

# 种植 Bt 玉米对土壤微生物活性和肥力的影响

王建武, 冯远娇

(华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广州 510642)

**摘要:**在温室种植比较了美国 Bt 玉米(34B24(Mon810))与同源常规玉米(34B23)、中国 Bt 玉米(1246×1482(Cry1A))与常规玉米(农大 3138)对土壤微生物活性和肥力的影响。结果表明,两个 Bt 玉米品种 5 次取样(25、39、53、67、82d)的根际土壤中都能检测到 Bt 蛋白,含量在  $20\sim 80\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{dry soil}$  之间。4 个处理土壤硝化作用和精氨酸氨化作用强度在所有取样时期均没有显著差异;土壤蔗糖酶、土壤蛋白酶和酸性磷酸酶活性则分别只在 25d(农大 3138<34B24 与 1246×1482)、67d(34B24>1246×1482 和农大 3138)和 67d(34B24>其它 3 个处理)存在显著差异;土壤脱氢酶、土壤脲酶和土壤呼吸强度则在多数取样时期多个处理间存在显著差异,说明其与玉米品种特性关系密切,其中,土壤脱氢酶和脲酶活性的差异在两个 Bt 玉米品种、Bt 与同源常规品种(34B24 与 34B23)、Bt 与常规品种(1246×1482 与农大 3138)以及常规与常规品种(34B23 与农大 3138)之间均没有一致的规律,但 34B24 与 34B23 处理的土壤呼吸作用强度高于 1246×1482 与农大 3138,说明种植该系列品种的土壤中微生物总活性较高、土壤代谢旺盛。82d 后 4 个处理土壤有机质、NPK 全量与速效养分含量均没有显著差异。本试验观测期种植 Bt 玉米并没有导致土壤微生物活性和土壤肥力的不利变化,但残留在根际土壤中的 Bt 蛋白是否达到生物有效活性浓度需要用生测法验证。商品化大规模种植 Bt 玉米对土壤微生物活性和肥力的可能影响仍需要在不同生态区开展长期的定位监测与评价。

**关键词:**Bt 玉米;土壤微生物活性;土壤肥力;土壤生态系统功能

**文章编号:**1000-0933(2005)05-1213-08 **中图分类号:**S154 **文献标识码:**A

## Effects of planting Bt corn on soil microbial activity and soil fertility

WANG Jian-Wu, FENG Yuan-Jiao (Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(5): 1213~1220.

**Abstract:** Bt (*Bacillus thuringiensis*) corn is one of the four large-scale commercialized GM crops being planted around the world. The debate surrounding the potential ecological risk of Bt corn is ongoing because of the persistence of larvicidal Bt proteins in soil after release from Bt corn root exudates and/or by plant decomposition. The majority of published papers has examined the effects of Bt corn on cultivation of ecologically important soil microorganisms or has used non-cultivation based molecular genetic analysis of differences in microbial community structure. There are no reports on differences in soil activity and fertility between soils planted with a Bt-crop and the non-Bt parental or cultivars of the same crop. This study determines and compares differences in microbial activities and fertility of soils planted with two different Bt-corn varieties (34B24 and 1246×1482) and two non-Bt cultivars, including one non-Bt parental counterpart of 34B24 (34B23) and one non-Bt hybrid (Nongda3138). Plants were grown in the greenhouse using a complete randomized block design. Samples were collected at different corn growth stages on days 25, 39, 53, 67, and 82. Soil microbial activity was assessed by measuring soil nitrification, arginine ammonification, and respiration of  $\text{CO}_2$ , and activity of the enzymes sucrase, acid phosphatase, dehydrogenase, and urease. Additionally, Bt protein contents in rhizosphere soil, organic matter content, total and available N/P/K in the surrounding soil were measured. Results showed that Bt protein concentration in the rhizosphere of one variety, 34B24, fluctuated between  $46.593$  and  $76.943 \text{ ng dry soil g}^{-1}$  throughout the season, whereas, there was a steady increase in

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(3027027);广东省自然科学基金资助项目(000569,021043)

**收稿日期:**2004-05-31;**修订日期:**2004-12-08

**作者简介:**王建武(1966~),男,甘肃天水人,博士,教授,主要从事分子生态学研究. E-mail: wangjw@scau.edu.cn

**Foundation item:** The National Natural Science Foundation of China (No. 3027027) and the Natural Science Foundation of Guangdong (No. 00569,021043)

**Received date:** 2004-05-31; **Accepted date:** 2004-12-08

**Biography:** WANG Jian-Wu, Ph. D., Professor, mainly engaged in molecular ecology. E-mail: wangjw@scau.edu.cn

concentration from 21.63 to 62.53 ng dry soil  $\text{g}^{-1}$  in the rhizosphere of the other variety, 1246  $\times$  1482. In general, soil microbial activity and fertility indicators comparisons grouped into three categories. Firstly, soils planted with any of the corn varieties, Bt or non-Bt, were not significantly different in soil nitrification, arginine ammonification, soil organic matter content, total N/P/K and available N/P/K. Secondly, significant differences were detected in sucrase, protease and acid phosphatase activities but only at one sampling time and for only two treatments that did not correspond to Bt- versus non-Bt hybrids. Thirdly, there were significant differences in dehydrogenase, and urease activity, and soil respiration at most sampling times among several treatments. However, all the significant differences were not found between Bt and the non-Bt cultivars. There was also no apparent correlation of these differences with the changes in Bt protein concentration that were observed. The only consistent difference was that soil respiration of one set of cultivars, 34B24 and 34B23, was higher than the other cultivar set throughout the growth season. This illustrates a varietal difference not associated with Bt protein production that may have contributed to the variation of microbial activity that was observed in these soils. In conclusion, although the Bt protein persists in the rhizosphere soil, there was no detectable negative effect resulting from it on soil microbial activities and fertility. Bioassays are still need to determine if Bt protein in rhizosphere soil remains active after release into soils. If Bt protein remains active then the insecticidal threshold concentrations need to be determined. Future work will address the long-term effects of Bt corn in soil ecosystem.

**Key words:** Bt corn; soil microbial activity; soil fertility; soil ecosystem function

Bt 玉米是全球商品化最快的抗虫转基因作物之一。2003 年全球共种植 Bt 玉米 1550 万  $\text{hm}^2$ , 占转基因作物总面积的 23%<sup>[1]</sup>。美国商品化种植的 Bt 玉米主要是 Bt11、Mon810 和 event 176<sup>[2]</sup>, 其中 Monsanto 的 Mon810 已于 1998 年获准在我国辽、吉、黑三省进行环境释放<sup>[3]</sup>。我国中国农业大学选育的 Bt 玉米也已获准在河北和东北等地环境释放<sup>[3]</sup>。Bt 玉米的 Bt 蛋白可通过根系分泌物、残茬分解或秸秆还田以及花粉飘落进入土壤生态系统<sup>[4,5]</sup>, 并快速吸附在土壤活性颗粒表面, 与之紧密结合而避免了生物降解<sup>[6]</sup>, 至少保持 8 个月的杀虫活性<sup>[6]</sup>。Bt 玉米的长期种植与秸秆还田, 可能使 Bt 蛋白在土壤生态系统中富集, 影响土壤的特异生物种群、功能类群以及土壤生物多样性和土壤生态学过程<sup>[7~9]</sup>。Bt 玉米对土壤生态系统的可能影响是生物安全研究的新热点<sup>[5~10]</sup>。

目前, Bt 玉米对土壤生态系统影响的研究主要集中在对土壤生物种类及数量的影响方面。种植 Bt 玉米的土壤与同源常规玉米的土壤相比, 可培养细菌、放线菌和真菌的数量和种类没有显著差异, 可培养土壤原生动物数量、线虫总数也没有显著差异<sup>[5]</sup>。以上报道中, 对土壤中最敏感的微生物的研究仅局限在占土壤微生物不到 1% 的可人工培养种类上, 不能代表土壤生物多样性的全貌<sup>[11]</sup>, 且仅与同源常规品种相比较寻找差异, 没有考虑 Bt 玉米之外其它生态环境因子或管理措施(如季节、气候、施肥、轮作等)对土壤微生物群落结构影响的正常变化幅度<sup>[12]</sup>, 尚未有探讨 Bt 玉米对土壤微生物影响的生态后果及其与土壤生态系统功能关系的报道<sup>[13]</sup>。

种植 Bt 玉米对土壤微生物的潜在影响是 Bt 蛋白在土壤中持续时间和土壤微生物活性变化的函数<sup>[9]</sup>。土壤酶和主要生物化学过程的强度可以反映土壤生态系统中土壤微生物的活性和养分循环功能的状况, 而土壤化学肥力是反映土壤微生物活动的效果、土壤供肥能力和质量状况的重要指标。本文在前期研究 Bt 玉米秸秆分解释放的 Bt 蛋白土壤降解动态<sup>[14]</sup>及其秸秆还田对土壤酶活性和肥力影响<sup>[15]</sup>、以及应用 16 sDNA PCR-DGGE 研究根际细菌群落变化<sup>①</sup>的基础上, 进一步研究种植 Bt 玉米对土壤生态系统影响的生态后果, 并通过多个品种的比较, 区分 Bt 玉米与常规玉米品种与土壤微生物活性和肥力的关系, 为 Bt 玉米的生物安全评价提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用玉米品种为中国农业大学培育的 Bt 玉米 1246  $\times$  1482 (Cry1A) 和常规玉米农大 3138 (Nongda3138)<sup>②</sup>, 美国先锋种子公司的 Bt 玉米 34B24 (Mon810) 和其同源常规玉米 34B23<sup>③</sup>。

① Wang J W, C. Nakatsu. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates of Bt corn has no apparent effect on rhizobacteria community confirmed by DGGE of 16S rDNA-PCR. *The 7<sup>th</sup> International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*. October 10<sup>th</sup>~16<sup>th</sup>, 2002, Beijing, China

② 中国农业大学戴景瑞院士惠赠

③ 美国普渡大学农学系 Cindy Nakatsu 博士惠赠

## 1.2 温室试验

试验在玻璃温室水泥池内进行,土壤为赤红壤,质地为粘壤土,基本理化性状为:pH 6.16,有机质  $18.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,全氮  $0.9\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,全磷(P) $0.70\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,全钾(K) $16.75\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,阳离子交换量  $9.54\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。试验采用随机区组设计,共 4 个小区 ( $3.0\text{m}\times 3.4\text{m}$ ),2002 年 10 月 12 日播种,各小区每品种种植 10 株(株距 34cm,行距 75cm),共 160 株,隔 3d 浇水。

播前每穴施复合肥(NPK 比例为 1:1:1)10g,10 月 28 日、11 月 11 日、11 月 21 日、11 月 30 日和 12 月 20 日 5 次追肥,每次每株施复合肥 15g。分别于 2002 年 11 月 6 日(播种后 25d,苗期)、11 月 20 日(播种后 39d,拔节期)、12 月 4 日(播种后 53d,喇叭口期)、12 月 18 日(播种后 67d,抽穗期)和 2003 年 1 月 2 日(播种后 82d,开花授粉期)取样。取样时各小区每品种随机选取 1 株,在距离茎 5cm 的 4 个方位用土钻采集 0~20cm 土壤样品,4 个方位的土样混合为一个混合土样,然后挖出整株玉米,土样和玉米带回实验室处理。

土样过筛(2mm),4℃冰箱保存,分析土壤脱氢酶、蛋白酶、酸性磷酸酶、蔗糖酶和脲酶活性以及土壤呼吸作用、土壤硝化作用和土壤精氨酸氨化作用。82d 的样品还分析了土壤有机质、全氮、碱解氮、全磷、速效磷、全钾、速效钾的含量。

玉米带回实验室,在茎底部生长点处切断,根系用来收集根际土壤,方法如下:用手(带胶套)小心除去附着在根上的土粒,把根装入灭菌塑料瓶中,加适量的 0.85% 的 NaCl,摇床振荡清洗 20min,把根取出,土壤混浊液离心 5min(4000r/min),弃掉上清液,加入 1ml NaCl(0.85%),用 Tip 头混匀,全部吸入 2ml 灭菌离心管中,离心 2min(14000r/min),弃掉上清液, -80℃冰箱保存,待全部实验结束后,用 ELISA 试剂盒测定根际土壤中 Bt 蛋白含量。

## 1.3 测定方法

**1.3.1 Bt 蛋白含量的测定**<sup>[14]</sup> Bt 蛋白含量用美国 EnviroLogix 公司生产的 AP003 ELISA 定量试剂盒测定,包括 1 块包埋好抗体的 96 孔( $12\times 8$ )平板及配套试剂,4 个 Cry1Ab 标样:浓度分别为 0、0.5、2.5、5.0 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。1.5ml 离心管加 0.2g 根际土壤和 0.5ml 1× Cry1Ab 提取/稀释缓冲液,振荡 1min(200r/min)混匀,离心 10min(12000r/min),取上清液,稀释 51 倍。加 100 $\mu\text{l}$  样品提取液于待测样品孔中,保鲜膜覆盖,振荡 15min(200r/min),每个微孔中加 100 $\mu\text{l}$  Cry1Ab-enzyme conjugate,保鲜膜覆盖,振荡 1h(200r/min),去膜,Wash Buffer 冲洗 3 次,每一个微孔中加 100 $\mu\text{l}$  的底物,保鲜膜覆盖,振荡 30min(200r/min),最后加 100 $\mu\text{l}$  终止液,充分混匀,30min 内在波长 450nm 下用酶标仪测定其 OD 值,根据标准曲线求出 Bt 蛋白的含量,用每克干土中所含的 Bt 蛋白纳克数表示( $\text{ng Bt protein}\cdot\text{g}^{-1}\text{dry soil}$ )。

**1.3.2 土壤指标的测定** 土壤脱氢酶活性、蔗糖酶活性、蛋白酶活性、脲酶活性、酸性磷酸酶活性、土壤呼吸作用、土壤硝化作用和土壤精氨酸氨化作用均参照 Alef<sup>[16]</sup>的方法,结果以每克干土产生的物质的微克数表示( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{dry soil}$ )。土壤有机质、全氮、碱解氮、全磷、速效磷、全钾、速效钾含量的测定则参照鲍士旦<sup>[17]</sup>的方法。

## 1.4 数据分析

所有数据均用 Microsoft Excel 和 SAS 8.0 统计软件分析,其中多重比较使用邓肯氏新复极差检验法,简称 DMRT 法。

## 2 结果与分析

### 2.1 根际土壤中 Bt 蛋白的含量

种植 2 个 Bt 玉米品种的根际土壤中均可以检测到 Bt 蛋白(图 1),而常规玉米根际土壤中则检测不到,这与许多报道结果一致<sup>[5, 18~25]</sup>。无论根际土壤中的 Bt 蛋白是玉米根系分泌的,还是玉米根表皮组织死亡后释放的,Bt 玉米的根际土壤中的确存在 Bt 蛋白。

2 个 Bt 玉米品种根际土壤中的 Bt 蛋白含量的动态变化略有不同(图 1),34B24 品种根际中的含量波动在  $46.593\sim 76.943\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  之间,1246 $\times$ 1482 品种为  $21.63\sim 62.53\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ;观测期 34B24 品种根际土壤中 Bt 蛋白含量在 25、39、53 和 82d 高于 1246 $\times$ 1482 品种,但只在 39d 显著高于对方( $t=3.0872, p=0.0215$ );2 个品种根际土壤中 Bt 蛋白含量在生育后期都有所增加。34B24 与 1246 $\times$ 1482 品种根际土壤中 Bt 蛋白含量的差异可能是二者导入的 Bt 基因结构不同所致<sup>[14]</sup>。从图 1 可知,Bt 玉米生长期间根际土壤中的 Bt 蛋白并没有大量累积,作者研究得出 Bt 蛋白土壤降解的半衰期为 3.43d(34B24)和 2.73d(农大 61(与 1246 $\times$ 1482 品种导入相同 Bt 基因的 Bt 玉米))<sup>[14]</sup>,源于 Bt 玉米根系的 Bt 蛋白不断进入根际土壤,又不断被根际土壤中的微生物降解,其累积量是分泌量与被降解量的差,本研究中,2 个 Bt 玉米品种生长期间根际土壤中 Bt 蛋白的最高含量只有  $76.943\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

### 2 对土壤酶活性的影响

**2.2.1 土壤脱氢酶** 土壤脱氢酶主要酶促碳水化合物、有机酸等有机物质的脱氢作用,其高低标志着土壤微生物分解代谢的强弱,反映了微生物总活性<sup>[16, 26, 27]</sup>。供试的 4 个品种中(图 2),2 个 Bt 玉米品种在 39d 和 67d 存在显著差异( $34\text{B}24>1246\times 1482$ );Bt 玉米 34B24 和同源常规玉米 34B23 相比,任何取样时间均没有显著差异;两个常规玉米品种 34B23 与农大 3138 在 53d 存在显著差异( $34\text{B}23>\text{农大 } 3138$ )。可见,无论是 Bt 玉米还是常规玉米,种植不同品种的玉米在某些生育期对土壤脱氢酶

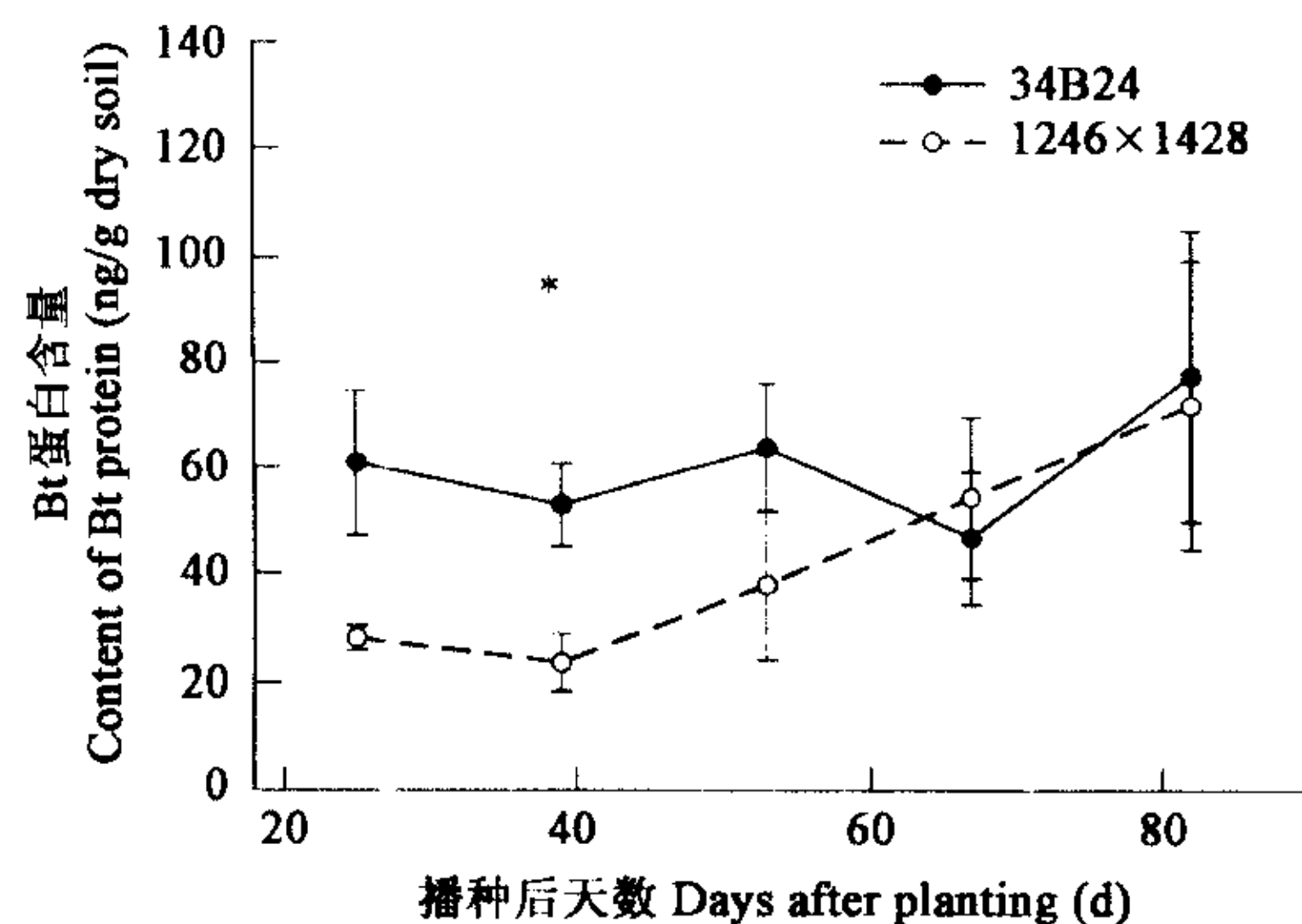


图1 根际土壤中 Bt 蛋白的含量变化(M±SD)

Fig. 1 Changes of Bt protein contents in rhizosphere soil (M±SD)

\* 表示差异显著(成组数据  $t$  检验,  $p \leq 0.05$ ) Shows the significant difference (group Student's  $t$ -test,  $p \leq 0.05$ )

活性的影响不同(图 2),其共同的变化规律是苗期活性较高。

**2.2.2 土壤蔗糖酶** 土壤蔗糖酶能水解蔗糖生成葡萄糖和果糖,它直接参与土壤 C 素循环,其产物是植物和微生物的营养源,反映了土壤环境中有机物分解代谢中蔗糖的代谢强弱<sup>[16,26,27]</sup>。供试 4 个品种只有农大 3138 处理的活性在 25d 显著小于 34B24 与 1246×1482 处理,其它取样时间 4 个处理均没有显著差异(图 3)。

**2.2.3 土壤蛋白酶** 土壤蛋白酶参与土壤中存在的氨基酸、蛋白质以及其它含蛋白质氮的有机化合物的转化,其活性强度常用来表征土壤 N 素供应强度<sup>[16,26,27]</sup>。4 个品种处理中只在 67d 存在显著差异(34B24>1246×1482 和农大 3138 处理,图 4),说明不同处理对土壤 N 素供应强度没有显著影响。

**2.2.4 土壤脲酶** 脲酶是土壤中的主要酶类,能酶促尿素生成氨、二氧化碳和水,它直接参与土壤中含 N 有机化合物的转化,对土壤中氮的转化,特别是对尿素的利用率等有重要影响作用<sup>[16,26,27]</sup>。4 个品种处理土壤脲酶活性在拔节期(39d)至抽穗期(67d)之间的 3 次取样中存在显著差异(图 5),39d 时,34B23>34B24 和 1246×1482 处理;53d 时,1246×1482>34B24 处理;

67d 时,34B24<34B23 处理和农大 3138,不同品种处理间土壤脲酶的差异并不一致,且不持久。

**2.2.5 土壤酸性磷酸酶** 土壤酸性磷酸酶的酶促作用能加速土壤有机磷的脱氢速度,从而提高磷的有效性,释放出的无机磷可供植物和土壤微生物利用,它是表征土壤中有效磷状况的主要酶类<sup>[16,26,27]</sup>。同时土壤酸性磷酸酶活性还是一个表征土壤管理系统效果和土壤有机质含量的重要指标<sup>[28]</sup>。4 个品种处理之间只在 67d 存在显著差异(34B24>其它 3 个处理,图 6),说明种植不同品种并不影响土壤速效磷的供应能力。

### 2.3 对土壤主要生物化学过程的影响

**2.3.1 土壤呼吸作用** 土壤呼吸作用强度是指微生物在一定时间内呼吸所释放的 CO<sub>2</sub> 量,反映了土壤中微生物的总活性,可以代表土壤代谢的旺盛度<sup>[16,29]</sup>。由图 7 可知处理间不同取样时间存在显著差异:25d 时,34B24>农大 3138;39d 时,34B24>1246×1482;67d 时,34B24 和 34B23>1246×1482 和农大 3138;82d 时 34B24>1246×1482 和农大 3138。34B24 和 34B23 处理的土壤呼吸作用强度较大,尤其是 34B24 处理,其强度在 5 次取样时期均最高,种植 34B24 品种的土壤中微生物总活性高、土壤代谢旺盛。

**2.3.2 土壤硝化作用** 土壤硝化作用是由硝化细菌作用下使氨氧化成硝酸盐的过程,土壤硝化作用的强弱在一定程度上反映了硝化细菌的多少,土壤中的硝化作用是导致氮素损失和环境污染的重要原因之一<sup>[16,29]</sup>。温室玉米地中土壤硝化作用强度的

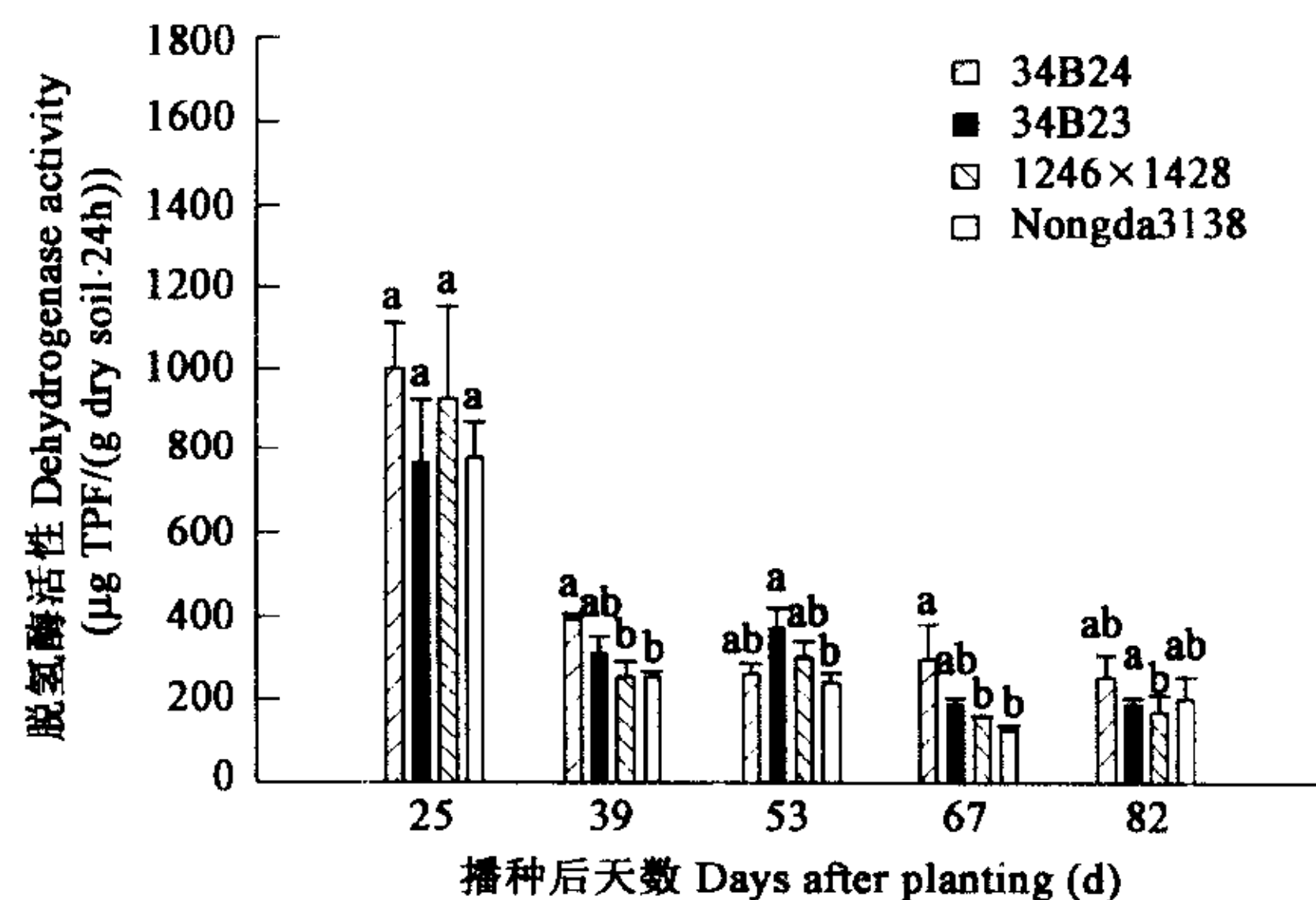


图2 玉米生长期间土壤脱氢酶活性(M±SD)

同一取样时期有相同字母表示数据间差异不显著(DMRT 法,  $p = 0.05$ ),下同

Fig. 2 Soil dehydrogenase activity during the growth period of corn (M±SD)

Columns marked by the same lower-case letters in each sampling time were not significantly different at 0.05 level. Duncan's multiple range test; the same below

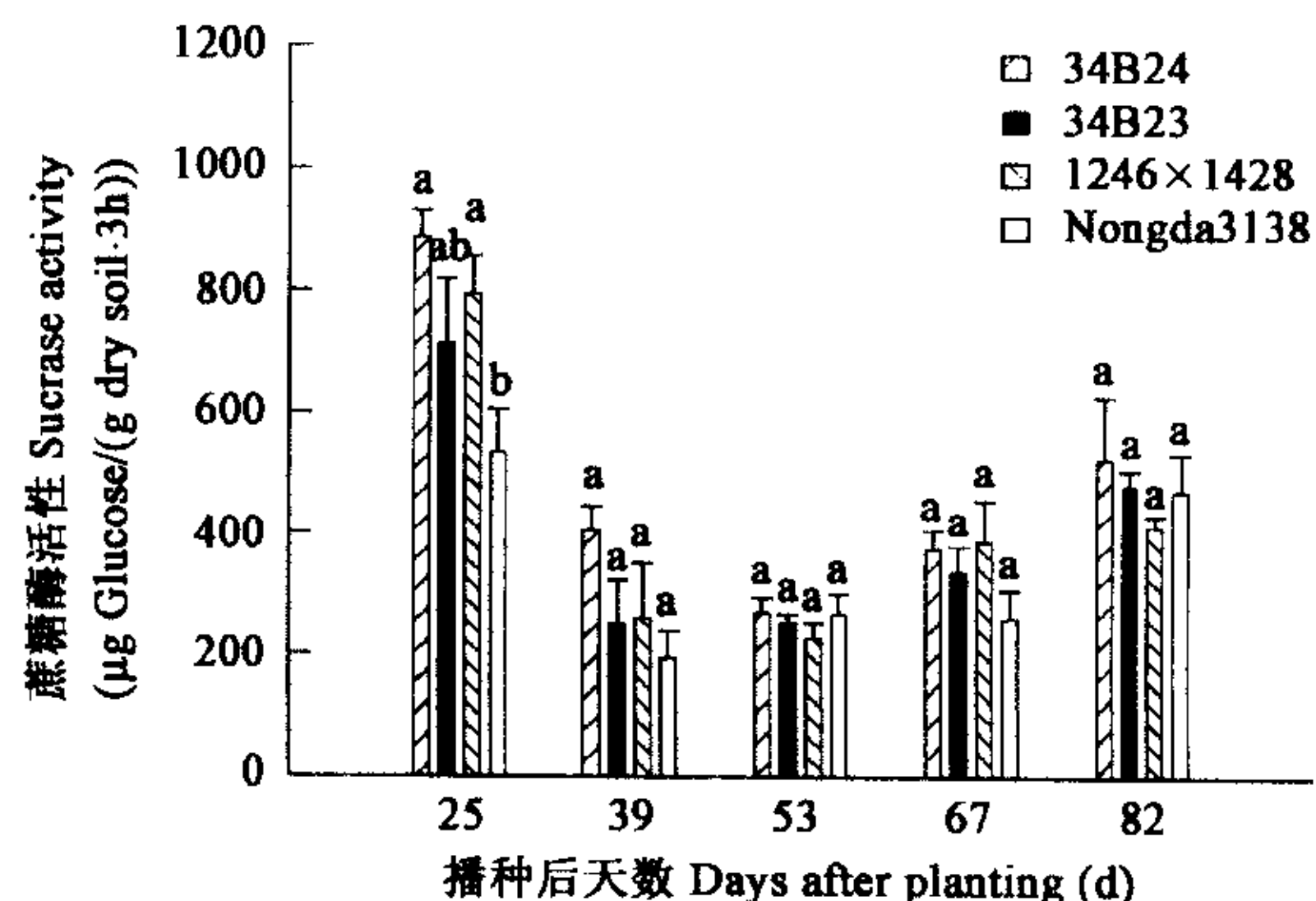


图3 玉米生长期间土壤蔗糖酶活性(M±SD)

Fig. 3 Soil sucrase activity during the growth period of corn (M±SD)

空间变异在苗期和拔节期较大(图 8),同一处理 4 个重复小区之间的差异较大,后期空间变异较小。所有取样期 4 个处理间土壤硝化作用强度均没有显著差异(图 8)。

**2.3.3 土壤精氨酸氨化作用** 土壤氨化作用是由氨化细菌作用下使有机氮(例如蛋白质和核酸)转化成氨的过程,最普遍的过程是精氨酸氨化作用,其强弱在一定程度上反映了氨化细菌的多少<sup>[16,29]</sup>。温室玉米田精氨酸氨化作用强度的空间变异比硝化作用更大,5 次取样中各处理的 4 个重复小区的变异均很大(图 9),以至于 4 个处理之间的差异均未达到统计学显著水平。

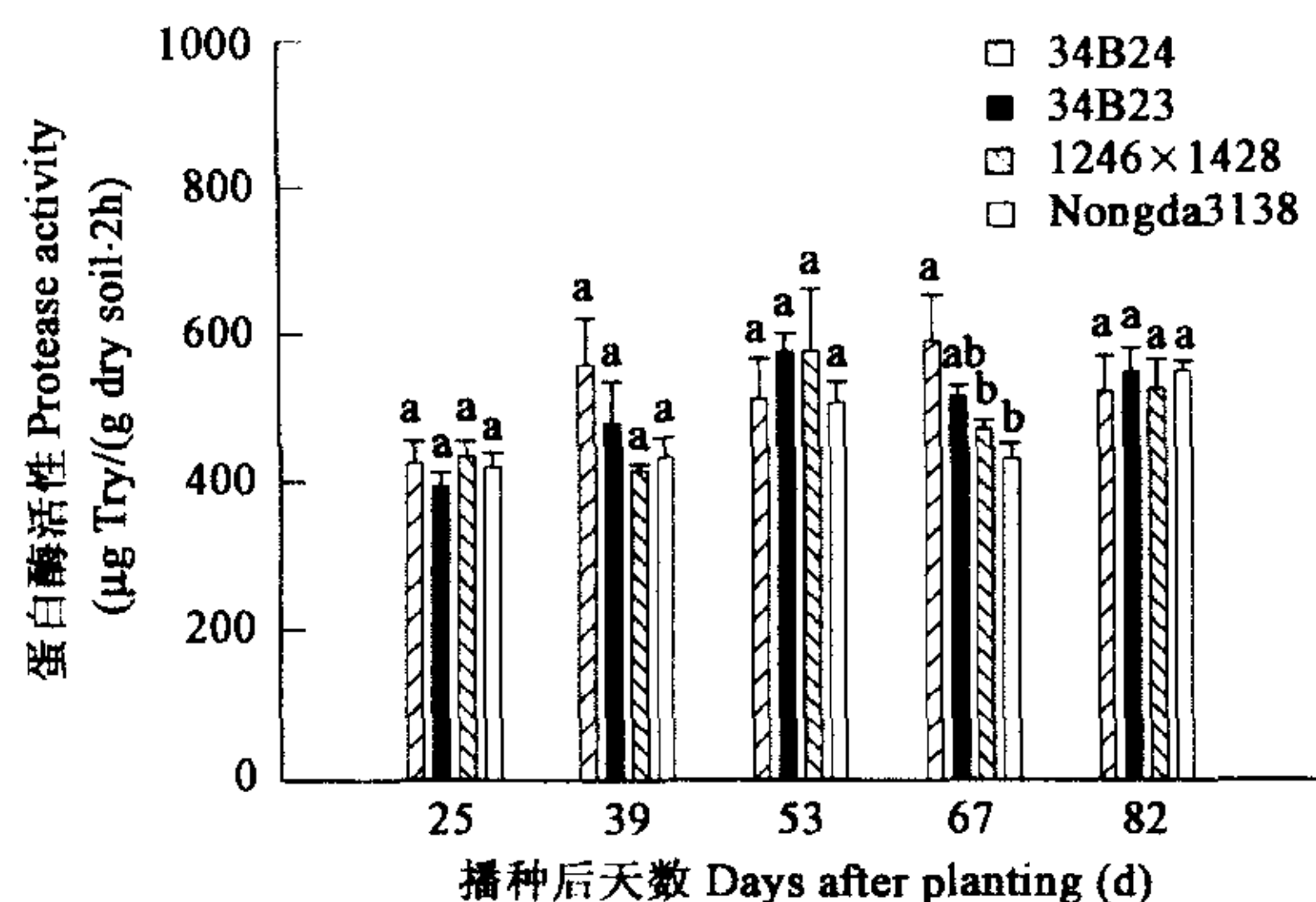


图 4 玉米生长期间土壤蛋白酶活性(M±SD)

Fig. 4 Soil protease activity during the growth period of corn (M±SD)

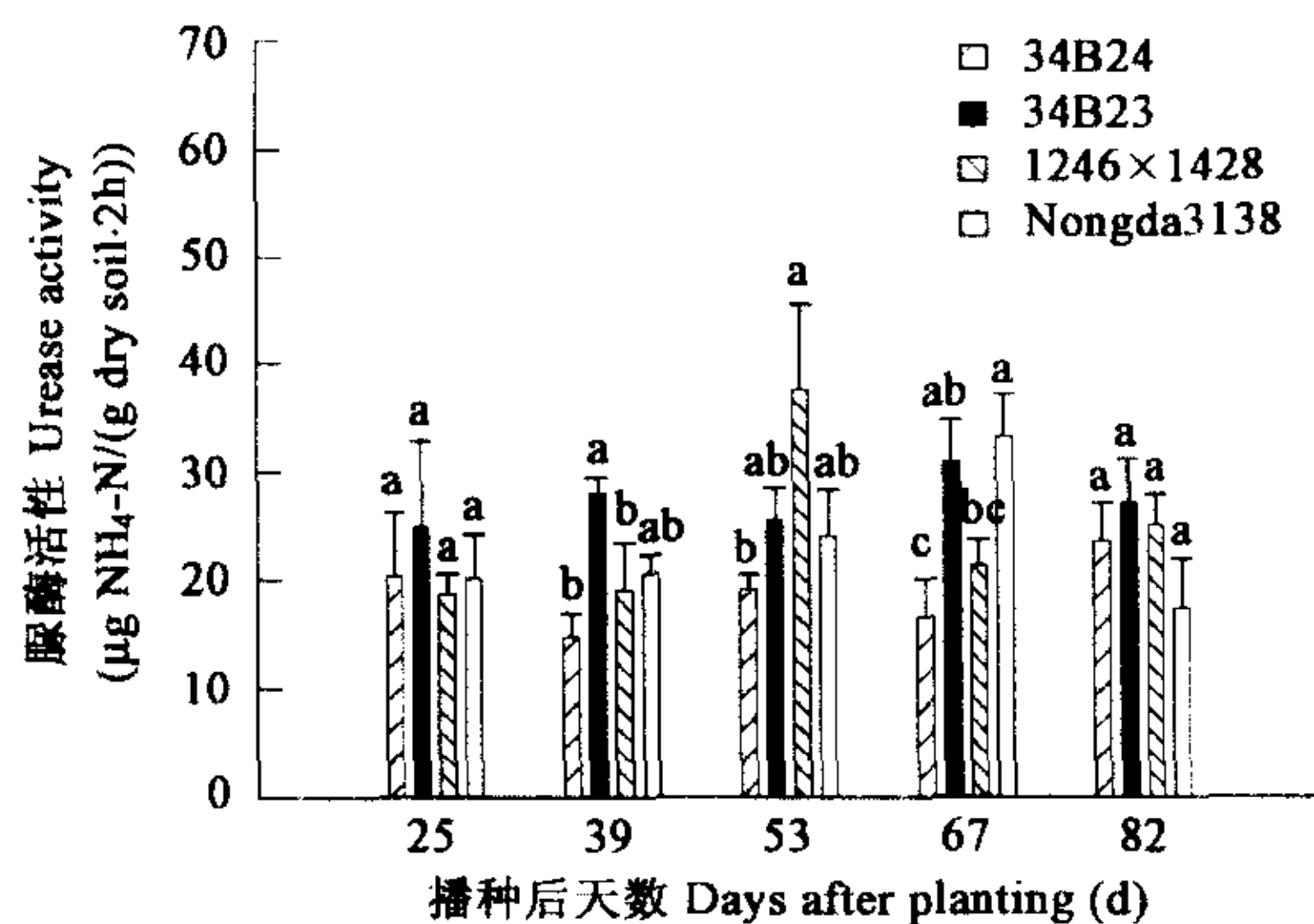


图 5 玉米生长期间土壤脲酶活性(M±SD)

Fig. 5 Soil urease activity during the growth period of corn (M±SD)

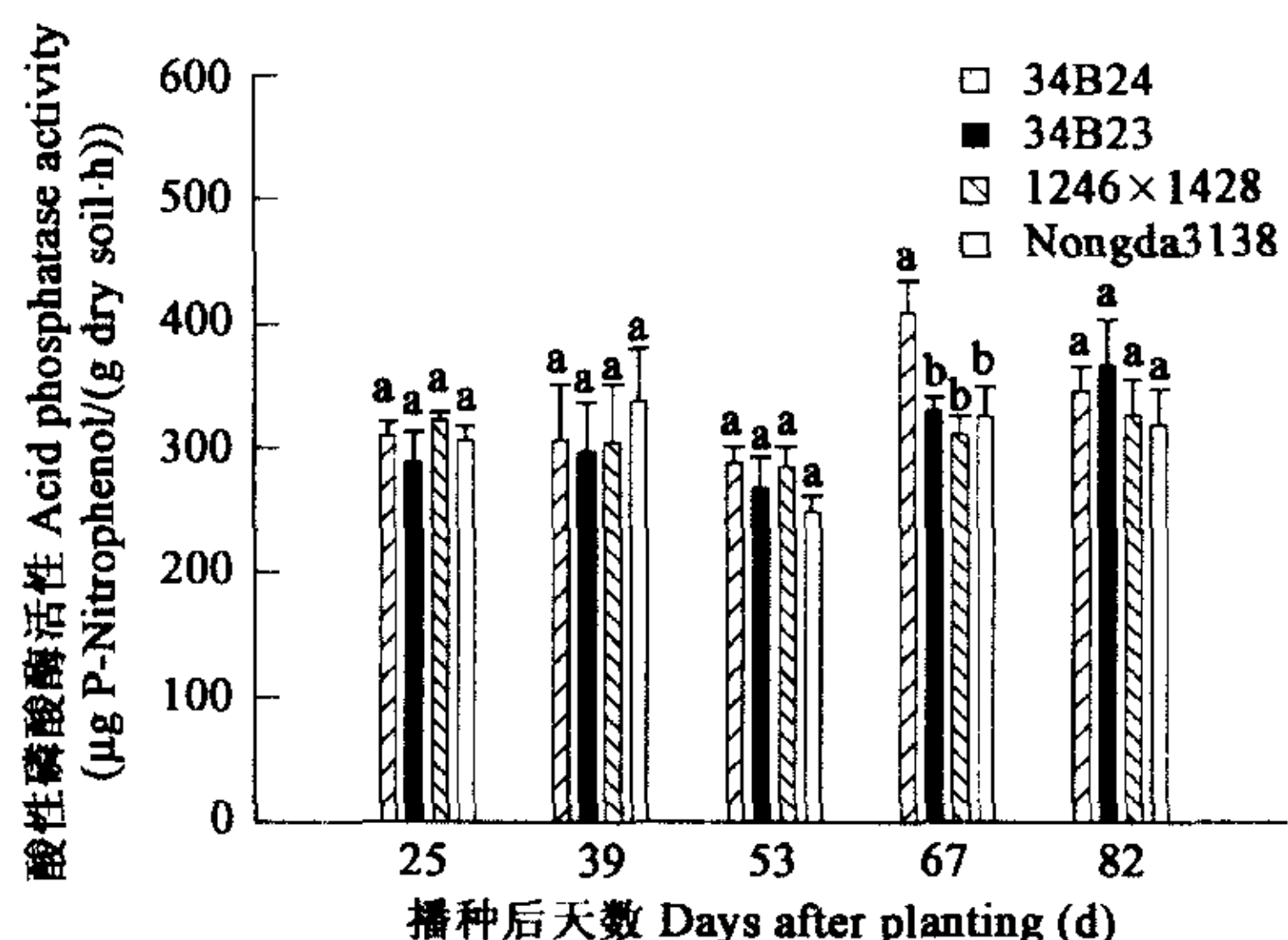


图 6 玉米生长期间土壤酸性磷酸酶活性(M±SD)

Fig. 6 Soil acid phosphatase activity during the growth period of corn (M±SD)

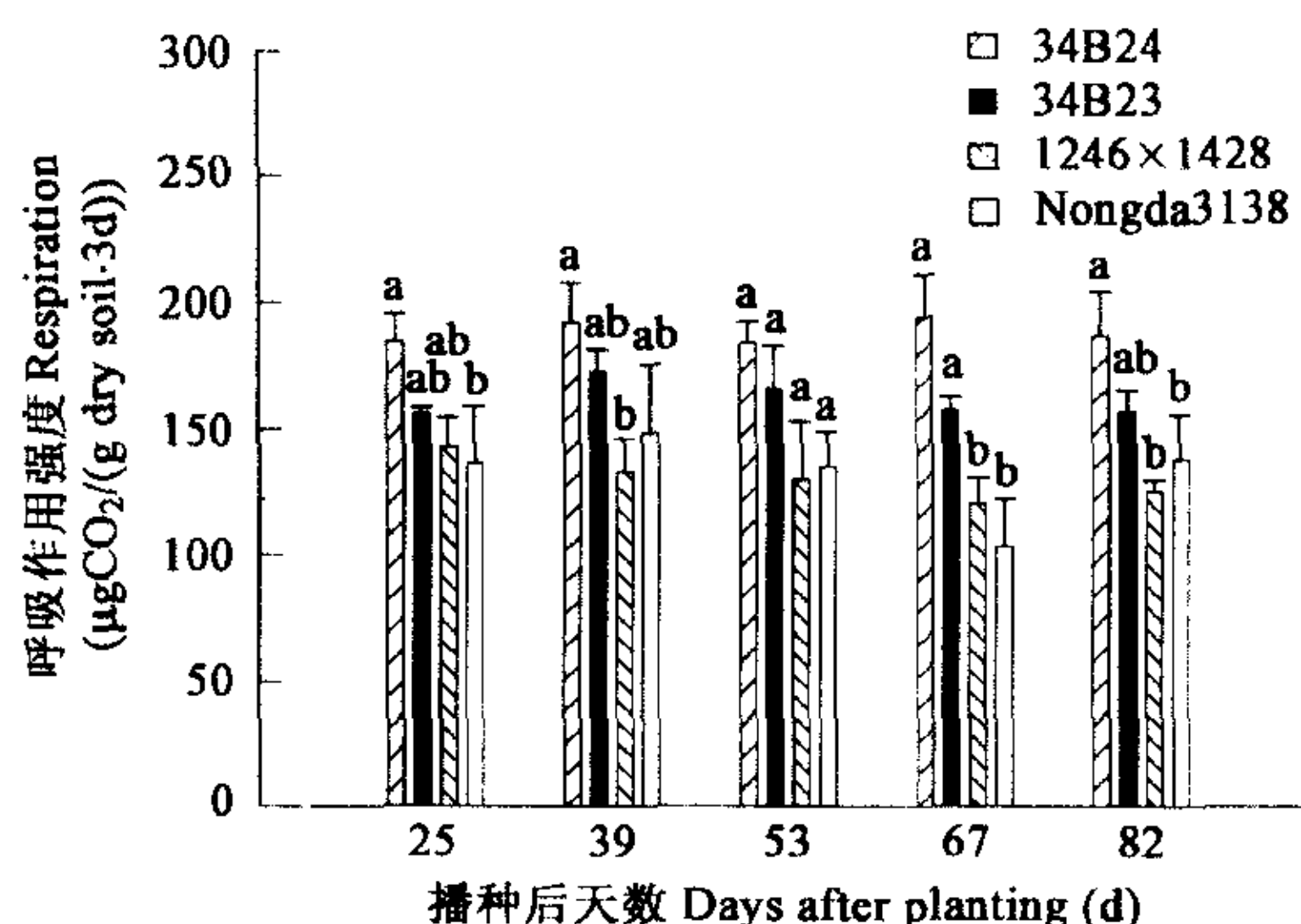


图 7 玉米生长期间土壤呼吸作用强度(M±SD)

Fig. 7 Soil respiration during the growth period of corn (M±SD)

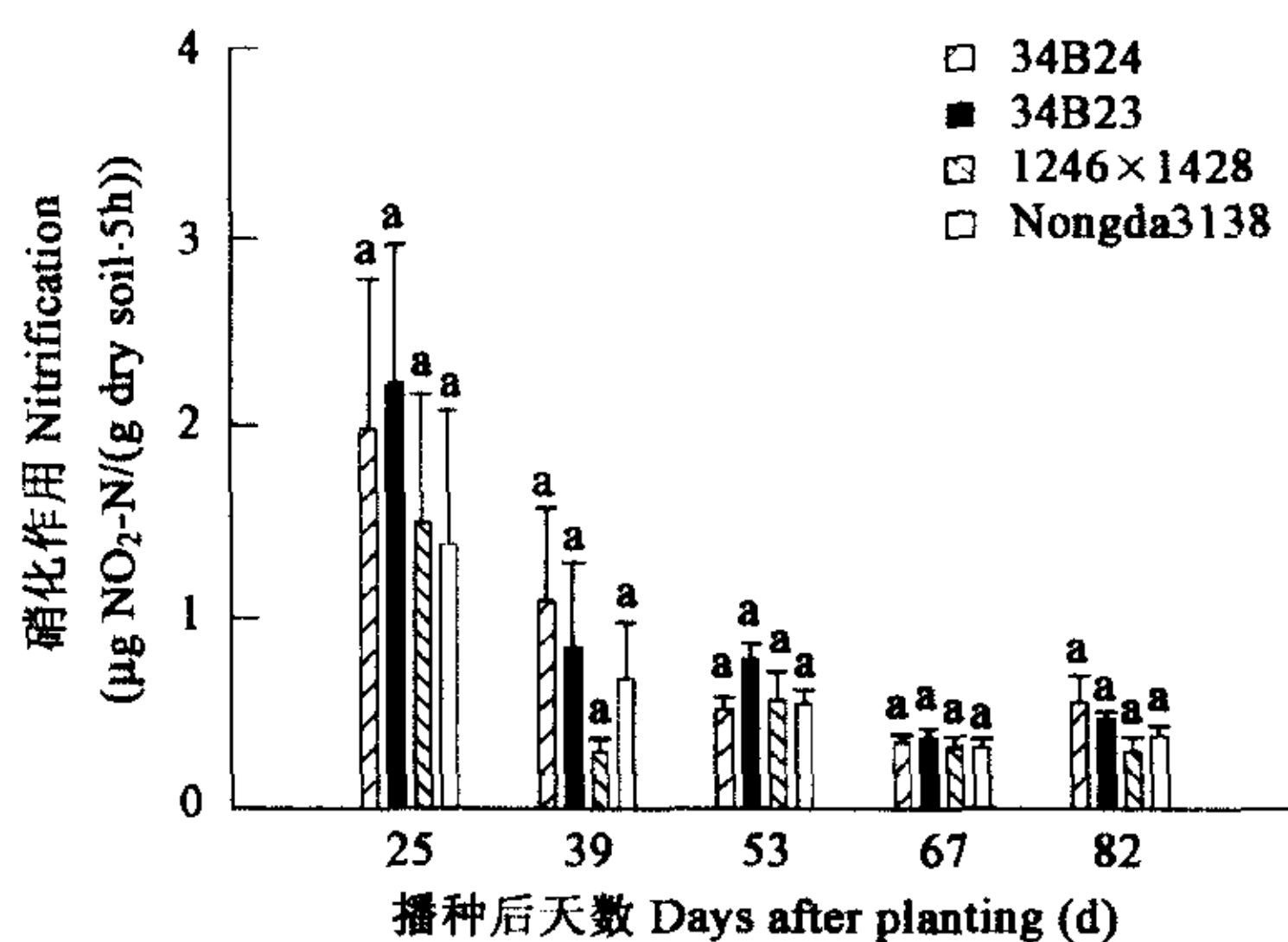


图 8 玉米生长期间土壤硝化作用(M±SD)

Fig. 8 Soil nitrification during the growth period of corn (M±SD)

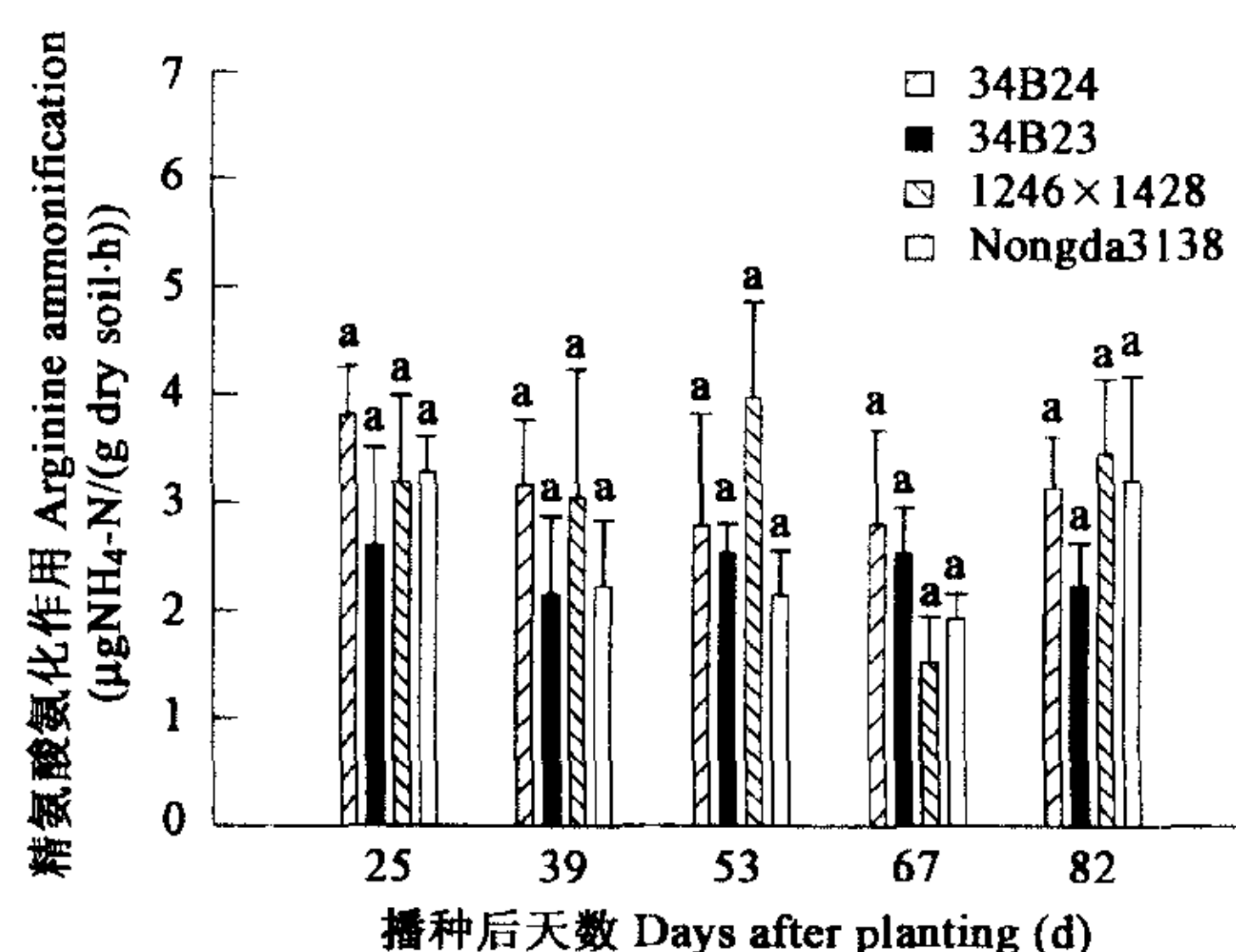


图 9 玉米生长期间土壤精氨酸氨化作用(M±SD)

Fig. 9 Soil arginine ammonification during the growth period of corn (M±SD)

2.4 对土壤养分的影响

玉米生长 82d 之后种植 4 个玉米品种的土壤在土壤中有有机质、全量养分(全氮、全磷、全钾)和速效养分(碱解氮、速效磷、速效钾)均没有显著差异(表 1),无论是 Bt 还是常规玉米品种,生长期间对土壤有机质、NPK 全量与速效养分含量没有影响。

表 1 玉米开花授粉期(82d)土壤养分含量(M±SD)

| Table 1 Soil nutrients contents at florescence and pollination stage (82d) of corn(M±SD) |                                                  |                                          |                                             |                                          |                                                |                                          |                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 处理<br>Treatments                                                                         | 有机质<br>Organic matter<br>(g · kg <sup>-1</sup> ) | 全氮<br>Total N<br>(g · kg <sup>-1</sup> ) | 碱解氮<br>Alkali-N<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 全磷<br>Total P<br>(g · kg <sup>-1</sup> ) | 速效磷<br>Available-P<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 全钾<br>Total K<br>(g · kg <sup>-1</sup> ) | 速效钾<br>Available K<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) |
| 34B24                                                                                    | 26.79±1.55a                                      | 1.83±0.24a                               | 207.81±19.41a                               | 1.17±0.11a                               | 52.26±11.40a                                   | 20.87±1.00a                              | 469.25±79.56a                                  |
| 34B23                                                                                    | 25.80±2.75a                                      | 1.87±0.16a                               | 199.94±17.07a                               | 1.08±0.15a                               | 50.67±12.06a                                   | 20.92±0.68a                              | 382.16±45.74a                                  |
| 1246×1482                                                                                | 24.71±0.47a                                      | 1.75±0.10a                               | 227.94±45.62a                               | 1.03±0.21a                               | 66.39±9.97a                                    | 20.98±2.86a                              | 455.73±88.31a                                  |
| Nongda3138                                                                               | 24.07±0.70a                                      | 1.64±0.06a                               | 181.56±24.61a                               | 1.07±0.13a                               | 47.35±8.72a                                    | 20.88±2.05a                              | 378.11±60.53a                                  |

\* 同列数据后的相同字母表示数据间差异不显著(DMRT 法,  $p=0.05$ ) Table entries followed by the same lower-case letters in each column were not significantly different at 0.05 level. Duncan's multiple range test

3 结论与讨论

种植 Bt 玉米的根际土壤中虽然存在 Bt 蛋白,但并没有导致土壤微生物活性和土壤肥力的不利变化。文中土壤微生物活性观测指标的变化可分为 3 类:土壤硝化作用和精氨酸氨化作用强度的空间变异较大,4 个处理所有取样期作用强度均没有显著差异;土壤蔗糖酶、土壤蛋白酶和酸性磷酸酶活性只在个别时间存在显著差异;土壤脱氢酶、土壤脲酶和土壤呼吸强度则在多数取样时期存在显著差异。相对而言,土壤脱氢酶、脲酶和土壤呼吸作用受玉米品种的影响较大。但上述差异在 2 个 Bt 玉米品种、Bt 玉米与常规玉米、2 个常规玉米品种之间均没有一致的变化规律,唯一一致的变化是 34B24 和 34B23 处理的土壤呼吸作用强度较大,说明种植该系列品种的土壤中微生物总活性高、土壤代谢旺盛。无论是 Bt 还是常规玉米品种,生长期间土壤有机质、NPK 全量与速效养分含量均没有显著差异。种植 Bt 玉米对土壤酶活性和肥力的影响可能来自两个方面,一是根系分泌的 Bt 蛋白影响土壤微生物多样性而导致的微生物活性的变化,二是外源 Bt 基因导入后引起受体作物秸秆以及根系分泌物化学成分的差异。截至目前,仍没有发现土壤中存在的 Bt 蛋白会导致土壤微生物多样性的变化<sup>[30]</sup>,但 Bt 基因导入对受体作物秸秆化学成分改变的报道却较多。Masero 等<sup>[31]</sup>发现与亲本相比,Bt 玉米秸秆中淀粉、木质素含量较高,蛋白质和可溶性氮含量较低;Saxena 和 Stotzky<sup>[32]</sup>报道,10 个 Bt 玉米品种中木质素的含量比受体亲本高 33%~97%。但与此相反,Escher 等<sup>[33]</sup>却发现 Bt 玉米叶片的碳氮比和木质素含量低于亲本,可溶性碳水化合物含量高于亲本。Bt 玉米不同的转化事件(transformation events)(如 Bt11,Mon810 和 event 176)可能对受体作物秸秆和根系分泌物的化学成分有不同的影响。Bt 基因导入对玉米根系分泌物成分的影响有待探讨。

最近,Saxena D 等<sup>[34]</sup>又发现除 Bt 玉米外,Bt 马铃薯和 Bt 水稻根系也能分泌有杀虫活性的 Bt 蛋白,而 Bt 棉花、Bt 大豆和 Bt 烟草则不能分泌。这使人们对根系能分泌 Bt 蛋白的 Bt 作物大面积种植的生态安全性的忧虑加重。美国曾报道<sup>[35]</sup>,连续种植 3~6 年 Bt 棉花(Cry1Ac)的田块土壤中 Bt 蛋白的含量低于 3.68ng · g<sup>-1</sup>(ELISA 的检测极限),低于烟实夜蛾(*Heliothis virescens*)生测法的生物活性有效浓度(8ng · g<sup>-1</sup>)。但在 Bt 玉米面积最大、商品化种植时间最长的美国为什么没有 Bt 玉米田块土壤中 Bt 蛋白残留量的报道呢?Bt 玉米与 Bt 棉花不同,一是其根系可以分泌有杀虫活性的 Bt 蛋白,二是其秸秆生物量远远大于棉花,且秸秆还田是各国玉米产区普遍采用的可持续农业技术之一。Bt 玉米释放的 Bt 蛋白(秸秆分解和根系分泌)在土壤中是否累积是其能否产生环境风险的核心问题。Bt 玉米释放的 Bt 蛋白的田间降解过程更复杂<sup>[36,37]</sup>,杀虫晶体蛋白类型与浓度、Bt 玉米品种、土壤类型、土壤微生物组成、土壤水分和环境条件等均可能影响土壤中 Bt 蛋白的降解速度<sup>[38]</sup>。Bt 玉米生长期间根系分泌以及秸秆还田降解释放的 Bt 蛋白在田间不同的土壤类型中的环境去向,仍然是其生态风险评价研究所需要解决的关键问题。

土壤是生态系统中物质和能量转化过程的重要场所。土壤微生物在维持土壤生态系统乃至这个陆地生态系统中的重要作用是不言而喻的<sup>[39]</sup>。土壤生态系统复杂而异质,土壤微生物多样性丰富且存在大量的功能冗余<sup>[40,41]</sup>,土壤微生物种类和数量对生态环境因子变化和人为扰动的反映十分敏感<sup>[39~41]</sup>,不同作物<sup>[42]</sup>,甚至同一作物的不同品种<sup>[43]</sup>对土壤微生物群落结构和功能的影响不同,不能只以与同源常规品种对比的土壤微生物数量与种类的差异来判定 Bt 作物对土壤生态系统产生了不利影响。种植 Bt 玉米对土壤微生物群落的影响只是叠加在农业管理措施(如耕作方式、施肥、灌溉等)和自然环境条件季节(温度、降雨等)引起的变化基础上的一个波动。正如加拿大 Royal Society Expert panel on the future of Biotechnology<sup>[44]</sup>建议的土壤中微生物群落的变化是不可避免的,转基因作物对土壤生态系统影响评价的关键是其对土壤功能的可能影响。为了区分 Bt 玉米的可能影响必须了解自然条件和农业管理措施等引起的土壤微生物群落的正常波动幅度及其生态后果。深入了解除转基因作物之

外其它生态环境或农业管理措施对其影响的正常波动范围是科学解释和评价 Bt 作物对土壤生态系统结构与功能潜在影响的关键<sup>[12]</sup>,很有必要在不同生态区开展定位研究与长期观测,并与耕作方式、水分管理、肥料管理等农业管理措施对土壤生态系统的影响相对比,才有可能探明其机理并对 Bt 作物环境安全性作出全面、科学和公正的评价。

## References:

- [1] James C. *Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops*; 2003. ISAAA; Ithaca, NY. ,ISAAA Briefs 2003. No. 30.
- [2] US EPA. *Bacillus thuringiensis* Plant-pesticides Registration Action Document; Preliminary Risks and Benefits Sections. U. S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, DC. 2000. (<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/news/news-Bt-corps-sap-oct.htm> ).
- [3] Management Office of GMO Biosafety Ministry of Agriculture. The approved results of agricultural gene safety assessment application in 1998. *Biotechnology Bulletin*, 1999, (1): 38~40.
- [4] Losey J E, Rayer L S, Cartet M E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 1999, **399**, 214.
- [5] Saxena D and Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn *in vitro* and *in situ*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **33**: 35~39.
- [6] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *Journal Environmental Quality*, 2000, **29**: 691~705.
- [7] Wang J W, Feng Y J, Luo S M. Effects of transgenic crops on soil ecosystem. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, **13** (4): 491~494.
- [8] Wang J W, Luo S M, Feng Y J, *et al.* Environmental fate and ecological effects of Bt toxin from transgenic Bt crops in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(4):797~804.
- [9] Morra M J. Assessing the impact of transgenic plant products on soil organisms. *Molecular Ecology*, 1994, **3**: 53~55.
- [10] Nie C R, Luo S M, Wang J W, *et al.* Advance on the biosafety assessment of GMO. *Chinese Journal of Ecology*, 2003, **22**(2):43~48.
- [11] 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. *Molecular Ecology*, 1994, **3**: 81~89.
- [12] Bruinsma M, Kowalchuk G A, van Veen J A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, **37**: 329~337.
- [13] Dunfield K E and Germida J J. Impact of Genetically Modified Crops on Soil- and Plant-Associated Microbial Communities. *Journal of Environmental Quality*, 2004,**33**:806~815.
- [14] Wang J W, Feng Y J, Luo S M. Studies on spatial-temporal dynamics of insecticidal protein expression of Bt corn and its degradation in soil. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, **36**(11): 1279~1286.
- [15] Wang J W, Feng Y J, Luo S M. Effects of Bt corn straw decomposition on soil enzyme activities and soil fertility. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, **16**(3):524~528.
- [16] Alef K. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. New York: Academic Press, 1995. 229~355.
- [17] Bao S D. *Soil agricultural-chemical analysis*. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2000.
- [18] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 1999, **402**: 480.
- [19] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, **34**: 133~137.
- [20] Palm C J, Donegan K K, Harris D, *et al.* Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin from transgenic plants. *Molecular Ecology*, 1994, **3**: 145~151.
- [21] Sims S R and Holden L R. Insect bioassay or determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki* cryIA (b) protein in corn tissue. *Environmental Entomology*, 1996, **25**: 659~664.
- [22] Palm C J, Schallet D L, Donegan K K, *et al.* Persistence in soil of transgenic plants produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin. *Canadian Journal of Microbiology*, 1996, **42**: 1258~1262.
- [23] Sims S R and Ream J E. Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki* cryIIA insecticidal protein within transgenic cotton tissue; laboratory microcosm and field studies. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 1997, **45**: 1502~1505.
- [24] Donegan K K, 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. *Applied Soil Ecology*, 1995, **2**:111~124.
- [25] Donegan K K, Schaller D L, Stone J K, *et al.* Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenbrionls* endotoxin. *Transgenic Research*, 1996, **5**:25~35.

- [26] Guan S Y. *Study way of soil enzymes*. Beijing: Agriculture Press, 1986.
- [27] Zhou L K. *Soil enzymes*. Beijing: Science Press, 1987.
- [28] Schloter M, Dilly O, Munch J C. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 2003, **98**:255~262.
- [29] Yang Y S, Qiu R H, Yu X T, *et al.* Study on soil microbes and biochemical activity in the continuous plantation of *Cunninghamia lanceolata*. *Chinese Biodiversity*, 1999, **7**(1): 1~7.
- [30] Motavalli P P, Kremer R J, Fang M, *et al.* Impact of Genetically Modified Crops and Their Management on Soil Microbially Mediated Plant Nutrient Transformations. *Journal Environmental Quality*, 2004, **33**: 816~824.
- [31] Masoero F, Moschini M, Rossi F, *et al.* Nutritive value, mycotoxin contamination and in vitro rumen fermentation of normal and genetically modified corn (cry1A(b)) grown in northern Italy. *Maydica*, 1999, **44**:205~209.
- [32] Saxena D and Stotzky G. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *American Journal of Botany*, 2001, **88**:1704~1706.
- [33] Escher N, Kach B, Nentwig W. Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Basic Applied Ecology*, 2000, **1**:161~169.
- [34] Saxena D, Stewart C N, Altosaar I, *et al.* Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B. thuringiensis* corn, potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, **42**, 383~387.
- [35] Head G, Surber J B, Watson J A, *et al.* No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (Bollgard) use. *Environmental Entomology*, 2002, **31**: 30~36.
- [36] Hopkins D W and Gregorich E G. Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European Journal of Soil Science*, 2003, **54**: 793~800.
- [37] Zwahlen C, Hilbeck A, Gugerli P, *et al.* Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology*, 2003, **12**: 765~775.
- [38] Herman R A, Scherer P N, Wolt J D. Rapid degradation of a binary, PS149B1,  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in soil, and a novel mathematical model for fitting curve-linear decay. *Environmental Entomology*, 2002, **31**(2): 208~214.
- [39] Torsvik V and Ovreas L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, **5**: 240~245.
- [40] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, *et al.* Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 2003, **54**: 655~670.
- [41] Johansson J F, Paul L R, Finlay R D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **48**: 1~13.
- [42] Buyer J S and Kaufman D D. Microbial diversity in the rhizosphere of corn grown under conventional and low-input systems. *Applied Soil Ecology*, 1997, **5**: 21~27.
- [43] Wieland G, Neumann R, Backhaus H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 5849~5854.
- [44] Royal Society Expert Panel on the Future of Biotechnology. Elements of precaution: Recommendations for the regulation of food biotechnology in Canada. The Royal Society of Canada, Ottawa, ON. 2001 ([www.rsc.ca/foodbiotechnology/indexEn.html](http://www.rsc.ca/foodbiotechnology/indexEn.html) (verified 9 Jan. 2004)).

#### 参考文献:

- [3] 农业部基因工程安全管理办公室. 1998 年农业生物基因安全性评价申报审批结果. 生物技术通报, 1999, (1): 38~40.
- [7] 王建武, 冯远娇, 骆世明. 转基因作物对土壤生态系统的影响. 应用生态学报, 2002, **13**(4): 491~494.
- [8] 王建武, 骆世明, 冯远娇, 等. Bt 作物 Bt 蛋白在土壤中的环境去向及其生态效应. 生态学报, 2003, **23**(4): 797~804.
- [10] 聂呈荣, 骆世明, 王建武, 等. GMO 生物安全评价研究进展. 生态学杂志, 2003, **22**(2): 43~48.
- [14] 王建武, 冯远娇, 骆世明. Bt 玉米抗虫蛋白表达的时空动态及其土壤降解研究. 中国农业科学, 2003, **36**(11): 1279~1286.
- [15] 王建武, 冯远娇, 骆世明. Bt 玉米秸秆分解对土壤酶活性和土壤肥力的影响. 应用生态学报, 2005, **16**(3): 524~528.
- [17] 鲍士旦编. 土壤农化分析. 北京: 农业出版社, 2000.
- [26] 关松荫编. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986.
- [27] 周礼恺编. 土壤酶学. 北京: 科学出版社, 1987.
- [29] 杨玉盛, 邱仁辉, 俞新妥, 等. 杉木连栽土壤微生物及生化特性的研究. 生物多样性, 1999, **7**(1): 1~7.