长期施用氮肥对水稻土亚硝酸还原酶基因多样性的 影响

罗希茜^{1,2},陈哲^{1,4},胡荣桂²,吴敏娜^{1,3},秦红灵^{1,3},魏文学^{1,3}

(1.中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态过程重点实验室,长沙 410125,2 华中农业大学资源与环境学院, 武汉 430070,3 桃源农业生态试验站,长沙 410125,4 中国科学院研究生院,北京 100049)

摘要: 以中国科学院桃源农业生态试验站长期定位试验的土壤样品为对象,采用 PCR 扩增、克隆测序等分子生物学技术,研究 长期施氮肥对水稻土亚硝酸还原酶基因 niK、nirS 多样性的影响. 序列分析结果表明,从水稻土中克隆的系列 niK 基因片段与 NCBI数据库中未知菌种的 niK 基因相似性较高,平均达 90.7%;而 niS 基因片段与数据库中已知的 niS 基因相似度低,平均 74.7%.通过 Chao1估计值预测, niK 基因在不施肥处理 (CK)、施氮肥处理 (N)中分别有 58±13和 49±9个不同的 OTUs,而 niS 基因在 CK 处理、N 处理中分别有 49±10和 132±43个不同的 OTUs Chao1预测曲线 95% 置信区间 (95% Cb)显示,氮肥 施用显著提高了 niS 基因的多样性,而对 niK 基因多样性则无显著影响. LBSHUFF分析比较 N、CK 处理克隆文库间的差异, 结果显示 niK 基因处理间群落结构差异 p < 0.022,达到显著水平;而 niS 基因处理间的群落结构无显著差异.系统发育分析 显示, niK、niS 基因的系统发育树分别可分为 3个及 4个大簇. 施用氮肥导致 niK、niS 克隆有不同程度的聚集,说明氮肥改 变了 niK 和 niS 基因群落结构,其中氮肥对 niK 基因群落结构的影响更大. 总体来说,氮肥的施用对水稻土 niK 基因群落多 样性无显著影响,但明显提高 niS 基因群落的多样性;而长期施氮肥使含 niK 基因的反硝化菌群落结构发生显著变化,对 niS 基因群落结构则无显著影响.

关键词: 氮肥; 水稻土; 反硝化; niK; niS; 多样性 中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010) 02-0423-08

Effect of Long-term Fertilization on the Diversity of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) in Paddy Soil

LUO X i q in^{1, 2}, CHEN Zhe^{1, 4}, HU Rong-gu², WU M in-na^{1, 3}, Q N H ong-ling^{1, 3}, WE IW en-xue^{1, 3}

(1. Key Laboratory for Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China 2. College of Resources and Environment Huazhong Agricultural University, W uhan 430070, China 3. Taoyuan Station for Agro-ecosystem Research, Changsha 410125, China 4. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract In order to investigate the effects of long-term application of nitrogen fertilizer on soil denitrifying communities the diversities of *nir* genes (*nirK* and *nirS*) were studied using molecular approaches in the long-term paddy field experiment (started in 1990) located in Taoyuan Analysis of clone sequences indicated that the *nirK* fragments from paddy soil showed close similarity (90, 7%) to the *nirK* sequences registered in GenBank database, but were not related to any known strain W hereas most of the *nirS* clones showed low similarity (74, 7%) to the *nirS* gene fragments registered in GenBank. The Chaol estimates showed that the diversity of *nirK* gene community appeared to be higher in CK treatment [(58 ± 13) OTUs] than in N treatment[(49 ± 9) OTUs], but the difference was not significant. However, application of nitrogen fertilizer resulted in significant difference of *nirS*-community compared to CK. N itrogen fertilizer had obvious effect on the community structure of *nirK*-denitrifiers (p < 0.022), but the *nirS*-containing community was not affected. Based on phylogenetic analysis, *nirK* clones grouped into three clusters with aggregations of some OTUs cloned from N treatment A lthough *nirS* clones grouped into four clusters, the majority of the clones were attributed in one cluster. The results suggested that application of nitrogen fertilizer had a greater influence on the diversity of *nirS*-containing bacterial community than that of the *nirK*. However, the community structure of *nirK*-containing denitrifiers was more sensitive to nitrogen fertilization than that of the *nirS*.

Keywords nitrogen fertilizer, paddy soil, den itrification; niuK; niuS; diversity

作者简介: 罗希茜 (1985~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤分子生态, E-m ail ciciluox ix@ 163 com

收稿日期: 2009-04-02,修订日期: 2009-05-18

基金项目: 中国科学院知识创新工程"百人计划"项目 (KZCX 2-YW-BR-01); 国家自 然科学基金项目 (40771115); "十一五"国家科技支撑计划

^{*} 通讯联系人, E-mail wenxuewe@ isa ac en © 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

氧化亚氮 (N₂O)作为仅次于 CO₂ 和 CH₄ 的管 制温室气体,产生的温室效应已经引起人们的广泛 关注. 据估算,75% 的 N₂O 来自于人类生产食物的 过程,其中有 36% 来自于施用合成氮肥的农田^[1], 而一大部分是由土壤微生物主导的硝化、反硝化作 用所产生的. 水稻田在非淹水条件下,主要为硝化作 用,淹水条件下则以反硝化作用为主^[2].

反硝化过程是微生物在少量氧或微量氧存在的 条件下, 以氮氧化物 NO₃⁻ 作为电子受体, 将其还原 为气态 N₂的过程, 是土壤氮损失的一个重要机制, 在氮循环中起着非常重要的作用^[3 4].土壤中能产 生含氮气体化合物的微生物有 3类: 异化反硝化细 菌、非反硝化发酵性细菌和真菌、自养型硝化细菌. 其中异化反硝化细菌是导致厌氧土壤氮素损失的主 要作用者^[5].

反硝化过程主要由 4种不同的酶主导: 硝酸盐 还原酶、亚硝酸还原酶、一氧化氮还原酶、氧化亚氮 还原酶.其中由亚硝酸还原酶诱导,将亚硝酸还原成 一氧化氮的反应,是区分反硝化菌和硝酸盐呼吸菌 的第一步,后者不会将硝酸还原成气体^[6].作为反 硝化过程中的关键酶,亚硝酸还原酶可以作为反硝 化菌的分子标记^[7]. 亚硝酸还原酶有 2种不同的结 构形态:其中一种酶由含铜基 (Cu-nir)的 niK 基因 编码,另一种由含有亚铁血红素 c和 d_i (cd_i-nir)的 nirS基因编码. Coyne等^[8]对反硝化菌中亚铁血红 素 cd₁及含铜的亚硝酸还原酶的分布进行了研究, 发现 Alcaligenes eutrophus, Bacillus azotoformans, Brady rhizobium japonicum, Corynebacterium nephridii, Rhizobium spp 这些细菌中含有含铜的亚硝酸还原 酶, 而 A qua sp ir il lum iterson ii, F lavo ba cter ium spp 、 P seudom on as fluorescens 有含亚铁血红素的亚硝酸还 原酶. nirS 编码的酶主要在 P seudom on as 菌株中占优 势,在不同菌株中分子量大小相似,形态结构相对保 守.而 nik 基因在许多亲缘关系较远的菌株中存 在,且分子量变化较大.这 2种基因在特定的菌株中 存在互斥的现象,但在一些菌种的不同菌株中分别 存在.

近年来,已有不少关于 niK 及 nirS 基因多样性的研究. Braker等^[7]发现普季特湾 (Puget Sound)沉积物中 nirS 基因的多样性高于华盛顿郊区 (Washington margin)沉积物中 nirK、nirS 基因的多样性. Sharma等^[9]发现 nirK 基因可顺利从豆科植物的根系土壤中扩增,且与数据库中已有 nirK 基因序列不同, 但没有扩增到 nirS 基因...而 Wolsing等^[10]观察

到施肥后耕地土壤中的 nik 基因反硝化菌群落结 构受到季节变化的影响. 目前,关于长期施肥对 nir 基因多样性影响的研究还不多,因此本研究主要探 讨长期施用氮肥对土壤 nir基因多样性的影响.

以传统的微生物分离培养方法来研究土壤微生物种群结构,会导致微生物多样性信息的严重丢失^[11].随着分子生物学技术的发展,使人们从分子水平更全面地认识土壤微生物多样性特征及变化成为可能.利用微生物分子生态学方法从桃源长期施肥定位实验点土壤样品中扩增 nik 及 nis 基因片段,通过分析 nir基因多样性及系统发育关系,研究长期单施氮肥对土壤反硝化群落的影响,以期为研究水稻土长期施肥对 N₂O 排放的影响提供依据.

1 材料与方法

11 供试土壤与施肥处理

供试土壤为第四纪红色粘土发育的水稻土,采 自始于 1990年的中国科学院桃源农业生态试验站 长期定位试验田. 试验设 2种施肥处理: 对照 (CK), 不施肥; 单施氮肥 (N), 施用尿素 406.6 kg /hm², 折合 纯 N 183 kg /hm². 每个处理设有 3个重复小区. 该试 验点从 1990年以来按上述施肥方法, 保持长期定量 施肥, 实行早稻-晚稻一年两季的种植制度. 2006年采 样时, 取土壤样品测其基本理化性质 (表 1).

表 1 桃源试验点土壤主要基本性质¹⁾

Tab	e	1	So	il	b as ic	properties	for	the	bn g- te m	experin e	ent
-----	---	---	----	----	---------	------------	-----	-----	------------------------------	-----------	-----

site in Taoyuan					
处	有机质 (铵态氮 (NH ¼ →N)	硝态氮 (NO3 -N)	μ	
理	/g• kg ^{− 1}	/mg• kg ⁻¹	/mg• kg ⁻¹	$({ m H}_2{ m O})$	
CK	31.26±1.96	3 35±0 91	0. 16 ±0. 02	5. 17 ±0 14	
Ν	34. 32±1. 78	$6 07 \pm 1 18^{*}$	3. 16 ±0. 2*	5. 17 ±0 18	
1)*	代表同一项数位	直差异显著 (p < 0	0.05)		

12 土壤样品采集及分析方法

于 2007年 3月采集各处理表层(0~ 20 m)土 样. 采样时每小区采 5点组成一个样, 混合均匀后, 迅速用锡箔纸包好装入布袋并置于液氮中, 运至实 验室, 经冷冻干燥机 (NEOCOOLE yan ato)干燥后, 在无菌碾钵中捣成粉末状,除去动植物残体等杂质, 装入无菌离心管中备用. 土壤 DNA 提取方法参考 SDS-G IFC-PEG法^[12-13].

13 简并引物设计

引物设计方法如下: 首先从 NCBI 数据库 (National Center for Biotechnology Information database, http://www.ncbinh.nih.gov/)中选择一 些已有的不同种类微生物的 *nit*K, *nirS* 基因氨基酸

31卷

序列,选择的微生物种类必须来自环境样品.本试验 选择了 16个 nik 基因和 19个 nik 基因的氨基酸 序列 (nik: YP 473141, AAB05880, 1, NP 435927, ABR 64876, BAA 02440, CAA 88564, NP_949481, YP_ 674799, NP_948645, YP_665890, YP_782977, YP 610634 YP 001167793 006006 YP 262569 YP 001372908: nirS: AAZ43111, P24040, CAM 74253, YP _42075& YP_313835, YP_15749& YP_84178& NP_ 24921Q AAG 34381, YP_986168, YP_286474, YP_ 585313, YP _ 286522, AAA93118, ZP _ 00967225, P72181、YP_423528、YP_299202、ZP_00053843). 利 用 ClustaW2 (http://www.ebiacuk/Tools/ clustalw/index hml)在线软件对这些序列进行比 对,找2段位置合适的保守氨基酸区域,分别用来设 计上游和下游引物. nik、nirS引物扩增的目的片段 长度分别为 540 bp和 710 bp 引物序列如下. niiKF: 5'-TTYGTSTAYCAYTGYGCVCC-3' nitKR: 5'-SCYTCGATVAGRTTRTGRTT-3' nirSF: 5'-TGCGYAARGG GCNACBGGCAA-3' nirSR₁: 5'-G CBACRCG SGGYTC SGGATG-3' nitSB₂: 5'-GCBACRCGSGGYTCSGGGTG-3' 1.4 nir基因片段的 PCR扩增

利用引物对 nikF-niKR nisF-nisR1和 nisFnirSR2别进行 nirK、nirS 基因片段扩增. PCR 反应体 系为 50 µL,其中含有 60 ng DNA 模板, 10 mmol/L 的 dNTP 2 µL, 10 µm ol/L的上下游 niK (nirS)基因 引物各 2 µL, 5 µL的 10 × buffer 2 U Taq (天根, 中 国). 采用"降落" PCR 扩增, 所用仪器为 Eppendorf Mastercycler(Model-5333). niK 基因扩增的具体条 件为: 95℃预变性 5 m in, 95℃ 30 s, 57℃ 45 s, 72℃ 1 m in, 3个循环;紧接着每 3个循环退火温度降低 2℃,直到退火温度为 49℃为止; 然后 47℃循环 25 次;最后 72℃延伸 10 m in 而 nirS 基因的扩增条件 为:95℃预变性 5 m in, 94℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min 3个循环: 接下来退火温度每 3个循环降低 1℃, 直到 54℃, 然后 53℃循环 22次; 最后 72℃延伸 10 m in PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后,利 用紫外投射仪 ModelM-26(UVP, USA)成像.

15 克隆测序

用试剂盒 (Wizard SV Gel and PCR clean-up Systems, Promega)回收目标片段,并根据说明,用 pGEM-T载体试剂盒(PromegaCom, USA)对回收的 目标片段克隆,转化到大肠杆菌(DH-5α)中^[14].挑 选白斑,用载体, pGEM-T特异性引物 M_13F和 M_13R 对克隆产物进行 PCR扩增,经电泳筛选有期望大小 片段的克隆.每个处理均大概选择 60~70个克隆, 送上海英骏生物技术有限公司广州分公司测序.

16 序列分析

将测序结果进行分析,筛选序列相似度 > 98% 的序列,将其看作同一可操作分类单元(operational taxonom ic unit OTU). 然后利用软件 Chastal X (1.83)和 MEGA (4.0)中的邻接法(Neighbor-Joining)分别建立 nik 和 nirS 基因的系统发育树, 进行系统发育分析.选择来自 Neisseria gonorrhoeae (accession na M97926)的 aniA 基因和 P. aerug inosa的 nitN gene (accession na D84475)分别 作为 nik 和 nirS 基因的外类群^[15].本研究提交的 所有 nir 基因序列在 GenBank 中的登录号为 FJ204477-FJ204532

17 克隆文库的数据分析

OTU 代表着克隆文库中不同的基因型, 根据这 些分析数据, 可计算库容及 Chao1指数. 基因文库库 容计算方法参考文献 [16] 的方法. 另外, 根据所有 测序的克隆数 中累计 的不同 OTUs 的个数, 用 EstimateS win7. 51软件计算 Chao1 估计量, 并绘制 预测曲线, 指示 nik 及 nis 基因在不同处理下的多 样性. 由于预测曲线为非正态分布, 利用对数转化来 计算 Chao1 估计量的 95% 置信区间 (95% Cls)^[17].

由不同施肥造成的基因文库遗传差异, 可通过 比较文库同源与异源的距离差值, 即 LIBSHUFF分 析方法(http://libshuff m h uga edu/) 来分析. LIBSHUFF方法比较2个基因文库间(X 与 Y)的差 异, 是通过比较同源覆盖曲线 $C_x(D)$ 与异源覆盖曲 线 $C_{xy}(D)$ 之间的差值 ΔC 来实现的.2个基因文库 越相似, 则 $C_x(D)$ 与 $C_{xy}(D)$ 值越接近, 即 ΔC 值越 小.LIBSHUFF分析结果得到的概率 a, 需通过公式 $p=1-(1-a)^{2(2-1)}$ 转换, p < 0.05则差异显著, p < 0.01则差异极显著^[18–19].

2 结果与分析

2.1 序列分析

通过分子生物学技术扩增和克隆长期不施肥和 单施氮肥处理土壤样品中的 niK、nis 基因片段,分 别挑选了 121个 nik 克隆和 139个 nis 克隆进行 测序.其中 95.8% 的 nik 克隆与 NCB I数据库中的 nik 基因序列片段相比呈较高的相似性 (表 2),达 80% ~ 95% (平均 90.7%),但这些序列均来源于未 知的微生物种类,无法判断本研究克隆到的 nik 基 因片段所属菌种. 而只有 74.8% 的 *nitS* 克隆与数据 库中 *nitS* 基因片段相似, 且相似度较低, 为 72% ~ 82% (平均 74.7%), 同样也不能判断这些 *nitS* 克隆 所属的细菌菌种.

表 2 不施肥和施氮肥处理中 n iK、nirS 基因片段 的多样性情况

Table 2 Diversity parameters from nucleotide analysis of

niK and *nirS* gene fragments cloned from CK and N treatments

而日	nu	ĸ	nırS	
坝日	CK	Ν	СК	Ν
测序的克隆数	60	61	53	66
与数据库中 nir基因相似的克隆数	58	58	52	52
可操作的分类单元 (OTU s)	31	32	30	32
库容 1%	66	69	65	52

2 2 基因克隆文库分析

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

页测的OTUs个数

(a) nirK基因

10

20

30

nirK基因测序克隆个数

40

通过分析库容及 Chao1曲线, 可判断所建立的 基因文库能否代表土壤中 nir基因多样性的情况. 当继续挑选克隆进行测序却没有新的 OTU 类型出 现, 也就是曲线达到平台区或库容接近于 1时, 基因 文库能很好地反映土壤样品中 nir基因的多样性情 况^[15,16].结果显示, *niK*、*niS*基因库容在不施肥与施氮肥的处理下,分别为 66%、69% 和 65%、52%, 且曲线接近平台期,说明本试验建立的克隆文库代 表了土壤样品中大多数含有 *niK*、*nirS*的反硝化菌.

由于其中 *nis* 基因 N 处理比 CK 处理的库容差 值较大,因此多样性指数分析方法不适合用于判断 *nis* 基因反硝化菌群落差异,而 Chao1 非参数估计 通过预测土壤中不同 OTUs个数,可反映出不同处 理 *nir* 基因多样性的差别.通过利用非指数的 Chao1 物种丰富度估计量,预测出 *nik* 基因在 CK 处理、N 处理中分别有 58 ±13和 49 ±9个不同的 OTU s *nir* 基因在 CK 处理、N 处理中分别有 49 ±10和 132 ± 43个不同的 OTU s 参考 Hughes等^[17]的分析方法, 利用对数转化方法计算 95% CIs 从 Chao1指数曲 线图可看出 (图 1,图中实线表示的为 CK 处理的 95% CIs 虚线为 N 处理的 95% CIs值), *nik* 基因 CK 与 N 处理相应的 95% CIs有重叠 [图 1(a)],处 理间无显著差异,而 *nirs* 基因 N 处理与 CK 处理的 群落多样性差异显著 [图 1(b)].





60

• CK

▲ N

50

Fig 1 Chaol estimates of *nik* and *nis* genes richness as a function of sample size

利用 LIBSHUFF 分析方法来测定各处理克隆文 库之间的差异,结果见表 3 与 CK 处理相比较, N 处 理的 nik 基因文库有显著变化 (p < 0.05),说明长期 施氮肥造成了含 nik 基因的反硝化菌群落结构的改 变. nirS 基因的情况则不同, CK、N 处理间比较,结果 无显著差异,说明氮肥对 nirS 基因群落结构无明显影 响.结合 Chao1分析推测,氮肥处理对 nik 基因反硝 化菌群落多样性无显著影响,但明显改变了群落的组 成结构;施氮肥显著提高了 nirS 基因反硝化菌群落多 样性,却对其群落组成无显著影响.

表 3 处理间克隆文库 LIBSHUFF分析

Table 3 LIBSHUFF analyses of the sequence compositions

of the clone libraries

CK-N	n iK	n irS	
LIBSHUFF (ΔC)	0. 257	0. 030	
显著性差异 (p) ¹⁾	0. 022	0. 661	

1)p < 0.05即达到显著差异

23 系统发育树分析

語了 nitS基因反硝化菌群落多 从土壤中克隆的不同 nitK 基因型可以分为 3 无显著影响. Academic Journal Electronic Publishing House. All Fights reserved. http://www.cnki.net

nikk 序列相似,但这些序列均出自未知的菌种,表明 本实验中含 nik 基因的未知菌种的微生物群落在 水稻土壤中占优势. 从不同处理的克隆分布情况来 看,施氮肥改变了土壤中 nik 基因的基因型.在 Cluster 1中,从CK处理中克隆的 nik 基因类型大 量聚集 (图 2 阴影区 A 与 B), 占总数的 71.1%, 而 施氮肥处理的 OTU s只有 28.9%, 这些克隆与其他 研究者从土壤中分离的一些克隆(登录号: DQ 78 3999 EU 790846) 有较高的相似度. 与 C luster 1 情况相反,在 Cluster 2中,施氮肥处理的 OTUs占 72%, CK 处理只占 28%, 且 N 处理的 OTU 大量聚 集(图 2阴影区 C). 根据 OTU s的聚集情况, 可将第 二大簇分为 3个亚簇,各亚簇分别与登录号为 EU 790832、AM 419513、AM 235286的土壤 nit 基因 克隆聚集.在 Cluster 3中,基本为 CK处理的 OTUs 只有一个 N 处理的 OTU 出现. 另外, CK 和 N 处理 分别有一个 OTU 落在这 3个簇外, 其中来自 N 处理 的克隆序列与 Nitrosom on as sp. TA-921 + NH4 (登录 号: AF339049)遗传相似度较高, 来自 CK 处理的克 隆则与 Rhodop seudom on as palustris (登录号: NC) 005296)聚集.

从 nirS 基因的系统发育树图 (图 3)上看,可将 从施氮肥与不施肥处理中分离的 nirS 基因型分为 4 个簇.其中大部分 OTU s 落在 Chuster 1中, CK 和 N 处理分别占 45% 和 55%.图 3 阴影区 A ~ C显示, 部分 N 处理的 OTU s聚集.在 Chuster 2中, CK, N 处 理的 OTU s分布均匀. N 处理的 OTU s在 Chster 3中 占绝对优势,达 71%, CK 处理只占 29%. CK 和 N 处理 中各 有一个 OTU 与 *Thibacillus denitrificans* 25259(登录号: NC_007404)聚集形成 Chster 4

总体来看,系统发育分析显示氮肥并未导致 nirS基因文库中序列同源性的较大改变,来自 2个 文库的 nirS基因序列高度同源;而氮肥则导致了 nirK基因群落结构的较大改变,CK或N克隆文库 中的序列均有聚集,且与GenBank中的一些已知序 列亲缘关系较近.这与LIBSHUFF分析结果一致,氮 肥对 nirK基因群落结构的影响大于 nirS基因.

3 讨论

W and ²⁰第一次尝试设计了检测 *nirS* 基因的 PCR 引物,但只用了 3个不同种的序列来设计引物. 1998年, B raker等^[21] 也设计了引物来扩增 *niK* 和 *nirS* 基因,其后又有许多学者参与了修改和设 计^[4 22 23] 最然目前已经有许多扩增 *niK*, *nirS* 基因







的引物,但大多数都是以纯培养菌株或有限的环境 样品 nir序列为基础设计的.关于验证和比较这些 引物对扩增 niK、nis 基因的研究也有不少,结果显 示这些引物不能从某些菌种中扩增出 niK 或 nir 基因片段^[34-26]本试验为了尽量扩增更多土壤中存

	64.FJ204611 (N)		7		
	E1204596 (CK)				
	E1204596 (CK/N)				
	FJ204380 (CK/N)				
	FJ204603 (CK)				
	FJ204587 (CK)				
	FJ204620 (N)				
	81 FJ204599 (CK)				
	FJ204602 (CK)				
	FJ204593 (CK)				
	(FJ204610 (N)				
	95 FJ204631 (N)				
	F1204614 (N)	Α			
	F1204613 (N)				
	F1204605 (CV)				
	F1204005 (CK)				
	99 FJ204697 (CK)				
	72'FJ204615 (N)				
	88 ₁ FJ204592 (CK)				
	92 FJ204532 (N)				
	⁵³ FJ204628 (N)	в		Clster 1	
	⁶² FJ204618 (N)	р			
	FJ204624 (N)				
	FJ204606 (CK)				
	FJ204619 (N)				
	1089 FJ204591 (CK)				
	87 FJ204626 (N)				
	88 57 F I 204608 (CK)				
	E1204629 (NI)				
	65 F1204633 (N)				
	E1204625 (N)	C			
	FJ204033 (N)	C			
	FJ204022 (IV)				
	88 62 FJ204012 (N)				
	76 FJ204027 (N)				
	FJ204607 (CK)				
	FJ204604 (CK/N)				
	FJ204594 (CK)				
	FJ204589 (CK)				
	FJ204609 (CK/N)				
	FJ204625 (N)	1			
	FJ204601 (CK)	1	lator		
	75 FJ204588 (CK)	Ľ	Ister	2	
	FJ204590 (CK/N)				
	-FJ204617 (N)	1			
	50 F1204600 (CK	۰ I			
	98 FI204634 (N)	'			
	92		Clet	er 3	
			0131	 5	
	72 95 $[13204021 (N)]$				
	99 ^{FJ204025} (N)				
1	66'FJ204630 (N)				
	Suicibacter pome	erc	yı D	55-3 [NC_006569]	
	Thiobacillus denitrific	an	s ATC	C25259 [NC_007404]	01
	80FJ204595 (CK)				Clster
	99∟FJ204616 (N)				
	— Magnetospirillum magn	eti	cum	AMB-1 [NC_00762	ρ]
	nirN_Pseudom	n	nas a	$\rho m \sigma m \sigma s \sigma = 1 \times 44'/5$	

图 3 nirS基因序列系统发育树



在的不同种类的反硝化菌,从 NCBI数据库中挑选 了 16个来自 9个不同属的 nik 基因序列及 19个源 自 8个不同属的 nirS基因序列,以此为基础分别设 计简并引物.而且挑选的菌种都是在土壤中普遍存 在,使引物的针对性更强.由于现在 GenBank数据 库中新所发布的 nir基因序列已增加近 100倍,因此 引物位点的变异性比前人设计的更大^[26].本试验 nirS基因的下游引物序列简并度过高, > 100,为了 降低其简并度提高其扩增的专一性,将下游引物拆 分成 2条.将其中的简并碱基 R分成 A和 G, 2条 引物仅一个位点的碱基有所不同.

施肥具有增加作物产量的作用,由于其经济效 益的诱惑,导致投入到农田的化学肥料量有明显的 递增趋势,其中氮肥的过量投入带来了严重的环境 污染和对人体的危害,这种现象在我国尤其明显,特 别是硝酸盐的积累与转化, 如硝酸盐在蔬菜等植物 体内超标积累,污染地下水,造成湖泊水体富营养 化,以及在转化过程中产生的各种含氮气体加剧了 温室效应^[27,28].亚硝酸还原酶在氮素循环中起着重 要作用^[21],研究施氮肥对亚硝酸还原酶 nir基因多 样性的影响,可为探讨施肥对水稻土氮素循环利用 机制及反硝化作用提供有力的依据,进而有助于提 高氮肥利用率,利于开展温室气体减排的研究.本试 验结果显示,水稻土经过 16 a 连续施用氮肥后, niK、n iS 基因反硝化菌的多样性出现了不同的变 化. 氮肥处理使含 nik 基因的反硝化菌在施氮肥后 多样性略有下降,显著提高了 nis 基因反硝化菌的 多样性. 有报道认为铵态氮肥等一些氮肥的施用可 能导致土壤 nH 值降低,从而影响微生物群落结 构^[29,30]. 桃源长期定位试验点所施氮肥为尿素, 从 所测土壤 HI值来看,施尿素并未导致土壤酸化.因 此,田值可能不是导致本实验中反硝化菌群落多样 性变化的主要因素.另有研究认为.土壤 C/N 是施 肥提高土壤微生物生物量以及反硝化速率的重要因 素之一^[29,31]. N 肥施用降低了土壤 C/N, 加速了土 壤原有有机碳的分解^[32],使得土壤微生物生长代谢 环境改变,可能影响微生物活性^[33]. 从供试土壤的 基本性状不难看出,长期施氮肥处理的有机质含量 与对照无明显差别,而土壤含氮量明显提高,C/N 下降.由此推测,反硝化菌多样性的变化可能与施氮 肥造成土壤 C/N的改变有关.

虽然 niK、nirS 基因的功能相似,但它们在环境 样品中的多样性却有差异.有许多研究发现,在不少 环境 样 品 中 nik 基 因 的 多 样 性 要 高 于 nirS^[9 10, 15, 24]. Chao1预测值的分析结果显示 nik 与 nirS 基因在未施肥的水稻土中的多样性略有差 别,分别为 58 和 49 个 OTU \$ 系统发育树也反映 nik 基因群落结构较 nirS 复杂.长期施用氮肥导致 部分菌株聚集,这种现象 nik 和 nirS 都有,可能是 由于不同菌株对环境变化的敏感度不一样.长期施 用氮肥对 nik 基因的 3 个大簇的构成都有影响,而 对 nirS基因的影响主要发生在第一簇. 总体来看, 氮肥的施用对 nik 基因群落多样性无显著影响, 但 对 nirS基因群落多样性有明显影响, 而 nik 群落组 成对氮肥的敏感度大于 nirS.

4 结论

(1)本研究设计的简并引物从水稻土中成功扩 增了亚硝酸还原酶基因片段,建立的克隆文库能较 好地反映土壤中含 *nik* 及 *nis* 基因的反硝化菌群 落的状况.

(2)长期施氮肥对水稻土中含 nir 基因反硝化 菌群落多样性的影响不一致. Chao1预测分析结果 显示,单施氮肥显著提高 nis 基因群落的多样性, 而对 nik 基因多样性的影响不显著.

(3) L IBSHUFF 及系统发育分析显示,长期单施 氮肥使 *nik* 基因群落结构发生明显变化,而对 *nis* 基因群落结构的影响不显著.

(4)综上所述,长期施氮肥促进了水稻土中含 nirS基因的反硝化菌多样性的增加,但对其群落结 构影响不大;相反,氮肥的施用对 nik 基因群落多 样性影响不显著,但明显改变其群落结构组成.要深 入探讨水稻土反硝化基因与 N₂O 排放的关系,还需 要明确上述反硝化基因的丰度和表达特征,以及分 离和鉴定土壤中的优势反硝化功能菌,为进一步开 展节氮减排打下坚实的基础.

参考文献:

 \bigcirc

- [1] Mosier A, Kroeze C, Nevison C, et al. Closing the global N₂O budget nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle-OECD / IPCC / IEA phase II development of IPCC guidelines for national greenhouse gas inventory methodology [J]. Nutr Cycl A groecosys 1998, 52 (2-3): 225–248
- [2] 刘杏认,董云社,齐玉春. 土壤 N₂O 排放研究进展 [J]. 地理 科学进展, 2005, **24**(6): 50-58
- [3] Parton W J Mosier A R, Ojin a D S, et al. Generalized model for N₂ and N₂O production from nitrification and denitrification
 [J]. G lobal Biogeochem C y, 1996, 10(3): 401-412
- [4] Henry S. Baudoin E, L pez-Guti rrez J C, et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by niK gene targeted real-time PCR[J]. JM icrobiol M eth. 2004, 59: 327-335.
- [5] Firestone M K. Biological denitrification[A]. In Stevenson F J (ed). Nitrogen in Agricultural Soils[C]. Agronom y Monograph No 22 ASA, CSSA & SSSA, Wisconsin: Madison, 1982 289-326.
- [6] Zum ftW G. Cell biology and molecular basis of denitrification
 [J]. Microbiol MolBiol R, 1997, 61(4): 533-616

denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities [J]. Appl Environ Microb, 2000, **66** (5): 2096–2104.

- [8] CoyneM S, Arunakumari A, Averill B A, et al. Immunobgical identification and distribution of dissimilatory heme cd₁ and nonheme copper nitrite reductase in denitrifying bacteria [J]. ApplEnviron Microh, 1989, 55 (11): 2924–2931.
- [9] Shama S, AnejaM K, Mayer J et al Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (niiK and nirS) in rhizospheres of grain legum es[J]. ApplEnviron Microb 2005, 71 (4): 2001–2007.
- [10] Wolsing M, Priene A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T– RFLP of *nir* gene fragments[J]. FEMS M icrobiol E col 2004, 48 (2): 261–271
- [11] Amann R J. Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation[J]. Microbiol Res 1995, 59(1): 143–169.
- [12] 杨建,洪葵.红树林土壤总 DNA不同提取方法比较研究[J].生物技术通报, 2006 (增刊): 366-371.
- [13] Porteous L A, Arm strong J I, Seidler R J et al. An effective method to extract DNA from environmental – samples for polymerase drain-reaction amplification and DNA fingerprint analysis[J]. CurrM icrobiol. 1994, 29 (5): 301–307.
- [14] Sam brook J. Russell D.W. Molecular Cloning A Laboratory Manual [M]. (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [15] Prim A, Braker G, Tiedje JM. Diversity of nitrite reductase (*niK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils[J]. ApplEnvironMicroh. 2002. 68(4): 1893–1900.
- [16] Stres B, Mahne I Avgu》tin G, et al. Nitrous oxide reductase (noZ) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils [J]. Appl Environ Microb, 2004, 70 (1): 301-309
- [17] Hughes JB, Hellmann JJ Richetts TH, et al Counting the uncoutable Statistical approaches to estimating microbial diversity[J]. ApplEnvironMicrob, 2001, 67(10): 4399-4406
- [18] Singleton D R, Furlong M A, Rathbun S L, et al. Quantitative comparisons of 16S rDNA gene sequences libraries from environmental samples [J]. A ppl Environ M icrob. 2001, 67. 4374–4376.
- [19] Stach JE M, Maklonado L A, Masson D G, et al. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments[J]. Appl Environ M icrob, 2003 69 6189–6200
- [20] W ard B B. Diversity of culturable denitrifying bacteria[J]. A rch M icrobiol. 1995, 163: 167-175.
- [21] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nitK* and *nitS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples [J]. ApplEnviron Microb, 1998, 64(10): 3769–3775
- [7] Braker G, Zhou J Z, W u L Y, et al Nitrite reductase genes [22] Michotey V, Mejean V, Bonin P. Comparison of methods for

(nink and nink), as functional markers to investigate diversity of quantification of cytochrome cd₁-denitrifying bacteria in marine 994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

samples[J]. ApplEnviron Microb, 2000, 66: 1564-1571.

- [23] Casciotti K L, W ard B B D issimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria[J]. Appl Environ Microh 2001, 67: 2213-2221.
- [24] Hallin S, Lindgren P E. PCR detection of genes encoding nitrile reductase in denitrifying bacteria [J]. Appl Environ M icrob, 1999, 65(4): 1652-1657.
- [25] R^Lsch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. ApplEnviron Microh. 2002. 68(8): 3818–3829.
- [26] Throb³/₄ck I N, Enwall K, Jarvis Å et al. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE [J]. FEMS M icrobiol E col 2004, 49 401–417.
- [27] 孙文涛, 肖千明, 朱洪国, 等. 试论氮肥施用对环境的影响 [J]. 杂粮作物, 2000, **20**(1): 38-41.
- [28] 张华勇,林先贵,李忠佩,等.单季不施氮肥对太仓水稻土的 微生物功能多样性的影响[J].土壤,2005 37(6):655-658

- [29] EnwallK, Philippot I, Hallin S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization [J]. Appl Environ Microb, 2005, 71 (12): 8335–8343.
- [30] EnwallK, Nyberg K, Bertilsson S, et al. Long-term in pact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil[J]. So il Biol Biochem, 2007, 39(1): 106-115
- [31] Goyal S ChanderK, MundraM C, et al Influence of inorganic fertilizers and organic amendments on soil organicmatter and soil microbial properties under tropical conditions [J]. Biol Fert Soils 1999, 29(2): 196-200.
- [32] 陈安磊,王凯荣,谢小立.施肥制度与养分循环对稻田土壤微
 生物生物量碳氮磷的影响[J].农业环境科学学报,2005 24
 (6):1094-1099
- [33] Perez C A, Hedin L O, Armesto J J Nitrogen mineralization in two unpolluted okl-growth forests of contrasting biodiversity and dynamics[J]. Ecosystems, 1998, 1(4): 361–373.