

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2020.04.008

郑曼曼, 王超, 沈仁芳. 碳酸钙和根际作用对酸性红壤解磷微生物丰度的影响. 土壤, 2020, 52(4): 704–709.

## 碳酸钙和根际作用对酸性红壤解磷微生物丰度的影响<sup>①</sup>

郑曼曼<sup>1,2</sup>, 王超<sup>1\*</sup>, 沈仁芳<sup>1,2</sup>

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 选用玉米品种郑单 958 为试验材料, 设置不添加碳酸钙(CK)、每千克土添加 0.3 g 碳酸钙(Ca-0.3)和 0.5 g 碳酸钙(Ca-0.5)3 个碳酸钙处理, 以相应处理未种植物土壤为非根际对照土壤, 研究了碳酸钙和根际作用对酸性红壤磷酸酶活性及解磷微生物相关功能基因 *phoC* 和 *phoD* 丰度的影响。结果表明: 碳酸钙添加能有效改善玉米生长, 促进地上部氮、磷、钾和钙的吸收。土壤酸性磷酸酶(ACP)活性显著高于碱性磷酸酶(ALP)活性, 表明酸性土壤中 ACP 在矿化有机磷方面占主导地位。根际土壤 ACP、ALP 活性和 *phoD* 基因拷贝数均显著高于非根际, 而仅 Ca-0.5 处理 ALP 活性和 *phoD* 基因拷贝数显著高于 CK, 说明根际效应强于碳酸钙处理。*phoC* 基因拷贝数与土壤铵态氮、硝态氮含量存在显著相关性, ALP 活性和 *phoD* 基因拷贝数与土壤 pH 及铵态氮、硝态氮、有效磷、交换性钙含量均存在显著相关性。可见, 碳酸钙和根际作用均影响酸性土壤解磷微生物功能和丰度, 但根际效应更加明显, 这些作用与土壤理化因子的改变密切相关。

**关键词:** 酸性土壤; 碳酸钙; 磷酸酶; 解磷微生物; 基因拷贝数

中图分类号: S154.3 文献标志码: A

### Effects of Calcium Carbonate and Rhizosphere on Abundance of Phosphate-Solubilizing Microorganisms in Acidic Red Soil

ZHENG Manman<sup>1,2</sup>, WANG Chao<sup>1\*</sup>, SHEN Renfang<sup>1,2</sup>

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Maize variety, Zhengdan 958 was used as experiment material, soils were treated with calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) at rates of 0, 0.3, 0.5 g per kg soil while soils treated with no plant were the non-rhizosphere soils, and then the effects of CaCO<sub>3</sub> and rhizosphere on phosphatase activity and the abundance of phosphate-solubilizing microorganisms (PSM) associated functional genes *phoC* and *phoD* in acidic red soil were studied. Results showed that CaCO<sub>3</sub> addition could effectively improve maize growth and promote the absorption of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium in maize shoots. Soil acid phosphatase (ACP) activity was significantly higher than alkaline phosphatase (ALP) activity, indicating that the dominated effect of ACP in mineralizing organic P in acidic soils. The ACP, ALP activities and *phoD* gene copy number in rhizosphere soil were significantly higher than those of non-rhizosphere, while ALP activity and *phoD* gene copy number under Ca-0.5 treatment were significantly higher than those of CK, indicating that rhizosphere effect was stronger than CaCO<sub>3</sub> treatment. *phoC* gene copy number was significantly correlated with the contents of ammonium nitrogen and nitrate nitrogen, while both ALP activity and *phoD* gene copy number were significantly correlated with soil pH and the contents of ammonium nitrogen, nitrate nitrogen, available phosphorus and exchangeable calcium. It can be seen that both CaCO<sub>3</sub> and rhizosphere can affect the function and abundance of PSM in acid soil, but the rhizosphere effect is more obvious, which is closely related to the changes of soil physicochemical properties.

**Key words:** Acidic soil; Calcium carbonate; Phosphatase; Phosphorus solubilizing microorganisms; Gene copy number

在中国,酸性土壤(pH<5.5)总面积约 218 万 km<sup>2</sup>, 主要分布在南方热带和亚热带地区<sup>[1]</sup>。酸性土壤中,

①基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项重点研究计划项目(XDB15030302)资助。

\* 通讯作者(chwang@issas.ac.cn)

作者简介: 郑曼曼(1989—), 女, 河南周口人, 博士研究生, 主要从事根际微生物研究。E-mail: mmzheng@issas.ac.cn

磷缺乏是限制农业发展的主要因素之一,在酸性红壤区尤为明显<sup>[2]</sup>。尽管土壤中存在大量的磷,但是植物能够吸收利用的有效磷比例却很低<sup>[3]</sup>,主要归因于酸性土壤中磷极易与  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  结合形成难溶态磷酸盐,以及被固定到有机物中<sup>[4]</sup>。提高土壤磷库中难溶性磷素的活化利用是节约磷肥资源和提高酸性土壤生产潜力的重要途径。解磷微生物作为土壤生态系统中的重要组成部分,是土壤难溶性磷活化和形态转化的主要驱动者<sup>[5-6]</sup>。发挥解磷微生物功能是缓解土壤缺磷的一个有效途径<sup>[3]</sup>。通过分泌磷酸酶,降解植酸盐、磷脂等含磷有机化合物,释放可溶性磷酸盐是土壤解磷微生物的一个重要功能<sup>[7]</sup>。磷酸酶活性是反映土壤有机磷矿化潜力的一个重要指标,根据其最适 pH 分为酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)<sup>[8]</sup>。ACP 和 ALP 是非特异性磷酸水解酶,能够水解许多正磷酸单酯(植酸除外)以获取正磷酸盐<sup>[9]</sup>。目前已经克隆出了编码 ACP 的基因 *phoC*<sup>[10]</sup>和编码 ALP 的基因 *phoD*<sup>[11]</sup>。这些解磷微生物功能基因的克隆为检测环境中解磷菌种类、丰度、分布状况和群落结构组成提供了有效手段。

一些农艺措施,比如碳酸钙广泛应用于酸性土壤改良<sup>[12]</sup>。施用碳酸钙能够显著降低土壤酸度<sup>[13]</sup>,增加作物产量<sup>[14]</sup>。Wang 等<sup>[13]</sup>研究表明,酸性土壤中添加碳酸钙能够显著增加细菌 16S rRNA 基因丰度,主要原因是碳酸钙降低了土壤酸毒害和铝毒害水平。Acosta-Martínez 和 Tabatabai<sup>[15]</sup>指出碳酸钙施用可增加微生物数量和多样性及土壤酶活性。在土壤-植物系统中,碳酸钙还通过改善植物生长和根际环境,间接影响根际微生物。植物根际环境变化可影响微生物功能、丰度和群落组成<sup>[16]</sup>。然而,碳酸钙添加对酸性土壤中解磷微生物,特别是对作物根际解磷微生物的影响还关注较少。

鉴于解磷微生物在土壤磷转化和有效性方面的重要作用,本研究通过设置碳酸钙添加试验,分析酸性土壤中玉米根际和非根际磷酸酶活性及 *phoC* 和 *phoD* 基因丰度,并探究它们与土壤理化性质的相关性,以期阐明碳酸钙和根际作用对酸性红壤磷酸酶活性和解磷微生物丰度的影响。

## 1 材料方法

### 1.1 试验材料和设计

盆栽试验所用酸性红壤采自江西省鹰潭市农田,土壤基本理化性质为 pH 4.38,有机质 16.79 g/kg,全氮 0.58 g/kg,全磷 0.39 g/kg,全钾 10.62 g/kg,

有效磷 6.37 mg/kg。试验时每盆装土 1.50 kg,并施用 0.20 g/kg 磷酸二氢钾和 0.50 g/kg 硫酸铵作为基肥。试验设置了不添加碳酸钙(CK)、每千克土添加 0.3 g 碳酸钙(Ca-0.3)和 0.5 g 碳酸钙(Ca-0.5)3 个碳酸钙水平处理,同时设置了各处理未种植物的对照(作为非根际土壤)。每个处理设置 3 个重复。试验在人工气候生长室进行,光照 14 h(30℃),光照强度为 400  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ ,黑暗 10 h(25℃),相对湿度为 65%。玉米品种郑单 958 为试验材料,种植植物处理每盆播种 10 粒玉米种子,土壤含水量保持在 20%(w/w)。玉米地上部长到 1 cm 时间苗,每盆定植 3 棵幼苗。自间苗之日起,进行为期 3 周的培养。

### 1.2 植物样品采集和元素测定

收获时测量玉米株高,玉米样品分别收集根系和地上部,用蒸馏水冲洗后于 105℃杀青,随后 70℃烘干至恒重,称重。地上部样品粉碎,经  $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$  消煮后用凯氏定氮仪(Hanon K9860)测定氮含量;经  $\text{HNO}_3$  消煮后,用 ICP-AES(IRIS-Advantage, Thermo Elemental, MA, USA)检测磷、钾和钙元素含量。

### 1.3 土壤样品采集和土壤理化性质测定

采用抖根法收集根际土壤,未种植玉米的土壤为非根际土。土壤样品采集后分 3 份保存:用于提取 DNA 的土壤样品放置于 -20℃ 冰箱;用于测定土壤磷酸酶活性的土壤放置于 4℃ 冰箱;其余土壤经风干、研磨后用于测定土壤理化性质。土壤 pH 按照土水质量比 1:2.5 振荡后,用 pH 计测定;土壤全碳(TC)和全氮(TN)采用 CNS 元素分析仪测定;土壤铵态氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )和硝态氮( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )采用氯化钾浸提-流动分析法测定;土壤中全磷(TP)、全钾(TK)、有效磷(AP)、速效钾(AK)、交换性钙(ExCa)测定方法详见《土壤农业化学分析方法》<sup>[17]</sup>。土壤酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)活性测定参照 Tabatabai<sup>[18]</sup>描述的方法。

### 1.4 土壤 DNA 提取和基因丰度测定

采用 DNA 试剂盒(FastDNA SPIN Kit for soil)提取土壤 DNA。解磷微生物功能基因 *phoC* 和 *phoD* 扩增的通用引物分别为 *phoC*-A-F1(5'-CGGCTCCTATCCGTCCGG-3')/*phoC*-A-R1(5'-CAACATCGCTTTGCCAGTG-3')<sup>[10]</sup>和 ALPS-F730(5'-CAGTGGGACGACCACGAGGT-3')/ALPS-R1101(5'-GAGGCCGATCGGCATGTCG-3')<sup>[11]</sup>。基因丰度采用 LightCycler 480 实时 PCR 系统(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)测定。实时荧光定量 PCR(qPCR)反应体系为 10  $\mu\text{l}$ ,包含 1  $\mu\text{l}$  DNA 溶液、0.4  $\mu\text{l}$  正向引物、0.4  $\mu\text{l}$  反向引物、5  $\mu\text{l}$  SYBR Premix ExTaq(Takara Bio, Inc.,

Janpan)和 3.2  $\mu\text{l}$  灭菌水。反应条件如下: 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。为了获得标准曲线, 目的基因 *phoC* 和 *phoD* 片段分别连接到 pMD19-T 载体(Takara, Dalian, China)上, 并用 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  完成转化。经筛选、测序验证后, 采用质粒提取试剂盒(Takara, Dalian, China)提取质粒。将质粒用 ddH $_2$ O 进行 10 倍梯度稀释, 用于制备标准曲线。基因 *phoC* 和 *phoD* 的 PCR 扩增效率分别为 98.2% ( $R^2 = 0.99$ )和 105.5% ( $R^2 = 0.98$ )。

### 1.5 数据处理与统计分析

数据处理采用 Microsoft Excel 2007, 统计分析使用软件 SPSS20.0。根际与非根际之间显著性差异采用 T 检验; 不同处理之间显著性差异采用 Duncan 检

验; 相关性分析采用 Pearson 分析。作图使用软件 SigmaPlot 10.0。

## 2 结果

### 2.1 碳酸钙对玉米生长和土壤理化性质的影响

Ca-0.3 和 Ca-0.5 处理下玉米株高和生物量均显著高于 CK, 并显著增加了地上部氮、磷、钾和钙的吸收量(表 1)。碳酸钙添加显著提高非根际土壤 pH 和  $\text{NO}_3^-$ -N、AP、ECa 含量, 但降低  $\text{NH}_4^+$ -N 含量(表 2)。碳酸钙添加显著提高根际土壤  $\text{NO}_3^-$ -N、AP、ECa 含量, 但显著降低  $\text{NH}_4^+$ -N 和 AK 含量。根际土壤中 TC 和  $\text{NO}_3^-$ -N 含量显著高于非根际土壤, 但土壤 pH 和  $\text{NH}_4^+$ -N、AK、ECa 含量显著低于非根际土壤。

表 1 碳酸钙处理下玉米生长性状及地上部元素含量

Table 1 Maize growth characteristics and N, P, K, Ca contents in maize shoots under  $\text{CaCO}_3$  treatments

处理	株高(cm)	生物量(g/盆)	氮含量(mg/盆)	磷含量(mg/盆)	钾含量(mg/盆)	钙含量(mg/盆)
CK	56.18 $\pm$ 0.30 b	1.57 $\pm$ 0.11 b	21.27 $\pm$ 2.23 b	1.69 $\pm$ 0.18 c	30.37 $\pm$ 3.34 c	3.88 $\pm$ 0.38 b
Ca-0.3	64.39 $\pm$ 1.77 a	2.47 $\pm$ 0.31 a	37.07 $\pm$ 2.16 a	2.95 $\pm$ 0.30 b	57.97 $\pm$ 6.11 b	9.32 $\pm$ 0.55 a
Ca-0.5	65.57 $\pm$ 3.08 a	2.53 $\pm$ 0.33 a	43.77 $\pm$ 7.28 a	3.44 $\pm$ 0.19 a	66.47 $\pm$ 2.23 a	11.13 $\pm$ 1.63 a

注: 同列数据后小写字母不同表示处理间差异达  $P < 0.05$  显著水平。

表 2 碳酸钙处理下根际和非根际土壤理化性质

Table 2 Physicochemical properties of non-rhizosphere and rhizosphere soils under  $\text{CaCO}_3$  treatments

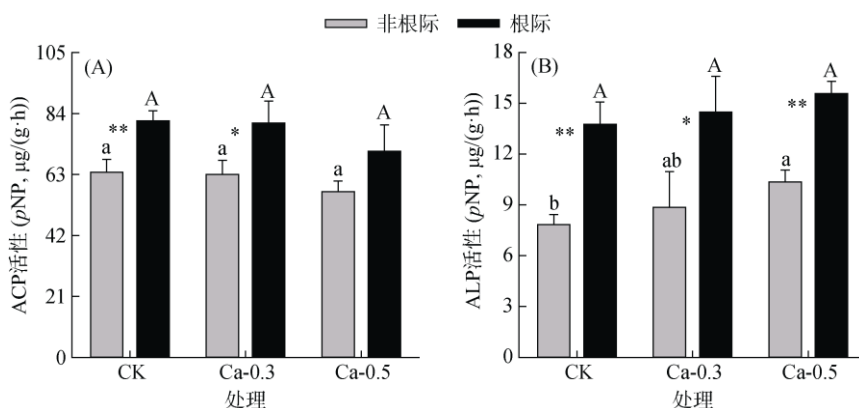
处理	取样位点	pH	全碳(g/kg)	全氮(g/kg)	$\text{NH}_4^+$ -N(mg/kg)	$\text{NO}_3^-$ -N(mg/kg)
CK	非根际	4.07 $\pm$ 0.05 b	5.00 $\pm$ 0.18 a	0.67 $\pm$ 0.02 a	<b>57.53 <math>\pm</math> 8.52 a</b>	<b>29.94 <math>\pm</math> 0.53 b</b>
	根际	4.01 $\pm$ 0.01 A	5.3 $\pm$ 0.25 A	0.65 $\pm$ 0.03 A	<b>23.85 <math>\pm</math> 1.53 A</b>	<b>42.05 <math>\pm</math> 4.26 B</b>
Ca-0.3	非根际	<b>4.18 <math>\pm</math> 0.01 a</b>	<b>4.96 <math>\pm</math> 0.10 a</b>	<b>0.67 <math>\pm</math> 0.01 a</b>	<b>47.95 <math>\pm</math> 3.48 ab</b>	<b>31.25 <math>\pm</math> 3.55 ab</b>
	根际	<b>4.02 <math>\pm</math> 0.04 A</b>	<b>5.25 <math>\pm</math> 0.04 A</b>	<b>0.64 <math>\pm</math> 0.01 A</b>	<b>17.19 <math>\pm</math> 1.50 B</b>	<b>61.76 <math>\pm</math> 3.59 A</b>
Ca-0.5	非根际	<b>4.20 <math>\pm</math> 0.03 a</b>	<b>5.05 <math>\pm</math> 0.06 a</b>	0.68 $\pm$ 0.01 a	<b>39.01 <math>\pm</math> 4.60 b</b>	<b>38.3 <math>\pm</math> 5.57 a</b>
	根际	<b>4.06 <math>\pm</math> 0.04 A</b>	<b>5.39 <math>\pm</math> 0.09 A</b>	0.66 $\pm$ 0.02 A	<b>16.71 <math>\pm</math> 2.30 B</b>	<b>66.59 <math>\pm</math> 3.15 A</b>
处理	取样位点	全磷(g/kg)	有效磷(mg/kg)	全钾(g/kg)	速效钾(mg/kg)	交换性钙(mg/kg)
CK	非根际	0.44 $\pm$ 0.02 a	16.76 $\pm$ 0.97 b	10.48 $\pm$ 0.31 a	<b>137.51 <math>\pm</math> 9.62 a</b>	<b>218.65 <math>\pm</math> 8.67 c</b>
	根际	0.43 $\pm$ 0.01 B	15.55 $\pm$ 0.79 C	10.32 $\pm$ 0.48 A	<b>109.31 <math>\pm</math> 13.51 A</b>	<b>181.49 <math>\pm</math> 19.06 C</b>
Ca-0.3	非根际	0.45 $\pm$ 0.01 a	<b>19.8 <math>\pm</math> 1.05 a</b>	10.75 $\pm$ 0.75 a	<b>139.98 <math>\pm</math> 7.07 a</b>	<b>348.69 <math>\pm</math> 22.92 b</b>
	根际	0.44 $\pm$ 0.01 B	<b>17.1 <math>\pm</math> 0.15 B</b>	10.24 $\pm$ 0.32 A	<b>56.67 <math>\pm</math> 3.08 B</b>	<b>300.37 <math>\pm</math> 5.20 B</b>
Ca-0.5	非根际	<b>0.43 <math>\pm</math> 0.01 a</b>	19.03 $\pm$ 0.68 a	<b>11.08 <math>\pm</math> 0.38 a</b>	<b>137.97 <math>\pm</math> 4.43 a</b>	<b>455.92 <math>\pm</math> 17.14 a</b>
	根际	<b>0.47 <math>\pm</math> 0.01 A</b>	19.7 $\pm$ 0.86 A	<b>9.91 <math>\pm</math> 0.48 A</b>	<b>57.84 <math>\pm</math> 3.06 B</b>	<b>367.06 <math>\pm</math> 3.18 A</b>

注: 同列小写或大写字母不同表示非根际或根际土壤理化因子处理间差异达  $P < 0.05$  显著水平; 黑体数据表述根际与非根际土壤理化因子差异达  $P < 0.05$  显著水平。

### 2.2 酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性

在 CK、Ca-0.3 和 Ca-0.5 处理样品中非根际土壤 ACP 活性(单位:  $p\text{NP}$ ,  $\text{mg}/(\text{kg h})$ )分别为 63.79  $\pm$  4.42、63.05  $\pm$  4.87 和 57.09  $\pm$  3.69, 明显低于根际土壤(分别为 81.46  $\pm$  3.50、80.73  $\pm$  7.58 和 71.01  $\pm$  9.09), 且在 CK 和 Ca-0.3 处理中差异达显著水平( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )(图

1A)。然而, 非根际或根际土壤 ACP 活性在不同碳酸钙处理间均无显著差异(图 1A)。非根际土壤 ALP 活性随碳酸钙用量的增加而增加, 且 Ca-0.5 处理显著高于前两个碳酸钙处理(图 1B), 但在根际土壤中各碳酸钙处理间无显著影响。各碳酸钙处理根际土壤 ALP 活性均显著高于非根际土壤( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )(图 1B)。



(图中灰色或黑色柱子上不同大或小写字母表示在非根际或根际土壤中各碳酸钙处理间差异达  $P < 0.05$  显著水平；星号表示非根际与根际土壤间差异达显著水平(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )；下同)

图 1 碳酸钙处理下根际和非根际土壤 ACP(A)和 ALP(B)活性

Fig. 1 Activities of ACP (A) and ALP (B) of non-rhizosphere and rhizosphere soils under  $\text{CaCO}_3$  treatments

### 2.3 解磷微生物功能基因 *phoC* 和 *phoD* 拷贝数

碳酸钙添加未显著影响根际和非根际土壤 *phoC* 基因拷贝数(图 2A)。虽然根际作用增加了 *phoC* 基因拷贝数, 但是统计上差异未达到显著水平。图 2B 显示, *phoD* 基因拷贝数随碳酸钙用量的增加而增加, Ca-0.5 处理显著高于 CK。3 个碳酸

钙处理根际土壤 *phoD* 基因拷贝数均显著高于非根际土壤( $P < 0.01$ )。线性回归分析表明, ACP 活性与 *phoC* 基因拷贝数在非根际( $P < 0.01$ )和根际( $P < 0.05$ )土壤中均呈显著正相关(图 3A)。ALP 活性与 *phoD* 基因拷贝数相关性在根际土壤中达到显著水平( $P < 0.05$ )(图 3B)。

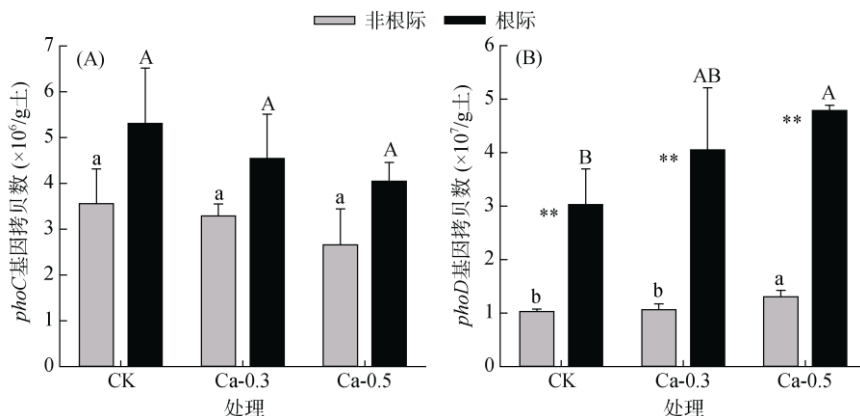


图 2 碳酸钙处理下非根际和根际土壤 *phoC*(A)和 *phoD*(B)基因拷贝数

Fig. 2 *phoC* (A) and *phoD* (B) gene copy numbers of non-rhizosphere and rhizosphere soils under  $\text{CaCO}_3$  treatments

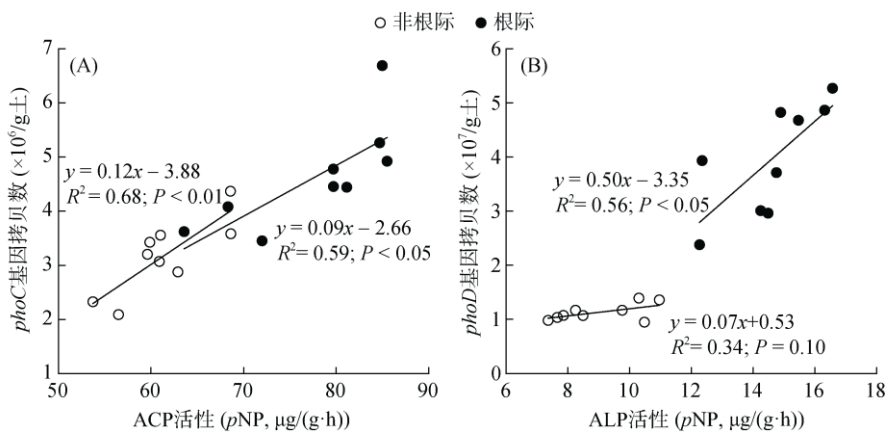


图 3 土壤磷酸酶活性与 *phoC*(A)和 *phoD*(B)基因拷贝数相关性

Fig. 3 Correlations between soil phosphate activities and *phoC* (A) and *phoD* (B) genes copy numbers

## 2.4 土壤磷酸酶活性和基因拷贝数与土壤理化性质的相关性

非根际土壤中, ACP 活性与 TK 呈显著负相关, 而 *phoC* 基因拷贝数与  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、TP 含量呈显著正相关; ALP 活性与土壤 pH、ECa 含量呈显著正相关,

与  $\text{NH}_4\text{-N}$  含量呈显著负相关, 而 *phoD* 基因拷贝数与  $\text{NO}_3\text{-N}$ 、ECa 含量呈显著正相关(表 3)。根际土壤中, *phoC* 基因拷贝数与  $\text{NO}_3\text{-N}$  含量呈显著负相关, *phoD* 基因拷贝数与 pH 及 AP、ECa 含量均呈显著正相关, 而与  $\text{NH}_4\text{-N}$  含量呈显著负相关(表 3)。

表 3 土壤中磷酸酶活性、*phoC* 和 *phoD* 基因拷贝数与土壤理化性质的 Pearson 相关分析  
Table 3 Pearson correlations between phosphate activities, *phoC*, *phoD* gene copy numbers and soil physicochemical properties

取样位点	指标	pH	全碳	全氮	铵态氮	硝态氮	全磷	有效磷	全钾	速效钾	交换性钙
非根际	ACP	-0.509	-0.395	-0.42	0.545	-0.51	0.593	-0.422	-0.884**	-0.538	-0.535
	ALP	0.668*	0.421	-0.009	-0.845**	0.394	-0.532	0.276	0.016	-0.44	0.790*
	<i>phoC</i>	-0.613	-0.632	-0.127	0.741*	-0.21	0.814**	-0.293	-0.61	-0.205	-0.501
	<i>phoD</i>	0.501	0.426	0.358	-0.663	0.851**	-0.31	0.415	0.501	-0.098	0.793*
根际	ACP	-0.099	-0.083	-0.086	0.232	-0.536	-0.318	-0.574	0.412	0.275	-0.559
	ALP	0.618	0.503	0.358	-0.547	0.334	0.471	0.509	-0.381	-0.372	0.426
	<i>phoC</i>	-0.229	-0.049	0.115	0.355	-0.688*	-0.456	-0.428	-0.126	0.458	-0.650
	<i>phoD</i>	0.779*	0.231	0.029	-0.800**	0.651	0.557	0.738*	-0.321	-0.641	0.699*

## 3 讨论

土壤酶参与养分循环, 并反映土壤微生物活动<sup>[8]</sup>。解磷微生物能够通过分泌磷酸酶参与土壤有机磷矿化, 提高土壤磷素有效性。Acosta-Martínez 和 Tabatabai<sup>[15]</sup>研究表明碳酸钙施用显著增加土壤 pH 和 ALP 活性, 但是降低 ACP 活性。类似地, 本研究中碳酸钙添加显著提高土壤 ALP 活性和 *phoD* 基因拷贝数, 表现出降低 ACP 活性和 *phoC* 基因拷贝数的趋势(图 1 和图 2), 这可能与碳酸钙对土壤 pH 的提高作用有关。两种磷酸酶产生主要取决于外界环境 pH, ACP 在酸性土壤中较多, 而中性或碱性土壤中 ALP 较为常见<sup>[19]</sup>。非根际土壤 ACP 和 ALP 活性分别与 pH 呈负相关和正相关(表 3), 充分证明这个结果。与 Dick 等<sup>[8]</sup>研究一致, 酸性土壤 ACP 活性显著高于 ALP(图 1), 表明酸性土壤中 ACP 在矿化有机磷方面起主导作用。

土壤酶活性对土壤管理引起的土壤理化性质变化很敏感, 并且不同类型酶的敏感程度存在明显差异<sup>[20]</sup>。本研究中, 碳酸钙添加显著影响非根际土壤 ALP 及非根际和根际土壤 *phoD* 基因拷贝数(图 1B 和 2B), 但对 ACP 活性和 *phoC* 基因拷贝数影响不显著(图 1A 和 2A)。Acosta-Martínez 和 Tabatabai<sup>[15]</sup>发现土壤 ALP 活性相较于 ACP 更易受碳酸钙的影响。磷酸酶活性和基因拷贝数与土壤理化性质间相关分析也表明, ALP 活性与 *phoD* 基因拷贝数更易受土壤理化因子的影响(表 3), 因此, ACP 和 ALP 对碳酸钙的响

应差异也支持了先前研究。磷酸酶是一类诱导酶, 磷缺乏能够诱导植物根系和微生物分泌磷酸酶和促进磷酸酶活性增加, 而磷酸酶的形态又与土壤 pH 密切相关<sup>[8-9]</sup>。ALP 对碳酸钙响应强于 ACP, 证明碳酸钙能够促进土壤微生物生长, 尤其是 *phoD* 基因相关的微生物种类。这可能归因于 ALP 并不来自于植物, 仅由微生物分泌<sup>[9]</sup>。此外, 杨艳菊等<sup>[21]</sup>报道土壤中钙离子含量显著影响解磷微生物的生长。本研究发现非根际 ALP 活性和 *phoD* 基因拷贝数与 ECa 含量呈显著正相关, 这也部分解释了 ALP 活性与 *phoD* 基因拷贝数对碳酸钙响应强于 ACP 活性和 *phoC* 基因拷贝数。此外, Zaheer 等<sup>[22]</sup>研究表明, 钙离子能够激发 ALP 活性, 添加钙离子(0.5 ~ 2.0 mmol/L)能够使 ALP 活性提升约 2.5 倍。钙离子的存在在很大程度上保护 ALP 免受其他金属离子的抑制作用, 说明磷酸酶对钙离子有较高的亲和力。

根际是植物能量和物质代谢最活跃的区域。植物根系释放的各种分泌物可以选择性地刺激微生物种群生长, 因此, 根际土壤形成了独特的微生物群落<sup>[23-24]</sup>。在各种环境条件下, 已经广泛报道了根际土壤微生物丰度和活性远高于非根际土壤<sup>[13, 25]</sup>, 其中解磷微生物的分布表现出强烈的根际效应<sup>[26]</sup>。植物生长引起根系分泌物增加和养分吸收增强能够刺激根际微生物的解磷功能<sup>[10, 27]</sup>。在本研究所有处理中根际土壤 *phoC*、*phoD* 基因拷贝数和磷酸酶活性均高于非根际土壤, 尤其是 *phoD* 基因拷贝数和 ALP 活性(图 1 和图 2), 表明根际土壤具有较高的解磷微生物活

性,并对磷酸酶活性有促进作用。这强烈地暗示根际区域可能存在更高水平的生物解磷作用。

#### 4 结论

综上所述,ACP在酸性土壤有机磷矿化方面强于ALP,其活性不易受碳酸钙处理的影响。虽然碳酸钙和根际效应均影响解磷微生物功能和丰度,但是根际效应更为强烈,主要表现在增加了磷酸酶活性和*phoD*基因丰度。因此,调控作物生长对促进酸性土壤解磷微生物功能具有重要指导意义。

#### 参考文献:

- [1] 赵其国. 红壤物质循环及其调控[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] 孙波. 红壤退化阻控与生态修复[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [3] Sharma S B, Sayyed R Z, Trivedi M H, et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils[J]. SpringerPlus, 2013, 2(1): 1–14.
- [4] Kochian L V, Hoekenga O A, Piñeros M A. How do crop plants tolerate acid soils? mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55(1): 459–493.
- [5] 孙婷婷, 陈晏, 樊剑波, 等. 土壤悬液培养法研究长期施肥下花生根际解磷菌溶磷特性[J]. 土壤学报, 2017, 54(1): 227–236.
- [6] Li H Z, Bi Q F, Yang K, et al. D<sub>2</sub>O-isotope-labeling approach to probing phosphate-solubilizing bacteria in complex soil communities by single-cell Raman spectroscopy[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(3): 2239–2246.
- [7] 滕泽栋, 李敏, 朱静, 等. 解磷微生物对土壤磷资源利用影响的研究进展[J]. 土壤通报, 2017, 48(1): 229–235.
- [8] Dick W A, Cheng L, Wang P. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32(13): 1915–1919.
- [9] Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, et al. Role of phosphatase enzymes in soil[M]//Soil Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 215–243.
- [10] Fraser T D, Lynch D H, Gaiero J R, et al. Quantification of bacterial non-specific acid (*phoC*) and alkaline (*phoD*) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields[J]. Applied Soil Ecology, 2017, 111: 48–56.
- [11] 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.
- [12] 徐仁扣. 土壤酸化及其调控研究进展[J]. 土壤, 2015, 47(2): 238–244.
- [13] Wang C, Zhao X Q, Chen R F, et al. Aluminum tolerance of wheat does not induce changes in dominant bacterial community composition or abundance in an acidic soil[J]. Plant and Soil, 2013, 367(1/2): 275–284.
- [14] Holland J E, Bennett A E, Newton A C, et al. Liming impacts on soils, crops and biodiversity in the UK: A review[J]. Science of the Total Environment, 2018, 610–611: 316–332.
- [15] Acosta-Martínez V, Tabatabai M A. Enzyme activities in a limed agricultural soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2000, 31(1): 85–91.
- [16] Weisskopf L, le Bayon R, Kohler F, et al. Spatio-temporal dynamics of bacterial communities associated with two plant species differing in organic acid secretion: A one-year microcosm study on lupin and wheat[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(7): 1772–1780.
- [17] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [18] Tabatabai M. Soil enzymes[M]//Bigham J M. Methods of soil analysis. Madison: SSSA, 1994: 775–834.
- [19] Juma N, Tabatabai M. Distribution of phosphomonoesterases in soils[J]. Soil Science, 1978, 126(2): 101–108.
- [20] Bergstrom D W, Monreal C M, King D J. Sensitivity of soil enzyme activities to conservation practices[J]. Soil Science Society of America Journal, 1998, 62(5): 1286–1295.
- [21] 杨艳菊, 王改兰, 张海鹏, 等. 解磷微生物的研究现状及在农业上的应用[J]. 湖南农业科学, 2012(6): 23–25.
- [22] Zaheer R, Morton R, Proudfoot M, et al. Genetic and biochemical properties of an alkaline phosphatase PhoX family protein found in many bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(6): 1572–1587.
- [23] Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(8): 478–486.
- [24] Hinsinger P, Bengough A G, Vetterlein D, et al. Rhizosphere: Biophysics, biogeochemistry and ecological relevance[J]. Plant and Soil, 2009, 321(1/2): 117–152.
- [25] Gutiérrez Castorena E V, Gutiérrez-Castorena M D C, González Vargas T, et al. Micromapping of microbial hotspots and biofilms from different crops using digital image mosaics of soil thin sections[J]. Geoderma, 2016, 279: 11–21.
- [26] 刘文干, 曹慧, 樊建波, 等. 一株红壤花生根际溶磷真菌的分离、鉴定及溶磷能力的研究[J]. 土壤学报, 2012, 49(5): 988–995.
- [27] 孙波, 廖红, 苏彦华, 等. 土壤-根系-微生物系统中影响氮磷利用的一些关键协同机制的研究进展[J]. 土壤, 2015, 47(2): 210–219.