

甲磺隆胁迫下小麦根际土壤微生物的菌群结构响应^①

方程冉^{1,2}, 王巍³, 贺永华^{2,4}, 沈东升²

(1 浙江科技学院建筑工程学院, 杭州 310023; 2 浙江大学环境工程系, 杭州 310029;

3 杭州市余杭区环境保护局, 杭州 311100; 4 浙江省人大环境与资源保护委员会, 杭州 310025)

Response of Microbial Population Composition to Metsulfuron-methyl in Wheat Rhizosphere Soil

FANG Cheng-ran^{1,2}, WANG Wei³, HE Yong-hua^{2,4}, SHEN Dong-sheng²

(1 School of Architecture and Civil Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2 Department of Environmental

Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 3 Environmental Protection Bureau of Yuhang District, Hangzhou 311100, China;

4 Environment Protection and Resources Conservation Committee of Zhejiang Provincial People's Congress, Hangzhou 310025, China)

摘要: 采用根箱盆栽法, 研究了甲磺隆对我国南方小麦根际与非根际土壤中三大类群微生物菌群结构的影响。结果表明: 在 2 µg/g 甲磺隆浓度胁迫下, 普通细菌受到显著抑制 ($P < 0.01$), 耐受细菌在前 30 天受影响显著, 但随着甲磺隆的降解和根际效应的加强而逐渐减弱; 真菌是甲磺隆污染土壤中的活跃菌群, 处理根际与非根际土壤中耐受真菌与对照相比 30 天后即达到 $P < 0.01$ 的显著水平; 放线菌是甲磺隆胁迫下的劣势菌。微生物三大类群对甲磺隆胁迫的响应依次为放线菌 > 细菌 > 真菌, 真菌的此类特性为寻求甲磺隆高效降解菌及其快速降解机制提供了可能。

关键词: 甲磺隆; 土壤微生物; 菌群结构; 根际效应

中图分类号: S154.37

除草剂在防除田间杂草同时由于其对生物具有毒性, 必将对土壤微生物区系以及土壤生物化学过程产生一定的影响, 乃至可能对土壤持续肥力和农作物生长构成威胁, 此时土壤中的微生物会在生理代谢上做出响应, 以适应环境的选择压力。因此, 微生物种群的数量和结构是反映农田土壤质量的重要指标。

磺酰脲类除草剂被国内外广泛使用, 具有用量少、除草活性高、对人畜低毒等显著特点。有关该类除草剂对土壤功能及某些微生物的不良影响前人已作了研究^[1-4]。然而, 对我国南方甲磺隆普遍使用区域土壤中微生物菌群结构响应的动态变化特征尚缺乏系统了解。本文研究了施用甲磺隆对小麦根际与非根际土壤中细菌、真菌和放线菌三大类微生物数量及菌群结构的影响, 为了解施用甲磺隆对土壤微生物的影响、寻求该类除草剂的快速降解机制、缓解其对环境的危害

提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试植物 小麦 (*Triticum aestivum* L.), 甲磺隆耐受植物。

1.1.2 供试甲磺隆 江苏溧阳化工厂提供, 纯度 ≥ 92.7%。

1.1.3 供试土样 供试土样为黄松土, 砂粉土质地, 采集于浙江大学华家池校区内的农田。于间隔 20 m 的两条平行线取样, 每 5 m 设一取样点, 取样于地表 5 ~ 15 cm 处。土样基本性状为: pH 6.5 (土水比 1:2.5), 比重 2.59 g/cm³, 总氮 2.9 g/kg, CEC 16.3 cmol/kg, 有机碳 19.5 g/kg, 黏粒 80 g/kg, 粉粒 713 g/kg, 砂粒 207 g/kg。据考证, 取样农田从未施用过磺酰脲

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (20077024) 资助。

作者简介: 方程冉 (1977—), 女, 浙江安吉人, 博士, 副教授, 主要从事废物生物处理理论与技术研究。E-mail: fangchengr@163.com

类除草剂。

1.2 试验方法

1.2.1 土样处理 原始土样制备：取自然风干（含水率约 5%）的新鲜土壤磨碎，过 20 目筛，备用。

甲磺隆母土制备：原始土样风干至含水率约 1%，磨碎过 100 目筛。200 mg 甲磺隆以 50 ml 甲醇溶解后加到 1 010g 上述土样中充分混匀，配制成甲磺隆含量为 200 μg/g（以干土计）的甲磺隆母土，备用。

实验土壤制备：取原始土样若干，拌入尿素和磷酸氢钾作底肥（氮、磷均为 0.4 g/kg），放置 3 天，然后以 1:99 将甲磺隆母土加入其中，混匀，即配成甲磺隆含量为 2 μg/g 的实验土壤。

1.2.2 植株种植 采用分室根箱模拟根际微域环境。根箱由有机玻璃制成，长 × 宽 × 高为 17 cm × 5 cm × 20 cm，用 300 目尼龙网分隔成宽为 2 cm 和 3 cm 两室。分别取 300 g、450 g 实验土壤放入根箱两侧，在窄室中种植小麦 20 株，宽室中不种植作物。同时设不加甲磺隆的土壤作为对照。

1.2.3 土样采集 分别于种植后第 0、15、30、50、80 天取样测定微生物菌群数量，每次取样 3 个重复。采集根际土时，拆开根箱，取出植株，轻轻抖落大块土壤，剩下的附着在根上的土壤视为根际土，同时在未种植株一侧相同深度处取样作为非根际土。分别称取根际土和非根际土各 10 g 置于 90 ml 无菌去离子水中，120 r/min 振摇 10 min，静置 5 min，取土壤悬液 1 ml 至恰当稀释度接种测定土壤微生物数量，每个稀释度 3 个重复。

1.2.4 土壤微生物计数^[5-6] 各微生物采用稀释平板法计数，其中普通细菌计数采用牛肉膏酵母培养基，普通真菌计数采用查彼克氏培养基，普通放线菌计数采用改良高氏 1 号培养基。降解或耐受甲磺隆的微生

物培养基中加入一定量的甲磺隆代替其中的部分蛋白胨和酵母浸出液（细菌）、蔗糖（真菌）和可溶性淀粉（放线菌），甲磺隆浓度为 500 mg/L。具体如下：

耐受细菌(g/L): 蛋白胨 0.5, 酵母浸膏 0.5, FeCl₃ 0.01, K₂HPO₄ 0.4, CaCl₂ 0.1, (NH₄)₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.05, 琼脂 18.0, 土壤浸出液 250.0, 去离子水 750.0, pH = 7.4, 甲磺隆 0.5 g。

耐受真菌(g/L): 蔗糖 20.0, NaNO₃ 2.0, K₂HPO₄ 1.0, KCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, 琼脂 18.0, 土壤浸出液 750.0, 去离子水 250.0, pH=7.0, 甲磺隆 0.5 g。

耐受放线菌(g/L): 可溶性淀粉 14.0, KNO₃ 1.0, FeSO₄·7H₂O 0.01, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 18.0, 土壤浸出液 750.0, 去离子水 250.0, pH=7.6~7.8, 甲磺隆 0.5 g。

2 结果与分析

2.1 甲磺隆胁迫下三大类群微生物数量的动态变化

2.1.1 细菌 如表 1 所示，初始施用浓度 2 μg/g 的甲磺隆对非根际土壤中的普通细菌产生了显著性抑制，第 15 天处理和对照之间的差异达到 $P<0.01$ 的显著性水平，而根际土壤中二者差异不显著。土壤中甲磺隆耐受细菌初始数量约占细菌总数的 70%，耐受细菌在根际土壤中处理与对照之间的差异未达到显著水平 ($P>0.05$)；处理非根际土壤中细菌第 30 天数量约为初始数量的 20%，甲磺隆对耐受细菌抑制作用十分明显。此外，对比普通细菌和耐受细菌，至培养结束，经甲磺隆驯化后耐受细菌数量约占细菌总数（普通细菌）的 65%~78%，而未经驯化的对照土壤中这一比例约为 30%~42%，说明甲磺隆对土壤细菌具有选择性作用。根际土壤中细菌数量超过非根际土壤的几倍

表 1 甲磺隆胁迫下普通细菌和耐受细菌的动态变化 (lg CFU/g) (以干土计，下同)

微生物	处理	土样	取样时间 (d)				
			0	15	30	50	80
普通细菌	甲磺隆	根际土壤		7.71 ± 0.11 a A	7.91 ± 0.12 a A	8.77 ± 0.01 a A	9.03 ± 0.02 b B
		非根际土壤		6.88 ± 0.09 c B	6.64 ± 0.12 c C	6.85 ± 0.13 c C	7.23 ± 0.08 d D
	对照	根际土壤		7.76 ± 0.13 a A	8.13 ± 0.17 a A	9.02 ± 0.06 a A	9.37 ± 0.04 a A
		非根际土壤	7.23 ± 0.11	7.49 ± 0.12 b A	7.30 ± 0.26 b B	7.34 ± 0.23 b B	7.52 ± 0.16 c C
耐受细菌	甲磺隆	根际土壤		7.60 ± 0.08 a A	7.65 ± 0.04 a A	8.61 ± 0.08 a A	8.84 ± 0.05 a A
		非根际土壤		6.42 ± 0.10 c C	6.38 ± 0.06 c C	6.62 ± 0.14 b B	6.97 ± 0.25 b B
	对照	根际土壤		7.63 ± 0.08 a A	7.84 ± 0.11 a A	8.74 ± 0.06 a A	8.99 ± 0.11 a A
		非根际土壤	7.06 ± 0.10	7.20 ± 0.25 b B	7.08 ± 0.18 b B	7.23 ± 0.05 b B	7.16 ± 0.26 b B

注：①甲磺隆施用浓度为 2 μg/g；②表中数据为平均值 ± 标准差；③对同一微生物，同一列中小写字母不同表示差异达到 $P<0.05$ 的显著水平，大写字母不同表示差异达到 $P<0.01$ 的显著水平；下同。

至几十倍。小麦根系的生长促进了细菌的生长与繁殖，使得细菌对甲磺隆的耐受或降解能力有明显的提高。可见，甲磺隆对土壤细菌具有显著的抑制作用，同时作物根系促进了细菌的生长，根际效应明显。

2.1.2 真菌 甲磺隆对土壤中普通真菌的影响不显著 ($P>0.01$) (表 2)，仅在小麦培养中期处理非根际和对照非根际土壤之间达到了 $P<0.01$ 的差异显著性水平，可见甲磺隆刺激了土壤真菌的生长。这一现象在耐受真菌中更为明显，第 50 天，处理的根际与非根际土壤中耐受真菌数量分别增加了 62 倍和 3.9 倍。处理非根际土壤中耐受真菌数量至培养后期略有下降，这可能是由于土壤中甲磺隆已大部分降解，其他

的微生物菌群得以繁殖而产生了营养竞争效应。根际土壤中降解或耐受甲磺隆的真菌数量明显高于非根际土，第 50 天，处理根际耐受真菌的数量为 $5.99 \lg \text{CFU/g}$ ，非根际 $4.79 \lg \text{CFU/g}$ ，根际效应十分明显。对比普通真菌和耐受真菌，培养结束时，根际土壤中耐受真菌数量约为普通真菌数量的 42.8%~44.1%，非根际土壤中这一比例约占了 85.8%~90.7%，远高于试验初始时 56.7% 的比例，这说明土壤真菌在甲磺隆的驯化作用下具备了耐受甲磺隆的能力，或是部分敏感菌群趋于消亡而耐受菌群能够旺盛生长。可见，真菌是甲磺隆胁迫下土壤中的优势菌，尤其在根际土壤中，其数量增加十分显著。

表 2 甲磺隆胁迫下普通真菌和耐受真菌的动态变化 ($\lg \text{CFU/g}$)

微生物	处理	土样	取样时间 (d)				
			0	15	30	50	80
普通真菌	甲磺隆	根际土壤		$4.98 \pm 0.14 \text{ a A}$	$5.46 \pm 0.11 \text{ a A}$	$6.33 \pm 0.06 \text{ a A}$	$6.41 \pm 0.08 \text{ a A}$
		非根际土壤		$4.62 \pm 0.14 \text{ b AB}$	$4.86 \pm 0.07 \text{ b B}$	$5.02 \pm 0.11 \text{ b B}$	$4.65 \pm 0.14 \text{ b B}$
	对照	根际土壤		$4.52 \pm 0.17 \text{ b AB}$	$5.32 \pm 0.17 \text{ a A}$	$6.19 \pm 0.04 \text{ a A}$	$6.33 \pm 0.03 \text{ a A}$
		非根际土壤	4.34 ± 0.08	$4.35 \pm 0.23 \text{ b B}$	$4.62 \pm 0.13 \text{ c B}$	$4.62 \pm 0.13 \text{ c C}$	$4.55 \pm 0.15 \text{ b B}$
耐受真菌	甲磺隆	根际土壤		$4.56 \pm 0.18 \text{ a A}$	$4.97 \pm 0.11 \text{ b A}$	$5.99 \pm 0.11 \text{ a A}$	$6.04 \pm 0.13 \text{ a A}$
		非根际土壤		$4.46 \pm 0.09 \text{ a A}$	$4.66 \pm 0.10 \text{ c B}$	$4.79 \pm 0.09 \text{ b B}$	$4.58 \pm 0.18 \text{ b B}$
	对照	根际土壤		$4.34 \pm 0.17 \text{ a A}$	$5.14 \pm 0.06 \text{ a A}$	$5.87 \pm 0.07 \text{ a A}$	$6.00 \pm 0.07 \text{ a A}$
		非根际土壤	4.18 ± 0.18	$4.35 \pm 0.11 \text{ a A}$	$4.53 \pm 0.08 \text{ c B}$	$4.37 \pm 0.20 \text{ c C}$	$4.52 \pm 0.04 \text{ b B}$

2.1.3 放线菌 如表 3 所示，根际土壤中普通放线菌的数量随着小麦生育期的延长平稳增长，但第 15 天，处理样中普通放线菌数量显著低于对照根际 ($P<0.01$)，甲磺隆显著抑制了放线菌的生长。非根际土壤处理样中普通放线菌数量在培养中前期下降明显，

至第 30 天同比对照根际土壤抑制率高达 90%，但后期放线菌数量也因土壤中甲磺隆的降解而缓慢回升。土壤中耐受放线菌数量较少，第 30 天的非根际土样中已检测不出。可见放线菌对甲磺隆或其降解中间产物十分敏感，从而成为甲磺隆胁迫下的劣势菌。

表 3 甲磺隆胁迫下普通放线菌和耐受放线菌的动态变化 ($\lg \text{CFU/g}$)

微生物	处理	土样	取样时间 (d)				
			0	15	30	50	80
普通放线菌	甲磺隆	根际土壤		$4.56 \pm 0.17 \text{ b A}$	$4.90 \pm 0.17 \text{ b B}$	$5.54 \pm 0.10 \text{ b B}$	$4.98 \pm 0.17 \text{ b B}$
		非根际土壤		$4.13 \pm 0.20 \text{ c B}$	$3.80 \pm 0.18 \text{ c C}$	$3.94 \pm 0.12 \text{ c C}$	$4.28 \pm 0.12 \text{ c C}$
	对照	根际土壤		$5.08 \pm 0.15 \text{ a A}$	$5.56 \pm 0.12 \text{ a A}$	$6.01 \pm 0.08 \text{ a A}$	$6.06 \pm 0.14 \text{ a A}$
		非根际土壤	4.88 ± 0.09	$4.76 \pm 0.12 \text{ b A}$	$4.82 \pm 0.09 \text{ b B}$	$4.99 \pm 0.12 \text{ b B}$	$4.86 \pm 0.09 \text{ b B}$
耐受放线菌	甲磺隆	根际土壤		$3.16 \pm 0.28 \text{ a A}$	3.32 ± 0.16	3.87 ± 0.11	3.79 ± 0.08
		非根际土壤		$3.10 \pm 0.17 \text{ a A}$	ND	ND	ND
	对照	根际土壤		$3.26 \pm 0.07 \text{ a A}$	3.99 ± 0.08	3.56 ± 0.07	4.16 ± 0.13
		非根际土壤	3.66 ± 0.22	$3.06 \pm 0.10 \text{ a A}$	ND	ND	ND

注：ND 表示未检出。

2.2 甲磺隆胁迫下微生物菌群结构响应

土壤微生物生物量通常代表了微生物的群体水平,反映土壤同化和矿化的能力,是土壤质量的重要表征指标。细菌、放线菌和真菌是土壤微生物的三大类群,构成了土壤微生物的主要生物量,它们的区系组成和数量变化通常反映土壤生物活性水平。除草剂可以导致土壤微生物的数目和种类的变化,而微生物群落多样性的变化在一定程度上反映了除草剂对土壤环境质量的影响^[7-9]。本研究中甲磺隆胁迫下小麦根际与非根际土壤中微生物三大类群相对数量的变化以及至培养结束甲磺隆对微生物三大类群的抑制率分别如表 4 和表 5 所示。

从表 4 可知,试验初始,土壤中微生物三大类群

相对数量以细菌最多,占总菌数的 99% 以上,放线菌次之,真菌最少,说明细菌是土壤微生物生命活动的主体,是土壤中物质分解的主要参与者。至培养结束,甲磺隆处理的土样中真菌的相对数量高于对照土样,细菌的相对数量略有上升,而放线菌的数量急剧下降。土壤中三大类群微生物比例是土壤肥力的衡量指标之一,细菌、放线菌密度高,表明土壤肥力水平较高,而真菌相对数量多通常是土壤性质不良的反映指标。因此甲磺隆处理土壤中微生物三大类群数量的这一分布特征说明经过甲磺隆处理后土壤性质略有降低。同时由 2.1 分析可知,根际土壤中细菌、放线菌绝对数量要高于对应的非根际土壤,说明根际土壤对甲磺隆解毒的作用强于非根际。

表 4 甲磺隆胁迫下小麦根际与非根际土壤中微生物三大类群相对数量的变化 (%)

微生物类群	供试土样初始值	试验结束 (80 d)			
		根际土壤		非根际土壤	
		处理	对照	处理	对照
细菌	99.42	99.75	99.85	99.64	99.73
真菌	0.13	0.24	0.10	0.30	0.10
放线菌	0.48	0.01	0.05	0.06	0.17

表 5 中抑制率计算方法为处理土壤中同一微生物数量除以对照样品中微生物数量的比值与 1 的差值。非根际土壤中,普通细菌和普通放线菌均不同程度地受到了抑制,而真菌数量有一定幅度增加,可见,甲磺隆对土壤微生物的不良影响程度表现为放线菌>细菌>真菌。土壤微生物三大类群的总量与其发挥的生态功能密切相关,数量减少反映土壤微生物活性的下降,而耐受真菌数量的上升说明甲磺隆对真菌具有一

定的刺激作用。据此,受甲磺隆污染土壤中真菌的这一特性为我们寻求甲磺隆高效降解菌及其快速降解机制提供了可能。

此外,至培养结束,处理土壤中放线菌的相对数量急剧下降,数量不到土壤微生物总数的 0.05% (表 4),甲磺隆对放线菌抑制作用高达 72.9%~100% (表 5),说明放线菌是甲磺隆胁迫下的劣势菌,可以作为甲磺隆除草剂残留污染土壤生态环境效应的评价指标。

表 5 培养结束甲磺隆对小麦根际与非根际土壤中三大微生物区系的抑制率 (%)

土样	细菌		真菌		放线菌	
	普通细菌	耐受细菌	普通真菌	耐受真菌	普通放线菌	耐受放线菌
根际土壤	-54.5	-30.1	+22.1	+11.8	-91.7	-100
非根际土壤	-56.4	-34.3	+27.0	+14.3	-72.9	-100

注: + 表示促进作用, - 表示抑制作用。

3 结论

我国南方稻麦轮作区域小麦根际与非根际土壤中微生物三大类群对甲磺隆处理的响应各异,根际土壤因其特殊的生境有效促进了土壤微生物的生长。

2 $\mu\text{g/g}$ 甲磺隆浓度胁迫下,微生物三大类群受

抑制响应依次为放线菌>细菌>真菌。甲磺隆对土壤中细菌具有选择性,普通细菌受到显著抑制 ($P<0.01$),耐受细菌所受影响随着甲磺隆的降解和根际效应的加强而逐渐减弱;真菌是甲磺隆污染土壤中的优势菌群,处理根际与非根际土壤中耐受真菌与对照相比 30 天后即达到 $P<0.01$ 的显著水平;放线菌是甲磺

隆胁迫下的劣势菌, 可作为甲磺隆污染土壤生态环境效应的评价指标。以上结果说明利用土壤微生物和植物根际效应来实现甲磺隆的快速降解是可行的, 但就二者具体协同作用机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Dinelli G, Vicari A, Accinelli C. Degradation and side effects of three sulfonylurea herbicides in soil. *Journal of Environmental Quality*, 1998, 27: 1459-1464
- [2] 张敏恒. 磺酰脲类除草剂的发展现状、市场与未来趋势. *农药*, 2010, 49(4): 235-240
- [3] 姚斌, 徐建民, 张超兰. 甲磺隆对土壤微生物多样性的影响. *土壤学报*, 2004, 41(2): 349-354
- [4] Perucci P, Scarponi L. Side effects of rimsulfuron on the microbial biomass of a clay-loam soil. *Journal of Environmental Quality*, 1996, 25: 610-613
- [5] 中国科学院南京土壤所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985
- [6] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986
- [7] 胡江, 代先祝, 李顺鹏. 阿特拉津及其降解菌的使用对土壤微生物群落的影响. *应用生态学报*, 2005, 16(8): 1518-1522
- [8] 罗海峰, 齐鸿雁, 张洪勋. 乙草胺对农田土壤细菌多样性的影响. *微生物学报*, 2004, 44(4): 519-522
- [9] Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, 57: 2351-2359