

## 转 *Bt* 玉米对土壤酶活性及速效养分的影响<sup>①</sup>

刘 玲<sup>1,2</sup>, 赵建宁<sup>1\*</sup>, 李 刚<sup>1</sup>, 杨殿林<sup>1</sup>, 王生荣<sup>2</sup>, 娜布其<sup>1,3</sup>, 娜日苏<sup>1,3</sup>

(1 农业部环境保护科研监测所, 农业部转基因生物生态环境安全监督检验测试中心, 天津 300191;  
2 甘肃农业大学草业学院, 兰州 730070; 3 内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022)

### Effects of Transgenic *Bt* Maize on Soil Available Nutrients and Enzyme Activities

LIU Ling<sup>1,2</sup>, ZHAO Jian-ning<sup>1</sup>, LI Gang<sup>1</sup>, YANG Dian-lin<sup>1</sup>, WANG Sheng-rong<sup>2</sup>, NA Bu-qi<sup>1,3</sup>, NA Ri-su<sup>1,3</sup>

(1 *Agro-Environmental Protection Institute, Eco-safety Supervision, Inspection & Testing Center of Genetically Modified Organisms, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China*; 2 *Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China*;  
3 *College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China*)

**摘 要:** 采用三室根箱法研究了转 *Bt* 玉米对播种后 40、50、60 天不同根区 (S1、S2、S3) 土壤速效养分及酶活性的影响。结果表明, 与对照亲本玉米相比, 种植 *Bt* 玉米对土壤过氧化氢酶活性无显著影响, 土壤脲酶活性在播种后 50 天时 S1 根区显著增高 6.91%, 碱性磷酸酶活性在 60 天时 S1 根区显著降低 8.12%; 土壤硝态氮含量无显著变化, 土壤铵态氮、速效磷含量不同种植天数各根区表现不同, 无明显变化规律。主成分分析结果表明转 *Bt* 玉米与非转基因亲本根区土壤速效养分含量和酶活性相似性高, 仅 3 个采样时期之间存在微小差异。

**关键词:** 转 *Bt* 玉米; 土壤酶; 土壤速效养分; 根箱

**中图分类号:** S154.2

转 *Bt* 基因玉米是全球商品化最快的抗虫转基因作物之一, 它通过转入苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的晶体蛋白基因使玉米自身产生抗虫蛋白而达到抗虫目的, 对靶标害虫玉米螟有很好的控制作用。随着越来越多的转 *Bt* 基因玉米在全球大规模商业化种植, 其对环境及土壤生态系统的风险评价受到了广泛的关注。土壤酶在土壤物质和能量转化过程中起主要的催化作用, 其活性大小可较敏感地反映土壤中各种生物化学过程的强度和方向<sup>[1]</sup>; 土壤速效养分是转基因作物生长发育过程中可利用的土壤氮、磷素的重要来源, 可以在土壤全量养分变化之前反映土壤的微小变化, 又直接参与土壤生物化学转化过程<sup>[2]</sup>。因而, 土壤酶和土壤速效养分已成为评价土壤养分平衡和土壤化学、生物化学肥力保持的重要指标。研究表明, 转基因作物种植过程中其外源基因的表达产物

有可能进入土壤生态系统而引起土壤微生物、酶活性的改变, 也可能通过根系分泌物的组成和质量改变, 直接或间接地影响土壤营养元素转化的相关过程<sup>[3]</sup>。目前, 关于转 *Bt* 玉米杀虫晶体蛋白通过根系分泌物或凋落物分解进入土壤后, 对生态系统营养元素循环与土壤酶活性产生的影响尚未定论<sup>[4]</sup>。本试验采用三室根箱装置, 探讨了转 *Bt* 玉米及其非转基因亲本玉米种植 40、50、60 天后不同根区土壤脲酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶活性以及土壤中硝态氮、铵态氮和速效磷含量的变化, 以期种植转 *Bt* 基因玉米的生态风险评估提供基础资料和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试土壤为潮湿锥形土 (Aquic Cambosolo), 取

①基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项项目 (2011ZX08011-002、2011ZX08012-005) 和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (农业部环境保护科研监测所) 资助。

\* 通讯作者 (zhaojn2008@163.com)

作者简介: 刘玲 (1985—), 女, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 主要从事转基因作物对土壤微生物多样性影响研究。E-mail: liuling116116@163.com

自中国农业科学院武清转基因生物农田生态环境影响野外科学观测试验站中未种植过转基因作物的土地。土壤有机质含量为 10.69 g/kg, 全氮 0.63 g/kg, 全磷 1.35 g/kg。供试 *Bt* 玉米为 *Bt11*, 以玉米 (*Zea mays* L.) NK4640 为亲本转入 *cry1Ab* 基因培育而成, 试验中对照为其非转基因亲本 NK4640, 这两个品种均由吉林省农业科学院生物技术研究中心提供。

### 1.2 试验设计及样品采集

试验在农业部环境保护科研监测所网室内进行, 三室根箱装置采用非透明有机玻璃加工而成, 植物生长室宽 3 cm, 两个土壤室宽度均为 5 cm, 植物生长室和两个土壤室之间用 30  $\mu$ m 孔径的尼龙网相隔, 将根系限制在生长室中生长, 以便于将植物根系与土壤分开, 这一设计充分避免了根系生长进入相邻土壤室, 实现了各室间物理分离的同时, 又确保了土壤养分及根系分泌物等的室间迁移, 示意图见图 1。设转基因玉米 *Bt11* 和其非转基因亲本对照玉米两个处理, 各 4 次重复, 于 2009 年 7 月 10 日播种, 每盒播种 2 粒玉米种子, 待 3 叶期时, 留苗一株, 分别于播种后 40、50 和 60 天采样。土壤样品采集时取植物生长室土壤用 S1 表示; 两侧土壤室紧贴尼龙网一侧 4 mm 范围内的土壤作为根际土, 用 S2 表示; 4 mm 之外的土壤作为非根际土<sup>[5]</sup>, 用 S3 表示, 新鲜土样混匀后一部分风干、过筛用于土壤酶和速效磷的测定, 其余部分用于测定硝态氮和铵态氮。

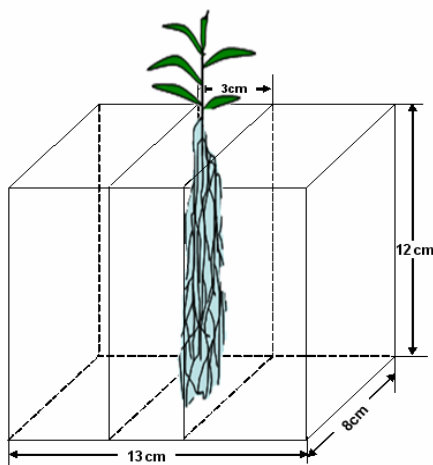


图 1 三室根箱剖面图

### 1.3 测定方法

土壤脲酶、碱性磷酸酶和过氧化氢酶活性分别采用苯酚钠比色法、磷酸苯二钠比色法和高锰酸钾滴定

法测定<sup>[6]</sup>。土壤速效磷、硝态氮、铵态氮含量的测定参照文献<sup>[7]</sup>方法。

### 1.4 数据分析

采用 Excel2003 软件对数据进行处理, 用 SPSS16.0 统计分析软件对数据进行方差分析 (多重比较用 Duncan 法) 和主成分分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 转 *Bt* 玉米种植对土壤酶活性的影响

转 *Bt* 基因玉米种植 40、50 和 60 天后各根区土壤酶活性变化因土壤酶种类的不同而表现出差异 (表 1), 播种后 50 天 S1 根区土壤脲酶活性较亲本玉米显著提高 6.91%, Sun 等<sup>[8]</sup>进行的转 *Bt* 基因棉花残体培养试验结果认为转 *Bt* 棉花的种植一定程度上提高了土壤脲酶活性, 王建武等<sup>[9]</sup>的研究也表明转 *Bt* 玉米添加培养前期显著提高了土壤脲酶活性。土壤磷酸酶可影响土壤有机磷的分解, 在一定程度上反映了土壤环境中磷的存在状况, 播种后 60 天 S1 根区土壤碱性磷酸酶活性显著低于亲本玉米 (降幅为 39.72%), 其他采样时间和根区碱性磷酸酶活性与亲本玉米无显著差异, Donegan 等<sup>[10]</sup>对转  $\alpha 2$  淀粉酶和木质素过氧化物酶基因紫花苜蓿的研究中发现转基因苜蓿释放后土壤中碱性磷酸酶活性下降, 孙彩霞等<sup>[11]</sup>在 *Bt* 棉盆栽种植过程中也得到了相似的结论。转 *Bt* 玉米各根区土壤过氧化氢酶活性在 3 个采样时期均与亲本玉米无显著差异, 与袁红旭等<sup>[12]</sup>对转基因水稻根际土壤微生物及酶活性的研究中得到的结论较一致。土壤酶主要以酶-无机矿质胶体复合体、酶-腐殖质复合体和酶-有机无机复合体等形式存在于土壤中, 其活性与土壤黏粒和腐殖质含量密切相关<sup>[13]</sup>。对纯化杀虫晶体蛋白与土壤关系的研究表明, 导入土壤中的杀虫晶体蛋白能与土壤矿物、土壤腐殖酸、土壤有机矿质复合体吸附和结合<sup>[14]</sup>, 因而导入土壤中的杀虫晶体蛋白可能通过与土壤酶竞争土壤颗粒活跃表面的结合位点而对土壤酶活性产生影响。整个试验过程中转 *Bt* 玉米的种植未使土壤过氧化氢酶活性发生显著变化, 而对土壤脲酶和碱性磷酸酶活性产生一定影响, 且均在 S1 根区发生变化, 可能是由于土壤中存在一定浓度的 *Bt* 杀虫晶体蛋白而导致土壤酶发生变化, 并且在距离根系较近的土壤中作用明显。也可能是转 *Bt* 玉米种植过程中引起根系分泌物发生变化而改变根系周围土壤环境, 进而影响到土壤中酶活性的变化。

表 1 土壤酶活性变化

酶种类	时间 (d)	S1 根区		S2 根区		S3 根区	
		Bt	CK	Bt	CK	Bt	CK
脲酶 ( $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ )	40	24.93 $\pm$ 0.42 a	24.40 $\pm$ 0.39 a	29.19 $\pm$ 0.23 a	28.48 $\pm$ 0.61 a	25.50 $\pm$ 0.22 a	27.11 $\pm$ 0.70 a
	50	24.30 $\pm$ 0.37 a	22.73 $\pm$ 0.33 b	30.66 $\pm$ 0.64 a	29.70 $\pm$ 0.20 a	33.42 $\pm$ 0.24 a	32.76 $\pm$ 0.40 a
	60	25.35 $\pm$ 0.41 a	24.93 $\pm$ 0.28 a	29.98 $\pm$ 0.22 a	30.42 $\pm$ 0.43 a	27.68 $\pm$ 0.43 a	26.34 $\pm$ 0.38 a
碱性磷酸酶 ( $\text{P}_2\text{O}_5$ , $\text{mg}/(100\text{g}\cdot 2\text{h})$ )	40	6.95 $\pm$ 0.22 a	6.86 $\pm$ 0.35 a	3.85 $\pm$ 0.13 a	3.70 $\pm$ 0.10 a	4.00 $\pm$ 0.10 a	4.23 $\pm$ 0.07 a
	50	6.87 $\pm$ 0.45 a	5.98 $\pm$ 0.44 a	4.38 $\pm$ 0.51 a	4.47 $\pm$ 0.25 a	3.00 $\pm$ 0.13 a	3.39 $\pm$ 0.09 a
	60	3.02 $\pm$ 0.24 b	5.01 $\pm$ 0.35 a	1.91 $\pm$ 0.07 a	2.09 $\pm$ 0.12 a	2.18 $\pm$ 0.09 a	2.32 $\pm$ 0.10 a
过氧化氢酶 ( $\text{KMnO}_4$ 0.1mol/L $\text{ml}/(\text{g}\cdot\text{h})$ )	40	7.22 $\pm$ 0.04 a	6.96 $\pm$ 0.06 a	7.33 $\pm$ 0.02 a	7.14 $\pm$ 0.06 a	7.31 $\pm$ 0.05 a	7.18 $\pm$ 0.04 a
	50	7.59 $\pm$ 0.06 a	7.71 $\pm$ 0.09 a	7.44 $\pm$ 0.04 a	7.46 $\pm$ 0.04 a	7.18 $\pm$ 0.14 a	7.48 $\pm$ 0.02 a
	60	7.14 $\pm$ 0.11 a	7.16 $\pm$ 0.05 a	6.86 $\pm$ 0.08 a	6.90 $\pm$ 0.10 a	7.22 $\pm$ 0.08 a	7.03 $\pm$ 0.08 a

注: Bt 表示转基因玉米 *Bt11*; CK 表示亲本对照; 表中同一根区转 *Bt* 玉米和非转基因亲本玉米标不同字母表示在  $P < 0.05$  水平差异显著, 下同。

## 2.2 转 *Bt* 玉米种植对土壤速效养分的影响

与非转基因亲本玉米相比, 转 *Bt* 玉米种植 40、50、60 天后土壤硝态氮含量在各根区变化较小, 统计学上无显著差异; 土壤铵态氮含量发生一定的变化, 转 *Bt* 玉米播种后 40 天 S1 根区、50 天 S1、S2 根区和 60 天 S2、S3 根区土壤铵态氮含量较亲本玉米均显著降低 (表 2), 且随生长天数的不同在不同根区发生变化; 土壤速效磷含量变化趋势与铵态氮不同, 转 *Bt* 玉米播种后 40 天 S2、S3 根区土壤速效磷含量显著高于亲本玉米 (增幅为 8.11% 和 21.52%), 播种后 50 天 S2 根区和 60 天 S1 根区土壤速效磷含量则与亲本玉米相比显著降低 (表 2), 其余各根区与亲本玉米无显著差异。土壤磷酸酶能促进有机磷化合物水解转化为植物可利用的形态, 播种后 60 天 S1 根区土壤速效磷含量较亲本显著降低, 而该时期碱性磷酸酶活性的降

低可能影响玉米该根区土壤中酶促反应的进行, 进而导致土壤速效磷发生变化。土壤铵态氮、硝态氮可直接被作物吸收利用, 它们的变化能够影响到土壤氮循环中的氨化和硝化作用。张丽莉等<sup>[4]</sup>对转基因棉花根际土壤氧化还原酶活性的研究表明土壤中硝酸还原酶活性较亲本无显著差异, 而硝酸还原酶在  $\text{NO}_3^-$  转化过程中起着重要作用, 因此土壤中硝态氮含量可能不受 *Bt* 玉米种植的影响。刘佳等<sup>[15]</sup>的研究表明种植抗草甘膦转基因大豆 (RRS) 对根际土壤中氨化作用强度有显著降低的作用, 刘立雄<sup>[16]</sup>也发现转基因棉花品种根际土壤氨化作用随棉花生长时间变化而变化不同。也有研究表明土壤中各种生物活动、酶活性变化与土壤中氮、磷、硫、碳等营养元素循环和植物营养状况的关系密切<sup>[17]</sup>, 因此转 *Bt* 作物在种植过程中土壤养分也有可能因土壤中生物活动和酶活性的变化而进一步改变。

表 2 土壤速效养分含量变化

养分	时间 (d)	S1 根区		S2 根区		S3 根区	
		Bt	CK	Bt	CK	Bt	CK
硝态氮 ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	40	3.93 $\pm$ 0.54 a	4.55 $\pm$ 0.33 a	9.28 $\pm$ 1.26 a	8.99 $\pm$ 1.91 a	13.05 $\pm$ 0.69 a	15.43 $\pm$ 2.54 a
	50	3.06 $\pm$ 0.33 a	3.81 $\pm$ 0.90 a	17.41 $\pm$ 3.51 a	19.21 $\pm$ 1.01 a	19.70 $\pm$ 1.72 a	18.95 $\pm$ 3.73 a
	60	5.99 $\pm$ 0.14 a	6.04 $\pm$ 0.87 a	14.79 $\pm$ 2.69 a	15.22 $\pm$ 1.50 a	19.62 $\pm$ 1.04 a	23.86 $\pm$ 5.37 a
铵态氮 ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	40	9.83 $\pm$ 0.12 b	17.10 $\pm$ 3.33 a	34.6 $\pm$ 0.92 a	29.03 $\pm$ 3.24 a	50.50 $\pm$ 3.67 a	46.60 $\pm$ 9.90 a
	50	6.70 $\pm$ 0.56 b	13.13 $\pm$ 2.00 a	9.83 $\pm$ 1.15 b	18.80 $\pm$ 1.90 a	22.57 $\pm$ 2.07 a	26.10 $\pm$ 1.43 a
	60	7.33 $\pm$ 0.32 a	8.23 $\pm$ 0.92 a	7.33 $\pm$ 0.43 b	21.63 $\pm$ 2.37 a	5.27 $\pm$ 1.21 b	14.10 $\pm$ 1.89 a
速效磷 ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	40	55.51 $\pm$ 0.69 a	55.05 $\pm$ 1.95 a	66.60 $\pm$ 1.10 a	61.60 $\pm$ 1.40 b	69.62 $\pm$ 0.5 a	57.29 $\pm$ 0.97 b
	50	72.08 $\pm$ 1.15 a	69.16 $\pm$ 1.55 a	41.17 $\pm$ 1.68 b	74.70 $\pm$ 0.52 a	31.01 $\pm$ 0.45 a	29.42 $\pm$ 1.60 a
	60	24.98 $\pm$ 1.32 b	27.52 $\pm$ 0.47 a	55.00 $\pm$ 3.27 a	57.64 $\pm$ 1.60 a	48.98 $\pm$ 0.89 a	51.65 $\pm$ 1.77 a

### 2.3 转 *Bt* 玉米对土壤速效养分和酶活性影响的主成分分析

研究中以转 *Bt* 玉米种植 40、50、60 天后土壤速效养分含量和酶活性进行主成分分析解释两个玉米品种之间的差异, 以进一步综合评价转基因玉米对土壤生态系统的影响。结果显示, 转 *Bt* 玉米和亲本玉米在两个主成分组成的坐标平面中分布较紧密, 均处于第 1 主成分轴的同侧, 而第 1 主成分的方差贡献率达 85.69% (图 2), 说明种植转 *Bt* 玉米 40、50 和 60 天后土壤速效养分及酶活性与其非转基因亲本相似, 转 *Bt* 玉米的种植并未明显影响土壤速效养分和酶活性的状况。但各采样时期转 *Bt* 玉米和亲本玉米两两聚集在一起, 不同生长天数之间表现出一定差异, 表明转 *Bt* 玉米和亲本玉米土壤速效养分及酶活性的变化一定程度上受生长时间的影响。Liu 等<sup>[18]</sup>的研究表明与种植转 *Bt* 水稻相比, 季节变化对土壤微生物群落及土壤酶活性的影响更大, 张美俊等<sup>[19]</sup>也发现转 *Bt* 基因棉不同生育期土壤酶活性和速效养分含量不同, 因此认为在评价转基因作物对土壤生态系统影响的过程中作物生长时间的变化也可能产生一定的干扰。

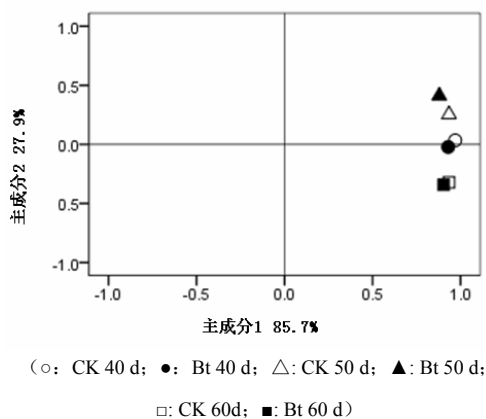


图 2 转 *Bt* 玉米及其非转基因亲本不同时期土壤速效养分和酶活性的主成分分析

### 3 结论

(1) 整个试验阶段种植转 *Bt* 玉米对土壤过氧化氢酶活性无显著影响; 土壤脲酶活性在播种后 50 天时 S1 根区较亲本玉米显著增高 ( $P < 0.05$ ); 碱性磷酸酶活性仅在 60 天时 S1 根区较亲本降低 8.12%; 总体上转 *Bt* 玉米的种植对 3 种土壤酶活性影响较小。

(2) 转 *Bt* 玉米土壤铵态氮和速效磷含量在 3 个根区变化趋势不同, 不同采样时间也有差异, 土壤硝

态氮含量在 3 个生长时期中均与亲本玉米无显著差异, 种植转 *Bt* 玉米对土壤速效养分存在一定的影响, 但因养分种类不同而表现不同。

(3) 总体上转 *Bt* 玉米对土壤酶活性和速效养分含量的影响较小, 其变化受生长时期的影响较转基因品种更加明显。

### 参考文献:

- [1] 周礼恺. 土壤酶学. 北京: 科学出版社, 1987: 263-281
- [2] 孙彩霞, 张玉兰, 缪璐, 陈利军, 武志杰. 转 *Bt* 基因作物种植对土壤养分含量的影响. 应用生态学报, 2006, 17(5): 943-946
- [3] 蔡红, 沈仁芳. 转基因棉花对土壤生态环境的影响. 土壤, 2005, 37(5): 487-491
- [4] 张丽莉, 武志杰, 陈利军, 孙彩霞. 转基因棉种植对土壤氧化还原酶活性的影响. 土壤通报, 2007, 38(2): 277-280
- [5] Yi LL, Xiao RF, Qi RS. The relationship between rhizosphere nitrification and Nitrogen-use efficiency in rice plants. Plant, Cell and Environment, 2008, 31(1): 73-85
- [6] 严昶升. 土壤肥力研究方法. 北京: 农业出版社, 1988: 243-279.
- [7] 鲍士旦. 土壤农化分析. 3 版. 北京: 农业出版社, 2000: 49-83
- [8] Sun CX, Chen LJ, Wu ZJ, Zhou LK, Shimizu H. Soil persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin from transgenic Bt cotton tissues and its effect on soil enzyme activities. Biol. Fertil. Soils, 2007, 43: 617-620
- [9] 王建武, 冯远娇. 种植 *Bt* 玉米对土壤微生物活性和肥力的影响. 生态学报, 2005, 25(5): 1 213-1 220
- [10] Donegan KK, Seidler RJ, Doyle JD, Porteous LA, DiGiovanni G, Widmer F, Watrud LS. A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *sinorhizobium meliloti*: Effects on the soil ecosystem. Journal of Applied Ecology, 1999, 36: 920-936
- [11] 孙彩霞, 陈利军, 武志杰. *Bt* 杀虫晶体蛋白的土壤残留及其对土壤磷酸酶活性的影响. 土壤学报, 2004, 41(5): 762-765
- [12] 袁红旭, 张建中, 郭建夫, 许新萍, 李玥仁. 种植转双价抗真菌基因水稻对根际微生物群落及酶活性的影响. 土壤学报, 2005, 42(1): 122-126
- [13] Tabatabai MA, Garcia-Manzanedo AM, Acosta-Martínez V. Substrate specificity of arylamidase in soils. Soil Biol. Biochem., 2002, 34: 103-110
- [14] Venkateswerlu G, Stotzky G. Banding of the protoxin and toxin proteins from *Bacillus thuringiensis* sub sp. Kurstakion Clay Minerals. Current Microbiol., 1992, 25: 1-9
- [15] 刘佳, 刘志华, 徐广惠, 王宏燕. 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. 农业环境科学学报, 2010, 29(7): 1 341-1 345
- [16] 刘立雄. 转基因棉花种植对根际土壤氮转化相关酶的影响. 作物杂志, 2010(3): 69-71
- [17] Benitez E, Melgar R, Sainz H, Gomez M, Nogales R. Enzyme activities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum* L.) grown with olive cake mulches. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, 32: 1 829-1 835
- [18] Liu W, Lu HH, Wu WX, Wei QK, Chen YX, Thies JE. Transgenic *Bt* rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40: 475-486
- [19] 张美俊, 杨武德. 转 *Bt* 基因棉种植对根际土壤生物学特性和养分含量的影响. 植物营养与肥科学报, 2008, 14(1): 162-166