

# $O_3$ 浓度升高对麦田土壤氨氧化细菌、氨氧化古菌和硝化细菌数量的影响

伍 文<sup>1,2</sup>, 黄益宗<sup>2\*</sup>, 李明顺<sup>1</sup>, 于方明<sup>1</sup>, 钟 敏<sup>2</sup>, 隋立华<sup>2</sup>, 郝晓伟<sup>2</sup>

(1.广西师范大学环境与资源学院, 广西 桂林 541004; 2.中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

**摘 要:**硝化作用在氮循环过程中至关重要,包括氨氧化作用和亚硝酸盐氧化作用,通过氨氧化反应和亚硝酸盐氧化反应将 N 素转化为植物可利用的  $NO_3^-$  形态。利用开顶式臭氧气室 (OTCs, open-top chambers) 试验平台,通过大田模拟熏气试验,结合 Real-time PCR 探讨大气  $O_3$  浓度升高对麦田土壤氨氧化细菌 (AOB)、氨氧化古菌 (AOA) 及硝化细菌 (NOB) 数量的影响。结果表明, AOB、AOA 和 NOB 对  $O_3$  胁迫的反应不一样, AOB 基因拷贝数基本上随着  $O_3$  浓度的升高呈现出降低的趋势, 而 AOA 和 NOB 基因拷贝数随  $O_3$  浓度的升高变化不明显。冬小麦拔节期, 当  $O_3$  浓度为 40、80、120  $nmol \cdot mol^{-1}$  时, 20~40 cm 土层的 AOB 基因拷贝数分别比对照处理降低 39.8%、51.2% 和 59.4%。AOB 和 NOB 基因拷贝数灌浆期多于收获期, 0~10 cm 土层多于 10~20 cm。AOA 基因拷贝数随季节的变化不大。 $O_3$  胁迫可通过影响 AOB、AOA 和 NOB 的数量和活性来影响土壤的硝化反应, 从而影响土壤的氮素循环过程。

**关键词:**  $O_3$  浓度升高; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 硝化细菌; 定量 PCR

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2012)03-0491-07

## Effects of Elevated Ozone on Quantity of Ammonium-oxidizing Bacteria, Ammonia-oxidizing Archaea and Nitrobacteria in Wheat Field Soil

WU Wen<sup>1,2</sup>, HUANG Yi-zong<sup>2\*</sup>, LI Ming-shun<sup>1</sup>, YU Fang-ming<sup>1</sup>, ZHONG Min<sup>2</sup>, SUI Li-hua<sup>2</sup>, HAO Xiao-wei<sup>2</sup>

(1.College of Environment and Resource, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2.Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** Nitrification is of vital importance in nitrogen cycle, including ammonoxidation and nitration processes. The nitrogen is transformed into  $NO_3^-$  form which is available for the plants through the ammonoxidation and nitration. The study aimed at the impact of near the surface  $O_3$  concentration on the quantities of ammonium-oxidizing bacteria (AOB), ammonium-oxidizing archaea (AOA) and nitrobacteria (NOB) by the real-time polymerase chain reaction (PCR), open-the top chambers (OTCs) and simulated-smoke experiment in the field. The results showed that the responses of AOB, AOA and NOB under the stress of  $O_3$  were different. The quantity of AOB gene copies had a trend of a decrease with the increase of  $O_3$  concentration, but the quantities of AOA and NOB gene copies were not changed significantly with the increase of  $O_3$  concentration. In the jointing stage of winter wheat, when  $O_3$  concentration were 40, 80 and 120  $nmol \cdot mol^{-1}$ , the quantities of AOB gene copies in 20~40 cm soil were respectively lower than the control group by 39.8%, 51.2% and 59.4%. The quantities of AOB and NOB gene copies in filling stage were more than those in the harvest time, and the quantities of AOB and NOB gene copies in 0~10 cm soil layer were more than those in 10~20 cm soil layer. The quantity of AOA gene copies had not changed significantly with the change of season. In summary, changes in the quantities and activities of AOB, AOA, NOB in response to different  $O_3$  concentrations provide a good indicator for investigating the nitrification, which can be used as indicator for the nitrogen cycling in soil.

**Keywords:** elevated  $O_3$  concentration; ammonium-oxidizing bacteria; ammonium-oxidizing archaea; nitrobacteria; real-time polymerase chain reaction

收稿日期: 2011-09-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (4071336); 国家环保公益性行业科研专项 (200809152)

作者简介: 伍 文 (1986—), 硕士生, 主要研究方向为农业生态保护。

\* 通讯作者: 黄益宗 E-mail: hyz@rcees.ac.cn

近几十年来,由于人类活动和工农业生产的迅猛发展导致近地层 O<sub>3</sub> 浓度日益增加,且污染范围和破坏程度均在增大,持续时间不断增长<sup>[1]</sup>。据报道,我国的京津唐地区、长江三角洲地区以及其他地区近地层 O<sub>3</sub> 浓度最高已达到 150 nmol·mol<sup>-1</sup> 以上<sup>[2]</sup>。O<sub>3</sub> 作为温室气体和光化学烟雾的主要成分,已成为人们重点研究的主要环境污染物之一。

生态系统中物质、能量的转化和平衡对其生产力和稳定性都至关重要,作为生物体结构组成物质并执行所有生物化学过程的氮元素的循环,在农业生产活动中起着十分重要的作用。包括氨氧化作用和亚硝酸盐氧化作用的硝化反应在氮循环过程中起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>,硝化反应是由微生物驱动的生物化学过程。氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)控制着硝化作用的第一步反应,即 NH<sub>3</sub> 氧化成 NH<sub>2</sub>OH,是硝酸盐形成的关键反应之一<sup>[4]</sup>。硝化细菌(NO<sub>3</sub>)在硝化作用过程中调控着 NO<sub>2</sub> 转化成 NO<sub>3</sub> 的关键环节<sup>[5]</sup>。因而土壤中上述 3 种微生物功能群的结构及其演变规律受到人们的广泛关注<sup>[6-10]</sup>。

小麦是我国基本的粮食作物之一,近地层 O<sub>3</sub> 浓度的增加已经严重影响到麦地生态系统<sup>[11-12]</sup>,包括对地上部分过程以及地下生物反应过程的影响<sup>[13-14]</sup>。目前人们只注重于研究 O<sub>3</sub> 对生态系统地上部分的影响,而对生态系统地下部分的影响研究较少。O<sub>3</sub> 对生态系统地下部分的影响效应比地上部分出现早,且其对地下生物过程影响有一个积累效应<sup>[15-17]</sup>,但 O<sub>3</sub> 对麦地生态系统土壤氮素循环影响的机制较少有报道。本文通过大田试验,结合开顶式气室实验手段和 Real-time PCR 技术探讨近地层 O<sub>3</sub> 浓度升高对冬小麦地土壤 AOB、AOA 和 NOB 数量的影响,为我国的大气 O<sub>3</sub> 污染防治管理以及保障粮食安全提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

实验地位于北京市昌平区种子管理站(40°12' N, 116°8' E)。该站位于北京市西北部,属暖温带大陆性季风气候,全年四季分明,年均降水量为 550.3 mm,雨量集中在 6—8 月,雨热同期,年均温为 11.8 °C,年均日照时数 2 684 h,无霜期为 200 d 左右。

### 1.2 试验材料

实验用作物为冬小麦,品种为北农 9549 (*Triticum aestivum* L. Beining 9549),由北京农学院提供。2009 年 9 月 28 日播种,2010 年 4 月 26 日追施尿

素(225 kg·hm<sup>-2</sup>)。整个生长期田间管理方式与当地保持一致。

### 1.3 试验设计

大田条件下建立开顶式气室进行模拟实验。开顶式气室模拟系统主要由框架和室壁构成的气室、通风系统、过滤系统、O<sub>3</sub> 发生系统、O<sub>3</sub> 浓度控制系统、O<sub>3</sub> 浓度自动采集监测系统等组成。开顶式气室主体为正八面柱体,底边长 1.0 m、总高 2.7 m,覆盖面积约为 4.8 m<sup>2</sup>。气室框架由钢筋构成,室壁材质为聚乙烯塑料膜。系统内 O<sub>3</sub> 通过医用纯氧(99.5%)经 O<sub>3</sub> 发生器(SK-CFG-3,济南)高压放电作用产生。通过质量流量计(GFC17, Aalborg Industries, Inc., Carson, CA)和组态王工控软件(MCGS 6.2, 北京)调节 O<sub>2</sub> 流量,进而控制系统内 O<sub>3</sub> 浓度。箱内和自然大气 O<sub>3</sub> 浓度通过 2 台 O<sub>3</sub> 分析仪(Model 49c, Thermo Electron Co., Franklin, MA)进行连续监测。

O<sub>3</sub> 浓度设 4 个处理:不熏 O<sub>3</sub>(CK)、40、80、120 nmol·mol<sup>-1</sup> O<sub>3</sub>。每个处理 3 次重复。实验从 2010 年 4 月 5 日开始熏气,每日熏气 9 h(8:00—17:00),6 月 12 日停止熏气,共熏气 50 d。

### 1.4 样品采集和分析

分别在 2010 年 4 月 30 日(拔节期)、6 月 22 日(灌浆期)和 12 月 13 日(收获期)采集土壤样品。在每个气室中用直径 2 cm 的土钻分别采集 0~10、10~20 cm 和 20~40 cm 深度的新鲜土壤,每个土样均由 5 个不同点的样品混合而成,样品装入自封袋后带回实验室用于测定土壤 AOB、AOA 和 NOB 的数量。

所有土壤样品均采用 FastDNA SPIN Kit (Bio 101, Inc., USA)试剂盒提取其总 DNA,提取过程按说明书进行;用 ND-1000 Spectrophotometer(Nanodrop)分析所提取 DNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值,保证所提取 DNA 的质量;用 Eppendorf PCR 仪进行 PCR 预实验,摸索各基因的反应条件和反应体系;Real-time PCR 反应在型号为 iQ5 (Bio-rad, USA)的定量 PCR 仪上运行,测定各基因的基因拷贝数;所有扩增反应均采用 SYBR<sup>(R)</sup>Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa, Biotechnology)试剂盒进行,反应条件和引物浓度参见表 1。

### 1.5 数据处理

土壤中 AOB、AOA 和 NOB 数量动态可分别从其基因拷贝数变化反映出来<sup>[21-23]</sup>,通过研究这 3 类细菌基因拷贝数变化来探讨 O<sub>3</sub> 对土壤硝化作用的影响。用 SPSS 11.5 对数据进行统计分析。采用 O<sub>3</sub> 浓度为因子,进行单因素方差分析 (One-way ANOVA, LSD,

表 1 普通 PCR 引物、浓度和反应程序

Table 1 Primers, probes and PCR conditions used for the conventional PCR

目标群落 Target group	引物 Primer	序列(5'-3')Sequence	扩增片段 Amplicon/bp	反应程序 Thermal profile	参考文献 Reference
AOB	amoA-1F*	GGGGTTTCTACTGCTGGT	491	5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at 55 °C and 1 min at 72 °C, and 10 min at 72 °C for the last cycle	Rotthauwe et al. 1997 <sup>[18]</sup>
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC			
AOA	Arch-amoA-F*	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635	3 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C and 2 min at 72 °C, and 3 min at 72 °C for the last cycle	Francis et al. 2005 <sup>[19]</sup>
	Arch-amoA-R	GCGGCCATCCATCTGTATGT			
NOB	nob-F	TTTTTTGAGATTGCTAG	388	3 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C and 2 min at 72 °C, and 3 min at 72 °C for the last cycle	明镇寰等 1999 <sup>[20]</sup>
	nob-R	CTAAAACTCAAAGGAATTGA			

Duncan)。应用 Excel 2003 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤氨氧化细菌

在不同生长期和不同  $O_3$  处理下,各土层的 AOB 基因拷贝数变化较大,最少仅为每克干土  $3.34 \times 10^5$  个拷贝数,最多可达每克干土  $2.91 \times 10^6$  个拷贝数。冬小麦拔节期,0~10 cm 土层的 AOB 基因拷贝数在低浓度  $O_3$  处理下显著比对照处理降低( $P < 0.05$ ),40  $nmol \cdot mol^{-1}$  和 80  $nmol \cdot mol^{-1}$   $O_3$  处理下 AOB 基因拷贝数分别比 CK 处理降低 35.3%和 46.8%,在 120  $nmol \cdot mol^{-1}$   $O_3$  处理时 AOB 基因拷贝数与 CK 处理相比变化则不明显(图 1);10~20 cm 土层的 AOB 基因拷贝数在 120  $nmol \cdot mol^{-1}$   $O_3$  处理下比 CK 处理显著降低 66.0%,而在低浓度  $O_3$  处理下变化不显著;20~40 cm 土层的 AOB 基因拷贝数在 40、80、120  $nmol \cdot mol^{-1}$   $O_3$  处理下均比对照处理显著降低,分别降低 39.8%、51.2%和 59.4%。冬小麦灌浆期,0~10 cm 土层的 AOB 基因拷贝数在 3 个  $O_3$  处理下与 CK 处理相比均未发生显著变化;10~20 cm 土层的 AOB 基因拷贝数在 80  $nmol \cdot mol^{-1}$   $O_3$  处理时较对照处理提高了 102.7%。冬小麦收获期,0~10 cm 和 10~20 cm 土层的 AOB 基因拷贝数在不同  $O_3$  处理下较对照处理均无显著性变化,但是 0~10 cm 和 10~20 cm 土层的 AOB 基因拷贝数在  $O_3$  浓度为 80  $nmol \cdot mol^{-1}$  和 120  $nmol \cdot mol^{-1}$  之间差异很显著(图 2)。

### 2.2 土壤氨氧化古菌

在冬小麦的灌浆期和收获期,不同的  $O_3$  处理导致 0~10 cm 和 10~20 cm 土层的 AOA 拷贝数在每克干土  $5.13 \times 10^6 \sim 2.01 \times 10^7$  个范围之间。冬小麦灌浆期,

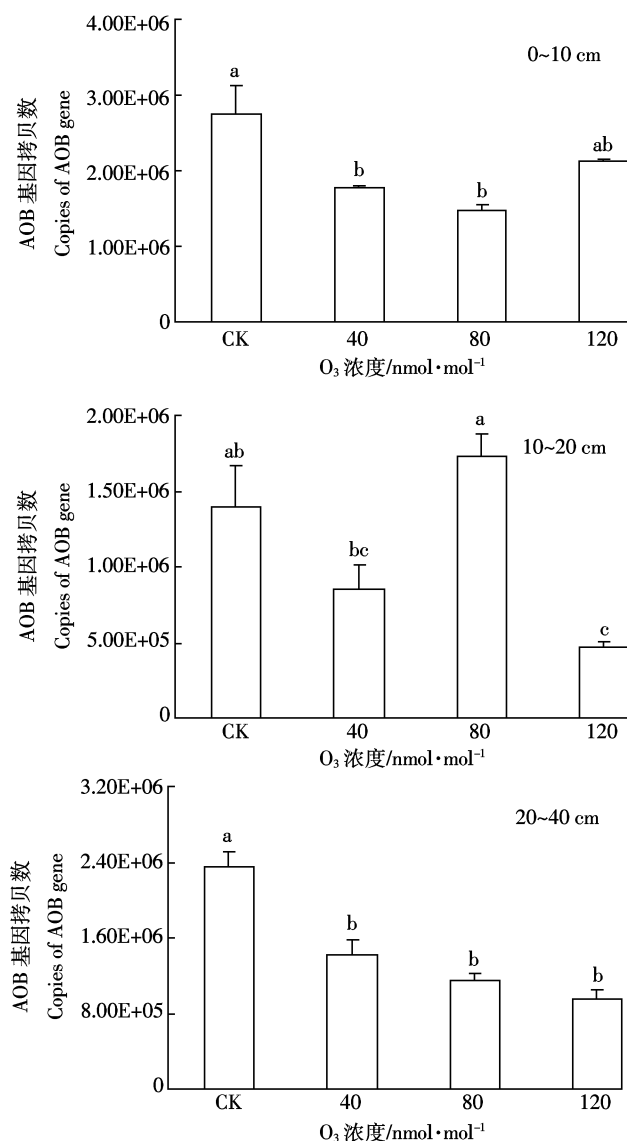
图 1  $O_3$  对冬小麦拔节期不同土层 AOB 基因拷贝数的影响

Figure 1 Effect of  $O_3$  on AOB quantity in different soil layers in jointing stage of winter wheat

0~10 cm 土层的 AOA 基因拷贝数各个处理间差异均不显著,说明  $O_3$  处理没有引起 0~10 cm 土层的 AOA 基因拷贝数发生急剧变化。土壤深度为 10~20 cm 时,熏蒸  $40\sim 120\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$  的  $O_3$  与对照处理相比土壤的 AOA 基因拷贝数也没有发生显著变化,但是  $40\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$   $O_3$  处理的 AOA 基因拷贝数与  $120\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$   $O_3$  处理的 AOA 拷贝数之间差异达到显著水平(图 3);冬小麦收获期,0~10 cm 和 10~20 cm 土层的 AOA 基因拷贝数在各  $O_3$  浓度处理下与对照处理相比均无显著差异,但是  $80\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$   $O_3$  处理下 0~10 cm 土层的 AOA 基因拷贝数与  $40\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$  和  $120\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$   $O_3$  处理的拷贝数存在显著差异(图 3)。

### 2.3 土壤硝化细菌

在冬小麦的拔节期、灌浆期和收获期,不同  $O_3$  处理导致土壤 NOB 基因拷贝数变化也比较大,最少为每克干土  $2.99\times 10^7$  拷贝数,最多达到了每克干土  $4.35\times 10^8$  拷贝数。冬小麦拔节期,0~10 cm 土层的 NOB 基因拷贝数在高浓度  $120\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$   $O_3$  处理下较对照处理有显著降低,其降低比率达到 39.7%(图 4);10~20 cm 土层的 NOB 基因拷贝数在浓度 40

$\text{nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$  和  $80\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$   $O_3$  处理下分别比对照提高了 69.0%和 117.8%;20~40 cm 土层中,各  $O_3$  处理的基因拷贝数之间无显著变化。冬小麦灌浆期,0~10 cm 和 10~20 cm 土层的 NOB 基因拷贝数在  $80\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$   $O_3$  处理下较对照处理均有显著提高,分别提高了 242.8%和 168.2%,其他处理与对照处理相比差异不显著。冬小麦收获期,不管是 0~10 cm 土层还是 10~20 cm 土层,土壤的 NOB 基因拷贝数虽然随  $O_3$  浓度的变化有一些升高或降低的趋势,但是经数理统计检验均与对照处理差异不显著(图 5)。

### 3 讨论

土壤氮循环是指  $N_2$ 、无机氮化合物、有机氮化合物在土壤中相互转化过程的总称,包括氨化作用、硝化作用、反硝化作用和固氮作用等。土壤氮循环的每个转化环节过程中均有微生物的参与,土壤微生物是土壤中各种生物化学和生理学过程动态平衡的主要调节者。 $O_3$  胁迫可影响农田生态系统中土壤微生物的活性。石春红等研究发现, $O_3$  浓度升高显著地降低了土壤细菌、真菌和放线菌等微生物的数量<sup>[24]</sup>。较高

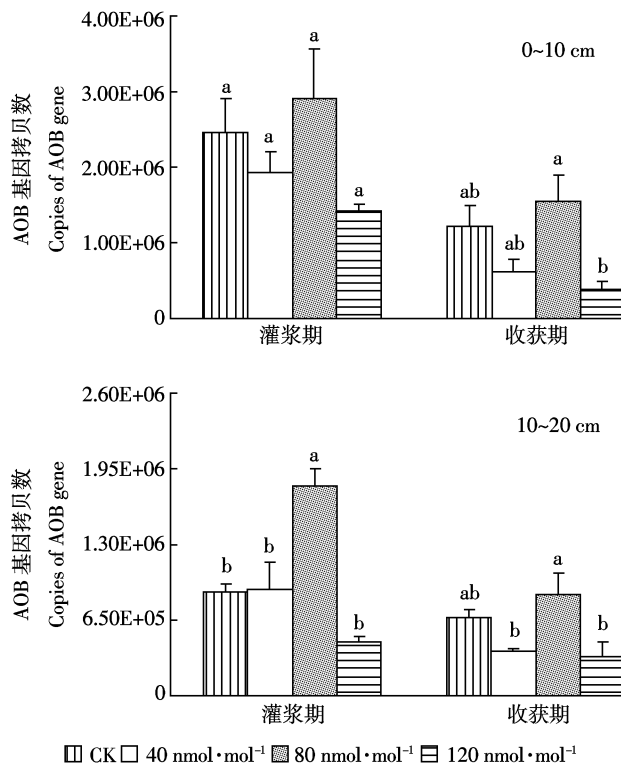


图 2  $O_3$  对冬小麦灌浆期及收获期不同土层 AOB 基因拷贝数的影响

Figure 2 Effect of ozone on AOB quantity in different soil layer in filling stage and harvest time of winter wheat

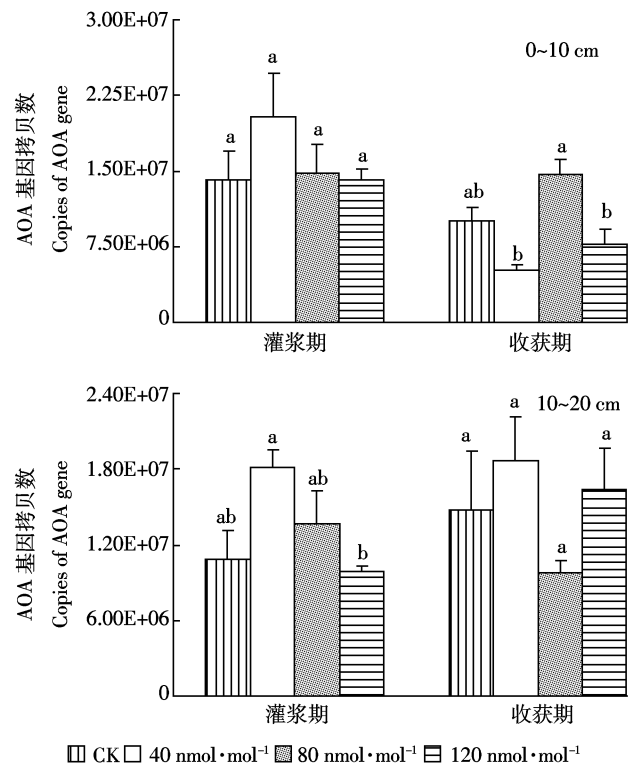


图 3  $O_3$  对冬小麦灌浆期及收获期不同土层 AOA 基因拷贝数的影响

Figure 3 Effect of ozone on AOA quantity in different soil layers in filling stage and harvest time of winter wheat



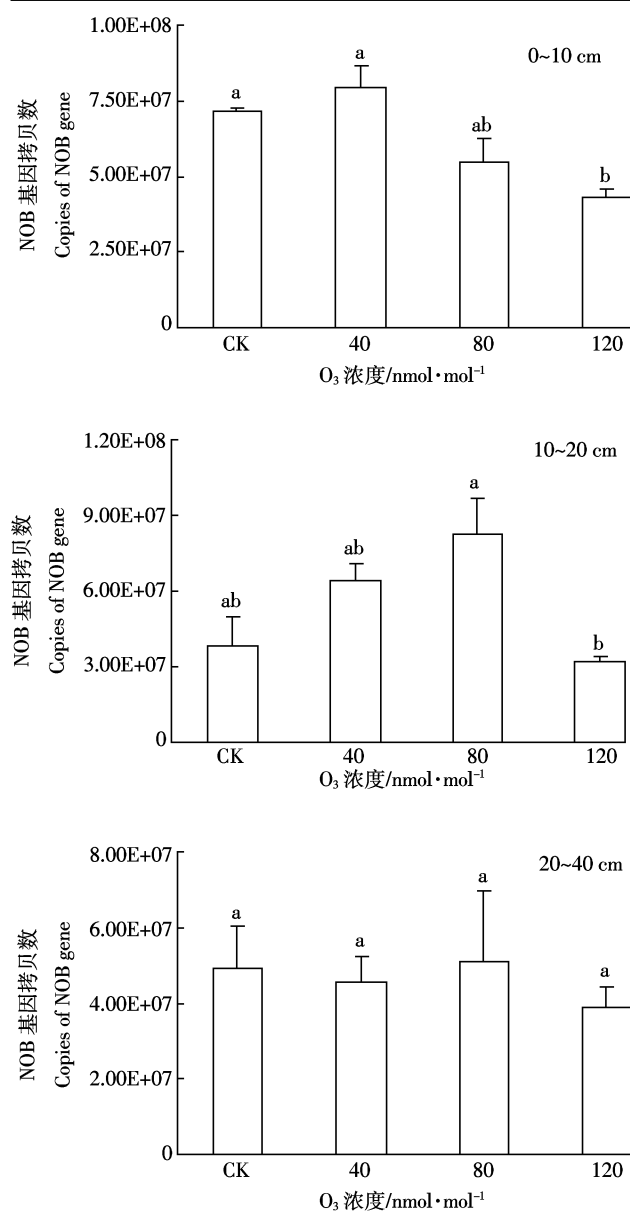
图4  $O_3$  对冬小麦拔节期不同土层 NOB 基因拷贝数的影响

Figure 4 Effect of ozone on NOB quantity in different soil layers in jointing stage of winter wheat

的  $O_3$  浓度 ( $110 \text{ nmol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 可造成根际土壤微生物多样性指数、微生物量碳降低,但对非根际土壤微生物影响不大<sup>[14]</sup>。本实验所采集的土壤样品均来自根际土壤,实验结果表明  $O_3$  胁迫影响了根际微生物的数量。

冬小麦的拔节期、灌浆期和收获期,不同浓度  $O_3$  处理下 AOB 基因拷贝数在整体上有下降的趋势, $O_3$  浓度越高 AOB 基因拷贝数下降越明显,说明  $O_3$  污染可抑制冬小麦拔节期土壤的氨氧化作用。但是  $O_3$  处理非但不降低反而提高土壤的 AOB 基因拷贝数,这可能是因为在大田实验条件下外界环境的多变性以

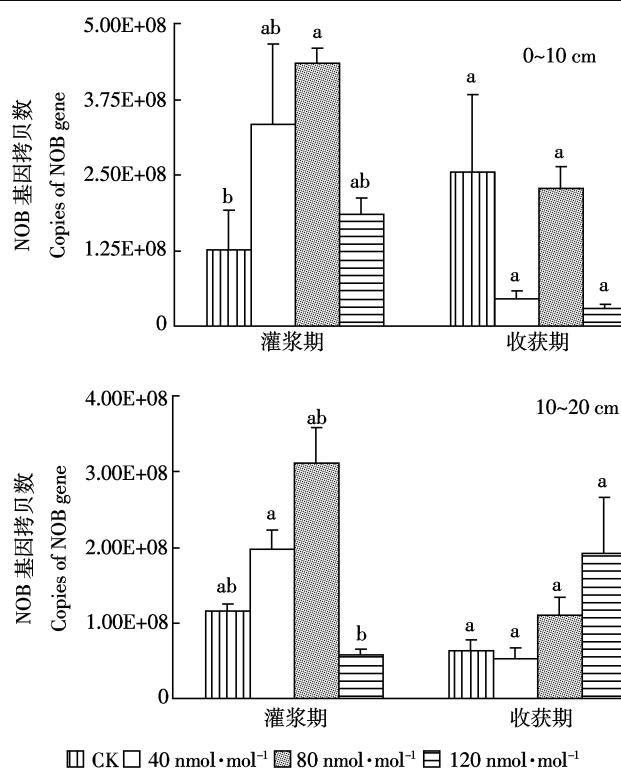


图5  $O_3$  对冬小麦灌浆期及收获期不同土层 NOB 基因拷贝数的影响

Figure 5 Effect of ozone on NOB quantity in different soil layers in filling stage and harvest time of winter wheat

及比较难于控制的特点导致不同  $O_3$  处理下土壤氨氧化细菌活性不一致,从而引起土壤 AOB 基因拷贝数变化较大。0~10 cm 和 10~20 cm 土层的 AOB 基因拷贝数总体上比 20~40 cm 土层的 AOB 拷贝数多,因为 0~10 cm 和 10~20 cm 土层是植物根系生长的主要区域,土壤有机质、氮、磷和钾等养分含量较高,这有利于氨氧化细菌的繁殖和生长。Scagel 和 Andersen 研究  $O_3$  胁迫对北美黄松土壤微生物活性的影响,发现活真菌生物量和活真菌与细菌生物量比值均随着  $O_3$  胁迫时间的延长而增加。低  $O_3$  ( $23 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 胁迫导致土壤真菌和细菌的生物量比对照处理增加,而高  $O_3$  ( $31 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 胁迫导致土壤真菌和细菌的生物量降低。一些学者认为, $O_3$  之所以可以抑制土壤微生物活性主要是通过改变植物叶片的组成和减少土壤落叶量<sup>[16]</sup>,影响植物根系生长和改变土壤呼吸<sup>[25-26]</sup>,降低植物根系有机和无机物的分泌<sup>[26-27]</sup>。以往关于  $O_3$  胁迫对小麦地下微生物群落的研究报道较少。对水稻地下微生物的研究表明,在  $O_3$  胁迫下氨氧化细菌随着水稻整个生长季节的变化也呈现出先增多后降低的趋势<sup>[28]</sup>。这与本实验的结果相类似,说明  $O_3$  胁迫虽然在

冬小麦的一些生育期内促进土壤氨氧化细菌数量增加,但随着 O<sub>3</sub> 浓度的增加其生理代谢活性趋于下降,从而抑制土壤的氨氧化作用。

自然生境中 AOA 在数量、多样性和栖居范围等各方面都胜于 AOB, 因此与 AOB 处于不同生境的 AOA 可能是作为氨氧化过程的一种潜在种群<sup>[29]</sup>。冬小麦灌浆期, 0~10 cm 和 10~20 cm 土层的 AOA 基因拷贝数变化不大, 说明 AOA 对外界环境的耐性比较强。冬小麦灌浆期的 AOA 基因拷贝数比收获期多, 两者比值为 1.01~3.96, 这与沈菊培等<sup>[30]</sup>的报道基本相似。不同 O<sub>3</sub> 浓度处理下, 0~10 cm 土层的 NOB 基因拷贝数多于 10~20 cm, 这与丁玲玲等<sup>[31]</sup>的研究结果比较一致。冬小麦灌浆期, 0~10 cm 和 10~20 cm 土层的 NOB 基因拷贝数在低浓度 O<sub>3</sub> 处理下表现出比对照增加的趋势。作物为了抵抗外界 O<sub>3</sub> 胁迫所造成的伤害, 将进行自身的生理调节, 如吸收更多的营养物质<sup>[32-35, 25]</sup>。郑有飞等<sup>[36]</sup>的研究结果表明, 植物的生理活性将随着 O<sub>3</sub> 浓度的升高而发生变化, 进入土壤的凋落物数量增加, 这为土壤中的 AOB、AOA 和 NOB 提供了丰富的营养, 从而促进这些细菌的快速生长和繁殖。

#### 4 结论

O<sub>3</sub> 胁迫可影响土壤氨氧化细菌、硝化细菌和氨氧化古菌的数量和活性, 从而影响农田生态系统的氮素循环, 进而影响农作物的产量和品质。O<sub>3</sub> 胁迫影响土壤硝化细菌的机制还需要人们更进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Fishman J. The global consequence of increasing tropospheric ozone concentration[J]. *Chemosphere*, 1991, 22: 685-695.
- [2] Shao M, Tang X, Zhang Y, et al. City clusters in China: Air and surface water pollution[J]. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2006, 4 (7): 353-361.
- [3] Prosser J I. Autotrophic nitrification in bacteria[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1989, 30: 125-181.
- [4] Deboer W, Gunnewiek P J A K, Veenhuis M, et al. Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57: 3600-3604.
- [5] Carnol M, Hogenboom L, Ewajach M, et al. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> in open top chambers increases net nitrification and potential denitrification[J]. *Global Change Biol*, 2002, 8: 590-598.
- [6] Roesch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 3818-3829.
- [7] Phillips C J, Harris D, Dollhopf S L, et al. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 5410-5418.
- [8] Liu B, Jia G, Chen J, et al. A review of methods for studying microbial diversity in soils[J]. *Pedosphere*, 2006, 16: 18-24.
- [9] Cavigelli M A, Robertson G P. Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 297-310.
- [10] Chu H Y, Fujii T, Morimoto S, et al. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 485-491.
- [11] 刘宏举, 郑有飞, 吴荣军, 等. 地表臭氧浓度增加对南京地区冬小麦生长和产量的影响[J]. *中国农业气象*, 2009, 30(2): 195-200.
- LIU Hong-ju, ZHENG You-fei, WU Rong-jun, et al. Impacts of increasing surface ozone on growth and yield of winter wheat in Nanjing Area[J]. *Chinese Journal of Agrometeorology*, 2009, 30(2): 195-200.
- [12] Feng Z W, Jin M H, Huang Y Z, et al. Effects of ground-level ozone (O<sub>3</sub>) pollution on the yields of rice and winter wheat in the Yangtze River delta[J]. *Journal of Environmental Science*, 2003, 15(3): 360-362.
- [13] 胡君利, 林先贵, 朱建国. 土壤微生物对大气对流层臭氧浓度升高的响应[J]. *土壤*, 2008, 40(6): 857-862.
- HU Jun-li, LIN Xian-gui, ZHU Jian-guo. Soil Microbial responses to elevated tropospheric O<sub>3</sub> concentration[J]. *Soils*, 2008, 40(6): 857-862.
- [14] 陈 展, 王效科, 冯兆忠, 等. 臭氧对生态系统地下过程的影响[J]. *生态学杂志*, 2007, 26(1): 121-125.
- CHEN Zhan, WANG Xiao-ke, FENG Zhao-zhong, et al. Effects of elevated ambient ozone on ecosystem below-ground processes[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(1): 121-125.
- [15] Hofstra G, Ali A, Wukash R T, et al. The rapid inhibition of root respiration after exposure of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to ozone[J]. *Atmospheric Environment*, 1981, 15: 483-487.
- [16] Scagel C F, Andersen C P. Seasonal changes in root and soil respiration of ozone-exposed ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) grown in different substrates[J]. *New Phytologist*, 1997, 136: 627-643.
- [17] Kasurinen A, Gonzales P K, Riikonen J, et al. Soil CO<sub>2</sub> efflux of two silver birch clones exposed to elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> levels during three growing seasons[J]. *Global Change Biology*, 2004, 10: 1654-1665.
- [18] Rothauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 4704-4712.
- [19] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 14683-14688.
- [20] 明镇寰, 岳春梅, 徐炳森, 等. 用 PCR 技术检测生物硝化池污水中硝化细菌 (Nitrobacteria) 的研究[J]. *浙江大学学报 (理学版)*, 1999, (26)2: 83-86.
- MING Zhen-huan, YUE Chun-mei, XU Bing-sen, et al. Detection of nitrobacteria populations in wastewater of biological nitrification stage

- by polymerase chain reaction analysis[J]. *Journal of Zhejiang University (Sciences Edition)*, 1999, 26(2):83-86.
- [21] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展[J]. 生态学报, 2009, 29(1):406-413.
- HE Ji-zheng, ZHANG Li-mei. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1):406-413.
- [22] 张伟. 硝化细菌的富集培养及氨单加氧酶基因片段的PCR扩增[D]. 杭州:浙江大学博士学位论文, 2002.
- ZHANG Wei. The enrichment of nitrifying bacteria and amplification of ammonia-monooxygenase (amoA) gene[D]. Hangzhou: Zhejiang University Ph. D. Thesis. 2002.
- [23] 张星, 林炜铁, 朱雅楠. 硝化细菌中亚硝酸盐氧化还原酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11):1806-1811.
- ZHANG Xing, LIN Wei-tie, ZHU Ya-nan. Research progress of nitrite oxidoreductase in nitrobacteria[J]. *Microbiology*, 2008, 35(11):1806-1810.
- [24] 石春红, 郑有飞, 吴芳芳, 等. 大气中臭氧浓度增加对根际和非根际土壤微生物的影响[J]. 土壤学报, 2009, 46(5):894-898.
- SHI Chun-hong, ZHENG You-fei, WU Fang-fang, et al. Effects of simulated elevated atmospheric O<sub>3</sub> concentration on the quantity of microorganisms in winter wheat rhizospheric and non-rhizospheric soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(5):894-898.
- [25] Andersen C P. Source-sink balance and carbon allocation below ground in plants exposed to ozone[J]. *New Phytologist*, 2003, 157:213-228.
- [26] Holmes W E, Zak D R, Pregitzer K S, et al. Soil nitrogen transformations under *Populus tremuloides*, *Betula papyrifera* and *Acer saccharum* following 3 years exposure to elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>[J]. *Global Change Biology*, 2003, 9(12):1743-1750.
- [27] McCrady J K, Andersen C E. The effect of ozone on below-ground carbon allocation in wheat[J]. *Environmental Pollution*, 2000, 107:465-472.
- [28] 李全胜, 林先贵, 胡君利, 等. 近地层臭氧浓度升高对稻田土壤氨氧化与反硝化细菌活性的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(8):1789-1793.
- LI Quan-sheng, LIN Xian-gui, HU Jun-li, et al. Elevated surface O<sub>3</sub> concentration effects on soil ammonia-oxidizing and denitrifying bacterial activities in a rice field[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(8):1789-1793.
- [29] Adair K, Schwartz E. Evidence that ammonia-oxidizing Archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of Northern Arizona, USA[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 56:420-426.
- [30] 沈菊培. 不同施肥处理下氨氧化微生物丰度和群落多样性研究[D]. 北京:中国科学院生态环境研究中心博士学位论文, 2008.
- SHEN Ju-pei. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia oxidizing archaea communities under different fertilization practices[D]. Beijing: A Dissertation for the Doctoral Degree of Environmental Science in the Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2008.
- [31] 丁玲玲, 祁彪, 尚占环, 等. 东祁连山亚高山草地土壤微生物功能群数量动态及其与土壤环境关系[J]. 草业学报, 2007, 16(2):9-18.
- DING Ling-ling, QI Biao, SHANG Zhan-huan, et al. Dynamics of different soil microbial physiological groups and their relationship to soil conditions under sub-alpine grasslands vegetation in the eastern Qilian mountain[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2007, 16(2):9-18.
- [32] 胡君利, 林先贵, 王俊华, 等. 大气对流层臭氧浓度升高下AM真菌对小麦生长的影响[J]. 环境科学, 2009, 30(11):3393-3398.
- HU Jun-li, LIN Xian-gui, WANG Jun-hua, et al. Arbuscular mycorrhizal fungal effects on wheat growth in response to elevated tropospheric O<sub>3</sub> concentration[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(11):3393-3398.
- [33] 陈展, 王效科, 段晓男, 等. 臭氧浓度升高对盆栽小麦根系和土壤微生物功能的影响[J]. 生态学报, 2007, 27:1803-1808.
- CHEN Zhan, WANG Xiao-ke, DUAN Xiao-nan, et al. Ozone effects on wheat root and soil microbial biomass and diversity[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27:1803-1808.
- [34] Xue D, Yao H Y, Ge D Y, et al. Soil microbial community structure in diverse land use systems: A comparative study using biologi, DGGE and PLFA analyses[J]. *Pedosphere*, 2008, 18(5):653-663.
- [35] Cardoso-Vilhena J, Balaguer L, Eamus D, et al. Mechanisms underlying the amelioration of O<sub>3</sub> induced damage by elevated atmospheric concentrations of CO<sub>2</sub>[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55:771-781.
- [36] 郑有飞, 石春红, 吴芳芳, 等. 大气臭氧浓度升高对冬小麦根际土壤酶活性的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(8):4386-4391.
- ZHENG You-fei, SHI Chun-hong, WU Fang-fang. Effects of simulated elevated atmospheric O<sub>3</sub> concentration on soil enzyme activity in winter wheat rhizosphere[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(8):4386-4391.