DOI: 10.20103/j.stxb.202303210543

夏允,徐玲琳,杨柳明,杨智杰,范跃新,杨玉盛.模拟氮沉降对中亚热带米槠天然林土壤解磷微生物群落和功能潜力的影响.生态学报,2024,44 (4):1727-1736.

Xia Y, Xu L L, Yang L M, Yang Z J, Fan Y X, Yang Y S. Effects of simulated nitrogen deposition on soil microbial community and functional potential of phosphate-solubilizing microorganisms in a subtropical *Castanopsis carlesii* forest. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(4): 1727-1736.

模拟氮沉降对中亚热带米槠天然林土壤解磷微生物群 落和功能潜力的影响

夏 允1,2,3,徐玲琳1,2,3,杨柳明1,2,3,杨智杰1,2,3,范跃新1,2,3,*,杨玉盛1,2,3

1 福建师范大学地理科学学院,福州 350007

2 福建师范大学福建省植物生理生态重点实验室,福州 350007

3 福建师范大学地理研究所,福州 350007

摘要:解磷微生物是森林土壤磷循环的关键驱动因素,对亚热带低磷土壤尤为重要。由于微生物对环境变化较为敏感,氮沉降 下土壤微生物如何变化以及如何影响土壤磷有效性尚不清楚。为此,依托福建三明森林生态系统与全球变化国家野外科学观 测研究站建立的米槠天然林长期氮沉降观测平台,借助 16S rRNA 和 ITS 高通量测序以及 PICRUSt 功能预测方法,探索氮添加 对土壤解磷微生物群落和功能潜力的影响。结果表明:氮添加显著增加了土壤有效氮含量,但显著降低了 Resin-P、NaHCO₃-P 和 TPo,表明氮沉降改变了土壤养分平衡,加剧了磷限制。此外,氮添加降低了根瘤菌和伯克霍尔德菌等解磷细菌的丰度,却增 加了青霉菌和曲霉菌等解磷真菌的丰度。PICRUSt 功能预测进一步发现,存在 15 种能够编码磷酸酶的基因,并且与对照相比, 施氮后酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和植酸酶等酶基因丰度显著增加。综上,本研究发现施氮加剧了亚热带米槠天然林土壤的磷限 制,同时增加了解磷真菌的丰度和磷酸酶的基因丰度来促进有机磷矿化,这可能是氮沉降下驱动米槠天然林土壤磷转化的主要 微生物机制。

关键词:解磷微生物;磷酸酶;高通量测序;PICRUSt功能预测

Effects of simulated nitrogen deposition on soil microbial community and functional potential of phosphate-solubilizing microorganisms in a subtropical *Castanopsis carlesii* forest

XIA Yun^{1,2,3}, XU Linglin^{1,2,3}, YANG Liuming^{1,2,3}, YANG Zhijie^{1,2,3}, FAN Yuexin^{1,2,3,*}, YANG Yusheng^{1,2,3}

1 School of Geographical Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

2 Fujian Provincial Key Laboratory for Plant Ecophysiology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

3 Institute of Geography, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

Abstract: Phosphate-solubilizing microorganisms are the key factors in driving phosphorus (P) cycle in forest soil, especially in subtropical forest soil where P is scarce. Although microorganisms are sensitive to environmental changes, it is still unclear the changes in microbial function and their effects on soil P cycling in response to nitrogen (N) deposition. In this study, a long-term N deposition experiment platform was established in the *Castanopsis Carlesii* natural forest at the National Research Station of Forest Ecosystem and Global Change in Sanming, Fujian Province. Through the 16S rRNA and ITS-based high-throughput sequencing and PICRUSt functional prediction methods, we investigated the effects of N addition

收稿日期:2023-03-21; 网络出版日期:2023-11-27

基金项目:国家自然科学基金(41977090,32192433,32171587)

^{*} 通讯作者 Corresponding author.E-mail: yxfan@ fjnu.edu.cn

on the community and functional potential of phosphate-solubilizing microorganisms in the soil. The results showed that the N addition significantly increased the available N content of the soil, but significantly decreased Resin-P, NaHCO₃-P, and TPo, indicating that N deposition altered the soil nutrient balance and aggravated soil P limitation. In addition, N addition significantly decreased the abundance of phosphate-solubilizing bacteria such as *Rhizobia* and *Burkholder*, while increased the abundance of phosphate-solubilizing bacteria such as *Rhizobia* and *Burkholder*, while increased the abundance of phosphate-solubilizing fungi such as *Penicillium* and *Aspergillus*. The prediction analysis of the function of phosphate-solubilizing microorganisms by PICRUSt also further revealed 15 genes that are capable of encoding phosphatases, the abundance of genes encoding enzymes such as acid phosphatase, alkaline phosphatase, and phytase increased significantly after N addition. In conclusion, N addition induced P limitation in this subtropical *Castanopsis carlesii* forest. The increased phosphate-solubilizing fungi and the associated increases in phosphatase genes might be beneficial to organic phosphate mineralization, which may act as the main microbial mechanism driving soil P transformation in *Castanopsis carlesii* natural forest under N deposition.

Key Words: phosphate-solubilizing microorganisms; phosphatase; high-throughput sequencing; PICRUSt function prediction

磷是限制陆地生态系统初级生产力的关键养分。特别是热带亚热带地区,由于土壤高度风化,大部分磷 被铁铝氧化物固定,导致该区域的森林生态系统普遍存在磷限制^[1]。此外,亚热带地区还是全球最严重的氮 沉降区域之一,大量的氮输入改变了生态系统的氮磷平衡,进一步加重亚热带森林土壤的磷限制^[2-3]。因此, 厘清氮沉降下土壤磷周转过程及其调控机制,对预测亚热带森林生产力如何适应全球变化具有重要意义。

土壤微生物在磷循环过程中发挥关键作用,被认为是驱动土壤磷周转的主导因素^[4]。其中,能够促进有 机磷分解或无机磷解吸附,进而提高土壤磷有效性的微生物被称为解磷微生物^[5]。目前已知的细菌、放线菌 和真菌等均具有溶解磷的功能。如假单胞菌属(Pseudomonas)、伯克霍尔德菌属(Burkholderia)、芽孢杆菌属 (Bacillus)、肠杆菌属(Enterobacter)、欧文氏菌属(Erwinia)、沙雷菌属(Serratia)、不动杆菌属(Acinetobacter)和 根瘤菌属(Rhizobium)等均具有溶解磷的功能^[6-7]。与细菌类似,部分真菌(如曲霉菌(Aspergillus)和青霉菌 (Penicillium))同样具有活化磷的能力^[8]。已有研究发现氮沉降会改变微生物群落结构,如基于全球数据的 Meta 分析发现长期氮添加会降低土壤微生物生物量和群落多样性,对微生物产生负面效应^[9-10]。此外,控制 实验也发现氮沉降导致功能微生物(如固氮细菌、氨氧化细菌和丛枝菌根真菌)丰度显著下降^[11-13],但也有 研究发现氮添加并未改变土壤微生物群落结构^[14]。说明氮沉降对土壤微生物群落结构的影响还存在不确 定性。

通过合成磷酸酶促进有机磷矿化是解磷微生物驱动土壤磷转化和提高土壤磷有效性的重要途径之一^[15]。由于不同磷酸酶的编码基因并不一致,携带不同编码基因的解磷微生物合成磷酸酶的能力和种类存在差异^[16]。一般认为,酸性磷酸酶主要来源于真菌和植物根系,是酸性土壤中参与矿化磷的主要酶;碱性磷酸酶主要来自碱性土壤微生物,在多种有机磷化合物中裂解酯键,从而释放磷酸盐^[17]。已有研究表明磷酸酶的产生取决于土壤有机质含量、pH值、植物和微生物氮磷养分需求等^[18-20]。比如,众多研究发现施氮后土壤磷酸酶的增加与氮沉降加剧土壤磷限制有关^[21-22]。但也有研究发现氮沉降对磷酸酶的影响因土壤养分状况而异,氮输入抑制了受氮限制土壤中磷酸酶的分泌进而加重了磷限制,但提高了受磷限制土壤中磷酸酶含量 来缓解了磷限制^[23]。在亚热带低磷土壤中,氮沉降是否会提高磷酸酶的含量以及增加哪些磷酸酶的含量来缓解磷限制仍不清楚。此外,已有研究主要通过测定酸性磷酸酶、碱性磷酸酶以及磷酸二酯酶等酶活性的变化表征土壤磷矿化潜力,而事实上植酸酶、磷酸单脂酶等也是驱动有机磷矿化的关键水解酶,对土壤磷转化十分重要。但由于难以直接观测,且测定过程受环境变化以及实验方法的干扰,导致较难揭示土壤中不同磷酸酶活性的真实变化。随着生物信息学工具的兴起,Langille等(2013)提出的 PICRUSt 功能预测手段提供了新的思路,该方法基于系统发育(从高通量测序技术中获得)和功能相联系的假设,预测宏基因组的功能组 成^[24],可用于揭示土壤酶编码基因的相对变化。尽管 PICRUSt 功能预测无法表征土壤酶活性的绝对数量,但可提供土壤磷转化酶编码基因的种类和相对丰度等信息,间接表征土壤磷酸酶的种类和活性,有助于更为清晰地认识外界环境干扰下土壤磷循环的微生物机理。

本研究选择亚热带森林顶级群落的建群种米槠天然林为研究对象,依托长期氮沉降观测研究平台,通过 16S rRNA 和 ITS 测序,结合 PICRUSt 功能预测手段,探究氮添加对亚热带森林土壤解磷微生物群落丰度和功 能潜力的影响。旨在揭示氮沉降背景下,驱动土壤磷转化的关键微生物类群以及促进有机磷分解的主要磷酸 酶种类,为理解氮沉降下驱动亚热带森林土壤磷循环的微生物类群和机制提供知识储备。

1 材料和方法

1.1 研究区概况

试验样地位于福建三明森林生态系统与全球变化国家站(26°11′N,117°8′E)。以米槠天然林为研究对 象,设置长期氮沉降观测样地。样地本底条件基本一致,采用随机区组设计。根据亚热带大气氮沉降的背景 值约 38 kg N hm⁻² a^{-1[25]},设置对照(CT,0 kg N hm⁻² a⁻¹)、低氮(LN,40 kg N hm⁻² a⁻¹)和高氮(HN,80 kg N hm⁻² a⁻¹)3个处理,每个处理4个重复。每个样方大小为20 m×20 m,样方之间用 PVC 板进行阻隔,间隔10 m 以上。于 2012 年 11 月开始,每月月初以喷洒 NH₄NO₃溶液的方式施氮。为消除外加水的影响,对照样方喷洒 等量去离子水。

于 2018 年 4 月用土钻钻取 0—10 cm 和 10—20 cm 土层的土样,每块样地随机取 5 个点混匀,将采集的土 壤样品用冰袋储存运回实验室,将鲜土过 2 mm 筛后分成三份,一部分放在-20℃冰箱保存,用于提取 DNA,一 部分置于 4℃冰箱低温储存,用于测定 DOC 和矿质氮等指标;另一部分自然风干,用于测定土壤磷组分和其 他基本理化指标。

1.2 土壤理化性质的测定

土壤 pH 采用玻璃电极在悬浮液(土水比 1:2.5) 中测定。土壤有机碳(SOC)和全氮(TN)采用高温氧化法利用碳氮元素分析仪(Elementar Vario EL III; Elementar, Langenselbod, Germany)测定。可溶性有机碳(DOC) 采用去离子水浸提(土水质量比为 4:1)利用 TOC 分析仪(Multi N / C 3100, Analytikjena, German)测定。采用 0.5 mol/L 的 KCl 浸提土样后用连续流动分析仪(Skalar San++, Skalar, 荷兰)测定土壤铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)含量。

1.3 土壤磷组分

参照 Hedley(1982)等制定以及 Tiessen 和 Moir(1993)改进的顺序提取方法来测定土壤磷组分^[26-27]。依 次用转化为碳酸氢盐形式(2 cm × 3 cm)的阴离子交换树脂膜条,0.5 mol/L NaHCO₃、0.1 mol/L NaOH、1 mol/L HCl 溶液浸提,并将 0.1 mol/L NaOH 溶液经过超声振荡浸提得到 NaOHs 溶液。使用流动分析仪 (Skalar San++,Skalar,荷兰)测定每种提取物中无机磷(Pi)的浓度。对于 0.5 mol/L NaHCO₃,0.1 mol/L NaOH和 mol/L HCl的浸提液,用浓硫酸和高氯酸消煮得到各浸提物的总磷(TP),有机磷(Po)则为每种提取物的 TP 与 Pi 的差值。Klotzbücher 等(2019)发现,只有前两个提取步骤(使用 HCO₃形式的阴离子交换树脂和碳酸 氢盐)代表了不同生物利用度的磷组分^[28]。因此,将磷组分划分为树脂磷(Resin-P)、NaHCO₃提取磷 (NaHCO₃-P)、总可提取有机磷(TPo,NaHCO₃-Po、NaOH-Po、NaOHs-Po 和 HCl-Po 的总和)和总可提取无机磷 (TPi,NaHCO₃-Pi、NaOH-Pi、NaOHs-Pi 和 HCl-Pi 的总和)。

1.4 DNA 提取、PCR 扩增和 Illumina MiSeq 测序

从-20℃储存的冻土中分别称取 0.25 g 样品,使用 MoBio PowersoilTM DNA 分离试剂盒(MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, 193 USA)提取微生物 DNA,然后使用 1%的琼脂糖凝胶电泳和 Thermo Nano Drop One 分光光度计(ND-2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)对提取的 DNA 进行可视化和定量。以稀释 10 倍的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。使用引物组 341F/806R 和 ITS1F/ITS2R 分别扩增细菌 16S rRNA

基因和真菌 ITS 区。扩增过程:94℃ 初始变性 5 min,然后 94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 30 s,在 72℃下延伸 10 min,最后在 4℃下保持,直到停止。每个样本 3 个重复,并将同一样本的 PCR 产物进行混合,使用 Illumina Miseq 平台(Majorbio Bio-Pharm Technology Co.206 Ltd.,Shanghai,China)对 PCR 产物进行处理和量化,并使用 QIIME 程序对基因序列进行定量分析^[29]。

1.5 数据处理

将测序得到的基因序列进行质控和过滤,去除长度< 200 bp 的序列,分别使用 SILVA 和 UNITE 数据库鉴 定细菌和真菌分类^[30]。在 97%相似度水平下将优化序列聚类为操作分类单元(Operational taxonomic unit OUT),使用 Microsoft Excel 2016 软件统计每个 OTU 的相对丰度信息以及微生物在门和属水平的分类信息。 采用 PICRUSt 功能预测探索和检验施氮处理后磷酸酶基因丰度的变化,筛选后的 BLAST 基因片段通过比对 KEGG 数据库进行功能注释^[31]。使用 R 包"psych"分别计算环境因子与解磷微生物、酶活性的相关性,并借 助"ggplot2"包制图。文中主要借助 R.4.2.1 软件和 Origin 2018 软件完成统计分析和制图。

2 结果和分析

2.1 土壤理化性质

施氮后土壤 pH 呈下降趋势(P>0.05,表1),与 CT 相比,LN 和 HN 处理在 0—10 cm 土层均降低 3.72%,在 10—20 cm 土层分别降低 0.97%和 1.45%。施氮后 SOC、TN、DOC 含量在不同土层均无显著差异(P>0.05)。但施 氮显著增加了两个土层的 NO₃-N 含量,且 HN>LN>CT(P<0.05),而 NH₄⁺-N 含量未发生显著变化。

Table 1 Effects of nitrogen deposition on soil physical and chemical properties							
	0—10 cm			10—20 cm			
Indicator	СТ	LN	HN	СТ	LN	HN	
pH (H ₂ 0)	4.03±0.05ab	$3.88 \pm 0.18 \mathrm{b}$	$3.88 \pm 0.06 \mathrm{b}$	4.14±0.08a	4.1±0.11ab	$4.08 \pm 0.05 \mathrm{ab}$	
土壤有机碳 Soil organic carbon/ (g/kg)	33.46±7.7a	35.41±5.25a	31.37±4.14a	$15.26{\pm}1.54\mathrm{b}$	$15.38 \pm 4.72 \mathrm{b}$	$14.37{\pm}2.67{\rm b}$	
可溶性有机碳 Dissolved organic carbon /(mg/kg)	92.05±34.23a	96.76±25.85a	75.68±24.5ab	42.22±7.84b	31.34 ± 12.39 b	33.93±8.79b	
总氮 Total nitrogen /(g/kg)	2.36±0.31a	2.41±0.51a	2.34±0.4a	$1.09{\pm}0.07{\rm b}$	$1.06{\pm}0.17{\rm b}$	$1.07{\pm}0.13{\rm b}$	
铵态氮 Ammonium nitrogen /(mg/kg)	24.16±3.57a	$27.79 \pm 8.82a$	23.21±7.39a	18.5±3.41a	16.62±4.63a	24.84±9.91a	
硝态氮 Nitrate nitrogen/ (mg/kg)	1.68 ± 0.46 cd	$5.7{\pm}1.09{\rm b}$	7.91±1.69a	$1.22 \pm 0.21 \mathrm{d}$	$3.32{\pm}0.49{\rm c}$	6.91±0.61ab	

表1 模拟氮沉降对土壤理化性质的影响

CT:对照处理 Control treatment;LN:低氮处理 Low nitrogen treatment;HN:高氮处理 High nitrogen treatment;同行不同字母表示处理间差异显著 (P<0.05),表中数据为平均值±标准差(n=4)

2.2 土壤磷组分的变化

施氮后,0—10 cm 土层 Resin-P、NaHCO₃-P 和 TPo 均显著降低(P<0.05,表 2),与 CT 处理相比,LN 处理 下分别降低 23.53%、25.62%、27.63%,HN 处理下分别降低 48.24%、24.35%、20.05%。同时,TPi 在不同处理 间没有显著差异。施氮后不同磷组分在 10—20 cm 土层的不同处理间均没有显著差异(P>0.05)。

2.3 土壤解磷微生物丰度的变化

基于 16S rRNA 和 ITS 的高通量测序手段来探究氮沉降对土壤解磷微生物群落组成和丰度的影响(图1)。结果显示米槠天然林土壤中解磷细菌主要包括变形菌门(慢生根瘤菌属(Bradyrhizobium)、伯克霍尔德菌属(Burkholderia)、中慢生根瘤菌属(Mesorhizobium))、放线菌门(链酶菌属(Streptomyces)和厚壁菌门(芽孢杆菌属(Bacillus)、类芽孢杆菌属(Paenibacillus)),解磷真菌主要有子囊菌门(青霉菌属(Penicillium)、曲霉菌属(Aspergillus)、镰刀菌属(Fusarium))。施氮后不同种属的解磷微生物丰度变化趋势并不一致,在 0—10 cm土层,与 CT 相比,HN 下慢生根瘤菌和伯克霍尔德菌分别降低 41.85%、69.70%,而链霉菌、青霉菌和曲霉菌分别增加 107.98%、99.59%、340.54%;在 10—20 cm 土层,HN 下慢生根瘤菌丰度降低 20.61%,链霉菌、芽孢杆、青霉菌、曲霉菌和镰刀菌分别增加了 0.53、6.22、12.29、6.00 倍和 13.00 倍。

表 2 模拟氮沉降对土壤磷组分的影响/(mg/kg)

Table 2 Effect of nitrogen deposition on soil phosphorus fractions							
磷组分		0—10 cm			10—20 cm		
P fraction	СТ	LN	HN	СТ	LN	HN	
树脂提取磷 Resin extractable phosphorus	1.70±0.14a	$1.30\pm0.14\mathrm{b}$	0.88±0.07c	$0.30 \pm 0.03 \mathrm{d}$	$0.34 \pm 0.02 \mathrm{d}$	0.36±0.13d	
NaHCO ₃ 提取磷 NaHCO ₃ extractable phosphorus	18.15±1.87a	$13.50{\pm}1.49{\rm b}$	13.73±2.00b	$7.88 \pm 0.45 \mathrm{c}$	$7.65 \pm 1.78 \mathrm{c}$	7.43±0.45c	
总可提取有机磷 Total extractable organic phosphorus	69.49±6.12a	$50.29 \pm 2.82 \mathrm{b}$	$55.56{\pm}3.53\mathrm{b}$	35.90±3.35c	33.11±5.65c	37.27±3.29c	
总可提取无机磷 Total extractable inorganic phosphorus	42.46±2.06a	32.29±7.23ab	31.91±4.35ab	$26.15{\pm}1.78\mathrm{b}$	25.53±6.48b	24.02±7.26b	

同行不同字母表示处理间差异显著(P<0.05);表中数据为平均值±标准差(n=4)



图1 氮沉降对土壤解磷微生物丰度的影响



2.4 土壤磷酸酶功能基因丰度的变化

基于 16S rRNA 观测数据,利用微生物 OTU(最小操作分类单元)和 FASTA(核苷酸序列)数据通过 PICRUSt 处理获取 KEGG Ortholog(KO)信息(表 3),然后通过 KEGG 数据库来获取编码磷酸酶类群的功能基 因的变化。结果表明米槠天然林土壤中共含有 15 种磷酸酶的功能基因,其中包括 12 种磷酸单脂酶和 3 种磷 酸二酯酶,施氮显著影响不同种类磷酸酶功能基因的相对丰度(图 2)。其中,与 CT 相比,LN 和 HN 处理下 0—10 cm 土层的酸性磷酸酶(A)、碱性磷酸酶(B)、4-植酸酶(C)、组氨醇磷酸酶(D)和 3-植酸酶(E)这 5 种 磷酸单脂酶以及二酯酶中的磷脂酶(M)功能基因相对丰度均显著增加(P<0.05)。在 10—20 cm 土层,HN 处 理下组氨醇磷酸酶和磷酸甘油酸磷酸酶(H)基因丰度显著降低(P<0.05)。

2.5 土壤解磷微生物丰度及功能基因变化的关键因素

通过相关分析检验了影响土壤解磷微生物丰度和功能基因变化的关键因素,发现施氮后显著变化的 解磷真菌(青霉菌和曲霉菌)与NO₃-N呈显著正相关(图3,P<0.05),与土壤pH和土壤磷组分(Resin-P、 表 3 PICRUSt 功能预测及 KEGG 数据库比对获得的磷酸酶信息

	Table 3	Phosphatase information obtained b	y PICRUSt function prediction and KEGG database comparison
KO 编号 KO number	基因 Gene	酶的国际系统命名 International System of enzyme nomenclature	磷酸酶的组成 Composition of phosphatase
K22913	FIG4	3.1.3	5"-磷酸核糖核酸磷酸酶 5"-phosphoribostamycin phosphatase
K01113	phoD	3.1.3.1	碱性磷酸酶 D.alkaline phosphatase D
K01087	otsB	3.1.3.12	海藻糖磷酸酶 trehalose-phosphatase
K05602	hisN	3.1.3.15	组氨醇磷酸酶 histidinol-phosphatase
K22223	pgp	3.1.3.18	磷酸甘油酸磷酸酶 phosphoglycolate phosphatase
K01078	PHO	3.1.3.2	酸性磷酸酶 acid phosphatase
K01092	suhB	3.1.3.25	肌醇-1(或4)-单磷酸酶 myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase
K01093	appA	3.1.3.26 3.1.3.2	4-植酸酶/酸性磷酸酶 4-phytase / acid phosphatase
K01096	pgpB	3.1.3.27	磷脂酰甘油磷酸酶 B.phosphatidylglycerophosphatase B
K02203	thrH	3.1.3.3 2.7.1.39	磷酸丝氨酸/高丝氨酸磷酸转移酶 phosphoserine/homoserine phosphotransferase
K02566	nagD	3.1.3.5	5′-核苷酸 5′-nucleotidase
K01083	—	3.1.3.8	3 植酸酶 3-phytase
K01114	plc	3.1.4.3	磷脂酶 C.phospholipase C
K18696	GDE1	3.1.4.46	甘油磷酰二酯磷酸二酯酶 glycerophosphoryl diester phosphodiesterase
K01127	GPLD	3.1.4.50	糖基磷脂酰肌醇磷脂酶 D.glycosylphosphatidylinositol phospholipase D
K01523	hisE	3.6.1.31	磷酸核糖基-ATP 焦磷酸水解酶 phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase









A:酸性磷酸酶 Acid phosphatase;B:碱性磷酸酶 D Alkaline phosphatase D;C:4-植酸酶/酸性磷酸酶 4-phytase / acid phosphatase;D:组氨醇磷酸 酶 Histidinol-phosphatase;E:3 植酸酶 3-phytase;F:肌醇-1(或4)-单磷酸酶 Myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase;G:5"-磷酸核糖核酸磷酸酶 5"-phosphoribostamycin phosphatase;H:磷酸甘油酸磷酸酶 Phosphoglycolate phosphatase;I:磷酸丝氨酸/高丝氨酸磷酸转移酶 Phosphoserine / homoserine phosphotransferase;J:磷脂酰甘油磷酸酶 B Phosphatidylglycerophosphatase B;K:海藻糖磷酸酶 Trehalose-phosphatase;L:5'-核苷酸 5'-nucleotidase;M:磷脂酶 C Phospholipase C;N:甘油磷酰二酯磷酸二酯酶 Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase;O:糖基磷脂酰肌醇磷脂 酶 D Glycosylphosphatidylinositol phospholipase D。CT:对照处理 Control treatment;LN:低氮处理 Low nitrogen treatment ;HN:高氮处理 High nitrogen treatment

http://www.ecologica.cn

NaHCO₃-P、TPo和TPi)呈负相关,而解磷细菌(伯克霍尔德菌和慢生根瘤菌)与土壤磷组分呈正相关。同时,施氮后显著变化的编码磷酸酶(碱性磷酸酶、4-植酸酶、酸性磷酸酶、组氨醇磷酸酶、3 植酸酶、磷脂酶)基因丰度与NO₃-N呈显著正相关,但与pH、土壤磷(Resin-P和TPi)呈显著负相关(图4,*P*<0.05)。此外,相比10—20 cm 土层,0—10 cm 土层微生物丰度和基因变化对土壤养分变化的响应更敏感。



图 3 解磷微生物丰度与环境因子的相关关系

Fig.3 Correlation between phosphorus-solubilizing microbial abundance and environmental factors

SOC:土壤有机碳 Soil organic carbon;TN:总氮 Total nitrogen;DOC:可溶性有机碳 Dissolved organic carbon;NH₄⁺-N:铵态氮 Ammonium nitrogen; NO₃⁻-N:硝态氮 Nitrate nitrogen;Resin-P:树脂磷 Resin extractable phosphorus;NaHCO₃-P:NaHCO₃提取磷 NaHCO₃ extractable phosphorus;TPo: 总可提取有机磷 total extractable organic phosphorus;TPi:总可提取无机磷 Total extractable inorganic phosphorus;图中标注数值为 r 值,表明差 异显著(P<0.05)

3 讨论

3.1 氮沉降对土壤磷组分的影响

施氮后表层土壤 Resin-P、NaHCO₃-P 和 TPo 均显著降低,这与亚热带毛竹林的研究结果相似^[32],施氮降 低了 NaHCO₃-P 和有机磷占总磷的比例,并认为 Po 是维持亚热带地区 P 供应的基础,当土壤 P 有效性不足 时,往往通过有机磷的矿化来满足植物和微生物的需求。Bowman 等(2008)通过对温带生态系统的研究也发 现施氮后土壤有效磷含量降低,其认为可能与氮添加引起的土壤酸化有关,由于碱性阳离子会被 Al³⁺取代产 生铝毒,这会导致微生物活性降低进而影响土壤磷的周转,从而导致有效磷含量降低^[33]。但本研究中施氮后 pH 变化不明显。Fan 等(2018)通过对亚热带米槠林的研究发现施氮会刺激生物的磷需求,微生物和植物根 系倾向于加速土壤有机磷的矿化来维持土壤有效磷的供应^[22]。因此,在富含微生物和植物根系的表层土壤 中,相比非生物因素,生物因素可能在土壤磷组分变化过程中发挥更重要的作用。在 10—20 cm 土层中,施氮 后各处理间的磷组分差异不明显,这可能是由于底层根系和微生物丰度较低,对土壤磷组分的影响低于表层 土壤。

3.2 氮沉降对土壤解磷微生物的影响

解磷微生物相对丰度对外界环境变化较为敏感,可指示土壤养分状况及其变化。本研究发现米槠天然林 土壤解磷细菌主要包括慢生根瘤菌、伯克霍尔德菌、中慢生根瘤菌、链酶菌、芽孢杆菌和类芽孢杆菌。施氮降 低了根瘤菌和伯克霍尔德菌等解磷细菌的相对丰度(图1),与施氮后碱性土壤解磷细菌丰度降低的研究结果





一致^[34]。此外,根瘤菌和伯克霍尔德菌属除了具有解磷功能,还会与植物根系结合形成根瘤,促进土壤固氮 并改善植物的氮吸收的能力^[35]。因此,本研究中施氮后根瘤菌和伯克霍尔德菌丰度的降低可能与土壤氮有 效性的提高导致植物减少了固氮功能微生物的养分投资有关^[36]。另一方面,微生物固氮本身也是一个耗磷 的过程,而氮沉降可能会加重土壤微生物的磷限制^[22],可能是根瘤菌等固氮微生物相对丰度降低的另一个原 因。如有研究发现,施氮后参与土壤磷转化的主要微生物类群由兼具固氮功能的解磷细菌转变为非固氮功能 的细菌为主^[37]。

相比解磷细菌,解磷真菌的种类较少,但其对氮沉降的响应更敏感。本研究发现施氮后米槠天然林土壤 青霉菌、曲霉菌和镰刀菌的相对丰度增加,这可能与施氮导致植物磷需求的增加有关。植物磷需求的增加可 能会改变土壤微生物群落,增加解磷能力更强的真菌的相对丰度来提高土壤磷有效性^[38]。目前,已有研究发 现曲霉素菌丝体的增加有助于促进不溶性磷酸盐的溶解和迁移。如 Wang 等发现接种青霉菌的作物具有更 强的磷吸收能力,其产量显著高于不接种的作物。通过对比研究发现,青霉菌的解磷能力甚至高于芽孢杆 菌^[5],如在农田生态系统中,施氮肥后植物矿化有机磷的能力显著增加^[39]。此外,解磷微生物与环境因子的 相关分析表明,解磷真菌对土壤环境因子的响应可能更敏感,除了氮磷养分的限制外,由氮沉降带来的土壤酸 化进程也可能会影响功能微生物类群的相对丰度。

3.3 氮沉降对微生物解磷功能的影响

为了探究氮沉降背景下米槠天然林土壤中解磷微生物的功能及作用机制,本研究借助 PICURSt 功能预 测来分析编码磷酸酶基因及其相对丰度的变化。结果发现施氮显著增加了表层土壤中酸性磷酸酶、碱性磷酸 酶、植酸酶等磷酸单脂酶和磷酸二酯酶基因的相对丰度(图 2),表明施氮后土壤微生物编码磷酸酶的能力可 能会增加。这与已有研究结果相似,如 Heuck 等通过对温带森林的研究,发现长期氮添加提高了土壤磷酸酶 活性^[40],在干热河谷土壤中也发现了类似的结果^[41]。但在樟子松人工林土壤中,施氮显著降低了酸性磷酸 酶、碱性磷酸酶以及磷酸酶功能基因的丰度^[42],可能与土壤类型等多种因素有关。一般认为,酸性土壤中的 大部分无机磷被铁铝氧化物固定^[3],有机磷成为潜在磷源,在受到低磷胁迫时,微生物可能会增加磷酸酶的 合成促进有机磷矿化来提高土壤有效磷含量^[5]。此外,植物根系属性的变化也可能影响磷酸酶的分泌,前期 研究发现施氮后细根生物量和比根长均显著增加^[3],有利于提高地下碳分配,为微生物提供更多的能量,提 高微生物合成磷酸酶的能力。此外,施氮对土壤磷酸酶的影响还取决于施氮方式和水平。如 Li 等在北温带 森林土壤的研究发现高氮水平下对酸性磷酸酶的分泌具有显著的促进作用,但抑制了碱性磷酸酶的分泌^[43]。

在亚热带高度风化的森林土壤中,土壤有机磷含量较高,占总磷的40%左右^[3],且易在磷酸酶作用下分 解后释放有效磷^[10]。本研究发现氮沉降后中等程度有机磷降低,但编码磷酸酶(酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、植 酸酶)功能基因的相对丰度显著增加,表明施氮后,土壤微生物可能通过分泌磷酸酶促进有机磷矿化来缓解 磷限制。此外,本研究中施氮降低了根瘤菌等解磷细菌的相对丰度,但却增加了青霉菌、曲霉菌等解磷真菌的 丰度(图1)。由于在土壤酸化等环境胁迫下,真菌具有更强的抵抗逆境和分泌磷酸酶能力^[38],解磷真菌相对 丰度的增加也可能是土壤磷酸酶基因丰度增加的重要原因之一。综上表明,在氮沉降背景下,植被可能会通 过改变土壤微生物群落,增加磷酸酶分泌潜力更强的微生物类群来应对和缓解低磷胁迫。

4 结论

施氮显著降低了土壤 Resin-P、NaHCO₃-P 和 TPo,加剧了土壤磷限制。并且改变了解磷微生物的组成,降 低了根瘤菌和伯克霍尔德菌等解磷细菌的相对丰度,却增加了青霉菌和曲霉菌等解磷真菌的相对丰度。此 外,氮沉降显著提高了编码酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和植酸酶基因的相对丰度。可见,氮沉降加重微生物磷限 制的背景下,增加土壤解磷真菌丰度,提高分泌磷酸酶的功能潜力,促进有机磷分解可能是微生物缓解磷限制 的重要途径。

参考文献(References):

- [1] Du E Z, Terrer C, Pellegrini A F A, Ahlström A, van Lissa C J, Zhao X, Xia N, Wu X H, Jackson R B. Global patterns of terrestrial nitrogen and phosphorus limitation. Nature Geoscience, 2020, 13(3): 221-226.
- [2] Penuelas J, Janssens IA, Ciais P, Obersteiner M, Sardans J. Anthropogenic global shifts in biospheric N and P concentrations and ratios and their impacts on biodiversity, ecosystem productivity, food security, and human health. Global Change Biology, 2020, 26(4): 1962-1985.
- [3] Fan Y X, Zhong X J, Lin F, Liu C, Yang L M, Wang M H, Chen G S, Chen Y, Yang Y S. Responses of soil phosphorus fractions after nitrogen addition in a subtropical forest ecosystem: insights from decreased Fe and Al oxides and increased plant roots. Geoderma, 2019, 337: 246-255.
- [4] 赵盼盼,周嘉聪,林开森,林伟盛,袁萍,曾晓敏,苏莹,徐建国,陈岳民,杨玉盛.不同海拔对福建戴云山黄山松林土壤微生物生物量 和土壤酶活性的影响.生态学报,2019,39(8):2676-2686.
- [5] Wang Y Y, Li P S, Zhang B X, Wang Y P, Meng J, Gao Y F, He X M, Hu X M. Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability. BioResources, 2020, 15(2): 2560-2578.
- [6] Dipta B, Bhardwaj S, Kaushal M, Kirti S, Sharma R. Obliteration of phosphorus deficiency in plants by microbial interceded approach. Symbiosis, 2019, 78(2): 163-176.
- [7] Rodriguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 1999, 17(4/5): 319-339.
- [8] Elias F, Woyessa D, Muleta D. Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in jimma zone, southwest Ethiopia. International Journal of Microbiology, 2016: 1-11.
- [9] Li T, Cui L Z, Liu L L, Wang H, Dong J F, Wang F, Song X F, Che R X, Li C J, Tang L, Xu Z H, Wang Y F, Du J Q, Hao Y B, Cui X Y. Characteristics of nitrogen deposition research within grassland ecosystems globally and its insight from grassland microbial community changes in China. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 947279.
- [10] Zhang T A, Chen H Y H, Ruan H H. Global negative effects of nitrogen deposition on soil microbes. The ISME Journal, 2018, 12(7): 1817-1825.
- [11] Berthrong S T, Yeager C M, Gallegos-Graves L, Steven B, Eichorst S A, Jackson R B, Kuske C R. Nitrogen fertilization has a stronger effect on soil nitrogen-fixing bacterial communities than elevated atmospheric CO₂. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(10): 3103-3112.
- [12] Wang C Y, Zhou J W, Liu J, Jiang K, Du D L. Responses of soil N-fixing bacteria communities to Amaranthus retroflexus invasion under different forms of N deposition. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2017, 247: 329-336.
- [13] Yan G Y, Xing Y J, Han S J, Zhang J H, Wang Q G, Mu C C. Long-time precipitation reduction and nitrogen deposition increase alter soil nitrogen dynamic by influencing soil bacterial communities and functional groups. Pedosphere, 2020, 30(3): 363-377.
- [14] Kim H, Kang H. The impacts of excessive nitrogen additions on enzyme activities and nutrient leaching in two contrasting forest soils. The Journal of Microbiology, 2011, 49(3): 369-375.
- [15] Lu J L, Jia P, Feng S W, Wang Y T, Zheng J, Ou S N, Wu Z H, Liao B, Shu W S, Liang J L, Li J T. Remarkable effects of microbial factors on soil phosphorus bioavailability: a country-scale study. Global Change Biology, 2022, 28(14): 4459-4471.

- [16] Wang C Q, Xue L, Jiao R Z. Stoichiometric imbalances and the dynamics of phosphatase activity and the abundance of *phoC* and *phoD* genes with the development of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook plantations. Applied Soil Ecology, 2022, 173: 104373.
- [17] Yadav R S, Tarafdar J C. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(6): 745-751.
- [18] Della Mónica I F, Godoy M S, Godeas A M, Scervino J M. Fungal extracellular phosphatases: their role in P cycling under different pH and P sources availability. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(1): 155-165.
- [19] 王丽君,程瑞梅,肖文发,沈雅飞,曾立雄,杨邵,孙鹏飞,陈天.三峡库区马尾松人工林土壤酶活性和微生物生物量对氮添加的季节性 响应. 生态学报, 2021, 41(24): 9857-9868.
- [20] Martínez-Toledo Á, González-Mille D J, Briones-Gallardo R, Carrizalez-Yañez L, Felipe Martínez-Montoya J, de Jesús Mejía-Saavedra J, Ilizaliturri-Hernández C A. Functioning of semi-arid soils under long-term mining activity with trace elements at high concentrations. Catena, 2023, 222: 106851.
- [21] Zhu F F, Yoh M, Gilliam F S, Lu X K, Mo J M. Nutrient limitation in three lowland tropical forests in Southern China receiving high nitrogen deposition: insights from fine root responses to nutrient additions. PLoS One, 2013, 8(12): e82661.
- [22] Fan Y X, Lin F, Yang L M, Zhong X J, Wang M H, Zhou J C, Chen Y, Yang Y S. Decreased soil organic P fraction associated with ectomycorrhizal fungal activity to meet increased P demand under N application in a subtropical forest ecosystem. Biology and Fertility of Soils, 2018, 54(1): 149-161.
- [23] You C M, Wu F Z, Yang W Q, Xu Z F, Tan B, Yue K, Ni X Y. Nutrient-limited conditions determine the responses of foliar nitrogen and phosphorus stoichiometry to nitrogen addition: a global meta-analysis. Environmental Pollution, 2018, 241: 740-749.
- [24] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, McDonald D, Knights D, Reyes J A, Clemente J C, Burkepile D E, Vega Thurber R L, Knight R, Beiko R G, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 814-821.
- [25] Jia Y L, Yu G R, Gao Y N, He N P, Wang Q F, Jiao C C, Zuo Y. Global inorganic nitrogen dry deposition inferred from ground- and space-based measurements. Scientific Reports, 2016, 6: 19810.
- [26] Hedley M J, Stewart J W B, Chauhan B S. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. Soil Science Society of America Journal, 1982, 46(5): 970-976.
- [27] Tiessen H, Moir J O. Characterization of available P by sequential extraction. In: Carter MR (ed) Soil sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers, Raton, 1993, 75-86.
- [28] Klotzbücher A, Kaiser K, Klotzbücher T, Wolff M, Mikutta R. Testing mechanisms underlying the Hedley sequential phosphorus extraction of soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2019, 182(4): 570-577.
- [29] Baldrian P, Kolařík M, Štursová M, Kopecký J, Valášková V, Větrovský T, Žifčáková L, Šnajdr J, Rídl J, Vlček Č, Voříšková J. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. The ISME Journal, 2012, 6(2): 248-258.
- [30] Nilsson H O, Mulchandani R, Tranberg K G, Stenram U, Wadstrom T. Helicobacter pylori detected in the liver of patients with primary cholangioand hepatocellular carcinoma by PCR and DNA sequencing. Gut, 2000, 47: A1-A2.
- [31] Chen S F, Zhou R C, Huang Y L, Zhang M, Yang G L, Zhong C R, Shi S H. Transcriptome sequencing of a highly salt tolerant mangrove species Sonneratia alba using Illumina platform. Marine Genomics, 2011, 4(2): 129-136.
- [32] 曾泉鑫,曾晓敏,林开森,张秋芳,程蕾,周嘉聪,林巧玉,陈岳民,徐建国.亚热带毛竹林土壤磷组分和微生物对施氮的响应.应用生态学报,2020,31(3):753-760.
- [33] Bowman W D, Cleveland C C, Halada L, Hreško J, Baron J S. Negative impact of nitrogen deposition on soil buffering capacity. Nature Geoscience, 2008, 1(11): 767-770.
- [34] Zheng B X, Hao X L, Ding K, Zhou G W, Chen Q L, Zhang J B, Zhu Y G. Long-term nitrogen fertilization decreased the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacteria in an alkaline soil. Scientific Reports, 2017, 7: 42284.
- [35] Zhong Y J, Tian J, Li X X, Liao H. Cooperative interactions between nitrogen fixation and phosphorus nutrition in legumes. The New Phytologist, 2023, 237(3): 734-745.
- [36] Wang Z J, Li X, Wang J H, Qi S S, Dai Z C, Du D L. Effect of nitrogen-fixing bacteria on resource investment of the root system in an invasive clonal plant under low nutritional environment. Flora, 2022, 297; 152166.
- [37] 徐鹏霞,韩丽丽,贺纪正,罗锋,张丽梅.非共生生物固氮微生物分子生态学研究进展.应用生态学报,2017,28(10):3440-3450.
- [38] Bowles T M, Jackson L E, Cavagnaro T R. Mycorrhizal fungi enhance plant nutrient acquisition and modulate nitrogen loss with variable water regimes. Global Change Biology, 2018, 24(1): e171-e182.
- [39] Ding X D, Zhang L, Zhang S R, Feng G. Phytate utilization of maize mediated by different nitrogen forms in a plant-arbuscular mycorrhizal fungusphosphate-solubilizing bacterium system. Journal of Plant Interactions, 2014, 9(1): 514-520.
- [40] Heuck C, Smolka G, Whalen E D, Frey S, Gundersen P, Moldan F, Fernandez I J, Spohn M. Effects of long-term nitrogen addition on phosphorus cycling in organic soil horizons of temperate forests. Biogeochemistry, 2018, 141(2): 167-181.
- [41] 樊博, 史亮涛, 潘志贤, 何光熊, 孙毅, 闫帮国. 干热河谷土壤酶活性对碳氮添加的响应. 生态学报, 2018, 38(23): 8604-8611.
- [42] Wu L H, Geng B M, Wang Y J, Zhou G W, Sun Q Y, Zhao Q. Effects of Nitrogen Addition on the Abundance of Bacterial Phosphatase Encoding Genes in the Soil of Pinus sylvestris var. mongolica Plantation. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(11): 202-209.
- [43] Li Y, Wang C M, Gao S J, Wang P, Qiu J C, Shang S S. Impacts of simulated nitrogen deposition on soil enzyme activity in a northern temperate forest ecosystem depend on the form and level of added nitrogen. European Journal of Soil Biology, 2021, 103: 103287.