

# 土壤中乙草胺的微生物降解及其对防除稗草持效性的影响\*

朱九生 乔雄梧\*\* 王 静 秦 曙

(山西省农业科学院植物保护研究所山西省农药重点实验室,太原 030031)

**【摘要】** 采用气相色谱法和生物测定法,研究了土壤中乙草胺的微生物降解及其对防除稗草持效性的影响。结果表明,在同样的湿度和温度条件下,当添加到土壤中的乙草胺浓度为 1.25、2.5 和 5.0 mg·kg<sup>-1</sup> 时,相同浓度的乙草胺在非灭菌土壤中的半衰期显著短于灭菌土壤,说明土壤微生物对乙草胺有明显的降解作用。三大主要菌群分离培养物降解实验与上述结果一致。生物测定结果表明,乙草胺在非灭菌土壤中防除稗草的持效期显著短于灭菌土壤,微生物的存在缩短了乙草胺在土壤中的滞留时间,从而降低了乙草胺防除稗草的持效性。

**关键词** 乙草胺 微生物降解 持效性 土壤

**文章编号** 1001-9332(2006)03-0489-04 **中图分类号** X171.5 **文献标识码** A

**Biodegradation of acetochlor in soil and its persistence against *Echinochloa crusgalli*.** ZHU Jiusheng, QIAO Xiongwu, WANG Jing, QIN Shu (Shanxi Key Laboratory of Pesticide Science, Institute of Plant Protection, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2006, 17(3): 489~492.

Gas chromatograph and bioassay were used to study biodegradation of acetochlor and its influence on the persistence against *Echinochloa crusgalli* in soil. The results showed that half-life of degradation of acetochlor was significantly shorter in unsterilized soil than that in sterilized soil under the same experimental conditions of concentrations, water content and temperature, when acetochlor was added to the soil with concentrations of 1.25, 2.5 and 5.0 mg·kg<sup>-1</sup> respectively, which demonstrated that microorganisms could evidently degrade acetochlor in soil. The experiment on degradation of three main kinds of microorganism cultivated in liquid culture medium gave same results above. The bioassay's result showed that the period of acetochlor persistence against *Echinochloa crusgalli* was shorter in unsterilized soil than that in sterilized soil, which indicated that existence of microorganism could accelerate the degradation of acetochlor and shorten remaining time of the herbicide in soil, consequently reduce its persistence against the weed.

**Key words** Acetochlor, Biodegradation, Persistence, Soil.

## 1 引言

全世界每年除草剂使用量达  $85 \times 10^4 \sim 88 \times 10^4$  t(按有效成分计),其中有相当一部分作为土壤处理剂使用。施入土壤中的除草剂在环境中的降解和转化受多种因素影响。微生物作为土壤生态系统中数量最大、种类最多的物种,对除草剂的降解起着举足轻重的作用。大量研究证实,有很多土壤微生物对包括除草剂在内的多种农药有降解作用<sup>[8,13~19,22]</sup>。微生物的降解作用可减少除草剂在土壤中的滞留时间,对消除农药污染、减轻环境压力起到了积极的作用。但是过快的生物降解导致除草剂持效性降低,反而使其不能充分发挥应有的防治效果。因此,研究土壤中除草剂的微生物降解以及微生物降解对持效性的影响,对科学合理使用农药、防治环境污染具有重要意义。

乙草胺属酰胺类除草剂,化学名称为 2'-乙基-6'-甲基-N-(乙氧甲基)-2-氯代乙酰替苯胺,作为土壤处理使用,能有效防除一年生禾本科杂草和部分阔叶杂草,是我国近年来使用最多的万吨级除草剂品种之一。目前对乙草胺在植物体内的代谢、残留及其在环境中的行为研究较多<sup>[1~4,6,15,18,20,21]</sup>,而在土壤中的生物降解及其对防除稗草持效性的影响研究较少。本试验研究了乙草胺在灭菌与非灭菌土壤中的降解规律及其对防除稗草持效性的影响,在此基础上,对土壤中 3 类主要可培养微生物对该农药的降解作用做了进一步的研究,旨在明确微生物降解对土壤中乙草胺的持效性和生态环境的影响,为乙草胺科学、合理和安全使用提供理论依据。

\* 山西省自然科学基金资助项目(20001092)。

\*\* 通讯联系人。

2005-02-21 收稿,2005-06-29 接受。

## 2 材料与方法

### 2.1 供试材料

50%的乙草胺乳油由河北省张家口市宣化农药厂提供。土壤样品为华北褐土,采自太原市山西省农科院植物保护研究所枣园,采样深度为0~20 cm耕作层土壤,经自然风干过2 mm筛备用。土壤质地为壤土,pH 8.3,有机质含量为22.6 g·kg<sup>-1</sup>,全N 1.28 g·kg<sup>-1</sup>,全P 0.62 g·kg<sup>-1</sup>。供试稗草(*Echinochloa crusgalli*)种子由河北农林科学院提供。培养细菌、真菌、放线菌的液体培养基分别为牛肉膏蛋白胨、马丁氏和高氏一号培养基,具体配方见参考文献<sup>[10]</sup>。

### 2.2 研究方法

**2.2.1 实验稗草处理** 经测定,稗草发芽率为80%。试验前2~3 d需对稗草种子进行催芽。具体过程是:取稗草种子适量,分别置于垫有滤纸的培养皿中,加少量蒸馏水,置于30℃温箱中催芽,露白后的种子放入8℃左右的冰箱中保存。

**2.2.2 乙草胺降解和持效性试验** 土壤分灭菌和非灭菌处理两组。灭菌土壤于121℃灭菌2 h,间歇灭菌3次,非灭菌土壤需提前1周进行预培养。灭菌土加入无菌水,非灭菌土加自来水,调节土壤含水量至田间最大持水量的60%。随后在土壤中添加50%的乙草胺乳油无菌水稀释液,使土壤中的乙草胺浓度分别为1.25、2.5和5.0 mg·kg<sup>-1</sup>。混匀后,置于25℃、黑暗培养箱中培养,采用称总量法每间隔2~3 d调节土壤含水量1次,使之保持恒定。加药当天及加药后1、3、7、14、21、35、49、70、91、112和133 d取土壤样品放入-20℃低温冰箱中保存。待取样完毕后,再解冻样品,在温室中统一播种稗草种子进行生测,同时取土壤样品进行残留量测定。灭菌土壤的制备及操作均在无菌室内进行。试验设灭菌与非灭菌不拌药对照,每处理重复3次。

**2.2.3 降解能力测试** 土样制备同2.2.2。在制备好的自然土壤样品中添加2.5 mg·kg<sup>-1</sup>乙草胺,于25℃培养箱中黑暗培养,分别取0、7和14 d的土样5 g,加入45 ml无菌水中,摇匀,静置,吸取土壤稀释液(土壤菌悬液)1 ml,分别加入含450 μg乙草胺的9 ml三大培养基中,30℃恒温摇床培养3和7 d后,测定培养基中残留量。降解率(%)=[(对照检出重-处理检出重)/对照检出重]×100。分别设不加土壤稀释液的培养基为对照,每处理设2次重复。

**2.2.4 乙草胺残留测定** 土壤残留测定参照文献<sup>[20]</sup>进行。将10 ml液体培养基全部转移到预先加有50 ml、8% NaCl水溶液的分液漏斗中,用30和30 ml石油醚萃取2次,以下步骤同文献<sup>[20]</sup>。

**2.2.5 乙草胺持效性测定** 在6 cm×6 cm的塑料钵中,加解冻后的处理土壤85 g,播种已露白的稗草种子10粒,播后覆土(同一处理解冻后的土壤)35 g,用药勺将土壤稍加压实,称重并记录。将塑料钵放入塑料筐中,用地膜封盖,将其置于合适条件下培养。3 d后去掉地膜,随后间隔1~2 d取出称取各钵重量,补充失去的水分,保持土壤含水量基本恒定。在播种后8 d,用剪刀剪下杂草地上部,称其鲜重。根据下

列公式计算乙草胺对稗草的抑制率:抑制率(%)=[(对照杂草鲜重-处理杂草鲜重)/对照杂草鲜重]×100。

用SPSS软件对拌药后取样天数与相应的抑制率作拟合分析,建立数据拟合模型,并对拟合方程进行F检验,同时求出抑制率达70%时的天数(IT<sub>70</sub>),以IT<sub>70</sub>来评价各处理的持效性<sup>[12]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 乙草胺在灭菌与非灭菌土壤中的降解

乙草胺在灭菌与非灭菌土壤中降解回归分析结果见表1。从表1可以看出,用一级反应动力学方程 $C_t = C_0 e^{-kt}$ 可很好地描述乙草胺在土壤中的降解(相关系数均在0.9以上),但在两组土壤中的降解速率常数( $k$ )存在明显差异,即在灭菌土壤中降解速率常数低,在非灭菌土壤中降解速率常数高。乙草胺在非灭菌土壤中的降解速度快于在灭菌土壤中的降解速度。结果表明,在非灭菌土壤条件下,1.25、2.5和5.0 mg·kg<sup>-1</sup>浓度处理组降解半衰期分别为5.1、3.8和2.8 d;在灭菌土壤条件下,3种浓度处理组降解半衰期分别为20.0、22.5和23.4 d,后者的半衰期为前者的4~8倍,远远大于前者。可见,土壤原位微生物对土壤乙草胺的降解速度有显著影响,即微生物的存在能加快土壤中乙草胺的降解,缩短乙草胺在土壤中的滞留时间。

### 3.2 乙草胺在灭菌与非灭菌土壤中的持效性

以添加农药后取样时间( $x$ )为自变量、鲜重抑制率( $y$ )为因变量,对测定结果进行拟合,其结果见表2。从表2可以得出,鲜重抑制率的动态变化可用直线方程( $y = a + bx$ )进行拟合表征,且方程对鲜重抑制率动态变化的拟合均达极显著水平( $P < 0.01$ )。对两组土壤的拟合方程进行比较可知,在非灭菌土壤中,拟合方程斜率( $b$ )的绝对值显著大于在灭菌土壤中的绝对值。随着时间的延长,鲜重抑制率在非灭菌土壤中的降低速度远远快于在灭菌土壤中的降低速度。1.25、2.50和5.00 mg·kg<sup>-1</sup>处理的持效期(IT<sub>70</sub>),在非灭菌土壤条件下分别为9.3、13.0和22.9 d,在灭菌土壤条件下分别为52.8、86.1和116.5 d。在灭菌土壤中,乙草胺防除稗草持效性长,而在非灭菌土壤中,乙草胺防除稗草持效性短,说明土壤微生物的存在能快速削弱土壤中乙草胺对稗草的防除效果,降低乙草胺防治杂草的持效性。

乙草胺在土壤中的降解半衰期与其持效性的关系见表3。从表3可以看出,在相同添加浓度条件下,灭菌土壤中的乙草胺半衰期长,对稗草的持效期

表1 乙草胺在土壤中降解的动力学参数

Table 1 Kinetic parameter for degradation of acetochlor in the soils

土壤处理 Soil treatment	添加浓度 Concentration (mg·kg <sup>-1</sup> )	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient(r)	半衰期 Half-life DT <sub>0.5</sub> (d)	降解速率常数 Constant (k)
非灭菌土 Unsterilized soil	1.25	$C_t = 0.5014e^{-0.0506t}$	-0.9465	5.1	$5.06 \times 10^{-2}$
灭菌土 Sterilized soil	1.25	$C_t = 1.0116e^{-0.0250t}$	-0.9459	20.0	$2.50 \times 10^{-2}$
非灭菌土 Unsterilized soil	2.50	$C_t = 0.9523e^{-0.0637t}$	-0.9248	3.8	$6.37 \times 10^{-2}$
灭菌土 Sterilized soil	2.50	$C_t = 1.6572e^{-0.0197t}$	-0.9187	22.5	$1.97 \times 10^{-2}$
非灭菌土 Unsterilized soil	5.00	$C_t = 2.4338e^{-0.0634t}$	-0.9534	2.8	$6.34 \times 10^{-2}$
灭菌土 Sterilized soil	5.00	$C_t = 4.0799e^{-0.0293t}$	-0.9622	23.4	$2.93 \times 10^{-2}$

表2 乙草胺在灭菌与非灭菌土壤中防除稗草的持效性

Table 2 Persistence of acetochlor against *Echinochloa crusgalli* in sterilized and unsterilized soils

土壤处理 Soil treatment	添加浓度 Concentration (mg·kg <sup>-1</sup> )	回归方程 Regression equation	决定系数 Coefficient of determination(R <sup>2</sup> )	IT <sub>70</sub> (95% CL) (d)	P
非灭菌土 Unsterilized soil	1.25	$y = 92.67 - 2.4431x$	0.8938	9.3(5.0~14.0)	<0.002
灭菌土 Sterilized soil	1.25	$y = 106.5 - 0.6909x$	0.8640	52.8(39.5~61.9)	<0.001
非灭菌土 Unsterilized soil	2.50	$y = 95.50 - 1.9648x$	0.9596	13.0(9.7~16.5)	<0.001
灭菌土 Sterilized soil	2.50	$y = 100.7 - 0.3566x$	0.9305	86.1(70.7~94.8)	<0.001
非灭菌土 Unsterilized soil	5.00	$y = 107.3 - 1.6296x$	0.9357	22.9(18.0~27.0)	<0.001
灭菌土 Sterilized soil	5.00	$y = 103.2 - 0.2851x$	0.7827	116.5(66.0~129.2)	<0.002

表3 乙草胺在土壤中的降解半衰期与其持效性关系

Table 3 Relationship between half-life and persistence of acetochlor in soils(d)

土壤处理 Treatment	添加浓度 Concentration(mg·kg <sup>-1</sup> )					
	1.25		2.5		5.0	
	半衰期 Half-life	持效期 Persistence	半衰期 Half-life	持效期 Persistence	半衰期 Half-life	持效期 Persistence
非灭菌土 Unsterilized soil	5.1	9.3	3.8	13.0	2.8	22.9
灭菌土 Sterilized soil	20.0	52.8	22.5	86.1	23.4	116.5

表4 土壤中3类可培养微生物对乙草胺的降解作用

Table 4 Biodegradation of acetochlor in media

取样天数 Days after treatment (d)	微生物种类 Classes of microorganism	培养3 d 3 days of inoculation			培养7 d 7 days of inoculation		
		处理检出量 Content detected of treatment(μg)	对照检出量 Content detected of control(μg)	降解率 Degraded rate (%)	处理检出量 Content detected of treatment(μg)	对照检出量 Content detected of control(μg)	降解率 Degraded rate (%)
		0	细菌 Bacteria	202.2±6.9	211.0±5.5	4.1	221.1±2.3
	真菌 Fungus	56.2±4.8	332.8±2.1	83.1	11.7±1.2	319.8±10.0	96.3
	放线菌 Actinomycetes*	344.3±7.7	371.1±2.4	7.22	366.8±11.1	291.0±21.8	-
7	细菌 Bacteria	100.3±0.9	266.2±8.9	62.3	90.5±0.6	256.9±3.8	64.8
	真菌 Fungus	18.5±1.9	293.3±0.4	93.7	24.6±1.0	309.6±1.0	92.1
14	细菌 Bacteria	227.7±3.0	384.4±13.2	40.8	38.1±3.8	306.4±4.5	87.6
	真菌 Fungus	348.3±2.5	412.5±2.2	15.6	8.3±8.3	413.5±2.3	98.0

\*放线菌为培养7和14 d的检测结果 Data for actinomycetes treatment were results detected in 7 days or 14 days of inoculation.

也长;而非灭菌土壤中的乙草胺半衰期短,对稗草的持效期也随之变短.结果说明,土壤中乙草胺的持效性与微生物对其降解有直接的关系.可以认为,乙草胺在土壤环境中的持效性降低,在很大程度上是由于微生物对其降解作用所造成的.

### 3.3 土壤中可培养微生物对乙草胺的降解作用

土壤中3类可培养微生物对乙草胺的降解结果见表4.结果进一步证实,微生物对乙草胺有明显的降解作用,但不同类群的微生物对乙草胺的降解能力存在明显的差异.在试验的3类菌群中,真菌对乙草胺的降解能力最强,不论是在土壤拌药当天,还是拌药后7 d或14 d,各土壤样品中的可培养真菌对

乙草胺的降解率7 d均达90%以上(92.1%~98.0%),而拌药当天所取的土壤可培养细菌和放线菌,培养7 d,对乙草胺基本上无降解作用.然而,随着拌药土壤培养时间的延长,细菌对乙草胺的降解能力逐渐增强.拌药后7 d土壤样品中的可培养细菌对乙草胺的降解率7 d可达到60%以上,拌药后14 d土壤样品中的可培养细菌对乙草胺的降解率7 d达85%以上,说明细菌对乙草胺的降解有一个适应和驯化过程.

## 4 讨论

在非灭菌土壤中,乙草胺的半衰期为2.8~5.1

d, 是其在灭菌土壤中的 1/4~1/8, 说明土壤微生物对乙草胺有明显的降解作用. 可培养微生物降解实验也证实了这一结果. 具体来说, 在施药初期, 土壤真菌对乙草胺的降解起主导作用; 随着时间延长, 土壤细菌的降解作用也逐渐增强. 在本实验条件下, 土壤放线菌对该农药没有明显的降解作用.

施入土壤中的乙草胺, 对土壤的呼吸强度和相关酶活性具有刺激效应<sup>[17]</sup>, 而土壤生物量及其代谢活性的高低, 直接影响到土壤中残留农药的多少<sup>[7]</sup>. 结果表明, 随着施药时间的延长, 可培养细菌对乙草胺的降解能力大大增强; 真菌的降解能力仍持续较强态势. 可见, 乙草胺施入土壤后, 增强了土壤微生物的活性, 进而提高了对该农药的降解能力. 生测结果也表明, 乙草胺在非灭菌土壤中的持效期比在灭菌土壤降低 4/5~5/6, 这与残留结果非常吻合.

大量实验证明, 微生物对农药的降解有一个诱导和适应的过程. 施用农药, 给农田生态系统中的微生物提供了选择和适应机会, 并且诱导其逐渐具有了降解该类农药的能力, 宏观上的表现就是农药的持效性降低. 例如, 20 世纪 80 年代克百威土壤处理效果越来越差, 其原因正是由于微生物增强了对克百威的降解而造成的<sup>[9]</sup>. 生产中, 随着某一除草剂品种的连年使用, 微生物对该除草剂的适应期消失, 分解加快, 持效期缩短<sup>[11]</sup>. 因此可以认为, 土壤微生物和该土壤是否曾受到过乙草胺的诱导驯化, 对此除草剂在该土壤中的持效性有决定性的作用.

农药微生物降解过程实际上是微生物系列酶促反应的生化过程, 受环境因素影响变化很大<sup>[5, 21]</sup>. 因此, 人们在相关理论指导下, 就可以根据实际情况和施药的不同的阶段, 采用适当的方法, 创造不同的微生物生长环境, 最大可能地缓解控害保收和农药残留之间的尖锐矛盾. 例如, 在施药初期, 控制土壤水、肥等因素, 来减缓微生物对农药的降解; 后期, 对作物进行追施有机肥或适当补充水分, 来刺激微生物大量生长, 减少环境中的农药残留.

## 参考文献

- Breaux EJ. 1986. Identification of the initial metabolites of acetochlor in corn and soybean seedlings. *J Agric Food Chem*, **34**: 884~888
- Fang T(冯涛), Cao A-H(曹爱华), Xu G-J(徐光军), et al. 2000. Study on residue of acetochlor in peanut and in soil. *Peanut Sci Technol*(花生科技), (3): 1~4(in Chinese)
- Hua R-M(花日茂), Yue Y-D(岳永得), Fan D-F(樊德方). 2000. The photodegradation of acetochlor in water. *Chin J Pestic Sci*(农药学报), **2**(1): 71~74(in Chinese)
- Jablonkai I, hulesch A, Barta I. 1997. Factors affecting the phototoxicity of the herbicide acetochlor to monocotyledonous and dicotyledonous weeds. *Pestic Sci*, **49**(4): 395~397
- Kong F-X(孔繁翔), Yin D-Q(尹大强), Yan G-A(严国安). 2000. *Environmental Biology*. Beijing: Higher Education Press. 209~230(in Chinese)
- Luo H-F(罗海峰), Qi H-Y(齐鸿雁), Zhang H-X(张洪勋). 2004. The impact of acetochlor on the bacterial diversity in soil. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), **44**(4): 519~522(in Chinese)
- Qiao X-W(乔雄梧). 1999. Environmental behavior of pesticides in soils. *Pestic Sci Admin*(农药科学与管理), **20**(supp.): 12~16(in Chinese)
- Qiao X-W(乔雄梧), Ma L-P(马利平), Hummel HE. 1995. Pathways of atrazine degradation in soils and its effects on the persistence of atrazine. *Rural Eco-Environ*(农村生态环境), **11**(4): 5~8(in Chinese)
- Shelton DR. 1997. Enhancement of carbofuran degradation by soil enrichment cultures, bacterial cultures and by synergistic interaction among bacterial cultures. *Pestic Sci*, **49**(2): 164~168
- Shen P(沈萍), Fan X-R(范秀容), Li G-W(李广武). 1999. *Experimental Techniques in Microbiology*. Third edition. Beijing: Higher Education Press. 50~57(in Chinese)
- Su S-Q(苏少泉), Song S-Z(宋顺祖). 1996. *Chemical Control of Farmland Weeds in China*. Beijing: China Agricultural Press. 125~200(in Chinese)
- Tu L-P(屠乐平). 1991. About conceptions of soil treatment by herbicides. *Pestic Sci Admin*(农药科学与管理), (2): 46~47(in Chinese)
- Wang H-Z(汪海珍), Xu J-M(徐建民), Xie Z-M(谢正苗), et al. 2003. Degradation of metsulfuron methyl in soil I. Effect of soil properties. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), **14**(1): 79~84(in Chinese)
- Wu C-H(吴春华), Chen X(陈欣). 2004. Impact of pesticides on biodiversity in agricultural areas. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), **15**(2): 341~344(in Chinese)
- Yu J-L(于建垒), Zhao D-Y(赵德友), Liu B-H(刘炳海). 1998. Study on residue of acetochlor in soybean and in soil. *Pesticides*(农药), **37**(1): 28~30(in Chinese)
- Zhang C-D(张承东), Han S-K(韩朔葵), Lu Y(卢颖). 2001. Degradation of mefenacet in different soils. *Agro-Environ Prot*(农业环境保护), **20**(3): 152~154(in Chinese)
- Zhang H-W(张惠文), Zhang Q-R(张倩茹), Zhou Q-X(周启星), et al. 2003. Jointly toxic effects of acetochlor and Cu<sup>2+</sup> on indigenous microorganism communities in phaeozem. *J Agro-Environ Sci*(农业环境科学学报), **22**(2): 129~133(in Chinese)
- Zhang R-F(张瑞福), Jing J-D(蒋建东), Cui Z-L(崔中利), et al. 2004. Degradation of methyl parathion in soil and Chinese chive by strain DLL-1. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), **15**(2): 295~298(in Chinese)
- Zhang W(张卫), Yu Y-L(虞云龙), Lin K-F(林匡飞), et al. 2004. Microbial degradation of Abamectin in soil. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), **15**(11): 2175~2178(in Chinese)
- Zheng H-H(郑和辉), Ye C-M(叶常明). 2001. The transferability of acetochlor and butachlor in soil. *Chin J Environ Sci*(环境科学), **22**(5): 117~121(in Chinese)
- Zhu J-S(朱九生), Qiao X-W(乔雄梧), Wang J(王静), et al. 2004. Degradation and the influencing factors of acetochlor in soils. *J Agro-Environ Sci*(农业环境科学学报), **23**(5): 1025~1029(in Chinese)
- Zhu L-S(朱鲁生), Wang J(王军), Fan D-F(樊德方), et al. 2003. Degradation of fenproprathrin, phoxim and their mixture by soil microbes. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), **14**(6): 1023~1025(in Chinese)

作者简介 朱九生, 男, 1963年生, 硕士, 副研究员. 主要从事农药残留分析和农药应用技术研究, 发表论文 40 余篇. Tel: 0351-7127683; E-mail: zgju5963@163.com

责任编辑 肖红