

生物炭原位添加对养殖池塘底泥中微生物群落结构的影响

赵汉胤, 陈潘毅, 唐欣哲, 陈以芹, 李娟英

引用本文:

赵汉胤, 陈潘毅, 唐欣哲, 等. 生物炭原位添加对养殖池塘底泥中微生物群落结构的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(12): 2770-2778.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0434>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

钝化材料对农田土壤Cd形态及微生物群落的影响

兰玉书, 袁林, 杨刚, 程蓉, 石楷岐, 高本汗

农业环境科学学报. 2020, 39(12): 2743-2751 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0637>

南京地区斑点叉尾养殖池塘水体微生物群落结构研究

钟立强, 王明华, 张世勇, 姜虎成, 陈校辉, 朱广伟, 边文冀

农业环境科学学报. 2020, 39(7): 1594-1604 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0157>

黑臭底泥硝酸钙原位氧化的温度影响及微生物群落结构全过程分析

王霖, 种云霄, 余光伟, 龙新宪

农业环境科学学报. 2015(6): 1187-1195 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.06.024>

不同碳氮磷源改良剂对铅锌尾矿废弃地土壤微生物群落结构的影响

杨胜香, 李凤梅, 彭禧柱, 曹建兵, 高智席

农业环境科学学报. 2019, 38(6): 1256-1264 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1594>

四种生物炭对潮土土壤微生物群落结构的影响

陈义轩, 宋婷婷, 方明, 于志国, 李洁, 赖欣, 张贵龙

农业环境科学学报. 2019, 38(2): 394-404 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0966>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

赵汉胤, 陈潘毅, 唐欣哲, 等. 生物炭原位添加对养殖池塘底泥中微生物群落结构的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(12): 2770–2778.

ZHAO H Y, CHEN P Y, TANG X Z, et al. Effects of *in-situ* biochar amendment on the microbial community structure of sediments in aquaculture ponds[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(12): 2770–2778.



开放科学 OSID

生物炭原位添加对养殖池塘底泥中微生物群落结构的影响

赵汉胤¹, 陈潘毅¹, 唐欣哲², 陈以芹¹, 李娟英^{1*}

(1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306; 2. 上海中学东校, 上海 201306)

摘要:为深入了解生物炭添加对养殖底泥微生物群落结构的影响,采用高通量测序方法,分析了在养殖池塘现场原位修复期间,养殖底泥中微生物群落的变化特征。结果显示:添加小麦秸秆生物炭修复期间,Simpson多样性指数先降低后逐渐升高,在第42 d时指数达到最低(0.16),Shannon指数与Chao1指数以及OTU数的变化也呈现相似的规律,即在第42 d时生物丰度达到最大值。养殖底泥细菌中门水平优势细菌相对丰度发生改变,变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度显著提高,而酸杆菌门(Acidobacteria)和绿弯菌门(Chloroflexi)的相对丰度降低。Heatmap图也呈现出相似的结果,即 *Ardenticatenales*、芽单胞菌科属(*Gemmatimonadaceae*)、*bacteriap25*和棒状杆菌属(*Rokubacteriales*)的相对丰度出现了先增加后降低的趋势。研究表明,养殖底泥中添加小麦秸秆生物炭可以改善微生物的群落结构,进而有助于底泥中多环芳烃等有机污染物的降解去除。

关键词:养殖底泥;生物炭;微生物;群落结构

中图分类号:X714 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2021)12-2770-09 doi:10.11654/jaes.2021-0434



Effects of *in-situ* biochar amendment on the microbial community structure of sediments in aquaculture ponds

ZHAO Hanyin¹, CHEN Panyi¹, TANG Xinzhe², CHEN Yiqin¹, LI Juanying^{1*}

(1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. East Shanghai High School, Shanghai 201306, China)

Abstract: To understand the impact of *in-situ* biochar addition on the microbial community structure of sediments in aquaculture ponds, the microbial structure of the sediments was analyzed during *in-situ* remediation with biochar, using high-throughput sequencing technology. The results showed that the Simpson diversity index first decreased and then gradually increased during the experiment with wheat straw biochar amendment. And the index reached its lowest (0.16) at 42 days. Similar variations were also observed in the Shannon index, Chao1 index and OTU number. The relative abundance of the dominant bacteria at the phylum level varied in the sediments. The

收稿日期:2021-04-12 录用日期:2021-06-29

作者简介:赵汉胤(1995—),男,江苏苏州人,硕士研究生,主要研究方向为养殖底泥中复合污染物的原位修复。E-mail:604379932@qq.com

*通信作者:李娟英 E-mail:jyli@shou.edu.cn

基金项目:上海市农业农村委员会科技兴农项目(D-8004-20-0218)

Project supported: The Shanghai Municipal Agricultural and Rural Committee, China(D-8004-20-0218)

relative abundance of Proteobacteria and Actinobacteria increased significantly, while the relative abundance of Acidobacteria and Chloroflexi decreased. A heatmap chart also showed that the relative abundance of *Ardenticatenales*, *Gemmatimonadaceae*, *bacteriap25*, and *Rokubacteriales* decreased after first increasing, which was consistent with the previous results. Therefore, adding wheat straw biochar to the sediments is beneficial to the growth and the development of microorganisms and changes the community structure.

Keywords: aquaculture sediment; biochar; microorganism; community structure

随着养殖技术的高速发展,水产养殖已呈现出规模化、集约化等特点,但与此同时,养殖池塘的污染状况也日渐凸显。焦宝玉等^[1]对万滩镇养殖池塘底泥中重金属的污染现状进行研究,结果表明该地区底泥中的重金属Cr已超《农产品安全质量无公害水产品产地环境要求》(GB/T 18407.4—2001)国家标准最高限值,存在潜在的生态风险;刘云飞等^[2]对崇明岛草鱼池塘沉积物中多环芳烃(PAHs)的分布状况进行调查,结果表明该沉积物中PAHs的总含量范围为ND~1 654.09 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,其中4~5环PAHs对总浓度的贡献率较高,来源分析表明沉积物中的PAHs主要来自于生物燃烧和石油燃烧,崇明岛草鱼池塘整体的生态风险较低,但个别池塘存在潜在生态风险,需引起重视。本课题组先前的研究表明,我国东部地区的养殖池塘底泥普遍存在PAHs污染^[3]。

目前,修复受污染养殖底泥的主要方法包括生物法、物理法和化学法。但生物修复和物理修复存在修复周期长、修复成本高等问题,因此不适用于养殖底泥的修复^[4]。化学修复中的吸附固定法,因其修复成本低、效果显著而被广泛应用^[5]。该方法将生物炭作为修复剂添加到底泥中,以达到固定污染物的目的,且已被证明效果可靠^[6-7]。小麦秸秆生物炭是一种具有高污染物固定能力的生物炭,已经被广泛用作模型生物炭用于土壤/沉积物的修复^[8-9]。同时,将小麦秸秆制成生物炭,不仅可以减少传统处理过程(堆肥或焚烧)对大气污染的影响,也可以达到以废治废的目的。

通常,生物炭除了吸附固定污染物外,还可以改善植物生长^[10],增加土壤阳离子交换能力^[11]和土壤孔隙度^[12],降低土壤密度并增强土壤通气性^[13]。已有的研究还表明,添加生物炭可以改变微生物群落组成^[14-15],提高微生物的生物量^[16],增加微生物的总体活性并促进有机污染物的微生物降解^[17-18],从而达到修复底泥的目的。因此,本文选择小麦秸秆生物炭,将其原位添加到养殖池塘底泥中,以底泥中的微生物作为研究对象,通过高通量测序方法,研究小麦秸秆生物炭的添加对底泥中微生物群落结构的影响,以期为

养殖池塘底泥原位修复提供理论指导和科学依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

有机溶剂二氯甲烷和乙腈均为色谱纯(Sigma-Aldrich);层析硅胶和铜片等为分析纯,购自国药集团。层析硅胶650 $^{\circ}\text{C}$ 下灼烧6 h,冷却后转移到干燥器中保存待用;PAHs标准物质购自Sigma-Aldrich公司(NIST1647F),将其置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待用。

1.2 小麦秸秆生物炭特性的测定

本文所选用小麦秸秆生物炭购于河南誉中奥农业科技有限公司。生物炭的C、H、O、N、S含量用EA有机元素分析仪(德国,Vario EL Cube)测定;小麦秸秆生物炭的比表面积采用比表面积与孔隙度分析仪(Autosorb-IQ3)测定;生物炭的表面结构特征采用六硼化镧扫描电子显微镜(Vega LaB6-SEM)观察。

1.3 养殖池塘底泥原位生物炭的添加

养殖池塘的选取:鱼虾混养养殖池塘位于上海市浦东新区书院镇祥园路(121 $^{\circ}$ 50'04"E,30 $^{\circ}$ 58'40"N),养殖品种包括虾类(南美白对虾和罗氏沼虾)和鱼类(鲢、鳙、草鱼、鲫鱼、鳊鱼),同时混有螺蛳、三角帆蚌等底栖生物。这些鱼虾类生物与上海市居民水产品消费结构中的优势品种高度吻合^[19],因此该养殖池塘作为研究对象具有很强的代表性。

生物炭添加:该养殖池塘底泥含水率约为60%,湿泥密度为 $1.4\times 10^3\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ 。在该养殖池塘的清塘阶段,将生物炭与实验塘的养殖池塘表层5 cm底泥混合,添加3%干质量比的小麦秸秆生物炭(参考本实验室之前的研究结果^[20]),即每平方米底泥中生物炭的添加量约为0.84 kg(热解老化处理后的生物炭^[21])。实验中每个池塘面积约为104 m^2 (8 m \times 13 m),为更好地促进生物炭与底泥的混合,将每个池塘分割成10个面积约为10 m^2 的小块。用瓢将事先称好质量的生物炭均匀覆盖在其表面,再利用铁铲等工具将其与表层底泥进行混合,重复多次,直至充分混匀。处理完成后,保持生物炭与底泥接触自然老化4周,池塘放水再接触

老化2周后投放养殖生物。整个实验分为实验塘($n=3$)和对照塘($n=3$)两组,在养殖池塘饲养阶段对塘内水质做定期监测以保证各个池塘无明显差异。该试验属于小型现场试验,以此探究生物炭在实际原位应用时的修复效果,但此方法并不适用于大范围修复。

1.4 底泥样品的采集

实验自6月放水开始持续28周,分别在实验过程中的第1、7、14、21、28、42、56、84、112、140、168 d对实验塘和对照塘中的底泥样品进行取样,在12月份时结束整个实验。每个养殖池塘设置3个采样点,在池塘的中心线上等分3个采样点,且每个采样点设3个平行,样品用经灭菌后的竹勺装入离心管中,置于干冰保温箱带回实验室,将其保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温冰箱中,一部分用于提取样品的DNA,另一部分用于测定样品的PAHs。

1.5 底泥样品中总DNA的提取方法

1.5.1 DNA抽提和PCR扩增

根据 E.Z.N.A.[®] soil DNA kit(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)说明书进行底泥样品总DNA抽提,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取质量,用NanoDrop2000测定DNA的浓度和纯度;同时采用338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对16S rRNA基因V3~V4可变区进行PCR扩增,每个样本3个重复。

1.5.2 Illumina Miseq 测序

将同一样本的PCR产物混合后使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物,利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)进行回收产物纯化,2%琼脂糖凝胶电泳检测,并用Quantus™ Fluorometer(Promega, USA)对回收产物进行检测定量。利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.5.3 数据处理

使用UPARSE软件,根据97%的相似度对序列进行OTU聚类并剔除嵌合体。利用RDP classifier对每条序列进行物种分类注释,比对Silva数据库(SSU128),设置比对阈值为70%。

1.6 底泥样品PAHs预处理及测定

称取3.0 g冷冻干燥的底泥样品,过100目筛后置于微波萃取管中,加入12 mL二氯甲烷萃取2 h,将萃取溶液移入10 mL玻璃离心管中,再用5 mL二氯甲烷淋洗微波管两次。将两次10 mL溶液氮吹合并至2 mL左右后过滤。用活化铜和层析柱硅胶净化上述

溶液,并用10 mL二氯甲烷洗脱,最后将洗脱液用氮气吹至近干,用乙腈定容至0.5 mL,待上机测定。所有PAHs样品用气相色谱-质谱法(GC-MS, Agilent 7890B/5975C)测定。

1.7 质量控制与数据分析

为保证实验结果的准确性和科学性,所有样品设置3个平行样,底泥样品中PAHs的检出限和回收率如表1所示。本文图表制作及数据分析均采用Prism 8.0和SPSS 20.0完成。

表1 底泥样品(干质量)中PAHs的检出限与回收率
Table 1 Detection limits and recoveries of PAHs in sediment (dry weight)

PAHs	检出限 Detection limits/(ng·g ⁻¹)	回收率 Recovery/%
NAP	1.89	62.23
ANY	2.12	73.09
ANA	1.30	78.53
FLU	1.43	89.18
PHE	0.63	86.65
ANT	1.61	79.90
FLA	2.70	83.77
PYR	0.85	88.49
CHR	3.75	105.08
BaA	2.61	98.33
BbF	2.19	83.41
BkF	1.71	93.65
BaP	1.69	76.78
DBA	0.37	87.93
IPY	0.51	113.26
BPE	1.40	63.21

2 结果与讨论

2.1 待修复池塘底泥污染特征及小麦秸秆生物炭的特性

2.1.1 待修复池塘底泥污染特征

待修复池塘底泥(干质量)中 Σ PAHs的浓度为 $396.68\pm 3.50\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (表2),共检出11种PAHs,以2、3、4环为主,占 Σ PAHs的76%~97%。绝对性优势的单体污染物为FLU、PHE和PYR,其中FLU的浓度为 $111.67\pm 5.12\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$,处于LONG等^[22]提出的效应区间低值($16\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$)与效应区间中值($500\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$)之间,即已具有一定的潜在生态毒性。因此,该待修复养殖底泥具有典型污染特征,与之前本课题组对长三角区域养殖池塘底泥污染的调查结果基本一致^[9]。为提高养殖水产品的质量,减小其食用的健康风险,有必要

表2 养殖池塘底泥(干质量)中PAHs的浓度($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)Table 2 Concentration of PAHs in aquaculture sediment (dry weight)($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)

PAHs	浓度 Concentration
NAP	12.05±0.67
ANY	40.02±8.57
FLU	111.67±5.12
ANA	nd
PHE	55.30±0.44
ANT	2.56±0.06
FLT	46.78±1.21
PYR	59.78±0.11
CHR	9.43±1.03
BaA	26.83±0.77
BbF	23.72±0.33
BkF	nd
BaP	9.52±1.62
DBA	nd
IPY	nd
BPF	nd
ΣPAHs	396.68±3.50

利用技术手段对养殖底泥展开修复。

2.1.2 小麦秸秆生物炭的特征

在 $5\ \mu\text{m}$ 分辨率的扫描电镜(SEM)下观测小麦秸秆生物炭(图1),其表面有很多凸起的细小颗粒,且具有大量无规则的孔隙结构。这些孔隙结构可为微生物提供更多的栖息地并成为它们的庇护所,从而有利于其生长^[23]。生物炭呈碱性(表3),可以提高底泥的pH,而中性或弱碱性的土壤条件可刺激细菌的增长,增加其菌落丰度^[24]。综合而言,该小麦秸秆生物炭施用于养殖底泥有利于底泥微生物的生长。

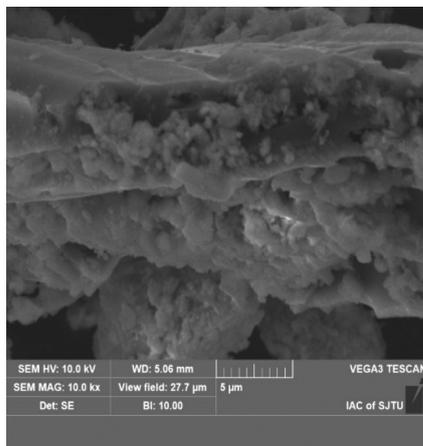


图1 小麦秸秆生物炭SEM图

Figure 1 SEM for wheat straw biochar

表3 小麦秸秆生物炭的基本理化性质

Table 3 Physical-chemical properties of wheat straw biochar

pH	BET/ ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)	元素质量组成 Element composition/%				
		C	H	O	N	S
10.24	20.78	62.88	1.08	16.10	13.86	6.08

2.2 生物炭添加对底泥中微生物群落多样性的影响

2.2.1 底泥中细菌 OTU 分布

图2为小麦秸秆生物炭添加后,不同修复时间的底泥样本组之间共有OTU的花瓣图分析。不同修复时间共有的OTU数目为904,而特有OTU数目存有一定差异。与第1d相比,小麦秸秆生物炭处理后的底泥特有OTU数目相对增加,实验开始时特有OTU数仅为62,随着修复时间的增加,改善作用明显。除实验第21d和168d时特有OTU数目较低外(63和27),其余时间特有OTU数目均高于原有数目。在实验第42d时,OTU特有数目升高到272,这可能是由于生物炭多孔的结构有利于微生物的生长发育^[25]。之后特有OTU数目呈持续下降趋势,在实验的第168d,特有OTU数目降至最低的27,这可能与现场实验中环境条件的变化有关。实验进行到第168d时,正值12月底,水温处于 $10\ \text{℃}$ 左右,微生物生长受到温度影响而持续下降。周涛等^[26]和任海伟等^[27]的研究皆表明,低温会降低微生物生长的多样性,因此,在实验临近结束时出现了OTU数目的下降。

2.2.2 底泥中细菌群落 Alpha 多样性

为进一步分析添加小麦秸秆生物炭对底泥微生物群落多样性的影响,本文采用3种方法计算了底泥细菌丰度,包括Simpson指数、Shannon指数以及

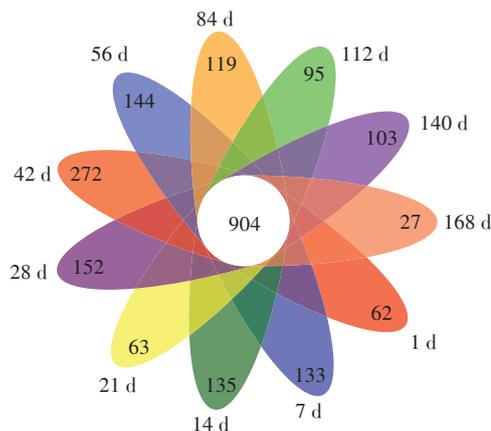


图2 小麦秸秆生物炭添加后底泥中微生物的 OTU 花瓣图

Figure 2 The flowers diagram with OTU in sediment after adding wheat straw biochar

Chao1 指数^[28]。Simpson 指数是用来估算样本中微生物多样性的指数之一,由 Edward Hugh Simpson 提出,该指数在生态学中常用来定量描述一个区域的生物多样性。Shannon 指数也是用来估算样本中微生物多样性的指数之一,常用于反映群落 Alpha 多样性^[29]。Simpson 指数侧重于对物种的均匀度,而 Shannon 指数侧重于物种的丰富度。Chao1 指数则反映的是群落的丰富度。

随着现场修复实验的持续进行,实验组中 Simpson 菌群丰度指数呈现先降低后升高的趋势(表 4),说明底泥中微生物的丰度是先升高再降低的。在实验的第 42 d,底泥细菌群落的 Simpson 指数达到最低(0.16),此时微生物的丰度达到最高。Shannon 多样性指数在实验过程中则呈现先上升后逐渐下降的趋势,同样是在第 42 d 时达到最高值(2.34),这与 Simpson 指数反映的结果一致。这些趋势与特有 OTU 的分布相似,因为一个 OTU 即代表一个分类学信息,特有 OTU 越多则菌落的分类信息也越多,多样性就越丰富。Chao1 指数代表了菌群的丰度,其数值越大,说明群落丰富度越高。Chao1 指数在实验第 21 d 时最高,说明此时底泥中微生物的多样性最高,随后多样性呈逐渐下降趋势,与其他两个指数的变化趋势基本一致。在临近实验结束的第 140 d 和 168 d 的 Chao1 指数减小,与养殖池塘的环境温度下降关系密切。而在对照组各项 Alpha 多样性数据中大部分均低于实验组,表明实验组中底泥微生物有更高的丰度和群落多样性。同时,对照组中的各项数据均呈下降

趋势,说明随着现场实验的进行,对照组中底泥微生物的丰度和多样性逐渐降低,且在实验临近结束时达到最低,这也是由于环境温度的降低造成的。综合而言,底泥中添加小麦秸秆生物炭可增加细菌群落的多样性,这与 EL-NAGGAR 等^[30]添加三种不同生物炭到底泥中,均增加了微生物群落的多样性的结论一致。

2.3 生物炭添加对底泥中微生物群落结构的影响

细菌通常以群落的形式存在,细菌群落结构主要指群落中细菌种群的种类和丰度。生物炭具有发达的多孔结构和较大的表面积,可以为细菌提供合适的生长环境^[31-32]。选取每个样本组在门水平下相对丰度大于 0.01 的菌群,菌群组成的丰度分布如图 3 所示。主要涉及到的菌群包括变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、棒状杆菌门(Rokubacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、蓝细菌(Cyanobacteria)、骸骨细菌门(Patescibacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、浮霉菌门(Planctomycetes)、匿杆菌门(Latescibacteria)、达达菌门(Dadabacteria)和其他菌群。

随着修复时间的增加,底泥中细菌群落的丰度也在发生缓慢的变化(图 3)。从门水平优势细菌相对丰度来看,实验组中变形菌门和放线菌门的相对丰度显著提升,成为优势菌种,而在对照组中并未观测到这一现象。这与 ZHANG 等^[33]和 SONG 等^[34]的研究结果一致,即生物炭的添加可导致变形菌门的相对丰度

表 4 底泥微生物群落的 Alpha 多样性

Table 4 The Alpha diversity of microbial communities in sediment

采样时间 Sampling time/d	实验组 Biochar			对照组 Control		
	Simpson	Shannon	Chao1	Simpson	Shannon	Chao1
1	0.22±0.01	1.95±0.23	52.37±4.32	0.23±0.03	2.23±0.17	51.33±1.33
7	0.18±0.01**	2.09±0.17*	46.16±2.78*	0.24±0.01	2.13±0.37	45.50±2.78
14	0.19±0.02**	2.04±0.28*	45.86±3.56*	0.22±0.02	2.02±0.17	47.98±5.07
21	0.18±0.03*	2.20±0.46	69.95±2.44**	0.23±0.02	2.20±0.25	42.82±3.74
28	0.18±0.02**	2.17±0.11*	52.42±5.89**	0.22±0.01	2.04±0.16	43.33±3.29
42	0.16±0.02*	2.34±0.31*	51.46±4.43*	0.24±0.02	2.02±0.21	41.59±2.94
56	0.17±0.01*	2.20±0.35**	46.50±4.31*	0.24±0.03	2.07±0.18	40.13±3.48
84	0.20±0.01*	2.11±0.13*	44.33±5.62*	0.25±0.01	1.96±0.22	38.49±2.69
112	0.21±0.02**	2.02±0.19*	50.86±5.49*	0.26±0.01	1.84±0.19	43.11±4.43
140	0.25±0.01	1.90±0.22	44.53±3.77	0.25±0.02	1.84±0.14	39.26±5.01
168	0.24±0.02**	1.79±0.18	39.23±3.94	0.28±0.01	1.72±0.20	36.75±3.53

注:*表示实验组与对照组间差异显著(P<0.05);**表示实验组与对照组间差异极显著(P<0.01)。

Note: *indicates statistical significance compared biochar with control at P<0.05, **indicates statistical significance compared biochar with control at P<0.01.

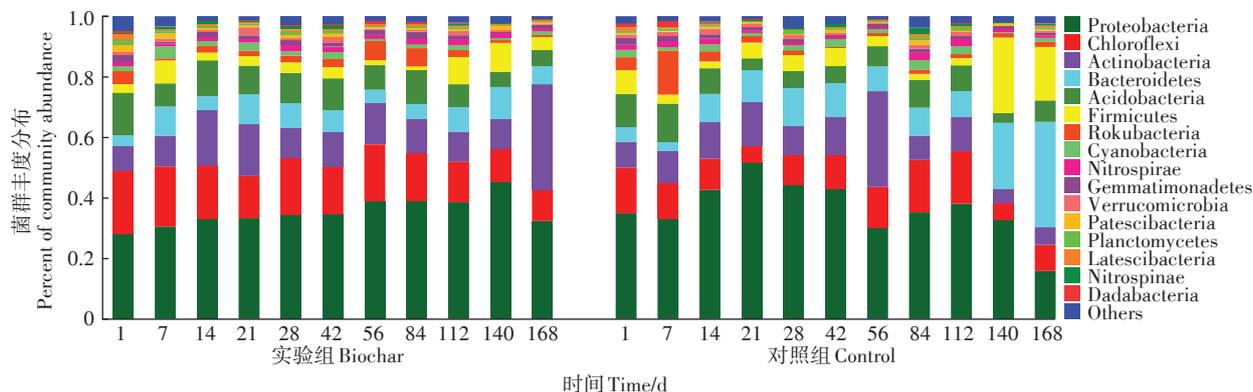


图3 样本组在门水平下菌群分类学组成和丰度分布图

Figure 3 The composition and abundance of bacterium at the phylum level of group

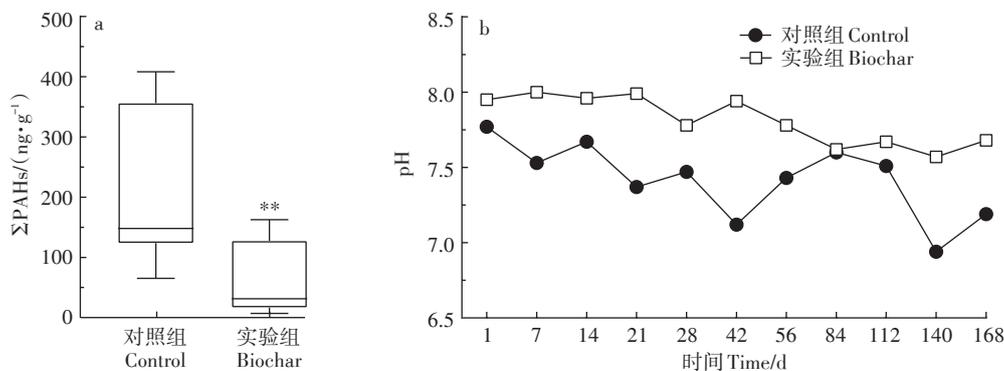
提高。放线菌门则可以有效降解底泥中复杂的芳香类化合物,从而获取更多能量用于生长繁殖,这使得修复实验期间其在整个细菌群落中的相对丰度逐渐增加^[35]。有研究也表明,变形菌门、放线菌门以及厚壁菌门在土壤的有机物降解和碳循环中起到关键作用,能够降解底泥中的部分 PAHs^[36-38]。本课题组先前的研究表明,我国东部地区的养殖池塘底泥普遍存在 PAHs 污染^[3]。而本研究也同时对实验组以及对照组底泥中的 PAHs 浓度进行了分析,结果表明经小麦秸秆生物炭修复后,底泥 PAHs 的含量显著降低(图 4a),这可能是由于微生物的降解作用。生物炭对 PAHs 的影响通常体现在其吸附固定能力上,其能够减少底泥中自由溶解态 PAHs 的浓度 (C_{free})^[20],但对底泥 PAHs 的总含量并无明显影响。而微生物可利用其自身优势降解 PAHs,使 PAHs 浓度降低,这与 PENG 等^[39]的研究结果一致。

此外,在实验组中绿弯菌门和酸杆菌门的相对丰

度显著降低。这可能是由于不同菌落对生物炭的利用能力以及环境因素造成的,酸杆菌是嗜酸性细菌,酸性土壤环境有利于酸杆菌门的代谢活动,而生物炭作为碱性物质施入底泥可以提高底泥 pH(图 4b),从而抑制了酸杆菌的生长,减少其在门水平优势细菌中的相对丰度^[40]。综合而言,向底泥添加小麦秸秆生物炭,不仅能够改善底泥中微生物群落结构,固定底泥中的 PAHs,而且微生物可以将 PAHs 部分降解,从而有利于养殖池塘底泥的修复。

2.4 生物炭添加后底泥微生物相对丰度的变化和聚类分析

为进一步揭示底泥微生物的群落结构,本文选择在属水平上制作 Heatmap 图。Heatmap 图是以颜色梯度来表征二维矩阵或表格中的数据大小,通过颜色变化来反映不同分组在各分类学水平上群落组成的相似性和差异性^[41]。本文选择相对丰度排名前 20 的菌属进行聚类分析。



*表示显著相关($P<0.05$);**表示极显著相关($P<0.01$)

*indicates statistical significance at $P<0.05$,**indicates statistical significance at $P<0.01$

图4 底泥中 Σ PAHs的浓度和生物炭处理后底泥pH随时间的变化Figure 4 Concentrations of Σ PAHs in sediment and changes of pH after biochar treatment in sediment

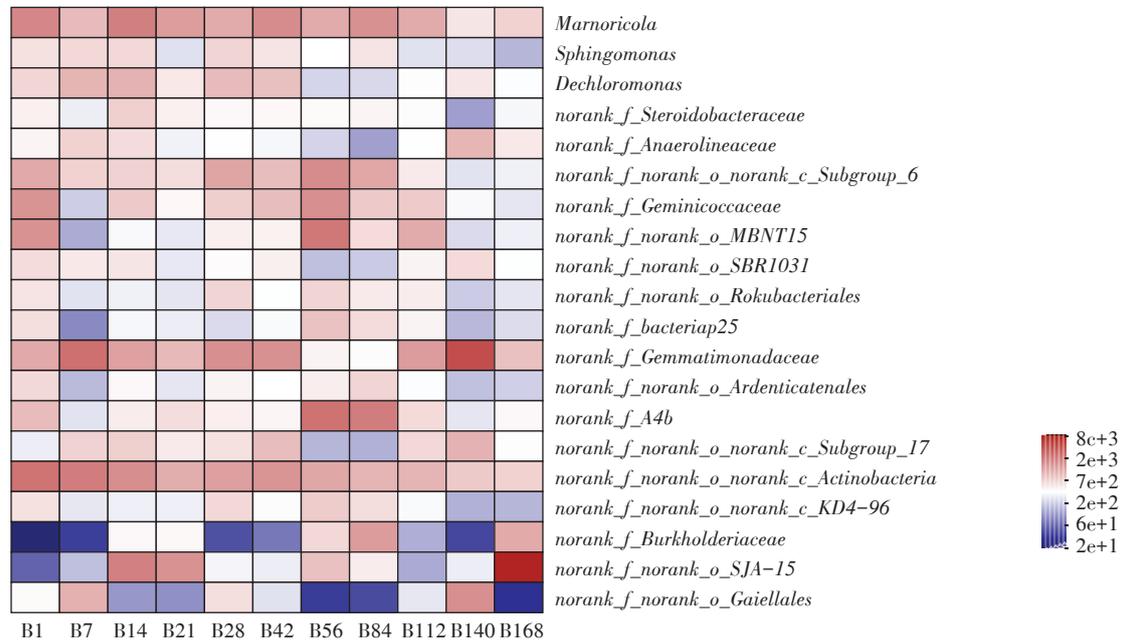


图5 生物炭添加后养殖底泥中细菌属的相对丰度聚类热图

Figure 5 The clustering heatmap of bacterial genus relative abundance in sediment under different amendment time

生物炭的添加明显改变了细菌属水平上的相对丰度(图5),其中,一些未分类的优势菌属在整个实验过程中并没有发生变化,仍为优势菌属,如 *norank_f_Steroidobacteraceae* 和厌氧绳菌属(*Anaerolineaceae*)。但也有一些菌属初始的相对丰度较低,而后逐渐变成优势菌属,例如大理石雕菌属(*Marnoricola*)和鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*),这可能是因为它们能够降解土壤中的PAHs,且分解化合物产生的养分有利于自身生长^[42]。其他未分类的菌属,如 *Ardenticatenales*、芽单胞菌科属(*Gemmatimonadaceae*)、*bacteriap25* 和棒状杆菌属(*Rokubacteriales*)的相对丰度出现了先增加后降低的趋势,原因可能是生物炭添加为这些菌属提供了有利的生存环境,故菌种大量繁殖,但在实验后期又受到气温影响,繁殖速度减弱,相对丰度降低。综合而言,生物炭的添加能为底泥微生物提供更多生长发育空间,从而增加底泥微生物的Alpha多样性,改善原有的微生物群落结构,在实现底泥中有机污染物吸附固定的同时,促进底泥中部分污染物的降解。

3 结论

(1)添加小麦秸秆生物炭的修复期间,实验组中Simpson多样性指数先降低后逐渐升高,说明该底泥中微生物多样性先增多后减少,Shannon指数与Chao1指数以及OTU数也表现出微生物多样性先增后降的趋势。对照组中的各项Alpha多样性指数均

低于实验组,这是由于生物炭的添加有利于微生物的生长发育,造成实验组中底泥微生物拥有更高的丰度和多样性。

(2)小麦秸秆生物炭处理条件下,实验组养殖底泥细菌中变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度显著提高,而酸杆菌门(Acidobacteria)和绿弯菌门(Chloroflexi)的相对丰度降低,这表明生物炭的添加可改变底泥微生物的群落结构,且有利于修复受PAHs污染的养殖底泥,因为这些细菌能够降解部分的PAHs化合物。

(3)Heatmap图显示,生物炭的添加使菌属丰度增加,有助于降解养殖底泥中的有机污染物。

参考文献:

- [1] 焦宝玉,刘慧,贾砾,等.河南中牟县万滩镇养殖池塘底泥重金属污染评价[J].淡水渔业,2015,45(2):15-19,66. JIAO B Y, LIU H, JIA L, et al. Heavy metal pollution assessment in sediments of aquaculture ponds of the Wantan Town in Zhongmu, Henan Province[J]. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(2): 15-19, 66.
- [2] 刘云飞,刘兴国,高子昕,等.崇明岛草鱼池塘沉积物中多环芳烃的分布状况及生态风险[J].水产学报,2020,44(12):2055-2065. LIU Y F, LIU X G, GAO Z X, et al. Distribution and ecological risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of Chongming Island grass carp ponds[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(12): 2055-2065.
- [3] 和庆.长三角地区池塘养殖水产品重金属和多环芳烃污染评价及其生物有效性研究[D].上海:上海海洋大学,2018. HE Q. Pollution

- tion evaluation and bioavailability of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in pond aquaculture products in the Yangtze River Delta[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [4] 陈华林, 陈英旭. 污染底泥修复技术进展[J]. 农业环境保护, 2002, 21(2): 179-182. CHEN H L, CHEN Y X. Progresses of remediation techniques for polluted sediment[J]. *Agro-environmental Protection*, 2002, 21(2): 179-182.
- [5] 曹心德, 魏晓欣, 代革联, 等. 土壤重金属复合污染及其化学钝化修复技术研究进展[J]. 环境工程学报, 2011, 5(7): 1441-1453. CAO X D, WEI X X, DAI G L, et al. Combined pollution of multiple heavy metals and their chemical immobilization in contaminated soils: A review[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(7): 1441-1453.
- [6] 王宏胜, 唐朝生, 巩学鹏, 等. 生物炭修复重金属污染土研究进展[J]. 工程地质学报, 2018, 26(4): 1064-1077. WANG H S, TANG C S, GONG X P, et al. Research progresses in remediation of heavy metal contaminated soils with biochar[J]. *Journal of Engineering Geology*, 2018, 26(4): 1064-1077.
- [7] 刘亮. 生物炭对土壤微生物及其强化修复多环芳烃污染的影响与机理研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2015. LIU L. The influence and mechanism of biochar on soil microbial and enhanced remediation of PAHs contamination[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2015.
- [8] CAO Y, XIAO W, SHEN G, et al. Carbonization and ball milling on the enhancement of Pb(II) adsorption by wheat straw: Competitive effects of ion exchange and precipitation[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 273: 70-76.
- [9] CUI L, NOERPEL M R, SCHECKEL K G, et al. Wheat straw biochar reduces environmental cadmium bioavailability[J]. *Environment International*, 2019, 126: 69-75.
- [10] ELAD Y, DAVID D R, HAREL Y M, et al. Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(9): 913-921.
- [11] SAARNIO S, HEIMONEN K, KETTUNEN R. Biochar addition indirectly affects N₂O emission via soil moisture and plant N uptake[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 58: 99-106.
- [12] HERATH H M S K, CAMPS-ARBESTAIN M, HEDLEY M. Effect of biochar on soil physical properties in two contrasting soils: An alfisol and an andisol[J]. *Geoderma*, 2013, 209/210: 188-197.
- [13] CHEN X W, WONG T F, NG W W, et al. Feasibility of biochar application on a landfill final cover: A review on balancing ecology and shallow slope stability[J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2016, 23(8): 7111-7125.
- [14] ANDERSON C R, CONDRON L M, CLOUGH T J, et al. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus[J]. *Pedobiologia*, 2011, 54(5/6): 309-320.
- [15] GELL K, GROENIGEN J W V, CAYUELA M L. Residues of bioenergy production chains as soil amendments: Immediate and temporal phytotoxicity[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 186(2/3): 2017-2025.
- [16] AMELOOT N, GRABER E R, VERHEIJEN F G A, et al. Interactions between biochar stability and soil organisms: Review and research needs[J]. *European Journal of Soil Science*, 2013, 64(4): 379-390.
- [17] TONG H, HU M, LI F B, et al. Biochar enhances the microbial and chemical transformation of pentachlorophenol in paddy soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 70: 142-150.
- [18] REIBE K, GTZ K P, RO C L, et al. Impact of quality and quantity of biochar and hydrochar on soil Collembola and growth of spring wheat [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 84-87.
- [19] 张太昌, 张迪. 上海市居民水产品消费结构调查分析[J]. 南方农业, 2015, 9(9): 169-170. ZHANG T C, ZHANG D. Investigation and analysis of Shanghai residents' consumption structure of aquatic products[J]. *South China Agriculture*, 2015, 9(9): 169-170.
- [20] 于纹鉴. 复合污染养殖底泥原位修复与效果评价[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020. YU W J. Research on *in-situ* remediation of mixture-contaminated sediment in aquaculture ponds and effect evaluation based on bioavailability[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [21] 赵汉胤, 张丽, 于纹鉴, 等. 不同老化方式的浒苔生物炭对养殖底泥中复合污染物的修复研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(12): 2860-2867. ZHAO H Y, ZHANG L, YU W J, et al. PAHs and heavy-metal polluted aquaculture sediment remediation using different-aged *Enteromorpha* biochar[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(12): 2860-2867.
- [22] LONG E R, MACDONALD D D, SMITH S L, et al. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments[J]. *Environmental Management*, 1995, 19(1): 81-97.
- [23] RICHARD S Q, HELEN C G, STEPHEN C W, et al. Life in the 'charosphere': Does biochar in agricultural soil provide a significant habitat for microorganisms?[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 65(1): 287-293.
- [24] CHEN J, LIU X, ZHENG J, et al. Biochar soil amendment increased bacterial but decreased fungal gene abundance with shifts in community structure in a slightly acid rice paddy from southwest China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 71: 33-44.
- [25] GUL S, WHALEN J K, THOMAS B W, et al. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: Mechanisms and future directions[J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2015, 206: 46-59.
- [26] 周涛, 吴晓营, 罗海波, 等. 贮藏温度对即食小龙虾品质及微生物菌群多样性的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 141-146. ZHOU T, WU X Y, LUO H B, et al. Analysis of quality and colony diversity of products of crayfish under different storage temperatures[J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(9): 141-146.
- [27] 任海伟, 赵泉霖, 赵祖莉, 等. 温度对白菜废弃物青贮发酵品质的影响及微生物多样性分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(1): 258-265. REN H W, ZHAO Q L, ZHAO Z L, et al. Effects of temperature on ensiling fermentation quality of cabbage wastes and microbial community analysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(1): 258-265.

- [28] 石丽芳. 生物炭固定化微生物对石油烃污染土壤的生物修复研究[D]. 抚顺: 辽宁石油化工大学, 2019. SHI L F. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by biochar immobilized microorganisms[D]. Fushun: Liaoning Shihua University, 2019.
- [29] 石伟. 河套灌区抗生素抗性基因空间分异与细菌群落多样性适应机制[D]. 太原: 山西大学, 2020. SHI W. Spatial variation of antibiotic resistance genes and adaptation mechanism of bacterial community diversity in Hetao Irrigation district[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020.
- [30] EL-NAGGAR A, LEE M H, HUR J, et al. Biochar-induced metal immobilization and soil biogeochemical process: An integrated mechanistic approach[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 698:134112.
- [31] VANDECASTEELE B, SINICCO T, D'HOSE T, et al. Biochar amendment before or after composting affects compost quality and N losses, but not P plant uptake[J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, 168:200-209.
- [32] SUN D, LAN Y, XU E G, et al. Biochar as a novel niche for culturing microbial communities in composting[J]. *Waste Management*, 2016, 54:93-100.
- [33] ZHANG F, ZHAO D, CHI J. Impact of different environmental particles on degradation of dibutyl phthalate in coastal sediments with and without *Cylindrotheca closterium*[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 261:114228.
- [34] SONG B, GONG J, TANG W, et al. Influence of multi-walled carbon nanotubes on the microbial biomass, enzyme activity, and bacterial community structure in 2, 4-dichlorophenol-contaminated sediment [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 713:136645.
- [35] DAI Z, A BARBERÁN, LI Y, et al. Bacterial community composition associated with pyrogenic organic matter(biochar) varies with pyrolysis temperature and colonization environment[J]. *mSphere*, 2017, 2(2):326-327.
- [36] WANG K, MAO H, LI X. Functional characteristics and influence factors of microbial community in sewage sludge composting with inorganic bulking agent[J]. *Bioresour Technol*, 2018, 249:527-535.
- [37] CEBRON A, BEGUIRISTAIN T, FAURE P, et al. Influence of vegetation on the in situ bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(19):6322-6330.
- [38] LI X, SONG Y, WANG F, et al. Combined effects of maize straw biochar and oxalic acid on the dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons and microbial community structures in soil: A mechanistic study[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 364:325-331.
- [39] PENG R H, XIONG A S, YONG X, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2010, 32(6):927-955.
- [40] XU M, XIA H, WU J, et al. Shifts in the relative abundance of bacteria after wine-lees-derived biochar intervention in multi metal-contaminated paddy soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 599/600:1297-1307.
- [41] 江琳琳. 生物炭对土壤微生物多样性和群落结构的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016. JIANG L L. The effect of biochar on soil microbial diversity and community structure[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.
- [42] VAN HERWIJNEN R, WATTIAU P, BASTIAENS L, et al. Elucidation of the metabolic pathway of fluorene and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Sphingomonas* sp. LB126[J]. *Research in Microbiology*, 2003, 154(3): 199-206.