

李绍隆,屠豪阳,阮艳萍,等.马尾松林土壤磷赋存形态及其对含 *phoD* 基因解磷细菌群落的影响 [J]. 中国环境科学, 2025,45(6):3190-3198.

Li S L, Tu H Y, Ruan Y P, et al. The phosphorus forms in the soil of *Pinus massoniana* forest and their impact on the community of phosphorus-decomposing bacteria harboring *phoD* genes [J]. China Environmental Science, 2025,45(6):3190-3198.

马尾松林土壤磷赋存形态及其对含 *phoD* 基因解磷细菌群落的影响

李绍隆,屠豪阳,阮艳萍,赵 亮,林敦梅* (重庆大学,三峡库区生态环境教育部重点实验室,重庆 400044)

摘要: 本研究测定了重庆主城区内 8 个代表性马尾松林样地表层土壤(0~10cm)不同赋存形态磷元素含量,并基于高通量测序技术研究了含碱性磷酸酶(*phoD*)基因的细菌群落特征.结果表明,研究区马尾松林表层土壤磷含量较低,冬季和夏季土壤总磷(TP)含量均值分别为 192.787,169.512mg/kg.其中无机磷形态含量分布为闭蓄态磷(O-P)>铁结合磷(Fe-P)>铝结合磷(Al-P)>钙结合磷(Ca-P)>可交换态磷(Ex-P),并呈现冬高夏低的季节变化格局.含 *phoD* 基因细菌群落优势门为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和浮霉菌门(Planctomycetes),平均相对丰度达到 96%.相关分析表明含 *phoD* 基因细菌多样性与 Al-P 之间存在显著负相关关系($P<0.05$),与土壤 pH 值存在显著正相关关系($P<0.05$).冗余分析表明 Al-P 和 pH 值是影响含 *phoD* 基因细菌群落结构的最主要因素.综上所述,重庆主城区马尾松林表层土壤普遍缺磷且磷含量受到季节变化的显著影响,磷赋存形态影响含 *phoD* 基因细菌群落结构及多样性.

关键词: 马尾松林; 磷赋存形态; *phoD* 基因; 解磷细菌多样性

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2025)06-3190-09

The phosphorus forms in the soil of *Pinus massoniana* forest and their impact on the community of phosphorus-decomposing bacteria harboring *phoD* genes. LI Shao-long, TU Hao-yang, RUAN Yan-ping, ZHAO Liang, LIN Dun-mei* (Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China). *China Environmental Science*, 2025,45(6): 3190-3198

Abstract: In this study, we measured the contents of P in various forms in the topsoil (0~10cm) of 8 representative pine (*Pinus massoniana*) forests in the main urban area of Chongqing. We used high-throughput sequencing technology to investigate the community characteristics of the *phoD*-harboring bacteria. The results showed that the surface soils of *Pinus massoniana* forests in the study area had relatively low phosphorus levels, with average total phosphorus (TP) contents of 192.787mg/kg in winter and 169.512mg/kg in summer. Among the inorganic phosphorus fractions, the content distribution followed the order: occluded phosphorus (O-P) > iron-bound phosphorus (Fe-P) > aluminum-bound phosphorus (Al-P) > calcium-bound phosphorus (Ca-P) > exchangeable phosphorus (Ex-P), showing a seasonal pattern of higher levels in winter and lower levels in summer. The dominant phyla of *phoD*-harboring bacteria in the soil were Proteobacteria, Actinobacteria, and Planctomycetes, collectively accounting for 96% of the average relative abundance. Correlation analysis showed a significant negative correlation ($P<0.05$) between the diversity of *phoD*-harboring bacteria and Al-P, as well as a significant positive correlation ($P<0.05$) with soil pH. Redundancy analysis indicated that Al-P and pH were the most important factors influencing the community structure of *phoD*-harboring bacteria. In conclusion, the topsoil of pine forests in the main urban area of Chongqing is generally P-deficient, and the P content is significantly influenced by season. The forms of P occurrence affect the community structure and diversity of *phoD*-harboring bacteria.

Key words: *Pinus massoniana* forests; phosphorus forms; *phoD* gene; diversity of phosphorus-solubilizing bacteria

土壤中的磷可分为有机磷和无机磷两大类,无机磷根据其活性或溶解性的不同可再划分为可交换态的磷(Ex-P)、铝结合磷(Al-P)、铁结合磷(Fe-P)、闭蓄态磷(O-P)、钙结合磷(Ca-P)及残渣态磷^[1];其中,Ex-P 可以被植物吸收利用,Al-P,Fe-P 和 Ca-P 不能被植物直接吸收,但在一定条件下可以转化为植物可吸收利用的形态,而 O-P 是以水化氧化铁胶膜包被的磷酸盐,其溶解度很小,难以被生物利用.由于

不同赋存形态的磷在生物有效性方面存在很大的差异^[2],解析土壤磷的赋存形态是深入认识生态系统磷供应状态的重要基础.

有机磷是土壤总磷的重要组成部分,有机磷的矿化是生物获取磷元素的重要途径.在土壤中有机的

收稿日期: 2024-11-01

基金项目: 重庆市大学生创新训练项目(S202110611406)

* 责任作者,副教授, lindunmei@cqu.edu.cn

磷的降解主要受胞外酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的催化^[3]。过去的研究表明,陆地生态系统中酸性磷酸酶主要由植物根系分泌,而碱性磷酸酶主要来自土壤微生物,特别是细菌^[3-5]。受到在酸性条件下酸性磷酸酶活性更强这一观点的影响^[6],传统上一般认为酸性土壤的有机磷矿化主要受酸性磷酸酶的影响,因此在对酸性土壤开展的研究中较少有研究者关注碱性磷酸酶及其相关的微生物群落^[7-8]。然而,近年来一些研究表明,即使在酸性土壤中,影响土壤有机磷矿化的因素也可能是碱性磷酸酶。例如,在酸性土壤中也发现存在大量编码碱性磷酸酶的基因^[9];在贡嘎山,酸性土壤中的有效磷主要受碱性磷酸酶的影响而不是酸性磷酸酶活性的影响^[10]。这些结果表明分泌碱性磷酸酶的细菌在酸性土壤的磷循环过程中也扮演了重要角色,揭示其群落结构及其影响因素对于深入认识土壤磷循环具有重要意义。细菌中编码碱性磷酸酶的基因主要包括 *phoA*, *phoD* 和 *phoX*^[11-12]。但在陆地生态系统中含 *phoD* 基因的细菌更为常见^[11],而且有研究发现 *phoD* 基因丰度与碱性磷酸酶的活性存在正相关关系^[3,13]。因此,很多研究采用含 *phoD* 基因的细菌群落来表征具备合成碱性磷酸酶的土壤微生物群落^[7,14-16]。不过已有研究主要以农田生态系统为研究对象,而对森林生态系统中含 *phoD* 基因的细菌群落结构特征及其影响因素的认识还相对缺乏^[15]。

马尾松(*Pinus massoniana*)广布于我国南方地区,马尾松林总面积达到 1001 万 hm^2 ^[17]。由于具备优良的抗旱、耐贫瘠等特性,马尾松是长江上游低山丘陵区退耕还林最常用的树种^[18]。三峡库区是我国重点敏感生态区和长江中下游的生态屏障,分布有大面积马尾松林^[18-19],同时马尾松林占重庆市森林总面积的近一半^[17]。重庆主城区“四山”(缙云山、中梁山、铜锣山和明月山)地处三峡库区腹地,也是重庆主城区的重要生态屏障,马尾松林是该区域最主要的植被类型。本研究在重庆主城区“四山”范围内选取了代表性马尾松林样地,解析了马尾松林表层土壤不同形态磷元素的含量水平,同时基于高通量测序技术研究了含碱性磷酸酶 *phoD* 基因的细菌群落特征,揭示该区域马尾松林土壤磷供应现状和参与磷循环的微生物群落结构特征和影响因素,以期为区域森林管理提供

理论参考。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

本研究在重庆主城区四山范围内开展。该区域位于三峡库区腹地,气候类型为亚热带季风性湿润气候,年平均气温 16~18℃,年平均降水量在 1000~1611mm 之间,日平均气温大于 10℃的积温约为 6500℃。其中夏季(6~8 月)月平均温度在 26~29℃之间,降水约占年总降水的 70%,积温约为 3360℃;冬季(12~次年 2 月)月平均气温为 4~8℃,降水明显减少,积温约为 747℃。区域土壤类型以黄壤和黄棕壤为主。该区域整体植被覆盖率高,但残存的天然常绿阔叶林很少,以马尾松纯林和马尾松针阔混交林为主。

1.2 样品采集及前处理

基于前期在该区域建设的马尾松林长期监测样地网络^[20]。考虑空间上的分布,共计选择 8 个马尾松林样地进行本研究,样地基本信息见表 1。分别于 2020 年 12 月(冬季)及 2021 年 7 月(夏季)进行两次野外土壤样品采集。在每个 20m×20m 样地内,用内径为 32mm 土钻按 S 形曲线随机钻取 12 钻深 10cm 的表层土壤置于无菌自封袋内充分混合为一份土壤样品,放入装有冰块的冷藏箱中尽快带回实验室。带回的样品用无菌勺随机挖取约 10g 土壤置于无菌自封袋中,保存于-80℃冰箱用于后续微生物的测定。余下土样分为两部分,一部份土壤样品自然风干保存,去除杂物,研磨过 100 目筛装袋用于不同赋存形态磷含量的测定,另一部分土壤样品保存于-20℃冰箱中冷冻保存,用于土壤 pH 值的测定。

1.3 样品测试分析

1.3.1 不同赋存形态磷含量及 pH 值的测定 土壤 pH 值采用电位法测定,土水比为 1:2.5(w/V)。

土壤总磷(TP)经 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HClO}_4$ 消解后用磷钼蓝比色法测定,有机磷(OrP)采用灼烧法测定,无机磷(IP)总量为总磷减去有机磷。

无机磷赋存形态分级采用 Chang 等^[21]提出的 C-J 化学连续提取法进行,简要步骤如下:(1)用 NH_4Cl 溶液浸提得到交换态磷(Ex-P)提取液;(2)上一步残渣使用 NH_4F 溶液(用 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 调节 pH 值至 8.2)浸提得到铝结合态磷(Al-P)提取液;(3)上一步残

渣使用 NaOH 溶液浸提得到铁结合态磷(Fe-P)提取液;(4)在上一步残渣中加入 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 缓冲液,振荡后加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$,90°C 热水浴并加入 NaOH 搅拌,体系由灰白色逐渐变为浅黄绿色时冷却并离心,上清液使用三酸混合液($\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3\text{-HClO}_4$)消解得到闭蓄态磷(O-P)提取液;(5)上一步残渣使用 H_2SO_4 浸提得到钙结合态磷(Ca-P)提取液;以上步骤获得的提取液均使用磷钼蓝比色法测定其中的磷元素含量.每份土壤样品均设置 3 个重复.

表 1 重庆主城区马尾松林地基本情况

Table 1 Summary of *Pinus massoniana* forest plots in main urban area of Chongqing

样点编号	地理位置	经纬度	样地海拔(m)	林龄(a)	土壤 pH 值
P1	南岸区茶园	106°36'29"E,29°29'38"N	427	37	4.40
P2	南岸区夏家坪	106°39'7"E,29°35'29"N	446	45	4.02
P3	璧山区杨秀口	106°18'29"E,29°46'19"N	382	27	4.22
P4	南岸区大坪子	106°45'11"E,29°31'37"N	410	46	4.00
P5	南岸区小龙洞	106°46'1"E,29°33'21"N	393	47	3.88
P6	巴南区二温泉	106°52'22"E,29°29'9"N	364	41	3.95
P7	巴南区圣灯山	106°41'9"E,29°12'21"N	770	49	4.16
P8	江北区五宝镇	106°49'8"E,29°37'26"N	375	41	3.84

1.3.2 含 *phoD* 基因土壤细菌群落测序及分析 将 -80°C 冷冻保存的土壤样品置于冷冻干燥机进行干燥,用干冰保温寄至上海美吉生物医药有限公司进行细菌群落的测试分析.土壤样品使用 FastDNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒抽提土壤微生物总 DNA.在 DNA 质量检验合格后,使用 *phoD*-733F(5'-TGGG-AYGATCAYGARGT-3')和 *phoD*-1083R(5'-CTGS-GCSAKSACRTTCCA-3')引物对细菌碱性磷酸酶基因(*phoD*)进行 PCR 扩增,每份样品同时做 3 个重复.PCR 在 ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 仪中进行.PCR 反应采用 Pro Taq,20μL 反应体系,包括 10 μL 2×Pro Taq,正反向引物各 0.8μL,10ng/μL DNA 模板,最后用超纯水(ddH₂O)补足至 20μL.PCR 扩增程序设定为:95°C 预变性 3min;95°C 变性 30s;55°C 退火 30s;72°C 延伸 40s,该步骤进行 36 个循环;然后在 72°C 延伸 10min,最后降温至 10°C 保持直到关机.同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行质检,然后建库,最后在 Illumina Novaseq PE2500 平台上进行测序.获得的序列数据在 QIIME2(v2020.2)平台上进行分析,使用 DADA2 插件对序列数据进行降

噪处理,获得扩增子序列变体(amplicon sequence variants,ASVs).然后通过数据库(nt_v20200604)比对进行分类学注释.最后,按最小样本的序列数对所有样品进行抽平处理,该数据用于后续的分析.

1.4 数据处理与统计分析

使用配对样本 Wilcoxon 秩和检验分析土壤各赋存形态磷元素在夏、冬季之间是否存在显著差异.经 Shapiro-Wilk 检验数据服从正态性后,使用 Pearson 相关分析检验微生物群落 α 多样性指数与各赋存形态磷含量(经对数变换)以及土壤 pH 值之间的相关关系^[22],显著性水平设定为 $P < 0.05$.其中,α 多样性指数包括 Chao1 丰富度指数、PD 谱系多样性指数、Shannon 多样性指数和 Pielou 均匀度指数;以属水平下含 *phoD* 基因菌群落(经 Hellinger 转化以消除极端值的影响并减少高丰度物种的权重)为响应变量、各磷元素赋存形态(经对数变换)为解释变量进行冗余分析(RDA),将方差膨胀因子大于 10 的变量从模型中删除;之后使用变差分解(variation partitioning)和层次分割(hierarchical partitioning)解析不同解释变量及其组合的相对重要性^[23].数据分析及绘图均在 R(v4.4.1)软件中进行.

2 结果与分析

2.1 重庆主城区马尾松林表层土壤磷赋存特征及夏冬季差异

如图 1 所示,不同样地土壤 TP 在冬季和夏季的变幅分别为 162.107~273.671mg/kg, 136.587~255.099mg/kg,其均值分别为 192.787,169.512mg/kg;无论哪个季节,土壤 IP 含量均高于 OrP 含量,占比变幅分别为 41.3%~68.4%和 31.6%~58.7%(图 1(a)).

如图 1(b)所示,整体上重庆主城区马尾松林表层土壤的 IP 形态分布稳定,各样地在冬季和夏季均呈现出 O-P> Fe-P> Al-P> Ca-P> Ex-P 的分布格局,且并没有表现出很大的变异性.其中,植物可直接吸收利用的 Ex-P(0.6%~2.1%)及释磷潜力较大的 Fe-P(15.2%~34.1%)以及 Al-P(7.9%~16.7%)的总占比低于 50%.

马尾松林表层土壤中磷含量表现出明显的夏冬季差异,普遍呈现出冬高夏低的分布格局,特别是 TP、O-P、Fe-P 和 Al-P 在冬夏季之间有显著的差异(图 1, $P < 0.05$).

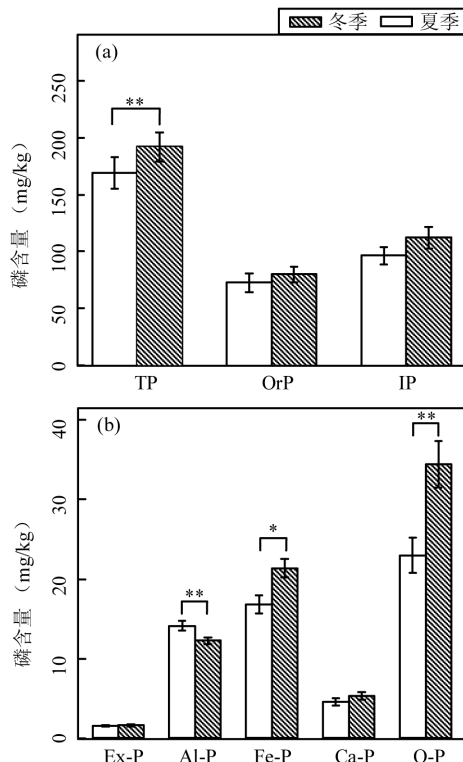


图 1 重庆主城区马尾松林表层土壤各种赋存形态磷含量及其冬夏季差异

Fig.1 Contents of various phosphorus forms and their differences between winter and summer in topsoil of *Pinus massoniana* forests in main urban area of Chongqing

(a)总磷(TP)、有机磷(OrP)和无机磷(IP)含量,(b)不同赋存形态无机磷含量. 数据为均值±标准误($n=8$).Wilcoxon 检验.*表示存在显著差异,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.2 土壤含 *phoD* 基因细菌群落分类群组成特征

基于夏季土壤的高通量测序分析,共得到 730450 条有效序列(最大序列数 100859,最小序列数 67947).以最小序列数抽平后,以 100%相似度聚类共得到 1295 个 ASVs,注释结果分属于 11 门 21 纲 46 目 71 科 134 属.

整体来看,重庆主城区马尾松林土壤含 *phoD* 基因细菌在门水平下以变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)为优势门,其中变形菌门相对丰度最高,占比达 62%(图 2(a)).在属水平下各样地优势属均为拉姆利杆菌属(*Ramlibacter*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*),这四种属的总平均相对丰度占 55%以上(图 2(b)).但具体到各样地之中,链霉菌属

(1.6%~42.2%)与慢生根瘤菌属(30.6%~2.2%)的相对丰度在不同样地间表现出此消彼长的格局(图 2(b)).

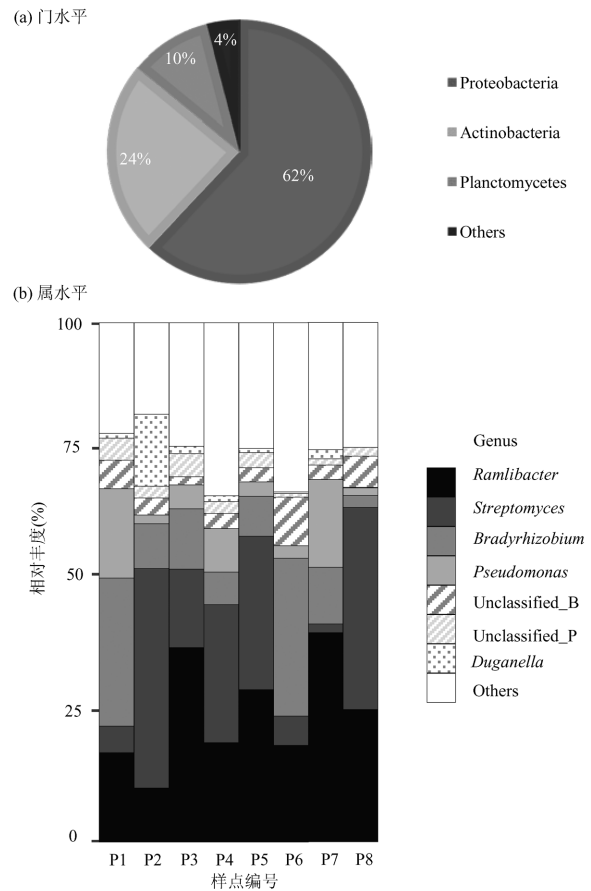


图 2 马尾松林土壤含 *phoD* 基因细菌在门水平和属水平的相对丰度

Fig.2 Relative abundance of the *phoD*-harboring bacteria at the phylum and genus levels in soil of *Pinus massoniana* forests

2.3 含 *phoD* 基因细菌群落多样性及其与土壤磷赋存形态和土壤 pH 值之间的关系

含 *phoD* 基因细菌 α 多样性指数见表 2.研究区含 *phoD* 基因细菌具有较高的 α 多样性,各样地之间部分指数存在较大的差异.其中 Chao1 丰富度指数介于 142.11~866.32 之间,变异系数达到 51.10%,Shannon 多样性指数介于 3.42~5.41 之间.

对土壤磷素形态及 pH 值和含 *phoD* 基因细菌 Alpha 多样性指数进行 Pearson 相关分析.含 *phoD* 基因细菌群落 PD 谱系多样性指数、Shannon 多样性指数、Pielou 均匀度指数均与 Al-P 呈显著的负相关关系(图 3, $P < 0.05$),Shannon 多样性指数、Pielou 均匀度指数和 Chao1 指数与土壤 pH 值呈显著的正相关

关系(图 3, $P < 0.05$), PD 谱系多样性指数与 Ex-P 呈显著的负相关关系(图 3, $P < 0.05$).

表 2 马尾松林土壤含 *phoD* 基因细菌多样性指数
Table 2 Diversity index of the *phoD*-harboring bacteria in soil of *Pinus massoniana* forests

多样性指数	最大值	最小值	平均值	标准差	变异系数(%)
Chao1 丰富度指数	866.32	142.11	403.85	206.38	51.10
Shannon 多样性指数	5.41	3.42	4.511	0.581	12.87
Pielou 均匀度指数	0.82	0.70	0.711	0.040	5.20
PD 谱系多样性指数	88.86	28.21	64.30	18.62	28.9

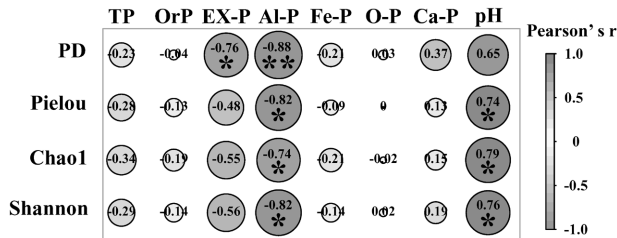


图 3 含 *phoD* 基因细菌 α 多样性指数与各赋存形态磷及土壤 pH 值之间的相关性

Fig.3 Correlation between α -diversity indices of the *phoD*-harboring bacteria and various phosphorus forms and soil pH
图中圆圈面积及颜色深度代表相关系数大小,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.4 土壤磷赋存形态及土壤 pH 值对含 *phoD* 基因细菌群落的影响

属水平下含 *phoD* 基因细菌群落与不同磷素形态的冗余分析结果见图 4.前两个排序轴共解释了数据 60.1%的变异,pH 值及各土壤磷赋存形态均对第一主轴存在较大贡献,其中 pH 值与 Al-P 是影响含 *phoD* 基因细菌群落最强烈的两个因素.在属水平下丰度排名靠前的链霉菌属与 Al-P、Fe-P、OrP、O-P 之间存在一定的正相关关系、拉姆利杆菌与 Ca-P 之间存在正相关关系,而慢生根瘤菌属与 Al-P 则表现出负相关关系.

进一步进行变差分解和层次分割分析(图 5),结果显示土壤 pH 值、有机磷、及各无机磷形态共解释了群落丰度总变差的 38.3%,其中单独效应相对重要的因素依次为 Al-P(16.57%, $P < 0.05$)、pH 值(15.19%, $P < 0.05$)和 OrP(4.69%).同时观察到所有 6 个

因素的单独效应均小于其边际效应,而 O-P 不论是单独效应(-1.91%)还是共同效应(-1.11%)均表现为极小的负效应.

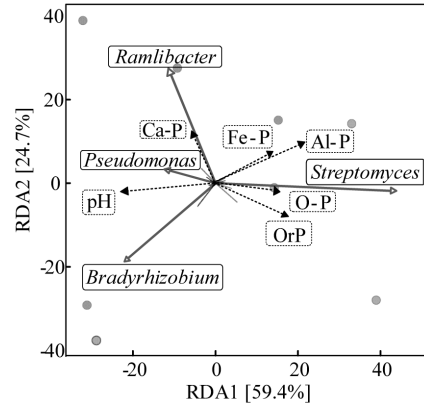


图 4 含 *phoD* 细菌与土壤磷赋存形态及土壤 pH 值的冗余分析结果

Fig.4 Redundancy analysis results of *phoD*-harboring bacteria communities and various forms of phosphorus and soil pH in soil samples

Bradyrhizobium 慢生根瘤菌属; *Streptomyces* 链霉菌属; *Ramlibacter* 拉姆利杆菌属; *Pseudomonas* 假单胞菌属

3 讨论

3.1 重庆主城区土壤磷元素赋存特征

我国土壤总磷(TP)含量很低,介于 170~1090mg/kg 之间^[24],而一般总磷量小于 800~1000mg/kg 以下时对于植物来说土壤便会出现磷素供应不足的情况^[5].本研究中的土壤总磷含量较低(图 1),这与我国南方地区普遍缺磷的认识一致^[25-26],也表明磷元素缺乏是限制重庆主城区马尾松生长的重要因素.本研究中无机磷元素赋存形态整体上表现出 Fe-P、Al-P 较多,而 Ca-P 较少的分布格局,与酸性土壤中富铝化程度高、铝氧化物络合能力强^[27]而钙磷溶解度大等因素相关.

与在西南亚高山与^[28]中丘陵区^[25]等地的研究结果中 TP、Ex-P 等磷元素赋存形态多表现夏高冬低(或秋低)型不同,本研究发现重庆主城区马尾松表层土壤磷含量除 Al-P 外都呈现出冬高夏低的季节分布格局.这可能是因为一方面重庆地区夏季降水集中,降雨量较大,磷元素可能通过淋溶作用流失.另一方面,温暖的夏季土壤条件适宜植物及微生物的生长,土壤中的磷元素被快速的

消耗,但由于马尾松松针在化学元素组成上属于较难分解的凋落物^[29],磷元素由植物体归还到土壤中的过程相对较慢,导致土壤磷库的补充相对困难.Yu^[30]等的研究结果也表明人工林缺乏相关的磷保留机制来应对磷循环过程中磷的快速消耗

过程.同时,夏季土壤温度和微生物活性的增加也增强了土壤磷的矿化能力^[31],而这部分矿化生成的磷会迅速的被土壤中大量的铝氧化物络合固定,这可能是本文结果中夏季 Al-P 含量高于冬季的原因.

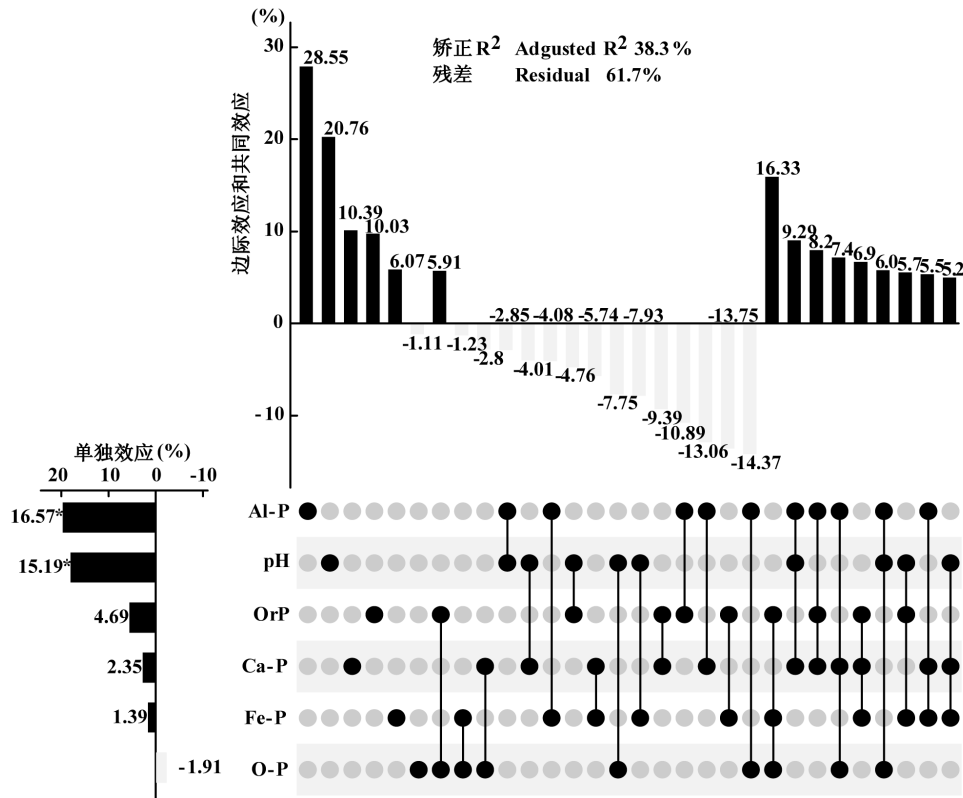


图 5 土壤 pH 值、有机磷(OrP)、及各无机磷形态对含 *phoD* 基因细菌群落结构(属水平)影响的相对重要性

Fig.5 The relative importance of soil pH, organic phosphorus and various inorganic phosphorus forms on the bacterial community structure (genus level) containing the *phoD* gene

在右侧点阵图中,每行对应一个环境因子.对于每一列,孤立黑点表示各环境因子的边际效应,多点间连线表示这些环境因子间的共同效应,各组分解释的变差百分比(来自方差分解)展示在上方柱形图中.左侧柱形图为各环境因子的单独效应(来自层次分割),其值等同于该环境因子的边际效应加上与其他环境因子的共同效应的平均分配值.共同效应影响较小的组合结果未展示. *, $P < 0.05$

3.2 土壤含 *phoD* 基因细菌群落结构特征

本研究与相关研究比较可发现在不同地区、不同林分^[32-34]土壤中含 *phoD* 基因细菌中变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)为主要优势类群(图 2(a)).值得注意的是,在海洋、耕地等研究地点的研究结果中蓝细菌门(Cyanobacteria)细菌同时具有较高的相对丰度,这和本研究的结果不同.Bergkemper 等^[35]在一项强酸性(pH=3.52)森林土壤的研究中的结果与本研究相似,这可能是由于相较于海洋、耕地等研究地点,发育成熟的森林生态系统郁闭度高,而土壤蓝细菌普遍是

自养微生物,没有充分的光能维持自身生长需要,而较低的土壤盐度水平及强酸性的土壤 pH 值也会强烈的威胁蓝细菌的生存^[36].进一步分析属水平的相对丰度结果显示(图 2(b)),链霉菌属与慢生根瘤菌属之间呈现出“此消彼长”的格局,推测这两种微生物之间可能存在较强的竞争关系.有研究表明链霉菌属中的一些细菌能够通过产生抗生素和其他抗微生物物质来抑制其他细菌的生长,同时链霉菌属与慢生根瘤菌属之间还存在“邻里防御性互惠”的复杂相互作用使其可以通过分泌去铁胺(Desferrioxamine)限制慢生根瘤菌的元素竞争能力从而限制其生

长^[37].慢生根瘤菌属的细菌则通常与植物根系结合形成根瘤,在解除自身氮限制的同时,能通过共生体系内的磷循环或直接分解土壤中较易分解的 IP 组分^[31]满足自身需要从而加强竞争优势.这一结果表明含 *phoD* 基因细菌的种间关系也是影响群落结构的重要原因.值得注意的是除根瘤菌外许多相对丰度优势的含 *phoD* 基因细菌同时也参与到土壤氮循环的过程中,例如假单胞菌属中的细菌在土壤反硝化过程中起到重要作用^[30,38].这说明土壤氮循环与磷循环之间密切相关,而土壤含 *phoD* 基因细菌可能从中起到“桥梁”作用.

3.3 土壤 pH 值及磷赋存形态对含 *phoD* 基因细菌群落的影响

一般认为,pH 值是影响微生物群落结构最主要的环境因素^[39-40].但在本文的结果中,含 *phoD* 基因细菌群落 α 多样性指数与 Al-P 的相关性比 pH 值更强(图 3),更进一步的分析也显示不论是单独效应还是共同效应,Al-P 对土壤含 *phoD* 基因细菌群落结构的影响均高于土壤 pH 值(图 5).与本文的结果相同,在许多研究中都观察到低磷含量土壤中 *phoD* 基因的丰度显著高于高磷含量土壤^[35].因此,磷限制对土壤含 *phoD* 基因细菌的影响要强于 pH 值.一方面,过去的研究已经证实 *phoD* 基因受 Pho 调节子的控制^[41],土壤的磷限制会上调微生物对碱性磷酸酶相关基因的表达,特别是适应更广泛底物的 *phoD* 基因^[42-43].另一方面,本研究所处西南地区酸性土有机质含量低、酸性强以及活性铝含量高,土壤中大量的活性铝离子会和土壤中的生物“争抢”Ex-P,这一环境行为直接影响了土壤磷的生物可利用性.Al-P 成为土壤中无机磷含量最多的部分.与此同时,随着 Al-P 含量增加,铝毒害^[44]也可能成为导致微生物多样性下降的重要原因之一.pH 值一般通过影响酶活性来影响土壤微生物生存,也能通过影响土壤磷赋存形态结构间接影响土壤含 *phoD* 基因细菌的群落结构.而微生物可以主动改变土壤环境,在酸性的环境中创造 pH 值中性的微位点^[45-46],削弱了土壤 pH 值对含 *phoD* 基因细菌群落结构的直接影响.这同时解释了为什么尽管碱性磷酸酶活性主要在中性和碱性环境中占主导地位^[47],但在本文的结果里强酸性的土壤中含 *phoD* 基因细菌的丰富度和多样性都较高.

自然演替理论认为,随着演替的进行,自然界中土壤磷素的有效性在时间尺度上逐渐下降,大量活性磷被集中固定到周转缓慢的土壤有机质和植物、微生物残体等有机磷库之中,导致磷循环过程中活跃的磷组分不断减少^[48].在本文的结果中,作为碱性磷酸酶反应底物的 OrP 含量在土壤 TP 中占比较高,却并没有表现出对土壤含 *phoD* 基因细菌的群落结构存在显著影响(图 5).这可能是因为开展本研究的马尾松人工纯林属于演替后期的成熟林,但土壤中磷循环路径较简单,土壤有机磷库的稳定性较差但是恢复力较强^[35].有研究表明土壤磷匮乏时微生物会与植物竞争土壤中矿化产生的 Ex-P 并将其保持在微生物磷库当中^[49],这可能导致虽然土壤 OrP 的矿化过程活跃,但整体上具有活性的磷只是在 OrP 范围内周转.

而土壤中大量的活性铝离子的络合固定影响了土壤磷的生物可利用性,表现为 Al-P 对含 *phoD* 基因细菌群落具有强烈的影响.O-P 虽然是含量最高(图 1)的无机磷组分,但由于其极稳定的物理化学性质导致它在土壤中不参与磷循环过程,在本文的结果中对于群落丰度变差的解释也几乎没有贡献.整体来看,各影响因素的共同效应与单独效应的比较结果表明各磷形态及 pH 值在综合环境下对含 *phoD* 基因细菌的群落结构影响更大,即各磷形态之间的赋存关系会加强其对微生物群落的影响.

4 结论

4.1 重庆四山地区土壤普遍缺磷,冬季和夏季土壤总磷(TP)含量均值分别为 192.787mg/kg, 169.512mg/kg.总磷(TP)、无机磷(IP)含量受到季节变化的显著影响,呈现冬高夏低的变化趋势.其中各无机磷形态含量分布较为稳定,呈现出闭蓄态磷(O-P)>铁结合磷(Fe-P)>铝结合磷(Al-P)>钙结合磷(Ca-P)>可交换态磷(Ex-P)的分布格局.

4.2 马尾松林土壤含 *phoD* 基因细菌群落主要由变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和浮霉菌门(Planctomycetes)组成,平均相对丰度达到 96%.土壤含 *phoD* 基因细菌多样性与 Al-P 之间存在显著负相关关系($P<0.05$),与 pH 值之间存在显著正相关关系($P<0.05$). Al-P 和 pH 值是影响含 *phoD* 基因细菌群落结构特征的最主要因素.

参考文献:

- [1] 崔 瑶, 辜夕容, 严宁珍, 等. 缙云山 4 种林分土壤无机磷与活性铝的含量及分布 [J]. 生态学报, 2022, 42(5): 1727–1738.
Cui Y, Gu X R, Yan N Z, et al. Content and distribution of inorganic phosphorus and labile aluminum in soil of four forest types in Jinyun Mountain [J]. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(5): 1727–1738.
- [2] Luo S P, He B H, Zeng Q P, et al. Effects of seasonal variation on soil microbial community structure and enzyme activity in a Masson pine forest in Southwest China [J]. Journal of Mountain Science, 2020, 17(6): 1398–1409.
- [3] Hu Y, Xia Y, Sun Q, et al. Effects of long-term fertilization on *phoD*-harboring bacterial community in Karst soils [J]. Science of the Total Environment, 2018, 628–629(575): 53–63.
- [4] Spohn M, Kuzyakov Y. Distribution of microbial- and root-derived phosphatase activities in the rhizosphere depending on P availability and C allocation—Coupling soil zymography with ¹⁴C imaging [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2013, 67: 106–113.
- [5] Krämer S. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32(2): 179–188.
- [6] Tazisong I A, Senwo Z N, He Z. Phosphatase hydrolysis of organic phosphorus compounds [J]. Advances in Enzyme Research, 2015, 3(2): 39–51.
- [7] Zheng M M, Wang C, Li W X, et al. Changes of acid and alkaline phosphatase activities in long-term chemical fertilization are driven by the similar soil properties and associated microbial community composition in acidic soil [J]. European Journal of Soil Biology, 2021, 104(6): 103312.
- [8] Zheng M M, Wang C, Li W X, et al. Soil nutrients drive function and composition of *phoC*-harboring bacterial community in acidic soils of Southern China [J]. Front Microbiol., 2019, 10: 2654.
- [9] Bergkemper F, Schöler A, Engel M, et al. Phosphorus depletion in forest soils shapes bacterial communities towards phosphorus recycling systems [J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(9): 1988–2000.
- [10] Li J B, Xie T, Zhu H, et al. Alkaline phosphatase activity mediates soil organic phosphorus mineralization in a subalpine forest ecosystem [J]. Geoderma, 2021, 404(68): 115376.
- [11] Lagos L M, Acuña J J, Maruyama F, et al. Effect of phosphorus addition on total and alkaline phosphomonoesterase-harboring bacterial populations in ryegrass rhizosphere microsites [J]. Biology and Fertility of Soils, 2016, 52(7): 1007–1019.
- [12] Luo G W, Ling N, Nannipieri P, et al. Long-term fertilisation regimes affect the composition of the alkaline phosphomonoesterase encoding microbial community of a vertisol and its derivative soil fractions [J]. Biology and Fertility of Soils, 2017, 53(4): 375–388.
- [13] Fraser T, Lynch D H, Entz M H, et al. Linking alkaline phosphatase activity with bacterial *phoD* gene abundance in soil from a long-term management trial [J]. Geoderma, 2015, 257–258(9): 115–122.
- [14] Wei X M, Hu Y J, Cai G, et al. Organic phosphorus availability shapes the diversity of *phoD*-harboring bacteria in agricultural soil [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2021, 161(5): 108364.
- [15] Wan W J, He D L, Li X, et al. Adaptation of *phoD*-harboring bacteria to broader environmental gradients at high elevations than at low elevations in the Shennongjia primeval forest [J]. Geoderma, 2021, 401(56): 115210.
- [16] Wang M, Wu Y, Zhao J, et al. Long-term fertilization lowers the alkaline phosphatase activity by impacting the *phoD*-harboring bacterial community in rice-winter wheat rotation system [J]. Science of the Total Environment, 2022, 821(3): 153406.
- [17] 薛沛沛, 齐代华, 陈道静, 等. 马尾松林改造成樟林过程中生态系统服务功能评估 [J]. 四川林业科技, 2019, 40(1): 30–34.
Xue P P, Qi D H, Chen D J, et al. Forest ecosystem service and its evaluation in the transforming process from *Pinus massoniana* forest into *Cinnamomum camphora* forest [J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology, 2019, 40(1): 30–34.
- [18] Cui N, Chen X, Liu Y, et al. Shrub and herb diversity at different ages of *Pinus massoniana* plantation [J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(15): 4313–4323.
- [19] 王轶浩, 陈 展, 周建岗, 等. 重庆酸雨区马尾松纯林改造对土壤酸化特征及团聚体稳定性的影响 [J]. 生态学报, 2021, 41(13): 5184–5194.
Wang Y H, Chen Z, Zhou J G, et al. Effects of transformation of Masson pine forest on characteristics of soil acidification and aggregate stability within polluted areas of Chongqing. [J] Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(13): 5184–5194.
- [20] 陈历容, 林佳妮, 沈 蓉, 等. 三峡库区马尾松林土壤真菌群落特征及影响因素 [J]. 应用生态学报, 2023, 33(9): 2397–2404.
Chen L R, Lin J N, Shen R N, et al. Characteristic of soil fungal community and the influencing factors of *Pinus massoniana* forests in the Three Gorges Reservoir Region [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2022, 33(9): 2397–2404.
- [21] Chang S C, Jackson M L W. Fractionation of soil phosphorus [J]. Soil Science, 1957, 84(9): 133–144.
- [22] Friedman J, Alm E J. Inferring correlation networks from genomic survey data [J]. PLoS Computational Biology, 2012, 8(9): e1002687.
- [23] Lai J S, Zou Y, Zhang J L, et al. Generalizing hierarchical and variation partitioning in multiple regression and canonical analyses using the rdacca.hp R package [J]. Methods in Ecology and Evolution, 2022, 13(4): 782–788.
- [24] 王树力. 不同经营类型红松林对汤旺河流域土壤性质的影响 [J]. 水土保持学报, 2006, (2): 90–93.
Wang S L. Effects of different management types of *Pinus koraiensis* forest on soil properties around Tangwang river [J] Journal of Soil and Water Conservation, 2006, (2): 90–93.
- [25] 洗应男, 陈 婵, 方 晰, 等. 湘中丘陵区 4 种植被类型土壤全磷、有效磷含量的变异特征 [J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(5): 79–88.
Xian Y N, Chen C, Fang X, et al. Variation characteristics of soil total phosphorus and effective phosphorus concentrations in four vegetation type soils in the central hilly area of Hunan Province, China [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2019, 39(5): 79–88.
- [26] 简尊吉, 倪妍妍, 徐 瑾, 等. 中国马尾松林土壤肥力特征 [J]. 生态学报, 2021, 41(13): 5279–5288.
Jian Z J, Ni Y Y, Xu J, et al. Soil fertility in the *Pinus massoniana*

- forests of China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021,41(13):5279–5288.
- [27] Huang X, Foster G D, Honeychuck R V, et al. The maximum of phosphate adsorption at pH 4.0: why it appears on aluminum oxides but not on iron oxides? [J]. *Langmuir*, 2009,25(8):4450–4461.
- [28] Li J S, Wu B Y, Zhang D D, et al. Elevational variation in soil phosphorus pools and controlling factors in alpine areas of Southwest China [J]. *Geoderma*, 2023,431:116361.
- [29] 陆晓辉,丁贵杰.马尾松人工纯林凋落松针数量及基质质量动态 [J]. *生态学报*, 2017,37(22):7568–7575.
- Lu X H, Ding G J. Dynamics and quality of leaf litter fall in pure *Pinus massoniana* plantations [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017,37(22):7568–7575.
- [30] Yu Z, Guoyi Z, Liu L, et al. Natural forests promote phosphorus retention in soil [J]. *Global Change Biology*, 2022,28(4):1678–1689.
- [31] Xu Z M, Adusei-Fosu K, Wang H L, et al. Interactive effects of biochar and phosphorus fertilizer on *PhoD*-harboring bacteria and phosphorus dynamics in Moso Bamboo forest soil [J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2024,24:7010–7023.
- [32] 滕泽栋,李敏,朱静,等.野鸭湖湿地芦苇根际微生物多样性与磷素形态关系 [J]. *环境科学*, 2017,38(11):4589–4597.
- Teng Z D, Li M, Zhu J, et al. Effects of soil microbial diversity on the phosphate fraction in the rhizosphere of *Phragmites communis* in the Yeyahu wetland in Beijing, China [J]. *Environmental Science*, 2017,38(11):4589–4597.
- [33] 余晨兴,林洪,苏玉萍,等.闽江口-平潭海域有机解磷菌多样性及群落特征 [J]. *应用生态学报*, 2021,32(5):1863–1872.
- She C X, Lin H, Su Y P, et al. Diversity and community characteristics of organic phosphate-mineralizing bacteria in the sea area between Minjiang Estuary to Pingtan [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021,32(5):1863–1872.
- [34] Gao Y, Tariq A, Zeng F, et al. Fractions of soil phosphorus mediated by rhizospheric *phoD*-harbouring bacteria of deep-rooted desert species are determined by fine-root traits [J]. *Functional Ecology*, 2024,38(10):2300–2315.
- [35] Bergkemper F, Scholer A, Engel M, et al. Phosphorus depletion in forest soils shapes bacterial communities towards phosphorus recycling systems [J]. *Environmental Microbiology*, 2016,18(6):1988–2000.
- [36] Zhang G, Bai J, Zhai Y, et al. Microbial diversity and functions in saline soils: A review from a biogeochemical perspective [J]. *Journal of Advanced Research*, 2024,59:129–140.
- [37] Du X, Liu N, Yan B, et al. Proximity-based defensive mutualism between *Streptomyces* and *Mesorhizobium* by sharing and sequestering iron [J]. *ISME Journal*, 2024,18(1):wrad041.
- [38] Pauleta S R, Dell'acqua S, Moura I. Nitrous oxide reductase [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2013,257(2):332–349.
- [39] Fierer N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017,15(10):579–590.
- [40] Zhou Z, Wang C, Luo Y. Meta-analysis of the impacts of global change factors on soil microbial diversity and functionality [J]. *Nature Communications*, 2020,11(1):3072.
- [41] Eder S, Shi L, Jensen K, et al. A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase/alkaline phosphatase is the product of a *Pho* regulon gene, *phoD* [J]. *Microbiology*, 1996,142(8):2041–2047.
- [42] 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 [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013,49(6):661–672.
- [43] Gao Y, Tariq A, Zeng F, et al. Soil microbial functional profiles of P-cycling reveal drought-induced constraints on P-transformation in a hyper-arid desert ecosystem [J]. *Science of the Total Environment*, 2024,925:171767.
- [44] 贺根和.铝胁迫对红壤微生物的生态毒理效应及微生物的耐铝特性研究 [D]. 南京:南京大学, 2012.
- He G H. Studies on microbial ecological and toxicological effects by aluminum stress and microbial aluminum-tolerance characteristics in acidic red soils. [D]. Nanjing: Nanjing University, 2012.
- [45] Philippot L, Chenu C, Kappler A, et al. The interplay between microbial communities and soil properties [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2024,22(4):226–239.
- [46] Šimek M, Cooper J E. The influence of soil pH on denitrification: progress towards the understanding of this interaction over the last 50years [J]. *European Journal of Soil Science*, 2002,53(3):345–354.
- [47] Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, et al. Role of Phosphatase Enzymes in Soil [M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2011:215–243.
- [48] Odum E P. The strategy of ecosystem development: an understanding of ecological succession provides a basis for resolving man's conflict with nature [J]. *Science*, 1969,164(3877):262–270.
- [49] Jiang M, Crous K Y, Carrillo Y, et al. Microbial competition for phosphorus limits the CO₂ response of a mature forest [J]. *Nature*, 2024,630(8017):660–665.

致谢: 感谢林佳妮、杨光蓉、沈蓉和陈历睿在野外调查和实验室测试分析工作中提供的帮助。

作者简介: 李绍隆(2000-),男,青海西宁人,重庆大学硕士研究生,主要从事土壤微生物群落相关研究.lishaolong@cqu.edu.cn.