

代谢指纹评估苯噻草胺对水稻土微生物群落的短期影响*

叶央芳^{1,2} 闵航^{2†}

(1 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江宁波 315211)

(2 浙江大学生命科学院, 杭州 310029)

摘要 本文探讨了酰胺类除草剂苯噻草胺对水稻土微生物群落功能多样性的短期影响。本研究采用微生物群落基质利用潜力测定(Biolog 法)评估生物群落。结果表明,苯噻草胺污染引起了水稻田微生物群落功能多样性的下降,降低了微生物对单一碳源底物的利用能力,但这种影响是短暂的,在试验最终没有导致土壤微生物群落功能多样性下降。多食鞘氨醇杆菌 Y1(*Sphingobacterium multivorum*)的添加有利于提高水稻土微生物群落的功能多样性。3 个处理土壤的群落代谢剖面值与培养时间之间呈非线性关系,其变化过程符合微生物种群生长动态模型(S 形)。模型模拟分析表明,动力学参数 a 和 x_0 能更灵敏地表征苯噻草胺和 Y1 菌株处理对水稻土微生物群落功能多样性的影响。在本实验研究中,多样性指标指数 Shannon(H) 能灵敏而有效地指示污染环境的微生物学变化,但群落丰富度指标颜色变化孔数(S)提供的信息较片面。

关键词 基质利用模式; 苯噻草胺; 水稻土; 微生物群落

中图分类号 X172

文献标识码 A

近来,微生物群落功能多样性变化被推荐作为农药胁迫时的生物指标^[1,2]。Biolog 技术是研究微生物群落功能多样性变化的一种新方法,它利用 95 种不同的碳源检测微生物的代谢图谱^[3]。基于不同微生物种群对不同碳源利用具有选择性,利用 Biolog 测试板测定土壤微生物群落功能多样性的方法被广泛应用于土壤环境微生物生态学研究^[4-9],并且检测出农药污染对土壤微生物群落多样性的影响^[2,10,11]。

苯噻草胺(mefenacet)是一种应用前景较好的新型乙酰苯胺类除草剂,化学名为 2-(1,3-苯并噻唑-2-氧基)-N-甲基乙酰替苯胺,具有活性高、可混性强、药效期长等优点,适用于移栽稻田的选择性芽前芽后除草,正在我国被开发并投入工业化生产^[12]。在其他亚洲国家已经被广泛和重复使用^[13,14]。在河流和湖泊中经常能检测到苯噻草胺^[15,16]。另外苯噻草胺产生的非生物胁迫可激活水稻幼苗体内的活性氧清除系统,诱导 SOD 和 CAT 酶的活性增强^[17]。

本研究通过测定苯噻草胺污染土壤中微生物群落基质利用模式变化,评估苯噻草胺的短期施用对

土壤微生物群落的影响,有助于阐明土壤微生物群落功能多样性在苯噻草胺胁迫下的急性反应,并为应用苯噻草胺降解菌修复苯噻草胺污染的土壤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土壤、苯噻草胺和多食鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium multivorum*) Y1 及实验设置

土壤样品采自浙江大学华家池校区实验农场水稻田(黄松田土,按系统分类属于普通铁聚水耕人为土,按发生分类系统属于人为土纲,人为水成土亚纲,水稻土类,潴育型水稻土亚类,粉泥田土属,2~15 cm),不曾施用过苯噻草胺,土壤经风干,过 2 mm 筛,充分混匀,置于 4℃ 备用。土壤理化性质见表 1。

60% 的苯噻草胺,可湿性粉剂,由中国美芬农化有限公司提供。

S. multivorum Y1,革兰氏阴性,无芽孢杆菌,能有效降解苯噻草胺,由本实验室从好氧污泥中分离获得^[18]。

* 浙江省自然科学基金项目(No. Y504002)、浙江省教育厅科研基金项目(No. 20040890)国家自然科学基金项目(30370048)资助

† 通讯作者, Tel. 0571-86971287, E-mail: minhang@zju.edu.cn

作者简介:叶央芳(1974~),女,浙江慈溪人,讲师,主要从事环境微生物学的研究。已发表论文 10 余篇

收稿日期:2005-01-19;收到修改稿日期:2005-06-20

实验设置 3 个处理, 分别为 (1) 对照 (CK); (2) 加有 $0.133 \mu\text{g g}^{-1}$ 干土 (终浓度) 苯噻草胺的土样 (M), $0.133 \mu\text{g g}^{-1}$ 干土的苯噻草胺浓度是生产厂家推荐的田间正常施用浓度; (3) 添加与处理 (2) 相同浓度的苯噻草胺并另加入 10^{10}CFU g^{-1} 干土 (终浓度) 多食鞘氨醇杆菌 Y1 (*S. multivorum*) 的生理盐水溶液的土样 (MY)。

具体实验操作步骤: 取风干土, 每份称取 1.5 kg, 分别装入塑料小桶 (上口直径 179 mm, 底面直径 134 mm, 高 161 mm) 中, 加自来水适量, 形成水封效果, 以模拟水稻田中的厌氧环境。于 28°C 预培养 2 周后, 按试验设计加入苯噻草胺乳液和 *S. multivorum* Y1。继续培养, 定期取样, 用于 Biolog 分析。在整个试验阶段 (共 51 d), 适时补水, 以保持厌氧环境^[19]。

各处理重复 3 次。

添加苯噻草胺的方法如下: 将苯噻草胺粉剂配成 0.5 g L^{-1} 的乳液, 充分摇匀, 然后将 0.8 ml 苯噻草胺乳液加入预培养 2 周后的 M 和 MY 处理样品中, 轻摇小桶, 使苯噻草胺在上层水相中分散均匀。菌液的浓度采用 10^{10}CFU g^{-1} 干土是考虑 Y1 菌株的浓度稍大于土壤中土著微生物的含量, 使得 Y1 菌株能在土壤中定殖, 从而起到修复苯噻草胺污染环境的作用。添加 Y1 菌株的方法如下: 离心获取 Y1 菌体, 配成生理盐水溶液, 用血球计数板计数, 计算出 Y1 菌液的初始浓度, 然后吸取适量该溶液, 使 Y1 菌株的添加终浓度为 10^{10}CFU g^{-1} 干土。而且在对照和 M 样品中也同步添加了等量的无 Y1 菌株的生理盐水溶液, 以消除生理盐水对实验的干扰。

表 1 黄松田土的主要理化性状

Table 1 Main physical and chemical properties of soil tested

土壤 Soil	有机质 Organic matter (g kg^{-1})	全氮 Total nitrogen (g kg^{-1})	C/N	全钾 Total potassium (g kg^{-1})	全磷 Total phosphorus (g kg^{-1})	pH
普通铁聚水耕人为土 General ferric agric anthropic soil	16.70 (± 0.12) ¹⁾	1.43 (± 0.01) ¹⁾	13.20 (± 0.22) ¹⁾	20.60 (± 0.34) ¹⁾	1.520 (± 0.025) ¹⁾	7.20 (± 0.10) ¹⁾

1) 圆括号中的值表示标准偏差 Values in parenthesis are the means with standard deviations

1.2 土壤微生物群落功能多样性测试

Biolog 的 Eco 板是一种多底物的酶联 (ELISA) 反应平板, 除对照孔仅有指示剂 (四氮叠茂) 和一些营养物质外, 其余 31 孔都装有不同的单一碳源底物 (表 2)。在进行 ELISA 反应时, 各孔中微生物利用

碳源底物, 呼吸作用产生还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH), 引起四氮叠茂发生氧化还原变色反应。根据反应孔中颜色变化的吸光值来指示微生物对 31 种不同碳源的利用模式, 从而反映微生物群落的功能代谢能力差异。

表 2 Eco 板上的 31 种碳源

Table 2 31 carbon resources in Ecoplate

水 Water	β -甲基 D-葡萄糖苷 β -Methyl D-Glucoside	D-半乳糖酸内酯 D-Galactonic Acid- γ -Lactone	L-精氨酸 L-Arginine
丙酮酸甲酯 Pyruvic Acid Methyl Ester	D-木糖 D-Xylose	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic Acid	L-天冬酰胺酸 L-Asparagine
吐温 40 Tween 40	Γ -赤藻糖醇 Γ -Erythritol	2-羟基安息香酸 2-Hydroxy Benzoic Acid	L-苯基丙氨酸 L-Phenylalanine
吐温 80 Tween 80	D-甘露醇 D-Mannitol	4-羟基安息香酸 4-Hydroxy Benzoic Acid	L-丝氨酸 L-serine
α -环糊精 α -Cyclodextrin	N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-Glucosamine	γ -羟基丁酸 γ -Hydroxybutyric Acid	L-苏氨酸 L-Threonine
肝糖 Glycogen	D-氨基葡萄糖酸 D-Glucosaminic Acid	衣康酸 Itaconic Acid	氨基乙酯-L-谷氨酸 Glycyl-L-Glutamic Acid
D-纤维二糖 D-Cellobiose	葡萄糖- Γ -磷酸 Glucose- Γ -Phosphate	α -酮基丁酸 α -Ketobutyric Acid	苯(基)乙胺 Phenylethylamine
α -D-乳糖 α -D-Lactose	D,L- α -磷酸甘油 D,L- α -Glycerol Phosphate	D-苹果酸 D-Malic Acid	腐胺 Putrescine

操作过程如下: 将 Biolog Eco 板从冰箱内取出, 25℃下预热。用 200 μ l 自动多头移液器吸取合乎 Eco 板系统要求浓度的土壤微生物提取液(用无菌水 10 倍系列稀释法提取)(10^{-3} 稀释度)加到 Eco 板的孔中, 每孔加 150 μ l, 28℃培养 7 d, 每隔 24 h 用 Biolog 自动读数装置在 590 nm 下测定其吸光值。

1.3 数据处理

土壤微生物群落 Biolog 代谢剖面的表达方法如下:

Eco 板中多底物酶联(ELISA)反应采用每孔的平均吸光值(Average Well Color Development, AWCD)来描述^[4], 计算表达式为: $AWCD \text{ 值} = [\sum(C-R)]/31$, 其中 C 是所测得 31 个反应孔的吸光值, R 是对照孔的吸光值。

参照文献[20], 采用 Eco 板中第 7 天读取的吸光值来测算土壤微生物群落功能多样性指数: Shannon 指数(H), 其计算公式为: $H = -\sum p_i (\ln p_i)$, 式中 p_i 为第 i 孔相对吸光值(C-R)与整个平板相对吸光值总和的比率。微生物群落的丰富度(S)是指代谢剖面反应孔的数目。

用 Genstart 5.3(NAG Ltd, Oxford, UK)软件进行 Biolog 数据分析。为了缩小不同重复间接种密度差异引起的误差, Biolog 读数在分析前均用平均吸光值进行了校正。相关性分析采用 SPSS10.0 软件, 线性与非线性回归分析采用 Sigma Plot2002 软件。

2 结果与分析

2.1 苯噻草胺污染下水稻土微生物群落功能多样性的变化

近年来, 国内外学者利用 Biolog 测试系统对农药污染土壤的微生物群落利用碳源功能多样性进行了一些研究^[2, 10, 11, 21], 确认 Biolog 代谢剖面(即 Biolog 盘中每孔的平均吸光值(AWCD)是评价污染环境土壤微生物群落利用碳源功能多样性的一个重要指标, 能敏感地反映农药污染土壤环境质量的变化。

Biolog 分析表明, 水稻土在受到苯噻草胺和 Y1 菌株的处理后 51 d 时间内, 微生物群落功能多样性发生了变化, 即微生物对单一碳源的利用模式发生了改变。在第 1 周, 3 个处理的微生物群落在 Eco 板上具有相似的显色结果(图 1a)。表明苯噻草胺和 Y1 菌株在第 1 周没有引起微生物对碳源的利用能力, 也不影响土壤微生物群落的功能多样性。但在第 2 周, MY 处理中的 AWCD 值在培养 120 h 后均低

于对照和 M 处理(图 1b)。在第 21 天, 处理 M 和 MY 中微生物群落 AWCD 值表现出明显的变化(图 1c)。MY 在培养一开始就显示出较强的利用 Eco 板上碳源的能力, 其 AWCD 值明显高于其他 2 个处理, 在整个培养期间, AWCD 值相差最大时分别是对照和 M 的 3.4 倍和 1.9 倍。但 M 的 AWCD 值出现明显差异时间是在 Eco 板上培养 120 h 后, 而且与 MY 不同的是, M 处理的微生物群落 Biolog 代谢剖面 AWCD 值显著低于对照和 MY, 在整个培养期间, 相差最大的时候分别是对照和 MY 的 73.2% 和 52.1%, 这种现象一直持续到 Eco 板培养结束。这表明苯噻草胺能抑制土壤微生物群落的基质利用能力, 而 Y1 菌株的添加有助于缓解苯噻草胺的抑制作用, 使微生物群落基质代谢能力提高, 甚至超过对照水平。在苯噻草胺和 Y1 菌株处理水稻土的第 51 天, 3 种处理的微生物群落 Biolog 代谢剖面又发生了显著变化。表现在 M 中微生物群落 Biolog 代谢剖面 AWCD 值回升, 而且超过了对照(图 1d)。这表明苯噻草胺对水稻土微生物利用单一碳素底物能力的抑制影响是暂时的。对吸光值作进一步的主成分分析(PCA)和典型变量分析(CVA)(文章另行发表)表明, 苯噻草胺和 Y1 菌株的添加使得土壤微生物群落对碳源的利用模式发生差异, 从而反映出微生物群落功能多样性发生了变化。在对 Eco 板连续检测的 8 d 中, AWCD 的理论值只会增加, 不会下降, 但在图 1b、图 1c 和图 1d 中 48 h 的数值出现了轻微的下降, 这可能是由于环境因素如光照、温度等以及测定仪器本身的误差造成的。

由于 Eco 板中制备有 31 种不同性质的碳源, 在培养过程中土壤的不同类群微生物对各自的优先利用碳源基质具有选择性, 进而使 Eco 板中反应孔的颜色出现不同程度的差异。因而, Eco 板中反应孔的颜色变化数目在一定程度上可以间接反映土壤微生物群落功能多样性组成的差异, 颜色变化孔数越多则表明土壤微生物群落种类相对就越丰富。通常把颜色变化孔数作为土壤微生物群落功能多样性的丰度(S)^[20]。从表 3 可知, 苯噻草胺和多食鞘氨醇杆菌 Y1 的处理, 使水稻土微生物群落的丰度随时间发生了明显变化。在第 1 周, 处理 M 和 MY 的显色孔数分别是 15 和 13.3 目(平均值), 显著低于对照的显色孔数 20.7 目(平均值)。对其作统计分析表明, 施用和不施用苯噻草胺是造成 S 值显著差异的因素($p < 0.05$), 而 Y1 菌株的添加并没有导致 S 值的显著差异。因此, 可以认为苯噻草胺施用

初期能导致土壤中微生物群落种群丰度下降,微生物利用 Eco 板上单一碳源的能力显著下降。但随着培养时间的延长,观察到苯噻草胺对微生物群落丰富度的影响并不稳定,在培养第 2 周,处理 M 和 MY 的显色孔数接近或超过对照,在第 3 周又低于对照,在第 7 周又超过对照,相应地,统计分析显示出施用苯噻草胺这个因素对 S 值的影响是不显著—显著—不显著,而 Y1 菌株的添加在随后的培养期间都使样品的 S 值产生显著差异。产生这种结果的原因可能是苯噻草胺本身的性质,也可能苯噻草胺进入土壤后发生的一些物理化学变化和微生物作用的结果,而

添加 Y1 菌株对土壤微生物群落功能多样性的影响是显著的。培养时间长短和处理与否的总效应对 S 值的相关性作一统计分析,表明这 2 个因素对 S 值的变化存在极显著相关($p < 0.01$),可导致 S 值的显著差异,而且培养时间和处理两因素之间存在交互作用,各因素对总变异的贡献大小依次是处理 > 处理和时间 > 时间。这说明造成 S 值显著差异的最主要因子是苯噻草胺和 Y1 菌株的处理。从 S 值的结果还可以看出,与微生物群落代谢剖面 AWCD 值变化不相符的地方,这可能与 S 值本身只能表征土壤微生物群落功能多样性的一个侧面有关。

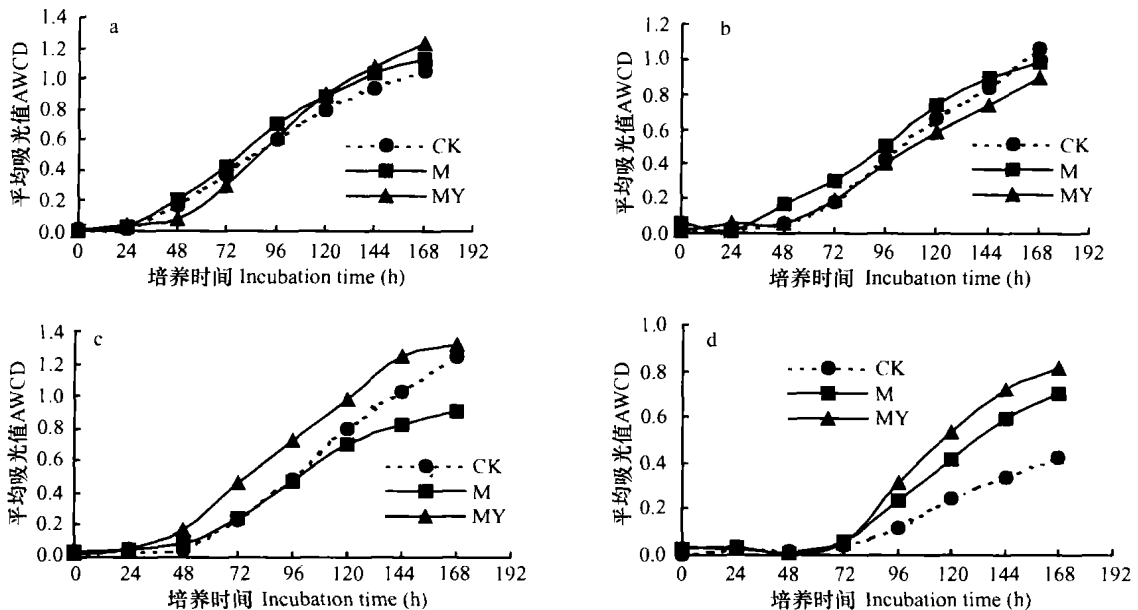


图 1 测试土样的 Eco 板平均吸光值(AWCD)(CK 对照土样;M 苯噻草胺处理土样;MY 苯噻草胺和多食鞘氨醇杆菌 Y1 处理土样。平均吸光值是指每个 Eco 板上 31 种基质的净光密度的平均值。a、b、c 和 d 分别代表第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 51 天所取土样)

Fig 1 AWCD of the Ecoplates at 590 nm for the tested soils (CK, the control soil; M, mefenacet treated soil; MY, mefenacet treated and *Sphingobacterium multivum* Y1 supplemented soil. AWCD (average well color development) denotes the mean of the net optical density for all 31 substrate wells on a plate. The letters a, b, c and d represent soil samples collected at D7, D14, D21 and D51, respectively)

Shannon 指数是研究群落物种及其个体数和分布均匀程度的综合指标,是目前应用最为广泛的群落多样性指数之一。苯噻草胺和多食鞘氨醇杆菌 Y1 处理下水稻土微生物群落多样性 Shannon 指数的变化如表 3 所示。在整个处理期间,Shannon 指数变化趋势与 AWCD 值变化情况基本一致,这表明 Shannon 指数作为表征土壤微生物群落功能多样性比颜色变化孔数更为合理。在第 1 周,与对照相比,2 个处理的 Shannon 指数变化不大。统计分析也证明苯噻草胺和 Y1 菌株两因素没有造成 H 值的显著差异。在第 2 周,MY 的 Shannon 指数明显低于其他

2 个处理,在统计上达到显著水平($p < 0.05$),说明 Y1 菌株的加入显著改变了水稻土微生物群落的结构,使群落中物种的分布均匀度发生改变,从而影响了 Eco 板上某些单一碳源的利用能力,降低了原有土壤微生物群落的功能多样性。但随着培养时间的延长,Y1 菌株对微生物群落多样性的抑制作用消失,反而促进了群落多样性的提高,而且这种促进作用达到了显著水平($p < 0.05$)。这可能与 Y1 菌株高效降解苯噻草胺的性质有关,Y1 菌株的添加,从根本上缓解了苯噻草胺对土壤微生物群落代谢能力的影响。而没有添加 Y1 菌株的土样,在处理第 21

天, 土壤微生物群落多样性 Shannon 指数仍低于对照, 但在处理第 51 天, Shannon 指数超过对照, 说明苯噻草胺对土壤微生物群落多样性的影响不是很大, 土壤中的土著微生物也可通过一段时间的适应和调整, 自然恢复其代谢功能。苯噻草胺这一因素在这段培养期间对各处理 H 值的影响达到显著水平

($p < 0.05$)。另外, 培养时间长短和处理与否的总效应对 H 值的相关性作一统计分析表明, 时间因素对 H 值的变化存在极显著相关($p < 0.01$), 但苯噻草胺和 Y1 菌株处理的总效应并没有导致 H 值的显著差异, 所以可以认为, 正常施用浓度的苯噻草胺进入水稻土不会造成微生物群落多样性的显著变化。

表 3 苯噻草胺和多食鞘氨醇杆菌 Y1 处理下水稻土微生物群落多样性指标变化

Table 3 Changes in microbial community richness and Shannon index in paddy soil after being treated with mefenacet and *S. multivorum* Y1

微生物多样性指标 Microbial community index	取样时间 Incubation time	处理编号 Number of treatment								
		CK			M			MY		
S	第 7 天	20	21	21	15	15	15	15	12	13
	第 14 天	22	17	17	22	16	24	15	17	16
	第 21 天	22	20	20	15	16	17	12	12	12
	第 51 天	20	20	18	24	24	20	9	10	13
H	第 7 天	1.25	1.30	1.29	1.31	1.23	1.21	1.32	1.26	1.29
	第 14 天	1.30	1.26	1.22	1.30	1.27	1.24	1.17	1.22	1.14
	第 21 天	1.31	1.24	1.31	1.21	1.19	1.21	1.37	1.37	1.31
	第 51 天	1.08	0.96	1.05	1.19	1.09	1.13	1.16	1.16	1.17

2.2 苯噻草胺污染下水稻土微生物群落功能多样性动力学参数特征

从图 2 可以看出, 供试土样的微生物群落代谢剖面(AWCD)与培养时间之间呈非线性相关, 其变化过程符合微生物种群生长动态模型(S 形)。因此采用修正的逻辑斯蒂方程 $f = y_0 + a / (1 + e^{-(x-x_0)/b})$ 来拟合土壤微生物群落功能多样性的动态变化, 其中 a 表示在培养过程中土壤微生物群落的最大平均吸光值, $1/b$ 表示其平均吸光值的变化指数, x_0 是指当达到最大平均吸光值一半时所需时间。供试土样土壤微生物群落功能代谢剖面的动态变化曲线分别如图 2a 至图 2f 所示。从图 2 可知, 供试土样微生物群落功能代谢剖面与时间的拟合结果良好, 其模型均达极显著水平 ($R_a = 0.996$; $R_b = 0.999$; $R_c = 0.998$; $R_d = 0.994$; $R_e = 0.988$; $R_f = 0.988$)。从供试土壤微生物群落功能多样性的动力学产生来看, 在培养第 21 天(如图 2a、图 2b 和图 2c), 处理 M 和 MY 的 a 值(最大平均吸光值)比对照分别下降了 27.87% 和升高了 9.84%, 而参数 x_0 值(达到最大平均吸光值的一半时所需时间)却都比对照分别提早了 10.19 h 和 15.58 h。而在培养第 51 天(如图 2d、图 2e 和图 2f), M 和 MY 的 a 值均高出对照 41.30% 和 60.87%, 参数 x_0 值也大于对照 8.98 h 和 15.53 h。这些参数能更灵敏地表征苯噻草胺对水稻土微生物群落功能

多样性的影响, 表明试验浓度的苯噻草胺在培养第 21 天对微生物群落的基质利用能力, 但这种抑制性是暂时的, 在第 51 天时回复并超过对照, 而且苯噻草胺的污染可以刺激微生物的生长, 加快对单一碳源的利用。Y1 菌株的添加有利于土壤微生物群落的功能多样性。可见, 用动力学参数 a 和 x_0 能更好地显示水稻土微生物对碳源利用的差异, 表明苯噻草胺和 Y1 菌株处理后土壤微生物群落功能多样性的变化。

3 结 论

本试验采用 Eco 板测试了苯噻草胺污染条件下水稻土微生物群落功能多样性的代谢指纹, 结果显示, 污染土壤的微生物群落功能多样性发生了变化, 微生物群落代谢剖面(AWCD)及群落丰富度、多样性指数均低于非污染土壤, 表明苯噻草胺污染引起了水稻田微生物群落功能多样性的下降, 减少了能利用有关碳源底物的微生物数量, 降低了微生物对单一碳源底物的利用能力, 但这种影响是短暂的, 在试验最终没有导致土壤微生物群落功能结构多样性下降, 说明在水稻田中施用 $0.133 \mu\text{g g}^{-1}$ 干土的苯噻草胺是相对安全的。另外, *S. multivorum* Y1 的添加有利于提高水稻土微生物群落的功能多样性。

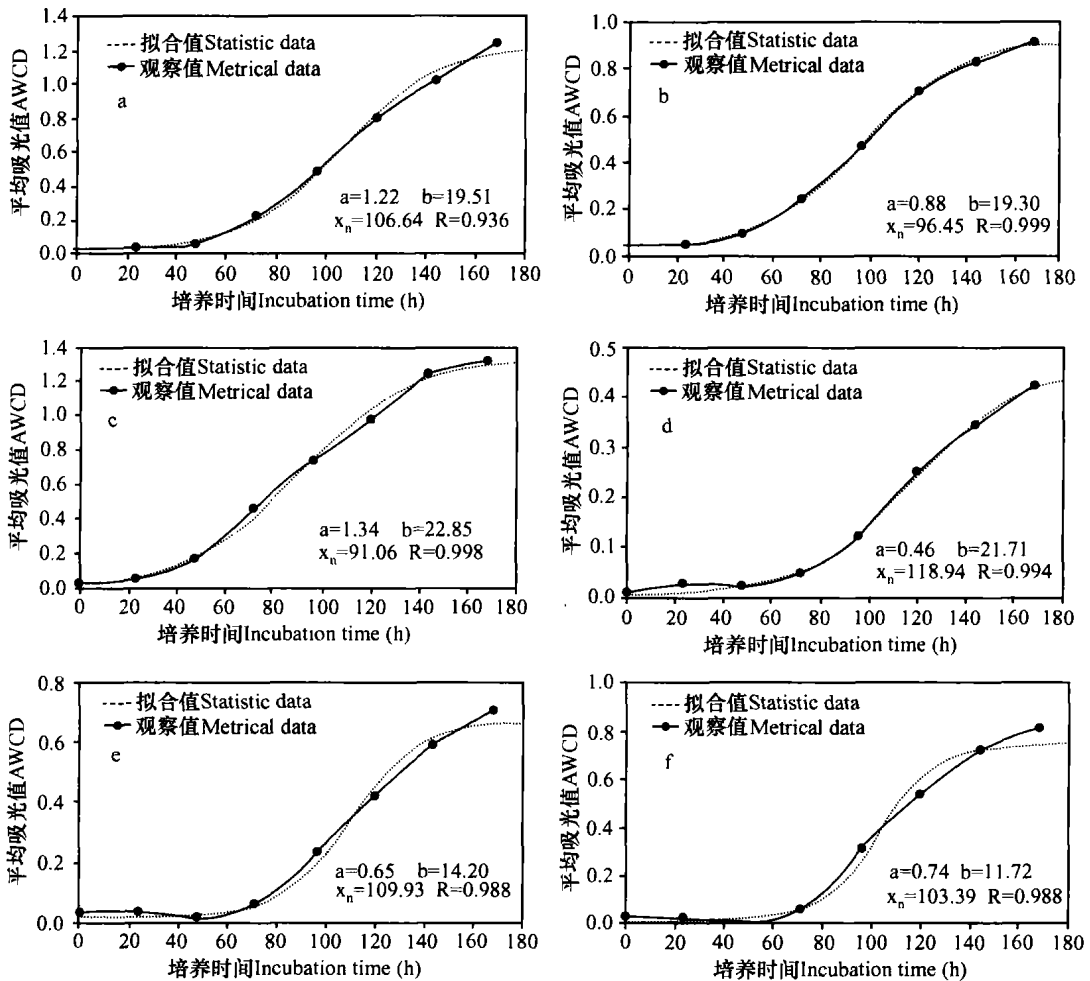


图2 供试土样微生物群落功能代谢剖面(AWCD)的动态变化(a、b、c、d、e和f分别代表第21天的处理CK、M和MY以及第51天的CK、M和MY)

Fig. 2 Kinetics of average well color development for soil samples (a, b, c, d, e and f represent CK, M and MY soil samples on D21 of incubation and CK, M and MY soil samples on D51 of incubation, respectively)

3个处理的群落代谢剖面值与培养时间之间呈非线性关系,其变化过程符合微生物种群生长动态模型(S形)。模型模拟分析结果表明,动力学参数 a 和 x_0 能更灵敏地表征苯噻草胺和Y1菌株处理对水稻土微生物群落功能多样性的影响。在本实验研究中,多样性指标Shannon(H)能灵敏而有效地指示污染环境的微生物学变化,但群落丰富度指标颜色变化孔数(S)提供的信息较片面。

Biolog技术是分析苯噻草胺污染土壤的微生物群落代谢多样性变化的有力工具,为污染环境下土壤微生物代谢多样性研究提供了新的实验方法与依据。

参考文献

[1] Said EF, Laurent V, Willy V, *et al.* Effect of phenylurea herbicides on

soil microbial communities estimated by analysis of 16 S rRNA gene fingerprints and community level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 982- 988

[2] Engelen B, Meinken K, von Wintzingrode F, *et al.* Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 814- 821

[3] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BILOG在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. *土壤学报*, 2004, 41(3): 456- 461. Zheng H, Ouyang ZY, Fang ZG, *et al.* Application of BILOG to study on soil microbial community functional diversity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(3): 456- 461

[4] 杨元根, Paterson E, Campbell C. Biolog方法在区分城市土壤与农村土壤微生物特性上的应用. *土壤学报*, 2002, 39(4): 582- 589. Yang YG, Paterson E, Campbell C. Application of Biolog method to study on microbial features in urban and rural soils

- (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2002, 39(4): 582~ 589
- [5] 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 等. 重金属复合污染下土壤微生物群落功能多样性动力学特征. *土壤学报*, 2004, 41(5): 735~ 741. Teng Y, Huang C Y, Luo Y M, *et al.* Kinetic characteristics for functional diversity of microbial communities in soils polluted with mixed heavy metals (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(5): 735~ 741
- [6] 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 等. 铅锌银尾矿区土壤微生物活性及其群落功能多样性研究. *土壤学报*, 2004, 41(1): 113~ 119. Teng Y, Huang C Y, Luo Y M, *et al.* Microbial activities and community functional diversity in soils polluted with Pb-Zn-Ag mine tailings (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(1): 113~ 119
- [7] Garland J L. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 1996, 28: 223~ 230
- [8] Ibekwe A M, Kennedy A C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1998, 26: 151~ 163
- [9] Pankhurst C E, Yu S, Hawke B G, *et al.* Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity and alkalinity at three locations in south Australia. *Biol. Fertil. Soils*, 2001, 33: 204~ 217
- [10] El Fantoussi S, Verschuere L, Verstraete W, *et al.* Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16 S rRNA gene fingerprints and community level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 982~ 988
- [11] 杨永华, 姚健. 分子生物学方法在微生物多样性研究中的应用. *生物多样性*, 2000, 8(3): 337~ 342. Yang Y H, Yao J. Molecular techniques and their application to the study of microbial diversity (In Chinese). *Chinese Biodiversity*, 2000, 8(3): 337~ 342
- [12] 卢颖, 韩朔暎. 除草剂苯噻草胺在土壤中的吸附. *环境化学*, 2000, 19(6): 513~ 517. Lu Y, Han S K. Sorption of herbicide mefenacet in soils (In Chinese). *Environmental Chemistry*, 2000, 19(6): 513~ 517
- [13] Hirahara Y K N, Sayato Y. Studies on behaviors of decomposition of pesticides in environment. *Japan. J. Toxicol. Environ. Health*, 1997, 43(4): 221~ 229
- [14] 杨剑波, 庞怀林. 除草剂苯噻草胺的合成及应用. *农药*, 2000, 39: 14~ 15. Yang J B, Peng H L. A study on synthesis and application on mefenacet (In Chinese). *Pesticides*, 2000, 39: 14~ 15
- [15] Okamura H, Piao M Y, Aoyama I, *et al.* Algal growth inhibition by river water pollutants in the agricultural area around Lake Biwa. *Japan Environ. Pollution*, 2002, 117(3): 411~ 419
- [16] Okamura H, Omori M, Luo R, *et al.* Application of short term bioassay guided chemical analysis for water quality of agricultural land run off. *Sci. Total Environ.*, 1999, 234(1/3): 223~ 231
- [17] 张承东, 韩朔暎, 张爱茜. 除草剂苯噻草胺胁迫对水稻活性氧清除系统的影响. *农业环境保护*, 2001, 20: 411~ 413, 417. Zhang C D, Han S K, Zhang A Q. Effect of herbicide mefenacet on response of active oxygen scavenging system in rice plant (In Chinese). *Agric. environmental Protection*, 2001, 20: 411~ 413, 417
- [18] Ye Y F, Min H, Du Y F. Characterization of a strain of *Sphingobacterium* sp. and its degradation to herbicide mefenacet. *J. Environ. Sci.*, 2004, 16(2): 343~ 347
- [19] Min H, Ye Y F, Chen Z Y, *et al.* Effects of butachlor on microbial populations and enzyme activities in paddy soil. *J. Environ. Sci. Health*, 2001, B36(5): 581~ 595
- [20] Bronwyn D H, Raymond L C. Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilization data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30: 91~ 101
- [21] Busse M D, Ratcliff A W, Shetak C J, *et al.* Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(12/13): 1777~ 1789

MONITORING OF SHORT TERM IMPACT OF MEFENACET TREATMENT ON PADDY SOIL MICROBIAL COMMUNITIES WITH METABOLIC FINGERPRINTING

Ye Yangfang^{1,2} Min Hang^{2†}

(1 College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

(2 College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Short-term effect of mefenacet, an acetanilide herbicide, on soil microbial communities in paddy soil was studied. The Biolog method (a kind of colour development assay) was used to determine substrate utilization potential of microbial communities for assessment of biological communities. The results show that functional diversity of the microbial communities decreased, and capability of the microbes of utilizing substrate of simple carbon sources reduced in mefenacet polluted soils compared with those in non-polluted soil. However, this effect was transient, and functional diversity of the microbial communities in mefenacet polluted soils came back at the end of the experiment. Supplementation of strain Y1 had a positive effect on metabolic potential of the soil microbial communities. A kinetic method was presented for characterizing the physiological state of microorganisms capable of carrying out specific metabolic function in paddy soils. Test well dye reduction was non-linear in microplates inoculated with duration of the incubation, and the color development curve was generally sigmoidal in shape. Test well OD values over time suggested a kinetic model based on the density-dependent logistic growth equation. The kinetic parameters generated by the model can be used as surrogates for single-time point data in constructing carbon source utilization patterns. And a and x_0 were more sensitive to indicate the effects of mefenacet and strain Y1 on functional diversity of the microbial communities. Shannon index (H) was more sensitive than the index of microbial community richness (S) to show the microbiological change in contaminated environment.

Key words Substrate utilization pattern; Mefenacet; Paddy soil; Microbial community