

DOI: 10.11766/trxb202008100448

王亚麒, 刘京, 苟剑渝, 袁玲. 长期有机无机配施下烤烟-玉米轮作优化土壤微生物活化无机磷[J]. 土壤学报, 2022, 59(3): 808-818.
WANG Yaqi, LIU Jing, GOU Jianyu, YUAN Ling. Optimization of Soil Microbial Activation of Inorganic Phosphorus in Tobacco-maize Rotation Under Long-term Combined Application of Organic and Inorganic Fertilizers[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(3): 808-818.

长期有机无机配施下烤烟-玉米轮作优化土壤微生物活化无机磷*

王亚麒¹, 刘京², 苟剑渝², 袁玲^{1†}

(1. 西南大学资源环境学院, 重庆 400715; 2. 贵州省烟草公司遵义市公司, 贵州遵义 563000)

摘要: 采集遵义市 15 年长期施肥定位试验的土壤, 包括撂荒地 (对照)、烤烟连作—单施化肥、烤烟连作—化肥有机肥配施、烤烟玉米轮作—单施化肥和烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施等处理, 通过土壤悬浊液与培养液混合培养技术、微生物高通量测序及常规分析, 研究长期施肥对土壤无机磷活化的影响。结果表明, 烤烟玉米轮作、施用有机肥和撂荒地的土壤可培养微生物 (细菌、真菌、放线菌和无机磷细菌) 数量增多, 种群多样性增加, 说明土壤生态环境改善。将土壤悬浊液接种至微生物培养液中, 培养期间混合液中的有效磷含量以烤烟玉米轮作高于烤烟连作, 化肥有机肥配施和撂荒地高于单施化肥, 其中以烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施最高, 烤烟连作—单施化肥最低, 说明合理种植和科学施肥有益于土壤无机磷的活化, 在遵义烟区提倡烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施很有必要。在混合液中, 氢离子与溶解钙磷、有机酸与溶解铁磷和铝磷显著相关。与溶磷微生物的纯培养技术相比, 土壤悬浊液培养既能反映微生物的溶磷特征, 又更接近土壤微生物菌群复杂的溶磷状况。在供试土壤微生物中, 存在柠檬酸合酶、蛋白葡萄糖脱氢酶和苹果酸合酶等的合成通路, 处理间的差异可从分子生物学角度解释合理轮作和化肥有机肥配施促进土壤无机磷活化的原因。

关键词: 土壤悬浊液; 溶磷微生物; 有机酸; 肥料; 轮作

中图分类号: S154.3 文献标志码: A

Optimization of Soil Microbial Activation of Inorganic Phosphorus in Tobacco-maize Rotation Under Long-term Combined Application of Organic and Inorganic Fertilizers

WANG Yaqi¹, LIU Jing², GOU Jianyu², YUAN Ling^{1†}

(1. College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Zunyi Company of Guizhou Tobacco Company, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: 【Objective】Mixed culture technology of soil suspension and culture medium, high-throughput sequencing, and conventional analysis methods were used to study the influence of long-term fertilization on inorganic phosphorus (P)

* 贵州省烟草公司遵义市公司科技项目 (2020XM03) 资助 Supported by the Technology Project of Zunyi Tobacco Company of Guizhou Province in China (No. 2020XM03)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lingyuannh@aliyun.com

作者简介: 王亚麒 (1992—), 男, 宁夏银川人, 博士研究生, 主要研究植物营养与环境。E-mail: 418626455@qq.com

收稿日期: 2020-08-10; 收到修改稿日期: 2021-03-17; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2021-06-29

mobilization in soil. 【Method】 Soil samples were collected from the plots of a 15-year-long experiment regarding crop cultivation and fertilization in Zunyi City, China. The treatments included (i) fallow soil (Control), (ii) consecutive flue-cured tobacco cultivation plus the application of only chemical fertilizers (C-CF), (iii) consecutive flue-cured tobacco cultivation plus the application of chemical fertilizers in combination with manures (C-CFM), (iv) flue-cured tobacco-maize rotation plus the application of only chemical fertilizers (R-CF), and (v) flue-cured tobacco-maize rotation plus the application of chemical fertilizers in combination with manures (R-CFM). The soil collected from the long-term fertilization test site was divided into two parts. A part of the soil sample was used for the mixed culture technology of soil suspension and culture solution. The method involved preparing the soil suspension (soil : sterile water = 1 : 100) and then diluting it to 10^{-5} with sterile water. 200 μ L diluent was taken and inoculated into NBRIP (National Biological Research Institute phosphate growth medium) solid medium with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 and AlPO_4 as phosphorus sources. After incubation at 30 °C for 2 days, the number of colonies with a phosphorus dissolving circle was observed. Then, another 200 μ L 1 : 100 soil suspension was taken and inoculated in 50 mL NBRIP liquid medium with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 and AlPO_4 as phosphorus sources for 16 days. At 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours after inoculation, the culture medium was drawn, and the pH, soluble inorganic phosphorus content, and organic acid content were determined. The other part of soil samples was sent to Meggie Biological Company for high-throughput sequencing to study the effect of long-term fertilization on the relative abundance of enzyme synthesis pathway related to organic acid synthesis. 【Result】The number of cultivable microorganisms (bacteria, fungi, actinomycetes and inorganic phosphate bacteria) in flue-cured tobacco-maize rotation, application of organic fertilizer and Control soil increased, and the population diversity increased. When the soil suspension was inoculated in a microbial culture medium, the content of available phosphorus was higher in the flue-cured tobacco-maize rotation than in consecutive flue-cured tobacco cultivation. Also, the available phosphorus was higher in the application of chemical fertilizers in combination with manures and Control than when only chemical fertilizers were applied; among which R-CFM was the highest and C-CF was the lowest. In the mixture, hydrogen ions were significantly correlated with dissolved $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, and organic acids were significantly correlated with dissolved FePO_4 and AlPO_4 . This indicates that compared with pure culture technology of phosphorus-mobilizing microbes, soil suspension culture can not only reflect the phosphorus-mobilizing characteristics of microorganisms but also be closer to the complex phosphorus solubilization status of soil microbial flora. In high-throughput sequencing, the relative abundance of the synthetic pathways of citrate (Si)-synthase, protein glucose dehydrogenase and malate synthase in the soil of R-CFM was significantly higher than that of other treatments. 【Conclusion】 Optimal crop cultivation and scientific fertilization are conducive to the activation of soil inorganic phosphorus, and R-CFM can be promoted as a flue-cured tobacco demonstration cultivation model for widespread promotion in Zunyi tobacco areas. Soil suspension culture can be used as an extension of pure microbial liquid culture as (a) it is closer to the complex phosphorus solubilization status of soil microbial flora, (b) effectively characterizes the ability of PMM to activate inorganic phosphorus, and (c) supplements the deficiencies of pure microbial liquid culture technology. The difference in the relative abundance of enzyme synthesis pathways related to the synthesis of organic acids also explains the reason for rational crop rotation and combined application of chemical fertilizers and manures to promote the activation of soil inorganic phosphorus from the perspective of molecular biology.

Key words: Soil suspension; Phosphorus-mobilizing microbes; Organic acid; Fertilizer; Rotation

在贵州省黔北地区，旱地以种植玉米和烤烟为主，因烤烟经济价值高于玉米，导致烤烟连作较普遍，长期连作引起生产力下降，而轮作是缓解连作障碍，提高经济和生态效益的重要方法^[1-2]。在当地，劳动力缺乏，以单施化肥为主。大量研究表明，化肥有机肥配施是解决农田可持续发展的重要手

段^[3-4]。磷是植物生长的必需元素之一。土壤中的磷以无机和有机形式存在，前者一般占土壤全磷的60%~80%，后者占20%~40%^[5]。由于钙、镁、铁、铝的固定作用，土壤溶液中的磷和施入土壤的磷肥迅速与之结合，形成难溶性磷酸盐，有效性降低，磷肥利用率一般不足30%^[6]。为了满足作物的磷素

营养和高产优质的需要, 过量施用磷肥的现象十分普遍, 由此产生了一系列如肥料浪费、环境污染和土壤磷积累等生产和环境问题。因此, 以黔北地区主要种植和施肥模式为对象, 利用长期定位试验, 研究土壤磷的转化供应及其机制, 有益于挖掘土壤供磷潜力, 提高磷肥利用率, 减施磷肥。

微生物是土壤的重要成分, 参与土壤有机质循环、养分转化和毒物降解等生物化学过程^[7]。其中, 活化磷的微生物 (phosphorus-mobilizing microbes, PMM) 能溶解难溶性无机磷和矿化有机磷, 提高土壤磷的有效性和磷肥利用率。在溶解无机磷的微生物中, 分泌氢离子和有机酸 (如甲酸、草酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸和葡萄糖酸等) 起重要作用^[8-9]; 目前, 人们普遍采用分离培养技术研究土壤 PMM 的种群、数量和功能。但是, 分离培养技术仅能获得 1%~3% 的土壤微生物^[10], 不能全面真实反映土壤 PMM 的种类、数量、多样性及其功能。此外, 土壤中的微生物互相影响和互相作用, PMM 活化磷是在多种微生物共存的条件下去进行的, 单独进行的分离培养难以反映 PMM 活化磷的实际情况。相对而言, 利用不同难溶性无机磷 (如 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 FePO_4 和 AlPO_4 等) 做磷源, 研究土壤悬浊液的溶磷作用, 可能更加真实地反映多种微生物共同存在的条件下, PMM 活化磷的特征^[11]。为此, 本研究利用 15 年的长期种植施肥的土壤, 制备土壤悬浊液, 研

究了土壤微生物对磷的活化作用, 并结合磷活化功能基因的丰度分析, 揭示了合理轮作和科学施肥提高土壤磷的有效性和磷肥利用率的机理, 为改善土壤功能和减肥增效提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

土壤肥力肥效长期定位监测基地位于贵州省遵义市烟草公司三岔镇科技园 (27°32'2"N, 106°56'32"E, 海拔 885 m)。当地天然植被为常绿亚热带阔叶林, 年均气温 15.5℃, 年均降水 1 100 mm, 年均蒸发量 550 mm。试验始于 2004 年春, 土壤类型为石灰岩发育的黄壤, 2019 年土壤理化性质见表 1。

试验处理包括: (1) 撂荒地 (CK), (2) 烤烟连作—单施化肥 (C-CF), (3) 烤烟连作—化肥有机肥配施 (C-CFM), (4) 烤烟玉米轮作—单施化肥 (R-CF), (5) 烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施 (R-CFM)。玉米施用 $\text{N } 120 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 、 $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ } 90 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 、 $\text{K}_2\text{O } 90 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, 烤烟施用 $\text{N } 100 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 、 $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ } 50 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 和 $\text{K}_2\text{O } 200 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$; 由烤烟专用复合肥、尿素、过磷酸钙和硫酸钾提供; 有机肥为遵义市烟草公司提供的专用有机肥 (N 2%、 P_2O_5 1% 和 K_2O 1%)。在化肥有机肥配施的处理中, 养分含量以氮计, 化学氮和有机氮各 50%, 不足的磷钾由过磷酸

表 1 土壤理化性质 (2019 年)

Table 1 Soil physicochemical properties in 2019

试验处理 Treatment	pH	有机质	全氮	全磷	全钾	碱解氮	有效磷	速效钾
		Organic matter /($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Total N /($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Total P /($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Total K /($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	NaOH-hydrolyzed N /($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Olsen P /($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Available K /($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
CK	7.68±0.10a	19.54±1.37d	0.85±0.01c	0.59±0.01b	19.57±0.99b	83.27±6.98c	15.89±0.46b	274.0±14.44b
C-CF	7.36±0.42a	21.52±0.82c	1.45±0.09b	0.72±0.00a	21.69±0.51a	93.86±2.09b	22.44±0.87a	308.6±16.73ab
C-CFM	7.59±0.10a	25.28±0.42a	1.5±0.05ab	0.72±0.00a	21.95±0.71a	102.8±4.69a	21.96±2.19a	316.4±46.61ab
R-CF	7.66±0.13a	23.48±0.28b	1.45±0.04b	0.73±0.00a	22.14±0.33a	90.17±6.18bc	23.58±4.13a	305.0±26.85ab
R-CFM	7.63±0.03a	25.38±0.45a	1.57±0.01a	0.72±0.00a	22.35±0.81a	102.9±3.88a	24.6±1.97a	331.4±38.48a

注: CK: 撂荒地; C-CF: 烤烟连作-单施化肥; C-CFM: 烤烟连作-化肥有机肥配施; R-CF: 烤烟玉米轮作-单施化肥; R-CFM: 烤烟玉米轮-化肥有机肥配施。在同一列中, 有不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。Note: CK: abandoned soil; C-CF: continuous flue-cured tobacco cropping-application of only chemical fertilizers; C-CFM: continuous flue-cured tobacco cropping-application of chemical fertilizers in combination with organic fertilizers; R-CF: flue-cured tobacco and maize rotation-application of only chemical fertilizers; R-CFM: flue-cured tobacco and maize rotation-application of chemical fertilizers in combination with organic fertilizers. In each column, data followed by different small letters are significantly different at $P < 0.05$. The same below unless stated otherwise.

钙和硫酸钾补充,使各处理的 NPK 用量相等。试验采用随机完全区组设计,各处理重复三次,小区面积 20 m^2 ($4\text{ m} \times 5\text{ m}$)。奇数年全部种植烤烟,偶数年烤烟-玉米轮作,供试烤烟品种 K326,供试玉米品种筑黄 3 号,行株距均为 $0.8\text{ m} \times 0.7\text{ m}$,种植管理同当地大田生产。

1.2 试验方法

在晴朗多日后,各小区随机选取 9 株植株,用抖根法采集根际土壤,混合均匀,分为两份。一份 50 g 土样 -80°C 保存,送上海美吉生物科技有限公司进行 16S rRNA 和 18S rRNA 基因测序和数据处理。具体方法是:用 E.Z.N.A.® Soil Kit 试剂盒提取土壤总 DNA,经纯化和检测等预处理后,以 338F ($5' \text{-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3}'$) 和 806R ($5' \text{-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3}'$) 为引物,PCR 扩增 16S rDNA 的 V3~V4 高变区,再经回收定量,利用 Illumina 高通量测序平台进行测序,去除测序得到的原始数据中可能存在的 PCR 扩增与测序错误,得到优化序列,按照 97%相似性对非重复序列(不含单序列)进行聚类,在聚类过程中去除嵌合体,将所有优化序列映射至操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)代表序列,形成 OTU。最后,利用 Mothur 软件计算土壤细菌的查欧(Chao)丰富度指数、希普(Heip)均匀度指数、香农(Shannon)多样性指数和辛普森(Simpson)优势度指数;通过每个 OTU 对应的 Greengene ID,获得 OTU 对应的 COG 家族信息和 KEGG Orthology (KO)信息,根据该信息可以从 EggNOG 数据库中解析到各个 COG 的描述信息,及其功能信息,计算得到微生物活化土壤无机磷的相关通路的丰度。

将另一份 250 g 土样磨细过 0.5 mm 筛,制备出土壤悬浊液(土:无菌水=1:100),再用无菌水稀释至 10^{-5} 。取 200 μL 稀释液,分别接种于由 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 FePO_4 和 AlPO_4 (以下简称钙磷、铁磷和铝磷)为磷源的 NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate growth medium) 固体培养基^[12]。30 $^\circ\text{C}$ 培养 2 d,观察出现溶磷圈的菌落数。用牛肉膏蛋白胨培养基,马铃薯-糖培养基和高氏培养基分别对土壤细菌、真菌和放线菌进行计数^[13]。另取 200 μL 1:100 的土壤悬浊液,分别接种于 50 mL 由钙磷、铁磷和铝磷为磷源的 NBRIP 液体培养

基(初始 pH 调节为 7.00,有效磷含量为 0,合称混合培养液,分别简称钙磷混合液、铁磷混合液和铝磷混合液,下同),培养 6 d (30 $^\circ\text{C}$ 、160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)。分别在接种后 12、24、48、72、96、120 和 144 h,吸取培养液,5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,测定 pH(电位法)和上清液中可溶性无机磷含量(钼锑抗比色法)^[14]。在培养结束后,用高效液相色谱仪(HITACHI Co., Ltd, Tokyo, 日本)测定上清液有机酸含量^[15]。色谱条件为色谱柱:Ion-300 有机酸分析专用柱(Phenomenex, Torrance, CA, 美国),进样量:20 μL ,流动相:2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸,流速:1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温:35 $^\circ\text{C}$,压力 450 psi (1 psi=6.895 kPa),检测器:Diode Array L-7455 紫外检测器,检测波长:210 nm。检测的有机酸包括柠檬酸、葡萄糖酸、丁二酸、乳酸、甲酸、乙酸和苹果酸,其出峰时间依次为 13.70、15.40、16.62、18.63、20.80、21.69 和 22.90 min。

1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),邓肯(Duncan)法比较处理间的差异显著性,Excel 2016 软件进行基本计算和作图。

2 结果

2.1 不同处理土壤中的可培养微生物

在不同处理的土壤中,微生物种群存在显著差异(表 2),表现为:(1)与单施化肥相比,化肥有机肥配施显著降低真菌数量,但增加土壤可培养微生物(细菌、真菌和放线菌之和,下同)、细菌、放线菌、溶磷微生物(包括溶解钙磷、铁磷和铝磷的微生物,下同)数量;(2)与烤烟连作相比,在烤烟玉米轮作的土壤中,可培养微生物、细菌、放线菌、真菌和溶磷微生物数量的变化趋势类似化肥有机肥配施(与部分处理间的差异未达显著水平);(3)在烤烟连作-单施化肥的处理中,真菌最多(与烤烟玉米轮作—单施化肥处理间的差异未达显著水平),可培养微生物、细菌、放线菌和溶磷微生物最少;(4)在烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施的土壤中,可培养微生物、细菌、真菌、放线菌和溶磷微生物的数量与烤烟连作—单施化肥的处理相反(与部分处理间的差异未达显著水平)。

表 2 土壤可培养微生物数量

Table 2 Number of culturable soil microorganisms (mean±SD, n=3)

处理 Treatment	微生物总数 Total microbial/ (10 ⁷ cfu·g ⁻¹)	细菌数 Bacteria/ (10 ⁷ cfu·g ⁻¹)	真菌数 Fungi/ (10 ⁴ cfu·g ⁻¹)	放线菌数 Actinomycetes/ (10 ⁶ cfu·g ⁻¹)	Ca-P 解磷菌数 Ca-P PSB/ (10 ⁵ cfu·g ⁻¹)	Fe-P 解磷菌数 Fe-P PSB/ (10 ⁵ cfu·g ⁻¹)	Al-P 解磷菌数 Al-P PSB/ (10 ⁵ cfu·g ⁻¹)
CK	3.09±0.10b	2.75±0.12b	1.24±0.09b	3.44±0.21b	0.87±0.04b	1.60±0.09b	1.72±0.08b
C-CF	1.98±0.12e	1.73±0.10e	1.56±0.11a	2.55±0.19c	0.52±0.04e	0.98±0.05e	1.08±0.06e
C-CFM	2.86±0.09c	2.43±0.08c	1.24±0.09b	4.34±0.15a	0.77±0.03c	1.33±0.04c	1.52±0.05c
R-CF	2.35±0.12d	2.04±0.10d	1.45±0.09a	3.15±0.19b	0.63±0.03d	1.15±0.06d	1.27±0.06d
R-CFM	3.73±0.19a	3.27±0.17a	1.23±0.12b	4.63±0.21a	1.05±0.06a	1.87±0.10a	2.04±0.10a

注: Ca-P: Ca₃(PO₄)₂; Fe-P: FePO₄; Al-P: AlPO₄。The same below unless stated otherwise.

2.2 不同处理土壤微生物的群落特征

高通量测序检测出细菌 16S rRNA 基因 30 802~43 244 片段, 真菌 18S rRNA 基因 30 228~40 020 片段。据此计算的细菌群落特征值(表 3)表明, 各处理土壤的查欧丰富度指数无显著差异, 变化于 1 691~1 751; 希普均匀度指数烤烟连作—单施化肥和撂荒地(0.36~0.38)显著低于烤烟玉米轮作和烤烟连作—化肥有机肥配施(0.42~0.44); 香农多样性指数烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施最高, 烤烟连作—单施化肥最低; 辛普森优势度指数烤烟连作—单施化肥最高, 烤烟玉米轮作和烤烟连作—化肥有机肥配施最低。真菌群落特征值查欧丰富度指数无显著差异; 希普均匀度指数由高到低依次为: 撂荒地(0.21)、单施化肥处理(0.16)、化肥有机肥配施(0.11~0.12); 香农多样性指数撂荒地最高, 烤烟连作—化肥有机肥配施最低; 辛普森优势度指数化

肥有机肥配施最高(0.10~0.12), 撂荒地最低(0.05)。

2.3 不同处理对土壤无机磷的活化

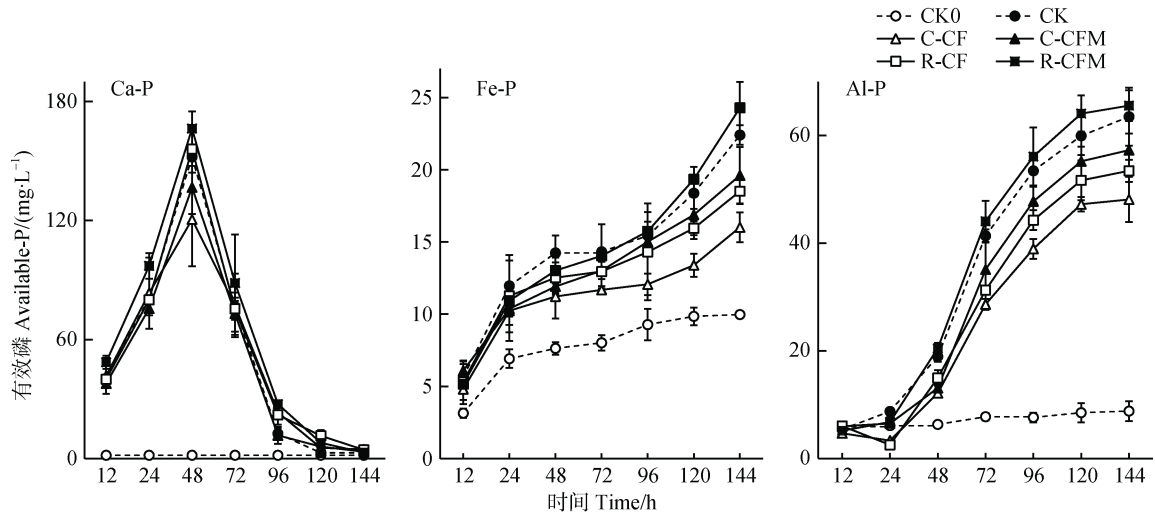
图 1 是培养期间各混合培养液的有效磷变化。在土壤悬浊液+钙磷培养液(简称钙磷混合液, 下同)中, 有效磷变化呈单峰曲线, 峰值以烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施者最高, 烤烟连作—单施化肥者最低; 培养结束时各钙磷混合培养液中的有效磷无显著差异。在土壤悬浊液+铁磷培养液或铝磷培养液(简称铁磷或铝磷混合液, 下同)中, 有效磷随培养时间延长而上升, 但铝磷混合液的升速和升幅大于铁磷混合液; 培养结束时, 各混合液中的有效磷高低顺序同钙磷混合液峰值时的变化。

此外, 在钙磷混合液中, 有效磷峰值为 120.5~166.4 mg·L⁻¹, 培养结束时变化于 1.69~4.42 mg·L⁻¹; 在铁磷和铝磷混合液中, 培养结束时分别变化于 16.02~24.29 mg·L⁻¹ 和 48.11~65.54 mg·L⁻¹。

表 3 土壤微生物群落特征

Table 3 Community characteristics of soil microorganisms

处理 Treatment	细菌 Bacteria					真菌 Fungus				
	OUT 数量	香农	辛普森	查欧	希普	OUT 数量	香农	辛普森	查欧	希普
	OTU number	Shannon	Simpson	Chao	Heip	OTU number	Shannon	Simpson	Chao	Heip
CK	1 561±30b	6.42±0.01d	0.0036±0b	1 706±20a	0.38±0.01b	137±8b	3.37±0.09a	0.05±0.01c	153±11a	0.21±0.02a
C-CF	1 538±10b	6.32±0e	0.0041±0.0002a	1 692±15a	0.36±0.02b	144±12ab	3.15±0.12abc	0.08±0.01b	146±10a	0.16±0.03b
C-CFM	1 552±3b	6.48±0.03c	0.003±0.0001c	1 706±22a	0.42±0.01a	152±11ab	2.9±0.05c	0.12±0.01a	163±11a	0.11±0.03c
R-CF	1 642±13a	6.53±0.01b	0.0029±0.0001c	1 739±94a	0.42±0.02a	161±10a	3.27±0.33ab	0.07±0.01bc	163±11a	0.16±0.02b
R-CFM	1 668±32a	6.58±0.01a	0.0028±0.0001c	1 752±113a	0.44±0.02a	152±12ab	2.97±0.05bc	0.1±0.01a	161±11a	0.12±0.02bc



注：CK0：液体培养基，下同。Note: CK0: liquid culture medium, the same below.

图 1 混合液有效磷的变化

Fig. 1 Changes of available P in the mixture of soil suspension and culture solution

2.4 混合液中的 pH 和有机酸的变化

图 2 是土壤悬浊液+不同磷源的培养液(简称不同磷源的混合液)的 pH 变化。其中,各处理钙磷混合液的 pH 先迅速降低,降至最低值后升高,不接种者无显著变化,各钙磷混合液之间的 pH 最终无显著差异;各处理铁磷混合液的 pH 持续降低,培养早期降速快,后期降速慢,不接种降幅最小,烤烟连作—单施化肥者降幅次之,烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施土壤的铁磷混合液降幅最大;铝磷混合液的 pH 变化类似铁磷混合液,但前期 pH 下降更快,培养 48 h 后几乎无显著变化。

此外,钙磷混合液的最低 pH 变化于 4.37~4.81,显著高于铁磷和铝磷混合液的最低 pH (1.76~2.44)。

在各混合液中,均检测到柠檬酸和乙酸;在钙磷混合液中能检测到丁二酸和甲酸;在钙磷、铁磷和铝磷混合液中能检测到葡萄糖酸、苹果酸、丁二酸、乳酸和甲酸(表 4)。就总有机酸而言,钙磷混合液、烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施和撂荒地制备的铁磷和铝磷混合液的含量最高,且无显著差异;烤烟连作—单施化肥的土壤悬浊液和铁铝磷制备的混合液最低。

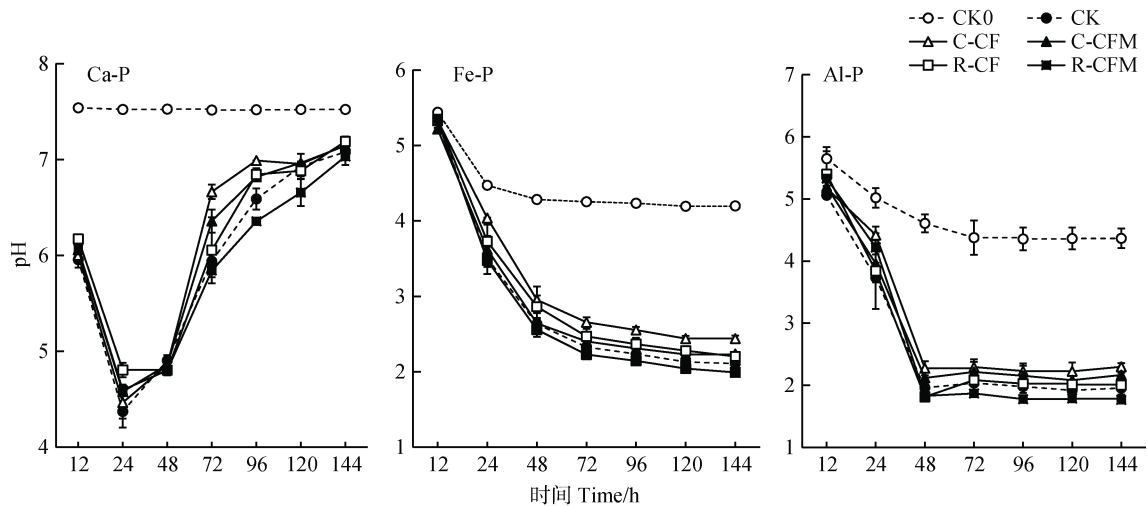


图 2 混合液 pH 的变化

Fig. 2 pH changes in the mixture of soil suspension and culture solution

表 4 不同混合液中有机酸含量

Table 4 Concentration of organic acids in mixture of soil suspension and culture solution/ (mg·mL⁻¹, mean±SD, n=3)

磷源	处理	柠檬酸	葡萄糖酸	苹果酸	丁二酸	乳酸	甲酸	乙酸	总有机酸
P source	Treatments	Citric acid	Glucose acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	Total organic acid
Ca-P	CK	0.85±0.11ab	ND	ND	0.10±0.02b	ND	0.05±0.01a	0.53±0.03a	1.52±0.11a
	C-CF	0.73±0.05b	ND	ND	0.15±0.03a	ND	0.01±0.00c	0.54±0.03a	1.43±0.06a
	C-CFM	0.81±0.02ab	ND	ND	0.11±0.01ab	ND	0.03±0.01b	0.55±0.05a	1.50±0.04a
	R-CF	0.79±0.10b	ND	ND	0.13±0.01ab	ND	0.02±0.00bc	0.48±0.21a	1.42±0.32a
	R-CFM	0.95±0.04a	ND	ND	0.15±0.02a	ND	0.01±0.00c	0.56±0.07a	1.67±0.05a
Fe-P	CK	0.24±0.01b	ND	0.11±0.01bc	ND	0.74±0.18a	0.03±0.00a	0.53±0.00b	1.67±0.20ab
	C-CF	0.08±0.00d	ND	0.07±0.00c	ND	0.23±0.07d	ND	0.23±0.00d	0.62±0.07d
	C-CFM	0.12±0.01c	ND	0.21±0.03a	ND	0.53±0.01b	ND	0.34±0.06c	1.21±0.08c
	R-CF	0.10±0.01d	0.56±0.07a	0.13±0.01b	ND	0.26±0.13cd	0.03±0.02a	0.36±0.01c	1.43±0.11bc
	R-CFM	0.27±0.01a	0.33±0.13b	0.13±0.02b	ND	0.45±0.07bc	0.03±0.01a	0.61±0.02a	1.82±0.20a
Al-P	CK	0.47±0.01a	ND	0.11±0.01b	ND	1.06±0.08a	0.11±0.01a	0.92±0.02b	2.68±0.07a
	C-CF	0.12±0.00d	ND	0.03±0.00e	ND	0.31±0.02e	ND	0.36±0.03d	0.81±0.03d
	C-CFM	0.16±0.03c	ND	0.07±0.00c	ND	0.67±0.02c	ND	0.51±0.08c	1.42±0.04b
	R-CF	0.16±0.00c	ND	0.05±0.01d	ND	0.42±0.02d	ND	0.48±0.03c	1.11±0.04c
	R-CFM	0.21±0.01b	ND	0.13±0.02a	ND	0.92±0.07b	0.11±0.01a	1.37±0.08a	2.74±0.15a

注: ND 表示未检测到有机酸。Note: ND means no organic acid is detected.

相关分析(表 5)表明,在三种不同的混合液中,有效磷均与柠檬酸呈显著或极显著正相关($r=0.575\sim 0.862$, $n=15$, $P<0.05$ 或 0.01);在铁磷和铝磷混合液中,有效磷与总有机酸($r=0.886\sim 0.973$, $n=15$, $P<0.01$)呈极显著正相关,其中,有效磷与乳酸、甲酸和乙酸呈显著或极显著正相关($r=0.629\sim 0.951$, $n=15$, $P<0.05$ 或 0.01);但仅

在铝磷混合液中,有效磷与苹果酸呈极显著正相关($r=0.983$, $n=15$, $P<0.01$)。

2.5 土壤微生物群落的功能组成预测

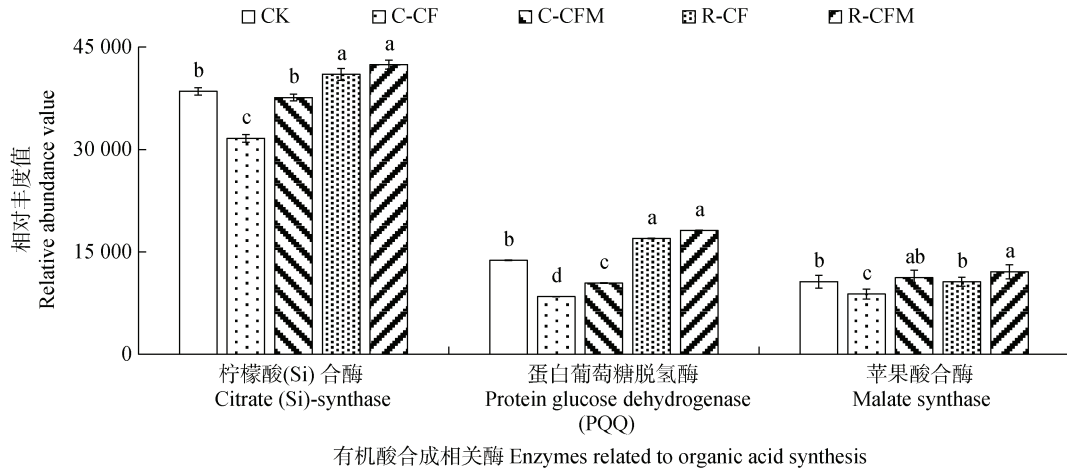
由图 3 可知,5 种处理的柠檬酸(Si)合酶、蛋白葡萄糖脱氢酶和苹果酸合酶合成通路的相对丰度由高到低依次为:R-CFM、R-CF、CK、C-CFM、C-CF,烤烟玉米轮作处理、撂荒地处理、烤烟连作处理。

表 5 混合液中有效磷与有机酸间的相关性

Table 5 Correlation analysis of available P and organic acids in mixture of soil suspension and culture solution

磷源	柠檬酸	葡萄糖酸	苹果酸	丁二酸	乳酸	甲酸	乙酸	总有机酸
P source	Citric acid	Glucose acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	Total organic acid
Ca-P	0.575*	NC	NC	0.389	NC	-0.354	0.041	0.407
Fe-P	0.862**	0.156	0.334	NC	0.629*	0.659**	0.895**	0.886**
Al-P	0.620*	NC	0.983**	NC	0.951**	0.889**	0.918**	0.973**

注: **表示 $P<0.01$; * $P<0.05$; NC 表示缺乏数据。Note: ** means $P<0.01$; * means $P<0.05$; NC means that there is no data to calculate.



注：图中不同小写字母表示同种酶不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Different lowercases indicate significantly difference ($P < 0.05$) between different treatments.

图3 柠檬酸(Si)合酶、蛋白葡萄糖脱氢酶和苹果酸合酶合成通路的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of synthesis pathways of citric acid (Si) synthase, protein glucose dehydrogenase and malate synthase

3 讨论

3.1 长期种植施肥对土壤微生物数量和种群结构的影响

一般而言，土壤微生物的数量较多，说明土壤生态环境良好，适宜它们生长繁殖；微生物群落的多样性指数高，意味着微生物种群丰富，多种微生物共存；优势度指数低，表明单一微生物尤其是病原微生物不能过度繁殖^[16]。因此，在肥沃健康的土壤中，微生物数量较多，种群比较丰富^[17]。在烤烟玉米轮作、化肥有机肥配施和撂荒地处理的土壤悬浊液中，可培养微生物、细菌和放线菌分别高于烤烟连作和单施化肥的处理（表2），说明轮作、施用有机肥和休闲改善了生态环境，提供了丰富多样的营养物质，有益于上述微生物生长繁殖，数量增加，种群增多，与前人研究^[18-19]类似。其中，在烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施的土壤中，可培养微生物、细菌和放线菌最多，土壤微生物群落特征值总体较优。因此，就土壤微生物的角度而言，合理种植和科学施肥对于培肥土壤较休耕的效果更好，在遵义烟区提倡烤烟玉米轮作和有机无机配施，能将粮食生产和经济效益充分结合，比较适宜当地人多地少的实际情况。

3.2 土壤悬浊液对无机磷的溶磷作用

将土壤用纯水按比例稀释后得到土壤悬浊液。与原土相比，土壤悬浊液中的微生物数量应呈比例减少，但其组成与土壤相似，研究土壤悬浊液对无机磷的溶解作用可大体反映原土壤微生物活化无机磷的总体状况。在培养过程中，钙磷混合液的有效磷峰值为铁磷和铝磷混合液的2.51倍~7.52倍（图1），说明供试土壤微生物活化钙磷的能力可能大于铁磷和铝磷。在分别供给三种无机磷源条件下，混合培养液有效磷的峰值以烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施者最高，烤烟连作—单施化肥者最低（图1），意味着长期实施烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施可能提高了土壤微生物活化无机磷的能力，有益于土壤磷素供应和提高磷肥利用率；长期烤烟连作—单施化肥则相反，土壤供磷和磷肥利用率降低。

在溶磷微生物的纯培养中，以有效磷的变化来指示溶磷能力^[20-21]。在本试验中，土壤悬浊液在钙磷、铁磷和铝磷这三种混合培养液中，有效磷的变化类似于微生物纯培养^[22]。混合培养液的有效磷变化是微生物活化与利用、化学溶解与固定等综合作用结果。研究^[9, 23]表明，多数溶磷微生物溶解钙磷的速率一般较快。在微生物培养过程中，微生物生长和代谢呈“S”曲线，导致混合液有效磷先迅速上升，丰富的有效磷同时也促进了微生物迅速生长繁

殖；随着微生物生长速率降低和对有效磷的利用，导致混合培养液中有效磷降低。相反，微生物溶解铁磷和铝磷的速率较为缓慢^[9, 24-25]。在培养过程中，土壤微生物尚未进入磷活化大于磷利用周期范围。但需要说明的是，微生物衰亡后，所释放的磷容易被植物吸收利用，故 PMM（磷活化微生物）对磷的利用可视为有效磷的一种储备形式。所以，土壤悬浊液混合培养技术既能反映溶磷微生物的溶磷特征，又更接近土壤微生物菌群复杂的溶磷状况。

3.3 土壤悬浊液中复合微生物菌群溶解无机磷的机理

在混合培养液中，pH 的变化与有效磷浓度的变化相反（图 2），说明土壤微生物分泌 H⁺ 参与无机磷溶解。但进一步分析发现，铁磷或铝磷混合培养液的 pH 最低值（1.76~2.44）和有效磷最大值（24.29~65.54 mg·L⁻¹）远低于钙磷混合液（pH 4.37, 166.4 mg·L⁻¹），说明 H⁺ 溶解铁磷和铝磷的作用小于对钙磷的溶解作用。相关分析表明，在铁磷和铝磷混合液中，有效磷与柠檬酸、苹果酸、丁二酸、乳酸、甲酸和有机酸总量呈显著正相关（ $r = 0.629 \sim 0.983$, $n = 15$, $P \leq 0.01$ ）；在钙磷混合液中，钙磷混合培养液有机酸总量最高，仅柠檬酸与有效磷呈显著正相关（ $r = 0.575$, $n = 15$, $P \leq 0.05$ ），葡萄糖酸、苹果酸、丁二酸、乳酸、甲酸和有机酸总量与有效磷均无显著相关（表 5）。由此可见，在铁磷和铝磷活化过程中，有机酸起重要作用；在钙磷活化过程中，H⁺ 的作用可能更大，支持前人纯培养结论^[9, 26]。

微生物（16S rDNA 和 18S rDNA）扩增测序预测出，供试土壤微生物中存在柠檬酸（Si）合酶、蛋白葡萄糖脱氢酶和苹果酸合酶等的合成通路。柠檬酸（Si）合酶和苹果酸合酶直接关系到低分子量有机酸的合成，蛋白葡萄糖脱氢酶涉及葡萄糖代谢形成葡萄糖酸和 H⁺ 分泌^[9]。各通路的相对丰富度均以烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施最高，烤烟连作—单施化肥最低，烤烟玉米轮作优于烤烟连作，化肥有机肥配施和撂荒地显著高于单施化肥。由此，从分子生物学角度解释了合理轮作和化肥有机肥配施提高土壤供磷能力的原因。在本研究中，作物收获后各处理之间的土壤有效磷含量无显著差异（表 1），但轮作和化肥有机肥配施处理的玉米和烤烟产量增加，磷的吸收量提高^[27]，说明在作物生长期，这些处理的土壤磷素供应水平是增加的。在施

磷量不变的条件下，土壤磷素供应水平提高，意味着磷的活化增强，源于溶磷菌的相对丰度提高，由此进一步说明，利用土壤悬浊液的溶磷特征可能更加真实地反映多种微生物共存的条件下微生物活化无机磷的能力。

4 结 论

在接种了土壤悬浊液的混合培养液中，土壤悬浊液中的 PMM 释放有机酸，在降低 pH 的同时溶解不同磷源的难溶性磷，培养液中的有效磷含量表现为化肥有机肥配施和撂荒地高于单施化肥，烤烟玉米轮作高于烤烟连作，说明长期单施化肥和烤烟连作会破坏原有的土壤环境，降低土壤微生物群落的多样性，烤烟玉米轮作和化肥有机肥配施可促进 PMM 对土壤无机磷的活化，提高土壤磷的生物有效性。此外，土壤悬浊液混合培养液中的有效磷变化和溶磷机制与微生物纯培养相似，说明土壤悬浊液培养可以作为纯微生物液体培养的延伸，有效表征 PMM 对无机磷的活化能力。对土壤细菌进行功能预测，发现土壤中有机酸合成相关酶合成通路相对丰度均以烤烟玉米轮作—化肥有机肥配施最高，烤烟连作—单施化肥最低，由此从分子生物学角度解释了轮作和有机肥促进土壤 PMM 活化无机磷的原因。

参考文献 (References)

- [1] Zhang K, Yuan L, Shi X, et al. Effects of cropping patterns on yield and quality of flue-cured tobacco, soil nutrients and enzyme activities[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2010, 16 (1): 124—128. [张科, 袁玲, 施娟, 等. 不同植烟模式对烤烟产质量、土壤养分和酶活性的影响[J]. *植物营养与肥料学报*. 2010, 16 (1): 124—128.]
- [2] Zhang Y. Nutrient utilization and optimal management in corn and flue-cured tobacco rotational cropping systems[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2014, 35 (5): 61—66. [张艳. 烤烟-玉米轮作体系氮磷钾养分利用及优化管理研究[J]. *中国烟草科学*, 2014, 35 (5): 61—66.]
- [3] Ma L Y. Effects of long-term fertilization on soil quality and sustainability of farmland system in Loess Hilly Region[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2018. [马露洋. 黄土丘陵区长期施肥对坡耕地土壤质量及农田系统可持续性的影响[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2018.]
- [4] Cao J. Evaluation of agricultural and environmental

- performance of combination of organic sources and chemical fertilizer on cropping systems[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015. [曹健. 有机资源与化肥配施农业模式的农学和环境效应评价[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.]
- [5] Wang Y Z, Chen X, Shi Y. Phosphorus availability in cropland soils of China and related affecting factors[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24 (1): 260—268. [王永壮, 陈欣, 史奕. 农田土壤中磷素有效性及影响因素[J]. 应用生态学报, 2013, 24 (1): 260—268.]
- [6] Ziadi N, Whalen J K, Messiga A J, et al. Assessment and modeling of soil available phosphorus in sustainable cropping systems[J]. Advances in Agronomy, 2013, 122: 85—126.
- [7] Yang N, Zou D S, Yang M Y, et al. Dynamic changes of soil microbial biomass and soil nutrients along Re-vegetation on sloping-land with purple soils in Hengyang of Hunan Province, south-central China[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2014, 50 (12): 144—150. [杨宁, 邹冬生, 杨满元, 等. 衡阳紫色土丘陵坡地恢复过程中土壤微生物生物量与土壤养分演变[J]. 林业科学, 2014, 50 (12): 144—150.]
- [8] Yang M Y, Wang C H, Wu Z H, et al. Identification of PSB in soybean rhizosphere and secretion of organic acids in the process of phosphate solubilizing[J]. Journal of South China Agricultural University, 2016, 37 (5): 38—44. [杨美英, 王春红, 武志海, 等. 大豆根际溶磷菌分离鉴定及溶磷过程中有机酸的分泌[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37 (5): 38—44.]
- [9] Chen Z, Wu M N, Qing H L, et al. Advances in research on molecular mechanisms of phosphate-solubilizing microorganisms in soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2009, 46 (5): 925—931. [陈哲, 吴敏娜, 秦红灵, 等. 土壤微生物溶磷分子机理研究进展[J]. 土壤学报, 2009, 46 (5): 925—931.]
- [10] Guo B, Wu X L, Qian Y. Approaches for increasing the culturability of microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46 (3): 504—507. [郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施[J]. 微生物学报, 2006, 46 (3): 504—507.]
- [11] Sun T T, Chen Y, Fan J B, et al. Study on characteristics of phosphorus-dissolving microbial dissolvig phosphorus in peanut rhizosphere under long-term fertilization with soil suspension cultivation method[J]. Acta Pedologica Sinica, 2017, 54 (1): 227—236. [孙婷婷, 陈晏, 樊剑波, 等. 土壤悬液培养法研究长期施下花生根际解磷菌溶磷特性[J]. 土壤学报, 2017, 54 (1): 227—236.]
- [12] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170 (1): 265—270.
- [13] Yang S B, Li X M. Modern microbiology experimental technology [M]. Shenyang: Liaoning Nationalities Press, 2003. [杨绍斌, 李晓明. 现代微生物学实验技术[M]. 沈阳: 辽宁民族出版社, 2003.]
- [14] Yang J H, Wang C L, Dai H L. Soil agrochemical analysis and environmental monitoring [M]. Beijing: China Land Press, 2008. [杨剑虹, 王成林, 代亭林. 土壤农化分析与环境监测[M]. 北京: 中国大地出版社, 2008.]
- [15] Qing K, Guo F, Xiao Z, et al. Simultaneous and rapid determination of four organic acids and one furfural in water by ultra-high performance liquid chromatography[J]. Modern Chemical Research, 2018 (4): 155—157. [秦恺, 郭峰, 饶竹, 等. 超高效液相色谱法快速同时分析水样中 4 种有机酸和 1 种糠醛[J]. 当代化工研究. 2018 (4): 155—157.]
- [16] Chen D M, Duan Y Q, Yang Y H, et al. Influence of crop rotation on enzyme activities and fungal communities in fluecured tobacco soil[J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36 (8): 2373—2381. [陈丹梅, 段玉琪, 杨宇虹, 等. 轮作模式对植烟土壤酶活性及真菌群落的影响[J]. 生态学报, 2016, 36 (8): 2373—2381.]
- [17] Gao D, He X H. Research advances on biodiversity and ecosystem stability[J]. Chinese Journal of Ecology, 2010, 29 (12): 2507—2513. [高东, 何霞红. 生物多样性与生态系统稳定性研究进展[J]. 生态学杂志, 2010, 29 (12): 2507—2513.]
- [18] Tarkalson D D, Jolley V D, Robbins C W, et al. Mycorrhizal colonization and nutrient uptake of dry bean in manure and compost manure treated subsoil and untreated topsoil and subsoil[J]. Journal of Plant Nutrition, 1998, 21 (9): 1867—1878.
- [19] Chen A Q, Fu B, Lu Y, et al. Exogenous organic materials applied to paddy field improving soil microbial biomass C, N and dissolved organic C, N[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31 (21): 160—167. [陈安强, 付斌, 鲁耀, 等. 有机物料输入稻田提高土壤微生物碳氮及可溶性有机碳氮[J]. 农业工程学报, 2015, 31 (21): 160—167.]
- [20] Wang Y Y. Screening of complex phosphate solubilizing bacteria and its effect on maize growth[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. [王誉瑶. 复合溶磷菌群筛选及对玉米生长的影响研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.]
- [21] Huang W. Screening of phosphate solubilizing bacteria in red soil and study on its characteristics[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006. [黄伟. 红壤中溶磷菌的筛选及溶磷特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.]
- [22] Zeng H W, Yuan L, Huang J G. Negative effects of artemisinin on phosphorus solubilizing bacteria *in vitro*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 158: 108—113.

- [23] Qin L J, Yang Y Z, Yang X Y. Advances in mechanisms of soil phosphorus solubilization and dissolution by phosphate solubilizing microorganisms[J]. *Life Science Research*, 2019, 23 (1): 59—64, 86. [秦利均, 杨永柱, 杨星勇. 土壤溶磷微生物溶磷、解磷机制研究进展[J]. *生命科学研究*, 2019, 23 (1): 59—64, 86.]
- [24] Zhang Y C, Liu F Z, Wang H B. Research progress on plant-growth-promoting mechanisms of phosphate-solubilizing rhizosphere microbes[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2020 (2): 1—9. [张艺灿, 刘凤之, 王海波. 根际溶磷微生物促生机制研究进展[J]. *中国土壤与肥料*, 2020 (2): 1—9.]
- [25] Li H Y, Kong W B, Da W Y, et al. Research progress of soil phosphate solubilizing microorganisms[J]. *Bulletin of Biology*, 2013, 48 (7): 1—5. [李海云, 孔维宝, 达文燕, 等. 土壤溶磷微生物研究进展[J]. *生物学通报*, 2013, 48 (7): 1—5.]
- [26] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1995, 27 (3): 257—263.
- [27] Wang Y Q, Huang C Y, Liu M H, et al. Long-term application of manure reduced nutrient leaching under heavy N deposition[J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2021, 119 (2): 153—162.

(责任编辑: 陈荣府)