

DOI: 10.11766/trxb201805080149

长期三水平磷肥施用梯度对砂姜黑土细菌群落结构和酶活性的影响*

马 垒^{1,3} 郭志彬² 王道中² 赵炳梓^{1†}

(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 安徽省农业科学院土壤肥料研究所, 合肥 230031)

(3 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要 磷素缺乏是砂姜黑土区作物生产的重要限制因子, 然而不同磷肥施用量如何影响微生物群落结构尚不清楚。以安徽蒙城氮磷钾肥肥效长期定位试验为平台, 选取 P0 (不施磷肥)、P1 (P_2O_5 45 $kg \cdot hm^{-2}$) 和 P2 (P_2O_5 90 $kg \cdot hm^{-2}$) 三个磷肥施用梯度, 明确土壤理化性质、土壤酶活性及细菌群落结构之间关系。研究表明长期施用磷肥显著提升土壤肥力: 与 P0 相比, P2 处理土壤有机碳、可溶性有机碳、全磷、有效磷和铵态氮分别增长 10.33%、31.36%、40.00%、384.19% 和 79.49%。变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 是砂姜黑土中的优势菌, 相对丰度分别为 40.16%、19.75% 和 14.91%。长期施用磷肥可显著提高细菌多样性, 改变细菌群落结构: P1 和 P2 处理中的香农指数分别较 P0 处理提高 2.49% 和 4.52%; 具有溶磷作用的 3 个门 (放线菌门、浮霉菌门 (Planctomycetes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes)) 和 3 个属 (*Terracoccus*、*Flavisolibacter* 和 *Arthrobacter*) 相对丰度随磷肥施入而显著升高, 而一些寡营养型细菌 (绿弯菌门 (Chloroflexi) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia))、具有反硝化作用 (*Kaistobacter* 和 *Rhodanobacter*) 和固氮作用 (*Bradyrhizobium* 和 *Burkholderia*) 的细菌相对丰度则在 P2 处理中显著降低。主坐标和多元回归树分析表明可溶性有机碳和全磷是导致不同磷肥处理中细菌群落结构差异的主要因素。 β -葡糖苷酶、蛋白酶和脱氢酶等活性均随磷肥施入量增加而显著升高, 酸性磷酸酶活性则没有显著变化。上述四种酶活性均与拟杆菌门、*Flavisolibacter* 属等在施磷处理中富集的微生物成显著正相关。以上结果表明长期施用磷肥导致的土壤理化性质变化驱动土壤细菌群落变化, 从而提高与碳氮循环转化相关微生物活性, 其中可溶性有机碳和全磷是导致细菌群落结构改变的关键理化因子。

关键词 砂姜黑土; 磷肥; 高通量测序; 微生物群落; 酶活性

中图分类号 S154.36 **文献标识码** A

农田生态系统中, 磷素是作物生长发育中仅次于氮素的第二重要养分。砂姜黑土占淮北平原耕地面积的 2/3, 土壤中磷含量及有效性不足, 严重制约着砂姜黑土区农作物生产, 是典型的中低产田^[1]。施用磷肥是提高作物产量和提升土壤肥力的重要农

业措施, 前人对砂姜黑土长期定位试验进行了大量研究, 结果发现长期施用磷肥可明显提高作物产量、养分含量和土壤酶活性^[2-5]。但是农民基于经济因素, 磷肥的施用并非全部足量, 存在不同磷肥施用梯度^[6]。然而在砂姜黑土区关于不同磷肥施用梯度

* 国家重点研发计划项目(2016YFD0300802)和现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-03)共同资助 Supported by the National Key Research and Development Program (No. 2016YFD0300802) and the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (No. CARS-03)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bzhao@issas.ac.cn

作者简介: 马垒 (1988—), 男, 山东济南人, 博士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: malei2601@163.com

收稿日期: 2018-05-08; 收到修改稿日期: 2018-07-27; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2018-08-15

对土壤养分和作物产量尚未展开系统研究。

土壤微生物是农田生态系统的重要组成部分,在维持生态系统结构和功能稳定性中发挥重要作用,其在土壤养分循环、有机质降解、团聚体形成等生物化学过程中均扮演着重要角色^[7]。然而关于施用磷肥对微生物群落影响的研究并没有一致的结论。一些研究表明施用磷肥可提高土壤有效磷含量从而改变土壤微生物群落结构和组成并会促进某些特定微生物的生长^[8]。比如 Tan 等^[9]经过 42 年不同磷肥施用梯度(不施磷肥、 P_2O_5 15 $kg\cdot hm^{-2}$ 和 P_2O_5 30 $kg\cdot hm^{-2}$)处理后,发现随着磷肥施用量的增加,土壤细菌多样性以及土壤中溶磷细菌的相对丰度也随之增加,但酸杆菌门(Acidobacteria)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等细菌相对丰度则随之降低。研究者认为磷肥施入土壤后可通过增加养分有效性、改变土壤 pH 和渗透势等多种途径影响土壤微生物^[10];然而还有一些研究发现长期施用磷肥对土壤微生物群落的影响很小。比如 Shi 等^[11]发现经过 17 年不同磷肥施用梯度(不施磷肥、 P_2O_5 17.5 $kg\cdot hm^{-2}$ 和 P_2O_5 35 $kg\cdot hm^{-2}$)后,土壤细菌群落结构并未发生显著改变。这些研究者认为虽然土壤中有效磷含量较低,但 C 和 N 仍为土壤微生物主要生长限制因素^[12]。因此关于施用磷肥对土壤微生物群落影响机制仍存在着广泛的不确定性^[13]。

本研究以典型砂姜黑土区—安徽蒙城氮磷钾肥肥效长期定位试验为平台,选取 P0(不施磷肥)、P1(P_2O_5 45 $kg\cdot hm^{-2}$)和 P2(P_2O_5 90 $kg\cdot hm^{-2}$)3 个磷肥施用梯度,采用现代高通量测序技术,测定经过 21 年连续不同磷肥施用梯度后,土壤细菌多样性及群落组成变化,以探索土壤细菌群落组成与土壤肥力指标及土壤酶活性的关系,为砂姜黑土区科学施用磷肥提供理论依据和科学支持。

1 材料与方法

1.1 长期试验概况

田间长期肥料定位试验始于 1994 年,位于农业部蒙城砂姜黑土生态环境站内(33°13'N, 116°35'E)。该地属暖温带半湿润季风气候,年均气温 14.8 °C,年均降水量 872.4 mm。试验共设置 9 个处理,本研究选取其中 3 个处理,即:(1) P0(不

施磷肥);(2) P1(P_2O_5 45 $kg\cdot hm^{-2}$);(3) P2(P_2O_5 90 $kg\cdot hm^{-2}$)。除磷肥施用差异外,所有处理氮肥和钾肥施用量一致,其中 N 187.5 $kg\cdot hm^{-2}$, K_2O 135 $kg\cdot hm^{-2}$ 。氮肥为尿素,磷肥为普钙,钾肥为氯化钾。小区面积 19 m^2 ,3 次重复,完全随机区组设计。所有肥料均在小麦播种时一次基肥施入,后茬作物不施肥。试验样地 1994—1998 年为小麦玉米轮作,1998—2015 年为小麦大豆轮作。

1.2 样品采集

试验样品于 2015 年 6 月小麦成熟期时采集,即截止样品采集时,各处理已经历总共 21 年不同施肥处理。按照 S 采样法,每个小区使用土钻(直径 5 cm)采集 9 份 0~15 cm 表层土样,混合成一个样品。所有样品置于冰袋中运回实验室。土样去除大的植物根系和石块后过 2 mm 筛。所有样品分为三部分,一部分风干后用于理化性质测定,一部分置于 4 °C 冰箱用于土壤酶活性的测定,另一部分置于 -80 °C 用于 DNA 提取。

1.3 土壤生化指标测定

土壤理化性质均采用土壤常规分析方法^[14]测定。土壤 pH 按土水比 1:5(质量体积比)充分混合后用 pH 计测定;土壤有机碳(SOC)采用重铬酸钾氧化外加热法测定;土壤全氮(TN)采用半微量开氏法测定;全磷(TP)和有效磷(AP)采用钼锑抗比色法测定;可溶性有机碳(DOC)采用土水比 1:5(质量体积比)充分振荡 30 min 后,上清液过 0.45 μm 滤膜,滤液用有机碳分析仪测定;土壤硝态氮(NO_3^- -N)和铵态氮(NH_4^+ -N)采用 2 $mol\cdot L^{-1}$ 的 KCl 提取,硝态氮采用双波段比色法,铵态氮采用靛酚蓝比色法测定。土壤酶活性^[15]采用鲜土测定: β -葡萄糖苷酶采用对硝基酚比色法;蛋白酶采用络氨酸比色法;酸性磷酸酶采用对硝基苯磷酸盐法;脱氢酶活性测定参考 Tabatabai^[16]方法测定。土壤生化指标结果均以烘干土(105 °C, 24 h)为基准表达。

1.4 土壤 DNA 提取及 16S rRNA 基因高通量测序

土壤 DNA 采用 Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)试剂盒提取。每个样品称取 0.50 g 鲜土,按照说明书操作提取 DNA。

选取细菌 16S rRNA 基因的 V4-V5 区进行高通量测序测定。PCR 扩增采用特异性引物 515F

(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')/907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')。每个样品前端引物均含有不同的 7 bp Barcode 用于区分不同样品。PCR 扩增条件包括 94 °C 5 min; 90 °C 60 s, 55 °C 60s, 72 °C 75 s, 30 个循环, 之后 72 °C 10 min。反应产物采用 QIA quick PCR Purification kit (Qiagen) 进行纯化。将不同样品的 PCR 扩增产物等摩尔混合后, 采用 Illumina 公司 MiSeq 测序仪完成序列分析 (委托上海派森诺生物科技股份有限公司测定)。

1.5 数据统计分析

高通量测序所得序列按照以下步骤进行分析:

(1) 双端序列采用 FLASH^[17]进行拼接; (2) 使用 Cutadapt^[18]切除引物; (3) 采用 QIIME (1.91)^[19]去除质量分数低于 20, 序列短于 300 bp 的低质量序列; (4) 采用 RDP^[20]数据库去除嵌合体; (5) 得到的高质量序列采用 Uparse^[21]软件, 以 97%相似度进行 OTU 划分, 采用 Blast 方法以 Greengenes13.8 数据库为比对进行注释。将未注释到门水平及注释为古菌的序列删除后, 所有样品随机抽取 10 000 条序列进行后续分析。细菌香农指数在 QIIME 中计算。基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA、CAP 和 Adonis 分析均使用 R 2.15.3 软件的 vegan 包进行。采用 mvpart 和 MVPARTwrap 包进行多元回归树 (MRT) 分析。使用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析, 相关性分析采用 Pearson 双尾检验; 平均值多重比较采用邓肯新复检验法 (Duncan's New Multiple Range

Test) 进行显著性检验 ($P < 0.05$)。采用 Microsoft Excel 2007 和 Origin 8.0 软件进行数据处理和绘图。

2 结 果

2.1 长期施用磷肥对砂姜黑土理化性质的影响

由表 1 可知经过 21 年不同磷肥施用梯度后土壤理化性质发生明显变化。土壤有机碳、铵态氮和有效磷含量在 P2 处理中显著升高 ($P < 0.05$), 分别较 P0 处理提高 10.33%、79.49%和 384.19%, 较 P1 处理提高 7.65%、65.68%和 98.42%。全磷、可溶性有机碳和碳氮比在不同处理间均按照 P0 < P1 < P2 的顺序升高, 其中 P2 和 P1 处理全磷含量较 P0 处理分别提高 40.00%和 12.90%, 可溶性有机碳含量分别提高 31.36%和 13.63%, 而碳氮比分别提高 12.74%和 8.54%。硝态氮、碳磷比和氮磷比在 P0 处理中均显著高于 P1 和 P2 处理, 而在 P1 和 P2 处理间没有显著差异。本试验条件下长期不同磷肥施用量对土壤 pH 和 TN 均没有显著影响 ($P > 0.05$)。

2.2 长期施用磷肥对砂姜黑土酶活性的影响

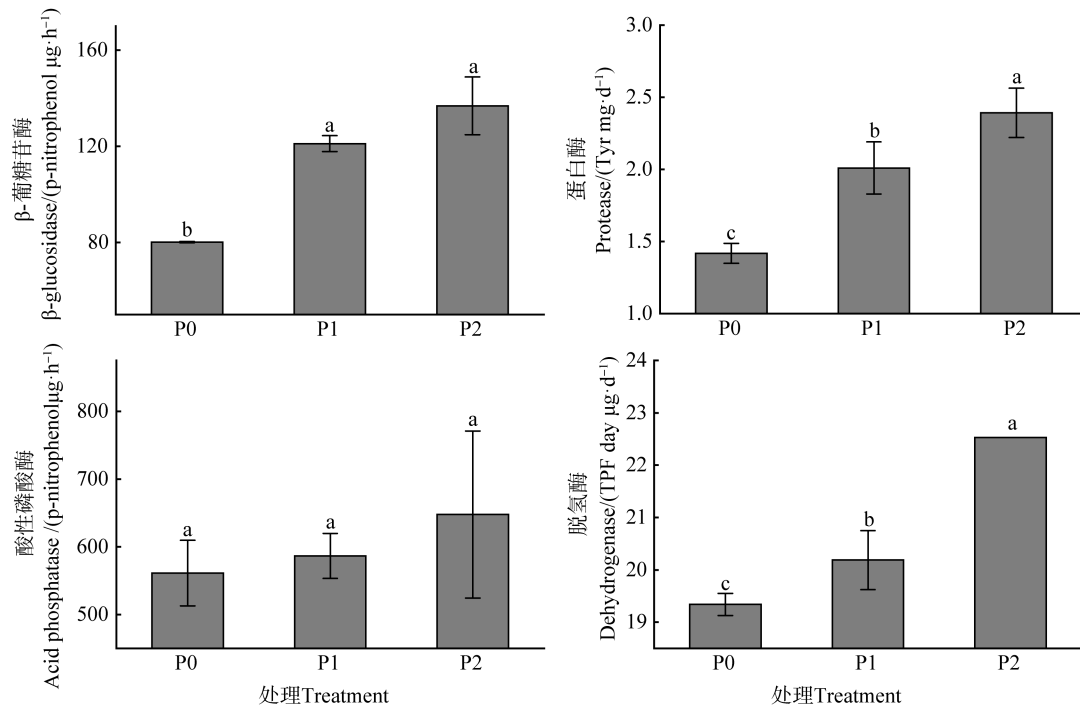
为了检验施用磷肥对土壤微生物功能的影响, 分别测量 β -葡糖苷酶、蛋白酶、酸性磷酸酶和脱氢酶等 4 种胞外酶活性 (图 1)。随着磷肥施用量增加, 所测 4 中酶活性均有增加的趋势, 但只有蛋白酶和脱氢酶活性在不同磷肥施用梯度间达到统计学上的差异显著水平, P2 和 P1 处理蛋白酶较 P0 分别升高

表 1 三种磷肥施用梯度下砂姜黑土理化性质的变化

Table 1 Physico-chemical properties of the lime concretion black soil relative to P application rate

处理 Treatment	pH	土壤有机碳 SOC/(g·kg ⁻¹)	全氮 TN/(g·kg ⁻¹)	全磷 TP/(g·kg ⁻¹)	可溶性有机碳 DOC/(mg·kg ⁻¹)	
P0	5.22±0.28a	8.42±0.31b	1.07±0.05a	0.25±0.01c	18.78±0.14c	
P1	5.43±0.06a	8.63±0.15b	1.01±0.03a	0.31±0.02b	21.71±1.63b	
P2	5.53±0.13a	9.29±0.23a	1.05±0.09a	0.35±0.01a	24.67±0.20a	
处理 Treatment	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N/(mg·kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N/(mg·kg ⁻¹)	有效磷 AP/(mg·kg ⁻¹)	碳氮比 C : N	碳磷比 C : P	氮磷比 N : P
P0	1.56±0.32b	43.08±5.07a	2.34±0.08b	7.85 ± 0.12b	34.05 ± 1.22a	4.34 ± 0.16a
P1	1.69±0.15b	10.44±1.02b	5.71±0.72b	8.52 ± 0.27ab	28.30 ± 2.12b	3.32 ± 0.21b
P2	2.80±0.01a	8.06±0.20b	11.33±2.92a	8.85 ± 0.50a	26.46 ± 0.54b	3.00 ± 0.23b

注: 平均值 ± 标准差 ($n=3$), 不同字母表示在处理间显著差异 (Duncan 法, $P < 0.05$)。下同 Note: Means ± standard deviation ($n=3$). Different letters indicate significant differences between fertilization treatments (Duncan method, $P < 0.05$). The same below



注:图中误差线为标准差 ($n=3$),不同字母表示在处理间显著差异 (Duncan 法 $P<0.05$)。下同 Note: The error bars represent standard deviation ($n=3$). Different letters indicate significant differences between fertilization treatments (Duncan method, $P<0.05$). The same below

图 1 三种磷肥施用梯度下砂姜黑土酶活性的变化

Fig. 1 Soil enzyme activities in the lime concretion black soil relative to P application rate

68.31% 和 41.55%，脱氢酶分别升高 16.48% 和 4.39%；β-葡萄糖苷酶在 P2 和 P1 处理间差异不显著，但分别较 P0 高 70.78% 和 51.22%；酸性磷酸酶在不同磷肥水平间均没有达到差异显著水平。

2.3 长期施用磷肥对砂姜黑土细菌多样性的影响

对 9 个样品 (3 个处理, 每个处理 3 个重复) 进行 MiSeq 高通量测序。经过质量控制, 总共得到 108 759 条高质量序列 (每个样品 10 187~15 169 条序列)。以 97% 相似度与数据库比对注释后, 共获得 655 个 OTU, 这些 OTU 归属于 228 个属、188 个科、120 个目、69 个科和 23 个门。以香农指数表征细菌群落多样性, 结果发现 (图 2A), 随着磷肥的施入, 细菌多样性显著升高; 相关性分析 (图 2B) 表明细菌多样性与 DOC 和 TP 均成显著正相关 ($r=0.89$, $P=0.001$; $r=0.93$, $P=0.001$), 因此施用磷肥后 DOC 和 TP 含量的增加可能是导致细菌多样性升高的主要原因。

2.4 土壤细菌群落组成及其与土壤性质之间关系

长期不同磷肥施用梯度可导致细菌群落组成和结构发生明显变化 (图 3)。与前人研究结果类似^[22], 变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门

(Actinobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 是砂姜黑土中的优势菌, 其相对丰度分别为 40.16%、19.75% 和 14.91% (图 3A)。其余相对丰度大于 1% 的门主要为绿弯菌门 (Chloroflexi, 7.20%)、浮霉菌门 (Planctomycetes, 6.65%)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes, 2.73%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia, 1.85%)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae, 1.75%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes, 1.68%) 和厚壁菌门 (Firmicutes, 1.27%)。对均一化后的 OTU 表, 基于 Bray-Curtis 距离进行主坐标分析发现: 主坐标分析的前两轴解释了大约 75% 的总方差, 其中第一轴和第二轴分别解释 55.24% 和 18.86% 的总方差, 各处理按照磷肥施用梯度 (P0<P1<P2) 沿第一轴分开, 施肥处理各重复聚集在一起, 而不同施肥处理间距较远。同样 Adonis 分析发现施肥处理对细菌群落结构具有显著影响 ($r^2=0.631$, $P=0.006$)。以上结果说明土壤细菌群落组成和结构在不同磷肥施用梯度下发生明显改变。

通过对各处理中相对丰度最高的前 10 个门 (图 4A) 和前 15 个属 (图 4B) 进行单因素方差分析, 发现不同磷肥施用梯度导致砂姜黑土中特定微生物

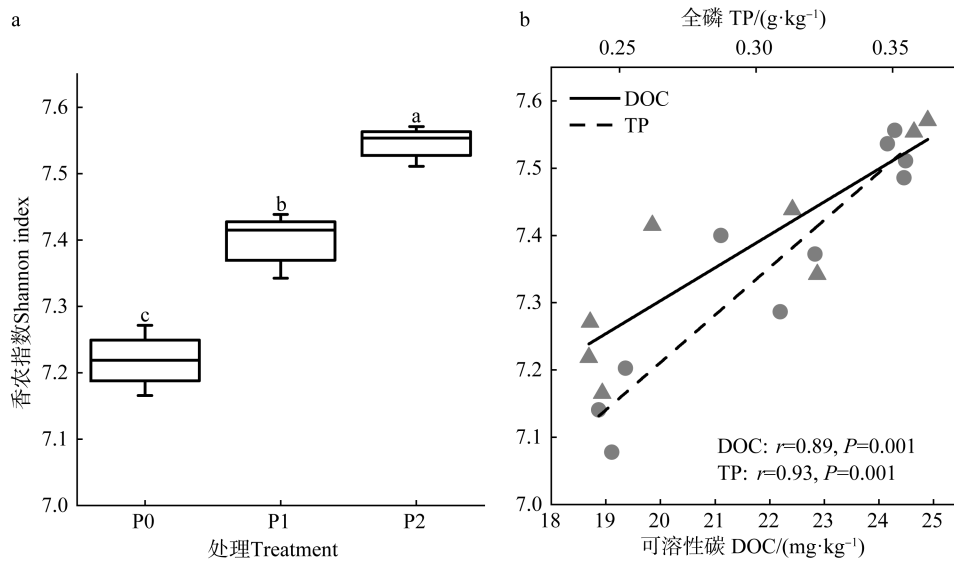
图 2 三种磷肥施用梯度下砂姜黑土细菌群落 α 多样性的变化

Fig. 2 Soil bacterial alpha-diversity of the lime concretion black soil relative to P application rate

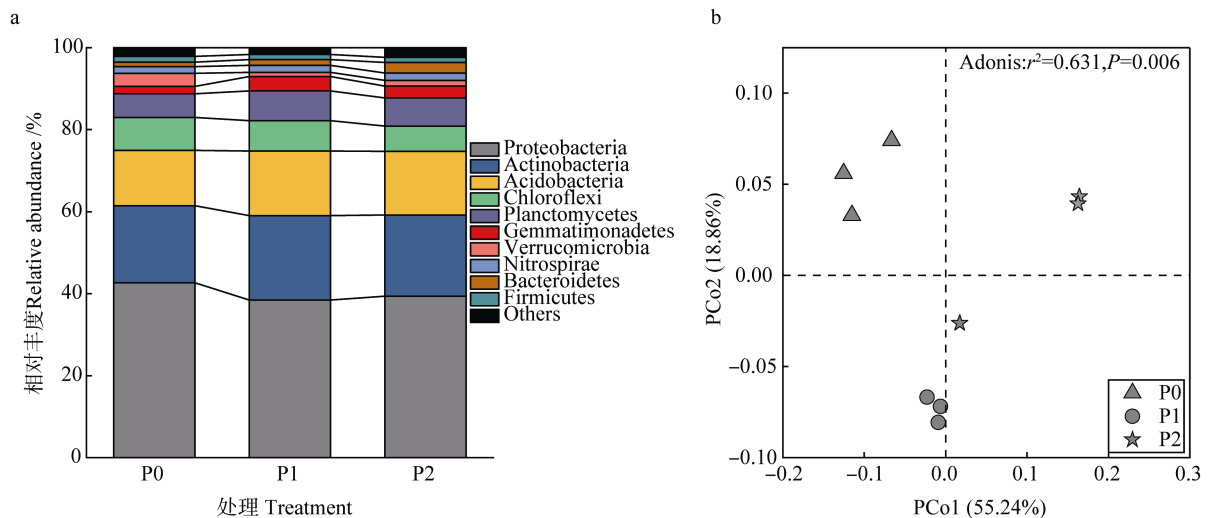


图 3 三种磷肥施用梯度下砂姜黑土细菌群落组成的变化

Fig. 3 Composition of the soil bacterial community in the lime concretion black soil relative to P application rate

相对丰度发生改变。与 P0 处理相比,共有 3 个门(变形菌门 (Proteobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia)) 和 3 个属 (*Kaistobacter*、*DA101* 和 *Rhodanobacter*) 细菌相对丰度在 P1 和 P2 处理中有不同程度降低;而 4 个门(放线菌门 (Actinobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes)) 和 3 个属 (*Terracoccus*、*Flavisolibacter* 和 *Arthrobacter*) 相对丰度在 P1 和 P2 处理中不同程度升高。与 P0 和 P1 处理相比, P2 处理中的 *Bradyrhizobium* 和 *Burkholderia* 相对丰度

显著降低。

CAP 分析 (图 5A) 表明 DOC 和 TP 对第一轴贡献率较高,而 NO_3^- -N 对第二轴贡献率较高;多元回归树分析 (图 5B) 总共解释了 73.10% 的细菌群落变异,细菌群落首先由 DOC 分为 2 个大的分支 (解释 43.15% 群落变异),然后由 TP 又分为两个分支 (解释 29.95% 群落变异)。MRT 分析的三片叶子基本将三个处理分开 (除一 P2 处理归属于第二片叶子)。以上结果说明在不同磷肥施用梯度下,土壤 DOC 和 TP 是调控砂姜黑土细菌群落的关键理化因子。

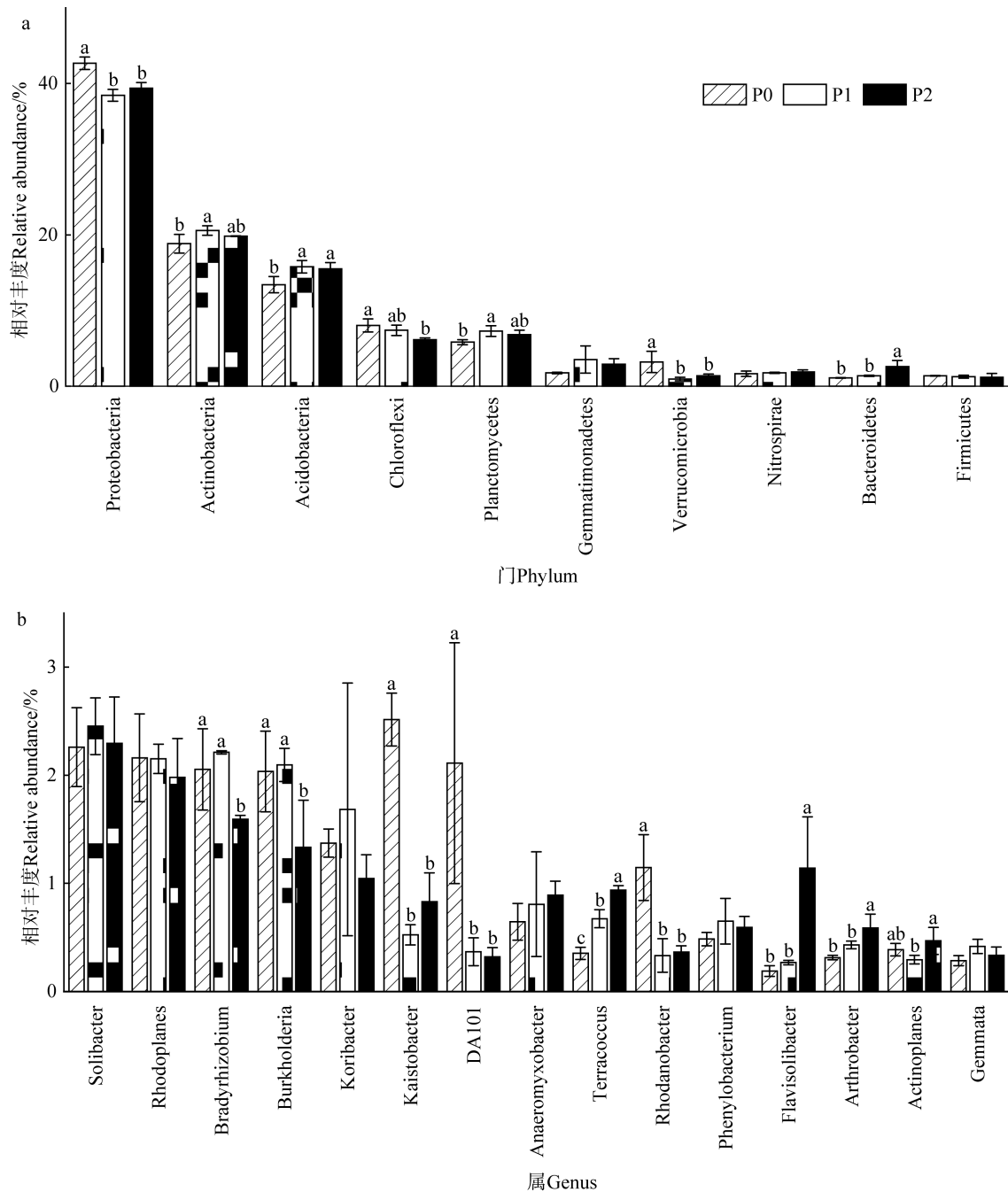
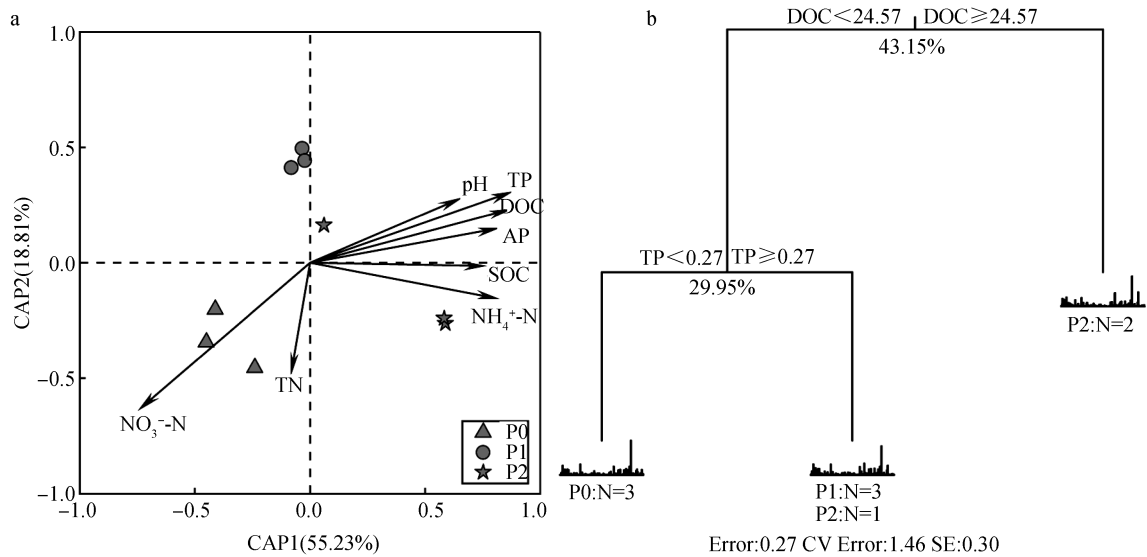


图 4 不同磷肥施用梯度下砂姜黑土相对丰度最高的前 10 个门 (A) 和前 15 个属 (B) 的变化

Fig. 4 Relative abundances of the top 10 phyla (A) and the top 15 genera (B) in the lime concretion black soil relative to P application rate

在门和属水平上, 对差异物种与环境因子进行相关性分析, 结果如表 2 所示。变形菌门 (Proteobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 以及 *Kaistobacter*、*DA101*、*Rhodanobacter* 等在施磷后相对丰度降低的细菌均与 DOC 和 TP 成显著负相关, 而与 C:P 和 N:P 成显著正相关; 酸杆菌门 (Acidobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes) 以及

Terracoccus、*Arthrobacter* 等在施磷后相对丰度升高的细菌则与 DOC 和 TP 成显著正相关, 与 C:P 和 N:P 成显著负相关; 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和 *Flavisolibacter* 与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 相关系数最高, 且均达到极显著水平。由上述结果可以看出长期不同磷肥施用梯度下土壤理化性质的变化是导致微生物群落结构发生改变的重要原因。



注：SOC：土壤有机碳；TN：全氮；TP：全磷；DOC：可溶性有机碳； $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ：铵态氮； $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ：硝态氮；AP：有效磷。下同
 Note: SOC: Soil organic carbon; TN: Total nitrogen; TP: Total phosphate; DOC: Soil dissolved organic carbon; $\text{NH}_4^+\text{-N}$: Ammonium; $\text{NO}_3^-\text{-N}$: Nitrate; AP: Available phosphate. The same below

图 5 三种磷肥施用梯度下砂姜黑土细菌群落结构与土壤理化性质之间关系

Fig. 5 Relationship between soil bacterial community structure and soil physico-chemical properties of the lime concretion black soil relative to P application rate

表 2 三种磷肥施用梯度下砂姜黑土差异细菌与土壤理化性质相关性

Table 2 Pearson correlation analysis of bacterial variation with soil physico-chemical properties in the lime concretion black soil relative to P application rate

水平 Level	细菌 Bacteria	pH	SOC	TN	TP	DOC	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	AP	C : N	C : P	N : P
门 Phylum	Proteobacteria	-0.73*	ns	ns	-0.69*	-0.72*	0.88**	ns	ns	-0.71*	0.78*	0.82**
	Chloroflexi	ns	-0.73*	ns	-0.82**	-0.60*	0.71*	-0.75*	-0.82**	ns	0.71*	0.71*
	Verrucomicrobia	ns	ns	ns	-0.68*	ns	0.71*	ns	ns	ns	0.82**	0.79*
	Actinobacteria	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.69*	ns
	Acidobacteria	0.79*	ns	ns	ns	ns	-0.80**	ns	ns	ns	-0.75*	-0.76*
	Planctomycetes	ns	ns	ns	ns	ns	-0.73*	ns	ns	ns	-0.73*	-0.69*
	Bacteroidetes	ns	0.78*	ns	0.74*	0.79*	ns	0.81**	0.67*	ns	ns	ns
	<i>Kaistobacter</i>	ns	ns	ns	-0.79*	-0.72*	0.93**	ns	ns	-0.73*	0.88**	0.89**
	<i>DA101</i>	ns	ns	ns	-0.78*	-0.68*	0.76*	ns	ns	ns	0.86**	0.84**
	<i>Rhodanobacter</i>	ns	ns	ns	-0.81**	-0.76*	0.85**	ns	ns	-0.73*	0.90**	0.91**
属 Genus	<i>Bradyrhizobium</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.77*	ns	ns	ns	ns
	<i>Burkholderia</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.68*	ns	ns	ns
	<i>Terracoccus</i>	ns	0.84**	ns	0.99**	0.88**	-0.90**	0.84**	0.92**	0.76*	-0.92**	-0.91**
	<i>Flavisolibacter</i>	ns	0.73*	ns	0.74*	0.78*	ns	0.84**	0.75*	ns	ns	ns
	<i>Arthrobacter</i>	ns	ns	ns	0.85**	0.80**	-0.73*	0.75*	0.89**	0.82**	-0.83**	-0.86**

注：*表示显著相关 ($P < 0.05$)；**表示极显著相关 ($P < 0.01$)；ns 表示相关性不显著 ($P > 0.05$)
 Note: * indicates significant correlation at 0.05 level; ** indicates significant correlation at 0.01 level; ns indicates no significant correlation ($P > 0.05$)

在门和属水平上,对差异物种与土壤酶活性进行相关性分析,结果如表 3 所示。 β -葡萄糖苷酶和蛋白酶与变形菌门 (Proteobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 以及 *Kaistobacter*、*DA101*、*Rhodanobacter* 等在施磷后相对丰度降低的细菌均成显著负相关,而与酸杆菌门 (Acidobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 以及 *Terracoccus*、*Flavisolibacter*、*Arthrobacter* 等在施磷后相对丰度升高的细菌成显著正相关。酸性

磷酸酶则与拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和 *Flavisolibacter* 成显著正相关。脱氢酶与绿弯菌门 (Chloroflexi)、*Bradyrhizobium* 和 *Burkholderia* 成显著负相关,而与拟杆菌门 (Bacteroidetes)、*Terracoccus*、*Flavisolibacter* 和 *Arthrobacter* 成显著正相关。由以上结果可以看出土壤中酶活性的变化与差异物种间存在显著性关联,施用磷肥后土壤酶活性的变化可能与相关功能微生物相对丰度的改变有关。

表 3 三种磷肥施用梯度下砂姜黑土差异细菌与土壤酶活性相关性

Table 3 Pearson correlation analysis of bacterial variation with soil enzyme activities in the lime concretion black soil relative to P application rate

水平	细菌	β -葡萄糖苷酶	蛋白酶	酸性磷酸酶	脱氢酶
Level	Bacteria	β -glucosidase	Protease	Acid phosphatase	Dehydrogenase
门 Phylum	Proteobacteria	-0.86**	-0.77*	ns	ns
	Chloroflexi	-0.67*	-0.76*	ns	-0.83**
	Verrucomicrobia	-0.69*	ns	ns	ns
	Actinobacteria	ns	ns	ns	ns
	Acidobacteria	0.76*	0.80*	ns	ns
	Planctomycetes	0.68*	0.67*	ns	ns
	Bacteroidetes	0.81**	0.84**	0.79*	0.81**
	<i>Kaistobacter</i>	-0.89**	-0.83**	ns	ns
	<i>DA101</i>	-0.79*	-0.72*	ns	ns
	<i>Rhodanobacter</i>	-0.84**	-0.72*	ns	ns
属 Genus	<i>Bradyrhizobium</i>	ns	ns	ns	-0.69*
	<i>Burkholderia</i>	ns	ns	ns	-0.74*
	<i>Terracoccus</i>	0.90**	0.90**	ns	0.91**
	<i>Flavisolibacter</i>	0.75*	0.80**	0.70*	0.85**
	<i>Arthrobacter</i>	0.82**	0.86**	ns	0.86**

3 讨论

磷素缺乏是砂姜黑土区作物产量低下的重要限制因子,施用磷肥是提高砂姜黑土磷素有效性的有效措施^[3-4]。然而关于长期不同磷肥施用梯度对地下微生物群落的影响尚未展开系统研究。本研究采用现代高通量测序技术,研究经过 21 年三种不同磷肥施用梯度后,土壤细菌群落多样性及细菌群落组成变化,探索其与土壤肥力指标及土壤酶活性的关系。

3.1 长期三水平磷肥施用梯度对细菌群落多样性和组成的影响

与以往的研究结果相同^[9],长期施用磷肥导致土壤细菌多样性显著升高(图 2A)。Zhong 和 Cai^[23]认为施用磷肥后土壤养分的升高尤其是有机质含量的增加是导致细菌多样性增加的主要原因。在本研究中施用磷肥后土壤 DOC 和 TP 含量显著升高,而相关性分析(图 2B)表明 DOC 和 TP 含量均与香农指标成显著正相关($r=0.89$, $P=0.001$; $r=0.93$, $P=0.001$)。因此在本研究中长期施磷后 DOC 和 TP

含量的升高可能是导致细菌多样性升高的重要原因。

磷肥施入不仅提高了细菌多样性，同时还改变了细菌群落组成和结构。在门水平上，放线菌门（Actinobacteria）、浮霉菌门（Planctomycetes）和拟杆菌门（Bacteroidetes）相对丰度随着磷肥施入而逐渐升高（图 4A）。研究表明这三种细菌在土壤中均具有溶磷作用，在土壤中可将难利用的无机磷和大分子的有机磷转化为作物可吸收利用的磷素形态，其相对丰度随磷肥的加入而升高^[24-26]。在属水平上，*Terracoccus*、*Flavisolibacter* 和 *Arthrobacter* 相对丰度则随着磷肥的施入逐渐升高（图 4B）。*Terracoccus* 和 *Arthrobacter* 均属于 Actinomycetales，*Flavisolibacter* 属于 Chitinophagaceae，它们在土壤中均具有溶磷作用，其相对丰度随磷肥施用而升高^[27-28]。由上述结果可以看出长期施用磷肥导致砂姜黑土中溶磷细菌的相对丰度升高。我们之前的研究表明砂姜黑土对磷素具有较强的固持作用，施用磷肥后土壤中的磷主要向生物有效性低的 Al-P 和 Fe-P 转化^[4]。因此施磷土壤中大量难利用的 P 素可能会促进溶磷细菌的生长，而溶磷细菌可通过分泌有机和无机酸性物质、H⁺、磷酸酶、激素等提高磷素有效性^[29]。

长期施用磷肥还导致部分细菌相对丰度的降低。在门水平上，变形菌门（Proteobacteria）、绿弯菌门（Chloroflexi）和疣微菌门（Verrucomicrobia）相对丰度随着磷肥的施入而有所降低（图 4A）。其中绿弯菌门（Chloroflexi）和疣微菌门（Verrucomicrobia）均为寡营养型细菌，适宜在养分有效性低环境中生长^[30]；相关性分析发现（表 2），它们的相对丰度均与全磷含量成显著负相关（ $r = -0.82, P < 0.05$ ； $r = -0.63, P < 0.05$ ），因此施磷土壤中较高的养分含量可能会抑制其生长。与之前的研究结果不同，属富营养型的变形菌门（Proteobacteria）^[30]在施用磷肥后相对丰度降低；相关性分析发现变形菌门（Proteobacteria）与 pH 成显著负相关（ $r = -0.73, P < 0.05$ ），这与之前的研究结果相同^[31]。因此未施磷肥土壤中较低的 pH 可能更适宜变形菌门（Proteobacteria）的生长（尽管不同处理间的 pH 差异没有达到显著水平）。在属水平上，*Kaistobacter*、*DA101* 和 *Rhodanobacter* 相对丰度在施磷后有所降低（图 4B）。*Kaistobacter* 和 *Rhodanobacter* 均为土壤中重要的反硝化细菌，可将硝酸盐转化为亚硝酸盐^[32-33]。在本研究中，其相对

丰度与 NO₃⁻-N 含量均呈极显著正相关关系（ $r = 0.93, P < 0.01$ ； $r = 0.85, P < 0.01$ ），由此可以推断，P0 处理中较高的硝酸盐含量可能更适宜其生长。*DA101* 属于 *Chthoniobacteraceae*，其在土壤中功能尚不清楚。P2 处理中 *Bradyrhizobium* 和 *Burkholderia* 显著低于其他两个处理，*Bradyrhizobium* 属于根瘤菌目，它和 *Burkholderia* 均是土壤中重要的固氮细菌，可将大气中的 N₂ 固定转化为土壤氮源。P2 处理中由于磷肥的不断施入，N:P 不断降低，N 的有效性下降，而固氮细菌固氮作用需要大量土壤 N，这种 N 有效性的不足可能会降低固氮菌相对丰度^[32-33]。

由以上结果可以看出长期施用磷肥可显著提高土壤中溶磷细菌相对丰度，但由于 DOC、TP、NO₃⁻-N 和 pH 等土壤理化指标的变化导致土壤中寡营养型细菌、反硝化细菌和固氮细菌相对丰度的降低。

3.2 细菌群落结构与土壤环境因子及酶活性关系

以往的大量研究表明，pH 是土壤细菌群落最佳预测因子，对细菌群落的变化起主导作用^[34]。朱敏^[5]和孙瑞波^[22]等分别采用荧光实时定量 PCR 和高通量测序技术研究不同施肥模式对砂姜黑土微生物群落的影响，其研究结果一致认为不同施肥处理后 pH 的变化是导致细菌群落变异的主要因素。而本研究中，DOC 和 TP 是细菌群落最重要的决定因素（图 5A 和图 5B）。这可能是由于在本研究中不同施磷处理间 pH 差异很小（5.22~5.53），如此小的 pH 差异对细菌群落结构的改变作用并不明显。DOC 是土壤中微生物可直接利用的有机碳源，而碳的有效性是限制土壤微生物生长最重要因素^[35]。Huang 等^[10]研究认为施用磷肥后细菌生物量的增加主要是由于 DOC 含量的升高。本研究中相关性分析（表 2）表明，C:P 和 N:P 与多个差异细菌间存在显著相关关系。在施磷土壤中，TP 和 AP 含量增加，C:P 和 N:P 降低，此时 C 源和 N 源成为限制微生物生长的环境因子。相反，在 P0 处理中，由于长期 P 素损耗，微生物的生长面临严重的 P 素胁迫，此时 P 取代 C 和 N 成为微生物生长的限制因子。因此不同施磷处理中这种 C、N、P 有效性的变化可能是导致微生物群落组成差异的重要因素。

砂姜黑土区长期施用磷肥不仅改变了微生物群落组成，同时还提高了土壤微生物功能。本研究以 β-葡糖苷酶、蛋白酶、酸性磷酸酶和脱氢酶等 4 种胞外酶活性代表微生物功能。其中 β-葡糖苷酶属于

纤维素酶类, 具有分解纤维素的功能, 其与土壤有机质的转化关系密切。蛋白酶参与土壤中氨基酸、蛋白质的转化, 其水解产物是作物生长的重要氮源。酸性磷酸酶在土壤磷素循环中具有重要作用, 其活性高低可直接影响土壤磷素有效性。脱氢酶可反映土壤体系内活性微生物量以及其对有机物的降解活性, 可以作为土壤微生物降解性能的指标^[15-16]。本研究结果(图 3)表明 β -葡糖苷酶、蛋白酶和脱氢酶等三种酶活性均随磷肥施入量的增加而显著升高 ($P < 0.05$), 有趣的是酸性磷酸酶活性并未受磷肥施用的影响 ($P > 0.05$)。这可能是由于施用磷肥后 C:P 和 N:P 降低, 此时 C 和 N 的有效性不足, 刺激微生物分泌 β -葡糖苷酶、蛋白酶等与 C 和 N 循环相关胞外酶; 而施磷后土壤中磷有效性较高, 微生物不需要分泌过多的酸性磷酸酶即可满足其生长对磷需求^[36]。相关性分析(表 3)表明, 施用磷肥后相对丰度升高细菌与土壤酶活性之间存在显著正相关关系, 其中拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和 *Flavisolibacter* 与所测四种酶均成显著正相关关系。这表明长期不同磷肥施用梯度导致的微生物群落结构变化推动了土壤中与 C、N、P 循环转化有关的功能微生物的改变。由此可以说明土壤养分、功能微生物和土壤酶活性之间关系密切, 土壤养分差异导致功能微生物的改变, 从而引起土壤中酶活性的变化, 而这种变化反过来又可能影响土壤性质。

4 结 论

长期施用磷肥可明显改善砂姜黑土土壤肥力, SOC、DOC、TP、AP 以及 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量在施磷处理中显著升高。土壤肥力的提升导致细菌群落多样性显著升高, 同时细菌群落结构和组成发生明显改变, 而 DOC 和 TP 是影响砂姜黑土细菌群落结构的最重要的环境因子。土壤中具有溶磷作用的细菌相对丰度在施磷处理中显著升高, 但寡营养型细菌、具有反硝化和固氮作用的细菌相对丰度则在施磷处理中显著降低。随着磷肥施用量的增加, 土壤中酶活性也随之升高, 而这种变化与土壤养分、细菌群落密切相关。

参 考 文 献

[1] 花可可, 王道中, 郭志彬, 等. 施肥方式对砂姜黑土钾

素利用及盈亏的影响. 土壤学报, 2017, 54 (4): 978—988

Hua K K, Wang D Z, Guo Z B, et al. Effects of long-term fertilization on soil potassium utilization and budgeting in vertisol relative to application method (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54 (4): 978—988

[2] 陈欢, 张存岭. 基于主成分-聚类分析评价长期施肥对砂姜黑土肥力的影响. 土壤学报, 2014, 51 (3): 609—617

Chen H, Zhang C L. Principal component-cluster analysis of effects of long-term fertilization on fertility of lime concretion black soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51 (3): 609—617

[3] 王道中, 郭熙盛, 何传龙, 等. 砂姜黑土长期定位施肥对小麦生长及土壤养分含量的影响. 土壤通报, 2007, 38 (1): 55—57

Wang D Z, Guo X S, He C L, et al. Effect of long-term fertilization on wheat growth and soil nutrition status in sha jiang black soil (In Chinese). *Chinese Journal of Soil Science*, 2007, 38 (1): 55—57

[4] 王道中, 郭熙盛, 刘枫, 等. 长期施肥对砂姜黑土无机磷形态的影响. 植物营养与肥料学报, 2009, 15 (3): 601—606

Wang D Z, Guo X S, Liu F, et al. Effect of long-term of fertilization on inorganic phosphorus fractions in lime concretion black soil (In Chinese). *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15 (3): 601—606

[5] 朱敏, 郭志彬, 曹承富, 等. 不同施肥模式对砂姜黑土微生物群落丰度和土壤酶活性的影响. 核农学报, 2014, 28 (9): 1693—1700

Zhu M, Guo Z B, Cao C F, et al. Impact of model of fertilization on microbial abundance and enzyme activity in lime concretion black soil (In Chinese). *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28 (9): 1693—1700

[6] Chu H, Lin X, Fujii T, et al. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39 (11): 2971—2976

[7] Stenberg B. Monitoring soil quality of arable land: Microbiological indicators. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science*, 1999, 49 (1): 1—24

[8] Grover J P. Predation, competition, and nutrient recycling: A stoichiometric approach with multiple nutrients. *Journal of Theoretical Biology*, 2004, 229 (1): 31—43

[9] 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. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49 (6): 661—672

[10] Huang J, Hu B, Qi K, et al. Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in a subalpine spruce plantation. *European*

- Journal of Soil Biology, 2016, 72: 35—41
- [11] Shi Y, Lalonde R, Ziadi N, et al. An assessment of the soil microbial status after 17 years of tillage and mineral P fertilization management. *Applied Soil Ecology*, 2012, 62: 14—23
- [12] Ehlers K, Bakken L R, Frostegård Å, et al. Phosphorus limitation in a ferralsol: Impact on microbial activity and cell internal P pools. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42 (4): 558—566
- [13] Eo J, Park K-C. Long-term effects of imbalanced fertilization on the composition and diversity of soil bacterial community. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2016, 231: 176—182
- [14] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000
- Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000
- [15] 关松荫. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986
- Guan S Y. Soil enzymes and its research methods (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1986
- [16] Tabatabai M. “Soil enzymes” in: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties*, 1994: 775—833
- [17] Magoč T, Salzberg S L. Flash: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27 (21): 2957—2963
- [18] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *Embnet Journal*, 2011, 17 (1): 10—12
- [19] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7 (5): 335—336
- [20] Cole J R, Wang Q, Fish J A, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42 (D1): 633—642
- [21] Edgar R C. Uparse: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, 10 (10): 996—998
- [22] 孙瑞波, 郭熙盛, 王道中, 等. 长期施用化肥及秸秆还田对砂姜黑土细菌群落的影响. *微生物学通报*, 2015, 42 (10): 2049—2057
- Sun R B, Guo X S, Wang D Z, et al. The impact of long-term application of chemical fertilizers and straw returning on soil bacterial community (In Chinese). *Microbiology China*, 2015, 42 (10): 2049—2057
- [23] Zhong W, Cai Z. Long-term effects of inorganic fertilizers on microbial biomass and community functional diversity in a paddy soil derived from quaternary red clay. *Applied Soil Ecology*, 2007, 36 (2): 84—91
- [24] Mander C, Wakelin S, Young S, et al. Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 44 (1): 93—101
- [25] Sun L, Zhao X, Zhang H, et al. Biological characteristics of a denitrifying phosphorus-accumulating bacterium. *Ecological Engineering*, 2015, 81: 82—88
- [26] Wakelin S, Mander C, Gerard E, et al. Response of soil microbial communities to contrasted histories of phosphorus fertilisation in pastures. *Applied Soil Ecology*, 2012, 61: 40—48
- [27] Long X E, Yao H, Huang Y, et al. Phosphate levels influence the utilisation of rice rhizodeposition carbon and the phosphate-solubilising microbial community in a paddy soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, 118: 103—114
- [28] Wang R, Sun Q, Wang Y, et al. Temperature sensitivity of soil respiration: Synthetic effects of nitrogen and phosphorus fertilization on chinese Loess Plateau. *Science of the Total Environment*, 2017, 574: 1665—1673
- [29] Adnan M, Shah Z, Fahad S, et al. Phosphate-solubilizing bacteria nullify the antagonistic effect of soil calcification on bioavailability of phosphorus in alkaline soils. *Scientific Reports*, 2017, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16537-5>
- [30] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (3): 626—631
- [31] Zhou J, Guan D, Zhou B, et al. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast china. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 90: 42—51
- [32] Bui T P N, Kim Y J, Kim H, et al. *Rhodanobacter soli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 (12): 2935—2939
- [33] Ward N L, Challacombe J F, Janssen P H, et al. Three genomes from the phylum acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (7): 2046—2056
- [34] Fierer N. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15 (10): 579—590
- [35] Li F, Chen L, Zhang J, et al. Bacterial community structure after long-term organic and inorganic fertilization reveals important associations between soil nutrients and specific taxa involved in nutrient transformations. *Frontiers in Microbiology*, 2017, DOI:10.3389/fmicb.2017.00187
- [36] Wei K, Bao H, Huang S, et al. Effects of long-term fertilization on available P, P composition and phosphatase activities in soil from the Huang-Huai-Hai Plain of China. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, 237: 134—142

Effect of Long-term Application of Phosphorus Fertilizer on Soil Bacterial Community Structure and Enzymatic Activity in Lime Concretion Black Soil Relative to P Application Rate

MA Lei^{1,3} GUO Zhibin² WANG Daozhong² ZHAO Bingzi^{1†}

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

(2 Soil and Fertilizer Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

(3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract 【Objective】 Soil phosphorus is a major nutrient essential for plant growth and plays an important role in achieving high crop yields. Application of chemical phosphorus fertilizer is a common agricultural strategy to improve phosphate availability in lime concretion black soil, where shortage of soil phosphate is a limiting factor in agricultural production. Numerous studies have been done addressing effects of phosphorus application on crop yield and soil fertility, but few are found in the literature about the effects of long-term phosphorus application on diversity and composition of soil microbial community in lime concretion black soil. The overall object of this study was to investigate relationships between soil nutrient availability, soil enzymatic activity and soil bacterial community as affected by phosphorus application strategy. 【Method】 A long-term P-fertilizer application field experiment, designed to have three treatments in P fertilizer application rate, that is P0 (No phosphorus applied); P1 (P_2O_5 45 kg·hm⁻² applied) and P2 (P_2O_5 90 kg·hm⁻² applied), was conducted in a tract of lime concretion black soil in the Mengcheng, Anhui. The technology of high-throughput sequencing of V4-V5 16s rRNA gene region was used to character bacterial community diversity and composition relative to phosphorus application rate. Activities of β -glucosidase, Protease, Acid phosphatase and Dehydrogenase were measured to represent functions of the soil bacterial community. 【Result】 Results show that after 21 years of phosphorus application improved soil fertilizer significantly. Compared with P0, P2 was 10.33%, 31.36%, 40.00%, 384.19% and 79.49% higher in content of soil organic carbon, soil dissolved organic carbon, total phosphorus, available phosphorus, and ammonium, respectively. The significant improvement in soil nutrient in turn altered composition of the soil bacterial community. The diversity (Shannon index) of soil bacteria improved by 2.49% and 4.52% in P1 and P2, respectively. Proteobacteria, Actinobacteria and Acidobacteria used to be the dominant phyla in the lime concretion black soil, accounting for 40.16%, 19.75% and 14.91% in relative abundance, respectively. Principal coordinate and Adonis analysis reveals significant differences between the treatments in structure of the soil bacterial community. In the soils applied with phosphate, phosphate-solubilizing bacteria, including three phyla, i.e. Actinobacteria, Planctomycetes and Bacteroidetes, and three genera, i.e. *Terracoccus*, *Flavisolibacter* and *Arthrobacter*, increased significantly, whereas oligotrophic bacteria, including two phyla, i.e. Chloroflexi and Verrucomicrobia, denitrifying bacteria, including two genera, i.e. *Kaistobacter* and *Rhodanobacter*, and nitrogen-fixing bacteria, including two genera, i.e. *Bradyrhizobium* and *Burkholderia*, decreased significantly in relative abundance. Canonical analysis of principal coordinate (CAP) and multivariate regression tree analysis (MRT) reveals that soil bacterial community composition was significantly related to contents of soil dissolved organic carbon and total phosphate in the treatments applied with phosphorus. As expected, long-term phosphorus application increased the activities of β -glucosidase, Protease and Dehydrogenase, while phosphorus application had no significant effects on the activity of acid phosphatase. The above-described four soil enzymes were all significantly and positively related in activity to relative abundance of the bacteria (i.e., Bacteroidetes and *Flavisolibacter*) enriched in the soils applied with phosphorus. 【Conclusion】 In conclusion, the present study has demonstrated that long-term phosphorus application can improve soil fertility, increase microbial diversity, alter soil bacterial community structure and enrich phosphate-solubilizing bacteria, which in turn, increase soil enzyme activities in lime concretion black soil.

Key words Lime concretion black soil; Phosphate; High-throughput sequencing; Microbial community; Enzymatic activity

(责任编辑: 檀满枝)