



长期施磷对石灰性土壤中编码碱性磷酸酶基因的细菌群落的影响

郎明^{1,2}, 李佳颖^{1,2}, 苏卫华¹, 邹温馨¹, 刘于³, 陈新平^{1,2*}

1 西南大学资源环境学院, 重庆市土肥资源高效利用重点实验室, 重庆 400715

2 西南大学长江经济带农业绿色发展研究中心, 重庆 400715

3 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310058

郎明, 李佳颖, 苏卫华, 邹温馨, 刘于, 陈新平. 长期施磷对石灰性土壤中编码碱性磷酸酶基因的细菌群落的影响. 微生物学报, 2022, 62(1): 242–258.

Lang Ming, Li Jiaying, Su Weihua, Zou Wenxin, Liu Yu, Chen Xinping. Effects of long-term phosphorus application on *phoD* harboring bacterial community in calcareous soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 242–258.

摘要:【目的】通过研究集约化玉米体系中长期不同供磷水平对土壤中编码碱性磷酸酶基因的细菌群落多样性、结构、组成和网络特征的影响及其与土壤有机磷形态之间的关系, 为探究有机磷循环功能在微生物的群落特征及提高土壤中有机磷矿化和利用提供科学依据。【方法】本研究依托华北平原小麦玉米轮作体系石灰性土壤长期施磷的定位试验(始于 2008 年), 试验处理包括 6 个供磷水平: 0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 kg P/hm² (分别表示为: P0、P12.5、P25、P50、P100 和 P200), 采用核磁共振技术测定土壤中有机磷的分子形态, 采用高通量测序技术分析编码碱性磷酸酶的 *phoD* 基因(alkaline phosphatase-encoding gene)的细菌群落, 探究含 *phoD* 基因的细菌群落特征及其与土壤有机磷形态之间的关系。【结果】随着供磷水平的增加, 土壤中磷酸单酯的含量无显著变化, 磷酸二酯的含量显著增加; 含 *phoD* 基因的细菌群落 α -多样性整体呈先不变(P0–P50)后降低趋势(P50–P200), 含 *phoD* 基因细菌的群落结构发生显著变化。优势类群中属水平的假单胞菌属(*Pseudomonas*)和马赛菌属(*Massilia*)随供磷水平的增加显著降低, 而壳聚糖酶产生菌

基金项目: 国家自然科学基金(32002126); 国家重点研发计划(2018YFD0200700, 2017YFD0200206); 国家玉米产业体系(CARS-02-15); 中央高校基本科研业务费(XDJK2019C065)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32002126), by the National Key Research and Development Plan (2018YFD0200700, 2017YFD0200206), by the National Corn Industry System (CARS-02-15) and by the Basic Scientific Research Business Expenses of Central Universities (XDJK2019C065)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68251082; E-mail: chenxp2017@swu.edu.cn

Received: 29 March 2021; Revised: 26 May 2021; Published online: 22 September 2021

属(*Mitsuaria*)和 *Kribbella* 随供磷水平的增加显著升高。其中, *Mitsuaria* 与土壤中速效磷的浓度呈显著的正相关, 同时与磷酸酶活性呈显著的负相关; *Pseudomonas* 的相对丰度与土壤中总有机磷的浓度呈显著的负相关, 溶杆菌属(*Lysobacter*)的相对丰度与土壤中总有机磷的浓度呈显著的正相关。网络分析中正相关连接线的比例在低磷条件下最高, P50 处理次之, P100 处理最低。其中在 P0、P12.5、P25、P50 处理中, 特定的关键类群, 如慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、*Stackebrandtia*、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、*Lysobacter* 与有机磷(包括总有机磷、磷酸单酯和磷酸二酯)的浓度呈显著相关, 而 P100 和 P200 处理下的关键类群与有机磷形态无显著相关。【结论】供磷水平通过显著影响土壤中 pH、有机磷形态和数量等理化性质, 进而影响含 *phoD* 基因细菌群落的 α -多样性、群落结构、群落组成、网络特征及其关键类群的变化。

关键词: 核磁共振; 有机磷分子形态; α -多样性; 群落组成; 关键类群; *phoD* 基因

Effects of long-term phosphorus application on *phoD* harboring bacterial community in calcareous soil

LANG Ming^{1,2}, LI Jiaying^{1,2}, SU Weihua¹, ZOU Wenxin¹, LIU Yu³, CHEN Xinping^{1,2*}

¹ Chongqing Key Laboratory of Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

² Interdisciplinary Research Center for Agriculture Green Development in Yangtze River Basin, Southwest University, Chongqing 400715, China

³ College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] This study was aimed to investigate the effects of long-term phosphorus (P) supply on the diversity, structure, composition and network characteristics of bacterial community encoding alkaline phosphatase gene and their relationship with the forms of soil organic P, so as to provide scientific basis for exploring the community characteristics of organic P cycling functional microorganisms and improving the mineralization and utilization of soil organic P. **[Methods]** Based on the long-term P application experiment in calcareous soil of wheat-maize rotation system in North China Plain (started in 2008), the experiment included six P levels: 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 kg P/hm² (P0, P12.5, P25, P50, P100 and P200 respectively) and the molecular forms of organic P in soil were determined by nuclear magnetic resonance (NMR), high-throughput sequencing technology was used to analyze the bacterial community of *phoD* gene (encoding alkaline phosphatase), and explore the bacterial community characteristics of *phoD* gene and its relationship with the forms of organic P in soil. **[Results]** With the increase of P supply level, the concentration of phosphate monoester did not change significantly, but the concentration of phosphate diester increased significantly; the α -diversity of the *phoD* harboring bacterial community was first unchanged (P0 to P50) and then decreased (P50 to P200), and the community structure of *phoD* harboring bacteria changed significantly. The dominant taxa named *Pseudomonas* and *Masslis* at genus level decreased significantly, while *Mitsuaria* and *Kribbella* increased significantly with the increase of P supply level. *Mitsuaria* was positively correlated with the concentration of available P in soil, and negatively correlated with the activity of

phosphatase. There was a significant negative correlation between the relative abundance of *Pseudomonas* and the concentration of total organic P in soil, and a significant positive correlation between the relative abundance of *Lysobacter* and the concentration of total organic P in soil. In the network analysis, the proportion of positive edges was the highest in P0 treatment, followed by P50 treatment, and the lowest in P100 treatment. In the treatments of P0, P12.5, P25 and P50, specific keystone taxa such as *Bradyrhizobium*, *Stackbrandtia*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium* and *Lysobacter* were significantly correlated with the concentration of organic P (including total organic P, phosphate monoester and phosphate diester), however, the keystone taxa under P100 and P200 treatments has no significant correlation with the forms of organic P. **[Conclusion]** The levels of P supply significantly affected the physicochemical properties of soil, such as pH, the forms and quantities of organic P, and then affected the changes of α -diversity, community structure, community composition, network characteristics and keystone taxa of *phoD* harboring bacterial community.

Keywords: nuclear magnetic resonance; molecular speciation of organic P; α -diversity; community composition; keystone taxa; *phoD* gene

有机磷是土壤磷库的重要组成部分, 世界范围内农田耕层土壤中全磷含量平均为 1 762 kg/hm², 其中有机磷的含量为 747 kg/hm², 占土壤全磷含量的 42%, 且仍在升高^[1-2]。我国大部分土壤中有机磷占全磷含量的 20%–40%, 且呈现逐年增加的趋势^[3]。近年来, 核磁共振技术的发展已将土壤有机磷形态的检测精确到分子水平^[4-5]。以磷酸单酯的含量为例, 使用核磁共振的相关研究结果表明, 丹麦连续 52 年施用无机磷肥, 土壤中磷酸单酯含量无显著变化^[6]; 而连续 11 年施用无机磷肥的草原土壤以及连续 9 年施用无机磷肥的农田土壤中, 磷酸单酯的含量显著提高^[7-8]; 在北爱尔兰农田土壤的研究发现, 连续 10 年施用无机磷肥降低了土壤中磷酸单酯的含量^[5]; 从土壤有机磷中磷酸单酯含量的研究结果可见, 长期施用无机磷对土壤中有机磷分子形态的影响还不明确, 需要进一步探究。

微生物分泌的磷酸酶主要包括酸性磷酸酶^[9-10]、碱性磷酸酶和植酸酶等^[11-12], 是土壤中有机磷矿化的重要来源。其中, *phoD* 是细菌

中最关键的碱性磷酸酶基因, 在陆地生态系统中占主导地位^[13-14]。供磷水平是影响含 *phoD* 细菌群落组成的重要因素。研究发现, 在低磷条件下, 放线菌纲(*Actinobacteria*)和蓝细菌纲(*Cyanobacteria*)是介导水稻土壤中有机磷矿化最重要的类群, 而在磷素充足条件下, 甲基杆菌属(*Methylobacterium*)是促进土壤中有机磷矿化的主要类群^[15]。供磷水平和根系提供的碳源协同影响水稻根际含 *phoD* 基因细菌的群落组成, 其中, 念珠藻目(*Nostocales*)是低磷条件下的优势种群, 根瘤菌目(*Rhizobiales*)在适量供磷条件下是优势种群, 而红螺菌目(*Rhodospirillales*)是高磷条件下的优势种群, 这些优势种群主要利用植物提供的碳源生长^[16], 这表明土壤的供磷水平和植物共同影响 *phoD* 基因细菌的群落组成。在对有机种植、传统集约化种植和自然草原土壤中 *phoD* 基因的研究中都发现, 含 *phoD* 基因的微生物可促进碱性磷酸酶的分泌, 进而促进土壤中有机磷的矿化^[17]。进一步的研究发现, 微生物分泌的碱性磷酸酶主要矿化不稳定形态的有机磷^[18], 这表明, 含 *phoD* 基因细菌

的群落特征与有机磷形态和含量、磷酸酶之间的关系密切相关。因此, 在不同供磷水平下, 对含 *phoD* 基因细菌的群落特征(包括: α -多样性、群落结构、群落组成、网络特征、关键类群)、有机磷的形态特征、碱性磷酸酶活性以及三者之间的关系值得系统深入探究。

华北地区是集约化小麦-玉米轮作的主要区域, 其典型的石灰性土壤面积占全球土壤面积的 30%^[19], 研究土壤中含 *phoD* 基因细菌的群落结构、有机磷的分子形态, 碱性磷酸酶活性及其相互作用关系, 对于利用微生物手段提高有机磷的利用效率具有重要意义。本研究以华北平原石灰性潮土为研究对象, 基于 10 年的磷梯度定位试验, 探究长期施磷对石灰性土壤中含 *phoD* 基因细菌群落特征的影响及其与有机磷形态之间的关系, 为农田系统中长期施磷对有机磷循环功能微生物的群落特征及提高土壤中有有机磷矿化利用研究提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地概况及处理

该试验于华北平原河北曲周长期定点定位试验站(36°52' N, 115°02' E)进行。该地区年平均气温 13.2 °C, 年降水量 494 mm。土壤类型为石灰性土壤, pH 为 7.3, 水土比为 2 : 1, 有机质含量 10.3 g/kg, 土壤全氮含量为 0.67 g/kg, 速效磷含量 7.0 mg/kg (Olsen-P)^[20], 交换性钾含量为 74 mg/kg。该试验点于 2008 年建立, 为冬小麦-夏玉米轮作体系, 在每一轮轮作中, 小麦在 10 月份播种, 次年 6 月份收获, 之后立即种植玉米, 10 月份收获。

本试验采用随机区组试验, 共设置 6 个处理, 每个处理设置 3 个重复小区, 每个小区面积为 43.2 m² (5.4 m×8 m)。2008 年 10 月至

2009 年 7 月, 冬小麦施磷量分别为 0、12.5、25、50、75、100 kg P/hm², 夏玉米施磷量分别为 0、6.25、12.5、25、37.5、50 kg P/hm²。2009 年 7 月以后, 冬小麦改施磷 0、25、50、100、200、400 kg P/hm², 夏玉米改施磷 0、12.5、25、50、100、200 kg P/hm²。所有磷肥均为过磷酸钙。播种前分别施 75 kg/hm² 尿素和 50 kg/hm² 硫酸钾, 小麦在拔节期追施 150 kg/hm² 尿素, 玉米在 12 叶期追施等量尿素, 不同磷肥处理小区施用的氮肥量保持一致。供磷水平的划分以 2009 年 7 月以后, 夏玉米施磷量为基础。

1.2 土样采集及理化特性的测定

土壤样品采集于 2018 年播种后第 26 天(玉米 V6 期)。共 18 个土壤样品(6 个处理, 每个处理 3 个重复)。从每个小区中植株行间的 5 个不同位置采集 0–10 cm 土壤样品混合, 作为一个生物学重复, 土样过 2 mm 筛, 之后分成两部分。一部分保存在-20 °C 中用于 DNA 提取和随后的扩增序列测定, 另一部分风干用于土壤理化分析, 包括 pH、速效磷(Olsen P)、有机磷(Po)、土壤有机碳(SOC)和全氮(TN)。土壤 Olsen P 在 pH 8.5 时用 0.5 mol/L NaHCO₃ 提取, 然后用比色法测定^[20]。有机磷的测定采用灼烧法^[21]。³¹P-核磁共振(³¹P-nuclear magnetic resonance, ³¹P-NMR)的测定参照 Cade-Menun 等^[22] (2005) 的方法, 用 MestReC 软件(v4.9.9.9)对所有 ³¹P 谱进行基线校正和处理。碱性磷酸酶用 Tabatabai^[23] (1982)描述的方法测定。

1.3 土壤含 *phoD* 群落 DNA 抽提和 PCR 扩增

采用 FastDNA SPIN Kit 试剂盒提取土壤 DNA, 然后取 DNA 样本进行琼脂糖凝胶电泳, 检验 DNA 提取质量。使用 NanoDrop 核酸检测仪(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)

测定所提取 DNA 样品的浓度和质量,随后将样品保存在 -20°C 用于后续分析。引物使用 ALPs-F730 (5'-CAGTGGGACGACCACGAGGT-3') 和 ALPs-1101 (5'-GAGGCCGATCGGCATGTC G-3')^[13,24] 扩增 *phoD* 基因, 扩增片段大小为 371 bp。每个 PCR 反应的体系为 25 μL , 包含 12.5 μL 的 SYBR[®]PreMix *Ex Taq* (2 \times RNase Plus), 0.5 μL 的 ROX Reference Dye II (50 \times ; TaKaRa, BIO, INC, Japan), 正向引物和反向引物分别 0.5 μL , 加入 1 μL 的 DNA 模板和 10 μL 灭菌水。PCR 的扩增条件为: 95°C 30 s, 之后 40 个循环的反应条件为 95°C 5 s 和 60°C 34 s。

1.4 Illumina Miseq 测序

使用 1%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 采用 DNA 凝胶提取试剂盒(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 1%琼脂糖电泳检测。使用 Illumina Miseq 平台进行高通量测序, 原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控, 使用 FLASH 软件进行拼接。序列相似性 $>97\%$, 则归为一个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 利用 RDP Classifier (ribosomal database project) 为每个 OTU 代表序列分配分类注释。原始数据提交到国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center), 序列号为 NMDC10017744。

1.5 数据分析

采用单因素方差分析检验了不同供磷水平之间土壤理化性质、磷形态、微生物群落组成的相对丰度和 α -多样性数据差异的显著性, 在 5%水平上利用 Duncan 检验进行比较。所有统计分析均基于 SPSS 分析软件(version 20)和 R 软件(3.3.1 版)。 α -多样性的估计基于 OTU 丰度矩阵, 包括在 R 软件中的‘Vegan’计算 *phoD* 的

OTU 和香农指数。含 *phoD* 基因的群落结构基于 Bray-Curtis 在 OTU 水平上的主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)。利用 ‘Vegan’中的‘envfit’功能, 在细菌的 OTU 水平上进行冗余分析(redundancy analysis, RDA), 以研究含 *phoD* 基因的群落结构与土壤理化性质等之间的关系。采用 Pearson 相关分析, 分析含 *phoD* 基因的优势类群与磷形态、碱性磷酸酶的相关性。

将相对丰度前 10 的微生物类群作为优势类群, 用相对丰度 $>0.01\%$ 的 OTU 构建网络, 并通过 SparCC 相关矩阵计算相关系数; 对相关数据进行过滤, 将相关阈值为 0.6, $P<0.05$ 的数据进行网络构建^[25]。共现网络通过 Gephi 软件可视化, 进而获得网络拓扑性质, 包括节点数、连接数、网络密度、聚类系数、网络集中度和相邻节点平均个数等。其中网络中节点的大小以节点度数表示, 将排序前 5 的微生物类群作为关键类群^[26]。

采用 AMOS 软件(IBM SPSS AMOS 24.0.0)构建结构方程模型(SEM), 以说明供磷水平、环境因子、编码碱性磷酸酶细菌群落 α -多样性和群落组成之间的关系。以 PCoA 分析的第一主成分(PC1)作为编码碱性磷酸酶细菌群落组成的指标, 以 OTU 和 Shannon 指数表示细菌群落的 α -多样性。模型使用拟合优度指数(goodness-of-fit index, GFI; GFI 的数值介于 0–1 之间, 其数值愈接近 1, 表示模型的适配度愈佳), 近似误差均方根(root-mean-square error of approximation, RMSEA; RMSEA <0.05 表示拟合较好, 如果 RMSEA=0, 表示模型完全拟合), 拟合优度的卡方检验(χ^2 goodness-of-fit test, χ^2 常与自由度 df 一起使用, χ^2/df 愈接近 1, 表示模型拟合愈好)进行检验^[27–28]。

2 结果与分析

2.1 长期施磷对土壤理化性质及有机磷分子形态的影响

随着供磷水平的增加, pH 显著降低, Olsen P 显著增加; 有机磷、全氮浓度随供磷水平增加先升高后降低; SOC 的含量不同供磷水平之间无显著差异; 随着供磷水平的升高, 磷酸酶活性整体上显著降低(表 1)。

针对不同供磷水平土样分别获取了 ^{31}P -NMR 图谱(图 1A), 有机磷形态为磷酸单酯和磷酸二酯, 将焦磷酸盐等磷形态归为其他, 结果表明, 在不同供磷水平中磷酸单酯浓度始终高于磷酸二酯和其他磷分子形态, 且磷酸单酯浓度在不同供磷水平条件下无显著差异。磷酸二酯浓度随供磷水平增加显著升高, 与 P0 相比, 在 P200 处理中磷酸二酯浓度增加了 0.98 倍(图 1B)。碱性磷酸酶的活性与土壤中 Olsen P、总有机磷、磷酸单酯和磷酸二酯的含量均无显著相关性(表 2)。

2.2 长期施磷对含 *phoD* 基因细菌群落多样性和群落组成的影响

将高通量测序后经过质量控制得到的序列

以 97% 相似度与数据库比对注释。用 OTU 数量和香农指数表征含 *phoD* 细菌群落多样性, 结果表明, 在 P0–P100 供磷水平下 OTU 数量没有显著变化, P200 的 OTU 数量相比于其他 5 个供磷水平显著降低(图 2A); 在 P0–P25 处理中含 *phoD* 细菌群落的香农指数无显著变化, P50–P200 处理的香农指数相比于 P0–P25 处理显著降低(图 2B)。基于 Bray-Curtis 距离进行主坐标分析发现, 供磷水平显著影响含 *phoD* 细菌的群落结构, 其中 P0、P12.5、P25、P50 与 P100、P200 之间存在显著差异(图 2C)。

长期不同供磷水平显著影响优势类群属水平的相对丰度, 其中, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)和马赛菌属(*Massilia*)相对丰度随着供磷水平增加而降低, 壳聚糖酶产生菌属(*Mitsuaria*)和韩国生工菌属(*Kribbella*)相对丰度随着供磷水平升高而增加, 溶杆菌属(*Lysobacter*)在 P12.5 供磷水平中相对丰度最高, 在供磷水平达到 P25 后相对丰度随着供磷水平的增加无显著变化(图 3)。

在优势属与有机磷形态的 Pearson 相关性分析表明, *Mitsuaria* 和 *Massilia* 分别与 Olsen P 呈显著正相关和负相关; *Pseudomonas* 和 *Lysobacter* 分别与总有机磷浓度呈显著负相关

表 1 长期不同供磷水平土壤的理化性质

Table 1 The concentrations of soil properties under long-term gradient P fertilization rates

Treatments	pH	SOC/(g/kg)	TN/(g/kg)	Olsen P/(mg/kg)	Po/(mg/kg)	ALP activity/[nmol/(g·h)]
P0	8.07±0.05ab	10.35±0.50a	1.13±0.05c	4.2±0.8f	125.0±28.6bc	944.1±9.1a
P12.5	8.20±0.10a	9.91±0.45a	1.14±0.03c	12.0±1.0e	147.7±27.4ab	927.1±15.1ab
P25	8.07±0.15ab	10.09±0.27a	1.32±0.06a	20.0±0.8d	183.9±20.9a	890.1±3.1bc
P50	8.00±0.10bc	10.45±0.22a	1.26±0.07ab	34.9±3.4c	152.6±35.0ab	910.1±3.1ab
P100	8.00±0.10bc	10.60±0.08a	1.23±0.05bc	78.9±4.6b	113.6±23.2bc	860.1±9.1c
P200	7.87±0.05c	11.30±3.30a	1.19±0.05bc	106.2±1.6a	88.0±41.4c	894.1±20.1bc

Data in the table are means±standard deviations of three replicates. Different lower case letters in the same column indicate significant differences between samples ($P<0.05$).

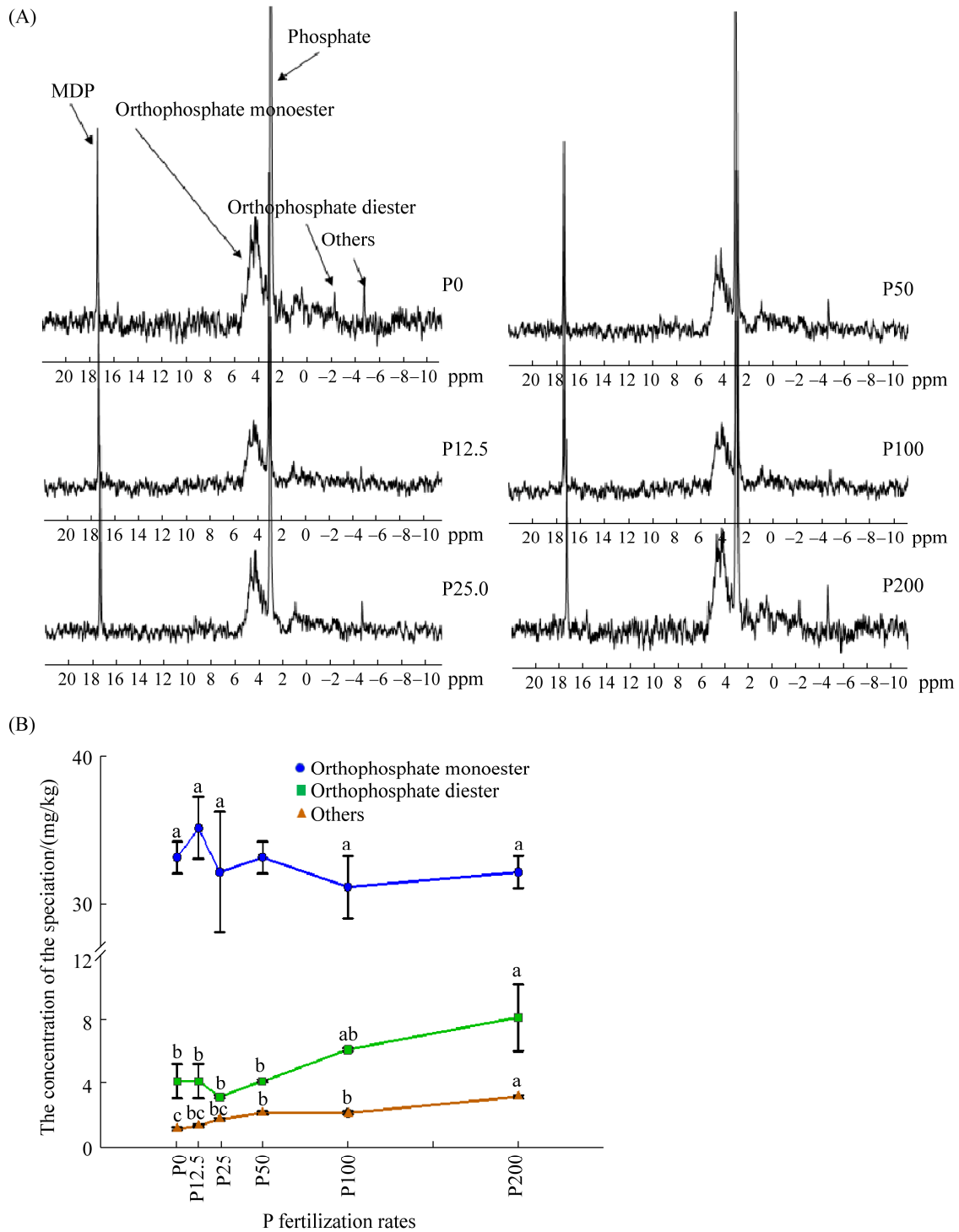


图 1 不同供磷水平 ^{31}P -NMR 液相核磁共振波谱(A)和不同供磷水平中磷酸单酯、磷酸二酯以及其他磷形态浓度(B)

Figure 1 Spectra (P-NMR) for each phosphorus fertilization rates (A) and the concentration of the P speciation under different phosphorus fertilization rates (B). P0, P12.5, P25, P50, P100 and P200 represent 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 kg P/hm², respectively.

表 2 碱性磷酸酶与磷形态的 Pearson 相关性分析

Table 2 Pearson correlation analysis of ALP and phosphorus speciation

Enzymes activity	Olsen P	Po	Orthophosphate_monoester	Orthophosphate_diester
ALP	-0.201	0.157	0.133	-0.077

ALP: alkaline phosphatase.

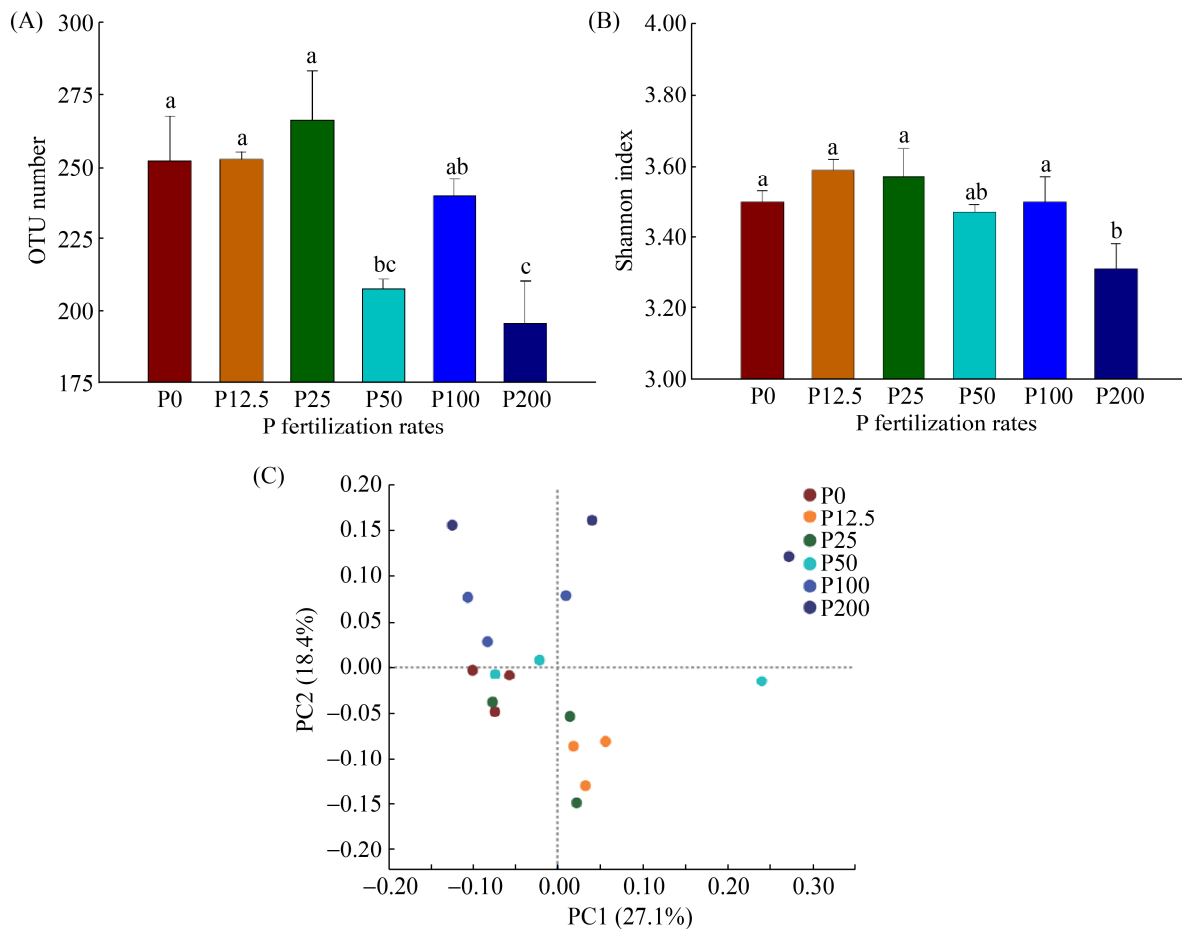
图 2 不同供磷水平下 OTU 数量(A)和香农指数(B)和不同供磷水平下含 *phoD* 细菌群落结构的主成分分析(C)

Figure 2 Bar chart of OTU number (A) and Shannon index (B) with different phosphorus fertilization rates and principal coordinate analysis (PCoA) plots of *phoD*-harboring bacteria community with different phosphorus fertilization rates (C). Different lower case letters denote significantly different on $P < 0.05$. P0, P12.5, P25, P50, P100 and P200 represent 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 kg P/hm², respectively.

和正相关; *Mitsuaria* 与碱性磷酸酶活性呈显著负相关; *Bradyrhizobium*, *Mitsuaria* 和剑菌属 (*Ensifer*)与有机碳呈显著正相关; *Lysobacter* 与 pH 呈显著正相关; 但优势属与磷酸单酯和磷

酸二酯无显著相关性(表 3)。RDA 分析结果表明, pH、土壤有机碳、Olsen P、有机磷、磷酸二酯是显著影响含 *phoD* 基因细菌群落的因素(图 4)。

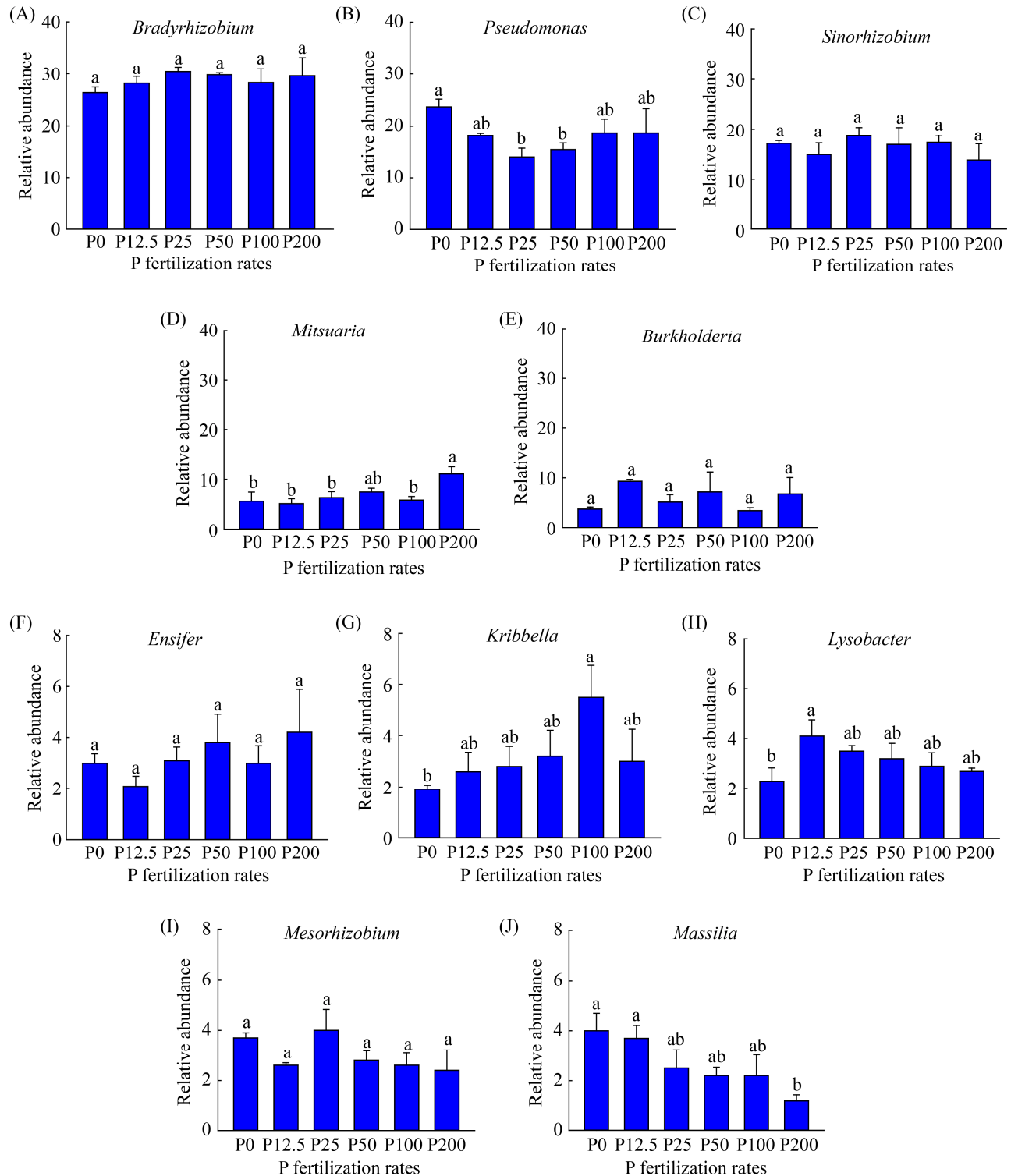


图3 含 *phoD* 基因细菌群落的优势菌(属水平)在不同供磷水平中的相对丰度

Figure 3 The relative abundance of *phoD*-harboring bacterial with different phosphorus fertilization rates. Different lower case letters denote significantly different on $P < 0.05$. P0, P12.5, P25, P50, P100 and P200 represent 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 kg P/hm², respectively.

表 3 含 *phoD* 基因优势类群与土壤理化性质的 Pearson 相关性分析Table 3 Pearson correlation analysis of *phoD*-harboring bacterial dominant taxa and soil properties

Dominant taxa	Olsen P	Po	Orthophosphate monoester	Orthophosphate diester	SOC	pH	ALP activity
<i>Bradyrhizobium</i>	0.154	0.330	0.128	-0.246	0.624**	-0.067	-0.209
<i>Pseudomonas</i>	-0.039	-0.580*	-0.031	0.261	-0.479*	0.003	0.076
<i>Sinorhizobium</i>	-0.200	-0.061	0.123	-0.076	-0.504*	0.028	0.167
<i>Mitsuaria</i>	0.575**	-0.143	-0.075	0.383	0.489*	-0.478*	-0.632**
<i>Burkholderia</i>	-0.079	0.447	0.077	-0.173	0.439	0.255	-0.092
<i>Ensifer</i>	0.274	0.111	-0.251	0.022	0.730**	-0.255	-0.352
<i>Kribbella</i>	0.367	-0.318	-0.334	0.355	-0.365	-0.307	0.403
<i>Lysobacter</i>	-0.225	0.487*	-0.013	-0.114	-0.150	0.503*	0.276
<i>Mesorhizobium</i>	-0.421	0.124	-0.388	-0.036	-0.410	-0.149	-0.036
<i>Massilia</i>	-0.652**	0.300	-0.075	-0.402	-0.178	0.256	0.254

*: a significant correlation $P < 0.05$; **: a significant correlation $P < 0.01$.

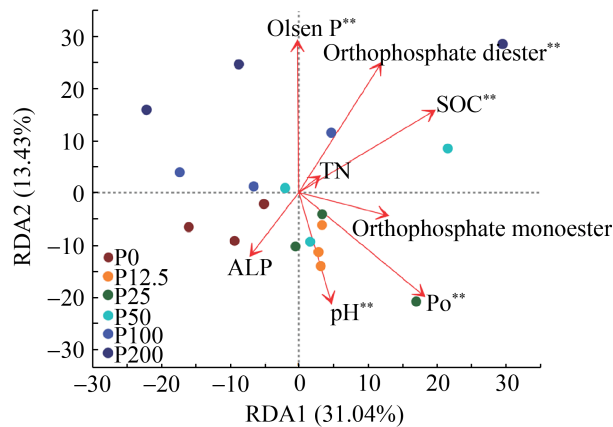


图 4 含 *phoD* 基因细菌群落与土壤因子冗余分析
Figure 4 Redundancy analysis of *phoD*-harboring bacterial community and soil factors. Po: organic phosphorus; TN: total nitrogen; SOC: soil organic carbon. Dotted circles with different color represent the distance between the microbial communities obtained from different P fertilization rates. P0, P12.5, P25, P50, P100 and P200 represent 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 kg P/hm², respectively. *: a significant correlation $P < 0.05$; **: a significant correlation $P < 0.01$.

2.3 不同供磷水平对含 *phoD* 基因细菌群落的网络特征和关键微生物类群的影响

供磷水平影响含 *phoD* 基因细菌群落之间的共现模式, 网络拓扑性质的分析表明, 网络节点随供磷水平的增加显著降低, 网络节点连

接度在 P0、P50 处理高于 P12.5、P25、P100 和 P200 处理; 其中, 正相关连接线的比例在 P0 处理最高(205, 63.1%), 其次是 P50 处理, P100 处理最低(图 5); 平均聚类系数在 P50 处理最高, 其次是 P100 处理, P200 处理最低(图 5)。不同供磷水平, 含 *phoD* 基因细菌群落的关键类群存在相似和不同, 其中 *Bradyrhizobium* 在不同供磷水平条件下的关键类群中均存在, 而 *Stackebrandtia*、*Actinosynnema*、*Gemmatirosa*、*Pseudomona*、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*) 和链霉菌属(*Streptomyces*)是 P0、P12.5、P25、P50、P100 和 P200 处理的特异性关键类群(图 6)。P0 处理的 *Bradyrhizobium* 与磷酸二酯呈显著正相关, 而 *Stackebrandtia* 与总有机磷呈显著负相关; P12.5 处理的 *Bradyrhizobium* 与磷酸单酯呈显著负相关; P25 处理的伯克氏菌属(*Burkholderia*)和 *Bradyrhizobium* 分别与磷酸二酯呈显著正相关和负相关; P50 处理的 *Lysobacter* 与总有机磷和磷酸单酯均呈显著正相关; P0 和 25 处理的关键类群 *Bradyrhizobium* 和 *Burkholderia* 的相对丰度与磷酸二酯呈显著正相关; 而 P100 和 P200 处理, 关键类群与有机磷形态无显著相关性(图 6)。

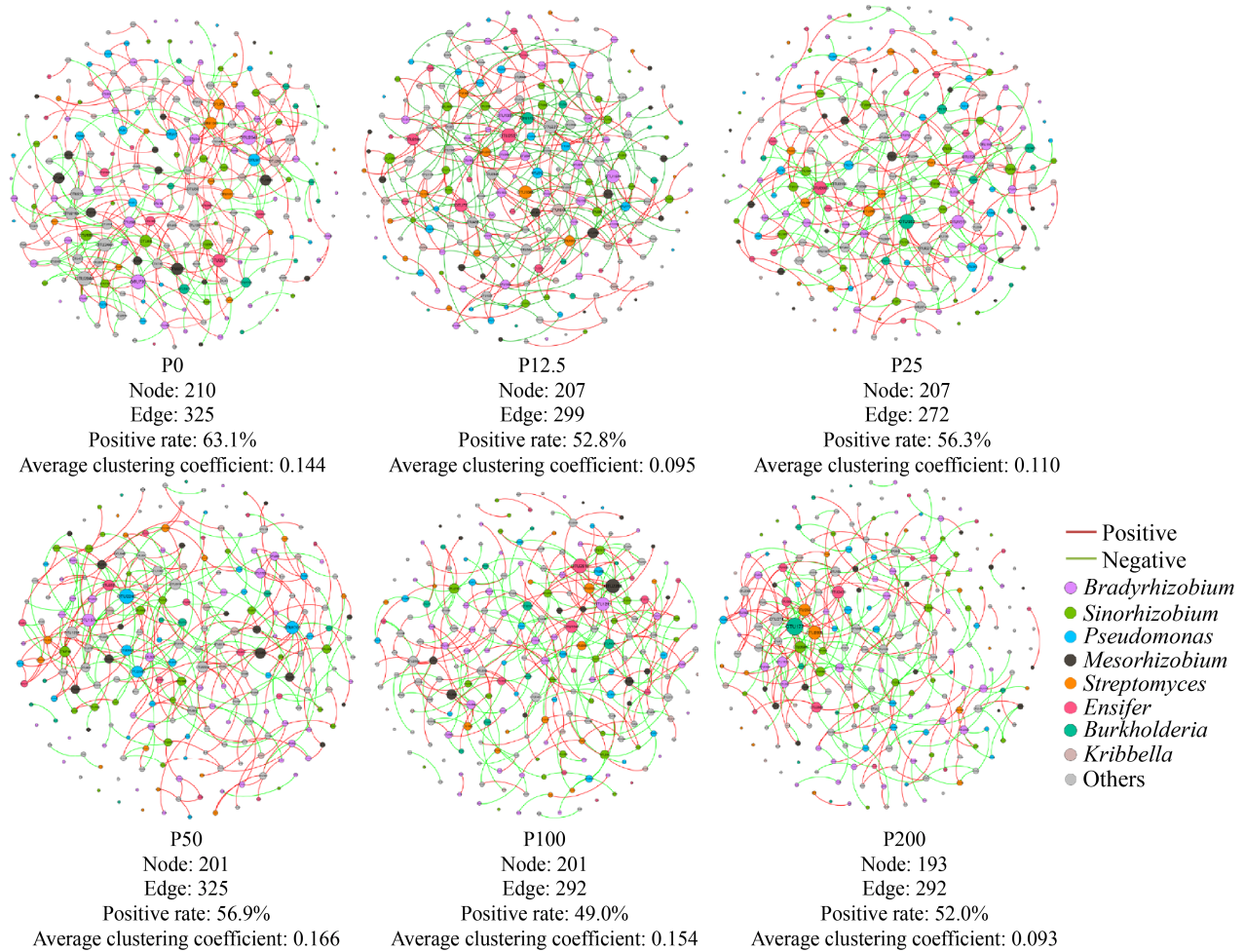


图 5 不同供磷梯度水平下细菌的网络结构

Figure 5 Network of bacteria depending on P fertilization based on RMT (random matrix theory) analysis from OTU profiles. The size of each node is proportional to the number of connections. The color of nodes represents the taxa on the genus classification. Red lines represent a positive correlation, and green lines indicate a negative correlation. P0, P12.5, P25, P50, P100 and P200 represent 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 kg P/hm², respectively.

2.4 长期施磷对土壤理化性质及有机磷形态与含 *phoD* 基因细菌群落关系的影响

结构方程模型阐明了长期不同供磷水平对土壤磷形态等理化性质与 *phoD* 群落多样性和群落组成的关系。最终模型拟合结果为 $\chi^2=10.046$, $df=10$, $GFI=0.867$, $IFI=0.999$, $RMSEA=0.016$, 说明模型适配良好。供磷水平显著影响土壤的 pH、磷酸二酯和土壤中总有机磷的浓度, 其中, pH 显著影响含 *phoD* 基因细

菌群落的 α -多样性, 磷酸二酯和土壤中总有机磷的浓度显著影响含 *phoD* 基因细菌的群落组成(图 7)。

3 讨论

3.1 长期施磷对有机磷分子形态的影响

本研究的结果发现, 随着供磷水平的增加, 石灰性土壤中总有机磷的浓度先增加后降低(表 1)。土壤有机磷主要来源于作物输入(根

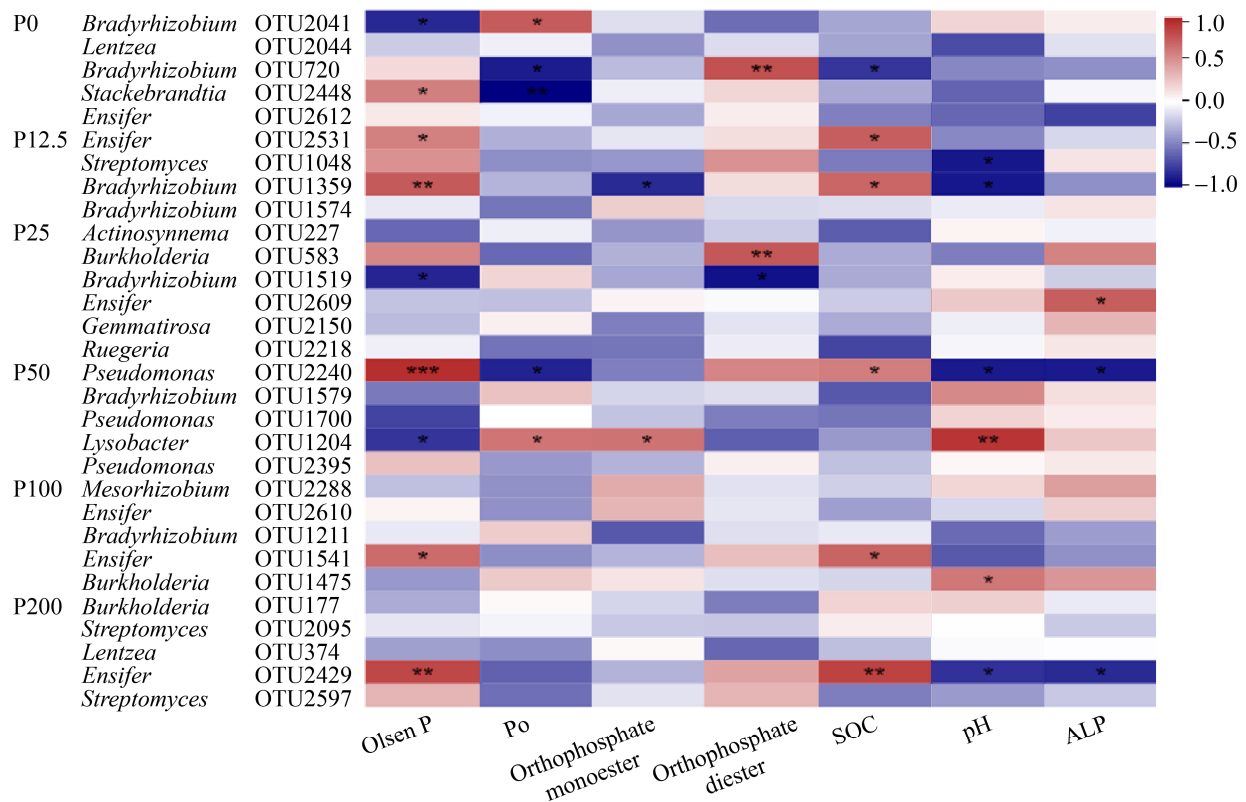


图 6 关键类群与土壤理化性质相关性热图

Figure 6 Heatmap of correlation coefficients between the soil properties and the keystone taxa (top 5 based on the degree at each taxonomic level). Po: organic phosphorus; Pi: inorganic phosphorus; Pt: total phosphorus; SOC: soil organic carbon. P0, P12.5, P25, P50, P100 and P200 represent 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 kg P/hm², respectively. *: a significant correlation $P < 0.05$; **: a significant correlation $P < 0.01$.

系残留)和微生物固定化^[29]。本研究土壤中连续 10 年的玉米-小麦轮作根系的残留, 之前在相同试验地的研究发现, 随着供磷水平的提高, 根系生物量先增加后降低^[30], 这可能是导致土壤中总有机磷的含量先增加后降低的原因之一。丹麦连续 52 年施用无机磷肥, 发现土壤中磷酸单酯含量无显著变化^[6], 与本研究的结果一致(图 1), 表明长期施用无机磷肥对土壤中有机磷含量的主要组成磷酸单酯的含量影响不大。之前的研究还发现, 较高 pH 和较低的有效磷浓度, 提高了土壤中有机磷的矿

化, 导致土壤中磷酸二酯的降解量增强^[31], 而本研究中随着供磷水平的提高, pH 的降低和有效磷浓度的增加, 可能导致磷酸二酯的浓度增加。

土壤中碱性磷酸酶的活性随着供磷水平的提高显著降低(表 1), 与之前的研究结果相似^[17], 但碱性磷酸酶的活性与土壤中 Olsen P、总有机磷、磷酸单酯和磷酸二酯的含量均无显著相关性(表 2), 可能与碱性磷酸酶活性的变异性大有关, Kuzyakov 等^[32]的研究发现, 碱性磷酸酶的分布存在时空异质性。

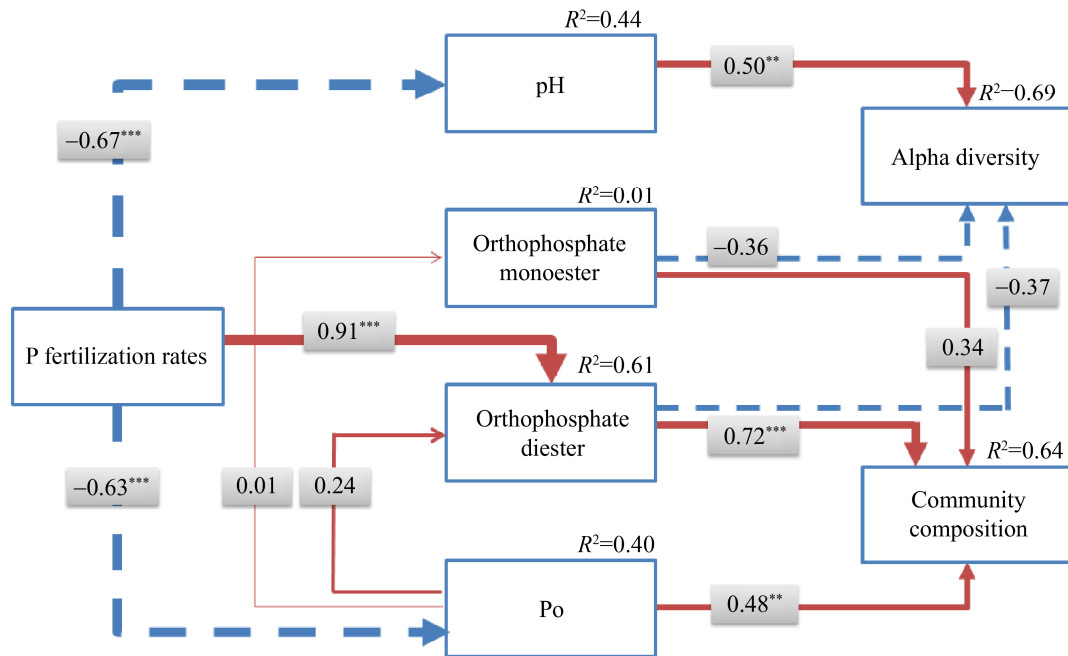


图 7 长期不同水平供磷条件下对土壤理化性质(包括酸碱性和有机磷、磷酸单酯、磷酸二酯)与含 *phoD* 基因细菌群落的 α -多样性、群落组成之间关系的结构方程模型

Figure 7 Structural equation model (SEM) of the influences for long-term phosphorus fertilization rates on the correlation ship among soil properties (including pH, Po, orthophosphate monoester, orthophosphate diester), alpha diversity and community composition. The width of the arrow indicates the strength of the causal effect. The red and blue arrows indicate the positive and negative relationships between the indicators. The number above the arrow indicates the path coefficient. “***” and “**” represent significant path. The percentage above each indicator represents the R^2 value, which is the variance explained ratio of each variable. The final model fits the data well. The model is: ($\chi^2=10.046$, $df=10$, $GFI=0.867$, $IFI=0.999$, $RMSEA=0.016$).

3.2 长期施磷对含 *phoD* 基因群落结构特征及其与土壤理化性状和有机磷分子形态的关系

本研究的结果表明,随供磷水平提高,含 *phoD* 基因细菌群落的 α -多样性显著降低(图 2B),这与 Chen 等^[33]的结果相似,但之前的研究还发现,随着供磷水平的提高,含 *phoD* 基因的细菌群落 α -多样性还会提高^[14,16]或无显著影响^[34],表明含 *phoD* 基因细菌的 α -多样性还受到其他因素的影响,如土壤类型、施肥种类、气候条件等。在群落组成方面,之前的研究发现,在低磷条件下, *Actinobacteria* 和 *Cyanobacteria*

是介导水稻土壤中有机磷矿化最重要的类群,而在磷素充足条件下 *Methylobacterium* 是促进土壤中有机磷矿化的主要类群^[15],表明不同供磷水平调控土壤中优势类群的变化,本研究中属水平的优势类群亦受供磷水平的影响发生了显著变化(图 3)。同时, *Pseudomonas* 的相对丰度与土壤中的总有机磷呈显著负相关, *Lysobacter* 的相对丰度与土壤中的总有机磷呈显著正相关,表明在低磷和高磷的环境下它们有可能是参与土壤中有机磷矿化的主要类群。

另外,微生物共现性网络分析已被证明在研究微生物物种之间的复杂关系方面有重要作

用^[35]。本研究的网络分析结果发现,网络分析中正相关连接线的比例在低磷条件下最高,其次是 P50 处理, P100 处理最低。Long 等^[16]在不同供磷水平的水稻根际土壤中的网络分析结果也发现, P0 处理正相关边数最高,其次为经 P50 和 P200 处理,与本研究的结果相似,整体上随着供磷水平的增加,微生物之间正的相互作用的比例降低。平均聚类系数反映了节点与其相邻节点的连接情况,平均聚类系数越高表明节点间连接越紧密^[36]。本研究中,平均聚类系数在 P50 处理最高,表明在适量供磷条件下,节点间的连接最紧密。进一步在网络结构中识别“关键类群(keystone taxa 或 core microbiome)”的成员和特征,这些微生物可能被用来组织其他不可控的微生物群落的动态^[37-38]。关键类群通过对其他分类群产生影响,进而影响群落组成。因此,移除它会导致微生物群落组成和功能的显著变化^[39]。Zheng 等^[40]发现与包含关键类群的网络特征相比,关键类群的去除导致网络复杂性明显降低,表明关键类群在微生物相互作用中起关键作用。本研究中供磷水平在 P0-P50 之间,存在与总有机磷含量相关的关键类群,而当供磷水平提高,关键类群与总有机磷含量无相关性(图 6)。Ren 等^[41]的研究发现微生物的功能决定了微生物的群落结构和组成,当养分缺乏时,微生物群落主要以满足养分需求为核心,而当养分不是限制因子时,微生物群落的功能以提高植物的抗性等功能为中心。表明在较低和适量供磷水平下,含 *phoD* 基因的细菌群落的关键类群主要参与有机磷的矿化,而高供磷水平条件下,速效磷养分充足,关键类群发挥的功能可能不是以有机磷的矿化为主,而是与提高抗性、胁迫等其他功能相关。综合表明,含 *phoD* 基因的细菌群落的优势类群和关键类群共同驱动土壤中有机磷的矿化,可能在

有机磷的矿化过程中发挥重要作用。

本研究的结果还发现,有机质是影响土壤中含 *phoD* 基因细菌群落的重要因子(图 4)。Hu 等^[42]研究发现,有机碳与含 *phoD* 基因细菌的群落结构有很强的相关性^[11,42]。Jiménez 等^[43]的研究也发现,以秸秆为碳源时,*Pseudomonas* 因其具植物半纤维素和木质素的降解能力而相对丰度也会显著升高,这一结果反映了碳的重要作用。

本研究与之前的研究均表明,环境因素,比如 pH 值、有效磷等因素显著影响土壤的微生物群落^[42,44-46]。其中, pH 是影响含 *phoD* 基因细菌群落多样性和结构的关键因素(图 4, 图 7),随着供磷水平的增加, pH 整体呈递减趋势,与本研究中施用的过磷酸钙是一种酸性肥料有关;同时,土壤中的解磷微生物在生长的过程中分泌大量的酸性物质如:质子、有机酸^[47]等也会影响土壤 pH 的改变,与本研究同步开展的定量结果表明,随着供磷水平的增加,含 *phoD* 基因的丰度在 P12.5 条件下丰度最低^[48],是导致其分泌的酸性物质较少的可能原因,也是影响土壤 pH 变化的主要因素,土壤中 pH 值的改变主要是施用磷肥和解磷微生物共同作用的结果。

4 结论

随着供磷水平的增加,含 *phoD* 基因细菌群落的 α -多样性整体呈先不变后降低趋势,含 *phoD* 基因细菌的群落结构发生显著变化。pH、有机磷形态、有机碳是决定含 *phoD* 基因细菌群落和多样性的主要环境因子。供磷水平显著影响含 *phoD* 基因细菌属水平中的优势类群,其中, *Pseudomonas* 和 *Masslis* 随供磷水平的增加显著降低,而 *Mitsuaria* 和 *Kribbella* 随供磷水平的增加显著升高。网络分析中正相关连接线的

比例在低磷条件下最高,其次是 P50 处理, P100 处理最低,表明微生物的相互作用随着供磷水平的增强有减弱的趋势。特定的关键类群如 *Bradyrhizobium*、*Stackebrandtia*、*Burkholderia*、*Lysobacter* 只在相对较低供磷水平条件下 (P0–P50) 与有机磷(包括总有机磷、磷酸单酯和磷酸二酯)存在相关性。供磷水平显著影响土壤中 pH、有机磷形态和数量等理化性质,进而影响含 *phoD* 基因细菌群落的 α -多样性、群落结构、群落组成、网络特征及其关键类群的变化。优势物种和关键类群的微生物在有机磷的矿化过程中都可能发挥着重要作用。

参考文献

- [1] Stutter MI, Shand CA, George TS, Blackwell MSA, Bol R, MacKay RL, Richardson AE, Condrón LM, Turner BL, Haygarth PM. Recovering phosphorus from soil: a root solution? *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(4): 1977–1978.
- [2] Menezes-Blackburn D, Giles C, Darch T, George TS, Blackwell M, Stutter M, Shand C, Lumsdon D, Cooper P, Wendler R, Brown L, Almeida DS, Wearing C, Zhang H, Haygarth PM. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review. *Plant and Soil*, 2018, 427(1/2): 5–16.
- [3] 沈善敏. 中国土壤肥力. 北京: 中国农业出版社, 1998.
Shen SM. Soil fertility in China. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1998. (in Chinese)
- [4] Cade-Menun B, Liu CW. Solution phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy of soils from 2005 to 2013: a review of sample preparation and experimental parameters. *Soil Science Society of America Journal*, 2014, 78(1): 19–37.
- [5] Cade-Menun BJ, Doody DG, Liu CW, Watson CJ. Long-term changes in grassland soil phosphorus with fertilizer application and withdrawal. *Journal of Environmental Quality*, 2017, 46(3): 537–545.
- [6] van der Bom FJT, McLaren TI, Doolette AL, Magid J, Frossard E, Oberson A, Jensen LS. Influence of long-term phosphorus fertilisation history on the availability and chemical nature of soil phosphorus. *Geoderma*, 2019, 355: 113909.
- [7] Gatiboni LC, Brunetto G, Rheinheimer DDS, Kaminski J, Pandolfo CM, Veiga M, Flores AFC, Lima MAS, Giroto E, Copetti ACC. Spectroscopic quantification of soil phosphorus forms by ^{31}P -NMR after nine years of organic or mineral fertilization. *Revista Brasileira De Ciência Do Solo*, 2013, 37(3): 640–648.
- [8] McLaren TI, Smernik RJ, Simpson RJ, McLaughlin MJ, McBeath TM, Guppy CN, Richardson AE. The chemical nature of organic phosphorus that accumulates in fertilized soils of a temperate pasture as determined by solution ^{31}P NMR spectroscopy. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2017, 180(1): 27–38.
- [9] Mullaney EJ, Ullah AHJ. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 312(1): 179–184.
- [10] Lim BL, Yeung P, Cheng CW, Hill JE. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME Journal*, 2007, 1(4): 321–330.
- [11] Ragot SA, Kertesz MA, Bünemann EK. *phoD* alkaline phosphatase gene diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(20): 7281–7289.
- [12] Fraser TD, Lynch DH, Gaiero J, Khosla K, Dunfield KE. Quantification of bacterial non-specific acid (*phoC*) and alkaline (*phoD*) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. *Applied Soil Ecology*, 2017, 111: 48–56.
- [13] Sakurai M, Wasaki J, Tomizawa Y, Shinano T, Osaki M. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2008, 54(1): 62–71.
- [14] Tan H, Barret M, Mooij MJ, Rice O, Morrissey JP, Dobson A, Griffiths B, O’Gara F. Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the *phoD* phosphorus mineraliser group in pasture soils. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(6): 661–672.
- [15] Wei XM, Hu YJ, Razavi BS, Zhou J, Shen JL, Nannipieri P, Wu JS, Ge TD. Rare taxa of alkaline phosphomonoesterase-harboring microorganisms mediate soil phosphorus mineralization. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 131: 62–70.
- [16] Long XE, Yao HY, Huang Y, Wei WX, Zhu YG. Phosphate levels influence the utilisation of rice rhizodeposition carbon and the phosphate-solubilising

- microbial community in a paddy soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 118: 103–114.
- [17] Fraser TD, Lynch DH, Bent E, Entz MH, Dunfield KE. Soil bacterial *phoD* gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 88: 137–147.
- [18] Luo GW, Ling N, Nannipieri P, Chen H, Raza W, Wang M, Guo SW, Shen QR. Long-term fertilisation regimes affect the composition of the alkaline phosphomonoesterase encoding microbial community of a vertisol and its derivative soil fractions. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53(4): 375–388.
- [19] Di Gregorio. Land cover classification system, classification concepts and user manual. 3rd ed. FAO: Rome, Italy, 2016.
- [20] Olsen SR, Sommers LE, Page AL. Phosphorus. In *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. Agronomy, No.9. ASA, SSSA, Madison, WI, 1982: 403–430.
- [21] Saunders WMH, Williams EG. Observations on the determination of total organic phosphorus in soils. *Journal of Soil Science*, 1955, 6(2): 254–267.
- [22] Cade-Menun BJ. Using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy to characterize organic phosphorus in environmental samples. *Organic phosphorus in the environment*. Wallingford: CABI, 2005: 21–44.
- [23] Tabatabai MA. Soil Enzymes. In: Miller R, Keeney D, *Methods of Soil Analysis*. American Society for Agronomy. Madison, 1982.
- [24] Lagos LM, Acuña JJ, Maruyama F, Ogram A, de la Luz Mora M, Jorquera MA. Effect of phosphorus addition on total and alkaline phosphomonoesterase-harboring bacterial populations in ryegrass rhizosphere microsites. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52(7): 1007–1019.
- [25] Friedman J, Alm EJ. Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Computational Biology*, 2012, 8(9): e1002687.
- [26] Banerjee S, Bora S, Thrall PH, Richardson AE. Soil C and N as causal factors of spatial variation in extracellular enzyme activity across grassland-woodland ecotones. *Applied Soil Ecology*, 2016, 105: 1–8.
- [27] Hooper D, Coughlan J, Mullen MR. Structural equation modelling: guidelines for determining model fit. *Electronic Journal of Business Research Methods*, 2008, 6: 141–146.
- [28] Grace JB. *Structural equation modeling and natural systems*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- [29] Condon LM, Turner BL, Cade-Menun BJ. *Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus*. Agronomy Monographs. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 2015: 87–121.
- [30] Deng Y, Feng G, Chen XP, Zou CQ. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization is considerable at optimal Olsen-P levels for maximized yields in an intensive wheat-maize cropping system. *Field Crops Research*, 2017, 209: 1–9.
- [31] Nash DM, Haygarth PM, Turner BL, Condon LM, McDowell RW, Richardson AE, Watkins M, Heaven MW. Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: a perspective. *Geoderma*, 2014, 221/222: 11–19.
- [32] Kuzyakov Y, Razavi BS. Rhizosphere size and shape: temporal dynamics and spatial stationarity. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 135: 343–360.
- [33] Chen XD, Jiang N, Chen ZH, Tian JH, Sun N, Xu MG, Chen LJ. Response of soil *phoD* phosphatase gene to long-term combined applications of chemical fertilizers and organic materials. *Applied Soil Ecology*, 2017, 119: 197–204.
- [34] Liu J, Han CQ, Zhao YH, Yang JJ, Cade-Menun BJ, Hu YF, Li JM, Liu H, Sui P, Chen YQ, Ma YB. The chemical nature of soil phosphorus in response to long-term fertilization practices: implications for sustainable phosphorus management. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 272: 123093.
- [35] Faust K, Raes J. Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(8): 538–550.
- [36] Zhou H, Gao Y, Jia XH, Wang MM, Ding JJ, Cheng L, Bao F, Wu B. Network analysis reveals the strengthening of microbial interaction in biological soil crust development in the Mu Us Sandy Land, northwestern China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 144: 107782.
- [37] Banerjee S, Schlaeppi K, van der Heijden MGA. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(9): 567–576.
- [38] Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, Fukuda S, Ushio M, Nakaoka S, Onoda Y,

- Yoshida K, Schlaeppi K, Bai Y, Sugiura R, Ichihashi Y, Minamisawa K, Kiers ET. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants*, 2018, 4(5): 247–257.
- [39] Berry D, Widder S. Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 219.
- [40] Zheng HP, Yang TJ, Bao YZ, He PP, Yang KM, Mei XL, Wei Z, Xu YC, Shen QR, Banerjee S. Network analysis and subsequent culturing reveal keystone taxa involved in microbial litter decomposition dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 157: 108230.
- [41] Ren Y, Xun W, Yan H, Ma A, Zhang R. Functional compensation dominates plant rhizosphere microbiota assembly. *Soil Biology and Biochemistry*. 2020, 150: 107968.
- [42] Hu YJ, Veresoglou SD, Tedersoo L, Xu TL, Ge TD, Liu L, Chen YL, Hao ZP, Su YR, Rillig MC, Chen BD. Contrasting latitudinal diversity and co-occurrence patterns of soil fungi and plants in forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 131: 100–110.
- [43] Jiménez DJ, Korenblum E, Elsas JD. Novel multispecies microbial consortia involved in lignocellulose and 5-hydroxymethylfurfural bioconversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(6): 2789–2803.
- [44] Chen XD, Jiang N, Condrón LM, Dunfield KE, Chen ZH, Wang JK, Chen LJ. Impact of long-term phosphorus fertilizer inputs on bacterial *phoD* gene community in a maize field, Northeast China. *Science of the Total Environment*, 2019, 669: 1011–1018.
- [45] Zhao J, Ni T, Li Y, Xiong W, Ran W, Shen B, Shen QR, Zhang RF. Responses of bacterial communities in arable soils in a rice-wheat cropping system to different fertilizer regimes and sampling times. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e85301.
- [46] Zhou J, Guan DW, Zhou BK, Zhao BS, Ma MC, Qin J, Jiang X, Chen SF, Cao FM, Shen DL, Li J. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 90: 42–51.
- [47] Zhu J, Li M, Whelan M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: a review. *Science of the Total Environment*, 2018, 612: 522–537.
- [48] Lang M, Zou WX, Chen XX, Zou CQ, Zhang W, Deng Y, Zhu F, Yu P, Chen XP. Soil microbial composition and *phoD* gene abundance are sensitive to phosphorus level in a long-term wheat-maize crop system. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 605955.

(本文责编 李磊)