

DOI: 10.11766/trxb202111090520

胡荷, 李胜君, 王蕊, 吴宪, 李玉洁, 赵建宁, 李刚, 修伟明. 氮肥配施秸秆对土壤原生生物群落的影响[J]. 土壤学报, 2023, 60(4): 1123–1133.

HU He, LI Shengjun, WANG Rui, WU Xian, LI Yujie, ZHAO Jianning, LI Gang, XIU Weiming. Effects of Nitrogen Fertilization Combined with Straw Incorporation on Soil Protist Community [J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60(4): 1123–1133.

氮肥配施秸秆对土壤原生生物群落的影响*

胡 荷¹, 李胜君¹, 王 蕊¹, 吴 宪¹, 李玉洁³, 赵建宁¹, 李 刚^{2†},
修伟明^{1†}

(1. 农业农村部环境保护科研监测所农业农村部产地环境污染防控重点实验室, 天津 300191; 2. 农业农村部环境保护科研监测所天津市农业环境与农产品安全重点实验室, 天津 300191; 3. 喀喇沁旗农牧局, 内蒙古赤峰市 024400)

摘 要: 长期施用化肥所致的不利影响严重威胁到环境和人类的健康, 已引起全世界的广泛关注。将生态友好的作物秸秆归还农田是减少化肥投入和缓解环境问题的极具潜力的农业管理措施。原生生物是土壤中丰富且多样的真核生物, 是土壤微生物组的重要组成部分。为研究氮肥配施秸秆对原生生物群落的影响, 设置了 2 × 4 (2 个秸秆还田组 × 4 个氮梯度) 全因子交互田间定位试验, 采用 Illumina 高通量测序技术研究了 8 种不同施肥处理下土壤原生生物群落多样性、组成和潜在功能的变化, 并结合土壤理化性质分析探究驱动土壤原生生物群落变化的关键环境因子。结果表明: 绿藻门 (Chlorophyta)、锥足亚门 (Conosa)、丝足虫门 (Cercozoa) 和纤毛虫门 (Ciliophora) 是所有处理中的优势类群。氮肥施用降低了土壤原生生物的多样性, 而配施秸秆提升了土壤原生生物的多样性, 并且在高施氮水平提升效果更为显著。绿藻门 (Chlorophyta) 的相对丰度随氮肥施用量增加呈下降趋势。丝足虫门 (Cercozoa) 和纤毛虫门 (Ciliophora) 的相对丰度在秸秆还田组中随氮肥施用量的增加而升高。捕食类原生生物 (phagotrophs) 在所有处理中均为绝对优势类群。与单施化肥处理相比, 配施秸秆提高了捕食类原生生物的相对丰度, 但降低了光养类原生生物 (phototrophs) 的相对丰度。单施化肥情况下, 寄生类原生生物 (parasites) 表现出对高施氮量的偏好。土壤有机质和 pH 是土壤原生生物群落变化的重要驱动因子。总之, 本研究证明了氮肥施用耦合秸秆还田措施能够影响土壤原生生物群落, 同时明确了对农业管理措施变化反应敏感的原生生物类群。

关键词: 氮肥施用; 秸秆还田; 原生生物; 多样性; 群落组成; 功能群

中图分类号: X172 **文献标志码:** A

Effects of Nitrogen Fertilization Combined with Straw Incorporation on Soil Protist Community

HU He¹, LI Shengjun¹, WANG Rui¹, WU Xian¹, LI Yujie³, ZHAO Jianning¹, LI Gang^{2†}, XIU Weiming^{1†}

* 农业农村部环境保护科研监测所基础前沿项目 (2021-jcqyrw-xwm)、中国农业科学院科技创新工程项目和公益性行业 (农业) 科研专项 (201503121-04) 资助 Supported by the Fundamental Cutting-edge Projects of Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China (No. 2021-jcqyrw-xwm), the Scientific and Technological Innovation Project of the Chinese Academy of Agricultural Sciences and the Special Fund for Scientific Research on Agricultural Public Causes of China (No. 201503121-04)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xiuweiming@caas.cn; ligang06@caas.cn

作者简介: 胡 荷 (1994—), 女, 贵州铜仁人, 硕士研究生, 主要从事生物多样性与生态农业研究。E-mail: huhe716@163.com

收稿日期: 2021-11-09; 收到修改稿日期: 2022-03-25; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2022-05-10

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Original Agro-environment Pollution Prevention and Control of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China; 2. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin Key Laboratory of Agro-environment and Agro-product Safety, Tianjin 300191, China; 3. Agricultural and Pastoral Bureau of Karakqin Banner, Chifeng, Inner Mongolia 024400, China)

Abstract: Long-term chemical fertilization (especially nitrogen fertilization) under intensive land-management practices in agriculture is of great concern globally due to its adverse influence on the environment and human health. Returning the eco-friendly crop residues to farmland is a promising way of reducing chemical fertilizer input and alleviating environmental problems. **【Objective】** Protists are unicellular eukaryotes with enormous abundance and diversity, and play versatile functional roles to improve soil fertility and agricultural productivity. Thus, they comprise an integral component of soil microbiota in the agroecosystem. However, little is known about the responses of the soil protist community to nitrogen fertilization in combination with straw incorporation. **【Method】** Here, a fixed field trial with 2 × 4 full-factor interaction was performed to examine the variations in diversity, composition, and potential function of the protistan community using Illumina high-throughput sequencing under eight different fertilization treatments (2 straw returning groups × 4 nitrogen gradients). Also, the key forces driving the variation in soil protistan community were determined in combination with edaphic property analysis. **【Result】** The phyla Chlorophyta, Conosa, Cercozoa and Ciliophora were dominant in the soils for all treatments. Nitrogen fertilization diminished the diversity of soil protists, whereas straw returning in general modified such impacts, with more pronounced effects under higher nitrogen application rates. Regardless of whether straw was added, the relative abundance of Chlorophyta exhibited an overall decrease with increased nitrogen gradient. Cercozoa and Ciliophora presented an increase in proportion with the amount of nitrogen fertilizer in the straw returning group. In the current study, the protistan functional community was predominated by phagotrophs in all treatments. Compared to treatments without straw addition, the implementation of straw returning enhanced the relative abundance of phagotrophs, but suppressed the proportion of phototrophs. Protistan parasites preferred a high nitrogen input under exclusive nitrogen fertilizer, with highest proportion in N300 treatment, which was significantly higher than those in all other treatments. Soil properties were important environmental factors determining the shifts in soil protist community, with soil organic matter and pH exhibiting the most intensive influences as revealed by redundancy analysis (RDA) and Pearson's correlation analysis. **【Conclusion】** This study provides experimental evidence that nitrogen fertilization coupled with straw incorporation have consequences for the soil protist community. It also shows that the phylogenetic and functional taxa of protists are responsive to such agricultural management regime alterations. Future studies should aim at deciphering the trophic associations among microorganisms, as well as constructing agricultural soil microhabitat beneficial for crops based on reasonable fertilization regimes and utilization of biotic resources like protists.

Key words: Nitrogen fertilization; Straw returning; Protists; Diversity; Community composition; Functional groups

集约化农业管理措施的广泛推行旨在提高作物产量以满足人类日益增长的粮食需求。由于作物生长需要大量的氮素，氮素供应成为直接影响作物产量的重要因子^[1]。增加化学氮素投入可显著促进农业生产^[2]，但长期大量施用氮素会导致土壤酸化^[2]、肥力下降^[3]、养分失衡^[4]、温室气体排放上升^[5]以及生物多样性丧失^[6]，继而降低土壤的生态系统服务多功能性^[7]。土壤质量每况愈下，人类健康受到严重威胁。如何培肥地力和提高养分循环效率以实现土壤生产力不断提升与生态环境协调发展，已成为现代农业发展所需解决的关键问题^[8-9]。

土壤微生物是土壤-植物系统中生源要素迁移转化的引擎，土壤中有机的分解与积累，氮素转化（包括生物固氮）等过程无不与微生物的活动密切相关^[10]。现代可持续和环境友好型农业鼓励有机肥和化学氮肥的联合应用。秸秆还田是提升土壤肥力的有效措施，能够显著提高土壤有机碳含量和减少氮素流失^[11]，从而减少化肥过量施用对环境所带来的负面影响。秸秆还田所带入的有机物质和矿质元素有利于土壤微生物的生长和繁殖，反之微生物数量的增加促进了秸秆分解^[12]。秸秆在土壤微生物的分解作用下发生矿化反应，土壤养分得到补充和

良性循环利用^[13]。秸秆还田措施真正实现了“取之于田，用之于田”。土壤微生物组是维系陆地生态系统地上-地下相互作用的纽带，那么，秸秆还田对土壤微生物多样性的影响直接影响着地下和地上生态系统结构和功能稳定性。有研究^[7]表明，氮肥配施秸秆对土壤理化性质和微生物多样性的影响大于单独施氮处理，其中秸秆还田增强了土壤微生物网络的复杂性。目前有关农业管理措施对土壤微生物组影响的研究大多集中在细菌和真菌群落，而对土壤原生物群落影响的了解尚不全面。

原生物包括除了植物、真菌和动物外的所有真核生物^[14]，在土壤真核群落中占据很大比例，是土壤微生物组的重要组成部分^[15]。在土壤生态系统中，原生物具有重要的服务功能，如调节有机质分解、影响养分循环过程、维持土壤肥力和植物生产力^[14, 16]。原生物包括光养类（Phototrophs）、捕食类（Phagotrophs）、寄生类（Parasites）以及兼性营养类等多种功能类群，构成地下微食物网的基础^[17]。捕食类原生物通过捕食个体更小的生物（如细菌、真菌、藻类、线虫和其他原生物），控制微生物种群的丰度和功能^[17-18]。而这种捕食活动重新分配了所获猎物中的养分，促进土壤养分的周转，在调节土壤肥力方面发挥关键作用。此外，原生物还可通过降低植物根际环境中致病菌的丰度和毒性或与植物有益微生物协同作用，达到抑制植物病害、促进植物生长、保持植物健康的作用^[18-20]。Guo 等^[20]表明原生物在激发植物性能中发挥重要作用，可以将其作为微生物因子用于调控和指示植物健康。同时，原生物是微生物组中对施肥处理和季节变化较敏感的种群，具有监测农田土壤质量的潜力^[7]。土壤原生物是生态系统物质循环的重要参与者，然而，由于原生物群落的研究起步较晚，开展土地管理策略变化对土壤原生物群落影响的研究十分必要。为此，本研究通过布设包括 2 个秸秆还田组和 4 个氮肥梯度的全因子交互田间定位试验，探究氮肥配施秸秆对土壤原生物群落的影响，明确主要环境驱动因子，以期增进对原生物在土壤质量变化中的指示作用及其在微生物组中重要性的了解，同时为氮肥施用配合秸秆还田技术的优化提供基础数据与理论支撑。

1 材料与方法

1.1 研究区概况与土壤样品采集

田间试验在位于天津市宁河区的农业农村部环境保护科研监测所实验站（39°48'N，117°71'E）中进行。该实验站的气候条件、土壤类型等信息见吴宪等^[21]。田间试验始于 2015 年 10 月，采取 2 × 4 全因子交互式设计，包括 2 个秸秆还田组（秸秆不还田组和秸秆还田组）和 4 个氮肥梯度，分别是不施氮肥秸秆不还田处理（CK）、N 100 kg·hm⁻² 处理（N100）、N 200 kg·hm⁻² 处理（N200）、N 300 kg·hm⁻² 处理（N300）、秸秆还田处理（S）、秸秆还田配施 N 100 kg·hm⁻² 处理（SN100）、秸秆还田配施 N 200 kg·hm⁻² 处理（SN200）、秸秆还田配施 N 300 kg·hm⁻² 处理（SN300）共计 8 个处理，各 3 个重复小区。试验中施用的肥料包括无机复合肥（N：P₂O₅：K₂O 为 28：8：8）、磷肥（P₂O₅ 含量 12%）、钾肥（K₂O 含量 60%）、尿素（N 含量 46%）。在冬小麦和夏玉米播种时分别将相当于纯氮量 60 kg·hm⁻²、120 kg·hm⁻²、180 kg·hm⁻² 的无机复合肥作为基肥施入相应的试验小区，并在小麦苗期和玉米拔节期分别将相当于纯氮量 40 kg·hm⁻²、80 kg·hm⁻²、120 kg·hm⁻² 的尿素作为追肥施入。所有处理所施用的磷肥和钾肥量均一致（P₂O₅：187.5 kg·hm⁻²、K₂O：63 kg·hm⁻²），在冬小麦和夏玉米播种时一次性施入。按照当地常规管理方式，所有处理中小麦秸秆全部粉碎还田，玉米季仅秸秆还田组中的玉米秸秆粉碎为小段后通过耕翻方式还田，因此本研究中的秸秆还田专指玉米秸秆还田。田间管理措施采用当地常规生产方式。

在玉米收获前（2020 年 9 月）采集土壤样品，采样深度 0~20 cm。在每个处理小区中，使用直径 5 cm 的土壤采样器随机采集 5 个土芯并混合成 1 个土壤样品，装入灭菌自封袋暂存于低温保温箱中，并迅速运送回实验室。将每份土壤样品过筛（2 mm），去除杂质后分为 3 份子样品：用于高通量测序分析的子样品于 -70℃ 保存；用于土壤硝态氮和铵态氮的测定的子样品于 4℃ 冷藏；第 3 份子样品经风干后于室温保存用于其他理化性质分析。

1.2 土壤理化性质测定

土壤理化性质的测定方法参见《土壤农化分

析》^[22]。采用烘干法测定土壤含水量 (Moisture Content, MC); 采用复合电极法测定土壤 pH[水土比 (v/v) 为 2.5 : 1]; 土壤有机质 (Soil Organic Matter, SOM)、全氮 (Total Nitrogen, TN)、全磷 (Total Phosphorus, TP) 和有效磷 (Available Phosphorus, AP) 分别采用重铬酸钾容量法、半微量凯氏法、HClO₄-H₂SO₄ 消煮—钼锑抗比色法和 NaHCO₃ 浸提—钼锑抗比色法测定; 土壤样品经 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂ 溶液浸提后使用连续流动分析仪 (AA3, SEAL Analytical, 德国) 测定铵态氮 (NH₄⁺-N) 和硝态氮 (NO₃⁻-N)。

1.3 高通量测序及生物信息学分析

使用 Fast DNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, 美国) 从 0.5 g 土壤提取 DNA, 提取步骤参照试剂盒操作说明书。DNA 的完整性通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳判断, 并使用 NanoDrop2000 超微量分光光度计 (NanoDrop Technologies, hermo Scientific, MA, 美国) 测定 DNA 吸光率, 计算 DNA 浓度并检验纯度。用带有 barcode 序列的引物组 F-TAReuk454FWD1/R-TAReukREV3^[23] 扩增真核生物 18S rRNA 基因的 V4 高变区序列。使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, 美国) 对 PCR 扩增子进行纯化, 并经 QuantiFluor[™]-ST (Promega, 美国) 定量后, 将纯化的扩增子等摩尔混合后, 在 Illumina MiSeq 测序仪上进行测序, 扩增子测序交由上海美吉生物医药科技有限公司 (Majorbio Bio-Pharm Technology Co., 上海) 完成。

使用 QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology X 1.9.1) 对原始序列进行质量筛选和修剪^[24], 使用 UPARSE 软件 (7.0.1090) 用于嵌合体移除^[25], 在 97% 的相似度水平上将序列聚类成操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs), 选择每个 OTU 中数量最多的序列作为代表性序列用于分类学注释。通过与 PR2 数据库 (Protist Ribosomal Reference Database) (version_4.5) 比对以确定每个 OTU 的分类学信息^[26]。去除 Rhodophyta、Streptophyta、fungus、Opisthokonta_X、后生动物等真核生物类群以获得最终的原生生物 OTU 分类表。参照相关文献人工划分原生生物功能群, 包括捕食类、光养类、寄生类、其他消费者类 (包括一些寄生兼捕食型、光养兼捕食型等) 以及其他无法归类

的^[27-28]。原始测序数据已提交至美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库, 登录号为 PRJNA 766328。

1.4 统计分析

采用单因素方差分析 (One-way analysis of variance, AONVA) 中的邓肯 (Duncan) 事后检验法检验不同处理间土壤理化性质的差异, *P* 值设置为 0.05。皮尔森 (Pearson) 相关分析采用 SPSS 20.0 (IBM SPSS Inc.) 进行。不同处理间原生生物群落结构相异性评价采用基于 Bray-Curtis 距离矩阵的主坐标分析 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA) 完成, 不同处理间差异显著性通过 R 语言的 vegan 包进行相似性分析 (Analysis of Similarities, ANOSIM) 和评价。采用冗余分析 (Redundancy Analysis, RDA) 明确驱动土壤原生生物群落组成变化的关键驱动因子。所有数据采用 R (v4.0.3) 或 Origin 2018 进行可视化处理, 并在 Adobe Illustrator 中进行图像整合。

2 结果

2.1 氮肥配施秸秆后土壤理化性质变化

由表 1 可见, 土壤 pH 随氮肥施用量的增加而显著降低 ($P < 0.05$), 秸秆还田整体上提高了土壤 pH。与配施秸秆处理相比, 单施化肥处理表现出更高的 SOM 含量 ($P < 0.05$)。与单施化肥处理相比, 秸秆还田显著降低了土壤 NO₃⁻-N 含量 ($P < 0.05$)。双因素方差分析结果表明 (表 2): 氮肥对土壤 SOM、MC、AP、pH、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、TN 影响显著 ($P < 0.05$); 秸秆还田显著改变土壤 SOM、AP、pH、NO₃⁻-N ($P < 0.05$); 施氮与秸秆还田对土壤 SOM、MC、AP、NO₃⁻-N 表现出显著的交互作用 ($P < 0.05$)。

2.2 土壤原生生物群落多样性和组成变化

本研究共获得 1 289 885 条高质量的原生生物序列, 聚类得到 1 045 个 OTU。如图 1 所示, 秸秆不还田组 (单施化肥) 中, 香农指数随施氮量的增加而降低; 而在秸秆还田组中, 除 0 kg·hm⁻² 施氮量外, 香农指数随施氮量增加而增加, 但变化幅度较小 (3.69~4.49)。在这些处理中, 仅 SN300 处理的香农指数较相应的 N300 处理显著增加 ($P < 0.05$)。

表 1 氮肥配施秸秆后土壤理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties

处理 Treatment	pH	有机质 Organic matter / (g·kg ⁻¹)	全氮 Total N / (g·kg ⁻¹)	全磷 Total P / (g·kg ⁻¹)	有效磷 Available P / (mg·kg ⁻¹)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N / (mg·kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N / (mg·kg ⁻¹)	含水量 Moisture content / (g·kg ⁻¹)
CK	8.40 ± 0.02a	18.49 ± 0.39d	0.96 ± 0.01c	0.78 ± 0.05b	55.94 ± 1.18bc	8.73 ± 0.28bc	13.87 ± 0.80d	208.4 ± 2.7e
N100	8.19 ± 0.02bc	24.81 ± 0.92a	1.20 ± 0.04ab	0.79 ± 0.04b	49.88 ± 2.49cd	9.89 ± 0.57bc	21.59 ± 3.33cd	237.1 ± 8.3bc
N200	8.02 ± 0.09d	25.27 ± 1.16a	1.28 ± 0.07a	0.72 ± 0.05b	50.19 ± 1.39cd	12.77 ± 5.10ab	91.90 ± 21.67a	253.7 ± 3.5a
N300	7.98 ± 0.04d	26.38 ± 0.66a	1.31 ± 0.02a	0.74 ± 0.05b	35.10 ± 3.30e	8.99 ± 0.59bc	81.40 ± 9.47a	247.1 ± 10.5ab
S	8.40 ± 0.05a	20.11 ± 0.93cd	1.04 ± 0.06c	0.72 ± 0.01b	47.45 ± 1.95d	6.98 ± 0.23c	16.44 ± 0.33cd	231.7 ± 7.3c
SN100	8.28 ± 0.07b	22.31 ± 1.30b	1.15 ± 0.11b	0.90 ± 0.10a	67.51 ± 3.87a	7.10 ± 0.61c	17.46 ± 2.07cd	229.3 ± 5.0cd
SN200	8.22 ± 0.05bc	20.34 ± 0.73cd	1.22 ± 0.05ab	0.74 ± 0.07b	56.69 ± 6.11b	10.92 ± 2.23bc	32.49 ± 1.68c	250.6 ± 3.5a
SN300	8.17 ± 0.02c	21.71 ± 1.58bc	1.22 ± 0.07ab	0.71 ± 0.02b	33.66 ± 4.88e	16.23 ± 4.78a	58.68 ± 7.80b	216.8 ± 11.5de

注：数据为平均值 ± 标准差 ($n = 3$)；同列不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。CK 为不施氮肥处理、N100 为 N 100 kg·hm⁻² 处理、N200 为 N 200 kg·hm⁻² 处理、N300 为 N 300 kg·hm⁻² 处理、S 为秸秆还田处理、SN100 为秸秆还田配施 N 100 kg·hm⁻² 处理、SN200 为秸秆还田配施 N 200 kg·hm⁻² 处理、SN300 秸秆还田配施 N 300 kg·hm⁻² 处理。下同。Note: The data were average value ± SD ($n = 3$); different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$). CK indicates treatment without nitrogen fertilization and straw incorporation, N100 indicates treatment with N fertilizer application rate of 100 kg·hm⁻², N200 indicates treatment with N fertilizer application rate of 200 kg·hm⁻², N300 indicates treatment with N fertilizer application rate of 300 kg·hm⁻², S indicates treatment with straw incorporation and no nitrogen fertilization, SN100 indicates treatment with straw incorporation and N fertilizer application rate of 100 kg·hm⁻², SN200 indicates treatment with straw incorporation and N fertilizer application rate of 200 kg·hm⁻², and SN300 indicates treatment with straw incorporation and N fertilizer application rate of 300 kg·hm⁻². The same below.

表 2 土壤理化性质和原生物多样性的双因素方差分析

Table 2 Two-factor ANOVA for soil physical and chemical properties and protist diversity

	有机质 Organic matter	含水量 Moisture content	有效磷 Available P	pH	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N	全磷 Total P	全氮 Total N	香农指数 Shannon index
N	0.00***	0.00***	0.00***	0.00***	0.01*	0.00***	0.01*	0.00***	0.36
S	0.00***	0.24	0.03*	0.00***	0.84	0.00***	0.73	0.31	0.26
N×S	0.00***	0.00***	0.00***	0.01*	0.01*	0.00***	0.11	0.12	0.05

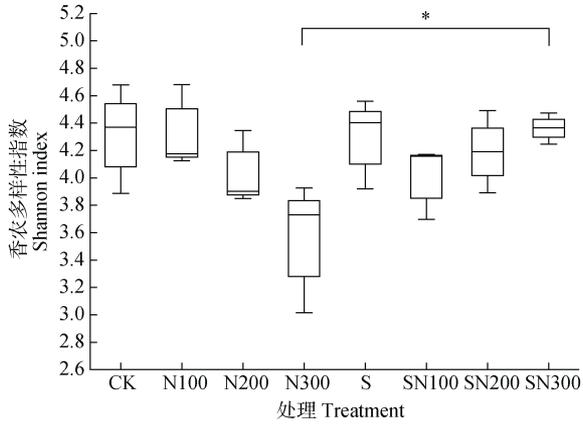
注：N 为氮肥施用，S 为秸秆还田，N×S 为氮肥施用与秸秆还田交互作用。*表示 $P < 0.05$ ，***表示 $P < 0.001$ 。Note: N indicates the influence factor of nitrogen fertilization, S indicates the influence factor of straw returning, and N×S presents the double factors of nitrogen fertilization and straw returning. * indicates $P < 0.05$, *** indicates $P < 0.001$.

系统发育分析表明，原生物群落分属 9 个超组、19 个门、61 个纲、108 个目、202 个科、338 个属和 396 个种。土壤原生物群落在门水平上的组成情况如图 2 所示，不同处理的优势门相同，其中绿藻门 (Chlorophyta) 平均相对丰度为 20.74%~42.21%，锥足亚门 (Conosa) 平均相对丰度为 15.50%~35.05%，丝足虫门 (Cercozoa) 平均相对丰度为 11.18%~27.09%，纤毛虫门 (Ciliophora)

平均相对丰度为 4.29%~15.95%。

如图 3 所示，秸秆不还田组，随施氮量的增加，绿藻门 (Chlorophyta) 的相对丰度降低，锥足亚门 (Conosa) 和纤毛虫门 (Ciliophora) 的相对丰度均呈降低-升高-降低趋势，丝足虫门 (Cercozoa) 的相对丰度呈升高-降低-升高趋势，而顶复门 (Apicomplexa) 的相对丰度在 N300 处理中最高 ($P < 0.05$)。秸秆还田组，随施氮量的增加，绿藻门 (Chlorophyta) 的

相对丰度整体降低，而锥足亚门（Conosa）和丝足虫门（Cercozoa）的相对丰度呈增加趋势。



注：*表示 $P < 0.05$ 。下同。Note: * means $P < 0.05$. The same below.

图 1 不同处理土壤原生生物群落的香农指数

Fig. 1 Shannon index of soil protist community of different treatments

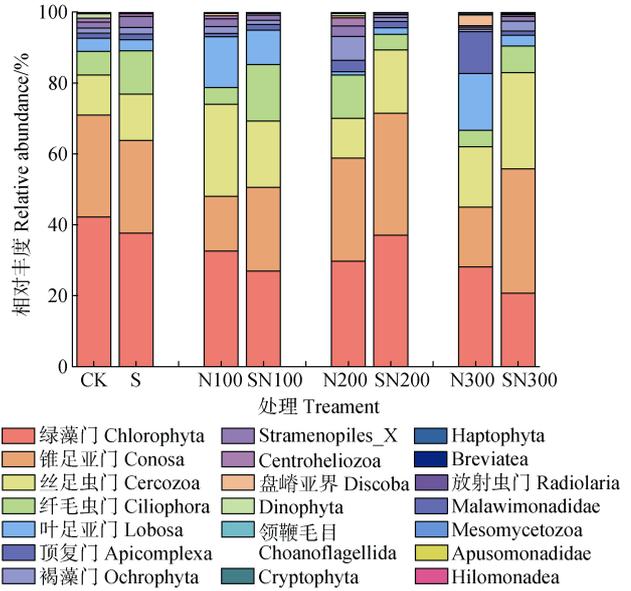


图 2 门水平上的土壤原生生物群落组成

Fig. 2 Soil protist community composition at the phylum level

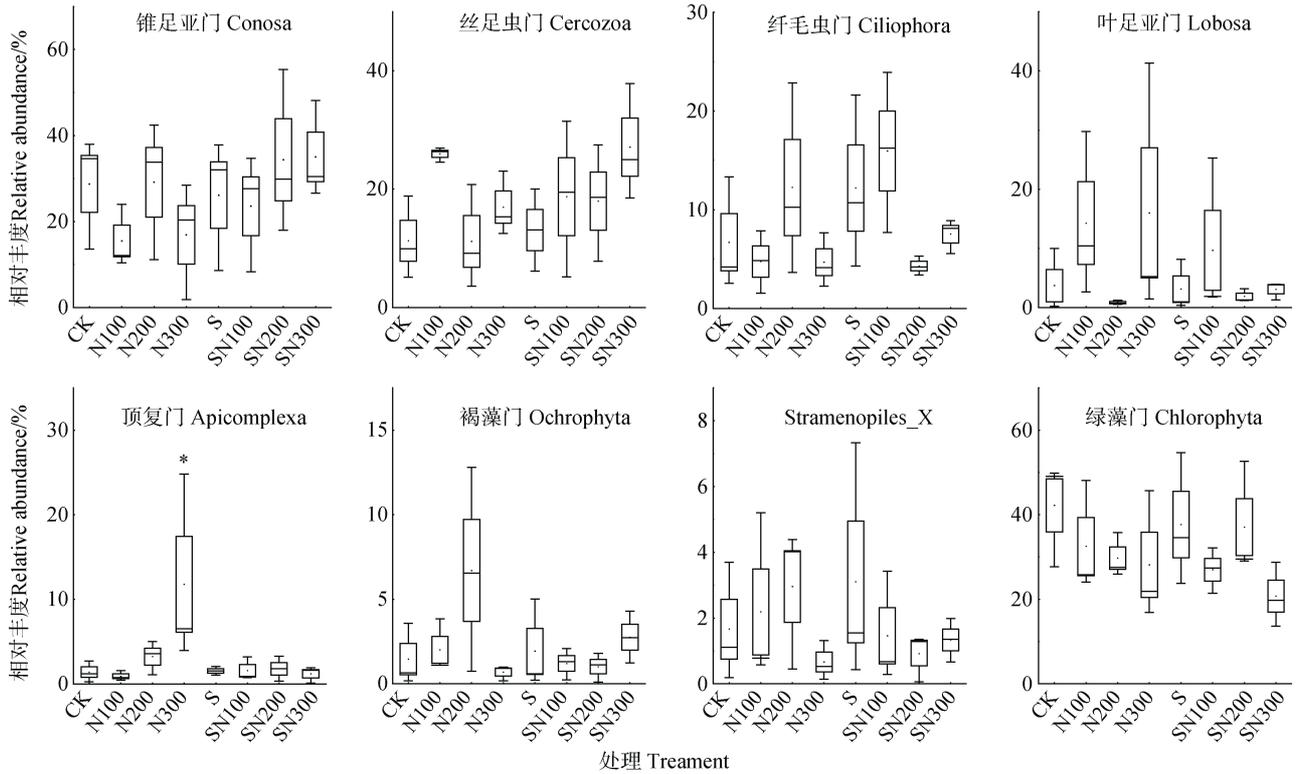


图 3 原生生物群落优势门的相对丰度变化

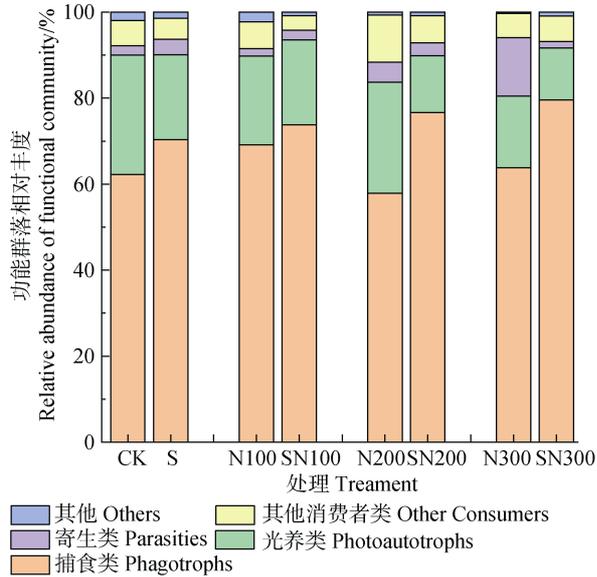
Fig. 3 Changes in relative abundances of the dominant phylum of protist community

2.3 土壤原生生物群落功能组成变化

土壤原生生物群落的功能组成如图 4 所示。各处理中，捕食类原生生物占比 57.00%~79.57%，光

养类占比 12.11%~27.78%，寄生类占比 1.40%~13.54%。同等施氮量条件下，秸秆还田处理较秸秆不还田处理的捕食类原生生物的相对丰度提高了

7.95%~14.01%，而光养类原生生物的相对丰度则降低了 0.8%~12.0%。N300 处理的寄生类原生生物比例 (13.54%) 显著高于其他处理 ($P < 0.05$)。



注：其他消费者类包括一些光养兼捕食类或寄生兼捕食类等消费者。Note: Other consumers include some consumers which both are phototrophic and phagotrophic or parasitic and phagotrophic.

图 4 土壤原生生物群落功能组成

Fig. 4 Functional composition of soil protist community

2.4 土壤原生生物群落结构变化

PCoA 分析结果 (图 5) 表明, 秸秆不还田组中, 各处理间原生生物群落结构差异不显著, 但均显著

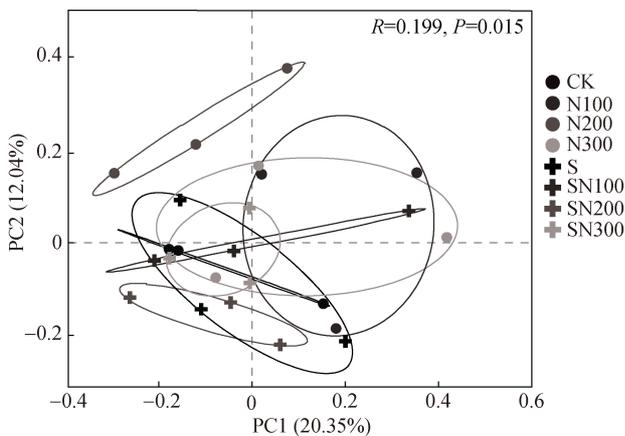


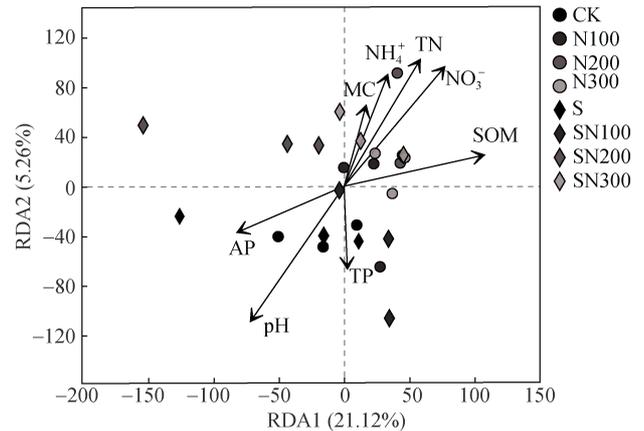
图 5 土壤原生生物群落的主坐标分析 (PCoA)

Fig. 5 Principal coordinates analysis (PCoA) of soil protist community

不同于 N200 处理。而就秸秆还田组而言, 仅 SN100 与 SN200 间群落结构差异显著。对比秸秆不还田组与秸秆还田组发现, 仅 N200 与 SN200 处理间群落结构表现出显著差异。

2.5 土壤原生生物群落与土壤理化性质间的关系

冗余分析 (Redundancy Analysis, RDA) 结果表明, 轴 1 和轴 2 分别解释原生生物群落变异的 21.12% 和 5.26% (图 6)。Mantel 检验结果表明, pH ($R^2 = 0.562$, $P = 0.001$)、TN ($R^2 = 0.458$, $P = 0.002$)、SOM ($R^2 = 0.337$, $P = 0.017$)、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ ($R^2 = 0.492$, $P = 0.003$) 和 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ ($R^2 = 0.309$, $P = 0.034$) 是影响原生生物群落组成的关键因子。



注：MC 表示含水量, SOM 表示土壤有机质, TN 表示全氮, TP 表示全磷, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 表示铵态氮, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 表示硝态氮, AP 表示有效磷。Note: MC indicates moisture content, SOM indicates soil organic matter, TN indicates total nitrogen, TP indicates total phosphorus, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ indicates ammonium, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ indicates nitrate, AP indicates available phosphorus.

图 6 土壤原生生物群落的冗余分析 (RDA)

Fig. 6 Redundancy analysis (RDA) of soil protist community

寄生类的相对丰度均与 SOM 显著正相关 ($P < 0.05$), 与 pH 显著负相关 ($P < 0.05$); 其他消费者类原生生物的相对丰度与 SOM 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 显著正相关 ($P < 0.05$), 与 pH 显著负相关 ($P < 0.05$) (表 3)。捕食类原生生物的相对丰度与寄生类和光养类原生生物的相对丰度均呈显著负相关 ($P < 0.05$), 其他消费者类与寄生类和光养类原生生物的相对丰度间分别呈极显著正相关 ($P < 0.01$) 和显著负相关 ($P < 0.05$) (表 4)。

表 3 原生物功能群相对丰度与土壤性质间的皮尔森相关性

Table 3 Pearson's correlation analysis between the relative abundances of functional groups and edaphic properties

	有机质 Organic matter	含水量 Moisture content	有效磷 Available P	pH	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N	全磷 Total P	全氮 Total N
寄生类 Parasites	0.460*	0.280	-0.264	-0.473*	-0.095	0.376	-0.209	0.361
光养类 Phototrophs	-0.054	-0.071	0.225	0.103	-0.227	-0.024	0.256	-0.163
捕食类 Phagotrophs	-0.140	0.017	-0.041	0.033	0.174	-0.045	-0.148	0.009
其他消费者类 Other consumers	0.470*	0.258	-0.234	-0.486*	0.188	0.431*	-0.17	0.323
其他类 Others	-0.263	-0.233	0.089	0.37	0.063	-0.355	0.142	-0.205

注：数值为皮尔森相关性系数，*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，下同。 Note: The values are Pearson's correlation coefficients, and * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$. The same as below.

表 4 原生物功能群相对丰度间的皮尔森相关性

Table 4 Pearson's correlation analysis between relative abundances of functional groups

	寄生类 Parasites	光养类 Phototrophs	捕食类 Phagotrophs	其他消费者类 Other consumers	其他类 Others
寄生类 Parasites	1				
光养类 Phototrophs	-0.280	1			
捕食类 Phagotrophs	-0.410*	-0.505*	1		
其他消费者类 Other consumers	0.798**	-0.065	-0.465*	1	
其他类 Others	-0.166	-0.238	-0.337	-0.235	1

3 讨论

土壤管理是影响原生物群落组成的重要人类活动^[29]。原生物作为农田环境变化的重要指示生物对氮肥施用尤为敏感^[7]。本研究各施肥处理的土壤原生物群落优势类群分别是绿藻门 (Chlorophyta)、锥足亚门 (Conosa)、丝足虫门 (Cercozoa) 和纤毛虫门 (Ciliophora)，与前人的研究结果^[30]相似，但其相对丰度受施肥措施的影响各有不同，如锥足亚门 (Conosa) 和丝足虫门 (Cercozoa) 的相对丰度仅在秸秆还田组中整体上随施氮量增加而增加，而在秸秆不还田组中未呈现规律性变化；绿藻门 (Chlorophyta) 的相对丰度整体上随施氮量增加而降低 (图 3)，这说明不同管理措施形成的异质土壤环境塑造了不同的原生物群落。本研究中单施化肥降低了土壤原生物多样性 (图 1)，说明对原生物产生了负面影响，这与

以往化肥施用对细菌和真菌群落的研究结果^[6, 31]相似。而结合秸秆还田措施后，原生物群落多样性整体上得到提升，尤其在低施氮水平下，原生物群落多样性的提升尤为明显 (图 1)，表明秸秆还田形成了有利于原生物的栖息环境。虽然通过双因素方差分析，未发现施肥或秸秆还田对原生物香农多样性的显著影响 (表 2)，这可能与所进行的试验持续时间仅有 5 年有关，但足以证明土壤环境在朝着有利于土壤原生物的方向发展。

捕食类土壤原生物是本研究的优势功能群 (图 4)，与 Li 等^[15]的研究结果一致，说明其在调节其他微生物群落的生物量、活性和结构中具有潜在的巨大作用，从而也对微生物驱动的生态系统功能产生重要影响。捕食类原生物能够将养分转移至土壤食物网的较高营养级，并通过捕食土壤中的细菌与真菌促进微生物的活动和养分循环，提高土壤食物网的养分周转速率^[32]。按照群落生态学理论，

捕食是影响群落结构的重要因素^[33]，土壤微生物群落也不例外。Chen 等^[34]研究表明，旱地土壤中原生物以捕食细菌群落为主，而对真菌群落的影响较小。课题组前期研究表明秸秆还田增加细菌的绝对丰度和多样性，并且有利于真菌的增殖^[35]。据此推测认为，秸秆还田为捕食类原生物提供了丰富的能量来源，促进了它们的繁殖。由于捕食单一猎物所获得的养分无法满足捕食者的生长和繁殖需求^[36]，原生物捕食者必须取食各种各样的猎物以获得足够的营养物质，进而形成了捕食者的猎物偏好，反之通过选择性捕食效应影响猎物（细菌）的丰度和种间竞争，维持和促进猎物（细菌）的多样性。此外，捕食类原生物可能通过吞噬植物病原菌，抑制植物病害和促进植物生长^[18-19]。本研究中秸秆还田措施降低了中和高施氮量下寄生类的顶复门（Apicomplexa）原生物相对丰度（图 3），该门类包含能引起人或动物弓形虫病和其他疟疾的病原物^[37]，这表明秸秆还田可降低某些土壤病原菌的致病风险，这也在一定程度上印证了捕食类与寄生类原生物的显著负相关关系（表 4），说明原生物捕食者可通过自上而下的调控发挥作用。

原生物群落变化与农业管理制度改变所致的土壤 pH、含水量和养分有效性变化密切相关。本研究中 RDA 和相关性分析结果（图 6，表 3）表明 SOM 和 pH 是影响原生物群落组成和功能的关键土壤环境因子。土壤微生物绝大部分是异养型的，因此，SOM 作为碳源能够促进异养微生物的生长，尤以细菌和真菌为主，这为原生物提供了丰富的食物来源。异养生物的生长繁殖会压缩自养生物的生存空间，本研究中直接体现在绿藻门（Chlorophyta）的占比整体上随施氮量增加而降低（图 3）。然而，细菌和真菌，乃至原生物不仅受到碳源的影响，也会受到其他关键环境因子（如 pH）的显著影响。本研究中无论是否实施秸秆还田措施，氮肥施用显著降低了土壤 pH（表 1），与 Hao 等^[3]的研究结果一致，这也可能是导致具有植物特性的绿藻门（Chlorophyta）比例降低的另一个因素。例如，本研究中单施化肥组中高施氮量处理所致的土壤酸化会抑制细菌和真菌的生长（表 1），这种抑制作用可能会超过 SOM 的激发作用，导致细菌和真菌数量降低，进而对原生物产生间接影响，如多样性下降和捕食类比例的降低。虽然秸秆还田未明显增加土

壤的 SOM，却显著提升了土壤 pH 和部分速效养分（如 AP），形成了对原生物有利的土壤环境。

对于土壤原生物群落结构，虽然个别处理间表现出显著差异，但就整体布局而言，原生物群落结构的变化并不明显，而且秸秆不还田组与秸秆还田组间也未形成鲜明的界线（图 5），推测可能是短期的秸秆还田尚未达到分化原生物群落结构的环境，或许在未来持续更长时间管理措施的影响下才能表现出明显差异。总之，以上研究结果暗示秸秆还田通过改变土壤非生物因子（即自下而上的调控）进而影响原生物的猎物，从而塑造了原生物群落。因此，未来应该从环境适应性和营养级关系来探索原生物在土壤-植物系统中的关键作用。

4 结 论

秸秆还田能够改变单独施用化肥所致的原生物群落多样性降低的不利影响，并且通过提高捕食类原生物的比例以控制寄生类原生物，具有对细菌和真菌群落自上而下的调控作用，从而降低土壤病害的发生，而上述结果可能归因于秸秆还田通过改变土壤非生物因子（如 pH 和 SOM）所引发的自下而上的调控。总之，未来应该系统研究小麦-玉米轮作制度下原生物在土壤微生物食物网营养级关系中的关键作用，并通过调整农业管理制度加强对有益土壤原生物功能群的利用以促进植物健康和农业可持续发展。

参考文献（References）

- [1] Qiu L L, Li Z Q, Xu J S, et al. Effects of biochar and straw application on soil biochemical properties and wheat yield in yellow-cinnamon soil[J]. *Soils*, 2021, 53 (3): 475—482. [邱丽丽, 李增强, 徐基胜, 等. 生物质炭和秸秆施用对黄褐土生化性质及小麦产量的影响[J]. *土壤*, 2021, 53 (3): 475—482.]
- [2] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. *Science*, 2010, 327 (5968): 1008—1010.
- [3] Hao T X, Zhu Q C, Zeng M F, et al. Impacts of nitrogen fertilizer type and application rate on soil acidification rate under a wheat-maize double cropping system[J]. *Journal of Environmental Management*, 2020, 270: 110888.
- [4] Tilman D, Cassman K G, Matson P A, et al. Agricultural sustainability and intensive production practices[J].

- Nature, 2002, 418 (6898): 671—677.
- [5] Yu K, Fang X T, Zhang Y H, et al. Low greenhouse gases emissions associated with high nitrogen use efficiency under optimized fertilization regimes in double-rice cropping systems[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 160: 103846.
- [6] Qin H Y, Deng H, Han C, et al. Anammox bacterial abundance and biodiversity in greenhouse vegetable soil are influenced by high nitrate content[J]. *Pedosphere*, 2020, 30 (3): 343—354.
- [7] Zhao Z B, He J Z, Geisen S, et al. Protist communities are more sensitive to nitrogen fertilization than other microorganisms in diverse agricultural soils[J]. *Microbiome*, 2019, 7 (1): 33.
- [8] Cai Z C. Discussion on the strategies for development of the subdiscipline of soil fertility and soil nutrient cycling for the 14th Five-year Plan [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57 (5): 1128—1136. [蔡祖聪. 浅谈“十四五”土壤肥力与土壤养分循环分支学科发展战略[J]. *土壤学报*, 2020, 57 (5): 1128—1136.]
- [9] Shen R F, Yan X Y, Zhang G L, et al. Status quo of and strategic thinking for the development of soil science in China in the new era[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57(5): 1051—1059. [沈仁芳, 颜晓元, 张甘霖, 等. 新时期中国土壤科学发展现状与战略思考[J]. *土壤学报*, 2020, 57 (5): 1051—1059.]
- [10] Zhu Y G, Shen R F, He J Z, et al. China soil microbiome initiative: Progress and perspective[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32 (6): 554—565, 542. [朱永官, 沈仁芳, 贺纪正, 等. 中国土壤微生物组: 进展与展望[J]. *中国科学院院刊*, 2017, 32 (6): 554—565, 542.]
- [11] Quan Z, Li S L, Zhu F F, et al. Fates of ¹⁵N-labeled fertilizer in a black soil-maize system and the response to straw incorporation in Northeast China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2018, 18 (4): 1441—1452.
- [12] Tian S Y, Li H M, Chen J L, et al. Differences of nutrient contents in residual wheat and maize straws and their relationship with microbial community composition in fluvo-aquic soil[J]. *Soils*, 2021, 53 (1): 55—63. [田胜营, 李慧敏, 陈金林, 等. 潮土中残留小麦和玉米秸秆养分含量差异及与微生物群落组成的关系[J]. *土壤*, 2021, 53 (1): 55—63.]
- [13] Ma L N, Ma J X, Wang D M, et al. Effects of straw returning and nitrogen application on soil nutrients and yield in saline-sodic Japonica rice region[J]. *Journal of Jilin Normal University (Natural Science Edition)*, 2021, 42 (4): 134—140. [马丽娜, 马俊祥, 王冬梅, 等. 秸秆还田与施氮量对盐碱硬稻区土壤养分及产量的影响[J]. *吉林师范大学学报(自然科学版)*, 2021, 42 (4): 134—140.]
- [14] Geisen S, Mitchell E A D, Adl S, et al. Soil protists: A fertile frontier in soil biology research[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42 (3): 293—323.
- [15] Li F F, Sun A Q, Jiao X Y, et al. Specific protistan consumers and parasites are responsive to inorganic fertilization in rhizosphere and bulk soils[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2021, 21 (12): 3801—3812.
- [16] Oliverio A M, Geisen S, Delgado-Baquerizo M, et al. The global-scale distributions of soil protists and their contributions to belowground systems[J]. *Science Advances*, 2020, 6 (4): eaax8787.
- [17] Lars G, Manfred J, Dominik H, et al. Protistan community analysis: Key findings of a large-scale molecular sampling[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(9): 2269—79.
- [18] Geisen S. The bacterial-fungal energy channel concept challenged by enormous functional versatility of soil protists[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 102: 22—25.
- [19] Xiong W, Song Y Q, Yang K M, et al. Rhizosphere protists are key determinants of plant health[J]. *Microbiome*, 2020, 8 (1): 27.
- [20] Guo S, Xiong W, Hang X N, et al. Protists as main indicators and determinants of plant performance[J]. *Microbiome*, 2021, 9 (1): 64.
- [21] Wu X, Hu H, Wang R, et al. Effects of reduction of chemical fertilizer and substitution coupled with organic manure on the molecular ecological network of microbial communities in fluvo-aquic soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59 (2): 545—556. [吴宪, 胡荷, 王蕊, 等. 化肥减量和有机替代对潮土微生物群落分子生态网络的影响[J]. *土壤学报*, 2022, 59 (2): 545—556.]
- [22] Bao S D. *Soil and agrochemical analysis* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000. [鲍士旦. *土壤农化分析* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.]
- [23] Stoeck T, Breiner H W, Filker S, et al. A morphogenetic survey on ciliate plankton from a mountain lake pinpoints the necessity of lineage-specific barcode markers in microbial ecology[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16 (2): 430—444.
- [24] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37 (8): 852—857.
- [25] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10 (10): 996—998.
- [26] Guillou L, Bachar D, Audic S, et al. The Protist Ribosomal Reference database (PR²): A catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41 (Database issue): D597-D604.
- [27] Zhao Z B, He J Z, Quan Z, et al. Fertilization changes

- soil microbiome functioning, especially phagotrophic protists[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 148: 107863.
- [28] Schulz G, Schneider D, Brinkmann N, et al. Changes in trophic groups of protists with conversion of rainforest into rubber and oil palm plantations[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 240.
- [29] Xiong W, Alexandre J, Guo S, et al. Soil protist communities form a dynamic hub in the soil microbiome[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12 (2): 634—638.
- [30] Kalinowska R and Pawlik-Skowrońska B. Response of two terrestrial green microalgae (Chlorophyta , Trebouxiophyceae) isolated from Cu-rich and unpolluted soils to copper stress[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158 (8): 2778—2785.
- [31] Chen Q L, Ding J, Zhu D, et al. Rare microbial taxa as the major drivers of ecosystem multifunctionality in long-term fertilized soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 141: 107686.
- [32] Selph K, Landry M, Laws E. Heterotrophic nanoflagellate enhancement of bacterial growth through nutrient remineralization in chemostat culture[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2003, 32: 23—37.
- [33] Ripple W J, Estes J A, Beschta R L, et al. Status and ecological effects of the world's largest carnivores[J]. *Science*, 2014, 343 (6167): 1241484.
- [34] Chen B B, Xiong W, Qi J J, et al. Trophic interrelationships drive the biogeography of protistan community in agricultural ecosystems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 163: 108445.
- [35] Wu X, Zhang T, Zhao J N, et al. Variation of soil bacterial and fungal communities from fluvo-aquic soil under chemical fertilizer reduction combined with organic materials in North China plain[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2021, 21 (1): 349—363.
- [36] Petchey O L. Prey diversity, prey composition, and predator population dynamics in experimental microcosms[J]. *Journal of Animal Ecology*, 2000, 69: 874—882.
- [37] Votýpka J, Modrý D, Oborník M, et al. Apicomplexa// Archibald J, Simpson A, Slamovits C. eds. *Handbook of the Protists*[M]. Cham: Springer, 2017: 1—58.

(责任编辑：陈荣府)