

DOI: 10.19741/j.issn.1673-4831.2019.0544

王静,王磊,张爱君,等.长期增施有机肥对土壤不同组分有机磷含量及微生物丰度的影响[J].生态与农村环境学报,2020,36(9):1161-1168.

WANG Jing, WANG Lei, ZHANG Ai-jun, et al. Effects of Long-term Organic Fertilization on the Content of Soil Organic Phosphorus Fractions and Abundance of Soil Microorganism[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2020, 36(9): 1161-1168.

长期增施有机肥对土壤不同组分有机磷含量及微生物丰度的影响

王静^{1,2}, 王磊^{1①}, 张爱君³, 张辉¹, 张永春^{1,2②} (1. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所/ 农业农村部级江苏耕地保育科学观测站, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏南京 210095; 3. 江苏徐淮地区徐州农业科学研究所, 江苏徐州 221131)

摘要: 为探究不同施肥模式对土壤不同组分有机磷(P_o)含量,细菌、真菌、有机磷转化相关微生物(*phoD*微生物)丰度和碱性磷酸酶(ALP)活性的影响。以长期施肥定位试验点土壤为试验材料,采用单因素随机区组设计,共选取不施肥(CK)、施氮钾肥(NK)、施氮磷钾肥(NPK)、单施有机肥(M)和有机无机肥配施(NPKM)5个处理。结果表明:与CK和NK处理相比,M处理土壤有机磷含量显著提高52.3%和47.8%,NPKM处理有机磷含量显著提高34.7%和30.6%。M处理土壤有效磷含量分别为CK和NK处理的34.2和31.0倍,NPKM处理有效磷含量分别为CK和NK处理的25.3和23.0倍。与CK处理比较,M和NPKM处理土壤活性P_o、中度活性P_o、中稳性P_o和高稳性P_o含量显著增加。M和NPKM处理土壤细菌、真菌、*phoD*微生物丰度和ALP活性均显著高于CK、NK和NPK处理。土壤活性P_o、中度活性P_o、中稳性P_o和高稳性P_o含量与*phoD*微生物丰度呈显著正相关($P < 0.05$);活性P_o、中稳性P_o和高稳性P_o含量与ALP活性呈显著正相关($P < 0.05$),且不同组分有机磷受*phoD*微生物丰度和ALP活性的影响程度由大到小依次均为高稳性P_o、活性P_o、中稳性P_o和活性P_o。土壤增施有机肥增加了土壤有机磷及不同组分有机磷含量,提高了细菌、真菌、*phoD*微生物丰度和ALP活性。

关键词: 有机肥; 土壤有机磷; 不同组分有机磷; 土壤*phoD*微生物

中图分类号: S154.1; S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-4831(2020)09-1161-08

Effects of Long-term Organic Fertilization on the Content of Soil Organic Phosphorus Fractions and Abundance of Soil Microorganism. WANG Jing^{1,2}, WANG Lei^{1①}, ZHANG Ai-jun³, ZHANG Hui¹, ZHANG Yong-chun^{1,2②}

(1. Institute of Agricultural Resources and Environments, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/ Scientific Observing and Experimental Station of Arable Land Conservation (Jiangsu), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China; 2. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Xuzhou Institute of Agricultural Sciences of Xuhuai District of Jiangsu Province, Xuzhou 221131, China)

Abstract: The effects of different fertilization regimes on soil organic phosphorus fractions (P_o), the abundances of bacteria, fungi, and microorganisms associated with soil organic phosphorus transformation (*phoD*-harboring microbial), and alkaline phosphatase (ALP) were explored by analyzing soil samples collected from a long-term fertilization experimental site. A single-factor randomized block design was adopted and five treatments were set up as follows: (1) CK, no fertilizer treatment; (2) NK, N and K fertilizer treatment; (3) NPK, N, P and K fertilizer treatment; (4) M, organic fertilizer treatment; (5) NPKM, organic and inorganic fertilizers treatment. Results show that compared with the CK and NK, soil organic phosphorus contents were significantly increased by 52.3% and 47.8% for the M, and 34.7% and 30.6% for the NPKM, respectively. The available phosphorus contents in the M was 34.2 and 31.0 times of that in the CK and NK, re-

收稿日期: 2019-07-18

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20190259); 国家甘薯产业技术体系项目(CARS-10-B9); 江苏省农业科技自主创新资金[cx(17)1001]; 江苏省重点研发计划(BE2019378); 国家重点研发计划(2018YFD0200505)

① 通信作者 E-mail: wanglei_njau@163.com

② 共同通信作者 E-mail: yczhang66@sina.com

spectively. The available phosphorus content in the NPKM was 25.3 times and 23.0 times of that in the CK and NK, respectively. Besides, the contents of labile organic phosphorus, moderately labile organic phosphorus, moderately resistant organic phosphorus and highly resistant organic phosphorus were significantly increased for the M and NPKM, compared with the CK. In comparison with the CK, NK and NPK, organic fertilizer application (M and NPKM) significantly stimulated the abundances of bacteria, fungi, and *phoD*-harboring microbes, and the activity of ALP ($P < 0.05$). In addition, soil organic phosphorus fractions were significantly and positively correlated with the *phoD*-harboring microbes ($P < 0.05$). There were significant ($P < 0.05$) positive correlations between labile Po, moderately resistant Po, highly resistant Po and ALP. The effect of *phoD*-harboring microbes and ALP on the organic phosphorus fractions was in the order of highly resistant Po > labile Po > moderately resistant Po > moderately labile Po. Together, the application of organic fertilizer could increase the contents of soil organic phosphorus and different organic phosphorus fractions, the abundances of bacteria, fungi and *phoD*-harboring microbes and the activity of alkaline phosphatase.

Key words: organic fertilizer; soil organic phosphorus; organic phosphorus fraction; soil *phoD*-harboring microbial

磷是植物生长所必需的大量营养元素之一。土壤矿物的固定或微生物的固持作用导致植物可直接利用的磷很少。土壤有机磷(Po)是土壤总磷库的主要存在形式,占土壤总磷的 30%~80%^[1]。但大量有机形态磷如肌醇磷酸盐、磷脂和核酸等不能被直接利用^[2],需经过相关微生物矿化分解成无机磷才能被植物吸收。依据 Bowman-Cole 对有机磷分级体系的改进^[3],将土壤有机磷分为活性有机磷、中度活性有机磷、中稳性有机磷和高稳性有机磷。大量研究表明,施肥能影响土壤各组分有机磷含量及其在有机磷中所占比例,施用化肥可促进中稳性和高稳性有机磷向活性和中度活性有机磷转化;而施有机肥显著提高土壤各组分有机磷的初始含量,减少土壤对磷素的固定,从而活化土壤中难溶性有机磷化合物^[4]。

微生物在土壤磷素转化过程中发挥着非常重要的作用。已有研究表明,在土壤高 C/P 比值和 N/P 比值条件下微生物表现出高度灵活性,并当磷利用率非常低时通过获取和利用有机形态磷供其生长繁殖^[5-6]。施用有机肥是提高土壤有机碳和恢复土壤微生物活性和多样性的重要管理措施^[7]。有研究表明,土壤微生物在有机磷转化分解过程中对碳的需求高于磷,在充足碳源供给条件下可加快土壤有机磷矿化速率^[8-9]。CELESTINA 等^[10]研究表明,有机肥和无机肥配合施用会改变细菌和真菌的相对丰度,如变形菌门、放线菌门和子囊菌门等。WEI 等^[11]研究表明,长期增施有机肥显著改变潮土真菌和细菌的相对丰度。也有研究表明某些功能微生物丰度也受施肥措施的影响,LUO 等^[12]研究发现长期施用有机无机肥能显著增加土壤中携带编码碱性磷酸酶基因的微生物(简称 *phoD* 微生物)丰度,而施用无机肥则产生相反的结果。SAKURAI 等^[13]研究也表明土壤有机碳或外源添加有机物料

能影响 *phoD* 微生物基因功能的表达。*phoD* 微生物在面临土壤磷素匮乏时,通过诱导上调编码磷酸酶的基因、加强高亲和力的磷酸盐运输器及增加与磷酸盐吸收相关的酶途径,使它们共同构成了磷素胁迫的调节子^[14-15],从而影响土壤有机磷的转化过程。而环境因子如气候、土壤类型、pH、土地利用和养分浓度直接影响 *phoD* 微生物的丰度、多样性和群落结构^[12]。此外,外源有机碳的输入也间接影响 *phoD* 微生物丰度^[16]。

由于土壤环境因子不同,施肥对土壤 *phoD* 微生物和碱性磷酸酶(ALP)的影响尚不明确,目前关于草原土壤或水稻土的研究较多,而对旱-旱轮作体系的研究还鲜见报道。因此,通过小麦-甘薯轮作的田间定位试验,探究不同施肥模式对土壤不同组分有机磷、碱性磷酸酶及微生物的影响,旨在筛选高效转化土壤有机磷的施肥模式,为提高土壤磷的有效性及其农业可持续发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

供试地点位于徐州市农业科学院(34°17' N, 117°09' E)内的长期肥料定位试验地,海拔为 42 m,属温带季风气候区,年均气温为 14 °C,年降水量为 800~930 mm,无霜期约为 210 d,年日照时数为 2 284~2 495 h。土壤类型为黄潮土,质地为砂壤。试验前耕层(0~20 cm)土壤 w (有机质)为 10.8 g·kg⁻¹, w (全氮)为 0.66 g·kg⁻¹, w (全磷)为 0.74 g·kg⁻¹, w (速效磷)为 12.0 mg·kg⁻¹, w (缓效钾)为 738.5 mg·kg⁻¹,pH 为 8.01, w [物理性黏粒(<0.01 mm)]为 141.1 mg·kg⁻¹, w [黏粒(<0.02 mm)]为 59.8 mg·kg⁻¹,阳离子交换量为 20.4 cmol·kg⁻¹。

1.2 试验设计

长期施肥定位试验始于 1980 年,1981—2001

年种植模式为小麦-玉米轮作,2002年以后改为小麦-甘薯轮作。试验采用单因素随机区组设计,设4次重复,所设5个处理分别为不施肥(CK)、氮钾肥(NK)、氮磷钾肥(NPK)、单施有机肥(M)和氮磷钾肥+有机肥(NPKM);小区面积为33.6 m²(7 m×4.8 m),人工翻地(20 cm深)。氮、磷、钾肥每年施用量为纯N 300 kg·hm⁻²,P₂O₅ 150 kg·hm⁻²,K₂O 225 kg·hm⁻²。有机肥为猪粪堆积制腐的厩肥,1981—1985年每年施用量(鲜基)为75 000 kg·hm⁻²,1985年之后为37 500 kg·hm⁻²,有机肥平均N含量为6.3 g·kg⁻¹,P₂O₅含量为5.14 g·kg⁻¹,K₂O含量为7.93 g·kg⁻¹,C/N比值为20.3。

1.3 土壤DNA的提取及土壤细菌、真菌和 *phoD* 微生物的荧光定量PCR分析

土壤DNA提取利用强力土壤DNA提取试剂盒(QIAGEN laboratories, Carlsbad, CA, Germany)参照其操作说明分别提取土壤样品的总DNA,并通过Nanodrop2000测定A₂₆₀/A₂₈₀和A₂₃₀/A₂₆₀比值,对提取的DNA进行质量控制后,于超低温(-80℃)冰箱中保存。

提取大肠杆菌的DNA作为模板,细菌采用通用引物338F/518R(338F: 5'-ACTCCTACGGGAG-GCAGCAG-3';518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3');真菌采用通用引物ITS1F/5.8S(ITS1F: 5'-TC-CGTAGGTGAACCTGCGG-3';5.8S: 5'-CGCTGCGT-TCTTCATCG-3');*phoD*微生物采用引物*phoD*-F733/*phoD*-R1083(5'-TGGGAYGATCAYGARGT-3';5'-CTGSGCSAKSACRTTCCA-3')分别进行PCR扩增^[17-18]。随后将PCR产物转化到大肠杆菌中,经蓝白斑筛选后,提取阳性克隆中的质粒构建标准曲线。以TB green为荧光染料使用ABI7500型定量PCR系统(Applied Biosystems, America)进行荧光定量PCR。DNA样品用双蒸水稀释至10 ng·mL⁻¹,每个反应都在96孔PCR板上进行,每个板上都设有3个重复的标线样品、阴性对照和待测样品。

表1 5个处理土壤基本理化性质

Table 1 Basic physicochemical properties of the five treatments

处理	w(全氮)/ (g·kg ⁻¹)	w(全磷)/ (g·kg ⁻¹)	w(速效钾)/ (mg·kg ⁻¹)	w(有效磷)/ (mg·kg ⁻¹)	pH	w(有机质)/ (g·kg ⁻¹)
CK	0.77±0.07 ^e	0.78±0.04 ^d	52.25±3.30 ^d	4.80±0.37 ^e	8.70±0.02 ^a	12.25±0.28 ^e
NK	0.94±0.05 ^d	0.72±0.03 ^d	138.25±0.96 ^a	5.28±0.77 ^e	8.46±0.05 ^b	12.85±0.32 ^d
NPK	1.19±0.19 ^c	1.14±0.08 ^c	75.00±0.82 ^c	8.70±0.97 ^e	8.40±0.01 ^c	16.15±0.16 ^c
M	1.37±0.02 ^b	1.58±0.17 ^b	75.00±0.82 ^c	164.31±4.29 ^a	8.35±0.01 ^d	21.87±0.33 ^b
NPKM	1.61±0.03 ^a	2.08±0.07 ^a	97.00±2.58 ^b	121.65±6.35 ^b	8.16±0.01 ^e	24.87±0.25 ^a

CK为不施肥处理;NK为不施磷肥处理;NPK为氮、磷、钾肥处理;M为有机肥处理;NPKM为有机无机肥配施处理。同一列数据后英文小写字母不同表示不同处理间某指标差异显著($P<0.05$)。

标准曲线以目标基因克隆体培养后提取质粒,并依次由10⁸ copies·mL⁻¹浓度逐步稀释到10 copies·mL⁻¹。定量PCR反应体系为25 μL(TliRNaseH Plus)(TaKaRa):TB[®] Premix Ex Taq(2×)10 μL,ROX reference Dye II(50×)0.5 μL,前端引物1 μL,末端引物1 μL,DNA模板2.0 μL,ddH₂O 10.5 μL。反应步骤如下:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s,返回第2步,40个循环;95℃ 30 s。扩增产物特异性表现为单一的熔融峰,并且 $\rho=20$ g·L⁻¹的凝胶电泳检测仅为1条条带。根据细菌、真菌和*phoD*微生物的标准曲线,计算得到土壤样品中细菌、真菌和*phoD*微生物丰度。

1.4 测定项目与方法

土壤全磷含量采用H₂SO₄-HClO₄消煮-钼锑抗比色法测定^[19];土壤有效磷含量采用经0.5 mol·L⁻¹NaHCO₃浸提-钼锑抗比色法测定;土壤有机磷含量采用经马福炉高温灼烧后用H₂SO₄浸提-钼锑抗比色法测定,灼烧与未灼烧差值即为有机磷含量^[20]⁷⁷⁻⁷⁸;土壤有机磷(Po)分组采用Bowman-Cole有机磷分组方法^[21]测定;土壤碱性磷酸酶(ALP)活性采用磷酸苯二钠比色法测定^[22];土壤全氮含量采用半微量开氏法测定;土壤速效钾含量采用1 mol·L⁻¹NH₄OAc浸提-火焰光度法测定;有机质含量采用重铬酸钾氧化法测定^[20]³⁶⁻³⁸;土壤pH采用pH计测定,V(水):m(土)为5:1。

1.5 数据处理与统计分析

采用SPSS 20软件分析试验数据。单因素方差分析(one-way ANOVA)配合Duncan检验各处理间均值差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 不同施肥处理对土壤理化性质的影响

2018年小麦-甘薯轮作体系中甘薯季不同施肥处理土壤理化性质见表1。

与CK处理相比,NPK、M和NPKM处理显著提高土壤全氮、全磷、有机质和速效钾含量($P<0.05$),M和NPKM处理显著提高土壤有效磷含量($P<0.05$)。其中,全氮、全磷和有机质含量以NPKM处理为最高,有效磷含量以M处理为最高,而速效钾含量以NK处理为最高。与CK处理相比,NPK、M和NPKM处理土壤全氮含量分别增加54.5%、77.9%和109.1%;全磷含量分别增加46.2%、102.6%和166.7%;有机质含量分别提高31.8%、78.5%和103.0%。与CK处理相比,NPK、M和NPKM处理土壤pH显著降低($P<0.05$),其降幅分别为0.30、0.35和0.54。

2.2 不同施肥处理对土壤有机磷、有效磷含量和ALP活性的影响

如表2所示,与CK和NK处理相比,M和NPKM处理显著增加土壤有机磷、有效磷含量和ALP活性($P<0.05$),且M和NPKM处理有机磷、有效磷含量和ALP活性较高。与CK处理相比,M和NPKM处理土壤有机磷含量分别提高52.3%和34.7%;与NK处理相比,M和NPKM处理土壤有机磷含量分别提高47.8%和30.6%。M和NPKM处理土壤有效磷含量分别为CK处理的34.2和25.3倍,分别为NK处理的31.0和23.0倍。NPK处理土壤有机磷含量低于CK和NK处理,但差异未达显著水平;NPK处理土壤ALP活性显著高于CK和NK处理($P<0.05$)。

表3 不同施肥处理土壤不同组分有机磷含量

Table 3 The content of organic phosphorus fractions in different fertilization treatments

处理	w (活性Po)/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	w (中度活性Po)/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	w (中稳性Po)/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	w (高稳性Po)/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
CK	4.83±0.90 ^c	123.16±3.80 ^d	4.45±0.26 ^b	15.48±1.76 ^d
NK	4.92±0.40 ^c	125.44±13.60 ^{cd}	4.15±0.71 ^b	17.99±2.38 ^d
NPK	9.18±0.98 ^b	136.22±8.73 ^b	4.71±0.88 ^b	24.26±1.96 ^c
M	15.78±2.93 ^a	145.21±15.55 ^a	6.92±1.29 ^a	57.43±2.24 ^a
NPKM	9.43±0.83 ^b	146.83±7.47 ^a	8.21±1.26 ^a	47.17±3.65 ^b

CK为不施肥处理;NK为不施磷肥处理;NPK为氮、磷、钾肥处理;M为有机肥处理;NPKM为有机无机肥配施处理。同一列数据后英文小写字母不同表示不同处理间某指标差异显著($P<0.05$)。

2.4 不同施肥处理对细菌、真菌和 *phoD* 微生物丰度的影响

如表4所示,土壤细菌16S rRNA基因、真菌18S rRNA基因和 *phoD* 基因丰度变化范围分别为 $4.1 \times 10^9 \sim 2.3 \times 10^{10}$ 、 $3.5 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^7$ 和 $6.8 \times 10^7 \sim 5.8 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 。与CK处理相比,NK、NPK、M和NPKM处理土壤细菌和真菌丰度显著增加,其丰度以M和NPKM处理为较高。M和NPKM处理 *phoD* 微生物丰度显著高于CK、NK和NPK处理,其

表2 不同处理土壤有机磷、有效磷含量及碱性磷酸酶活性
Table 2 Soil organic phosphorus, available phosphorus and alkaline phosphatase activity in different fertilization treatments

处理	w (有机磷)/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	w (有效磷)/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	碱性磷酸酶活性/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
CK	147.92±5.16 ^b	4.81±0.24 ^c	0.32±0.01 ^d
NK	152.50±26.59 ^b	5.30±0.24 ^c	0.40±0.04 ^c
NPK	144.68±33.92 ^b	8.70±0.97 ^c	0.49±0.02 ^b
M	225.35±10.19 ^a	164.31±4.29 ^a	0.57±0.04 ^a
NPKM	199.21±26.72 ^a	121.65±6.35 ^b	0.59±0.02 ^a

CK为不施肥处理;NK为不施磷肥处理;NPK为氮、磷、钾肥处理;M为有机肥处理;NPKM为有机无机肥配施处理。同一列数据后英文小写字母不同表示不同处理间某指标差异显著($P<0.05$)。

2.3 不同施肥处理对土壤不同组分有机磷的影响

如表3所示,中度活性Po是含量最高的土壤有机磷形态,其后依次为高稳性Po、活性Po和中稳性Po。与CK和NK处理相比,NPK、M和NPKM处理土壤活性Po、中度活性Po和高稳性Po含量显著增加,且以M和NPKM处理为较高。与CK处理相比,NPK处理活性Po、中度活性Po、中稳性Po和高稳性Po含量分别提高90.1%、10.6%、5.8%和56.7%,M处理活性Po、中度活性Po、中稳性Po和高稳性Po含量分别提高226.7%、17.9%、55.5%和271.0%;NPKM处理活性Po、中度活性Po、中稳性Po和高稳性Po含量分别提高95.2%、19.2%、84.5%和204.7%。

中,CK处理显著高于NK处理,但与NPK处理之间差异未达显著水平。因此,施肥能显著改变土壤细菌、真菌和 *phoD* 微生物丰度,尤其是施用有机肥。

2.5 土壤有机磷、有效磷含量、ALP活性和 *phoD* 微生物丰度的相关性

土壤有机磷、有效磷含量,ALP活性和 *phoD* 微生物丰度的关系见图1,土壤有效磷含量与 *phoD* 微生物丰度呈显著正相关($R^2=0.854, P<0.05$),ALP活性与土壤有机磷含量呈显著正相关($R^2=0.680$,

$P < 0.05$), *phoD* 微生物丰度与 ALP 活性呈显著正相关 ($R^2 = 0.559, P < 0.05$)。

2.6 *phoD* 微生物丰度、ALP 活性与不同组分有机磷的相关性

相关性分析结果(图2)表明 *phoD* 微生物丰度与活性 P_o 、中度活性 P_o 、中稳性 P_o 和高稳性 P_o 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 不同组分有机磷受 *phoD* 微生物丰度影响程度由大到小依次为高稳性 P_o ($R^2 = 0.815$)、活性 P_o ($R^2 = 0.671$)、中稳性 P_o ($R^2 = 0.628$) 和中度活性 P_o ($R^2 = 0.529$)。

ALP 活性与活性 P_o 、中稳性 P_o 和高稳性 P_o 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$), 不同组分有机磷受 ALP 活性影响程度由大到小依次为高稳性 P_o ($R^2 = 0.858$)、活性 P_o ($R^2 = 0.750$)、中稳性 P_o ($R^2 = 0.727$) 和中度活性 P_o ($R^2 = 0.271$)。由此可知土壤不同组分有机磷变化与 *phoD* 微生物丰度和 ALP 活

性密切相关。

表4 不同处理土壤细菌、真菌和 *phoD* 微生物丰度

Table 4 The copy numbers of bacteria, fungi and *phoD*-harboring microbial abundance in different fertilization treatments

处理	lg [A/ (copies · g ⁻¹)]	lg [B/ (copies · g ⁻¹)]	lg [C/ (copies · g ⁻¹)]
CK	9.61±0.04 ^d	6.54±0.05 ^d	8.19±0.12 ^c
NK	9.93±0.07 ^c	6.84±0.06 ^c	7.83±0.27 ^d
NPK	10.18±0.07 ^b	7.13±0.12 ^b	7.98±0.16 ^{cd}
M	10.33±0.08 ^a	7.32±0.12 ^a	8.76±0.15 ^a
NPKM	10.36±0.11 ^a	7.33±0.05 ^a	8.47±0.10 ^b

CK 为不施肥处理; NK 为不施磷肥处理; NPK 为氮、磷、钾肥处理; M 为有机肥处理; NPKM 为有机无机肥配施处理。同一列数据后英文小写字母不同表示不同处理间某指标差异显著 ($P < 0.05$)。土壤质量以干土质量计。A、B 和 C 分别为细菌、真菌和 *phoD* 微生物丰度。

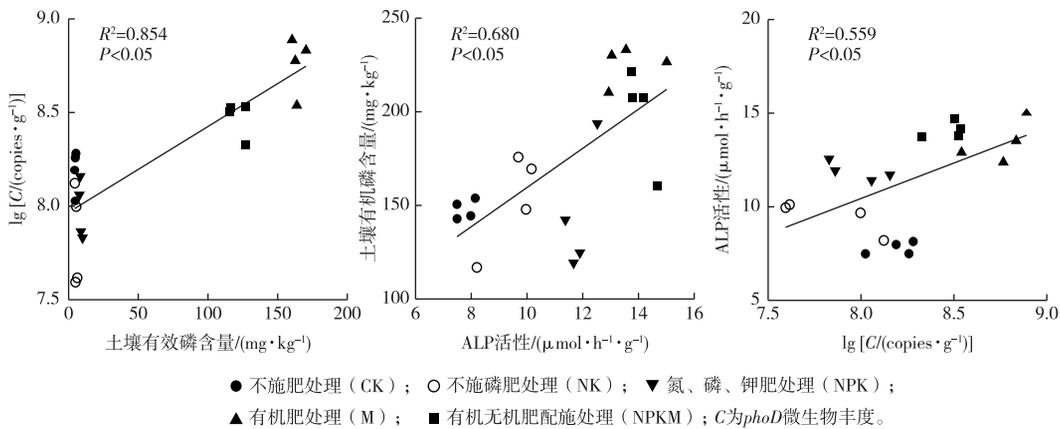


图1 碱性磷酸酶 (ALP) 活性、*phoD* 微生物丰度、有机磷和有效磷含量的相关性

Fig. 1 The correlations of alkaline phosphatase, *phoD*-harboring microbial abundance, organic phosphorus and available phosphorus

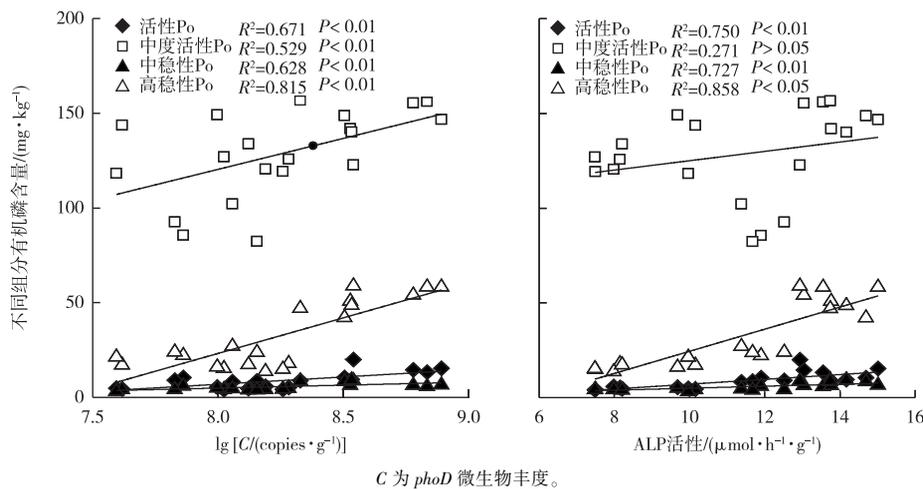


图2 *phoD* 微生物丰度、碱性磷酸酶 (ALP) 活性与不同组分有机磷含量的相关性

Fig. 2 The correlations of *phoD*-harboring microbial abundance, alkaline phosphatase and organic phosphorus fractions

2.7 土壤理化性质与微生物丰度和 ALP 活性的关系

相关分析结果(表 5)表明土壤有机质、全氮、有效磷、有机磷和 pH 是影响 *phoD* 微生物丰度和 ALP 活性的主要因素。其中,土壤有机质、全氮、有效磷和有机磷含量与细菌、真菌、*phoD* 微生物丰度和 ALP 活性呈显著正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而 pH 与细菌、真菌丰度和 ALP 活性呈显著负相关($P < 0.05$),与 *phoD* 微生物丰度相关性未达显著水平。

表 5 土壤理化性质与微生物基因丰度的相关关系

Table 5 Correlations between soil physicochemical properties and abundance of microbial

指标	土壤有机质含量	pH	全氮含量	有效磷含量	有机磷含量
细菌丰度	0.857**	-0.910**	0.885**	0.743**	0.578**
真菌丰度	0.866**	-0.886**	0.888**	0.768**	0.628**
<i>phoD</i> 微生物丰度	0.703**	NS	0.541*	0.854**	0.656**
碱性磷酸酶活性	0.916**	-0.883**	0.926**	0.807**	0.680**

* 和 ** 分别表示在 $\alpha = 0.05$ 和 0.01 水平上显著相关。

3 讨论

笔者研究发现增施有机肥显著增加土壤中不同组分有机磷含量,且增加幅度均高于单施化肥。与不施肥处理相比,增施有机肥的土壤活性 Po 和高稳性 Po 增幅较大,其后依次为中稳性 Po 和中度活性 Po。尹岩等^[23]研究表明施用有机肥显著增加水稻土不同组分有机磷含量,且施用有机肥对其影响程度由大到小依次为高稳性 Po、活性 Po、中稳性 Po 和中度活性 Po。但 AHMED 等^[24]研究表明水稻土施用有机肥显著增加土壤活性 Po、中度活性 Po 和非活性 Po 含量,其中,中度活性 Po 增幅最大。李和生等^[25]研究表明,冬小麦根际土壤施用有机肥明显提高土壤有机磷含量,主要提高了中度活性 Po 和活性 Po 含量,而非根际土壤主要提高活性 Po 含量。上述结果不同的原因可能是中度活性 Po 作为土壤含量最高的有机磷组分,其转化过程受 *phoD* 微生物丰度的影响。土壤增施有机肥有利于中度活性 Po 向活性 Po 和稳定性 Po 转化,其转化速率相对较快,所以土壤活性 Po 和高稳性 Po 含量增加量不同。笔者研究中, M 处理活性 Po 含量高于 NPKM 处理,原因可能是 NPKM 处理作物产量较高,作物收获后带走较多的有效磷,加速了活性 Po 的转化,从而导致土壤有效磷含量与 M 处理相比显著降低。此外, NPKM 处理 ALP 活性明显提高,这

有利于土壤活性 Po 进一步向有效磷转化,所以 NPKM 处理土壤活性 Po 积累量较少。笔者研究还发现 NPKM 处理高稳性 Po 含量虽显著低于 M 处理,但 NPKM 处理土壤中稳性 Po 和中度活性 Po 含量却明显提高。这可能是在 *phoD* 微生物和酶的共同调控下, NPKM 处理高稳性 Po 向中稳性 Po 和中度活性 Po 转化的速率高于 M 处理,从而导致高稳性 Po 含量有所下降。综合上述 2 点结果, NPKM 处理土壤活性 Po 和高稳性 Po 含量均低于 M 处理,这也可能是导致 NPKM 处理土壤总有机磷含量下降的原因。谢林花等^[4]研究表明施化肥有利于土壤中稳性 Po 和高稳性 Po 向活性 Po 和中度活性 Po 转化,而笔者研究表明单施化肥可使部分中稳性 Po 和中度活性 Po 向活性 Po 转化,同时有部分中稳性 Po 和中度活性 Po 向高稳性 Po 累积。以上结果的不同可能是因为单施化肥后 *phoD* 微生物丰度下降,而高稳性 Po 受 *phoD* 微生物的影响较大,在 *phoD* 微生物丰度降低的条件下不利于高稳性 Po 转化,进而增加了其积累量。

笔者研究发现土壤增施有机肥可显著增加土壤细菌、真菌、*phoD* 微生物丰度和 ALP 活性。已有研究表明草地根际土壤中 *phoD* 微生物主要来源于细菌,少部分来源于真菌, ALP 主要是土壤细菌和真菌的代谢产物^[26]。笔者研究发现缺磷处理 *phoD* 微生物丰度显著低于不施肥处理,而 ALP 活性却显著提高,原因可能是在土壤可利用磷含量较低条件下, *phoD* 微生物为获得更多的磷素致使其类群间的竞争更激烈,从而加速其编码蛋白。与不施肥处理相比,土壤施用无机磷肥后 *phoD* 微生物丰度虽略有下降,但差异并不显著,这说明添加无机磷肥是影响土壤 *phoD* 微生物丰度的因素之一。TAN 等^[27]研究表明,在草原土壤中长期施用无机磷肥显著增加 *phoD* 微生物群落多样性。也有研究表明,草地土壤施用无机磷肥可改变 *phoD* 微生物的群落组成^[28]。笔者研究发现土壤施用无机磷肥显著增加活性 Po、中度活性 Po 和高稳性 Po 含量,且不同组分有机磷与 *phoD* 微生物丰度呈显著正相关。但与不施肥处理相比,施用无机磷肥处理 *phoD* 微生物基因拷贝数有所下降,原因可能是添加无机磷肥在一定程度上可抑制 *phoD* 微生物丰度。此外, *phoD* 微生物也受其他因素影响,例如土壤中有机碳含量或外源添加有机物料等,且 *phoD* 微生物对碳的需求高于磷。所以在施用无机磷肥土壤中,虽然不同组分有机磷含量显著增加,但施用无机磷肥的土壤 *phoD* 微生物丰度并未增加。袁佳慧等^[29]研究表明 ALP 在生物释

磷过程中发挥重要作用,而笔者研究也发现活性 P_o 、中稳性 P_o 和高稳性 P_o 含量与 ALP 活性呈显著正相关。不同组分有机磷受 *phoD* 微生物丰度和 ALP 活性的影响程度由大到小依次均为高稳性 P_o 、活性 P_o 、中稳性 P_o 和适度活性 P_o 。当土壤 *phoD* 微生物丰度较高时,更有利于活性 P_o 的转化;当 *phoD* 微生物丰度较低时,则有利于高稳性 P_o 的积累。综上所述,一方面,增施有机肥通过增加土壤不同组分有机磷含量,促进土壤总有机磷的积累;另一方面,增施有机肥在不同程度上影响土壤 ALP 活性和 *phoD* 微生物丰度,从而影响各组分有机磷的分配。

笔者研究中增施有机肥显著提高了土壤有效磷含量,且土壤有效磷含量与 *phoD* 微生物丰度、ALP 活性与有机磷含量以及 *phoD* 微生物丰度与 ALP 活性之间均呈显著正相关。而 CHEN 等^[30] 研究发现玉米地土壤施用有机肥后土壤有效磷含量分别与 *phoD* 微生物丰度和 ALP 活性呈显著负相关。出现此结果的原因可能是增施有机肥显著提高土壤有机碳含量,有研究表明 *phoD* 微生物在碳源供给充足的情况下有利于增强其繁殖能力,从而加速编码 ALP。同时,ALP 活性的提高不同程度地影响各组分有机磷含量,有利于土壤活性有机磷向有效磷的转化从而提高土壤有效磷含量。另外,笔者研究发现与单施有机肥处理相比,有机和无机肥配合施用明显提高土壤细菌和真菌丰度,但对 *phoD* 微生物丰度存在抑制作用。这可能是由于无机肥料施入土壤后,在养分供应充足的条件下其影响其他微生物的增殖,却抑制了 *phoD* 微生物丰度。有研究也发现长期输入无机氮肥增加了土壤养分含量进而抑制 *phoD* 微生物丰度和多样性^[31]。

许多研究表明土壤理化性质显著影响土壤微生物丰度和酶活性。笔者研究发现土壤有机质含量、pH 和全氮含量与细菌、真菌、*phoD* 微生物丰度和 ALP 活性密切相关。RAGOT 等^[28] 研究表明全氮和 pH 是细菌、真菌及 *phoD* 微生物丰度和群落结构的环境驱动因子。在缺磷条件下向土壤中施氮肥显著增加土壤全氮含量,但显著降低细菌、*phoD* 微生物丰度和 ALP 活性,并导致土壤酸化。过酸或过碱的土壤均不利于土壤微生物的生长与繁殖,而通过合理的农业措施能有效缓解这种状况。化党领等^[32] 研究表明与单施化肥处理相比,石灰性土壤施用有机肥会加速土壤 pH 下降,这有利于改善土壤养分状况,特别是提高磷的有效性,笔者研究结果与之一致。有机肥含有大量有机酸,土壤增施有

机肥后更有利于改善石灰性土壤的酸碱度,同时也为微生物提供大量碳源,为微生物参与土壤养分循环过程提供良好条件。

4 结论

在小麦-甘薯轮作土壤中,长期增施有机肥可改善土壤酸碱度和养分状况,提高土壤细菌、真菌、*phoD* 微生物丰度和 ALP 活性。长期增施有机肥通过提高土壤有机磷和不同组分有机磷含量,增加了土壤有机磷库。土壤不同组分有机磷含量与土壤 *phoD* 微生物丰度和 ALP 活性密切相关,*phoD* 微生物丰度和 ALP 活性共同调控土壤磷的有效性及其有机磷的分配。因此,长期增施有机肥是维持土壤供磷能力和加速土壤有机磷循环转化的土壤管理措施。

参考文献:

- [1] MCLAUGHLIN M J, BAKER T G, JAMES T R, *et al.* Distribution and Forms of Phosphorus and Aluminum in Acidic Topsoils Under Pastures in South-eastern Australia [J]. *Australian Journal of Soil Research*, 1990, 28(3): 371-385.
- [2] 赵少华, 宇万太, 张璐, 等. 土壤有机磷研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2004, 15(11): 2189-2194. [ZHAO Shao-hua, YU Wan-tai, ZHANG Lu, *et al.* Research Advance in Soil Organic Phosphorus [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(11): 2189-2194.]
- [3] 范业宽, 李世俊. Bowman-Cole 石灰性土壤有机磷分组法的改进 [J]. *土壤通报*, 2004, 35(6): 743-749. [FAN Ye-kuan, LI Shi-jun. A Modification of Bowman-Cole' Fractionation Method of Soil Organic Phosphorus [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(6): 743-749.]
- [4] 谢林花, 吕家珑, 张一平, 等. 长期施肥对石灰性土壤磷素肥力的影响: II. 无机磷和有机磷 [J]. *应用生态学报*, 2004, 15(5): 790-794. [XIE Lin-hua, LÜ Jia-long, ZHANG Yi-ping, *et al.* Influence of Long-term Fertilization on Phosphorus Fertility of Calcareous Soil: II. Inorganic and Organic Phosphorus [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(5): 790-794.]
- [5] GODWIN C M, COTNER J B. Aquatic Heterotrophic Bacteria Have Highly Flexible Phosphorus Content and Biomass Stoichiometry [J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(10): 2324-2327.
- [6] WEI X M, HU Y J, PENG P Q, *et al.* Effect of P Stoichiometry on the Abundance of Nitrogen-cycle Genes in Phosphorus-limited Paddy Soil [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53(7): 767-776.
- [7] SUN L, XUN W B, HUANG T, *et al.* Alteration of the Soil Bacterial Community During Parent Material Maturation Driven by Different Fertilization Treatments [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96: 207-215.
- [8] BUNEMANN E K, MARSCHNER P, MCNEILL A M. Measuring Rates of Gross and Net Mineralisation of Organic Phosphorus in

- Soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(4): 900-913.
- [9] SPOHN M, KUZYAKOV Y. Phosphorus Mineralization Can Be Driven by Microbial Need for Carbon[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 61: 69-75.
- [10] CELESTINA C, SALE P W G, TANG C X, *et al.* Organic and Inorganic Amendments Did not Affect Microbial Community Composition in the Bulk Soil Differently but Did Change the Relative Abundance of Selected Taxa[J]. European Journal of Soil Science, 2019, 70(4): ejs.12767. DOI: 10.1111/ejss.12767.
- [11] WEI M, HU G Q, WANG H, *et al.* 35 Years of Manure and Chemical Fertilizer Application Alters Soil Microbial Community Composition in a Fluvio-aquic Soil in Northern China[J]. European Journal of Soil Biology, 2017, 82: 27-34.
- [12] LUO G W, LING N, NANNIPIERI P, *et al.* Long-term Fertilisation Regimes Affect the Composition of the Alkaline Phosphomonoesterase Encoding Microbial Community of a Vertisol and Its Derivative Soil Fractions[J]. Biology and Fertility of Soils, 2017, 53(4): 375-388.
- [13] SAKURAI M, WASAKI J, TOMIZAWA Y, *et al.* Analysis of Bacterial Communities on Alkaline Phosphatase Genes in Soil Supplied With Organic Matter[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2008, 54(1): 62-71.
- [14] APEL A K, SOLA-LANDA A, RODRÍGUEZ-GARCÍA A, *et al.* Phosphate Control of *phoA*, *phoC* and *phoD* Gene Expression in *Streptomyces Coelicolor* Reveals Significant Differences in Binding of *phoP* to Their Promoter Regions[J]. Microbiology, 2007, 153(10): 3527-3537.
- [15] VERSHININA O A, ZNAMENSKAYA L V. The Pho Regulons of Bacteria[J]. Microbiology, 2002, 71(5): 497-511.
- [16] HU Y J, XIA Y H, SUN Q, *et al.* Effects of Long-term Fertilization on *phoD*-harboring Bacterial Community in Karst Soils[J]. Science of the Total Environment, 2018, 628/629: 53-63.
- [17] FIERER N, JACKSON J A, VILGALYS R, *et al.* Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-specific Quantitative PCR Assays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 4117-4120.
- [18] RAGOT S A, KERTESZ M A, BÜNEMANN E K. *PhoD* Alkaline Phosphatase Gene Diversity in Soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(20): 7281-7289.
- [19] 中国土壤学会农业化学专业委员会. 土壤农业化学常规分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 95-102, 401-402.
- [20] 南京农学院. 土壤农化分析[M]. 北京: 农业出版社, 1980.
- [21] BOWMAN R A, COLE C V. An Exploratory Method for Fractionation of Organic Phosphorus From Grassland Soils[J]. Soil Science, 1978, 125(2): 95-101.
- [22] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 310-313.
- [23] 尹岩, 梁成华, 杜立宇, 等. 施用有机肥对土壤有机磷转化的影响研究[J]. 中国土壤与肥料, 2012(4): 39-43. [YIN Yan, LIANG Cheng-hua, DU Li-yu, *et al.* Effect of Manure on Transformation of Organic Phosphorus in Paddy Soil[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2012(4): 39-43.]
- [24] AHMED W, HUANG J, LIU K, *et al.* Changes in Phosphorus Fractions Associated With Soil Chemical Properties Under Long-term Organic and Inorganic Fertilization in Paddy Soils of Southern China[J]. PLoS one, 2019, 14(5): e0216881. DOI: 10.1371/journal.pone.0216881.
- [25] 李和生, 马宏瑞, 赵春生. 根际土壤有机磷的分组及其有效性分析[J]. 土壤通报, 1998, 29(3): 21-23. DOI: 10.19336/j.cnki.trtb.1998.03.009.
- [26] LAGOS L M, ACUÑA J J, MARUYAMA F, *et al.* Effect of Phosphorus Addition on Total and Alkaline Phosphomonoesterase-harboring Bacterial Populations in Ryegrass Rhizosphere Microsites[J]. Biology and Fertility of Soils, 2016, 52(7): 1007-1019.
- [27] TAN H, BARRET M, MOOIJ M J, *et al.* Long-term Phosphorus Fertilisation Increased the Diversity of the Total Bacterial Community and the *phoD* Phosphorus Mineraliser Group in Pasture Soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49(6): 661-672.
- [28] RAGOT S A, HUGUENIN-ELIE O, KERTESZ M A, *et al.* Total and Active Microbial Communities and *phoD* as Affected by Phosphate Depletion and pH in Soil[J]. Plant and Soil, 2016, 408(1/2): 15-30.
- [29] 袁佳慧, 汪玉, 王慎强, 等. 稻麦轮作磷肥减施下水稻土磷素生物有效性特征[J]. 生态与农村环境学报, 2018, 34(7): 599-605. [YUAN Jia-hui, WANG Yu, WANG Shen-qiang, *et al.* Characteristic of Soil P Availability in Reduced P-Input Rice-wheat Cropping Rotation Paddy Soils[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2018, 34(7): 599-605.]
- [30] CHEN X D, JIANG N, CONDRON L M, *et al.* Impact of Long-term Phosphorus Fertilizer Inputs on Bacterial *phoD* Gene Community in a Maize Field, Northeast China[J]. Science of the Total Environment, 2019, 669: 1011-1018.
- [31] JORQUERA M A, MARTÍNEZ O A, MARILEO L G, *et al.* Effect of Nitrogen and Phosphorus Fertilization on the Composition of Rhizobacterial Communities of Two Chilean Andisol Pastures[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(1): 99-107.
- [32] 化党领, 介晓磊, 张一平, 等. 有机肥对石灰性土壤肥力属性的长期影响[J]. 生态学杂志, 2005, 24(9): 1053-1057. [HUA Dang-ling, JIE Xiao-lei, ZHANG Yi-ping, *et al.* Long-term Effects of Organic Manure on the Fertility Properties of Calcareous Soil[J]. Chinese Journal of Ecology, 2005, 24(9): 1053-1057.]

作者简介: 王静(1995—), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士生, 主要研究方向为土壤微生物与元素循环。E-mail: 2018103149@njau.edu.cn

(责任编辑: 李祥敏)