

脱硫废弃物改良宁夏盐渍化土壤对细菌和 氨氧化微生物丰度的影响

李明^{1*}, 张俊华¹, 姜丽丽²

(1. 宁夏大学新技术应用研究开发中心, 宁夏 银川 750002;

2. 中国科学院青藏高原研究所, 北京 100101)

摘要: 为探明脱硫废弃物改良盐渍化土壤对微生物群落的影响效果, 在 2009~2010 年, 采用田间试验, 施用不同量的脱硫废弃物 (0、0.74、1.49、2.25、3.00 kg·m⁻²), 研究了脱硫废弃物对盐渍化土壤细菌、氨氧化细菌和氨氧化古菌的影响。试验结果表明: 0~20 cm 土层, Ca²⁺ 和 NO₃⁻-N 含量随着施用量增加而增加; 土壤 pH 值、电导率值显著下降。实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析结果表明, 微生物丰度随着脱硫废弃物的施用发生变化, 但这种变化并不与脱硫废弃物的施用量呈线性关系。在 0~20 cm 土壤层, 施脱硫废弃物使得细菌 16S rRNA 基因拷贝数处理组显著高于对照组。氨氧化古菌与氨氧化细菌基因拷贝数在 T2 和 T4 处理高于其它处理。20~40 cm 土层各处理间微生物群落没有显著变化, 或没有出现规律的变化趋势。因此, 脱硫废弃物增加了土壤细菌和氨氧化功能基因丰度, 且对上层土壤影响更为显著。本研究中施用脱硫废弃物 1.49 kg·m⁻² (T2) 是引起细菌和氨氧化功能基因丰度增加的施用量。

关键词: 脱硫废弃物; 盐渍土; 细菌; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌

中图分类号: S156.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6257 (2015) 04-0041-09

土壤盐渍化仍然是 21 世纪人类面临的十分突出的问题。据估计, 全球盐渍化土地每年以 $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ hm² 的速度在增长^[1]。我国在人口日益增长, 耕地面积减少、淡水资源匮乏的情况下, 大量森林、草地、湿地等被开垦为耕地, 再加上人类不合理耕作而造成的土壤次生盐渍化, 使土壤盐渍化日趋加重, 大面积改良盐渍化土壤已迫在眉睫。宁夏回族自治区位于西北地区东部、黄河中上游, 现有耕地面积 127 万 hm²^[1]。1985 年调查资料表明, 宁夏银北西大滩所属平罗县盐渍化的重度、中度和轻度面积分别占 11.1%、12.2% 和 25.2%, 盐渍化面积占总面积的 50% 以上^[2]。土壤盐渍化问题严重制约着该地区农业综合生产能力的提高、绿洲生态系统的建设和农业可持续发展。因此, 宁夏地区盐渍化土壤作为潜在耕地的后备资源, 存在巨大的

开发潜力。

利用脱硫废弃物改良盐渍化土壤是目前土壤改良中一个行之有效的手段^[3-4]。近年来燃煤电厂引入烟气脱硫技术以减少 SO₂ 排放。脱硫技术绝大多数以钙基物质作为吸收剂, 最终生成一种脱硫副产物 (脱硫废弃物), 其主要成分硫酸钙在盐渍化土壤中与土壤溶液中的碳酸钠、碳酸氢钠等发生反应, 生产硫酸钠。钙离子置换钠离子后, 一方面形成钙胶体和有机-无机复合体, 改善土壤团粒结构, 提高土壤通透性; 另一方面降低土壤碱性, 减轻钠离子对作物的毒害。一些研究结果已表明, 在盐渍化土壤中施用脱硫废弃物后, 降低了土壤 pH 值、电导率值、碱化度等理化性质^[5], 增加作物产量^[6-7], 增强作物的抗逆性等。

土壤微生物是农田生态系统的重要组成部分, 在土壤有机质分解、腐殖质形成以及土壤养分转化和循环过程中具有重要作用, 土壤微生物的组成和变化是评价土壤质量、维持土壤肥力和作物生产力的重要指标^[8]。

在土壤氮、磷和钾等营养元素含量变化的同时, 土壤微生物的多样性、尤其某些特定的功能微生物的数量也在不断变化。由于与土壤氮循环密切

收稿日期: 2014-04-15; 最后修订日期: 2014-07-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41261080); 国家科技支撑计划 (2013BAC02B04)。

作者简介: 李明 (1980-), 女, 汉族, 宁夏中卫人, 博士, 助理研究员, 微生物生态学专业。并为通讯作者。E-mail: lm_y096@126.com。

相关的功能微生物—氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 和氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA), 与土壤直接具有特定的响应特性, 可以作为理想的模式微生物, 并且不同施肥、改良措施处理对土壤氨氧化微生物丰度和群落多样性影响的研究已经成为表征土壤环境变化的指标之一^[9]。

施用脱硫废弃物在增加作物生产力和改善土壤环境质量的同时, 也会对土壤的物理、化学和生物学活性产生影响。Siddaramappa 等^[10]通过短期的培养实验发现土壤总氮与脱硫废弃物的施用量呈显著正相关, 这可能是由于脱硫废弃物中含有少量的氮素。这些变化会对土壤微生物产生影响, 同时土壤微生物又会对环境的变化产生响应, 直接的表现就是微生物的丰度和群落结构多样性的变化。由于进入土壤中的铵态氮至少经历一次硝化过程, 以氨氧化微生物模式, 运用定量 PCR 方法测定环境中氨氧化细菌、氨氧化古菌和细菌的丰度对于评价氨氧化微生物在土壤中的生态功能具有重要的生物进化意义; 此外, 为盐渍化土壤的改良利用和可持续性发

展、盐渍化土壤演变规律等的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验基地位于宁夏银北地区平罗县境内的西大滩蝶形洼地, 东经 106°13′~106°26′, 北纬 38°45′~38°55′, 海拔 1 091~1 102 m, 年均降水量 172.5 mm, 7、8、9 三个月降水量占 66.6%, 年平均蒸发量达 1 755 mm, 全年平均相对湿度 56%, 年平均日照时数 2 800~3 200 h, 年均气温 8.5℃, 昼夜温差 8~15℃, 极端最高气温 30℃, 极端最低气温 -25℃; 全年无霜期 155 d。2010 年 8 月采集土壤样品, 试验区内主要有灰钙土、浅色草甸土、灌淤土、盐土、湖土、白僵土、鸡粪土、新积土、沙丘沙地土。采样季试验样地气候条件: 月降水量 29~73 mm, 蒸发量 200.8 mm; 月平均气温为 20.6~21.8℃; 土壤 0~1 m 土层内含水量 7.6%~19.1%, 0~40 cm 土层内土壤温度 22.3~19.0℃, 供试土壤为白僵土, 其理化性质见表 1。

表 1 供试土壤理化性质^[11]

土壤层 (cm)	有机质 (g·kg ⁻¹)	全氮 (g·kg ⁻¹)	碱解氮 (mg·kg ⁻¹)	有效磷 (P, mg·kg ⁻¹)	速效钾 (K, mg·kg ⁻¹)	容重 (g·cm ⁻³)	pH 值	电导率值 (mS·cm ⁻¹)	碱化度 (%)
0~20	4.56	0.25	7.40	6.31	121	1.57	9.58	3.75	28.6
20~40	4.01	0.22	8.91	5.01	116	1.51	9.60	4.75	27.1

1.2 脱硫废弃物成分

脱硫废弃物 (pH=7.1) 来源于宁夏马莲台电厂, 由中国科学院南京土壤研究所土壤与环境分析测试中心进行分析。检测结果: 脱硫废弃物的主要成分为硫酸钙 (CaSO₄·2H₂O 928.1 g·kg⁻¹), 其主要组分类似天然石膏, 其中还含有 Na₂O (2.3 g·kg⁻¹), K₂O (0.15 g·kg⁻¹), MgO (1.9 g·kg⁻¹), Cl (0.3 g·kg⁻¹), As (6.93 g·kg⁻¹), Hg (0.34 g·kg⁻¹), Pb (32 g·kg⁻¹), Cr (23.99 g·kg⁻¹), Cd (0.08 g·kg⁻¹)^[7]。经过洗涤和滤水处理的脱硫废弃物含有 10%~20% 的游离水, 颗粒细小松散均匀, 粒径 30~60 μm, 纯度 90%~95%^[12]。

1.3 研究方法

1.3.1 试验设计

试验样地建立于 2008 年 11 月。采用随机区组设计, 共设置有 5 个处理, 分别为施用脱硫废弃物 0、0.74、1.49、2.25、3.00 kg·m⁻², 分别表示为

CK、T1、T2、T3、T4。每个处理设 3 次重复, 总共 15 个小区, 每个小区面积 10 m×8 m, 分成 3 行 5 列, 小区间距 1 m, 保护行宽 4 m。在撒施脱硫废弃物前清除试验小区样地上的原始植被。于 2008 年 10 月结合整地冬灌将脱硫废弃物一次性均匀施于地表, 旋耕深翻 20 cm, 使其与土壤充分混匀。灌水 2 225 m³·hm⁻²。在每年 4 月人工播种油葵 (富葵 1 号, 播种量 0.075 kg·km⁻²), 行距 50 cm, 株距 25~30 cm。全生育期灌水 2 次, 每次灌水 2 225 m³·hm⁻², 各小区单排单灌, 其他田间管理按常规进行。

1.3.2 样品采集

2009~2011 年 8 月中下旬油葵生长末期在 0~20、20~40 cm 两个土层取样, 用 5 cm 土钻每个处理随机采集 5 个点混成一个样品。土样立即过 2 mm 筛除去较大的根系和石砾, 随后样品收入封口袋, 置于冷藏箱中 (约 4℃) 带回实验室备用。每个混合土壤样品分为 3 个小样品分别置于

实验室 4、-20℃ 和 风干状态条件下保存。保存在 4℃ 条件下的土样用于土壤无机氮的分析；保存在 -20℃ 条件下的土样用于测定微生物数量（定量 PCR 分析）；风干土样用于土壤理化性质测定分析。

1.3.3 测定项目与方法

1.3.3.1 土壤理化性质测定 取土样烘干称重，计算含水量（%）；pH 值采用 pH 计法测定，土水比为 1:2.5。土壤电导率值用电导率仪测定，土水比为 1:5；土壤有机碳和全氮分别采用重铬酸钾外加热法^[13]和凯氏定氮法测定；无机氮采用 KCl 浸提法测定。

1.3.3.2 DNA 提取 每个样品取 0.5 g 土样提取

DNA，本试验采用土壤基因组 DNA 提取（试剂盒 FastDNA® SPIN Kit For Soil）试剂盒提取土壤微生物基因组 DNA，按说明书操作步骤进行。

1.3.3.3 定量 PCR 分析 反应体系：本研究共有 3 个目标基因，分别为细菌的 16S rRNA 基因、氨氧化细菌和氨氧化古菌的 *amoA* 基因，所用的引物具体信息详见表 2。引物的合成由英骏生物工程（上海）有限公司完成。所有反应中添加 0.4 mg · mL⁻¹ 牛血清蛋白（BSA）（用于减少杂质对 PCR 反应的抑制作用）和 1.2 μL 的 DNA 模板。细菌、氨氧化细菌、氨氧化古菌使用 SYBR（R）Premix Ex Taq™（TakaRa, Biotechnology）试剂盒，反应条件和引物序列参见表 2^[14-16]。

表 2 定量 PCR 的引物和反应条件

扩增目标	引物	序列 (5'-3')	扩增长度 (bp)	反应条件
细菌	341F	ACTCCTACGGGAGGCAG ^[14]	200	95℃ 预变性 2 min, 35 个循环 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s
	534R	ATTACCGCGGCTGCTGG		
氨氧化细菌	<i>amoA</i> 1F	GGGGTTTCTACTGGT ^[15]	491	95℃ 预变性 2 min, 40 个循环 95℃ 15 s, 53℃ 30 s, 72℃ 45 s, 80℃ 20 s, 72℃ 60 s
	<i>amoA</i> 2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
氨氧化古菌	arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG ^[16]	635	95℃ 预变性 2 min, 40 个循环 95℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 80℃ 20 s, 72℃ 60 s
	arch- <i>amoA</i> R	GCCATCCATCTGTATGTCCA		

Real-time PCR 反应在型号为 iQ5 (Bio-rad, USA) 机器上运行，反应程序参见表 2。由于聚合酶的原因，细菌的扩增采用 35 个循环，用于扣除阴性对照的荧光背景值，其余几个反应均采用 40 个循环。细菌和氨氧化细菌的 PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测特异性。在 83℃ 收集氨氧化古菌的反应荧光信号，以防止由于引物二聚体的存在所引起的误差 (Horz et al. 2004)，反应完成后设置溶解曲线用以检验产物的特异性，其程序为 55℃ 至 99℃ 之间，每 0.5℃ 读数，其间停留 10 s。起始模

板浓度由 Ct 值确定。数据分析采用 iCycler 软件 (version 1.0.13840.0 CR)。

标准曲线的制作：①提取土壤 DNA (FastDNA® SPIN Kit For Soil 试剂盒)。②应用特异性引物扩增目标片段和反应条件见表 3，即为 341F/534R；氨氧化细菌 *amoA* - 1F/*amoA* - 2R；氨氧化古菌 *amoA*F/*amoA*R；③所得 PCR 产物经切胶纯化连接在 pGEM - T Easy 载体 (Promega, Corp., Madison, Wis.)，然后克隆到大肠杆菌 JM109 (TakaRa)，所获得的蓝白斑平板采用 T7/SP6 通用引物鉴

表 3 普通 PCR 的引物和反应条件

扩增目标	引物	序列 (5'-3')	扩增长度	反应条件
细菌	341F	ACTCCTACGGGAGGCAG ^[14]	200	94℃ 预变性 5 min, 30 个循环 94℃ 60 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1min, 72℃ 10 min
	534R	ATT ACC GCG GCTGCT GG		
氨氧化细菌	<i>amoA</i> - 1F	GGGGTTTCTACTGGT ^[15]	491	94℃ 预变性 5 min, 35 个循环 94℃ 30 s, 50℃ 60 s, 72℃ 3min, 72℃ 10 min
	<i>amoA</i> - 2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
氨氧化古菌	arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG ^[16]	635	94℃ 预变性 5 min, 35 个循环 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 1min, 72℃ 10 min
	arch- <i>amoA</i> R	GCCATCCATCTGTATGTCCA		

定阳性克隆子并送交测序; ④所得克隆子经 LB + Ampicillin 培养基 37℃ 过夜培养, 采用 MiniBEST 质粒纯化试剂盒 (TaKaRa) 提取质粒, 并用 Nano-drop 测定质粒浓度; ⑤将质粒进行 10 倍梯度系列稀释制作标准样品和待测样品一起扩增, 根据所得标准曲线计算出样品中的基因拷贝数, 最后以基因拷贝数每克干土为单位进行分析。

1.3.4 数据分析

用单因素方差分析每年、每个土层和每个处理定量 PCR 的结果。用 Kolmogorov - Smirnov 方法检测数据是否符合正态分布。如检测到不符合正态分布将数据进行对数转换。单因素方差分析采用 SPSS 16.0 软件。为了进一步调查是哪些变量影响土壤微生物量和 16S rRNA 基因拷贝数, 以微生物生物量或 16S rRNA 基因拷贝数作为因变量, 土壤水分、pH 值、总有机碳、总氮、C/N、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 Ca^{2+} 和 Na^+ 作为自变量进行逐步多元回归分析。逐步回归所用到的分析软件为 SAS 8.1。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质的变化

2009 年各土层土壤理化性质见表 4。在 0 ~ 20 cm 土层, 土壤 pH 值随着脱硫废弃物的施用量增加逐渐降低, 在 20 ~ 40 cm 土层没有随着脱硫废弃物的施用出现线性变化。在 0 ~ 20 cm 土层, 土壤有机碳在 T2 处理组最低。在两个土层中没有发现土壤 C/N 随着脱硫废弃物施用梯度发生线性变化。其他的理化因子没有显著的变化。

2010 年各土层土壤理化性质见表 5。土壤 pH 值的变化趋势与 2009 年一致。在 0 ~ 20 cm 土层土壤电导率值在施用脱硫废弃物后 T3 比对照下降 67%。土壤无机氮在施用脱硫废弃物后 ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$) 分别增加了 8% ~ 33%, 64% ~ 290%。土壤电导率值和无机氮的变化没有随着脱硫废弃物的施加而呈线性关系。在 20 ~ 40 cm, 土壤 C/N、有机碳、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 随着脱硫废弃物施用量增加而呈梯度增加。脱硫废弃物对其他一些理化因子影响不显著。

2.2 土壤细菌、氨氧化古菌和氨氧化细菌 *amoA* 基因数量变化

2009 年和 2010 年各土层土壤细菌 16S rRNA 基因拷贝数见图 1。2009 年, 细菌 16S rRNA 基因拷贝数变化范围是 3.93×10^6 ~ 1.91×10^7 拷贝数每克

干土之间。在 0 ~ 20 cm 土层, 细菌基因拷贝数在 T3 和 T4 处理组中显著的高于其他处理组。20 ~ 40 cm 土层, 各处理间没有显著差异。

2010 年细菌 16S rRNA 基因拷贝数变化范围 8.51×10^5 ~ 1.83×10^8 拷贝数每克干土 (图 1)。0 ~ 20 cm 土层, 细菌基因拷贝数在 T1、T2、T3、T4 显著高于对照组, 但在 T1 - T4 处理组间没有显著的差异。在 20 ~ 40 cm 土层, 各处理间没有显著差异。0 ~ 20 cm 土层, 细菌基因拷贝数高于 20 ~ 40 cm 土层。

氨氧化古菌和氨氧化细菌 *amoA* 基因均采用 SYBR green I 检测。所有样品均被成功扩增, 重复间 Ct 值大于 0.5 的给予舍弃。氨氧化古菌和氨氧化细菌标准曲线的扩增效率均大于 90%, 标准曲线的线性关系 r 大于 0.99。

2009 年和 2010 年各土层氨氧化古菌和氨氧化细菌的 *amoA* 基因拷贝数见图 2。2009 年氨氧化古菌的变化范围在 2.59×10^4 ~ 1.41×10^5 拷贝数每克干土之间, 氨氧化细菌的变化范围 4.49×10^3 ~ 7.36×10^4 拷贝数每克干土之间。在 0 ~ 20 cm 土层, 氨氧化古菌呈增长趋势, 其中 T4 处理组显著高于 CK、T1、T3 处理组。氨氧化细菌在 T2 和 T3 处理组显著减少。在 20 ~ 40 cm 土层, 氨氧化古菌高于氨氧化细菌。另外, 氨氧化古菌在 T4 处理组显著低于其他处理组; T2、T3、T4 氨氧化细菌显著低于其他处理。

2010 年 (图 2), 0 ~ 20 cm, 在 T2 处理组中氨氧化古菌基因拷贝数高于其他组, 氨氧化细菌也得到一致的结果。氨氧化细菌在对照组、T1、T2 和 T4 处理组高于 T3 处理组。氨氧化古菌的变化范围在 2.47×10^4 ~ 5.41×10^5 拷贝数每克干土之间, 氨氧化细菌的变化范围 1.32×10^3 ~ 7.49×10^4 拷贝数每克干土之间。在 20 ~ 40 cm 土层, 各处理组的氨氧化古菌均高于氨氧化细菌。

2.3 土壤理化因子与土壤微生物群落相关性的分析

2009 年和 2010 年土壤理化因子和土壤微生物群落相关性分析结果见表 6。2009 年, 氨氧化古菌 *amoA* 基因拷贝数与土壤水分呈正相关, 与电导率值呈负相关。氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数与电导率值和有机碳呈显著正相关, 与土壤水分和 Ca^{2+} 浓度呈负相关。

表4 2009年0~20 cm和20~40 cm两个土层的土壤理化性质

	0~20 cm				20~40 cm					
	CK	T1	T2	T3	T4	CK	T1	T2	T3	T4
SM (%)	8.54 ± 0.65a	8.12 ± 0.56a	7.55 ± 0.34a	8.89 ± 0.34a	8.28 ± 0.34a	11.40 ± 0.57a	9.92 ± 0.82a	8.97 ± 0.64a	12.39 ± 0.80a	9.37 ± 0.05a
pH值	9.33 ± 0.18a	9.19 ± 0.52ab	9.20 ± 0.06a	8.44 ± 0.02ab	8.28 ± 0.03b	9.45 ± 0.35a	9.33 ± 0.07a	9.30 ± 0.25a	8.84 ± 0.15a	8.80 ± 0.40a
EC (dS · m ⁻¹)	1.17 ± 0.04a	1.33 ± 0.27a	1.09 ± 0.10a	1.21 ± 0.13a	1.12 ± 0.13a	1.11 ± 0.09a	1.13 ± 0.03a	1.06 ± 0.00a	1.03 ± 0.04a	1.04 ± 0.22a
SOC (g · kg ⁻¹)	7.27 ± 0.38a	7.79 ± 0.07a	6.00 ± 0.45b	6.47 ± 0.60ab	6.97 ± 0.27a	4.94 ± 0.62a	4.34 ± 0.71a	5.24 ± 0.78a	5.25 ± 0.03a	4.42 ± 0.33a
TN (g · kg ⁻¹)	0.40 ± 0.07a	0.36 ± 0.03a	0.35 ± 0.03a	0.38 ± 0.02a	0.56 ± 0.04a	0.34 ± 0.01a	0.35 ± 0.00a	0.33 ± 0.02a	0.31 ± 0.02a	0.38 ± 0.05a
C/N	18.80 ± 3.87ab	21.35 ± 0.55a	14.21 ± 0.43bc	17.03 ± 0.28ab	12.48 ± 1.46c	15.82 ± 2.74b	12.01 ± 2.86bc	16.19 ± 0.62a	16.64 ± 0.48a	11.57 ± 0.18c
NH ₄ ⁺ - N (mg · kg ⁻¹)	11.68 ± 0.16a	11.13 ± 0.01a	13.51 ± 0.55a	11.14 ± 1.31a	13.15 ± 0.26a	11.79 ± 0.20a	12.90 ± 0.05a	11.07 ± 1.28a	11.03 ± 0.13a	11.55 ± 1.44a
NO ₃ ⁻ - N (mg · kg ⁻¹)	1.93 ± 0.27a	1.61 ± 0.21a	2.25 ± 0.02a	2.27 ± 0.25a	2.59 ± 0.86a	1.48 ± 0.11a	1.31 ± 0.33a	1.00 ± 0.19a	1.71 ± 0.05a	2.20 ± 0.61a
Ca ²⁺ (%)	2.58 ± 0.20a	2.68 ± 0.08a	2.73 ± 0.13a	2.64 ± 0.06a	2.76 ± 0.03a	2.67 ± 0.06a	2.86 ± 0.11a	2.79 ± 0.13a	2.83 ± 0.14a	2.78 ± 0.07a
Na ⁺ (%)	0.63 ± 0.07a	0.70 ± 0.04a	0.75 ± 0.05a	0.60 ± 0.13a	0.67 ± 0.05a	0.65 ± 0.03a	0.67 ± 0.03a	0.67 ± 0.02a	0.67 ± 0.03a	0.61 ± 0.01a

注：数值为平均值 ± 标准差 (n=3)，同一行同一土层数据显著性差异以不同字母表示 (P<0.05)。SM = 土壤含水量；EC = 电导率值；SOC = 土壤有机碳；TN = 土壤总氮；C/N = 土壤总有机碳/土壤总氮^[17]。下同。

表5 2010年0~20 cm和20~40 cm两个土层的土壤理化性质

	0~20 cm				20~40 cm					
	CK	T1	T2	T3	T4	CK	T1	T2	T3	T4
SM (%)	11.29 ± 0.38a	7.84 ± 0.35a	11.36 ± 0.51a	13.23 ± 2.41a	9.76 ± 0.31a	16.04 ± 2.30b	11.00 ± 1.16b	14.13 ± 0.30b	17.49 ± 0.42a	16.36 ± 0.84ab
pH值	9.27 ± 0.04a	8.32 ± 0.30b	8.33 ± 0.18b	8.33 ± 0.08b	8.21 ± 0.01b	9.26 ± 0.37a	9.25 ± 0.16a	8.97 ± 0.49a	9.08 ± 0.12a	8.93 ± 0.16a
EC (dS · m ⁻¹)	0.70 ± 0.06a	0.42 ± 0.08b	0.31 ± 0.02c	0.23 ± 0.02c	0.67 ± 0.09a	0.39 ± 0.05c	0.53 ± 0.05bc	0.93 ± 0.09a	0.68 ± 0.15b	0.18 ± 0.01d
SOC (g · kg ⁻¹)	7.42 ± 1.60a	6.84 ± 0.73a	6.31 ± 0.12a	6.20 ± 0.00a	6.15 ± 0.59a	5.05 ± 0.07b	6.98 ± 0.90a	6.30 ± 0.26ab	5.37 ± 0.12b	5.71 ± 0.49ab
TN (g · kg ⁻¹)	0.41 ± 0.02a	0.46 ± 0.07a	0.46 ± 0.02a	0.42 ± 0.08a	0.46 ± 0.01a	0.30 ± 0.01a	0.35 ± 0.05a	0.35 ± 0.04a	0.28 ± 0.02a	0.31 ± 0.06a
C/N	18.38 ± 1.75a	14.55 ± 1.09b	13.44 ± 1.37b	14.05 ± 0.32b	13.92 ± 1.13b	16.71 ± 0.44b	19.56 ± 0.57a	18.06 ± 0.43ab	19.16 ± 0.67a	18.46 ± 0.41a
NH ₄ ⁺ - N (mg · kg ⁻¹)	8.49 ± 0.71b	9.34 ± 0.81ab	9.23 ± 0.50ab	11.33 ± 0.63a	9.53 ± 0.52ab	6.89 ± 0.86a	5.30 ± 0.22a	5.52 ± 0.73a	6.03 ± 0.12a	6.01 ± 0.46a
NO ₃ ⁻ - N (mg · kg ⁻¹)	1.18 ± 0.32b	1.94 ± 0.64b	3.70 ± 0.68b	3.40 ± 0.07b	4.61 ± 0.69a	0.59 ± 0.38b	1.75 ± 0.00a	2.05 ± 0.66a	1.13 ± 0.03a	1.23 ± 0.18a
Ca ²⁺ (%)	2.57 ± 0.06b	3.34 ± 0.11a	2.99 ± 0.08b	2.92 ± 0.05b	2.90 ± 0.07b	2.67 ± 0.08a	2.98 ± 0.00a	2.88 ± 0.10a	2.86 ± 0.03a	2.72 ± 0.01a
Na ⁺ (%)	0.49 ± 0.01a	0.43 ± 0.01a	0.44 ± 0.01a	0.43 ± 0.01a	0.44 ± 0.01a	0.48 ± 0.04a	0.45 ± 0.01a	0.46 ± 0.02a	0.46 ± 0.03a	0.48 ± 0.02a

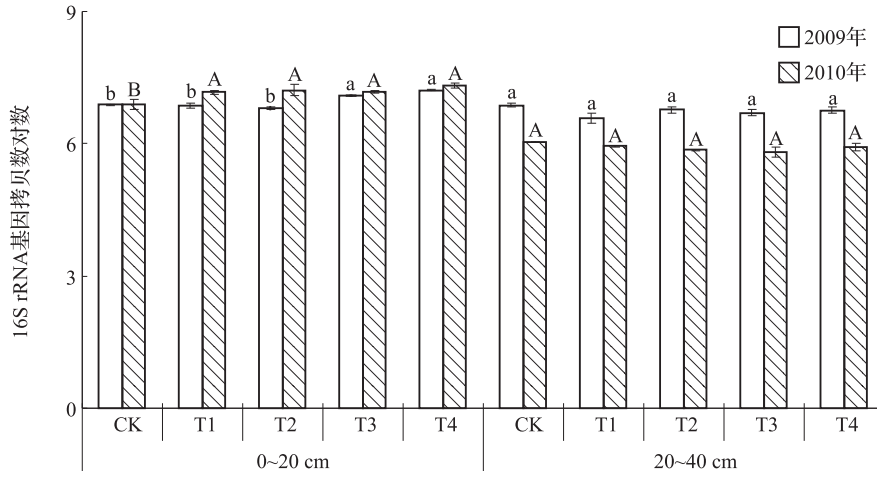


图1 2009年和2010年不同施脱硫废弃物处理下土壤细菌16S rRNA基因拷贝数
注：柱形图上方的大、小写字母分别表示2010年、2009年在方差分析中0.05水平的差异显著性。

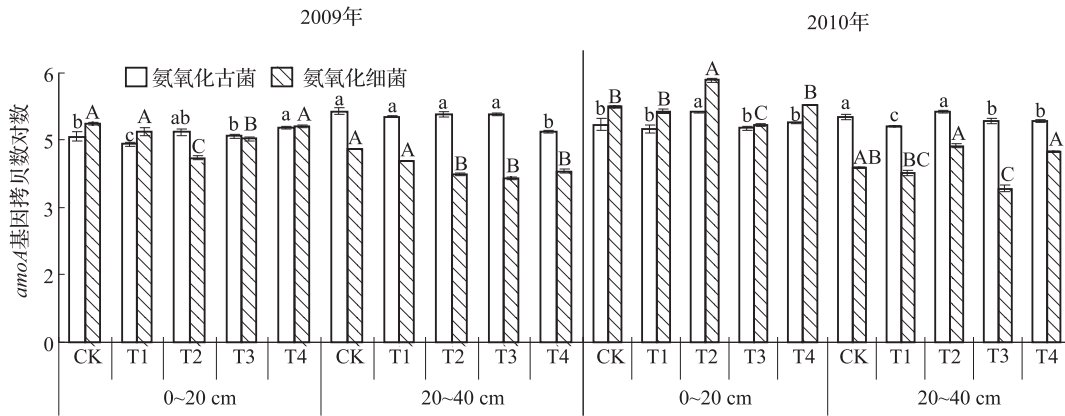


图2 2009年和2010年不同脱硫废弃物处理下氨氧化古菌和氨氧化细菌的amoA基因拷贝数
注：柱形图上方的大、小写字母分别表示每种菌、每年在方差分析中0.05水平的差异显著性。

表6 2009年和2010年影响微生物群落的理化因子

年份	微生物群落	理化因子变量	r ²	±	F	P
2009	氨氧化古菌	土壤含水量	0.44	+	22.21	<0.000 1
		电导率值	0.59	-	9.75	0.00
		C/N	0.69	+	8.88	0.01
	氨氧化细菌	电导率值	0.22	+	7.95	0.01
		Ca ²⁺	0.43	-	9.58	0.04
		土壤有机碳	0.53	+	6.00	0.02
	细菌	土壤含水量	0.61	-	5.18	0.03
		pH值	0.35	-	15.16	0.00
2010	氨氧化细菌	C/N	0.10	+	4.64	0.04
		土壤含水量	0.70	-	5.82	p < 0.000 1
		NH ₄ ⁺ - N	0.63	+	7.19	0.05
	细菌	C/N	0.75	-	5.12	P < 0.000 6
		总氮	0.67	+	51.8	p < 0.000 1
		NH ₄ ⁺ - N	0.10	+	11.07	0.00

注：以P值0.05为评定标准。

2010年,细菌的16S rRNA基因拷贝数与土壤总氮和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量呈显著正相关。氨氧化细菌与土壤水分、C/N呈显著负相关,与土壤 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量呈显著正相关。

3 讨论

氨单加氧酶功能基因 *amoA* 在泉古菌中的发现,使研究者开始关注古菌在各种生态系统氨氧化过程中所起的作用。现已探明氨氧化古菌广泛分布于海洋水相和陆地土壤等环境中^[18]。本研究对不同脱硫废弃物施用量处理下土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌的 *amoA* 基因拷贝数进行了比较分析,结果在0~20 cm 土层,氨氧化细菌的 *amoA* 基因拷贝数要显著高于氨氧化古菌,预示着其在氨氧化过程中的潜在作用。从 Real-time PCR 的结果显示,在施用脱硫废弃物的第一年(2009年),氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数随着施用量的增加呈先降低后升高,但是施用量最高的 T4 处理组和 CK 之间差异不显著,这表明,第一年施用脱硫废弃物对氨氧化细菌的影响不大。土壤氨氧化细菌适宜生长的 pH 值范围为 7.0~8.0,而在 pH 值小于 6 或者大于 9 的范围内,氨氧化能力就会受到影响^[19]。由此可以推测,短期施用脱硫废弃物对土壤 pH 值的影响不大,从而对氨氧化细菌的影响也较小。分析 2009 年的结果发现,土壤电导率值与氨氧化古菌和氨氧化细菌的 *amoA* 的基因拷贝数都具有显著的相关性,表明土壤盐分(电导率值)是氨氧化微生物的重要影响因子。在 2009 年,氨氧化细菌与土壤中 Ca^{2+} 呈显著的负相关,这主要是由于脱硫废弃物中含有大量的可溶性盐分和微量元素,在脱硫废弃物施入之初会抑制土壤氮循环^[20-21],对氮循环的抑制势必会影响到氨氧化细菌的丰度。但是在 2010 年,研究发现氨氧化细菌丰度随着施用年限的增加而增加,这证明长期施用脱硫废弃物能够改善土壤的营养元素的含量^[22-23]。

试验结果表明,2009年0~20 cm 土层细菌 16S rRNA 基因拷贝数随着施用脱硫废弃物数量的增加而显著增加,在 2010 年基本保持了相同的变化趋势。进一步进行逐步回归分析发现,施用脱硫废弃物第一年,土壤 pH 值与细菌的基因拷贝数呈显著负相关。这表明脱硫废弃物所引起的盐碱地土壤 pH 值的降低有利于微生物的生长繁殖,进而会引起土壤微生物量的增加。另外一些研究结果表

明,在酸性土壤中,低的土壤 pH 值会抑制微生物的活性和生长,从而导致微生物量的降低^[24-25]。因此,土壤微生物对脱硫废弃物如何响应也是由土壤类型决定的。在 20~40 cm 土层,各个处理间细菌在两年间的变化差异不显著,这表明,脱硫废弃物的施用对深层土壤微生物群落的影响相对要小于表层土壤。

在本研究中,土壤总氮与 2010 年 16S rRNA 基因拷贝数呈显著正相关。这与已有的研究结果一致,Murphy 等^[26]报道指出土壤总氮与微生物量呈正相关。同时,2010 年试验结果发现氨氧化细菌 *amoA* 基因拷贝数与无机氮($\text{NO}_3^- - \text{N}$, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$)显著正相关。以上结果表明,在本研究样地无机氮对于土壤微生物来说是非常重要的氮源,脱硫废弃物的施加缓解了该地区的氮素限制,刺激微生物的生长。土壤盐碱化往往会导致土壤有机碳和氮素偏低^[27-28]。土壤微生物生长与活动可能会不同程度的受到碳或氮的限制^[29]。外源性氮素的添加会引起土壤微生物生物量、活性和种群结构的变化^[30-31]。

从本研究结果可看出,脱硫废弃物的施用能显著改良盐渍化土壤,并对细菌和氨氧化微生物产生影响。施用量以 T2 的效果最为明显,因此引起微生物群落响应的脱硫废弃物施用量阈值为 $1.49 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ (T2)。但细菌 16S rRNA 基因拷贝数在 T1~T4 处理间差异不显著,因此脱硫废弃物的施用量可能不是一个精确值,而是一个范围,王彬^[12]和李凤霞^[32]等的研究即证实了这一点。从本研究结果来看,最佳施用范围应该在 $1.49 \sim 3.00 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ (T2~T4) 之间。

参考文献:

- [1] 肖国举,罗成科,张峰举,等. 脱硫石膏施用时期和深度对改良碱化土壤效果的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2009, 27(6): 197-203.
- [2] 张俊华,贾科利,孙兆军. 宁夏银北地区盐化土壤改良成效研究[J]. 干旱地区农业研究, 2009, 27(6): 232-235.
- [3] Desutier T M, Cihacek L J. Potential agricultural uses of flue gas desulfurization gypsum in the northern great plains [J]. Agronomy Journal, 2009, 101(4): 817-825.
- [4] Sakai Y, Matsumoto S, Sadakata M. Alkali soil reclamation with flue gas desulfurization gypsum in China and assessment of metal content in corn grains [J]. Soil and Sediment Contamination, 2006, 13(1): 65-80.
- [5] 陈欢,王淑娟,陈昌和,等. 烟气脱硫废弃物在碱化土壤改良中的应用及效果[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23

- (4): 38–42.
- [6] 李茜, 孙兆军, 秦萍, 等. 燃煤烟气脱硫废弃物和糠醛渣对盐碱土的改良效应 [J]. 干旱地区农业研究, 2008, 26 (4): 70–73.
- [7] 白海波, 毛桂莲, 李晓慧, 等. 脱硫废弃物对盐碱地水稻幼苗抗氧化酶活性和膜脂过氧化作用的影响 [J]. 西北农业学报, 2009, 18 (3): 122–126.
- [8] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil; a review [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29: 111–129.
- [9] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia – oxidizing bacteria; a model for molecular microbial ecology [J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 2001, 55: 485–529.
- [10] Siddaramappa R, McCarty G W, Wright R J, et al. Mineralization and volatile loss of nitrogen from soils treated with coal combustion byproducts [J]. *Biol Fertil Soils*, 1994, 18: 279–284.
- [11] 孙兆军. 银川平原盐碱荒地改良模式研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [12] 王彬, 肖国举, 毛桂莲, 等. 燃煤烟气脱硫废弃物对盐碱土的改良效应及对向日葵生长的影响 [J]. *植物生态学报*, 2010, 34: 1227–1235.
- [13] Kalembsa S J, Jenkinson D S. A comparative study of titrimetric and gravimetric methods for the determination of organic carbon in soil [J]. *Journal of Scientific Food Agriculture*, 1973, 24: 1085–1090.
- [14] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 127–141.
- [15] Rotthauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker; Molecular fine – scale analysis of natural ammonia – oxidizing populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 4704–4712.
- [16] Tourna M, Freitag T E, Nicol G W, et al. Activity and temperature responses of ammonia – oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10: 1357–1364.
- [17] Li M, Jiang L L, Sun Z J, et al. Effects of flue gas desulphurization gypsum by – products on microbial biomass and community structure in alkaline – saline soils [J]. *Journal of Soils and Sediment*, 2012, 12: 1040–1053.
- [18] 李晓慧. 不同作物与施肥对黑土氨氧化微生物的影响 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.
- [19] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia – oxidizing bacteria; A model for molecular microbial ecology [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 485–529.
- [20] Garau M A, Dalmau J L, Felipe M T. Nitrogen mineralization in soil amended with sewage and fly ash [J]. *Water Sci Tech*, 1991, 12: 199–201.
- [21] Sudha J, Dinesh G. Fly ash as a soil ameliorant for improving crop production – a review [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 1136–1147.
- [22] Rautaray S K, Ghosh B C, Mitra B N. Effect of fly ash, organic wastes and chemical fertilizers on yield, nutrient uptake, heavy metal content and residual fertility in a rice – mustard cropping sequence under acid lateritic soils [J]. *Bioresour Technol*, 2003, 90: 275–283.
- [23] 黄菊莹, 于海龙, 孙兆军, 等. 添加燃煤脱硫废弃物和专用改良剂对碱化土壤和水稻生长的影响 [J]. 干旱地区农业研究, 2011, 29: 70–74.
- [24] He J Z. Microbial diversity under long – term fertilization regimes of Chinese soils [A]. Liu S J, Drake H L. *Microbes and environment; Perspectives and challenges* [M]. Beijing: Science Press, 2008.
- [25] Zhang N L, Wan S Q, Li L H, et al. Impacts of urea N addition on soil microbial community in a semi – arid temperate steppe in northern China [J]. *Plant and Soil*, 2008, 311: 19–28.
- [26] Murphy D V, Sparling G P, Fillery I R P. Stratification of microbial biomass C and N and gross N mineralization with soil depth in two contrasting Western Australian agricultural soils [J]. *Aust J Soil Res*, 1998, 6: 45–55.
- [27] El – Ahyad M S, Ismail I K, Risk M A. Ecological studies of the microflora of saline Egyptian soils [A]. In: *Arid land of plant resources* [C]. Cairo, Egypt: the International Arid Land Conference of Plant Resources, 1979. 582–597.
- [28] Zahran H H. Characterization of root – nodule bacteria indigenous in the salt – affected soils of Egypt by lipopolysaccharide, protein and plasmid profiles [J]. *J Basic Microbiol*, 1992, 32: 279–287.
- [29] Michelsen A, Graglia E, Schmidt I K. Differential responses of grass and a dwarf shrub to long – term changes in soil microbial biomass C, N and P following factorial addition of NPK fertilizer, fungicide and labile carbon to a heath [J]. *New Phytologist*, 1999, 143: 523–538.
- [30] Sarathchandra S U, Ghani A, Yeates G W, et al. Effect of nitrogen and phosphate fertilizers on microbial and nematode diversity in pasture soils [J]. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33: 953–964.
- [31] Xu W H, Wan S Q. Water – and plant – mediated responses of soil respiration to topography, fire, and nitrogen fertilization in a semiarid grassland in northern China [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, 40: 679–687.
- [32] 李凤霞, 杨涓, 许兴, 等. 脱硫废弃物施用对盆栽油菜碱化土壤微生物多样性的影响 [J]. *土壤*, 2011, 43 (2): 270–276.

[下转第 70 页]

1984, 26 (6): 605–615.

粒期叶片衰老与根系活力的影响 [J]. 玉米科学, 2012, (2): 75–81.

[12] 王海燕, 高聚林, 王志刚, 等. 高密度对超高产春玉米花

Effects of different fertilization treatments on yield and activated oxygen metabolism of maize

WANG Hong-fei, LI Xu-hua^{*}, DONG Jing, XU Jiu-kai, ZHUANG Zhen-dong, WANG Chun-na, ZHAO Xiao-cui (National Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Taian Shandong 271018)

Abstract: Long-term field experiment was carried out from 2009 to 2013 to study the effect of different fertilization treatments on yield and active oxygen metabolism of summer maize. The results showed that, in NPK treatment the yield of summer maize significantly increased, which was up to 9 299.85 kg/hm² and grains per spike and 1 000 grain weight were the highest. The spike length and spike weight of NP treatment had no significant difference with those of NPK treatment. Nitrogen effectively improved the chlorophyll content of spike leaf and grain filling rate and it had the most influence on the activity of peroxidase of maize leaves located near the ear. N and K fertilizer effectively increased the superoxide dismutase activity and soluble protein content of maize leaves located near the ear, and decreased their content of malondialdehyde. Therefore, the rational combination of N and K could effectively improve the efficiency of photosynthesis, delay leaf senescence and increase the grain yield of maize.

Key words: fertilization treatments; summer maize; yield; activated oxygen metabolism

[上接第 48 页]

Influence of flue gas desulphurization by-products on abundance of soil bacteria, ammonia oxidizing microorganisms in saline soil in Ningxia province

LI Ming^{1*}, ZHANG Jun-hua¹, JIANG Li-li² (1. Development Center of New Technique Application and Research, Ningxia University, Yinchuan Ningxia 750002; 2. Institute of Tibetan Plateau Research Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: To investigate the effect of flue gas desulphurization by-products on saline-soil microbial communities, a field experiment with five different levels of flue gas desulphurization by-products (FGDB) gradient, which were 0, 0.74, 1.49, 2.25, 3.00 kg · m⁻² respectively, was performed to examine the effect of FGDB on the soil bacteria, ammonia oxidizing bacteria and ammonia oxidizing archaea in 2009 and 2010. The results indicated that FGDB addition resulted in an increase in Ca²⁺ and NO₃⁻ - N and a decrease in pH and electrical conductivity. The results of real-time quantitative PCR showed that the abundance of microbial community composition differed with different FGDB gradient but was non-linear. Total bacterial 16S rRNA gene copy numbers were significantly higher in FGDB treatments than control. The abundance of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacterial (AOB) in T2 and T4 treatments was higher than other treatments. There were no significant differences at 20 ~ 40 cm depth for microbial community. The addition of 1.49 kg · m⁻² was a threshold value for improving soil bacterial and functional gene abundance. The effects of FGDB on soil microbial community were more effective in top soil than deeper depth.

Key words: flue gas desulphurization by-products; saline-soil; bacteria; ammonia oxidizing bacteria; ammonia oxidizing archaea