15:0、a15:0、i16:0、i17:0、i17:0、a17:0、i19:0、cy17:0、cy19:0、16:1 ω 7c、18:1 ω 7c	Frostegård <i>et al.</i> , 1996; Frostegård <i>et al.</i> , 1993; Smithwick <i>et al.</i> , 2005
真菌	18:3 ω 6c(6,9,12)、18:1 ω 9c	Frostegård <i>et al.</i> , 1996; Zelles, <i>et al.</i> , 1995
革兰氏阴性菌	cy17:0、cy19:0、16:1 ω 7c	汪润池等, 2012
革兰氏阳性菌	i14:0、i15:0、a15:0、i16:0、a17:0、i17:0	Frostegård <i>et al.</i> , 1993; Smithwick <i>et al.</i> , 2005
放线菌	17:0 10Me、18:0 10Me	Frostegård <i>et al.</i> , 1996; 张秋芳等, 2009

注:i、a、cy、Me 分别代表异、反异、环状和甲基分支脂肪酸,10Me 表示第 10 个碳原子上有一个甲基团(从羟基端算起), ω 代表脂肪端,c 表示顺式空间构造的脂肪酸。

2.5 数据分析

实验数据分析采用 Microsoft Excel 2007.采用 SPSS 17.0 对同一类型土壤样品处理进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA),Duncan 分析法计算不同处理差异显著性($p < 0.05$);对同一处理的两种类型土壤样品进行配对 t 检验以分析显著性;利用一般线性模型(general linear model, GLM)进行多因素方差分析,综合评估土壤有机质、生物质炭类型及用量对土壤微生物 PLFA 含量、多样性指数和压力指数的影响.利用 Canoco 软件对各处理中微生物脂肪酸进行主成分分析(Principal Components Analysis, PCA).土壤微生物

群落状态采用 Shannon 指数(H)和微生物压力指数(Stress level)(Hammesfahr *et al.*, 2008)来表示,计算公式如下:

$$H = - \sum p_i \ln p_i \quad (1)$$

$$\text{微生物压力指数} = \frac{\text{cy17:0}}{16:1\omega7c} \quad (2)$$

其中, p_i 表示第 i 种特征 PLFA 与总 PLFA 含量的比值。

3 结果(Results)

3.1 土壤及生物质炭的基本性状

熟化红壤的 pH 值大于新垦红壤,二者均为酸

性土壤 ($\text{pH} < 7$) (表 1). 两种土壤的理化性质基本相同, 且熟化红壤中有机质碳和全氮含量分别新垦红壤的 6.34 倍和 6.67 倍. 添加生物质炭后, 土壤的 pH 值增加, 且随生物质炭含量的升高而增加 (表 4). 其中稻草炭对土壤 pH 值的增加幅度高于毛竹炭, 当

添加 2% 稻草炭时, 熟化红壤和新垦红壤的 pH 分别增加了 0.63 和 1.34 个单位 (表 4), 这是由于稻草炭的 pH 值高于毛竹炭; 且与毛竹炭相比, 稻草炭的比表面积更大, 是毛竹炭的 1605 倍 (表 2).

表 4 生物质炭对土壤 pH 值的影响

Table 4 Effect of biochar on the value of soil pH

处理名称	熟化红壤 (H)					新垦红壤 (L)				
	CK	S 0.5%	S 2%	B 0.5%	B 2%	CK	S 0.5%	S 2%	B 0.5%	B 2%
pH	6.06	6.29	6.69	6.08	6.10	5.43	5.70	6.77	5.46	5.49

3.2 生物质炭对 DBP 污染土壤中细菌、真菌及微生物 PLFA 总量的影响

土壤中细菌 PLFA、真菌 PLFA 及微生物总 PLFA 这三者的含量变化如图 1 所示. 对同一处理中

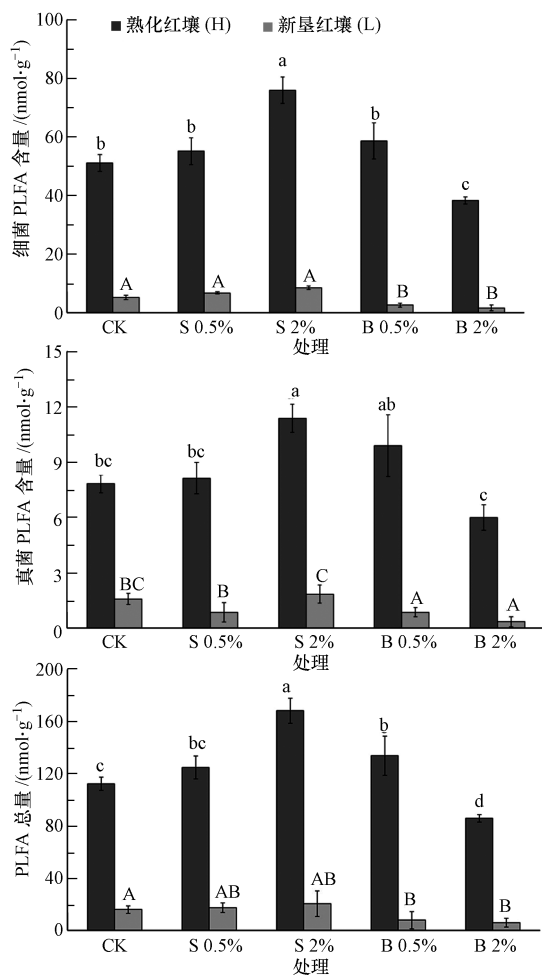


图 1 不同处理中细菌 PLFA、真菌 PLFA 及微生物总 PLFA 的含量 (注: 相同系列字母不同表示不同处理间数据差异达到显著性水平 ($p < 0.05$))

Fig.1 Effect of biochar treatments on the bacterial PLFA, fungal PLFA and total quantity of microbial PLFA in soil

新垦红壤、熟化红壤样品进行配对 t 检验得出 p 值均小于 0.01, 表明熟化红壤各处理中的细菌、真菌及微生物总 PLFA 的含量均极显著 ($p < 0.05$) 高于新垦红壤处理. 与对照相比, 熟化红壤中添加 0.5% 稻草炭对细菌、真菌及微生物总 PLFA 的含量无影响, 而添加 2% 稻草炭显著 ($p < 0.05$) 提高细菌、真菌及微生物总 PLFA 的含量, 分别增加了 48.6%、45.2% 及 49.7%. 添加 0.5% 毛竹炭显著 ($p < 0.05$) 提高了微生物总 PLFA 量, 但是对细菌及真菌没有显著影响, 而 2% 毛竹炭添加量下, 细菌及微生物总 PLFA 的含量分别降低了 25.0% 和 23.6%, 显著 ($p < 0.05$) 低于对照. 与对照相比, 新垦红壤添加稻草炭对细菌、真菌及微生物总 PLFA 的含量无显著影响, 添加毛竹炭显著 ($p < 0.05$) 降低了三者 PLFA 的含量, 但不同毛竹炭添加量对其 PLFA 的含量无影响.

3.3 生物质炭对 DBP 污染土壤中真菌 PLFA/细菌 PLFA 比值的影响

对照及 B 0.5% 处理中, 新垦红壤的真菌/细菌比值均显著 ($p < 0.05$) 高于熟化红壤, S 0.5%、S 2% 及 B 2% 处理中, 新垦红壤的真菌/细菌比值与熟化红壤之间无显著差异 (图 2). 与对照相比, 熟化红壤

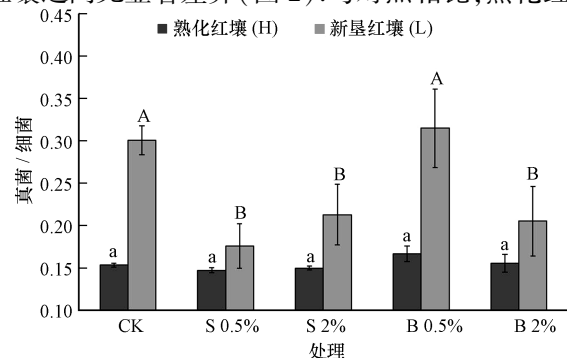


图 2 不同处理样品中真菌 PLFA/细菌 PLFA 的比值

Fig.2 Effect of biochar treatments on the ratio of fungal PLFA to bacterial PLFA

中添加生物质炭对细菌 PLFA/真菌 PLFA 的比值无显著性影响.在新垦红壤中,添加 0.5%或 2%稻草炭较对照均显著($p<0.05$)降低了土壤中真菌/细菌的比值,分别下降了 41.61%或 29.26%.而添加 0.5%毛竹炭对土壤真菌/细菌的比值没有显著影响,仅在 2%的毛竹添加量下,土壤中真菌/细菌比值较对照显著($p<0.05$)降低了 31.81%.

3.4 生物质炭对 DBP 污染土壤中革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌比值的影响

从图 3 可以看出,熟化红壤中革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌的比值均显著($p<0.05$)小于新垦红壤.熟化红壤中添加不同种类和用量的生物质炭对革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌的比值无显著影响.与对照相比,在新垦红壤中添加 0.5%和 2%的稻草炭显著($p<0.05$)增加了革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌的比值,分别为对照的 1.41 倍和 1.56 倍,添加不同量的毛竹炭对革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌的比值无显著性影响.

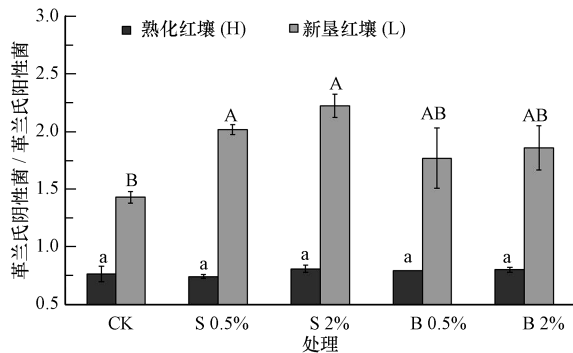


图 3 不同处理样品中革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌的值

Fig.3 Effect of biochar treatments on the ratio of Gram-negative bacteria PLFA to Gram-positive bacteria PLFA

3.5 生物质炭对 DBP 污染土壤中微生物群落多样性指数的影响

根据公式(1)计算不同处理下土壤样品的微生物群落多样性指数(H 值),如图 4 所示,同样的生物质炭添加条件下,熟化红壤中微生物群落 Shannon 指数均显著($p<0.05$)大于新垦红壤,表明熟化红壤中微生物群落多样性比新垦红壤更为丰富.熟化红壤中,添加不同种类、不同用量的生物质炭对土壤微生物群落 Shannon 指数无显著性影响.新垦红壤中添加 2%稻草炭处理中土壤微生物群落 Shannon 指数均显著($p<0.05$)高于添加毛竹炭的处理.与对照相比,添加毛竹炭会显著($p<0.05$)降低微生物群落 Shannon 指数,添加 2%毛竹炭处理中土壤

微生物群落 Shannon 指数最低达到 2.59,比对照显著($p<0.05$)降低了 0.25 个单位.

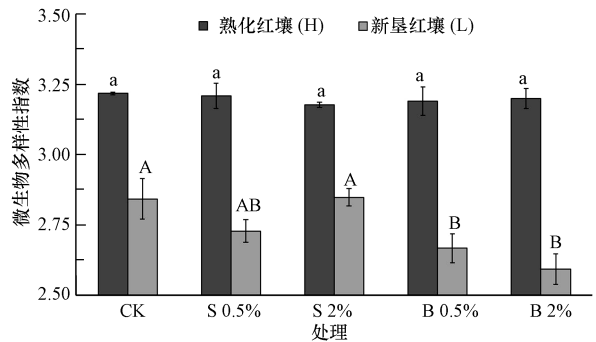


图 4 不同处理样品的微生物群落 (Shannon) 多样性指数(H)

Fig.4 Effect of biochar treatments on the Shannon's index of diversity (H) in soil

3.6 生物质炭对 DBP 污染土壤中微生物压力指数的影响

在 DBP 污染土壤中添加生物质炭,由公式(2)计算出各土壤处理中微生物压力指数(图 5).同一生物质炭相同添加量条件下,熟化红壤中 S 0.5%、S 2%和 B 2%处理的微生物压力指数均显著($p<0.05$)大于新垦红壤,对照与 B 0.5%处理则无显著影响.与对照相比,熟化红壤中添加 2%稻草炭显著($p<0.05$)降低了土壤微生物压力指数.与对照相比,熟化红壤中添加 0.5%毛竹炭显著($p<0.05$)降低了土壤微生物压力指数,而添加 2%毛竹炭时无显著影响.在新垦红壤中,随稻草炭添加量的增加,土壤微生物压力指数均显著($p<0.05$)降低,且添加 2%稻草炭时微生物压力指数显著($p<0.05$)低于添加 0.5%稻草炭的处理,较对照显著($p<0.05$)降低了 39.72%.新垦红壤中随毛竹炭添加量的增加,土壤微生物压力指数较对照显著下降.

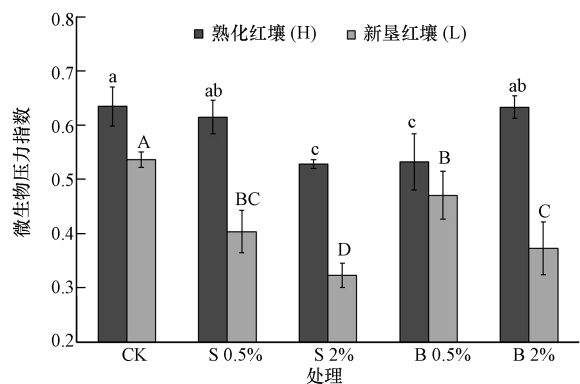


图 5 不同处理中微生物压力指数

Fig.5 Effect of biochar treatments on the soil microbial stress level

3.7 土壤有机质、生物质炭类型及用量对土壤微生物 PLFA 含量、多样性指数和压力指数的影响

多因素方差分析结果表明,土壤有机质含量对土壤微生物总 PLFA、细菌、真菌、革兰氏菌、革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌和 Shannon 指数有显著 ($p < 0.05$) 影响,而对真菌/细菌、微生物压力指数无显著影响(表 4).生物质炭用量仅对革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌的值有显著 ($p < 0.05$) 影响.土壤有机质和

生物质炭类型对细菌和革兰氏阳性菌具有显著 ($p < 0.05$) 的交互作用,而土壤有机质和生物质炭用量对土壤微生物 PLFA 含量无显著影响.生物质炭种类和用量对土壤微生物总 PLFA、细菌、真菌和革兰氏菌有显著 ($p < 0.05$) 的交互作用;生物质炭类型、用量以及土壤有机质对土壤微生物总 PLFA、细菌、革兰氏菌具有显著 ($p < 0.05$) 的交互作用.

表 4 土壤有机质、生物质炭类型及用量对土壤微生物 PLFA 含量、多样性指数和压力指数影响的多因素方差分析

Table 4 Multiple factorial ANOVA of the effects of soil organic matter, biochar type and dosage on the soil microbial PLFA, Shannon index and stress level

方差来源	P (总 PLFA)	P (细菌)	P (真菌)	P (真菌/ 细菌)	P (革兰氏 阳性菌)	P (革兰氏 阴性菌)	P (革兰氏阴 性菌/革兰氏 阳性菌)	P (Shannon 指数)	P (压力指数)
OM	0.004	0.004	0.009	0.151	0.004	0.004	0.010	0.001	0.089
T	0.042	0.035	0.102	0.261	0.032	0.039	0.333	0.318	0.499
D	0.864	0.868	0.957	0.756	0.858	0.653	0.005	0.546	0.400
OM×T	0.091	0.073	0.112	0.310	0.035	0.153	0.299	0.348	0.696
OM×D	0.715	0.959	0.385	0.763	0.902	0.776	0.139	0.346	0.121
T×D	0.015	0.008	0.042	0.474	0.011	0.002	0.530	0.434	0.249
OM×T×D	0.038	0.022	0.110	0.464	0.022	0.011	0.991	0.173	0.058

注:OM 表示土壤有机质;T、D 分别表示生物质炭的类型、用量.

3.8 土壤微生物群落结构的主成分分析

对土壤微生物 PLFA 的主成分分析表明,土壤有机质及新垦红壤中添加毛竹炭对微生物群落结构差异的影响较大(图 6).所有处理提取得出两个主成分,它们共同解释了土壤样品总变异的 93.30%,表明所列各指标的提取信息丢失量小.其中,PC1 解释了土壤样品 78.06%的模式变异系数,权重最大.与熟化红壤相比,新垦红壤不同处理在

PC1 轴上有较好的分离度,生物质炭对土壤微生物群落结构的影响较大,尤其是添加 0.5%毛竹炭的处理,与对照及其他处理明显分离.熟化红壤在 PC1 轴上的值较为集中,生物质炭的种类和用量对土壤微生物群落结构的影响不明显.PC2 解释了土壤样品 17.25%的模式变异系数,从图 6 中可以明显看出,熟化红壤和新垦红壤处理之间具有较大的离散度,表明不同类型土壤的微生物群落结构差异较大.

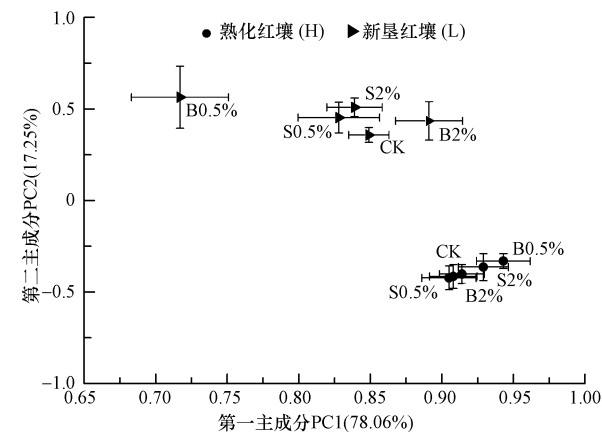


图 6 不同处理土壤中微生物群落 PLFA 的主成分分析

Fig.6 Principal components analysis of PLFA profiles of the soil microbial community with different biochar treatments

各特征 PLFA 在主成分上的载荷因子贡献率分析结果如图 7 所示,PC1 对土壤微生物总 PLFA 数据变异的载荷因子贡献率为 78.06%,特征磷脂脂肪酸 16:1 ω 7c、cy19:0、18:1 ω 9c、18:1 ω 7c、i15:0 等在 PC1 上具有较高的载荷贡献值(均大于 1),可将 PC1 作为它们的代表因子;其中 i15:0、18:1 ω 7c、cy19:0 表征细菌 PLFA,18:1 ω 9c 表征真菌 PLFA,表明新垦红壤和熟化红壤中细菌、真菌的含量较多.PC2 对土壤微生物总 PLFA 数据变异的载荷因子贡献率为 17.25%,16:1 ω 7c、18:3 ω 6c(6,9,12)、cy17:0、18:1 ω 7c 等细菌和真菌的特征脂肪酸在 PC2 的载荷因子贡献率较高,且 cy17:0、16:1 ω 7c 是革兰氏阴性菌的特征脂肪酸.将 PC2 作为它们的代表因子,表明在 DBP 污染的新垦红壤中添加生物质

炭使革兰氏阴性菌和真菌的 PLFA 含量增加。i15:0、cy19:0、a15:0、i17:0、i14:0、10Me17:0 及 10Me18:0 与 PC2 呈较强的负相关,其中 i15:0、a15:0 和 i17:0 是革兰氏阳性菌的特征脂肪酸,10Me17:0 和 10Me18:0 是放线菌的特征脂肪酸,表明在 DBP 污染的熟化红壤中添加生物质炭使革兰氏阳性菌和放线菌的 PLFA 含量增加。

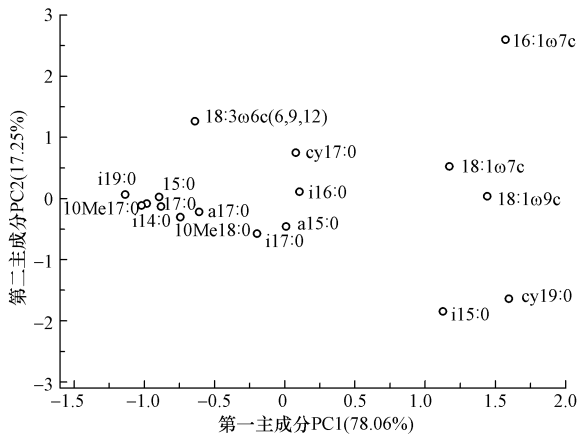


图7 不同处理土壤样品中单体微生物群落 PLFA 的载荷因子贡献率

Fig.7 Eigenvector loading of individual PLFAs contributing to soil microbial community with different biochar treatments

4 讨论 (Discussion)

在 DBP 污染土壤中添加生物质炭可影响土壤微生物区系组成和微生物群落结构多样性及活性的变化 (Anderson *et al.*, 2011; Ducey *et al.*, 2013), 也可促进土壤中细菌和真菌的丰度 (Graber *et al.*, 2010), 主要是由于生物质炭本身具有巨大的比表面积、丰富的多孔性、弱碱性以及能够保持空气、水分和养分等特性, 且能为土壤微生物提供新的碳源和良好的“温床” (Malcolm, 2007). 本研究结果表明, 在熟化红壤中添加 2% 稻草炭对土壤细菌、真菌及微生物总 PLFA 含量的增加效果比毛竹炭更为明显, 这一方面可能是由于本实验采用的稻草炭的比表面积是毛竹炭的 1600 多倍, 能更好地为土壤微生物提供较多的吸附点位和较大的生存空间, 丰富了土壤微生物多样性 (许涛, 2012); 另一方面由于比表面积的稻草炭对 DBP 具有较强的吸附能力, 从而降低 DBP 对土壤微生物的毒害作用, 因此稻草炭更有利于细菌和真菌的生长 (余向阳等, 2007). 同时, 比表面积较大的稻草炭可通过包封作用与吸附保护作用来抑制其吸附的土壤有机质的消解 (Kaiser

et al., 2000), 提高土壤的保肥能力; 且生物质炭本身含有较丰富的矿质养分元素, 施入土壤后可增加土壤中养分含量, 从而有利于土壤微生物的生长、发育和代谢 (Malcolm, 2007; 卜晓莉等, 2014; 王冬冬等, 2013). 生物炭对土壤微生物活性和群落结构组成的改变, 也受到土壤本身性质的影响 (吴萌等, 2015). 熟化土壤中细菌、真菌及微生物总 PLFA 含量高于新垦土壤, 表明土壤有机碳含量越高, 土壤微生物生物量越大. 这是由于有机碳控制着土壤中能量和营养物质的循环, 制约着土壤微生物的活性 (Liu, 2010).

真菌 PLFA/细菌 PLFA 比值的大小可反映出土壤中真菌和细菌这两个菌群的相对丰富程度以及相对含量的变化 (Frostegård *et al.*, 1993), 且真菌 PLFA/细菌 PLFA 的比值越大, 农田土壤生态系统越稳定 (De vries *et al.*, 2006). 从图 1 可以看出, 熟化红壤真菌 PLFA/细菌 PLFA 的比值显著低于新垦红壤. 研究表明, 土壤真菌/细菌的比值与土壤的全氮呈负相关 (张地等, 2012). 不管是在熟化红壤还是在新垦红壤中, 添加稻草炭都会增加土壤中细菌 PLFA 含量, 这可能是由于稻草炭对土壤 pH 值的增加幅度大于毛竹炭, 而细菌 PLFA 的含量会随着土壤 pH 值的增大而增大, 真菌 PLFA 的含量会随着土壤 pH 值的增大而减少 (William *et al.*, 1998), 所以稻草炭处理中细菌 PLFA 的含量会较毛竹炭高, 而真菌 PLFA 的含量则会较毛竹炭低, 由此会造成稻草炭处理中真菌 PLFA/细菌 PLFA 的比值变化不大甚至降低, 而毛竹炭处理中真菌 PLFA/细菌 PLFA 的比值显著升高. 另外, 毛竹炭表面不易沉积可溶性有机物, 如富里酸腐殖酸脂类物质及其他有机物等, 对毛竹炭微孔的阻塞作用小于稻草炭, 造成稻草炭对 DBP 的吸附能力明显下降 (Lu *et al.*, 2012; 何丽芝等, 2015). 因此, 在全氮含量低的新垦红壤中添加 0.5% 的毛竹炭更有利于农田生态系统的稳定性.

本研究表明土壤有机质因素对革兰氏菌以及革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌的比值均有显著影响, 生物质炭的类型对 DBP 污染土壤中革兰氏菌有显著影响, 但是对其比值无显著影响, 这可能是与稻草炭、毛竹炭的组分及结构差异性、供试土壤特性、试验条件等因素有密切的联系 (Kolb *et al.*, 2006). 研究表明, 革兰氏阴性菌更易生长在营养丰富的土壤中, 而革兰氏阳性菌则在资源受限的土壤

中占优势 (Margesin *et al.*, 2009). 在稻草炭处理中, 革兰氏阴性菌的数量显著高于革兰氏阳性菌, 一方面是由于稻草炭高比表面积和多孔性对水肥具有较强的吸附作用, 为革兰氏阴性菌提供生长所需营养, 从而增加革兰氏阴性菌的数量及活性 (Doan *et al.*, 2014); 另一方面是由于革兰氏阴性菌能够更好地将稻草炭作为新的碳源而使其含量增加 (Byss *et al.*, 2008), 这与 Steinbeiss 等 (2009) 的研究结果一致. 而革兰氏阳性菌能形成孢子且本身具有较厚的细胞壁, 对外源有机污染物的胁迫不敏感 (Huang *et al.*, 2009), 因此不同处理中生物质炭种类及添加量的变化对革兰氏阳性菌数量的影响不大. 由此导致革兰氏阴性菌/革兰氏阳性菌的比值主要受革兰氏阴性菌的数量决定 (图 3).

熟化红壤中添加生物质炭对土壤微生物群落结构多样性指数并无显著影响 (图 4), 但是在新垦红壤中添加毛竹炭则显著降低土壤的微生物群落结构多样性, 这可能是由于毛竹炭可能含有的某些有害物质会抑制某种微生物的生长, 从而降低其多样性, 因此毛竹炭的添加对其影响并不显著. 从图 5 中可以看出, 新垦红壤中添加毛竹炭会降低微生物的压力指数, 这是由于毛竹炭虽然会抑制微生物群落的结构多样性, 但是也会吸附有机污染物阻止其对微生物的毒害作用, 促进其他种类微生物的生长. 稻草炭则由于其比毛竹炭更大的比表面积而更有效地吸附有机污染物, 降低土壤微生物的压力指数, 减缓了 DBP 对土壤微生物的毒害作用.

主成分分析法可用来比较土壤微生物群落结构多样性差异的大小, 处理之间分离度越大, 则土壤微生物群落结构的差异性越强. 主成分分析结果表明, 熟化红壤和新垦红壤两者之间的微生物群落结构差异较大, 而熟化红壤、新垦红壤内部处理之间的微生物群落结构差异较小, 这说明了土壤的有机质含量影响了微生物多样性的变异程度, 是影响土壤微生物代谢的主要因素, 与土壤微生物总 PLFA 含量之间具有极显著的相关关系 (向泽宇等, 2014). 在新垦红壤中添加不同含量的毛竹炭比稻草炭对土壤微生物 PLFA 群落结构的差异性影响也不尽相同, 这与生物质炭的微孔结构及其对土壤结构疏松度的改变等因素有关 (Hoshi, 2001). 因此, 土壤有机质含量、生物质炭的种类及用量是影响土壤微生物群落结构差异的主要因素 (图 6). 真菌和细菌是土壤微生物群落的两大优势种群, 本研究结果

表明, DBP 污染土壤中放线菌 PLFA (17:0 10Me、18:0 10Me) 含量较少, 细菌 PLFA 中以 16:1 ω 7c、cy19:0、i15:0、18:1 ω 9c、18:1 ω 7c 和 18:3 ω 6c (6, 9, 12) 的含量较多 (图 7), 这可能与土壤中不同种类微生物对污染物 DBP 的降解或适应能力差异有关.

5 结论 (Conclusions)

1) 土壤有机质含量的高、低对土壤微生物群落结构多样性的影响存在明显差异, 且在有机质含量不同的土壤中添加不同种类、不同用量的生物质炭对土壤微生物群落结构多样性的影响不一致.

2) 在熟化红壤中添加稻草炭会提高土壤中细菌、真菌及微生物总 PLFA 的量; 而在新垦红壤中添加毛竹炭会降低三者 PLFA 的量, 添加稻草炭则无显著影响.

3) 与毛竹炭相比, 稻草炭更能降低 DBP 污染土壤的微生物压力指数, 有利于土壤微生物的生长; 但在新垦红壤中添加毛竹炭对土壤微生物 Shannon 指数具有更好地降低效果.

4) 添加毛竹炭增大了土壤微生物群落结构的差异性; 添加生物质炭可以提高新垦红壤中革兰氏阴性菌和真菌的含量以及熟化红壤中革兰氏阳性菌和放线菌的含量.

责任作者简介:王海龙 (1962—), 教授, 博士生导师. 浙江省特聘教授、“千人计划”入选者. 主要研究领域包括土壤及水体污染修复, 有机废物及生物质炭施用对农林生态环境的影响. 先后主持参与项目 30 余项, 发表论文 200 多篇 (90 余篇 SCI). E-mail: hailong@zafu.edu.cn.

参考文献 (References):

- Anderson C R, Condron L M, Clough T J, *et al.* 2011. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus [J]. *Pedobiologia*, 54: 309-320
- 卜晓莉, 薛建辉. 2014. 生物炭对土壤生境及植物生长影响的研究进展 [J]. *生态环境学报*, 23(3): 535-540
- Byss M, Elhottová D, Tríska J, *et al.* 2008. Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study [J]. *Chemosphere*, 73(9): 1518-1523
- Doan T T, Bouvier C, Bettarel Y, *et al.* 2014. Influence of buffalo manure, compost, vermicompost and biochar amendments on bacterial and viral communities in soil and adjacent aquatic systems [J]. *Applied Soil Ecology*, 73(2): 78-86

- De V, Franciska T, Hoffland, *et al.* 2006. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:2092-2103
- Ducey, Thomas F, James A, *et al.* 2013. Addition of activated switchgrass biochar to an aridic subsoil increases microbial nitrogen cycling gene abundances [J]. *Applied Soil Ecology*, 65(2):65-72
- Frostegård A, Bååth E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 22(1/2):59-65
- Frostegård Å, Bååth E, Tunlio A. 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 25:723-730
- 高军, 陈伯清. 2008. 酞酸酯污染土壤微生物效应与过氧化氢酶活性的变化特征 [J]. *水土保持学报*, 22(6):166-169
- Graber E R, Gerstl Z, Lew B, *et al.* 2012. High surface area biochar negatively impacts herbicide efficacy [J]. *Plant and Soil*, 353(1/2):95-106
- Graber E R, Harel Y M, Kolton M, *et al.* 2010. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media [J]. *Plant and Soil*, 337:481-496
- Grossman J M, O'neill B E, Tsai S M, *et al.* 2010. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy [J]. *Microbial Ecology*, 60(1):192-205
- Hammesfahr U, Holger H, Bert M, *et al.* 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:1583-1591
- He L Z, Fan S L, Müller K, *et al.* 2015. Biochar reduces the bioavailability of di-(2-ethylhexyl) phthalate in soil [J]. *Chemosphere*, 142: 24-27
- 何丽芝, 张小凯, 吴慧明, 等. 2015. 生物质炭及老化过程对土壤吸附吡虫啉的影响 [J]. *环境科学学报*, 35(2):535-540
- Hoshi T. 2001. A practical study on bamboo charcoal use to tea trees. Report on Research by Project (Tokoi University, Japan) 3:1-47
- 黄昌勇, 廖敏, 陈雪花, 等. 2007. 土壤-青菜系统中铅污染对土壤微生物活性及多样性的影响 [J]. *环境科学学报*, 27(2):220-227
- Huang H L, Zhang S Z, Wu N Y, *et al.* 2009. Influence of *Glomus etunicatum* / *Zea mays* mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(4): 726-734
- Kaiser K, Guggenberger G. 2000. The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils [J]. *Organic Geochemistry*, 31:711-725
- Kolb, Simone E, Kevin J F, *et al.* 2009. Effect of charcoal quantity on microbial biomass and activity in temperate soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 73(4):1173-1181
- Lehmann, Johannes, Matthias C, *et al.* 2011. Biochar effects on soil biota-A review [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 43:1812-1836
- 李力, 刘娅, 孙文红, 等. 2011. 生物炭的环境效应及其应用的研究进展 [J]. *环境化学* 30(8):1411-1421
- 李晶, 刘玉荣, 贺纪正, 等. 2013. 土壤微生物对环境胁迫的响应机制 [J]. *环境科学学报*, 33(4):959-967
- 刘玲玲, 姬亚芹, 孙增荣. 2010. 天津市郊区不同土地利用类型土壤中邻苯二甲酸酯含量的调查 [J]. *环境与健康杂志*, 27(8): 690-692
- Liu B R. 2010. Changes in soil microbial biomass carbon and nitrogen under typical plant communities along an altitudinal gradient in east side of Helan Mountain [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 19(4):883-888
- 鲁如坤. 2000. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京:中国农业科技出版社. 205-226
- Lu L, Zhu L Z. 2012. Effect of soil components on the surfactant-enhanced soil sorption of PAHs [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 12(2):161-168
- Malcolm F. 2007. Black carbon sequestration as an alternative to bioenergy [J]. *Biomass and Bioenergy*, 31:426-432
- Manickam N, Pathak A, Saini H S, *et al.* 2010. Metabolic profiles and phylogenetic diversity of microbial communities from chlorinated pesticides contaminated sites of different geographical habitats of india [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4):1458-1468
- Margesin R, Jud M, Tscherko D, *et al.* 2009. Microbial communities and activities in alpine and subalpine soils [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(2):208-218
- Qin H, Philip C B, Xu J M. 2014. *Cucurbita* spp. and *Cucumis sativus* enhance the dissipation of polychlorinated biphenyl congeners by stimulating soil microbial community development [J]. *Environmental Pollution*, 184:306-312
- Smithwick, Erica A H, Turner, *et al.* 2005. Variation in NH_4^+ mineralization and microbial communities with stand age in lodgepole pine (*Pinus contorta*) forests, Yellowstone National Park (USA) [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(8):1546-1559
- Song Y, Wang F, Kengara F O, *et al.* 2013. Immobilization of chlorobenzenes in soil using wheat straw biochar [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(18):4210-4217
- Steinbeiss S, Gleixner G, Antonietti M. 2009. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6):1301-1310
- Steiner C, Wenceslau G, Teixeira, *et al.* 2007. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil [J]. *Plant and Soil*, 291(1-2):275-290
- Wang H, Lin K, Hou Z, *et al.* 2010. Sorption of the herbicide terbutylazine in two New Zealand forest soils amended with biosolids and biochars [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 10(2): 283-289
- William J, Trevors J, Duchesne L, *et al.* 1998. Soil microbial diversity and community structure across a climatic gradient in western Canada [J]. *Biodiversity and Conservation*, 7(8):1081-1092
- 王冬冬, 徐琪, 杨洋, 等. 2013. 基施生物质炭对菜用大豆植株营养吸收及土壤养分供应初报 [J]. *大豆科学*, 32(1):72-75
- 王丽霞. 2007. 保护地邻苯二甲酸酯污染的研究 [M]. 山东:山东农业大学
- 王晓辉, 郭光霞, 郑瑞伦, 等. 2013. 生物炭对设施退化土壤氮相关

- 功能微生物群落丰度的影响 [J]. 土壤学报, 50(3):624-631
- 汪润池, 宗良纲, 邱晓蕾, 等. 2012. 有机与常规种植蔬菜地土壤微生物群落特征的比较 [J]. 南京农业大学学报, 35(2):99-104
- 吴萌, 李明, 李忠佩, 等. 2015. 不同秸秆生物炭对红壤性水稻土养分及微生物群落结构的影响 [J]. 中国农业科学, 48(7):1361-1369
- 向泽宇, 张莉, 张全发, 等. 2014. 青海不同林分类型土壤养分与微生物功能多样性 [J]. 林业科学, 50(4):23-31
- 许涛. 2012. 竹炭对梨园土壤碳-氮-磷及微生物多样性的影响 [M]. 浙江:浙江大学
- 杨影州. 2010. 用气相色谱法测定土壤和蔬菜中 PAEs 的含量 [J]. 中国高新技术企业, (20):39-42
- 余向阳, 张志勇, 张新明, 等. 2007. 黑碳对土壤中毒死蜱降解的影响 [J]. 农业环境科学学报, 26(5):1681-1684
- 张地, 张育新, 曲来叶, 等. 2012. 海拔对辽东栎林地土壤微生物群落的影响 [J]. 应用生态学报, 23(8):2041-2048
- 张秋芳, 刘波, 林营志, 等. 2009. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸 plfa 生物标记多样性 [J]. 生态学报, 29(8):4127-4137
- Zelles L, Bai Q Y, Rackwitz R, *et al.* 1995. Determination of phospholipid-and lipopolysaccharide-derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structures in soils [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 19(2/3):115-123
- Zwieten L V, Kimber S, Morris S, *et al.* 2010. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility [J]. *Plant and Soil*, 327(1/2):235-246