



# 香豆素对苜蓿生长的自毒效应分析及其降解菌筛选与鉴定

赵廷伟, 季彬, 彭轶楠, 宋婕, 叶泽, 杨建军, 王治业

(甘肃省微生物资源开发利用重点实验室, 甘肃省科学院 生物研究所, 兰州 730030)

**摘要** 为缓解由于香豆素等自毒物质所引起的苜蓿连作障碍问题,通过高效液相色谱(HPLC)法对异龄苜蓿植株及根际土壤中香豆素含量进行检测和对其自毒效应进行验证分析;同时以香豆素作为唯一碳源对苜蓿根际土壤中香豆素降解菌株进行分离、筛选和16S rDNA基因序列鉴定。利用不同选择性培养基对所筛菌株的相关特性进一步研究分析。结果显示,随着生长年限的增加,苜蓿植株及根际土壤中香豆素浓度呈显著上升趋势,最高分别可达227.31  $\mu\text{g/g}$ 和3.21  $\mu\text{g/g}$ 。且当香豆素浓度在0~500  $\mu\text{g/mL}$ 不断升高时,会严重抑制其发芽势和胚根、胚芽的生长。当其浓度达到1  $\mu\text{g/mL}$ 时,胚根、胚芽伸长长度分别减少36.49%和7.91%;浓度超过10  $\mu\text{g/mL}$ 时,种子发芽势降低为0,均达到显著水平。通过筛选获得1株高效香豆素降解菌株,经鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),其最大降解率接近100%。功能性分析表明,该菌株同时具备溶磷、解钾、固氮及分泌ACC脱氢酶的能力。通过此研究发现苜蓿连作会导致土壤中香豆素含量不断积累,并严重影响苜蓿种子的发芽和幼苗的生长。恶臭假单胞杆菌具有较强的香豆素降解能力和环境适应能力,这为后期微生物防治自毒物质提供了菌种资源和理论基础。

**关键词** 苜蓿;自毒作用;香豆素;降解菌;恶臭假单胞杆菌

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)为多年生牧草,是优质豆科饲料作物,营养价值高,含有丰富的蛋白质、氨基酸及微量元素,色素多样化,各种畜禽均喜食,被称为牧草之王。近年来,随着畜牧养殖业不断发展,苜蓿商品草需求量逐年大幅度上升,导致苜蓿连作年限增加,土传病害的发生、营养物质的亏损、自毒现象发生等一系列问题出现,最终形成苜蓿连作障碍。

其中土壤的传染性病害、土壤理化性状劣变等可以通过合理施用农药和化肥等措施基本上得到消除,而自毒作用是生物间的生化互作,很难通过农艺措施消除,只会伴随长年连作愈积愈多<sup>[1]</sup>。目前已有大量研究表明,包括苜蓿在内的多种农作物长期连作都会导致作物根系和残茬腐解释放酚酸物质,使土壤中香豆素、阿魏酸、对羟基苯甲酸等自毒类物质浓度升高,引起作物自毒作用<sup>[2]</sup>。其中香豆素(Coumarin,学名1,2-苯并吡喃酮)能够严重影响作物的细胞膜结构与功能、植物激素平衡、细胞分裂与伸长等生理活动,造成作物种子萌发率低、根系发育不良、产量下降等负面作用,

对作物生长造成严重的毒害作用<sup>[3]</sup>。此外还有大量研究发现酚酸类化感物质(包括香豆素)还会影响微生物群落组成和活性,进而间接影响土壤中N、P、K等矿质营养元素的释放速率,影响作物对矿质营养元素的吸收利用<sup>[4]</sup>。综上所述,如何有效降解土壤中的自毒物质是解决苜蓿连作障碍的关键问题之一,是保障全国饲草产业可持续发展的一个重要课题。目前,在众多消减的方法中,生物防治法因具有易实施、安全性高、对环境不会造成二次污染等优点成为自毒物质防治的研究热点之一。

当前,在自毒物质生物防治的研究进展中,对微生物资源的开发和利用还十分有限,尤其在苜蓿自毒物质降解微生物方面的研究报道相对更加缺乏。因此,本研究以异龄紫花苜蓿根际土壤为研究材料,对香豆素积累情况和自毒效应进行研究,并从其根际土壤中进行香豆素降解菌种的分离筛选鉴定、生理生化分析和相关特性分析,为生物防治自毒效应及保障苜蓿高产量和高质量种植提供微生物资源和研究基础。

收稿日期:2025-03-24 修回日期:2025-05-13

基金项目:甘肃省科学院青年科技创新基金(2023QN-01)。

第一作者:赵廷伟,男,硕士研究生,研究方向为微生物资源利用及植物保护。E-mail:1373949979@qq.com

通信作者:王治业,男,研究员,研究方向为微生物资源开发利用。E-mail:zhiye\_wang@sina.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 样品与试剂 供试土壤取自于甘肃省张掖市华瑞农业股份有限公司紫花苜蓿基地(100°22'~101°13'E, 37°56'~38°48'N), 土壤类型均为沙壤土。分别从生长年龄为 1 a、2 a、3 a、4 a 的苜蓿地中随机挑选长势相同的苜蓿各 10 株, 用蒸馏水将上面的泥土清洗干净后冷冻干燥并粉碎, 4 °C 储存, 备用。采集其 5~30 cm 根际土壤, 混合均匀后挑除根系及碎石后分成两份带回实验室, 于 4 °C 冰箱保存, 一份用作降解菌分离, 一份冷冻干燥后用作香豆素自毒效应研究。

供试紫花苜蓿由华瑞农业股份有限公司提供。

供试试剂: 香豆素(索莱宝科技有限公司), SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物), Taq Plus DNA 聚合酶(BBI), 革兰氏染色剂(南京建成科技有限公司)。试验所用的无机盐(MSM)培养基、硅酸盐培养基、阿须贝培养基、有机磷和无机磷培养基、DF 和 ADF 培养基、微量元素溶液均购买自山东拓普生物工程有限公司; 牛肉膏、蛋白胨等其他所有化学药品均为分析纯, 均购买自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备 高速微量离心机(生工生物), PCR 反应扩增仪(BBI), 电泳仪(北京六一), HP400G-C 培养箱(武汉瑞华仪器设备有限公司), UV-2450 紫外可见光分光光度计(Shimadzu, 日本), Agilent HPLC 1260 液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司), JPS-008A 超声仪(深圳市洁泰超声洗净设备有限公司), 离心仪(常州天瑞仪器有限公司), 吹干仪(北京线上生物科技有限公司)。

### 1.2 方 法

1.2.1 香豆素对苜蓿生长的自毒效应研究 不同年限苜蓿植株及根际土壤中香豆素含量测定: 采用高效液相色谱(HPLC)法分别测定 1 a、2 a、3 a、4 a 生紫花苜蓿植株及根际土壤中香豆素含量。

外源添加香豆素对苜蓿种子的影响: 采用培养皿纸上发芽法, 将香豆素标准药品分别配置成浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液, 以蒸馏水作对照(CK), 外源添加处理紫花苜蓿种子, 于

第 3 天测定发芽势, 第 7 天测定其发芽率和幼苗胚根、胚芽长度, 计算各指标的化感指数(RI), 测定方法参照文献[5]。

1.2.2 降解菌的筛选 参照 Huang 等<sup>[6]</sup>的方法, 并稍作修改。本试验采用以香豆素为唯一碳源法进行降解菌的初筛。取 10 g 新鲜土样于 100 mL 无菌水中, 振荡 1 h, 静置取上清液 5 mL 加入盛有 45 mL MSM 的液体培养基中传代培养 3 次以上, 取培养后浑浊菌液 1 mL, 用 0.85% NaCl 溶液稀释  $10^5 \sim 10^6$  倍, 将其涂布至以香豆素为唯一碳源的 MSM 固体培养基上, 37 °C、150 r/min 摇床培养 72 h, 待菌落长出后, 挑取单菌落在新的 MSM 固体培养基上反复划线法纯化培养 3 次以上, 将最终得到的纯化菌株接种于 MSM 固体斜面 and LB 斜面上, 4 °C 冰箱保存, 备用。

1.2.3 降解菌的鉴定 取 1 mL 新鲜 MSM 培养菌液, 离心后收集菌体, 然后利用细菌基因组试剂盒提取 DNA, 选取通用引物 1492R(5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3') 和 27F(5'-AGA-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') 对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: DNA 模板(10 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 10 × PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0  $\mu\text{L}$ , Taq 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , MgSO<sub>4</sub> (50 mmol/L) 12.5  $\mu\text{L}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min, PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 由上海生工生物工程股份有限公司进行纯化测序, 测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性分析, 确定菌种类型。

1.2.4 形态学观察 将待测菌液涂布至无机盐固体培养基上, 静置于 37 °C 培养箱中培养 24~48 h, 观察菌落生长形态。并利用扫描电镜观察单个细菌形态。

1.2.5 生理生化分析 降解菌的生理生化鉴定参照《伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)》和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[7-8]</sup>, 其中包括氧化酶试验、过氧化氢酶试验、淀粉水解试验、葡萄糖利用试验、明胶试验、甲基红试验、V-P 试验、吲哚试验、硝酸盐还原试验和荧光色素试验。

1.2.6 液体培养降解试验 将初筛得到的降解菌株接种到 MSM 培养基中进行活化培养至其数量达到约  $4 \times 10^8$  CFU/mL, 取 1 mL 菌液在

5 000 r/min 下离心 10 min,用等体积的 0.85% NaCl 溶液重悬后加入 100 mL 的 MSM 液体培养基中,然后加入 500 mg/L 的香豆素为唯一碳源,以不加菌液为对照,37 ℃、150 r/min 下摇床培养 24 h,每种菌株设置 3 个重复,每间隔 4 h 取样 1 次,在 600 nm 波长下用分光光度计测定菌液的 OD 值。同时采用高效液相色谱法测定香豆素浓度,绘制香豆素降解曲线。

**1.2.7 高效液相色谱法测定香豆素浓度** 土壤香豆素提取:采用加速溶剂萃取(ASE)方法提取,方法参照文献[9]并稍作修改。准确称取冷冻干燥并粉碎后的植物样品 5.0 g 及根际土样 10.0 g,装入萃取池中。萃取条件设置为:萃取炉温度 50 ℃,热平衡时间 5 min,静态萃取时间 5 min,溶剂流速 2.5 mL/min,氮气吹扫时间 120 s,循环 2 次,使用乙腈溶液作为提取溶剂。最终收集萃取液 30.0 mL,置于 2 ℃ 冰箱备用,测定前过 0.45 μm 有机滤膜(PTFE 材质)后进样分析。菌液中香豆素提取:取 5 mL 菌液,以 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液过 0.45 μm 滤膜。上清液在 40 ℃ 下氮吹至近干,用乙腈溶液复溶残渣,涡旋混匀后过 0.22 μm PTFE 滤膜(预活化),进样 HPLC 分析。

色谱条件:色谱柱为安捷伦色谱柱:C18(150 mm×4.6 mm,5 μm),柱温 30 ℃,流速 1.0 mL/min,进样量为 10 μL,流动相为乙腈(A)和 0.5%甲酸水溶液(B)。梯度洗脱程序:70% A 相和 30% B 相等梯度洗脱,0~4 min。

香豆素标准曲线的绘制:分别取 20 mg 标品使用乙腈溶液溶解定容到 20 mL 得到母液,配制成为 1.0 mg/mL 的标准品母液,存放于棕色试剂瓶中,-20 ℃ 保存,备用。上液相色谱仪前,用乙腈溶液采用逐级稀释法将标准品母液配制成 10、20、50、100、200、500 μg/mL 和 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μg/mL 浓度的标准品混合溶液,分别拟合得到高浓度和低浓度标准曲线。

**1.3 数据分析**

采用 Excel 2010 和 SPSS 17 进行数据统计与分析,运用 Origin 2018 和 MEGA 7.0 软件进行绘图。

**2 结果与分析**

**2.1 异龄紫花苜蓿植株和土壤中香豆素积累情况**

通过高效液相色谱法定量测定不同年限植株

及根际土壤样品中香豆素浓度,以香豆素含量的响应峰面积为纵坐标(y),香豆素浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,所得的线性回归方程分别为:高浓度  $y = 27.329x - 32.756$ ,决定系数  $R^2 = 0.986$ ;低浓度  $y = 45.680x + 0.512$ ,决定系数  $R^2 = 0.998$ 。由此可知,香豆素在 0~10 μg/mL 和 10~500 μg/mL 浓度范围内均呈良好的线性相关性。植株样和土样分别采用高浓度标曲和低浓度标曲进行计算。香豆素标准液相色谱图如图 1 所示,在时间 2.089 min 左右时检出峰,且形成的色谱峰峰型良好,无干扰峰。

不同年限苜蓿植株及根际土壤中香豆素含量如图 2 所示,随着连作年限增加,苜蓿植株内香豆素含量呈先上升后下降趋势,其中在连作第 3 年时香豆素含量达到最大值 227.31 μg/g,第 4 年虽有所下降,但与连作 3 a 数据无显著差异,说明香豆素含量在第 3 年后达到稳定阶段,第 2、3、4 年苜蓿植株内香豆素含量较 1 a 生苜蓿分别增加为 1.59、2.27、1.90 倍。土壤中积累的香豆素含量较 1 a 龄苜蓿呈显著上升趋势。当连作 4 a 后土壤中香豆素含量最高可达 3.21 μg/g,其中第 2、3、4 年香豆素含量无显著差异,分别较对照 1 a 龄苜蓿增加 0.51、0.71、0.80 倍。试验结果说明苜蓿长期连作会引起香豆素在植株及根际土壤中积累。

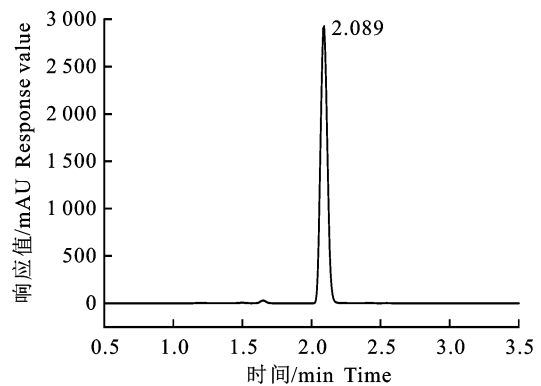
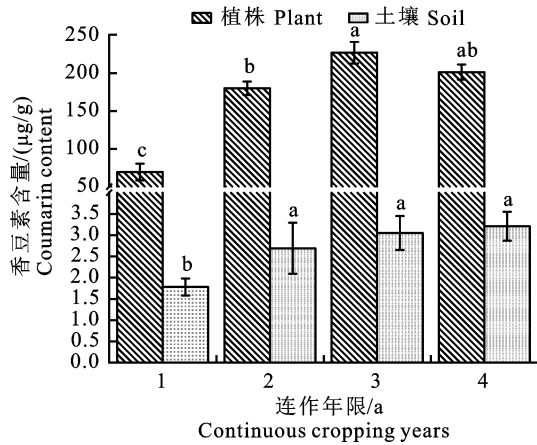


图 1 香豆素标准样品色谱图

Fig. 1 Chromatographic diagram of coumarin content

**2.2 外源添加香豆素对苜蓿种子萌发和幼苗生长的影响**

香豆素浓度对苜蓿种子发芽势的影响如图 3-a 所示,在种子培养后第 3 天进行观测,发现随着香豆素浓度增加,苜蓿种子发芽势呈先上升后急剧下降趋势。当香豆素浓度达到 1 μg/mL 时,苜蓿种子发芽势显著增加,达到最大值 86%,较



不同字母表示不同处理数据差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同

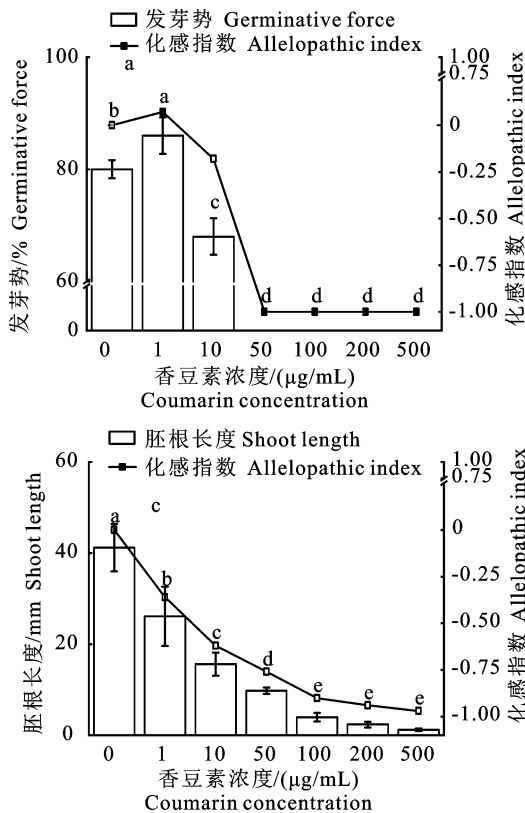
Different letters on the data indicate significant differences at different treatments ( $P < 0.05$ ). The same below

图 2 不同连作年限紫花苜蓿植株及土壤中香豆素含量

Fig. 2 Content of coumarin in alfalfa plants and soil under different continuous cropping years

CK 提高 7.5%, 其化感指数为 0.07 > 0, 当其浓度超过 10 µg/mL 时, 种子发芽势降为 0, 说明香豆素对苜蓿种子发芽时间快慢具有低浓度促进高浓度抑制的作用。

当苜蓿种子种植第 7 天后对其发芽率进行统



计, 结果如图 3-b 所示, 所有处理之间均无显著差异, 其化感指数接近于 0, 说明香豆素浓度在 0~500 µg/mL 时不会对苜蓿种子发芽率产生影响。

香豆素浓度对苜蓿种子培根长度的影响如图 3-c 所示, 当香豆素浓度在 0~100 µg/mL 时, 苜蓿种子培根长度随浓度的增加呈显著下降趋势, 当浓度超过 100 µg/mL 时, 各处理之间差异不显著。其中, 香豆素浓度为 1、10、50、100、200、500 µg/mL 时, 其胚根长度较空白 CK 分别降低 36.49%、62.03%、76.23%、94.25%、96.99%, 化感指数均 < 0。说明香豆素浓度增加会对苜蓿种子胚根生长造成严重的毒害作用, 引起苜蓿根系生长缓慢和发育不良等现象。

香豆素对苜蓿胚芽生长的影响如图 3-d 所示, 随着香豆素浓度的升高, 苜蓿种子胚芽伸长越缓慢, 各处理较空白 CK 分别降低 7.91%、16.74%、16.33%、36.73%、69.51%、83.21%, 除 10 µg/mL 与 50 µg/mL 之间无显著差异外, 其他各处理之间均达到显著差异, 分析其化感指数可以看出, 当香豆素浓度超过 1 µg/mL 时, 会对苜蓿胚芽生长产生严重抑制作用, 影响其生长发育。

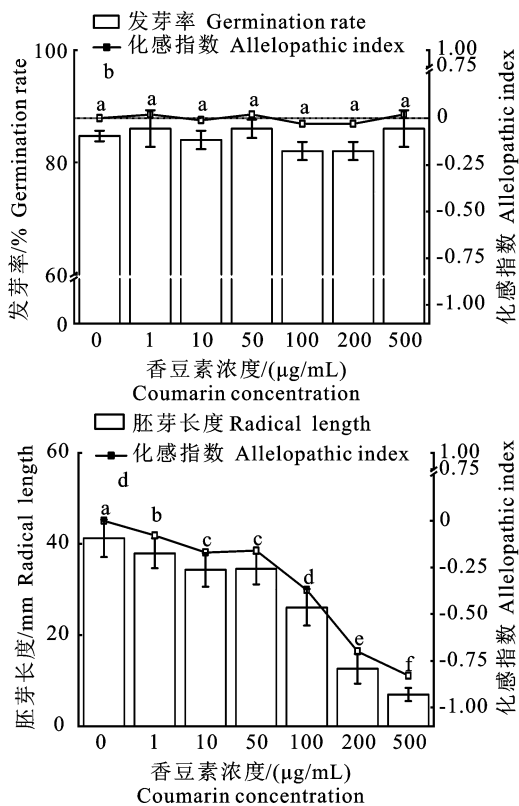


图 3 不同浓度香豆素对苜蓿种子发芽势、发芽率、胚根长、胚芽长的影响

Fig. 3 Effects of coumarin concentrations on germination potential, germination rate, radicle length and radical length of alfalfa seeds

### 2.3 香豆素降解菌株的筛选结果

2.3.1 分子生物学鉴定 经过以香豆素为唯一碳源的 MSM 固体培养基进行筛选培养,随机挑取 10 株长势良好的菌株,分别命名为 Dc0、Dc1、Dc2、...、Dc9,对其进行 16S rDNA 分子生物学鉴定,将所测得的 16S rDNA 序列与 GenBank 基因库中已知的原核生物 16S rDNA 序列进行比较,

并利用软件 MEGA7.0 构建系统发育树。将基因序列与 GenBank 比对结果如图 4 所示,从苜蓿根际土壤中所分离得到的 10 株菌均与恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 拥有 99% 相似度。10 株细菌的 16S rDNA 基因序列已经上传至 GenBank,登录号分别为 PQ444060~PQ444069。

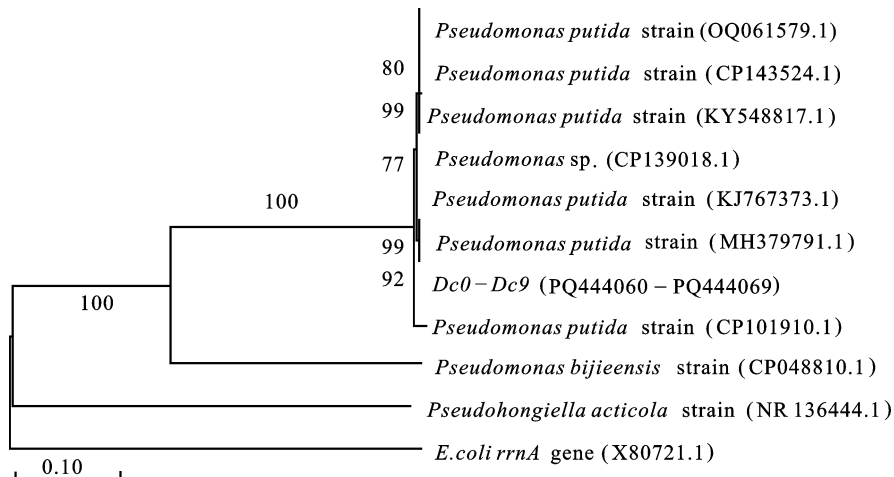
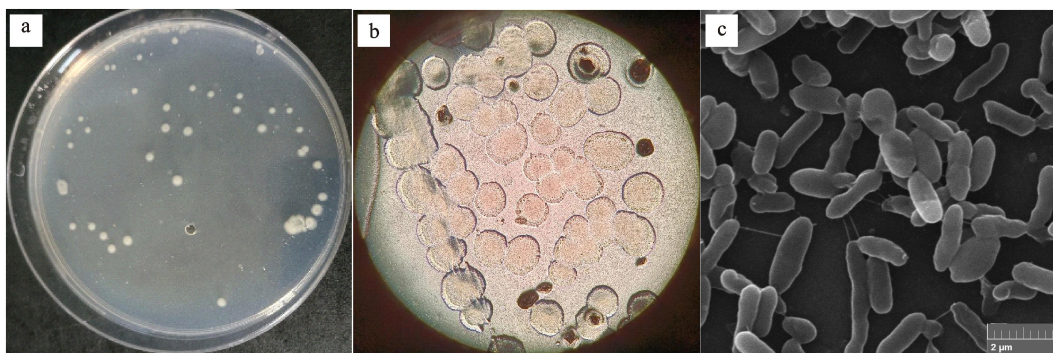


图 4 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree

2.3.2 降解菌菌落形态观察 通过对所筛选的香豆素降解菌落进行形态学观察,如图 5-b 可以看出,该菌落形状呈圆形,菌落直径 1.5~3 mm,菌落边缘光滑,无光泽,颜色为浅黄色半透明状。

从单个菌体的扫描电镜图 5-c 可知,该细菌为短杆状菌,且大小相近,都是长度 0.5~2.0 μm,形状接近于椭圆形,无明显的鞭毛。



a. MSM 平板培养图; b. 显微镜下放大 10×5 倍菌落形态图; c. 单个细菌电镜图

a. MSM plate culture; b. Colony morphology of 10×5 times larger under microscope; c. Electron micrograph of a single bacterium

图 5 降解菌菌落形态图

Fig. 5 Colony morphology of degrading bacteria

2.3.3 降解菌生理生化特性分析 所筛选的降解菌生理生化鉴定结果如表 1 所示,其为革兰氏阴性细菌,淀粉水解、硝酸盐还原、吲哚试验、甲基红试验、V-P 检验、明胶试验、淀粉水解酶和葡萄糖利用试验均表现为阴性,具有分泌氧化酶、过氧

化氢酶的能力,不产生荧光色素。

结合分子生物学鉴定、菌落形态观察和生理生化特性分析结果,可以确定所筛选香豆素降解菌株为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)。

表 1 降解菌的生理生化特性  
Table 1 Physio-biochemical properties  
of degrading bacteria

鉴定测试 Qualification tests	降解菌 Degrading bacteria
革兰氏染色 Gram staining	—
氧化酶试验 Oxidase test	+
过氧化氢酶试验 Catalase test	+
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	—
葡萄糖利用试验 Glucose utilization test	—
明胶试验 Gelatin liquefaction test	—
甲基红试验 Methyl red test	—
V-P 试验 V-P test	—
吲哚试验 Indole test	—
硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	—
荧光色素试验 Fluorescent pigment production test	—

注:“+”为阳性;“—”为阴性。

Note:“+” indicates positive; “—” indicates negative.

## 2.4 降解效果验证

恶臭假单胞菌降解香豆素的能力通过高效液相色谱法定量测定菌液中剩余香豆素浓度进行,测定方法与“2.1”中香豆素浓度测定方法相同。所筛选降解菌的生长能力和降解香豆素能力验证如图 6 所示。降解菌的生长能力通过定时取样于 600nm 波长下用分光光度计测定菌液的 OD 值发现,所筛选的恶臭假单胞菌降解菌株的生长均有明显的延迟期、对数期、稳定期和衰亡期,0~4 h 时为生长延迟期,4~12 h 达到对数期,12~16 h 进入稳定期,16 h 以后逐渐进入衰亡期,其

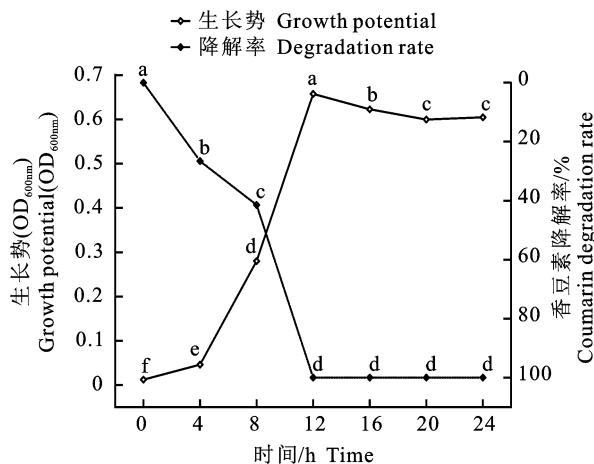


图 6 香豆素降解菌的生长曲线和降解曲线  
Fig. 6 Growth curve and degradation curve  
of coumarin-degrading bacteria

中 12 h 时 OD<sub>600nm</sub> 值达到最大值为 0.658。香豆素降解率与降解菌生长趋势呈正比关系,当生长时间在 0~12 h 时,香豆素含量急剧下降,4、8 h 时香豆素降解率分别达到 26.59%、41.47%,超过 12 h 以后,香豆素降解率接近 100%,说明所筛选的恶臭假单胞菌对香豆素具有较强的降解利用能力。

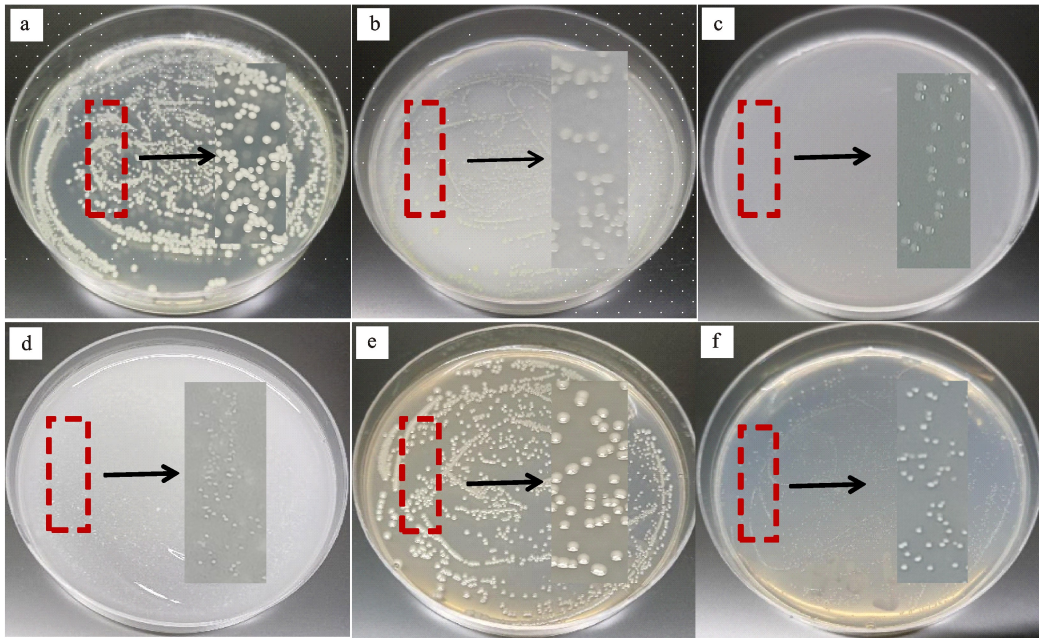
## 2.5 降解菌株功能性与促生性鉴定结果

为进一步探究该菌株的植物促生潜力,对其溶磷、解钾、固氮及 ACC 脱氨酶活性进行了系统性功能验证。结果如图 7 所示,该菌株在有有机磷(如卵磷脂,图 7-a)和无机磷(如磷酸钙,图 7-b)选择性平板上均形成明显的生长菌落,表明其具备分泌有机酸和磷酸酶的能力,可将难溶性磷转化为有效态磷,具有一定的溶磷作用。此外,菌株在硅酸盐培养基中形成明显溶钾圈(图 7-c),证实其能通过分泌有机酸或硅酸盐酶释放土壤中固定的钾元素。在阿须贝无氮培养基中,菌株表现出稳定生长(图 7-d),暗示其可能通过固氮酶系统参与氮素转化或利用小分子氮源。尤为值得注意的是,菌株在 DF (ACC 脱氨酶初筛)和 ADF (ACC 脱氨酶复筛)培养基上均呈现显著生长(图 7-e,7-f),表明其具备 ACC 脱氨酶活性,可通过降解植物胁迫激素乙烯前体(1-氨基环丙烷-1-羧酸,ACC)缓解植物逆境胁迫。

综上,该恶臭假单胞菌株不仅具有香豆素降解能力,还展现出多重植物促生特性,包括溶磷、解钾、潜在固氮及 ACC 脱氨酶活性。其功能多样性表明该菌株可通过协同作用促进植物养分吸收、缓解连作障碍并增强抗逆性,为开发兼具自毒物质消减与土壤改良功能的复合微生物菌剂提供理论依据。

## 3 讨论

作物自毒作用 (Autotoxicity) 是植物通过地上部分淋溶、根系分泌物或植株残茬等途径释放一些物质对同茬或下茬同种或同科植物的生长产生抑制作用的现象<sup>[10]</sup>。已有大量研究表明,香豆素是作物主要的自毒物质之一,化学式为 C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>,是一种有机化合物,常用作定香剂、增香剂、脱臭剂使用,其在作物根际中会对作物产生严重的毒害作用<sup>[11-12]</sup>。陶茸<sup>[13]</sup>研究表明高浓度的香豆素会对紫花苜蓿根长伸长、根缘细胞活性产生抑制效应,造成苜蓿生长缓慢等现象。Chon 等<sup>[14]</sup>研究 10 种酚类化合物对紫花苜蓿根长的影



a. 有机磷; b. 无机磷; c. 硅酸盐; d. 阿须贝; e. DF; f. ADF

a. Organic phosphorus; b. Inorganic phosphorus; c. Silicate; d. Aspergillus; e. DF; f. ADF

图 7 降解菌功能性与促生性平板验证试验

Fig. 7 Verification tests of functional and growth-promoting plates of degrading bacteria

响,香豆素、反式肉桂酸和邻香豆素对根生长的毒害作用最为明显,特别是香豆素的毒性最强烈。郭亚丽等<sup>[15]</sup>研究指出,香豆素对铜绿微囊藻的生长产生“低促高抑”作用,浓度高于 100 mg/L 的香豆素对铜绿微囊藻表现出明显的抑制作用,高浓度香豆素处理可能通过破坏细胞膜、增加  $O_2^-$  含量、降低叶绿素 a 含量等作用抑制藻细胞的生长。

本研究通过测定不同生长年龄的苜蓿植株及根际土壤中香豆素含量,发现其含量会随连作年限增加而积累。其原因可能与植株次生代谢增强、根系持续分泌、土壤微生物降解能力下降及化感自毒效应等协同作用有关,化感物质在作物和土壤中经过一系列的滞留、转化、迁移等途径逐渐富集导致<sup>[9]</sup>。外源添加不同浓度的香豆素研究其对苜蓿种子生长发芽的影响,结果发现随着香豆素浓度的升高,对苜蓿种子发芽率无显著影响,但会对苜蓿种子的发芽势和胚根、胚芽生长造成严重抑制作用,且随着香豆素浓度的升高,抑制作用越严重。这可能是由于香豆素所含的苯基结构及其低分子量特性所致,当香豆素进入植物体后,会抑制 SOD、POD、CAT 等抗氧化酶的活性,破坏细胞内活性氧的代谢平衡,进而影响细胞膜透性、亚显微结构、细胞分裂,以及水分与矿质离子

的吸收。同时,它还会干扰植物激素(如吲哚乙酸)的代谢、呼吸与光合作用、蛋白质合成及基因表达等一系列正常生理活动与物质运输,最终对植株造成损害<sup>[16-18]</sup>。

通过以香豆素为唯一碳源进行降解菌的筛选结果发现,共筛选得到 1 株具有高效降解香豆素能力的菌株,经鉴别分别为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。以香豆素为唯一碳源对所筛选的降解菌株进行进一步降解验证试验发现,在 0~24 h 内,降解菌液的生长速率与香豆素降解速率呈明显正比关系,当培养达 12 h 时  $OD_{600nm}$  值达到最大值 0.658,香豆素降解率接近 100%,说明所筛选菌株可以很好地以香豆素为碳源进行生命繁殖。根据前人研究发现,部分微生物可以通过自身生命代谢对酚酸类物质脱羧、氧化和羟基化等过程,将酚酸类物质降解为低碳化合物或完全矿化,如在菌株作用下可将苯甲酸降解为小分子化合物如儿茶酚、乙酸和丙酮酸等无毒害物质<sup>[19-20]</sup>。Horn 等<sup>[21]</sup>和 Harayama 等<sup>[22]</sup>已从恶臭假单胞菌的 TOL 质粒 pWW0 上发现一个可以编码甲苯 1,2-双加氧酶的 *xytXYZ* 基因,它不仅催化苯甲酸的羟基化,还能催化 3-,4-位取代基苯甲酸的羟基化,起到苯甲酸等酚酸类物质的降解作用。

氮、磷、钾是植物生长所必须的大量元素,对植物生长具有不可替代的作用,其含量直接影响植物的各项生命活动,又被称作肥料三要素,是评价土壤肥力的重要指标之一。研究发现,长期连作不仅会造成土壤自毒物质的积累,还会导致土壤微生物数量和活性下降,减缓土壤中矿质营养元素向有效态养分的分解转化速率,导致土壤养分亏缺,不均衡的现象。本研究筛选获得的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)不仅具有香豆素降解能力,还表现出溶磷、解钾、潜在固氮及 ACC 脱氨酶活性,其多功能特性在微生物修复领域具有显著优势。根据已有研究表明,溶磷、解钾作用可能是由于其可能通过分泌有机酸(如柠檬酸、草酸)或磷酸酶、硅酸盐酶等,将难溶性磷和固定态钾转化为植物可利用的形态。固氮方面主要是由于部分微生物可以直接利用空气中大量的氮元素进行生命活动有关,尽管固氮能力需通过乙炔还原试验进一步验证,但已有研究表明,假单胞菌可通过与植物共生或独立代谢参与氮循环<sup>[23]</sup>。菌株在 DF 和 ADF 培养基上表现出的 ACC 脱氨酶活性表明其能够降解乙烯前体(1-氨基环丙烷-1-羧酸,ACC),从而降低植物体内乙烯水平,缓解逆境胁迫<sup>[24]</sup>。这一特性与菌株的溶磷、解钾功能相结合,可能通过“代谢-抗逆”协同机制,有效缓解苜蓿连作障碍。

综上所述,本研究所筛选的恶臭假单胞菌在香豆素降解与养分活化方面表现出显著的协同作用,为开发兼具自毒物质消减与土壤改良功能的复合微生物菌剂提供了重要的理论依据。此外,鉴于该菌株能够同时存在有机污染物和磷限制的环境中生长繁殖,其潜在的环境修复应用价值值得进一步探索,特别是在复合污染土壤的生态修复领域。

## 4 结 论

随着苜蓿连作年限的增加,苜蓿植株及根际土壤中香豆素积累浓度越高,且在 0~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内,香豆素对苜蓿种子发芽率无显著影响,但随其浓度的不断升高,会严重影响种子发芽速度和抑制胚根、胚芽生长。

降解菌筛选结果显示:此研究共分离、筛选得到 1 株高效香豆素降解菌株,经鉴定为恶臭假单胞杆菌,其最大降解率在生长 12 h 后可接近 100%,且该菌株同时具备溶磷、解钾、固氮及分泌

ACC 脱氨酶的能力。

## 参考文献 Reference:

- [1] 张静怡,韩海斌,尹强,等. 紫花苜蓿连作障碍研究进展[J]. 中国草地学报,2024,46(6):135-143.
- [2] 李小龙. DIMBOA 缓解紫花苜蓿香豆素自毒效应的机制研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2023.
- [3] 徐军. 香豆素对一年生黑麦草生理特性及根系微生物的影响[D]. 江苏扬州:扬州大学,2020.
- [4] BERTIN C, YANG X, WESTON L A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere[J]. *Plant and Soil*, 2003, 256(1):67-83.
- [5] 尹国丽. 紫花苜蓿-小麦/玉米轮作土壤微生物生态特征与自毒效应消减[D]. 兰州:甘肃农业大学,2019.
- [6] HUANG S, WANG M, MAO D, et al. Isolation, identification and characterization of growth parameters of *Pseudomonas putida* HSM-C2 with coumarin-degrading bacteria[J]. *Molecules*, 2022, 27(18):6007.
- [7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [8] 廖延雄.《伯杰氏鉴定细菌学手册》与《伯杰氏分类细菌学手册》[J]. 微生物学通报,1992(4):59.
- [9] 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[J]. 土壤,2016,48(5):931-938.
- [10] 曹克强,代丽,张学英,等. 连作草莓根系分泌物自毒作用的模拟研究[J]. 植物生态学报,2004,28(6):828-832.
- [11] EGAN D, O'KENNEDY R, MORAN E, et al. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds[J]. *Drug Metabolism Reviews*, 1990, 22(5):503-529.
- [12] SVENSSON S B. The effect of coumarin on root growth and root histology[J]. *Physiologia Plantarum*, 1971, 24(3):446-470.
- [13] 陶茸. 香豆素、咖啡酸对紫花苜蓿及轮作作物幼根形态和结构的影响及其生理变化[D]. 兰州:甘肃农业大学,2019.
- [14] CHON S U, NELSON C. Allelopathy in Compositae plants[J]. *Sustainable Agriculture Volume*, 2011, 2:727-739.
- [15] 郭亚丽,傅海燕,黄国和,等. 阿魏酸和香豆素对铜绿微囊藻的化感作用[J]. 环境科学,2013,34(4):1492-1497.
- [16] 崔佳佳. 两种典型化感自毒物质对兰州百合生长及微生物作用研究[D]. 兰州:西北师范大学,2021.
- [17] WU B, SHI S, ZHANG H, et al. Study on the key autotoxic substances of alfalfa and their effects[J]. *Plants*, 2023, 12(18):3263.
- [18] 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[J]. *Agronomy*, 2021, 11(6):1027.
- [19] TAN S M, HO L N, WONG Y S, et al. Sustainable utilization of anthraquinone-rich *Rheum officinale* as electron shuttle in microbial fuel cell: Strategy for stimulating monohydric phenols degradation and bioelectricity generation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 475:146423.
- [20] ALI S S, ELSAMAHY T, ABDELKARIM E A, et al. Biowastes for biodegradable bioplastics production and end-of-life scenarios in circular bioeconomy and biorefinery concept[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363:127869.

- [21] HORN J M, HARAYAMA S, TIMMIS K N. DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWW0) xylG-FJ genes of *Pseudomonas putida*: implications for the evolution of aromatic catabolism[J]. *Molecular Microbiology*, 1991, 5(10): 2459-2474.
- [22] HARAYAMA S, REKIK M. Comparison of the nucleotide sequences of the meta-cleavage pathway genes of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* with other meta-cleavage genes suggests that both single and multiple nucleotide substitutions contribute to enzyme evolution[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1993, 239(1): 81-89.
- [23] 杨志远. 耐盐碱解磷菌高效解磷的种间趋同进化及种内变异效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2024.
- [24] 吕百栓. 竹林根际促生菌筛选鉴定及其促生效果评价[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2024.

## Analysis of Autotoxic Effects of Coumarin on Alfalfa Growth and Identification of Coumarin-Degrading Bacteria

ZHAO Tingwei, JI Bin, PENG Yinan, SONG Jie, YE Ze,  
YANG Jianjun and WANG Zhiye

(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Key Laboratory of Microbial Resources  
Exploitation and Application of Gansu Province, Lanzhou 730030, China)

**Abstract** To address the continuous cropping obstacles in alfalfa caused by autotoxic compounds such as coumarin, the coumarin content in alfalfa plants of different ages and their rhizosphere soil was measured using high performance liquid chromatography (HPLC) and their autotoxic effect was evaluated. Coumarin was also used as the sole carbon source to isolate coumarin-degrading strains from the rhizosphere soil, which were subsequently identified based on their 16S rDNA gene sequence. The physiological and biochemical characteristics of the isolated strains were further analyzed using different selective media. The results showed that with the increase of growth years, the coumarin concentration in both alfalfa plants and rhizosphere soil significantly increased, peaking at 227.31  $\mu\text{g/g}$  and 3.21  $\mu\text{g/g}$ , respectively. Moreover, increasing coumarin concentrations from 0 to 500  $\mu\text{g/mL}$  significantly inhibited seed germination potential as well as radicle and hypocotyl growth. At 1  $\mu\text{g/mL}$ , the elongation of radicles and hypocotyls decreased by 36.49% and 7.91%, respectively. When the concentration exceeded 10  $\mu\text{g/mL}$ , seed germination potential dropped to zero, with all changes being statistically significant. Through screening, one highly efficient coumarin-degrading strain was obtained and identified as *Pseudomonas putida*, with a maximum degradation rate approaching 100%. Functional analysis indicated that this strain possessed multiple plant growth-promoting traits, including phosphorus solubilization, potassium release, nitrogen fixation, and ACC deaminase secretion. This study demonstrated that continuous alfalfa cropping leads to the gradual accumulation of coumarin in the soil, which severely impairs seed germination and seedling growth. *Pseudomonas putida* has strong coumarin degradation capacity and environmental adaptability, providing strain resources and theoretical basis for the microbial control of allelochemicals in the future.

**Key words** Alfalfa; Autotoxicity; Coumarin; Coumarin-degrading bacteria; *Pseudomonas putida*

**Received** 2025-03-24      **Returned** 2025-05-13

**Foundation item** Youth Innovation Fund of Gansu Academy of Sciences (No. 2023QN-01).

**First author** ZHAO Tingwei, male, master student. Research area: utilization of microbial resources and plant protection. E-mail: 1373949979@qq.com

**Corresponding author** WANG Zhiye, male, research fellow. Research area: development and utilization of microbial resources. E-mail: zhiye\_wang@sina.com

(责任编辑:潘学燕      **Responsible editor: PAN Xueyan**)