

转基因作物在土壤环境中的残留及其对土壤生物的影响^①

汪海珍 徐建民 谢正苗

(浙江大学水土资源与环境研究所 杭州 310029)

摘 要 随着转基因作物的推广和应用, 其对农田生态系统造成的潜在危害日益引起人们的重视。本文综述了转基因作物在土壤中的残留及其对土壤动物、土壤微生物和土壤酶活性影响的研究进展, 为转基因作物对土壤环境的生态风险性评价提供参考。

关键词 转基因作物; 残留; 土壤生物

中图分类号 S31; S188

转基因作物是指利用生物技术, 把从动物、植物或微生物等生物体中鉴定、分离的目的基因插入植物基因组中, 改变其遗传组成, 产生新的农艺性状的植物。自 1983 年世界首例转基因烟草在美国问世后, 全球范围掀起了研究和开发转基因技术的热潮。转基因作物在培育抗虫、抗病、抗逆境、抗除草剂和高产优质等农作物新品种方面取得了令人瞩目的成绩。但随着转基因作物的商品化和在生产上的大面积种植, 转基因作物在自然环境释放后的潜在生态风险问题也日益引起人们的重视。转基因作物的生态风险评估中, 除了转基因作物与野生亲缘种间的基因漂流、靶标生物的抗性以及对非目标生物物种多样性的影响之外, 还应包括对土壤生态环境、土壤微生物群落结构和多样性影响的研究^[1~4]。目前, 转基因作物对土壤生态系统的影响已经成为转基因作物释放的生物安全性研究的新热点。本文根据近年来国内外的研究进展, 对转基因作物在土壤中的残留及其对土壤动物、土壤微生物结构和土壤酶活性的影响进行简要综述, 为系统评价转基因作物释放可能引起的生态环境风险提供参考。

1 转基因作物在土壤中的残留

1.1 转基因作物在土壤中的残留途径

转基因作物的外源基因及其表达产物可通过许多途径进入土壤生态系统, 其中最直接的途径包括 3 个方面:

(1) 作物残茬: 转基因作物在收割前后遗留在田间的根茬和残枝落叶等是转基因作物的外源基因

及其表达产物进入土壤中的最主要途径。

据 James^[5]报道, 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 产生的 Bt 毒素蛋白可通过枯枝落叶残留在土壤中, 与土壤黏粒结合而不易降解, 毒性可持续 2~3 个月。Sims 等^[6]研究发现, 转 Bt 基因玉米收获后, 根茬中的 Bt 杀虫蛋白 1447 天后才消失。田间条件下, 转蛋白酶抑制剂基因烟草凋落物中的蛋白酶抑制剂在 57 天后仍然保持一定的免疫活性, 14 天时蛋白酶抑制剂的浓度为起始浓度的 43%, 35 天时为 0.33%, 57 天时为 0.05%^[7]。另外, 抗生素基因也可通过转基因作物的残枝落叶转移到土壤中。Widmer 等^[8]利用叶枝埋入土壤法对转基因烟草中抗生素基因在土壤中的残留进行了研究, 120 天后仍能够检测到 0.14% 的外源抗生素序列。Hoffmann 等^[9]通过实验证实, 转基因油菜、黑芥菜、蒺藜和甜豌豆中抗生素基因可通过残枝落叶转移到黑曲霉微生物中从而导致外源基因的逃逸。

近年来许多研究表明, 转基因作物中的杀虫蛋白的表达存在一定的时间和空间效应^[3,10~12]。在时间上, 不同生育时期的杀虫蛋白表达量有所不同; 在空间上, 不同组织器官的杀虫蛋白含量也有显著差异。因而, 除了对转基因作物的外源基因及其表达产物在土壤中的残留进行检测和试验之外, 对转基因作物体内毒素存在的状态、毒性消长时间, 尤其是作物残体中毒素含量及活性变化等也需开展深入研究, 为大规模种植转基因作物的风险评价提供科学依据。

(2) 根系分泌物: 转基因作物的根系也表达毒

^①高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划项目资助。

素蛋白,同时其根系分泌物也在源源不断地向作物根际周围土壤释放外源基因及其表达产物。在土培和水培转 Bt 基因玉米的根系分泌物中均发现了活性 Bt 毒素^[13]。将转 Bt 基因玉米幼苗生长 25 天后的根际土壤用缓冲提取液旋转离心,用 SDS-PAGE 电泳方法检测不到 Bt 毒素蛋白,但生物测试法证明根系分泌物中的毒素蛋白仍具有杀虫毒性。用转 Bt 基因玉米的根系分泌物在室内喂养欧洲玉米螟,5 天后死亡率高达 95%~100%,对照组则无一死亡;而且用根际土壤的悬浮颗粒直接进行生物检测,具有与上清液相当的杀死率。Saxena 等^[14]还对转 Bt 玉米生物体及其根系分泌物释放的毒素对土壤蚯蚓、线虫、原生动物、细菌和真菌的影响进行了研究,结果表明转 Bt 玉米生物体和根系分泌物释放的 Bt 毒素蛋白在土壤中至少保持 180 天的杀虫活性,生物体和根系分泌物的致死率分别为 68%±11.9% 和 56%±11.9%,但毒素的降解中间产物对土壤蚯蚓、线虫、原生动物、细菌和真菌没有毒性。盆栽种植实验结果也证明了转 Bt 基因水稻确实能通过根系分泌物向土壤导入杀虫晶体蛋白,而且导入量与植株生长发育时间有关^[12]。

(3) 花粉:绝大多数转基因作物在花粉中表达毒素蛋白,且表达的量很高,转基因作物花粉的散布成为外源基因逃逸的主要渠道之一。张秀娟^[15]报道,不同的转基因作物花粉传播的距离不同,而且传粉距离和转基因作物种群规模直接相关。转 Bt 基因水稻花粉向桑叶上飘飞程度的田间试验表明,桑叶自然飘落的转 Bt 水稻花粉平均为 3.8 粒/cm²,转 Bt 水稻在我国南方蚕桑地区推广将可能对家蚕的生长发育造成负面影响^[16]。Losey 等^[17]研究发现,饲喂转 Bt 基因玉米花粉污染的马利筋可杀死黑脉金斑蝶幼虫。但有关转基因作物花粉的毒素在土壤中残留及其存活特性研究目前尚未见报道。

1.2 转基因作物的表达毒素与土壤组分的结合

Crecchio 等^[18]研究了 Bt 亚种 *kurstaki* 产生的毒素蛋白(Btk)与蒙脱石-腐殖酸-Al 羟基聚合体混合物的稳态吸附和结合,结果表明,在 1 h 内吸附达到总吸附量的 70%,在 8 h 内产生了最大吸附,吸附量随毒素量的增加而提高,稳态吸附的等温线为 L-型。Tapp 等^[19]研究发现,土壤中 Bt 毒素蛋白仅在很短时间内呈游离态,土壤黏粒和腐殖酸能迅速吸附 Bt 蛋白并紧紧地结合,234 天后的结合态 Bt 蛋白对烟草甲虫和天蛾幼虫仍有毒害作用,而且其

杀虫活性比游离态 Bt 蛋白还强,但结合态 Bt 蛋白的结构并未被修饰。Btk 与 4 种不同土壤纯化的腐殖酸的结合试验亦证实了 Btk 毒素蛋白能快速与胡敏酸结合,结合能力与腐殖酸的各种功能团有关,并且结合态 Btk 毒素保持较高的杀虫活性^[20]。研究表明,与土壤黏粒、腐殖物质等组分结合的转基因毒素比游离态毒素更不易被微生物降解,土壤中结合态的毒素蛋白不能作为微生物生长所需的 C 源,只有极少部分可作为 N 源被利用^[19~21]。由此可见,土壤中的毒素蛋白可通过与土壤各组分的结合而被积累并长期存在,残留的结合态毒素能对非目标生物造成危害和增加目标昆虫的选择抗性,这将会增加转基因作物释放可能引起的生态环境风险。

2 转基因作物对土壤生物的影响

2.1 转基因作物对土壤动物的影响

土壤动物是表征土壤质量变化的敏感生物学指标之一。因而,转基因作物的外源基因及其表达产物进入土壤后对土壤动物的影响受到了较多关注。转凝集素基因马铃薯的盆栽试验和大田试验均表明,原生动物类群、鞭毛虫和变形虫数量与对照相比都有显著降低;叶的分解试验表明,转凝集素基因马铃薯原生动物类群明显减少,原生动物总生物量、鞭毛虫生物量与对照间的差异达到极显著水平,变形虫生物量差异显著;但与对照相比,转凝集素基因马铃薯土壤线虫在生长期没有差异,残茬分解对线虫也没有很大影响^[22]。Donegan 等^[7]实验结果还得到,转蛋白酶抑制剂基因番茄周围的土壤与亲本和空白土壤相比,弹尾虫种群数量下降,线虫数量显著增加,但原生动物没有明显差别。而 Romeis 等^[1]研究也表明,与常规作物相比,转基因小麦的种植和根茬分解对土壤线虫的生长没有不良影响,但转基因作物对非目标生物的潜在影响仍不容忽视。

2.2 转基因作物对土壤微生物的影响

转基因作物根系分泌物及其残体进入土壤后,可能与土壤微生物相互作用,对微生物群落结构及其活动过程等构成影响。Donegan 等^[23]发现,种植转基因紫花苜蓿的土壤细菌群落功能多样性比非转基因紫花苜蓿土壤单一,但可培养的需氧芽孢杆菌和利用纤维素的细菌数量显著增多;美国几种 Bt 抗虫棉土壤微生物数量、种群和组成与常规棉的差异显著。实验室研究表明,转 Bt 基因水稻秸秆降解

对土壤真菌和细菌具有显著影响,对土壤的放线菌和反硝化细菌活性有一定负面影响,但对解磷细菌的活性没有明显作用^[24]。沈法富等^[3]大田栽培试验证实了转基因抗虫棉根际微生物和细菌生理群的数量发生了变化,根际细菌生理群的 Simpson 指数、Shannon-Wiener 指数和细菌生理群分布的均匀度皆下降。Savka 等^[25]研究表明,转冠瘿碱基因烟草根系分泌物组成的改变影响了两种假单孢菌的物种丰富度,以冠瘿碱为代谢物的种群数量是另一种细菌种群的 2~3 倍。对转甘露碱基因烟草根系分泌物对根际细菌影响的研究结果发现,转基因作物的根系分泌物可改变根际微环境并导致细菌群落结构发生变化。在转甘露碱基因烟草根际土壤中以甘露碱为底物的细菌数量是非转基因烟草的 80 倍,而细菌总数和芽孢细菌、耐热细菌、荧光假单孢菌属细菌的数量与非转基因烟草相比较无显著差异性^[26]。钱迎倩等^[27]也报道,带有几丁质酶的抗真菌转基因作物会通过残枝落叶的降解物或根系分泌物减少土壤中菌根的种群。带有抗真菌和细菌蛋白的转基因作物,在提高了对有害菌抵抗能力的同时,也会对土壤中其他有益菌造成一定威胁,破坏土壤生态系统和物种群落结构,对作物带来不利影响^[28]。

转基因作物通过残枝落叶和根系分泌物引起土壤微生物种类、数量的变化,同时也可能改变微生物群落生理特性和代谢活性,对土壤中作物残茬分解和 C、N 等养分循环过程产生负面效应,进而影响土壤生物、生态过程和肥力^[2]。研究表明,转蛋白酶抑制剂烟草与亲本在起始取样时有机 C 含量相同,35 天后转蛋白酶抑制剂烟草凋谢物中的有机 C 含量明显低于亲本^[7],说明微生物利用底物的差异性。

2.3 转基因作物对土壤酶活性的影响

土壤酶活性体现了土壤中各种生物化学过程的强度和方向,是反映土壤质量变化的敏感指标之一。研究结果表明,含有凝集素和内切几丁质酶的转基因马铃薯释放后,提高了土壤脱氢酶的活性^[22];而转 α -淀粉酶和木质素过氧化物酶基因的紫花苜蓿使得土壤脱氢酶和碱性磷酸酶活性下降^[23]。盆栽实验证明,种植转 Bt 基因水稻后,土壤酶活性发生了显著变化,而且变化幅度与土壤酶的类型和转 Bt 基因水稻的生长发育时间有关。与非 Bt 基因水稻相比,转 Bt 基因水稻生长 15 天时,土壤脲酶活性降低了 2.47%,土壤酸性磷酸酶活性提高了 8.91%,土壤

芳基硫酸酯酶活性有所下降而脱氢酶活性有所增加,但差异不显著;生长 30 天时,土壤脲酶活性下降了 16.36%,土壤酸性磷酸酶、芳基硫酸酯酶和脱氢酶活性显著升高,增幅分别是 35.69%、19.70%和 16.83%;土壤蔗糖酶活性在测定过程中则无明显改变^[12]。吴伟祥等^[11]在实验室条件下通过秸秆还土试验研究了孕穗期和成熟期转 Bt 基因克螟稻秸秆对淹水土壤磷酸酶和脱氢酶活性的影响,结果认为土壤脱氢酶活性可作为转 Bt 基因水稻生态安全风险性评价的潜在指标。

3 结语

转基因作物对土壤生物的影响依赖于许多因素,迄今的研究结果也尚无定论。有诸多报道表明,转基因作物对土壤生物有毒害作用,其给环境带来的潜在风险乃是今后人类在推广转基因作物时所面临的重大挑战之一。也有实验结果认为,转基因作物对土壤生物没有影响,但随着时间的积累及生物富集作用的不断扩大,其危害性是否会逐步显现却存在高度的不可预见性。因此,今后还应加强转基因作物对土壤环境或农业生态系统的风险监测和评估,特别要重点开展敏感指标的筛选和评价,使转基因作物对环境的负面影响减少到最低限度。另外,值得注意的是,有关转基因作物对土壤生物影响的绝大部分研究结果大都是在实验室或盆栽条件下获得,转基因作物对土壤生态系统的潜在环境风险仍需通过田间试验进一步探讨和长期跟踪研究,以便作出更精确的评价。

参考文献

- 1 Romeis J, Battini M, Bigler F. Transgenic wheat with enhanced fungal resistance causes no effects on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae). *Pedobiologia*, 2003, 47: 141 ~ 147
- 2 Lachnicht SL, Hendrix PF, Potter RL, Coleman DC, Crossley Jr DA. Winter decomposition of transgenic cotton residue in conventional-till and no-till systems. *Applied Soil Ecology*, 2004, 27: 135 ~ 142
- 3 沈法富, 韩秀兰, 范术丽. 转 Bt 基因抗虫棉根际微生物区系和细菌生理群多样性的变化. *生态学报*, 2004, 24 (3): 432 ~ 437
- 4 聂建荣, 王建武, 骆世明. 转基因植物对农业生物多样性的影响. *应用生态学报*, 2003, 14 (8): 1369 ~ 1373

- 5 James RR. Utilizing a social ethic toward the environment in assessing genetically engineered insect-resistance in trees. *Agriculture and Human Value*, 1997, 14: 237 ~ 249
- 6 Sims SR, Ream JE. Soil inactivation of the insecticidal protein within transgenic cotton tissue: Laboratory microcosms and field studies. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 1997, 45 (6): 1502 ~ 1505
- 7 Donegan KK, Seidler RJ, Fieland VJ, Schaller DL, Palm CJ, Ganio LM, Cardwell DM, Steinberger Y. 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. *Journal of Applied Ecology*, 1997, 34 (3): 767 ~ 777
- 8 Widmer F, Seidler RJ, Watrud LS. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Molecular Ecology*, 1996, 5 (5): 603 ~ 613
- 9 Hoffmann T, Golz C, Schieder O. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *A. niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Current Genet*, 1994, 27: 70 ~ 76
- 10 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 叶恭银, 谢小波, 夏英武. “克螟稻”后代 cryIAb 基因表达特性及其对二化螟抗性的研究. *中国农业科学*, 2001, 34 (5): 496 ~ 501
- 11 吴伟祥, 叶庆富, 闵航. 不同生长期转 Bt 基因水稻秸秆还土对淹水土壤酶活性的影响. *生态学报*, 2003, 23 (11): 2353 ~ 2358
- 12 孙彩霞, 陈利军, 武志杰, 张玉兰, 张丽莉. 种植转 Bt 基因水稻对土壤酶活性的影响. *应用生态学报*, 2003, 14 (12): 2261 ~ 2264
- 13 Saxena D, Florest S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 1999, 402: 480
- 14 Saxena D, Florest 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
- 15 张秀娟. 转基因作物潜在生物入侵问题. *世界环境*, 2004, (1): 47 ~ 50
- 16 樊龙江, 吴月友, 庞洪泉, 吴建国, 舒庆尧, 徐孟奎, 陆剑飞. 转基因 Bt 水稻花粉在桑叶上的自然飘落浓度. *生态学报*, 2003, 23 (4): 826 ~ 833
- 17 Losey JE, Rayor LS, Carter ME. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 1999, 399: 214
- 18 Crecchio C, Stotzky G. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 573 ~ 581
- 19 Tapp H, Stotzky G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30: 471 ~ 476
- 20 Crecchio C, Stotzky G. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30: 463 ~ 470
- 21 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 of Environmental Quality*, 2000, 29: 691 ~ 705
- 22 Griffiths BS, Geoghegan IE, Robertson WM. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes. *Journal of Applied Ecology*, 2000, 37 (1): 159 ~ 170
- 23 Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM, Schaller DL, Bucio LQ, Seidler RJ. 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 (2): 111 ~ 124
- 24 王洪兴, 陈欣, 唐建军, 叶庆富, 王忠华. 转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响. *生态学报*, 2004, 24 (1): 89 ~ 94
- 25 Savka MA, Farrand SK. Modification of rhizobacterial populations by engineering bacterium utilization of a novel plant-produced resource. *Nature Biotechnology*, 1997, 15 (4): 363 ~ 368
- 26 Oger P, Petit A, Dessaux Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature Biotechnology*, 1997, 15 (4): 369 ~ 372
- 27 钱迎倩, 马克平. 经遗传修饰生物体的研究进展及其释放后对环境的影响. *生态学报*, 1998, 18 (1): 1 ~ 9
- 28 Glandorf DCM, Bakker PAHM, Loon LC. Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora. *Acta Botanica Neerlandica*, 1997, 46 (1): 85 ~ 104

RESIDUES OF TRANSGENIC PLANTS IN SOIL AND IMPACT ON SOIL ORGANISMS

WANG Hai-zhen XU Jian-min XIE Zheng-miao

(*Institute of Soil and Water Resources and Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029*)

Abstract With the popularization and application of transgenic plants an increasing attention has been paid to their potential impact on the cultivated ecosystems. This paper reviewed progresses in the study on residues of transgenic plants in soil and their effects on soil microfauna, soil microorganisms and soil enzyme activities. The review should provide reference for ecological risk assessment of transgenic plants to soil environment.

Key words Transgenic plants, Residues, Soil organisms