植物营养与肥料学报 2012,18(2):444-450
Plant Nutrition and Fertilizer Science

接种自生固氮菌对玉米根际土壤酶活性和细菌群落功能多样性的影响

陈胜男,谷 洁*,付青霞,孙 薇,钱 勋,高 华,秦清军
(西北农林科技大学资源与环境学院,陕西杨凌 712100)

摘要: 为了探索玉米根际土壤微生态特征对接种自生固氮菌的响应机理,在盆栽实验条件下,研究了3株自生固氮菌—褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum* YCYS)、芸苔叶杆菌(*Phyllobacterium brasssicacearum* QL54)和类芽孢杆菌(*Paenibacillus sabinae* MX31)接种盆栽玉米(*Zea mays* L.)之后,玉米根际土壤酶活性和细菌群落功能多样性的变化。结果表明,接种自生固氮菌对玉米根际土壤酶活性和细菌群落功能多样性产生了一定的影响,而且不同自生固氮菌之间的接种效果有一定的差异。接种褐球固氮菌(*A. chroococcum* YCYS)和类芽孢杆菌(*P. sabinae* MX31)玉米根际土壤脲酶活性分别比对照高20.55%和9.58%。然而接种处理对玉米根际土壤碱性磷酸酶活性的影响差异不显著($P>0.05$)。BIOLOG结果显示,接种自生固氮菌可以提高细菌总代谢活性,其中接种褐球固氮菌(*A. chroococcum* YCYS)处理的AWCD是对照的1.8倍,并且细菌群落丰富度指数(R)显著高于对照($P<0.01$)。不同接种处理土壤根际细菌生理碳代谢优势群落结构不同。主成分分析(PCA)表明接种自生固氮菌可以调控根际土壤细菌群落功能多样性。

关键词: 自生固氮菌;玉米;BIOLOG;土壤酶活性;细菌群落功能多样性
中图分类号: S144.5;S154.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1008-505X(2012)02-0444-07

Effects of inoculating azotobacter on soil enzyme activities and bacterial community functional diversity in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.)

CHEN Sheng-nan, GU Jie*, FU Qing-xia, SUN Wei, QIAN Xun, GAO Hua, QIN Qing-jun
(*College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China*)

Abstract: In order to explore the response of soil micro-ecological characteristics associated with the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) to azotobacter's inoculation, the responses of soil enzyme activities and bacterial community functional diversity in the rhizosphere soils of maize seedlings inoculated with azotobacter isolates including *Azotobacter chroococcum* YCYS, *Phyllobacterium brasssicacearum* QL54 and *Paenibacillus sabinae* MX31 were examined in pot culture conditions. The results show that the inoculation of azotobacter can change the soil enzyme activities and regulate the soil bacterial functional community associated with the rhizosphere of maize, and different strains have different inoculation effects. Compared with the control, the urease activities of *A. chroococcum* YCYS and *P. sabinae* MX31 treatments are increased by 20.55% and 9.58%, respectively. However, there are not significant differences between the inoculation and control treatments in the phosphatase activity ($P>0.05$). The BIOLOG results show that the azotobacter inoculation can increase the total bacterial metabolic activity, the activity of inoculating *A. chroococcum* YCYS is 1.8 times higher than that of the control. Meanwhile, the species richness (R) is significantly higher that that of the control ($P<0.01$). The results of six carbon sources reveal that there are different carbon metabolic communities among the treatments. Principle components analysis (PCA) suggests that the azotobacter inoculation can regulate the bacterial community associated with the rhizosphere soils.

收稿日期: 2011-09-13　　**接受日期:** 2011-11-21
基金项目: 国家自然科学基金(40871119;41171203);农业部948项目(2010-Z20)资助。
作者简介: 陈胜男(1982—),女,山东济宁人,博士研究生,主要从事自生固氮菌多样性与微生物肥料研究。E-mail:csn82811@yahoo.com.cn
*通讯作者 gujoyer@sina.com.cn

Key words: azotobacter; *Zea mays*; BIOLOG; soil enzyme activity; bacterial community functional diversity

自生固氮菌(Azotobacter)是一类能在土壤中独立进行专性好氧固氮活动的细菌,在微生物肥料方面有重要的利用价值[1-2]。国内外研究发现大部分自生固氮菌如巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)、褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)和类芽孢杆菌(*Paenibacillus sabinae*)等可以促进植物生长[1]。Bahrani 等[3]研究发现接种褐球固氮菌可以提高冬小麦(*Triticum. aestivum*)子粒产量和蛋白质含量。Kizilkaya 等[4]采用分离于土耳其安纳托利亚北部的 11 株褐球固氮菌接种春小麦(*T. aestivum*),结果表明褐球固氮菌可以促进春小麦生长和提高植株氮含量。研究学者认为接种外源 PGPR 对植物根际微生态特征(如土壤团聚体、土壤呼吸、酶活性、微生物活性和微生物群落多样性)的影响是揭示其促生作用的重要途径之一。其中,土壤酶活性和微生物群落多样性是分析 PGPR 对土壤生态过程影响机制的重要指标,土壤微生物群落多样性的变化可能对地下生态系统稳定性存在影响[5-6],然而具体机制尚不明确。

目前,土壤微生物群落多样性分析方法主要有 BIOLOG、磷脂脂肪酸(PLFA)和高通量分子指纹技术(如 PCR-DGGE、T-RFLP 和 Pyrosequencing)[7]。其中,BIOLOG 技术是通过分析微生物对单一碳源利用程度来描述微生物群落功能多样性的分析方法[8]。该技术在分析外源微生物菌剂对土著土壤细菌群落功能多样性影响方面得到广泛应用[5-6, 8-10]。Buyer 等[11]采用 BIOLOG-GN 板研究表明接种内生真菌使得高羊茅(*Lolium arundinaceum*)根际代谢糖类、羧酸类和多聚物类的细菌类群功能多样性降低。Felici 等[12]采用巢式 PCR - DGGE 技术研究发现接种巴西固氮螺菌(*A. brasilense* Sp245.)对马铃薯(*Lycopersicon esculentum*)根际细菌群落遗传多样性产生显著影响。Baudoin 等[13]运用自动化核糖体基因间隔分析(ARISA)技术研究了大田条件下接种产脂固氮螺菌(*A. lipoferum* CRT1)对玉米根际土壤土著细菌群落遗传多样性的影响,结果发现在接种后第 7 d 玉米根际细菌群落发生显著变化。然而,有关接种自生固氮菌对玉米根际土壤酶活性和细菌群落功能多样性的影响却鲜见报道。

因此,本文采用 BIOLOG 技术研究了盆栽实验条件下,接种 3 种自生固氮菌菌株—褐球固氮菌(*A. chroococcum*)、芸苔叶杆菌(*P. brasssicacearum*)和类芽孢杆菌(*P. sabinae*)对玉米(*Z. mays* L.)幼苗期根际土壤酶活性和细菌群落功能多样性的影响,为自生固氮菌菌剂的开发利用与菌剂环境释放的土壤微生态效应研究提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　试验设计

试验在西北农林科技大学资源与环境学院网室进行。土壤(0—20 cm)的基本理化性状为:pH 7.6、速效氮 14.14 mg/kg、速效磷 3.13 mg/kg、速效钾 231.00 mg/kg。自生固氮菌菌株分离于秦岭南坡土壤中,经形态学、生理生化和 16S - rDNA 测序确定为自生固氮菌,分别为褐球固氮菌(*A. chroococcum* YCYS)、芸苔叶杆菌(*P. brasssicacearum* QL54)和类芽孢杆菌(*P. sabinae* MX31)。玉米品种为陕单 22 (*Z. mays* cv. Shandan 22)。

试验设 4 个处理,分别为:对照,不接种自生固氮菌(简称 Control);接种褐球固氮菌(*A. chroococcum* YCYS,简称 YCYS);接种芸苔叶杆菌(*P. brasssicacearum* QL54,简称 QL54);接种类芽孢杆菌(*P. sabinae* MX31,简称 MX31)。参考 Bahrani 等[3]、Kizilkaya 等[4]和 Narula 等[14]的方法并稍作改进,挑取单菌落接入含有 50 mL 液体无氮阿须贝培养基的三角瓶中,摇床(125 r/m)培养 72 h,5000 r/min 离心 7 min,将菌体悬浮在 250 mL 的 0.1 mol/L $MgSO_4$ 的溶液中,调节菌体浓度为 10^7 cfu/mL。将 75% 酒精表面消毒后的玉米种子用无菌水冲洗 3 次,在菌液中浸泡 30 min。每处理重复 10 次,共 40 盆,每塑料盆(口径 30 cm、高 20 cm)装土 6.0 kg,随机排列。每盆留长势健壮的幼苗 2 株,再次在根部接种 10 mL 菌液,对照接种 10 mL 不含自生固氮菌的阿须贝液体培养基,试验过程不施加肥料,每隔两天补充自来水 200 mL。

1.2　样品采集与测定方法

依据 Baudoin 等[13]文献,为了反映自生固氮菌接种后对土著细菌功能多样性的影响,本试验在接种自生固氮菌 7 d 后采集根际土壤。将玉米扣盆后,轻轻抖落附在根上的土壤,将剩下的根系和土壤在无菌自封袋中轻轻抖动大约 1 min,作为根际土[15],每个处理重复 3 次,共 12 份土样;迅速运回实验室,过 2 mm 筛后均分两份,一份用于土壤酶活性测定,一份用于 BIOLOG 分析,其中细菌群落

BIOLOG分析在48 h内进行[16]。

1.2.1 土壤酶活性测定　土壤酶活性的测定参照关松荫[17]的方法进行。脲酶活性测定用次氯酸钠-苯酚钠比色法,活性单位用 NH_3 -N mg/(g·d)表示;碱性磷酸酶活性测定用磷酸苯二钠比色法,活性单位用酚 mg/(g·d)表示;脱氢酶活性测定用氯化三苯基四氮唑(TTC)还原法,活性单位用 TF μg/(g·d)表示;蔗糖酶活性测定用3,5-二硝基水杨酸比色法,活性单位用 Glucose mg/(g·d)表示。

1.2.2 细菌群落功能多样性测定　BIOLOG-ECO板的31种单一碳源分为6大类[16]:糖类(10种)、羧酸类(7种)、氨基酸类(6种)、多聚物类(4种)、多胺类(2种)和芳香化合物类(2种)。参考张海涵等[18]的方法,精确称取相当于5.0 g干土的新鲜根际土,放入盛有45 mL 0.85% NaCl无菌溶液三角瓶中,摇床震荡(200 r/min)30 min;在超净工作台上,采用10倍稀释法,用0.85% NaCl无菌溶液将其稀释至浓度为 10^{-3} 的悬浮液,将稀释好的 10^{-3} 土壤悬浮液采用8道电子移液器(美国 Bio-Rad 公司)接种到ECO板中,每孔150 μL;置于25℃暗箱培养;连续培养240 h,在此培养过程中每隔12 h在590 nm处扫描读数1次。

1.3 数据处理

采用ECO板培养96 h的数据进行孔平均颜色变化率(AWCD)、细菌群落丰富度指数(R)和细菌群落 Shannon 指数(H)分析,其中:

1) $AWCD = \sum(X_1 - X_2)/31$　式中,X_1 为各反应孔在590 nm下的光密度值;X_2 为ECO板对照孔的光密度值,$X_1 - X_2$ 小于零的孔,计算中记为零[19];

2) 细菌群落丰富度指数(R)用BIOLOG-ECO板中碳源代谢孔的数目(AWCD>0.2,则代表该孔碳源被利用,该孔即为反应孔)表示群落丰富度指数[20];

3) 细菌群落 Shannon 指数(H) $= -\sum P_i \times \ln P_i$ 式中,$P_i = (X_1 - X_2)/\sum(X_1 - X_2)$,表示有碳源的孔与对照孔A1的光密度值之差与整板总差的比值。

采用CANOCO(Version 4.5)软件进行土壤酶活性与细菌群落BIOLOG代谢指纹的主成分分析(PCA),并且使用Cano Draw(Version 4.0)进行PCA图形构建[21];单因素方差分析采用JMP9.0软件(SAS Institute Inc., USA)进行,多重比较采用Tukey-Kramer HSD法统计;31种碳源与酶活性的主成分分析。数据均为3次重复的平均值±S.E。

2 结果与分析

2.1 接种自生固氮菌对玉米根际土壤酶活性的影响

土壤酶活性是表征土壤生物学性状的重要指标之一[22]。由表1分析可见,接种自生固氮菌对土壤酶活性产生影响,而且不同自生固氮菌的接种效果不同。脲酶是与土壤氮循环有关的水解酶之一[17],接种YCYS和MX31可以提高玉米根际土壤脲酶活性,分别比对照高20.55%和9.58%。接种YCYS处理脲酶活性比QL54高37.5%,差异显著($df=3$, $F=4.67$, $P<0.05$)。脱氢酶活性是表征土壤微生物群落活性的指标之一[10]。脱氢酶活性最高为接种QL54处理,接种YCYS和MX31处理与对照差异不显著($P>0.05$)。4个处理间土壤碱性磷酸酶和蔗糖酶活性差异不显著($P>0.05$)。说明碱性磷酸酶和蔗糖酶活性对外源固氮菌添加响应迟缓。

2.2 接种自生固氮菌对玉米根际土壤细菌群落功能多样性的影响

BIOLOG分析细菌群落水平代谢(即功能)多样性[8,10]。AWCD可以反映土壤细菌群落总的代谢活性,AWCD值越高,说明细菌群落代谢活性越大[10]。由图1A分析可见,4个处理的AWCD为:YCYS(1.25±0.03)>MX31(1.17±0.10)>QL54(1.12±0.05)>CK(0.68±0.05),单因素方差分析显示接种自生固氮菌处理AWCD显著高于对照($df=3$, $F=16.28$, $P<0.01$)。多样性Shannon指数(H)受物种群落变化的影响最大,是目前应用最广泛的指数[18]。图1B分析可见,细菌群落丰富度指数(R)为:YCYS(28±0.88)>QL54(27±1.53)>MX31(26±1.53)>CK(22±1.53),YCYS极显著高于对照($P<0.05$)。由图1C可见,细菌群落多样性指数(H)表现为接种YCYS、QL54和MX31处理分别比对照高7.90%、7.37%和4.84%,但是4个处理间无显著差异($df=3$, $F=4.23$, $P>0.05$)。

2.3 接种自生固氮菌对玉米根际土壤细菌群落6类碳源代谢的影响

表 1　接种自生固氮菌对玉米根际土壤酶活性的影响

Table 1　Effects of inoculating azotobacter on the soil enzyme activities in the rhizosphere of maize

处理 Treatment	脲酶活性 Urease activity [NH_3 -N mg/(g·d)]	碱性磷酸酶活性 Phosphatase activity [Phenol mg/(g·d)]	脱氢酶活性 Dehydrogenase activity [TF μg/(g·d)]	蔗糖酶活性 Sucrase activity [Glucose mg/(g·d)]
CK	0.73 ±0.04 ab	1.61 ±0.12 a	2.02 ±0.56 b	13.57 ±0.15 a
YCYS	0.88 ±0.04 a	1.79 ±0.03 a	2.80 ±0.27 ab	15.23 ±0.85 a
QL54	0.64 ±0.04 b	1.71 ±0.24 a	4.45 ±0.51 a	14.97 ±0.77 a
MX31	0.80 ±0.06 ab	1.71 ±0.30 a	2.47 ±0.50 ab	15.08 ±0.96 a
		方差分析 ANOVA		
	$F=4.67$, $P<0.05$	$F=0.13$, $P>0.05$	$F=5.02$, $P<0.05$	$F=1.05$, $P=0.42$

注(Note): 表中数据为 3 次重复的平均值 ± S.E ($n=3$),采用 Tukey-Kramer's honestly 进行差异显著性检验,不同字母代表有差异,$\alpha=0.05$. Value are means ± S.E ($n=3$). Values in each column followed by different letters are significantly different by Tukey-Kramer's honestly test, $\alpha=0.05$.

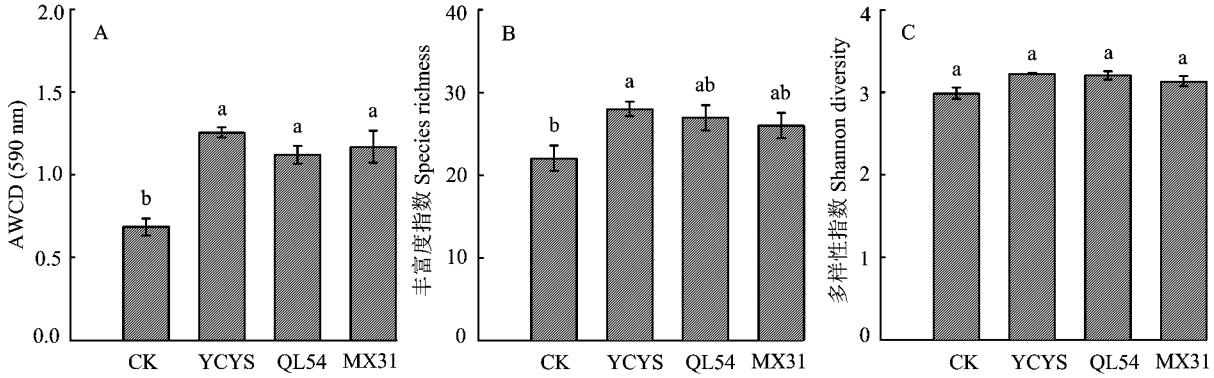

图 1　AWCD、细菌群落丰富度指数和多样性指数

Fig. 1　AWCD, species richness and Shannon diversity index of bacterial community

[注(Note): 柱上不同字母表示在 0.05 水平差异显著 Different letters above the bars indicate significance at 0.05 level.]

土壤细菌对 BIOLOG-ECO 板中 31 种碳源的利用可以反映细菌的代谢功能类群[8, 10, 18]。对 31 种碳源进行归类,可以分为 6 大类,可以表征土壤细菌群落代谢类群[18]。由表 2 分析可见,不同处理土壤细菌对碳源的优先利用种类和利用程度有明显差异,从而反映出接种自生固氮菌对土壤细菌生理碳代谢群落结构存在影响。从表 2 还可看出,不同接种处理土壤根际细菌生理碳代谢群落结构不同。对照处理的优势群落结构为: 多胺化合物代谢群 > 糖代谢群 > 多聚物代谢群。接种 YCYS 处理的优势群落结构为: 糖代谢群 > 多聚物代谢群 > 多胺化合物代谢群。接种 QL54 处理的优势群落结构为: 糖代谢群 > 多胺化合物代谢群 > 多聚物代谢群。接种 MX31 处理的优势群落结构为: 糖代谢群 > 氨基酸类代谢群 > 多聚物代谢群。在氨基酸类碳源方面,接种处理与对照间差异极显著($df=3$, $F=15.05$, $P<0.01$);在羧酸类碳源方面,接种 YCYS、QL54 和 MX31 处理比对照分别提高 41.24%、26.55% 和 42.17%,达到显著差异水平($df=3$, $F=4.41$, $P<0.05$);糖类代谢对照与接种之间差异极显著($df=3$, $F=40.91$, $P<0.01$),但是接种处理间差异不显著($P>0.05$)。然而 4 个处理在多胺化合物、多聚物类和芳香类处理之间差异不显著($P>0.05$)。由此可见,不同接种处理根际土壤细菌碳代谢群落结构不同,各处理的最弱碳代谢群落均为芳香化合物代谢群。

表2 接种自生固氮菌对玉米根际土壤细菌群落6类碳源代谢的影响

Table 2 Effects of inoculating azotobacter on six groups of carbon sources metabolism by soil bacteria in the rhizosphere of maize

处理 Treatment	氨基酸类 Amino acids	羧酸类 Carboxylic acids	多胺化合物类 Amines	糖类 Carbohydrates	多聚物类 Polymers	芳香化合物类 Aromatic compounds
CK	0.60±0.01 b	0.65±0.05 b	0.90±0.21 a	0.77±0.06 b	0.70±0.07 a	0.65±0.38 a
YCYS	1.19±0.10 a	0.92±0.02 a	1.23±0.07 a	1.67±0.01 a	1.30±0.10 a	0.47±0.11 a
QL54	1.04±0.07 a	0.83±0.08 a	1.16±0.12 a	1.53±0.04 a	1.09±0.11 a	0.34±0.18 a
MX31	1.24±0.09 a	0.93±0.08 a	0.93±0.01 a	1.48±0.10 a	1.10±0.29 a	0.55±0.06 a
方差分析 ANOVA						
	$F=15.05, P<0.01$	$F=4.41, P<0.05$	$F=1.67, P=0.25$	$F=40.91, P<0.01$	$F=2.19, P=0.17$	$F=0.36, P=0.78$

注(Note):表中数据为3次重复的平均值±S.E ($n=3$),采用Tukey-Kramer's honestly差异显著性检验,不同字母代表有差异,$\alpha=0.05$. Values are means ±S.E ($n=3$). Values in each column followed by different letters are significantly different by Tukey-Kramer's honestly test, $\alpha=0.05$.

2.4 玉米根际土壤细菌群落功能多样性主成分分析

图2显示,前两个主成分PC1和PC2可以解释总变异的62.67%,PC1和PC2分别为46.36%和16.31%(特征根分别为3.341和1.175)。对照主要分布在第三象限,QL54和YCYS主要分布在第一、四象限,MX31主要分布在第一、二象限。PC1的方差贡献率最大,主要综合了对照和接种的变异。PC2将MX31和YCYS与QL54明显区分。QL54处于PC1的正端,MX31处于PC2的最正端。单因素方差分析显示PC1典型变量值差异极显著($P<0.05$)。QL54土壤典型变量值变异(离散)最大,对照和YCYS处理的土壤典型变量值变异(离散)较小。说明接种自生固氮菌改变了玉米根际细菌群落功能多样性,其中接种YCYS之后,根际细菌群落稳定性升高(离散降低),而接种QL54之后玉米根际细菌群落结构稳定性降低(离散升高)。

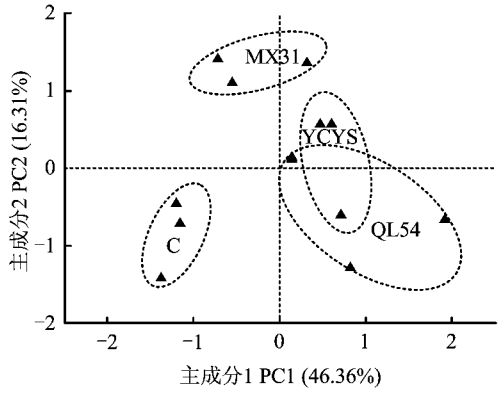

图2 玉米根际细菌群落多样性的主成分分析

Fig. 2 The principle components analysis (PCA) of bacterial community diversity in the rhizosphere of maize

从表3以看出,对PC1贡献大的碳源有15种,其中糖类占53.33%,羧酸类1种,多聚物类为3种,可见影响PC1的主要为糖类,其次是多聚物类;对PC2贡献大的碳源有6种。由图3分析可见,31种单一碳源与土壤酶活性的主成分分析结果显示,脱氢酶活性与H2(D, L-α-磷酸甘油)、B1(丙酮酸甲酯)、C3(2-羟基苯甲酸)等碳源呈现正相关;E2(N-乙酰-D葡萄糖氨)和A2(β-甲基-D-葡萄糖苷)与蔗糖酶活性呈现正相关;H1(α-D-乳糖)与碱性磷酸酶相关性显著;A4(L-精氨酸)与脲酶活性相关性显著。

表3 前2个主成分贡献的特征向量≥0.50的碳源数目

Table 3 Numbers of carbon sources with loadings ≥0.50 grouped according to substrate chemistry for PC1 and PC2

碳源 Carbon source	PC1	PC2
糖类 Carbohydrates	8	1
氨基酸类 Amino acids	2	1
羧酸类 Carboxylic acids	1	1
芳香类 Aromatic compounds	0	1
多聚物类 Polymers	3	2
多胺类 Amines	1	0
合计 Total	15	6

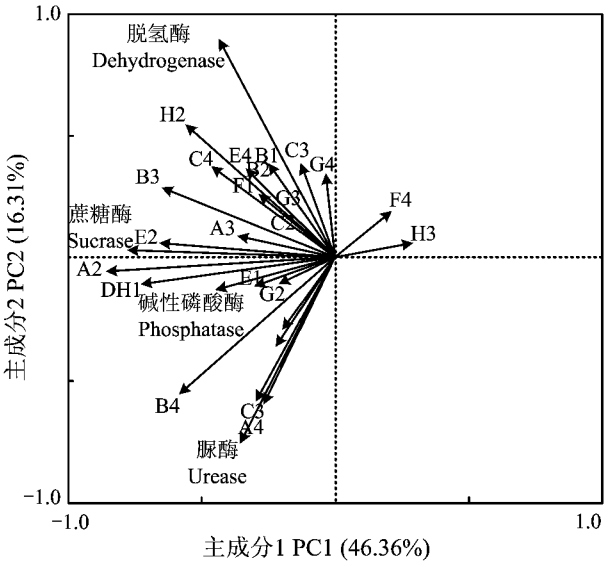

图 3　细菌群落碳源代谢多样性与土壤酶活性的主成分分析

Fig. 3　The principle components analysis (PCA) of bacterial community carbon sources metabolic diversity and soil enzyme activities

[注(Note)：图中字母 A2、B3、C4 等代表 BIOLOG-ECO 板中 31 种单一碳源 The letters in the figure A2, B3, C4 *et al.* represent 31 sole carbon sources in BIOLOG-ECO plate.]

3　讨论

农田土壤酶活性和微生物群落多样性是表征土壤生物学特征的指标之一，受到不同耕作模式[23-24]、轮作方式[25]和施肥模式[26]等因素的影响。国内外研究表明，施加外源微生物菌剂可以改变植物根际土著微生物类群[9-10]。蔡晓布等[27]在野外条件下研究了接种丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)对长芒草(*Stipa bungeana*)根际微生态的影响，结果发现多数接种处理的根际土壤磷酸酶活性有一定程度的升高，且根际土壤细菌数量显著增加，然而放线菌和真菌数量变化不显著。Cordier 等[28]研究了木霉(*Trichoderma atroviride*)对土壤细菌群落多样性的影响，采用稀释涂布平板法和 T-RFLP 技术监测细菌群落的变化，发现在接种后第 7 d 对细菌数量没有显著影响。

土壤酶系是土壤组分中最活跃的有机成分之一，是由微生物、动植物残体分解释放到土壤中的一种生物催化剂，酶类参与土壤中各种生物化学反应，其中蔗糖酶、脲酶和土壤磷酸酶活性能够代表土壤碳、氮和磷等养分的循环状况[29-30]。本研究结果表明，接种自生固氮菌对土壤酶活性产生影响，而且不同自生固氮菌的接种效果不同。脲酶能酶促酰胺态有机氮化物水解转化为无机氮化物，其反应产物氨是植物氮源之一，它的活性可以用来表征土壤氮素状况。本研究中发现脱氢酶活性最高为接种芸苔叶杆菌(*P. brasssicacearum* QL54)处理，达到 TF 4.45 ±0.51 μg/(g·d)，显著高于对照($P<0.01$)，然而接种处理对玉米根际土壤碱性磷酸酶活性的影响差异不显著($P>0.05$)。该结果与 Chen 等[26]研究结果一致，其认为在大田试验条件下，小麦接种褐球固氮菌菌剂之后，小麦根际土壤脱氢酶活性显著提高。原因可能是自生固氮菌的固氮作用加速了土壤物质转换，植物根系代谢加强，脱落物增加，有机质含量升高，从而酶促反应底物增加导致酶活性升高。

本研究表明，接种自生固氮菌后玉米根际细菌群落功能多样性发生变化，接种处理玉米根际细菌群落总代谢活性显著高于对照。接种 QL54 后，细菌群落多样性稳定性降低。该结果与 Baudoin 等[13]研究结果一致，Baudoin 等运用自动核糖体基因间隔序列分析(ARISA)技术研究了固氮螺菌(*A. lipoferum*)对玉米根际细菌群落的影响，发现玉米接种促生细菌(PGPR)—固氮螺菌(*A. lipoferum*)7 d，固氮螺菌对玉米根际土壤细菌群落遗传多样性产生了显著的影响。Chen 等[8]研究认为，大田实验条件下施加褐球固氮菌菌剂对小麦根际细菌群落单一碳源利用的功能多样性存在显著影响。自生固氮菌的接种对玉米根际细菌群落的影响可能是直接或者间接原因导致的。首先，自生固氮菌作为一类特殊的固氮微生物在土壤中与植物和其他微生物发生一定的互作关系，如自生固氮菌代谢产物可以促进其他土壤微生物类群的生长。其次，接种褐球固氮菌可以促进植物根系的生长发育[12]，如促进植物根系生物量提高和根系分叉数目增多，进而使得根系活力增加，根系分泌物增多(如糖类、氨基酸和多种微量元素)，加速土壤养分转化。此时，根际微域环境中其他细菌可利用的生存附着空间(植物根系)和能量物质(植物残体或者根系分泌物、菌丝分泌的蛋白类物质)显著提高，从而细菌数量有所增加。然而，具体的互作机理需要进一步研究。今后可采用稳定性同位素探测标记技术(SIP，如 SIP-PLFA、SIP-DNA-T-RFLP 和 SIP-Pyrosequencing)分析参与土壤氮素流动的功能微生物类群(如硝化细菌、反硝化细菌群落)对接种外源自生固氮菌的群落水平响应机制。

参考文献:

[1] Vessey J K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers [J]. Plant Soil, 2003, 255(2): 571-586.

[2] Oros D, Pavlecic M, Santek B, Novak S. Cultivation of the bacterium *Azotobacter chroococcum* for preparation of biofertilizers[J]. Afr. J. Biotechnol., 2011, 10(16): 3104-3111.

[3] Bahrani A, Pourreza J, Hagh J M. Response of winter wheat to co-inoculation with Azotobacter and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under different sources of nitrogen fertilizer[J]. Am.-Eur. J. Agric. Environ. Sci., 2010, 8(1): 95-103.

[4] Kizilkaya R. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains[J]. Ecol. Eng., 2008, 33(2): 150-156.

[5] Mishra A, Shekhar Nautiyal C. Functional diversity of the microbial community in the rhizosphere of chickpea grown in diesel fuel-spikedsoil amended with *Trichoderma ressei* using sole-carbon-source utilization profiles[J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2009, 25(7): 1175-1180.

[6] Lupwayi N Z, Clayton G W, O'Donovan J T, Grant C A. Soil microbial response to nitrogen rate and placement and barley seeding rate under no till[J]. Agron. J., 2011, 103(4): 1064-1071.

[7] Hirsch P R, Mauchline T H, Clark I M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology[J]. Soil Biol. Biochem., 2010, 42(6): 878-887.

[8] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization[J]. Appl. Environ. Microb., 1991, 57(8): 2351-2359.

[9] Chen S N, Gu J, Gao H, Qin Q J. Effect of microbial fertilizer on microbial activity and microbial community diversity in the rhizosphere of wheat growing on the Loess Plateau[J]. Afr. J. Microbiol. Res., 2011, 5(2): 137-143.

[10] Zhang H H, Tang M, Chen H, Zheng C L. Effects of inoculation with ectomycorrhizal fungi on microbial biomass and bacterial functional diversity in the rhizosphere of *Pinus tabulaeformis* seedlings[J]. Eur. J. Soil Biol., 2010, 46(2): 55-61.

[11] Buyer J S, Zuberer D A, Nichols K A, Franzluebbers A J. Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection[J]. Plant Soil, 2011, 339(1-2): 401-412.

[12] Felici C, Vettori L, Giraldi E *et al*. Single and co-inoculation of Bacillus subtilis and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community[J]. Appl. Soil Ecol., 2008, 40(2): 260-270.

[13] Baudoin E, Nazaret S, Mouge C *et al*. Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize[J]. Soil Biol. Biochem., 2009, 41(2): 409-413.

[14] Narula N, Behl K, Dudi H R *et al*. Response of wheat genotypes to azotobacter inoculation under rained conditions[J]. Rachis, 2002, 17: 66-67.

[15] Clegg S, Gobran G R. Rhizospheric P and K in forest soil manipulated with ammonium sulfate and water[J]. Can. J. Soil Sci., 1997, 77(4): 525-533.

[16] Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of Biolog micro plates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. J. Microbiol. Meth., 1999, 36(3): 203-213.

[17] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1983. 260-339.
Guan S Y. Soil enzyme and its research methods[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1983. 260-339.

[18] 张海涵, 唐明, 陈辉. 黄土高原典型林木根际土壤微生物群落结构与功能特征及其环境指示意义[J]. 环境科学, 2009, 30(8): 2432-2437.
Zhang H H, Tang M, Chen H. Characterization of soil microbial community function and structure in rhizosphere of typical tree species and the meaning for environmental indication in the Loess Plateau[J]. Environ. Sci., 2009, 30(8): 2432-2437.

[19] Selmants P C, Hart S C, Boyle S I *et al*. Red alder (*Alnus rubra*) alters community-level soil microbial function in conifer forests of the Pacific Northwest, USA[J]. Soil Biol. Biochem., 2005, 37(10): 1860-1868.

[20] Fisk M C, Ruether K F, Yavitt J B. Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems[J]. Soil Biol. Biochem., 2003, 35(4): 591-602.

[21] Saul-Tcherkas V, Steinberger Y. Substrate utilization patterns of desert soil microbial communities in response to xeric and mesic conditions[J]. Soil Biol. Biochem., 2009, 41(9): 1882-1893.

[22] Haryun K, Hojeong K. The impacts of excessive nitrogen additions on enzyme activities and nutrient leaching in two contrasting forest soils[J]. J. Microbiol., 2011, 49(3): 369-375.

[23] Vargas Gil S, Meriles J, Conforto C *et al*. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of soybean agroecosystem in Argentina[J]. Eur. J. Soil Biol., 2011, 47(1): 55-60.

[24] Briar S S, Fonte S J, Park I *et al*. The distribution of nematodes and soil microbial communities across soil aggregate fractions and farm management systems[J]. Soil Biol. Biochem., 2011, 43(5): 905-914.

[25] Lupwayi N Z, Rice W A, Clayton G W. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation[J]. Soil Biol. Biochem., 1998, 30(13): 1733-1741.

[26] Chen S K, Subler S, Edwards C A. Effects of agricultural biostimulants on soil microbial activity and nitrogen dynamics[J]. Appl. Soil Ecol., 2002, 19(3): 249-259.

[27] 蔡晓布, 盖京苹, 钱成, 冯固. 西藏高原天然长芒草地丛枝菌根真菌接种效应[J]. 应用生态学报, 2006, 17(11): 2121-2126.
Cai X B, Gai J P, Qian C, Feng G. Field inoculation effect of AM fungi on Tibet plateau *Stipa bungeana grassland*[J]. Chin. J. Appl. Ecol., 2006, 17(11): 2121-2126.

[28] Cordier C, Alabouvette C. Effects of the introduction of a biocontrol strain of *Trichoderma atroviride* on non target soil micro-organisms[J]. Eur. J. Soil Biol., 2009, 45(3): 267-274.

[29] 刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 等. 长期施肥对土壤微生物量及土壤酶活性的影响[J]. 植物生态学报, 2008, 32(1): 176-182.
Liu E K, Zhao B Q, Li X Y *et al*. Biological properties and enzymatic activity of arable soils affected by long-term different fertilization systems[J]. Chin. J. Plant Ecol., 2008, 32(1): 176-182.

[30] Andersona C R, Condrona L M, Cloughb T J *et al*. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus [J]. Pedobiologia, 2011, 54(5-6): 309-320.