

转基因植物释放 *Bt* 毒素的土壤环境行为 与生物学效应*

姚艳玲 崔海瑞[†] 卢美贞 忻雅

(浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029)

摘要 *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) 杀虫晶体蛋白基因是植物抗虫基因工程中应用最广泛的基因, 随着大批转 *Bt* 基因作物的商品化, *Bt* 毒素对土壤生态系统的影响已引起了人们的高度关注。本文对转基因植物释放 *Bt* 毒素的土壤环境行为与生物效应进行了综述, 包括 *Bt* 毒素蛋白进入土壤的途径、在土壤中的运动、与土壤颗粒的结合与存留及其对土壤生物和土壤酶的影响。

关键词 转基因植物; *Bt* 毒素; 土壤环境行为; 生物学效应

中图分类号 S154, X171 **文献标识码** A

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 是一种广泛存在于土壤中的革兰氏阳性菌, 它在芽孢形成时可产生具有杀虫活性的晶体蛋白质^[1]。自从 Schnepf 等^[2] 首次成功地克隆了第一个编码 *Bt* 杀虫晶体蛋白基因, 到 2004 年 5 月, 人们已经克隆了 323 个杀虫晶体蛋白基因, 其中 315 个已定大名^[3]。大量 *Bt* 基因的克隆, 为利用转基因技术进行植物品种改良提供了丰富和有效的抗虫基因资源, 目前它已成为植物抗虫基因工程中应用最广泛的抗虫基因。抗虫玉米、棉花、马铃薯、番茄等已实现商品化应用, 2003 年全球种植抗虫转基因作物的面积已达到 $1220 \times 10^4 \text{hm}^2$, 占转基因作物总种植面积的 18%^[4]。

土壤-植物系统是地球生态系统中与人类生存与健康关系最为密切的亚系统, 它一方面为人类提供优质食物、纤维等基本物质, 同时为人类生存创造舒适的环境条件。而土壤环境也与人类生存息息相关, 土壤环境的好坏直接影响了农作物的产量。随着转 *Bt* 基因作物在生产上的大面积应用, 将会有大量的 *Bt* 蛋白通过不同的途径进入土壤并积累。随之而来的问题是这些 *Bt* 毒素是否与土壤质粒结合进而破坏土壤结构? 对土壤生物群落、生物学活性是否会产生不利的影响? 而土壤结构、土壤生物群落和生物学活性又与土壤肥力水平、生产能力和可持续利用等密切相关, 因此转基因植物释放 *Bt* 毒素在土壤中环境行为与效应已受到人们的关注, 国内

外在这方面也进行了广泛的研究。本文将从 *Bt* 毒素进入土壤的途径、在土壤中的归趋及其可能产生的效应等方面进行综合评述, 以期对转 *Bt* 基因植物的合理利用和安全性评价提供理论依据。

1 *Bt* 毒素进入土壤的途径

转基因植物释放 *Bt* 毒素的途径有多种, 其中最具有代表性的途径有三个。一是通过植株残体或凋落物。转 *Bt* 作物遗留在田间的植株残体或凋落物(如落叶)可通过耕作方式向土壤中释放 *Bt* 毒蛋白, 这是 *Bt* 毒蛋白进入土壤的主要途径, 尤其是随着作物秸秆还田技术在农业生产上的大面积应用, 为转 *Bt* 作物释放的毒蛋白进入土壤并在土壤中积累提供了有利条件^[5~7]。二是通过根系分泌。植物可通过根系分泌多种不同的物质, 转 *Bt* 作物的根系则可能不断地向根际周围的土壤生物圈中释放着 *Bt* 毒素蛋白。例如, 转 *Bt* 基因玉米通过根系向土壤分泌具有杀虫活性的 *Bt* 毒素蛋白^[8]。由于不同植物的根系分泌特性及其分泌物存在着差异, 因此不同的转 *Bt* 基因植物其分泌 *Bt* 毒素蛋白的情况也不完全相同。据 Saxena 等^[9] 的研究, *Bt* 毒素从转 *Bt* 基因玉米、水稻和马铃薯的根系分泌物中释放出来, 而且分泌 *Bt* 毒素的量也不一样, 但在转 *Bt* 基因油菜、棉花和烟草的根系分泌物中却没有检测到。对

* 国家自然科学基金项目(30270273)资助

[†] 通讯作者, E-mail: hrcui@zju.edu.cn

作者简介: 姚艳玲(1980-), 女, 硕士研究生, 从事转 *Bt* 基因表达产物的环境行为与效应研究

收稿日期: 2004-11-23; 收到修改稿日期: 2005-04-11

于转 *Bt* 基因植物根系是否分泌 *Bt* 毒素及其分泌量差异的原因, 目前尚不清楚, 还需要进一步研究。三是通过花粉释放 *Bt* 毒素。大多数转 *Bt* 作物在花粉中表达 *Bt* 毒蛋白, 且表达的量很高^[10], 其携带的 *Bt* 蛋白就可能进入土壤, 而通过这一途径释放 *Bt* 毒素的情况显然与 *Bt* 基因在生殖器官中的表达水平及转化时所用启动子的特性有关。

2 *Bt* 毒素在土壤中的归趋

2.1 *Bt* 毒素在土壤中的运动

经上述途径 *Bt* 毒素被释放到土壤中, 通过雨水、灌溉等可水平运移或者通过淋洗等垂直渗透, 土壤颗粒是影响 *Bt* 毒素在土壤中运动的重要因素。Saxena 等^[11] 比较了粘土对 *Bt* 毒素垂直运动的影响, 他们在 0%、3%、6%、9% 和 12% 等不同粘土含量的土壤中分别加入从植株中纯化的 *Bt* 蛋白和 *Bt* 作物的秸秆, 在没有加入粘土的土壤渗透液中测得 *Bt* 蛋白含量最高(75%), 在粘土含量为 12% 土壤渗透液里测得 *Bt* 蛋白含量最低(16%), 而在未加入 *Bt* 蛋白的土壤或者加入非转 *Bt* 基因作物秸秆的土壤渗透液中检测不到 *Bt* 蛋白, 土壤渗透液里的 *Bt* 蛋白含量随着加入蛋白浓度的增加而增加, 但随着土壤中粘土含量的增加而降低, 其结果表明粘土对 *Bt* 蛋白具有很强的吸附性, 土壤中粘土成分较高有利于 *Bt* 毒素与土壤颗粒结合, 而结合态的 *Bt* 毒素则不易降解, 这样通过水平流动将会侵蚀地表水; 相反, 土壤中缺乏粘土则有利于 *Bt* 毒素渗透进入地下水。此外, *Bt* 蛋白含量的高低也直接影响其在土壤中的垂直运动。

2.2 *Bt* 毒素与土壤颗粒的结合

土壤颗粒如粘土矿物、腐质酸、有机矿物聚合体等, 影响着肥力因素和土壤耕性, 这些土壤颗粒可吸附 *Bt* 毒素。Venkateswerlu 等^[12] 的研究表明, 从 *Bt* 提取的毒素能快速被土壤吸附并紧紧地结合, 但结合蛋白的结构并未被修饰。Tapp 等^[13] 报道土壤中的蒙脱石和高岭石可快速吸附 *Bt* 毒素, 蒙脱石对 *Bt* 毒素的吸附作用明显高于高岭石, 其最大吸附量分别为 $790\mu\text{g mg}^{-1}$ 和 $280\mu\text{g mg}^{-1}$, 分别占加入毒素量的 38% 和 13.5%。Stotzky 领导的研究小组^[14, 15] 报道, *Bt* 玉米通过根系向土壤分泌的 Cry1Ab 蛋白能快速紧密地与土壤粘粒及腐质酸结合, 而与其与森林土壤腐质酸、耕作土壤腐质酸达到吸附平衡的时间分别为 1~2h 和 4~8h; *Bt* 毒素浓度一定时, 吸附

量与腐质酸含量成正比, 但单位重量腐质酸的相对吸附率随着毒素含量的升高而下降; 当腐质酸含量一定时, 腐质酸的吸附量与 *Bt* 毒素的浓度成正比。Crecchio 等^[16] 研究表明, *Bt* 毒素与腐殖酸的结合受腐殖酸的各种功能性基团含量的影响, 结合态毒素仍保持杀虫活性。Crecchio 等^[17] 还研究了 *Bt* 毒素与蒙脱石-腐殖酸 A1 羟基聚合体混合物的稳态吸附和结合, 发现 1h 内吸附达到总吸附量的 70%, 在 8h 内产生了最大吸附, 吸附常量随毒素量的增加而增加。另有研究报道土壤 pH 值对其吸附 *Bt* 毒素也有明显的影响^[18]。笔者也研究了红砂土、碱性土、红壤、青紫泥、黄筋泥和小粉土等六种常见土壤与 *Bt* 蛋白 Cry1Ab 的结合情况, 发现不同类型土壤与 Cry1Ab 毒素的结合能力不同, 而土壤的颗粒组成(有机质、粉粒含量、沙粒含量)是造成这种差异的主要因素(资料将另文发表)。

2.3 *Bt* 毒素在土壤中的降解与存留

Bt 毒素在土壤中通过生物降解和自然失活作用得以减少或消除, *Bt* 毒素可直接被土壤微生物降解或进入靶标害虫和非靶标害虫体内后被“消化”降解, 另外太阳光中紫外线的照射, 也可使 *Bt* 毒素分解。其中, 微生物降解是消除土壤中 *Bt* 毒素的重要途径^[19]。

Steven 等^[20] 分析了转 *Bt* 玉米组织中的毒蛋白在土壤中被土壤微生物降解, 生物测定的结果显示, 玉米组织中 *Bt* 毒素消散 90% 和 50% 生物活性的时间(DT_{90} 和 DT_{50}) 与土壤有关, 将转 *Bt* 基因的玉米组织与土壤混合后其 DT_{90} 和 DT_{50} 值分别为 16 d 和 1.6 d, 而未与土壤混合的 DT_{90} 和 DT_{50} 分别为 40.7 d 和 25.6 d。Palm 等^[5] 报道土壤中 *Bt* 毒蛋白量在前 14 d 快速下降, 然后下降趋势减缓, 经过与 γ 射线辐射的无菌土壤分析比较, 揭示快速下降的主要原因是游离的 *Bt* 毒蛋白被微生物作为一种碳源或氮源分解利用所致。

目前, *Bt* 毒蛋白在土壤中存留的时间长短因不同的材料、试验方法和条件而不同。早期关于 *Bt* 蛋白 DT_{50} 的报道变化很大^[21, 22], 而且呈非指数衰减。Tapp 和 Stotzky^[6] 用生测法估算结合态 *Bt* 毒素在土壤中的降解时间大于 234 d, 这也是迄今已知的 *Bt* 毒蛋白在土壤中存留的最长时间, 可见结合后的 *Bt* 毒素不易降解。Palm 和 Sims 等^[5, 23, 24] 用半衰期法估算的转 *Bt* 基因玉米、棉花的纯化 *Bt* 毒素在土壤中的降解时间为 8~17 d, 其秸秆分解后 *Bt* 毒素在土壤中降解时间为 2~41 d。笔者在转 *cry1Ab* 基因

高粱秸秆还田研究中观察到, 粉碎后的秸秆还田后 1~ 22 d 内, 释放到土壤中 *Bt* 蛋白量逐步增加, 到 22 d 时达到最大, 此后则逐渐降低, 到 52 d 时为最大释放量的 20%, 而到 67 d 时土壤中基本检测不到 *Bt* 蛋白, 说明转 *Bt* 基因高粱在土壤中的降解周期在 67 d 之内(资料待发表)。由于没有可靠的衰减速率常数或半减期, 将杀虫晶体蛋白残留特性数量化比较困难。目前通过试验仅能提供关于 *Bt* 杀虫晶体蛋白在土壤中衰减和残留的定性预测而并非是通用的量化数值。土壤是复杂的基质, 许多因子可以影响土壤中蛋白的降解。土壤中杀虫晶体蛋白的降解速率不仅与杀虫晶体蛋白的类型、形式、浓度有关, 而且与土壤类型、土壤湿度、土壤微生物的构成、耕作的深度和气候等因子有关^[25]。

3 *Bt* 毒素的土壤生物学效应

3.1 *Bt* 毒素对根际微生物的影响

根际是植物、土壤和微生物密切相关的一个区域, 土壤微生物种群数量变化的测定将有助于了解外源转入基因表达产物对土壤微生态的影响。为此, 很多研究学者研究不同转 *Bt* 基因植物的根际微生物。

Donegan 等^[26] 研究了 3 个不同抗虫棉品系 (247、249、81) 对土壤微生物的影响, 其结果表明, 与常规棉相比, 种植 *Bt* (*cry1Ac* 基因) 抗虫棉 247 和 249 系土壤中好氧细菌和真菌的数量显著增加, 优势种为芽孢杆菌和链球菌; 但 81 系 *Bt* (*cry1Ab* 基因) 抗虫棉及其纯化蛋白 247 和 249 系的纯化蛋白对土壤细菌和真菌则没有显著影响。Saxena 等^[18, 27] 和 Donegan 等^[28] 进行了转 *Bt* 基因作物秸秆还土试验, 在培养 45 d 和 56 d 后, 观察到添加转基因玉米或棉花秸秆的土壤细菌、放线菌和真菌数量与对照无显著差异。王洪兴等^[29] 报道, 在转 *Bt* 基因水稻秸秆降解初期, 土壤可培养细菌数量显著低于对照, 而真菌的数量有所增长, 且达到了极显著水平。徐晓宇等^[30] 研究了克螟稻秸秆释放 *Bt* 毒素对土壤反硝化细菌、水解发酵细菌、厌氧固氮细菌、产甲烷细菌等厌氧性微生物的影响, 结果表明, 克螟稻秸秆的加入在某些培养阶段, 促进了厌氧微生物类群的生长发育, 与对照处理相比, 土壤厌氧微生物在数量上有明显差异, 除厌氧固氮菌外, 克螟稻秸秆还土对其他微生物种群的影响均达到显著水平。尽管在整个培养过程的某些时段, 转 *Bt* 基因克螟稻和对照秸秆

还土后氯化细菌、好氧性自生固氮菌和纤维素降解菌等数量存在一些差异, 但这种显著性差异并不持续, 随着培养时间的延长差异逐渐消失。由上可见, 在目前此类研究报告中, 各研究者所用植物转入的 *Bt* 基因不同, 考察的目标也各不相同, 得出的结果也不一样, 所以有关转 *Bt* 基因植物释放 *Bt* 蛋白对土壤生物种群数量和结构影响还没有明确的定论。

3.2 *Bt* 毒素对土壤其他生物的影响

在田间种植条件下, 目前尚未发现种植转 *Bt* 基因植物会对其他土壤生物产生显著的不利影响的报道。Donegan 等^[26] 在进行了种植转 *Bt* 基因抗虫棉和对照间的比较研究后, 认为种植转 *Bt* 基因抗虫棉对土壤中变形虫、纤毛虫、鞭毛虫的数量没有显著影响。Saxena 等^[27] 也报道 *Bt* 玉米根系分泌物或 *Bt* 玉米生物体降解释放的毒素对土壤中蚯蚓、线虫、原生动物等没有毒性。但 Watrud 等^[31] 则报道种植转 *Bt* 基因烟草后土壤中线虫数量增加明显。而这些仅仅是初步的研究结果, 种植转 *Bt* 基因作物对这些土壤生物的种群结构是否有影响仍待深入研究。

转 *Bt* 作物释放的 *Bt* 毒蛋白与土壤活性颗粒间的结合是一种可逆的物理反应, 结合态 *Bt* 毒素并没有改变其原有的结构, 利用这种结合态 *Bt* 毒蛋白室内饲喂靶标昆虫时仍具有杀虫活性^[13, 15]。Saxena 等^[8] 报道转 *Bt* 玉米根系分泌的 *Bt* 毒素对烟草天蛾幼虫具有很强的毒性, 他们^[14, 32, 33] 进一步实验发现, 转 *Bt* 玉米植株体和根系分泌物释放的 *Bt* 毒蛋白能以结合态形式对烟草天蛾和马铃薯甲虫的幼虫保持较强的毒性, 其杀虫活性甚至在游离态的毒蛋白之上, 对烟芽夜蛾幼虫也同样表现出其较强的毒性^[34]; 种植过 *Bt* 玉米和水稻后土壤结合态的 *Bt* 毒素对烟草幼虫和天蛾科幼虫都具有毒性, 而种植过转 *Bt* 马铃薯后对鳞翅目和鞘翅目昆虫都有毒性。Crechio 等^[16, 17] 也报道, 纯化的 *Bt* 毒蛋白分别与腐殖质酸和蒙脱石-腐殖质酸-铝羟基聚合物的复合体的结合态同游离态一样具有对烟草天蛾幼虫的杀虫活性。

3.3 *Bt* 毒素对土壤酶学活性的影响

土壤酶活性反映了土壤中各种生物化学过程的强度和方向, 是土壤重要的生物学特性, 在土壤营养物质的循环和能量的转移中起关键性作用。因而, 转 *Bt* 基因植物释放 *Bt* 毒素是否会对土壤酶活性产生影响也是人们关心的重要问题之一。

Jepson 等^[35] 首先提出转 *Bt* 基因植物的种植可能改变土壤脲酶、土壤脱氢酶、磷酸酶的活性, 但未

进行实验验证。近来以转 *Bt* 基因水稻和棉花为试材的研究结果证实了这一观点。吴伟祥等^[36-39]研究了淹水条件下转 *Bt* 基因水稻(克螟稻) 秸秆还田对土壤酶活性的影响, 其结果表明, 与相同生长期的亲本水稻秸秆相比, 孕穗期和成熟期克螟稻秸秆对磷酸酶活性的影响较小, 而对脱氢酶活性的影响非常显著, 并且添加孕穗期和成熟期秸秆对脱氢酶的影响趋势也存在较大差异; 而在非淹水条件下, 克螟稻秸秆还田对土壤蛋白酶、中性磷酸酶、脲酶活性和土壤呼吸强度没有显著性影响, 而土壤脱氢酶对添加克螟稻秸秆极其敏感, 培养前 63d 内其活性明显高于对照处理, 但此后两种秸秆处理间的土壤脱氢酶活性差异逐渐消失。孙彩霞等^[40]也报道了种植转 *Bt* 基因水稻对一些土壤酶活性的影响, 转 *Bt* 基因水稻生长 15 d 时, 根围土壤脲酶活性比对照显著下降(降幅为 2.47%), 酸性磷酸酶活性显著升高(增幅为 8.91%), 而芳基硫酸酯酶、蔗糖酶和脱氢酶活性无显著变化; 生长 30d 时, 土壤脲酶活性仍显著下降(降幅为 16.36%), 但酸性磷酸酶、芳基硫酸酯酶和脱氢酶活性显著升高(35.69%、19.70% 和 16.83%), 而土壤蔗糖酶活性仍无显著变化。孙彩霞等^[41]还研究了以不同处理方式所导致的土壤残留 *Bt* 毒素对土壤磷酸酶活性的影响, 在土壤中添加 *Bt* 菌体和转 *Bt* 基因棉组织后, 土壤磷酸酶活性均呈现出比对照增高的趋势, 但种植 *Bt* 棉过程中根际土壤的磷酸酶活性则呈现降低的趋势; 而且无论以何种方式处理, 不同 *Bt* 蛋白残留量(浓度) 间的土壤磷酸酶活性都存在显著差异。

4 结 语

转 *Bt* 基因植物已在农业生产上大面积种植利用, 通过植株残体或凋落物、根系分泌和花粉飘落等不同途径, *Bt* 毒素被释放到土壤中并仅在短时间内呈游离态, 随后将被土壤表面活性颗粒所吸附结合, 结合态的 *Bt* 蛋白不易降解, 残留在土壤中的活性可保持数周或数月, 并对土壤生物产生一定的影响, 这已被大量研究证实, 也为转 *Bt* 基因植物的安全性评价提供了理论依据。

根据现有的研究结果, 转基因作物释放的 *Bt* 毒蛋白可被生物降解和自然分解, 因此, 同商业 *Bt* 生物制剂一样, 理论上转 *Bt* 作物释放的 *Bt* 毒素在土壤中应不会保持较高的量。但是, 如果长期重复种植这些转 *Bt* 作物, 则可能会造成土壤中残留 *Bt* 毒

蛋白的积累, 从而影响土壤生物并引起其他生物的连锁反应, 进而影响整个土壤生态系统。为此, 应对转基因作物释放的 *Bt* 毒素在土壤中残留与积累情况进行长期的追踪和监控研究。

土壤颗粒与 *Bt* 毒素的结合在很大程度上决定着 *Bt* 毒素的归趋。不同土壤结构对 *Bt* 毒素的结合及渗透能力各不相同, 而土壤在不同温度、不同 pH 条件下对 *Bt* 毒素的吸附、解吸及降解规律是否一致也有待进一步研究。另一个值得注意的问题是, 目前这方面研究报道所用的 *Bt* 毒素多是从 *Bt* 中直接提取纯化的, 而在转化时为了提高 *Bt* 基因的表达水平, 不同研究者往往对野生 *Bt* 基因进行了密码子修饰, 使得不同转 *Bt* 基因植物间以及与 *Bt* 本身的杀虫晶体蛋白在化学结构和性质等方面可能存在差异, 所以这些研究结果难以反映目前转基因作物释放 *Bt* 毒素与土壤结合及其行为的田间实际情况。

土壤中富集的 *Bt* 毒素对土壤生物的潜在影响不容忽视。目前报道的结果并不一致, 不同转 *Bt* 基因植物对根际生物影响不同, 但大多数仅仅是针对非靶标生物、细菌、真菌的总数进行的测定, 评价的物种相对单一, 而且研究周期较短, 并不能全面而又真实地反应实际情况。此外, 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% 种类的可人工培养种类上。因此, 今后研究转基因植物释放 *Bt* 毒素的土壤生物效应时, 重点应放在对土壤生物多样性、生物群落构成及功能的长期定位研究。

土壤酶活性在土壤生态系统的物质循环和能量转化过程中起着重要的作用。土壤中的脲酶、磷酸酶、芳基硫酸酯酶、蔗糖酶、脱氢酶与土壤中的 N、P、S、C 等营养元素循环及植物营养状况的关系密切^[42-44]。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, 土壤酶活性与土壤粘粒和腐殖质含量密切相关^[45,46], 而转基因植物释放的 *Bt* 毒蛋白能被土壤矿物质、土壤腐殖酸、土壤有机矿质复合体吸附和结合, 因而 *Bt* 毒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。目前, 在有关转 *Bt* 基因水稻和棉花研究中已证实了 *Bt* 毒素对一些土壤酶活性的影响, 但考察的土壤酶种类有限, 且不同的土壤酶对 *Bt* 毒素的反应不一, 而土壤酶系统包含着繁多的不同酶类, 它们的功能不同, 所以在这方面还有待于进行广泛和深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Hannay C L, Fitz-James P. The protein crystals *Bacillus thuringiensis* of Berliner. Can. J. Microbiol., 1955, 1(8): 694~ 710
- [2] Schnepf H E, Whiteley H R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1981, 78: 2893~ 2897
- [3] Crickmore N, Zeigler D R, Schnepf E, *et al.* *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/, 05/20/2004
- [4] Clive J. Global status of commercialized transgenic crops: 2003. *ISAAA Briefs*, 2003, (30): 1~ 25
- [5] Palm C J, Schaller D L, Donegan K K, *et al.* Persistence in soil of transgenic plants produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin. Can. J. Microbiol., 1996, 42: 1258~ 1262
- [6] Tapp H, Stotzky G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30(4): 471~ 476
- [7] 白耀宇, 蒋明星, 程家安, 等. 转 *Bt* 基因作物 *Bt* 毒蛋白在土壤中的安全性研究. *应用生态学报*, 2003, 14(11): 2062~ 2066. Bai Y Y, Jiang M X, Cheng J A, *et al.* Advances in safety studies of soil *Bt* toxin proteins released from transgenic *Bt* crops (In Chinese). *Chinese J. Appl. Ecol.*, 2003, 14(11): 2062~ 2066
- [8] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. *Nature*, 1999, 402: 480
- [9] Saxena D, Stewart C N, Altoosar 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 Physiol. Biochem.*, 2004, 42: 383~ 387
- [10] Fearing P L, Brown D, Vlachos D, *et al.* Quantitative analysis of CryIAb expression in *Bt* maize plants' tissue and silage and stability of expression over successive generations. *Mol. Breed.*, 1997, 3: 169~ 176
- [11] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Vertical movement in soil of insecticidal CryIAb protein from *Bacillus thuringiensis*. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, 34: 111~ 120
- [12] Venkateswerlu G, Stotzky G. Banding of the protoxin and toxin proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. *Current Microbiol.*, 1992, 25(4): 225~ 233
- [13] Tapp H, Calamai L, Stotzky G. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay. *Soil Biol. Biochem.*, 1994, 26: 663~ 679
- [14] Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of *Bt* corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, 33(1): 35~ 39
- [15] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *J. Environ. Qual.*, 2000, 29: 691~ 705
- [16] Crecchio C, Stotzky G. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30(4): 463~ 470
- [17] Crecchio C, Stotzky G. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to complexes of montmorillonite-humic acids-A1 hydroxypolymers. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, 33: 573~ 581
- [18] Aronson A I, Beckman W, Dunn P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.*, 1986, 50: 1~ 24
- [19] Koskella J, Stotzky G. Microbial utilization of free and clay bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(9): 3561~ 3568
- [20] Seven R S, Lary R H. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIAb protein in com tissue. *Environ. Entomol.*, 1996, 25: 659~ 664
- [21] West A W. Fate of the insecticidal, proteinaceous parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1984, 16(4): 357~ 360
- [22] Pruett C J, Buges H D, Wyborn C H. Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1980, 35(2): 168~ 174
- [23] Sims S R, Holden L R. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* CryIA(b) protein in com tissue. *Environ. Entomol.*, 1996, 25: 659~ 664
- [24] Palm C J, Donegan K, Harris D, *et al.* Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. *Mol. Ecol.*, 1994, 3: 145~ 151
- [25] 孙彩霞, 武志杰, 陈利军. 转 *Bt* 基因玉米的生态安全性研究进展. *生态学报*, 2004, 24(4): 798~ 805. Sun C X, Wu Z J, Chen L J. Advances in the eco-safety researches of transgenic *Bt* maize (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(4): 798~ 805
- [26] 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. *Appl. Soil Ecol.*, 1995, 2: 111~ 124
- [27] Saxena D, Stotzky G. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin released from root exudates and biomass of *Bt* com has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, 33: 1225~ 1230
- [28] 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. *tenebrionis* endotoxin. *Transgen. Res.*, 1996, 5: 25~ 35
- [29] 王洪兴, 陈欣, 唐建军, 等. 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. Wang H X, Chen X, Tang J J, *et al.* Influence of the straw decomposition of *Bt* transgenic rice on soil culturable microbial flora (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(1): 89~ 94
- [30] 徐晓宇, 叶庆富, 吴伟祥, 等. 转 *Bt* 基因“克螟稻”秸秆还田对稻田厌氧微生物种群和酶活性的影响. *植物营养与肥料学报*, 2004, 10(1): 63~ 67. Xu X Y, Ye Q F, Wu W X, *et al.* Effect of transgenic *Bt* rice straw on anaerobic microbial populations and enzyme activities in paddy soil (In Chinese). *Plant Nutr. Fertil. Sci.*, 2004, 10(1): 63~ 67

- [31] Watrud L S, Seidlet R J. Nontarget ecological effects of plant, microbial and chemical introductions to terrestrial systems. In: Soil Science Society of America. ed. Soil Chemistry and Ecosystem Health. Special Publication 52. Wisconsin: Madison, 1998. 313~ 340
- [32] Saxena D, Flores S, Stotzky G. *Bt* toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, 34: 133~ 137
- [33] Saxena D, Stotzky G. *Bt* toxin uptake from soil by plants. *Nature Biotech.*, 2001, 19: 199
- [34] Steven R S, Berberch S A. *Bacillus thuringiensis* CryIA protein levels in raw and processed seed of transgenic cotton determination using insect bioassay and Elisa. *J. Econ. Entomol.*, 1996, 89: 247~ 251
- [35] Jepson P C, Croft B A, Pratt G E. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release for *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. *Mol. Ecol.*, 1994, 3: 81~ 89
- [36] Wu W X, Ye Q F, Min H, *et al.* *Bt*-transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatase activities in a flooded paddy soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2004, 36: 289~ 295
- [37] 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. Wu W X, Ye Q F, Min H. Enzyme activities variation in flooded soils amended with *Bt* transgenic rice straws at different stages of plant development (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(11): 2353~ 2358
- [38] Wu W X, Ye Q F, Min H. Effect of straws from *Bt*-transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil. *Soil Biol.*, 2004, 40: 15~ 22
- [39] 吴伟祥, 叶庆富, 闵航, 等. 克螟稻秸秆 *cry1Ab* 基因表达产物对土壤生物学活性的影响. *土壤学报*, 2003, 40(4): 606~ 611. Wu W X, Ye Q F, Min H, *et al.* Effect of *cry1Ab* toxin released from straw of *Bt*-transgenic rice on microflora and enzymatic activities in upland soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(4): 606~ 611
- [40] 孙彩霞, 陈利军, 武志杰, 等. 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. Sun C X, Chen L J, Wu Z J, *et al.* Effect of transgenic *Bt* rice planting on soil enzyme activities (In Chinese). *Chinese J. Appl. Ecol.*, 2003, 14(12): 2261~ 2264
- [41] 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): 761~ 766. Sun C X, Chen L J, Wu Z J. Persistence of *Bt* toxin in soil and its effects on soil phosphatase activity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(5): 761~ 766
- [42] Henitez E, Melgar R, Melgar H, *et al.* Enzyme activities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum* L.) grown with olive cake mulches. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, 32(13): 1829~ 1835
- [43] Deng S P, Tabatabai M A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils ④ Phosphatases and arylsulphatases. *Biol. Fertil. Soil*, 1997, 24: 141~ 146
- [44] Reid I D. Biodegradation of lignin. *Can. J. Bot.*, 1995, 73: 1011~ 1018
- [45] Rao M A, Violante A, Gianfreda L. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: Kinetics and stability. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, 32: 1007~ 1014
- [46] Tabatabai M A, Garcia-Manzanedo A M, Acosta-Martinez V. Substrate specificity of arylamidase in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, 34: 103~ 110

ENVIRONMENTAL BEHAVIOR AND BIOLOGICAL EFFECTS OF *Bt* TOXINS RELEASED FROM *Bt*-TRANSGENIC PLANTS IN SOIL

Yao Yanling Cui Hairui Lu Meizhen Xin Ya

(Institute of Nuclear and Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract The insecticidal crystal protein gene of *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) has been the most extensively used one in plant insect resistant genetic engineering. Along with commercialization of large groups of *Bt*-transgenic crops, the impact of *Bt* toxins released from transgenic plants on the soil ecosystem has aroused high concerns. In this paper the environmental behavior and biological effects of the *Bt* toxin are reviewed, addressing ways of *Bt* toxins released into the soil from transgenic plants, its movement, bond onto soil surface active particle, degradation, persistence and effects on organisms and enzymes in the soil.

Key words Transgenic plant; *Bt* toxin; Soil environmental behavior; Biological effects