

除草剂二氯喹啉酸对水稻田土壤中微生物种群的影响*

吕镇梅¹ 闵航^{1**} 叶央芳^{1,2}

(¹浙江大学生命科学院, 杭州 310029; ²宁波大学生命科学与生物技术学院, 宁波 315211)

【摘要】 对好氧微生物采用平板稀释法, 厌氧微生物采用最大或然计数法和滚管法研究土壤中施入 0.33、0.67、1.00、1.33、2.00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土除草剂二氯喹啉酸后对土壤可培养微生物种群数量的影响。结果表明, 各种微生物对二氯喹啉酸的反应随其施加浓度的不同而有差异。二氯喹啉酸对水稻田土壤中好氧性细菌、水解发酵细菌、反硝化细菌数量的影响都是短暂的, 第 33 d 时均能恢复至接近对照水平。浓度在 1.33 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土以下时二氯喹啉酸促进真菌数量增加, 高于该浓度时则具有抑制作用。施用各浓度二氯喹啉酸初期, 对土壤中放线菌和产甲烷菌有一定程度的抑制效应, 但低浓度时抑制效应在培养后期消失。正常土壤施用量的二氯喹啉酸(即 0.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土)对水稻田土壤微生物各种群无实质危害级农药。

关键词 二氯喹啉酸 水稻田 好氧微生物 厌氧微生物 种群影响

文章编号 1001-9332(2004)04-0605-05 **中图分类号** X172 **文献标识码** A

Effect of herbicide quinclorac on microbial populations in a paddy soil. LÜ Zhenmei¹, MIN Hang¹, YE Yangfang^{1,2} (¹College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2004, 15(4): 605-609.

The potential effect of herbicide quinclorac on culturable microorganisms was investigated in a flooded paddy soil added with 0.33, 0.67, 1.00, 1.33, and 2.00 μg quinclorac $\cdot\text{g}^{-1}$ dried soil, by a 10-fold serial dilution plate technique for total soil aerobic bacteria, actinomycetes and fungi, by three-tube anaerobic most-probable-number (MPN) method with anaerobic liquid enrichment media for anaerobic fermentative bacteria (AFB), denitrifying bacteria (DNB) and hydrogen-producing acetogenic bacteria (HPAB), and by the rolling tube method in triplicate for methanogenic bacteria (MB) and nitrogen-fixing bacteria (NFB). The results showed that there were some differences in the aerobic heterotrophic bacteria, AFB and DNB between soils supplemented with quinclorac and non-quinclorac at the early stage of incubation, but none of them was persistent. The numbers of fungi and DNB were increased in soil samples treated with lower than 1.33 μg quinclorac $\cdot\text{g}^{-1}$ dried soil, while the CFU of fungi and HPAB were decreased in soil samples treated by higher than 1.33 μg quinclorac $\cdot\text{g}^{-1}$ dried soil. The population of actinomycete declined in negative proportion to the concentrations of quinclorac applied after 4 days, and the application of quinclorac greatly stimulated the growth of AFB and NFB. MB was more sensitive to quinclorac than the others, but its number in the soil samples with lower concentrations of quinclorac was nearly equal to that in the control on the 33rd d. It could be concluded that quinclorac was safe to the soil microorganisms when applied at normal concentrations (0.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dried soil).

Key words Quinclorac, Flooded paddy soil, Microbial populations, Aerobic heterotrophic bacteria, Anaerobic bacteria.

1 引言

农药杀稗王, 通用名二氯喹啉酸, 英文名称为 Quinclorac, 化学名称为 3, 7-二氯-8-喹啉羧酸, 为德国 BASF 公司开发的选择性芽前、芽后除草剂, 主要用于防治稻田中稗草和其它禾本科杂草, 具有良好除草效果和较长残效期^[6]。近几年应用越来越广^[3, 4]。土壤微生物生物量及活性能明显影响土壤肥力的持续性^[9, 18]。农田施用的化学农药大部分残留于土壤中, 从而对土壤微生物产生影响^[16]。不同品种的农药对不同土壤微生物的影响不同, 有些杀

菌剂能杀死土壤中某些有害细菌, 而另一些农药则能影响土壤微生物的正常活动, 甚至危及固氮菌、根瘤菌等有益微生物, 从而影响土壤肥力^[7, 19]。因此, 新农药开发中, 研究农药对微生物的影响, 已成为不少国家评价农药对生态环境安全性的一个重要指标^[20]。Ghini 等^[5]评估了二氯喹啉酸对其实验室分离微生物和淹水水稻田土壤好氧微生物活性及生物量的影响, 研究发现二氯喹啉酸对好氧微生物活性

* 国家“863”计划资助项目(2002A2104101)。

** 通讯联系人。

2003-01-07 收稿, 2003-05-15 接受。

及生物量的影响是暂时性的,一定时间内可恢复正常.但迄今有关二氯喹啉酸对水稻淹水土壤中厌氧微生物影响的系统报道还甚少.本文报道了二氯喹啉酸对水田土壤可培养好氧性细菌和厌氧性细菌生长的影响,以期安全、合理使用农药,防治环境污染及评估农药对水田土壤环境生物生态安全的影响提供科学依据.

表1 黄松田土的主要理化性状

Table 1 Main physico-chemical properties of soil tested^{a)}

	有机质 Organic matter (g·kg ⁻¹)	全氮 Total N (g·kg ⁻¹)	C/N	全钾 Total K (g·kg ⁻¹)	全磷 Total P (g·kg ⁻¹)	pH
黄松田土 Huangsong paddy soil	16.70(±0.12)	1.43(±0.01)	13.20(±0.22)	20.60(±0.34)	1.520(±0.025)	7.20(±0.10)

a)括号内为标准偏差 Values in the parenthesis are the means and standard deviations.

2.3 试验设计与实施

分别称取 1.5 kg 土样,装入 6 只相同的塑料小桶(上口直径 179 mm,底面直径 134 mm,高 161 mm)中,加自来水适量,保持土壤淹水状态,置于 28℃ 预培养两周,使微生物特别是厌氧微生物复活并构成一稳定区系.然后加入不同剂量 50% 的二氯喹啉酸,使各处理浓度分别为 0.33、0.67、1.00、1.33、2.00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土,搅拌混匀,继续培养,采用五点法定期取样测定稻田土的好氧和厌氧微生物种群数量.在整个培养时期内,随时补水,以稳定和模拟水田厌氧环境^[12,14].

2.4 微生物数量的测定

细菌、真菌、放线菌培养基组成见文献^[8],水解发酵性细菌培养基组成见文献^[15]和反硝化细菌培养基组成见文献^[17].厌氧固氮菌培养基配方(g·L⁻¹): KH₂PO₄ 0.2; K₂HPO₄ 0.8, MgSO₄·7H₂O 0.2, NaCl 0.1, CaSO₄·7H₂O 0.1, 甘露醇 10, 琼脂 18, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0^[11,13].

2.5 数据分析

所有试验数据均为 3 次重复的平均值.数据分析用 SPSS 10.0 for windows 分析软件.

3 结果与分析

3.1 二氯喹啉酸对好氧性细菌数量的影响

由图 1 可见,施用二氯喹啉酸浓度低于 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土时,到第 4 d 刺激好氧细菌数量的增加;高于该浓度时首先强烈抑制该细菌群的生长.至第 2 周时细菌数量迅速增加,甚至超过低浓度处理土样,但这种变化并不持续,培养第 33 d 时,与对照水平接近.经 *t*-检验分析,各处理土样好氧细菌数量与对照相比无显著差异($P=0.05$).

3.2 二氯喹啉酸对真菌数量的影响

由图 1 可见,二氯喹啉酸对水稻田土壤中真菌数量的影响具有明显的浓度界限,施用浓度小于 0.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土时,对真菌有明显的刺激作用,经 *t*-检验表明,两处理土样真菌数量与对照相比,达到 $P=0.05$ 水平的显著差异.施用浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干

2 材料与方法

2.1 药剂

50% 二氯喹啉酸可湿性粉剂,由浙江大学农药与环境毒理学研究所朱国念教授提供.

2.2 供试土壤

土壤样品采自浙江大学华家池校区实验农场水稻田(2~15 cm),土壤经风干,过 1 mm 筛备用.土壤理化性质见表 1.

土时,第 1 周内对真菌有些轻微抑制,而随着培养时间的延长,表现出一定的刺激作用.当二氯喹啉酸施加浓度为 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土时,便抑制真菌生长,而且第 33 d 时,真菌数量仍没有回升,与对照数量相比,达 $P=0.01$ 水平显著差异,表明二氯喹啉酸达到一定浓度即对真菌生长具有抑制作用.

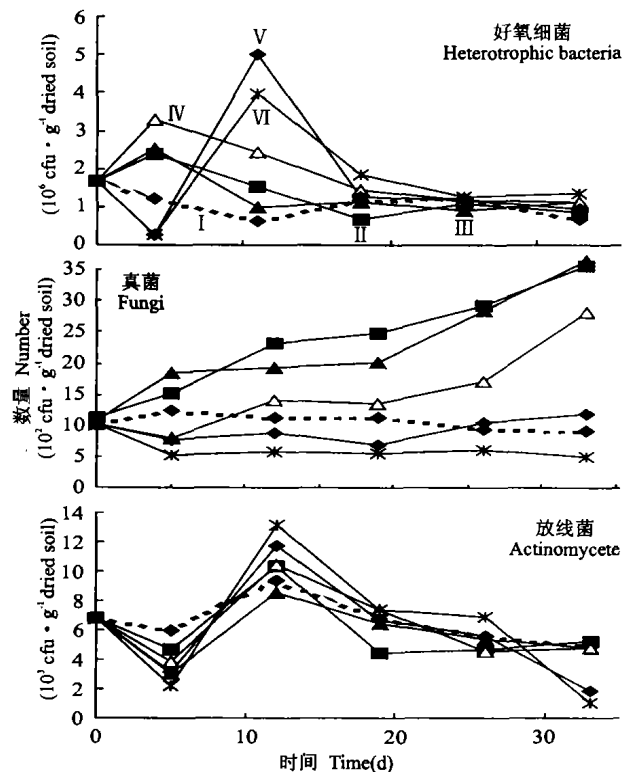


图1 二氯喹啉酸对水稻田土壤中好氧细菌、真菌、放线菌数量的影响
Fig.1 Effects of quinclorac on the number of aerobic heterotrophic bacteria, fungi and actinomycetes.

I. CK, II. 0.33 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dried soil, III. 0.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dried soil, IV. 1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dried soil, V. 1.33 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dried soil, VI. 2.00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dried soil. 下同 The same below.

3.3 二氯喹啉酸对放线菌数量的影响

土壤中放线菌对各浓度二氯喹啉酸都比较敏感(图 1),处理后第 4 d,各浓度二氯喹啉酸对土壤放线菌均呈一定程度的抑制效应.经相关性分析,这种

效应与二氯喹啉酸浓度具有一定的负相关性. 二氯喹啉酸施用浓度为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土时的放线菌抑制率为 70.2%. 5 d 后, 放线菌进入快速生长阶段, 但随着二氯喹啉酸的消耗, 放线菌数量下降, 并逐渐与对照持平. 在第 33 d 时, 放线菌数量又呈现第二次抑制, 而且抑制程度与二氯喹啉酸施用量也呈负相关 $y = -2.2575x + 5.7806, R^2 = 0.8799$. 结合二氯喹啉酸在水稻田土壤中半衰期为 8~11 d^[10] 和本结果, 推测其代谢产物对放线菌也存在一定影响.

3.4 二氯喹啉酸对厌氧性水解性细菌数量的影响

对 AFB 实验数据进行方差分析结果显示, 按 0.05 检验水平, 施用各浓度二氯喹啉酸土样 AFB 数量的均数之间无明显差异(图 2), 考虑时间因子, 0、5、19、26、33 d 时 AFB 数量之间不存在显著差异, 但 12 d 时的 AFB 数量与 0、19、26、33 d 时的 AFB 数量之间差异显著. 低于二氯喹啉酸施加浓度 $0.67 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土时, AFB 数量很快增加, 而 12 d 后即可基本恢复正常水平. 当二氯喹啉酸施用浓度略高于一般田间施用浓度(即 $0.67 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土)时, AFB 需要一段时间的滞留期以适应异源物质, 12 d 后数量达到最大, 19~26 d 后恢复正常.

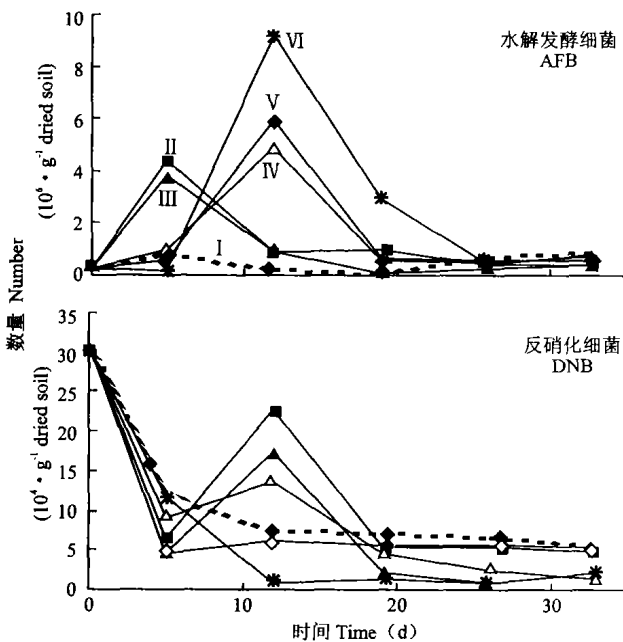


图 2 二氯喹啉酸对水稻田土壤中 AFB 和 DNB 数量的影响
Fig.2 Effect of quinclorac on the number of AFB and DNB in paddy soil.

3.5 二氯喹啉酸对厌氧反硝化细菌(DNB)数量的影响

图 2 反映了二氯喹啉酸对水稻田土壤中 DNB 数量的影响, 在施加各浓度二氯喹啉酸的初始 5 d, DNB 数量明显下降, 表现出对环境中异源物质明显的不适应. 但 12 d 后, 除施加浓度高于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土的二氯喹啉酸抑制 DNB 的生长外, 其他 3 个浓度

的二氯喹啉酸都不同程度地促进了 DNB 的增殖. 3 周后, DNB 数量又下降, 而且始终低于对照. 经 *t*-检验表明, 施加 $2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土二氯喹啉酸的处理土样与对照土样 DNB 数量相比, 在 $P = 0.05$ 水平下差异显著, 其它处理土样与对照相比在 $P = 0.05$ 水平下并无明显差异.

3.6 二氯喹啉酸对产氢产乙酸菌(HPAB)数量的影响

由图 3 可看出, 二氯喹啉酸对水稻田土壤中 HPAB 数量的影响, 施药最初 1 周内, HPAB 生长均受到抑制, 而 2 周后, 二氯喹啉酸施加浓度为 $0.33 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土和 $0.67 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土的土样中 HPAB 数量分别为对照的 4.1 和 2.7 倍, 3 周后, 仍明显高于对照, 但增长数量呈下降趋势, 说明低浓度二氯喹啉酸对水稻田土壤中 HPAB 生长起促进作用. 而二氯喹啉酸施加浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土时, HPAB 数量反而变化不明显. 浓度高于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土时, 严重抑制土壤中 HPAB 数量, 而且滞留期较长, 5 周后 HPAB 数量仍极低.

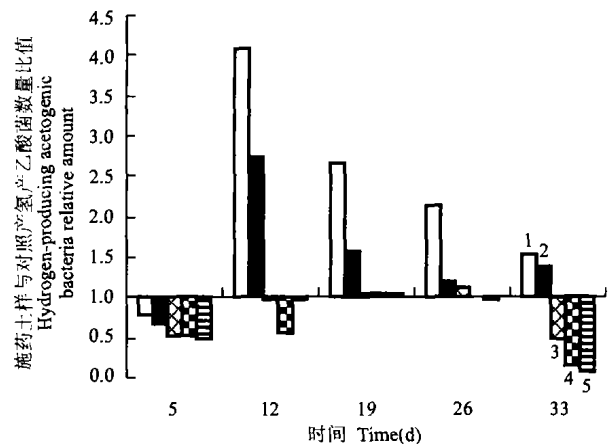


图 3 二氯喹啉酸对水稻田土壤中 HPAB 数量的影响
Fig.3 Effect of quinclorac on the number of hydrogen-producing acetic acid bacteria in paddy soil.
1) $0.33 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dried soil, 2) $0.67 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dried soil, 3) $1.00 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dried soil, 4) $1.33 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dried soil, 5) $2.00 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dried soil. 下同 The same below.

3.7 二氯喹啉酸对厌氧固氮菌数量的影响

图 4 中厌氧固氮菌数量以相对数值表示, 即处理土样与对照土样厌氧固氮菌数量的比值(下同). 第 1 周, 2 个施用浓度较小的土样厌氧固氮菌都受到不同程度的刺激作用, 而且刺激作用与二氯喹啉酸的施用浓度成正比, 但另 3 个土样由于所施用农药的浓度较高, 它们的厌氧固氮菌数量略有下降. 2 周后, 5 个浓度土样厌氧固氮菌数量均比对照高, 而农药浓度高的 3 个土样数量比低浓度的低. 4 周后逐渐接近对照水平, 而第 5 周二氯喹啉酸浓度为 1

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土的土样菌量为对照的 2.5 倍。

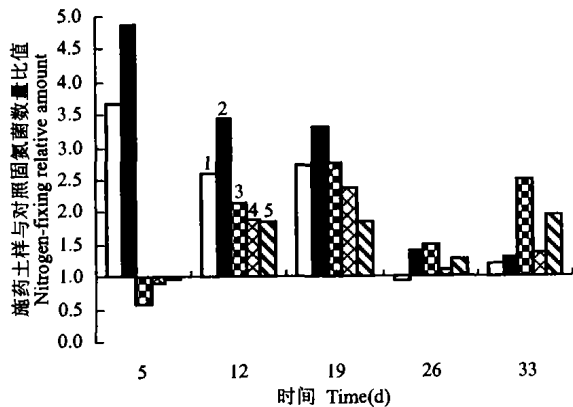


图 4 二氯喹啉酸对水稻田土壤中固氮菌数量的影响
Fig. 4 Effect of quinclorac on the number of nitrogen-fixing bacteria in paddy soil.

3.8 二氯喹啉酸对水稻田土壤中产甲烷菌数量的影响

图 5 表明二氯喹啉酸对水稻田土壤中产甲烷菌抑制作用较大,二氯喹啉酸施加浓度为 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土和 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土时,第 5 d,就对产甲烷菌抑制率分别达到 60.5% 和 72.9%,而且施用浓度越高,受抑制程度越强(图 6),产甲烷菌数量与二氯喹啉酸施用浓度之间符合 Logistic 模型, $y = 8.3467 / (1 +$

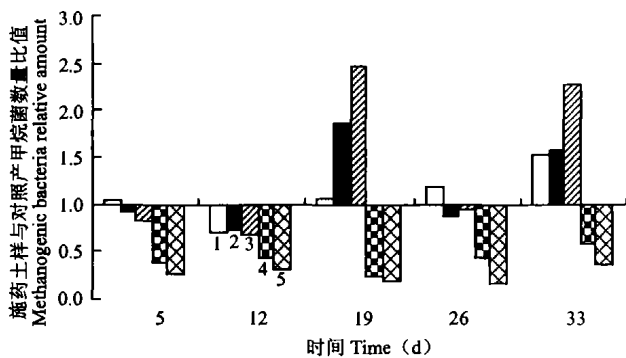


图 5 二氯喹啉酸对水稻田土壤中产甲烷菌数量的影响
Fig. 5 Effect of quinclorac on the number of methanogenic bacteria in paddy soil.

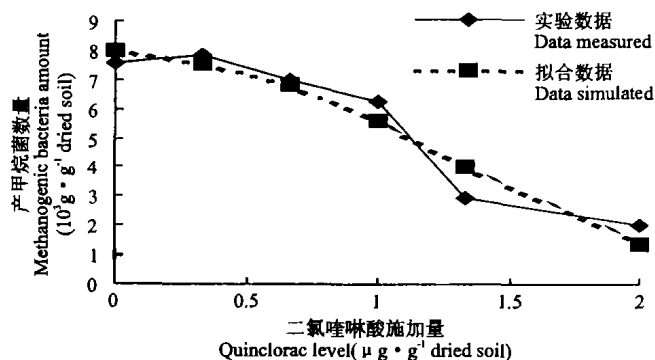


图 6 二氯喹啉酸施用量与土壤产甲烷菌数量的关系
Fig. 6 Correlation of the number of methanogenic bacteria in paddy soil with quinclorac level.

$\exp(-3.0788 + 2.3609x)$), $R^2 = 0.9247$. 施加浓度为 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土的土样直到第 5 周产甲烷菌才略有回升,但抑制率仍达 42.7%,说明高浓度二氯喹啉酸对水稻田土壤中产甲烷菌毒性较大,持续时间较长.当二氯喹啉酸施加浓度为 $0.67\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土、 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土时,经过一段滞留期,第 3 周表现出明显的刺激作用,产甲烷菌数量呈对数增长,而第 26 d 基本与对照相同,第 33 d 又有所增长。

4 结 语

实验结果表明,各种微生物对二氯喹啉酸的反应差别很大.与其它除草剂相比,正常施用量时,二氯喹啉酸比丁草胺和杀草丹对稻田土壤放线菌抑制作用小.各浓度二氯喹啉酸对土壤中好氧细菌总体影响不大($P = 0.05$).低浓度二氯喹啉酸(小于 $1.33\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土)能促进水稻田土壤中真菌和反硝化细菌数量.但施加高浓度二氯喹啉酸(大于 $1.33\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土),抑制了真菌和产氢产乙酸细菌数量,不利于水田土壤微生物种群结构的稳定和多样性保护.施用各浓度二氯喹啉酸初期,对土壤中放线菌和产甲烷菌均呈一定程度的抑制效应,但低浓度二氯喹啉酸抑制效应在培养后期消失。

另外,土壤中好氧细菌放线菌、厌氧细菌产甲烷细菌比其它细菌对二氯喹啉酸要敏感得多,容易受到抑制,而且施加高浓度二氯喹啉酸时,产甲烷细菌恢复时间较长.二氯喹啉酸对水解发酵性细菌的刺激性较强,各个浓度都对其有一定的刺激作用.二氯喹啉酸对水稻田土壤中好氧细菌、水解发酵性细菌和反硝化细菌数量的影响都是短暂的,实验结束即第 33 d 时都能恢复至接近对照水平.二氯喹啉酸以正常土壤施用量(即 $0.67\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土)施用时对水田土壤各微生物种群均无实质性危害。

土壤中可培养的微生物一般只占微生物总量的 0.1%~1% 左右,至多不超过 10%^[1,2].因此,作者认为有必要采用诸如变性梯度凝胶电泳(DGGE)、末端标记的限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)以及单链构象多态性(SSCP)分析等分子生态学手段研究二氯喹啉酸对土壤中难培养微生物种群和数量的影响,以进一步阐明二氯喹啉酸的施用对土壤微生物影响的生物学机理以及二氯喹啉酸在土壤和微生物中的可能分布与残存。

参考文献

- 1 Amann RI, Ludwig W, Scheidler KH. 1995. Phylogenetic identifi-

- cation and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *FEMS Microbiol Rev*, 59:143~269
- 2 Atlas RM, Bartha R. 1993. *Microbial Ecology. Fundamentals and Applications*. 3rd edition. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA. 563
 - 3 David L. 1997a. Efficacy of reduced-rate herbicide combinations in dry-seeded rice (*Oryza sativa*) on alluvial clay soil. *Weed Sci*, 45: 151~157
 - 4 David L. 1997b. Efficacy of reduced rates of quinclorac applied with propanil or propanil plus molinate in dry-seeded rice (*Oryza sativa*). *Weed Sci*, 45:824~828
 - 5 Ghini R, Ligo M, Hermes LC. 1997. Effect of herbicides on microbial biomass on soil of irrigated rice. *Ecosystema*, 22:97~101
 - 6 Grossmann K. 1998. Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides. *Weed Sci*, 46(6):707~716
 - 7 Jhonen BG, Drew EA. 1977. Ecological effects of pesticides of soil microorganisms. *Soil Sci*, 123(5):319~324
 - 8 Li F-D(李阜棣), Yu Z-N(喻子牛), He S-J(何绍江). 1996. *Experimental Techniques in Agricultural Microbiology*. Beijing: China Agricultural Press. 69~71(in Chinese)
 - 9 Liao M(廖敏), Huang C-Y(黄昌勇). 2002. Microbial biomass affected by cadmium with the occurrence of organic acids in red soil. *Chin J Appl Ecol(应用生态学报)*, 13(3):300~302(in Chinese)
 - 10 Lu Z-B(逯忠斌), Liu Y-L(刘伊玲), Xu W(徐威). 1996. Residual dynamics of quinclorac and its metabolite in rice field environment and rice. *Acta Sci Circums(环境科学学报)*, 16: 503~506(in Chinese)
 - 11 Min H, Zhao YH, Zheng P, *et al.* 1999. *Microbial Research Techniques*. Beijing: Science Press. 30~52
 - 12 Min H(闵航), Zhao Y-H(赵宇华), Lu Y-T(陆贻通), *et al.* 1993. Influences of trifluralin on the soil microorganisms and earthworm. *Rural Ecol Environ(农村生态环境)*, (3):40~43(in Chinese)
 - 13 Min H, Chen ZY, Zhao YH, *et al.* 2001a. Effects of trifluralin on soil microbial populations and the nitrogen fixation activities. *J Environ Sci Health*, 36(5):569~579
 - 14 Min H, Ye YF, Chen ZY. 2001. Effects of butachlor on microbial populations and enzyme activities in paddy soil. *J Environ Sci Health*, 36(5):581~595
 - 15 Qian Z-S(钱泽澍), Min H(闵航). 1985. *Sludge Gas Fermentation Microbiology*. Hangzhou: Zhengjiang Science and Technology Press. 260~261(in Chinese)
 - 16 Tu CM. 1990. Effect of four experimental insecticides on enzyme activities and levels of adenosine triphosphate in mineral and organic soils. *J Environ Sci Health*, 25(6):787~800
 - 17 Xu G-H(许光辉), Zheng H-Y(郑洪元). 1986. *Handbook on Edaphon Analysis*. Beijing: Agricultural Press. 239(in Chinese)
 - 18 Yao H-Y(姚槐应), He Z-L(何振立), Chen G-C(陈国潮), *et al.* 1999. Fertility significance of microbial biomass in red soil ryegrass system. *Chin J Appl Ecol(应用生态学报)*, 10(6):725~728(in Chinese)
 - 19 Yu L-Q(余柳青), Xu F-Q(徐福强), Yu S-K(俞圣康), *et al.* 1997. The effect of butachlor and satum on actinomycetes and streptomyces albus in paddy field. *Sci Agric Sin(中国农业科学)*, 30(6):81~83(in Chinese)
 - 20 Zhu L-S(朱鲁生), Zhang Y-F(张玉凤), Fan D-F(樊得方) 1999. Study on the effects of phoxim, fenprothrin and its mixture on respiration of soil microbe. *Agro-Environ Prot(农业环境保护)*, 18(1):25~27(in Chinese)

作者简介 吕镇梅,女,1976年生,博士生,主要从事环境微生物研究,已发表SCI论文6篇. Tel: 0571-86022589 E-mail: lvzhenmei@zju.edu.cn lvzhenmei@netease.com
