

# 甲磺隆胁迫下小麦根际特殊微生物生理群区系的动态变化<sup>①</sup>

方程冉<sup>1,2</sup>, 王 巍<sup>3</sup>, 贺永华<sup>2,4</sup>, 沈东升<sup>2,5</sup>

(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;

5 浙江工商大学环境科学与工程学院, 杭州 310035)

## Effects of Metsulfuron-methyl on Special Significant Microbial Population in Wheat Rhizosphere Soil

FANG Cheng-ran<sup>1,2</sup>, WANG Wei<sup>3</sup>, HE Yong-hua<sup>2,4</sup>, SHEN Dong-sheng<sup>2,5</sup>

(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; 5 School of Environmental Science and Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, 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特殊微生物生理群区系, 包括氮素转化生理群区系、硫素转化生理群区系和芳香族分解群区系的影响。结果表明: 固氮菌对甲磺隆不敏感, 亚硝化菌和反硝化菌受甲磺隆毒害严重, 但小麦根系的生长可在一定程度上缓解甲磺隆的抑制作用; 硫化细菌和反硫化细菌的生长也受到了甲磺隆的强烈抑制, 根际效应亦明显; 甲磺隆驯化以及作物根系的协同作用, 共同促进了芳香族化合物分解菌的生长和繁殖, 为利用植物和微生物联合修复受甲磺隆等芳香族化合物污染的土壤提供了理论依据。

**关键词:** 甲磺隆; 氮素转化菌; 硫素转化菌; 芳香族分解菌; 根际效应

中图分类号: S154.37

土壤微生物是土壤物质循环和能量流动的主要参与者, 其中微生物活细胞数量是衡量农田土壤生态系统各功能是否正常的重要指标<sup>[1]</sup>。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。磺酰脲类除草剂因具有用量少、活性高、对人畜低毒等显著特点被国内外广泛使用。有关该类除草剂对土壤功能及某种微生物的不良影响前人已作了研究<sup>[2-5]</sup>。然而, 对于土壤中多类别的具有特殊意义的微生物生理群, 尤其是对我国南方稻麦轮作区域土壤中特殊微生物生理群区系的动态变化特征则未见报道。本文研究了施用甲磺隆对小麦根际与非根际土壤中氮素转化菌、硫素转化菌和芳香族化合物分解菌等具有特殊意

义微生物数量的影响, 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** 由江苏溧阳化工厂提供, 纯度 92.7%。

**1.1.3 供试土样** 供试土样为黄壤, 粉砂黏土质地, 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

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

于地平面下 5~15 cm 处。土样基本性状为：pH6.5(土水比 1:2.5), 比重 2.59 g/cm<sup>3</sup>, 总氮 2.9 g/kg, CEC16.3 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 1 010 g 上述土样中充分混匀, 配制成为甲磺隆含量为 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(图 1)。根箱由有机玻璃制成, 长、宽、高分别为 17、5 和 20 cm, 用 300 目尼龙网分隔成宽为 2 cm 和 3 cm 两室, 整个装置用螺丝固定。分别称取 300 g、450 g 实验土壤放入根箱两侧, 在窄室中种植小麦 20 株, 宽室中不种植物。同时设不加甲磺隆的土壤作为对照。

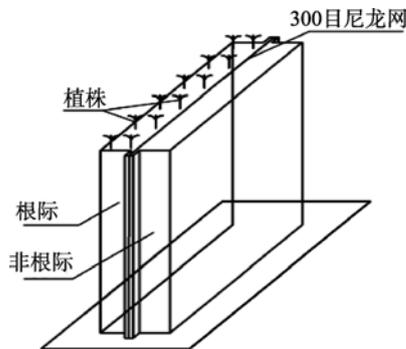


图 1 根箱示意图

**1.2.3 土样采集** 分别于种植后 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** 测定了甲磺隆胁迫下小麦根际固氮菌、亚硝化细菌、反硝化细菌、硫化细菌、

反硫化细菌、芳香族化合物分解菌的数量<sup>[6-7]</sup>。其中固氮菌采用 Ashby 培养基; 亚硝化细菌采用改良的 Stephenson 液体培养基; 反硝化细菌采用柠檬酸钠培养基; 硫化细菌采用硫代硫酸钠培养基; 反硫化细菌采用硫酸钠-酒石酸钾钠培养基; 芳香族化合物分解菌采用苯酚蛋白胨培养基。固氮菌采用稀释平板法计数, 其余各菌均采用 MPN 法计数。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲磺隆胁迫下氮素转化生理群区系的动态变化

固氮菌、亚硝化细菌和反硝化细菌均属于氮素转化菌。氮素转化菌直接参与有机氮和无机氮的转化过程, 与氮素循环密切相关。不同处理条件下固氮菌的数量变化如表 1 所示。甲磺隆处理的非根际土壤中固氮菌数量与对照非根际相比差异达到了  $P<0.01$  的显著性水平, 在整个培养期间处理样中的数量约为对照的一半左右。第 30 天, 处理根际土壤中固氮菌的数量为未处理根际土样中的 9 倍, 随后数量急剧下降, 二者之间的差距也相对缩小。可见, 甲磺隆对固氮菌的生长有影响但时效不长。Soulas<sup>[8]</sup>曾指出, 土壤环境中能以农药为能源物质的降解菌和其他非降解菌之间存在明显的拮抗作用, 可能导致那些具有协同降解作用的微生物数量减少, 而随着农药的降解殆尽, 降解菌和非降解菌之间对土壤中营养物质的竞争加剧, 降解菌的数量将会减少乃至消失。因此出现上述结果可能是因为甲磺隆加入初期, 由于土壤环境的急剧恶化, 敏感微生物不能在此环境中稳定生长, 而自生固氮菌等对甲磺隆不敏感的微生物得以大量繁殖, 后期大部分甲磺隆已降解, 土壤环境有所改善, 各类微生物活性逐渐恢复, 微生物之间的竞争作用又抑制了固氮菌的生长。比较对照的根际土壤与非根际土壤, 两者之间的差异未达到  $P<0.05$  的显著性水平, 根际效应不明显。

第 80 天, 处理根际与非根际土壤中亚硝化菌的数量分别为初始量的 31.7% 和 15.0%, 而对照根际与非根际土壤中同期相对量分别为 150.0% 和 50.0%, 可见甲磺隆的抑制作用十分明显。此外, 根际样品中亚硝化菌的数量高于对应非根际土壤, 尤其是在甲磺隆处理的土壤中二者差异显著( $P<0.01$ ), 这说明虽然甲磺隆对亚硝化细菌有明显的抑制作用, 但根际效应可在一定程度上缓解甲磺隆的毒性。

甲磺隆对反硝化细菌也存在显著的抑制作用。至第 50 天, 甲磺隆胁迫下根际土壤反硝化菌数量仅为

表 1 甲磺隆胁迫下小麦根际与非根际土壤中氮素转化菌的动态变化(lg CFU/g)(以干土计, 下表同)

微生物	土样	取样时间 (d)				
		0	15	30	50	80
固氮菌	甲磺隆处理	根际土壤	3.39 ± 0.12 a A	4.62 ± 0.10 a A	2.52 ± 0.06 b B	2.58 ± 0.07 c C
		非根际土壤	2.71 ± 0.12 c C	2.65 ± 0.09 c C	2.60 ± 0.09 b B	2.55 ± 0.03 d D
	对照	根际土壤	3.07 ± 0.06 b B	3.08 ± 0.08 b B	2.93 ± 0.02 a A	3.39 ± 0.07 a A
		非根际土壤	3.00 ± 0.10	3.06 ± 0.10 b B	3.04 ± 0.06 b B	2.89 ± 0.03 a A
亚硝化菌	甲磺隆处理	根际土壤	3.81 ± 0.02 a A	3.65 ± 0.03 a A	3.39 ± 0.11 a A	2.98 ± 0.09 c C
		非根际土壤	3.38 ± 0.12 b B	3.30 ± 0.06 b B	2.65 ± 0.03 b B	2.65 ± 0.03 d D
	对照	根际土壤	3.75 ± 0.06 a A	3.38 ± 0.09 b B	3.40 ± 0.05 a A	3.66 ± 0.11 a A
		非根际土壤	3.47 ± 0.03	3.05 ± 0.08 c C	3.18 ± 0.08 b B	3.36 ± 0.03 a A
反硝化菌	甲磺隆处理	根际土壤	6.30 ± 0.05 a A	5.95 ± 0.09 b B	5.18 ± 0.05 b B	7.15 ± 0.08 c B
		非根际土壤	5.98 ± 0.09 b B	5.20 ± 0.06 c C	4.85 ± 0.10 c C	6.60 ± 0.03 d C
	对照	根际土壤	6.29 ± 0.12 a A	6.60 ± 0.06 a A	6.65 ± 0.03 a A	7.98 ± 0.02 a A
		非根际土壤	6.20 ± 0.02	6.20 ± 0.04 a A	6.54 ± 0.11 a A	6.60 ± 0.06 a A

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

对照根际土壤中的 3.3%, 在非根际土壤中这一比例约为 1.8%, 抑制作用非常明显。小麦根系的生长仍在一定程度上缓冲甲磺隆的抑制作用, 至培养结束, 甲磺隆胁迫下的根际土壤中反硝化细菌为  $(7.15 \pm 0.08)$  lg CFU/g(以干土计), 而相同条件下非根际土中为  $(6.60 \pm 0.03)$  lg CFU/g。这可能因为随着小麦根系生长逐渐旺盛, 造成根呼吸加强, 根系附近氧压降低, 由此造成的嫌气环境更有利于土壤反硝化作用, 同时, 因为根系分泌大量能激发微生物活性的物质, 可使土壤反硝化菌活性增强。该试验结果与罗明等<sup>[9]</sup>的研究结果相符合。

## 2.2 甲磺隆胁迫下硫素转化生理群区系的动态变化

土壤中的硫素转化菌主要包括硫化细菌和反硫化细菌。与其他细菌相比, 硫化细菌数量相对较少, 且随小麦生长期的延长逐渐减少(表 2)。前一月甲磺

隆对根际土中硫化细菌抑制不明显, 处理和对照之间差异不显著( $P < 0.05$ )。但一个月后, 甲磺隆处理样中硫化细菌约为未处理对照根际土中的 1/3。对非根际土, 甲磺隆处理的土样与对照相比前 15 天差异就达到了  $P < 0.01$  的显著水平。同时, 处理根际土壤中硫化菌数量高于处理非根际, 根际效应也很明显。

小麦生长前一个月, 未处理的对照土样中反硫化细菌数量显著增多, 尤其是在根际土中, 其数量从  $(4.04 \pm 0.03)$  lg CFU/g 上升至  $(4.84 \pm 0.06)$  lg CFU/g, 约为对照非根际土中  $(4.21 \pm 0.05)$  lg CFU/g 的 4 倍, 根际效应明显。甲磺隆胁迫下非根际土中反硫化细菌的数量随着小麦生长持续减少, 说明反硫化菌对甲磺隆也较敏感。而相同条件下的根际土中反硫化细菌数量波动不大, 这可能是由于植物根系在一定程度上缓解了甲磺隆的抑制作用。可见, 反硫化细菌受甲磺隆的抑制作用和植物根系的促进作用同时存在, 其数量随

表 2 甲磺隆胁迫下小麦根际与非根际土壤中硫素转化菌的动态变化(lg CFU/g)

微生物	土样	取样时间 (d)				
		0	15	30	50	80
硫化菌	甲磺隆处理	根际土壤	2.89 ± 0.11 a A	2.90 ± 0.04 a A	2.06 ± 0.08 b B	1.95 ± 0.08 c C
		非根际土壤	2.54 ± 0.06 b B	2.11 ± 0.05 b B	1.39 ± 0.09 c C	1.29 ± 0.09 d D
	对照	根际土壤	2.84 ± 0.08 a A	2.77 ± 0.09 a A	2.54 ± 0.04 a A	2.29 ± 0.11 b B
		非根际土壤	2.93 ± 0.04	2.90 ± 0.05 a A	2.77 ± 0.10 a A	2.64 ± 0.15 a A
反硫化菌	甲磺隆处理	根际土壤	3.93 ± 0.04 c B	3.89 ± 0.03 c C	3.93 ± 0.03 b B	3.90 ± 0.06 a A
		非根际土壤	3.52 ± 0.07 d C	3.29 ± 0.09 d D	3.23 ± 0.05 d D	3.18 ± 0.03 d D
	对照	根际土壤	4.47 ± 0.09 a A	4.84 ± 0.06 a A	4.30 ± 0.08 a A	3.54 ± 0.03 c C
		非根际土壤	4.04 ± 0.03	4.10 ± 0.06 b B	4.21 ± 0.05 b B	3.69 ± 0.08 c C

时间的变化直接反映了二者作用的此消彼长的变化规律。

### 2.3 甲磺隆胁迫下芳香族分解菌群区系的动态变化

土壤环境中存在着大量可以代谢或降解芳香族化合物的微生物,其中大多数是细菌。另外,在芳香族化合物的降解菌中,真菌也起到了重要的作用,如白腐真菌是降解芳香族化合物能力最强的微生物,对所有芳香族化合物具有直接降解或潜在降解的能力<sup>[10]</sup>。

由表 3 可知,当小麦生长至第 30 天,甲磺隆处理根际土壤中芳香族化合物分解菌的数量高出未处

理的对照根际土壤约一个数量级,第 80 天,该类菌群的数量上升到 $(5.86 \pm 0.04)$  lg CFU/g。在非根际土壤中处理样与对照样在第 15 天差异即达到  $P < 0.01$  的显著水平,培养结束时甲磺隆处理非根际土中芳香族化合物分解菌的数量高出对照非根际两个数量级。可见,施用甲磺隆显著刺激了芳香族化合物分解菌的生长。并且随着小麦的生长,根际土壤中的芳香族化合物分解菌的数量逐步增长。由此推断,甲磺隆驯化以及作物根系生长的协同作用,共同促进了根际芳香族化合物分解菌的生长繁殖以及芳香族化合物的降解,这一结论说明利用土壤微生物和植物根系的协同作用来实现甲磺隆的快速降解是可能的。

表 3 甲磺隆胁迫下小麦根际与非根际土壤中芳香族化合物分解菌的动态变化(lg CFU/g)

微生物	土样	取样时间 (d)					
		0	15	30	50	80	
芳香族化合物降解菌	甲磺隆处理	根际土壤		$3.26 \pm 0.24$ b B	$3.67 \pm 0.06$ b B	$5.16 \pm 0.08$ a A	$5.86 \pm 0.04$ a A
		非根际土壤		$3.72 \pm 0.12$ a A	$4.03 \pm 0.04$ a A	$3.97 \pm 0.07$ b B	$5.31 \pm 0.07$ b B
	对照	根际土壤		$3.12 \pm 0.05$ b B	$2.96 \pm 0.16$ c C	$2.97 \pm 0.07$ c C	$4.39 \pm 0.07$ c C
		非根际土壤	$3.10 \pm 0.17$	$2.67 \pm 0.18$ c C	$2.55 \pm 0.13$ d D	$2.10 \pm 0.17$ d D	$3.02 \pm 0.12$ d D

## 3 结论

(1) 甲磺隆对固氮菌的生长有一定影响但不强烈,亚硝化菌和反硝化菌受甲磺隆毒害较严重,但小麦根系可在一定程度上缓解甲磺隆的抑制作用。

(2) 至培养结束,甲磺隆对硫化细菌和反硫化细菌抑制作用明显,处理根际与非根际土壤中二菌数量与相应对照之间差异均达到  $P < 0.01$  的显著水平。处理根际土壤中硫化细菌和反硫化细菌数量明显高于处理非根际,根际效应明显。

(3) 甲磺隆驯化以及作物根系的协同作用,共同促进了芳香族化合物分解菌的生长,这为利用植物和微生物联合修复受甲磺隆等芳香族化合物污染的土壤提供了理论依据。

### 参考文献:

[1] Insam H, Mitchell CC, Dormaar JF. Relationship of soil microbial biomass and activity with fertilization practice and crop yield of three Uhisols[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1991, 23: 459-464

[2] Dinelli G, Vicari A, Accinelli C. Degradation and side effects of three sulfonylurea herbicides in soil[J]. Journal of Environmental Quality, 1998, 27: 1 459-1 464

[3] 徐建民, 黄昌勇, 安曼, 陈祖亮. 磺酰胺类除草剂对土壤质量生物学指标的影响[J]. 中国环境科学, 2000, 20(6): 491-494

[4] 张敏恒. 磺酰胺类除草剂的发展现状、市场与未来趋势[J]. 农药, 2010, 49(4): 235-240

[5] 方程冉, 贺永华, 龙於洋, 谯华, 沈东升. 驯化小麦根际土壤中甲磺隆生物降解潜力研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2008, 34(5): 586-590

[6] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008

[7] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 农业出版社, 1986

[8] Soulas G. Mathematical model for microbial degradation of pesticides in soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1982, 14: 107-115

[9] 罗明, 文启凯, 陈全家, 盛建东, 王新燕, 徐余虹, 张国建, 陈奇. 不同用量的氮磷化肥对棉田土壤微生物区系及活性的影响[J]. 土壤通报, 2000, 31(2): 66-69

[10] 黄俊, 余刚, 成捷, 刘莉, 郑叶青. 白腐真菌生物降解五氯苯酚的动力学研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(1): 167-169