DOI: 10. 11686/cyxb2025507
http://cyxb. magtech. com. cn
张雯珺, 赵康羽, 徐艳霞, 等. 蜡样芽孢杆菌DS-9的分离鉴定及其缓解苜蓿连作障碍的潜力. 草业学报, 2026, 35(12): 90－102.
ZHANG Wen-jun, ZHAO Kang-yu, XU Yan-xia, *et al*. Isolation and identification of *Bacillus cereus* strain DS-9 and potential for alleviating alfalfa continuous cropping autotoxin accumulation. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(12): 90－102.

蜡样芽孢杆菌DS-9的分离鉴定及其缓解苜蓿连作障碍的潜力

张雯珺[1],赵康羽[1],徐艳霞[2*],付学鹏[1*],刘秋瑾[2,3],李丹妮[2,3]
(1. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161000;2. 黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院,黑龙江 齐齐哈尔 161000;3. 黑龙江省中国科学院草田轮作科学家工作室,黑龙江 齐齐哈尔,202004)

摘要:为缓解苜蓿连作障碍中酚酸类自毒物质积累导致的生长抑制,本研究以3种典型酚酸(香豆素、阿魏酸、咖啡酸)为对象,通过种子萌发与幼苗胁迫试验,筛选出对苜蓿抑制最显著的关键物质——香豆素。随后,以香豆素为唯一碳源,从苜蓿－燕麦轮作系统的燕麦根际土壤中分离降解菌株。经16S rRNA基因序列分析,鉴定出一株蜡样芽孢杆菌DS-9。高效液相色谱定量检测,该菌株在300 mg·L^{-1}香豆素为唯一碳源的培养基中培养72 h后,降解率达50.33%。盆栽回接试验进一步表明,接种DS-9可显著缓解香豆素胁迫对苜蓿生长的抑制,使幼苗鲜重和干重分别比香豆素胁迫组提高126.47%和69.56%。综上所述,蜡样芽孢杆菌DS-9对香豆素具有良好的降解能力,并能有效促进苜蓿生长,为苜蓿连作障碍的生物修复提供潜在的微生物资源。

关键词:苜蓿;连作障碍;香豆素;蜡样芽孢杆菌;生物降解

Isolation and identification of *Bacillus cereus* strain DS-9 and potential for alleviating alfalfa continuous cropping autotoxin accumulation

ZHANG Wen-jun[1], ZHAO Kang-yu[1], XU Yan-xia[2*], FU Xue-Peng[1*], LIU Qiu-jin[2,3], LI Dan-ni[2,3]
1. *College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar* 161000, *China*; 2. *Branch of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar* 161000, *China*; 3. *Heilongjiang Province, Chinese Academy of Sciences Grass Field Rotation Scientists' Studio, Qiqihar* 202004, *China*

Abstract: To mitigate the growth inhibition in alfalfa (*Medicago sativa*) caused by the accumulation of phenolic acid autotoxins under continuous cropping systems, this study focused on three representative phenolic acids, coumarin, ferulic acid, and caffeic acid. Through seed germination and seedling stress experiments, coumarin was identified as the compound that most significantly inhibited alfalfa growth. Subsequently, using coumarin as the sole carbon source, a coumarin-degrading bacterial strain was isolated from the rhizosphere soil of oats (*Avena sativa*) in an alfalfa－oat rotation system. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, the strain was identified as *Bacillus cereus* DS-9. High performance liquid chromatography quantitative analysis showed that after 72 hours of incubation in a medium containing 300 mg·L^{-1} coumarin as the sole carbon source, the degradation rate was as high as 50.33%. Pot reinoculation experiments further demonstrated that inoculation with DS-9 significantly alleviated coumarin-

收稿日期:2025-12-11;改回日期:2026-01-22
基金项目:黑龙江省省属科研院所科研业务费(CZKYF2024-1-B015)资助。
作者简介:张雯珺(2000－),女,贵州安顺人,在读硕士。E-mail: 1943883092@qq. com
*通信作者 Corresponding author. E-mail: xuyanxia0214@163. com, 409799196@qq. com

induced stress in alfalfa, increasing seedling fresh weight and dry weight by 126.47% and 69.56%, respectively, compared to the coumarin-stressed treatment. In summary, *B. cereus* DS-9 exhibits efficient coumarin-degrading capability and effectively promotes alfalfa growth, providing a potential microbial resource for the bioremediation of alfalfa continuous cropping autotoxin accumulation.

Key words: alfalfa; continuous cropping obstacle; coumarin; *Bacillus cereus*; biodegradation

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是我国栽培历史悠久的重要豆科牧草,因营养价值高而被广泛种植[1-3]。为满足畜牧业需求,苜蓿在北方地区常需长期连作,但由此引发了严重的连作障碍。紫花苜蓿连作导致自毒物质(尤其是酚酸类)在土壤中累积,是制约其可持续生产的关键因素[4]。

自毒作用是化感作用的一种特殊形式,即植物释放代谢产物抑制自身或同种植物生长[5]。苜蓿连作下,其分泌的水溶性酚酸类物质(如香豆素)通过根系分泌、残体分解等途径在土壤中持续累积[6-8],远超轮作系统中微生物降解或稀释的速度,最终在根际达到毒害浓度,对后茬苜蓿产生直接负面影响[9]。这种自毒效应在田间表现为植株矮小、发黄、根系发育不良并伴有无效根瘤[8],经研究表明,自毒物质能够显著抑制苜蓿种子的萌发与幼苗的早期生长,导致发芽率、发芽势和活力指数降低,主根缩短、侧根发育受阻,根系形态异常[10-11]。为了明确苜蓿的关键自毒物质与自毒性的关系,有研究结果表明,总香豆素是导致自毒性的主要因素,香豆素含量越高,自毒物质含量越高,自毒作用也越强[10]。王俊等[12]的研究进一步揭示,长期连作(19 年)的苜蓿地会出现植株从外到内高度递减、生物量积累锐减的“生物漏斗”现象,此时施肥对地上部分生物量的提升已无显著效果,凸显了自毒作用的深远危害。由此可见,自毒物质的累积是一系列土壤问题的诱因。因此,开发绿色、可持续的生物降解技术,成为缓解苜蓿连作障碍的重要方向。

为缓解苜蓿连作障碍,国内外研究者探索了多种方法。目前最为普遍的方法是与禾本科(小麦 *Triticum aestivum*、玉米 *Zea mays*、燕麦 *Avena sativa* 等)作物轮作或间作[13-14]。阿芸[15]的研究表明,苜蓿－小麦轮作两年可有效降低土壤自毒物质含量,同时提高土壤有机质和碱解氮含量,改善土壤结构。李争艳等[16]在江淮地区的研究也证实,轮茬玉米和高粱(*Sorghum bicolor*)能显著提升苜蓿产量并改善根际土壤质量。然而,轮作和间作需要统筹规划土地与种植制度,在集约化、规模化的苜蓿生产基地应用时常受到限制。因此,探寻一种能够直接应用在连作系统中,且绿色可持续的矫正技术显得尤为重要。近年来,利用功能微生物降解土壤中累积的自毒物质,被视为一种极具潜力的新途径,其核心是从连作土壤中筛选出能将酚酸类物质作为唯一碳源或能源进行生长代谢的菌株,通过菌株的分解作用,将自毒因子从土壤中移除,从而实现“原位修复”[3,17]。目前,虽然利用生防菌或植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria,PGPR)来防治苜蓿病害、促进生长的研究已有较多报道,但专门针对其降解自毒物质功能的研究仍处于起步阶段,且多集中于实验室筛选与机理探索。

多项研究结果表明,苜蓿连作土壤中的香豆素含量相较于其他酚酸类化合物含量更高[4,8,10]。为评估菌株降解的广谱性,本研究还选取了与香豆素同结构(C_3～C_6型酚酸化合物[18])的咖啡酸及阿魏酸代表自毒物质进行研究验证。前期研究证明,连作不仅引发自毒物质积累,还会改变土壤微生物区系,具体表现为从病原真菌增殖、有益真菌衰减的细菌生态网络结构简化的多层次生态退化[19-20]。本研究选取苜蓿－燕麦轮作模式下的燕麦根际土作为分离菌株的材料,该模式已被多方证实能有效改善土壤微生态及苜蓿品质[21-22]。基于轮作可改善土壤微生态的认知,本研究假设在苜蓿－燕麦轮作土壤中存在可降解酚酸类自毒物质的微生物。为验证此假设,本研究利用燕麦根际土壤筛选具有降解酚酸类物质能力的优良菌株;通过种子萌发与幼苗胁迫试验明确关键自毒物质;进一步验证菌株的降解效能与回接效应,并采用高效液相色谱法定量评价其降解率,旨在为苜蓿连作障碍的生物修复提供理论依据与菌种资源。

1　材料与方法

1.1　试验材料及培养基

本试验于 2024 年 10 月至 2025 年 6 月在黑龙江省齐齐哈尔大学实验室及温室进行。供试自毒物质香豆素

(coumarin, C)、阿魏酸(ferulic acid, F)、咖啡酸(caffeic acid, CA)均为分析纯,供试作物为"龙牧"系列紫花苜蓿(*M. sativa* 'Longmu'),由黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院提供。分离菌株的根际土壤取自黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院齐齐哈尔市富拉尔基区试验基地(123°45′E, 47°15′N),年均气温3.37 ℃,年均降水量415.5 mm,无霜期130~140 d。

试验中所使用的培养基为无机盐培养基[$(NH_4)_2SO_4$ 2 g, NaH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.1 g (g·L^{-1})]及LB培养基[Luria-Bertani medium, NaCl 10 g,胰蛋白胨10 g,酵母提取物5 g (g·L^{-1})]。PBS缓冲液为NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g (g·L^{-1})。

1.2 *试验方法*

1.2.1 自毒物质(酚酸类)对苜蓿种子萌发的影响 将香豆素、阿魏酸和咖啡酸分别配制1 g·L^{-1}母液(溶于5 mL无水乙醇,蒸馏水定容至1 L),再稀释为0.5、5.0和50.0 mg·L^{-1} 3个浓度。在无菌培养皿(9 cm×9 cm)中铺置灭菌滤纸,每皿均匀摆放30粒经表面消毒(75%乙醇处理3 min,无菌水冲洗4次)的苜蓿种子,加入5 mL相应浓度酚酸溶液,每个处理3次重复。以含等量乙醇的蒸馏水为对照。于室温下培养7 d,每2 d补充对应溶液。分别于第3和第7天统计发芽势(germination potential, GP)[10]与发芽率(germination rate, GR)[10],并测定主根长度,观察记录萌发情况及根系形态(发芽即胚根长度达到种子长度的1/2)。

$$GR = \frac{\text{发芽种子数}}{\text{供试种子总数}} \times 100\%$$

$$GP = \frac{\text{第3天发芽种子数}}{\text{供试种子数}} \times 100\%$$

1.2.2 自毒物质(酚酸类)对苜蓿幼苗生长的影响 试验于2024年10月至2025年1月在温室内进行。分别配制0.1、0.5和1.0 g·L^{-1}的香豆素、咖啡酸和阿魏酸溶液。使用灭菌土壤种植苜蓿,每盆(直径9 cm,500 g土)播种5粒,待出苗后每盆定苗2株,并浇灌10 mL处理液,间隔4 d处理1次,共4次,对照组施用等量无菌水。每个处理5次重复(盆),处理期间每隔2 d进行1次浇水。末次处理后正常生长45 d,取样测定植株生物量、株高、根长等指标。

1.2.3 降解菌株的分离及分子鉴定 于2025年3月进行菌株分离。以苜蓿—燕麦轮作田的燕麦根际土壤为菌源,采用香豆素为唯一碳源的无机盐固体培养基(香豆素浓度1 g·L^{-1})进行降解菌株分离。取50 mL无菌PBS (PBS buffer)(pH≈7)缓冲液冲洗根际土,静置后取上清液1000倍稀释后涂布于筛选平板,28 ℃倒置培养3~7 d。挑取单菌落经多次划线纯化,纯培养后于4或−80 ℃贮藏。

选取初筛降解效果良好的菌株,培养发酵液(≥12 h)送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行16S rRNA基因测序。序列在NCBI数据库中进行BLAST比对,选取同源性高的参比序列,利用MEGA 12软件以邻接法(neighbor-joining, NJ法)构建系统发育树,进化距离使用Kimura 2-parameter模型进行计算,所有位点均被包含在内。通过进行1000次重复的Bootstrap分析来评估分支的置信度。在发育树中指定大肠杆菌(*Escherichia coli*) ON799228.1作为外群。

1.2.4 降解菌株生长曲线测定 试验于2025年3月进行。将菌株(供试菌株为DS-9、WS-6、WS-13、WS-42、WS-46及ZS-3)接种于LB液体培养基中,30 ℃、200 r·min^{-1}振荡培养24 h制备种子液,离心收集菌体,无菌水重悬调节至OD_{600}=1.0。将香豆素配制成50~500 mg·L^{-1}系列浓度作为唯一碳源制备无机盐液体培养基,每瓶接菌悬液300 μL(占总体系的2%),37 ℃、200 r·min^{-1}(培养条件为28~37 ℃,150~220 r·min^{-1})振荡培养,每36 h取样测定OD_{600},每个处理3次重复,设无菌水+香豆素培养基为对照,共监测144 h。

1.2.5 降解率的测定 试验于2025年7月进行。将菌株接种于50、100、200、300及500 mg·L^{-1}香豆素为唯一碳源的无机盐液体培养基中,生长旺盛期取培养液2~3 mL。取未经处理的样品送杭州研趣信息技术有限公司进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析,上机检测前,样品经甲醇稀释1000倍,色谱条件:HPLC液相色谱仪(岛津LC-40,日本);色谱柱:waters symmetry C8, 5 μm×250 mm×4.6 mm;流动相

$V_{甲醇}$∶$V_{纯水}$=7∶3；流速：1.0 mL·min^{-1}；柱温：40 ℃；检测波长：270 nm。设置与接种菌株同浓度的未接菌香豆素标品溶液为空白对照，每个浓度设置3次重复，并稀释为0、0.05、0.10、0.50、1.00 μg·mL^{-1}进行标准曲线测定。以标准品（纯度≥98%）为对照，根据峰面积计算接种菌株后的香豆素残留量。

$$降解率(\%)=\frac{C_0-C_x}{C_0}\times 100\%$$

式中：C_0：接种前培养基中香豆素的初始浓度；C_x：接种后待测物的剩余浓度。

1.2.6 降解菌株回接盆栽验证　试验于2025年4至6月在温室内进行。选取生长稳定的菌株制备OD_{600}=1.0的菌悬液。将灭菌连作土壤装盆（直径9 cm，每盆约500 g土），播种3～5粒种子，出苗后每盆定苗2株。建苗后以1 g·L^{-1}香豆素溶液胁迫处理（每盆10 mL），共3次，间隔4 d。胁迫处理3 d后接种菌悬液（每盆10 mL），共4次，间隔4 d，设无菌水为对照，共2个处理[CK（无菌水）、香豆素胁迫+DS-9]，每个处理均为5次重复（盆）。末次处理45 d后取样，测定植株生物量、株高和主根长等生长指标。

相对增长率=（处理组−CK组）/CK组×100%

式中：CK组为香豆素胁迫后无菌水处理；处理组为香豆素胁迫下接种菌株。首次香豆素胁迫处理前浇水，之后每隔2 d浇1次水。

1.3 数据分析

采用GraphPad Prism 8.0.2进行图表绘制，SPSS 26.0进行统计分析。试验数据以平均值±标准差（standard deviation，SD）表示。多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），若差异显著（$P<0.05$）时，则进行LSD多重比较检验。对香豆素降解率数据进行线性回归分析，生长曲线数据采用Logistic生长模型进行拟合。

2 结果与分析

2.1 3种自毒物质对苜蓿种子萌发的影响

3种自毒物质的不同浓度处理对苜蓿种子萌发的影响不同（表1），低浓度（0.5和5.0 mg·L^{-1}）的阿魏酸对发芽势和发芽率无显著影响，但50.0 mg·L^{-1}阿魏酸也未表现出显著（$P>0.05$）抑制作用。和对照相比，咖啡酸在各浓度下对主根长均无显著影响（$P>0.05$）。低浓度香豆素（0.5 mg·L^{-1}）对苜蓿种子的发芽率没有显著影响，但显著抑制了主根长（$P<0.05$）；5.0 mg·L^{-1}香豆素对种子发芽势和主根长有显著抑制作用，而高浓度（50.0 mg·L^{-1}）香豆素显著抑制种子的发芽率、发芽势和主根长（$P<0.05$），其中7 d之后发芽率较对照组下降了66.3%。

表1 不同自毒物质处理对苜蓿种子萌发和幼苗主根生长的影响

Table 1 Effects of different phenolic acid treatments on alfalfa seed germination and seedling root growth

处理 Treatment	浓度 Concentration (mg·L^{-1})	种子数 Seed quantity (No.·petri dish^{-1})	主根长 Main root length (mm)	发芽势 Germination potential	发芽率 Germination rate	
					5 d	7 d
CK	—	30	45.90±13.25a	0.77±0.06a	0.85±0.04a	0.86±0.04a
阿魏酸 Ferulic acid	0.5	30	38.84±7.03a	0.76±0.07a	0.81±0.07a	0.85±0.05a
阿魏酸 Ferulic acid	5.0	30	38.06±5.98a	0.82±0.13a	0.82±0.13a	0.85±0.10a
阿魏酸 Ferulic acid	50.0	30	31.91±7.84b	0.74±0.02a	0.78±0.04a	0.79±0.06a
咖啡酸 Caffeic acid	0.5	30	36.79±9.60a	0.81±0.02a	0.82±0.02a	0.82±0.02a
咖啡酸 Caffeic acid	5.0	30	36.03±10.51a	0.80±0.04a	0.83±0.07a	0.83±0.07a
咖啡酸 Caffeic acid	50.0	30	35.46±11.55a	0.75±0.09a	0.82±0.05a	0.82±0.05a
香豆素 Coumarin	0.5	30	34.28±4.49b	0.75±0.02a	0.83±0.03a	0.83±0.03a
香豆素 Coumarin	5.0	30	31.74±7.66b	0.43±0.06b	0.80±0.06a	0.81±0.07a
香豆素 Coumarin	50.0	30	4.93±1.93c	0.01±0.02b	0.20±0.14b	0.29±0.19b

注：同列不同字母表示处理间差异显著（$P<0.05$）。

Note：Different letters in the same column indicate significant differences among treatments（$P<0.05$）.

处理1周后观察发现,各自毒物质处理组幼苗主根较对照组(CK)更为弯曲,且根部上端出现不同程度膨大(图1)。香豆素处理对根系形态影响最为明显,在50 mg·L^{-1}浓度下,根部明显缩短膨大(图1A),根毛不可见(图2A),部分未萌发种子出现霉变。在5.0和0.5 mg·L^{-1}香豆素处理下,根上部膨大程度有所减轻。5.0和0.5 mg·L^{-1}咖啡酸处理苜蓿种子后根系变化并不明显,仅50 mg·L^{-1}处理后根毛变短(图2D)。而3种浓度阿魏酸对种子进行处理后根系长短无明显变化,50 mg·L^{-1}处理时根毛可见干瘪(图2G)。

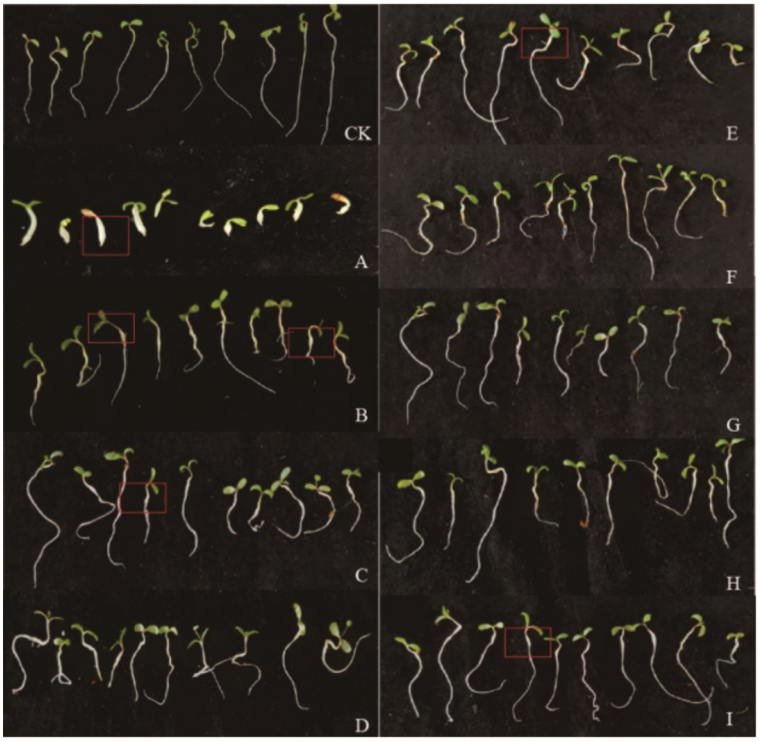

图1 3种自毒物质处理下苜蓿种子萌发和根系形态变化

Fig. 1 Changes in alfalfa seed germination and root morphology under treatment with three phenolic acids

CK为无菌水对照,A、B、C分别为50.0、5.0、0.5 mg·L^{-1}香豆素处理,D、E、F分别为50.0、5.0、0.5 mg·L^{-1}咖啡酸处理,G、H、I分别为50.0、5.0、0.5 mg·L^{-1}阿魏酸处理,下同。CK, sterile-water control; A, B and C were treated with coumarin at concentrations of 50.0, 5.0 and 0.5 mg·L^{-1}respectively; D, E and F were treated with caffeic acid at concentrations of 50.0, 5.0 and 0.5 mg·L^{-1}respectively; G, H and I were treated with ferulic acid at concentrations of 50.0, 5.0 and 0.5 mg·L^{-1}respectively, the same below.

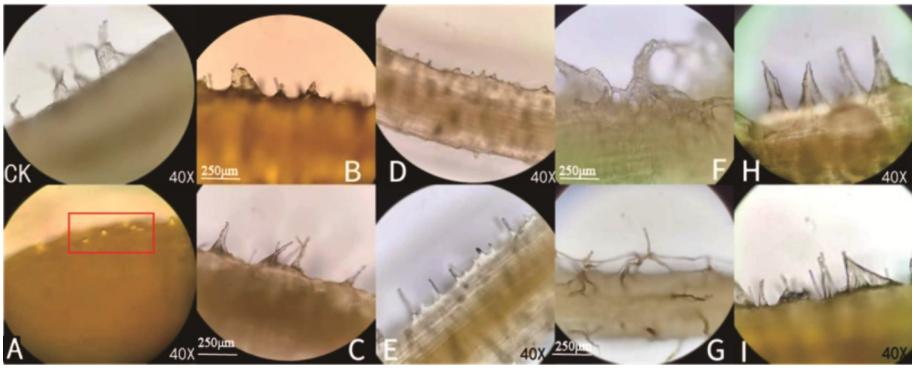

图2 3种自毒物质处理下苜蓿种子萌发后根毛形态变化

Fig. 2 Morphological changes of root hairs in alfalfa seeds after germination under three phenolic acid treatments

2.2 3种自毒物质对苜蓿幼苗生长的影响

部分自毒物质处理对苜蓿幼苗生长产生抑制作用,且抑制程度随浓度升高而增强。与对照组相比,自毒物质

处理后的幼苗生长缓慢，叶片较小，根系较短。阿魏酸仅在 1 g·L^{-1}时对苜蓿幼苗鲜重有抑制效果，而在 0.1 g·L^{-1}时可能促进幼苗生长，表现为苜蓿植株鲜重较对照组显著增加 88.88%（P<0.05），呈“低促高抑”现象（图 3）。咖啡酸在各浓度下均抑制幼苗生长，高浓度（1 g·L^{-1}）下抑制效果最显著（图 4），相较于对照组，主根长及鲜重分别降低了 39.98% 及 66.60%（P<0.05）。香豆素的 3 种浓度对主根长均有显著抑制效果，在 1 g·L^{-1}浓度下使幼苗全株鲜重、干重及主根长分别下降 62.50%、66.60% 及 53.21%（P<0.05，图 5），其余两种浓度的香豆素使主根长分别下降了 27.11%（0.1 g·L^{-1}）和 37.80%（0.5 g·L^{-1}）（P<0.05），从而导致了苜蓿全株长度的显著差异。

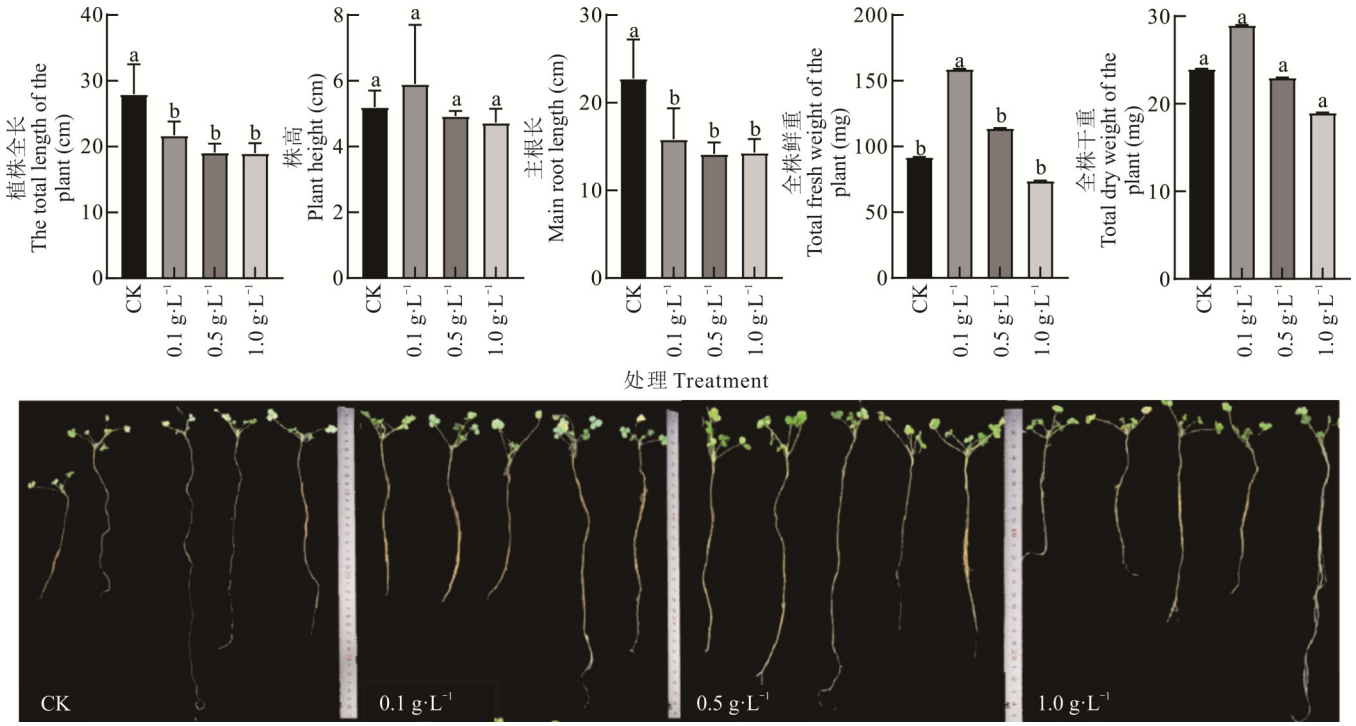

图 3　3 种浓度阿魏酸处理下苜蓿幼苗的生长状况

Fig. 3　Growth of alfalfa seedlings treated with different concentrations of ferulic acid

不同小写字母表示在 P<0.05 水平上不同处理间差异显著，下同 Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at the P< 0.05 level, the same below.

综上所述，在幼苗生长阶段，香豆素对苜蓿的抑制作用最强且广泛，显著影响了其生物量和主根长。咖啡酸在高浓度下也表现出显著的抑制作用，而阿魏酸则表现出低浓度促进、高浓度抑制的复杂情况。

2.3　降解菌株的分离

以香豆素作为唯一碳源从燕麦根际土分离出 98 株菌株。随后通过点接法再次验证，其中 36 株可在培养基上生长。菌株在香豆素无机盐培养基上大多数为中心透明状，外圈颜色加深（图 6）。

2.4　降解菌株生长曲线测定

为评估香豆素浓度对菌株 DS-9 生长的影响，将该菌株分别接种于含 50、100、200、300 及 500 mg·L^{-1}香豆素的无机盐液体培养基中，培养 144 h 后发现（图 7），在 50～300 mg·L^{-1}浓度，菌株均能正常生长，表现为典型的延迟期、对数生长期和稳定期。其中，当香豆素浓度为 300 mg·L^{-1}时，部分菌株的生长表现较为优良。当香豆素浓度升高至 500 mg·L^{-1}时，菌株的生长受到明显抑制，主要表现为延迟期显著延长（约 72 h），对数生长期起始时间推迟，表明高浓度底物对菌株初期生长产生了一定的胁迫效应。

在供试浓度范围内，香豆素浓度为 300 mg·L^{-1}时最有利于菌株 DS-9 的生长代谢，该浓度条件下菌体生物量积累最大，推测该浓度可能最适于诱导菌株降解系统的表达。

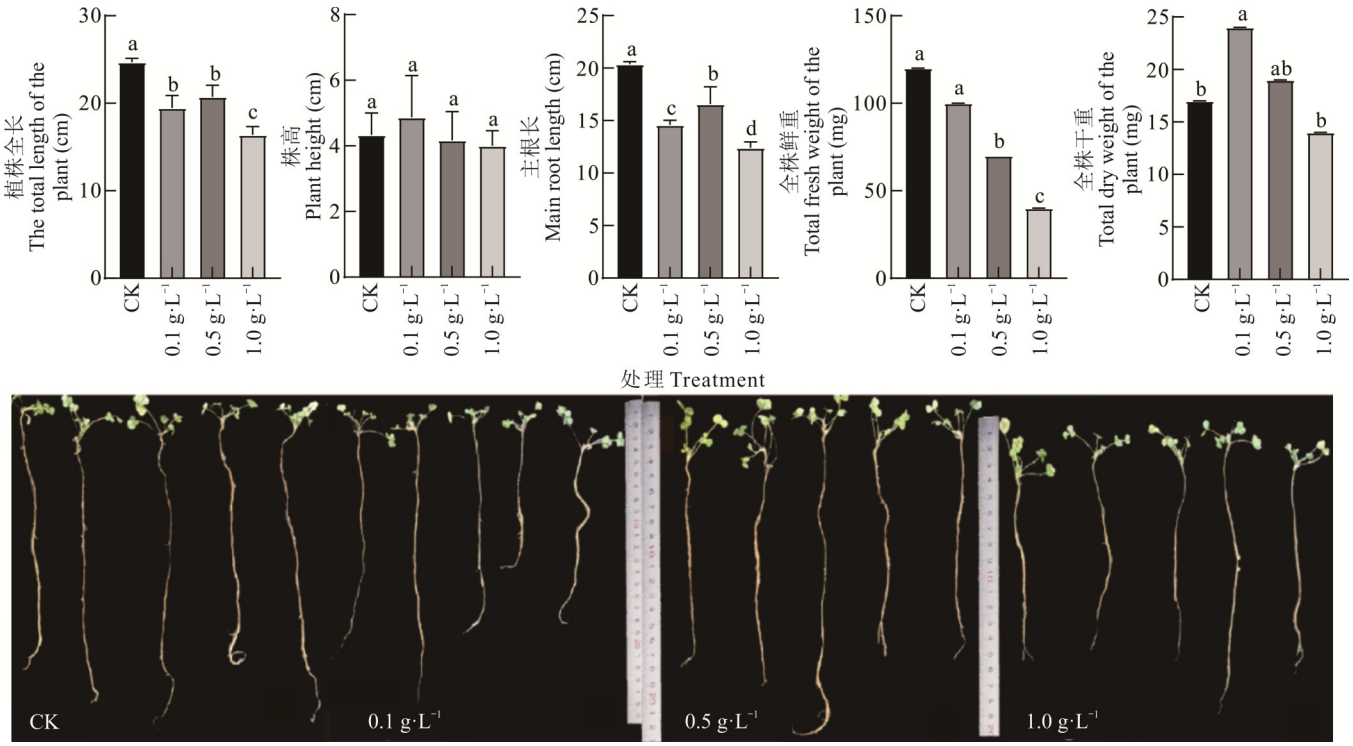

图4 3种浓度咖啡酸处理下苜蓿幼苗的生长状况

Fig. 4 Growth of alfalfa seedlings treated with different concentrations of caffeic acid

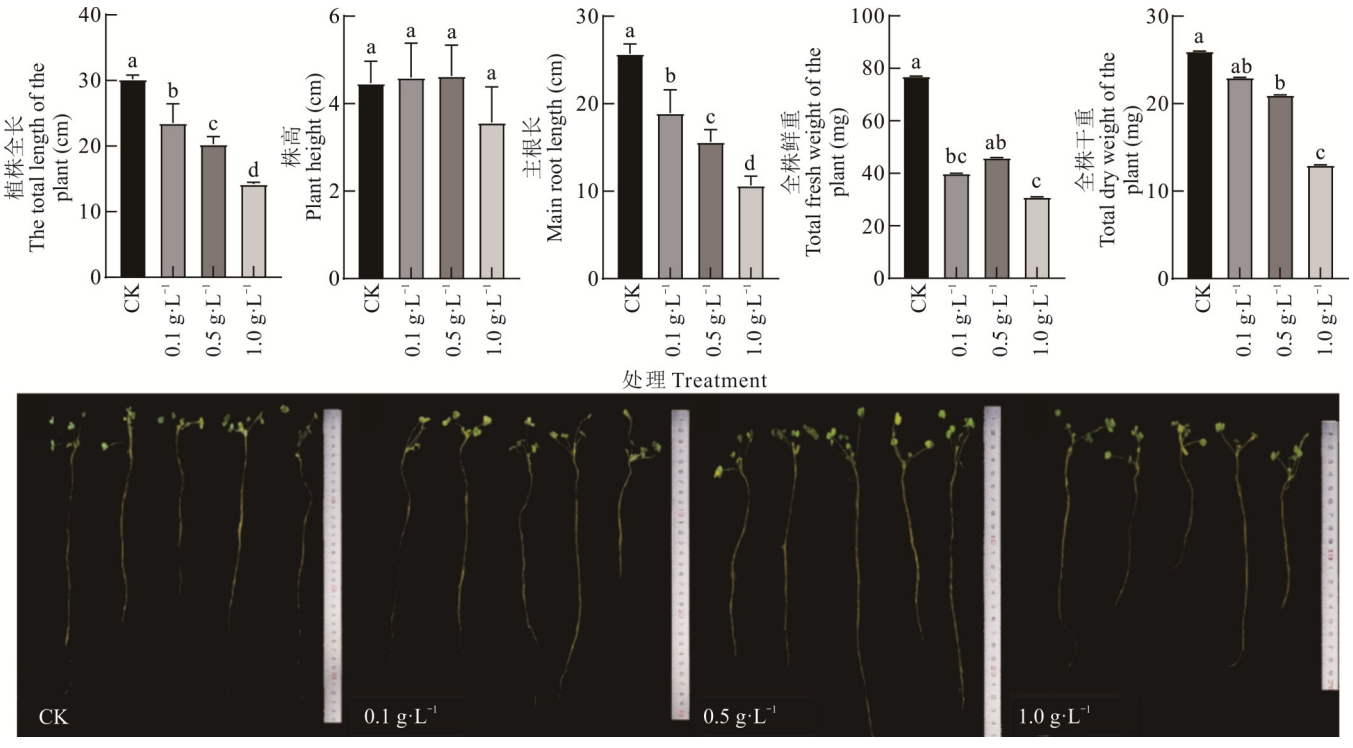

图5 3种浓度香豆素处理下苜蓿幼苗的生长状况

Fig. 5 Growth of alfalfa seedlings treated with different concentrations of coumarin

2.5 接种菌株后的香豆素含量

HPLC分析显示(图8),香豆素在0~1.0 μg·mL^{-1}内线性关系良好,标准曲线方程为y=57554.1x+3940.58,相关系数R^2=0.9995。经DS-9处理72 h后,300 mg·L^{-1}香豆素残留量为149 mg·L^{-1},降解率达

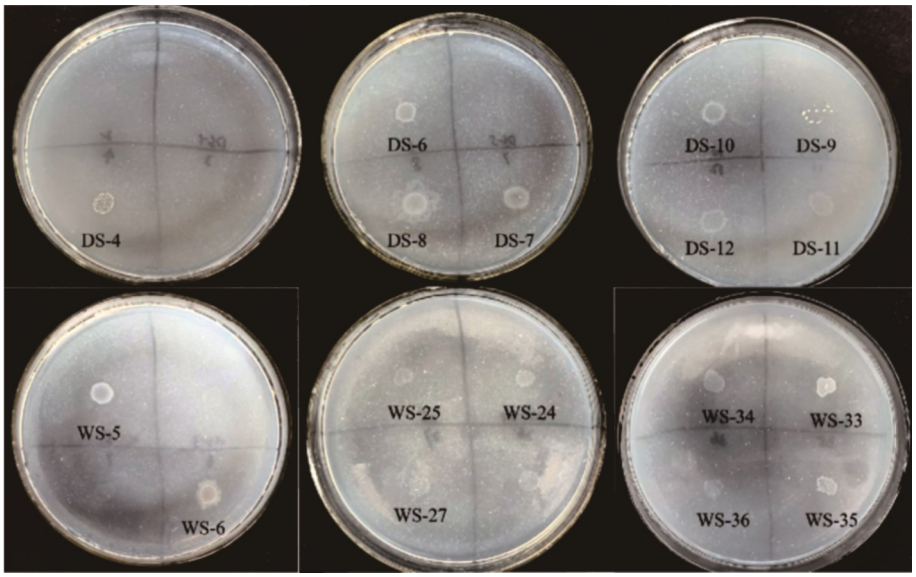

图 6　菌株在香豆素培养基上的生长特征

Fig. 6　Growth status of the strains in the coumarin medium

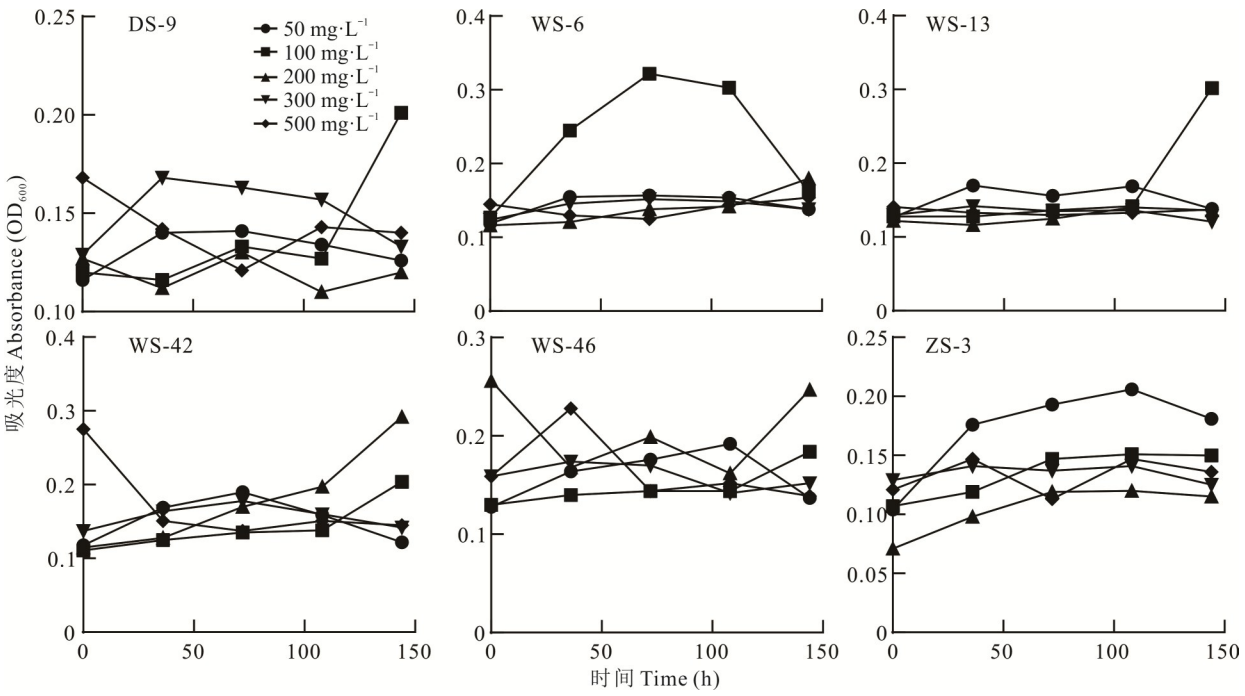

图 7　菌株在香豆素无机盐培养基中的生长状况

Fig. 7　Growth status of the strains in the coumarin inorganic salt medium

50.33%。不同初始浓度下的降解动力学分析表明,降解速率与初始浓度呈正相关(r=0.87,P<0.05)关系,说明在一定范围内提高底物浓度可促进降解效率。

2.6　香豆素胁迫下菌株的降解活性验证

盆栽回接试验结果表明,接种 DS-9 显著缓解了香豆素对苜蓿的胁迫效应(图 9)。与香豆素胁迫未接种组(CK)相比,接种菌株使苜蓿全株的鲜重和干重显著增加了 126.47% 和 69.56%(P<0.05)。菌株回接对苜蓿全长、株高及主根长也产生了一定程度的促进作用,分别增加了 15.5%、6.7% 及 16.4%(P>0.05),根粗无明显变化,但也能说明接种 DS-9 后一定程度上缓解了香豆素胁迫对苜蓿幼苗的影响,削减了香豆素的抑制作用。

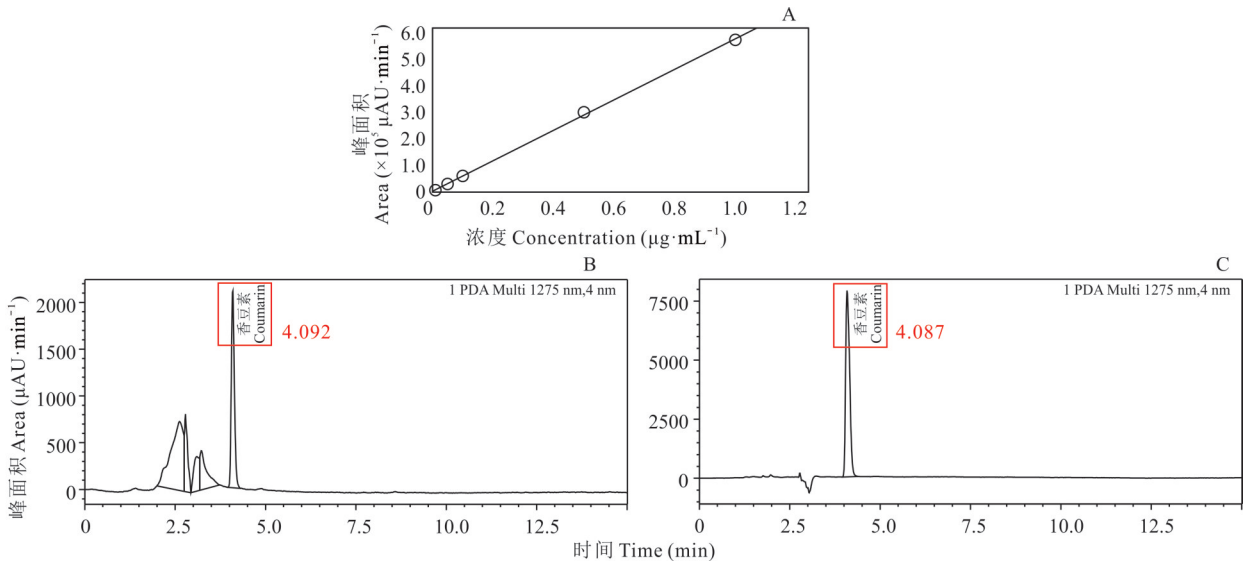

图8 300 mg·L⁻¹香豆素高效液相色谱图

Fig. 8 High-performance liquid chromatogram of 300 mg·L⁻¹ coumarin

A: 300 mg·L⁻¹香豆素标准曲线 Standard curve of 300 mg·L⁻¹ coumarin; B: 接种DS-9 72 h后定量检测色谱图 Quantitative detection chromatogram after DS-9 inoculation; C: 300 mg·L⁻¹香豆素标品色谱图 Chromatogram of coumarin standard substance at 300 mg·L⁻¹.

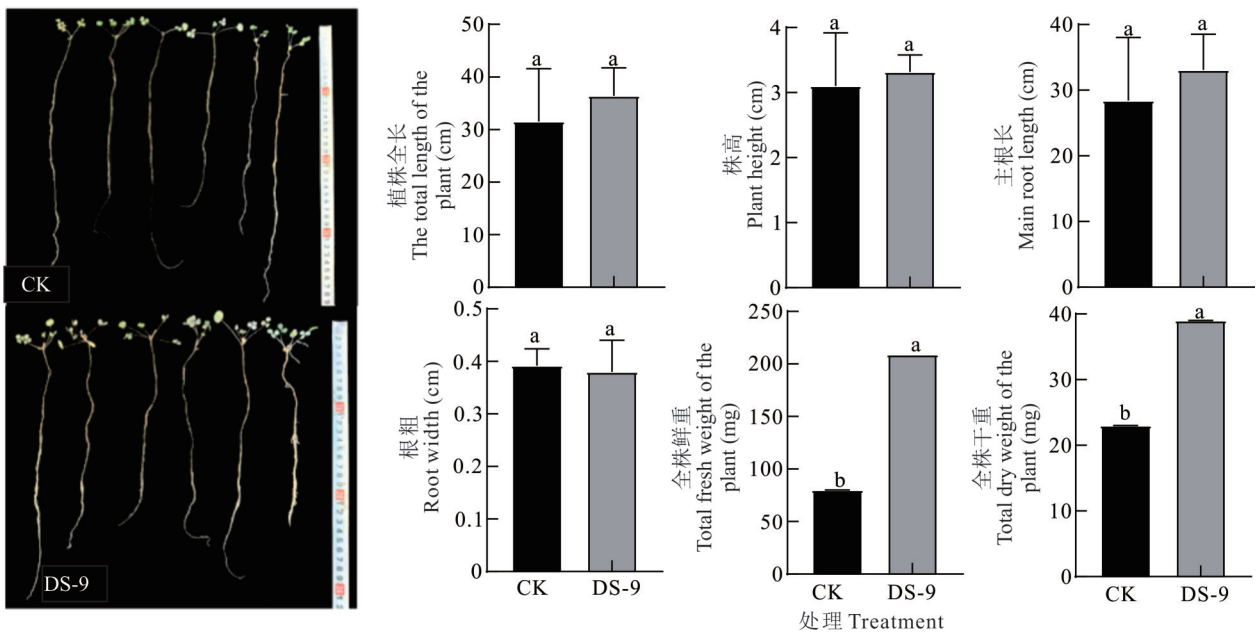

图9 接种蜡样芽孢杆菌DS-9后苜蓿在香豆素胁迫下的生长状况

Fig. 9 Growth of alfalfa after *Bacillus cereus* DS-9 inoculation under coumarin stress

2.7 菌株分子鉴定

基于16S rRNA基因序列(约1500 bp)构建的系统发育树显示(图10),本研究中分离出菌株DS-9被鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*),与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)同源性为99.6%,自举支持率为92%且处于同一分支。菌落形态也几乎相似,均呈乳白色(典型如白蜡),单菌落呈表面粗糙、不透明、规则圆形,多菌落呈粗大且链状排列。

3 讨论

有研究表明,土壤中自毒物质的累积是引发苜蓿连作障碍的关键因素之一[23],多项研究一致表明,香豆素在

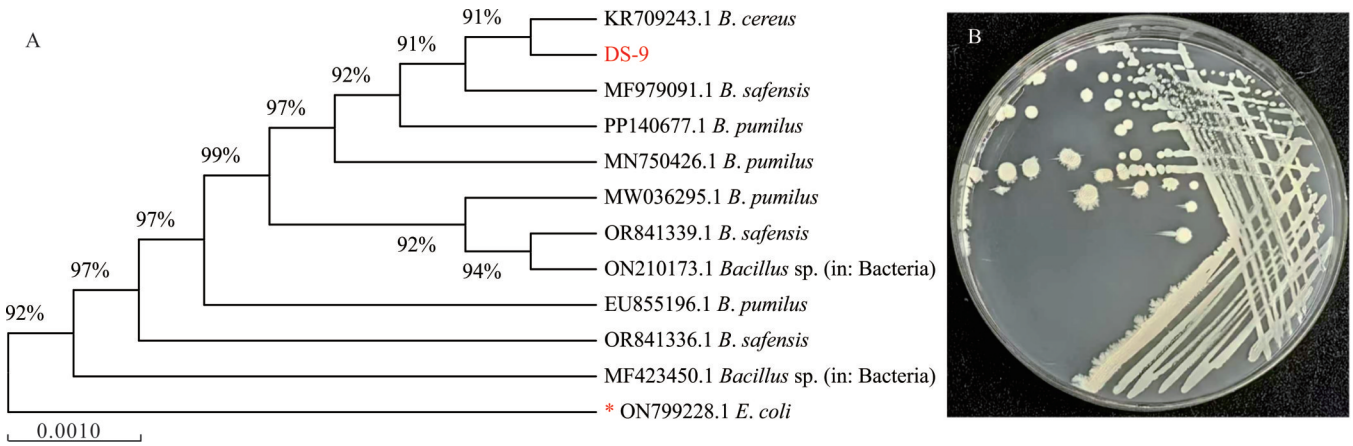

图 10　DS-9(蜡样芽孢杆菌)的系统发育树及菌落形态

Fig. 10　The phylogenetic tree and morphology of DS-9 (*B. cereus*)

系统发育树基于 16S rRNA 基因序列,采用 MEGA 软件邻近法(NJ 法)构建,利用进化模型(GTR+G+I)分析,进行 1000 次重复的 Bootstrap 分析来评估分支的置信度,比例尺代表每个位点估计的替换数为 0.001,以大肠杆菌(ON799228.1)作为外群,红色*号标出。使用 DNAMAN 比对 DS-9(蜡样芽孢杆菌)与 KR709243.1 *B. cereus* 的同源性。The phylogenetic tree was constructed based on the 16S rRNA gene sequence using the MEGA software proximity method (NJ method), analyzed using the evolutionary model (GTR+G+I), and a 1000-repetition Bootstrap analysis was conducted to evaluate the confidence level of the branches. The scale represents that the estimated replacement number for each point is 0.001. *E. coli* (ON799228.1) is used as the exgroup, marked with a red asterisk. The homology of DS-9 (*B. cereus*) and KR709243.1 *B. cereus* was compared using DNAMAN.

根际土壤中的累积浓度显著高于其他酚酸类物质[24−25]。该物质浓度达到一定阈值对苜蓿种子萌发与幼苗生长表现出强烈抑制作用,种子发芽率可降至对照组的 1/2 乃至更低,而对幼苗表现出典型的“低促高抑”效应[10]:Chung 等[6]研究发现香豆素对根长的半抑制浓度(EC_{50})低至 45.2 mg·L^{-1};而 Zhang 等[11]进一步揭示,在敏感品种‘3105C’中,香豆素胁迫可导致发芽指数与活力指数的抑制率超过 80%,并伴随严重的氧化损伤。总体而言,香豆素在连作土壤中的持续积累,最终可导致苜蓿幼苗根长与生物量的抑制率普遍超过 50%,构成了其连作障碍的核心化学因子。本研究结果与上述发现高度一致,也发现了香豆素对苜蓿种子萌发及幼苗生长具有显著抑制作用(表 1 和图 1~5),50 mg·L^{-1}香豆素处理下苜蓿种子发芽率仅为 29%,1 g·L^{-1}浓度时幼苗鲜重与干重分别下降 62.5% 与 66.6%。因此,香豆素在苜蓿连作障碍形成中扮演重要角色,是生物修复技术中需重点消减的目标物质。

利用微生物降解自毒物质被视为一种绿色、可持续的消减途径,可将毒性物质转化为低毒或无毒产物,且不易引发二次污染[26]。Tang 等[27]与 Zhang 等[28]的研究均证明了特定菌株对香草酸及其他多种酚酸近乎完全的快速降解能力,并能有效缓解自毒胁迫和促进作物生长。更重要的是,该策略的作用远不止于简单的“消减”,而是能通过微生物互作产生协同效应:如 Liu 等[29]分离的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)在降解酚酸的同时,还促进了根际有益微生物的富集;Wang 等[30]则发现,将具有生防功能的菌株与降解菌株联合接种,可通过“降解自毒物质”与“抑制病原菌”的双重途径,实现对作物健康的协同增效。蜡样芽孢杆菌早期因与人类食源性疾病相关而受到关注,但近年研究发现其在农业生态中具有多重有益功能。该菌可产生抗菌物质,抑制植物病原微生物[31−33],并能降解多种环境污染物,如氨氮[34]、TNT(三硝基甲苯)[35]和邻苯二甲酸酯[36]等,甚至对杀虫剂也具有降解能力[37]。

本研究从燕麦根际土壤中筛选出蜡样芽孢杆菌 DS-9,该菌株能够以香豆素为唯一碳源生长,在 300 mg·L^{-1}浓度下 72 h 降解率达 50.33%(图 8),表现出良好的降解效果。芽孢杆菌属微生物普遍具有丰富的酶系统,可能通过多种方式,如羟基化、开环或侧链修饰等,将香豆素转化为低毒或易于代谢的产物。DS-9 在较高浓度底物下生长速率提升(图 7A),可能提示该菌株存在某种降解系统,能在高浓度底物下被激活而加速香豆素的转化。未来可通过代谢组学分析来阐明 DS-9 降解香豆素的关键通路。在缓解香豆素对苜蓿的胁迫方面,DS-9 不仅通过直接降解降低根际香豆素浓度,还可能通过多种间接机制促进苜蓿生长。接种 DS-9 使苜蓿幼苗鲜重和干重分别

提高了126.47%和69.56%(图9),且主根长、株高等指标均得到改善。这一促生效应可能由以下因素导致:第一,菌株降解香豆素后减轻了土壤毒性,改善了根系生长环境;第二,DS-9作为根际促生菌(PGPR),可能产生IAA(indole-3-acetic acid)、铁载体或ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate)脱氨酶等物质,直接促进了苜蓿生长并增强抗逆性;第三,菌株定殖根际后,可能通过竞争或拮抗作用抑制土壤中病原微生物的增殖,间接改善根际微生态。

尽管DS-9展现出良好的应用潜力,其对香豆素的降解效率仍有提升空间。单一菌株在复杂土壤环境中可能存在功能局限,未来研究可考虑将其与其他功能菌株构建复合菌系,通过协同作用实现更高效的降解与促生效果。此外,结合基因组学、转录组学与代谢组学等手段,深入解析DS-9降解香豆素的代谢途径与分子机制,将为该菌株的田间应用与连作障碍生态调控提供理论依据。

4 结论

本研究分离出一株对香豆素具有降解效果的蜡样芽孢杆菌DS-9。菌株回接盆栽验证及高效液相色谱检测结果表明,菌株DS-9对香豆素具有降解作用,同时也增加了苜蓿的生物量。综上,蜡样芽孢杆菌DS-9为缓解苜蓿连作障碍提供了新的微生物资源,同时在指导利用微生物降解方面具有重要意义。

参考文献 References:

[1] Sun Q Z, Liu Q, Tao Y, *et al*. Research on alfalfa planting in Han, Wei, Jin, Southern and Northern Dynasties. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(11): 185-195.
孙启忠, 柳茜, 陶雅, 等. 两汉魏晋南北朝时期苜蓿种植利用刍考. 草业学报, 2017, 26(11): 185-195.

[2] Yuan Q H. Advances in alfalfa diseases in China. Plant Protection, 2007, 33(1): 6-10.
袁庆华. 我国苜蓿病害研究进展. 植物保护, 2007, 33(1): 6-10.

[3] Wang X J, Zhang S Z, Lin S S, *et al*. Advances in study on bio-energy utilization of stem cell wall components in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(8): 1694-1705.
王晓娟, 张树振, 林双双, 等. 紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)生物能源利用的研究进展. 中国农业科学, 2013, 46(8): 1694-1705.

[4] Zheng R, Shi S L, Ma S C. Effect of autotoxicity and allelopathy on alfalfa and wheat. Pratacultural Science, 2019, 36(3): 849-860.
郑瑞, 师尚礼, 马史琛. 苜蓿、小麦自毒及他感作用机理. 草业科学, 2019, 36(3): 849-860.

[5] Zhang Z J, Liu Y J, Yuan L, *et al*. Effect of allelopathy on plant performance: A Meta-analysis. Ecology Letters, 2021, 24(2): 348-362.

[6] Chung I M, Miller D A. Allelopathic influence of nine forage grass extracts on germination and seedling growth of alfalfa. Agronomy Journal, 1995, 87(4): 767-772.

[7] Wang J J, Liu L P, Guo P F. Thinking and forestry meaning on the allelopathy. Journal of Gansu Forestry Science and Technology, 2014, 39(3): 11-17.
王俊杰, 刘丽萍, 郭鹏飞. 他感作用及其林学意义与思考. 甘肃林业科技, 2014, 39(3): 11-17.

[8] Wang X, Shen Y Y, Gao C Y, *et al*. Autotoxicity effects of aqueous extracts of different aged alfalfa on seeds germination. Acta Agrestia Sinica, 2008, 16(6): 609-612.
王希, 沈禹颖, 高崇岳, 等. 异龄苜蓿水浸液对其种子萌发的自毒效应. 草地学报, 2008, 16(6): 609-612.

[9] Panda S, Kazachkova Y, Aharoni A. Catch-22 in specialized metabolism: Balancing defense and growth. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(17): 6027-6041.

[10] Wu B, Shi S S, Zhang H H, *et al*. Study on the key autotoxic substances of alfalfa and their effects. Plants, 2023, 12(18): 3263.

[11] Zhang X Y, Shi S L, Li X L, *et al*. Effects of autotoxicity on alfalfa (*Medicago sativa*): Seed germination, oxidative damage and lipid peroxidation of seedlings. Agronomy, 2021, 11(6): 1027.

[12] Wang J, Liu W Z, Zhong L P, *et al*. Spatial variability of soil moisture and aboveground biomass of alfalfa under long term alfalfa continuous planting//Youth Work Committee of the Chinese Ecological Society. Proceedings of the Fifth Academic Symposium of Young Ecologists in China. Beijing: Science Press, 2008: 470-475.

王俊，刘文兆，钟良平，等．长期苜蓿连作草地地上部分生物量与土壤水分的空间差异性//中国生态学会青年工作委员会．第五届中国青年生态学工作者学术研讨会论文集．北京：科学出版社，2008：470－475.

[13] Yin G L，Cai Z S，Tao R，*et al*. Effects of different crop rotations on soil nutrient，microorganism abundance and soil allelochemical levels in alfalfa. Acta Prataculturae Sinica，2019，28(3)：42－50.
尹国丽，蔡卓山，陶茸，等．不同草田轮作方式对土壤肥力、微生物数量及自毒物质含量的影响．草业学报，2019，28(3)：42－50.

[14] Fan Y W，Xin X L，Zhong X Y，*et al*. Effects of intercropping of maize and legume cover crops on enzyme activities and fungal community characteristics in fluvo-aquic soil. Acta Pedologica Sinica，2021，58(6)：1236－1243.
范祎玮，信秀丽，钟新月，等．玉米豆科覆盖作物间作对潮土酶活性和真菌群落特征的影响．土壤学报，2021，58(6)：1236－1243.

[15] Ayun. Characteristics of alfalfa and *Poa pratensis* rotation sequences on aboveground dry biomass，forage quality and soil nitrogen. Lanzhou：Gansu Agricultural University，2019.
阿芸．紫花苜蓿与草地早熟禾轮作序列的地上干物质量、饲用品质及土壤氮素特征．兰州：甘肃农业大学，2019.

[16] Li Z Y，Xu Z M，Shi S L，*et al*. Effects of different crop rotations on alfalfa yield and soil quality in the Jianghuai area. Acta Prataculturae Sinica，2019，28(8)：28－39.
李争艳，徐智明，师尚礼，等．江淮地区不同轮茬作物对苜蓿产量及根际土壤质量的影响．草业学报，2019，28(8)：28－39.

[17] Wu H J，Yang G F，Sun J，*et al*. The responses of soil structures and nutrients under different alfalfa-planting patterns. Acta Agriculturae Boreali-Sinica，2015，30(5)：189－196.
武海杰，杨国锋，孙娟，等．苜蓿不同种植模式下土壤结构及养分的响应．华北农学报，2015，30(5)：189－196.

[18] Taiz L，Zeiger E，Møller I M，*et al*. Secondary metabolism and plant defense//Murphy A. Plant physiology and development (6th ed). Sunderland：Sinauer Associates，2018：229－234.

[19] Xu Y X，Liu J J，Liu X F，*et al*. Continuous cropping of alfalfa (*Medicago sativa* L.) reduces bacterial network complexity but increases stability in the black soil region of northeast China. Soil Ecology Letters，2021，3(4)：1－13.

[20] Yao Q，Xu Y X，Liu X F，*et al*. Dynamics of soil properties and fungal community structure in continuous-cropped alfalfa fields in Northeast China. PeerJ，2019，7：e7127.

[21] Xu Y X，Liu Z X，Shen Z B，*et al*. Alfalfa with forage crop rotation alleviates continuous alfalfa obstacles through regulating soil enzymes and bacterial community structures. Agronomy，2024，14(7)：1349.

[22] Li C，Shi L，Wang K C，*et al*. Crop rotation differentially increases soil bacterial and fungal diversities in global croplands：A Meta-analysis. Nature Communications，2025，16：11686.

[23] Rong S C，Shi S L，Sun C C. Determination of coumarins and major phenolic acids in plant and rhizosphere soil of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Soils，2016，48(5)：931－938.
荣思川，师尚礼，孙灿灿．苜蓿植株及根际土壤中主要酚酸和香豆素物质含量测定．土壤，2016，48(5)：931－938.

[24] Abdul R A，Habib S A. Allelopathic effect of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on blady grass (*Imperata cylindrica*). Journal of Chemical Ecology，1989，16(7)：2289－2300.

[25] Wyman-Simpson C L，Waller G R，Jurzysta M，*et al*. Biological activity and chemical isolation of root saponins of six cultivars of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant and Soil，1991，135(1)：83－94.

[26] Tang L Z，Zhong S M，Chen D Y，*et al*. Research progress in plant autotoxicity and biodegradation. Acta Agriculturae Jiangxi，2025，37(6)：46－54，121.
唐龙珠，钟淑敏，陈德远，等．植物自毒作用及生物降解研究进展．江西农业学报，2025，37(6)：46－54，121.

[27] Tang S，Zhang Z，Liu X，*et al*. Study on screening and degradation effect of autotoxin-degrading bacteria in muskmelon. Agronomy，2023，13(5)：1334.

[28] Zhang C Y，Liu S P，Guo Q Y，*et al*. *Sphingobium* sp. V4，a bacterium degrading multiple allelochemical phenolic acids. Annals of Microbiology，2024，74(1)：5.

[29] Liu D L，Ge X，Pan D D，*et al*. *Bacillus subtilis* B55 degraded the ferulic acid and p-coumaric acid and changed the soil bacterial community in soils. Journal of Applied Microbiology，2024，135(9)：243.

[30] Wang H W，Cai X Y，Xu M，*et al*. Enhanced biocontrol of cucumber *Fusarium wilt* by combined application of new antagonistic bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B2 and phenolic acid-degrading fungus *Pleurotus ostreatus* P5. Frontiers in Microbiology，2021，12：713－725.

[31] Ma W F. A novel strain of *Bacillus cereus* with a strong antagonistic effect specific to *Sclerotinia* and its genomic and transcriptomic analysis. Haikou: Hainan University, 2024.
马万福. 一株对核盘菌具有强拮抗作用的蜡样芽孢杆菌及其基因组学和转录组学分析. 海口: 海南大学, 2024.

[32] Dai Y, Peng J J, Zhang T Y, *et al*. Optimization of fermentation conditions and inhibition effect of a strain of *Bacillus cereus* producing inhibitory substances. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2024, 52(6): 6-9.
戴悦, 彭金菊, 张腾月, 等. 一株蜡样芽孢杆菌产抑菌物质发酵条件优化及抑菌效果研究. 安徽农业科学, 2024, 52(6): 6-9.

[33] Qin G H, Yuan H B, Wang Z N, *et al*. Antagonistic activity of volatile organic compounds of *Bacillus cereus* strain G3-17 against apple ring rot. Acta Horticulturae Sinica, 2024, 51(6): 1403-1412.
覃艮红, 袁洪波, 王卓妮, 等. 蜡样芽孢杆菌挥发物对苹果轮纹病菌的拮抗活性. 园艺学报, 2024, 51(6): 1403-1412.

[34] Liu R H, Zhang L, Guo S H, *et al*. Screening of *Bacillus cereus* for efficient degradation of ammonia nitrogen and experimental evaluation of ammonia nitrogen degradation effect in sewage. Tianjin Agricultural Sciences, 2025, 31(3): 79-85.
刘荣徽, 张琳, 郭圣辉, 等. 氨氮高效降解蜡样芽孢杆菌的筛选与污水中氨氮降解效果试验评估. 天津农业科学, 2025, 31(3): 79-85.

[35] Yin M L, Lai J L, Yang X, *et al*. Analysis of TNT degradation and tolerance mechanism of *Bacillus cereus* strain T4. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(5): 309-320.
尹茂灵, 赖金龙, 杨旭, 等. 蜡样芽孢杆菌T4对TNT的降解及耐受机制. 生态毒理学报, 2024, 19(5): 309-320.

[36] Liu S J, Hu X M, Zhang C P, *et al*. Study on the degradation characteristics of DEHP by *Bacillus cereu*. Yunnan Chemical Technology, 2024, 51(7): 70-75.
刘淑娟, 胡雪敏, 张翠萍, 等. 蜡样芽孢杆菌对邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯的降解特性研究. 云南化工, 2024, 51(7): 70-75.

[37] Xiang X Z, Xie Y, Tian D, *et al*. Microbial degradation mechanism and pathway of the insecticide thiamethoxam by isolated *Bacillus cereus* from activated sludge. Environmental Research, 2024, 246: 117929.