

辛顺佳,杨虹琦,熊伟,等. 不同除草剂对 3 株土壤细菌蛋白酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):300-303.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.072

不同除草剂对 3 株土壤细菌蛋白酶活性的影响

辛顺佳,杨虹琦,熊伟,杨俊兴,杨红武,严永旺

(湖南农业大学生物科学技术学院,湖南长沙 410128)

摘要:为验证不同除草剂对土壤微生物分泌蛋白酶活性的影响,以高有机质土壤中分离出的 3 种产蛋白酶细菌为材料,采用干酪素平板透明圈法研究二甲戊灵、异丙甲草胺和精喹禾灵 3 种除草剂对 3 种细菌蛋白酶活性的影响。结果表明,从土壤中分离的 3 种产蛋白酶活性高的细菌均为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)细菌,其中以蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)的蛋白酶活性最高;二甲戊灵浓度低于 0.198 mg/mL 时不能抑制蜡样芽孢杆菌和 NX-3 菌株的蛋白酶活性,但能抑制短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)的蛋白酶活性;异丙甲草胺浓度低于 0.36 mg/mL 时不能抑制蜡样芽孢杆菌的蛋白酶活性;低浓度的精喹禾灵对 3 种芽孢杆菌的蛋白酶活性都有很强的抑制作用。综上,二甲戊灵、异丙甲草胺和精喹禾灵 3 种除草剂对这 3 种芽孢杆菌的蛋白酶活性均有影响,且除草剂浓度越高,抑制作用越强。

关键词:除草剂;土壤细菌;分离鉴定;蛋白酶活性;氨基酸含量;二甲戊灵;异丙甲草胺;精喹禾灵

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0300-04

近年来,我国化学除草剂用量和使用面积呈现逐年增加的趋势。据全国农技推广中心统计,2009 年全国杂草发生面积 0.89 亿 hm^2 ,化学防除面积达 0.91 亿 hm^2 ,挽回粮食损失 2 141 万 $\text{t}^{[1]}$ 。由于化学除草剂具有速度快、防效好、省力、省工等优点,因此被农民广泛使用。研究表明,这些除草剂有 70% 会进入土壤^[2],并且对土壤微生物的活动产生影响^[3-4],进而影响土壤中有有机物质的分解速度。微生物是土壤有机物质的最早来源,虽然土壤中微生物数量占有机物质总量的比例很少,但它们对土壤有机物质的转化起着非常重要的作用。土壤有机物质是指那些进入土壤中尚未被微生物分解的动植物残体,其中含氮化合物主要是由各种氨基酸构成的蛋白质,并且大部分蛋白质须要经过微生物分泌产生的蛋白酶作用才能被分解和利用。因此,土壤中产蛋白酶微生物的种群结构、数量及其分泌蛋白酶活性与土壤有机物质中蛋白质的分解速度密切相关,并且在一定程度上可以反映土壤有机质矿化的速率^[5-6]。对湖南省烟稻轮作地区耕层土壤养分调查发现,其土壤有机质有逐年升高的趋势,虽然有关除草剂对土壤微生物群落影响的相关研究报道较多^[7-9],但未见针对湖南省烟稻轮作地区耕层土壤分离的产蛋白酶细菌种属及其分泌蛋白酶活性研究的报道。本试验选取生产上广泛使用且作用机

制不同的 3 种除草剂(二甲戊灵、异丙甲草胺和精喹禾灵)为试验材料,系统研究了土壤中分离的产蛋白酶细菌种属及不同除草剂对细菌蛋白酶活性的影响,为探明湖南省烟稻轮作地区土壤有机质逐年升高与大量使用化学除草剂是否有关提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤 供试高有机质土壤样品采自湖南农业大学耘园(YY)、湖南省宁乡县横市镇(NX)、湖南省邵阳市横板桥乡(SY)。经检测已知耘园土壤有机质平均含量为 25.92 g/kg,宁乡土壤有机质平均含量为 33.29 g/kg,邵阳土壤有机质平均含量为 40.83 g/kg。

1.1.2 供试除草剂 供试除草剂为 33% 二甲戊灵乳油、720 g/L 异丙甲草胺乳油和 10% 精喹禾灵乳油,均由市场采购。

1.1.3 培养基 (1)酪素培养基。KH₂PO₄ 0.360 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.500 g, ZnCl₂ 0.014 g, Na₂HPO₄ · 7H₂O 1.070 g, NaCl 0.160 g, CaCl₂ 0.002 g, FeSO₄ 0.002 g, 干酪素 4.000 g, 琼脂 20.000 g, 蒸馏水 1 L, pH 值为 7.0 ~ 7.2。(2)牛肉膏蛋白胨培养基。牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 值为 7.0 ~ 7.2。

1.2 方法

1.2.1 土壤产蛋白酶细菌的分离纯化 称取 5 g 清除残根杂物的土壤样品,倒入含有 45 mL 无菌水的 150 mL 锥形瓶

收稿日期:2017-08-25

作者简介:辛顺佳(1993—),女,湖南长沙人,硕士研究生,主要从事烟草生理生化与区域生态研究。E-mail:447418040@qq.com。

通信作者:杨虹琦,博士,教授,博士生导师,主要从事特色优质烟叶开发、烟草品质分析与质量评价研究。E-mail:csyhq@sina.com。

[32]朱赖民,高志友,尹观,等. 南海表层沉积物的稀土和微量元素的丰度及其空间变化[J]. 岩石学报,2007,23(11):2963-2980.

[33]颜彬,苗莉,黄蔚霞,等. 2012. 广东近岸海湾表层沉积物的稀土元素特征及其物源示踪[J]. 热带海洋学报,31(2):67-79.

[34]王鹏,赵志忠,王军广,等. 海南岛西南干旱区土壤中稀土元素含量及其空间分布特征[J]. 干旱区资源与环境,2012,26(5):83-87.

[35]李景瑞,刘升发,冯秀丽,等. 孟加拉湾中部表层沉积物稀土元素特征及其物源指示意义[J]. 海洋地质与第四纪地质,2016,36(4):41-50.

中,振荡 20 min,使土样充分打散,即成为 10⁻¹ 的土壤悬液。用移液枪吸 10⁻¹ 的土壤悬液 1 mL,放入 9 mL 无菌水中即为 10⁻² 稀释液,如此重复,依次制成 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 的稀释液,分别涂布于酪素培养基上。37 ℃ 培养 2 d 后,挑取产生蛋白水解圈的菌落,进一步划线直到得到单菌落,对菌株进行编号,斜面保存,置于 4 ℃ 冰箱中。

1.2.2 产蛋白酶细菌的初筛 将分离纯化得到的菌种接种到酪素培养基中,37 ℃ 恒温培养 2 d,挑选生长良好、蛋白水解圈明显较大且透明度高的单菌落,测量其水解圈直径(*D*)与菌落直径(*d*)。

1.2.3 产蛋白酶细菌的复筛 在 250 mL 锥形瓶中加入液体牛肉膏蛋白胨培养基 100 mL,121 ℃ 灭菌 30 min,将初筛得到的菌株分别接种于培养基中,37 ℃ 摇床培养 24 h,离心培养液,取上清液 1 mL 测蛋白酶活性。从每份土壤中选择形态各不相同且酶活性最高的 1 株细菌作为不同剂量除草剂对细菌及其分泌蛋白酶活性影响的试验菌株。

1.2.4 产蛋白酶细菌种属鉴定

1.2.4.1 形态观察和生理生化鉴定 在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上培养菌株,37 ℃ 培养 24 h,观察菌落形态。根据《常见细菌系统鉴定手册》^[10] 和《微生物学实验指导》^[11] 对菌株进行革兰氏染色、接触酶、甲基红、硝酸盐还原、淀粉水解、葡萄糖发酵、V-P 试验等生理生化鉴定。

1.2.4.2 16S rRNA 基因测序 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行菌株的 16S rRNA 基因测序,所得结果在 GenBank 中进行 Blast 搜索同源序列,并利用 Mega 5.0 软件进行同源性分析以确定菌种。

1.2.5 除草剂对细菌产蛋白酶活性的影响 将已鉴定出的细菌以 1% 的接种量接种到酪素体培养基中,加入不同浓度的除草剂。其中,二甲戊灵使用浓度为 0.099、0.198、0.396、0.792、1.584 mg/mL,异丙甲草胺使用浓度为 0.36、0.72、1.44、2.88、5.76 mg/mL,精喹禾灵使用浓度为 0.033、0.066、0.132、0.264、0.528 mg/mL;以不加除草剂的酪素体培养基为对照。37 ℃ 摇床培养 48 h,离心培养液,取上清液测蛋白酶活性和游离氨基酸含量。

1.2.6 蛋白酶活性测定 取 5 mL 0.6% 酪蛋白溶液于试管中,40 ℃ 预热 2 min 后加 19 mL pH 值为 8 的硼酸缓冲液和 1 mL 酶液,40 ℃ 水浴反应 10 min,再加 5 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应,40 ℃ 保温 20 min,沉淀残余底物并过滤,滤液在 275 nm 下用紫外分光光度计测定吸光度。以先加三氯乙酸使酶失活的试管为空白对照,以 1 min 内由酪蛋白释放出的三氯乙酸可溶物在 275 nm 处的吸光度与 1 μg 的酪氨酸相当时,其所需的酶量为 1 个单位,单位为 U/mL。

1.2.7 游离氨基酸含量测定 采用茚三酮显色法测定^[12]。

2 结果与分析

2.1 土壤产蛋白酶细菌筛选

从 3 份供试土壤中共计筛选出 37 株产蛋白酶细菌,菌种编号、透明圈直径与菌落直径之比及细菌蛋白酶活性的测定结果见表 1。根据透明圈直径与菌落直径之比及蛋白酶活性,选择蛋白酶活性较高的 YY-4、NX-3 和 SY-2 菌株进行生理生化特性及 16S rRNA 基因分析和鉴定。但通过观察

发现,YY-4 和 SY-2 菌落形态相似,因此 SY 地点选用 SY-9 菌株进行试验。YY-4 菌株蛋白酶活性最高,其次为 NX-3 菌株,SY-9 菌株蛋白酶活性最小。

表 1 产蛋白酶细菌筛选结果

菌株编号	酶活性 (U/mL)	透明圈直径/菌落直径	菌株编号	酶活性 (U/mL)	透明圈直径/菌落直径
YY-1	25.66	1.89	NX-3	75.57	2.08
YY-2	37.12	4.07	NX-4	20.48	3.01
YY-3	40.12	1.93	NX-5	39.85	2.45
YY-4	102.03	3.12	NX-6	22.39	2.46
YY-5	41.21	3.23	NX-7	43.12	3.38
YY-6	24.03	3.90	NX-8	24.85	1.87
YY-7	52.39	2.14	NX-9	35.21	2.06
YY-8	14.75	3.75	NX-10	62.21	4.27
YY-9	80.21	2.85	NX-11	43.12	3.34
YY-10	48.85	3.84	SY-1	26.48	2.84
YY-11	46.12	3.68	SY-2	46.66	1.41
YY-12	32.75	2.31	SY-3	36.57	1.73
YY-13	21.57	1.87	SY-4	45.30	1.34
YY-14	23.21	1.47	SY-5	20.75	1.41
YY-15	25.66	1.75	SY-6	36.85	1.58
YY-16	28.66	4.20	SY-7	31.66	2.17
YY-17	33.03	1.74	SY-8	29.75	3.05
NX-1	17.75	1.93	SY-9	46.12	3.21
NX-2	24.57	2.40			

2.2 产蛋白酶细菌鉴定

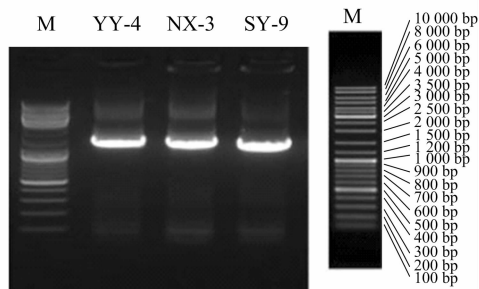
2.2.1 产蛋白酶细菌形态与生理生化特性 YY-4 菌落为乳白色、圆形突起、表面光滑、白蜡状;NX-3 菌落颜色为乳白色偏黄、圆形、表面光滑、湿润;SY-9 菌落为乳黄色、不规则形蔓延、半透明、表面光滑、湿润。3 株产蛋白酶细菌主要生理生化指标分析结果见表 2。3 种细菌的革兰氏染色、接触酶、硝酸盐还原、葡萄糖产酸和葡萄糖产气特性均相同,但甲基红显色、淀粉水解和 V-P 特性有所不同。

表 2 3 株产蛋白酶细菌主要生理生化特性

测试项目	YY-4	NX-3	SY-9
革兰氏染色	+	+	+
接触酶	+	+	+
甲基红	+	-	+
硝酸盐还原	+	+	+
淀粉水解	+	+	-
葡萄糖产酸	+	+	+
葡萄糖产气	-	-	-
V-P	+	-	+

注:“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应。

2.2.2 产蛋白酶细菌 16S rRNA 基因鉴定 3 种细菌 16S rRNA 基因的 PCR 产物电泳图谱见图 1。经测序得到的 16S rRNA 基因序列长度分别为 YY-4 长 1 496 bp;NX-3 长 1 496 bp;SY-9 长 1 492 bp。将得到的基因序列与 Blast、GeneBank 数据库中的序列进行比对,并利用 Mega 5.0 软件进行同源性分析,根据细菌鉴定中核糖体基因 16S 区域同源性大于 99% 可视为同一个种属的准则,确定菌株 YY-4 为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*);NX-3 菌株为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.);SY-9 菌株为短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)。



M—DNA 分子混合标记物

图1 3种细菌 16S rRNA 基因产物 PCR 电泳

2.3 除草剂对 3 种细菌蛋白酶活性及培养液中氨基酸含量的影响

2.3.1 二甲戊灵对 3 种细菌蛋白酶活性及培养液中氨基酸含量的影响 二甲戊灵通常作为芽前、芽后早田土壤除草剂^[13], 广泛应用于玉米、大豆、马铃薯、烟草、蔬菜等田地除草。二甲戊灵对 3 种细菌蛋白酶活性及培养液中氨基酸含量的影响见图 2、图 3。结果显示, 二甲戊灵浓度低于 0.198 mg/mL 时, 对蜡样芽孢杆菌和 NX-3 菌株蛋白酶活性无抑制作用, 但对短小芽孢杆菌蛋白酶活性有抑制作用; 当二甲戊灵浓度超过 0.198 mg/mL 后, 3 种菌株产蛋白酶活性均迅速下降。蜡样芽孢杆菌培养液中氨基酸含量的变化与蛋白酶活性变化基本一致, 但在低浓度的二甲戊灵中, NX-3 菌株和短小芽孢杆菌培养液的氨基酸含量持续下降。由此可见, 二甲戊灵对短小芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌和 NX-3 菌株产蛋白酶活性均有抑制作用, 并且低浓度的二甲戊灵 (超过 0.198 mg/mL 时) 对短小芽孢杆菌、NX-3 菌株的抑制作用较强, 对蜡样芽孢杆菌的抑制作用相对较弱。

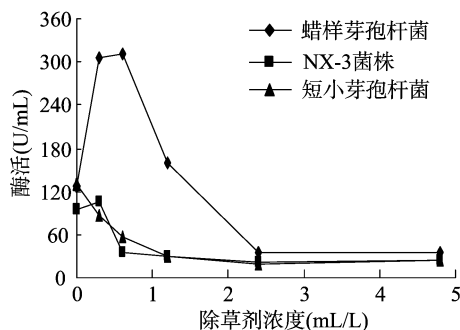


图2 二甲戊灵对 3 种细菌蛋白酶活性的影响

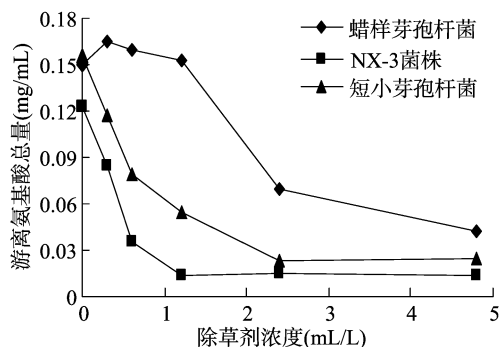


图3 二甲戊灵对 3 种细菌培养液中氨基酸含量的影响

2.3.2 异丙甲草胺对 3 种细菌蛋白酶活性及培养液中氨基

酸含量的影响 异丙甲草胺是一种选择性苗前使用的土壤除草剂^[14], 可用于棉花、花生、马铃薯、烟草等田地除草。异丙甲草胺对 3 种细菌蛋白酶活性及培养液中氨基酸含量的影响见图 4、图 5。异丙甲草胺浓度低于 0.36 mg/mL 时, 对蜡样芽孢杆菌蛋白酶活性及培养液中氨基酸含量均无抑制作用, 但对 NX-3 菌株和短小芽孢杆菌蛋白酶活性及培养液中氨基酸含量有一定的抑制作用; 异丙甲草胺浓度超过 0.36 mg/mL 后, 蜡样芽孢杆菌蛋白酶活性及培养液中氨基酸含量均急速下降。说明当异丙甲草胺浓度超过 0.36 mg/mL 后对 3 种细菌蛋白酶活性都有较强的抑制作用。

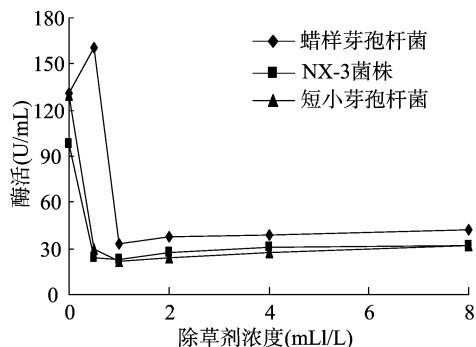


图4 异丙甲草胺对 3 种细菌蛋白酶活性的影响

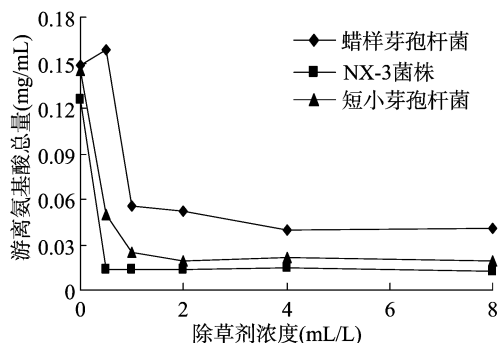


图5 异丙甲草胺对 3 种细菌培养液中氨基酸含量的影响

2.3.3 精喹禾灵对 3 种细菌蛋白酶活性及培养液中氨基酸含量的影响 精喹禾灵是一种新型的芳基苯氧基丙酸类除草剂^[15], 可用于大豆、烟草、棉花、花生、油菜等田地除草。精喹禾灵对 3 种细菌蛋白酶活性及细菌培养液中氨基酸含量的影响见图 6、图 7。结果表明, 低浓度的精喹禾灵对蜡样芽孢杆菌、NX-3 菌株、短小芽孢杆菌蛋白酶活性和培养液中氨基酸含量都有很强的抑制作用。

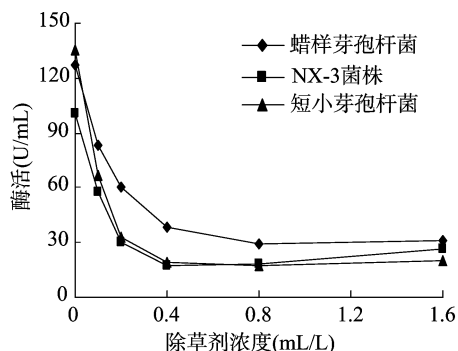


图6 精喹禾灵对 3 种细菌蛋白酶活性的影响

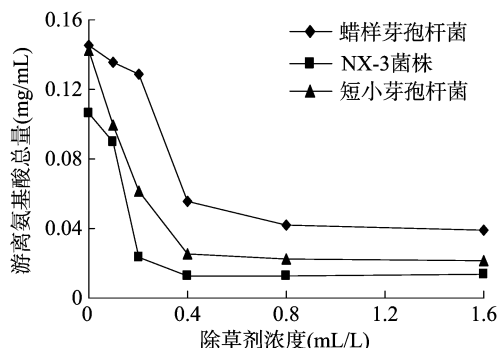


图7 精喹禾灵对 3 种细菌培养液中氨基酸含量的影响

3 结论与讨论

前人研究结果表明,2,4-D^[3]、阿特拉津^[4]、草甘膦^[8]、苄嘧磺隆^[9]等除草剂会影响土壤细菌的数量;甲磺隆的施入不仅会影响微生物生物量和微生物群落结构,而且对土壤微生态系统会产生一定的破坏作用^[16]。滕春红等的研究表明,氟磺胺草醚对土壤蛋白酶活性表现出抑制作用,低浓度(5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的氯嘧磺隆对蛋白酶活性有轻微的激活作用,而高浓度(20、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的氯嘧磺隆对蛋白酶活性有抑制作用^[17-18]。本试验研究了二甲戊灵、异丙甲草胺、精喹禾灵这 3 种除草剂,发现它们在低浓度时均对蜡样芽孢杆菌、NX-3 菌株、短小芽孢杆菌的蛋白酶活性有明显的抑制作用。但由于这 3 种除草剂的作用机制各不相同,所以相同条件下对不同细菌蛋白酶活性的影响略有不同。

土壤蛋白酶是土壤氮素矿化过程中的重要水解酶,其酶活性在一定程度上可以反映土壤中分泌蛋白酶细菌的数量,也可以反映土壤氮素矿化的速率。Kamimura 等研究表明,蛋白酶与全氮矿化速率呈显著正相关关系^[6]。因此,揭示不同除草剂对细菌蛋白酶活性的影响将为除草剂对土壤矿化速率影响的研究奠定坚实的理论和试验基础。本试验仅以高有机质土壤中分离出的 3 种产蛋白酶活性较高的细菌为供试对象,研究除草剂二甲戊灵、异丙甲草胺、精喹禾灵对细菌蛋白酶活性的影响,而这 3 种除草剂是否对细菌分泌的其他水解酶或氧化酶活性有抑制作用还有待今后做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 张宏军,刘学,沙虎全,等. 我国除草剂登记使用现状及存在问题[J]. 杂草学报,2011,29(1):7-11.
- [2] 陆贻通,朱有为. 基本农田保护区的环境污染及防治对策[J]. 上海环境科学,1995,14(8):45-46.
- [3] 韩丽珍,赵德刚. 除草剂 2,4-D 胁迫对土壤微生物的影响研究[J]. 土壤通报,2013,44(4):974-979.
- [4] 姚斌,徐建民,尚鹤,等. 阿特拉津除草剂对土壤微生物生态特征的影响[J]. 水土保持学报,2005,19(3):46-49.
- [5] 蔡红,沈仁芳. 改良茚三酮比色法测定土壤蛋白酶活性的研究[J]. 土壤学报,2005,42(2):306-313.
- [6] Kamimura Y, Hayano K. Properties of protease extracted from tea-field soil[J]. Biology & Fertility of Soils,2000,30(4):351-355.
- [7] 宿翠翠,李玮,郭青云. 除草剂对马铃薯土壤中细菌、放线菌群落的影响[J]. 河南农业科学,2014,43(12):96-101.
- [8] 陶波,蒋凌雪,沈晓峰,等. 草甘膦对土壤微生物的影响[J]. 中国油料作物学报,2011,33(2):162-168.
- [9] 赵兰,黎华寿. 四种除草剂对稻田土壤微生物类群的影响[J]. 农业环境科学学报,2008,27(2):508-514.
- [10] 东秀珠,妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [11] 黄秀梨,辛明秀. 微生物学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2008:48-51.
- [12] 刘美,马叶萍,柳阳阳,等. 茶叶中游离氨基酸含量的测定[J]. 微量元素与健康研究,2016,33(1):51-52.
- [13] 金前,贾会娟,李雪玲,等. 二甲戊灵胁迫下的土壤酶活性变化[J]. 新疆农业科学,2015,52(5):889-894.
- [14] 刘少平. 异丙甲草胺在烟田的残留降解行为和效应研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2010.
- [15] 周丽兴,万树青,陈泽鹏,等. 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilis*)对精喹禾灵的降解特性[J]. 农药,2006,45(9):627-629.
- [16] 郭梅燕. 两种长残效除草剂土壤降解动态及对土壤酶的影响[D]. 新乡:河南科技学院,2014.
- [17] 滕春红,陶波. 除草剂氯嘧磺隆对土壤酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报,2006,25(5):1294-1298.
- [18] 姚斌,汪海珍,徐建民,等. 除草剂对水稻土微生物的影响[J]. 环境科学学报,2004,24(2):349-354.