

滩涂土壤固氮菌群落与环境因子的典范对应分析^①

蔡树美^{1,2,3}, 徐四新^{1,2,3}, 张翰林^{1,2,3}, 张德闪^{1,2,3}, 吕卫光^{1,2,3}, 顾富家⁴, 诸海焘^{1,2,3*}

(1 上海市农业科学院生态环境保护研究所, 上海 201403; 2 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403;

3 农业部上海农业环境与耕地保护科学观测实验站, 上海 201403; 4 申农(上海)生态农业发展有限公司, 上海 202150)

摘要: 选择连续 4 年进行水稻-紫云英轮作的田块, 在 0~10、10~20、20~40 和 40~80 cm 剖面深度分别采集土样, 利用 PCR-DGGE 技术分析水稻-紫云英轮作对土壤不同剖面深度固氮菌 *nifH* 基因丰度与群落多样性的影响, 并对固氮菌群落与 8 个环境因子进行了典范对应分析 (CCA)。试验结果表明, 水稻-紫云英轮作能提高滩涂土壤固氮菌的丰度和多样性。水稻-紫云英轮作处理 10~20 cm 土壤剖面中固氮菌丰度最大, 水稻-休闲处理 40~80 cm 土壤剖面中的最小, 其 Shannon-Weaver 多样性指数分别为 3.18 和 1.51。滩涂土壤环境因子中, 总氮与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、EC 与有效磷、pH 与速效钾, 两两之间的相关性最高; CCA 排序图表明土壤有机质、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和有效磷是影响滩涂土壤固氮菌群落的主要因子。

关键词: 滩涂盐碱地; *nifH* 基因; PCR-DGGE; 典范对应分析

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A

我国耕地资源紧缺, 滩涂是重要的后备土地资源, 有着巨大的开发潜力和利用价值。然而滩涂土壤并非农用耕地, 恶劣的滩涂生态环境仍是制约人们更深层次利用这片资源的瓶颈。其限制因子主要包括土壤结构差、含盐量高、有机质和全氮含量低等问题^[1-3]。因此, 如何合理利用和开发这片极具价值的土壤后备资源, 已经成为缓解当前农业用地日益紧缺矛盾、助推农业可持续发展的难点之一。

面对滩涂资源生态不断恶化的现实, 以生物利用为核心的生物改良技术近年来日趋受到重视。通过紫云英等绿肥种植和农田耕翻轮作等模式, 提升土壤有机质、增加碳汇、培肥地力, 已经成为近年来滩涂土壤生物改良的新趋势。目前对滩涂紫云英-水稻轮作生物改良技术的试验研究, 大多集中在土壤类型、水分、施肥、植被等非微生物学因素方面^[4-8], 对固氮菌群落结构和多样性等微生物学因素方面的野外试验研究相对较少。虽有报道显示紫云英-水稻轮作能提高根际土壤和水稻根内生微生物多样性^[9-10], 但对紫云英-水稻轮作生物改良行为下滩涂土壤特殊生理类群微生物群落结构的响应机制仍不清楚, 制约了滩

涂土壤土地利用效率和土壤改良效率的提高。

本研究通过分析紫云英-水稻轮作模式对滩涂土壤固氮菌群落结构和土壤环境因子的影响, 并通过土壤固氮菌群落结构和土壤环境因子的相关性分析, 比较固氮菌群落和土壤环境对紫云英-水稻轮作模式的响应, 为滩涂盐碱地的生物改良技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

试验于 2011 年 10 月至 2015 年 6 月在上海崇明岛东滩优质水稻种植功能区进行(121°51'E, 31°36'N)。该区域位于上海崇明东滩上实现现代农业园区范围内, 属北亚热带季风海洋性气候, 年均日照时数 2 104 h, 日照百分率 47%, 全年无霜期 229 d, 平均气温 15.3 °C, 年均降水量 1 022 mm。由于园区位处新近形成的潮滩湿地, 1990 年才开始进行大面积围垦, 土壤普遍存在盐碱较重、肥力偏低等问题。在前期对 200 份土壤样品的调查数据中发现, pH>7.5 的土壤占比 95.5%, 其中 pH>8.5 的碱性土壤占比 24.0%; 盐分 >1 g/kg 的土壤占比 77.5%, 部分土壤盐分含量高达 6 g/kg

基金项目: 科技部星火计划(2015GA680001), 上海市农业科学院卓越团队建设计划(农科创 2017A-03), 上海市科委成果转化项目(153919N0402), 崇明县科技攻关项目(CKS2016-02)和上海市科技兴农推广项目(沪农科推字 2015 第 2-2 号)资助。

* 通讯作者(htzhu123@163.com)

作者简介: 蔡树美(1984—), 女, 江苏溧阳人, 博士, 副研究员, 主要从事植物营养与环境的研究。E-mail: caishumei@saas.sh.cn

以上;有机质含量 <10 g/kg 的土壤占比 40.5%,部分土壤有机质含量低于 2 g/kg。故此采取播种水稻、水稻-绿肥轮作等方式对园区土壤进行洗盐改造。

供试水稻为当地主栽品种“花优 14”,系上海市农业科学院选育的优质超高产、耐盐性强的水稻新品种,供试紫云英为余江大叶籽,供试土壤为长江泥沙淤积而成的盐渍土壤。试验区土壤地力偏低,地势平坦。0~20 cm 耕层土壤性质为:全氮 0.48 g/kg,全磷 0.61 g/kg,全钾 16.4 g/kg,速效氮 36.3 mg/kg,有效磷 22.3 mg/kg,速效钾 198.2 mg/kg,有机质 4.42 g/kg, pH 8.55,全盐 2.46 g/kg, EC 214.3 μ S/cm。

1.2 试验设计

试验设置水稻-紫云英轮作区和水稻-冬季休闲区,每区面积 66.7 m²。紫云英于每年 10 月 5 日播种,播种量为 2.5 kg/667m²,于 4 月底全量翻压还田。

试验从 2011 年起连续进行 4 年,共计有 4 茬绿肥、4 茬水稻。田间按照常规施肥方式进行水肥管理,商品有机肥用量为 3 000 kg/hm²,化肥用量折算为纯 N 270 kg/hm², P₂O₅ 120 kg/hm², K₂O 150 kg/hm²。氮肥分 4 次施用:基肥 50%,蘖肥(苗期)20%,拔节肥 10%,穗肥占 20%;磷肥 100% 作基肥;钾肥分为基肥 50% 与拔节期追肥 50%。化肥品种选用尿素(N 46%)、复合肥(15:15:15)、氯化钾(K₂O 60%)。田间管理按常规方法进行。

1.3 样品采集

选择水稻-休闲和水稻-紫云英轮作改良 4 年以上的田块(编号分别为“1”、“2”),分别采集土壤样品。用土钻采集剖面土壤样品,采样深度分别为 0~10 cm(编号“a”)、10~20 cm(编号“b”)、20~40 cm(编号“c”)和 40~80 cm(编号“d”)。每个采样点按连续“S”形采样法均匀布 10~15 个点,用土钻采集不同剖面深度土样,将 10~15 个点土样混合成 1 个混合样品,每个样地各取 3 个平行,共得 24 个混合土壤样品。将样品装入已标记的自封袋中带回实验室,去除石块、昆虫残体、植物残根等杂质后待用。

1.4 检测指标与方法

参照土壤农业化学分析方法,有机质采用重铬酸钾容量法测定;土壤样品经 H₂SO₄-H₂O₂ 消煮后,全氮用蒸馏定氮法测定,全磷用钒钼黄比色法测定,全钾用火焰光度计测定,速效氮用蒸馏定氮法测定,有效磷用钼蓝比色法测定,速效钾用火焰光度计法测定,土壤全盐用质量法测定,EC 用电导率法测定,pH 用电位法测定^[11]。另取部分新鲜土样放入已灭菌的 2 ml 离心管中,并置于-80 °C 冰箱保存,用 PCR-DGGE 法分析土壤固氮菌群落结构分析^[12-13],

具体步骤如下:

1)采用 Mobio Powersoil Isolation Kit 试剂盒抽提土壤基因组 DNA,固氮菌 *nifH* 基因的 PCR 扩增采用 Nested-PCR 程序。

2)第一次 PCR:所用引物为固氮菌 *nifH* 基因的引物 FGPH 19 和 Po1R,反应体系为:BioLinker2 \times Taq Mix 20 μ l,每种引物 1 μ l,10 倍稀释的土壤总 DNA 提取液 1 μ l,加 ddH₂O 至反应终体积 40 μ l。扩增程序为:94 °C 预变性 2 min;25 个循环:94 °C 变性 30 s,56.4 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,最后 72 °C 延伸 5 min。

3)第二次 PCR:反应体系与第一次相同,模板为第一次 PCR 产物,扩增程序为:94 °C 预变性 2 min;20 个循环:94 °C 变性 30 s,56.4 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s;最后一步 72 °C 延伸 5 min,获得约 320 bp(包括 40 bp 的 GC 夹)的基因片段。

4)Reconditioning PCR:继续进行 Reconditioning PCR 以消除扩增产物中异二聚体。反应体系为:BioLinker2 \times Taq Mix 20 μ l,每种引物 2 μ l,巢氏扩增产物 4 μ l,加 ddH₂O 至反应终体积 40 μ l。扩增程序为:94 °C 预变性 2 min;5 个循环:94 °C 变性 30 s,56.4 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s;最后 72 °C 延伸 5 min。

5)DGGE 分析:采用 BIO-RAD Dcode™ 突变检测系统(Bio-Rad Laboratories,美国)进行固氮菌 *nifH* 基因的 DGGE 分析。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性剂梯度为 53%~75%(100% 的变性剂含有 7 mol/L 尿素和 40%(v/v)的去离子甲酰胺,电泳缓冲液为 1 \times TAE buffer。60 °C、70 V 电压下电泳 15 h。电泳结束后,用 Biolinker DNA Red 染色液进行染色 40 min,然后用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统观察样品的电泳条带并拍照。

1.5 数据处理

采用 Canoco for Windows 4.5 软件对物种数据和相关环境因子数据进行典范对应分析(CCA)。物种数据采用固氮菌群落结构多样性指数(香农指数 Shannon-Weaver、均匀度指数 Pielou Evenness 和丰富度指数 Richness),用 $\lg(x+1)$ 进行处理使之更趋于正态分布^[14]。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质差异

表 1 显示了土壤环境因子在不同轮作方式下的空间变化特征。在水稻-休闲方式下,0~10 cm 和 10~20 cm 土壤剖面中总氮(TN)、NH₄⁺-N、有机质(SOM)

含量较高,随着剖面深度加深, TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、SOM 含量下降趋势明显。在水稻-紫云英方式下,剖面深度对 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、SOM 含量的影响比水稻-休闲方

式下的影响小。总体来看,水稻-紫云英轮作可以降低土壤电导率 (EC),并且使滩涂土壤中 0~10 cm 和 10~20 cm 土壤剖面的 pH 下降。

表 1 不同轮作方式下滩涂土壤理化性质
Table 1 Soil physical and chemical properties under different rotation patterns

土样	TN(g/kg)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/kg)	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/kg)	Olsen-P(mg/kg)	$\text{NH}_4\text{OAc-K}$ (mg/kg)	SOM(g/kg)	EC($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH
1a	0.49 ± 0.06 bc	18.9 ± 0.89 a	7.55 ± 0.63 a	22.0 ± 1.53 c	70.0 ± 10.0 d	6.40 ± 0.26 a	174.0 ± 7.94 c	8.25 ± 0.18 cd
2a	0.62 ± 0.07 a	17.0 ± 1.00 b	3.78 ± 0.38 b	35.0 ± 2.79 b	90.0 ± 20.0 d	4.70 ± 0.26 b	208.0 ± 7.21 b	8.20 ± 0.05 d
1b	0.52 ± 0.04 b	18.9 ± 0.98 a	3.78 ± 0.27 b	34.6 ± 1.23 b	190.0 ± 26.5 a	6.90 ± 0.36 a	200.0 ± 5.00 b	8.40 ± 0.07 abc
2b	0.48 ± 0.04 bc	15.1 ± 0.67 c	3.78 ± 0.23 b	15.5 ± 3.04 d	100.0 ± 10.0 cd	4.70 ± 0.44 b	181.0 ± 6.56 c	8.32 ± 0.09 bcd
1c	0.43 ± 0.04 c	15.1 ± 0.74 c	1.89 ± 0.24 c	24.1 ± 2.52 c	140.0 ± 34.6 b	4.40 ± 0.26 b	250.0 ± 5.00 a	8.35 ± 0.05 bcd
2c	0.41 ± 0.05 cd	13.5 ± 0.35 cd	3.78 ± 0.12 b	9.43 ± 1.23 e	100.0 ± 20.0 cd	4.60 ± 0.17 b	177.0 ± 11.5 c	8.43 ± 0.09 ab
1d	0.34 ± 0.03 d	13.2 ± 0.92 d	3.78 ± 0.09 b	40.7 ± 2.70 a	130.0 ± 17.3 bc	4.10 ± 0.17 b	250.0 ± 13.2 a	8.45 ± 0.07 ab
2d	0.41 ± 0.04 cd	15.1 ± 1.13 c	3.78 ± 0.24 b	9.43 ± 1.17 e	220.0 ± 20.0 a	6.40 ± 0.47 a	176.0 ± 8.54 c	8.54 ± 0.05 a

注：同列数据小写字母不同表示差异达到 $P < 0.05$ 显著水平；1a：稻-闲 0~10 cm；2a：稻-紫 0~10 cm；1b：稻-闲 10~20 cm；2b：稻-紫 10~20 cm；1c：稻-闲 20~40 cm；2c：稻-紫 20~40 cm；1d：稻-闲 40~80 cm；2d：稻-紫 40~80 cm，下同。

为进一步明确土壤环境因子之间的关系,对各环境因子进行典范对应分析(表 2),结果可见,土壤环境因子之间存在着相关性。TN 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 典型相关系数最高,

与 pH 和有效磷(Olsen-P)的相关性次之;EC 与、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、Olsen-P 之间的典型相关系数较高;pH 与速效钾($\text{NH}_4\text{OAc-K}$)的典型相关性高于其他土壤环境因子。

表 2 环境因子之间的典型相关分析
Table 2 Correlation coefficients between different environmental factors

	TN	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	Olsen-P	$\text{NH}_4\text{OAc-K}$	SOM	EC	pH
TN	1.000							
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	0.566	1.000						
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	0.227	0.412	1.000					
Olsen-P	0.487	0.481	-0.041	1.000				
$\text{NH}_4\text{OAc-K}$	-0.233	-0.089	-0.395	-0.068	1.000			
SOM	-0.099	0.207	0.262	-0.375	0.608	1.000		
EC	-0.071	-0.200	-0.656	0.590	0.179	-0.460	1.000	
pH	-0.501	-0.304	-0.169	-0.445	0.671	0.473	-0.051	1.000

2.2 土壤固氮菌 PCR-DGGE 分析

2.2.1 nifH 基因的 DGGE 分析图谱 采用 Quantity one 4.6.2 对 DGGE 图谱进行条带识别及相似性分析,每条泳道不同位置的条带为土壤样品中被分离的 PCR 产物片段,属于不同的固氮菌类群。从图 1 可以看出, DGGE 电泳图中各泳道条带数目、强度、迁移率均存在一定差异,两种轮作方式下 40~80 cm 土壤剖面中条带数目均较少。水稻-紫云英轮作的土壤固氮菌群落丰富度高于水稻-休闲。水稻-紫云英轮作方式下, 10~20 cm 土壤剖面中条带数目最多。

2.2.2 nifH 基因的多样性指数 群落多样性通常与物种的丰富度和均匀度密切相关。本研究采用丰富度指数 Richness、香农指数 Shannon-Weaver、均匀度指数 Pielou Evenness 对固氮菌群落多样性进行分析。

香农指数可反映群落结构的复杂程度,均匀度指数用于反映群落均匀度。从表 3 可以看出,水稻-紫云英轮作方式下,不同剖面深度土壤的固氮菌多样性指数总体上高于水稻-休闲;10~20 cm 土层水稻-紫云英轮作方式中土壤固氮微生物群落多样性表现为最高,固氮菌群落组成复杂,群落多样性高于水稻-休闲。此外,对比两种轮作方式发现,水稻-休闲 40~80 cm 土层土壤固氮微生物群落的多样性显著低于水稻-紫云英。

2.3 固氮菌群落结构与土壤养分因子的关系

为进一步研究土壤固氮菌群落结构与土壤理化性质的关系,将 DGGE 指纹图谱中每一条带的光密度值作为物种数据,使用 CANOCO 软件将固氮菌群落与土壤理化性质做典范对应分析(表 4)。结果显

示,固氮菌群落多样性 CCA 排序轴与环境因子相关。在前 3 个排序轴中,固氮菌群落多样性与环境的相关性分别为 0.983、0.946 和 0.971,固氮菌群落多样性与环境关系的变化累计比例分别为

24.3%、41.6% 和 56.4%。前 3 个排序轴的固氮菌群落多样性与环境关系方差累计贡献率达到 72.7%,排序结果可行有效,能较好地解释固氮菌群落与环境之间的相关关系。

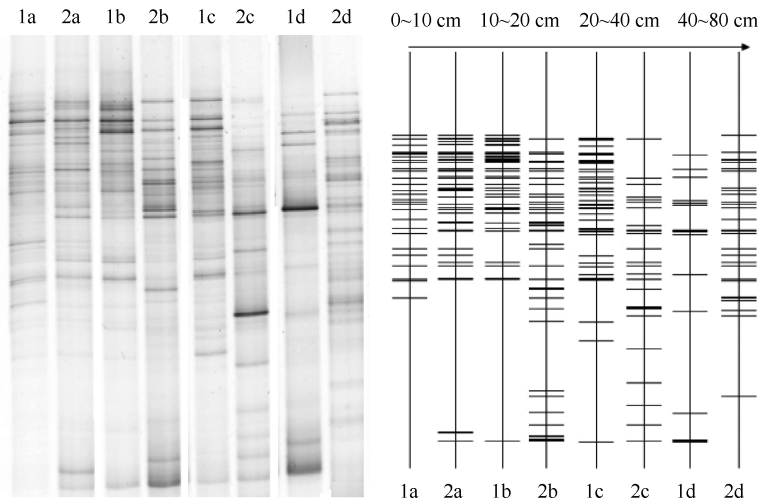


图 1 不同轮作模式下滩涂土壤 *nifH* 基因的 DGGE 分析图谱
Fig. 1 DGGE profiles of soil *nifH* genes under different rotation patterns

表 3 不同轮作方式下土壤 *nifH* 基因的多样性指数
Table 3 Diversity indexes of soil microbial *nifH* genes under different rotation patterns

土样	香农指数 H	丰富度 S	均匀度 J
1a	2.73 ± 0.10 b	26.15 ± 0.94 a	0.84 ± 0.07 cd
2a	3.01 ± 0.14 ab	29.42 ± 1.04 a	0.90 ± 0.08 bc
1b	2.87 ± 0.09 ab	32.04 ± 0.77 a	0.83 ± 0.07 b
2b	3.18 ± 0.11 a	36.67 ± 0.93 a	0.89 ± 0.08 a
1c	3.07 ± 0.13 a	30.33 ± 0.57 a	0.90 ± 0.04 bc
2c	2.15 ± 0.13 c	23.25 ± 1.05 b	0.69 ± 0.07 d
1d	1.51 ± 0.06 d	12.16 ± 0.84 b	0.61 ± 0.09 e
2d	2.91 ± 0.11 ab	27.07 ± 0.60 a	0.88 ± 0.08 cd

采用典范对应分析,将样本与环境因子在同一个二维图上反映出来,可以直观地看出群落分布、物种分布与环境变量之间的关系。环境因子用箭头表示,

箭头所处的象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性,箭头连接长度代表该环境因子与样本分布相关程度的大小,而箭头连线间的夹角代表环境因子间的相关性大小^[15-16]。从图 2 可见,第 1 象限与 NO_3^- -N、pH 呈正相关,与 TN、 NH_4^+ -N、 $\text{NH}_4\text{OAC-K}$ 、SOM 呈负相关;第 2 象限与 EC、Olsen-P 表现为正相关;第 3 象限与 TN、 NH_4^+ -N、 $\text{NH}_4\text{OAC-K}$ 、SOM 表现出正相关,与 NO_3^- -N、pH 为负相关;第 4 象限与 EC、Olsen-P 为负相关。其中,SOM 与 NO_3^- -N、EC 与 Olsen-P 之间两两距离较近,说明在不同固氮菌群落分布的影响下,这两组土壤环境因子两两之间的变异情况较为相似。从箭头的连线长度可以看出影响土壤固氮菌群落的重要环境因子依次为 SOM、 NH_4^+ -N、Olsen-P>TN>pH> $\text{NH}_4\text{OAC-K}$ >EC> NO_3^- -N。

表 4 CCA 排序图特征值及群落多样性与环境的典型相关分析
Table 4 Eigenvalues of CCA ordination diagram and correlations between special axes and environmental axes

因子	排序轴 1	排序轴 2	排序轴 3	排序轴 4
特征值	0.343	0.243	0.209	0.118
种群与环境的相关性	0.983	0.946	0.971	0.889
种群变化累计比例(%)	24.3	41.6	56.4	64.8
种群与环境关系的变化累计比例(%)	31.3	53.6	72.7	83.5

3 讨论

固氮菌是一类植物根际促生细菌,不仅具有固

氮、溶磷、解钾等作用,还能分泌植物生长激素、抗生素类物质,促进植物生长,在维持农田生态系统健康稳定、物质转换和能量流动等方面发挥着重

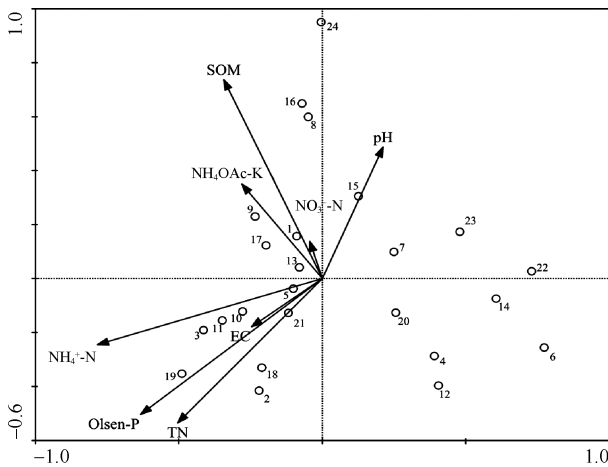


图 2 固氮菌多样性与土壤环境因子的 CCA 二维排序图
Fig. 2 Two dimensional ordination diagram of CCA of nitrogen microbial diversity and environmental variables

要作用^[17-18]。作为生态系统中一类重要的功能菌群，固氮菌的分布特征和数量通常与土壤氮、碳循环密切相关，直接影响土壤肥力。Poly 等^[19-20]借助 RFLP-PCR 技术研究了植被覆盖、土壤的管理制度以及土壤理化性质对 *nifH* 基因群落结构的影响，通过主成分分析发现管理制度是影响土壤 *nifH* 基因多样性的主因，理化性质和植被覆盖的影响次之。Bannert 等^[22]运用定量 PCR 和 T-RFLP 技术研究了浙江慈溪地区潮滩湿地与水稻田土壤固氮菌数量和结构的多样性差异，结果表明，土壤 pH 的改变使得 50 a 稻龄水稻田的固氮菌数量比潮滩湿地大大增加。

尽管固氮菌在不同生境中的群落结构及其多样性成为近年来国际上的研究热点，但在滩涂绿肥-水稻轮作这一特殊生境中固氮菌的相关研究还未见报道，对滩涂土壤绿肥-水稻轮作改良过程中固氮菌的分布和变化特征了解甚少，对其适应和响应机制的研究尚有待深入。本研究以滩涂土壤为研究对象，分析了滩涂紫云英-水稻轮作这一特殊生境中土壤剖面理化性质、固氮菌群落结构的变化及它们之间的关系，初步探讨了固氮菌群落在紫云英-水稻轮作过程中对滩涂土壤改良所起到的作用。研究结果表明，经过 4 年的连续紫云英-水稻轮作改良，土壤的理化性质得到了一定的提高，土壤的有机质含量增加、电导率和 pH 降低。受土壤理化性质改善的影响，土壤固氮菌群落也有了积极的响应，生物量及多样性增加，能够促进土壤氮素循环、活化土壤养分、提高土壤肥力和营养元素有效性，确保作物健康生长。因此，在固氮菌的根际促生调节功能下，通过紫云英-水稻轮作，土壤环境得到明显的改良，而土质的改良又能稳定固氮菌的群落结构，提高土壤-作物-微生物之间的协同

互作用。

已有对不同生态系统土壤中固氮菌群落结构组成的研究显示，环境因子和种植制度对固氮菌群落结构存在影响。相关研究表明通过种植绿肥来改良滩涂，可以疏松土壤，减轻板结，增强土壤透水透气性，减少表面土壤的积盐，功能微生物的根际活动可以激活土壤中 CaCO_3 并加速其溶解，从而改善土壤理化性质并加速土壤脱盐^[23-24]。紫云英-水稻轮作由于改良措施成本低、对环境扰动小、改良效果显著的特征而被广泛应用于滩涂盐碱地生态修复工程中。在本研究中，不同轮作方式对滩涂土壤环境有着不同的改良效果，对比水稻-休闲方式，水稻-紫云英轮作对 10~20 cm 土壤剖面中电导率、pH、固氮菌群落的改善作用最为显著。两种轮作方式下，土壤固氮菌群落结构受环境因子变化的影响有较大差异，不同土壤剖面深度的固氮菌群落结构也因受环境因子影响不同而存在差异。对土壤固氮菌群落影响较大的主要环境因子为有机质、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和有效磷。

4 结论

1) 滩涂改良过程中土壤理化性质变化规律存在着一定差异。其中，总氮和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的相关性最高，与 pH、有效磷的相关性次之；EC 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、有效磷之间的相关性较高；pH 与速效钾的典型相关性高于其他土壤环境因子。

2) 水稻-紫云英轮作的土壤固氮菌丰富度指数高于水稻-休闲，采用水稻-紫云英轮作方式更能提高滩涂土壤 0~10 cm 和 10~20 cm 剖面中固氮菌的 Shannon-Weaver 多样性指数及其均匀度。

3) 典范对应分析表明，水稻-紫云英轮作方式与水稻-休闲方式下，滩涂土壤固氮菌群落结构受环境因子变化的影响有较大差异，对土壤固氮菌群落影响较大的主要环境因子为有机质、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和有效磷。

参考文献：

- [1] 王雨濛, 吴娟, 张安录. 我国耕地资源问题与实现有效保护的耕地补偿机制探讨[J]. 农业现代化研究, 2010, 31(1): 29-33
- [2] 周健民. 我国耕地资源保护与地力提升[J]. 中国科学院院刊, 2013, 28(2): 263, 269-273
- [3] 姚荣江, 杨劲松, 陈小兵, 等. 苏北海涂围垦区耕层土壤养分分级及其模糊综合评价[J]. 中国土壤与肥料, 2009(4): 16-20
- [4] 万建华, 徐悦, 张莉莉, 等. 滨海盐碱土资源化利用的新探索与研究[J]. 国土与自然资源研究, 2011(5): 53-55

- [5] Cao W, Wong M. Current status of coastal zone issues and management in China: A review[J]. *Environment International*, 2007, 33(7): 985–992
- [6] Wang F, Wall G. Mudflat development in Jiangsu Province, China: Practices and experiences[J]. *Ocean and Coastal Management*, 2010, 53(11): 691–699
- [7] 金海洋. 不同农艺措施对浦东滨海滩涂垦区土壤熟化的影响[J]. *上海农业学报*, 2012, 28(4): 93–96
- [8] 肖克飏, 吴普特, 雷金银, 等. 不同类型耐盐植物对盐碱土生物改良研究[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 31(12): 2433–2440
- [9] 曹艳花. 长期豆科绿肥轮作水稻根内生细菌多样性及促生功能研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012: 66–69
- [10] Gao S J, Zhang R G, Cao W D, et al. Long-term rice-rice-green manure rotation changing the microbial communities in typical red paddy soil in South China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(12): 2512–2520
- [11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 22–24
- [12] 刘骁蓓, 涂仕华, 孙锡发, 等. 秸秆还田与施肥对稻田土壤微生物生物量及固氮菌群落结构的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(17): 5210–5218
- [13] 宋延静, 张晓黎, 龚骏. 添加生物质炭对滨海盐碱土固氮菌丰度及群落结构的影响[J]. *生态学杂志*, 2014, 33(8): 2168–2175
- [14] 陈熙, 刘以珍, 李金前, 等. 稀土尾矿土壤细菌群落结构对植被修复的响应[J]. *生态学报*, 2016, 36(13): 3943–3950
- [15] 杨思存, 逢焕成, 王成宝, 等. 基于典范对应分析的甘肃引黄灌区土壤盐渍化特征研究[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(1): 100–110
- [16] 赵秀芳, 杨劲松, 姚荣江. 基于典范对应分析的苏北滩涂土壤春季盐渍化特征研究[J]. *土壤学报*, 2010, 47(3): 422–428
- [17] Franche C, Linderstrom K, Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with legumes and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 2009, 321: 35–59
- [18] Wardle D A, Bardgett R D, Klironomos J N, et al. Ecological linkages between above ground and below ground biota[J]. *Science*, 2004, 304(5677): 1629–1633
- [19] Poly F, Monrozier L J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil[J]. *Research in microbiology*, 2001, 152: 95–103
- [20] Poly F, Ranjard L, Nazarel S, et al. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2255–2262
- [21] 李刚, 王丽娟, 李玉洁, 等. 呼伦贝尔沙地不同植被恢复模式对土壤固氮微生物多样性的影响[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(6): 1639–1646
- [22] Bannert A, Kleineidam K, Wissing L, et al. Changes in diversity and functional gene abundances of microbial communities involved in nitrogen fixation, nitrification, and denitrification in a tidal wetland versus paddy soils cultivated for different time periods[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(17): 6109–6116
- [23] Mårtensson L, Díez B, Wartiaainen I, et al. Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a nice paddy field in Fujian, China[J]. *Plant and Soil*, 2009, 325(2): 207–218
- [24] Zhang X L, Li X, Zhang C, et al. Responses of soil nitrogen-fixing, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacterial communities to long-term chlorimuron-ethyl stress in a continuously cropped soybean field in Northeast China[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(4): 1619–1627

Canonical Correspondence Analysis of Relationship Between Characteristics of Nitrogen-fixing Microbes Community and Environmental Factors in Mudflat Soil

CAI Shumei^{1,2,3}, XU Sixin^{1,2,3}, ZHANG Hanlin^{1,2,3}, ZHANG Deshan^{1,2,3},
LV Weiguang^{1,2,3}, GU Fujia⁴, ZHU Haitao^{1,2,3*}

(1 Institute of Eco-Environment and Plant Protection, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201403, China; 2 Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201403, China; 3 Shanghai Scientific Observation and Experimental Station for Agricultural Environment and Land Conservation, Shanghai 201403, China; 4 Shennong (Shanghai) Ecological Agriculture Development Co. Ltd., Shanghai 202150, China)

Abstract: In order to study the characteristics of soil nitrogen-fixing microbial communities, an experiment of rice-*astragalus smicus* rotation was conducted for 4 consecutive years in mudflat soil, *nifH* gene abundance and community diversity in different depth of profile (0–10, 10–20, 20–40 and 40–80 cm) were investigated by PCR-DGGE, and canonical correspondence analysis (CCA) was used to study the correlation between nitrogen-fixing microbes and environmental factors. The results showed that rice-*astragalus smicus* rotation increased the richness and diversity indexes of nitrogen-fixing microbes in mudflat soil. The abundance and diversity indexes of nitrogen-fixing microbes were the highest in 10–20 cm soil under rice-*astragalus smicus* rotation and was the lowest in 40–80 cm soil under rice-fallow rotation, with Shannon-Weaver diversity indexes of 3.18 and 1.51, respectively. High correlations were observed between soil total nitrogen and ammonium nitrogen, EC and available P, pH and available K. CCA ordination analysis indicated that soil organic matter, ammonium nitrogen and available phosphorus were the main factors affecting nitrogen-fixing microbial communities in mudflat soil.

Key words: Mudflat soil, *nifH* Gene, PCR-DGGE, Canonical correspondence analysis