

乙草胺、甲胺磷及组合对农田黑土细菌种群生长及多样性的毒性效应

张惠文, 周启星, 张倩茹, 张成刚

(中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016, E-mail: huiwen.zhang@Yahoo.com.cn)

摘要:应用传统及分子微生物生态学 16S rDNA-PCR DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 等研究方法, 分别对不同浓度乙草胺、甲胺磷及其乙草胺-甲胺磷二元组合胁迫下黑土中细菌活细胞数量 (CFU Colony Forming Units)、种群丰富度 (Richness) 及其结构变化规律进行了研究。结果表明: 单因子乙草胺及甲胺磷对细菌 CFU 产生急性毒性效应, 但是长期毒性效应不显著; 高浓度乙草胺-甲胺磷的二元组合对细菌 CFU 产生复合毒性效应, 其对细菌 CFU 的复合抑制率明显高于相应组合中各单因子。乙草胺对可培养自生固氮菌表现出强烈刺激的作用, 甲胺磷表现为严重抑制作用; 而所有乙草胺-甲胺磷二元组合却对自生固氮菌 CFU 表现为复合毒性效应, 其复合毒性明显高于相应组合中各单因子对自生固氮菌的毒性效应。应用 16S rDNA-PCR DGGE 技术研究结果显示: 乙草胺、甲胺磷及乙草胺-甲胺磷组合不同程度地降低了黑土中细菌种群在分子水平上的丰富度, 并使其种群组成和结构均发生了显著变化。

关键词:乙草胺; 甲胺磷; 复合污染; 细菌种群

中图分类号: X592 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)04-0143-06

Toxic Effects of Acetochlor, Methamidophos and Their Combination on Bacterial Amount and Population Richness at Molecular Levels in Agricultural Black Soils

ZHANG Hui-wen, ZHOU Qi-xing, ZHANG Qian-ru, ZHANG Cheng-gang

(Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Science, Shenyang 110016, China E-mail: huiwen.zhang@Yahoo.com.cn)

Abstract: Bacterial amount and population richness in agricultural black soil under the stress of acetochlor, methamidophos and their combination were analyzed by CFU and 16S rDNA-PCR DGGE. Results showed that both of acetochlor and methamidophos had acute toxic effects on the growth of bacteria in agricultural black soil; Growth of free-living nitrogen fixing bacteria was inhibited badly by methamidophos, but stimulated greatly by acetochlor. The joint inhibitory effects of all combinations at different concentration between methamidophos and acetochlor on free-living nitrogen fixing bacteria were severer than each of their singal factors, which indicate the significant joint toxic effects between acetochlor and methamidophos on free-living nitrogen fixing bacteria in tested soil. Bacterial population diversity were decreased and the structure were changed respectively at different levels according to their concentration and combinations. Some bacterial species were diminished, but some others were accumulated under the stress of two agrochemicals and their combinations.

Key words: acetochlor; methamidophos; combined pollution; bacterial population

农药对生态环境和人类生活所潜在的生态风险和以及由此引起的食品安全问题正逐步引起人们的广泛关注^[1,2]。在农业生产实践中不合理的农药组合及其广泛施用已经成为当前农药污染典型特征之一。乙草胺和甲胺磷是目前我国东北地区农业生产, 尤其是旱田作物生产中被大面积使用的 2 种重要农药。其中乙草胺作为选择性除草剂, 广泛应用于玉米、大豆、棉花和花生的生长过程中; 甲胺磷作为广谱有机磷杀虫剂和杀螨剂, 用于棉花、谷物和果树等大多数害虫的防治。生产实践中, 这 2 种农药的同时施用在当地较为普遍。利用传统和分子微生物生态学研究方法揭示在乙草胺和甲胺磷复合作用胁迫下黑土微生物生态系统变化规律, 对于科学评价农药

潜在的生态风险具有重要的意义。到目前为止关于污染物复合效应的研究大部分集中在对重金属污染物复合毒性效应的研究方面。研究结果证明, 重金属等污染物的复合作用效应与相应单一因子相比其复合毒性效应被显著增强^[3~6]。

目前, 关于农药在土壤微生物生态毒理方面的研究报道均集中在对单一农药生态毒理方面^[7~12], 对复合农药胁迫下的生态效应的研究鲜见报道。本文以乙草胺-甲胺磷复合污染为例, 利用传统微生物

收稿日期: 2003-09-05; 修订日期: 2003-11-22

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(20225722); 中国科学院知识创新重要方向项目(KZCX2-SW-416)

作者简介: 张惠文(1963~), 女, 博士, 副研究员, 主要从事微生物资源与分子微生物生态学方面的研究工作。

生态学及分子微生物生态学 16S rDNA-PCR DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 研究方法, 对乙草胺、甲胺磷及其组合对东北黑土农田生态系统中不同类群细菌活细胞数量、种群多样性及其结构的毒性效应进行研究, 探讨农药复合施用对农田生态系统中土壤微生物所产生的复合毒性效应的基本规律。

1 材料与方法

1.1 供试土壤及土壤处理

供试土壤采自中国科学院黑龙江海伦农业生态

实验站(地理位置位于 47°27' N, 126°55' E), 分别采集 8 年以上未施过任何农药的试验样地 5 个不同位点 0 ~ 20 cm 土壤, 供试土壤基本理化性质见表 1。

采集土样经适当风干并充分混匀后, 过 2 mm 土壤筛, 将准备好的各种农药储备液按照表 2 的浓度组合投加到各组土壤中, 放置 30 min 以上, 尽量使乙草胺中甲醇溶剂完全挥发, 向土壤中补加蒸馏水, 使土壤水分含量达到黑土田间最大持水量的 60%。分别将 250 g 处理土壤分装到每个玻璃培养杯中, 杯口覆盖封口薄膜, 每组处理 3 个重复。处理土壤置于

表 1 供试土壤理化性质/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

Table 1 Chemical and physical characteristics of the tested soil/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

采样深度 / cm	pH	有机质	全氮	全磷	全钾	土壤颗粒(mm)物理组成/ %		
						沙粒($0.01\sim1.0$)	粉粒($0.001\sim0.01$)	粘粒(<0.001)
0~20	6.58	37.83	2.56	0.61	26.00	51.4	39.6	26.6

25℃恒温培养箱中闭光培养, 以称重法定期补充水分, 分别于培养的第 6、15 和 30 天测定土壤中目标微生物的 CFU (Colony Forming Units), 并利用土壤细菌 16S rDNA-PCR DGGE 技术对第 30 天各种处理土壤中细菌种群分子水平多样性的变化进行分析^[13]。

表 2 不同浓度乙草胺、甲胺磷及其二元组合处理/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Table 2 Treatment of acetochlor, methamidophos and their binary combination/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

处理组	乙草胺浓度			
	0	50	150	250
甲胺磷浓度	0	CK	1	2
	50	4		3
	150	5	7	8
	250	6	9	10

1.2 化学试剂

甲胺磷(纯度 > 99%) 购自沈阳化工研究院, 配制甲胺磷(1000 mg/L) 水溶储备液; 乙草胺产品名禾耐斯 (Harness) 90% 乳油(美国孟山都公司), 配制乙草胺甲醇溶液(223 mg/L) 储备液。其他化学试剂均为分析纯。土壤全基因组 DNA 提取、分离、纯化所涉及生化试剂及试剂盒均购自上海生工生物工程有限公司; 所有与 PCR 反应相关的酶及生化试剂(TaKaRa Ex Taq PCR-buffer Kid) 均购自宝生物(大连)有限公司(TaKaRa biotechnology Dalian Co., Ltd);

1.3 土壤细菌活细胞数量(CFU) 分析

本实验所选择的目标微生物为黑土土著细菌类群, 包括所有可人工培养土壤细菌以及土壤中植物生长有益细菌-自生固氮菌和综合固氮菌(Free-Living ni-

trogen fixation bacteria), 微生物计数方法参照文献^[14]。

1.4 DGGE 实验方法

(1) 土壤全 DNA 直接提取 黑土全 DNA 直接提取方法参考文献^[15]并做适当修改。粗提 DNA 样品经 DNA 纯化试剂盒(silver bead DNA extration Kid 上海生工生物工程有限公司) 纯化后, A_{260}/A_{280} 比值为 1.50 ~ 1.62, A_{260}/A_{230} 比值为 1.78 ~ 1.90, DNA 浓度大于 $180\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

(2) 土壤 DNA 细菌 16S rDNA-PCR 扩增 本文利用巢式 PCR 对土壤中所有细菌 16S rDNA V_3 高变区(*E. coli* 16S rDNA 357 ~ 518 Position) 进行扩增。其中细菌 16S rDNA 全长通用引物(*E. coli* 8 ~ 1541) 序列: $F_{8\sim27}$ (20 bp): 5'-AGAGTTTGATCC-TG-GCTCAG-3'; $R_{1541\sim1522}$ (20 bp): 5'-AAGGAGGT-GATCCAGCCGCA-3'; 细菌 16S rDNA V_3 高变区(*E. coli*: 357 ~ 518) 序列通用引物: 357F-GC/518R^[13]。本文所有 PCR 反应均在温度梯度 PCR 仪上完成(PCR Express Thermal Cycler HBPX220 thermoHybaid)。细菌 16S rDNA 全长通用引物 PCR 反应混合体系 50 μL (PCR 反应试剂盒: TaKaRa Ex Taq PCR-buffer Mg^{2+} plus Kid) 包括: 10 $\times$ Taq 缓冲液 5 μL , dNTP 混合液 4 μL , 引物 F_8 及 R_{1522} 各 40 pmol, DNA 模板 10 ng, Taq 酶 2.5 U。PCR 反应在 95℃ 预变性 5 min 后进行由 95℃ 变性 1 min, 62℃ 退火 1 min 到 72℃ 延伸 3 min 进行 15 个循环。细菌 16S rDNA V_3 高变区(*E. coli*: 357 ~ 518) 序列引物 PCR 反应混合体系 50 μL 包括: 10 $\times$ Taq 缓冲液 5 μL , dNTP 混合液 4 μL , 引物 357F-GC 及 518R 各 40 pmol, 上述 PCR 产物 DNA 模板

3 μ L, Taq 酶 2.5 U; PCR 过程包括 3 个循环程序:第 1 程序:由 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s 到 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 10 个循环;第 2 程序:由 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60~55 $^{\circ}$ C 退火 30 s (- 0.5 $^{\circ}$ C/ 循环) 到 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 10 个循环;第 3 程序:由 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s 到 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 10 个循环;最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min.

(3) DGGE 条件 DGGE 变性梯度凝胶电泳 (D-Code system, Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) 过程温度保持在 60 $^{\circ}$ C, 电极缓冲液 0.5 $\times$ TAE(Tris- HCl, EDTA), 8% 聚丙烯酰胺, 变性梯度 30%~60% (100% 变性相当于 7 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 尿素和 40% 去离子甲酰胺); PCR 产物加样量 40~50 μ L, 120 V, 330 min. 电泳胶片利用改进的 Bas-sam 银染色方法^[16] 进行银染色, 染色胶片干燥后进行扫描分析并封片保存.

1.5 实验结果处理

根据 DGGE 图谱指纹信息, 对所有处理土壤 16S- rDNA- PCR DGGE 指纹图谱指纹进行统计, 得出谱带类型总数(N_{total}); 同时对每种处理土壤 16S- rDNA- PCR DGGE 类型进行统计分析, 得到每种处理土壤样品 DGGE 指纹谱带数(N_i), 通过计算每种

处理土壤 DGGE 指纹条带数量占有所有 DGGE 指纹谱带总类型谱带数的比率($P = N_i / N_{total}$), 作为各处理土壤样品细菌丰富度系数(P), 比较各种土壤中细菌的多样性变化. 根据各土壤样品 DGGE 条带指纹特征, 利用 PHYLIP3.0 分析软件将所有处理土壤样品进行相似性分析, 建立不同农药处理土壤细菌 DGGE 种群组成相似性矩阵图.

2 结果与讨论

2.1 乙草胺、甲胺磷及其二元组合对土壤中细菌生长及活细胞数量毒性效应及动态变化

土壤微生物区系中, 由于细菌典型的单细胞结构和快速的生长繁殖方式, 使其成为能对土壤外界环境条件变化作出即时响应的最为敏感的生物类群之一. 本文对不同农药及其组合胁迫下, 黑土中细菌种群活细胞数量变化及其规律进行了分析(图 1). 结果表明: 在处理初期, 3 种不同浓度(50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 、150 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 、250 mg $\cdot$ kg $^{-1}$) 乙草胺均强烈抑制土壤细菌的生长, CFU 增长率均低于 - 86.4%; 15 天时, 细菌生长逐渐恢复, 此时细菌 CFU 的增长率分别为 36.5%、8.9% 和 - 24.3%; 30 天时, 所有乙草胺处理土壤细菌 CFU 均进一步恢复, 增长率分别

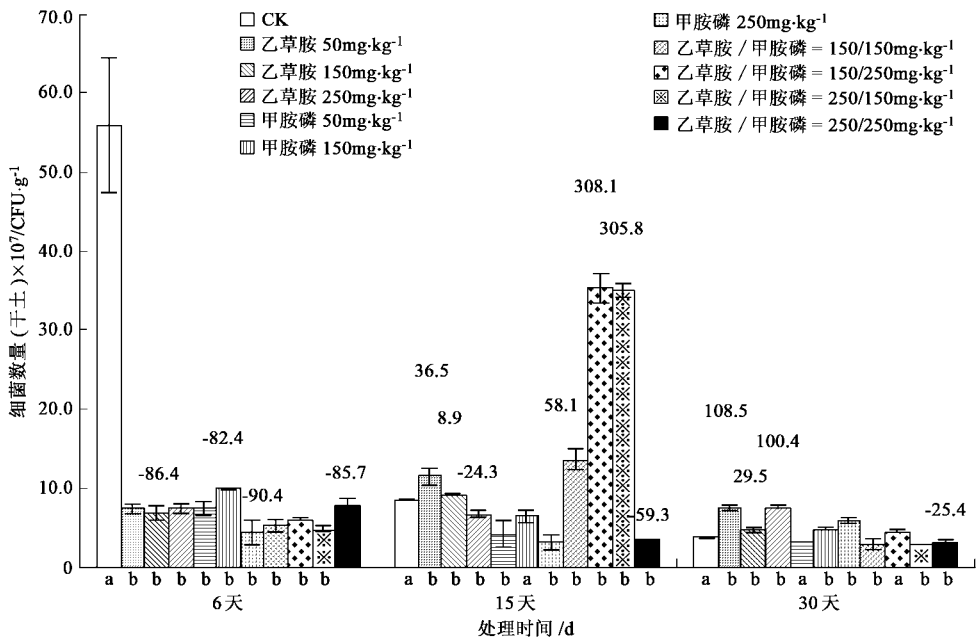


图 1 2.3 和 4 中字母为各处理土壤 CFU 与对照组比较, 在 $p = 0.05$ 水平上 T 检验差异显著性分析, 相同字母差异不显著, 不同字母差异显著; 图中数值为各组与对照组比较组比较活细胞数量提高百分率(%).

图 1 乙草胺、甲胺磷及其复合胁迫对黑土土壤细菌 CFU 的影响

Fig.1 Effects of acetochlor, methamidophos and their combination on black soil indigenous bacterial CFU

为 108.5%、29.5% 和 100.4%. 由此证明乙草胺对土壤细菌生长具有急性毒性效应; 但是, 这种毒性作用可以随处理时间延长不断被减弱, 土壤中被抑制的细菌 CFU 逐渐得到恢复, 并最终显著高于对照.

作为一种剧毒农药,甲胺磷对土壤细菌种群生长的毒性效应结果见图1.第6天时,甲胺磷对土壤细菌产生明显的急性毒性效应,所有处理土壤细菌 CFU 均显著低于对照土壤,其中最为典型的是 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理土壤细菌 CFU 的抑制率达到 90.4%;第30天时,除 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理土壤细菌 CFU 与对照无显著差异外,其他浓度甲胺磷均使土壤中细菌 CFU 显著高于对照土壤.实验结果证明:较高浓度甲胺磷对土壤细菌的长期效应是使土壤细菌 CFU 显著提高.

由于乙草胺和甲胺磷对供试土壤细菌较强的急性毒性效应,二者复合后于第6天同样表现出对土壤细菌 CFU 强烈的急性抑制效应(图1).本实验中乙草胺与甲胺磷所有组合对土壤细菌 CFU 的抑制率均大于 85.7% ($250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乙草胺/ $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲胺磷).证明农药复合处理在不同程度对土壤中绝大部分细菌的生长表现为急性毒性效应.但是,乙草胺与甲胺磷的组合在经历急性毒性期后,于第15天,土壤细菌 CFU 便明显恢复,并比对照分别

提高 58.1%、308.1% 及 305.8%.但是其中 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乙草胺/ $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲胺磷高浓度组合处理土壤细菌 CFU 在整个处理期间,均低于对照土壤;长期效应低于相应的单因子处理土壤,表现出明显的复合毒性效应.

从不同浓度乙草胺、甲胺磷胁迫下土壤细菌 CFU 变化规律分析,土壤中大部分细菌对乙草胺和甲胺磷敏感,使处于快速生长期的细菌被严重抑制;同时,作为环境中半衰期较短的农药品种^[17],乙草胺和甲胺磷在自然环境中降解主要依靠微生物的代谢作用.当乙草胺和甲胺磷施入土壤以后,土壤中存在的部分乙草胺和甲胺磷降解微生物的代谢作用使乙草胺和甲胺磷被大量降解,减轻了乙草胺和甲胺磷对微生物的毒性效应;同时,作为外加碳源乙草胺和甲胺磷的降解产物为微生物生长提供营养基质;另外,土壤中部分降解和耐受细菌经过一段时间的适应,在部分敏感细菌被严重抑制(见图3)的情况下,生存竞争压力减小,从而使土壤中这部分具有特殊功能的细菌数量得到恢复并最终显著高于对照.

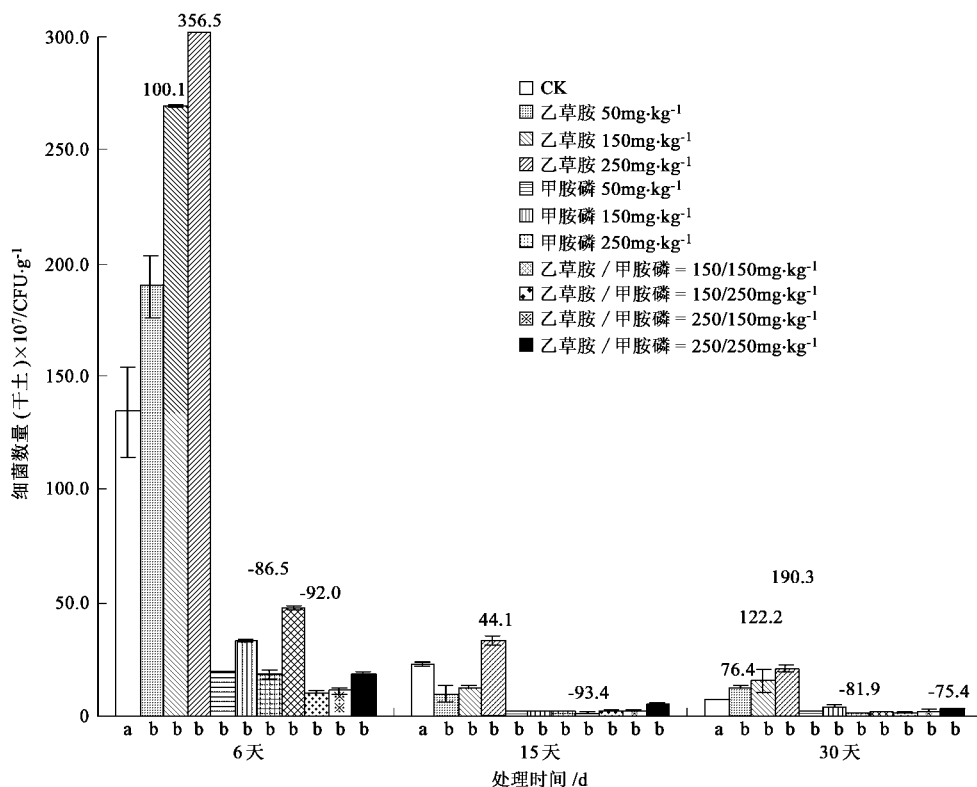


图2 乙草胺、甲胺磷及其复合胁迫对土壤固氮菌 CFU 的影响(图注同图1)

Fig. 2 Effects of acetochlor, methamidophos and their combination on CFU of black soil indigenous free living N-fixing bacteria

土壤中自生固氮菌是土壤中典型的植物生长益生菌,通过对土壤中自生固氮细菌数量变化的监测,可以作为评价农药胁迫对土壤微生物毒性效应及生态风险的微生物学指标之一.本文对乙草胺和

甲胺磷及其组合胁迫下土壤中自生固氮菌 CFU 变化规律的研究结果显示:乙草胺对土壤自生固氮菌表现为刺激效应,而甲胺磷在整个处理过程中却表现为强烈的抑制效应.这是2种截然相反的作用结果,但

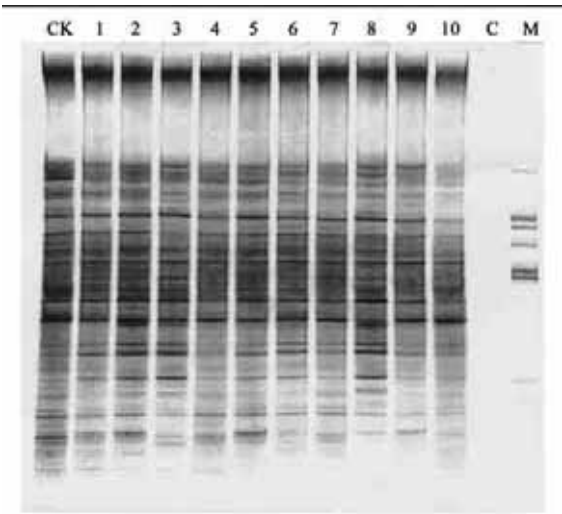
是,当乙草胺与甲胺磷进行组合时,土壤自生固氮菌的生长却受到强烈的抑制(图2)。第6天时,150 mg·kg⁻¹乙草胺使土壤自生固氮菌 CFU 比对照提高 100.1%,250 mg·kg⁻¹甲胺磷使土壤自生固氮菌 CFU 增长 - 86.5%,将二者进行组合后却使土壤自生固氮菌 CFU 增长 - 92.0%,说明组合使相应的乙草胺和甲胺磷对土壤自生固氮菌抑制作用被加强,表现出明显的协同毒性效应。在 30 天处理过程中,所有乙草胺与甲胺磷组合均使土壤自生固氮菌 CFU 数量明显低于对照,并且始终没有得到恢复,表现出对土壤自生固氮菌强烈的协同毒性效应。

上述结果在细胞水平上证明:尽管农药胁迫对土壤细菌 CFU 具有强烈的急性毒性效应,但是这种毒性效应可以随着处理时间的延长得到不同程度的恢复,因此在对农药生态风险进行评价时应当考虑时间因素。同时尽管在乙草胺、甲胺磷及其组合胁迫下土壤细菌 CFU 可以被恢复,甚至高于对照,但是其中部分以自生固氮菌为代表的敏感种群的 CFU 却被严重抑制并难以自然恢复,造成不可自然逆转的毒性效应。因此,在利用传统的土壤细菌群落 CFU 方法进行农药生态风险评价时,由于方法学的局限,不能对所有涉及到的土壤微生物的动态变化进行综合监测,因此其所获得的关于农药微生物生态风险评价的结果值得商榷。

2.2 乙草胺、甲胺磷及其组合胁迫对土壤细菌分子水平多样性 种群结构的毒性效应

应用 16S rDNA-PCR-DGGE 分子生物学技术,研究了草胺、甲胺磷及其组合对土壤细菌种群多样性及其结构的影响。根据 DGGE 指纹图谱丰富度分析,除对照以外,150 mg·kg⁻¹乙草胺/150 mg·kg⁻¹甲胺磷组合处理土壤中细菌的丰富度最高(0.8039),而 250 mg·kg⁻¹乙草胺/250 mg·kg⁻¹甲胺磷组合土壤细菌的丰富度最低(0.4706)。其他组合处理土壤细菌丰富度与对照比均有不同程度的降低,与相应单因子相比,差异不显著。说明不管土壤细菌 CFU 怎样变化,乙草胺、甲胺磷及其组合处理均使土壤细菌在 16S rDNA 分子水平的多样性降低,使土壤细菌种群组成受到不同程度的影响;同时,适当浓度乙草胺与甲胺磷组合处理对土壤细菌种群丰富度无明显的协同效应;但是,高浓度乙草胺和甲胺磷组合对土壤细菌多样性产生明显的复合毒性效应。(图3和表3)。

由各组处理土壤细菌 DGGE 图谱谱带类型分析,在 150 mg·kg⁻¹乙草胺/150 mg·kg⁻¹甲胺磷以



CK:对照处理组;Lane1:50×10⁻⁶ Aceto;Lane2:150×10⁻⁶ Aceto; Lane3:250×10⁻⁶ Aceto; Lane4:50×10⁻⁶ Metha; Lane5:150×10⁻⁶ Metha; Lane6:250×10⁻⁶ Metha; Lane7:150×10⁻⁶ Aceto+150×10⁻⁶ Metha; Lane8:150×10⁻⁶ Aceto+250×10⁻⁶ Metha; Lane9:250×10⁻⁶ Aceto+15×10⁻⁶ Lane 10:250×10⁻⁶ Aceto+250×10⁻⁶ Metha; C:Control; M:100bp ladder Marker

图3 乙草胺-甲胺磷复合处理土壤 16S rDNA-PCR-DGGE电泳图谱
Fig.3 16S rDNA DGGE of univrsal bacteria in black soil under the stress of acetochlor, methamidophos and their combination

表3 乙草胺、甲胺磷及复合胁迫下土壤细菌 16S rDNA-DGGE 丰富度系数
Table 3 Bacterial richness-index of black soil under the stress of acetochlor methamidophos and their combination by 16S rDNA-PCR-DGGE

序号	实验处理 / mg·kg ⁻¹	每处理组谱带数	特异性谱带数	丰富度系数
CK		46	0	0.9020
1	乙草胺=50	37	0	0.7255
2	乙草胺=150	40	5	0.7843
3	乙草胺=250	39	4	0.7647
4	甲胺磷=50	37	0	0.7255
5	甲胺磷=150	35	3	0.6863
6	甲胺磷=250	32	3	0.6275
7	乙草胺/甲胺磷=150/150	41	3	0.8039
8	乙草胺/甲胺磷=150/250	40	3	0.7843
9	乙草胺/甲胺磷=250/150	38	3	0.7451
10	乙草胺/甲胺磷=250/250	24	0	0.4706
谱带类型总数:		51		

及 150 mg·kg⁻¹乙草胺/250 mg·kg⁻¹甲胺磷组合中,有大量谱带被显著富集,说明乙草胺与甲胺磷组合处理土壤中大量耐受及利用乙草胺或甲胺磷细菌种群的生长和繁殖被强烈刺激,数量急剧增加,成为该土壤细菌群落中的优势种群之一。对各处理土壤细菌 DGGE 谱带类型相似性进行聚类分析(图4)结果表明:50 mg·kg⁻¹乙草胺和 50 mg·kg⁻¹甲胺磷单因子处理土壤的细菌种群组成与对照土壤最为相似

(第 II 组),说明低浓度乙草胺和甲胺磷进入土壤后通过土壤吸附-解吸和降解等作用,实际上对土壤细菌群落组成的影响较小.3 种浓度乙草胺处理土壤中 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 两组土壤细菌 DGGE 指纹类型更相似,并且与 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乙草胺/ $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲胺磷和 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乙草胺/ $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲胺磷 2 种组合处理土壤的细菌 DGGE 图谱类型接近,同属于第 III 组类型,在这组类型中,乙草胺是决定土壤细菌类型的重要因素.与此同时, $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲胺磷处理组与 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乙草胺/ $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲胺磷组合处理土壤细菌 DGGE 指纹类型最相似,同属于第 IV 组类型,证明在该类型中,甲胺磷是决定土壤细菌组成种类的最主要因素. $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乙草胺/ $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲胺磷(第 I 组)组合无论是丰富度还是 DGGE 指纹类型均与其他组合处理和相应单因子处理土壤显著不同,表现出明显的乙草胺和甲胺磷对土壤细菌的协同毒性效应.

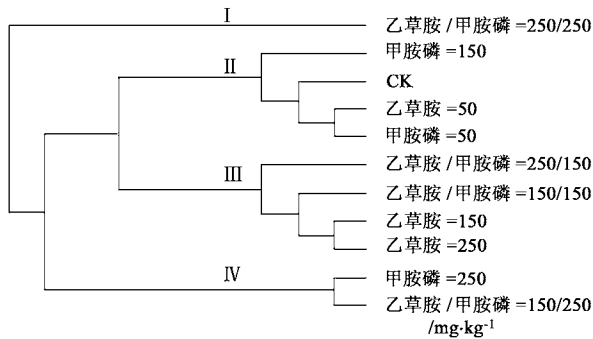


图 4 乙草胺、甲胺磷及复合胁迫下黑土细菌种群组成相似性矩阵图
Fig.4 Similarity matrix of bacterial composition in black soil under the stress of acetochlor, methamidophos and their combination

3 结论

在细胞水平上,不同浓度乙草胺、甲胺磷及其组合对黑土中一些敏感细菌种群产生严重的急性毒性效应,使土壤中细菌活细胞数量急剧降低;但是,长期效应却使土壤细菌活细胞数量得到恢复甚至超过对照土壤;乙草胺对土壤中自生固氮菌活细胞数量起强烈的刺激作用,但甲胺磷却起强烈的抑制作用;当二者组合后对土壤中自生固氮菌产生严重的短期和长期毒性效应,而且大大加强了相应浓度单因子乙草胺和甲胺磷的抑制效应水平,表现出明显的复合毒性效应.因此,在土壤中被恢复的总细菌细胞数量可能来自于土壤中对乙草胺、甲胺磷具有耐受或降解能力细菌的大量富集,而那些对乙草胺和甲胺磷敏感的细菌类群的活细胞数量却受到严重的抑制.

利用分子微生物生态学 16S-rRNA-PCR-DGGE

研究方法对乙草胺、甲胺磷及其组合处理黑土中细菌种群多样性和组成进行研究,其结果表明:尽管处理土壤经过长期培养,其中细菌总活细胞数量可以恢复到正常水平,但是与此相对应的土壤细菌种群多样性和种群结构却发生了明显的变化.不适当的乙草胺和甲胺磷组合对黑土细菌群落的组成和结构均可产生严重的复合毒性效应.

致谢:本文得到中国科学院黑龙江海伦农业生态实验站站长韩晓增研究员、赵全老师等在样品采集方面的大力支持,云南大学姜成林和徐丽华教授在实验方法学方面的无私帮助,谨表衷心感谢.

参考文献:

- [1] Pearce GR. Agrochemical Pollution Risk Associated with Irrigation in Developing Countries, A Guide HR [C]. England: Wallingford, 1998.
- [2] 苏允兰,莫汉宏,杨克斌,等.土壤中结合态农药环境毒理研究进展[J].环境科学进展,1997,7(3):45~51.
- [3] 周启星.复合污染生态[M].北京:环境科学出版社,1995.1.
- [4] Hadjispyrou S, Kungolos A, Anagnostopoulos A. Toxicity, Bioaccumulation and interactive effects of organotin, Cadmium, and Chromium on *Artemia franciscana* [J]. Ecotoxicol Environ Safety, 2001, 49:179~186.
- [5] Zhou QX. Combined chromium and phenol pollution in a marine prawn fishery [J]. Bull Environ Contamin Toxicol., 1999, 62: 476~482.
- [6] 王新,梁仁录,周启星. Cd-Pb 复合污染对稻田土壤生态系统的生态效应[J].城市生态环境,2001,17:41~44.
- [7] 徐建民,黄昌勇,安曼,陈祖亮. 磺酰脲类除草剂对土壤生物学指标的影响[J].中国环境科学,2000,20(6):491~494.
- [8] Martensson A M, et al. Impact of phosphorus fertilization on VAM diaspores in two Swedish long-term field experiment [J]. Agriculture Ecosystem and Environment, 1994, 47(4):327~333.
- [9] 王发园,刘润进. 生物因子对 AM 真菌多样性的影响[J].生态学报,2002,22(3):403~408.
- [10] Ibekwe A Mark, Papiernik Sharon K, Gan Jianying, Yates Scott R. Impact of Fumigants on Soil Microbial Communities [J]. Appl Environ Microbiology, 2001, 67(7):3245~3257.
- [11] 朱鲁生,王军.乙草胺和秀去津对土壤微生物的影响及安全性评价[J].土壤与环境,2000,9(1):71~72.
- [12] 于建垒,宋国春,万鲁长,等.乙草胺对土壤微生物的影响研究[J].环境污染治理技术与设备,2000,1(5):61~65.
- [13] Koshikawa Ogino, H, Nakahara T, Uchiyama H. Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91:625~635.
- [14] 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,1986.91~136.
- [15] Kuske Cheryl R, Banton Kaysie L, Asorada Dante L, et al. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cell and spores in soil [J]. Applied and environmental Microbiology, 1998, 64(7):2463~2472.
- [16] Bassam B J, Caetano Anollés G. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Annual Biochemistry, 1991, 196:80~83.
- [17] Antonious G F, Snyder J C. Residues and Half Lives of Acephate, Methamidophos, and Pirimiphos Methyl in Leaves and Fruit of Greenhouse-Grown Tomatoes [J]. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1994, 52:141~148.