

除草剂丁草胺对高产水稻土微生物群落功能多样性的影响

张仕颖^{1,2}, 夏运生², 肖炜³, 崔晓龙³, 王永霞³, 史静², 张乃明^{1,2*}

1. 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学资源与环境学院, 云南 昆明 650201;

3. 云南大学云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091

摘要: 采用 BIOLOG 碳素利用法, 研究了模拟条件下不同丁草胺剂量(有效成分质量分数 0.15、0.30 和 1.5 mg·kg⁻¹)对高产水稻土微生物群落功能多样性的影响。AWCD 值分析结果表明: 各处理均在温育 72~120 h 期间表现出较强的碳源利用能力, 中低浓度对微生物有促生长作用, 高浓度有抑制作用, 随着培养时间延长, 丁草胺对微生物的促进和抑制作用逐渐减缓, 直至完全消失。采用温育 96 h 数据进行群落多样性和碳源利用特征主成分分析, Shannon 指数和 Simpson 指数分析结果表明, 施用丁草胺会对高产水稻土微生物群落碳源利用能力产生不利影响, 施药浓度是导致微生物群落碳源利用能力集中、可利用碳源种类数减少的直接原因, 且浓度越高, 发生变化所需时间越短。主成分分析结果表明, 施用丁草胺会导致高产水稻土微生物群落碳源利用能力改变, 中低浓度改变速度快, 高浓度改变速度较慢, 随着丁草胺的自然降解, 农药对微生物群落碳源利用能力的影响逐渐消退。

关键词: 丁草胺; 功能多样性; 微生物; BIOLOG; 高产水稻土

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906 (2013) 05-0815-05

引用格式: 张仕颖, 夏运生, 肖炜, 崔晓龙, 王永霞, 史静, 张乃明. 除草剂丁草胺对高产水稻土微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态环境学报, 2013, 22(5): 815-819.

ZHANG Shiyong, XIA Yunsheng, XIAO Wei, CUI Xiaolong, WANG Yongxia, SHI Jing, ZHANG Naiming. Effects of butachlor on the functional diversity of microbial communities in high-yield paddy soil [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2013, 22(5): 815-819.

丁草胺是亚洲应用最广泛的苯乙酰胺类除草剂^[1], 在中国每年消耗量达 8 000 t^[2], 其安全性一直备受研究者关注^[3-10]。云南永胜涛源乡是保持我国水稻小面积超高产纪录的特殊生态区, 常年使用丁草胺作为选择性芽前除草剂。而土壤微生物作为表征土壤质量最有潜力的指标^[11-12], 与农田生态系统稳定性^[13]和生产力^[14]密切相关。丁草胺主要用于水稻苗期, 通常直接毒土, 若产生药害, 不仅破坏土壤微生物群落结构, 还直接影响秧苗发育^[15], 进而影响水稻的产量和品质^[16-17]。因此, 了解丁草胺对超高产水稻土微生物的影响意义重大。本研究从微生物功能多样性变化的角度, 深入探讨模拟条件下丁草胺对高产水稻土微生物的生态毒理影响, 以期稻田土壤农药污染的风险评价和丁草胺的合理使用提供科学依据。

1 试验设计与方法

1.1 供试药品

50%丁草胺乳油, 上海升联化工有限公司生产, 农药登记号: D20091403, 产品标准号:

HG3292-2001。

1.2 试验设计

丁草胺的合理施用标准为有效成分浓度 747~1 278 g·hm⁻²^[18], 折算合 0.216~0.370 mg·kg⁻¹干土, 本研究取中间质量分数 0.30 mg·kg⁻¹干土作为 100%推荐剂量。称取相当于 500 g 干质量的新鲜土样, 加入超纯水使其含水量为田间最大持水量的 60%, 在室内模拟条件下, 添加以超纯水稀释的丁草胺乳油, 使其在土样中的有效成分质量分数分别为 50%推荐剂量(0.15 mg·kg⁻¹, 简称 B15)、100%推荐剂量(0.30 mg·kg⁻¹, 简称 B30)和 500%推荐剂量(1.5 mg·kg⁻¹, 简称 B150), 搅拌均匀, 另设不加丁草胺的处理为对照 (0 mg·kg⁻¹, 简称 CK), 每个处理 3 个重复。所有处理密封, 置于恒温培养箱 (25±1)°C 中避光培养, 于药剂处理后 7、15、30、45 d 取样测定, 每隔 2~3 d 用差减法补充水分以调节含水量, 供试土壤基本理化性质见表 1。

1.3 土壤微生物群落功能多样性测定

采用 BIOLOG ECO 微平板, 称取相当于 10 g

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41201321; 41161041; 31200138)

作者简介: 张仕颖 (1979 年生), 女, 讲师, 博士研究生, 主要从事土壤微生物方面的研究。E-mail: amy-zhang999@163.com

*通信作者: 张乃明 (1963 年生), 男, 教授, 博导, 主要从事土壤与水环境污染防治方面的研究。

收稿日期: 2013-02-16

表 1 供试土壤基本理化性质
Table 1 Basic properties of the tested soil

w(有机质)/ (g·kg ⁻¹)	w(全氮)/ (g·kg ⁻¹)	w(全磷)/ (g·kg ⁻¹)	w(碱解氮)/ (mg·kg ⁻¹)	w(有效磷)/ (mg·kg ⁻¹)	w(速效钾)/ (mg·kg ⁻¹)	w(缓效钾)/ (mg·kg ⁻¹)	pH	质地
17.89	1.30	0.67	101.65	142.91	142.91	408.95	7.84	中壤土

干土重的处理土样,加入 90 mL 磷酸缓冲液中,180 r·min⁻¹ 振荡 30 min,静置 10 min,梯度稀释成 10⁻³ 悬液,用移液器接种样品至 ECO 板,每孔 150 μL,每个样品 3 个重复,25 °C 温育 7 d,每隔 24 h 用 BIOLOG 自动读板仪读取 590 nm 吸光值。

1.4 数据处理

试验数据使用 SPSS 17.0 软件处理,采用单因素 (one way ANOVA) 方差分析和 LSD 法进行多重比较 ($P<0.05$)。微生物代谢活性采用微平板每孔颜色平均变化率 (Average Well Color Development, AWCD) 描述,采用 Shannon 指数 (Shannon index) 和 Simpson 指数 (Simpson index) 表征土壤微生物群落功能多样性 (表 2)。

2 结果与分析

2.1 不同处理微生物群落代谢活性分析

丁草胺处理后高产水稻土微生物群落代谢活性变化见图 1,各处理均在温育 72~120 h 期间表现出较强的碳源利用能力。施药 7 d, B30 的 AWCD 值明显高于其他处理,其次为 B15, B150 和 CK 差别不明显,温育 96 h 后, B30 和 B15 分别比 CK 高出 36.5% 和 18.9%,说明中低剂量丁草胺可刺激微生物生长,高浓度丁草胺影响不显著;施药 15 d, B30 仍然保持最强的代谢活性, B15 在温育 96 h 后降至 CK 以下, B30 在温育 168 h 时与 CK 持平,而 B150 始终保持相对较低的代谢状况,说明随着处理时间延长,中低浓度丁草胺对微生物的刺激作用逐渐消退,高浓度则表现出抑制作用;施药 30 d, CK 表现出对碳源最强的利用能力,温育 96 h 时,

表 2 BIOLOG ECO 微平板相关计算公式
Table 2 The related computational formulae of BIOLOG Ecoplates

用途	公式	备注
AWCD 值 反映群落整体代谢活性	$AWCD = \sum \frac{(C - R)}{31}$	C: 各孔吸光值 R: 对照孔吸光值
Shannon 指数 评价群落丰富度	$H = -\sum p_i \cdot \ln p_i$	p_i : 第 i 孔相对吸光值与整板相对吸光值总和之比
Simpson 指数 评价常见种的优势度	$D = \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$	n_i : 第 i 孔的相对吸光值 N : 相对吸光度总和

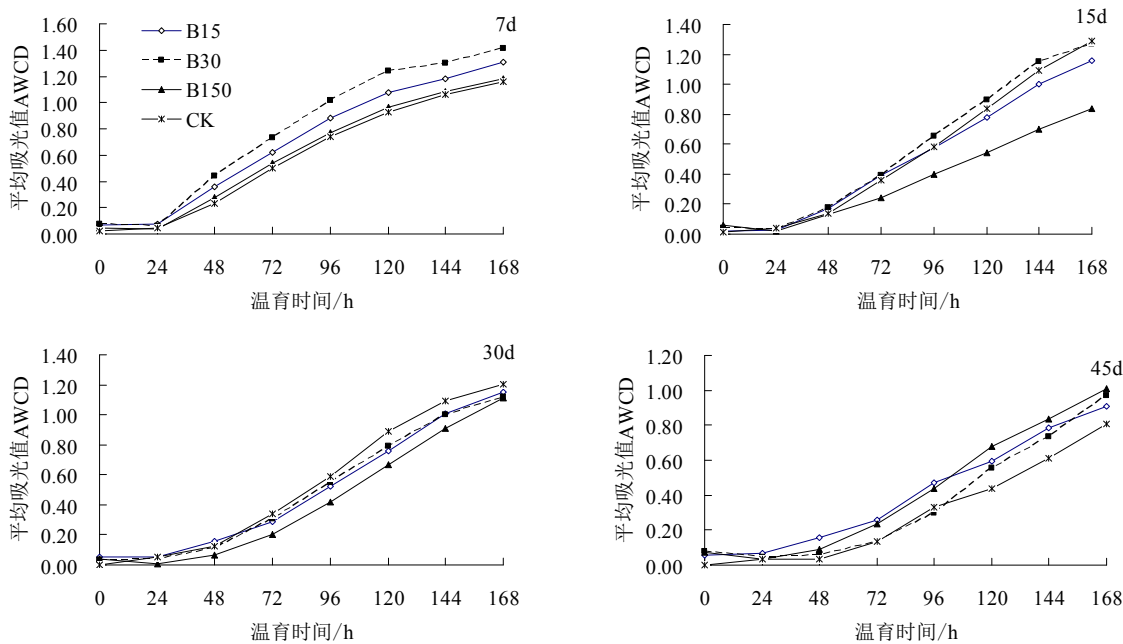


图 1 土壤微生物群落温育过程中 AWCD 值的变化
Fig.1 Variation of AWCD with the incubation of soil microbial community

其 AWCD 值与 B15 和 B30 差异不明显,但比 B150 高出 40.5%,说明随着农药的自然降解,中低浓度丁草胺的刺激作用已不存在,高浓度的抑制作用尚未解除;施药 45 d,所有处理整体代谢活性无明显差别,随着温育时间延长,B150 碳源利用能力逐渐增强,说明高浓度丁草胺对微生物的抑制作用正逐渐消除。

2.2 不同处理微生物群落多样性指数分析

采用温育 96 h 数据进行微生物群落多样性分析。Shannon 指数反映微生物群落物种多样性,若群落中每个体都属于不同的种,Shannon 指数最大;若每个体都属于同一种,则 Shannon 指数最小。将 Shannon 指数应用于 BIOLOG ECO 板,微生物能够利用的碳源种类越多,Shannon 指数越大。由图 2 A 可知,施药 7 d,除 B30 的 Shannon 指数明显偏高外,其余处理与 CK 均无显著差异,说明 100%推荐剂量可提高微生物碳源利用能力,与 AWCD 值分析结果一致。施药 15 d,所有处理 Shannon 指数与 CK 均无显著差异,丁草胺未表现出明显影响。施药 30 d, B150 的 Shannon 指数出现显著下降。施药 45 d, B30 也表现出 Shannon 指数显著下降,据此趋势推测,若继续培养, B15 的 Shannon 指数很可能也会下降。说明施用丁草胺会导致微生物群落可利用碳源种类数显著下降,而且药剂浓度越高,发生变化所需时间越短。

Simpson 指数又称优势度指数,是对多样性的反面即集中性的度量, Simpson 指数越高,说明群落集中性越高,即多样性程度越低^[19]。将 Simpson 指数应用于 BIOLOG ECO 板,微生物能够利用的碳源种类越集中, Simpson 指数越高,反之,微生物能够利用的碳源种类越多, Simpson 指数越低。由图 2 B 可知,施药 7 d,除 B30 的 Simpson 指数明显偏低外,其余处理与 CK 均无显著差异,说明 100%推荐剂量可提高微生物碳源利用能力,与 AWCD 值和 Shannon 指数分析结果一致。施药 15 d,

B150 最早出现 Simpson 指数的明显升高,与 CK 达到差异显著,说明高浓度处理最早引起微生物碳源利用能力集中,可利用碳源种类数减少。施药 30 d, B150 的 Simpson 指数进一步提高,比 CK 高出 33.3%,达到差异显著;而 B30 和 B15 与 CK 虽未达到差异显著,但其 Simpson 指数也表现出升高的趋势,比 CK 分别高出 15.9%和 11.6%。施药 45 d, B30 的 Simpson 指数与 CK 达到差异显著,说明中等浓度处理也引起了微生物碳源利用能力集中。据此趋势推测,若继续培养, B15 很可能也会引起微生物碳源利用能力集中。施用丁草胺会导致微生物群落碳源利用能力集中,而且药剂浓度越高,发生变化所需时间越短。

两个多样性指数分析结果均表明,施用丁草胺会对高产水稻土微生物群落碳源利用能力产生不利影响,施药浓度是导致微生物群落碳源利用能力集中、可利用碳源种类数减少的直接原因,且浓度越高,发生变化所需时间越短。

2.3 不同处理微生物碳源利用特征主成分分析

采用温育 96 h 数据进行微生物碳源利用特征主成分分析,结果如图 3 所示。施药 7 d, PC1 和 PC2 贡献率分别为 47.14%和 32.36%,累计方差贡献率 79.50%; PC1 能较好区分 CK、B15 和 B30, PC2 能较好区分 CK 和 B15,说明施用丁草胺会造成高产水稻土微生物群落碳源利用能力的差别, B15 和 B30 首先获得响应,考虑到 PC1 和 PC2 贡献率不同,综合评价应为 B30 变化最显著。施药 15 d, PC1 和 PC2 贡献率分别为 47.71%和 32.43%,累计方差贡献率 80.14%; PC1 能较好地将 3 个农药处理与 CK 区分开, PC2 能较好区分 CK、B30 和 B150,说明随培养时间延长,高浓度处理微生物碳源利用能力也开始发生改变,但不及中低浓度处理变化明显。施药 30 d, PC1 和 PC2 贡献率分别为 41.15%和 29.92%,累计方差贡献率 71.06%; PC1 能较好地将 CK 与其他 3 个处理区分开, PC2 则只能明显

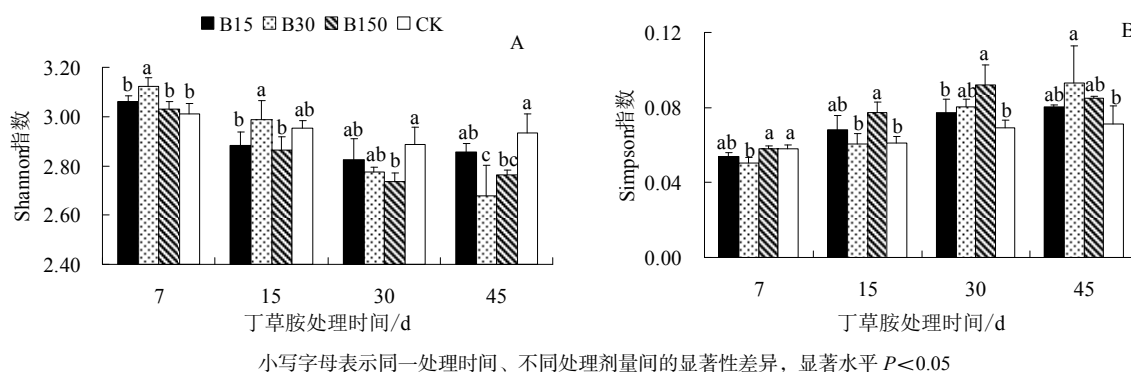


图 2 土壤微生物群落功能多样性指数的变化

Fig.2 Variation of functional diversity indices of soil microbial community

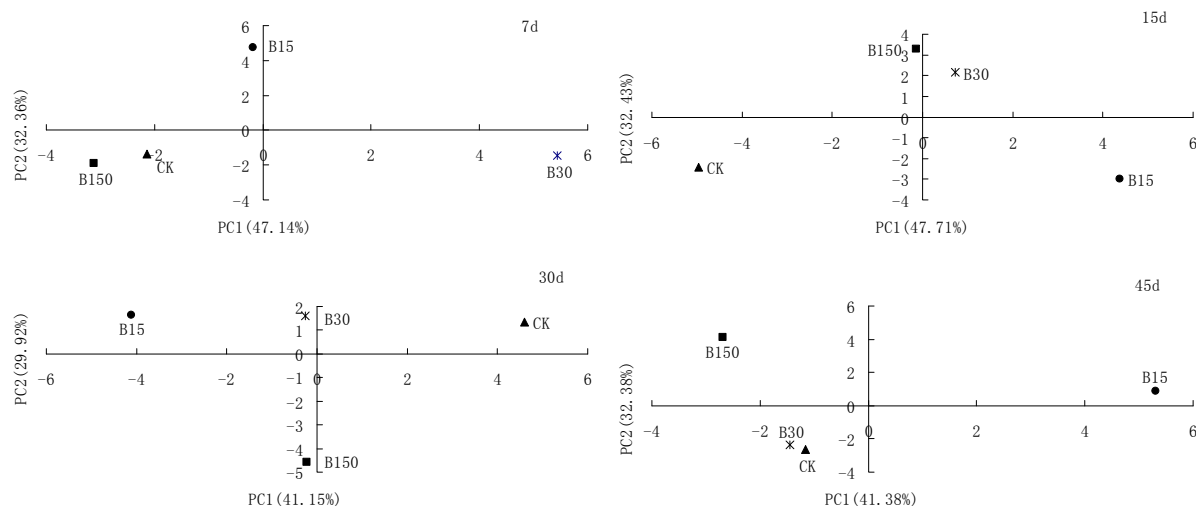


图3 土壤微生物碳源利用特性的主成分分析

Fig.3 Principal component analysis of the carbon utilization of soil microbial community

区分 CK 和 B150,说明丁草胺对微生物碳源利用能力的影响仍存在,但中低浓度影响力开始减弱。施药 45 d, PC1 和 PC2 贡献率分别为 41.38%和 32.38%,累计方差贡献率 74.21%; PC1 和 PC2 均能够较好区分 CK、B15 和 B150,而无法区分 CK 和 B30。说明随着丁草胺的自然降解,农药对土壤微生物碳源利用能力的影响逐渐消退。按此趋势推测,若继续培养,其它浓度处理微生物碳源利用能力也会逐渐恢复。

3 讨论

目前关于丁草胺对土壤微生物影响的研究主要集中在 4 个方面。1) 对土壤微生物数量的影响: Min 等^[3]发现施用不同浓度丁草胺后,土壤放线菌数量显著下降,细菌和真菌数量上升,22 mg·kg⁻¹ 高质量分数丁草胺可导致真菌生长迟滞;单敏等^[20]发现 10 mg·kg⁻¹ 高质量分数下细菌、真菌和放线菌均受到抑制,2~4 mg·kg⁻¹ 丁草胺对放线菌生长有刺激作用;赵兰等^[21]则发现低浓度对细菌有刺激作用,20 mg·kg⁻¹ 高质量分数对放线菌有抑制作用,各质量分数处理对真菌均表现为先抑制后刺激。2) 对土壤功能微生物的影响:施用丁草胺可影响解磷微生物的生长和活性^[4],刺激水解发酵性细菌^[3]、硫酸盐还原细菌^[3,22]和反硝化细菌^[3,23]生长,抑制产氢产乙酸细菌^[3]生长,对甲烷产生菌的影响则与浓度相关,低浓度加速生长,高浓度抑制生长,施药 7 d 时抑制作用最大^[3,24]。3) 对土壤微生物群落功能多样性的影响:研究表明,施用丁草胺后可加强微生物群落的固氮作用^[3,5,10]和反硝化作用^[3];若重复施用推荐剂量丁草胺,可对微生物群落碳源利用能力产生短暂抑制作用,随着培养时间延长,群落代谢功能可得到恢复^[9]。4) 与重金属或其他农药联

合污染对土壤微生物的影响:100 mg·kg⁻¹ 高质量分数丁草胺与 Cd 联合作用会造成微生物群落结构多样性的显著改变^[6-8];丁草胺和毒死蜱复合施用则会引起细菌多样性降低,造成某些细菌富集^[25]。

虽然研究者采用不同浓度组合进行模拟试验,但结果仍有共性,综合前人和本研究结果可以发现,施用丁草胺会对土壤微生物造成影响,浓度是关键因子,中低浓度处理能刺激微生物生长,加强群落的某些生态功能,高浓度处理会对微生物的生长和活性产生抑制作用,但抑制是短暂的,随着处理时间延长,微生物群落及其功能一般能得到恢复,若丁草胺与重金属或其他农药联合污染,则影响更为复杂。

4 结论

本研究通过分析模拟条件下丁草胺对高产水稻土壤微生物的生态毒理影响,得到以下结论。

1) 施用丁草胺会改变高产水稻土壤微生物群落代谢活性,中低浓度对微生物有促生长作用,高浓度有抑制作用,随着培养时间延长,促进和抑制作用逐渐减缓,直至完全消失。

2) 施用丁草胺会对高产水稻土壤微生物群落碳源利用能力产生不利影响,施药浓度是导致微生物群落碳源利用能力集中、可利用碳源种类数减少的直接原因,且浓度越高,发生变化所需时间越短。

3) 随着丁草胺的自然降解,其对高产水稻土壤微生物群落碳源利用能力的不利影响会逐渐消退。

参考文献:

- [1] KUMARI N, NARAYAN O P, RAI L C. Understanding butachlor toxicity in *Aulosira fertilissima* using physiological, biochemical and proteomic approaches[J]. Chemosphere, 2009, 77(11):1501-1507.
- [2] YU Y L, CHEN Y X, LUO Y M, et al. Rapid degradation of butachlor

- in wheat rhizosphere soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 50(6):771-774.
- [3] MIN H, YEY F, CHEN Z Y, et al. Effects of butachlor on microbial populations and enzyme activities in paddy soil [J]. *Journal of environmental science and health Part B*, 2001, 36:581-595.
- [4] DEBNATH A, DAS A C, MUKHERJEE D. Persistence and effect of butachlor and basalin on the activities of phosphate solubilizing microorganisms in wetland rice soil[J]. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 2002, 68(5):766-770.
- [5] SUSEELA M. Effect of butachlor on growth and nitrogen fixation by *Anabaena sphaerica*[J]. *Journal of environmental biology*, 2001, 22(3): 201-203.
- [6] WANG J, LU Y, DING H, et al. Effect of cadmium alone and in combination with butachlor on soil enzymes[J]. *Environmental geochemistry and health*, 2007a, 29(5):395-403.
- [7] WANG J H, LU Y T, SHEN G Q. Combined effects of cadmium and butachlor on soil enzyme activities and microbial community structure[J]. *Pedosphere*, 2007b, 17(2):191-199.
- [8] WANG J, DING H, LU Y, et al. Combined effects of cadmium and butachlor on microbial activities and community DNA in a paddy soil[J]. *Pedosphere*, 2009, 19(5):623-630.
- [9] FANG H, YU Y L, WANG X G, et al. Persistence of the herbicide butachlor in soil after repeated applications and its effects on soil microbial functional diversity [J]. *Journal of environmental science and health Part B*, 2009, 44:123-129.
- [10] CHEN W C, YEN J H, CHANG C S, et al. Effects of herbicide butachlor on soil microorganisms and on nitrogen-fixing abilities in paddy soil[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2009, 72(1): 120-127.
- [11] SHARMA S K, RAMESH A, SHARMA M P, et al. Microbial community structure and diversity as indicators for evaluating soil quality[J]. *Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Agriculture*, 2011, 5: 317-358.
- [12] ROMANIUK R, GIUFFRE L, COSTANTINI A, et al. Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems[J]. *Ecological Indicators*, 2011, 11(5):1345-1353.
- [13] GRIFFITHS B S, RITZ K, BARDGETT R D, et al. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity ecosystem function relationship[J]. *Oikos*, 2000, 90(2):279-294.
- [14] ABOIM M C R, COUTINHO H L C, PEIXOTO R S, et al. Soil bacterial community structure and soil quality in a slash-and-burn cultivation system in Southeastern Brazil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2008, 38(2): 100-108.
- [15] 韩玉军,赵长山. 丁草胺对水稻分蘖影响的研究[J]. *植物保护*, 2007, 33(6):64-67.
- [16] 韩玉军, 赵长山. 淹水胁迫下水稻幼苗对丁草胺的生理响应[J]. *作物杂志*, 2012(5):86-90.
- [17] 余保文,朱诚. 丁草胺对镉胁迫条件下水稻生长、镉积累及活性氧代谢的影响[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(9):1878-1886.
- [18] 国家质量技术监督局. GB/T 8321.1—2000 农药合理使用准则(一) [S]//中华人民共和国国家标准. 北京:中国标准出版社, 2002: 5.
- [19] SIMPSON E H. Measurement of Diversity[J]. *Nature*, 1949, 163: 688-688.
- [20] 单敏, 虞云龙, 方华. 丁草胺对土壤微生物数量和酶活性的影响[J]. *农药学报*, 2005, 7(4): 383-386.
- [21] 赵兰, 黎华寿. 四种除草剂对稻田土壤微生物类群的影响[J]. *农业环境学报*, 2008, 27(2): 508-514.
- [22] 陈中云, 闵航, 张夫道, 等. 农药污染对水稻田土壤硫酸盐还原菌种群数量及其活性影响的研究[J]. *土壤学报*, 2004, 41(1):97-102.
- [23] 陈中云, 闵航, 吴伟祥, 等. 农药污染对水稻田土壤反硝化细菌种群数量及其活性的影响[J]. *应用生态学报*, 2003a, 14(10): 1765-1769.
- [24] 陈中云, 闵航, 吴伟祥. 农药污染对黄松稻田土壤产甲烷菌数量和甲烷排放通量影响的研究[J]. *中国沼气*, 2003b, 21(1):18-21.
- [25] 解开治, 徐培智, 陈建生, 等. 丁草胺和毒死蜱复合污染对稻田土壤细菌群落多样性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(4): 686-690.

Effects of butachlor on the functional diversity of microbial communities in high-yield paddy soil

ZHANG Shiying^{1,2}, XIA Yunsheng², XIAO Wei³, CUI Xiaolong³,

WANG Yongxia³, SHI Jing², ZHANG Naiming^{1,2*}

1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. College of Resources and Environment Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: Effects of the herbicide butachlor on microbial functional diversity in high-yield paddy soil were investigated under laboratory conditions, and the microbial communities structures under different butachlor concentrations (calculated by active ingredient 0.15、0.30 and 1.5 mg·kg⁻¹) were evaluated using BIOLOG Ecoplates. The results of the average well color development (AWCD) analysis showed that the growth and activity of microbial communities were stimulated under low concentration, moreover, were inhibited under high concentration, and thereafter gradually recovered to a similar level to the control soil. The Shannon index *H* and the Simpson index *D* analyses showed that butachlor applications had a negative influence on the carbon using abilities of microbial communities. The abilities of microbial communities were significantly reduced as the concentrations increased, moreover, the higher the concentration, the shorter time required. Principal component analysis had indicated the analogous results. It is concluded that butachlor applications in high-yield paddy soil had a temporary or short-term inhibitory effect on soil microbial communities.

Key words: butachlor; functional diversity; microbial communities; BIOLOG; high-yield paddy soil