

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 *nirK*、*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 *nirK* 基因片段与 NCBI 数据库中未知菌种的 *nirK* 基因相似性较高,平均达 90.7% ;而 *nirS* 基因片段与数据库中已知的 *nirS* 基因相似度低,平均 74.7% 。通过 Chao1 估计值预测,*nirK* 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 *nirS* 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% CIs)显示,氮肥施用显著提高了 *nirS* 基因的多样性,而对 *nirK* 基因多样性则无显著影响。LIBSHUFF 分析比较 N、CK 处理克隆文库间的差异,结果显示 *nirK* 基因处理间群落结构差异 $p < 0.022$,达到显著水平,而 *nirS* 基因处理间的群落结构无显著差异。系统发育分析显示,*nirK*、*nirS* 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 *nirK*、*nirS* 克隆有不同程度的聚集,说明氮肥改变了 *nirK* 和 *nirS* 基因群落结构,其中氮肥对 *nirK* 基因群落结构的影响更大。总体来说,氮肥的施用对水稻土 *nirK* 基因群落多样性无显著影响,但明显提高 *nirS* 基因群落的多样性,而长期施氮肥使含 *nirK* 基因的反硝化菌群落结构发生显著变化,对 *nirS* 基因群落结构则无显著影响。

关键词 :氮肥 ;水稻土 ;反硝化 ;*nirK* ;*nirS* ;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 Xi-qian^{1,2}, CHEN Zhe^{1,4}, HU Rong-gui², WU Min-na^{1,3}, QIN Hong-ling^{1,3}, WEI Wen-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, Wuhan 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. Whereas, most of the *nirS* clones showed low similarity (74.7%) to the *nirS* gene fragments registered in GenBank. The Chao1 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. Nitrogen 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. Although *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*.

Key words :nitrogen fertilizer ; paddy soil ; denitrification ; *nirK* ; *nirS* ; diversity

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(KZCX2-YW-BR-01) ;国家自然科学基金项目(40771115) ;“十一·五”国家科技支撑计划重点项目(2008BADA7B07)

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-mail :xciluoxxi@163.com

* 通讯联系人, E-mail :wenxuewei@isa.ac.cn

氧化亚氮(N_2O)作为仅次于 CO_2 和 CH_4 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 N_2O 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 NO_3^- 作为电子受体,将其还原为气态 N_2 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 *nirK* 基因编码,另一种由含有亚铁血红素 c 和 d_1 ($\text{cd}_1\text{-nir}$)的 *nirS* 基因编码. Coyne 等^[8]对反硝化菌中亚铁血红素 cd_1 及含铜的亚硝酸还原酶的分布进行了研究,发现 *Alcaligenes eutrophus*、*Bacillus azotoformans*、*Bradyrhizobium japonicum*、*Corynebacterium nephridii*、*Rhizobium* spp. 这些细菌中含有含铜的亚硝酸还原酶,而 *Aquaspirillum itersonii*、*Flavobacterium* spp.、*Pseudomonas fluorescens* 有含亚铁血红素的亚硝酸还原酶.*nirS* 编码的酶主要在 *Pseudomonas* 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 *nirK* 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 *nirK* 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 *nirK* 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 *nirK* 及 *nirS* 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 N_2O 排放的影响提供依据.

1 材料与方法

1.1 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/hm^2 ,折合纯 N 183 kg/hm^2 .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⁾

Table 1 Soil basic properties for the long-term experiment site in Taoyuan

处 理	有机质 /g · kg ⁻¹	铵态氮($\text{NH}_4^+ \text{-N}$) /mg · kg ⁻¹	硝态氮($\text{NO}_3^- \text{-N}$) /mg · kg ⁻¹	pH (H_2O)
CK	31.26 ± 1.96	3.35 ± 0.91	0.16 ± 0.02	5.17 ± 0.14
N	34.32 ± 1.78	6.07 ± 1.18 *	3.16 ± 0.2 *	5.17 ± 0.18

1) * 代表同一项数值差异显著($p < 0.05$)

1.2 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 cm)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 yamato)干燥后,在无菌钵钵中捣成粉末状,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-GITC-PEG 法^[12,13].

1.3 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.ncbi.nlm.nih.gov/>)中选择一些已有的不同种类微生物的 *nirK*、*nirS* 基因氨基酸

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 *nirK* 基因和 19 个 *nirS* 基因的氨基酸序列(*nirK*:YP_473141、AAB05880.1、NP_435927、ABR64876、BAA02440、CAA88564、NP_949481、YP_674799、NP_948645、YP_665890、YP_782977、YP_610634、YP_001167793、Q06006、YP_262569、YP_001372908;*nirS*:AAZ43111、P24040、CAM74253、YP_420758、YP_313835、YP_157499、YP_841789、NP_249210、AAG34381、YP_986168、YP_286474、YP_585313、YP_286522、AAA93118、ZP_00967225、P72181、YP_423528、YP_299202、ZP_00053843).利用 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>)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.*nirK*、*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.

*nirK*F 5'-TTYGTSTAYCAYTGYGCVCC-3'

*nirK*R 5'-SCYTTCGATVAGRTTTRTGRTT-3'

*nirS*F 5'-TGCGYAARGGIGCNACBGGCAA-3'

*nirS*R₁ 5'-GCBACRCGSGGYTCSGGATG-3'

*nirS*R₂ 5'-GCBACRCGSGGYTCSGGGTG-3'

1.4 *nir* 基因片段的 PCR 扩增

利用引物对 *nirK*F-*nirK*R、*nirS*F-*nirS*R₁ 和 *nirS*F-*nirS*R₂ 别进行 *nirK*、*nirS* 基因片段扩增.PCR 反应体系为 50 μ L,其中含有 60 ng DNA 模板,10 mmol/L 的 dNTP 2 μ L,10 μ mol/L 的上下游 *nirK*(*nirS*)基因引物各 2 μ L,5 μ L 的 10 $\times$ buffer 2 U *Taq*(天根,中国).采用“降落”PCR 扩增,所用仪器为 Eppendorf Mastercycler(Model-5333).*nirK* 基因扩增的具体条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,3 个循环;紧接着每 3 个循环退火温度降低 2 $^{\circ}$ C,直到退火温度为 49 $^{\circ}$ C 为止;然后 47 $^{\circ}$ C 循环 25 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.而 *nirS* 基因的扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,3 个循环;接下来退火温度每 3 个循环降低 1 $^{\circ}$ C,直到 54 $^{\circ}$ C,然后 53 $^{\circ}$ C 循环 22 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后,利用紫外投射仪 Model M-26(UVP,USA)成像.

1.5 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(Promega Corp, USA)对回收的目标片段克隆,转化到大肠杆菌(DH-5 α)中^[14].挑选白斑,用载体 pGEM-T 特异性引物 M13F 和 M13R

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.

1.6 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 taxonomic unit, OTU).然后利用软件 Clustal X (1.83)和 MEGA (4.0)中的邻接法(Neighbor-Joining)分别建立 *nirK* 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 no. M97926)的 *aniA* 基因和 *P. aeruginosa* 的 *nirN* gene (accession no. D84475)分别作为 *nirK* 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.

1.7 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 *nirK* 及 *nirS* 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% CIs)^[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.mib.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 α ,需通过公式 $p = 1 - (1 - \alpha)^{2^{(2-1)}}$ 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 *nirK*、*nirS* 基因片段,分别挑选了 121 个 *nirK* 克隆和 139 个 *nirS* 克隆进行测序.其中 95.8% 的 *nirK* 克隆与 NCBI 数据库中的 *nirK* 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 *nirK* 基

因片段所属菌种. 而只有 74.8% 的 *nirS* 克隆与数据库中 *nirS* 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 *nirS* 克隆所属的细菌菌种.

表 2 不施肥和施氮肥处理中 *nirK*、*nirS* 基因片段的多样性情况

项目	<i>nirK</i>		<i>nirS</i>	
	CK	N	CK	N
测序的克隆数	60	61	53	66
与数据库中 <i>nir</i> 基因相似的克隆数	58	58	52	52
可操作的分类单元(OTUs)	31	32	30	32
库容/%	66	69	65	52

2.2 基因克隆文库分析

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, *nirK*、*nirS* 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 *nirK*、*nirS* 的反硝化菌.

由于其中 *nirS* 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 *nirS* 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 *nirK* 基因在 CK 处理、N 处理中分别有 58 ± 13 和 49 ± 9 个不同的 OTUs, *nirS* 基因在 CK 处理、N 处理中分别有 49 ± 10 和 132 ± 43 个不同的 OTUs. 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), *nirK* 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)].

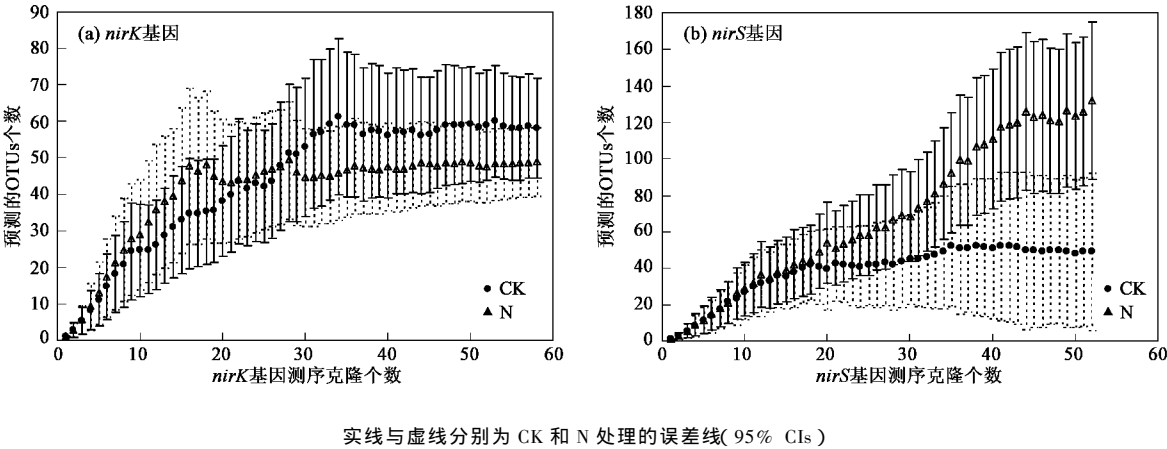


图 1 *nirK*、*nirS* 基因 Chao1 估计值曲线图

Fig. 1 Chao1 estimates of *nirK* and *nirS* 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 *nirK* 基因文库有显著变化 ($p < 0.05$), 说明长期施氮肥造成了含 *nirK* 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 *nirK* 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	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>
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

2.3 系统发育树分析

从土壤中克隆的不同 *nirK* 基因型可以分为 3 大簇, 见图 2. 大部分克隆序列与 GenBank 中已知的

nirK 序列相似,但这些序列均出自未知的菌种,表明本实验中含 *nirK* 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 *nirK* 基因的基因型。在 Cluster 1 中,从 CK 处理中克隆的 *nirK* 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 OTUs 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:DQ783999、EU790846)有较高的相似度。与 Cluster 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 OTUs 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 EU790832、AM419513、AM235286 的土壤 *nirK* 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 *Nitrosomonas* sp. TA-921i-NH₄(登录号:AF339049)遗传相似度较高,来自 CK 处理的克隆则与 *Rhodopseudomonas 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 OTUs 落在 Cluster 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 OTUs 聚集。在 Cluster 2 中,CK、N 处理的 OTUs 分布均匀。N 处理的 OTUs 在 Cluster 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 Cluster 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

Ward^[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,Braker 等^[21]也设计了引物来扩增 *nirK* 和 *nirS* 基因,其后又有许多学者参与了修改和设计^[4, 22, 23]。虽然目前已经有许多扩增 *nirK*、*nirS* 基因

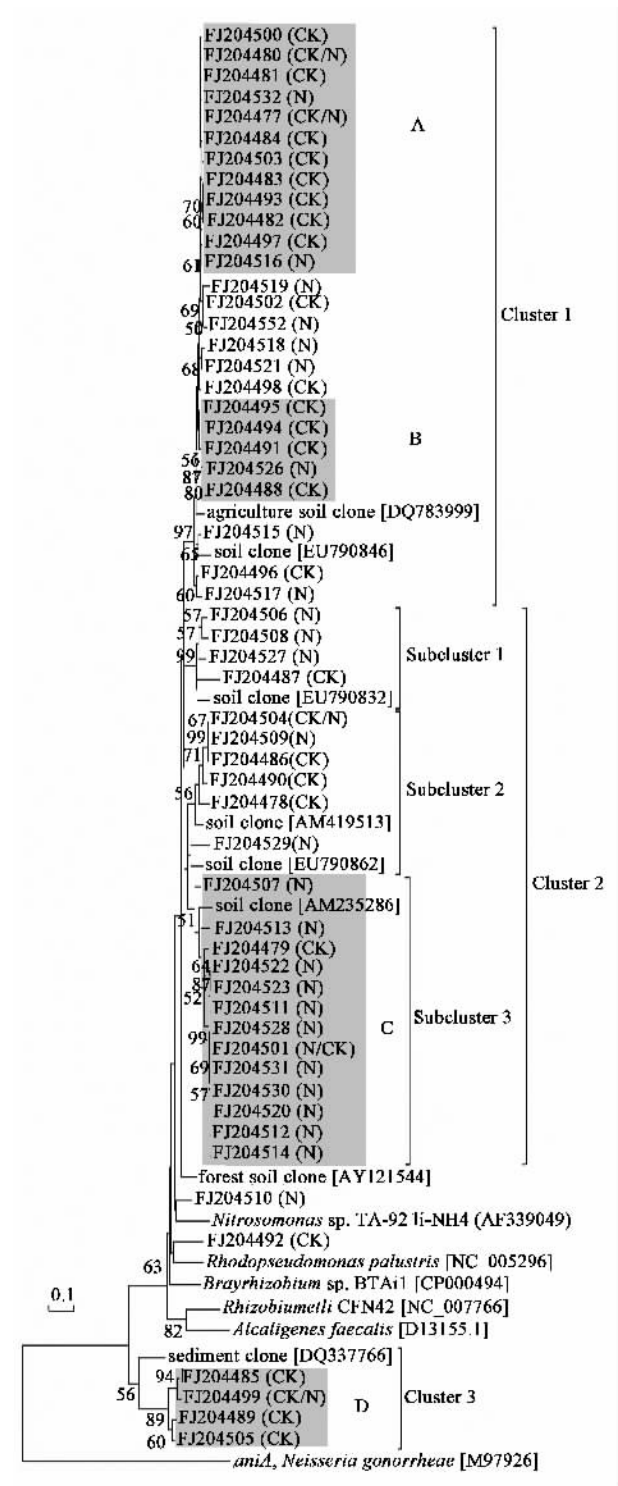


图 2 *nirK* 基因序列系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of *nirK* cloned sequences

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 *nirK*、*nirS* 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 *nirK* 或 *nirS* 基因片段^[24-26]。本试验为了尽量扩增更多土壤中存

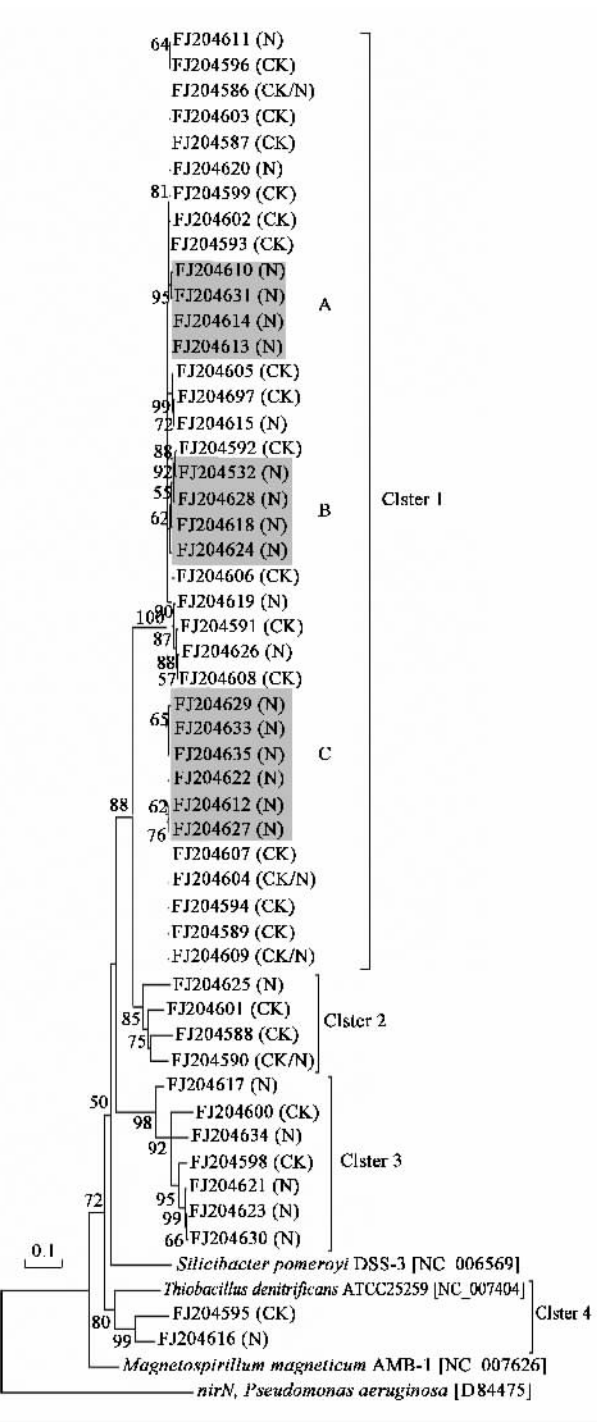


图3 *nirS* 基因序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *nirS* cloned sequences

在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*nirK*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 newly 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,*nirK*、*nirS*基因反硝化菌的多样性出现了不同的变化.氮肥处理使含*nirK*基因的反硝化菌在施氮肥后多样性略有下降,显著提高了*nirS*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pH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pH值来看,施尿素并未导致土壤酸化.因此,pH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*nirK*、*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*nirK*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*nirK*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OTUs,系统发育树也反映*nirK*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*nirK*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*nirK*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 *nirK* 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 *nirK* 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 *nirK* 及 *nirS* 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 *nirS* 基因群落的多样性 , 而对 *nirK* 基因多样性的影响不显著.

(3)LIBSHUFF 及系统发育分析显示 , 长期单施氮肥使 *nirK* 基因群落结构发生明显变化 , 而对 *nirS* 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 *nirK* 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 N_2O 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 :

[1] Mosier A , Kroeze C , Nevison C , *et al.* Closing the global N_2O 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 Agroecosys* , 1998 , **52**(2-3) : 225-248.

[2] 刘杏认 , 董云社 , 齐玉春. 土壤 N_2O 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 , Ojima D S , *et al.* Generalized model for N_2 and N_2O production from nitrification and denitrification [J]. *Global Biogeochem Cy* , 1996 , **10**(3) : 401-412.

[4] Henry S , Baudoin E , López-Gutiérrez J C , *et al.* Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR[J]. *J Microbiol Meth* , 2004 , **59** : 327-335.

[5] Firestone M K. Biological denitrification[A]. In : Stevenson F J (ed). *Nitrogen in Agricultural Soils*[C]. *Agronomy Monograph* No. 22 ASA , CSSA & SSSA , Wisconsin : Madison , 1982. 289-326.

[6] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification [J]. *Microbiol Mol Biol R* , 1997 , **61**(4) : 533-616.

[7] Braker G , Zhou J Z , Wu L Y , *et al.* Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of

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

[8] Coyne M S , Arunakumari A , Averill B A , *et al.* Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd₁ and nonheme copper nitrite reductase in denitrifying bacteria[J]. *Appl Environ Microb* , 1989 , **55**(11) : 2924-2931.

[9] Sharma S , Aneja M K , Mayer J , *et al.* Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes[J]. *Appl Environ Microb* , 2005 , **71**(4) : 2001-2007.

[10] Wolsing M , Prieme 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 Microbiol Ecol* , 2004 , **48**(2) : 261-271.

[11] Amann R I , 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 , Armstrong J L , Seidler R J , *et al.* An effective method to extract DNA from environmental - samples for polymerase chain-reaction amplification and DNA fingerprint analysis[J]. *Curr Microbiol* , 1994 , **29**(5) : 301-307.

[14] Sambrook J , Russell D W. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* [M]. (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2001.

[15] Priemé A , Braker G , Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils[J]. *Appl Environ Microb* , 2002 , **68**(4) : 1893-1900.

[16] Stres B , Mahne I , Avguštin G , *et al.* Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils[J]. *Appl Environ Microb* , 2004 , **70** (1) : 301-309.

[17] Hughes J B , Hellmann J J , Richetts T H , *et al.* Counting the uncouthable : Statistical approaches to estimating microbial diversity[J]. *Appl Environ Microb* , 2001 , **67**(10) : 3399-4406.

[18] Singleton D R , Furlong M A , Rathbun S L , *et al.* Quantitative comparisons of 16S rDNA gene sequences libraries from environmental samples[J]. *Appl Environ Microb* , 2001 , **67** : 4374-4376.

[19] Stach J E M , Maldonado L A , Masson D G , *et al.* Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments[J]. *Appl Environ Microb* , 2003 , **69** : 6189-6200.

[20] Ward B B. Diversity of culturable denitrifying bacteria[J]. *Arch Microbiol* , 1995 , **163** : 167-175.

[21] Braker G , Fesefeldt A , Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples [J]. *Appl Environ Microb* , 1998 , **64**(10) : 3769-3775.

[22] Michotey V , Mejean V , Bonin P. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd₁-denitrifying bacteria in marine

- samples[J]. Appl Environ Microb ,2000 ,**66** :1564-1571.
- [23] Casciotti K L , Ward B B. Dissimilatory nitrite reductase genes from autotrophic ammonia-oxidizing bacteria[J]. Appl Environ Microb ,2001 ,**67** :2213-2221.
- [24] Hallin S ,Lindgren P E. PCR detection of genes encoding nitrile reductase in denitrifying bacteria[J]. Appl Environ Microb , 1999 ,**65**(4) :1652-1657.
- [25] Rösch C , Mergel A , Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. Appl Environ Microb ,2002 ,**68**(8) 3818-3829.
- [26] Throbäck 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 Microbiol Ecol ,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] Enwall K , Philippot L , 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] Enwall K , Nyberg K , Bertilsson S , *et al.* Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil[J]. Soil Biol Biochem , 2007 ,**39**(1) :106-115.
- [31] Goyal S , Chander K , Mundra M C , *et al.* Influence of inorganic fertilizers and organic amendments on soil organic matter 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 old-growth forests of contrasting biodiversity and dynamics[J]. Ecosystems ,1998 ,**1**(4) 361-373.