

不同磷肥用量对水稻土有机碳矿化和 细菌群落多样性的影响*

李霞¹ 田光明¹ 朱军² 张志剑^{1†}

(1 浙江大学环境与资源学院, 杭州 310058)

(2 Department of Bioproducts and Biosystems Engineering of Minnesota University, St. Paul 55108, USA)

摘要 以水稻田间定位试验为研究对象, 利用三维荧光光谱技术(3D EEMs)和 454 测序技术, 采集 4 个施磷水平(0、30、60、90 kg hm⁻² a⁻¹)土壤, 测定其有机碳矿化、溶解有机碳(DOC)组成和结构特征及细菌群落结构和丰度的变化。结果显示: 水田施磷增加了土壤速效磷(Olsen-P), 从而提高了土壤 DOC 含量, 加速了有机碳的矿化速率和累积矿化量。3D EEMs 结果表明, 施磷分别显著增加了荧光指数和鲜度指数值 1%~10% 和 3%~21%, 而降低了腐殖化指数, 且与土壤生化性质(Olsen-P、DOC 和 β -葡萄糖苷酶)具有显著相关性。说明施磷通过提高 Olsen-P, 促进了微生物源 DOC 的生成, 同时降低了 DOC 的芳香化程度、分子量及腐殖化程度, 从而提高了 DOC 生物可降解性。同时, 施磷提高了细菌群落的丰度和多样性, 特别是磷诱导了多种具有碳降解功能细菌的增加, 从而加速了复杂有机碳的降解和甲烷氧化。此外, 主成分分析表明稻田磷素施用量在 30~60 kg hm⁻² a⁻¹ 时对土壤有机碳矿化及细菌群落多样性的提高作用最为明显。因此, 适度施磷能显著提高涉碳降解微生物的活性, 从而提高 DOC 的生物可降解性, 加速有机碳的矿化速率, 促进稻田土壤有机碳循环。

关键词 有机碳; 三维荧光光谱; 腐殖化; 细菌群落; 454 高通量测序

中图分类号 S158.2 **文献标识码** A

土壤有机碳是农业土壤肥力的重要组成部分, 是土壤质量及生态服务功能的核心^[1]。水稻田作为我国主要的农田土壤类型储存着 1.3 Pg 有机碳, 其有机碳库的消长对耕地土壤生物多样性及保障植株养分供应具有重要意义^[1], 而土壤有机碳矿化动态受到外源营养物质的强烈影响^[2]。磷肥作为水稻获得高产的重要措施^[3], Huang 等^[4]研究表明磷肥能显著提高约 10% 的稻田土壤有机碳含量。陈小云等^[5]对红壤性水稻土研究也表明, 施磷有助于土壤总有机碳和活性有机碳的累积。溶解性有机碳(DOC)作为土壤有机碳库中最活跃的组分^[6], 在土壤有机质分解^[6]和微生物的生长代谢过程^[7]中有着重要的作用, 其生物降解性主要取决于 DOC 的结构特征^[8]。目前, 对于 DOC 组成及结构特征对其生物可降解性研究主要集中在森林土壤^[8-9], 农田土壤 DOC 研究多集中在 DOC 产生和含量等方

面^[6]。然而有关磷输入对稻田土壤有机碳矿化及 DOC 组成和结构特征的影响, 特别是磷输入对两者的综合影响及其内在调控机制还少见报道, 而这部分研究对于全面了解有机碳的生物可利用性具有十分重要的意义。

土壤微生物既是土壤有机碳转化的执行者, 又是植物营养元素的活性库^[6]。土壤微生物群落特征与 DOC 的结构变化密切相关, 并能指示土壤质量变化^[10]。土壤细菌占土壤微生物总量的 70%~90%, 其在土壤肥力的保持、有机物分解和物质循环等方面具有不可替代的作用^[10]。胡星明等^[11]研究表明磷肥能显著提高农田土壤中微生物活性, 从而促进土壤微生物的生长。Liu 等^[6]利用磷脂脂肪酸分析(PLFA)对热带森林土壤中微生物群落结构的研究表明, 磷输入可明显增加土壤微生物量, 并改变微生物的群落结构。Tan 等^[12]利用变性梯度凝

* 国家自然科学基金项目(40701162)、环境保护部公益性行业科研专项(2010467014)资助

† 通讯作者, E-mail: zjzhang6917@163.com

作者简介: 李霞(1983—), 女, 山西太原人, 博士, 主要从事生源要素循环与气候变化研究。E-mail: lixia200820082008@163.com

收稿日期: 2013-07-28; 收到修改稿日期: 2013-10-12

胶电泳法(DGGE)对草地土壤的细菌群落研究也表明,施磷可提高土壤细菌群落的多样性,促进其功能多样性的增加。然而基于454高通量测序技术研究稻田土壤磷输入对土壤细菌群落多样性的研究较少^[13],尤其将涉碳降解细菌与土壤有机碳矿化及DOC结构变化相耦合的研究还未见报道。因此,本文以水稻田田间定位试验为研究对象,利用三维荧光光谱技术与454高通量测序技术,探讨了不同磷肥用量对稻田土壤有机碳矿化、DOC结构特征和细菌群落多样性的影响,阐明微生物驱动的土壤碳-磷素耦合作用的生化及遗传学机理,并提出水田磷素最佳管理技术,可为区域农业与生态可持续发展及应对气候变化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

本项目水田磷素长期定位试验位于杭州市余杭区长岗农场永建分场(30°18'51.84"N,119°54'13.37"E),始建于1997年。试验基地属于亚热带季风气候区,多年平均气温为17.8℃,平均年降雨量为1450mm,其中6月初至7月中为梅雨季节。本试验水稻土为湖沼相沉积物发育而成的青紫泥黏土。表层耕作层15cm土壤机械组成为:砂粒(>0.05mm)3%、粉粒47%、黏粒50%。

1.2 试验设计

本研究的试验设计小区单位面积为4m×5m,共计12个小区,并行排列,单排单灌。采用水泥砖砌(深入田表45cm)田埂隔离相邻小区,田埂中间预先植入PE防渗膜避免漏水和漏肥,配套建立独立的灌水-排水系统。

磷肥设计采用完全随机区组设计,四个处理,3次重复,即0kg hm⁻²(P-0)、30kg hm⁻²(P-30)、60kg hm⁻²(P-60)、90kg hm⁻²(P-90)(以P计)过磷酸钙。各试验小区每年施170kg hm⁻²尿素和50kg hm⁻²氯化钾。水稻肥料分别在2011年6月27日和2012年6月28日撒施后,用铁耙混入约5~6cm的表土中。本试验为期2a,分别于2011年5月、8月和11月以及2012年5月和11月采集土壤样品。

1.3 土壤样品采集

土壤样品按“S”形线路,选取5个点采集样品,再将5点样品进行混合,为该地块的土壤样品。混合土样采取耕层0~15cm土壤。每一土样分为两

部分,其中一部分新鲜土样,去除植物残体后,立即过2mm筛,装入塑料封口袋中,保存于4℃冰箱内,在一周之内检测土壤生物学性质指标;另一部分土壤样品风干后,捡去植物残体和石块等。分别过60目和100目筛,保存在塑料封口袋中,用于土壤理化性质分析。

1.4 土壤生化性质分析

(1)土壤基础呼吸强度采用碱液吸收法测定^[14]。称取过2mm筛的20g新鲜土壤,均匀铺于250ml定制呼吸瓶底,调节至最大持水量60%,在连通试管加入10ml 0.1mol L⁻¹NaOH溶液。呼吸瓶密封好,于28±1℃的恒温箱中培养(重复3次)。分别于第1、3、5、7、14、21、28、35、42、49、56天后,将NaOH溶液吸出,加入1mol L⁻¹BaCl₂溶液2ml,加1滴酚酞指示剂,用标准酸(约0.05mol L⁻¹HCl)滴定至红色消失,测得NaOH吸收的CO₂量。根据CO₂的释放量计算土壤的呼吸强度。

(2)通过一级反应动力学方程模型,对累计矿化的CO₂进行拟合,表达式为:

$$C_t = C_0(1 - e^{-kt})$$

其中: C_0 为潜在矿化势,即土壤中生物活性有机碳库的大小,反映土壤中潜在活性养分的含量。 C_t 为经过 t 时间后土壤中累积释放的CO₂量, k 为矿化常数,即生物活性有机碳库的周转速率,半周期 $T_{1/2} = \ln 2/k$,可以反映土壤中的养分循环和供应状况,是有机碳矿化快慢的标志^[2]。

(3)土壤速效磷(Olsen-P)采用pH为8.5的0.5mol L⁻¹NaHCO₃溶液提取,比色法测定^[15];β-葡萄糖苷酶(BG)采用微平板荧光比色法测定^[16]。

1.5 三维荧光光谱特征分析

(1)准确称取10g风干样品(过100目筛),置于100ml离心管中,按土水质量比1:5加入50ml Milli-Q水,常温震荡4h,4℃下12000r min⁻¹离心20min(CR22G型高速冷冻离心机,日立,日本)后过0.45μm滤膜,滤液置于4℃冰箱冷藏,待分析^[17]。总有机碳分析仪(TOC-VCPH,岛津,日本)测定溶解DOC浓度。

(2)三维荧光光谱测定在高灵敏度荧光光谱分析仪(Cary Eclipse 荧光分光光度计,瓦里安,美国)上进行。实验空白为Milli-Q超纯水。为消除荧光内滤作用,所有样品均将DOC浓度稀释至10mg L⁻¹后进行分析,且每测10个样品监控一次稳定性。扫描结束后,分别测定各样品的荧光光谱参数,具体测定及计算方法见表1^[18]。

表 1 各荧光光谱参数测定及计算方法

Table 1 Measurement and calculation of the three fluorescence spectra parameters

荧光参数 Fluorescence parameter	测定计算方法 Measurement
荧光指数 Fluorescence index (FI)	激发波长为 370 nm 时, 450 nm 处的发射强度与 500 nm 处的发射强度之比 The ratio of the emission intensity at 450 nm to that at 500 nm for an excitation wavelength of 370 nm
鲜度指数 β/α index (β/α)	激发波长为 310 nm 时, 380 nm 处的发射强度与 420 ~ 435 nm 之间的最大发射强度之比 The ratio of the emission intensity at 380 nm to the maximum emission intensity observed between 420 and 435 nm for an excitation wavelength of 310 nm
腐殖化指数 Humification index (HI)	激发波长为 254 nm 时, 435 ~ 480 nm 之间的发射光谱面积与 300 ~ 445 nm 之间的发射光谱面积之比 The ratio of the area of the emission spectra at 435 ~ 480 nm to that at the 300 ~ 445 nm

(3) 土壤样品 DOC 组分采用日本岛津 UV-2550 紫外可见光分光光度计测定 200 ~ 400 nm 的吸收值, 扫描间隔为 0.2 nm。样品测定前保持温度恒定 (恒温水浴 20 ± 0.1 °C)。所测结果均扣除实验空

白 (相同条件下 Milli-Q 超纯水的紫外吸光度值), 按表 2 分别计算 $SUVA_{280}$ 、 $SUVA_{254}$ 、 $E_{250/365}$ 、 $E_{253/203}$ 的值^[19]。

表 2 各紫外光谱参数测定及计算方法

Table 2 Measurement and calculation of the four UV spectra parameters

紫外参数 Spectra parameter	计算方法 Measurement
$SUVA_{280}$	280 nm 处的紫外可见光吸光值与标准化的 DOC 浓度之比 The ratio of the UV absorbance at 280 nm and the normalized DOC concentration
$SUVA_{254}$	254 nm 处的紫外可见光吸光值与标准化的 DOC 浓度之比 The ratio of the UV absorbance at a wavelength of 254 nm and the normalized DOC concentration
$E_{250/365}$	250 nm 处的紫外可见光吸光值与 365 nm 处的紫外可见光吸光值之比 The ratio of UV absorbances at 250 nm and at 365 nm wavelengths
$E_{253/203}$	253 nm 处的紫外可见光吸光值与 203 nm 处的紫外可见光吸光值之比 The ratio of the UV absorbances at 253 nm and at 203 nm

1.6 土壤细菌群落特征分析

(1) 准确称取 0.5 g 鲜土, 用无菌水洗涤 3 次; 12 000 r min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清; 加入一定量的石英砂 (石英砂: 土壤 = 1: 5) 及 1 ml 磷酸缓冲液 (0.1 mol L⁻¹, pH 7.4), 旋涡振荡破碎 10 min; 12 000 r min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清; 沉积的土壤用于基因组 DNA 的提取。

基因组 DNA 的提取参照 Ezup 柱式基因组土壤 DNA 抽提试剂盒 (SK8264, 生工生物, 上海) 的操作说明进行。提取的基因组 DNA 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。将提取的 DNA 样品, 首先对细菌 16S rRNA 区进行扩增, 引物分别为 27F 和 1492R。其次采用引物 341F 和 1073R, 对 16S rRNA V3-V6 区扩增^[20]。PCR 仪为 ABI GeneAmp9700 型。取 3 μ l PCR 产物进行 2.0% 凝胶电泳检测, 并使用回收

试剂盒 (AXYGEN 公司) 切胶回收, 再次电泳检测。

(2) 将 PCR 产物用 QuantiFluorTM-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司) 和 PicoGreen[®] dsDNA 定量试剂盒 (PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Reagent) 进行检测定量, 之后按照每个样品的测序量要求, 进行相应比例的混合, 在 GS FLX 平台上进行 454 测序。上机测序试剂使用 Roche 指定的 GS FLX + - Sequencing Method Manual - XL + Kit。

(3) 根据 454 测序数据计算多样性指数^[21], 其中菌群丰度 (Community richness) 的指数有超 (Chao) 和覆盖度评估指数 (Ace), 主要用于估计物种总数; 菌群多样性 (Community diversity) 的指数有香农指数 (Shannon index) 和辛普森指数 (Simpson index), 常用于反映 alpha 多样性指数。Shannon 值越大, 说明群落多样性越高, 而 Simpson 指数值越

大,说明群落多样性越低。

1.7 数据处理

试验数据使用 Excel 2010 进行计算处理,折线图和柱状图均使用 Origin 8.0 制作。统计分析采用 SPSS15.0 对各处理之间的差异性进行一维方差分析(One-way ANOVA)和基于 Duncan($p < 0.05$)的显著性检验,并对不同处理及不同采样时间进行主成分分析(PCA)。Pearson 相关性采用 SPSS15.0 软件中 Pearson 相关系数和双侧显著性检验进行相关性分析。利用软件 SigmaPlot 9.0 中 Contour 作图功能,绘制溶解有机碳三维荧光光谱等高线图。细菌群落结构聚类统计,利用 PAST(V1.0) 软件,以 Bray-Curtis 距离进行 unweighted-pair group 分析。

2 结果与讨论

2.1 磷肥对有机碳矿化及土壤生化性质的影响

由图 1 可知,5 月与 8 月 P-60 土壤样品的有机碳矿化速率均在培养前 35 d 显著高于对照(P-0) ($p < 0.05$),而 P-30 和 P-90 则在培养前 14 d 显著高于 P-0($p < 0.05$),之后随着土壤有机碳中易分解组分的减少,逐渐趋于一致。11 月土壤有机碳的矿化速率,P-60 和 P-90 均显著高于 P-0($p < 0.05$);而 P-30 处理在培养前 21 d 显著高于 P-0,之后差异不显著(图 1)。整个培养期间,磷输入均增加了三次样品土壤有机碳的累积矿化量,分别较 P-0 显著($p < 0.05$)增加了 6% ~ 19% (P-30)、35% ~ 51% (P-60)、19% ~ 26% (P-90),其中 P-60 和 P-90 累积有机碳矿化量达到极显著水平($p < 0.01$)(图 2)。土壤有机碳矿化主要为活性有机碳分解,因此采用一级动力学方程,模拟土壤有机碳矿化量随时间变化的矿化动态(表 3)。不同施磷量处理下,土壤有机碳累积矿化过程均较好地符合一级动力学方程($R^2 \geq 0.95$)。如表 3 所示,不同采样时间,施磷均增加了土壤有机碳的潜在矿化势,且 P-60 达到最大值,较 P-0 增加了 36% ~ 50%,表明磷输入明显增加了土壤中活性有机碳库。除 11 月 P-60 处理外,磷输入增加了土壤有机碳矿化常数,缩短了其半周转时间,这表明施磷促进了土壤有机碳矿化,从而加速土壤碳素的循环。相应的,速效磷(Olsen-P)均随着施磷量的增加而增加,处理组与 P-0 相比提高了 1 倍 ~ 7 倍。磷肥施入均显著($p < 0.05$)提高了 12% ~ 83% 的 β -葡萄糖苷酶(BG)活性,且除 2011 年 5 月处理外,BG 酶的活性在 P-60 处理下均达到最大值(表 4)。

本研究表明不同施磷处理均增加了土壤有机碳的矿化速率和累积矿化量,这与国内外其他研究^[2-6]报道的土壤施磷量的增加可使得土壤有机碳周转速率加快的研究结果相一致。这可能是由于磷输入提高了土壤 Olsen-P 的含量(表 4),为微生物的生长提供了速效养分,促进了微生物的活性^[6],从而提高 BG 酶活性(表 4),加速了土壤有机碳的矿化速率(图 1 和图 2),为微生物生长提供碳源^[1]。有研究表明南方土壤中,当 Olsen-P 含量为 0.32 mmol kg⁻¹左右时,对水稻生长养分供应充足^[22]。本研究中 P-0 (0.08 ~ 0.13 mmol kg⁻¹) 和 P-30 (0.14 ~ 0.20 mmol kg⁻¹) 处理下,土壤 Olsen-P 均低于 0.32 mmol kg⁻¹,只有 P-60 处理(0.27 ~ 0.47 mmol kg⁻¹) Olsen-P 含量最接近 0.32 mmol kg⁻¹,因此可以有效提高土壤中速效养分的供应。而 P-90 (0.41 ~ 0.59 mmol kg⁻¹) 中 Olsen-P 含量却明显高于 0.32 mmol kg⁻¹,磷素过剩。培养后期,由于可被微生物利用的土壤易分解有机碳组分逐渐减少,且微生物生长也需要一定比例氮磷营养元素^[3],而可利用氮素也逐渐减少,所以微生物活性减弱,使得各处理矿化速率趋于一致。因此,施磷加速了土壤有机碳的矿化,提高了土壤微生物对有机碳的利用效率。

2.2 磷肥对土壤溶解有机碳及其荧光光谱特征的影响

固相有机碳只有先进入溶液中解聚和溶解,转化为溶解有机碳(DOC)的形式,才能被微生物吸收和利用^[7]。研究发现,土壤有机碳的矿化速率动态不仅与 DOC 含量的变化趋势相一致^[23],而且与 DOC 的结构特征相关^[8]。

本研究中,DOC 含量与土壤有机碳的矿化速率变化相一致。2011 年不同采样时间,施磷均显著($p < 0.05$)提高了 DOC 的含量,与 P-0 相比分别提高了 17% ~ 20% (5 月)、12% ~ 26% (8 月)和 7% ~ 20% (11 月),且 P-60 均达到最大值。2012 年与 2011 年的 DOC 含量变化一致,施磷处理均显著($p < 0.05$)提高了 DOC 的含量。为充分了解施磷后 DOC 组成及结构的变化特征,对土壤中 DOC 进行了三维荧光光谱及紫外光谱分析,所得特征峰光谱见图 3。由图 3 可知,施磷使土壤中 DOC 的荧光光谱特征发生了明显变化。荧光峰 A ($Ex/Em = 254/438$ nm) 和 B ($Ex/Em = 254/438$ nm) 与腐殖酸(富里酸和胡敏酸)有关,是源于木质素和蛋白质的降解产物^[18]。相对于对照 P-0 处理,施磷处理下,类

表 3 磷输入土壤有机碳累积矿化量的一级动力学参数

Table 3 First-order kinetic parameters of cumulative organic carbon mineralization relative to phosphorus input

时间 Time (yyyy-mm)	处理 Treatments	潜在矿化势 Potential mineralization (mg kg ⁻¹)	矿化常数 Mineralization constant (d ⁻¹)	决定系数 Determination coefficient R ²	半周转期 Half turnover period (d)
2011-05	P-0	23.15	0.072	0.95	3.32
	P-30	27.18	0.091	0.96	3.09
	P-60	31.50	0.091	0.97	3.09
	P-90	28.61	0.101	0.96	2.99
2011-08	P-0	42.61	0.134	0.96	2.70
	P-30	46.23	0.158	0.96	2.54
	P-60	59.98	0.140	0.96	2.66
	P-90	50.72	0.174	0.95	2.44
2011-11	P-0	32.04	0.083	0.96	3.18
	P-30	36.89	0.108	0.95	2.92
	P-60	47.92	0.079	0.96	3.23
	P-90	40.15	0.093	0.96	3.07

腐殖酸荧光峰 A 和 B 发生蓝移^[24],即峰值向低发射波长方向移动,并且荧光强度减弱,这表明磷输入改变了 DOC 的组分和结构。Valencia 等^[25]认为,蓝移与 DOC 中低分子量、低芳香聚程度有关;相反,红移则代表伸展的,聚合较高芳香环结构,以及其他含有共轭不饱和键高度腐殖化的大分子增加。荧光峰的蓝移表明 DOC 中碳水化合物组分增加,而多酚类组分相对减少,从而提高 DOC 的生物可降解性和微生物的生物可利用性^[7]。腐殖化指数 (HI) 和紫外光谱特征值 (SUVA₂₈₀、SUVA₂₅₄、E_{253/203}) 用于评估 DOC 的腐殖化程度。由表 4 可知,施磷处理下腐殖化指数 HI 相对 P-0 显著降低了 5% ~ 30%,与 3D EEMs 分析的结果一致(图 3)。研究认为^[26],有机物在 254 nm 下的紫外吸收值和 E_{253/203} 主要代表芳香族化合物及具有不饱和碳碳键的一类较难分解的化合物,而施磷处理下该吸光度值的减少(表 4)则表明磷素降低了 DOC 的芳香化程度,使其向非腐殖化方向转化。SUVA₂₈₀ 同样表征有机质的方向性构化程度,其值越小,芳香性构化程度也越小^[18]。从表 4 可以看出,SUVA₂₈₀ 与 SUVA₂₅₄ 具有相同的变化趋势。因此,施磷降低了 DOC 分子量、芳香度和腐殖化程度,提高微生物对 DOC 的生物可利用性。

荧光指数 (FI) 和鲜度指数 (β/α) 是表征 DOC 中腐殖质的来源问题^[18],其值越大则表示由微生物作用产生的 DOC 的相对量越大。陆源 DOC 和生物源 DOC 的两个端源 FI 值分别是 1.4 和 1.9^[18]。本

研究中,由表 4 可知,除 2011 年 8 月和 2012 年 5 月 P-30 处理下的 β/α 值,各施磷处理均显著 ($p < 0.05$) 增加了 FI 和 β/α 值,分别较对照 P-0 增加了 1% ~ 10% 和 3% ~ 21%,其中 P-60 处理下的 FI 和 β/α 均达到了极显著水平 ($p < 0.01$)。这与 Wilson 和 Xenopoulos^[18] 对农田调查研究相一致,表明磷输入同时促进了微生物的活性,从而增加了微生物源 DOC 的产生,提高了土壤活性碳库(表 4)。

土壤生化性质与有机质荧光特征间的 Pearson 相关性矩阵如表 5 所示。Pearson 相关性表明 Ols-en-P 与 FI、 β/α 、及 E_{250/365} 呈显著正相关 ($p < 0.05$),而与 HI 和 SUVA₂₅₄ 呈显著负相关 ($p < 0.05$)。这表明磷素是驱动土壤 DOC 来源、组成和结构变化的源动力。土壤 DOC 与 FI、 β/α 、及 E_{250/365} 呈显著正相关 ($p < 0.05$),而与腐殖化指标 (HI、SUVA₂₈₀、SUVA₂₅₄、E_{253/203}) 呈显著负相关 ($p < 0.05$),说明土壤 DOC 的含量变化与其组成和结构特征具有显著的相关性。除 SUVA₂₈₀ 和 SUVA₂₅₄ 外,各有机质荧光特征值均与 BG 呈显著相关性 ($p < 0.05$),这可能是由于微生物源 DOC 是 BG 酶合成的底物^[7]。由上可知,施磷促进了 DOC 的结构简单化(图 3),降低了 DOC 分子量和腐殖化程度,提高了 DOC 的生物可降解性,增加了 DOC 中小分子如碳水化合物的比例,为微生物生长提供基质^[7],进而提高微生物源 DOC 的产生(表 4)。这主要是因为 DOC 的结构变化是微生物调控的酶促反应的结果(表 5),由于 BG

能加速纤维素降解为葡萄糖供微生物利用^[3],而磷肥的施入提高了 BG 酶的活性(表 4),所以降低了 DOC 的结构复杂度,进而提高其生物可利用性,促进微生物生长,加速有机碳的矿化(图 1 和图 2)。

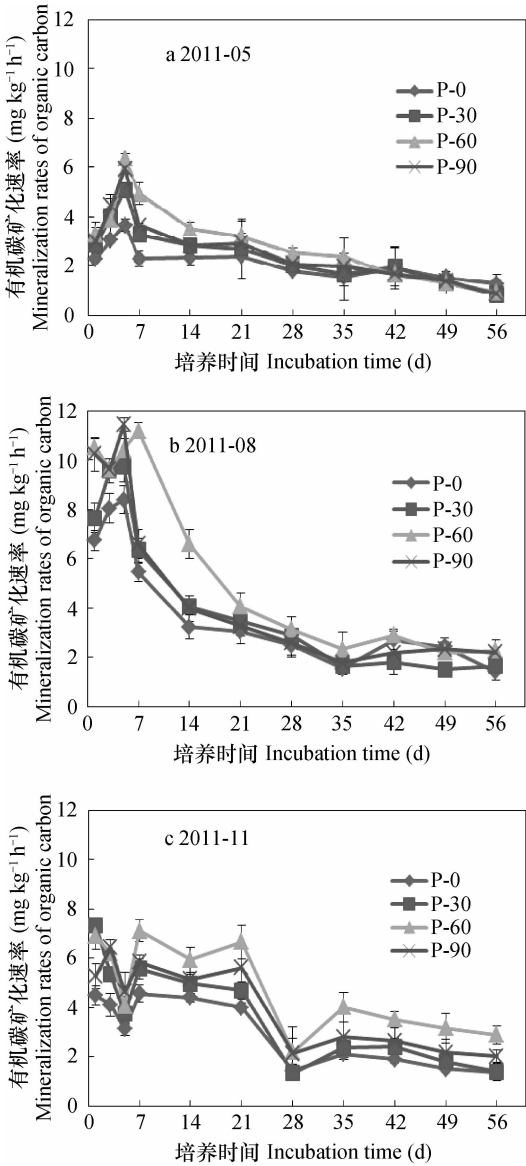


图 1 不同施磷处理水平和采样时间下土壤有机碳矿化速率的变化

Fig. 1 Change in mineralization rate of soil organic carbon as affected by phosphorus treatment and sampling time

2.3 磷肥对土壤细菌群落多样性的影响

土壤微生物群落结构和多样性变化可以影响生态系统的稳定性、生产力、以及其应对压力和扰动时的恢复力^[10],在一定程度上反映了土壤质量。利用特定引物对稻田土壤细菌群落结构进行了 454 高通量测序分析。454 测序样本共 4 个,分别对应 P-0、P-30、P-60 以及 P-90 处理,细菌总测序量

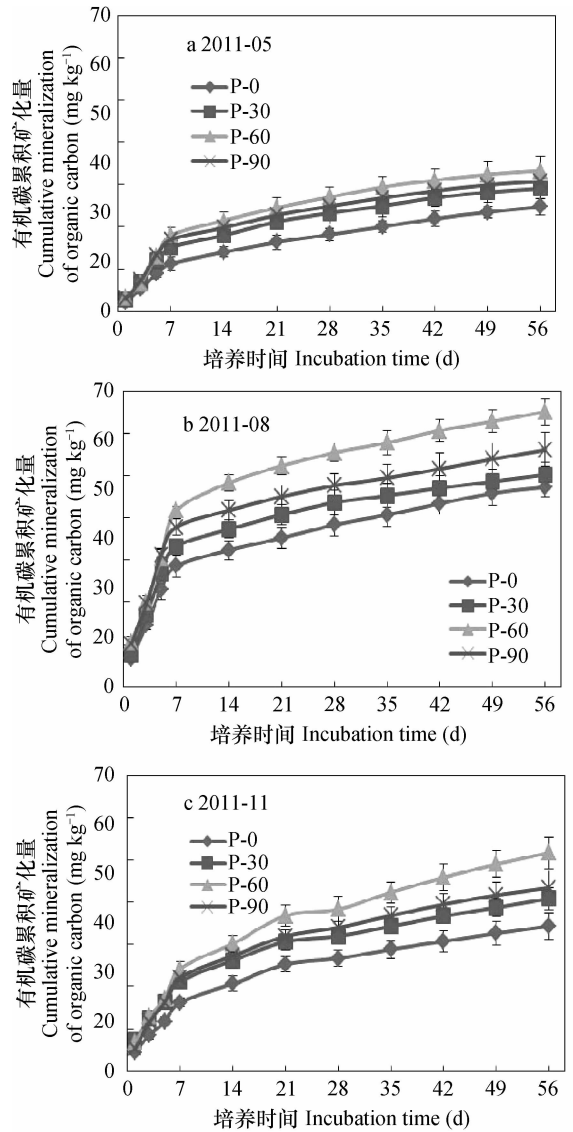


图 2 不同施磷处理水平和采样时间下土壤有机碳累积矿化量的变化

Fig. 2 Change in cumulative mineralization of the organic carbon as affected by phosphorus treatment and sampling time

为 114 423 条序列。利用 QIIME 选取大于 200 bp 的序列,进行序列优化,共得到 81 900 条序列,序列的平均长度为 487 bp。以 97% 的序列相似性为标准,共划分为 13 825 个 OTUs。

图 4 显示了基于各处理下细菌群落在科 (family) 水平上的差异进行的稻田土壤细菌群落结构的聚类分析。聚类分析表明,在科水平上,P-30 和 P-90 为一组,而 P-60 为一组。方差统计分析表明,P-30 和 P-90 处理与对照 P-0 呈显著 ($p < 0.05$) 差异,且 P-60 呈极显著 ($p < 0.01$) 差异。这说明磷输入改变了土壤细菌群落组成和结构,并且

表 4 土壤溶解有机碳荧光光谱特征及土壤生化性质的变化 (平均值 ± 标准差)

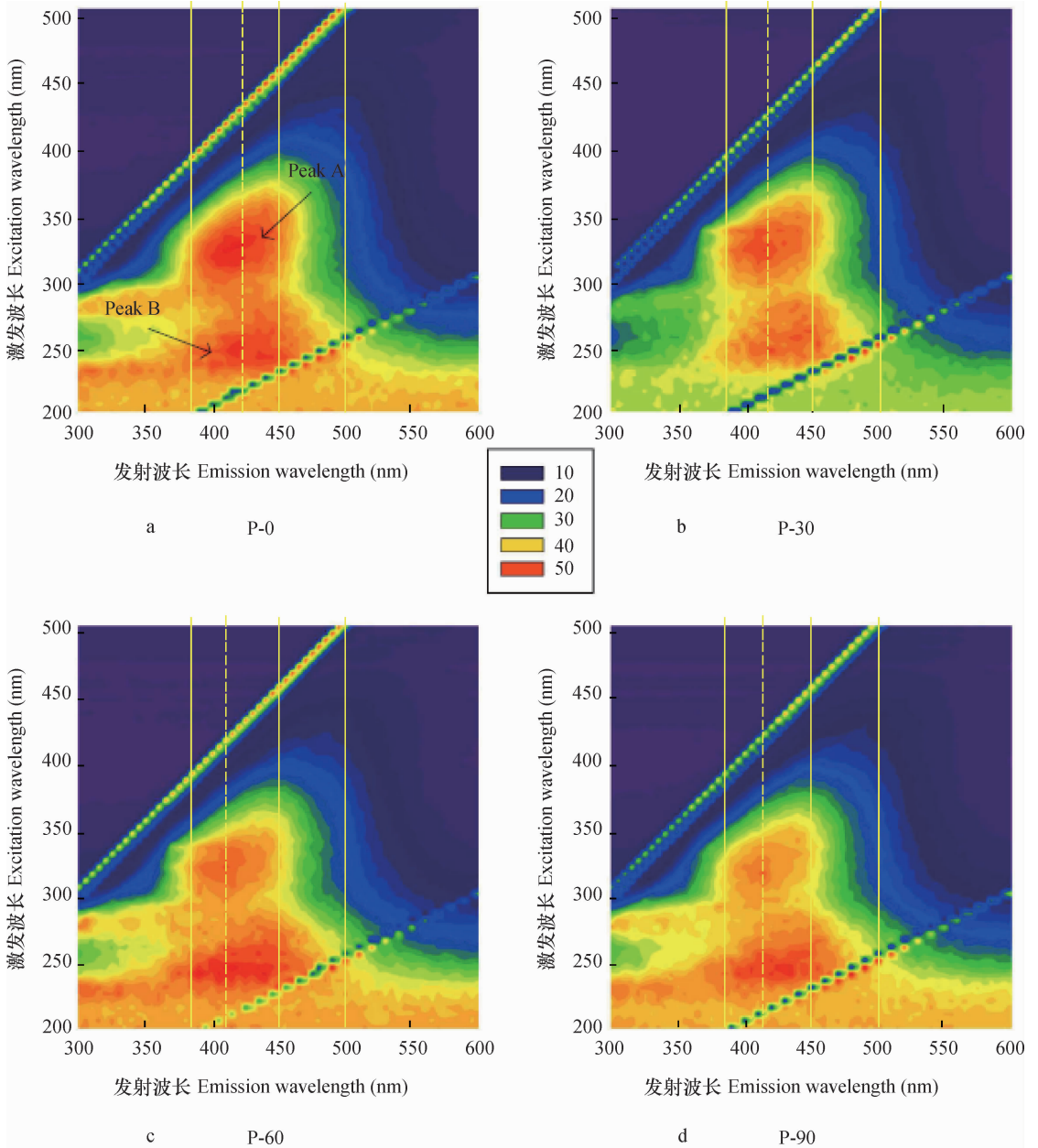
时间 Time (yyyy-mm)	土壤生化性质 Soil biochemical properties				荧光参数 Fluorescence indices			紫外参数 Spectra indices			
	处理 Treatments	速效磷 Olsen-P (mmol kg ⁻¹)	β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	溶解有机碳 Dissolved organic carbon (mmol kg ⁻¹)	荧光指数 Fluorescence index	鲜度指数 β/α index	腐殖化指数 Humification index	SUV _{A₂₃₀}	SUV _{A₂₅₄}	E _{233/203}	E _{250/245}
2011-05	P-0	0.13 ± 0.02c	80.4 ± 10.5c	296 ± 10c	1.48 ± 0.02c	0.61 ± 0.01b	0.56 ± 0.02a	0.06 ± 0.004a	0.13 ± 0.007a	0.20 ± 0.011a	6.24 ± 0.21c
	P-30	0.18 ± 0.03c	112 ± 18b	355 ± 20b	1.50 ± 0.01bc	0.66 ± 0.03ab	0.53 ± 0.01b	0.06 ± 0.003b	0.09 ± 0.006b	0.17 ± 0.004b	7.06 ± 0.11b
	P-60	0.27 ± 0.04b	126 ± 8ab	416 ± 4a	1.54 ± 0.02a	0.70 ± 0.04a	0.51 ± 0.01b	0.05 ± 0.003c	0.08 ± 0.003c	0.15 ± 0.002c	7.56 ± 0.23a
	P-90	0.41 ± 0.03a	140 ± 15a	347 ± 11b	1.51 ± 0.01ab	0.68 ± 0.02a	0.53 ± 0.01b	0.06 ± 0.002b	0.09 ± 0.004b	0.17 ± 0.005b	6.76 ± 0.20b
2011-08	P-0	0.10 ± 0.02c	146 ± 8c	350 ± 12c	1.53 ± 0.01c	0.64 ± 0.01b	0.53 ± 0.02a	0.06 ± 0.004a	0.10 ± 0.003a	0.19 ± 0.004a	5.54 ± 0.45c
	P-30	0.14 ± 0.01c	163 ± 7bc	393 ± 9b	1.54 ± 0.01bc	0.66 ± 0.01b	0.50 ± 0.01ab	0.06 ± 0.001b	0.08 ± 0.005b	0.17 ± 0.006b	6.56 ± 0.45b
	P-60	0.36 ± 0.03b	240 ± 22a	442 ± 20a	1.58 ± 0.01a	0.70 ± 0.01a	0.47 ± 0.01b	0.05 ± 0.001c	0.06 ± 0.002c	0.15 ± 0.002c	7.42 ± 0.07a
	P-90	0.56 ± 0.04a	183 ± 11b	431 ± 10ab	1.56 ± 0.02ab	0.71 ± 0.02a	0.49 ± 0.01b	0.05 ± 0.002bc	0.08 ± 0.003b	0.15 ± 0.002c	7.34 ± 0.06a
2011-11	P-0	0.09 ± 0.02d	121 ± 15c	427 ± 10c	1.54 ± 0.03b	0.63 ± 0.02c	0.49 ± 0.02a	0.06 ± 0.002a	0.07 ± 0.004a	0.16 ± 0.009a	7.31 ± 0.16c
	P-30	0.20 ± 0.02c	153 ± 19b	477 ± 9b	1.59 ± 0.03ab	0.69 ± 0.01b	0.44 ± 0.01b	0.05 ± 0.003b	0.07 ± 0.004a	0.14 ± 0.006b	9.14 ± 0.39b
	P-60	0.47 ± 0.05b	221 ± 13a	514 ± 21a	1.59 ± 0.01a	0.74 ± 0.02a	0.41 ± 0.01c	0.04 ± 0.002c	0.05 ± 0.004b	0.11 ± 0.005d	10.24 ± 0.47a
	P-90	0.59 ± 0.03a	177 ± 11b	456 ± 22ab	1.62 ± 0.02a	0.72 ± 0.02ab	0.42 ± 0.01c	0.04 ± 0.003c	0.05 ± 0.001b	0.12 ± 0.005c	9.91 ± 0.29a
2012-05	P-0	0.09 ± 0.01c	84.4 ± 8.2c	253 ± 5c	1.45 ± 0.01b	0.60 ± 0.01b	0.59 ± 0.01a	0.07 ± 0.003a	0.17 ± 0.016a	0.17 ± 0.013a	5.50 ± 0.34b
	P-30	0.17 ± 0.02c	94.8 ± 4.9b	304 ± 23b	1.51 ± 0.01a	0.62 ± 0.02b	0.54 ± 0.01b	0.07 ± 0.004ab	0.12 ± 0.011b	0.13 ± 0.006bc	6.63 ± 0.13a
	P-60	0.28 ± 0.05b	109 ± 3a	361 ± 6a	1.51 ± 0.01a	0.65 ± 0.02a	0.51 ± 0.01c	0.07 ± 0.003ab	0.09 ± 0.005c	0.13 ± 0.009c	6.85 ± 0.01a
	P-90	0.53 ± 0.09a	98.6 ± 4.0ab	335 ± 33ab	1.53 ± 0.01a	0.67 ± 0.01a	0.52 ± 0.02c	0.07 ± 0.001b	0.10 ± 0.018b	0.15 ± 0.012ab	6.85 ± 0.09a
2012-11	P-0	0.08 ± 0.01d	112 ± 11d	320 ± 7c	1.66 ± 0.02c	0.63 ± 0.01c	0.52 ± 0.03a	0.04 ± 0.001a	0.07 ± 0.007a	0.10 ± 0.002a	7.11 ± 0.16b
	P-30	0.17 ± 0.03c	157 ± 11b	352 ± 9b	1.70 ± 0.01bc	0.70 ± 0.01b	0.45 ± 0.01b	0.04 ± 0.001ab	0.05 ± 0.001b	0.09 ± 0.005ab	8.15 ± 0.77a
	P-60	0.46 ± 0.05b	173 ± 3a	430 ± 21a	1.73 ± 0.01b	0.76 ± 0.02a	0.37 ± 0.04c	0.02 ± 0.001c	0.03 ± 0.004c	0.07 ± 0.006c	8.22 ± 0.47a
	P-90	0.58 ± 0.003a	128 ± 2c	364 ± 12b	1.84 ± 0.05a	0.77 ± 0.02a	0.37 ± 0.02c	0.04 ± 0.003b	0.05 ± 0.005b	0.08 ± 0.008bc	8.34 ± 0.43a

注: 相同时间同列数据不同字母之间表示差异达 $p < 0.05$ 的显著水平. Note: Different letters in the same column at the same sampling time indicate significant difference at the 0.05 level.

表 5 土壤生化性质与溶解有机碳荧光光谱和紫外光谱特征相关性

Table 5 Pearson correlation coefficients of soil biochemical properties with soil DOC spectral properties and UV spectral properties of the paddy field soil

	荧光指数 Fluorescence index	鲜度指数 β/α index	腐殖化指数 Humification index	SUVA ₂₈₀	SUVA ₂₅₄	$E_{253/203}$	$E_{250/365}$
速效磷 Olsen-P	0.591 *	0.865 **	-0.762 **	-0.429	-0.613 *	-0.429	0.755 **
溶解有机碳 Dissolved organic carbon	0.554 *	0.881 **	-0.853 **	-0.794 **	-0.886 **	-0.748 **	0.726 **
β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	0.819 **	0.806 **	-0.705 **	-0.471	-0.383	-0.891 **	0.864 **



注: 实线表示用于计算鲜度指数的发射波长; 虚线表示最大发射波长

Note: The solid lines denotes the emission wavelengths used in the calculation of β/α ; the dashed line represents the maximum emission wavelength for the α component

图 3 土壤溶解有机碳三维荧光光谱特征

Fig. 3 Changes in soil DOC character with proportion of three-dimensional excitation-emission matrices

P-60 处理影响最大,可能是由于细菌群落中贫营养细菌和嗜营养细菌^[27]对磷素产生不同反应而导致的细菌群落结构变化。细菌群落多样性指数如表 6 可知,P-60 和 P-90 处理均显著($p < 0.05$)提高了细菌群落的物种丰度(Ace 和 Chao)。Shannon

和 Simpson 多样性指数表明,尽管各处理间 Simpson 指数没有达到显著性差异,但施磷处理下 Shannon 指数,与 P-0 相比显著($p < 0.05$)增加。这表明磷输入对微生物细菌群落的多样性也具有明显的促进作用,且 P-60 处理下达到最大值。

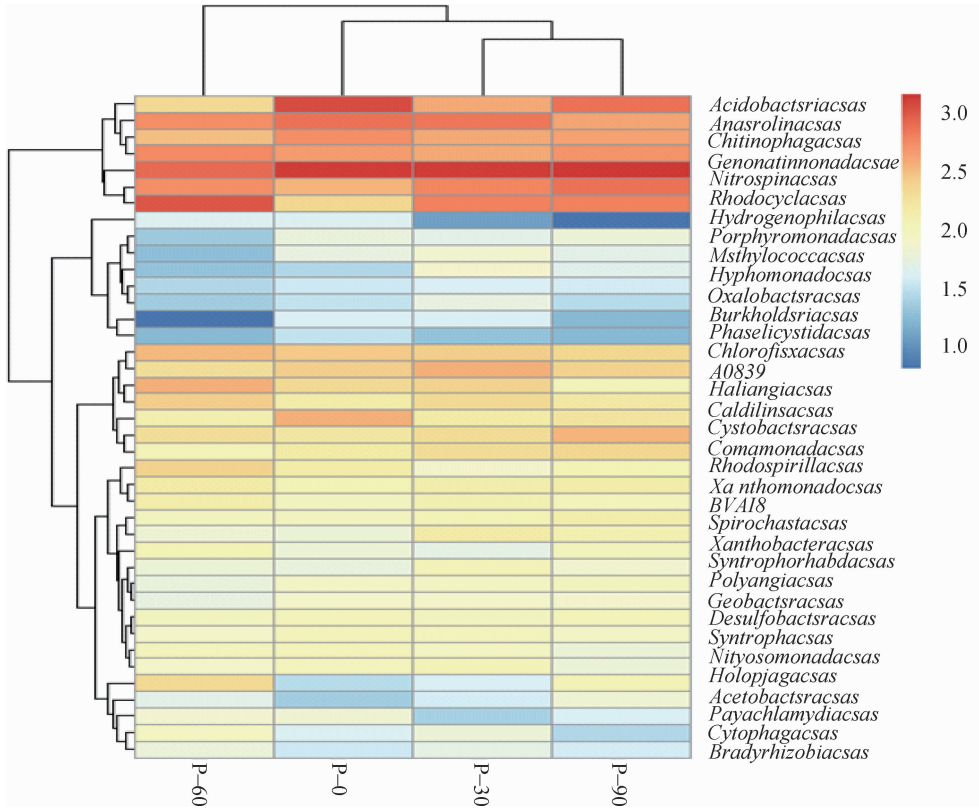


图 4 基于不同处理和细菌群落科水平上的聚类分析

Fig. 4 Hierarchical cluster analysis of bacterial distribution of families among the four treatments soil samples

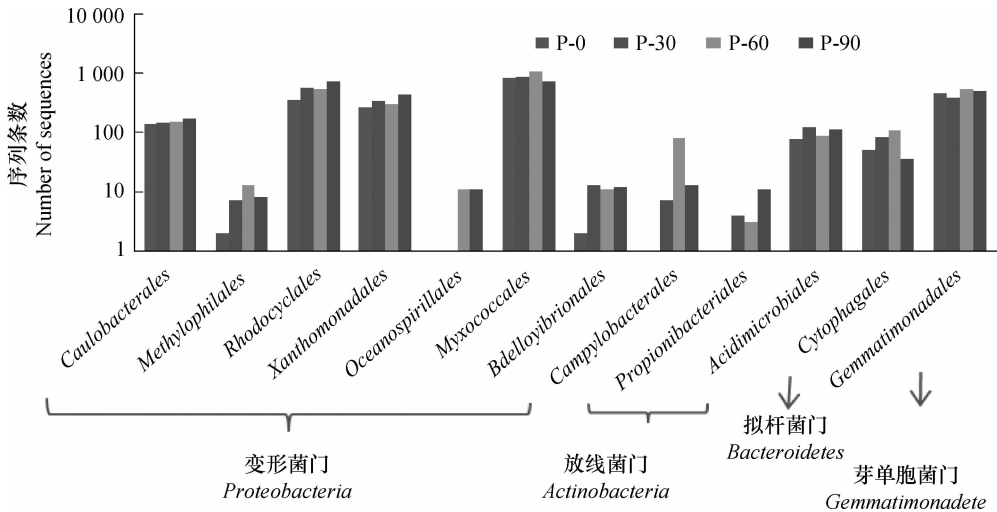


图 5 涉碳降解细菌相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of the bacteria detected responsible for carbon

表 6 细菌群落的丰度和多样性(平均值 ± 标准差)
Table 6 Richness and diversity of the bacterial community in the soil (Mean ± SD)

处理 Treatments	分类单元 OTUs	细菌群落丰度 Bacterial community richness		细菌群落多样性 Bacterial community diversity	
		覆盖度评估指数 Ace index	超指数 Chao index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
		P-0	5 550	13 532 ± 407b	10 203 ± 474b
P-30	5 785	13 359 ± 386b	10 218 ± 444b	7.86 ± 0.02b	0.001 1 ± 0.000 1a
P-60	6 178	15 065 ± 434a	11 363 ± 493a	7.97 ± 0.02a	0.001 2 ± 0.000 1a
P-90	6 004	14 664 ± 424a	10 737 ± 458ab	7.89 ± 0.02b	0.001 0 ± 0.000 1a

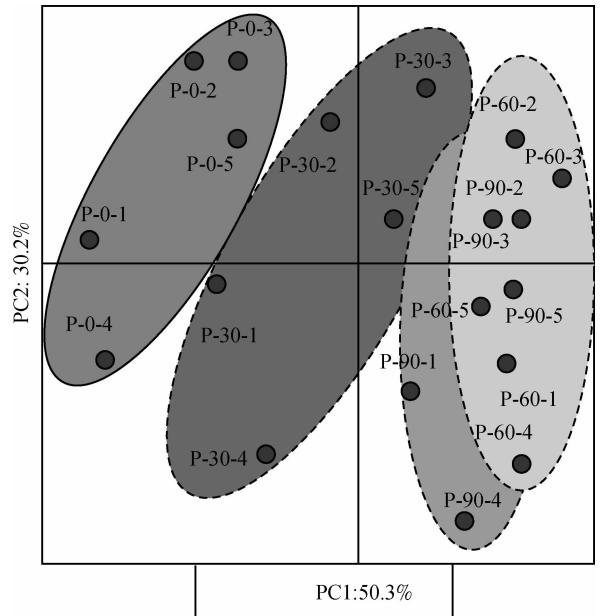
注:同列数据不同字母之间表示差异达到 $p < 0.05$ 的显著水平 Note: Different letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level

土壤中微生物种群,担负着地球 C、N、P、S 等物质循环的“调节器”,主要控制有机物的生物矿化过程,且 90% 以上有机物的矿化均是由细菌完成的^[10]。磷肥对涉碳降解细菌群落的影响,如图 5 所示。研究表明,细菌 *Proteobacteria* 门包含多种具有碳降解功能的细菌,从而降解植物残体、复杂有机物等^[28]。图 5 表明,磷输入显著增加了 8 种属于 *Proteobacteria* 门下能降解复杂有机碳化合物的细菌科水平上的细菌种类。此外, *Acidimicrobiales* 能催化产生葡萄糖苷水解酶,分解植物细胞壁,储存碳水化合物^[28]。 *Cytophagales* 也是能产生 BG 酶,从而分解纤维素的一种细菌。由图 5 可知,磷输入增加了 *Acidimicrobiales* 和 *Cytophagales*,表明磷同时促进了水解酶类的产生,进而加速了有机碳的降解。特别地,磷素诱导了 *Oceanospirillales*, *Campylobacteriales* 和 *Propionibacteriales* 三种加速碳降解菌种的产生,可能是由于这三种菌是嗜营养菌^[27]。

总体而言,磷肥施用提高了土壤 Olsen-P 的含量(表 4),为微生物生长提供了速效养分,调控 BG 酶的活性(表 4),降低了 DOC 分子量和腐殖化程度(图 3),提高了 DOC 的生物可利用性,从而促进了微生物的生长,改变了细菌群落的结构,并提高了细菌群落的丰度和多样性(图 4 和表 6)。相应地,本文的研究也表明磷诱导了多种具有能催化产生 BG 酶和降解复杂有机碳化合物的细菌增加(图 5),从而加速了土壤复杂有机碳化合物的降解以及微生物源 DOC 的产生,进而提高了土壤有机碳的矿化速率和累积矿化量。因此,磷素驱动下微生物涉碳菌落的增加,是加速活性有机碳的周转的主导因素。

此外,近期有研究表明, *Methylophilales* 和 *Rhodocyclales* 具有氧化土壤甲烷的功能^[29],这将对

温室气体排放产生重要影响。本研究表明,磷增加了 *Methylophilales* 和 *Rhodocyclales* 菌的丰度,从而加强了甲烷的氧化,减少了温室气体的排放。基于生态化学计量学原理,前人已对该研究中磷对甲烷的减排作用进行推测^[3]。 *Methylophilales* 和 *Rhodocyclales* 的丰度增加可能就是甲烷减排的基因调控机理,这将为温室气体减排提供一定指导依据。



注: 处理后数字代表不同采样次数
Note: The numbers following each treatment represent different sampling times

图 6 不同磷肥用量处理的主成分得分
Fig. 6 Principal component scores of different phosphorus treatments

2.4 土壤有机碳特征及微生物多样性的主成分分析

基于不同施磷处理有机碳矿化、DOC 荧光特征、及微生物群落结构的特征变化,得到 4 种处理土

壤在各自两个主成分上的得分情况(图6)。结果显示,第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2),可以解释总变量 80.5%。在以 PC1 所代表的得分水平上,各施肥水平大小依次为 $P-60 > P-90 > P-30 > P-0$ 。PC2 各处理没有明显的分异程度,且 PC1 显著大于 PC2,这主要是由于 PC1 对土壤质量水平的方差贡献率较大有关。此外,不同的采样季节均表现出一致的结果。因此, $P-60$ 处理最大程度提高了土壤质量, $P-90$ 和 $P-30$ 处理依次递减,对照 $P-0$ 土壤质量最低,表明磷肥输入可以提高土壤肥力水平,尤其是施磷水平介于 $30 \sim 60 \text{ kg hm}^{-2} \text{ a}^{-1}$ 对土壤有机碳的矿化及微生物多样性的提高最为明显。此外,磷素是微生物膜结构系统和其体内高磷酸化合物的主要构成元素^[10],因此,缺磷往往不利于微生物生长,进而影响整个生态系统的稳定性和生产力。

3 结 论

水稻田磷肥施入促进了土壤 Olsen-P 的累积和 BG 酶的活性,从而加速了有机碳的矿化速率和累积矿化量。然而,DOC 的芳香化程度、分子量及腐殖化程度却在施磷处理下显著降低,明显提高了 DOC 的生物可降解性。磷输入增加了 FI 和 β/α 值,说明磷肥增加了微生物源 DOC 的产生。施磷显著提高了细菌群落的丰度和多样性,尤其是诱导了多种具有涉碳降解功能的细菌增加,所以降低了 DOC 结构复杂度,加速了土壤有机碳的矿化。然而,本研究仅针对涉碳降解微生物进行了分析,但在蛋白质水平上的细胞代谢过程仍有待进一步研究,从而更好的揭示磷素循环“驱动”碳素变化的分子生物学本质,揭示微生物功能的机理过程。

参 考 文 献

- [1] Lal R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, 2004, 304(5677): 1623—1627
- [2] 刘德燕,宋长春. 磷输入对湿地土壤有机碳矿化及可溶性碳组分的影响. *中国环境科学*, 2008, 28(9): 769—774. Liu D Y, Song C C. Effects of phosphorus enrichment on mineralization of organic carbon and contents of dissolved carbon in a freshwater marsh soil (In Chinese). *China Environmental Science*, 2008, 28(9): 769—774
- [3] Li X, Wang H, Gan S, et al. Eco-stoichiometric alterations in paddy soil ecosystem driven by phosphorus application. *Plos One*, 2013, 8(5): 1—9
- [4] Huang Q R, Hu F, Huang S, et al. Effect of long-term fertilization on organic carbon and nitrogen in a subtropical paddy soil. *Pedosphere*, 2009, 19(6): 727—734
- [5] 陈小云,郭菊花,刘满强,等. 施肥对红壤性水稻土有机碳活性和难降解性组分的影响. *土壤学报*, 2011, 48(1): 125—131. Chen X Y, Guo J H, Liu M Q, et al. Effects of fertilization on lability and recalcitrancy of organic carbon of red paddy soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(1): 125—131
- [6] Liu L, Gundersen P, Zhang T, et al. Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in three forest types in tropical china. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 44(1): 31—38
- [7] Song Y Y, Song C C, Yang G S, et al. Changes in labile organic carbon fractions and soil enzyme activities after marshland reclamation and restoration in the sanjiang plain in northeast china. *Environmental Management*, 2012, 50(3): 418—426
- [8] Fellman J B, D'Amore D V, Hood E, et al. Fluorescence characteristics and biodegradability of dissolved organic matter in forest and wetland soils from coastal temperate watersheds in southeast alaska. *Biogeochemistry*, 2008, 88(2): 169—184
- [9] Bengtson P, Bengtsson G. Rapid turnover of DOC in temperate forests accounts for increased CO₂ production at elevated temperatures. *Ecology Letters*, 2007, 10(9): 783—790
- [10] 林先贵,胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能. *土壤学报*, 2008, 45(5): 892—900. Lin X G, Hu J L. Scientific connotation and ecological service function of soil microbial diversity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(5): 892—900
- [11] 胡星明,袁新松,王丽平,等. 磷肥和稻草对土壤重金属形态,微生物活性和植物有效性的影响. *环境科学研究*, 2012, 25(1): 77—82. Hu X M, Yuan X S, Wang L P, et al. Effects of phosphate fertilizer and rice straw on soil heavy metal fraction, microbial activity and phytoavailability (In Chinese). *Research of Environmental Sciences*, 2012, 25(1): 77—82
- [12] 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*, 2012, 49(6): 1—12
- [13] Wu M, Qin H, Chen Z, et al. Effect of long-term fertilization on bacterial composition in rice paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(4): 397—405
- [14] Tu C, Louws F J, Creamer N G, et al. Responses of soil microbial biomass and N availability to transition strategies from conventional to organic farming systems. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2006, 113(1/4): 206—215
- [15] Bolt G. Physico-chemical analysis of the compressibility of pure clays. *Geotechnique*, 1956, 6(2): 86—93
- [16] German D P, Weintraub M N, Grandy A S, et al. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43(7): 1387—1397
- [17] Chapin F S, McGuire A D, Randerson J, et al. Arctic and boreal ecosystems of western north america as components of the climate system. *Global Change Biology*, 2000, 6(1): 211—223
- [18] Wilson H F, Xenopoulos M A. Effects of agricultural land use on

- the composition of fluvial dissolved organic matter. *Nature Geoscience*, 2009, 2(1): 37—41
- [19] Nishijima W, Speitel G E. Fate of biodegradable dissolved organic carbon produced by ozonation on biological activated carbon. *Chemosphere*, 2004, 56(2): 113—119
- [20] Wu G D, Lewis J D, Hoffmann C, et al. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *Biomed Central Microbiology*, 2010, 10(4): 1—14
- [21] 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
- [22] 颜晓, 王德建, 张刚, 等. 长期施磷稻田土壤磷素累积及其潜在环境风险. *中国生态农业学报*, 2013, 21(4): 393—400. Yan X, Wang D J, Zhang G, et al. Soil phosphorous accumulation in long-term P fertilization paddy field and its environmental effects (In Chinese). *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2013, 21(4): 393—400
- [23] 李忠佩, 张桃林, 陈碧云. 可溶性有机碳的含量动态及其与土壤有机碳矿化的关系. *土壤学报*, 2004, 41(4): 544—552. Li Z P, Zhang T L, Chen B Y. Dynamics of soluble organic carbon and its relation to mineralization of soil organic carbon (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(4): 544—552
- [24] Mobed J J, Hemmingsen S L, Autry J L, et al. Fluorescence characterization of ihss humic substances; total luminescence spectra with absorbance correction. *Environmental Science & Technology*, 1996, 30(10): 3061—3065
- [25] Valencia S, Marin J M, Restrepo G, et al. Application of excitation-emission fluorescence matrices and UV/Vis absorption to monitoring the photocatalytic degradation of commercial humic acid. *Science of the Total Environment*, 2013, 442(1): 207—214
- [26] Hyun-Chul K, Yu M J. Characterization of aquatic humic substances to dbps formation in advanced treatment processes for conventionally treated water. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 143(1/2): 486—493
- [27] Singh B K, Bardgett R D, Smith P, et al. Microorganisms and climate change: Terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(11): 779—790
- [28] Panis G, Lambert C, Viollier P H. Complete genome sequence of caulobacter crescentus bacteriophage phicbk. *Journal of Virology*, 2012, 86(18): 10234—10235
- [29] Del Nery V, Damianovic M H Z, Pozzi E, et al. Long-term performance and operational strategies of a poultry slaughterhouse waste stabilization pond system in a tropical climate. *Resources Conservation and Recycling*, 2013, 71(1): 7—14

EFFECTS OF RATE OF PHOSPHORUS FERTILIZER ON ORGANIC CARBON MINERALIZATION AND BACTERIAL COMMUNITY DIVERSITY IN PADDY SOIL

Li Xia¹ Tian Guangming¹ Zhu Jun² Zhang Zhijian^{1*}

(1 College of Environmental & Resource Sciences of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

(2 Department of Bioproducts and Biosystems Engineering of Minnesota University, St. Paul 55108, USA)

Abstract Soil dissolved organic carbon (DOC) is an important fraction in the global carbon cycle and is critical to soil biogeochemical processes related to soil fertility and climate change. Soil bacteria play an important role in controlling soil DOC dynamics. To determine effects of phosphorus (P) fertilization rate on paddy field soil mineralization of the soil organic carbon, DOC structural complexity and bacterial community structures, a stationary field experiment, designed to have four P application rates, i. e. 0, 30, 60 and 90 kg hm⁻² a⁻¹ of superphosphate, was carried out in a paddy field, and lab analysis was performed with the 3D EEMs and 454 pyrosequencing techniques. Results show that higher P application rate raised the content of soil readily available phosphorus (Olsen-P), thus increasing the content of soil DOC, and DOC mineralization rate and accumulative mineralization as well. Analysis with the 3D EEMs demonstrates that P input increased fluorescence index and β/α index of the DOC by 1% ~ 10% and 3% ~ 21%, respectively, but decreased its humification index, which were significantly related to soil biochemical properties (Olsen-P, DOC and β -glucosidase). The results also indicate that P application increased the content of Olsen P, stimulated formation of microbe-derived DOC and meanwhile decreased the aromatization degree, molecular weight and humification degree of the DOC, thus improving the biodegradability of the DOC. P input also increased the abundance and diversity of microbial communities, and in particular, induced growth of a variety of carbon-degrading bacteria, thus speeding up degradation of complicated organic carbon and oxidation of methane. Besides, principal component analysis shows that the effect of P fertilization on mineralization of SOC and diversity of bacterial communities was the most significant when P 30 ~ 60 kg hm⁻² a⁻¹ was applied. It is, therefore, assumed that a proper rate of P applied may significantly stimulate the activity of C-degradation-related microbes, and

hence improve the biodegradability of DOC, accelerate mineralization of the soil organic carbon and promote the cycling of soil organic carbon in paddy field.

Key words Soil organic carbon; Three-dimensional excitation emission matrices; Humification; Bacterial communities; High-throughput 454 pyrosequencing

(责任编辑:汪枫生)