

抗草甘膦转基因大豆(RRS) 对根际微生物和土壤氮素转化的影响

刘 佳, 刘志华, 徐广惠, 王宏燕

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘 要:采用室外小区试验方法,研究了抗草甘膦转基因大豆(RRS)对根际土壤细菌、真菌、放线菌、氨化细菌、硝化细菌和反硝化细菌的氨化作用强度、硝化作用强度和反硝化作用强度的影响。结果显示,RRS 显著降低了根际土壤细菌和放线菌的数量,提高了根际土壤真菌的数量;RRS 根际土壤氨化细菌、硝化细菌和反硝化细菌低于其亲本非转基因大豆和部分栽培大豆;RRS 对根际土壤氨化作用强度和硝化作用强度有显著影响,但对反硝化作用强度的影响不显著($P<0.05$)。研究表明,RRS 不同程度上降低了根际土壤微生物的数量和生化强度,并对根际土壤真菌生长有一定的促进作用。

关键词:抗草甘膦转基因大豆;根际土壤;微生物;生化强度

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)07-1341-05

Effects of Roundup Ready Soybean (RRS) on Microorganisms and Nitrogen Transformation in the Rhizospheric Soil

LIU Jia, LIU Zhi-hua, XU Guang-hui, WANG Hong-yan

(Resources and Environment Sciences College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Roundup Ready Soybean (RRS) is one of genetically modified crops and the majority of study on it address only potential risks and aboveground effects. There is little attention paid on the effect of genetically modified crops on microbial communities and biochemical reactions in soil. This experiment studied the effect of RRS on bacteria, fungi, actinomycete, ammonification bacteria, nitrification bacteria, denitrification bacteria and intensities of ammonification and nitrification. Results showed that RRS reduced the quantity of bacteria and actinomycete but increased the quantity of fungi in the rhizospheric soil. The amount of ammonification bacteria, nitrification bacteria and denitrification bacteria were all lower in the RRS rhizospheric soil than those of non-genetically modified and other cultivated soybean cultivars. RRS had a significant effect on the intensity of ammonification and nitrification, but its effect on denitrification intensity was not significant ($P<0.05$) in the rhizospheric soil. In general, RRS had a negative effect on the amount of bacteria and biochemical intensities to some degree but a positive effect on fungi in the rhizospheric soil.

Keywords: Roundup Ready Soybean (RRS); rhizospheric soil; microorganisms; biochemical intensity

随着转基因作物商品化进程的加快,转基因作物的风险评价倍受人们的关注^[1-2]。目前,国内外针对转基因作物对土壤微生物和环境的影响研究,大多集中在转基因玉米^[3-4]、油菜^[5]、棉花^[6]、马铃薯^[7]、小麦^[8]等作物上,而研究转基因大豆对根际土壤微生物影响的报道较少。

土壤微生物在土壤物质能量转化过程中起着重要的作用,其多样性与活性的保持是农业生态系统健康和稳定的基础^[9-10]。近年来的研究表明,转基因作物的外源基因和基因表达产物可通过根系分泌物或残茬进入土壤生态系统,进而对土壤生物功能类群及多样性造成影响。因此,评价转基因作物对土壤微生物的影响具有重要的生态学意义^[11-15]。

本研究采用传统培养的方法,对种植抗草甘膦转基因大豆(RRS)的土壤进行研究,重点研究 RRS 对根际土壤微生物数量和生化强度的影响,目的在于深入探讨 RRS 对黑土生态区土壤细菌群落多样性的影

收稿日期:2009-12-17

基金项目:黑龙江省自然科学基金(04-0402:ZJN)

作者简介:刘 佳(1983—),女,黑龙江庆安人,在读博士,主要从事土壤生态学和微生物分子生态学研究。

E-mail:liujia4047@yahoo.com.cn

通讯作者:王宏燕 E-mail:why220@126.com

响,进而探讨对土壤氮素转化的影响,为转基因大豆生物安全性评价提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

研究地点位于黑龙江省哈尔滨市试验基地(N45°34',E126°22'),气候属于寒温带大陆性气候,年降水量 400~600 mm,无霜期平均气温 3.78 ℃,平均有效积温 2 800 ℃。供试土壤为黑土,部分理化性状参数如下:有机质 44.1 g·kg⁻¹,速效氮 169 mg·kg⁻¹,速效磷 21 mg·kg⁻¹,速效钾 218 mg·kg⁻¹,pH 7.01。

1.2 试验方法

试验始于 2007 年,设 5 个处理,试验材料为 5 种大豆 (*Glycine max*), 分别为抗草甘膦转基因大豆 (RRS)、亲本非转基因大豆 (RRS-S)、东农 42 (D-42)、东农 46 (D-46) 和野生大豆 (*Glycine soja*) (W-S)。各品种按株距 10 cm 均匀撒播,各处理在种植及管理过程中均不施用化肥和农药。试验处理为随机区组设计,3 次重复,小区面积 30 m²。于大豆盛花期采集根际土壤样品,每个试验区随机取 10 株植株,采用抖落法收集根际土壤并混匀,作为 1 个土壤样品。

土壤含水量测定采用土壤烘干的方法。细菌用牛肉膏蛋白胨培养基培养,真菌用马丁氏 (Martin) 培养基培养,放线菌用高氏 1 号培养基培养,氨化细菌用 MPN-Griss-Ilosvay 法,硝化细菌用改良的斯蒂芬逊 (Stephenson) 培养基,反硝化细菌用稀释法。氨化作用强度采用比色法测定;硝化作用强度采用培养基接种土壤悬液法测定;反硝化作用强度采用硝酸盐消失法^[16]。

1.3 数据处理

采用 SPSS15.0 对试验数据进行处理及方差分析。

2 结果与分析

由图 1 可以看出,RRS-S 根际土壤细菌菌落数最多,达到 11.41×10^5 个·g⁻¹,而 D-42、D-46、RRS 和 W-S 分别为 5.17×10^5 、 7.95×10^5 、 4.60×10^5 、 8.10×10^5 个·g⁻¹。RRS 分别比 D-42、D-46、RRS-S 和 W-S 降低 11.03%、42.14%、59.68% 和 43.21%。方差分析结果表明,RRS 与 D-46、RRS-S、W-S 根际土壤细菌菌落数在 $P < 0.05$ 水平上差异显著,与 D-42 根际土壤细菌菌落数未达到显著水平。结果表明 RRS 降低了根际土壤中细菌的数量。

由图 2 可以看出,在大豆生长的花期 RRS 根际

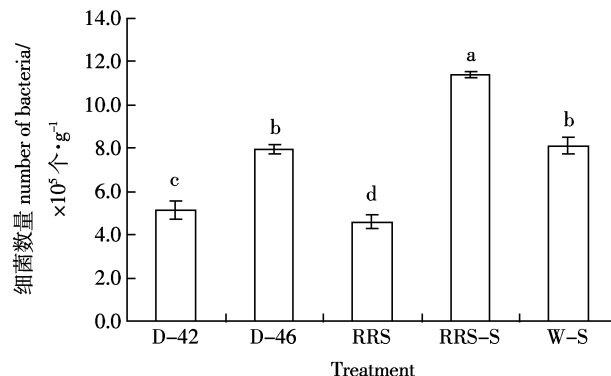


图 1 不同处理对土壤根际细菌数量的影响

Figure 1 The effect on bacteria quantity in rhizospheric soil by different treatment

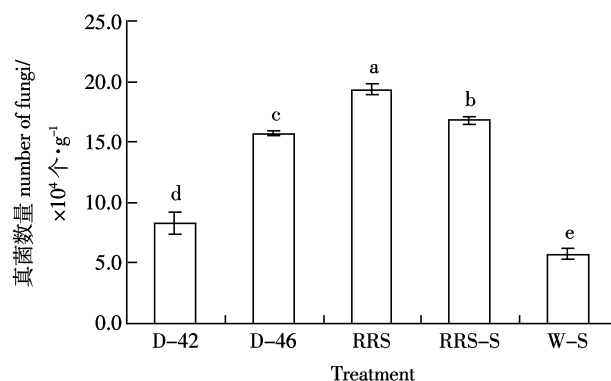


图 2 不同处理对土壤根际真菌数量的影响

Figure 2 The effect on fungi quantity in rhizospheric soil by different treatment

土壤真菌菌落数最多,达到 19.33×10^4 个·g⁻¹,与 D-42、D-46、RRS-S 和 W-S 相比分别高出 2.32、1.23、1.15 和 3.37 倍。方差分析结果表明,RRS 与 D-42、D-46、RRS-S、W-S 根际土壤真菌菌落数在 $P < 0.05$ 水平达到差异显著。

方差分析结果得出不同处理对根际土壤放线菌数量的影响达到显著水平 ($P < 0.05$)。RRS 根际土壤放线菌数量为 6.454×10^5 个·g⁻¹,低于其他 4 个处理。其中以 RRS-S 最高,比 RRS 提高 68.09%,趋势为 RRS-S > D-46 > W-S > D-42 > RRS (图 3)。

由表 1 可知,花期 RRS 的氨化细菌数量为 0.641×10^7 个·g⁻¹,D-42、D-46、RRS-S 和 W-S 比 RRS 分别提高 20.07%、53.25%、66.03% 和 63.95%。方差分析结果得出不同处理对土壤氨化细菌数量的影响达到显著水平 ($P < 0.05$)。不同处理的根际土壤硝化细菌数量以 D-46 为最高,达到 2.472×10^2 个·g⁻¹,RRS 为 1.780×10^2 个·g⁻¹,D-46 是 RRS 的 1.39 倍,RRS 根际土壤硝化细菌数量仅高于 W-S 和 D-42,小于其他栽

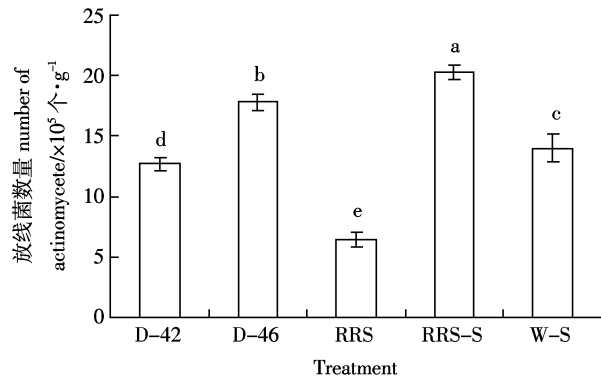


图 3 不同处理对土壤根际放线菌数量的影响

Figure 3 The effect on actinomycete quantity in rhizospheric soil by different treatment

表 1 不同处理对土壤根际氨化细菌、硝化细菌和反硝化细菌数量的影响

Table 1 The effect on ammoniae bacteria, nitrifying bacteria, denitrifying bacteria quantity in rhizospheric soil by different treatment

处理	氨化细菌/ $\times 10^7$ 个 $\cdot g^{-1}$	硝化细菌/ $\times 10^2$ 个 $\cdot g^{-1}$	反硝化细菌/ $\times 10^6$ 个 $\cdot g^{-1}$
D-42	0.802 $\pm$ 0.01d	1.248 $\pm$ 0.03d	0.352 $\pm$ 0.01c
D-46	1.371 $\pm$ 0.06c	2.472 $\pm$ 0.05a	0.517 $\pm$ 0.02b
RRS	0.641 $\pm$ 0.02e	1.780 $\pm$ 0.03c	0.283 $\pm$ 0.02d
RRS-S	1.887 $\pm$ 0.02a	1.998 $\pm$ 0.03b	0.731 $\pm$ 0.02a
W-S	1.778 $\pm$ 0.05b	1.755 $\pm$ 0.06c	0.224 $\pm$ 0.03d

注:表中数据为平均值 $\pm$ 标准误差。Date in the table are Mean $\pm$ SE; 表中不同字母表示 5%差异显著水平。Different letters represent the significant difference at $P<0.05$. 下同。The same below.

培大豆品种;不同处理对根际土壤硝化细菌数量有显著影响($P<0.05$)。不同处理根际土壤反硝化细菌数量以 D-46 和 RRS-S 最高,比 RRS 分别提高 45.26%和 61.29%,总趋势为 RRS-S>D-46>D-42>RRS>W-S。

由表 2 可以看出,除 RRS-S 以外,栽培大豆(D-42、D-46)和野生大豆(W-S)的氨化作用强度均大于 RRS,分别是 RRS 的 1.03 倍、1.05 倍和 1.02 倍;根际

表 2 不同处理对根际土壤生化强度的影响

Table 2 The effect on biochemistry intensity in rhizospheric soil by different treatment

不同强度处理	氨化作用强度/ $mg\cdot g^{-1}$	硝化作用强度/ %	反硝化作用强度/ %
D-42	3.209 $\pm$ 0.04ab	11.87 $\pm$ 0.53d	62.55 $\pm$ 2.47a
D-46	3.267 $\pm$ 0.03a	13.19 $\pm$ 0.47b	57.17 $\pm$ 2.31a
RRS	3.125 $\pm$ 0.05ab	12.97 $\pm$ 0.48c	60.62 $\pm$ 4.17a
RRS-S	3.027 $\pm$ 0.06b	15.98 $\pm$ 0.58a	60.93 $\pm$ 5.61a
W-S	3.181 $\pm$ 0.05a	15.89 $\pm$ 0.53a	61.12 $\pm$ 5.34a

土壤的硝化作用强度表现为 RRS-S>W-S>D-46>RRS>D-42,RRS-S 的根际土壤的硝化作用强度比 RRS 提高了 23.21%,方差分析结果显示各处理间存在显著差异($P<0.05$)。不同处理对根际土壤反硝化强度有不同的影响,但差异不显著。

3 讨论

转基因植物对土壤微生物可能造成的影响一直是人们进行转基因植物安全性评价的焦点,2000 年美国环保署(EPA)将转基因植物对土壤生态系统的影响列为风险评价的重要组成部分,相关报道也在不断增多^[17-19]。但对转基因大豆对根际微生物的研究较少,并且研究场所也不在大豆主产区的黑土生态区,生态环境和野生近缘种的差别很大,随着转基因大豆研制生产不断扩大,对生态系统安全性研究已成为大豆基因工程进一步发展的关键。本试验在黑土生态区通过种植不同品种大豆,讨论转基因大豆 RRS 对土壤微生物菌群及生化强度的影响,具有实践及理论意义。

本试验结果表明,RRS 根际土壤细菌和放线菌的数量均低于亲本非转基因大豆及一些栽培品种。这在一定程度上表明 RRS 的种植可能影响了土壤中微生物的数量。Siciliano 证实了抗草甘膦转基因作物明显抑制了土壤微生物数量;李宁利用传统培养方法证明抗草甘膦转基因大豆抑制了根际土壤细菌数量^[20-22];徐广惠等利用常规培养与 PCR-DGGE 相结合的方法研究表明抗草甘膦转基因大豆显著降低了根际土壤细菌的数量并抑制了细菌群落某些类群的生长^[23]。这些结论与本文结论相同,共同证明了抗草甘膦转基因作物会对某些土壤微生物类群产生影响。但 RRS 根际土壤真菌数量却显著高于其他处理。Powell 和 Castro 的研究结果表明,抗草甘膦转基因大豆根际土壤的镰刀菌(真菌类)群落有明显的增加,指出根际镰刀菌可以将根系分泌物中的草甘膦作为 P 和 C 的来源^[24-25],也有研究表明转基因释放到根际的草甘膦将与碳水化合物或高浓度氨基酸相结合有利于增加镰刀菌生长^[26]。这可能由于抗除草剂目的 DNA 片段进入土壤微生物体内并与其发生重组,通过重组微生物的增殖,进而改变土壤微生物群落结构及其多样性^[23]。

考察不同基因型大豆品种对氨化细菌、硝化细菌和反硝化细菌及氨化作用强度、硝化作用强度和反硝化作用强度的影响,发现不同基因型大豆对土壤氨化细菌数量差异显著,转基因大豆根际土壤硝化细菌和

反硝化细菌数量低于亲本非转基因大豆及部分栽培品种大豆。说明转基因大豆对根际土壤中的氨化细菌、硝化细菌和反硝化细菌有显著的影响作用,这和前人的结论基本一致^[27-29]。不同处理对根际土壤氨化作用强度和硝化作用强度的影响存在显著的差异,但是对反硝化作用强度的影响不显著。这可能由于抗草甘膦基因通过基因工程转移到作物上,使作物体内能够产生杀虫毒素,作物产生的毒素能够被束缚在土壤小颗粒中,很难被降解,并持续产生毒性在被实验的所有土壤类型中,从而对作物生长有益的根际功能菌种群数量发生变化^[30]。Kremer 研究了抗草甘膦转基因大豆与传统大豆根系分泌物成分的区别,表明前者根系分泌物中有更高量的氨基酸和碳水化合物,进而对根际微生物有一定影响^[31]。

本试验得出 RRS 对根际土壤微生物数量有一定的影响。但由于土壤生态系统的结构和微生物群落功能的复杂性,要求我们在评估转基因作物安全性的研究中要包含更多的评估指标,这要比评估单一的指标提供更可靠的科学依据^[26]。因此其影响机制及更多的评价指标有待于进一步的研究。

4 结论

(1)RRS 对根际土壤细菌和放线菌表现为促进作用;对土壤氨化细菌、硝化细菌和反硝化细菌也表现出不同程度的促进作用;但对根际土壤真菌表现为抑制作用。

(2)RRS 对根际土壤氨化作用强度和硝化作用强度有显著影响,但对反硝化作用强度的影响不明显。

(3)总体来看,RRS 不同程度上降低了根际土壤微生物的数量和生化强度,并可能改变了土壤微生物群落结构。

参考文献:

- [1] 张井勇,孙 寰,王曙明,等. 抗草甘膦转基因大豆利弊[J]. 大豆科学, 2009, 28(3):543-547.
ZHANG Jin-yong, SUN Huan, WANG Shu-ming, et al. Discussion on advantage and disadvantage of transgenic soybean resistant[J]. *Soybean Science*, 2009, 28(3):543-547.
- [2] Wolfenbarger L L, Phifer P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants[J]. *Science*, 2000, 290(5499):2088-2093.
- [3] 聂呈荣,骆世明,王建武. Bt 玉米光合作用和生长性状的变化[J]. 生态学报, 2006, 26(6):1957-1962.
NIE Cheng-rong, LUO Shi-ming, WANG Jian-wu. Change of photosynthesis and growth of Bt corn[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(6):1957-1962.
- [4] 孙彩霞,武志杰,陈利军. 转 Bt 基因玉米的生态安全性研究进展[J]. 生态学报, 2004, 24(4):798-805.
SUN Cai-xia, WU Zhi-jie, CHEN Li-jun. Advances in the eco-safety researches of transgenic Bt maize[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(4):798-805.
- [5] Gyamfi S, Pfeifer U, Stierschneider M, et al. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and Pseudomonas communities in the rhizosphere[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 41(3):181-190.
- [6] Donegan KK, Seidler RJ, Fieland VJ, et al. Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: Persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations[J]. *Journal of Applied Ecology*, 1997, 34(3):767-777.
- [7] Donegan KK, Palm C J, Fieland V J, et al. Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki endotoxin[J]. *Applied Soil Ecology*, 1995, 2(2):111-124.
- [8] 李艳红,祝长青,覃建兵. 转基因小麦的环境风险[J]. 新疆师范大学学报(自然科学版), 2007, 26(3):140-142.
LI Yan-hong, ZHU Chang-qing, QIN Jian-bing. The environmental risks of transgenic wheat[J]. *Journal of Xinjiang Normal University(Natural Sciences Edition)*, 2007, 26(3):140-142.
- [9] Finlay B J, Maberly S C, Cooper J I. Microbial diversity and ecological function[J]. *Oikos*, 1997, 80:209-213.
- [10] Groffman P M, Bohlen P J. Soil and sediment biodiversity cross system comparisons and largescale effects[J]. *Bio Science*, 1999, 49(2):139-148.
- [11] Angle J S. Release of transgenic plants: Biodiversity and population level considerations[J]. *Molecular Ecology*, 1994, 3:45-50.
- [12] 王洪兴,陈 欣,唐建军,等. 释放后的转抗病虫基因作物对土壤生物群落的影响[J]. 生物多样性, 2002, 10(2):232-237.
WANG Hong-xing, CHEN Xin, TANG Jian-jun, et al. Influence of released transgenic pest- and disease-resistant crops on plant-associated microorganisms in soil[J]. *Biodiversity Science*, 2002, 10(2):232-237.
- [13] 王洪兴,陈 欣,唐建军,等. 转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(1):89-94.
WANG Hong-xing, CHEN Xin, TANG Jian-jun, et al. Influence of Bt transgenic rice on cultivable microorganisms in soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(1):89-94.
- [14] Jepson P C, Croft B A, Pratt G E. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants[J]. *Molecular Ecology*, 1994, 3:81-89.
- [15] 胡建军,张蕴哲,卢孟柱,等. 欧洲黑杨转基因稳定性及对土壤微生物的影响[J]. 林业科学, 2004, 40(5):105-109.
HU Jian-jun, ZHANG Yun-zhe, LU Meng-zhu, et al. Transgene stability of transgenic populus nigra and its effects on soil microorganism[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2004, 40(5):105-109.
- [16] 许光辉,郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:农业出版社, 1986:110-170.

- XU Guang-hui, ZHENG Hong-yuan. Soil microbial analysis handbook [M]. Beijing: Agriculture Publishing House of China, 1986: 110-170.
- [17] Glandorfd C M, Bakker PAHM, Van, Loon L C, et al. Influnc of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora[J]. *Acta Bot Neerl*, 1997, 46(1): 85-104.
- [18] Oger P, Petit A, Dessaux Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment[J]. *Nature Biotechnol*, 1997, 15(4): 369-372.
- [19] 赵海泉, 曹珂珂, 王凤娟, 等. bar 基因对盆栽小麦根际微生物的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(1): 1-7.
- ZHAO Hai-quan, CAO Ke-ke, WANG Feng-juan, et al. Effects of bar-gene on microbial flora in wheat rhizosphere soil[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2007, 34(1): 1-7.
- [20] Siciliano S D, Theoret C M, Defreitas J R, et al. Differences in the microbial communities associated with roots of different culti vars of canola and wheat[J]. *Can J Microbiol*, 1998, 44: 844-851.
- [21] Siciliano S D, Germida J J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic Brassica napus cv. Quest, compared to the non-transgenic B. napus cv. Excel and B. rapa cv. Parkland[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29: 263-272.
- [22] Li N, Wang H Y. Effect of RRS on nitrogen transition and related bacteria in rhizosphere soil[J]. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 2007, 14(4): 333-336.
- [23] 徐广惠, 王宏燕, 刘 佳. 抗草甘膦转基因大豆(RRS)对根际土壤细菌数量与多样性的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(8): 4535-4541.
- XU Guang-hui, WANG Hong-yan, LIU Jia. Effects of RRS on the amount and diversity of bacteria in rhizospheric soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(8): 4535-4541.
- [24] Powell J R, Swanton C J. A critique of studies evaluating glyphosate effects on diseases associated with *Fusarium spp*[J]. *Weed Res*, 2008, 48: 307-318.
- [25] Castro J V, Peralba M C R, Ayub MAZ. Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor [J]. *J Environ Sci Health B*, 2007, 42(8): 883-886.
- [26] Kremer RJ. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms[J]. *European Journal of Agronomy*, 2009, 31: 153-161.
- [27] Oger P, Mansouri H, Dessaux Y. Effects of crop rotation and soil alteration of the soil microflora generated by the culture of transgenic plants producing opines[J]. *Microbiology Ecology*, 2001, 9(7): 881-890.
- [28] Hopkins D W, Webster E A, Chudek J A, et al. Decomposition in soil of tobacco plants with genetic modifications to lignin biosynthesis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(11): 1455-1462.
- [29] Griffiths B S, Ritz K, Ebbelwhite N, et al. Soil microbial community structure; Effects of substrate loading rates[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(1): 145-153.
- [30] Paoletti M G, Gentic I D P. Engineering in agriculture and the environment: Assessing risk and benefits[J]. *Bioscience*, 1996, 46: 665-671.
- [31] Kremer R J, Means N E. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2005, 85(15): 1165-1174.