

DOI: 10.5846/stxb202104271106

冯发运, 王亚, 岳远浩, 李俊霞, 孙星, 程金金, 葛静, 余向阳. 接种内生降解菌 *Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3 对多菌灵胁迫下水稻根际微生态的影响. 生态学报, 2022, 42(7): 2730-2740.

Feng F Y, Wang Y, Yue Y H, Li J X, Sun X, Cheng J J, Ge J, Yu X Y. Effects of *Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3 on rice rhizosphere microecology under carbendazim stress. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(7): 2730-2740.

接种内生降解菌 *Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3 对多菌灵胁迫下水稻根际微生态的影响

冯发运^{1,2}, 王亚¹, 岳远浩³, 李俊霞⁴, 孙星¹, 程金金¹, 葛静¹, 余向阳^{1,*}

1 江苏省农业科学院, 农业资源与环境研究所, 南京 210014

2 省部共建国家重点实验室培育基地-江苏省食品质量安全重点实验室, 南京 210014

3 青岛科技大学, 青岛 266042

4 福建农林大学, 福州 350002

摘要: 内生降解菌定殖可促进水稻中农药等有机污染物的降解代谢, 研究功能内生菌对农药暴露下水稻根际微生态的影响, 可为利用植物-微生物互作调控农作物农药残留及修复农田生态环境污染提供科学依据。以水稻根际土壤中的蚯蚓、土壤酶和微生物群落为研究对象, 分析接种内生菌 *Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3 对水稻根际微生态响应多菌灵胁迫的影响。结果表明: 多菌灵暴露导致水稻根际土壤过氧化氢酶活性增强, 脲酶和蔗糖酶活性被抑制; 多菌灵污染可对水稻根际周围的蚯蚓造成氧化损伤, 致使其体内丙二醛累积并诱导超氧化物歧化酶和乙酰胆碱酯酶过表达; 多菌灵残留显著降低水稻根际土壤微生物群落的多样性与碳源代谢活性。接种内生降解菌 *S. pavanii* DJL-M3 促进了水稻根际残留多菌灵的降解, 缓解根际土壤微生物与蚯蚓所受胁迫压力, 显著提高了土壤脲酶、蔗糖酶活力以及蚯蚓的存活率, 并有效提升了水稻根际微生物群落的代谢活性与多样性。因此, 接种内生降解菌 *S. pavanii* DJL-M3 有助于多菌灵残留污染下稻田土壤生态环境的恢复。

关键词: 内生菌; 多菌灵; 水稻; 蚯蚓; 土壤酶; 根际微生物

Effects of *Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3 on rice rhizosphere microecology under carbendazim stress

FENG Fayun^{1,2}, WANG Ya¹, YUE Yuanhao³, LI Junxia⁴, SUN Xing¹, CHENG Jinjin¹, GE Jing¹, YU Xiangyang^{1,*}

1 Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China

2 Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base, Nanjing 210014, China

3 Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China

4 Fujian Agriculture & Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Inoculation with agrichemical-degrading endophytes can boost the metabolism of agrichemicals in rice. This beneficial microbe-plant interaction could prove useful for regulating fungicide residues in crop and for the remediation of contaminated farmland. However, the overall effects of introducing functional endophytes on rice rhizosphere microecology under fungicide exposure remain unclear, and the responses of rhizospheric organisms to degrading endophytes should be thoroughly investigated before further application of this symbiotic relationship. Therefore, in this study, we conducted pot experiments to investigate the stress responses of earthworms (*Eisenia foetida*), soil enzymes, and rhizospheric

基金项目: 国家自然科学基金(32001951, 31772197); 江苏省农业科技自主创新项目 CX(20)3052

收稿日期: 2021-04-27; 网络出版日期: 2021-12-15

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yuxy@jaas.ac.cn

microorganisms in the rice rhizosphere under carbendazim (CBZ) exposure with and without inoculation with *Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3, which is a CBZ-degrading endophyte. We applied the recommended dosage of CBZ, and then sampled rice rhizosphere soil at regular intervals; soil catalase, soil urease, and sucrose activity were detected immediately, whereas CBZ residue degradation was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC). After 2 weeks of CBZ exposure, the earthworms were collected and their morphological characteristics were observed; we also detected earthworm malondialdehyde levels and superoxide dismutase and acetylcholine esterase activity *in vivo* to evaluate the degree of stress damage caused by CBZ contamination. The diversity index and carbon metabolic activity of rhizosphere soil microorganisms were analyzed using an Eco-Plate (Biolog, USA). Rice plants without CBZ treatment and microbial inoculation were used as a background control. The results showed that foliage spraying caused rhizosphere soil exposure with CBZ, which activated soil catalase, but inhibited soil urease and sucrose activity. The CBZ residue in rhizosphere soil led to oxidative damage in earthworms, as demonstrated by the accumulation of malondialdehyde and the overexpression of superoxide dismutase and acetylcholine esterase *in vivo*. The CBZ contamination significantly reduced the diversity and carbon metabolic activity of rhizosphere soil microorganisms. Within the 14-day experimental period, *S. pavanii* DJL-M3 inoculation boosted CBZ degradation in the rice rhizosphere by shortening the half-life of CBZ residue, thereby relieving fungicide stress on rhizosphere soil microorganisms and earthworms, as indicated by the enhanced carbon metabolic activity, Shannon index and McIntosh index of rice rhizosphere soil microorganisms, and the recovery of the earthworm survival rate to that of the unpolluted control. This stress relief ultimately significantly promoted soil urease and sucrose activity under CBZ exposure. Therefore, the degrading endophyte *S. pavanii* DJL-M3 could be used for the bioremediation of CBZ-contaminated paddy soil.

Key Words: endophyte; carbendazim; rice; *Eisenia foetida*; soil enzyme; rhizospheric microorganism

植物根系是联系植物与土壤微生态环境的纽带,保持根际微生态系统活力对植物主动适应和抵御污染物胁迫意义重大^[1]。在水稻等作物栽培管理过程中,大量农药未能起到防治靶标的作用,而是直接散落到环境^[2];据研究统计,施入农田的农药有 70%进入作物所在土壤^[3],随着土壤农药残留累积含量的增加,作物的根际微生态也可能遭受污染物胁迫。多菌灵(Carbendazim,化学名称为 N-(2-苯并咪唑基)氨基甲酸甲酯)是我国农业生产中大量使用的一种重要的杀菌剂,近年来在农产品中检出率较高^[4-5],其在农田环境和农产品中的残留风险问题也逐渐受到关注。多菌灵在稻田土壤中很难迁移及降解,在水稻收获期前 14 d 依然能够检出^[2]。残留累积于农田环境中的多菌灵污染长期威胁土壤健康,不仅对稻区生态环境中的蚯蚓等有益生物带来毒害^[6-7],同时降低了土壤微生物群落的生物量及功能多样性^[8],还会通过植物根部、叶部和籽粒累积进入食物链^[9],最终污染如糙米、米糠及精白米等农副产品^[10-11],对人类和畜禽健康造成危害。因此,探索有效的环境污染修复和农作物中残留消减途径有重要意义。

利用内生降解菌协同提升环境污染物的植物修复效率,降低农作物中农药等有机污染物的残留累积,是农业生态环境治理和农产品质量安全控制领域的一项有益探索工作。利用植物内生菌定殖在植物根表及组织内形成互利共生体系,不仅可降低外界环境及微生物竞争对其污染物降解功能的影响^[12],内生菌分泌的植物促生因子还能提高宿主对不利环境胁迫的耐受能力^[13],而宿主植物的表型特性又会通过根际互作影响土壤微生态的健康,进一步促进残留有机污染物的降解、维持土壤微生物多样性及稳定性^[14]。我们前期研究发现,具有农药降解功能的内生菌定殖水稻后,不仅可促进污染胁迫条件下水稻植株的生长,还可加速植株残留农药的消解,降低稻田土壤、水稻植株以及稻谷中的农药残留量^[15-16]。然而,关于接种降解性内生菌对原位土壤微生态影响的研究却鲜有报道。根际微生态尤其是土壤动物及微生物成员对植物接种内生降解菌的响应,是评价内生菌-植物互作模式用作农药污染修复手段安全性与合理性的重要依据。本文以盆栽土培方式模拟水稻大田生长环境,研究内生降解菌 *Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3 定殖对多菌灵暴露下水稻根际微生

态中原生动物(蚯蚓)的胁迫耐受性,根际微生物群落代谢功能多样性和土壤酶活性的影响,结果为全面揭示内生降解菌在农田生态修复中的作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

水稻内生菌:分离自水稻植株根部,对多菌灵具有较高耐药性及降解能力,同时具备良好的植物促生长特性,经生理生化试验及 16S rRNA 同源化比对分析,鉴定其为寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3),该菌株已送中国普通微生物菌种保藏管理中心保存(保藏号:CGMCC No.21198)。

水稻:品种为南粳 5055,由江苏省农业科学院提供。

蚯蚓:赤子爱胜蚯蚓(*Eisenia foetida*)购自江苏省句容市王军蚯蚓养殖场,每条体重约 300 mg,体长约 60 mm,经实验室预培养后挑选带环明显,大小基本一致的健康成蚯,试验前清肠 24 h。

土壤:采集自江苏省农业科学院水稻田,其基本理化性质为:pH 5.97,总有机质含量 66.8 g/kg 干土,氮含量 0.36%,碳含量 49.61%,氢含量 5.72%,硫含量 0.01%,氧含量 44.37%。土样自然风干后过 50 目网筛去除大颗粒石子备用。水稻栽培过程中喷洒无菌水以保持约 60%含水量。

多菌灵:多菌灵可湿性粉剂购自江阴福达农化股份有限公司,其有效成分含量为 50%。

1.2 试验设计

水稻苗在育秧盘上生长至三叶一心(约 15 cm)后选取 10 株移栽至直径 15 cm,高 25 cm 的塑料钵钵,每钵含 500 g 稻田土并均匀放养 10 只蚯蚓。按表 1 的方式设置空白处理组(Control),内生菌接种的多菌灵处理组(CBZ-M3)与未接种的多菌灵处理组(CBZ)。其中水稻内生多菌灵降解菌 DJL-M3 预经胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)富集过夜培养后,用无菌磷酸缓冲液 PBS(pH 7.0)清洗并重悬成 OD_{600nm} 值为 1.0 的菌悬液,取 30 mL 菌液浇灌水稻根部进行接种处理。按照推荐剂量(120 g/hm²)对盆栽水稻喷施多菌灵药剂,于施药后 2 h、1 d、3 d、7 d 及 14 d 采集水稻根际土壤并用液相色谱仪分析不同处理下水稻根际土壤多菌灵的降解规律,获得最终残留含量(14 d)并计算降解半衰期,稻田土壤多菌灵的提取及检测参照刘双双等^[10]建立的方法。药剂处理后为了防止蚯蚓逃离,用保鲜膜封住每个钵钵顶部,仅留水稻地上部分于外界,并用移液枪头在保鲜膜上随机扎上气孔。每个处理 6 个重复。整个试验在温室条件(光照 16 h/黑暗 8 h,30℃/25℃)下进行,在多菌灵喷施后定期收集根际土壤,进行土壤酶活检测与微生物群落多样性分析,施药两周后结束试验,同时将钵钵土倒置回收试验蚯蚓,统计存活率、测定其解毒酶活性。

表 1 试验水稻处理方式

Table 1 Different treatment of rice seedlings

处理 Treatment	初始蚯蚓量 No. of earthworms/只	内生菌接种 Endophytic- inoculation	多菌灵喷施 Carbendazim- spraying	多菌灵半衰期 The half-life of carbendazim/d	多菌灵残留量 Residual of carbendazim/ (μg/mg 土壤)
Control	10	未接种	未喷施	—	—
CBZ-M3	10	接种	喷施	2.8881±0.3311b	0.4851±0.1059b
CBZ	10	未接种	喷施	4.1258±0.5267a	1.1108±0.1717a

注:同列数据后字母不同代表差异显著($P<0.05$);Control:空白对照,without carbendazim spraying and DJL-M3 inoculation; CBZ-M3:多菌灵胁迫-接种处理,Carbendazim spraying with DJL-M3 inoculation; CBZ:多菌灵胁迫-未接种处理,Carbendazim spraying without DJL-M3 inoculation

1.3 水稻根际土壤收集和酶活测定

根际土壤样品的采集参照李依韦等^[17]的方法并做适当调整,分别在多菌灵药剂喷施 1 d、3 d、7 d 和 14 d 后在钵钵中随机挑选一株水稻苗整体挖出,首先抖掉与根系结合松散的土壤,然后用毛刷将与根系紧密结合的土壤刷下来装入无菌袋,每个处理中的 6 盆水稻进行两两随机混合形成 3 个平行待测样品,并立即进行土

壤酶活性的测定。土壤过氧化氢酶(S-CAT)活性采用高锰酸钾滴定法测定;土壤脲酶(URE)活性采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定;土壤蔗糖酶(SAC)活性则采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定^[18]。

1.4 蚯蚓胁迫耐受能力分析

在多菌灵药剂喷施 2 周后,将盆钵倒置收集蚯蚓,统计每个盆钵中蚯蚓的存活率,并通过检测存活蚯蚓体内丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)与乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)活性来分析多菌灵残留对蚯蚓的过氧化损害程度。其中蚯蚓 SOD 活力测定采用黄嘌呤氧化酶-羟胺法,MDA 含量采用硫代巴比妥酸比色法测定,用蚯蚓体内对三硝基苯(TNB)颜色深浅进行比色定量分析 AChE 活性。具体酶活测定方法参照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒^[19]。

1.5 根际土壤微生物群落代谢功能多样性分析

同 1.3 方法采集多菌灵暴露 14 d 后的新鲜水稻根际土壤,并使用 BIOLOG 公司的 ECO 生态板分析不同处理下水稻根际土壤中微生物对 31 种碳源的代谢指纹图谱,接菌液的制备参照赵倩等^[20]的方法。接种好的生态板在 28℃ 恒温培养箱(黑暗环境)中连续培养 10 d,每隔 24 h 用酶标仪测定 OD_{590nm} 下吸光度变化来表征土壤中微生物对各种碳源的代谢活性。土壤微生物群落利用碳源的整体能力用平均颜色变化率(Average Well Color Development, AWCD)表示,微生物群落功能多样性采用香农指数 Shannon-wiener Index,优势度指数 Simpson Index,均匀度指数 Pielou Index 和 McIntosh Index 进行分析^[21]。具体计算公式如下:

$$AWCD = \sum (C_i - R) / 31 \quad (1)$$

$$H = - \sum P_i (\ln P_i) \quad (2)$$

$$D = 1 - \sum P_i^2 \quad (3)$$

$$J = H / \ln S \quad (4)$$

$$U = \sqrt{\sum n_i^2} \quad (5)$$

式中, H 为 Shannon 指数; D 为 Simpson 指数; J 为 Pielou 指数; U 为 McIntosh 指数; C_i 为第 i 个非对照孔的吸光值, R 为对照孔的吸光值; P_i 表示第 i 个非对照孔的相对吸光值与所有非对照孔的相对吸光值总和的比值,即 $P_i = (C_i - R) / \sum (C_i - R)$; S 为被利用的碳源总数; n_i 表示第 i 个孔的相对吸光值,即 $n_i = (C_i - R)$ 。

1.6 数据处理

用 Windows Microsoft Excel 2003 对本试验生物学数据进行初步整理,求和与标准差计算。绘图、显著差异性分析及主成分分析由 Origin 2018 软件完成。

2 结果与分析

2.1 水稻根际土壤酶活性变化

如图 1 所示,多菌灵施用显著激活水稻根际土壤中过氧化氢酶的活性,其在药剂喷施后的第 1 天便达到最高水平,在 CBZ 组中的酶活力是 Control 组的 2.28 倍,DJL-M3 接种能够将多菌灵暴露下水稻根际土壤中被激活的过氧化氢酶活力降低 41.06%。水稻根际土壤中过氧化氢酶活性随着施药时间推移而降低,但在整个检测周期内 CBZ 组中过氧化氢酶活性一直显著高于 Control 组与 CBZ-M3 组。

多菌灵在施药后第 1 天就显示出对土壤脲酶的抑制作用,如图 2 所示,相比较于 Control 组,多菌灵胁迫(未接菌)导致水稻根际土壤脲酶活性降低 27.56%,而

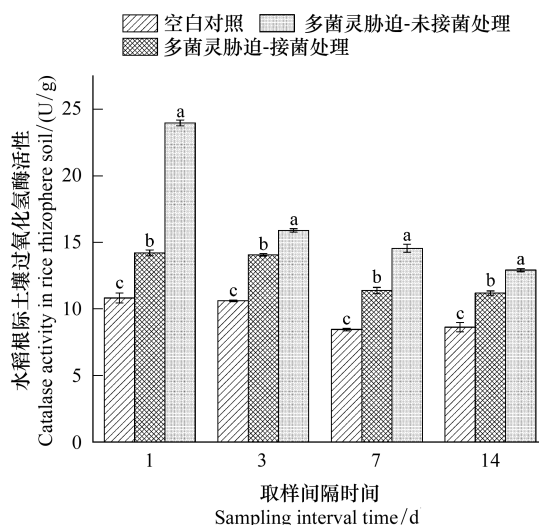


图 1 不同处理下水稻根际土壤过氧化氢酶活性
Fig.1 Catalase activity in rice rhizosphere soil under different treatments

DJL-M3 接菌能够缓解多菌灵对根际土壤脲酶的抑制效应,将被抑制的酶活性提升 10.76%。CBZ-M3 组土壤脲酶活性在第 3 天便恢复到与 Control 组差异不显著水平,而此时 CBZ 组土壤脲酶活性依旧显著低于 Control 组 69.51%,虽然其在第 3 天后有所提高,但在整个检测周期中一直显著低于其他两个处理组。

如图 3 所示,多菌灵暴露对水稻根际土壤蔗糖酶的影响与脲酶类似,在多菌灵喷施 1 d 后 CBZ 组中土壤蔗糖酶活性分别较 Control 组和 CBZ-M3 组降低 82.57%与 63.14%,DJL-M3 水稻接种能够促进根际土壤蔗糖酶活性的恢复,而 CBZ 组与 Control 组的酶活差异在第 3 天达到最大(89.53%),在 14 d 的试验周期中多菌灵胁迫处理组水稻根际土壤蔗糖酶活性一直显著低于 Control 组水平。

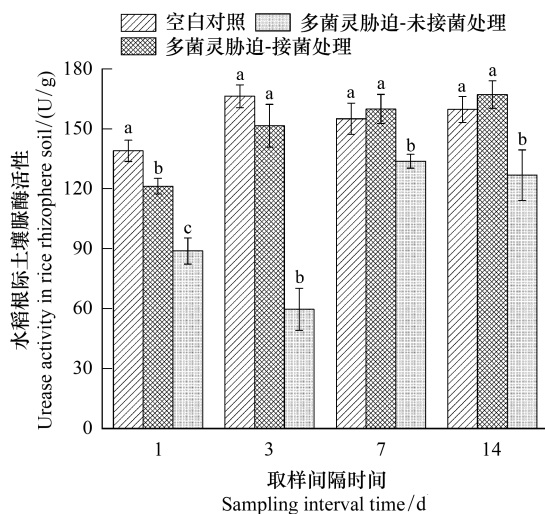


图 2 不同处理下水稻根际土壤脲酶活性

Fig.2 Urease activity in rice rhizosphere soil under different treatments

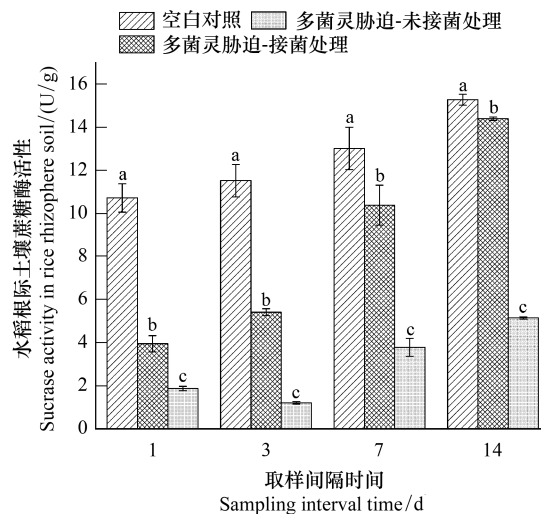


图 3 不同处理下水稻根际土壤蔗糖酶活性

Fig.3 Sucrase activity in rice rhizosphere soil under different treatments

2.2 水稻根际土壤中蚯蚓对多菌灵胁迫的耐受性

水稻在喷施多菌灵药剂 1 d 后便对根际环境中的蚯蚓造成了胁迫压力,致使蚯蚓出现逃逸现象,而 CBZ-M3 组则无此现象。在多菌灵喷施两周后将水稻土壤全部倾倒收集蚯蚓,首先观察其形态特征及活性。相比于 Control 组,CBZ 组中的蚯蚓体色发暗,活动迟缓,体型明显偏瘦偏短,部分蚯蚓个体出现生殖带肿胀、出血及尾部断节现象。而 CBZ-M3 组的蚯蚓除了体型偏瘦,其他特征与 Control 组没有显著差异(图 4)。进一步统计不同处理组中蚯蚓的存活率及所受氧化胁迫程度(表 2),发现经过 14 d 的自然稻田土暴露,多菌灵能够诱导蚯蚓机体积累 MDA,而 DJL-M3 接菌能够显著减少水稻根际蚯蚓体内 MDA 含量。同样地多菌灵暴露能

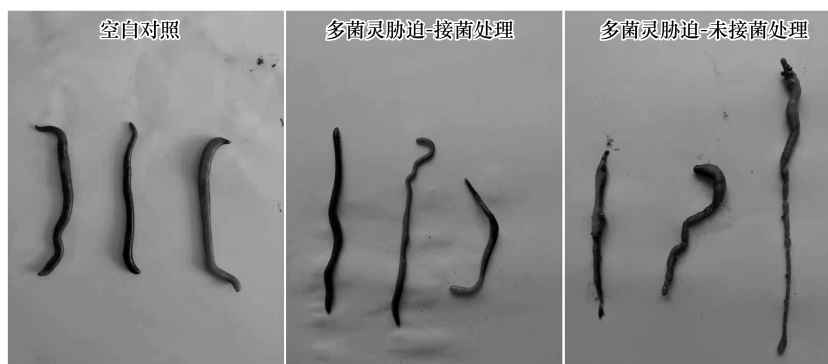


图 4 不同处理下水稻根际蚯蚓的表现形态

Fig.4 Morphology of earthworms in rice rhizosphere under different treatments

够显著刺激蚯蚓体内 AchE 活性,接种内生菌 DJL-M3 可一定程度上缓解该刺激作用。CBZ 组中蚯蚓的 T-SOD 显著高于 Control 组,而 CBZ-M3 组与 Control 组差异不显著。与蚯蚓氧化胁迫指标相对应的是,CBZ 组的蚯蚓存活率显著低于 Control 组,CBZ-M3 组蚯蚓的存活率虽然也低于 Control 组,但差异并不显著。这些结果表明,多菌灵土壤残留能对水稻根际周遭的蚯蚓造成一定的毒害,诱导氧化损伤而降低其生存能力,在水稻根部接种具多菌灵降解特性的水稻内生菌能够显著缓解根际多菌灵暴露对蚯蚓的胁迫伤害。

表 2 不同处理方式对蚯蚓存活率及氧化胁迫程度影响
Table 2 Effect of different treatments on the survival rate and oxidative stress degree of *Eisenia foetida*

处理 Treatment	存活率 Survival rate/%	总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mgprot)	丙二醛 MDA /(nmol/mgprot)	乙酰胆碱酯酶 AChE/(U/mgprot)
Control	93.33±12.11a	1.91±0.068b	1.55±0.092c	4.20±0.48c
CBZ-M3	91.67±9.83a	1.87±0.027b	14.14±2.34b	5.97±0.55b
CBZ	73.33±10.33b	2.24±0.087a	52.62±5.13a	31.95±2.94a

同列数据后字母不同代表差异显著 ($P<0.05$);单位解释:蚯蚓组织匀浆中每毫克蛋白的酶活力或纳摩尔含量;T-SOD: total superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde; AchE: acetylcholinesterase

2.3 水稻根际土壤微生物群落结构及多样性

如图 5 所示,在 10 d 的培养周期中,AWCD 的最大值及变化速率均呈现 Control>CBZ-M3>CBZ 的趋势,多菌灵药剂喷洒 2 d 后,污染土壤微生物 AWCD 值显著低于未喷施多菌灵的 Control 组 ($P<0.05$)。说明多菌灵暴露能够显著降低土壤微生物的活性。培养 7 d 后,各处理组的 AWCD 值变化率趋于稳定,同一处理组中的 AWCD 增长已不显著,虽然此时 Control 组的 AWCD 值依然高于其他两个多菌灵胁迫处理组,但与 CBZ-M3 组不具有显著差异性 ($P>0.05$),这表明降解菌 DJL-M3 接种水稻能在一定程度上提高土壤微生物活性,缓解多菌灵胁迫对水稻根际微生态的负面影响。

我们假设多菌灵暴露 7 d 后水稻根际微生物群落结构已经稳定,以该时间点所测量的吸光值 (OD_{590 nm}) 计算各处理组的 Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数和 McIntosh 指数分析土壤微生物群落功能多样性,结果如表 3 所示,多菌灵胁迫对水稻根际土壤 Pielou 指数没有显著影响,但能显著降低 Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数 ($P<0.05$),而接种 DJL-M3 能够在一定程度上提高 Shannon 指数和 McIntosh 指数。

表 3 不同处理方式下水稻根际土壤微生物群落功能多样性指数
Table 3 Functional diversity indexes of rice rhizosphere microbial community under different treatments

处理 Treatment	香农指数 (H) Shannon-wiener Index	优势度指数 (D) Simpson Index	均匀度指数 (J) Pielou Index	均匀度指数 (U) McIntosh Index
Control	3.4234±0.0013a	0.9994±0.0003a	0.9941±0.0045a	11.8225±0.3703a
CBZ-M3	3.4079±0.0108ab	0.9651±0.0027b	0.9829±0.0195a	11.6736±0.517ab
CBZ	3.3524±0.0485b	0.9661±0.001b	0.9886±0.0082a	10.7264±0.5739b

同列数据后字母不同代表差异显著 ($P<0.05$)

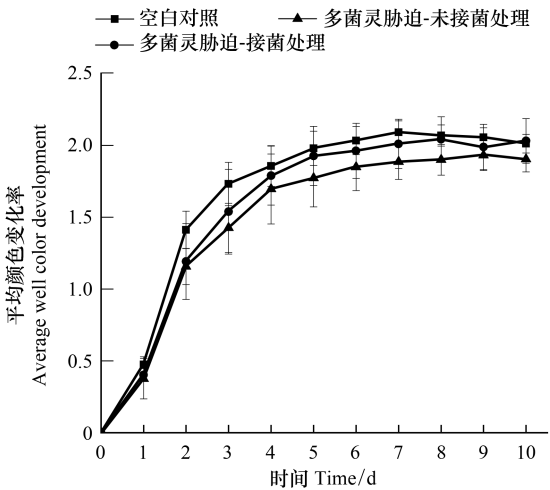


图 5 不同处理组中水稻根际土壤微生物的 AWCD 值变化
Fig.5 AWCD variation under different treatments in rice rhizosphere soil microbes

AWCD: 颜色平均变化率

2.4 水稻根际土壤微生物碳源代谢特征

为了分析根际微生物群落多样性差异背后特定的碳源代谢情况,同样选取 3 个处理组土壤在培养 7 d 后微生物对 31 种碳源的 AWCD 值进行主成分(PCA)分析,提取 2 个主成分,其中第 1 主成分(PC1)和第 2 主成分(PC2)的方差贡献率分别为 93%和 7%,累计贡献率达 100%,可以全面反映根际微生物碳源代谢能力的分异特征。结果如图 6 所示,Control 组在 PC1 上得分最高,而 CBZ-M3 组在 PC2 上得分则明显高于其他两组,这说明无论是多菌灵暴露还是外源降解内生菌的引入都会极显著地改变水稻根际微生物组对土壤碳源的代谢能力;Control 组和 CBZ-M3 组都位于 PC1 轴正方向,它们之间的距离也要比同处于 PC1 轴与 PC2 轴负方向的 CBZ 组要近,这表明 Control 组和 CBZ-M3 组的根际微生物对碳源的利用能力更为相似。

为了进一步分析不同处理水稻根际微生物的代谢功能类群,我们将 Biolog-ECO 板上 31 种碳源在 7 d 测定的 AWCD 值进行热图绘制,以此表征不同处理水稻

根际微生物碳代谢指纹图谱,结果如图 7 所示。总体上,Control 组中根际土壤微生物对碳源的整体利用能力最强,CBZ-M3 组次之,CBZ 组最弱。在 6 大类碳源中,多菌灵暴露能够显著降低根际土壤微生物对糖类、氨基酸类、酯类、醇类及酸类中 2-羟基苯甲酸的利用能力,对胺类碳源的影响则不显著($P>0.05$)。有趣的是,内

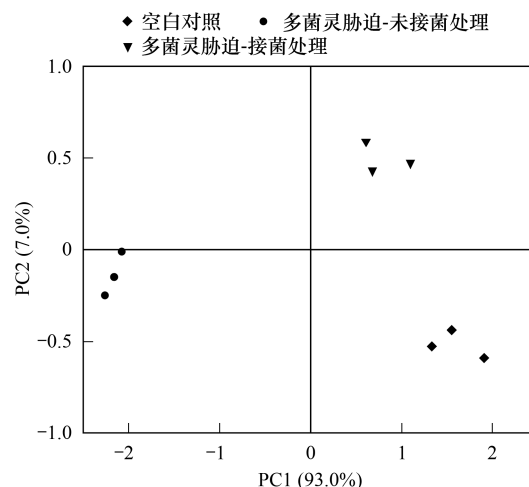


图 6 不同处理组中水稻根际土壤微生物碳源代谢主成分分析
Fig.6 Principal component analysis (PCA) of carbon sources metabolism of rice rhizosphere soil microbes under different treatments

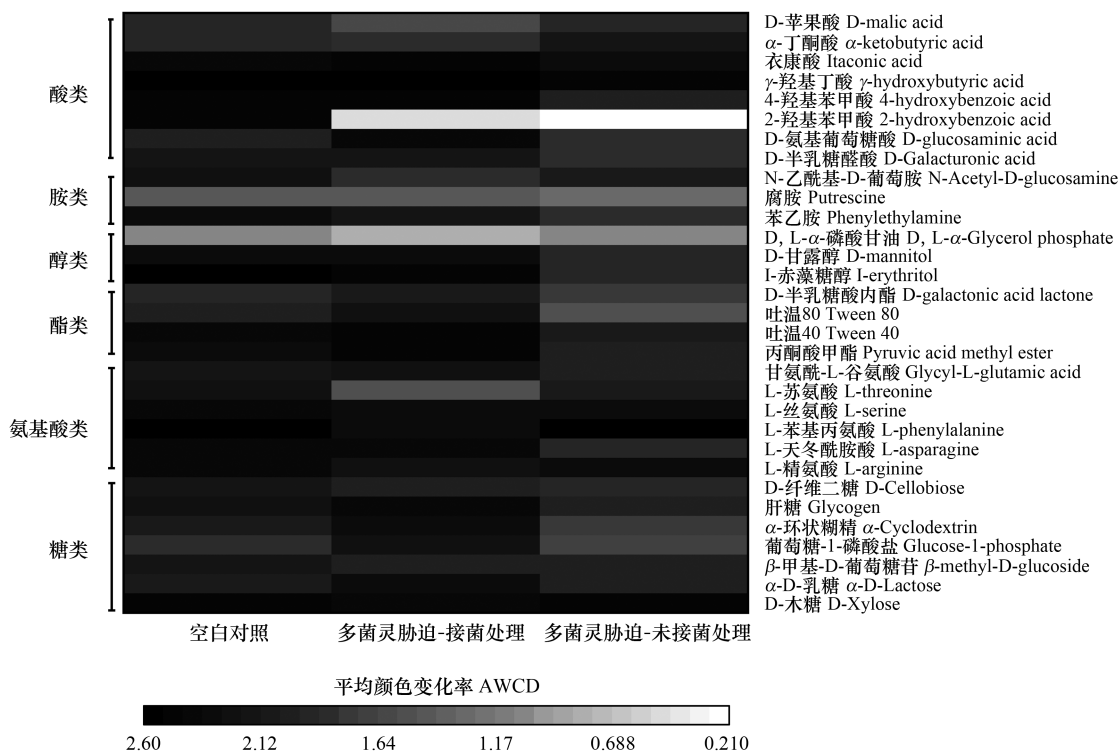


图 7 不同处理下水稻根际土壤微生物对 31 种碳源代谢的指纹图谱

Fig.7 Metabolic fingerprint of rice rhizosphere soil microbes using 31 carbon sources under different treatments

生菌 DJL-M3 的引入也会改变水稻根际土壤微生物的碳源代谢特性,其显著提高了糖类中 α -D-乳糖、葡萄糖-1-磷酸盐、 α -环状糊精和肝糖,酯类中的吐温 80、丙酮酸甲酯以及酸类中 D-氨基葡萄糖酸的利用能力,但却显著降低了根际土壤微生物组对 L-苏氨酸、D, L- α -磷酸甘油、N-乙酰基-D-葡萄糖胺及酸类中 D-苹果酸的利用能力。

3 讨论

3.1 DJL-M3 对多菌灵暴露下水稻根际土壤酶活性的影响

土壤酶是土壤重要组成部分之一,其参与土壤中绝大多数生化过程,包括营养物质转化、能量代谢和污染物净化等^[3]。其中,过氧化氢酶主要分解土壤中过度累积的过氧化氢,降低其对植物根系及生物体的毒害作用;脲酶是土壤中唯一一种能将尿素转化为有效氮的酰胺酶,酶促尿素水解成氨,为植物生长提供氮源;蔗糖酶作为评价土壤熟化程度和肥力水平的常规指标之一,其可以把土壤中高分子量的蔗糖转化成能被植物和土壤微生物吸收利用的易溶性营养物质,从而为土壤生物体提供能源及提高土壤生物学活性^[22]。在本研究中,我们发现多菌灵喷施刺激了水稻根际土壤中过氧化氢酶的活性,而抑制土壤脲酶和蔗糖酶的活性,该现象与孙佳为等^[23]的研究结果基本一致。其原因可能是多菌灵残留对水稻植株及根际微生物群落造成了一定的氧化胁迫,作为应激反应,植株及微生物会表达更高水平的过氧化氢酶以缓解氧化损伤。因为土壤酶主要来自土壤微生物、植物根系分泌以及动植物残体的释放等途径^[24],多菌灵污染抑制了根际微生物及土壤动物的活力^[8],从而降低土壤脲酶与蔗糖酶的产生。水稻内生菌 DJL-M3 定殖能够显著缓解多菌灵的胁迫效应,提高土壤脲酶和蔗糖酶活力。这可能是因为 DJL-M3 直接降解残留于土壤中的多菌灵(表 1),从而减少其对水稻根际微生物群落的胁迫压力。与此同时,人工接种降解性内生菌能够缓解高浓度农药对宿主作物的植物毒性,并在胁迫条件下促进植物生长^[25]。DJL-M3 的优良促生长特性也极有可能提高了水稻对多菌灵污染的应激耐受性,并促进胁迫条件下植株根系的发育,进而提高土壤酶活性。事实上,付风云等^[26]的研究已经表明,添加对作物具有促生长功能的微生物有机肥能够显著提高多菌灵胁迫条件下土壤脲酶和蔗糖酶的活性。综上所述,内生菌 DJL-M3 可能通过直接降低多菌灵残留对水稻植株及根际微生物的胁迫压力,以及提高接种水稻的生理活性来缓解多菌灵暴露对根际土壤酶活力的抑制作用。

3.2 DJL-M3 对水稻根际中蚯蚓多菌灵胁迫耐受性的影响

蚯蚓是土壤健康的关键指示生物,其对维持土壤肥力具有重要作用,而农田生态系统中农药残留污染对蚯蚓在个体、细胞和分子等不同生命层面都会产生毒理学作用^[19]。郇志博等^[27]的研究表明,多菌灵对赤子爱胜蚯蚓具有中等毒性,其能够诱导蚯蚓血细胞产生微核畸变,因此,残留于水稻根际的多菌灵不可避免会对周遭的蚯蚓造成胁迫危害。本研究发现,多菌灵施药后水稻根际土壤中蚯蚓的存活率显著降低,在所有存活蚯蚓体内 SOD 活性及 MDA 含量显著高于未施药组,该现象与大多数杀菌剂农药对蚯蚓的生物毒理学研究结果相一致^[28—29]。SOD 主要参与生物体内氧化与抗氧化平衡,其能够清除因外源胁迫而产生的超氧阴离子自由基(ROS),保护机体细胞免受损伤^[30];MDA 则是 ROS 攻击生物膜中不饱和脂肪酸而引发脂质过氧化作用的产物,其含量高低反应机体细胞受自由基攻击的严重程度^[31]。多菌灵残留对蚯蚓造成了氧化胁迫,导致其体内 MDA 水平升高,作为应激反应蚯蚓也会提高其自身 SOD 活性以期清除机体内过多的自由基,进而缓解氧化胁迫损伤。AChE 广泛存在于动物组织中,能够特异性催化乙酰胆碱水解为胆碱和乙酸,维持神经系统的正常生理功能^[32]。区别于有机磷类和氨基甲酸酯类农药对蚯蚓 AChE 的抑制作用^[19],我们发现多菌灵残留会刺激水稻根际中蚯蚓的 AChE,该现象与杀菌剂丙环唑污染诱导蚯蚓 AChE 表达相一致^[33],虽然鲜有研究能够完全解释该现象,但蚯蚓体内 AChE 活性与机体受到氧化胁迫而改变的细胞内离子平衡有关^[34];除此之外, AChE 作为生物靶标在机体经历细胞凋亡或炎症的时候同样会被激活^[35]。根据 CBZ 组中试验蚯蚓的存活率及肿胀的形态,说明多菌灵残留水平已经达到促发蚯蚓产生炎症并诱发个体死亡,从而导致蚯蚓体内 AChE 出现过度补偿现象^[36]。在 CBZ-M3 处理组中,虽然蚯蚓体内 MDA 含量依然显著高于 Control 组,但可能已低

于蚯蚓的耐受极限,所以对应的是较低水平的 SOD 和 AchE 活性及显著提高的整体存活率。综上所述,内生降解菌 DJL-M3 能显著缓解多菌灵残留对水稻根际中蚯蚓的氧化胁迫,提高蚯蚓在污染暴露条件下的适应性。

3.3 DJL-M3 对多菌灵暴露下水稻根际土壤微生物的影响

土壤微生物同样是土壤生态系统的重要组成部分,是土壤质量和健康状况的重要表征,在推动有机质分解、养分转化与循环、促进植物营养吸收、调节土壤肥力及污染物降解过程中发挥关键作用^[37]。研究表明,多菌灵污染会造成土壤微生物数量及呼吸量降低,微生物群落的丰富度、均匀度和优势度受到抑制^[38]。这与我们研究结果相一致,虽然施药靶标是水稻植株,多菌灵在喷施过程及施药后依旧进入了水稻根际微环境,对其中的微生物群落造成胁迫,降低其整体活性(图 5)。Shannon 指数、Simpson 指数、Pielou 指数和 McIntosh 指数可以综合表征土壤微生物群落中物种的丰富度、分布的均匀度以及不同微生物对碳源的利用程度^[21]。本研究发现,多菌灵暴露显著降低了根际土壤微生物 Shannon、Simpson 和 McIntosh 指数,这是因为作为广谱性杀菌剂,多菌灵可能会无差别地毒杀水稻根际土壤中的病原菌与有益微生物,从而造成群落多样性的降低^[8]。AWCD 值是从微生物群落对碳源的相对利用能力来反映土壤微生物的种群数量及结构特征,其值大小与微生物代谢活性水平呈正相关关系^[20-21]。肖丽等^[39]的研究发现多菌灵污染能够对土壤生物量碳造成抑制作用,这表明其减弱了土壤微生物对碳源的整体代谢活力。在本实验中,接种内生菌 DJL-M3 能够提高多菌灵暴露下水稻根际土壤微生物的 AWCD 值及多样性指数,这可能是接种 DJL-M3 提高了根际残留多菌灵的代谢速率(表 1),同时减少的外源污染胁迫维护了原有微生物群落的多样性,而被 DJL-M3 促生的水稻植株同样可以通过有益的根际互作提高微生物的活力。土壤微生物对不同类型碳源的利用强度可以反映土壤肥力与质量的变化,体现其群落结构在碳素物质转化和能量流动中的协同与竞争作用^[40]。因为土壤微生物群落对碳源的利用主要集中在碳水化合物(糖类)、氨基酸和羧酸^[20],而多菌灵污染能够降低土壤微生物群落的活力及多样性,进而抑制它们对这类碳源的利用。我们发现接种降解性内生菌 DJL-M3 同样改变了根际土壤微生物群落对碳源的代谢模式,这可能是由 DJL-M3 对特殊碳源的偏好性造成;除此之外,内生菌定殖宿主后能够改变宿主植株所在土壤微生物的数量及组成,比如土壤细菌与真菌的比值^[41],这同样会影响根际微生物群落对碳源的整体利用方式。在土壤微生物对碳源代谢的主成分分析中,CBZ 组的 PC 值与其他两组的距离要远大于它们之间的距离,这表明多菌灵残留对水稻根际微生态的影响要强于 *S. pavanii* DJL-M3 的引入,这是因为相对于单个菌株的接种,土壤微生物群落具有足够的缓冲能力进行适应和再平衡,多菌灵等农药污染会改变土壤的理化性质与植物生理状况,进而在短期内重塑根际土壤微生物组成及代谢特性^[42]。综上所述,多菌灵暴露显著抑制水稻根际土壤微生物对碳源的代谢活性,降低其物种组成多样性与均匀度。接种降解性内生菌 DJL-M3 能够促进胁迫下水稻根际微生物对碳源的整体利用能力,提高微生物群落的多样性并在一定程度上缓解多菌灵对水稻根际微生物群体的胁迫效应,最终将多菌灵胁迫下水稻根际微生物碳源代谢特征修复到接近无污染水平。

4 结论

本研究揭示了接种内生降解菌 *Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3 能在促进水稻根际多菌灵残留降解代谢的同时,缓解多菌灵暴露对土壤微生物群落和蚯蚓的胁迫损害,提高多菌灵污染条件下根际土壤酶活性及微生物群落代谢功能多样性。因此,降解性内生菌在修复多菌灵等农药污染暴露下的水稻根际微生态环境中具有较强的应用潜力。

参考文献 (References):

- [1] 吴林坤,林向民,林文雄. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望. 植物生态学报, 2014, 38(3): 298-310.
- [2] 李亚梦,李晋成,李芹,田娟娟,解超男,吴立冬,刘欢. 稻渔综合种养模式下多菌灵的残留现状研究进展. 中国渔业质量与标准, 2019, 9(4): 64-70.

- [3] 呼蕾, 和文祥, 王旭东, 郑粉莉. 草甘膦的土壤酶效应研究. 农业环境科学学报, 2009, 28(4): 680-685.
- [4] 吴成, 王蕾, 赵志强. 对国家标准 GB 2763-2014 中多菌灵、苯菌灵和甲基硫菌灵残留规定存在问题分析. 农产品质量与安全, 2016, (4): 69-71, 76-76.
- [5] 徐信辉, 施春雷. 多菌灵的毒性及风险评估研究进展. 南方农业, 2019, 13(34): 40-44, 47-47.
- [6] Rico A, Sabater C, Castillo M Á. Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 127: 222-229.
- [7] Wang K, Fan R L, Ji W N, Zhang W W, Chen X M, Wang S, Yin L, Gao F C, Chen G H, Ji T. Transcriptome analysis of newly emerged honeybees exposure to sublethal carbendazim during larval stage. Frontiers in Genetics, 2018, 9: 426.
- [8] Fang H, Han L X, Cui Y L, Xue Y F, Cai L, Yu Y L. Changes in soil microbial community structure and function associated with degradation and resistance of carbendazim and chlortetracycline during repeated treatments. Science of The Total Environment, 2016, 572: 1203-1212.
- [9] Eissa S, Zourob M. Selection and characterization of DNA aptamers for electrochemical biosensing of carbendazim. Analytical Chemistry, 2017, 89(5): 3138-3145.
- [10] 刘双双, 杨仁斌, 陈海平, 傅强. 多菌灵在水稻及土壤中的消解动态和残留规律研究. 农业环境科学学报, 2012, 31(2): 357-361.
- [11] Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada A, Besil N, Heinzen H, Böcking B, Cesio V, Fernández-Alba A R. Occurrence and distribution study of residues from pesticides applied under controlled conditions in the field during rice processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(18): 4440-4448.
- [12] Chen S, Ma Z, Li S Y, Waigi M G, Jiang J D, Liu J, Ling W T. Colonization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria on roots reduces the risk of PAH contamination in vegetables. Environment International, 2019, 132: 105081.
- [13] Jan R, Khan M A, Asaf S, Lubna, Lee I J, Kim K M. Metal resistant endophytic bacteria reduces cadmium, nickel toxicity, and enhances expression of metal stress related genes with improved growth of oryza sativa, via regulating its antioxidant machinery and endogenous hormones. Plants, 2019, 8(10): 363.
- [14] Feng F Y, Chen X L, Wang Q, Xu W J, Long L, El-Masry G N, Wan Q, Yan H J, Cheng J J, Yu X Y. Use of *Bacillus-siamensis*-inoculated biochar to decrease uptake of dibutyl phthalate in leafy vegetables. Journal of Environmental Management, 2020, 253: 109636.
- [15] Feng F Y, Ge J, Li Y S, He S, Zhong J F, Liu X J, Yu X Y. Enhanced degradation of chlorpyrifos in rice (*Oryza sativa* L.) by five strains of endophytic bacteria and their plant growth promotional ability. Chemosphere, 2017, 184: 505-513.
- [16] Zhan H L, Wan Q, Wang Y, Cheng J F, Yu X Y, Ge J. An endophytic bacterial strain, *Enterobacter cloacae* TMX-6, enhances the degradation of thiamethoxam in rice plants. Chemosphere, 2021, 269: 128751.
- [17] 李依韦, 毕佳欣, 袁琴, 尹萌萌, 魏晓奇. 不同施肥处理玉米根际微生物种群结构及代谢多样性. 中国微生物学杂志, 2020, 32(1): 21-24, 30-30.
- [18] 段媛媛, 刘晓洪, 吴佳奇, 周武先, 郭晓亮, 游景茂, 唐涛, 王帆帆, 郭杰. 间作模式对黄连生理生长性状及根际土壤理化性质的影响. 生态学杂志, 2020, 39(11): 3676-3685.
- [19] 王冰洁, 姜蕾, 潘波, 刘迎, 林勇. 草甘膦对蚯蚓体内抗氧化酶和 AChE 酶活性的影响. 热带作物学报, 2019, 40(9): 1804-1809.
- [20] 赵倩, 任广伟, 王杰, 王新伟, 韦建玉, 王晓强, 卢燕回, 陈信, 王静. 施用韩国假单胞菌(*Pseudomonas koreensis*) CLP-7 对连作烟田土壤质量及微生物群落功能多样性的影响. 生态学报, 2020, 40(15): 5357-5366.
- [21] 王雪梅, 黄利群, 刘成, 李佳芮, 胡金朝, 刘国. 基于 Biolog-ECO 分析稀土、铅和氟复合污染农田土壤微生物群落功能多样性. 应用与环境生物学报, (2020- 10- 15). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CJFQ&dbname=CAPJLAST&filename=YYHS20201015001>.
- [22] 巩彪, 张丽丽, 隋申利, 王秀峰, 魏琨, 史庆华, 杨凤娟, 李岩. 大蒜秸秆对番茄根结线虫病及根际微生态的影响. 中国农业科学, 2016, 49(5): 933-941.
- [23] 孙佳为, 郭正元, 罗敏, 谭智勇. 多菌灵与氟硅唑对土壤微生物及酶活性的影响. 湖南农业科学, 2009, (11): 49-51, 65-65.
- [24] 李锐, 刘瑜, 褚贵新. 不同种植方式对绿洲农田土壤酶活性与微生物多样性的影响. 应用生态学报, 2015, 26(2): 490-496.
- [25] Wang W F, Wan Q, Li Y X, Ge J, Feng F Y, Yu X Y. Application of an endophyte *Enterobacter* sp. TMX13 to reduce thiamethoxam residues and stress in Chinese cabbage (*Brassica chinensis* L). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(34): 9180-9187.
- [26] 付风云, 相立, 徐少卓, 刘训理, 沈向, 陈学森, 尹承苗, 毛志泉. 多菌灵与微生物有机肥复合对连作平邑甜茶幼苗及土壤的影响. 园艺学报, 2016, 43(8): 1452-1462.
- [27] 郇志博, 罗金辉. 多菌灵及其杂质和代谢物对赤子爱胜蚯蚓的急性毒性和遗传毒性. 热带农业科学, 2014, 34(10): 78-81.
- [28] Yao X F, Zhang F W, Qiao Z H, Yu H Y, Sun S A, Li X D, Zhang J W, Jiang X Y. Toxicity of thifluzamide in earthworm (*Eisenia fetida*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 188: 109880.
- [29] Liu T, Liu Y L, Fang K, Zhang X L, Wang X G. Transcriptome, bioaccumulation and toxicity analyses of earthworms (*Eisenia fetida*) affected by

- trifloxystrobin and trifloxystrobin acid. *Environmental Pollution*, 2020, 265: 115100.
- [30] Zhao Q, Zhou L J, Liu J C, Cao Z Z, Du X X, Huang F D, Pan G, Cheng F M. Involvement of CAT in the detoxification of HT-induced ROS burst in rice anther and its relation to pollen fertility. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(5): 741-757.
- [31] Mahapatra K, De S, Banerjee S, Roy S. Pesticide mediated oxidative stress induces genotoxicity and disrupts chromatin structure in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seedlings. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 369: 362-374.
- [32] 李冰, 白桂芬, 谢艳. 敌百虫对蚯蚓体内几种解毒酶活性的影响. *天津师范大学学报: 自然科学版*, 2015, 35(3): 116-118.
- [33] Hackenberger D K, Palijan G, Lončarić Ž, Glavaš O J, Hackenberger B K. Influence of soil temperature and moisture on biochemical biomarkers in earthworm and microbial activity after exposure to propiconazole and chlorantraniliprole. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 148: 480-489.
- [34] Mrdaković M, Ilijin L, Vlahović M, Matić D, Gavrilović A, Mrkonja A, Perić-Mataruga V. Acetylcholinesterase (AChE) and heat shock proteins (Hsp70) of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larvae in response to long-term fluoranthene exposure. *Chemosphere*, 2016, 159: 565-569.
- [35] Jiang W, Duysen E G, Lockridge O. Induction of plasma acetylcholinesterase activity and apoptosis in mice treated with the organophosphorus toxicant, tri-*o*-cresyl phosphate. *Toxicology Research*, 2012, 1(1): 55-61.
- [36] Gambardella C, Mesarić T, Milivojević T, Sepčić K, Gallus L, Carbone S, Ferrando S, Faimali M. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2014, 186(7): 4249-4259.
- [37] 李慧, 李雪梦, 姚庆智, 李强. 基于 Biolog-ECO 方法的两种不同草原中 5 种不同植物根际土壤微生物群落特征. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 2947-2958.
- [38] 郎漫, 李平, 蔡祖聪. 多菌灵在土壤中的降解及其生态环境效应. *农药*, 2012, 51(1): 8-10, 34-34.
- [39] 肖丽, 冯燕燕, 赵靓, 周川, 冶军, 危常州, 侯振安. 多菌灵对灰漠土土壤微生物的影响. *新疆农业科学*, 2012, 49(4): 638-645.
- [40] 林婉奇, 薛立. 基于 BIOLOG 技术分析氮沉降和降水对土壤微生物功能多样性的影响. *生态学报*, 2020, 40(12): 4188-4197.
- [41] 任豫霜, 朱丹, 姜伟, 李玖燃, 张磊. 酸性土壤中接种耐酸根瘤菌对豆科植物根际微生态的影响. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(4): 1077-1088.
- [42] Hameed A, Yeh M W, Hsieh Y T, Chung W C, Lo C T, Young L S. Diversity and functional characterization of bacterial endophytes dwelling in various rice (*Oryza sativa* L.) tissues, and their seed-borne dissemination into rhizosphere under gnotobiotic P-stress. *Plant and Soil*, 2015, 394(1/2): 177-197.