

乔志伟, 刘 超, 王 红. 一株硝基还原假单胞菌的溶磷特性及对碳循环相关基因的影响[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(5): 1151-1158.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.05.007

一株硝基还原假单胞菌的溶磷特性及对碳循环相关基因的影响

乔志伟^{1,2,3}, 刘 超², 王 红²

(1. 安顺学院农学院, 贵州 安顺 561000; 2. 安顺学院资源与环境工程学院, 贵州 安顺 561000; 3. 贵州省高校乡村振兴研究中心, 贵州 安顺 561000)

摘要: 为提高黔中黄壤区农田土壤磷素的有效性, 以从该地区筛选的 1 株具有溶磷能力的硝基还原假单胞菌(QHR-9)为试验菌株, 通过室内摇瓶培养试验研究菌株的溶磷特性。设置对照、QHR-9、QHR-9+葡萄糖、QHR-9+组合糖类等 4 个处理, 通过室外土壤培养试验研究菌株在土壤中的作用及对碳循环相关基因的影响。室内摇瓶培养试验结果表明, 培养第 7 d, QHR-9 对磷酸三钙、磷酸铝、磷矿粉的溶解能力分别为 645.82 mg/L、269.17 mg/L、272.45 mg/L; QHR-9 在 10 种不同碳源条件下溶磷能力为 28.06~645.82 mg/L, 在 10 种组合碳源条件下的溶磷能力为 92.31 mg/L。室外土壤培养试验结果表明, QHR-9 可以显著增加土壤有效磷含量、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性、硝基还原假单胞菌丰度等, QHR-9+葡萄糖与 QHR-9+组合糖类处理上述 4 项指标均高于 QHR-9 处理; 土壤 pH 以 QHR-9+葡萄糖处理最低, 与 QHR-9、QHR-9+组合糖类处理差异不显著; QHR-9 处理微生物碳循环糖基转移酶(*GT*)和辅助活性酶(*AA*)基因相对丰度与对照相比降低, 糖苷水解酶(*GH*)基因相对丰度增加, QHR-9+葡萄糖和 QHR-9+组合糖类处理加剧了这一变化趋势。相关性分析结果表明, 土壤有效磷含量、pH、酸性(碱性)磷酸酶活性与微生物碳循环相关基因相对丰度均有显著或极显著相关性。

关键词: 硝基还原假单胞菌; 溶磷特性; 不同碳源; 碳循环基因

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)05-1151-08

Phosphorus solubilizing characteristics of a *Pseudomonas nitroreducens* strain and its effect on carbon cycling related genes

QIAO Zhi-wei^{1,2,3}, LIU Chao², WANG Hong²

(1. College of Agriculture, Anshun University, Anshun 561000, China; 2. College of Resources and Environmental Engineering, Anshun University, Anshun 561000, China; 3. Rural Revitalization Research Center of Guizhou Universities, Anshun 561000, China)

Abstract: To improve soil phosphorus availability in yellow soil area farmland of central Guizhou, a *Pseudomonas nitroreducens* strain (QHR-9) with phosphorus-solubilizing ability was selected from this area as the test strain. The phosphorus solubilization characteristics of the strain were studied by laboratory shaking flask culture test. Outdoor soil culture experiments were conducted to study the effect of the strain in soil and its effect on carbon cycling related genes, based on four treatments which contained CK, QHR-9, QHR-9+glucose and QHR-9+combined carbohy-

收稿日期: 2022-09-29

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合基础 20181401); 贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划项目(黔教合 KY 字 2017091); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字 2017289)

作者简介: 乔志伟(1985-), 男, 山西大同人, 博士, 副教授, 主要从事土壤溶磷细菌筛选及应用研究。(E-mail) 704725646@qq.com

drate. Results of laboratory shaking flask culture test showed that, the dissolution capacity of QHR-9 to tricalcium phosphate, aluminum phosphate and ground phosphorite were 645.82 mg/L, 269.17 mg/L and 272.45 mg/L respectively on the 7th day of culturing. The phosphorus solubilizing capacity of QHR-9 was 28.06-645.82 mg/L under ten carbon sources conditions, the phosphorus solubilizing capacity under the combined ten carbon source condition was 92.31 mg/L. Results of outdoor soil culture experiments showed that, QHR-9 could significantly increase soil available phosphorus content, acid phosphatase activity, alkaline phosphatase activity and relative abundance of *Pseudomonas nitroreducens* strain, etc. Under QHR-9+glucose treatment and QHR-9+combined carbohydrate treatment, the above four indexes were significantly higher than those under QHR-9 treatment. Under QHR-9+glucose treatment, the pH was the lowest, and there was no significant difference between QHR-9 or QHR-9+ combined carbohydrate treatment. Compared with CK, the relative abundance of glycosyltransferases (*GT*) and auxiliary actives (*AA*) genes of microbial carbon cycle under QHR-9 treatment decreased, while the relative abundance of glycoside hydrolases (*GH*) genes increased, the variation trend was exacerbated by QHR-9+glucose treatment and QHR-9+ combined carbohydrate treatment. Correlation analysis showed that, soil available phosphorus content, pH, acid phosphatase or alkaline phosphatase activity were significantly or extremely significantly correlated with relative abundance of microbial carbon cycling related genes.

Key words: *Pseudomonas nitroreducens* strain; phosphorus solubility; different carbon sources; carbon cycle gene

磷在植物生长发育中发挥着重要的作用^[1],磷素的丰缺影响生态系统结构和功能的稳定性^[2]。磷素易在土壤中累积,这是其利用率较低的重要原因。溶磷细菌可以改善土壤磷素的有效性,因此成为土壤磷素利用研究的热点方向。通过溶磷细菌的作用,对化学磷肥减量增效和增加作物产量等都有积极的效果^[3-5]。不同碳源条件下,微生物溶磷能力差异较大^[6-7],研究溶磷细菌在不同碳源条件下的溶磷特性是其应用的前提之一。土壤溶磷细菌种类多样,芽孢杆菌、假单胞菌等属中许多种类的微生物都具有溶磷能力,但是关于硝基还原假单胞菌作为溶磷细菌的研究未见报道。

碳是微生物有机体的能源物质,也是重要的结构物质,微生物介导的碳循环是地球物质循环的重要组成部分,其微生物驱动机制和关键功能基因是重要研究内容^[8]。外源磷添加可以通过改变木质素的分解和微生物残体的分解^[2]、土壤呼吸^[9]、团聚体的稳定性^[10]等影响碳循环进程。土壤微生物碳循环相关基因丰度与碳合成、分解等有密切关系^[11],宏基因组学及碳水化合物活性酶(*CAZY*)数据库的不断完善为全面研究微生物碳循环相关基因提供了前提条件。溶磷细菌施用增加了土壤有效磷含量,由溶磷微生物作用导致的土壤有效磷含量增加对碳循环相关基因的影响,需要进一步分析,且通过宏基因组学探讨溶磷细菌对微生物碳循环相关基因的影响鲜有研究。

本研究试验菌株为具有溶磷特性的硝基还原假

单胞菌,通过室内培养试验,研究其在不同碳源条件下的溶磷能力;通过土壤培养试验,设置空白、溶磷细菌、溶磷细菌+葡萄糖、溶磷细菌+组合糖类等 4 个处理,测定土壤养分含量、磷酸酶活性、硝基还原假单胞菌丰度、碳循环相关基因丰度等指标,并分析不同指标之间的相关性,以期为溶磷细菌的应用和探究溶磷细菌对土壤微生物碳循环的影响提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

试验菌株为硝基还原假单胞菌 QHR-9,来源于安顺学院微生物实验室,经鉴定为硝基还原假单胞菌,从贵州省安顺市农田土壤中分离出来,具有较强的溶磷能力。菌株 16S rDNA 序列分析采用引物 7f (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')、1540r (5'-AG-GAGGTGATCCAGCCGCA-3') 建立扩增反应体系并测序^[12],将获得的 DNA 序列输入 GenBank,用 BLAST 程序与数据库中的所有序列进行比对,通过 MEGA 7.0 软件和 Neighbor-Joining 方法^[13]进行系统发育树的构建。

1.2 菌株溶磷特性测定

1.2.1 菌株活化培养基(牛肉膏蛋白胨培养基)

牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,氯化钠 5.0 g,水 1.0 L,调节 pH 6.5~7.5。

1.2.2 溶磷能力测定培养基(NBRIP)^[14] 葡萄糖 10.0 g,磷酸三钙 5.0 g,氯化镁 5.0 g,硫酸镁 0.25

g,硫酸铵 0.1 g,氯化钾 0.2 g;磷酸三钙(或磷酸铝、磷矿粉)5.0 g,水 1.0 L,调节 pH 6.5~7.5。

1.2.3 菌株的活化 将保存于 4℃ 冰箱中的菌株取出,接种在灭菌冷却后的活化培养基上培养 24 h,备用。

1.2.4 菌株对磷酸三钙、磷酸铝、磷矿粉的溶解能力 将配制好的 NBRIP 培养液分装在 250 ml 三角瓶中,每瓶装培养液 100 ml,灭菌后冷却,将 1 ml 活化好的菌液接种于冷却后的 NBRIP 培养液中,振荡培养,无菌操作下分别在第 1 d、第 3 d、第 5 d、第 7 d 取培养液 5 ml,离心后取上清液测定其有效磷含量,并设置空白对照。根据接种菌株培养液有效磷含量和空白培养液有效磷含量的差值计算菌株对难溶态磷酸盐(磷酸三钙、磷酸铝、磷矿粉)的溶解能力,每个处理(包括空白对照)设置 3 次重复。

1.2.5 不同碳源条件下菌株溶磷能力 在 NBRIP 液体培养基中,难溶态磷为磷酸三钙。分别以鼠李糖、淀粉、蔗糖、乳糖、木糖、甘露醇、麦芽糖、纤维二糖、葡聚糖等糖类质量替换葡萄糖,接菌(菌液与培养液体积比为 1:100)振荡培养 7 d,并设置空白对照,测定培养液有效磷含量,分析不同碳源条件下菌株的溶磷能力。

在 NBRIP 培养基中,以葡萄糖、鼠李糖、淀粉、蔗糖、乳糖、木糖、甘露醇、麦芽糖、纤维二糖、葡聚糖等 10 种糖类物质组合作为碳源,各糖类质量比为 1:1,组合碳源含量为 10 g/L,接菌(菌液与培养液体积比为 1:100)振荡培养 7 d,并设置空白对照,测定培养液有效磷含量,分析组合碳源条件下菌株的溶磷能力。

1.3 外加碳源条件下菌株土壤培养试验

1.3.1 试验土壤 试验土壤采集于贵州省安顺市西秀区的农田,风干后过筛备用。土壤养分基本性质如下:pH 4.23,碱解氮含量 137.12 mg/kg,有效磷含量 79.65 mg/kg,速效钾含量 318.10 mg/kg,全氮含量 2.45 g/kg,全磷含量 0.91 g/kg,全钾含量 28.02 g/kg,有机质含量 39.03 g/kg。

1.3.2 试验设计 将采集的土样风干,过筛后装盆,每盆装土 1.5 kg,共设置 4 个处理,分别为对照(CK)、QHR-9、QHR-9+葡萄糖(QHR-9P)、QHR-9+组合糖类(QHR-9C),每个处理重复 3 次。其中 QHR-9 菌液接种量为 1%(菌液与土壤体积质量比),组合糖类为葡萄糖、淀粉、乳糖、木糖、甘露醇、

麦芽糖、蔗糖、纤维二糖、鼠李糖、葡聚糖等 10 种糖类按照质量等比配制而成,试验设计见表 1。

将上述物质加入塑料盆后与土壤充分混匀,放置在室外,培养时间为 60 d,定期管理。培养结束后,采集表层新鲜土样 50 g 左右,除去杂草等杂质后装于塑封袋中,样品采集完成后放在干冰箱中寄送至生工生物工程(上海)股份有限公司,进行土壤宏基因组测序;剩余的土样风干后过筛,进行土壤养分和磷酸酶活性的测定。

表 1 试验设计

Table 1 Experimental design

处理	不同物质加入量		
	菌液 (ml/kg)	葡萄糖 (g/kg)	组合糖 (g/kg)
CK	0	0	0
QHR-9	10	0	0
QHR-9C	10	10	0
QHR-9P	10	0	10

1.3.3 土壤养分和磷酸酶活性测定 土壤有效磷含量采用 0.5 mol/L 碳酸氢钠溶液浸提后,使用钼锑抗比色法测定^[15];pH 通过 pH 计直接测定(水土质量比为 1:1)^[15];土壤有机质含量采用重铬酸钾容量法^[15]测定;土壤酸性或碱性磷酸酶活性采用磷酸苯二钠比色法^[16]测定。

1.3.4 土壤宏基因组测定

1.3.4.1 土壤 DNA 提取和宏基因组测序 称取土样 0.5 g,使用 E.Z.N.A Mag-Bind Soil DNA Kit 试剂盒,按照说明书上的方法提取总群落基因组 DNA,使用 Qubit 4.0 测量 DNA 浓度。取 500 ng DNA 样品进行宏基因组测序,采用 Illumina NovaSeq 6000 高通量测序平台测序。

1.3.4.2 宏基因组序列分析方法 测得的原始数据使用 Trimmomatic 进行过滤处理,默认参数值为 Q20,去除得分值低于 Q20 的质量序列,得到 Clean 数据;使用基于 De Bruijn graph 原理的拼接软件 ID-BA_UD 对优质的 reads 进行拼接组装,获得 contigs;选择 100 bp 以上的基因,翻译出蛋白质序列。将所有预测出来的基因序列,用 CD-HIT 软件进行聚类(设置参数为 95% identify、90 coverage),构建非冗余基因集^[17]。

1.3.4.3 物种丰度分析方法 将基因与美国国立生

物技术信息中心 (NCBI) 数据库进行 BLASTp 同源性比对,得到物种相关信息及丰度信息。

1.3.4.4 碳水化合物活性酶注释分析方法 通过 HMMER3 将翻译出的蛋白质序列与 CAZY 数据库比对,得到其相应的碳水化合物活性酶注释,筛选条件 $Evalue < 1 \times 10^{-5}$,并统计 CAZY 各功能层级的丰度。

1.4 数据处理

使用 Excel 2016 和 SPSS 20.0 等软件进行数据

处理和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 QHR-9 同源性分析及系统发育树

菌株 QHR-9 的 16S rDNA 序列长度为 1 477 bp,对其进行序列分析,结果(图 1)表明,QHR-9 与硝基还原假单胞菌 [*Pseudomonas nitroreducens* strain (NR 042435.1)] 同源性最接近。

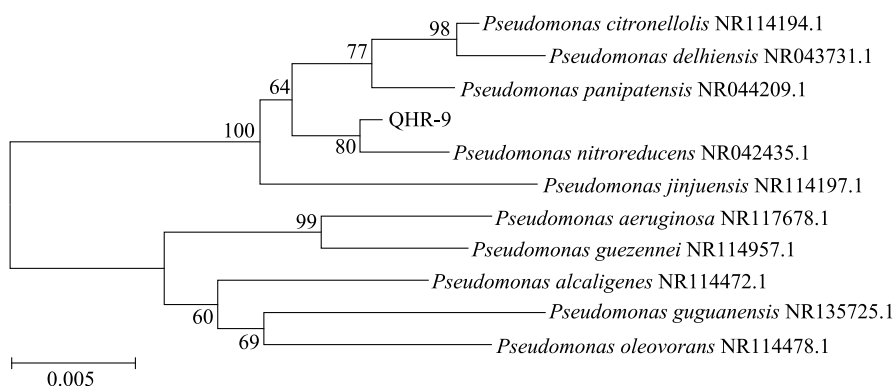


图 1 QHR-9 系统发育树

Fig.1 QHR-9 phylogenetic tree

2.2 QHR-9 溶磷特性

2.2.1 QHR-9 对磷酸三钙、磷酸铝、磷矿粉等的溶解能力 QHR-9 对磷酸三钙、磷酸铝、磷矿粉等的溶解能力见表 2。由表 2 可知,QHR-9 对磷酸三钙、磷酸铝、磷矿粉的溶解能力在第 1~5 d 随时间延长呈现显著增加的趋势,第 7 d 菌株溶磷能力趋于稳定。QHR-9 在第 7 d 对磷酸三钙、磷酸铝、磷矿粉的溶解能力分别为 645.82 mg/L、269.17 mg/L、272.45 mg/L,说明 QHR-9 菌株对各种难溶态磷酸盐具有较强的溶解能力。

表 2 QHR-9 对磷酸三钙、磷酸铝、磷矿粉的溶解能力

Table 2 Solubility of QHR-9 to tricalcium phosphate, aluminum phosphate and ground phosphorite

菌株培养时间 (d)	对难溶态磷酸盐的溶磷能力 (mg/L)		
	磷酸三钙	磷酸铝	磷矿粉
1	301.81±16.60c	97.67±4.04c	61.64±12.28c
3	503.09±20.07b	117.99±8.68b	98.51±13.51b
5	658.02±35.06a	271.32±20.90a	266.04±13.19a
7	645.82±23.87a	269.17±22.98a	272.45±15.55a

同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

2.2.2 不同碳源条件下 QHR-9 的溶磷特性 由表 3 可知,在不同碳源条件下 QHR-9 溶磷能力差异较

大,菌株以葡萄糖为碳源的溶磷能力显著高于其他糖类,以乳糖为碳源时溶磷能力次之,为 201.82 mg/L,以淀粉、甘露醇、蔗糖、木糖、麦芽糖、鼠李糖、葡聚糖、纤维二糖等为碳源,其溶磷能力均在 100.00 mg/L 以下,菌株对这些糖类的利用率较低。QHR-9 在 10 种碳源条件下溶磷能力范围在 28.06~645.82 mg/L,最大变化幅度为 617.76 mg/L。QHR-9 在组合碳源条件下的溶磷能力为 92.31 mg/L,比以葡萄糖为单独碳源时的溶磷能力降低了 85.71%。

2.3 QHR-9 土壤培养试验

2.3.1 土壤养分含量 由表 4 可知,QHR-9 各处理土壤有效磷含量均显著高于 CK,QHR-9、QHR-9P、QHR-9C 处理土壤有效磷含量分别比 CK 增加了 9.74 mg/kg、20.81 mg/kg、17.16 mg/kg,施用 QHR-9 对土壤有效磷含量的增加效果显著,QHR-9P、QHR-9C 处理土壤有效磷含量显著高于 QHR-9。

各处理土壤 pH 值为 4.11~4.20,QHR-9 各处理土壤 pH 差异不显著。QHR-9 处理土壤有机质含量为 38.81 mg/kg,与对照差异不显著,QHR-9P、QHR-9C 处理土壤有机质含量分别为 40.59 mg/kg、40.89 mg/kg,显著高于 QHR-9,但 2 个处理之间差异不显著。

表3 不同碳源条件下 QHR-9 对磷酸三钙的溶解能力

Table 3 Solubility of QHR-9 to tricalcium phosphate under different carbon sources

糖类	QHR-9 溶磷能力 (mg/L)
葡萄糖	645.82±23.87a
淀粉	57.44±3.58e
乳糖	201.82±13.02b
蔗糖	64.43±2.55d
麦芽糖	93.92±3.69c
甘露醇	59.77±1.62e
木糖	34.97±1.81g
鼠李糖	41.88±4.43f
纤维二糖	46.35±3.50f
葡聚糖	28.06±3.27h
组合碳源	92.31±6.77c

同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

表4 QHR-9 不同处理土壤养分含量

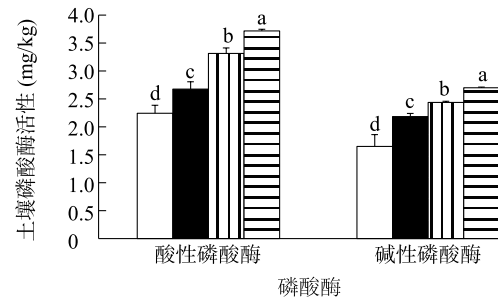
Table 4 Soil nutrient content of different QHR-9 treatments

试验处理	有效磷含量 (mg/kg)	pH	有机质含量 (g/kg)
CK	81.12±6.92d	4.20±0.03a	38.94±1.24ab
QHR-9	90.86±0.58c	4.17±0.03ab	38.81±0.35b
QHR-9P	101.93±0.11a	4.11±0.04b	40.59±0.34a
QHR-9C	98.28±1.89b	4.15±0.03ab	40.89±1.17a

CK: 对照; QHR-9: QHR-9 菌株; QHR-9P: QHR-9+葡萄糖; QHR-9C: QHR-9+组合糖类。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

2.3.2 土壤磷酸酶活性 由图 2 可知, CK、QHR-9、QHR-9P、QHR-9C 处理土壤酸性磷酸酶活性分别为 2.24 mg/kg、2.67 mg/kg、3.31 mg/kg、3.71 mg/kg, QHR-9、QHR-9P、QHR-9C 处理的土壤酸性磷酸酶活性分别比 CK 显著增加了 19.20%、47.77%、65.63%, 溶磷细菌可以显著增加土壤酸性磷酸酶的活性, QHR-9P、QHR-9C 处理酸性磷酸酶活性分别比 QHR-9 处理显著增加了 23.97%、38.95%, 溶磷细菌与葡萄糖或者组合糖类可以进一步增加土壤酸性磷酸酶的活性; QHR-9C 处理土壤酸性磷酸酶活性最高, 比 QHR-9P 处理显著增加了 12.08%。各处理土壤碱性磷酸酶活性的变化趋势与酸性磷酸酶一致。

2.3.3 土壤硝基还原假单胞菌 (*Pseudomonas nitroreducens* strain) 丰度 由图 3 可知, 培养 60 d 后 QHR-9 各处理土壤 *Pseudomonas nitroreducens* strain 的相对丰度显著高于 CK, QHR-9、QHR-9P、QHR-9C 处理土壤 *Pseudomonas nitroreducens* strain 的相对丰度分别比 CK 显著增加了 36.56%、67.44%、82.90%,



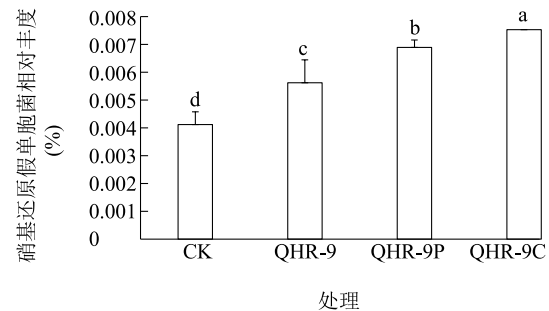
□ CK; ■ QHR-9; ▨ QHR-9P; ▩ QHR-9C

CK、QHR-9、QHR-9P、QHR-9C 见表 4 注。不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图2 QHR-9 不同处理土壤磷酸酶活性

Fig.2 Soil phosphatase content in different QHR-9 treatments

QHR-9 在土壤中表现出较强的生长和繁殖能力; QHR-9P、QHR-9C 处理土壤 *Pseudomonas nitroreducens* strain 的相对丰度分别比 QHR-9 显著增加了 22.61%、33.93%, 添加葡萄糖或者组合糖类可以进一步增强 QHR-9 在土壤中的生存能力。



CK、QHR-9、QHR-9P、QHR-9C 见表 4 注。不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图3 QHR-9 不同处理土壤硝基还原假单胞菌 (*Pseudomonas nitroreducens* strain) 丰度Fig.3 Soil *Pseudomonas nitroreducens* strain abundance under different QHR-9 treatments

2.3.4 土壤微生物碳循环相关基因相对丰度 GH (糖苷水解酶) 参与土壤有机碳分解, GT (糖基转移酶) 参与土壤有机碳生物合成, AA (辅助活性酶) 参与木质素的微生物分解。由表 5 可知, QHR-9 处理微生物碳循环基因相关 GT 基因相对丰度与对照相比显著减少, GH 基因相对丰度呈现增加趋势, 比对照显著增加, 溶磷细菌可以在一定程度上影响土壤微生物碳循环; QHR-9+葡萄糖和 QHR-9+组合糖类处理微生物碳循环相关基因 AA、GT 丰度与 QHR-9 处理相比, 均呈减少趋势, GH 基因相对丰度呈现增加趋势, QHR-9 与

葡萄糖或者组合糖类共同施用,进一步影响了土壤微生物碳循环相关基因的相对丰度;QHR-9+葡萄糖和QHR-9+组合糖类处理微生物碳循环各类基因丰度之间差异均不显著。

2.3.5 土壤微生物碳循环基因相对丰度与土壤养分含量、磷酸酶活性的相关性 由表 6 可知,土壤有效磷含量、酸性磷酸酶活性、碱性磷酸酶活性与 *AA*、*GT* 基因相对丰度呈现极显著负相关,与 *GH* 基因相对丰度呈现极显著正相关;pH 与 *AA*、*GT* 基因相对丰度呈现极显著正相关,与 *GH* 基因相对丰度呈现显著负相关;有机质含量与 *GH* 基因相对丰度呈现显著正相关,与 *AA*、*GT* 基因相对丰度相关性不显著。

表 5 QHR-9 不同处理土壤微生物碳循环相关基因相对丰度

Table 5 QHR-9 soil microbial carbon cycle gene abundance under different treatments

不同处理	微生物碳循环基因丰度 (%)		
	<i>AA</i>	<i>GH</i>	<i>GT</i>
CK	0.203±0.005a	1.574±0.008c	1.519±0.002a
QHR-9	0.198±0.002a	1.600±0.007b	1.474±0.007b
QHR-9P	0.189±0.006b	1.657±0.058ab	1.432±0.014c
QHR-9C	0.185±0.004b	1.691±0.015a	1.449±0.046bc

CK、QHR-9、QHR-9P、QHR-9C 见表 4 注。*GH*、*GT*、*AA* 分别代表糖苷水解酶、糖基转移酶、辅助活性酶。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

表 6 土壤微生物碳循环相关基因相对丰度与土壤养分含量、磷酸酶活性的相关性系数

Table 6 Correlation coefficient between soil microbial carbon cycle genes and soil nutrients

土壤养分含量和磷酸酶活性指标	<i>AA</i> 基因相对丰度	<i>GH</i> 基因相对丰度	<i>GT</i> 基因相对丰度
有效磷含量	-0.795 **	0.744 **	-0.773 **
pH	0.743 **	-0.635 *	0.715 **
有机质含量	-0.560	0.651 *	-0.558
酸性磷酸酶活性	-0.763 **	0.747 **	-0.824 **
碱性磷酸酶活性	-0.766 **	0.709 **	-0.828 **

AA、*GH*、*GT* 见表 5 注。* 表示 0.05 水平上显著相关,** 代表 0.01 水平上显著相关。

3 讨论与结论

3.1 溶磷细菌溶磷能力及不同碳源对其影响

微生物对难溶态磷酸盐的溶解能力是评价其溶磷能力大小的重要指标^[18-19]。溶磷能力为接菌培养

后培养液有效磷含量与未接菌培养液有效磷含量的差值。李慧萍等^[20]对祁连山云杉林土壤溶磷细菌的研究中筛选出 5 株对磷酸三钙溶解能力为 387.41~479.87 mg/L 的菌株;朱芙蓉等^[21]在滇重楼根际土壤分离出 42 株无机溶磷细菌,对磷酸三钙溶磷能力为 66.68~104.10 mg/L;刘萍等^[22]的研究结果显示,溶磷细菌 RPB03 在较高的温度、盐度和碱性条件下对磷酸三钙溶磷能力均在 300.00 mg/L 以上;吕俊等^[23]、刘春菊等^[24]筛选的溶磷菌株对磷酸三钙溶磷能力在 200 mg/L 以上。本试验中,在培养第 7 d QHR-9 对磷酸三钙、磷酸铝、磷矿粉的溶解能力分别为 645.82 mg/L、269.17 mg/L、272.45 mg/L,对各种难溶态磷酸盐都具有较强的溶解能力,可以作为黔中黄壤区农田土壤溶磷细菌研究的菌株资源。

培养基碳源种类对溶磷微生物溶磷能力影响较大^[8]。本试验中,QHR-9 以葡萄糖为碳源时溶磷能力最强,在 10 种碳源条件下其溶磷能力为 28.06~645.82 mg/L,最大变化幅度为 617.76 mg/L。这是因为溶磷细菌对不同碳源的利用率不尽相同,在利用率高的碳源条件下溶磷能力强,在无法利用或者利用率较低的碳源条件下溶磷能力显著降低。研究表明,不同碳源通过影响微生物产生有机酸的种类和含量不同进而影响溶磷能力^[25],产生有机酸是微生物溶磷的重要机理之一^[26-27]。溶磷细菌研究的关键在于应用,土壤中的碳源种类繁多,含量也不尽相同,因此研究碳源对菌株溶磷能力的影响,不仅要分析单一碳源的影响,更要分析组合碳源的影响。本研究采用室内摇瓶培养,QHR-9 在组合碳源条件下的溶磷能力比以葡萄糖为单一碳源降低了 85.71%,组合碳源是 10 种糖类的等量组合,其中有 8 种是 QHR-9 利用率较低的碳源,其余 2 种利用率较高的碳源在培养液中的含量也较低,不足以提供其正常生长所需要的能量物质,因此菌株在组合碳源条件下的溶磷能力也较低。

3.2 溶磷细菌外加碳源对土壤有效磷含量、磷酸酶活性和微生物碳循环相关基因相对丰度的影响

本研究中,QHR-9 各处理与 CK 相比,土壤有效磷含量均显著增加,这与 Barra 等^[28]的研究结果相同,溶磷细菌在提升土壤磷素有效性方面发挥积极的作用;QHR-9P 处理的土壤有效磷含量最高,溶磷细菌与其可高效利用的碳源共同施用,对溶磷能力的发挥可以起到协同作用。土壤磷酸酶的作用之一是将

有机磷转化为无机磷^[29],酸性磷酸酶是中国农业和自然生态系统磷素有效性的重要预测因子^[30],碱性磷酸酶活性高低与微生物磷素丰缺有显著相关性^[29]。本研究中 QHR-9C 处理的土壤磷酸酶活性最高,溶磷细菌增加土壤有效磷含量的重要原因之一是磷酸酶活性增强,这与 Angelica 等^[31]、张雪梅等^[32]的研究结果一致。微生物增殖会导致土壤磷酸酶活性增强^[33],本研究中不同处理土壤 *Pseudomonas nitroreducens* strain 相对丰度与土壤有效磷含量、酸性磷酸酶活性、碱性磷酸酶活性等呈现一致的变化趋势,QHR-9 的增殖在一定程度上增加了磷酸酶活性,进而促进了土壤有效磷含量的增加。在土壤中添加不稳定碳源(葡萄糖等),微生物可以利用添加的碳源进行自身生长^[34],因此本试验中 QHR-9P 和 QHR-9C 处理土壤碳循环相关基因相对丰度显著高于 QHR-9 处理,土壤中以 QHR-9 为代表的溶磷细菌数量的增加,进一步促进了土壤磷酸酶活性和有效磷含量等磷素相关指标的变化。

土壤碳循环相关基因中,*GH* 参与有机碳的微生物分解,*GT* 与有机碳的合成有关,*AA* 参与木质素的微生物分解。QHR-9 处理土壤 *GT* 基因相对丰度与对照相比呈现减少趋势,*GH* 基因相对丰度增加,这可能是因为溶磷细菌需要利用土壤中的碳源作为生长的碳骨架和能源物质,维持自身生长和发挥溶磷能力,促进了土壤碳的分解,土壤有机碳分解相关基因 *GH* 相对丰度增加,有机碳合成相关基因 *GT* 相对丰度减少。Luo 等^[2]的研究结果表明,添加人工磷,通过降低氧化酶活性抑制了木质素的分解,施用溶磷细菌的土壤有效磷含量显著增加,有效磷含量的增加对木质素的分解产生抑制作用,与木质素分解有关的 *AA* 基因丰度呈现下降的趋势。外加不稳定碳源(葡萄糖等)会产生正激发效应,导致土壤有机碳分解增加^[34],因此 QHR-9C 处理 *GH* 基因相对丰度高于 QHR-9 处理,QHR-9C 处理的 *GT* 基因相对丰度与 QHR-9 处理相比呈下降趋势。QHR-9+葡萄糖与 QHR-9+组合糖类处理 *GH*、*GT*、*AA* 基因相对丰度差异不显著,这可能与土壤微生物系统的复杂性以及对碳源利用的多样性有关,单独加入葡萄糖或者加入组合糖类,两者对土壤微生物碳循环相关基因影响的差异性较小。

3.3 土壤微生物碳循环相关基因相对丰度与土壤养分含量、磷酸酶活性的相关性

本研究中,土壤有效磷含量与微生物碳循环 *AA*、

GT 基因相对丰度等均呈现极显著负相关,与 *GH* 基因相对丰度呈现极显著正相关。土壤有效磷是影响土壤微生物碳循环功能相关基因的重要因素,袁银龙等^[35]的研究结果也证明土壤有效磷对土壤微生物碳循环具有重要影响,这也揭示了外源磷添加对碳库的影响,即外源磷添加会增加土壤有效磷含量,进而影响碳循环过程。在影响微生物群落和结构方面,pH 是关键因子之一^[36],Dai 等^[37]的研究结果表明,土壤 pH 与土壤微生物碳循环 *AA*、*GT* 基因相对丰度呈正相关,与 *GH* 基因相对丰度呈负相关,这与本试验研究结果一致。溶磷细菌在土壤中分泌低分子量有机酸,通过降低土壤 pH 促进有效磷含量的增加,土壤 pH 的变化与有效磷含量的变化呈现相反趋势,因此 pH 与土壤微生物碳循环相关基因相对丰度的相关性也呈相反的趋势。微生物参与土壤有机质的分解和合成,因此与微生物碳循环相关基因有密切的关系。本研究中,由于试验包含添加葡萄糖或组合糖等处理,有机质含量仅与 *GHs* 基因相对丰度呈现显著正相关。

参考文献:

- [1] RINGEVAL B, NOWAK B, NESME T, et al. Contribution of anthropogenic phosphorus to agricultural soil fertility and food production [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2014, 28(7): 743-756.
- [2] LUO R Y, KUZYAKOV Y K, ZHU B, et al. Phosphorus addition decreases plant lignin but increases microbial necromass contribution to soil organic carbon in a subalpine forest [J]. *Global Change Biology*, 2022(420): 1-17.
- [3] MOHAMMAD S K, ALMAS Z, MLUNEES A, et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective [J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2010, 56(1): 73-98.
- [4] MADHUSMITA P, RANJAN K S, CHINMAY P, et al. Contribution of native phosphorous-solubilizing bacteria of acid soils on phosphorous acquisition in peanut [J]. *Protoplasma*, 2017, 254(6): 2225-2236.
- [5] WASEEM H, HINA A, USMAN I, et al. Analysis of ecological attributes of bacterial phosphorus solubilizers, native to pine forests of Lower Himalaya [J]. *Applied Soil Ecology*, 2017(112): 51-59.
- [6] 刘文干,曹慧,樊建波,等.一株红壤花生根际溶磷真菌的分离、鉴定及溶磷能力的研究 [J]. *土壤学报*, 2012, 49(5): 988-994.
- [7] 贺梦醒,高毅,胡正雪,等.解磷菌株 B25 的筛选、鉴定及其解磷能力 [J]. *应用生态学报*, 2012, 23(1): 235-239.
- [8] RUI J P, LI J B, WANG S P, et al. Responses of bacterial communities to simulated climate changes in alpine meadow soil of the

- Qinghai-Tibet Plateau [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(17):6070-6077.
- [9] FENG J G, ZHU B. A global meta-analysis of soil respiration and its components in response to phosphorus addition[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019(17):38-47.
- [10] DU J X, LIU K L, HUANG J, et al. Organic carbon distribution and soil aggregate stability in response to long-term phosphorus addition in different land-use types[J]. Soil and Tillage Research, 2022(215):1-9.
- [11] XUE K, YUAN M M, SHI Z J, et al. Tundra soil carbon is vulnerable to rapid microbial decomposition under climate warming [J]. Nature Climate Change, 2016, 6(6):595-600.
- [12] 乔志伟,洪坚平,谢英荷,等. 石灰性土壤拉恩氏溶磷细菌的筛选鉴定及溶磷特性[J]. 应用生态学报, 2013,24(8):2294-2300.
- [13] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. PANS, 2004, 101(30):11030-11035.
- [14] 沈佳佳,候小改,王二强,等. 油用牡丹根际解有机磷细菌的筛选及解磷功能研究[J]. 生物技术通报, 2022,38(6):157-165.
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 2008.
- [16] 关松荫. 土壤酶学研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 1986.
- [17] PENG J, LU X R, XIE K L, et al. Dynamic alterations in the gut microbiota of collagen-induced arthritis rats following the prolonged administration of total glucosides of paeony[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019(9):1-17.
- [18] TENG Z D, CHEN Z P, ZHANG Q, et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soils of the Yeyahu Wetland in Beijing, China[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019(26):33976-33987.
- [19] MORA M L, DEMANET R, VISCARDI S, et al. Aluminum-tolerant bacteria improve the plant growth and phosphorus content in ryegrass grown in a volcanic soil amended with cattle dung manure [J]. Applied Soil Ecology, 2017(115):19-26.
- [20] 李慧萍,甘雅楠,韩庆庆,等. 祁连山云杉林土壤溶磷细菌的分离及对白三叶的促生效应[J]. 草地学报, 2022,30(4):879-888.
- [21] 朱芙蓉,杜慧慧,周 浓,等. 滇重楼根际土壤解无机磷细菌的分离与鉴定[J]. 中国土壤与肥料, 2022(1):155-162.
- [22] 刘 萍,夏江宝. 滨海盐碱地根际溶磷细菌磷素转化特征[J]. 生态学报, 2021,41(11):4531-4540.
- [23] 吕 俊,潘洪祥,于 存. 马尾松根际溶磷细菌 *Paraburkholderia* sp. 的筛选、鉴定及溶磷特性研究[J]. 生物技术通报, 2020,36(9):147-156.
- [24] 刘春菊,杜传印,梁子敬,等. 高效解磷细菌菌株 CT45-1 的鉴定及其对烟草的促生作用[J]. 山东农业科学, 2019,51(4):74-78.
- [25] REYES I, BERNIER L, SIMARD R R, et al. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999(28):281-290.
- [26] WEI Y Q, ZHAO Y, SHI M Z, et al. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation [J]. Bioresour Technol, 2018 (247):190-199.
- [27] ANZUAY M S, MGR C, ANGELINI J G. Growth promotion of peanut and maize plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides[J]. Microbiological Research, 2017(199):98-109.
- [28] BARRA P J, PONTIGO S, DELGADO M. Phosphobacteria inoculation enhances the benefit P-fertilization on *Lolium perenne* in soils contrasting in P-availability [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019(136):1-12.
- [29] 杨文娜,余 烁,罗东海,等. 化肥和有机肥配施生物炭对土壤磷酸酶活性和微生物群落的影响[J]. 环境科学, 2022, 43(1):540-549.
- [30] LU J L, JIA P, FENG S W, et al. Remarkable effects of microbial factors on soil phosphorus bioavailability: a country-scale study [J]. Global Change Biology, 2022(422):1-17.
- [31] ANGELICA B C, BETSY A R, VERONICA C M G. Phosphate-solubilizing bacteria improve *Agave angustifolia* Haw. growth under field conditions[J]. Journal of the Food and Agriculture, 2019, 99(14):6601-6607.
- [32] 张雪梅,张秀梅,李文涛. 鳊草根际溶磷微生物分离、筛选及其对鳊草生长的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(1):82-95.
- [33] YOO G, KANG H. Effects of biochar addition on greenhouse gas emissions and microbial responses in a short-term laboratory experiment[J]. Journal of Environmental Quality, 2012, 41(4):1193-1202.
- [34] MORRISSEY E M, MAU R L, SCHWARTZ E, et al. Bacteria carbon use plasticity, phylogenetic diversity and the priming of soil organic matter[J]. The ISME Journal, 2017(11):1890-1899.
- [35] 袁银龙,孙 杰,徐如玉,等. 丛枝菌根真菌与有机肥配施对甜玉米根际土壤关键碳循环功能基因的影响 [J]. 福建农业学报, 2020, 35(7):753-763.
- [36] 邓玲玲,王如海,吴电明. 增温和互花米草入侵对崇明东滩湿地土壤碳循环功能基因的影响[J]. 南京信息工程大学学报(自然科学版), 2022, 14(1):62-76.
- [37] DAI Z M, ZANG H D, CHEN J, et al. Metagenomic insights into soil microbial communities involved in carbon cycling along an eaevation climosequences[J]. Environmental Microbiology, 2021,23(8):4631-4645.

(责任编辑:陈海霞)