

# 绿草定-2-丁氧基乙酯 对竹林土壤微生物的影响

崔海军<sup>1</sup> 吴晓丽<sup>1\*</sup> 章忠军<sup>2</sup> 袁娜<sup>3</sup>

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 浙江省富阳市渌渚镇林业站, 浙江 富阳 311405; 3. 浙江省杭州市余杭区林业水利局, 浙江 杭州 311100)

**摘要:**采用室内培养的方法,研究了绿草定-2-丁氧基乙酯在不同施药剂量下对竹林土壤微生物种群和生物量碳的影响。土壤微生物种群的影响研究采用平板培养法,土壤微生物生物量碳的影响研究采用熏蒸-提取法,提取液中的有机碳采用总有机碳分析仪测定。结果表明,绿草定-2-丁氧基乙酯对细菌高浓度时有抑制作用,低浓度时有刺激作用,生产用量(1.8 mg/kg)在培养的25 d内可恢复到对照水平。真菌培养结果表明,各浓度均有刺激作用,且随着浓度的增大刺激作用增强,生产用量在培养的40 d内可恢复到对照水平。放线菌培养结果表明,较低浓度时有刺激作用,较高浓度时有抑制作用,生产用量在培养的25 d内可恢复到对照水平。绿草定-2-丁氧基乙酯低浓度时土壤微生物生物量碳增加,高浓度时土壤微生物生物量碳减小,生产用量在40 d内恢复到对照水平。随着培养时间的延长,各浓度对土壤微生物的影响均减小,可能与绿草定-2-丁氧基乙酯的缓慢降解有关。模拟非均匀施药情况的10倍生产用量(18 mg/kg)60 d内可恢复到对照水平,说明绿草定在合理用药的情况下对土壤微生物影响较小,不会构成长期不可恢复的影响。

**关键词:**绿草定; 绿草定-2-丁氧基乙酯; 竹林土壤; 微生物; 微生物生物量碳

**中图分类号:**S154 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2286(2011)06-1082-06

## The Impact of Triclopyr-2-butoxyethylester on Microbe in Bamboo Forest Soil

CUI Hai-jun<sup>1</sup>, WU Xiao-li<sup>1\*</sup>, ZHANG Zhong-jun<sup>2</sup>, YUAN Na<sup>3</sup>

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry Science, Fuyang 311400, China; 2. Forest Station of Luzhu Town of Fuyang, Fuyang 311405, China; 3. Hangzhou City Yuhang District Water Conservancy Bureau of Forest, Hangzhou 311100, China)

**Abstract:** The effects of triclopyr-2-butoxyethylester under different concentrations on bamboo forest soil microbial populations and biomass carbon were studied through laboratory incubation experiment. The study on soil microbial population used plate culture method. The study on microbial biomass carbon used fumigation-extraction method, and the organic carbon in the extract was quantified with organic carbon analyzer. The results indicated that high concentrations of triclopyr-2-butoxyethylester had an inhibiting effect and low concentrations had a stimulating effect. The production amount (1.8 mg/kg) could recover to the control level within 25 days. Fungal culture results showed that all the concentrations had stimulating effect and it increased with concentration increasing. The production amount could recover to the control level within 40 days. Actinomycetes

收稿日期:2011-07-29 修回日期:2011-09-16

基金项目:国家林业局林业公益性行业专项(201004008)和浙江省重点科技创新团队项目(2009R50030-05)

作者简介:崔海军(1985—)男,硕士生,主要从事竹林培育和竹林生态研究, E-mail: navy138332@163.com; \* 通讯作者:吴晓丽,副研究员,博士, E-mail: wuxiaoli02@163.com。

culture results showed that lower concentrations had a stimulating effect, and higher concentrations had an inhibiting effect. The product amount could recover to the control level within 25 days. Soil microbial biomass increased in low concentrations of triclopyr-2-butoxyethylester, and reduced in high concentration. The production amount could recover to the control level within 40 days. With the culture time, the effect of all concentrations on soil microbes reduced, which might be related to the slow degradation of triclopyr-2-butoxyethylester. 10 times production amount (18 mg/kg) simulating non-uniform spraying condition could recover to the control level within 60 days, which indicated that triclopyr-2-butoxyethylester in rational use amount could have less impact on bamboo forest soil microbial populations, and would not constitute a long-term non-recovery effect.

**Key words:** triclopyr; triclopyr-2-butoxyethylester; bamboo forest soil; microorganism; microbial biomass carbon

土壤质量和土壤健康与农林业的可持续发展和环境质量的改善息息相关。微生物在土壤功能及土壤主要生态过程中直接或间接地起重要作用,包括对动植物残体的分解、养分的储存转化及异源生物的降解等<sup>[1]</sup>。土壤微生物几乎参与土壤中的一切生物化学反应,能够灵敏地反映土壤污染状况及土壤质量健康变化,因此可以用微生物学指标作为对土壤生态功能、土壤污染及环境质量评价的生物标志物<sup>[2-3]</sup>。长期以来,有关污染物对土壤微生物的研究主要集中在重金属方面,近几年涉及到除草剂对土壤微生物群落多样性及功能等方面的研究也在增加。探讨除草剂对土壤微生物生物量及其活性影响,将有助于评价除草剂是否对土壤生产力存在威胁<sup>[4]</sup>。

绿草定是一种常用除草剂,对绿草定的研究始于二十世纪七八十年代,研究主要集中在绿草定在植物、土壤中的运动和残留<sup>[5-9]</sup>、绿草定的选择活性<sup>[10]</sup>等。国内外有关绿草定对土壤微生物影响评价报道甚少,只有 P. Chakravarty 等<sup>[11]</sup>报道的绿草定与草甘膦、环嗪酮对 5 种外生菌根菌影响的比较。其长期使用是否对土壤微生物构成危害,是否会造成土壤质量的下降,有待进行研究做出评价。绿草定-2-丁氧基乙酯(triclopyr-2-butoxyethylester)是在绿草定结构基础上改造而成的新型除草剂<sup>[12]</sup>。2009 年在国内已经商业化生产。在毛竹林下杂草杂灌防除实践证明,绿草定-2-丁氧基乙酯对林下阔叶杂灌防除效果极佳,与草甘膦混用能有效防除林下所用杂草、杂灌。本文研究模拟竹林土壤生态系统中绿草定-2-丁氧基乙酯对土壤微生物的影响,以了解它对土壤健康的影响,为其安全性评价提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

采集浙江庙山坞部级自然保护区毛竹林(无任何农药使用历史)2~15 cm 土层新鲜土壤,剔除植物残根和石砾等杂物,风干过 2 mm 筛备用。供试土壤的基本理化性质见表 1。试验药剂:480 g/L 绿草定-2-丁氧基乙酯乳油(四川利尔化学股份有限公司)。

表 1 供试土壤的基本理化性质

Tab. 1 Some physico-chemical properties of soils tested

| 有机质/(mg·kg <sup>-1</sup> )<br>Organic matter | 全氮/(g·kg <sup>-1</sup> )<br>Total N | 速效磷/(mg·kg <sup>-1</sup> )<br>Soluble P | 速效钾/(mg·kg <sup>-1</sup> )<br>Soluble K | pH   |
|--|-------------------------------------|---|---|------|
| 45.1   | 2.19                                | 1.64                                    | 45.27                                   | 4.68 |

### 1.2 土壤处理

分别称取 30 份相当于 100 g 烘干土的刚风干土样分别置于 500 mL 烧杯中,添加适量无菌水,使土壤含水量达最大持水量的 60%,隔 2 d 调节 1 次,使含水量保持恒定,于人工气候箱(28±1)℃ 黑暗培养。预培养 7 d,然后添加少量等体积以无菌水稀释的各质量浓度农药,使其在土样中浓度分别达到 1/2 倍生产用量(0.9 mg/kg),生产用量(1.8 mg/kg),2 倍生产用量(3.6 mg/kg),10 倍生产用量(18 mg/kg),以不加农药同样处理作对照。用于微生物平板培养的各处理均设 3 个重复,即共需土样 15 份。同理用于微生物生物量碳测定的土样也需 15 份。药剂处理后分别于 1,10,25,40,60 d 取样进行测定。各

药剂试验浓度设计以生产用量为基本浓度值(即:每667 m<sup>2</sup>生产用药量/耕作层厚度×667 m<sup>2</sup>×土壤容重),以其倍数值为各处理浓度值。生产用量取值为3 000 g/hm<sup>2</sup>,耕作层厚度取值为15 cm,土壤容重为1.11 g/cm<sup>3</sup>。各设置浓度值均以有效成分计算,代表意义分别为:1/2倍生产用量为低剂量使用情况,生产用量为正常剂量使用情况,2倍生产用量为大剂量使用情况,10倍生产用量为喷施不均特殊情况。

### 1.3 试验方法

按常规平板法培养微生物,细菌用牛肉膏蛋白胨培养基培养,真菌用PDA培养基培养,放线菌用改良高氏1号培养基培养<sup>[13]</sup>。采用熏蒸-提取法测定土壤微生物生物量碳,提取液中的有机碳采用总有机碳分析仪测定<sup>[14]</sup>。

### 1.4 数据分析

数据分析用SPSS 13.0进行方差分析,Duncan's新复极差法进行显著差异比较,Excel制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿草定-2-丁氧基乙酯对可培养细菌的影响

从图1可以看出,施药第1天各浓度与对照差别不大,说明绿草定-2-丁氧基乙酯对细菌来说毒性不强,短时间不会对细菌群落造成大的影响。第10天,10倍生产用量与对照相比出现明显抑制作用,细菌菌落数下降了32.3%。1/2倍生产用量与对照差别不大,生产用量和2倍生产用量与对照相比有明显的刺激作用,菌落数量分别增加了41.9%、32.3%,生产用量刺激作用大于2倍生产用量。第25天10倍生产用量仍有明显的抑制作用,但抑制作用有所下降,菌落数比对照低25.0%,1/2倍生产用量和生产用量与对照相比差别不显著,2倍生产用量刺激作用明显,菌落数比对照多25.0%左右。第40天高浓度由抑制作用转变为刺激作用,菌落数比对照多36.7%,其他浓度与对照相比差别达不到明显水平。第60天各浓度与对照均无显著差异。

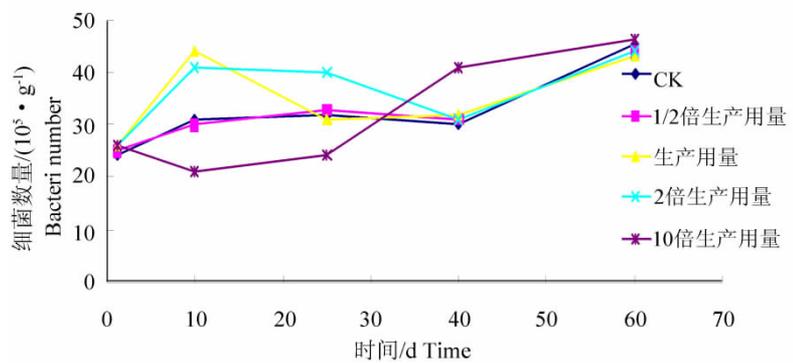


图1 不同处理细菌数量随时间变化动态

Fig. 1 The dynamics of bacteria number in different treatment over time

绿草定-2-丁氧基乙酯对细菌高浓度时有抑制作用,低浓度时有刺激作用,这种作用随着施药时间的延长逐渐减小,直到恢复到对照水平。1/2倍生产用量在各个阶段对细菌的影响达不到显著水平。生产和2倍生产用量在施药前期的刺激作用,在40 d内很快恢复,没有对细菌群落构成长期危害。10倍生产用量对细菌的影响在前期出现抑制作用,后期出现刺激作用,在60 d内可减小到不显著的程度。

前人有关除草剂对土壤细菌的影响研究结果持有两种观点,一种观点认为大部分除草剂对土壤细菌群落影响不大,且这种影响很快消失。如吕镇梅研究得出,二氯喹啉酸对水稻田土壤中好氧性细菌、水解发酵细菌、反硝化细菌数量影响都是短暂的,第33天时均能恢复至接近对照水平,正常使用对水田土壤微生物各种群均无实质性危害<sup>[15]</sup>。另一种即为相反观点。阿特拉津和甲草胺(Alachlor)等除草剂会降低玉米地土壤中的细菌总量,减少氨化菌和固氮菌数量,抑制土壤脱氢酶活性,而增加真菌和放线菌数量,而且浓度越高,其抑制作用越大;其中,甲草胺的抑制效果比阿特拉津更高些<sup>[16]</sup>。从本研究的结果看,在合理用药的情况下,绿草定-2-丁氧基乙酯不会对土壤可培养细菌群落造成大的危害。

### 2.2 绿草定-2-丁氧基乙酯对可培养真菌的影响

由图2可知,第1天各浓度与对照相比差别不显著,说明绿草定-2-丁氧基乙酯对真菌的毒性不是很强。第10天,各浓度与对照相比均出现刺激作用,1/2倍生产用量、生产用量、2倍生产用量与对照相比均达显著水平,菌落数分别增加了40.7%、38.9%、42.6%。3浓度间不存在显著差异,10倍生产用量与各浓度相比差异均达显著水平,刺激作用最大,与对照相比菌落数增加了61.1%。第25天1/2倍生

产用量恢复到对照水平。生产用量、2倍生产用量、10倍生产用量与对照相比刺激作用均达显著水平,菌落数分别增加了14.8%、23.0%、50.8%,刺激作用随浓度的增大而增大。第40天,只有10倍生产用量与对照相比刺激作用达显著水平,刺激作用也有所下降,菌落数比对照多32.7%,其他浓度与对照无明显区别。第60天各浓度均恢复到对照水平。

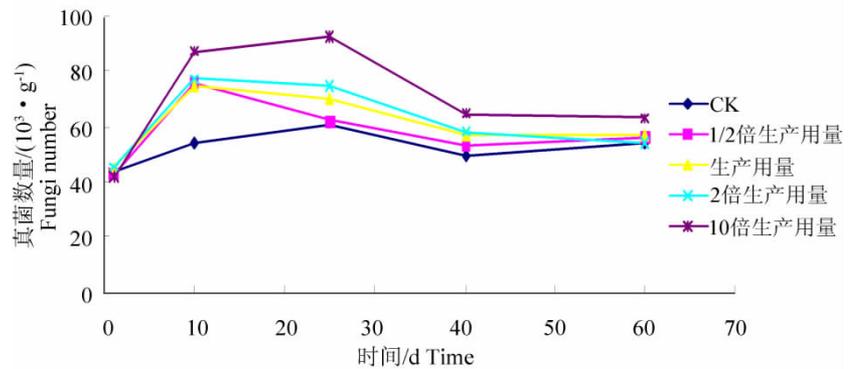


图2 不同处理真菌数量随时间变化动态

Fig. 2 The dynamics of fungi number in different treatment over time

10倍生产用量第1天与对照相比未出现显著差异,说明绿草定-2-丁氧基乙酯对真菌群落毒性不强,短时间构不成影响。培养期间各浓度均出现了对真菌的刺激作用,可能是因为绿草定-2-丁氧基乙酯加入后作为一种碳源刺激了可利用此物质真菌的生长与繁殖,随着绿草定-2-丁氧基乙酯分解各种影响逐渐消失,恢复到对照水平。生产用量对可培养真菌的刺激作用在第40天恢复到对照水平。有关绿草定-2-丁氧基乙酯的微生物分解有待今后深入研究。

### 2.3 绿草定-2-丁氧基乙酯对可培养放线菌的影响

由图3可以看出,第1天各浓度与对照相比差别不大。第10天,1/2倍生产用量、生产用量与对照相比对放线菌有明显刺激作用,刺激率分别为19.4%和21.0%。2倍生产用量与对照相比差别不大,10倍生产用量与对照相比受抑制作用明显,抑制率为30.7%。第25天,1/2倍生产用量刺激作用减小,与对照相比达不到显著水平。生产用量和2倍生产

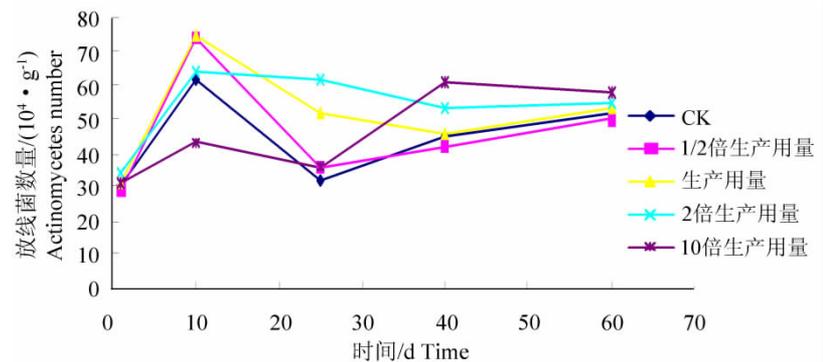


图3 不同处理放线菌数量随时间变化动态

Fig. 3 The dynamics of actinomycetes number in different treatment over time

用量与对照相比刺激作用均达显著水平,刺激率分别为62.5%和93.8%,二者之间差异显著,2倍生产用量刺激作用较大。10倍生产用量出现较小刺激作用,但与对照相比达不到显著水平。第40天,1/2倍生产和生产用量与对照差异不显著,2倍生产用量与10倍生产用量刺激作用与对照相比均达显著水平,刺激率分别为17.8和35.6%,二者之间差异显著,10倍生产用量刺激作用较大。第60天,各浓度与对照相比差别均达不到显著水平。结果分析表明,绿草定-2-丁氧基乙酯较低浓度时对放线菌有刺激作用,较高浓度时对放线菌有抑制作用,而这种影响程度随着培养时间的增加逐渐减小。生产用量水平的绿草定-2-丁氧基乙酯在施入后的初始阶段对可培养放线菌表现刺激作用,但刺激作用在40d内恢复到对照水平。

### 2.4 绿草定-2-丁氧基乙酯对土壤微生物生物量碳的影响

土壤微生物量碳可反映有效养分状况和微生物总量,能在很大程度上反映土壤微生物数量,是评价土壤微生物数量和活性以及土壤肥力的重要指标<sup>[17]</sup>。

由图4可知,第1天各浓度与对照相比土壤微生物生物量碳没有显著变化。第10天,1/2倍生产用量、生产用量与对照相比土壤微生物生物量碳增加明显,刺激率分别为6.1%和8.2%。2倍生产用量与对照相比土壤微生物生物量碳也有所增加,但达不到显著效果。1/2倍生产用量、生产用量、2倍生产用量三者之间差异不显著。10倍生产用量与对照相比土壤微生物生物量碳减小达显著水平,抑制率

为 5.8%。第 25 天,生产用量、2 倍生产用量与对照相比土壤微生物生物量碳增加均达显著水平,刺激率为 6.8% 和 8.3%。2 倍生产用量土壤微生物生物量碳较大,其他浓度与对照相比差异不显著。第 40 天 2 倍生产用量、10 倍生产用量与对照相比土壤微生物生物量碳增加达显著水平,刺激率为 5.6% 和 8.2%。生产用量土壤微生物生物量碳也有所增加,但达不到显著水平,1/2 倍生产用量土壤微生物生物量碳恢复到对照水平。第 60 天,各浓度与对照相比土壤微生物生物量碳变化均达不到显著水平。

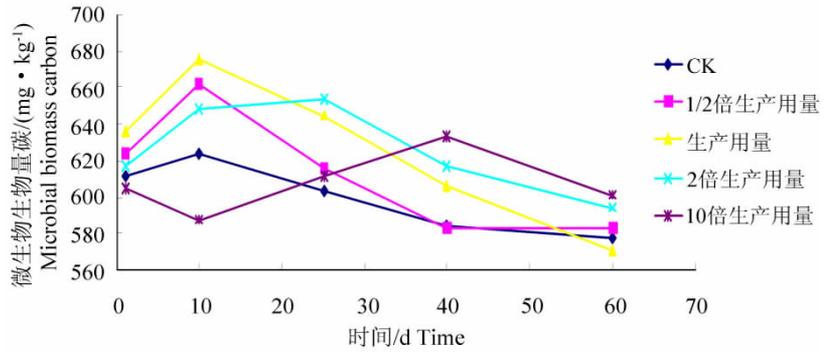


图4 不同处理微生物生物量碳随时间变化动态

Fig.4 The dynamics of microbial biomass carbon in different treatment over time

结果分析表明,第 1 天各浓度处理土壤微生物生物量碳差异不显著,说明绿草定-2-丁氧基乙酯短时间内不会造成各种微生物总量的变化,对微生物毒性较小。绿草定-2-丁氧基乙酯较低浓度时土壤微生物生物量碳增加,较高浓度时土壤微生物生物量碳减小。随着培养时间的增加,土壤微生物生物量碳变化减小,60 d 内均恢复到对照水平。生产用量在培养前期土壤微生物生物量增加,在 40 d 内恢复到了对照水平,说明从微生物总量上来看,绿草定-2-丁氧基乙酯在合理使用的情况下不会对土壤质量造成大的影响。

目前已有研究表明:土壤微生物生物量随着除草剂施用量的增加而降低,尤其是高浓度的除草剂会显著抑制微生物的活性,但也有一些除草剂并不影响或增加土壤微生物的生物量<sup>[18-19]</sup>。由本研究对 3 类土壤微生物的研究结果看,绿草定高浓度时对不同微生物类群作用不同,但从微生物类群和数量总体来看,主要表现抑制作用,降低了微生物总体活性,从而导致微生物量碳减少。而绿草定低浓度时对不同微生物类群作用也存在差异,但从总体来看,主要表现刺激作用,刺激了微生物总体活性,从而导致微生物量碳增加。本研究对微生物量碳的研究结果与其他学者关于除草剂的研究结果稍有不同。以前报道的除草剂对微生物量碳影响结果,不是单纯抑制作用,就是单纯刺激作用,而本研究在除草剂高低浓度时出现了不同的结果,分析原因,可能与试验的浓度设置、除草剂种类存在差异所致,更深入的了解有待今后进一步研究。

### 3 结论与讨论

从结果分析看,绿草定-2-丁氧基乙酯对土壤微生物群落不会造成持久影响,生产用量 3 000 g/hm<sup>2</sup> 在均匀喷药情况下,40 d 内对微生物影响可基本解除。非均匀喷药特殊情况下,绿草定-2-丁氧基乙酯对土壤微生物影响时间要长一些,但在试验土壤中 60 d 内也可以恢复,可以说绿草定-2-丁氧基乙酯对土壤微生物影响不大。研究<sup>[20]</sup>报道,绿草定及其衍生物在土壤中平均半衰期为 46 d(本试验半衰期可能更短),不会在土壤中长期大量积累,因此绿草定-2-丁氧基乙酯长期使用不会造成由微生物群落破坏而引起的地力衰退。

本文就绿草定-2-丁氧基乙酯对土壤微生物的影响进行了初探,对微生物多样性影响研究采用的是传统平板培养计数法,体现的是绿草定-2-丁氧基乙酯对三类可培养微生物的影响。微生物生物量碳指标体现的是绿草定-2-丁氧基乙酯对土壤微生物总量的影响。从分析结果看,微生物总量变化趋势和三类可培养微生物总变化趋势不完全一致。原因可能是传统平板培养计数法的局限性,只能体现土壤中部分微生物对绿草定-2-丁氧基乙酯的响应。以后有必要利用多种现有手段,如荧光染色法、Biolog 微平板分析、磷脂脂肪酸(PLFA)谱图分析方法和分子生物学方法等<sup>[21]</sup>,进行多角度研究才能就除草剂对土壤微生物影响有更全面深入的认识。

本试验是在模拟的室内环境下进行的,与大田环境存在很大差异,预计在降雨、光解等的影响下,绿草定-2-丁氧基乙酯降解更快,对土壤微生物影响作用更小些。大量试验研究所采用的除草剂均为纯

品,而本试验采用的是生产中直接使用的成品,更接近于实际情况,因为除草剂中其他成分对土壤微生物的影响也包含在结果中。本试验只讨论了绿草定-2-丁氧基乙酯对土壤微生物的影响问题,对于绿草定-2-丁氧基乙酯在竹林中使用可能带来的其他问题有待更深入研究,例如食用竹笋中的残留问题,对下游水源可能带来的影响问题等。

#### 参考文献:

- [1] Dick R P. Soil enzyme activities as integrative indications of soil health [M]. // *Biological Indicators of Soil Health*. New York, 1997: 121-156.
- [2] Brookes P C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 19(4): 269-279.
- [3] Stenberg B. Monitoring soil quality of arable land: Microbiological indicators [J]. *Acta Agricultural Scandinavica*, Section B Soil and Plant Science, 1999, 49(1): 1-24.
- [4] 黄顶成, 尤民生, 侯有明, 等. 化学除草剂对农田生物群落的影响 [J]. *生态学报*, 2005, 25(6): 1451-1458.
- [5] Morris L A, Montgomery M L, Warren L E, et al. Triclopyr persistence in western Oregon Hill pastures [J]. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 1987, 39: 134-141.
- [6] Thompson D G, Pitt D G, Buscarini T M, et al. Comparative fate of glyphosate and triclopyr herbicides in the forest floor and mineral soil of an Acadian forest regeneration site [J]. *Canadian Journal of Forest Research*, 2000, 30(11): 1808-1816.
- [7] Newton M, Cole E C, Tinsley L J. Dissipation of four forest-use herbicides at high latitudes [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2008, 15(7): 573-583.
- [8] Bentson K P, Norris L A. Foliar penetration and dissipation of triclopyr butoxyethyl ester herbicide on leaves and glass slides in the light and dark [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39(3): 622-630.
- [9] Stephenson G R, Solomon K R, Bowhey C S, et al. Persistence, leachability, and lateral movement of triclopyr (Garlon) in selected Canadian forestry soils [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38(2): 584-588.
- [10] Lewer P, Owen W J. Selection action of the herbicide Triclopyr [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1990, 36: 187-200.
- [11] Chakravarty P, Sidhu S S. Effect of glyphosate, hexazinone and triclopyr on in vitro growth of five species of ectomycorrhizal fungi [J]. *European Journal of Forest Pathology*, 1987, 17(4/5): 204-210.
- [12] 王广成, 吴春先, 高立明, 等. 绿草定-2-丁氧基乙酯原药的高效液相色谱分析 [J]. *农药*, 2007, 46(12): 834-836.
- [13] 赵兰, 黎华寿. 四种除草剂对稻田土壤微生物类群的影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(2): 508-514.
- [14] 姚斌, 张超兰. 除草剂对土壤微生物生物量碳、氮及呼吸的影响 [J]. *生态环境*, 2008, 17(2): 580-583.
- [15] 吕镇梅, 闵航, 叶央芳. 除草剂二氯喹啉酸对水稻田土壤中微生物种群的影响 [J]. *应用生态学报*, 2004, 15(4): 605-609.
- [16] Subbaiah H, Nanjappa H V, Balakrishna A N. Effect of herbicides on soil microbial biomass [J]. *Crop Research Hisar*, 1994, 8(1): 28-31.
- [17] 胡诚, 曹志平, 叶钟年, 等. 不同的土壤培肥措施对低肥力农田土壤微生物量碳的影响 [J]. *生态学报*, 2006, 26(3): 808-814.
- [18] Wardle D A, Parkinson D. Influence of the herbicides 2,4-D and glyphosate on soil microbial biomass and activity: a field experiment [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24(2): 185-186.
- [19] 张超兰, 徐建民, 姚斌. 阿特拉津污染胁迫下土壤微生物生物量对外源有机无机物质的响应 [J]. *土壤学报*, 2004, 41(2): 40-43.
- [20] 朱良天. *农药* [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 498-499.
- [21] 周桔, 雷霆. 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望 [J]. *生物多样性*, 2007, 15(3): 306-311.