

乙酸盐对几种地带性土壤吸附 Bt 毒素的影响^{*}

付庆灵 向爱华 胡红青[†] 黄巧云

(华中农业大学农业部亚热带农业资源与环境重点实验室, 武汉 430070)

EFFECT OF ACETATE ON ADSORPTION OF BACILLUS THURINGIENSIS INSECTICIDAL TOXIN BY SEVERAL ZONAL SOILS IN CENTRAL AND SOUTHERN CHINA

Fu Qingling Xiang Aihua Hu Hongqing[†] Huang Qiaoyun

(Key Laboratory of Subtropical Agriculture Resource and Environment, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

关键词 *Bacillus thuringiensis* 毒素; 乙酸盐; 土壤胶体; 吸附; 解吸
中图分类号 S153.3 文献标识码 A

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 近缘于蜡状芽胞杆菌, 革兰氏染色阳性, 在其芽孢形成过程中产生 Bt 杀虫晶体蛋白。Bt 是目前应用最广的生物杀虫剂之一, 其杀虫原理也被广泛应用于转基因抗虫育种实践中。

转 Bt 基因作物的外源基因表达产物 Bt 杀虫晶体蛋白可通过根系分泌物或作物残茬等方式进入土壤^[1,2], 其残留会影响土壤生态系统平衡^[3]。纯化的 Bt 毒蛋白可被黏土矿物、腐殖酸和有机矿物质复合体等活性颗粒快速吸附, 且不易解吸^[3~5]。吸附后毒素蛋白仍具有杀虫活性, 毒性甚至较游离态的还强^[6]; 红外光谱和 X 射线衍射表明, 吸附后毒素蛋白结构仅有微小变化^[4]。毒素一旦被土壤吸附, 就会对微生物分解产生抗性, 至少保持 8 个月的杀虫活性^[4]。Bt 毒素的吸附—解吸行为可改变其存在形态和杀虫活性, 而低分子量有机酸盐能影响蛋白质的吸附解吸行为^[7,8]。但目前有关 Bt 杀虫蛋白在土壤中的吸附、转化及环境效应, 特别是有机酸盐对毒素残留的影响, 尚无系统研究。

本文研究溶解状态的 Bt 毒蛋白在中南地区几种典型土壤 (红壤、砖红壤、黄棕壤、黄褐土) 胶体上的吸附特性, 着重比较乙酸盐对 Bt 毒蛋白吸附、解吸的影响和不同土壤胶体对 Bt 毒素蛋白的吸附能力差异,

为揭示 Bt 毒蛋白环境安全问题提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 苏云金芽胞杆菌杀虫蛋白制备

将 Bt 工程菌株 (库斯塔克亚种) 经 BDFO-5000 全自动发酵罐 (美国 NBS) 制备的发酵液喷雾干燥得到原粉。取苏云金芽胞杆菌原粉若干, 用去离子水洗 3 次。将洗后的沉淀配成水悬液, 充分分散, 用 1 mol L^{-1} NaOH 调 pH 至 11~12, 4~5 h 后再用 6 mol L^{-1} HCl 调 pH 至 7~8, 离心去沉淀。上清液用 25% 乙酸调 pH 至 4.4, 离心, 得杀虫蛋白无定形沉淀。用去离子水反复洗涤直至无 Cl^- , 冷冻干燥, 低温保存。经 SDS-PAGE 电泳测得提取的 Bt 杀虫蛋白分子量约为 66 kDa。

1.2 土壤胶体制备

红壤、砖红壤、黄棕壤和黄褐土分别采自湖南长沙、海南詹县、湖北武汉和枣阳。土样用超声波分散后, 按虹吸法吸取 $< 2 \mu\text{m}$ 的胶体悬液, CaCl_2 絮凝, 收集沉淀。用去离子水和 95% 乙醇洗涤至无 Cl^- , 烘干, 研细, 过 100 目筛备用。供试土壤胶体的基本性质见表 1。

* 教育部高校博士点基金项目 (20050504011) 和国家自然科学基金项目 (40671087) 资助

† 通讯作者, E-mail: hqhu@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 付庆灵 (1980~), 湖北长阳人, 博士研究生, 研究方向为土壤表面化学

收稿日期: 2006-12-13; 收到修改稿日期: 2007-04-16

表 1 供试土壤的基本性质

土壤	有机质 (g kg ⁻¹)	CEC (cmol kg ⁻¹)	等电点 PZC	A _d (g kg ⁻¹)	Fe _d (g kg ⁻¹)	矿物组成
砖红壤	19.3	13.3	3.85	10.3	59.9	高岭石 90%、铁铝氧化物 5%
红壤	13.8	12.8	3.27	9.1	54.4	高岭石 45%、伊利石 40%、1.4 nm 矿物 10%
黄棕壤	12.6	43.5	2.9	7.1	53.4	伊利石 70%、高岭石 30%
黄褐土	15.1	63.3	—	4.2	35.3	伊利石 75%、高岭石 20%、蛭石 5%

注: A_d, Fe_d指 DCB 提取 Al、Fe 含量

1.3 吸附试验

将 Bt 杀虫晶体蛋白溶解于 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液中,离心去除不溶成分。等温吸附实验控制蛋白浓度在 0.1 ~ 1.0 mg ml⁻¹;乙酸盐影响实验控制蛋白浓度为 0.2 mg ml⁻¹,乙酸盐 (pH 7.0) 浓度 0 ~ 120 mmol L⁻¹,土壤胶体浓度为 0.5 mg ml⁻¹,体系总体积为 3 ml。蛋白和土壤胶体的混合物在恒温摇床上于 (25 ± 1) 振荡 2 h 后取出,离心,280 nm 处测定上清液的吸光度。同时设置对照。以牛血清蛋白制备标准曲线,计算蛋白在土壤胶体上的吸附量。

1.4 土壤胶体吸附态 Bt 蛋白的解吸

控制乙酸盐浓度为 10 mmol L⁻¹,胶体与蛋白 2:1 浓度比进行吸附,同时设置不加乙酸盐的空白吸附,各设 4 次重复。吸附平衡后离心,沉淀用 1 mol L⁻¹ NaCl 解吸 1 次, pH 7.0 磷酸盐缓冲液 (Na₂HPO₄·NaH₂PO₄) 解吸 2 次,解吸平衡时间均为 1 h,上清液在 280 nm 比色测定毒素含量。

2 结果与分析

2.1 Bt 毒素蛋白在土壤胶体上的等温吸附

由图 1 可知,土壤胶体对 Bt 毒素的吸附量随着毒素浓度升高,最初上升很快,随后缓慢增加并逐渐达到饱和。当加入毒素浓度为 1.0 mg ml⁻¹ 时,砖

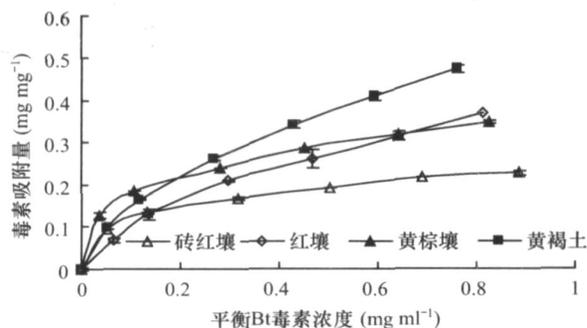


图 1 Bt 毒素在供试土壤胶体上的吸附等温线

红壤和黄棕壤胶体对毒素的吸附基本达到饱和,吸附量分别为 0.23 和 0.35 mg mg⁻¹,红壤和黄褐土胶体吸附未饱和,吸附量为 0.37 和 0.47 mg mg⁻¹。

由表 2 可见,毒素在土壤胶体表面的等温吸附曲线可用 Langmuir 方程 $= X_m KC / (1 + KC)$ 拟合 ($R^2 > 0.97, n = 6$)。供试土壤胶体对 66 kDa 毒素最大吸附量 (X_m) 为黄褐土 (0.72 mg mg⁻¹) > 红壤 (0.61 mg mg⁻¹) > 黄棕壤 (0.36 mg mg⁻¹) > 砖红壤 (0.24 mg mg⁻¹),而吸附结合能常数 K 值表现为砖红壤 > 黄棕壤 > 黄褐土 > 红壤,表明 Bt 毒素在砖红壤表面吸附量低,但结合更紧密。

表 2 土壤胶体对 Bt 毒素等温吸附的 Langmuir 方程 $= X_m KC / (1 + KC)$ 参数

土壤	X_m (mg mg ⁻¹)	K	R^2
砖红壤	0.24	10.3	0.98
红壤	0.61	1.80	0.99
黄棕壤	0.36	10.1	0.97
黄褐土	0.72	2.32	0.99

注: X_m 为 Bt 毒素的最大吸附量; K 为结合能常数; R^2 为相关系数

2.2 乙酸盐对不同土壤胶体吸附 Bt 毒素的影响

由图 2 可以看出,在乙酸盐浓度为 0 时,黄褐土对 Bt 毒素的吸附量为 0.21 mg mg⁻¹,其余 3 种供试土壤的吸附量均小于 0.20 mg mg⁻¹。当乙酸盐的浓度增加至 5 mmol L⁻¹ 时,红壤和黄褐土对蛋白的吸附量均达最低值,分别为 0.08 和 0.13 mg mg⁻¹。而黄棕壤和砖红壤分别在乙酸盐浓度为 10 和 20 mmol L⁻¹ 时对 Bt 毒素的吸附最小,吸附量分别为 0.12 和 0.08 mg mg⁻¹。随乙酸盐浓度的继续增加,土壤胶体对蛋白的吸附量增大,乙酸盐表现出促进毒素在土壤胶体表面的吸附,但仍小于无乙酸盐加入时的吸附量。显然,乙酸盐抑制土壤胶体对毒素的吸附,特别是在低浓度 (0 ~ 5 mmol L⁻¹) 时抑制作用更明显。其中,对黄褐土的抑制作用最强,吸附量降低了 0.07 mg mg⁻¹,其次是黄棕壤和砖红壤,

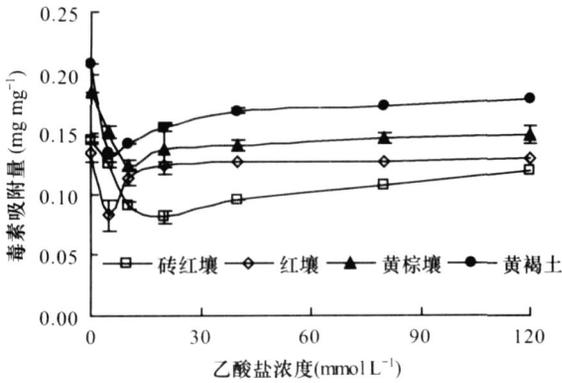


图 2 乙酸盐对土壤吸附 Bt 毒素的影响

吸附量均减少了 0.06 mg mg^{-1} , 而红壤吸附量减少幅度最小, 为 0.05 mg mg^{-1} 。

2.3 NaCl和磷酸盐溶液对土壤胶体吸附态 Bt 毒素的解吸

由表 3 可见, 对照处理中, NaCl 溶液对黄棕壤和砖红壤吸附毒素的解吸率分别为 3.3% 和 3.0%, 而对红壤和黄褐土吸附态毒素解吸率为 0% 和 1.3%, 表明 NaCl 很难解吸土壤胶体吸附态 Bt 毒素。磷酸盐缓冲液对供试土壤吸附毒素的解吸率以黄棕壤最大, 为 13.1%, 其次为黄褐土和红壤, 分别为 10.2% 和 6.9%, 而砖红壤吸附的毒素基本上不能被解吸, 解吸率仅为 0.2%。

乙酸盐体系中, NaCl 对吸附态毒素的解吸率为 2.3%~5.0%, 且磷酸盐缓冲液对土壤吸附态毒素的解吸率为 20.4%~28.6%, 但是 NaCl 和磷酸盐缓冲液均不能解吸砖红壤胶体吸附的 Bt 毒素。与对照处理比较发现, 乙酸盐体系中 NaCl 和磷酸盐缓冲液对毒素的解吸率均有不同程度的增加 (除砖红

表 3 NaCl 磷酸盐连续解吸矿物吸附态 Bt 毒素的解吸率 (%)

土壤	处理	NaCl	磷酸盐		合计
			1st	2nd	
砖红壤	对照	3.0	—	0.2	3.2
	乙酸盐	—	—	—	—
红壤	对照	0.0	3.8	3.1	6.9
	乙酸盐	2.3	9.5	10.9	22.7
黄棕壤	对照	3.3	4.7	8.4	16.4
	乙酸盐	3.7	9.6	19.0	32.4
黄褐土	对照	1.3	1.7	8.5	11.5
	乙酸盐	5.0	6.0	15.8	26.7

注: “—” 表示计算的解吸率为负值, 表示不能被解吸

壤吸附的毒素外), 特别是磷酸盐的解吸率增加了 2~3 倍。总体来看, 土壤胶体吸附态毒素的解吸率为 3.2%~32.4%, 表明吸附态毒素较难被 NaCl 和磷酸盐解吸, 但随乙酸盐的加入, 解吸能力增强, 毒素在土壤胶体表面的结合变松。而对不同土壤胶体吸附毒素的解吸量而言, 不论是否存在乙酸盐, 均表现为黄棕壤 > 黄褐土 > 红壤 > 砖红壤。

3 讨论

低分子量有机酸广泛存在于土壤特别是根际土中, 其中很小部分以游离态存在, 绝大部分是以吸附态存在于土壤固相部分^[9]。而有机酸的吸附改变土壤表面化学性质, 并影响 Bt 毒素在土壤胶体表面的吸附。

本文供试土壤中, 有机质含量以砖红壤最高, 依次为黄褐土、红壤和黄棕壤; 黄褐土和黄棕壤矿物组成以 2:1 型矿物为主, 而红壤和砖红壤以高岭石和铁铝氧化物为主, 其游离铁铝含量较高, 黄棕壤游离铁铝含量次于红壤。土壤对有机酸的吸附与土壤中游离铁含量正相关^[10], 且土壤 CEC 越高, 表面带负电荷量越高。毒素的等电点 (IEP) 约为 5.5^[11], 而供试土壤的等电点 (PZC) 均小于 4, 故在 pH 7.0 时土壤胶体和毒蛋白表面均带负电, 静电斥力阻碍吸附作用。因此, 毒素在供试土壤胶体表面吸附及乙酸盐抑制程度的差异是土壤有机质含量、CEC、PZC、游离铁含量以及矿物组成共同作用的结果。而 Stotzky 等^[3]的研究表明 Bt 毒素在有机矿质复合体表面的吸附与复合物的比表面、CEC 等没有显著的相关性。

毒素蛋白可通过配位交换、静电力、疏水键、氢键和范德华力等方式结合在土壤胶体表面^[12], 一般认为能被中性盐 (NaCl 等) 解吸的为静电吸附, 能被磷酸盐解吸下来的为配位吸附。实验结果表明, 吸附的大部分毒素不能被 NaCl 和磷酸盐缓冲液解吸, 特别是吸附在砖红壤表面的, 说明毒素极少部分 (<5%) 以静电方式吸附在土壤胶体表面, 少部分 (<1/3) 以配位方式吸附。而乙酸盐的存在增加了吸附态毒素的解吸率, 一定程度上增加了毒素在土壤胶体表面的静电吸附和配位吸附作用, 使毒素和土壤间的结合变松。

参考文献

[1] Palm C J, Donegan K K, Harris D, et al Quantification in soil

- of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants *Molecular Ecology*, 1994, 3: 145 ~ 151
- [2] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34: 133 ~ 137
- [3] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants *Plant and Soil*, 2004, 266: 77 ~ 89
- [4] Venkateswerlu G, Stotzky G. Binding of protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals *Current Microbiology*, 1992, 25: 225 ~ 233
- [5] Tapp H, Calamai L, Stotzky G. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26: 663 ~ 679
- [6] Tapp H, Stotzky G. Insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 1786 ~ 1790
- [7] 赵振华,黄巧云,李学垣,等. 低分子量有机酸对胶体矿物吸附酸性磷酸酶和牛血清蛋白的影响. 乙酸的影响. *土壤学报*, 2003, 40(2): 224 ~ 231
- [8] Fu Q L, Dong Y J, Hu H Q, *et al*. Adsorption of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by soil minerals: Effects of organic acid ligands *Applied Clay Science*, 2007, 37: 201 ~ 206
- [9] Jones D L, Dennis P G, Owen A G, *et al*. Organic acid behavior in soils: Misconceptions and knowledge gaps *Plant and Soil*, 2003, 248: 31 ~ 41
- [10] 徐仁扣. 低分子量有机酸对可变电荷土壤和矿物表面化学性质的影响. *土壤*, 2006, 38(3): 233 ~ 241
- [11] Keeton T P, Bulla L A Jr. Ligand specificity and affinity of BT-R1, the *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 3419 ~ 3425
- [12] Huang Q Y, Jiang M H, Li X Y. Effects of iron and aluminum oxides and kaolinite on adsorption and activity of invertase *Pedosphere*, 1998, 8(3): 251 ~ 260