

氟磺胺草醚及其降解菌对大豆生长及生物固氮的影响

周聪, 陈未, 高岩, 施曼, 李江叶, 刘丽珠, 陈金林

引用本文:

周聪, 陈未, 高岩, 等. 氟磺胺草醚及其降解菌对大豆生长及生物固氮的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(12): 2660–2668.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0264>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

氟磺胺草醚对不同豆科作物生长及根际固氮菌的影响

陈未, 李江叶, 刘丽珠, 童非, 戴群, 高岩

农业环境科学学报. 2021, 40(10): 2076–2085 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0474>

东北沼泽湿地土壤中氨氧化微生物活性和丰度研究

谢月, 梁红, 宋立全, 王清波, 付东风, 高大文

农业环境科学学报. 2018, 37(3): 546–551 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0992>

模拟氮沉降对贝加尔针茅草原土壤氮转化微生物的影响

刘红梅, 张海芳, 秦洁, 王慧, 张艳军, 杨殿林

农业环境科学学报. 2019, 38(10): 2386–2394 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0231>

一株草甘膦高效降解菌的筛选和表征研究

王天廓, 温玉娟, 杨悦锁, 路莹, 张茜, 曹楠, 孙东

农业环境科学学报. 2021, 40(3): 591–599 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1404>

磺胺二甲嘧啶对稻田土壤微生物的中长期效应

徐佳迎, 周金蓉, 吴杰, 王珏, 程粟裕, 赵鸽, 蒋静艳

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1757–1766 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0123>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

周聪, 陈未, 高岩, 等. 氟磺胺草醚及其降解菌对大豆生长及生物固氮的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(12): 2660–2668.
ZHOU C, CHEN W, GAO Y, et al. Effects of fomesafen and its degrading bacteria on soybean growth and biological nitrogen fixation[J].
Journal of Agro-Environment Science, 2021, 40(12): 2660–2668.



开放科学 OSID

氟磺胺草醚及其降解菌对大豆生长及生物固氮的影响

周聪^{1,2}, 陈未², 高岩^{2*}, 施曼³, 李江叶², 刘丽珠², 陈金林^{1*}

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京 210037; 2. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 南京 210014; 3. 浙江农林大学林业与生物技术学院, 杭州 311100)

摘要: 从生长于氟磺胺草醚污染土壤的大豆根瘤中筛选出的 *Sinorhizobium* sp. W16 菌株, 能高效降解氟磺胺草醚并能缓解氟磺胺草醚的生物负效应。以大豆(苏 C1008)为研究对象, 采用盆栽试验, 探究 *Sinorhizobium* sp. W16 对大豆生长、氮累积量、根瘤固氮酶活性及根际土壤氮循环相关微生物功能基因丰度等的影响。结果表明: 氟磺胺草醚的施用量(以有效成分计)超过 $450 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时显著降低了大豆生物量, 抑制了大豆根瘤固氮酶活性和土壤脲酶活性, 降低了土壤固氮细菌(*nifH*)、氨氧化古菌(AOA)、氨氧化细菌(AOB)基因丰度, 限制了植物-根际系统的生物固氮及有机氮素转化; 接种 *Sinorhizobium* sp. W16 降解菌显著提高土壤中氟磺胺草醚的降解率至 81.97%, 且显著提高了大豆根瘤干质量、根瘤固氮酶活性和土壤 *nifH* 基因丰度, 增强了大豆的固氮作用, 同时刺激了脲酶活性, 提升土壤 AOA 和 AOB 的基因丰度, 增加了土壤有效氮素的供应, 从而使大豆植株氮含量提高了 15.85%~24.93%。研究表明, 氟磺胺草醚的施用抑制了大豆-根际系统的生物固氮作用, 但接种 *Sinorhizobium* sp. W16 降解菌不仅能有效降低土壤中氟磺胺草醚的残留量、缓解氟磺胺草醚对大豆的持续药害, 还增强了植物-根际系统中生物固氮能力、土壤有效氮素供应及大豆的氮素累积, 对修复氟磺胺草醚污染土壤、增强大豆固氮具有较好的应用价值和市场前景。

关键词: 氟磺胺草醚; 大豆; 根瘤菌; 生物固氮; 氨氧化古菌(AOA); 氨氧化细菌(AOB)

中图分类号: X172; X592; S565.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2021)12-2660-09 doi:10.11654/jaes.2021-0264

Effects of fomesafen and its degrading bacteria on soybean growth and biological nitrogen fixation

ZHOU Cong^{1,2}, CHEN Wei², GAO Yan^{2*}, SHI Man³, LI Jiangye², LIU Lizhu², CHEN Jinlin^{1*}

(1. Co-innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China; 3. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311100, China)

Abstract: A fomesafen-degrading bacteria strain, *Sinorhizobium* sp. W16, was isolated and screened from root nodules of soybean grown in soil contaminated with fomesafen; however, whether inoculation of this strain could improve soybean growth and the biological nitrogen fixation capacity in plant-soil system remains unclear. A pot experiment was carried out to investigate the effects of *Sinorhizobium* sp. W16 inoculation on soybean (Su C1008) growth, nitrogen content, nodule nitrogenase activity, and nitrogen cycle-related functional genes abundance in the rhizosphere soil. The results showed that the use of fomesafen (calculated by available ingredient) over $450 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$

收稿日期: 2021-03-05 录用日期: 2021-07-15

作者简介: 周聪(1995—), 男, 江苏常州人, 硕士研究生, 从事土壤环境与污染修复研究。E-mail: jenleszhou@163.com

*通信作者: 陈金林 E-mail: jlchen@njfu.edu.cn; 高岩 E-mail: ygao@jaas.ac.cn

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程项目; 江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(20)1010]; 河北省湿地生态与保护重点实验室(筹)开放基金项目(hk1k202005)

Project supported: The Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD); The Innovation Foundation of Agricultural Science and Technology of Jiangsu Province, China[CX(20)1010]; Open Foundation of Hebei Key Laboratory of Wetland Ecology and Conservation(hk1k202005)

significantly reduced soybean biomass, inhibited the activities of nitrogen fixing enzymes in soybean nodules and urease in rhizosphere-soil, and decreased the gene abundance of nitrogen-fixing bacteria (*nifH*), ammonia oxidizing archaea (AOA), ammonia oxidizing bacteria (AOB) in the rhizosphere-soil, and thereby limited the biological nitrogen fixation and organic nitrogen transformation in plant-rhizosphere system. Inoculation of the *Sinorhizobium* sp. W16 strain significantly improved the degradation rate of fomesafen by up to 81.97%, and enhanced the dry weight of soybean nodules, activities of nodule nitrogenase and gene abundances of soil *nifH*, resulting in the increase of nitrogen fixation in soybeans-rhizosphere system. Meanwhile, the strain inoculation stimulated urease activity and enhanced the abundance of soil AOA and AOB, leading to the increase of the available nitrogen in the rhizosphere-soil. Combined, these effects of *Sinorhizobium* application led to the increase in nitrogen content of soybean plants by 15.85%~24.93%. The use of fomesafen significantly inhibited the nitrogen fixation in soybeans-rhizosphere system; however inoculation of the *Sinorhizobium* sp. W16 strain could not only degrade the fomesafen in soil effectively, alleviating the toxicity of fomesafen to soybeans, but could also enhance the biological nitrogen fixation and available nitrogen in the soybeans-rhizosphere system, and nitrogen accumulation by soybeans, implying a good prospect for remediating fomesafen-contaminated soil and enhancing soybean nitrogen fixation.

Keywords: fomesafen; soybean; rhizobium; biological nitrogen fixation; ammonia oxidizing archaea (AOA); ammonia oxidizing bacteria (AOB)

氟磺胺草醚是一类常用于大豆田除草的高效茎叶类除草剂,但其在土壤中半衰期较长,为100~240 d^[1]。近年来的研究发现,氟磺胺草醚田间实际用量为登记用量的3~4倍^[2],80%~90%的除草剂最终进入土壤,长残效除草剂(氟磺胺草醚)在农田土壤中长期累积,导致杂草抗性日趋加重,作物产量逐渐下降,后茬作物立苗受到显著影响,土壤微生物多样性和活性遭到破坏,生物固氮受到影响^[3-4]。因此,及时有效地消除氟磺胺草醚对豆科作物生长及固氮微生物的不利影响是农业生产过程中亟待解决的关键问题。

近年来,越来越多的研究发现,根瘤菌在不同环境长期的自然选择过程中,形成了降解有毒物质的关键酶系。据报道,从不同污染土壤中分离获得的根瘤菌能够在离体条件下降解甲苯、莠去津、多环芳烃、茅草枯、草甘膦等有机污染物^[5-6]。根瘤菌能够增强有机污染物的降解可能是因为:根瘤菌定殖在植物根部,生存环境较好,可以增加植物根系分泌物,促进土壤微生物数量及土壤酶活性,改善土壤微生物群落结构,形成植物-微生物修复体系,增强微生物的降解作用^[7];微生物可以通过变异产生新的菌种,形成新的降解酶系统,降解相应的人工合成的有机化合物^[8]。因此,筛选高效降解氟磺胺草醚根瘤菌应用于长期施用该除草剂的土壤是缓解其对农田系统生物固氮及豆科作物生长所造成负面影响的一种有效手段。

本项目组筛选出了一批具有降解氟磺胺草醚能力的固氮根瘤菌,其中菌株 *Sinorhizobium* sp. W16 在预试验中对缓解氟磺胺草醚药害以及促进大豆苗期生长表现出了良好的效果,但其对大豆生长过程中生物固氮的影响还不清楚。生物固氮占全球固氮总量

的70%,其包括自生固氮、共生固氮以及联合固氮,生物固氮是大豆的主要氮素来源^[9]。目前,氟磺胺草醚降解菌对作物生长影响的研究较多,但对豆科植物-根瘤菌共生固氮及土壤固氮微生物的影响及相关机制仍不明确^[10]。本项目组通过盆栽试验,研究了氟磺胺草醚及其降解菌 *Sinorhizobium* sp. W16 对大豆生长、生物固氮能力、根瘤菌干质量与根瘤固氮酶活性、根际固氮功能基因丰度及氮转化相关功能基因丰度的影响,旨在为大豆种植中合理施用除草剂以及修复除草剂污染土壤提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验土壤采自江苏省常州市(119°57'05"E, 31°56'49"N)0~20 cm农田耕层土壤,农田5 a内未曾使用过氟磺胺草醚。试验所用土壤为长江中下游典型大豆种植区域土壤——黄棕壤,土壤理化性质为:有机质4.03 g·kg⁻¹、全氮0.370 g·kg⁻¹、碱解氮17.33 mg·kg⁻¹、全磷0.552 g·kg⁻¹、有机磷0.040 g·kg⁻¹、pH 7.29。土样在室温下自然风干,磨碎,过2 mm筛,供盆栽试验使用。

试验所用除草剂为25%氟磺胺草醚水剂,购自山东天润化工有限公司。所用大豆品种为苏C1008,由江苏省农业科学院经济作物研究所提供。

试验所用降解菌株 *Sinorhizobium* sp. W16 由江苏省农业科学院农业资源与环境研究所农产品产地环境研究中心筛选提供。以50 mg·kg⁻¹氟磺胺草醚为唯一碳源,5%的接种量(质量比)进行7 d液体降解试验,降解菌株 W16 对氟磺胺草醚的降解率

在35%左右,通过测序发现菌株W16为中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp.。

试验用盆为硬质塑料花盆,底部留有孔径以供排水,盆的规格为长24 cm×宽24 cm×高19 cm。

1.2 试验设计

试验于2020年5月在江苏省农业科学院温室大棚(118°52'13.65"E, 32°02'9.07"N)进行,光照为自然光照。在每个花盆中装入4.5 kg风干土壤,盆内播种大豆种子8~10粒,浇透水,然后采用称质量的方法将土壤含水率维持在田间持水量(60%)。待长出真叶后每个花盆保留4株长势一致的幼苗。

试验采用完全随机设计,共7个处理,包括不接菌组(F)、接菌组(FJ)和对照组(CK)。其中,不接菌组和接菌组均设置3个氟磺胺草醚施用剂量(以有效成分计),分别为大田推荐剂量(F1和FJ1, 225 g·hm⁻²)、2倍大田推荐剂量(F2和FJ2, 450 g·hm⁻²)和5倍大田推荐剂量(F3和FJ3, 1 125 g·hm⁻²)。对照组不施用氟磺胺草醚且不接菌。每个处理设置4个重复,每个时间点采集4/5个重复样本,共计140盆。

在播种后第21 d(V2苗期)时施用除草剂,使用配有氟磺胺草醚试剂的真空按压分装瓶(30 mL)对每盆植株进行茎叶喷施。播种后第28 d时,在接菌组大豆根部滴加20 mL降解菌悬液。

加入降解菌悬液后分别在始花期(10 d, R1)、初荚期(20 d, R2)、盛荚期(30 d, R4)、鼓粒期(40 d, R6)和成熟期(50 d, R7)进行样品的破坏性采样。采集土壤样品时首先进行盆土分离,将非根际土壤混匀后,取1 kg左右用于土壤铵态氮和土壤硝态氮的测定,并将采集的一部分新鲜土壤保存于-20℃冰箱用于土壤脲酶的测定。去除根系附着土壤,然后用毛刷轻轻刷取大豆根部新鲜根际土壤并保存于-80℃冰箱,用于土壤DNA的提取以及相关功能基因的测定。同时采集作物地下部样品,轻轻洗去根系附着土壤,用吸水纸

擦干,用于根部生物量以及根瘤固氮酶活性的测定,地上部样品保存于-80℃冰箱用于植物全氮的测定。

1.3 植物与土壤理化指标的测定

采用凯氏定氮法^[11]测定植株全氮含量,采用乙炔还原法^[12]测定大豆根瘤固氮酶活性;使用索莱宝试剂盒(购自北京索莱宝科技有限公司)测定土壤脲酶活性;使用天平称取作物单株质量、籽粒百粒质量、根干质量、根瘤干质量。采用FastDNA Spin试剂盒(MP Biomedical, Carlsbad, USA)提取土壤样品的DNA,根据LI等^[13]和XU等^[14]已修正的程序,采用实时荧光定量扩增技术(qPCR)测定基因拷贝数,扩增引物及扩增条件详见表1。

土壤氟磺胺草醚提取方法:称取2 g冷冻干燥的新鲜土样于50 mL离心管中,加入5 mL去离子水和5 mL乙腈,涡旋1 min,浸泡2 h后,振荡4 h,然后将离心管置于离心机中8 000 r·min⁻¹离心5 min,取5 mL上清液转移至装有1 g NaCl的10 mL离心管中,振荡20 min后,静置15 min,取上层乙腈相过0.22 μm有机相滤膜后上机测试。液相色谱测定条件:分离柱为ZORBAX SB-C 184.6 mm×150 mm不锈钢柱,流动相为乙腈/水(0.5%磷酸)=65/35,波长290 nm,柱温30℃,流速1 mL·min⁻¹,进样量20 μL。

1.4 数据处理

采用Excel 2012和Adobe Illustrator 2020进行数据处理和制图。采用SPSS 22.0进行单因素、多因素方差分析和皮尔逊相关分析,处理间多重比较采用最小显著性差异(LSD)法。

2 结果与分析

2.1 氟磺胺草醚及其降解菌对大豆生长和氮累积的影响

由图1A可知,大豆干质量(地上部生物量)随着氟磺胺草醚施用量的增加呈现降低趋势,2倍和5倍大田推荐剂量时的,大豆干质量较CK显著下降

表1 扩增引物及扩增条件

Table 1 Amplification primers and amplification conditions

功能基因 Functional gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增条件 Amplification conditions	参考文献 References
固氮基因 <i>nifH</i>	polF	5'-ATGACCATGCGTCAATGCG-3'	95℃ 5 min - × 1个循环; 94℃ 60 s,	[15]
	polR	5'-TCAGGCCCGCTTTTTCGGCGG-3'	55℃ 60s, 72℃ 2 min - × 30个循环	
氨氧化古菌 AOA	ArchamoAF	5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3'	95℃ 1 min - × 1个循环; 95℃ 20 s,	[16]
	ArchamoAR	5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'	55℃ 20s, 72℃ 30 s - × 40个循环	
氨氧化细菌 AOB	amoA-1F	5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'	95℃ 2 min - × 1个循环; 95℃ 20 s,	[17]
	amoA-2R	5'-CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC-3'	57℃ 30 s, 72℃ 30s - × 40个循环	

7.42%和11.12% ($P<0.05$);接菌后,大豆植株干质量较不接菌提高3.16%~5.44%。氟磺胺草醚的施用显著降低了大豆籽粒百粒质量(鲜质量),且随着施用剂量的增加,影响加剧(图1B)。5倍大田推荐剂量显著降低籽粒百粒质量达22.23%。相较于不接菌,接菌处理使得大豆籽粒百粒质量增加9.30%~11.94%。施用不同剂量氟磺胺草醚均显著降低大豆根干质量(图1C),降低率最高达43.51%。接种菌株W16能够一定程度缓解高剂量除草剂对大豆根系的药害作用,相较于不接菌,接菌后根干质量增加1.57%~12.73%。

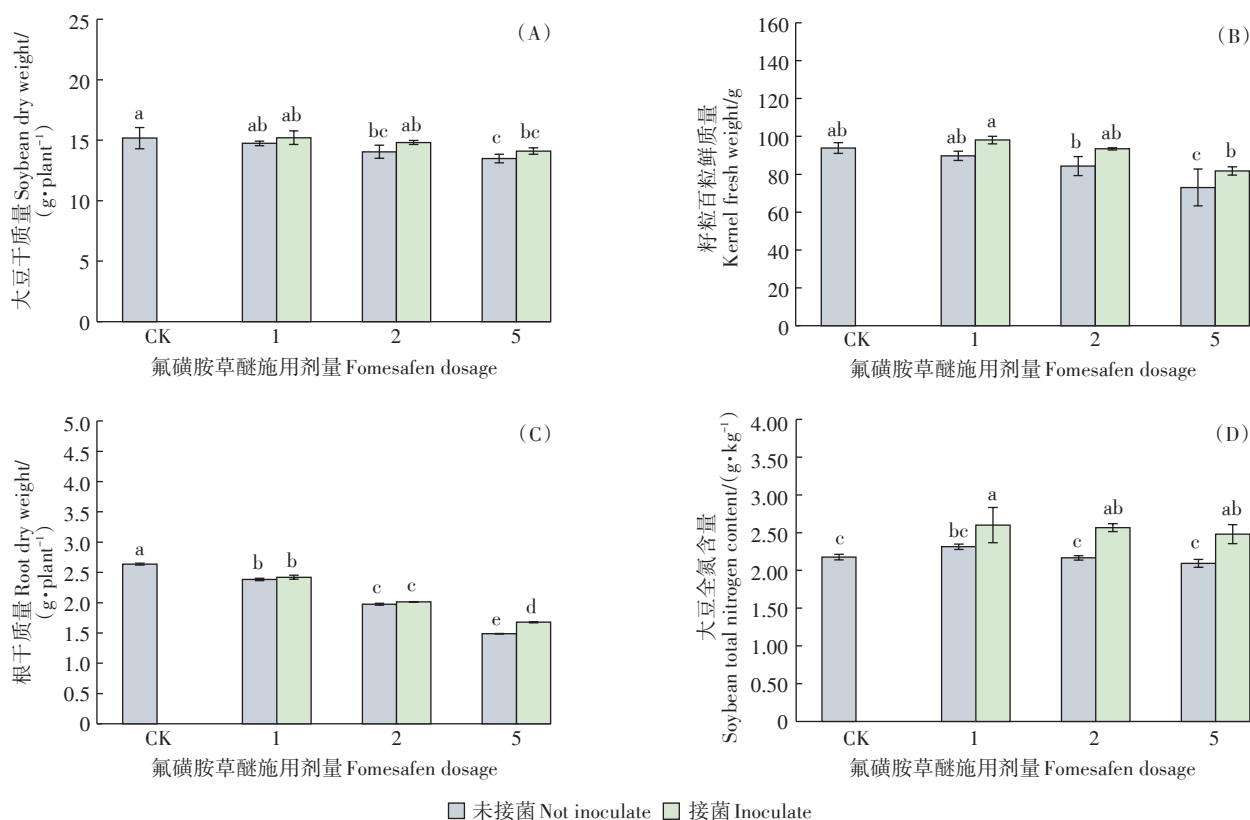
随氟磺胺草醚施用量的增加,大豆对氮素的累积呈现先升高后降低的趋势(图1D)。接种菌株W16可以显著提高大豆全氮含量,相较于未接菌处理,接菌可增加大豆全氮含量15.84%~24.93%。

2.2 氟磺胺草醚及其降解菌对大豆根瘤和根瘤固氮酶活性的影响

由图2A可知,氟磺胺草醚的施用降低了根瘤干

质量,且随着施用剂量的增加而加剧,2倍大田推荐剂量显著降低大豆根瘤干质量,5倍大田推荐剂量时的抑制率达到最高,为26.47%。接菌后,根瘤干质量增加1.52%~11.01%。

总体上大豆根瘤固氮酶活性呈现先上升后下降的趋势(图2B),其中盛荚期R4时根瘤固氮酶活性最高。这可能是与大豆生长习性有关,在鼓粒期R6前,大豆生长急需氮素供应,因此大豆根瘤固氮酶活性逐渐升高,以获取充足的氮素供应满足生长需求。氟磺胺草醚的施用在大豆各个时期均抑制了根瘤固氮酶活性,大田推荐量下的抑制率可达38.37%(盛荚期R4),2倍田间推荐量下的抑制率可达52.23%(始花期R1)、5倍田间推荐量下的抑制率可达91.07%(始花期R1)。接菌处理能够显著缓解中、低剂量氟磺胺草醚对根瘤固氮酶活性的抑制,其中在30 d(盛荚期R4)时,接种W16降解菌可使1倍和2倍田间推荐量下根瘤固氮酶活性恢复至与对照相近水平。



未接菌:仅施加氟磺胺草醚;接菌:施加氟磺胺草醚基础上加入W16降解菌;CK、1、2、5分别指不施用任何除草剂、大田推荐剂量($225 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$)、2倍大田推荐剂量($450 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$)、5倍大田推荐剂量($1125 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$)。图中小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同

Not inoculate: only fomesafen applied; Inoculate: fomesafen based on addition of W16 degrading bacteria; CK, 1, 2, 5 respectively refer to no herbicide application, recommended field dose ($225 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$), 2 times recommended field dose ($450 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$), 5 times recommended field dose ($1125 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$).

Lowercase letters in the figure indicate significant differences between among treatments ($P<0.05$). The same below

图1 氟磺胺草醚及其降解菌对大豆成熟期生物量和氮累积的影响

Figure 1 The effect of fomesafen and its degrading bacteria on biomass and nitrogen accumulation of soybean at the maturity phase

2.3 氟磺胺草醚及其降解菌对大豆根际土壤氮循环功能基因丰度和土壤氮素转化的影响

由图3A可知,大豆根际土壤 *nifH* 基因丰度随着时间的增加呈上升趋势,这可能是受到 W16 菌株及大豆生长的持续影响。但与未施用除草剂的对照相比,施用氟磺胺草醚降低了根际土壤 *nifH* 基因丰度。接种 W16 降解菌可以显著增加施用氟磺胺草醚根际土壤 *nifH* 基因丰度 ($P<0.05$),使根际土壤 *nifH* 基因丰度增加 31.86%~146.87%,使根际土壤 *nifH* 基因丰度(成熟期 R7)恢复甚至高于未施用除草剂的对照水平。

土壤氨氧化古菌 AOA 基因丰度(图3B)随大豆生长呈先上升后下降的趋势,土壤氨氧化细菌 AOB 基因丰度(图3C)随大豆生长呈下降趋势。与未施用除草剂相比,施用高浓度氟磺胺草醚显著降低大豆各生长时期根际土壤 AOA 基因丰度 ($P<0.05$),根际土壤 AOB 基因丰度在大豆始花期 R1 受氟磺胺草醚影响较小,但在盛荚期 R4 和成熟期 R7 时受施用高浓度氟磺胺草醚影响而显著增加。接种 W16 降解菌提高了根际土壤 AOA 和 AOB 的基因丰度,最高分别达未接菌根际土壤的 1.31 倍和 2.05 倍。

与未施用除草剂的对照相比,氟磺胺草醚的施用在大豆不同生长时期整体表现为田间推荐量处理显著刺激了土壤脲酶活性,而 2 倍和 5 倍田间推荐量处理显著抑制土壤脲酶活性(图3D)。相较于未接菌,接种 W16 降解菌仅在成熟期 R7 时,使土壤脲酶活性增加了 27.62%。

由图4A可知,在培养期内,土壤铵态氮含量呈先上升后下降的趋势,与未施用除草剂的对照相比,氟磺胺草醚的施用使土壤中铵态氮含量降低了 9.46%~19.83%。相较于未接菌,接种 W16 降解菌使土壤中铵态氮含量增加了 5.34%~6.21%。

土壤中硝态氮含量随着大豆的吸收作用而不断下降(图4B)。与未施用除草剂的对照相比,氟磺胺草醚的施用在始花期 R1、鼓粒期 R6 和成熟期 R7 均显著 ($P<0.05$) 降低了土壤硝态氮含量。相较于未接菌,接种 W16 降解菌促进了大豆-根际系统中生物固氮和土壤硝化作用,增加了土壤中有效氮素的供应。

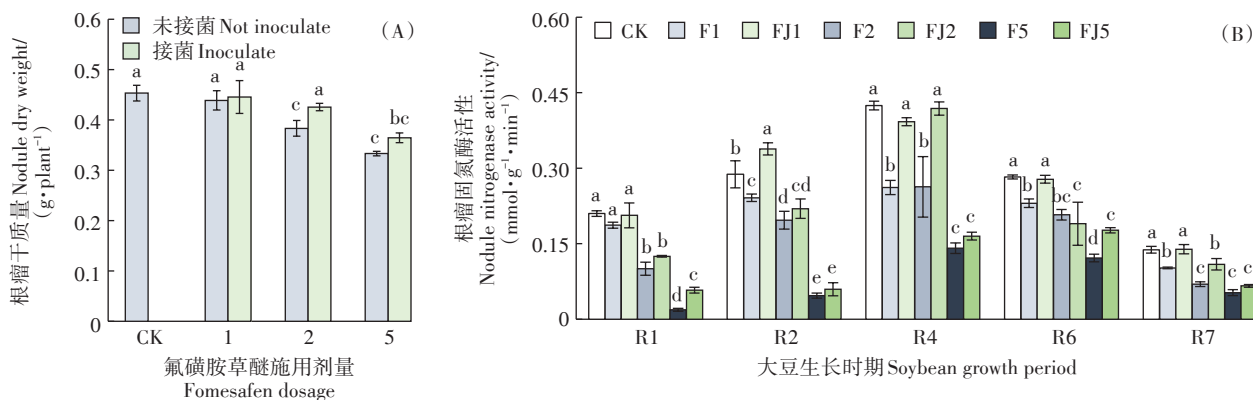
2.4 *Sinorhizobium* sp. W16 菌液处理后土壤氟磺胺草醚降解动态

由图5可知,施用不同浓度的氟磺胺草醚后,其残留量均随时间推移呈显著下降趋势,但高剂量氟磺胺草醚残留量均显著高于低剂量。接菌处理组氟磺胺草醚的残留量均显著低于未接菌组 ($P<0.05$):未接菌组氟磺胺草醚最终降解率为 71.32%~75.37%;而接菌组氟磺胺草醚降解率提升了 8.76 个百分点(大田推荐剂量)、14.05 个百分点(2 倍大田推荐剂量)、10.03 个百分点(5 倍大田推荐剂量)。

3 讨论

3.1 *Sinorhizobium* sp. W16 降解菌对氟磺胺草醚残留及大豆生长的影响

目前,已有研究证实降解菌不仅可以应用于土壤的修复,还可以缓解其对植物的毒害作用,恢复甚至



R1: 始花期, R2: 初荚期, R4: 盛荚期, R6: 鼓粒期, R7: 成熟期。图中小写字母表示同一时期不同处理间差异显著 ($P<0.05$)。下同
R1: Initial flowering period, R2: Initial pod period, R4: Full pod period, R6: Seed filling period, R7: Maturity period. Lowercase letters in the figure indicate significant differences among different treatments in the same period ($P<0.05$). The same below

图2 氟磺胺草醚及其降解菌对大豆根瘤固氮酶活性(以 C_2H_4 计)和大豆全氮含量的影响

Figure 2 The effect of fomesafen and its degrading bacteria on nodule nitrogenase activity (calculated by C_2H_4) and total nitrogen content of soybean

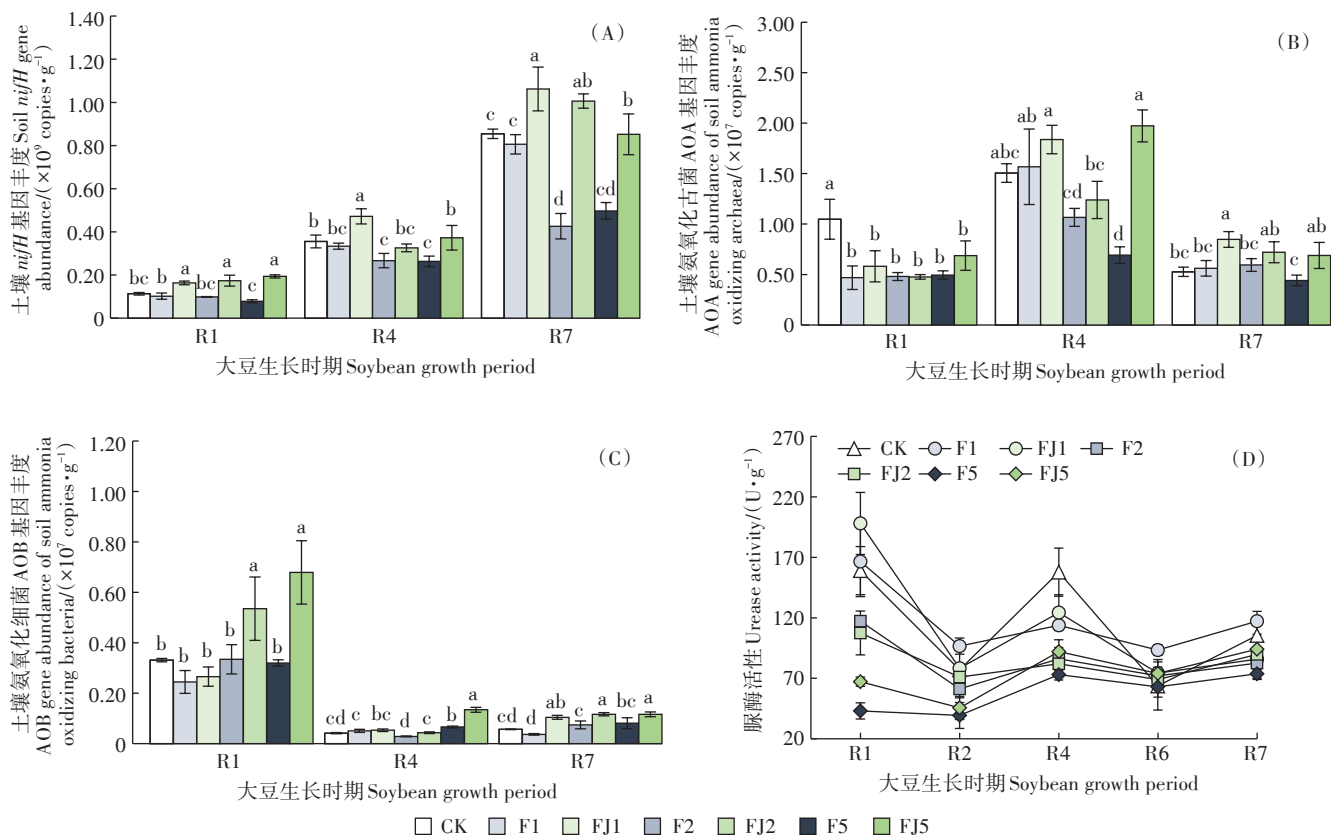


图3 氟磺胺草醚及其降解菌对根际土壤 *nifH*、AOA、AOB 基因丰度和脲酶活性的影响

Figure 3 The effect of fomesafen and its degrading bacteria on the abundance of *nifH*, AOA, AOB genes and urease activity in rhizosphere soil

促进植物生长^[18-19]。本研究中,施用氟磺胺草醚后,大豆根系受到氟磺胺草醚药害,生物量及产量显著下降。*Sinorhizobium* sp. W16降解菌的接种不仅有效地降低了土壤氟磺胺草醚残留量,而且提高了大豆籽粒百粒质量、根生物量、根瘤生物量,较好地恢复了大豆植株的生长,缓解了氟磺胺草醚对豆科作物生长所造

成的负面影响。这与 YANG 等^[10]从氟磺胺草醚污染土壤中分离的多萨假单胞菌 *Pseudomonas mendocina* 的生物效应接近,该菌不仅具有良好的氟磺胺草醚降解能力,同时能促进玉米和高粱的生长。郭静等^[20]也发现接入氟磺胺草醚降解菌可以较好地恢复玉米的各项生长和生理指标。接种降解菌能够较好地恢复植物生长,一方面,是由于降解菌可有效降解土壤中有有机污染物,降低其残留量。氟磺胺草醚在土壤中的自然降解率为 40.85%~50.55%^[21]。本研究中所使用的菌株 W16 为中华根瘤菌 (*Sinorhizobium* sp.), 其能够以氟磺胺草醚作为唯一生长碳源,氟磺胺草醚最终降解率达 81.97%,与对照相比,降解率提高 8.76~14.05 个百分点,较好缓解了氟磺胺草醚对大豆的持续药害。FENG 等^[22]发现好氧细菌 *Pseudomonas zeshuii* BY-1 通过脱卤(氯、氟)、脱硫及乙酰化的过程对氟磺胺草醚进行脱毒降解。本研究中 *Sinorhizobium* sp. W16 对氟磺胺草醚的降解机理需要后续进一步研究。另一方面,氮素是大豆生长发育和产量形成的主要元素,接种 *Sinorhizobium* sp. W16 降解菌显

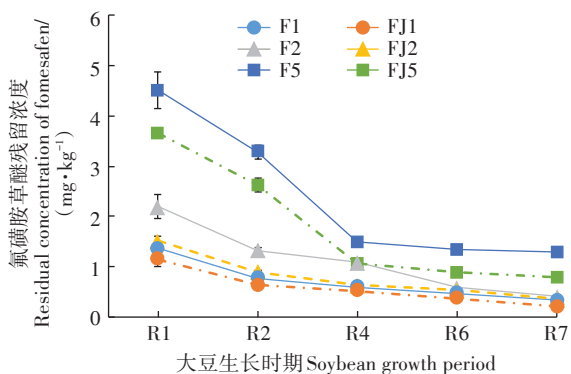


图5 菌液处理后大豆不同时期土壤中氟磺胺草醚的降解动态

Figure 5 Degradation dynamics of fomesafen in soybean soil at different periods after bacterial liquid treatment

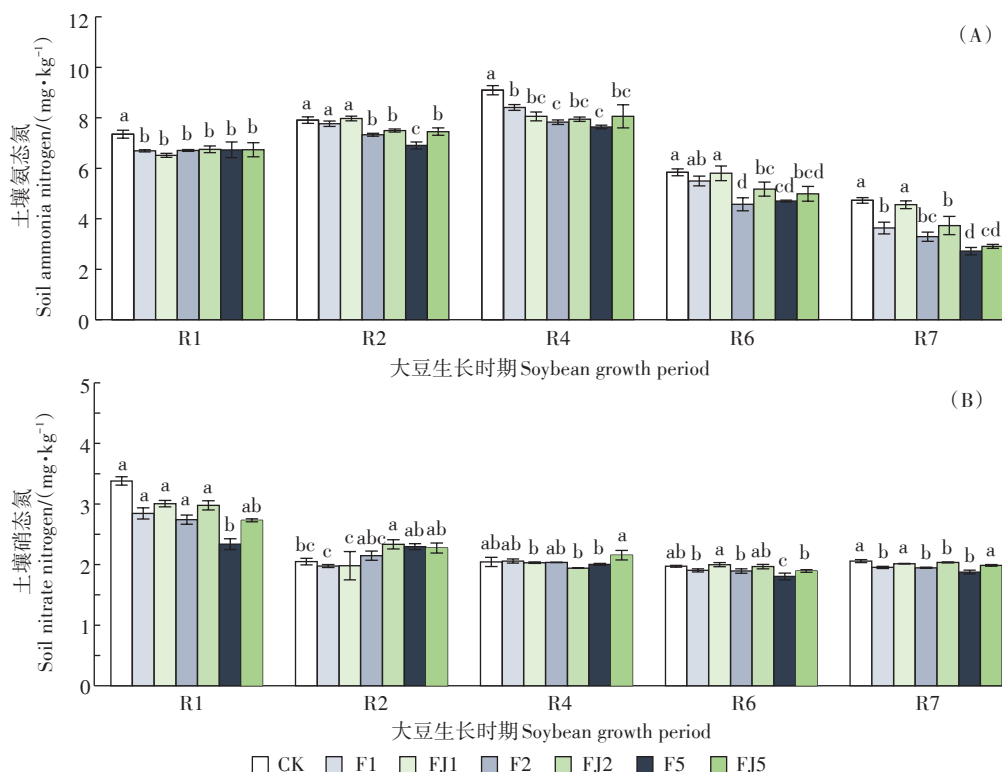


图4 氟磺胺草醚及其降解菌对土壤铵态氮和硝态氮含量的影响

Figure 4 The effect of fomesafen and its degrading bacteria on the content of ammonium nitrogen and nitrate nitrogen in soil

著刺激大豆根瘤固氮酶活性、土壤脲酶活性,改变氟磺胺草醚对原有根际土壤氮循环功能微生物区系的影响,增加了根际土壤 *nifH* 基因丰度 31.86%~146.87%,提高了根际土壤 AOA 和 AOB 的基因丰度,加速了土壤中有机氮的水解,促进土壤中固氮作用和硝化作用,增加土壤对大豆的速效氮供应。

3.2 氟磺胺草醚及其降解菌对根际土壤固氮的影响

目前,大量研究已表明除草剂对土壤固氮潜力具有较大的影响^[23-24]。本研究中氟磺胺草醚的施用显著降低了根际土壤 *nifH* 基因丰度,弱化了土壤固氮潜力。EBERBACH 等^[25]认为除草剂主要是通过影响土壤细菌数量进而影响固氮系统。目前已发现氟磺胺草醚、甲氧磷、西玛津等除草剂的添加显著减少土壤细菌总量以及土壤好氧固氮微生物数量,使土壤 *nifH* 基因丰度显著下降,从而弱化土壤微生物固氮能力^[26-28]。KOLE 等^[29]则发现除草剂氯乙氟灵、二甲戊乐灵的施用显著降低了花生田间土壤细菌总量及好氧非共生固氮菌数量,导致土壤非共生微生物固氮潜力下降。而根瘤菌的存在有利于土壤固氮微生物的生存,增加生物固氮潜力。前人研究发现,在未受任何污染的大豆土壤上接种根瘤菌后土壤中自由固氮细菌(寡养细菌)数量增加,土壤 *nifH* 固氮菌的基因丰

度提高^[30-31]。本研究中菌株 *Sinorhizobium* sp. W16 的接种较好地缓解了氟磺胺草醚对大豆-根际系统中土壤固氮微生物的限制,使根际土壤 *nifH* 基因丰度恢复至未施用氟磺胺草醚的对照水平,增强了微生物固氮潜力。大豆根瘤固氮酶活性是衡量大豆固氮能力的一个重要指标^[32]。本研究中 450 g·hm⁻² 和 1 125 g·hm⁻² 氟磺胺草醚的施用显著抑制了根瘤生物量和根瘤固氮酶活性,导致大豆-根瘤菌共生固氮受限,但接种 *Sinorhizobium* sp. W16 后显著缓解了氟磺胺草醚对大豆根瘤固氮酶活性的抑制,在盛荚期 R4 时可恢复至与对照相近水平,提升了大豆共生固氮潜力。MOORMAN 等^[33]认为根瘤固氮酶活性受限主要是由于除草剂抑制了作物的光合作用以及根系的生长。除草剂的施用又会导致根瘤中同化产物供应不足、根瘤血红蛋白下降,从而降低根瘤固氮酶活性^[34-35]。

3.3 氟磺胺草醚及其降解菌对土壤及大豆氮素累积的影响

本研究发现与未施用除草剂相比,氟磺胺草醚的施用限制了土壤有效氮素的累积,降低了土壤铵态氮和硝态氮的含量。在培养期内,土壤铵态氮含量呈先上升后下降的趋势,这可能是由于在鼓粒期 R6 前,土壤 *nifH* 基因丰度的增加以及大豆根瘤固氮酶活性和

土壤脲酶活性受到刺激,增强生物固氮潜力,增加尿素水解,提高土壤中有效氮素的供应,而在生长后期大豆对氮素需求降低,土壤硝化作用开始增强。土壤中硝态氮含量随大豆生物量增加而不断下降,这可能是由于一部分土壤硝态氮被大豆吸收利用。而接种 *Sinorhizobium* sp. W16 后土壤脲酶活性、土壤 AOA 和 AOB 基因丰度显著增加,从而提升了土壤中铵态氮与硝态氮含量,增加土壤有效氮素的累积。这与 GORICA 等^[31]接种根瘤菌及共生固氮细菌后土壤铵态氮和硝态氮含量增加结果一致。与 FENG 等^[36]在华南低磷酸土壤上接种根瘤菌提升土壤氮素状况的结果相近。

大豆植株氮素积累是产量形成的基础,土壤中氮素的变化又直接影响着大豆氮素累积量。氟磺胺草醚一定程度上限制了大豆-根际系统的生物固氮,导致大豆全氮含量下降。而接种 *Sinorhizobium* sp. W16 降解菌后,大豆全氮含量增加达 24.93%,这一方面受益于接菌有效降解了土壤中氟磺胺草醚的残留,缓解了除草剂残留对大豆生长的抑制,另一方面接菌提升了大豆-根际系统的固氮潜力,增加了土壤中有效氮素的供应。由此可见,接种氟磺胺草醚降解菌 *Sinorhizobium* sp. W16 有利于大豆氮累积,促进大豆生长发育。

4 结论

(1) 氟磺胺草醚施用剂量(以有效成分计)达到或超过 $450\text{ g}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时会显著抑制大豆根生物量和根瘤固氮能力,同时显著降低根际土壤 *nifH* 基因丰度,导致大豆根际生物固氮受限。土壤脲酶活性、土壤氮循环相关微生物功能基因丰度受氟磺胺草醚影响逐渐降低又造成了土壤有机氮素转化受限,从而影响大豆生长。

(2) 从大豆根瘤中分离获得的一株氟磺胺草醚降解根瘤菌 *Sinorhizobium* sp. W16, 其不仅有效地降低了氟磺胺草醚的残留量,还缓解了氟磺胺草醚对大豆-根际系统的土壤有机氮素转化,提升了大豆-根际系统中生物固氮能力,较好恢复了大豆植株生长。*Sinorhizobium* sp. W16 降解菌在氟磺胺草醚污染土壤修复上具有较好的应用前景。

参考文献:

[1] 崔书芳. 黑龙江省大豆田反枝苋对氟磺胺草醚的抗药性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2016. CUI S F. Study on resistance of *Amaranthus retroflexus* L. to fomesafen of soybean field in Heilongjiang

Province[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.

[2] 曲耀训. 大豆田杂草危害与化学防除述评[J]. 农药市场信息, 2016, 14(6): 6-10. QU Y X. Review on the harm and chemical control of weeds in soybean fields[J]. *Pesticide Market Information*, 2016, 14(6): 6-10.

[3] WU X H, ZHANG Y, DU P Q, et al. Impact of fomesafen on the soil microbial communities in soybean fields in northeastern China[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 148: 169-176.

[4] HU H, ZHOU H, ZHOU S, et al. Fomesafen impacts bacterial communities and enzyme activities in the rhizosphere[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 253: 302-311.

[5] GOEL G, PANDEY P, SOOD A, et al. Transformation of pWWO in *Rhizobium leguminosarum* DPT to engineer toluene degrading ability for rhizoremediation[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2012, 52(2): 197-202.

[6] TENG Y, WANG X, LI L, et al. Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 32-43.

[7] 于跃, 刘静, 邓波, 等. 外源根系分泌物对紫花苜蓿根瘤菌共生体系的影响[J]. 草地学报, 2020, 28(1): 88-94. YU Y, LIU J, DENG B, et al. Effects of exogenous root exudates on symbiosis of alfalfa and rhizobium[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(1): 88-94.

[8] 周斌, 方萍, 张亚雷, 等. 有机磷农药生物降解技术研究进展[J]. 化工环保, 2005(5): 353-357. ZHOU B, FANG P, ZHANG Y L, et al. Research progress of organophosphorus pesticide biodegradation technologies[J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2005(5): 353-357.

[9] 李欣欣, 许锐能, 廖红. 大豆共生固氮在农业减肥增效中的贡献及应用潜力[J]. 大豆科学, 2016, 35(4): 531-535. LI X X, XU R N, LIAO H. Contributions of symbiotic nitrogen fixation in soybean to reducing fertilization while increasing efficiency in agriculture[J]. *Soybean Science*, 2016, 35(4): 531-535.

[10] YANG F S, LIU L, LIU C G, et al. Isolation, identification and soil remediation of fomesafen-degrading strain FB8[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(9): 1232-1239.

[11] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. BAO S D. Soil agrochemical analysis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.

[12] STAAL M, LINTEL-HEKKERT S T, HARREN F, et al. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: A comparison between batch incubation and on-line monitoring[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 3(5): 343-351.

[13] LI J, ZHANG Q, LI Y, et al. Impact of mowing management on nitrogen mineralization rate and fungal and bacterial communities in a semiarid grassland ecosystem[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2017, 17(6): 1715-1726.

[14] XU Y, GE Y, SONG J X, et al. Assembly of root-associated microbial community of typical rice cultivars in different soil types[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2020, 56(2): 249-260.

[15] ZOU Y K, ZHANG J N, YANG D L, et al. Effects of different land use patterns on *nifH* genetic diversity of soil nitrogen-fixing microbial

- communities in *Leymus Chinensis* steppe[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(3):150-156.
- [16] GAO J, DUAN Y, LIU Y, et al. Long- and short-chain AHLs affect AOA and AOB microbial community composition and ammonia oxidation rate in activated sludge[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2019, 78:53-62.
- [17] JU X, WU S, HUANG X, et al. How the novel integration of electrolysis in tidal flow constructed wetlands intensifies nutrient removal and odor control[J]. *Bioresour Technol*, 2014, 169:605-613.
- [18] 吴雁雯, 张金池, 郭晓平, 等. 应用于矿山修复的高效菌株鉴定与溶岩机制:基于增强回归树分析[J]. *环境科学*, 2017, 38(1):283-293. WU Y W, ZHANG J C, GUO X P, et al. Identification of efficient strain applied to mining rehabilitation and its rock corrosion mechanism: Based on boosted regression tree analysis[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(1):283-293.
- [19] LISINA T O, GARAN K N G, KRUGLOV Y V. The effect of soil inoculation with microbial pesticide destructors on plant growth and development[J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2001, 37(3):374-378.
- [20] 郭静, 宋秀丽, 白杰, 等. 氟磺胺草醚降解菌株 TB-2 的生物学特性及生物修复对玉米生长发育的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(5):1059-1065. GUO J, SONG X L, BAI J, et al. Biological characteristics of fomesafen-degrading strain TB-2 and effects of bioremediation on growth and development of corn[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2020, 26(5):1059-1065.
- [21] 刘迎春, 王小琴, 陶波. 不同土壤条件对氟磺胺草醚降解作用的研究[J]. *东北农业科学*, 2016, 41(1):81-85, 112. LIU Y C, WANG X Q, TAO B. Studies on effect of soil characteristics on degradation of fomesafen[J]. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2016, 41(1):81-85, 112.
- [22] FENG Z Z, LI Q F, ZHANG J, et al. Microbial degradation of fomesafen by a newly isolated strain *Pseudomonas zeshuii* BY-1 and the biochemical degradation pathway[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2012, 60(29):7104-7110.
- [23] 王利平, 王金信, 孙艾蕊, 等. 4 种除草剂对紫花苜蓿-根瘤菌共生固氮的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(增刊1):114-117. WANG L P, WANG J X, SUN A R, et al. Influence of four herbicides on rhizobium-alfalfa symbiotic nitrogen-fixation[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(Suppl 1):114-117.
- [24] FAN L, FENG Y, WEAVER D B, et al. Glyphosate effects on symbiotic nitrogen fixation in glyphosate-resistant soybean[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 121:11-19.
- [25] EBERBACH P L, DOUGLAS L A. Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum* L.[J]. *Plant & Soil*, 1989, 119:15-23.
- [26] WU X, XU J, DONG F, et al. Responses of soil microbial community to different concentration of fomesafen[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 273:155-164.
- [27] CHENG S Z, ZHANG H W, LI X Y, et al. Toxic effects of acetochlor, methamidophos and their combination on *nifH* gene in soil[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(7):864-873.
- [28] MARTINEZ-TOLEDO M V, SALMERON V, RODELAS B, et al. Studies on the effects of the herbicide simazine on microflora of four agricultural soils[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, 15(7):1115-1118.
- [29] KOLE S C, DEY B K. Effect of aromatic amine herbicides on bacterial population and nitrogen fixing power of the rhizosphere soil of groundnut[J]. *Environment and Ecology*, 1989, 7(4):850-853.
- [30] 高圣超. 接种大豆根瘤菌对东北黑土细菌群落影响及其调控作用[D]. 北京:中国农业科学院, 2017. GAO S C. Effects of inoculating soybean rhizobia on bacterial community in black soil of northeast China and its regulation[D]. Beijing:Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
- [31] GORICA C, DOZET G, VOJIN D, et al. Microbial activity of soil during the inoculation of soya bean with symbiotic and free-living nitrogen-fixing bacteria[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(3):590-597.
- [32] 陈慧, 邸伟, 姚玉波, 等. 不同大豆品种根瘤固氮酶活性与固氮量差异研究[J]. *核农学报*, 2013, 27(3):379-383. CHEN H, DI W, YAO Y B, et al. Study on the difference of nodule nitrogenase activity and amount of nitrogen fixation of different soybean varieties[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 27(3):379-383.
- [33] MOORMAN T B. A review of pesticide effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility[J]. *Journal of Production Agriculture*, 1989, 2(1):14-23.
- [34] 李慧. 咪唑乙烟酸抑制大豆根瘤固氮酶活性的机理研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2014. LI H. Research on inhibited mechanism of nodule's nitrogenase activity by imazethapyr in soybean (*Glycine max* L.)[D]. Harbin:Northeast Agricultural University, 2014.
- [35] LAYZELL D B, HUNT S, PALMER G R. Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules: Pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by O₂[J]. *Plant Physiology*, 1990, 92(4):1101-1107.
- [36] FENG X C, GUI Q C, XIU R W, et al. Isolation and application of effective nitrogen fixation rhizobial strains on low-phosphorus acid soils in south China[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(3):412-420.