

配施荧光假单胞菌对采煤区复垦土壤化学及生物学特性的影响

洪坚平^{1,2}, 武欣¹, 孟会生¹, 张杰¹, 王向英^{1,2}

(1.山西农业大学 资源环境学院, 山西 太谷 030801; 2.山西农业大学 生命科学学院, 山西 太谷 030801)

摘要:为探讨无机肥、有机肥配施荧光假单胞菌对采煤区复垦土壤化学生物学特性的影响,以复垦5a的土壤为研究对象,设置单施无机肥(CF)、荧光假单胞菌剂配施无机肥(CFB)、单施有机肥(M)、荧光假单胞菌剂配施有机肥(MB)、不施肥(CK)共5个处理。结果表明,MB处理较M处理有机质、碱解氮、有效磷、微生物量碳氮含量显著增加了5.57%~21.30%,碱性磷酸酶、脲酶、转化酶活性显著增加了15.44%~18.68%;而CFB处理较CF处理仅碱解氮含量、脲酶活性分别显著增加了4.77%、12.62%,表明荧光假单胞菌可以在一定程度上提高复垦土壤化学生物学指标。复垦土壤的优势菌门为放线菌门、变形菌门、绿弯菌门、芽单胞菌门、拟杆菌门,优势菌属为节杆菌属、芽生球菌属、KD4-96、芽单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、类诺卡氏菌属、*Vicinamibacterales*、*Vicinamibacteraceae*、JG30-KF-CM45。施加荧光假单胞菌对复垦土壤细菌多样性指数和优势菌门、菌属组成无显著影响,但可在一定程度上改变细菌属水平相对丰度。冗余分析结果表明,有机质、碱解氮对复垦土壤细菌群落的影响程度较高,脲酶、碱性磷酸酶、转化酶对复垦土壤细菌群落的影响程度较低。主成分分析表明,与M处理相比,MB处理的综合得分增加了2.92;与CF处理相比,CFB处理的综合得分增加了1.82。综上,荧光假单胞菌的施用有利于采煤复垦区土壤的熟化,且荧光假单胞菌与有机肥配施效果优于荧光假单胞菌与无机肥配施。

关键词:荧光假单胞菌;采煤复垦区;土壤化学特性;土壤生物学特性

中图分类号:TD88

文献标识码:A

文章编号:1002-2481(2024)04-0001-08

Effects of *Pseudomonas fluorescens* on Soil Chemical and Biological Properties in Coal Mining Areas

HONG Jianping¹, WU Xin¹, MENG Huisheng¹, ZHANG Jie¹, WANG Xiangying^{1,2}

(1.College of Resources and Environment, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2.College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: This paper is to explore the effects of inorganic and organic fertilizers combined with *Pseudomonas fluorescens* on the chemical and biological properties of reclaimed soil in coal mining areas. In this article, the soil reclaimed for five years was taken as the research object. Five treatments were set up: inorganic fertilizer(CF), *P. fluorescens* + inorganic fertilizer(CFB), organic fertilizer(M), *P. fluorescens* + organic fertilizer(MB), and no fertilization(CK). The results show that the organic matter, alkaline nitrogen, available phosphorus, and microbial biomass carbon and nitrogen content of MB treatment significantly increased by 5.57%~21.30% compared to M treatment, while the activities of alkaline phosphatase, urease, and invertase significantly increased by 15.44%~18.68%. CFB treatment only significantly increased the alkali-hydrolyzale nitrogen content and urease activity by 4.77% and 12.62% compared to CF treatment, indicating that *P. fluorescens* could improve the chemical and biological properties of the reclaimed soil to some extent. The dominant bacterial phyla in the reclaimed soil were *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Chlorobacterium*, *Bacteroidetes*, *Bacteroidetes*, the dominant bacterial genera were *Arthrobacter*, *Bacillus*, KD4-96, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Vicinamibacterales*, *Vicinamibacteraceae*, and JG30-KF-CM45. Addition of *P. fluorescens* had no significant effect on the bacterial diversity index and the composition of dominant phyla and genus in the reclaimed soil, but it could change the relative abundance of bacteria genera to some extent. Redundancy analysis showed that organic matter and alkali-hydrolyzale nitrogen had the higher impact on the bacterial community in the reclaimed soil, while urease, alkaline phosphatase, and invertase had the lower impact. Principal component analysis showed that compared with M treatment, the comprehensive score of MB treatment increased by 2.92, and compared with CF treatment, the comprehensive score of CFB treatment increased by 1.82. In summary, the application of *P. fluorescens* was beneficial for the maturation of soil in coal mining and reclamation areas and the combination of *P. fluorescens* and organic

收稿日期:2024-05-15

基金项目:国家自然科学基金重点项目(U1710255)

作者简介:洪坚平(1958-),男,浙江绍兴人,教授,博士,博士生导师,主要从事矿区土地复垦与生态修复研究工作。

fertilizer had a better effect than the combination of *P. fluorescens* and inorganic fertilizer.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*; coal-mining reclamation areal; soil chemical properties; soil biological properties

我国作为世界上最大的煤炭生产国和消费国,截至 2020 年底,煤炭资源查明储量为 1.73 万亿 t,占世界储量的 13.3%,预计 2024 年全国煤炭产量将维持在 47.0 亿 t 左右^[1-2]。由于大量的煤炭开采对农田造成了严重的损毁,仅山西一省因采煤而损毁的农田面积就超过 10 万 hm²。在对这些农田复垦过程中由于施工工艺等原因,造成了复垦土壤养分流失、孔隙比例失调,微生物数量锐减等^[3-4]。

目前,我国主要采取施用有机肥、无机肥的方式来熟化采煤复垦区土壤,对有机肥、无机肥施用下复垦土壤物理、化学特性的变化规律已进行了较为详尽的研究^[5-6],但对包括细菌群落在内的土壤生物学特性研究较少。细菌作为土壤微生物的重要组成部分,直接参与了土壤生态系统的物质循环和能量流动,在维持和改善土壤肥力等方面发挥着至关重要的作用^[7]。因此,土壤生物学特性亦是采煤区复垦成功与否的关键指标。由于有机肥、无机肥缺少微生物等生物活体物质,导致物质能量转化缓慢,复垦土壤生物学特性恢复时间较长^[8-9]。

微生物复垦技术不仅可以利用微生物的接种优势活化土壤养分、改良土壤生态环境等^[10],而且在保证土壤化学特性快速增加的同时可加快土壤细菌群落等土壤生物学特性恢复和重建。荧光假单胞菌作为一种重要的植物根际促生细菌,具有营养需求简单、繁殖快、竞争定殖力强等特点^[11]。在采煤复垦区的研究已表明,单施荧光假单胞菌可以活化土壤磷素,促进玉米生长^[12]。荧光假单胞菌与硝态氮、铵态氮肥配施可以提高复垦土壤溶解性总氮、铵态氮量^[13],与有机肥配施可以提高复垦土壤微生物量碳、氮含量和酶活性^[14]。这些研究表明,荧光假单胞菌在采煤区复垦土壤熟化方面具有极大的应用潜力。

目前,针对荧光假单胞菌应用于复垦土壤的研究多集中在土壤化学特性方面,关于其对复垦土壤细菌丰富度、多样性等生物学特性的影响以及化学生物学特性间的相互关系还未见报道。本研究以山西省屯兰煤矿填埋区复垦 5 a 的土壤为对象,分析配施荧光假单胞菌对复垦土壤化学及生物学特性的影响,以揭示复垦土壤化学与生物学特性间的关系,进而为荧光假单胞菌在采煤复垦区的应用及复垦土壤的快速熟化提供理论依据和技术支撑。

1 材料和方法

1.1 试验地概况

试验地位于山西省古交市以南 6 km 的屯兰煤矿废弃物(风化煤、煤泥、煤矸石)填埋区,属于暖温带半湿润大陆性季风气候。年平均气温 9.50 °C,年平均降水量 475.00 mm。2012 年煤矿废弃物堆置填埋完成后,取附近山体土壤覆盖煤矿废弃物,覆土类型为石灰性褐土,覆土厚度约 1.00 m。同时采用混匀、翻耕等方式,使试验地土壤具有相似的化学性质:pH 值为 8.53,有机质含量为 3.45 g/kg,全氮含量为 0.19 g/kg,全磷含量为 0.25 g/kg,全钾含量为 11.97 g/kg,碱解氮含量为 9.58 mg/kg,有效磷含量为 2.51 mg/kg,速效钾含量为 55.46 mg/kg。本次试验于 2016 年开始。

1.2 供试材料

供试作物为玉米(大丰 30)。供试菌种为 2 株于 2014 年分离自山西省农田土壤的荧光假单胞菌(*P. fluorescens*),编号为 N64-1、N137-1,由北京美吉桑格生物医药科技有限公司鉴定(2015),现保存于山西农业大学资源环境学院微生物实验室。经检测,N64-1、N137-1 均具有固氮解磷能力(固氮量分别为 4.54、4.44 mg/L(半微量开氏法)),D/d 值分别为 1.39、1.57(平板溶磷圈法)),在 0~40 °C,pH 值为 6~9,呈现较好的生长态势,可利用葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、甘露醇等多种碳源,且 2 株菌间无拮抗作用。将 2 株菌分别接种至 LB 液体培养基,在 28 °C 条件下,150 r/min 摇床培养至活菌数为 1.0×10⁸ cfu/mL,然后等体积混合制成荧光假单胞菌剂。供试肥料为尿素(N 46%)、过磷酸钙(P₂O₅ 16%)、氯化钾(K₂O 60%)、腐熟鸡粪(N 1.45%、P₂O₅ 1.14%、K₂O 0.85%)。

1.3 试验设计

以等量施肥为原则(约周边正常农田施肥量的 1.5 倍),共设 5 个处理:单施无机肥(CF)、荧光假单胞菌剂配施无机肥(CFB)、单施有机肥(M)、荧光假单胞菌剂配施有机肥(MB)、不施肥(CK)。每个处理重复 3 次,小区面积为 100 m²。各施肥处理均在播种前一天,将肥料以旋耕播撒方式作为底肥一次性施入,施肥量如表 1 所示。玉米拔节期除草 1 次,玉米生育期均未进行灌溉。播种密度为

6.0 万株/hm²。

表 1 不同处理的施肥量
Tab.1 Fertilization quantity for different treatments

处理 Treatment	尿素 Urea	过磷酸钙 Superphosphate	氯化钾 Potassium chloride	腐熟鸡粪 Decomposed chicken manure	荧光假单胞菌剂 <i>P. fluorescens</i>	LB 培养液 LB culture medium
CK						
CF	378	855	170			750
CFB	378	855	170		750	
M				12 000		750
MB				12 000	750	

1.4 样品采集及指标测定

土壤样品于 2020 年玉米收获后采集, 为试验第 5 年土壤样品。按照农化分析样品的要求进行采集, 采样深度 0~20 cm, 将土壤样品分为 3 份。一份 4 °C 保存, 用于测定土壤微生物量碳氮(采样后 12 h 完成), 一份 -80 °C 保存, 用于高通量测序, 一份经风干后, 研磨过 1.00 mm 筛, 用于其余土壤化学特性和生物学特性测定。

土壤 pH 值采用电极法(水:土=2.5:1)测定, 有机质(SOM)采用重铬酸钾容量法(外加热)测定, 碱解氮(AN)采用碱解扩散法测定, 有效磷(AP)采用 0.5 mol/L 碳酸氢钠法测定, 速效钾(AK)采用醋酸铵浸提-火焰光度法测定^[15], 微生物量碳(MBC)、微生物量氮(MBN)含量采用氯仿熏蒸-浸提法测定^[16], 过氧化氢酶(Catalase)活性采用容量法测定, 脲酶(Urease)活性采用苯酚-次氯酸钠比色法测定, 碱性磷酸酶(Phosphatase)活性采用磷酸苯二钠比色法测定, 转化酶(Invertase)活性采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定^[17]。

土壤 DNA 提取及高通量测序。称取 0.25 g 土壤样本, 按照 Power soil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, USA) 试剂盒说明, 提取土壤总 DNA,

并采用 Nano Drop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) 微量分光光度仪定量并检测纯度。提取的 DNA 存储于 -80 °C 冰箱, 用于后续的高通量测序分析。16S V3+V4 区 PCR 扩增正向引物为 341F: 5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3', 反向引物为 806R: 5'-GACTACN VGGGTATCTAATCC-3'。PCR 反应体系总体积为 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 的凝胶电泳产物委托广州基迪奥生物科技有限公司使用 Illumina MiSeq 测序平台测序。

1.5 数据处理

采用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析, 采用 Origin 2021 处理数据并制图, 单因素方差分析检验处理间差异, 差异性显著水平为 $P < 0.05$ 。数据均为 3 次重复后的平均值, 表中数据为平均值 ± 标准差。

2 结果与分析

2.1 荧光假单胞菌对复垦土壤化学特性的影响

不同施肥处理下复垦土壤化学特性分析结果如表 2 所示。

表 2 不同施肥处理下复垦土壤化学特性分析
Tab.2 Chemical properties analysis of reclaimed soil under different fertilization treatments

处理 Treatment	有机质含量/(g/kg) Organic matter content	碱解氮含量/(mg/kg) Available nitrogen content	有效磷含量/(mg/kg) Available phosphorus content	速效钾含量/(mg/kg) Available potassium content	pH
CK	2.72±0.06d	9.10±0.05d	3.13±0.03d	42.68±0.59c	8.44±0.03b
CF	3.53±0.12c	29.66±0.60c	4.24±0.06c	78.78±1.26b	8.46±0.04ab
CFB	3.66±0.03c	31.07±0.79b	4.40±0.15c	76.95±1.69b	8.46±0.01ab
M	4.99±0.09b	32.04±0.42b	5.09±0.07b	94.13±2.78a	8.47±0.03a
MB	5.38±0.05a	36.62±0.90a	5.90±0.14a	91.03±0.44a	8.36±0.09a

注: 同列不同小写字母表示不同处理间在 0.05 水平上差异显著。下表同。

Note: The different lowercase letters in the same colutnn were significant differences between different treatments at the 0.05 level. The same as below.

从表 2 可以看出, 有机质、碱解氮、有效磷含量

最高的施肥处理均为 MB 处理, 且 MB 处理与 CF、

CFB、M 处理相比差异达显著水平 ($P < 0.05$)。M 处理速效钾含量最高,但只与 CF、CFB 处理差异达显著水平 ($P < 0.05$)。各施肥处理的 pH 值相似。CFB 处理与 CF 处理相比仅碱解氮含量显著增加了 4.75% ($P < 0.05$)。MB 处理与 M 处理相比,有机质、碱解氮、有效磷含量分别显著增加了 7.82%、14.29%、15.91% ($P < 0.05$)。

2.2 荧光假单胞菌对复垦土壤生物学特性的影响

2.2.1 荧光假单胞菌对复垦土壤微生物量及酶活性的影响

由表 3 可知,MB 处理与 CF、CFB、M 处

理相比,微生物量碳含量分别显著增加了 46.26%、40.82% 和 21.30%,微生物量氮含量分别显著增加了 29.90%、20.67% 和 6.68%,碱性磷酸酶活性分别显著增加了 67.27%、50.82% 和 16.46%,脲酶活性分别显著增加了 52.43%、35.34% 和 15.44%,转化酶活性分别显著增加了 73.73%、66.18% 和 18.68% ($P < 0.05$)。各施肥处理间的过氧化氢酶活性无显著差异。CFB 处理与 CF 处理相比,仅脲酶活性显著增加了 12.62% ($P < 0.05$)。

表 3 不同施肥处理下复垦土壤微生物量及酶活性分析

Tab.3 Microbial biomass and enzyme activity analysis of reclaimed soil under different fertilization treatments

处理 Treatment	微生物量碳/(mg/kg) Microbial biomass carbon	微生物量氮/(mg/kg) Microbial biomass nitrogen	碱性磷酸酶/(mg/g) Alkaline phosphatase	脲酶/(mg/g) Urease	过氧化氢酶/ (mL/g) Catalase	转化酶/(mg/kg) Invertase
CK	54.17±1.74d	6.15±0.13d	0.46±0.02d	0.92±0.04e	1.96±0.09a	12.25±1.74d
CF	80.05±5.13c	8.36±0.70c	0.55±0.01c	1.03±0.03d	1.75±0.14b	17.85±0.78c
CFB	83.14±2.94c	9.00±0.12c	0.61±0.01c	1.16±0.05c	1.81±0.08ab	18.66±0.52c
M	96.52±3.46b	10.18±0.33b	0.79±0.07b	1.36±0.04b	1.90±0.07ab	26.13±2.14b
MB	117.08±4.46a	10.86±0.19a	0.92±0.05a	1.57±0.03a	1.87±0.06ab	31.01±0.95a

2.2.2 荧光假单胞菌对土壤细菌群落的影响

从表 4 可以看出,土壤样品的覆盖度均高于 99.70%,且各处理间覆盖度无显著性差异,表明测序深度可以满足分析要求。土壤细菌丰富度指数大小表现为 MB>M>CFB>CK>CF,其中,CF 处理较 CK 显著降低了 3.53% ($P < 0.05$);MB、M、CFB 处理较 CK 增加了 2.47%~4.64%,且 MB、M 处理与 CK 相比差异达显著水平 ($P < 0.05$)。多样性指数的大小顺序为 MB>M>CFB>CF>CK,其中,MB、M 处理较 CK 多样性指数分别显著增加了 4.14%、2.48%。CFB 处理与 CF 处理相比,多样性指数无显著性差异。MB 处理的丰富度指数、多样性指数与 M 处理相比均未达显著性水平。

表 4 不同施肥处理下复垦土壤细菌 α 多样性指数分析
Tab.4 α diversity index analysis of reclaimed soil bacteria under different fertilization treatments

处理 Treatment	覆盖度 Coverage	丰富度 Abundance	多样性 Shannon
CK	0.997 2±0.000 3a	567.33±4.51b	4.83±0.06c
CF	0.997 2±0.000 5a	548.00±13.08c	4.85±0.03c
CFB	0.997 0±0.000 1a	581.33±7.23ab	4.91±0.00bc
M	0.997 3±0.000 1a	588.33±0.58a	4.95±0.02ab
MB	0.997 1±0.000 3a	593.67±3.79a	5.03±0.06a

由图 1 可知,复垦土壤的优势菌门均为放线菌门(Actinobacteriota)、变形菌门(Proteobacteria)、绿

弯菌门(Chloroflexi)、芽单胞菌门(Gemmatimonadota)和拟杆菌门(Bacteroidota)(相对丰度 $\geq 3\%$),占比超过总细菌群落的 90.82%。CFB 处理较 CF 处理放线菌门、变形菌门、拟杆菌门相对丰度分别降低了 0.74%、3.48%、0.25%,绿弯菌门、芽单胞菌门分别增加了 3.87%、0.36%。MB 处理与 M 处理相比,放线菌门、绿弯菌门相对丰度分别降低了 0.85%、0.75%,变形菌门、芽单胞菌门、拟杆菌门相对丰度分别增加了 0.36%、0.56%、0.42%。

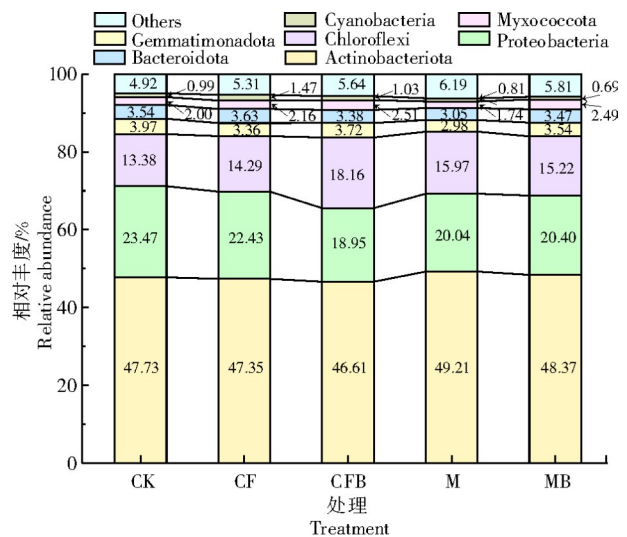


图 1 不同施肥处理下复垦土壤细菌门水平物种组成
Fig.1 Species composition at the bacterial phyla level in reclaimed soil under different fertilization treatments

如图2所示,在属水平上,节杆菌属(*Arthrobacter*)、芽生球菌属(*Blastococcus*)、KD4-96、芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、*Vicinamibacterales*、*Vicinamibacteraceae*、JG30-KF-CM45为优势菌属(相对丰度 $\geq 2\%$)。从聚类分析发现,CF、M处理聚为一簇,CFB、MB处理聚为一簇,CK处理单独为一簇。

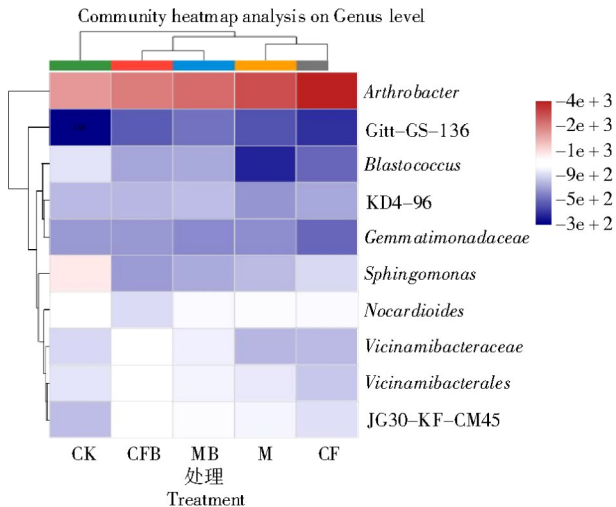


图2 不同施肥处理下复垦土壤细菌属水平物种丰度热图
Fig.2 Heat map of species abundance at the bacterial genus level in reclaimed soil under different fertilization treatments

2.3 复垦土壤特性因子与细菌群落的关系

对复垦土壤特性因子与细菌群落进行RDA分析,结果如图3所示,RDA1解释总变异量的34.68%,RDA2解释总变异量的15.63%,二者共同解释了细菌群落变异量的50.31%。在属水平上,有机质、碱解氮对细菌群落的影响程度较高,pH值、脲酶、碱性磷酸酶、转化酶对细菌群落的影响程度较低。

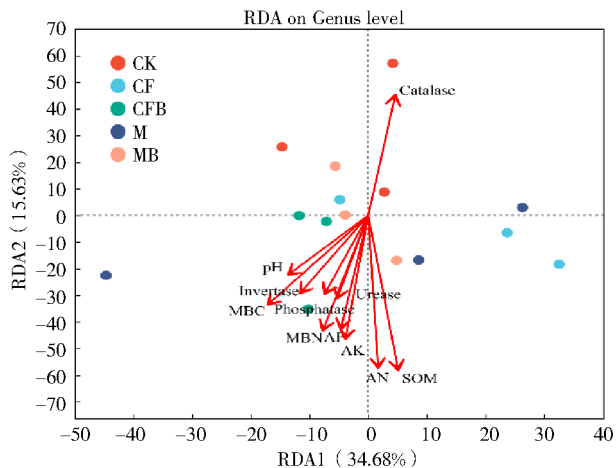


图3 复垦土壤细菌群落与土壤因子的冗余分析
Fig.3 Redundancy analysis of bacterial communities and soil factors in reclaimed soil

2.4 复垦土壤化学及生物学特性的主成分分析

为进一步直观了解荧光假单胞菌对复垦土壤化学及生物学特性的影响,对土壤有机质等因子进行主成分分析。根据特征值 > 1 ,提取出2个主成分。第1主成分(PC1)的特征值为8.74,方差贡献率为79.49%,第2主成分(PC2)的特征值为1.60,方差贡献率为14.57%,二者共解释了方差变量94.06%的变异,可以代表系统内的所有信息。施肥处理及CK在2个主成分上的得分如图4所示,各处理的综合得分大小依次为 $MB > M > CFB > CF > CK$ 。其中,MB处理综合得分较M处理提高了1.78,CFB处理综合得分较CF处理提高了0.50,表明荧光假单胞菌与有机肥配施对复垦土壤特性的影响高于荧光假单胞菌与无机肥配施。

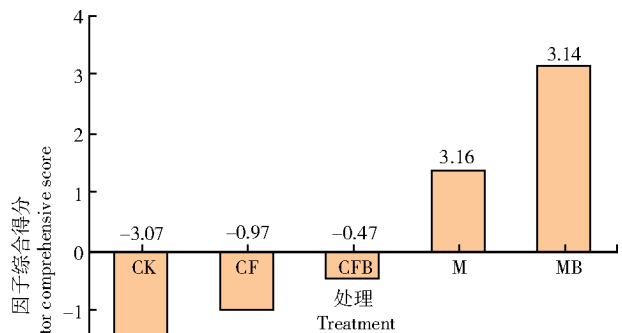


图4 不同施肥处理的主成分综合得分
Fig.4 Comprehensive score of different fertilization treatments on principal components

3 结论与讨论

荧光假单胞菌作为一种重要的植物根系促生菌,已被证明,其在农业生产、复垦土壤熟化方面具有巨大的应用潜力。与大多数微生物菌剂类似,以荧光假单胞菌菌种制成的菌剂也存在稳定性差的缺点,尤其是养分贫瘠的复垦土壤环境更不利于其生存^[18],因此,本研究采用荧光假单胞菌与无机肥、有机肥结合施用的方式^[19-20],增加其在复垦土壤中的定殖时间,用以保持肥效的稳定。研究结果表明,各施肥处理较不施肥处理显著提高了复垦土壤的有机质、碱解氮、有效磷、速效钾、微生物量碳氮含量及碱性磷酸酶、脲酶、转化酶活性,其中荧光假单胞菌与有机肥配施效果最佳,这与大多数研究结果一致^[21]。本研究还发现,复垦土壤pH值、过氧化

氢酶活性并无显著变化,这是由于荧光假单胞菌配施的无机肥、有机肥均呈碱性,无机肥、有机肥中含有的 OH^- 会与荧光假单胞菌等土壤微生物分泌的有机酸以及呼吸产生的 CO_2 在土壤溶液中溶解形成的 H^+ 发生酸碱中和反应^[22];过氧化氢酶的辅基则是遭到了无机肥、有机肥中阴离子的封阻^[23]。这与袁玲等^[24]的研究结果相一致。不同处理在 2 个主成分上的综合得分结果进一步表明,荧光假单胞菌与有机肥配施对复垦土壤熟化的效果优于荧光假单胞菌与无机肥配施。这是由于无机肥仅能为荧光假单胞菌提供氮源、碳源及少量无机盐,而有机肥可以通过增加土壤有机胶体,把土壤颗粒胶结起来使其变成稳定的团粒结构,提高了复垦土壤保肥能力^[25],持续不断提供荧光假单胞菌生长所需的碳源、氮源、无机盐、生长因子等营养要素,使复垦土壤中微生物数量有了显著提高,改善了土壤微生物区系,增强了土壤生物和生化活性,直接增加了微生物量和酶的分泌^[23]。同时荧光假单胞菌生长繁殖又促进了有机养分的释放,形成良性循环,从而加速了复垦土壤的熟化。

已有研究表明,矿区经过煤炭资源开采等严重扰动后,细菌群落多样性呈现降低的趋势^[26],但随着外源微生物肥料的加入提高了土壤养分含量、微生物代谢功能和利用碳源的能力,以及复垦年限增加导致的土壤微生物生存环境不断改善,致使土壤细菌的多样性、丰富度呈现提高的趋势。本研究结果还表明,复垦土壤的优势菌门均为放线菌门、变形菌门、绿弯菌门、芽单胞菌门和拟杆菌门。这是由于放线菌门等具有相当大的生理、形态和代谢多样性,能够在恶劣的环境条件下生存,是复垦土壤中数量最多、代谢多样性最丰富的细菌门^[27]。其中,绿弯菌门含有绿色色素,与作物地上部生物量呈显著正相关关系^[28],荧光假单胞菌可以通过影响作物生长来促进绿弯菌门繁殖和生长。芽单胞菌门因其具有特殊的生理结构,可以适应复垦土壤恶劣环境,是典型的旱地优势菌门^[29]。但作为农田土壤中的第二大细菌类群的酸杆菌门,因其主要生存在酸性土壤环境中^[30],而本试验土壤呈碱性,因此使酸杆菌门丧失了复垦土壤中优势菌门的地位。相较于菌门水平,荧光假单胞菌对细菌种群分布的影响更突出地表现在属水平上。本研究聚类分析发现,CF、M 处理聚为一簇,CFB、MB 处理聚为一簇,荧光假单胞菌的施用使 *Vicinamibacterales*、*Vicinamibacteraceae*、JG30-KF-CM45 的相对丰度

增加。孟会生等^[31]研究结果表明,微生物菌肥与有机肥配施会使对土壤熟化有利的诺卡氏菌属等细菌群落明显增加,因此,推测 *Vicinamibacterales*、*Vicinamibacteraceae*、JG30-KF-CM45 中是含有某些有利于土壤熟化的细菌,但其正确性还需进一步研究验证。土壤细菌作为地表下数量巨大的生命形式,广泛参与了土壤氧化、硝化、氨化等土壤发生发育全过程,土壤又反作用于其活性、群落结构和功能状态^[32]。本研究结果表明,土壤化学特性指标对细菌群落的影响程度高于土壤生物学特性指标。这是由于有机质、碱解氮等通过提供养分的方式,直接提高了土壤细菌的数量、活性^[33],而脲酶、碱性磷酸酶等主要取决于土壤微生物的数量、活性。张洋等^[34]研究发现,养分含量贫瘠的土壤具有相似的生物细菌群落,该结论也印证了土壤化学特性是影响细菌群落的重要因子^[35]。

不同施肥处理对复垦土壤化学及生物学特性的影响由强到弱依次为荧光假单胞菌配施有机肥 > 单施有机肥 > 荧光假单胞菌配施无机肥 > 单施化肥。其中,荧光假单胞菌配施有机肥较其他施肥处理土壤有机质、碱解氮、有效磷含量显著增加了 7.82%~52.41%,微生物量碳氮含量显著增加了 6.68%~46.26%,碱性磷酸酶、脲酶、转化酶活性显著提高了 15.44%~73.73%。配施荧光假单胞菌对复垦土壤细菌多样性指数无显著影响,在菌门水平上,各处理优势菌门均为放线菌门(*Actinobacteriota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadota*)和拟杆菌门(*Bacteroidota*)(相对丰度 $\geq 3\%$)。在菌属水平上,荧光假单胞菌可以改变土壤细菌的聚类结果。相较于菌门水平,荧光假单胞菌对细菌种群分布的影响更突出地表现在菌属水平上。有机质、碱解氮等土壤化学特性对细菌群落的影响程度明显高于脲酶、碱性磷酸酶、转化酶等土壤生物学特性。

参考文献:

- [1] WANG G F, LI S J, ZHANG J H, et al. Ensuring the safety of coal industry to lay the cornerstone of energy security[J]. *China Coal*, 2022, 48(7): 1-9.
- [2] 戴宝华, 王德亮, 曹勇, 等. 2023 年中国能源行业回顾及 2024 年展望[J]. *当代石油石化*, 2024, 32(1): 1-7.
DAI B H, WANG D L, CAO Y, et al. China's energy industry: 2023 review and 2024 prospect[J]. *Petroleum & Petrochemical Today*, 2024, 32(1): 1-7.
- [3] JING Z R, WANG J M, ZHU Y C, et al. Effects of land subsidence resulted from coal mining on soil nutrient distributions in a

- loess area of China[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 177: 350-361.
- [4] 尚锦, 刘慧颖, 刘赛赛, 等. 煤矸石充填复垦耕地重金属污染风险研判[J]. 河南农业科学, 2023, 52(12): 69-76.
SHANG J, LIU H H, LIU S S, et al. Risk assessment of heavy metal pollution in reclaimed farmland with coal gangue filling[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(12): 69-76.
- [5] 谢钧宇, 张慧芳, 罗云琪, 等. 连续7年施有机肥和化肥提高复垦土壤上玉米产量的驱动因子[J/OL]. 农业工程学报, 1-11 [2024-05-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2047.S.20240126.1904.036.html>.
XIE J Y, ZHANG H F, LUO Y Q, et al. Driving factors of improving maize yields in the reclaimed soils by seven years of applied organic manure and chemical fertilizer[J/OL]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 1-11 [2024-05-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2047.S.20240126.1904.036.html>.
- [6] 王怡宁, 郝鲜俊, 高文俊, 等. 有机肥对矿区复垦土壤团聚体活性有机碳含量的影响[J]. 山西农业科学, 2023, 51(11): 1299-1306.
WANG Y N, HAO X J, GAO W J, et al. Effect of organic fertilizer on the active organic carbon of soil agglomerates in reclaimed mine sites[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2023, 51(11): 1299-1306.
- [7] 梁晓霞. 芦芽山亚高山草甸土壤微生物群落特征及其驱动因子研究[D]. 太原: 山西大学, 2023.
LIANG X X. Study on characteristics and driving factors of soil microbial community in subalpine meadows of Luya mountain [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2023.
- [8] 奚振邦, 王寓群, 杨佩珍. 中国现代农业发展中的有机肥问题[J]. 中国农业科学, 2004, (12): 1874-1878.
XI Z B, WANG Y Q, YANG P Z. The issue on organic manure in developing modern agriculture in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, (12): 1874-1878.
- [9] 李建华. 长期施肥下采煤塌陷区复垦土壤有机碳及微生物特性研究[D]. 太原: 山西大学, 2020.
LI J H. Study on soil organic carbon and microbial characteristics of reclaimed coal mining subsidence area under long-term fertilization[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020.
- [10] 孟瑶, 徐凤花, 孟庆有, 等. 中国微生物肥料研究及应用进展[J]. 中国农学通报, 2008, (6): 276-283.
MENG Y, XU F H, MENG Q Y, et al. Current application status and prospect of microbiological fertilizer in China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, (6): 276-283.
- [11] 金杰人, 鲁凯珩, 肖明. 荧光假单胞菌的应用与展望[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2019, 48(5): 526-535.
JIN J R, LU K H, XIAO M. Application and prospect of *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences), 2019, 48(5): 526-535.
- [12] 王向英, 武欣, 张杰, 等. 解磷菌在复垦土壤中的定殖及促生效果研究[J]. 东北农业大学学报, 2021, 52(7): 40-47.
WANG X Y, WU X, ZHANG J, et al. Colonization of phosphate-solubilizing bacteria in reclaimed soil and the growth promoting effects on maize[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2021, 52(7): 40-47.
- [13] 王帅兵, 孟会生, 武欣, 等. 不同形态氮肥配施固氮菌对复垦土壤酶活性及氮素形态的影响[J]. 灌溉排水学报, 2022, 41(11): 45-49, 77.
WANG S B, MENG H S, WU X, et al. Efficacy of nitrogen-fixing bacteria combined with different nitrogen fertilizers in improving enzymatic activity and nitrogen in reclaimed soil[J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2022, 41(11): 45-49, 77.
- [14] 焦金铨, 安晓虎, 王妍茏, 等. 不同有机腐熟物与荧光假单胞菌配施对复垦土壤氮素形态和酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2024, 47(2): 298-305.
JIAO J C, AN X H, WANG Y L, et al. Effect of different organic rotten materials and *Pseudomonas fluorescens* application on nitrogen morphology and enzyme activities of reclaimed soil [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(2): 298-305.
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
BAO S D. Soil agrochemical analysis[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000.
- [16] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
XU G H, ZHENG H Y. Analyzing methods manual of soil microorganism[M]. Beijing: Agricultural Publishing Press, 1986.
- [17] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986.
GUAN S Y. Soil enzyme and its research methods[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1986.
- [18] 梁利宝, 许剑敏, 张小红. 菌肥与有机无机肥配施对北方石灰性土壤物理性质的影响[J]. 灌溉排水学报, 2014, 33(6): 105-108.
LIANG L B, XU J M, ZHANG X H. Effect of microbial fertilizer and organic chemical fertilizer on physical properties of calcareous cinnamon soil in north of China[J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2014, 33(6): 105-108.
- [19] ZHOU L X, LIU W, DUAN H J, et al. Improved effects of combined application of nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter beijerinckii* and microalgae *Chlorella pyrenoidosa* on wheat growth and saline-alkali soil quality[J]. Chemosphere, 2023, 313, 137409.
- [20] WANG K N, HOU J J, ZHANG S D, et al. Preparation of a new biochar-based microbial fertilizer: nutrient release patterns and synergistic mechanisms to improve soil fertility[J]. Science of The Total Environment, 2023, 860, 160478.
- [21] 董泽鹏, 薛世通, 董琦, 等. 有机无机培肥对复垦土壤肥力和水稻产量的影响[J]. 山西农业科学, 2019, 47(8): 1366-1370.
DONG Z P, XUE S T, DONG Q, et al. Effects of organic-inorganic fertilization on reclaimed soil fertility and rice yield [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2019, 47(8): 1366-1370.
- [22] PHILIPPOT L, CHENU C, KAPPLER A, et al. The interplay between microbial communities and soil properties[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 22: 226-239.
- [23] 秦俊梅, 王改玲. 不同培肥对煤矿区复垦土壤酶活性及微生物量碳、氮的影响[J]. 水土保持学报, 2014, 28(6): 206-210.
QIN J M, WANG G L. Influence of different fertilizers upon carbon and nitrogen of microbial biomass and soil enzyme activity of reclaimed soil in the coal mine area[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2014, 28(6): 206-210.
- [24] 袁玲, 杨邦俊, 郑兰君, 等. 长期施肥对土壤酶活性和氮磷养

- 分的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 1997, (4): 300-306.
- YUAN L, YANG B J, ZHENG L J, et al. Effects of long-term fertilization on enzymatic activities and transformation of nitrogen and phosphorus in soil[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 1997, (4): 300-306.
- [25] 孙瑞莲, 赵秉强, 朱鲁生, 等. 长期定位施肥对土壤酶活性的影响及其调控土壤肥力的作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(4): 406-410.
- SUN R L, ZHAO B Q, ZHU L S, et al. Effects of long-term fertilization on soil enzyme activities and its role in adjusting-cont rolling soil fertility[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2003, 9(4): 406-410.
- [26] 李金融, 侯湖平, 王琛, 等. 基于高通量测序的复垦土壤细菌多样性研究[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(12): 148-157.
- LI J R, HOU H P, WANG C, et al. Soil bacteria diversity of reclaimed soil based on high throughput sequencing[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 41(12): 148-157.
- [27] RAMPELOTTO P H, FERREIRA A S, BARBOZA A D M, et al. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in brazilian savanna under different land use systems[J]. Microbial Ecology, 2013, 66(3): 593-607.
- [28] PODOSOKORSKAYA O A, KADNIKOV V V, GAVRILOV S N, et al. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. Nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class *Ignavibacteria*, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae*[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(6): 1759-1771.
- [29] 张世文, 蔡慧珍, 张燕海, 等. 煤矿区土壤细菌群落结构及其对不同复垦模式的响应[J]. 煤炭科学技术, 2024, 52(2): 338-349.
- ZHANG S W, CAI H Z, ZHANG Y H, et al. Soil bacterial community structure and its response to different reclamation modes in coal mining area[J]. Coal Science and Technology, 2024, 52(2): 338-349.
- [30] WANG Y, LIU Z Y, HAO X Y, et al. Biodiversity of the beneficial soil-borne fungi steered by *Trichoderma*-amended biofertilizers stimulates plant production[J]. Biofilms and Microbiomes, 2023, 9, 46.
- [31] 孟会生, 洪坚平, 杨毅, 等. 配施磷细菌肥对复垦土壤细菌多样性及磷有效性的影响[J]. 应用生态学报, 2016, 27(9): 3016-3022.
- MENG H S, HONG J P, YANG Y, et al. Effect of applying phosphorus bacteria fertilizer on bacterial diversity and phosphorus availability in reclaimed soil[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(9): 3016-3022.
- [32] 张清霞, 吴小刚, 张力群, 等. 荧光假单胞菌 2P24 调控基因突变体定殖能力和生防效果分析[J]. 中国生物防治, 2008, 24(1): 40-46.
- ZHANG Q X, WU X G, ZHANG L Q, et al. Analysis of colonization and biocontrol ability of *Pseudomonas fluorescens* 2P24 regulatory system mutants[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(1): 40-46.
- [33] 毕银丽, 胡晶晶, 刘京. 煤矿微生物复垦区灌木林下土壤养分的空间异质性[J]. 煤炭学报, 2020, 45(8): 2908-2917.
- BI Y L, HU J J, LIU J. Spatial heterogeneity of soil nutrients under shrubbery in micro-reclamation demonstration base in coal mine areas of China[J]. Journal of China Coal Society, 2020, 45(8): 2908-2917.
- [34] 张洋. 不同施肥条件下黄瓜连作土壤微生物多样性分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- ZHANG Y. Analysis of soil microbial diversity in cucumber continuous cropping under different fertilization conditions[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016.
- [35] 梁雪丽, 梁晓霞, 毛晓雅, 等. 芦芽山鬼箭锦鸡儿灌丛不同深度土壤细菌群落分布格局及其影响因素[J]. 应用生态学报, 2024, 35(2): 381-389.
- LIANG X L, LIANG X X, MAO X Y, et al. Distribution pattern and influencing factors of bacterial communities in different soil depths of *Caragana jubata* shrub in Luya mountain, China [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2024, 35(2): 381-389.

著作权使用声明

本刊已许可中国知网以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。本刊支付的稿酬已包含中国知网著作权使用费, 所有署名作者向本刊提交文章发表之行为视为同意上述声明。如有异议, 请在投稿时说明, 本刊将按作者说明处理。

《山西农业科学》编辑部