

DOI: 10.5846/stxb202112253651

曾昭阳, 栾璐, 薛敬荣, 孙波, 蒋瑀霁. 有机肥施用对红壤原生生物与微生物互作的影响. 生态学报, 2023, 43(7): 2938-2948.

Zeng Z Y, Luan L, Xue J R, Sun B, Jiang Y J. Impacts of manure application on interaction between protists community and microorganisms in red soil. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(7): 2938-2948.

有机肥施用对红壤原生生物与微生物互作的影响

曾昭阳^{1, 2}, 栾璐¹, 薛敬荣¹, 孙波¹, 蒋瑀霁^{1, *}

1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008

2 中国科学院大学, 北京 100049

摘要:为明确不同施肥处理对土壤原生生物群落、微生物碳代谢活性的影响,以南方典型旱地红壤为研究对象,基于中国科学院鹰潭红壤生态实验站玉米单作系统有机培肥长期定位试验,选取不施肥(M0)、低量猪粪(M1)、高量猪粪(M2)、高量猪粪+石灰(M3)4个处理,利用高通量测序技术研究不同猪粪处理下红壤原生生物多样性、群落结构的变化,揭示原生生物与微生物互作对土壤微生物碳代谢活性和玉米产量的影响。结果表明:①长期施用猪粪处理下,土壤 pH、有机质(SOM)、全氮(TN)、全磷(TP)、速效磷(AP)和速效钾(AK)的含量显著提高;②与 M0 处理相比,施肥处理显著提高了原生生物生物量和多样性,并且显著改变了其群落结构,其中土壤 TP、pH、AP、TN、SOM 和 AK 是原生生物群落结构变化的重要驱动因子;③施肥处理显著提高了土壤细菌和真菌生物量,增加了微生物碳代谢活性(Average well color development, AWCD);④土壤 pH 和 AP 通过影响原生生物多样性和群落结构,间接提高了微生物碳代谢活性和玉米产量。本研究结果为提升旱地红壤的生物多样性,保障土壤健康和维持生态系统服务功能提供了科学依据。

关键词:原生生物;多样性;群落结构;微生物碳代谢;猪粪;玉米产量

Impacts of manure application on interaction between protists community and microorganisms in red soil

ZENG Zhaoyang^{1,2}, LUAN Lu¹, XUE Jingrong¹, SUN Bo¹, JIANG Yuji^{1, *}

1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The purpose of this study was to investigate the protist community and soil microbial carbon metabolism with pig manure application in the dryland red soil of south China. The long-term field experiment was conducted in maize mono-cropping system at the National Agro-Ecosystem Observation and Research Station in Yingtan, Jiangxi Province. Four treatments included no manure (M0), low manure (M1), high manure (M2), and high manure with lime addition (M3). The high-throughput sequencing of 18S rRNA gene was used to explore the diversity and structure of soil protist community, and to estimate the effect of protists-microorganisms interaction on microbial carbon metabolism and maize yield. Our results showed that soil chemical properties significantly varied under the four fertilization treatments. Soil pH, soil organic matter (SOM), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), available phosphorus (AP), and available potassium (AK) were significantly increased under manure treatments. Compared with M0 treatment, manure treatments (M1, M2, and M3) significantly enhanced the biomass and diversity of protist, and remarkably modified the protist community structure. The protist community composition was mainly affected by soil TP, pH, AP, TN, SOM, and AK. Manure application significantly improved the bacterial and fungal biomasses, and consequently promoted microbial carbon metabolism indicated

基金项目:国家优秀青年基金(41922048);国家面上基金(42107336, 42177298)

收稿日期:2021-12-25; 网络出版日期:2022-11-21

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yjjiang@issas.ac.cn

by the values of average well color development (AWCD). Structural equation modelling indicated that soil pH and AP could indirectly increase microbial carbon metabolism and maize yield through regulating the diversity and structure of protist community. Taken together, we provide the scientific basis for promoting the microbial diversity in the dryland red soil, and maintaining soil health and ecosystem service functioning.

Key Words: protist; diversity; community structure; microbial carbon metabolism; manure; maize yield

原生生物是除了真菌、植物和动物外的单细胞真核生物,在土壤中广泛存在,其种类丰富,在土壤食物网中占据重要位置^[1-2]。根据它们在生态系统中的功能可将其分为:吞噬型、光养型、寄生型和腐生型四大类^[2-3]。在土壤生态系统中,光养型原生生物虽然仅占土壤原生生物的 10%,但它们的光合作用是土壤有机碳的重要来源^[4-5]。吞噬型原生生物是土壤中细菌和真菌的主要捕食者^[6],其选择性捕食作用改变了细菌和真菌的群落结构与功能,进而影响土壤生态系统的养分循环和能量流动^[5-6]。原生生物的捕食作用会加快土壤有机碳转化,导致更多氮磷养分被释放到土壤中^[7],从而促进植物对氮磷等养分的吸收^[2]。有研究表明,由于对环境变化敏感,原生生物是指示土壤微环境变化和植物健康的关键指标^[8-9]。尽管原生生物在生态系统中发挥着至关重要的作用,但对原生生物的认知远少于细菌、真菌等微生物群体。同时,已有的研究只关注某一特定类群的原生生物^[10],针对原生生物的群落水平仍有待深入探究。

施用有机肥被认为是土地培肥、实现农业循环发展、保持土壤健康和粮食安全的重要举措^[11]。中国作为一个畜禽大国,每年畜禽粪便产量约 27 亿 t^[12]。由于畜禽粪便中富含氮、磷、钾等作物生长所需的营养元素,因此常被作为有机肥料用于提高耕地地力和土壤生物功能活性,实现资源的循环利用,其中猪粪是我国施用量最大的有机肥^[13]。施加有机肥可以有效减少化肥的施用量,降低因过量施用化肥所带来的环境污染^[14-15]。与施用化肥相比,施用有机肥更能提高土壤细菌、真菌以及原生生物的数量和多样性,并显著改变微生物和原生生物的群落结构^[9,16-17]。有研究表明,施加猪粪可以改善土壤理化性质,阻控土壤酸化,增加红壤的酶活性和有效氮磷含量,促进了土壤肥力和作物产量快速提升^[18-19]。猪粪输入的有机质和养分元素会通过自下而上的作用影响土壤微食物网中生物的多样性和生态功能^[20]。土壤微生物在调控农田生态系统养分转化和作物增产中发挥着至关重要作用,土壤微生物对碳源的利用能力可以表征微生物的代谢活性,敏感地反映生态系统的微小变化^[21]。目前,国内外研究大多聚焦在施肥对土壤微生物群落的影响上^[22-23],关于原生生物的群落特征,以及原生生物与微生物互作对微生物碳代谢和作物产量的影响机制鲜有报道。

旱地红壤作为我国南方的典型土壤,面临着酸化加速、养分贫瘠和生物功能退化等严重问题,制约了土壤健康和粮食产能的提升^[24]。探究土壤原生生物群落对施肥措施的响应,有助于我们理解施用有机肥背景下土壤健康和生态功能的状况。近年来,高通量测序技术不断突破以及原生生物数据库的建立,为研究土壤生态系统中原生生物多样性和群落结构提供了新契机^[25]。本研究针对我国南方典型旱地红壤,依托中国科学院红壤生态实验站设置的有机培肥长期定位试验,通过高通量测序技术,深入研究:①不同猪粪处理下土壤原生生物多样性和群落组成特征;②原生生物捕食作用对微生物碳代谢活性的影响机制。研究结果为提高红壤生态系统功能稳定性,保障耕地健康提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

田间长期定位试验位于江西省鹰潭市中国科学院红壤生态实验站(116°55'E, 28°13'N)。该试验区属于中亚热带季风气候,年均温 17.8℃,年均降水量 1795 mm,无霜期 262 d。试验地土壤为第四纪红黏土发育的黏化湿润富铁土,呈强酸性,有机质含量低,氮磷养分贫瘠。供试表层土壤(0—20 cm)基本理化性质为:pH 4.9,有机质 6.0 g/kg,全氮 0.29 g/kg,速效磷 20 mg/kg,速效钾 48.45 mg/kg。

1.2 试验设计

旱地红壤有机培肥长期定位试验设置于 2002 年,共 12 个试验小区($2\text{ m} \times 2\text{ m}$),分为 4 个处理:①不施肥(M0);②低量猪粪(M1, $150\text{ kg N hm}^{-2}\text{ a}^{-1}$);③高量猪粪(M2, $600\text{ kg N hm}^{-2}\text{ a}^{-1}$);④高量猪粪+石灰(M3, $600\text{ kg N hm}^{-2}\text{ a}^{-1}$ +石灰 $3000\text{ kg hm}^{-2}(3\text{ a})^{-1}$)。小区内种植单季玉米,品种为苏玉 24,种植密度为 50000 株/hm^2 。猪粪在播种前一次性施入,与表层土一起翻耕、耙匀。猪粪的基本性质为:pH 7.7,全碳 306.6 g/kg ,全磷 20.2 g/kg ,全氮 32.7 g/kg ,全钾 14.1 g/kg 。

1.3 样品采集与土壤理化分析

在 2020 年 7 月玉米收获前,每个小区按照 S 型采样法采集 10 个土钻的表层土壤(0—20 cm),混匀后冰袋保存立刻带回实验室。所有土样分为 3 份,1 份自然风干,用于测定土壤基本理化性质;1 份保存在 -80°C 冰箱,用于提取土壤基因组 DNA,1 份保存在 4°C 冰箱,用于测定磷脂脂肪酸(Phospholipid fatty acids, PLFAs)和微生物碳代谢活性,一周内完成。

土壤化学性质测定参照《土壤农业化学分析方法》^[26]。土壤 pH 采用电位计法测定,土壤有机质(SOM)采用重铬酸钾氧化-容量法测定,全氮(TN)采用凯氏定氮法测定,全磷(TP)采用碳酸钠熔融法测定,全钾(TK)采用氢氧化钠熔融法测定,有效磷(AP)采用碳酸氢钠浸提—钼锑抗比色法测定,速效钾(AK)采用乙酸铵浸提—火焰光度法测定。玉米籽粒于玉米成熟期采集,将籽粒于 105°C 杀青, 65°C 烘干后计算每个小区的玉米产量。

1.4 土壤原生生物高通量测序

称取 0.5 g 土壤样品,采用 Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals,美国)参照试剂盒说明书的具体方法和步骤提取土壤基因组 DNA。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。使用引物 TAREuk454FWD1($5'-\text{CCAGCASCYGGCGTAATTCC}-3'$)和 TAREukREV3($5'-\text{ACTTTCGTTCTTGATYRA}-3'$)对原生生物 18S rRNA 的 V4 区进行扩增^[27],通过 Illumina 平台进行高通量测序,测序数据已提交至 NCBI 数据库中(PRJNA623238)。

对获得的原始序列进行质量筛选,运用 QIIME2(Quantitative Insights into Microbial Ecology Version 2)流程进行分析^[28]。使用 Usearch 平台按照 97% 的相似性对序列进行聚类并去除嵌合体,将聚类的样品划分为不同的分类操作单元(operational taxonomic units, OTUs),根据原生生物核糖体参考数据库(Protist Ribosomal Reference database, PR2, <https://app.pr2-primers.org/>)对原生生物的可操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs)进行物种分类注释,在 phylum(门)、class(纲)、order(目)、family(科)、genus(属)和 species(种)水平上统计各样本的物种组成,得到原生生物 OTUs 分类水平数据表,每个样本高通量测序平均深度为 40009 条序列,其中原生生物 10692 条序列。根据 Xiong 等^[9]的方法将红藻门(Rhodophyta),链形植物(Streptophyta),后生动物(Metazoa)、真菌(Fungi)和模糊类群全部剔除后,再将所有样品序列条数进行抽平后计算原生生物 alpha 多样性,按照功能把土壤原生生物划分为吞噬型、光养型、寄生型和腐生型四大类^[5,9]。不同原生生物类群的相对丰度以该类群的序列数占原生生物总序列数的比例来表示。

1.5 土壤微生物生物量

土壤 PLFA 的测定参考 Frostegard 等^[29]的方法。称取 2 g (干重当量)鲜土样品,用磷酸钾、氯仿和甲醇缓冲液提取,在硅胶柱上分离磷脂。样品经过碱性甲醇分解,转化成脂肪酸甲酯,加入脂肪酸 19:0 为内标。然后通过气相色谱仪(Hewlett-Packard, Wilmington, DE)进行测定。用 MIDI Sherlock 微生物鉴定系统(Version 4.5)对 PLFA 进行鉴定。利用 PLFA 标记法分析细菌、真菌和原生生物的生物量^[30]。

1.6 土壤微生物碳代谢

用 Biolog-ECO 板(美国 Biolog 公司)测定的每孔颜色平均变化率(Average well color development, AWCD),以此表示微生物群落对单一碳源的利用能力,即微生物碳代谢能力。取 5 g 新鲜土壤(干重当量)添加到 45 mL 无菌的 0.85% (w/v)生理盐水中,以 90 rpm 的速度震荡 30 min ,静置 2 h 。将 1 mL 上清液用无菌

盐溶液稀释至 20 mL,取 200 μ L 混合悬浮液加入 Biolog-ECO 板的每个孔中。将生态板放置在 25℃ 培养 7 d。碳源利用率由四唑紫氧化染料的还原来确定,随着微生物对底物的利用,相应的孔会无色变为紫色。每 24 h 通过测定 590 nm 处的吸光度 OD_{590} 来计算 AWCD 值,最终选择培养第 96 h 的 AWCD 值进行分析。AWCD 的计算方法为:

$$AWCD = \sum (C_i - R) / 31$$

式中: C_i 为第 i 个孔 590 nm 下的吸光值; R 为对照孔的吸光值。

1.7 数据处理

利用 SPSS 23.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),皮尔森(Pearson)相关性分析,和多重比较采用 LSD 法(显著性水平为 $P=0.05$)。利用 R 软件(version 3.6.2)中的相关软件包(vegan, stats 和 randomForest)进行典型相关分析(canonical correlation analysis, CCA)和随机森林分析,计算原生生物群落丰富度指数(Chao1、ACE)和物种多样性指数(Shannon-Wiener 和 Simpson),分析土壤原生生物群落组成,并进行蒙特尔检验(Mantel test)。通过随机森林模型筛选显著影响 AWCD 值的土壤因子和生物因子,在 AMOS 24.0 软件中构建结构方程模型(structural equation modelling, SEM),分析土壤化学性质和原生生物群落对微生物碳代谢活性的影响。利用 Origin 9.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 不同施肥处理对土壤化学性质和玉米产量的影响

施用有机肥显著影响了旱地红壤化学性质和玉米产量(表 1)。与 M0 处理相比,M1 处理下土壤 pH 升高至 4.69,M2 和 M3 处理下土壤 pH 分别升高至 6.08 和 6.56。与 M0 处理相比,低肥和高肥处理(M1、M2 和 M3)均显著提高了土壤 SOM、TN 和 TP 含量($P<0.05$),而高肥处理(M2 和 M3)显著增加了土壤 AP 和 AK 含量($P<0.05$)。其中,M2 处理下 SOM 含量比 M0 和 M1 分别上升了 2.74 倍和 1.58 倍。M2 处理下 TN 和 TP 含量分别为 M0 处理的 2.95 倍和 7.15 倍,为 M1 处理的 1.76 倍和 2.28 倍。M3 处理下 TN 和 TP 含量分别为 M0 处理的 2.75 倍和 6.82 倍,为 M1 处理的 1.64 倍和 2.20 倍。施用有机肥显著提高了玉米产量,其中 M2 和 M3 处理玉米产量增加最为显著。

表 1 不同施肥处理条件下的红壤化学性质和玉米产量

Table 1 Soil chemical properties and maize yield under different fertilization treatments

处理 Treatments	pH	有机质 SOM/ (g/kg)	全氮 TN/ (g/kg)	全磷 TP/ (g/kg)	全钾 TK/ (g/kg)	速效磷 AP/ (mg/kg)	速效钾 AK/ (mg/kg)	产量 Yield (kg/hm ²)
M0	4.45±0.02d	8.97±0.77c	0.55±0.08c	0.29±0.02c	12.11±0.27a	4.3±0.87c	87.3±9.47b	406.1±27.54c
M1	4.69±0.07c	15.56±1.01b	0.92±0.11b	0.90±0.13b	11.95±0.44a	90.9±4.63b	93.1±3.79b	4316.0±353.9b
M2	6.08±0.06b	24.61±2.99a	1.62±0.12a	2.05±0.03a	11.74±0.47a	467.3±20.93a	140.7±0.47a	8734.7±532.6a
M3	6.56±0.03a	23.74±3.40a	1.51±0.14a	1.98±0.14a	11.63±0.14a	486.5±14.00a	142.4±8.5a	8342.8±175.9a

M0:不施肥;M1:低量猪粪;M2:高量猪粪;M3:高量猪粪+石灰;pH:土壤酸碱度 soil acidity;SOM:土壤有机质 soil organic matter;TN:全氮 soil nitrogen;TP:全磷 total phosphorus;TK:全钾 total potassium;AP:速效磷 available phosphorus;AK:速效钾 available potassium;同一列中不同小写字母表示不同处理之间差异显著($P<0.05$),表中数据为平均值±标准误

2.2 不同施肥处理对土壤原生生物与微生物生物量、以及碳代谢的影响

施肥处理下显著增加了土壤细菌和真菌 PLFA 含量($P<0.05$,图 1),细菌和真菌 PLFA 含量均在 M2 处理下最高,分别为 25.7 nmol/g 和 11.8 nmol/g,其中 M2 和 M3 处理下细菌的 PLFA 含量分别为 M0 处理的 7.17 倍和 6.22 倍,为 M1 处理的 1.64 倍和 1.43 倍,M2 和 M3 处理下真菌的 PLFA 含量分别为 M0 处理的 5.13 倍和 4.79 倍,为 M1 处理的 1.84 倍和 1.72 倍。施肥处理下,土壤原生生物 PLFA 含量显著增加,顺序依次为 M3 $\approx$ M2>M1>M0,其中 M1、M2、M3 处理下原生生物的 PLFA 含量分别为 M0 处理下的 3.8 倍、6.6 倍和 7.3 倍,M2

和 M3 处理下原生生物的 PLFA 含量分别为 M1 处理下的 1.7 倍和 1.9 倍。与 M0 处理相比,猪粪处理下 AWCD 值显著增加,其中 M2 处理 AWCD 值分别为 M0, M1 和 M3 处理的 7.18 倍, 1.55 倍和 1.48 倍。

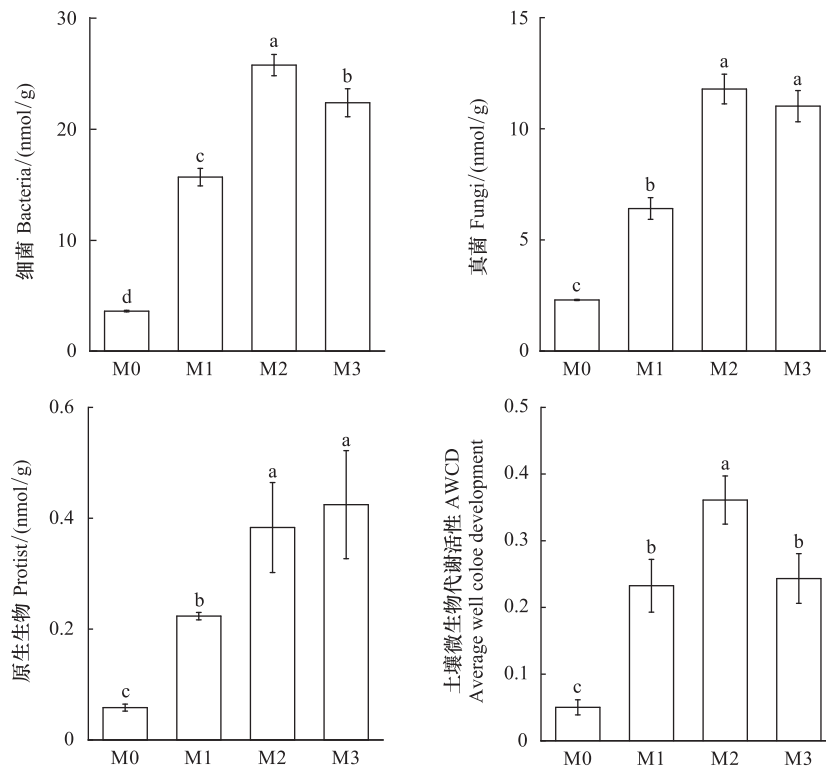


图1 不同施肥处理下土壤细菌、真菌、原生生物生物量和 AWCD 值

Fig.1 The PLFAs from the bacterial, fungi and protist communities and AWCD values under different fertilization treatments

M0: 不施肥; M1: 低量猪粪; M2: 高量猪粪; M3: 高量猪粪+石灰; AWCD: 每孔颜色平均变化率 average well color development; 同一组柱形图上不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$), 误差棒为标准误

2.3 不同施肥处理对土壤原生生物多样性和群落结构的影响

施肥处理显著提高了土壤原生生物的 alpha 多样性 ($P < 0.05$, 图 2)。M1、M2 和 M3 处理下原生生物的 Chao1 和 ACE 指数显著高于 M0 处理 ($P < 0.05$)。施肥显著提高了土壤原生生物的 Shannon 指数 ($P < 0.05$), 其中 M1 和 M2 处理下 Shannon 指数显著高于 M3 处理 ($P < 0.05$)。在 M2 处理下原生生物的 Simpson 指数显著提高 ($P < 0.05$)。

原生生物的优势门为锥足亚门 (Conosa)、叶足变形虫门 (Lobosa) 和丝足虫 (Cercozoa) 和绿藻门 (Chlorophyta), 它们的相对丰度范围分别是 21.7%—27.3%、12.0%—32.6%、13.1%—22.8% 和 4.4%—27.0% (图 3)。不同处理中, 吞噬型原生生物的相对丰度最高 (68.6%—90.3%), 其次为自养型 (5.6%—30.5%), 寄生型 (0.3%—1.1%) 和腐生型 (0.6%—3.0%)。施肥处理下, 原生生物中丝足虫 (Cercozoa) 和绿藻门 (Chlorophyta) 的相对丰度显著降低 ($P < 0.05$), 变形虫的 Lobosa 门相对丰度显著升高 ($P < 0.05$)。四大功能类群中, 吞噬型原生生物在 M2 和 M3 处理下相对丰度显著升高 ($P < 0.05$), M1、M2 和 M3 处理均显著降低自养型原生生物的相对丰度 ($P < 0.05$)。

2.4 土壤原生生物多样性和群落结构与环境因子的关系

CCA 分析用于检验土壤因子对原生生物群落结构的影响。结果表明, 主坐标 1 (CCA1) 和主坐标 2 (CCA2) 分别解释了总变异的 55.7% 和 16.7%, 不同施肥处理之间土壤原生生物群落结构存在显著差异 (图 4, $P < 0.05$)。土壤 TP ($R = 0.79$, $P < 0.001$)、pH ($R = 0.64$, $P < 0.001$)、AP ($R = 0.63$, $P < 0.001$)、TN ($R = 0.64$, $P < 0.001$)、SOM ($R = 0.59$, $P < 0.001$) 和 AK ($R = 0.57$, $P < 0.001$) 均对土壤原生生物群落结构具有显著影响 (图 4)。

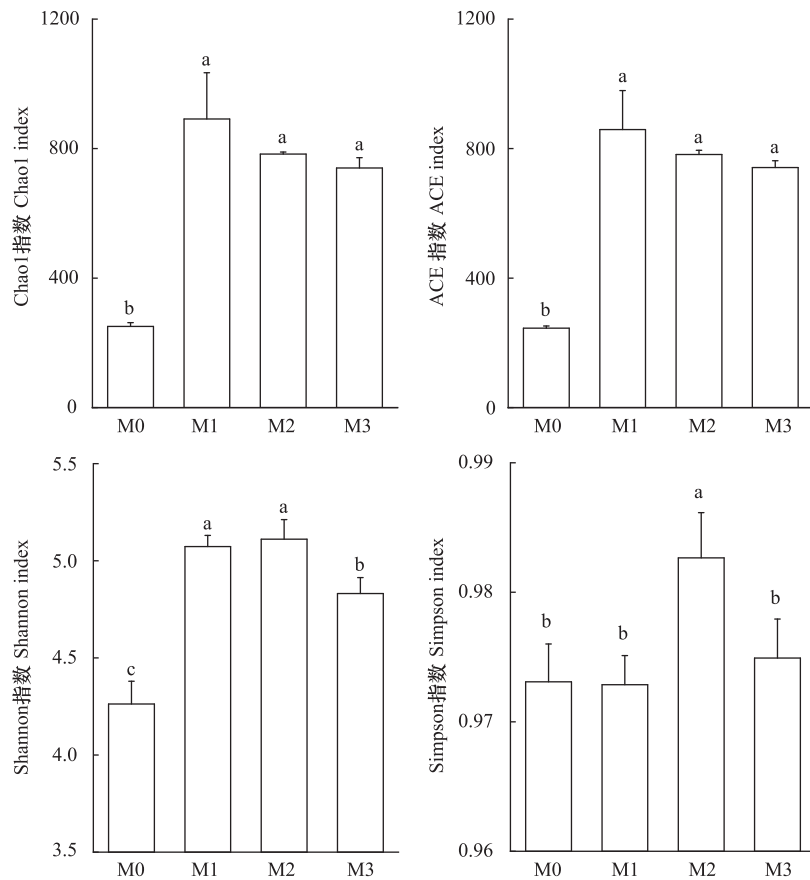


图2 不同施肥处理下土壤原生生物 alpha 多样性指数

Fig.2 Alpha diversity indexes of the protist community under different fertilization treatments

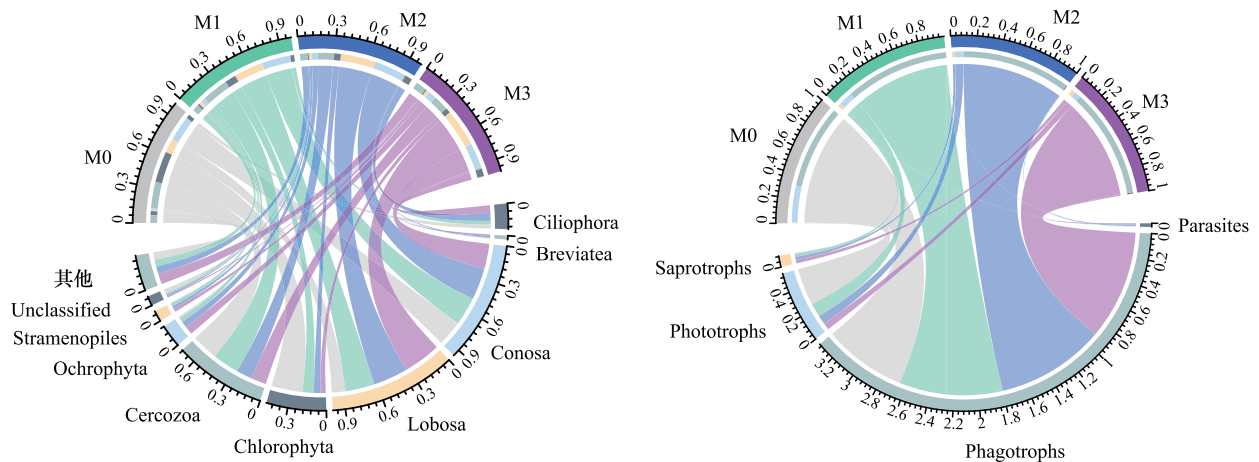


图3 土壤原生生物优势门和四大功能类群分类相对丰度

Fig.3 Relative abundance of the protist dominant phyla and four functional groups

Breviatea: 简虫门; Conosa: 锥足亚门; Lobosa: 叶足变形虫门; Chlorophyta: 绿藻门; Cercozoa: 丝足虫门; Ochrophyta: 棕藻门; Stramenopiles_X: 不等鞭毛类; Phagotrophs: 吞噬型原生生物; Phototrophs: 自养型原生生物; Parasites: 寄生型原生生物; Saprotrophs: 腐生型原生生物

皮尔森相关性分析表明(图5),原生生物多样性指数和丰富度指数与 SOM($r=0.63-0.71$, $P<0.05$)、TN($r=0.59-0.68$, $P<0.05$)和 TP($r=0.57-0.65$, $P<0.05$)均显著正相关,土壤 AP 含量仅与 Simpson 指数显著正相关($r=0.60$, $P<0.05$)。

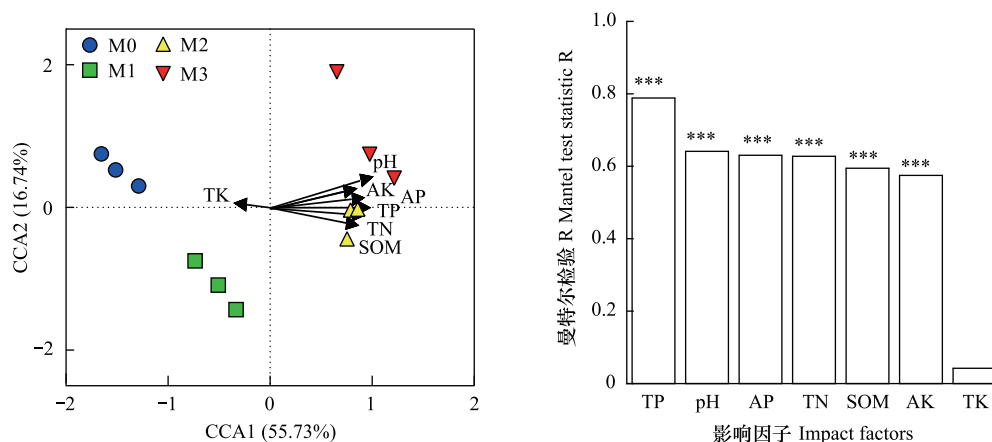


图4 土壤环境因子与原生生物群落结构的 CCA 排序图和 Mantel 分析

Fig.4 Canonical correlation analysis (CCA) and mantel test of the protist community and soil chemical properties

SOM:土壤有机质 soil organic matter;TN:全氮 soil nitrogen;TP:全磷 total phosphorus;TK:全钾 total potassium;AP:速效磷 available phosphorus;AK:速效钾 available potassium;***表示 $P < 0.001$

2.5 土壤因子、原生生物群落、微生物生物量和碳代谢活性的关系

相关性分析表明,土壤原生生物 Shannon 指数和群落结构与细菌($r=0.82$, $P < 0.01$ 和 $r=0.98$, $P < 0.001$)和真菌生物量($r=0.74$, $P < 0.01$ 和 $r=0.97$, $P < 0.001$)显著相关,吞噬型、腐生型和寄生型原生生物的相对丰度与细菌和真菌生物量极显著正相关($P < 0.01$),光养型原生生物的相对丰度与细菌和真菌生物量极显著负相关($P < 0.001$)(图5)。随机森林分析的结果表明,影响 AWCD 值的主要土壤因子是 AP(9.56%, $P < 0.01$), pH(9.53%, $P < 0.05$)和 TP(5.33%, $P < 0.05$);主要生物因子为细菌生物量(13.94%, $P < 0.01$),原生生物生物量(12.95%, $P < 0.01$)和群落组成(7.94%, $P < 0.01$),以及吞噬型原生生物(10.69%, $P < 0.01$)(图6)。影响玉米产量的土壤因子为 pH(10.63%, $P < 0.01$), AP(9.15%, $P < 0.01$), AK(8.29%, $P < 0.05$), TP(6.16%, $P < 0.05$)和 TN(2.97%, $P < 0.05$);生物因子中细菌生物量(14.77%, $P < 0.01$),原生生物生物量(12.15%, $P < 0.01$)、多样性(6.74%, $P < 0.05$)和群落结构(6.01%, $P < 0.05$),以及吞噬型原生生物(11.31%, $P < 0.01$)对玉米产量也产生显著影响(图6)。结构方程模型分析的结果表明,土壤 pH 和 AP 对微生物碳代谢(AWCD 值)表现出直接效应($r=0.15$, $P < 0.001$ 和 $r=0.52$, $P < 0.001$)。原生生物生物量和吞噬型原生生物相对丰度通过影响细菌生物量($r=0.24$, $P < 0.001$ 和 $r=0.15$, $P < 0.001$),间接对微生物碳代谢和玉米产量产生显著的正向效应(图6)。

3 讨论

3.1 有机肥处理对红壤原生生物多样性的影响

土壤原生生物的多样性受土壤养分水平的影响^[31],可以敏感地指示土壤健康并影响植物生长^[32-33]。Chao1 和 ACE 指数表示原生生物群落丰富度,Shannon 和 Simpson 指数表示原生生物群落多样性^[34]。与其他土壤微生物相比,原生生物对氮肥的输入更为敏感。Zhao 等^[32]研究发现施用氮肥降低了原生生物的多样性,但本研究中施用有机肥显著提高了原生生物多样性和丰富度(图2),这主要与土壤 pH 和全氮含量有关。我国亚热带地区红壤酸化严重,氮磷养分贫瘠^[35],施用有机肥可以缓解红壤酸化,增加土壤有效氮磷等养分库容含量^[19]。施用有机肥显著提高了土壤 pH,阻控了土壤酸化过程,这可能会导致土壤中酸性和碱性磷酸酶活性增强,促进了有机磷矿化成能被植物吸收利用的速效磷,提高了土壤中有效磷含量^[36-37]。土壤中 SOM、TN 和 AP 含量增加,表明施用有机肥具有培肥土壤的效果,刺激了微生物生物量增加,为原生生物的生长与定殖提供了丰富的资源,从而提高了原生生物的多样性和丰富度,这与前人的研究结果一致^[39-40]。此外,施用有机肥通过改变土壤结构^[41],提高大团聚体比例及其孔隙内有效水含量^[42],改善原生生物的生存环境,显

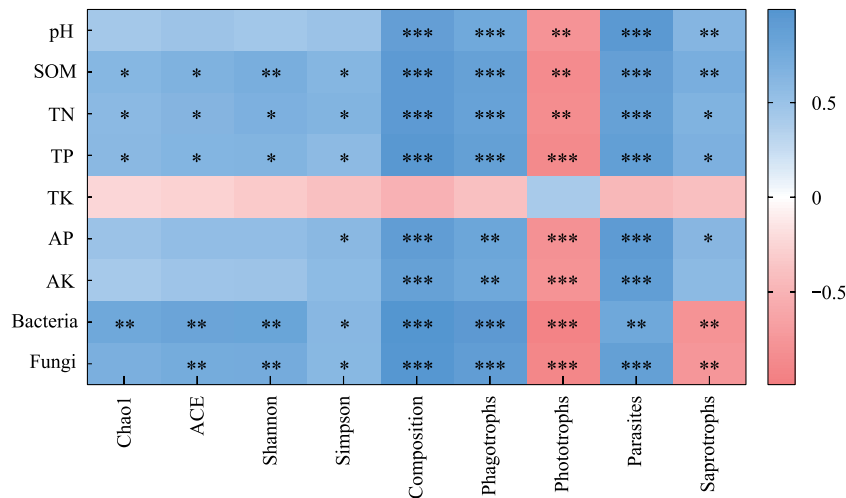


图5 土壤化学性质、原生生物与微生物群落的皮尔森相关性分析

Fig.5 Pearson correlations between soil chemical properties, protists and microorganisms

* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$

著增加其多样性。本文研究结果表明,不同处理中吞噬型原生生物占原生生物的 68.6%—90.3%,由于吞噬型原生生物主要以土壤微生物(细菌和真菌)为食^[6],与 M2 处理相比,M3 处理中细菌生物量显著下降,减少了优势原生生物类群的食物来源,可能导致了原生生物多样性降低。

3.2 有机肥处理对土壤原生生物群落结构的影响

本研究表明,施用有机肥显著改变了土壤原生生物群落结构,其主要影响因素为土壤 pH 和 TP。有机肥处理下原生生物群落结构与 M0 处理显著差异。M0 处理下原生生物的优势属为 Chlorophyta 和 Cercozoa,施加有机肥显著增加了变形虫两个优势门 Lobosa 和 Conosa 的相对丰度。Cercozoa 对干旱的适应性较强,通常在干旱与半干旱土壤中广泛存在^[43]。与森林和草地生态系统相比,由于农田生态系统光照增强,Chlorophyta 的相对丰度通常较高^[44]。施肥通过对土壤原生生物群落结构的影响,导致其功能类群发生改变。近年一项全球尺度下原生生物的分布研究表明,绝大多数土壤以作为消费者的吞噬型原生生物为主^[5]。有研究发现,施用氮肥会显著降低土壤中吞噬型原生生物数量^[8],这是由于施氮会导致土壤中氮素富集,过高浓度的铵态氮会穿透原生生物的细胞膜导致细胞裂解。施用无机氮肥会加剧红壤酸化,对吞噬型原生生物产生间接影响^[45]。本研究中施用猪粪增加土壤 pH,改善了原生生物生存的土壤环境,显著提高了土壤细菌和真菌的生物量,喂养了更多的吞噬型原生生物^[17],从而导致吞噬型原生动物的相对丰度增加。与无机氮肥相比,施用有机肥更能显著地改变原生生物的群落组成^[46]。

3.3 土壤原生生物与微生物互作对碳代谢及玉米产量的影响

在农业生态系统中,土壤微生物参与了有机碳的转化过程^[47],对维持生态系统的稳定性和服务功能至关重要^[48]。土壤微生物对环境变化十分敏感,土壤微生物对碳源的利用能力可以揭示外界扰动下,土壤微生物代谢活性的变化^[49]。本研究中,有机肥处理下土壤微生物碳代谢(AWCD 值)显著高于 M0 处理,即施肥后土壤微生物具有较高的碳源利用能力,增加了土壤微生物碳代谢活性^[50]。施肥显著提高了土壤 pH 和 AP 含量,直接影响了微生物的碳代谢活性^[51]。由于易矿化有机质倾向于促进细菌生长,难矿化有机质更容易促进真菌生长^[16],本研究施加猪粪,易矿化的有机质和 AP 含量较高^[52],因此主要通过影响细菌群落来影响土壤微生物碳代谢活性^[53—54]。由于原生生物的 C/N 比通常高于细菌和真菌,在原生生物捕食土壤细菌和真菌的过程中,会释放出多余的氮供应其他微生物使用,这一过程会促进细菌和真菌生物量的增加,从而增强了微生物碳代谢活性^[55—56],导致微生物碳代谢活性增强,从而促进了土壤养分的转化,提高了对植物的养分供应,使得玉米产量显著增加。吞噬型原生生物对细菌和真菌的捕食关系及其互作强度与土壤 pH 和有效养分含量

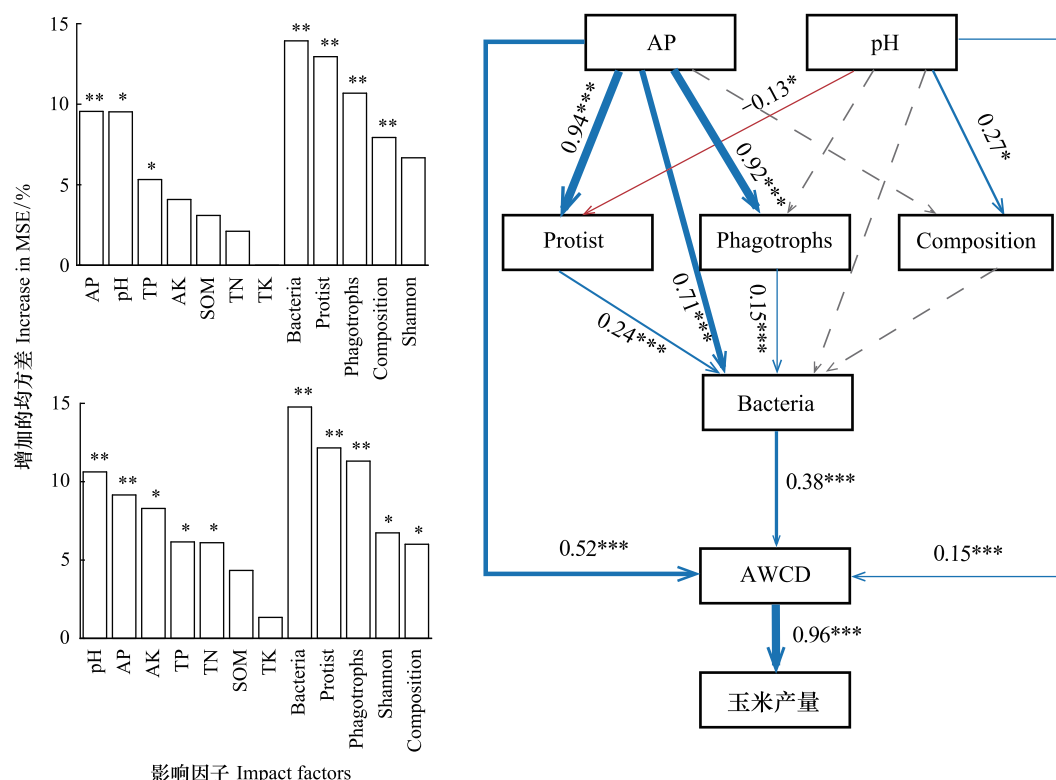


图6 土壤微生物碳代谢和玉米产量影响因子的随机森林和结构方程模型分析

Fig.6 Predictors of microbial carbon metabolism and maize yield based on random forest modelling and structural equation modelling

Increase in MSE: 增长的错误率平方均值, 表示对目标变量预测准确的贡献度 Increase in mean squared error; pH: 土壤酸碱度 soil acidity; SOM: 土壤有机质 soil organic matter; TN: 全氮 soil nitrogen; TP: 全磷 total phosphorus; TK: 全钾 total potassium; AP: 速效磷 available phosphorus; AK: 速效钾 available potassium; Protist: 原生生物量; Phagotrophs: 吞噬型原生生物; Composition: 原生生物群落结构; AWCD: 每孔颜色平均变化率 average well color development. * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$, 蓝线表示正相关关系, 红线表示负相关关系, 虚线表示无显著相关; 箭头旁边的数字代表路径系数; 线条粗细表示系数大小

密切相关。在降水量充沛的地区, 原生生物可以在水分充足的土壤孔隙中移动, 更倾向于捕食细菌^[57], 而在土壤 pH 和 C/N 比值较高的地方, 如在北方黑土中, 原生生物与真菌的相互作用更强^[33]。

4 结论

本研究结果表明, 施用有机肥显著提高了土壤 pH, 缓解了土壤酸化, 高肥处理下显著改善了土壤养分状况, 土壤 SOM、TN、TP、AP 和 AK 含量最高。高肥处理下土壤细菌、真菌和原生生物数量最高, 原生生物多样性及其群落结构相比 CK 处理显著变化。原生生物的多样性和群落结构可能通过影响细菌生物量, 间接增加了土壤微生物碳代谢活性, 进而加快红壤有机碳的周转过程, 提高了玉米产量。本研究对提升红壤生态系统功能稳定性、保障粮食高产增效具有重要意义。

参考文献 (References):

- [1] 韦中, 宋宇琦, 熊武, 徐阳春, 沈其荣. 土壤原生动物—研究方法及其在土传病害防控中的作用. 土壤学报, 2021, 58(1): 14-22.
- [2] Geisen S, Mitchell E A D, Adl S, Bonkowski M, Dunthorn M, Ekelund F, Fernández L D, Jousset A, Krashevska V, Singer D, Spiegel F W, Walochnik J, Lara E. Soil protists: a fertile frontier in soil biology research. FEMS Microbiology Reviews, 2018, 42(3): 293-323.
- [3] Singer D, Seppely C V W, Lentendu G, Dunthorn M, Bass D, Belbahri L, Blandenier Q, Debroas D, de Groot G A, de Vargas C, Domaizon I, Duckert C, Izaguirre I, Koenig I, Mataloni G, Schiaffino M R, Mitchell E A D, Geisen S, Lara E. Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems. Environment International, 2021, 146: 106262.

- [4] Risse-Buhl U, Schlieff J, Mutz M. Phagotrophic protists are a key component of microbial communities processing leaf litter under contrasting oxic conditions. *Freshwater Biology*, 2015, 60(11): 2310-2322.
- [5] Oliverio A M, Geisen S, Delgado-Baquerizo M, Maestre F T, Turner B L, Fierer N. The global-scale distributions of soil protists and their contributions to belowground systems. *Science Advances*, 2020, 6(4): eaax8787.
- [6] Geisen S. The bacterial-fungal energy channel concept challenged by enormous functional versatility of soil protists. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 102: 22-25.
- [7] Geisen S, Hu S R, dela Cruz T E E, Veen G F. Protists as catalyzers of microbial litter breakdown and carbon cycling at different temperature regimes. *The ISME Journal*, 2021, 15(2): 618-621.
- [8] Zhao Z B, He J Z, Quan Z, Wu C F, Sheng R, Zhang L M, Geisen S. Fertilization changes soil microbiome functioning, especially phagotrophic protists. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020, 148: 107863.
- [9] Xiong W, Song Y Q, Yang K M, Gu Y A, Wei Z, Kowalchuk G A, Xu Y C, Jousset A, Shen Q R, Geisen S. Rhizosphere protists are key determinants of plant health. *Microbiome*, 2020, 8(1): 27.
- [10] 熊杰, 陈建平, 陈晓光, 陈瑛, 冯耀宇, 高凤, 高珊, 顾福康, 黄兵, 梁爱华, 龙红岸, 赖德华, 伦照荣, 缪伟, 倪兵, 邱子健, 邵晨, 汪建国, 文建凡, 徐奎栋, 余育和, 张龙现, 张西臣, 赵元君, 宋微波. 进展中的原生动物学研究: 热点领域与新格局. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(10): 1301-1322.
- [11] 刘希玉, 王忠强, 张心昱, 徐丽丽, 施瑶, 孙晓敏, 杨风亭. 施肥对红壤水稻土团聚体分布及其碳氮含量的影响. *生态学报*, 2013, 33(16): 4949-4955.
- [12] 孙铭鸿, 蒋炳恒, 沈健林, 宋变兰, 李巧云, 李勇, 吴金水. 猪粪化肥配施对稻田土壤氮素含量及氮肥利用效率的影响. *农业现代化研究*, 2021, 42(1): 175-183.
- [13] Huang G F, Wong J W C, Wu Q T, Nagar B B. Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. *Waste Management*, 2004, 24(8): 805-813.
- [14] 付浩然, 李婷玉, 曹寒冰, 张卫峰. 我国化肥减量增效的驱动因素探究. *植物营养与肥料学报*, 2020, 26(3): 561-580.
- [15] 张敏, 姚元林, 曾科, 李冰洋, 田玉华, 尹斌. 配施有机肥减少太湖地区稻田土壤硝态氮淋失的机理研究. *土壤*, 2020, 52(4): 766-772.
- [16] Qiu M H, Zhang R F, Xue C, Zhang S S, Li S Q, Zhang N, Shen Q R. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(7): 807-816.
- [17] Xiong W, Jousset A, Guo S, Karlsson I, Zhao Q Y, Wu H S, Kowalchuk G A, Shen Q R, Li R, Geisen S. Soil protist communities form a dynamic hub in the soil microbiome. *The ISME Journal*, 2018, 12(2): 634-638.
- [18] 柳开楼, 余跑兰, 谭武贵, 胡惠文, 黄庆海, 余喜初, 李大明, 叶会财, 徐小林, 周利军. 长期施用猪粪对红壤旱地和水稻土肥力和土壤As转化的影响. *生态环境学报*, 2015, 24(6): 1057-1062.
- [19] 杨小东, 曾希柏, 文炯, 王亚男, 白玲玉, 许望龙, 苏世鸣, 吴翠霞. 猪粪施用量对红壤旱地理化性质及酶活性的影响. *土壤学报*, 2020, 57(3): 739-749.
- [20] 陈云峰, 夏贤格, 胡诚, 李双来, 乔艳, 刘东海. 有机肥和秸秆还田对黄泥田土壤微生物网的影响. *农业工程学报*, 2018, 34(S1): 19-26.
- [21] 王利彦, 周国娜, 朱新玉, 高宝嘉, 许会道. 凋落物对土壤有机碳与微生物功能多样性的影响. *生态学报*, 2021, 41(7): 2709-2718.
- [22] 彭双, 林先贵, 王一鸣. 添加猪粪对不同施肥历史土壤细菌群落的影响. *中国环境科学*, 2020, 40(2): 748-756.
- [23] Liu G M, Zhang X C, Wang X P, Shao H B, Yang J S, Wang X P. Soil enzymes as indicators of saline soil fertility under various soil amendments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, 237: 274-279.
- [24] 孙波. 红壤退化阻控与生态修复. 北京: 科学出版社, 2011.
- [25] Geisen S, Bonkowski M. Methodological advances to study the diversity of soil protists and their functioning in soil food webs. *Applied Soil Ecology*, 2018, 123: 328-333.
- [26] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [27] Luan L, Jiang Y J, Cheng M H, Dini-Andreote F, Sui Y Y, Xu Q S, Geisen S, Sun B. Organism body size structures the soil microbial and nematode community assembly at a continental and global scale. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 6406.
- [28] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, Bokulich N A, Abnet C C, Al-Ghalith G A, Alexander H, Alm E J, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz J E, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn C J, Brown C T, Callahan B J, Caraballo-Rodríguez A M, Chase J, Cope E K, Da Silva R, Diener C, Dorrestein P C, Douglas G M, Durall D M, Duvallet C, Edwardson C F, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz J M, Gibbons S M, Gibson D L, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J R, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley G A, Janssen S, Jarmusch A K, Jiang L J, Kaehler B D, Kang K B, Keefe C R, Keim P, Kelley S T, Knights D, Koester I, Kosciorek T, Kreps J, Langille M G I, Lee J, Ley R, Liu Y X, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin B D, McDonald D, McIver L J, Melnik A V, Metcalf J L, Morgan S C, Morton J T, Naimey A T, Navas-Molina J A, Nothias L F, Orchanian S B, Pearson T, Peoples S L, Petras D, Preuss M L, Priesse E, Rasmussen L B, Rivers A, Robeson II M S, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song S J, Spear J R, Swafford A D, Thompson L R, Torres P J, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh P J, Ul-Hasan S, van der Hooft J J J, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y H, Wang M X, Warren J, Weber K C, Williamson C H D, Willis A D, Xu Z Z, Zaneveld J R, Zhang Y L, Zhu Q Y, Knight R, Caporaso J G. Author Correction: reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(9): 1091.
- [29] Frostegård Å, Bååth E, Tunlio A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(6): 723-730.

- [30] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(2): 111-129.
- [31] Schulz-Bohm K, Geisen S, Wubs E R J, Song C X, de Boer W, Garbeva P. The prey's scent - volatile organic compound mediated interactions between soil bacteria and their protist predators. *The ISME Journal*, 2017, 11(3): 817-820.
- [32] Zhao Z B, He J Z, Geisen S, Han L L, Wang J T, Shen J P, Wei W X, Fang Y T, Li P P, Zhang L M. Protist communities are more sensitive to nitrogen fertilization than other microorganisms in diverse agricultural soils. *Microbiome*, 2019, 7(1): 33.
- [33] Guo S, Xiong W, Hang X N, Gao Z L, Jiao Z X, Liu H J, Mo Y N, Zhang N, Kowalchuk G A, Li R, Shen Q R, Geisen S. Protists as main indicators and determinants of plant performance. *Microbiome*, 2021, 9(1): 64.
- [34] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, 19(6): 703-707.
- [35] 赵其国. 红壤物质循环及其调控. 北京: 科学出版社, 2002.
- [36] Jiang Y J, Liu M Q, Zhang J B, Chen Y, Chen X Y, Chen L J, Li H X, Zhang X X, Sun B. Nematode grazing promotes bacterial community dynamics in soil at the aggregate level. *The ISME Journal*, 2017, 11(12): 2705-2717.
- [37] Fan Y X, Lu S X, He M, Yang L M, Hu W F, Yang Z J, Liu X F, Hui D F, Guo J F, Yang Y S. Long-term throughfall exclusion decreases soil organic phosphorus associated with reduced plant roots and soil microbial biomass in a subtropical forest. *Geoderma*, 2021, 404: 115309.
- [38] Jiang Y J, Luan L, Hu K J, Liu M Q, Chen Z Y, Geisen S, Chen X Y, Li H X, Xu Q S, Bonkowski M, Sun B. Trophic interactions as determinants of the arbuscular mycorrhizal fungal community with cascading plant-promoting consequences. *Microbiome*, 2020, 8(1): 142.
- [39] Scharroba A, Dibbern D, Hünninghaus M, Kramer S, Moll J, Butenschoen O, Bonkowski M, Buscot F, Kandeler E, Koller R, Krüger D, Lueders T, Scheu S, Ruess L. Effects of resource availability and quality on the structure of the micro-food web of an arable soil across depth. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 50: 1-11.
- [40] Tedersoo L, Bahram M, Cajthaml T, Pölme S, Hiiesalu I, Anslan S, Harend H, Buegger F, Pritsch K, Koricheva J, Abarenkov K. Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *The ISME Journal*, 2016, 10(2): 346-362.
- [41] Scharroba A, Dibbern D, Hünninghaus M, Kramer S, Moll J, Butenschoen O, Bonkowski M, Buscot F, Kandeler E, Koller R, Krüger D, Lueders T, Scheu S, Ruess L. Effects of resource availability and quality on the structure of the micro-food web of an arable soil across depth. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 50: 1-11.
- [42] Jiang Y J, Sun B, Jin C, Wang F. Soil aggregate stratification of nematodes and microbial communities affects the metabolic quotient in an acid soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 60: 1-9.
- [43] Harder C B, Rønn R, Brejnrod A, Bass D, Al-Soud W A, Ekelund F. Local diversity of heathland Cercozoa explored by in-depth sequencing. *The ISME Journal*, 2016, 10(10): 2488-2497.
- [44] Xiong W, Jousset A, Li R, Delgado-Baquerizo M, Bahram M, Logares R, Wilden B, de Groot G A, Amacker N, Kowalchuk G A, Shen Q R, Geisen S. A global overview of the trophic structure within microbiomes across ecosystems. *Environment International*, 2021, 151: 106438.
- [45] Angus J F, Gupta V V S R, Pitson G D, Good A J. Effects of banded ammonia and urea fertiliser on soil properties and the growth and yield of wheat. *Crop and Pasture Science*, 2014, 65(4): 337-352.
- [46] Lentendu G, Wubet T, Chatzinotas A, Wilhelm C, Buscot F, Schlegel M. Effects of long-term differential fertilization on eukaryotic microbial communities in an arable soil: a multiple barcoding approach. *Molecular Ecology*, 2014, 23(13): 3341-3355.
- [47] Bender S F, Wagg C, van der Heijden M G A. An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends in Ecology & Evolution*, 2016, 31(6): 440-452.
- [48] Ling N, Chen D M, Guo H, Wei J X, Bai Y F, Shen Q R, Hu S J. Differential responses of soil bacterial communities to long-term N and P inputs in a semi-arid steppe. *Geoderma*, 2017, 292: 25-33.
- [49] 何越, 李春涛, 俞元春, 何黄盼, 陶晓. 亚热带森林土壤微生物生物量及群落功能特征的城乡梯度变化. *应用生态学报*, 2021, 32(1): 93-102.
- [50] 冯慧芳, 林婉奇, 薛立. 氮磷添加和栽植密度对大叶相思林土壤微生物群落功能多样性的影响. *生态学报*, 2021, 41(6): 2305-2314.
- [51] 张恩平, 田悦悦, 李猛, 时毛, 蒋雨含, 任如冰, 张淑红. 长期不同施肥对番茄根际土壤微生物功能多样性的影响. *生态学报*, 2018, 38(14): 5027-5036.
- [52] Jiang Y J, Luan L, Hu K J, Liu M Q, Chen Z Y, Geisen S, Chen X Y, Li H X, Xu Q S, Bonkowski M, Sun B. Trophic interactions as determinants of the arbuscular mycorrhizal fungal community with cascading plant-promoting consequences. *Microbiome*, 2020, 8(1): 142.
- [53] Jiang Y J, Zhou H, Chen L J, Yuan Y, Fang H, Luan L, Chen Y, Wang X Y, Liu M Q, Li H X, Peng X H, Sun B. Nematodes and microorganisms interactively stimulate soil organic carbon turnover in the macroaggregates. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2803.
- [54] Jiang Y J, Qian H Y, Wang X Y, Chen L J, Liu M Q, Li H X, Sun B. Nematodes and microbial community affect the sizes and turnover rates of organic carbon pools in soil aggregates. *Soil Biology and Biochemistry*, 2018, 119: 22-31.
- [55] Dumack K, Pundt J, Bonkowski M. Food choice experiments indicate selective fungivorous predation in *Fisculia terrestris* (Thecofilosea, Cercozoa). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2019, 66(3): 525-527.
- [56] Gao Z L, Karlsson I, Geisen S, Kowalchuk G, Jousset A. Protists: puppet masters of the rhizosphere microbiome. *Trends in Plant Science*, 2019, 24(2): 165-176.
- [57] Payne R J, Thompson A M, Standen V, Field C D, Caporn S J M. Impact of simulated nitrogen pollution on heathland microfauna, mesofauna and plants. *European Journal of Soil Biology*, 2012, 49: 73-79.