

## 微生物降解褐煤产生的黄腐酸对大豆种子萌发及主要抗氧化酶活性的影响

栾 白,高同国,姜 峰,李宝珍,杨金水,袁红莉

(农业生物技术国家重点实验室,农业部农业微生物资源及其利用重点开放实验室,中国农业大学 生物学院,北京 100193)

**摘 要:**研究了微生物降解褐煤产生的黄腐酸(FA)对大豆萌发过程中过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的影响,以期揭示 FA 促进种子萌发的机理。结果表明:适宜浓度 FA 可以提高大豆萌发率,显著增加种子 POD、CAT 及 SOD 的活性。FA 浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,CAT、SOD 活性分别提高 32.15%、24.5%;FA 浓度为  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,大豆萌发率比对照提高 34.6%,并且 POD 活性增加 19.92%。而高浓度的黄腐酸对大豆萌发及抗氧化酶活性产生抑制作用。FA 表现出类似生长调节剂的性质,适宜浓度的黄腐酸能提高大豆种子的萌发率,显著提高其抗氧化酶的活性,对种子萌发起到促进作用。

**关键词:**大豆;褐煤黄腐酸;微生物降解;抗氧化酶

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0607-04

## Effect of Fulvic Acid (FA) from Lignite Degraded on Germination Rate and Activities of Main Antioxidases in Soybean Seedlings

LUAN Bai, GAO Tong-guo, JIANG Feng, LI Bao-zhen, YANG Jin-shui, YUAN Hong-li

(State Key Lab for Agrobiotechnology, Key Laboratory of Agro-Microbial Resource and Application, Ministry of Agriculture College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The antioxidase system can remove reactive oxygen and play an important role in the process of soybean germination. To study how fulvic acid (FA), produced by microbial degraded lignite, can improve the germination, Spectrophotometry and nitroblue tetrazolium test (NBT) illumination method were taken to detect the activities of peroxidase (POD), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). The results showed when the concentration of FA was  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , the activities of CAT and SOD were improved by 32.15% and 24.5%, respectively. The germination ratio increased by 34.6% under a condition where the concentration of FA was  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , and the activity of POD was also increased by 19.92% under this FA concentration. In contrast with the promotion effect, solution with high FA concentration can restrain the activities of antioxidase. The study has shown that appropriate concentration of FA from lignite degraded by microorganism can improve the germination of soybean and increase the activities of POD, CAT and SOD significantly. FA is something like plant growth regulator, the appropriate concentration of FA can improve the germination ratio of soybean seed and improve its activities of antioxidase apparently.

**Key words:** Soybean; Fulvic acid; Biodegradation; Antioxidase

植物细胞内产生的超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^-$ ),能转化为活性氧,使细胞内氧代谢平衡失调,细胞膜会因此而被氧化,蛋白质和核酸也会受到活性氧不同程度的损伤。细胞内存在清除活性氧的抗氧化物酶系统,该系统主要包括过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)。抗氧化物酶系统可以降低细胞内 $\text{O}_2^-$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的含量,从而减小活性氧对细胞产生的危害<sup>[1]</sup>。在种子萌发过程中,如遭遇低温、干旱等不利条件胁迫,细胞内自由基和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 会大量增加,抗氧化酶系统能清除

细胞内过多的活性氧,保证种子正常萌发<sup>[2]</sup>。

腐植酸是微生物分解、转化动植物的残骸后,再经过一系列的地球物理化学过程转变而来的一类有机物质。研究发现,当土壤中含有一定浓度的腐植酸时,能够促进植物的生长<sup>[3-4]</sup>。据相关统计,地球上蕴含着数以万亿吨计的腐植酸,其作用涉及到地球化学循环的多个方面,如碳循环、矿物迁移积累、土壤肥力、生态平衡等<sup>[5]</sup>。具体功效表现为增强土壤活力、促进植物生长、增强植物根系活力等。我国有丰富的低热量煤(如:褐煤、风化煤等)

收稿日期:2010-03-05

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA10A213);国家基础科学人才培养基金资助项目(J0730639);科技部成果转化资助项目(2008360075)。

第一作者简介:栾白(1987-),男,在读学士,研究方向为环境微生物学。E-mail:beibe6688983@yahoo.com.cn。

通讯作者:袁红莉,教授。E-mail:hlyuan@cau.edu.cn。

的资源,通过化学提取法获得的褐煤腐植酸在农业、医药上具有重要用途。与化学提取法相比,通过微生物降解褐煤产生的腐植酸分子量更小,具有更高的生物活性<sup>[5]</sup>。黄腐酸(FA)是腐植酸中分子量最低、颜色最浅、并且具有水溶性的组分。黄腐酸有多个功能基团,生理活性比较强,在农业和医药等相关领域的用途更为广泛<sup>[7-9]</sup>。研究表明,黄腐酸能缩小叶片气孔开张度、促进根系发育、增加叶绿素含量、影响多种酶的活性、增强作物抗逆能力、提高作物产量和改善产品品质等诸多功能<sup>[10-12]</sup>。微生物降解褐煤产生黄腐酸技术大大提高了褐煤中黄腐酸的产量,并且田间试验表明,大豆出苗 3 d 后,使用 5 mL 500 mg · kg<sup>-1</sup> 的黄腐酸根灌可以使大豆增产 12.6%<sup>[5]</sup>。该试验以微生物降解褐煤产生的黄腐酸为材料,研究了其对大豆种子萌发和抗氧化酶系统活性的影响,以期为进一步明确微生物降解褐煤产生的 FA 对大豆生长的调节作用,为有效利用褐煤资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

植物材料为京黄 1 号大豆。黄腐酸是褐煤经微生物降解后获得<sup>[13]</sup>,产品红外光谱分析表明,该黄腐酸产品在 1 720、1 620、1 400、1 225 cm 处有吸收峰,具有黄腐酸典型吸收光谱特征<sup>[14]</sup>。从大豆种子中挑选出大小相似,籽粒饱满的种子 600 粒,用 95% 的乙醇浸泡 30 s 后,转入 1‰ 升汞中消毒 5 min。用无菌水反复冲洗干净后,置于无菌水中浸泡 12 h。以 100 粒大豆为一组,放入铺有双层滤纸中的培养皿中,滤纸分别用 5 mL 蒸馏水以及不同浓度(100、200、300、600、1 000 mg · kg<sup>-1</sup>)的黄腐酸溶液(过滤除菌)浸湿,置于 20℃ 的恒温培养箱中暗环境培养。在培养过程中,每隔 2 d 向各培养皿中补加相同剂量的无菌水,使滤纸保持湿润。培养至第 7 天对各培养皿中发芽率进行统计,并取种子萌发后的胚根部分进行抗氧化酶活性的测定,3 次重复。

### 1.2 测定项目与方法

POD 活性测定采用愈创木酚法<sup>[15]</sup>,以 1 min 内 OD<sub>470</sub> 变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活性单位(U);CAT 活性测定采用紫外吸收法<sup>[16]</sup>,以 1 min 内  $\Delta A_{240}$  减少 0.1 的酶量为 1 个过氧化氢酶活性单位(U);SOD 活性测定采用 NBT(氮蓝四唑)光化还原法<sup>[17]</sup>,以抑制 NBT 光还原 50% 的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件中的 LSD 法比较酶活值的

变化以及分析显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄腐酸对大豆种子萌发的影响

图 1 是恒温培养至第 7 天各组大豆的萌发率。在一定范围内,随着黄腐酸浓度的升高,种子的萌发率逐渐升高,在浓度达到 200 mg · kg<sup>-1</sup> 左右时,萌发率达到最高值 87.5%。比对照组提高了 34.6%;当黄腐酸浓度加大,大豆种子萌发率逐渐下降,当 FA 的浓度达到 1 000 mg · kg<sup>-1</sup> 时,萌发率为 43.7%,比对照组下降了 32.8%,表现出明显的抑制效果。

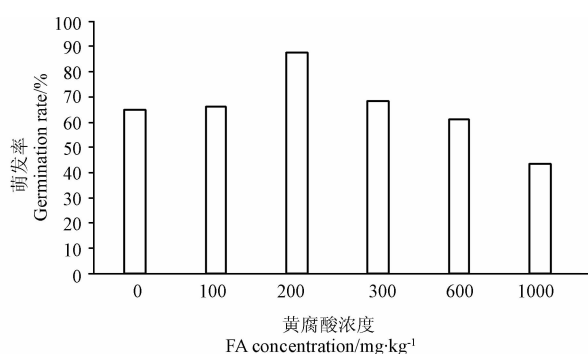


图 1 黄腐酸处理对大豆种子萌发的影响

Fig. 1 Effect of fulvic acid from lignite degraded on soybean germination rate

### 2.2 黄腐酸对萌发大豆抗氧化酶活性的影响

2.2.1 POD 活性 从图 2 可以看出,POD 活性随黄腐酸浓度的增加呈先升高后降低的变化趋势。具体表现为:黄腐酸的浓度为 100 mg · kg<sup>-1</sup> 时,POD 的活性为 45.10 U,与对照组酶活 43.12 U 相比,酶活基本保持不变。黄腐酸的浓度增加到 200 mg · kg<sup>-1</sup> 时,POD 的活性处于最高水平(51.71 U),比对照组高出 19.92%。但随着黄腐酸浓度进一步增大,则逐步表现出抑制作用。黄腐酸浓度为 600 和 1 000 mg · kg<sup>-1</sup> 时,POD 的酶活性分别下降到 32.1 U 和 27.3 U,与对照组相比,分别显著减少 25.56% 和 36.39%。

2.2.2 CAT 活性 CAT 活性的变化趋势与 POD 相同,但酶活性最高时的 FA 浓度与 POD 的有所不同。具体表现为:当 FA 的浓度为 100 mg · kg<sup>-1</sup> 时,CAT 的活性增加迅速,并达到最高值 104.25 U,相比对照组提高了 23.80%。当黄腐酸的浓度为 200 mg · kg<sup>-1</sup> 时,CAT 的酶活为 86.13 U,下降了 17.38%,但与对照相比差异并不显著。当 FA 的浓度达到 300 mg · kg<sup>-1</sup> 时,FA 对 CAT 表现出抑制作用,且随着 FA 浓度的加大,抑制作用越来越明显。当 FA 浓度为 600 和 1 000 mg · kg<sup>-1</sup> 时,CAT 的酶

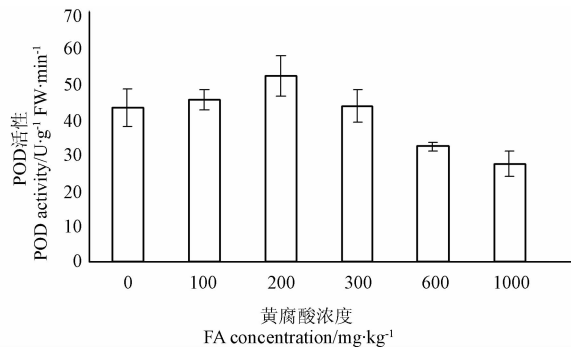


图2 黄腐酸处理对萌发大豆种子 POD 活性的影响

Fig. 2 Effect of fulvic acid from lignite degraded on POD activity of soybean seedlings

活性分别是 73.80 U 和 53.88 U,与对照组相比分别减少 12.35% 和 34.83%。

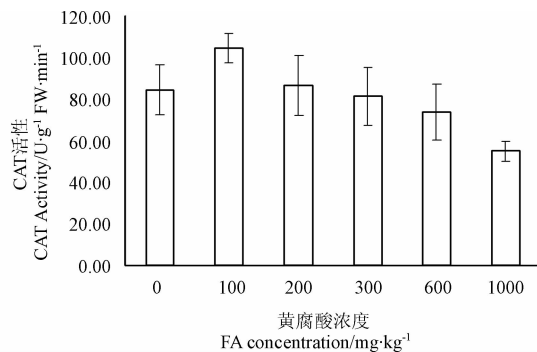


图3 黄腐酸处理对萌发大豆种子 CAT 活性的影响

Fig. 3 Effect of fulvic acid from lignite degraded on CAT activity of soybean seedlings

2.2.3 SOD 活性 从图 4 可以看出,SOD 活性的变化趋势及达到最高酶活时的 FA 浓度与 CAT 活性相同,并且 3 种酶的活性都表现出先升高后降低的趋势。具体表现为:在 FA 的浓度为 100 和 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,SOD 的酶活分别为 18.30 和 17.37 U,保持着较高的活性,与对照组 12.37 U 相比,显著提高了 47.93% 和 40.42%。当 FA 的浓度达到 300  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时开始表现出抑制作用,浓度为 600 和 1 000  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,SOD 的活性分别为 7.15 和 2.86 U,与对照组相比,分别下降了 42.20% 和 76.88%,显著抑制了 SOD 的活性。

### 3 讨论

黄腐酸促进植物生长,提高植物抗逆能力在其它非豆科作物上也有类似研究。程扶玖等在低温胁迫条件下发现黄腐酸可提高油菜的光合速率和根系活力,增强油菜幼苗 SOD 及 CAT 活性,减少低温胁迫对细胞的破坏<sup>[18]</sup>。陈玉玲等研究发现干旱条件下 FA 能提高冬小麦幼苗 SOD 和 POD 活性<sup>[19]</sup>。结果表明在一定浓度范围内,黄腐酸提高了大豆的萌发率和抗氧化酶活性,特别当褐煤黄腐酸

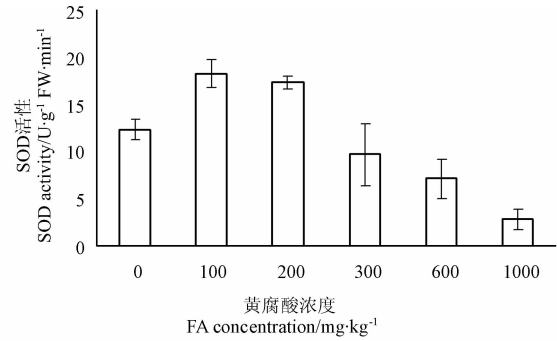


图4 黄腐酸处理对萌发大豆种子 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effect of fulvic acid from lignite degraded on SOD activity of soybean seedlings

的浓度在 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  或 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,3 种抗氧化酶的活性均明显高于对照组。但高浓度 FA 对大豆的萌发及抗氧化酶活性均表现出抑制作用。早在 19 世纪前期就有关于腐植质是生长调节类似物的假说,并且 Muscolo 等的研究表明,低分子量的腐植酸具有类似 IAA 的性质<sup>[20]</sup>,该研究支持了褐煤黄腐酸作为生长调节剂类似物的作用,即高浓度 FA 减弱、甚至抑制抗氧化酶的酶活。同样,高同国等对玉米幼苗株高、叶绿素及根系活力的研究结果也支持了微生物降解褐煤产生的黄腐酸有类似生长调节剂作用这一观点<sup>[21]</sup>。但由于黄腐酸结构比较复杂,其能作为生长调节剂类似物及对抗氧化酶作用的分子机理尚不清楚,还需要进一步研究。

### 4 结论

褐煤经微生物降解提取得到的黄腐酸对不同抗氧化酶活性的影响浓度有所不同。当黄腐酸浓度为 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,CAT 和 SOD 活性达到最高值,而大豆萌发率及 POD 活性的最高值则出现在黄腐酸的浓度为 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。大豆萌发率及各抗氧化酶活性均表现为先升高后降低的趋势,即低浓度黄腐酸促进大豆萌发及增强抗氧化酶活性,高浓度的黄腐酸表现出相反的作用。说明褐煤黄腐酸作为小分子物质可以用做生长调节剂类似物应用于农业生产,但不同作物间黄腐酸的最适作用浓度还需进一步探究。

### 参考文献

- [1] 张立军,宋广州,白霜,等.  $\text{H}_2\text{O}_2$  对不同大豆品种低温萌发及主要抗氧化酶活性的影响[J]. 大豆科学,2008,27(1):97-105. (Zhang L J, Song G Z, Bai S, et al. Effect of exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  on germination rate and activities of main antioxidantase in soybean (*Glycine max* L.) seedlings under low temperature[J]. Soybean Science, 2008,27(1):97-105.)
- [2] 郝晶,张立军,谢甫绶. 低温对大豆不同耐冷性中萌发期保护

- 酶活性的影响[J]. 大豆科学, 2007, 26(2): 171-175. ( Hao J, Zhang L J, Xie F T. Effects of the low temperature on defense enzyme activities of different chilling-tolerant soybean cultivars during the germination [J]. Soybean Science, 2007, 26(2): 171-175. )
- [3] Adani F, Genevini P, Zaccheo P, et al. The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition[J]. Journal Plant Nutrure, 1998, 21(3): 561-575.
- [4] 程渡, 彭玉梅, 崔鲜一, 等. 黄腐酸旱地龙对农作物、牧草应用效果试验[J]. 腐植酸, 1996(3): 33-34. ( Cheng D, Peng Y M, Cui X Y, et al. The effect test of applying handilong and fulvic acid to crops and Herd's grass[J]. Humic Acid, 1996(3): 33-34. )
- [5] 袁红莉, 姜峰, 高同国. 微生物降解褐煤产生黄腐酸的研究[J]. 腐植酸, 2009(5): 1-4. ( Yuan H L, Jiang F, Gao T G. Study on biotechnology application in producing fulvic acid by degraded lignite [J]. Humic Acid, 2009(5): 1-4. )
- [6] 袁红莉, 王凤芹, 李宝珍, 等. 微生物降解褐煤产生的腐殖酸生物活性研究[J]. 土壤学报, 2002, 39(增刊): 129-134. ( Yuan H L, Wang F Q, Li B Z, et al. The biological active research of humic acid from lignite degraded [J]. Acta Pedologica Sinica, 2002, 39(Suppl): 129-134. )
- [7] 袁红莉, 周希贵, 陈文新, 等. 微生物降解褐煤产生的腐植酸化学特性研究[J]. 环境化学, 2000, 19(3): 240-243. ( Yuan H L, Cai Y Q, Zhou X G, et al. Study on chemical properties of humic acid of microboal degraded lignite [J]. Environmental Chemistry, 2000, 19(3): 240-243. )
- [8] 朱京涛, 曹霞, 王学东. 生物黄腐酸对番茄幼苗发育及产量品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(3): 964-965, 968. ( Zhu J T, Cao X, Wang X D. Study on effects of the biological humic acid on seedlings growth and quality of tomato [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(3): 964-965, 968. )
- [9] 苏桂华, 王云忠, 藩世华. 黄腐酸药浴治疗良性关节肿痛 328 例[J]. 腐植酸, 1996(2): 35-45. ( Su G H, Wang Y Z, Pan S H. The 328th case of fulvic acid dipping treatment to cure the swelling and pain of benign joint[J]. Humic Acid, 1996(2): 35-45. )
- [10] 李绪行, 邵莉楣, 殷蔚蕙, 等. 黄腐酸和汪平酸对小麦种子萌发与幼苗生长及绿豆下胚轴生根的影响[J]. 植物学通报, 1991, 8(3): 51-55. ( Li X H, Shao L M, Yin W Y, et al. The influences of fulvic acid and wangping acid on seed germination and seedling growth of wheat and rhizogenic action of mung bean [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1991, 8(3): 51-55. )
- [11] 李绪行, 殷蔚蕙, 邵莉楣, 等. 黄腐酸增强小麦抗旱能力的生理生化机制初探[J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 44-46. ( Li X H, Yin W Y, Shao L M, et al. Preliminary investigation of physiological and biochemical mechanisms on drought-resistance of wheat enhanced by leaf-spraying fulvic acid [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1992, 9(2): 44-46. )
- [12] 王高伟, 胡光洲, 孔倩, 等. 煤炭腐植酸的基本性能及其工农业应用[J]. 煤炭技术, 2007, 26(11): 111-114. ( Wang G W, Hu G Z, Kong Q, et al. Properties of humic acid in coal and its applications in industry and agriculture[J]. Coal Technology, 2007, 26(11): 111-114. )
- [13] 袁红莉, 陈文新. 微生物降解生产黄腐酸方法: 中国, 02158189.4[P]. 2004-07-07. ( Yuan H L, Chen W X. Methods of manufacturing fulvic acid by micro-biological degradation; PR China, 02158189.4[P]. 2004-07-07. )
- [14] 张德和. 风化煤黄腐酸的结构表征[J]. 化学学报, 1981, 39(5): 401-408. ( Zhang D H. Structure characterizations of weathered coal fulvic acid[J]. Chemistry Academic Journal, 1981, 39(5): 401-408. )
- [15] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 154-156. ( Zhang Z L. Guidance of plant physiology experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 154-156. )
- [16] Kraus T E, Fletcher R A. Wheat seedlings from heat and paraquat injury is detoxification of active oxygen involved[J]. Plant Cell Physiology, 1994, 35(1): 45-52.
- [17] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴, 等. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990: 242-245. ( Zhu G L, Zhong H W, Zhang A Q, et al. Guidance of plant physiology experiment [M]. Beijing: Peking University Press, 1990: 242-245. )
- [18] 程扶玖, 杨道麒, 吴庆生. 黄腐酸对油菜种子萌发、氮素吸收及抗寒性的生理效应[J]. 安徽农业大学学报, 1995(2): 123-128. ( Cheng F J, Yang D Q, Wu Q S. Physiological effects of fulvic acid (FA) on seed germination, nitrogen uptake and cold resistance of rape [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 1995(2): 123-128. )
- [19] 陈玉玲, 曹敏, 李云萌. 干旱条件下黄腐酸对冬小麦幼苗中内源 ABA 和 IAA 以及 SOD 和 POD 活性的影响[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(4): 311-314. ( Chen Y L, Cao M, Li Y Y. Effect of fulvic acid on aba, iaa and activities of superoxide dismutase and peroxylase in winter wheat seedling under drought condition [J]. Plant Physiology Communications, 2000, 36(4): 311-314. )
- [20] Muscolo A, Felici M, Concheri G, et al. Effect of earthworm humic substances on esterase and peroxidase activity during growth of leaf explants of *Nicotiana plumbaginifolia*[J]. Biology and Fertility of Soils, 1993, 15: 127-131.
- [21] 高同国, 姜峰, 李召虎, 等. 微生物降解褐煤产生的黄腐酸对玉米幼苗生长的影响[J]. 腐植酸, 2009(1): 14-18. ( Gao T G, Yang J S, Yuan H L. Effects of fulvic acid from lignite degraded by microbial on growth of maize seedling [J]. Humic Acid, 2009(1): 14-18. )