

怀山药根际土壤微生物、酶活性和 酚酸物质变化及其关系研究

乔卿梅,程茂高,王新民,魏志华

(郑州牧业工程高等专科学校药物工程系,郑州 450011)

摘要:对不同生育期怀山药根际土壤微生态变化及其关系进行研究,为研究怀山药根际微生态与其品质的相关性奠定基础。采用室内测定法研究怀山药根际土壤微生物数量、土壤酶活性及酚酸物质含量。结果表明:怀山药在其生长发育过程中,根际土壤中酚酸物质的含量和土壤细菌、放线菌、真菌数量均呈显著升高趋势,且根茎膨大速度越快时上升趋势越明显;根际细菌绝对数量一直占根际土壤微生物的80%左右,并呈增长趋势;过氧化氢酶、多酚氧化酶、蛋白酶活性逐渐增强,蔗糖酶、磷酸酶、脲酶活性呈下降趋势;根际土壤中酚酸物质的含量与根际土壤中微生物的含量和多数土壤酶活性呈显著相关性。怀山药在其生长发育过程中根际微生态发生了显著变化,土壤中酚酸物质、微生物和酶活性间存在密切关系。

关键词:怀山药;根际微生物;土壤酶活性;酚酸

中图分类号:S154.37;S567.9

文献标识码:A

论文编号:2009-1709

Study on the Change of Microbial Quantity, Enzyme Activity And Phenolic Acids in *Rehmannia glutinosa* Rhizosphere Soil

Qiao Qingmei, Cheng Maogao, Wang Xinmin, Wei Zhihua

(Department of Pharmacy Engineering, Zhengzhou College of
Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011)

Abstract: This paper studied the variations of phenolic acids contents, microbes flora and enzyme activity in yam *Rehmannia glutinosa* rhizosphere soil and their relations. The results showed that the content of phenolic acids and the numbers of fungi, bacteria, actinomycetes had a prominent increase with the yam growing development. The more fast of rootstalk growing rate, the more distinct of increase tendency. While the number of bacteria in yam rhizosphere soil were about 80% all the time, and showed increase tendency. The enzyme activity of catalase, polyphenol oxidase, protease in rhizosphere showed increase tendency, and the variation of enzyme activity in sucrase, phosphatase, urease were contrary. The content of rhizosphere phenolic acids presented a prominent pertinence with the numbers of fungi, bacteria, actinomycetes and the enzyme activity of catalase, polyphenol oxidase, protease, phosphatase, urease in rhizosphere soil. This means rhizosphere microecological had a prominent change during the yam growing development, and it had close relation between phenolic acid, microorganism and enzyme activity in rhizosphere soil.

Key words: *Rehmannia glutinosa*, rhizosphere microbe, soil enzyme activity, phenolic acids

项目基金:河南杰出青年科学基金“河南省道地(地产)药材 GAP 栽培与质量控制研究”(074100510018);国家第四十一批博士后科学基金“怀牛膝道地性成因的土壤微域环境研究”(20070410616)。

第一作者简介:乔卿梅,女,1974年出生,硕士,讲师,主要从事药用植物资源开发与栽培研究,发表论文26篇。通信地址:450011 河南郑州市北林路16号 郑州牧业工程高等专科学校药物工程系。Tel: 0371-65765173, E-mail: qqm727@sohu.com。

通讯作者:王新民,男,1973年出生,河南商丘人,副教授,博士,硕士生导师,研究方向为药用植物资源开发与利用,通信地址:450011 河南郑州市北林路16号 郑州牧业工程高等专科学校科研处。Tel: 0371-65765564, E-mail: wangxinmindr@sina.com.cn。

收稿日期:2009-08-24, **修回日期:**2009-09-28。

0 引言

山药属薯蓣科多年蔓生草本植物薯蓣(*Dioscorea opposita* Thunb.)的根茎,分布广泛,尤以古怀庆府(今河南省武陟、温县、沁阳等地,称为怀山药)出产最为有名。怀山药含淀粉、蛋白质、游离氨基酸等多种成分,具有免疫调节、抗氧化、降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗突变、调节脾胃功能等功效^[1],是中国著名的补益中药,也是传统的保健菜肴。

土壤中的酶和微生物活性高低既可以代表土壤中物质代谢的旺盛程度,也是土壤生态系统发育成熟与否和系统资源能否高效持续利用的重要标志^[2]。由于药用植物次生代谢产物(如黄酮、生物碱、萜类、蒽醌、酚酸类等)丰富,在生长过程中很容易释放到土壤中,从而改变根际土壤理化性质,导致根际这一特殊微生态环境中的土壤微生物和酶活性较非根际有更大变化^[2-4],某些次生代谢物甚至会对植物产生自毒作用^[5],引起植物生长障碍。近年来,人们日益重视研究不同药材根际微生态的变化规律,为了解中药材道地性成因^[6-7]、解决连作障碍^[8-10]、提高药材产量与品质寻找依据,但对怀山药根际微生态的研究尚未涉及。为此,笔者对不同生育期怀山药根际土壤酚酸物质含量、微生物数量及土壤酶活性的变化进行研究,对于丰富怀山药根际微生态方面的内容,并为研究怀山药根际微生态与其品质的相关性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

室内试验于2008年在校实验研究中心进行。

1.2 供试土壤

供试土壤样品采自河南温县黄河滩怀山药种植基地的同一地块,沙壤土,连续5年以上未种植怀山药,前茬作物为玉米。于2008年7月25日开始,以后

每35天采用五点取样法取样一次,采用抖根法获取根际土壤,土样一部分风干后过20目筛备用,测定土壤酶活性;一部分在4℃下保存鲜样,测定微生物类群和数量。对照土来自邻近未种植山药的地块。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤微生物数量的测定 采用混合平板培养记数法,细菌培养采用牛肉膏蛋白胨培养基,真菌采用马丁氏孟加拉红培养基,放线菌采用改良高氏1号培养基。微生物数量=每克根际土壤样品的菌数-每克对照样品的菌数。

1.3.2 土壤酶活性的测定 过氧化氢酶活性采用高锰酸钾滴定法测定,多酚氧化酶活性采用邻苯三酚比色法测定,蔗糖酶活性用3,5-二硝基水杨酸比色法测定,蛋白酶用茚三酮比色法测定,脲酶用茚三酮比色法,磷酸酶用磷酸苯二钠(4-氨基安替比林)比色法^[11]。

1.3.3 土壤酚酸物质含量的测定 采用福林法测定土壤全酚的含量^[12],以单位重量土壤中对羟基苯甲酸的微克数表示。

1.4 数据分析

应用SPSS 11.5软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 根际土壤微生物区系变化

从表1可以看出,根际土壤细菌、放线菌、真菌都随着怀山药生长期的延长呈显著上升趋势,三者11月份的绝对数量分别是7月份的2.11倍、1.70倍、26.19倍,细菌、放线菌、真菌在7月份时分别占总数的78.929%、21.049%、0.022%,11月份时则分别为82.057%、17.657%、0.286%,细菌和真菌所占百分比在逐渐上升,且真菌所占百分比为原来的13倍,其中的黄曲霉在真菌中的比率也从9.529%升高至36.364%,而放线菌所占百分比在逐渐下降。

表1 根际土壤中可培养微生物数量变化

| 采样时间 | 细菌/($\times 10^6$ cfu) | 放线菌/($\times 10^5$ cfu) | 真菌/($\times 10^3$ cfu) | 黄曲霉/($\times 10^2$ cfu) |
|-------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 07-25 | 25.000 cC | 6.667 cA | 0.700 cC | 0.667 cC |
| 08-29 | 28.333 cC | 8.333 bcA | 1.267 cC | 1.333 cC |
| 10-03 | 41.000 bB | 10.000 bcA | 11.667 bB | 26.000 bB |
| 11-07 | 52.667 aA | 11.333 abA | 18.333 aA | 66.667 aA |

注:同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著,同列不同大写字母表示在0.01水平上差异极显著,下同。

2.2 土壤酶活性变化

从表2可知,不同处理的根际土壤中,过氧化氢酶、多酚氧化酶、蛋白酶的变化趋势一致,都是随着怀山药生长期的延长酶活性增强,其11月份的酶活性分别是7月份酶活性的1.34倍、1.88倍、1.75倍,增速均达

到极显著水平;蔗糖酶、磷酸酶、脲酶活性呈下降趋势,各时期均达极显著水平,其中8月份蔗糖酶活性较7月份降幅达59.77%。

2.3 土壤酚酸物质含量变化

怀山药不同生育期根际土壤中酚酸物质含量变

表2 怀山药根际土壤酶活性变化

| 采样时间 | 过氧化氢酶/(ml/g) | 多酚氧化酶/(mg/g) | 蔗糖酶/(mg/g) | 蛋白酶/(mg/g) | 磷酸酶/(mg/g) | 脲酶/(mg/g) |
|-------|--------------|--------------|------------|------------|------------|-----------|
| 07-25 | 6.610 dD | 8.137 dD | 14.077 aA | 0.817 dC | 3.957 aA | 1.373 aA |
| 08-29 | 7.056 cC | 12.420 cC | 5.663 bB | 0.907 cC | 3.633 bB | 1.053 bB |
| 10-03 | 7.667 bB | 13.350 bB | 4.233 cC | 1.143 bB | 3.010 cC | 0.840 cC |
| 11-07 | 8.830 aA | 15.313 aA | 3.240 dD | 1.427 aA | 2.313 dD | 0.607 dD |

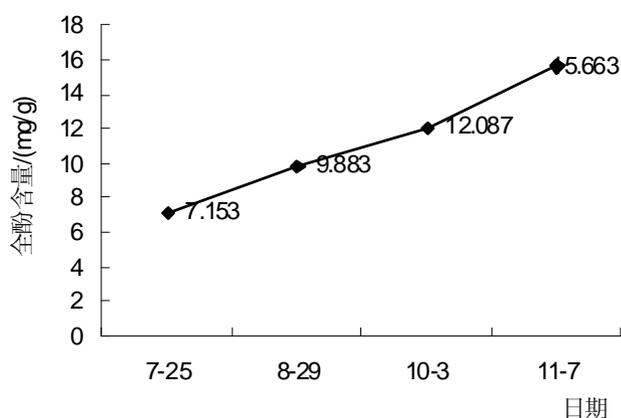


图1 根际土壤中酚类物质含量变化

化如图1。可以看出,随着怀山药块根的膨大,其根际土壤中酚酸物质的含量呈显著升高趋势,且根茎膨大速度越快(9月以后),酚酸物质含量升高越快,最终导致土壤中酚酸物质含量增加了1.2倍。

2.4 酚酸物质含量、微生物区系和土壤酶活性的关系

怀山药根际土壤中酚酸物质含量、微生物区系和土壤酶活性的 Pearson 相关系数见表3。可以看出:根际土壤中酚酸物质的含量与根际土壤中细菌、真菌、放线菌含量和过氧化氢酶、多酚氧化酶、蛋白酶的活性呈正相关性,而与蔗糖酶、磷酸酶和脲酶活性呈负相关;3种土壤微生物含量与过氧化氢酶、多酚氧化酶、蛋白酶活性呈较高的正相关,与蔗糖酶、磷酸酶和脲酶活性呈负相关,表明土壤微生物不是每种根际土壤酶的重要来源。

3 讨论

大量研究表明,忌连作植物连作时根际微生物区系从高肥的“细菌主导型”向低肥的“真菌主导型”转化^[10],而耐连作的牛膝在连作时根际土壤中细菌总数占绝对优势,真菌最少;随着种植年限的增加,细菌的

表3 怀山药根际土壤酚酸物质含量、微生物区系和土壤酶活性的相关性

| | 细菌 | 放线菌 | 真菌 | 过氧化氢酶 | 多酚氧化酶 | 蔗糖酶 | 蛋白酶 | 磷酸酶 | 脲酶 |
|-----|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|---------|---------|
| 酚酸 | .977* | .989* | .952* | .989* | .950* | -.863 | .984* | -.991** | -.989* |
| 细菌 | | .968* | .995** | .987* | .873 | -.764 | .998** | -.997** | -.952* |
| 放线菌 | | | .950* | .963* | .962* | -.901 | .968* | -.981* | -.997** |
| 真菌 | | | | .967* | .832 | -.723 | .987* | -.984* | -.926 |

注: *表示在0.05水平上差异显著(单尾), **表示在0.01水平上差异显著(单尾)。

数量和比例明显增加,土壤由放线菌型向高肥的细菌型过渡^[9]。研究结果显示,怀山药在其生长过程中,根际土壤中细菌、真菌、放线菌数量均呈显著增长趋势,且真菌增长速度最快,表明怀山药根际分泌物可能对根际微生物尤其是真菌具有促进增长的作用;同时,黄曲霉的快速生长可导致病害的加重。但怀山药根际细菌一直占根际土壤微生物的近80%,且绝对数量呈增长趋势,这可能是怀山药连作障碍比怀地黄小的原因之一。

土壤酶是土壤微生物、植物根系和土壤中其他生物细胞产生的胞内酶和胞外酶的总称,其活性反映了土壤中各种生物化学过程的强度和方向,其中土壤过氧化氢酶、蔗糖酶、磷酸酶、脲酶、蛋白酶和多酚氧化酶活性之间的关系及总体活性对评价土壤肥力水平有重

要意义。土壤中微生物种类、水气热状况、酸碱度、结构组成、养分丰缺、污染程度及培肥方式等都显著地影响着土壤酶活性,如在土壤表层脲酶活性较高,随着土壤剖面加深而降低;过氧化氢酶活性与作物根系距离越近,活性越小;离作物根系越远,活性越大;保护性耕作与传统耕作方式相比,对土壤的干扰较小,表土中的土壤酶活性较高^[13]。试验中,怀山药根际土壤过氧化氢酶、多酚氧化酶、蛋白酶活性增强,蔗糖酶、磷酸酶、脲酶活性下降,是否与山药在栽培前的深度旋耕(深1.5 m左右)、前期取土样深度较浅后期较深等因素有关尚需进一步研究。

酚酸化合物通过植物残体分解、根系分泌等途径进入土壤,可直接影响作物根系细胞膜的特性,或者通过改变土壤微生物类群等,进而对作物产生抑制作用,

是使作物产生连作障碍的重要因素之一^[14]。目前从根系分泌物中发现的酚酸类化合物有对羟基苯甲酸、咖啡酸、肉桂酸、香豆酸、阿魏酸、五倍子酸、香草酸、氢氰酸、苯甲酸等^[14-16]。同时进入土壤中的作物残体,在生物与非生物因素的作用下不断地分解转化,生成多种中间产物,酚酸物质是重要的中间产物之一^[14,17]。笔者得到的土壤酚酸物质含量的变化趋势与马云华等的结果一致^[15],但对来源和种类尚需进一步研究。

土壤中酚酸物质、土壤微生物和酶活性有密切的相互关系。酚酸成分和数量可以直接影响根际微生物的区系、数量和活性^[18-19],同时微生物类群和数量也可影响酚酸物质的种类和浓度,如在黄瓜幼苗根际施加利用酚酸细菌可以减少由于酚酸混合物引起的生长抑制^[20]。研究结果显示,怀山药根际土壤中酚酸物质的含量与细菌、真菌、放线菌数量呈显著正相关,表明在怀山药生长过程土壤微生物数量的快速增长可适当降低土壤酚酸物质含量的积累,从而减轻酚酸物质对怀山药生长的抑制作用,这可能是怀山药连作障碍比怀地黄小的原因之一。低浓度酚酸类物质对多酚氧化酶、过氧化氢酶、蔗糖酶、脲酶和蛋白酶具有激活作用,而高浓度酚酸类物质则显著降低酶活性^[15-16],酚酸物质对不同的酶的激活与抑制浓度拐点可能不同。研究结果表明,酚酸物质对蔗糖酶、磷酸酶和脲酶的抑制浓度低于对过氧化氢酶、多酚氧化酶、蛋白酶的抑制浓度,其机理有待进一步研究。一般而言,特定的土壤酶活性与细菌和真菌类群关系密切,放线菌能释放降解腐殖质和木质素的过氧化物酶、酯酶和氧化酶等,细菌对其他微生物种群具有明显的抑制作用,但提高了土壤酶活性^[18]。研究中3种土壤微生物含量与过氧化氢酶、多酚氧化酶、蛋白酶活性呈较高的正相关与此观点一致;3种土壤微生物含量而与蔗糖酶、磷酸酶和脲酶活性呈负相关,可能与这3种酶对怀山药根际分泌物尤其是酚酸类物质比较敏感等因素有关。

参考文献

- [1] 袁书林.山药的化学成分和生物活性作用研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(3):176-179.
- [2] Morgan J A W, Bending G D, White P J. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere [J]. J. Experi Botany,2005,56:417.
- [3] Ni G Y,Song L Y,Zhang J L,et al. Effects of root extracts of Mikania micrantha HBK on soil microbial community [J]. J. Allelopathy, 2006,17(2):247-254.
- [4] Park S W, Stevens N M, Vivanco J M, et al. Enzymatic specificity of three ribosome inactivating proteins against fungal ribosomes and correlation with antifungal activity[J]. Planta,2002,216(2): 227-234.
- [5] 吴凤芝,赵凤艳.根系分泌物与连作障碍[J].东北农业大学学报, 2003,34(1):114-118.
- [6] 郑艳.中药材的地道性与根际土壤微生物[J].现代中药研究与实践,2007,21(6):61-63.
- [7] Albareda M, Dardanelli M S, Sousa C, et al. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots[J]. FEMS Microbiol Lett,2006,259:67-73.
- [8] 陈慧,郝慧荣,熊君,等.地黄连作对根际微生物区系及土壤酶活性的影响[J].应用生态学报,2007,18(12):2755-2759.
- [9] 郝慧荣,李振方,熊君,等.连作怀牛膝根际土壤微生物区系及酶活性的变化研究[J].中国生态农业学报,2008,16(2):307-311.
- [10] 李琼芳.不同连作年限麦冬根际微生物区系动态研究[J].土壤通报,2006,37(3):563-567.
- [11] 关松荫.土壤酶及其研究法[M].北京:农业出版社,1986:59-210.
- [12] 姚槐应,黄昌勇.土壤微生物生态学及其实验技术[M].北京:科学出版社,2006:186-191.
- [13] 孟立君.设施不同种植年限土壤酶活性及其与土壤肥力关系的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2004:13-18.
- [14] 张淑香,高子勤.连作障碍与根际微生态研究 II.根系分泌物与酚酸物质[J].应用生态学报,2000,11(1):152-156.
- [15] 马云华,王秀峰,魏珉,等.黄瓜连作土壤酚酸类物质积累对土壤微生物和酶活性的影响[J].应用生态学报,2005,16(11):2149-2153.
- [16] 吕卫光,沈其荣,余廷园,等.酸化化合物对土壤酶活性和土壤养分的影响[J].植物营养与肥料学报,2006,12(6):845-849.
- [17] 王明道,吴宗伟,原增艳,等.怀地黄连作对土壤微生物区系的影响[J].河南农业大学学报,2008,42(5):532-538.
- [18] 薛成玉,吴凤芝,王洪成,等.浅论酚酸与土壤微生物之间的相互作用[J].黑龙江农业科学,2005(3):45-47.
- [19] 谭秀梅,王华田,孔令刚,等.杨树人工林连作土壤中酚酸积累规律及对土壤微生物的影响[J].山东大学学报:理学版,2008,43(1): 14-19.
- [20] 吕卫光,张春兰,彭宇,等.外源苯丙烯酸抑制连作黄瓜生长的机制初探[J].中国蔬菜,2001(3):10-12.