

DOI: 10.11766/trxb201804100189

郑丽霞, 王玉书, 刘海, 黄建国. 吡虫啉对伯克霍尔德氏菌生长和溶磷作用的影响[J]. 土壤学报, 2020, 57(1): 174–182.

ZHENG Lixia, WANG Yushu, LIU Hai, HUANG Jianguo. Effects of Imidacloprid on the Growth and P-Solubilization of *Burkholderia Yabunchi*[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(1): 174–182.

吡虫啉对伯克霍尔德氏菌生长和溶磷作用的影响*

郑丽霞¹, 王玉书¹, 刘 海^{1,2}, 黄建国^{1†}

(1. 西南大学资源环境学院, 重庆 400716; 2. 贵州省农业科学院农业科技信息研究所, 贵阳 550006)

摘 要: 吡虫啉 (Imidacloprid) 是近年来国内外普遍使用的新型高效烟碱类广谱杀虫剂, 残留期约 25 d, 对土壤有益微生物的生物风险有待评估。利用固、液培养技术, 以 3 株溶解无机磷的伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia Yabunchi* B05, B07 和 B09) 为对象, 设置 0、5、10、20 mg·L⁻¹ 浓度的吡虫啉处理, 研究无机磷细菌 (Inorganic phosphate-solubilizing bacteria, IPSB) 的生长繁殖、对 Ca₃(PO₄)₂ 的溶解及其机理。结果表明, 在固体培养时, 吡虫啉显著抑制 IPSB 生长, 但菌株不同抑制程度各异, 菌落直径的降幅高达 39.81%~55.45%; 供试 IPSB 菌株不同, 吡虫啉对它们溶解 Ca₃(PO₄)₂ 能力的影响也不一样, 降低 B09 但提高 B05 和 B07 的溶磷圈直径和溶磷指数。在液体培养时, 吡虫啉也抑制 IPSB 生长, 菌密度降低 49.87%~65.28%。吡虫啉对 IPSB 溶磷量的影响因浓度和菌株不同而异。具体表现为全浓度范围促进 B05 溶解无机磷; 中、低浓度吡虫啉对 B07 溶解 Ca₃(PO₄)₂ 无显著影响, 高浓度有促进作用; 低浓度吡虫啉对 B09 溶解 Ca₃(PO₄)₂ 无显著影响, 中、高浓度产生抑制作用。供试 3 株 IPSB 均能分泌氢离子 (H⁺)、草酸和柠檬酸。除此之外, B05 和 B07 可分泌乙酸, B07 还会分泌琥珀酸, B09 可分泌苹果酸。在分泌的这些有机酸中, 草酸和柠檬酸分泌量最多, 合计占有有机酸分泌总量的 67.65%~83.28%。吡虫啉不同程度地抑制 IPSB 分泌 H⁺, 但对 IPSB 分泌有机酸的影响因浓度、菌株和有机酸种类不同而表现出多样性。供试 IPSB 有机酸分泌总量和 H⁺ 分泌量分别与 Ca₃(PO₄)₂ 溶解量呈显著线性正相关 ($r_{\text{有机酸}} = 0.876$ 和 $r_{\text{H}^+} = 0.823$, $P < 0.05$, $n = 12$)。总之, 吡虫啉显著抑制 IPSB 生长繁殖, 通过改变有机酸和 H⁺ 的分泌而影响 Ca₃(PO₄)₂ 溶解。农业生产中, 施用吡虫啉影响土壤 IPSB 的代谢、种群结构和溶磷作用。

关键词: 吡虫啉; 无机磷细菌; 溶磷

中图分类号: S144 文献标志码: A

Effects of Imidacloprid on the Growth and P-Solubilization of *Burkholderia Yabunchi*

ZHENG Lixia¹, WANG Yushu¹, LIU Hai^{1,2}, HUANG Jianguo^{1†}

(1. College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Institute of Agricultural Science and Technology Information, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

* 重庆市科委重点项目 (CSTC2018jcsx-mszd0133) 和贵州省烟草公司遵义市公司科研项目 (201503) 资助 Supported by the Major Project of Chongqing Science and Technology Bureau (No. CSTC2018jcsx-mszd0133) and the Research Project of Zunyi Tobacco Company, Guizhou Province (No. 201503)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: huang99@swu.edu.cn

作者简介: 郑丽霞 (1993—), 女, 甘肃人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: 1871809558@qq.com

收稿日期: 2018-04-10; 收到修改稿日期: 2018-07-21; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2018-11-02

Abstract: 【Objective】Imidacloprid, a new type of neonicotinoid insecticide with high pest control efficiency, is widely used in recent years. As this chemical insecticide has a long residual period (about 25 days), it is necessary to evaluate risks it might pose to beneficial microbes in the soils. 【Method】Solid and liquid incubations were carried out simultaneously to investigate effects of the insecticide on growth, reproduction, and phosphorus (P) dissolving capacity of inorganic phosphate-solubilizing bacteria (IPSB), such as *Burkholderia Yabunchi* B05, B07 and B09, relative to concentrations of imidacloprid (0, 5, 10, and 20 mg·L⁻¹). 【Results】Imidacloprid inhibited to a varying extent the growth and reproduction of all the three strains of IPSB, with the diameter of bacterial colonies decreased by 39.81%~55.45% in solid incubation. The tested bacteria varied in solubilization of tricalcium phosphate in response to imidacloprid. B09 was lowered in diameter of P-dissolving halos and index in the presence of imidacloprid, but B05 and B07 behaved otherwise, with the diameter of P-dissolving halos and index reaching as high as 9.72%~19.44% and 40.69%~106.94%, respectively. In liquid incubations, imidacloprid also inhibited growth and reproduction of the three strains of IPSB, with the bacterial density decreased by 49.87%~65.28% in culture solutions. P solubilization capability of the bacterial strains varied with imidacloprid concentrations. Imidacloprid, regardless of concentration, stimulated P solubilization of B05. P solubilization of B07 varied in solutions low or medium in concentration of imidacloprid, but increased in those high in imidacloprid concentrations compared with CK (without imidacloprid). B09 showed a similar trend to B07 in variation of P dissolving capacity in solutions low in imidacloprid concentrations, while it decreased greatly in solution medium or high in imidacloprid concentrations. All the three strains of bacteria were able to excrete protons, oxalate, and citrate. Oxalate and citrate accounted for 67.65%~83.28% of the total organic acids excreted. In addition, acetate was detected in culture solution with B05 and B07, malate with B09, and succinate with B07. Excretion of the organic acids was affected by not only imidacloprid concentration, but also strain of bacteria and type of organic acid. Furthermore, imidacloprid inhibited bacterial proton secretion by a varying degrees. The amount of P dissolved from tricalcium phosphate was positively related to the excretion of total organic acids ($r = 0.876$, $P < 0.05$, $n = 12$) and to that of protons ($r = 0.823$, $P < 0.05$, $n = 12$) as well. 【Conclusion】It could be concluded that imidacloprid inhibits growth and reproduction of the IPSB by a varying degree in the soil, thus affecting the effects of the bacterial excreting organic acids and protons, and hence the effect of promoting or inhibiting and P solubilization. So in pest controlling application of a large amount of imidacloprid could influence the activities, numbers, and functions of IPSB to a various extent, depending on type of the soil and group of IPSB.

Key words: Imidacloprid; Inorganic phosphate-solubilizing bacteria; Phosphorus solubilization

吡虫啉 (Imidacloprid) 又名氯化烟碱, 是目前国内外施用最广、用量最大的新型烟碱类高效杀虫剂, 广泛用于植物生产、宠物和野生动物等的寄生虫防治。杀虫谱广、效果好、毒性低、不易产生抗性, 对非靶标生物—人、家畜、鱼类和天敌昆虫比较安全。但是, 该杀虫剂的残留期较长, 约 25 d^[1]。在作物虫害防治过程中, 吡虫啉主要施于土壤和叶面或用于浸种, 防治粮食作物、经济作物和蔬果虫害, 如飞虱、叶蝉和蚜虫等多种刺吸式口器和咀嚼式口器害虫^[2-3]。吡虫啉施用之后, 经直接或间接途径进入土壤^[4], 可能影响微生物生命活动、种群结构和生态功能等, 进而影响土壤有机质矿化、毒物降解、养分活化, 氮素循环等生物化学过程^[5-6]。用吡虫啉防止豆科植物虫害, 根瘤数减少, 瘤体减小, 瘤重减轻, 生物固氮受到抑制^[7]。

在农业生产中, 磷是作物需要的“三要素”之一。可溶性磷肥施入土壤之后, 由于强烈的固定作用, 其利用率一般不超过 25%^[8-9]。为了满足日益增长粮食需要, 只得大量施用磷肥以维持作物产量。但大量施肥造成一系列生产、土壤和环境问题, 如肥效降低、土壤磷积累、水体富营养化等。从全球土壤平均含磷量看, 目前积累在土壤中的磷高达 1 584 kg·hm⁻², 若能有效利用则可持续满足约 350 年的作物生产需要^[10]。因此, 活化利用土壤中积累的磷有益于减施磷肥, 保持农业生产的可持续发展。在土壤中, 无机磷细菌 (Inorganic phosphate-solubilizing bacteria, IPSB) 是重要的有益微生物, 它们能分泌氢离子 (H⁺) 和低分子有机酸, 包括草酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸等, 溶解或络合沉淀土壤难溶性无机磷酸盐中的钙、镁、铁、铝

等, 释放可溶性磷, 提高有效含量^[11]。因此, 利用 IPSB 挖掘利用土壤难溶性是供给作物磷素营养, 提高磷肥利用率重要策略之一^[12-13]。

伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia Yabunchi*) 分布广泛, 具有多种多样的生理生态功能, 它们不仅能溶解土壤难溶性无机磷酸盐, 增加有效磷含量, 而且还能增强作物抗病能力, 提高产量品质^[14-15]。在葡萄糖、草酸铵和氯化钠组成的液体培养基中, *B. Yabunchi* P0417 的溶磷能力与培养液 pH 密切相关, H⁺分泌量越高, 对 Ca₃(PO₄)₂ 溶解作用愈强, 溶磷量高达 791.84 μg·mL⁻¹^[14]。在农业生产中, 使用化学农药防治病虫害的现象十分普遍, 其机理也有深入研究, 但对土壤 IPSB 种群结构和生理功能的影响研究甚少。为此, 本研究以 *B. Yabunchi* 的 3 株 IPSB 为供试菌株, 利用固体和液体培养技术, 设置不同浓度吡虫啉处理, 研究其生长繁殖、对 Ca₃(PO₄)₂ 溶解影响及其有关机理, 目的是了解该农药对土壤 IPSB 种群结构和溶磷作用的影响, 为合理使用吡虫啉提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

IPSB 菌株: 3 株伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia Yabunchi* B05、B07 和 B09), 分离自重庆市缙云山国家森林公园的砂岩黄壤 (106°20' E, 29°49' N, pH 4.34), 保存于西南大学资源环境学院微生物—植物营养实验室。

固体培养基 (g·L⁻¹): 10 葡萄糖、2.5 Ca₃(PO₄)₂、0.5 (NH₄)₂SO₄、0.2 NaCl、0.1 MgSO₄·7H₂O、0.2 KCl、0.5 酵母膏、0.002 MnSO₄·4H₂O、0.002 FeSO₄·7H₂O、20 琼脂、1 L 蒸馏水, pH 7.0~7.5。液体培养基则含琼脂。

吡虫啉: 吡虫啉粉剂 (含吡虫啉 10%), 上海悦联化工有限公司生产。

1.2 研究方法

蒸汽灭菌 (121℃, 1.5 kPa, 30 min, 下同) 固体培养基。取保藏菌株, 划线接种, 25±1℃ 恒温暗培养 72 h, 无菌生理盐水洗涤, 配成 1×10³ cell·mL⁻¹ 的菌悬液备用。在通常情况下, 吡虫啉在土壤中的残留量 ≤ 10 mg·L⁻¹, 故当培养基冷却至 50℃ 左右, 加入吡虫啉, 形成 0、5、10 和 20 mg·L⁻¹ 等不同浓度

的处理, 依次简称为对照、低、中、高浓度 (下同)。取 10 mL 尚未固化的培养基, 转移到直径为 6.0 cm 的培养皿中, 冷却至常温 (25~30℃) 后, 分别在培养基中央接种 0.1 mL 菌悬液, 25±1℃ 暗培养 7 d, 重复 5 次, 用菌落测定仪测量菌落和透明圈直径, 计算 Ca₃(PO₄)₂ 的溶解指数 (溶磷指数)^[16]:

$$\text{溶磷指数} = (\text{菌落直径} + \text{透明圈直径}) / \text{菌落直径}$$

取 100 mL 液体培养基, 置于 250 mL 三角瓶中, 蒸汽灭菌, 待冷却至常温 (25~30℃) 后分别加入吡虫啉, 形成 0、5、10 和 20 mg·L⁻¹ 等不同浓度的处理。然后, 各接种 1.0 mL 菌悬液, 摇床暗培养 120 h (25±1℃、75 r·min⁻¹), 重复 5 次。

在培养至 6、12、18、36、72、120 h 时, 各吸取 5.0 mL 菌悬液, 用 XSP-6C 显微镜 (上海迪诺力泰公司生产) 观测计数 IPSB。然后, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清液, 先用 pH 电极测定 pH, 再用钼蓝比色法测定无机磷含量^[17], 计算氢离子浓度 (pH = -lg [H⁺]) 和溶磷量 (培养液无机磷浓度 - 对照培养液无机磷浓度) × 培养液体积^[18]。培养结束后, 用 0.1 mol·L⁻¹ HCl 酸化培养液, 离心去除固体物质, 用 D-7000 高效液相色谱仪 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) 测定有机酸浓度。色谱条件为: L-7455 二级管阵列检测器, RezexRoa-Organic Acid 300 离子交换柱 (Phenomenex Ltd., Los Angeles, USA), 进样量 20 μL, 流动相 2.5 mmol·L⁻¹ H₂SO₄, 柱温 35℃, 压力 3.1 MPa, 流速 0.5 mL·min⁻¹, Diode Array L-7455 紫外检测器, 检测波长 210 nm。检测的有机酸为乙酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸和草酸等, 出峰时间依次为 23.92、19.47、16.05、13.73 和 11.60 min。

1.3 数据处理

分别用 Excel 2010 和 SPSS 17.0 进行基本计算、方差分析和 LSD 多重比较, 显著水平为 P < 0.05; 作图软件为 SigmaPlot 12.5。

2 结 果

2.1 吡虫啉对 IPSB 生长和溶磷作用的影响

将供试菌株接种于固体培养基, 随培养基中吡虫啉浓度提高, 对 IPSB 的抑制作用显著增强, 菌落

直径的降幅高达 39.81%~55.45% (图 1, 表 1)。与之类似, B09 的溶磷透明圈和溶磷指数显著减小; 但 B05 和 B07 则相反, 透明圈直径和溶磷指数增加, 最大增幅分别为 9.72%~19.44% 和 40.69%~106.94%。

在液体培养时, 由于菌株不同, IPSB 的生长速

率也不一样 (图 2)。培养 120 h 后, IPSB 在培养液中的平均密度变化于 $9.07 \times 10^8 \sim 26.56 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, B07 和 B9 的密度无显著差异, 但显著高于 B05。随吡虫啉浓度提高, IPSB 在培养液中的密度呈逐渐降低的趋势, 降幅高达 49.87%~65.28%。

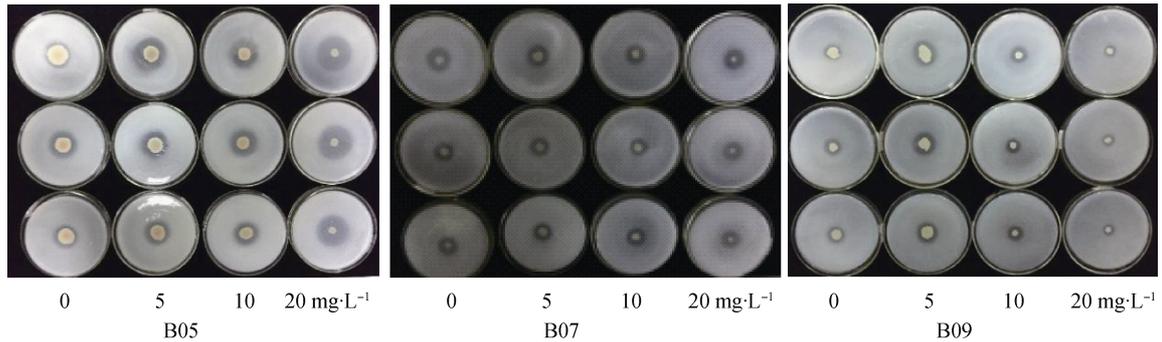


图 1 在含吡虫啉的固体培养基上, 3 株 IPSB 的生长状况和溶磷圈

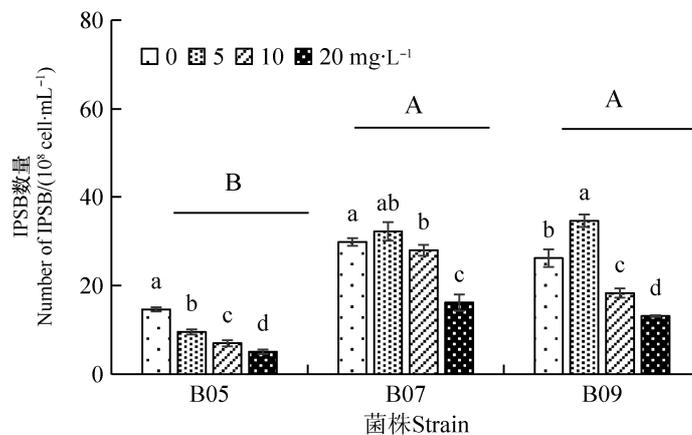
Fig. 1 Growth and P solubilization halos of three IPSB strains on solid culture media containing imidacloprid

表 1 固体培养时吡虫啉对 IPSB 生长和溶磷的影响

Table 1 Growth of inorganic phosphate-solubilizing bacteria and P solubilization in response to imidacloprid in solid culture

菌株 Strain	吡虫啉浓度 Imidacloprid concentration / (mg·L ⁻¹)	菌落直径 Bacterial colony diameter /cm	透明圈直径 Transparent ring diameter /cm	溶磷指数 P dissolving index
B05	0	1.01±0.10b	2.16±0.21cd	3.17±0.31e
	5	0.81±0.03c	2.24±0.20c	3.77±0.15cd
	10	0.70±0.11cde	2.37±0.06bc	4.46±0.55b
	20	0.45±0.03fg	2.58±0.18a	6.56±0.34a
B07	0	0.60±0.08de	1.65±0.23de	3.74±0.73cd
	5	0.72±0.03cd	1.54±0.14fg	3.15±0.14e
	10	0.57±0.05ef	1.40±0.07fg	3.46±0.11de
	20	0.44±0.04g	1.51±0.23fg	4.43±0.39b
B09	0	1.03±0.09b	2.10±0.04cd	3.22±0.15de
	5	1.21±0.04a	2.56±0.13ab	3.32±0.15de
	10	0.73±0.04cd	1.61±0.20ef	3.16±0.13e
	20	0.62±0.08de	1.16±0.14g	2.87±0.09f

注: 在同列中, 有不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。Note: Means±standard deviations followed by different lowercase letters in each column are significantly different at $P < 0.05$ level. The same below.



注: 不同大写表示菌株间差异显著; 不同小写字母表示吡虫啉浓度间差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Different capital and lowercase letters above the bars indicate significant difference among fungal strains and among imidacloprid concentrations at 0.05 level, respectively.

图 2 在液体培养基中, 吡虫啉对 IPSB 数量的影响

Fig. 2 Variation of the number of inorganic phosphate-solubilizing bacteria in liquid culture media with imidacloprid concentrations spiked

2.2 吡虫啉对 IPSB 分泌有机酸和 H^+ 的影响

由表 2 可知, 供试验菌株均可分泌较多草酸和柠檬酸, 二者合计超过有机酸分泌总量的 67.65%, 最高达 83.28%。值得注意的是, IPSB 分泌有机酸和 H^+ 的数量因菌株和吡虫啉浓度不同而有所差异。

就分泌草酸而言, B05、B07 和 B09 的平均分泌量分别为 1.01、1.29 和 1.45 $mmol \cdot L^{-1}$ 。在培养液中加入吡虫啉, 随浓度提高, 对 B07 和 B09 分泌草酸的抑制作用增强; 但对 B05 的作用则相反, 即吡虫啉浓度越高, 分泌草酸的速率反而增加, 最大增

表 2 IPSB 培养液中的有机酸和 H^+ 浓度

Table 2 Organic acid and proton concentrations in the culture solutions with IPSB inoculation

菌株 Strain	吡虫啉浓度 Imidacloprid concentration / $(mg \cdot L^{-1})$	草酸 Oxalate / $(mmol \cdot L^{-1})$	柠檬酸 Citrate / $(mmol \cdot L^{-1})$	乙酸 Acetate / $(mmol \cdot L^{-1})$	苹果酸 Malate / $(mmol \cdot L^{-1})$	琥珀酸 Butyrate / $(mmol \cdot L^{-1})$	H^+ / $(\mu mol \cdot L^{-1})$
B05	0	0.87±0.05f	0.40±0.01c	1.18±0.11a	ND	ND	13.25±0.93h
	5	0.95±0.04ef	0.39±0.01c	1.22±0.05a	ND	ND	17.73±1.26h
	10	1.04±0.05e	0.40±0.03c	1.15±0.13a	ND	ND	19.63±1.27h
	20	1.18±0.06d	0.39±0.04c	1.15±0.05a	ND	ND	29.95±2.48g
B07	0	1.60±0.06b	0.69±0.035b	0.77±0.03b	ND	0.65±0.03a	391.4±8.2b
	5	1.29±0.08cd	0.74±0.02a	0.74±0.06b	ND	0.64±0.02a	416.3±3.9a
	10	1.32±0.09c	0.75±0.04a	0.80±0.02b	ND	0.64±0.02a	379.3±8.3c
B09	20	0.96±0.06ef	0.75±0.03a	0.82±0.03b	ND	0.65±0.05a	370.9±5.0c
	0	1.80±0.05a	0.21±0.02d	ND	48.83±7.01a	ND	197.5±6.6d
	5	1.78±0.03a	0.17±0.03de	ND	35.37±2.95b	ND	202.3±6.5d
	10	1.29±0.07cd	0.13±0.01e	ND	27.71±1.97c	ND	157.2±5.4e
	20	0.94±0.04ef	0.08±0.02f	ND	15.65±1.58d	ND	137.9±7.2f

注: ND 表示未检出 Note: ND, not detected

幅达到 35.63%。供试菌株的柠檬酸分泌量 $B09 < B05 < B07$ ，平均分泌速率变化于 $0.15 \sim 0.73 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间。在含吡虫啉的液体培养基中，B05 分泌柠檬酸无显著变化，B07 的分泌速率增加，B09 显著降低；B09 的乙酸分泌量低于检测限，B05 的乙酸分泌量显著高于 B07，分别为 $1.15 \sim 1.22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.74 \sim 0.82 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外，在 B05 和 B07 的培养液中，未检测到分泌苹果酸；B09 分泌苹果酸的速率随吡虫啉浓度增加而降低，最大降低幅度超过 67.95%；B05 和 B09 不分泌琥珀酸，吡虫啉对 B07 分泌琥珀酸无显著影响，变化于 $0.64 \sim 0.65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

供试菌株 H^+ 平均分泌量依次为：B07 ($389.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、B09 ($172.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、B05 ($20.14 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在培养液中加入不同浓度的吡虫

啉，促进 B05 分泌 H^+ ；低浓度吡虫啉对 B07 分泌 H^+ 有促进作用；尽管低浓度吡虫啉对 B09 分泌 H^+ 无显著影响，但中、高浓度的吡虫啉仍表现出显著的抑制作用。

2.3 吡虫啉对 IPSB 溶磷量的影响

在培养液中，吡虫啉对 IPSB 溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的影响因菌株和浓度而异(图 3)。溶磷量 B05 最低、B09 次之、B07 最高。其中，B05 和 B09 对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解量为 $y = x/(a+bx)$ ，B07 的溶磷量为 $y = y_0 + a(1 - e^{-bx})^c$ (x 为培养时间)。此外，培养液中的吡虫啉浓度越高，B05 对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解量愈大；在高浓度的吡虫啉培养液中，促进 B07 但抑制 B09 溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ；在低浓度的吡虫啉培养液中，B07 和 B09 对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解量与对照无显著差异。

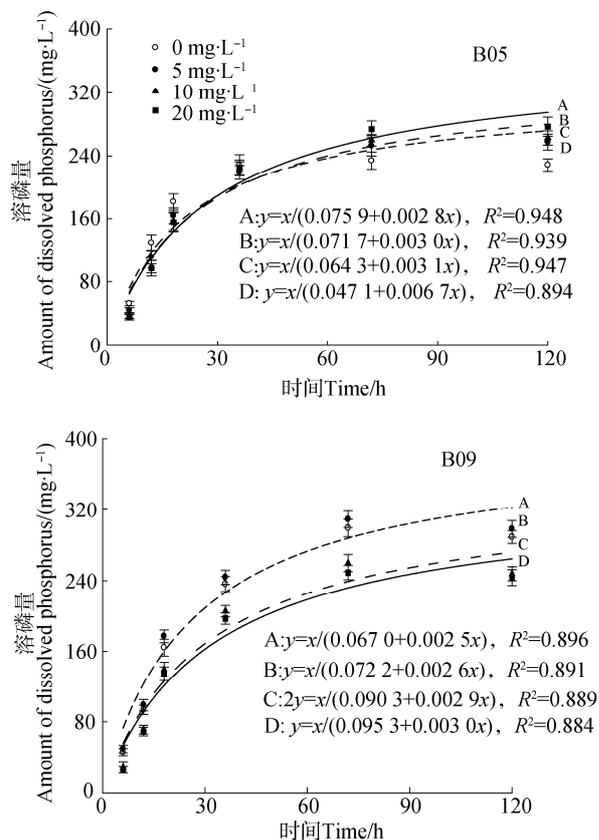


图 3 在培养液中，吡虫啉对 IPSB 溶磷量的影响

Fig. 3 Influence of imidacloprid on the amount of phosphorus dissolved by IPSB grown in culture solution

2.4 有机酸和 H^+ 分泌与 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 溶解的关系

相关性分析表明，在 B07 和 B09 培养液中， $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解量分别与有机酸和 H^+ 分泌总量呈极显著线性正相关；但是，B05 对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶

解量与有机酸和 H^+ 分泌总量相关不显著。将供试菌株作为整体进行统计时发现， $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解量均与有机酸和 H^+ 分泌总量呈显著线性正相关 ($r_{\text{有机酸}} = 0.876^{**}$, $r_{\text{氢离子}} = 0.823^*$, $n = 12$, $^{**}P < 0.01$, $^*P <$

0.05)。此外, IPSB的 H^+ 和有机酸分泌总量也呈显著线性正相关($r = 0.852^*$, $n = 12$)。

3 讨论

化学农药对土壤微生物数量、活性、种群结构及功能有重要影响^[19]。当浓度大于 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 吡虫啉对供试 IPSB 的生长繁殖均有不同程度的抑制作用, 在固体培养时菌落减小, 液体培养时密度降低。据报道, 吡虫啉显著抑制青海弧菌 (*Vibriosp. splendidus qinghaiensis* Q67)、费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 和发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum* T₃) 的生长繁殖, 表现出较强生物毒性^[20-21]。吡虫啉抑制土壤硫酸盐还原菌 (*Desulfovibrio vulgaris* Q235) 产酸, 可能减轻土壤酸化, 但增强对金属材料的腐蚀作用^[22]。培养试验表明, 吡虫啉抑制水稻条纹病毒 (Rice stripe virus) 的 NSvc4、CP、NS3 和 SP 等多个基因的表达, 降低 CP 和 SP 基因所控制的蛋白质合成^[23]; 利用电子显微镜观察还发现, 吡虫啉可破坏某些微生物细胞内的线粒体、细胞膜、高尔基体的结构, 并使 DNA 发生断裂、扭曲和形状改变^[23]。此外, 在酶促作用下, 吡虫啉在昆虫和微生物体内发生去饱和、脱烷基、甲基化、羟基化、酯化和硝基化等一系列生物化学反应, 产物包括胍、脲、5-羟基吡虫啉和亚硝基胍等^[25]。其中亚硝基胍为烷基化剂, 可作用于 DNA 双螺旋结构中的多个靶点, 造成基因突变, 使昆虫和微生物代谢改变, 生长繁殖异常, 或使细胞形态发生畸变、解体、死亡^[26]。

多数 IPSB 属于根际微生物, 除活化土壤难溶性无机磷酸盐和改善植物磷素营养之外, 还能合成植物激素和生长活性物质, 如生长素、水杨酸、嘌呤类、细胞分裂素等, 调节植物生长发育^[27]。在加入吡虫啉的固体和液体培养基中, 不同程度地降低了供试 IPSB 的菌落直径和在培养液中的密度, 说明吡虫啉抑制了它们的生长繁殖。与此同时, B09 溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的能力降低, 但随吡虫啉浓度提高, B05 和 B07 对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解量增加, 说明即使供试 IPSB 属于同一个种, 吡虫啉对它们生长繁殖和溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的影响也不完全相同。这意味着在农业生产中, 大量使用吡虫啉可能改变土壤 IPSB 的群落结构, 影响供试菌株对土壤难溶性无机

磷酸盐的溶解。

吡虫啉不同程度地抑制 IPSB 生长, 故对不同菌株溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的影响也不一样, 很有必要究其原因。大量的研究表明, 在微生物活化土壤难溶性磷酸盐的过程中, 主要依赖于它们分泌的有机酸和 H^+ ^[11]。相关分析表明, 在 B07 和 B09 培养液中, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解量与有机酸和 H^+ 分泌总量呈极显著线性正相关; 但是, B05 对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解量与 H^+ 和有机酸分泌总量的相关性不显著。这意味着在 B07 和 B09 溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的过程中, 有机酸和 H^+ 具有重要作用; 相反, B05 可能通过其他机制溶解培养液中的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 。前人研究发现, 吡虫啉对不同生物作用的代谢的靶点相同^[28], 由于供试 IPSB 菌株溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的机制有所不同, 这就会造成它们在溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的过程中, 对吡虫啉的响应也不一样。在培养液中, 微生物可直接分泌 H^+ , 它们分泌的有机酸也可电离产生 H^+ ^[29]。根据化学原理, H^+ 能直接溶解多种钙镁磷酸盐, 如羟基磷灰石, 氯磷灰石、氟磷灰石等, 提高土壤磷的有效性^[30]。低分子量有机酸尤其是柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、草酸能络合或沉淀难溶性磷酸盐中的金属离子, 释放出可溶性 H_2PO_4^- 和 $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ 。其中, 草酸对三价铁铝和二价钙镁离子的络合(沉淀)系数依次为 20.20、3.00、16.30 和 4.38。因此, 微生物分泌的草酸与难溶性含磷矿物发生接触后, 络合其中的这些金属离子, 破坏其晶体或非晶体结构, 释放出可溶性无机磷酸根^[31-32]。此外, 草酸和乙酸的电离常数较高(分别为 4.27 和 4.76), 属有机强酸, 可电离出大量 H^+ , 直接溶解磷酸钙镁^[33]。

值得注意的是, 类似于其他 IPSB 种群, 供试 3 株伯克霍尔德氏菌均能分泌 H^+ 、草酸和柠檬酸, B07 还能分泌琥珀酸和乙酸, B09 分泌苹果酸, B05 分泌乙酸。菌株之间 H^+ 和各种有机酸的分泌量也有所不同, 这意味着在不同供试菌株之间, H^+ 和有机酸代谢(或分泌)各异。不同代谢(或分泌)途径对吡虫啉敏感性可能有所差异, 这可能也是吡虫啉对 IPSB 溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 产生不同影响的重要原因之一。在土壤中, IPSB 分泌的 H^+ 和有机酸不仅能活化难溶性磷酸盐, 溶解钙镁, 提高磷、钙、镁的生物有效性, 而且还可溶解含钾矿物, 既能释放钾离子, 又可减少钾离子固定, 提高钾肥利用率^[30]。此外, 由于草酸、柠檬酸和苹果酸等低分子量有机酸络

合(沉淀)重金属的能力较强,故存在于根系周围的有机酸可减少植物吸收重金属,减轻危害^[34]。在农业生产中,防治虫害施用的吡虫啉进入土壤之后,不同程度地抑制 IPSB 的生长繁殖,可能影响其种群结构和溶磷功能。由于人工纯培养试验与田间自然情况的差异较大,很有必要进一步开展田间研究。

4 结 论

吡虫啉不同程度地抑制 IPSB 繁殖生长,促进 B05 和 B07 但降低 B09 的溶磷能力;供试菌株均能分泌 H⁺和不同种类的有机酸,参与 Ca₃(PO₄)₂溶解;在不同菌株之间,有机酸代谢、H⁺分泌和溶解 Ca₃(PO₄)₂的机制有所不同,这可能是供试 IPSB 的溶磷作用对吡虫啉产生不同响应的主要原因之一。因此,在农业生产中,施用吡虫啉防治作物虫害对土壤 IPSB 种群结构和溶磷功能等的影响可能因 IPSB 株系不同而异。

参考文献 (References)

- [1] Cai D S, Huang X P, Jiang D J, et al. Study on the formulation of 70% imidacloprid WG. Guangdong Chemical Industry, 2013, 40 (24): 49—50. [蔡德胜, 黄雪萍, 蒋殿君, 等. 70% 吡虫啉水分散粒剂的研制. 广东化工, 2013, 40 (24): 49—50.]
- [2] Cang T, Wang Y H, Wu C X, et al. Acute toxicity risk assessment of neonicotinoid insecticides to Hon-eybees (*Apis mellifera* L.). Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12 (4): 285—292. [苍涛, 王彦华, 吴长兴, 等. 新烟碱类杀虫剂对蜜蜂的急性毒性及风险评价. 生态毒理学报, 2017, 12 (4): 285—292.]
- [3] Wang J J, Han Z J, Wang Y C. A review on the toxicology of new nicotinyl insecticides. Acta Phytophylacica Sinica, 2001, 28 (2): 178—182. [王建军, 韩召军, 王荫长. 新烟碱类杀虫剂毒理学研究进展. 植物保护学报, 2001, 28 (2): 178—182.]
- [4] Yu S Q. Study on residue of pesticide imidacloprid in water and soil. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2016. [俞思琦. 农药吡虫啉在水体和土壤中的残留研究. 成都: 西南交通大学, 2016.]
- [5] Yang Q. Study on effects of planting years and pesticides on microbial number and enzyme activities in vegetables solar greenhouse soil. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013. [杨琴. 种植年限和农药对蔬菜日光温室土壤微生物数量及酶活性影响的研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.]
- [6] Zheng X Z, Ding H, Lei J J, et al. Effect of imidacloprid and chlorpyrifos on the transformation of urea nitrogen in soil. Chinese Journal of Pesticide Science, 2013, 15 (6): 648—654. [郑祥洲, 丁洪, 雷俊杰, 等. 吡虫啉和毒死蜱对尿素氮在土壤中转化的影响. 农药学报, 2013, 15 (6): 648—654.]
- [7] Gong P, Sun T H, Li P J. Ecological effects of pesticides on soil microorganisms. Chinese Journal of Applied Ecology, 1996, 7 (Sup): 127—132. [龚平, 孙铁珩, 李培军. 农药对土壤微生物的生态效应. 应用生态学报, 1996, 7 (增): 127—132.]
- [8] Yang M Y, Wang C H, Wu Z H, et al. Phosphorus dissolving capability, glucose dehydrogenase gene expression and activity of two phosphate solubilizing bacteria. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56 (4): 651—663. [杨美英, 王春红, 武志海, 等. 不同条件下两株溶磷菌溶磷量及葡萄糖脱氢酶基因表达与酶活分析. 微生物学报, 2016, 56 (4): 651—663.]
- [9] Han X F, Xie D T, Gao M, et al. Effect of reduced phosphorus fertilizer combining organic fertilizers and phosphorus dynamics changes in purple soil. Journal of Soil and Water Conservation, 2016, 30 (6): 207—213. [韩晓飞, 谢德体, 高明, 等. 紫色土减磷配施有机肥的磷肥效应与磷素动态变化. 水土保持学报, 2016, 30 (6): 207—213.]
- [10] Pingale S S, Virkar P S. Study of influence of phosphate dissolving micro-organisms on yield and phosphate uptake by crops. Ciência & Saúde Coletiva, 2017, 19 (9): 3809—3818.
- [11] Menezes-Blackburn D, Jorquera M A, Greiner R, et al. Phytases and phytase-labile organic phosphorus in manures and soils. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2013, 43 (9): 916—954.
- [12] Sreedevi S. Effect of phosphate solubilizing bacteria bacillus IPSB24 on growth of tomato plants. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2016, 5 (7): 311—320.
- [13] Delfim J, Schoebitz M, Paulino L, et al. Phosphorus availability in wheat, in volcanic soils inoculated with phosphate-solubilizing bacillus thuringiensis. Sustainability, 2018, DOI: 10.3390/su10010144.
- [14] Huang D M, Li Q, Guan G Q, et al. Selection, identification and medium optimization of a phosphate-solubilizing bacterium. Biotechnology Bulletin, 2015, 31 (2): 173—178. [黄达明, 李倩, 管国强, 等. 一株解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷培养条件的优化. 生物技术通报, 2015, 31 (2): 173—178.]
- [15] Yang J, Jiang Y, Wang X T, et al. Screening and identification of several endophytic diazotrophs with high capability of phosphate solubilizing and potassium decomposing from *Oryza officinalis*. Journal of Agricultural Biotechnology, 2016, 24 (2): 186—195. [阳洁, 江院, 王晓甜, 等. 几株高效溶磷解钾药用稻内生固氮菌的筛选与鉴定. 农业生物技术学报, 2016, 24 (2): 186—195.]
- [16] Wang Y S, Liu H, Yuan L. Negative allelopathic effects

- of root exudate of *Alternanthera philoxeroides* on growth and phosphate dissolution of inorganic phosphorus bacteria. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54 (6): 1486—1496. [王玉书, 刘海, 袁玲. 空心莲子草根分泌物对IPSB的负化感效应. *土壤学报*, 2017, 54(6): 1486—1496.]
- [17] Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科学技术出版, 2000.]
- [18] Li J, Wang W L, Lu B L, et al. Selection and measurement of phosphate-solubilizing micro-organisms and their phosphate-dissolving ability in high calcium soil of Hexi corridor in Gansu Province (In Chinese). *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2008, 26 (2): 7—10. [李娟, 王文丽, 卢秉林, 等. 甘肃省河西高钙土溶磷菌筛选及其溶磷能力初步研究. *干旱地区农业研究*, 2008, 26(2): 7—10.]
- [19] Karpouzias D G, Tsiamis G, Trevisan M, et al. “LOVE TO HATE” pesticides: Felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environmental Science & Pollution Research*, 2016, 23 (18): 1—5.
- [20] Zhu X W, Liu S S, Zhang Q, et al. Short-term and long-term toxicities of selected insecticides on photobacteria. *Research of Environmental Sciences*, 2009, 22 (5): 589—594. [朱祥伟, 刘树深, 张琼, 等. 杀虫剂及抗生素对发光菌的短期毒性与长期毒性. *环境科学研究*, 2009, 22(5): 589—594.]
- [21] Wu S H, Zhou D P, Xu Y T, et al. A cute toxicity of 18 kinds of pesticide to photobacteria. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26 (6): 2267—2270. [吴淑杭, 周德平, 徐亚同, 等. 18种农药对发光细菌的急性毒性研究. *农业环境科学学报*, 2007, 26(6): 2267—2270.]
- [22] Zhao L L, Zhao P, Sun C, et al. Reserch on the influence of pesticide to Q235 steel microbiological corrosion. *Journal of Shenyang Ligong University*, 2011, 30 (6): 22—24. [赵琳琳, 赵平, 孙成, 等. 杀虫剂对Q235钢微生物腐蚀影响的研究. *沈阳理工大学学报*, 2011, 30(6): 22—24.]
- [23] Wang S, Fu H W, Yang Y Z. Stress effect of imidacloprid on RSV in rice plants. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25 (12): 3593—3599. [王爽, 伏红伟, 杨益众. 吡虫啉对水稻体内条纹病毒的胁迫效应. *应用生态学报*, 2014, 25(12): 3593—3599.]
- [24] Karabay N U, Oguz M G. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genetics and Molecular Research*, 2005, 4 (4): 653—662.
- [25] Fan Y J, Shi X Y, Gao X W. Research progresses on the metabolism of neonicotinoids imidacloprid and thiamethoxam. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2012, 14 (6): 587—596. [范银君, 史雪岩, 高希武. 新烟碱类杀虫剂吡虫啉和噻虫嗪的代谢研究进展. *农药学报*, 2012, 14(6): 587—596.]
- [26] Wang Q, Jin X H, Niu B L, et al. Mutagenesis breeding of nitrosoguanidine and optimization of fermentation conditions in high yield strain of *Curdian*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45 (33): 83—86, 105. [王钦, 靳晓茜, 牛宝琳, 等. 可得然胶高产菌株的亚硝基胍诱变育种及其发酵条件的优化. *安徽农业科学*, 2017, 45(33): 83—86, 105.]
- [27] Zhao C X, Liu Q G, Zhang Z Y. Study on the ability of phosphoric bacteria and potassic bacteria in decomposing of phosphate and silicate. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2004, 30(6): 519—521. [赵晨曦, 刘前刚, 张志元. 磷钾细菌解磷解钾能力的研究. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 30(6): 519—521.]
- [28] Zhang H X, Zhang Q L, Wang Z S, et al. Pesticide degrading mechanism in soil. *World Sci-tech R&D*, 2009, 31 (1): 112—115. [张洪霞, 张祺玲, 王兆守, 等. 土壤农药降解微生物及其作用机理. *世界科技研究与发展*, 2009, 31(1): 112—115.]
- [29] Niu X G, Hua X Y, He S C. Studies on the potassium-dissolving ability of silicate bacteria. *Chinese Journal of Soil Science*, 2005, 36 (6): 950—953. [钮旭光, 华秀英, 何随成. 硅酸盐细菌解钾活性的研究. *土壤通报*, 2005, 36(6): 950—953.]
- [30] Najafi S, Jalali M. Effect of heavy metals on pH buffering capacity and solubility of Ca, Mg, K, and P in non-spiked and heavy metal-spiked soils. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2016, <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5329-9>.
- [31] Fox T R, Comerford N B, Mcfee W W. Phosphorus and aluminium release from a spodic horizon mediated by organic acids. *Soil Science Society of America Journal*, 1990, 54 (6): 1763—1767.
- [32] Gadd G M. Fungal production of citric and oxalic acid: Importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Advances in Microbial Physiology*, 1999, 41: 47—92.
- [33] Chen S H. Analytical chemistry. Beijing: China Agriculture Press, 2013. [陈时洪. 分析化学. 北京: 中国农业出版社, 2013.]
- [34] Ding L, Shen S G, Liang S X, et al. Effect of different organic acids for heavy metal extraction from Pb, Zn and Cd contaminated soil. *DEStech Transactions on Environment, Energy and Earth Science*, 2016, DOI: 10.12783/dteees/edep2016/5898.

(责任编辑: 卢萍)