

抗除草剂微生物与 水生植物的研究

王晓萍 著



东北林业大学出版社

抗除草剂微生物与 水生植物的研究

王晓萍 著

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

抗除草剂微生物与水生植物的研究/王晓萍著. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2008

ISBN 978-7-81131-338-3

I. 抗… II. 王… III. 除草剂—抗药性—研究 IV. TQ457.01

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 122947 号

责任编辑: 付 佳

封面设计: 彭 宇



NEFUP

抗除草剂微生物与水生植物的研究

Kangchucaoji Weishengwu Yu Shuishengzhiwu De Yanjiu

王晓萍 著

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

哈尔滨市工大节能印刷厂印装

开本 850 × 1168 1/32 印张 6.5 字数 163 千字

2008 年 7 月第 1 版 2008 年 7 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 978-7-81131-338-3

TQ · 13 定价: 18.00 元

前言

目前,除草剂污染是影响我国范围最大的有机污染之一,这些污染物严重影响土壤的可持续利用和人类的健康生活。仅黑龙江省大豆田除草剂的覆盖面积已占大豆种植面积的70%以上,个别县市近100%,已严重影响我国特别是黑龙江省农业种植结构的调整 and 经济发展。乙草胺、氟磺胺草醚和氯嘧磺隆是黑龙江省大豆产区应用面积较大的选择性除草剂,因其对大豆高度安全,杀草谱广、低毒、高效等特点被广泛使用。但由于连年大量的施用,极易对后茬造成药害,且氯嘧磺隆和氟磺胺草醚都是长残效除草剂,在土壤中残留时间长,对后茬敏感作物毒害严重,严重地影响大豆的轮作换茬,使种植业结构调整受到极大地限制,同时对农田环境也造成了污染。未被土壤吸附的除草剂通过淋溶、渗透、排水和地表径流而进入水体,引起地表和地下水体的污染。

关于生态环境中残留农药的降解,目前研究者认为主要途径是微生物降解。这三种除草剂中,目前国内报道的对氯嘧磺隆有降解作用的微生物相对较多,主要有假单胞菌属、芽孢杆菌属、丛毛单胞菌属、曲霉菌属、念珠菌属、链霉菌属、诺卡氏菌属、根霉菌属等;关于乙草胺降解菌,只有Jun Xu等(2006)从乙草胺污染土壤中分离出一株假单胞菌LCa₂;目前还没有氟磺胺草醚降解菌的相关报道。20世纪70年代中期以来,利用高等水生植物净化水体污染方面国内外做了大量的研究工作,越来越受到人们的重视,利用水生生物治理污水的技术发展迅速,但是黑龙江省在这方面的研究还几乎是空白。

本书共分十章,具体阐述了以黑龙江地区长期施用乙草胺、

氟磺胺草醚和氯嘧磺隆除草剂的豆田土壤为试验材料,分离筛选出分别对这三种除草剂有降解活性的菌株,并对其进行分类鉴定及生理生化特性和生长特性方面的研究。同时以水生高等植物皇冠草为研究对象,通过比较各项生理指标,明确水体除草剂污染对皇冠草造成毒害的机理,探讨皇冠草对除草剂污染的耐性机制和生态敏感性,探索利用皇冠草作为水体除草剂污染的监测植物的可行性。本研究将为乙草胺、氟磺胺草醚和氯嘧磺隆降解菌的有效利用及进一步开发应用于除草剂或其他有机污染物污染土壤的生物修复提供依据,为应用水生植物处理污水提供基础数据,对于更好的利用水生植物治理水体污染及筛选、培育优良的植物材料具有重要的理论和实践意义。

本书在撰写的过程中,得到哈尔滨师范大学生命科学与技术学院张大维教授、关旻博士以及范丽微、刘会娟硕士的大力支持,在此对关心和支持本书出版的所有人士表示衷心的感谢。

由于知识水平有限,加之时间紧迫,书中错误与不妥之处在所难免,真诚地希望各位专家和广大的读者批评指正,不吝赐教。

编 者

2008年7月

目 录

第一部分 概 述

- 1 除草剂的使用及市场现状 (3)
 - 1.1 除草剂产业概况及在我国的使用情况 (3)
 - 1.2 除草剂乙草胺、氯嘧磺隆及氟磺胺草醚概述 ... (6)
 - 1.3 使用除草剂带来的环境问题 (13)
- 2 除草剂污染土壤的微生物修复技术 (15)
 - 2.1 微生物修复技术 (15)
 - 2.2 除草剂引起的土壤污染及修复 (17)
- 3 水生植物及其对水环境的净化 (32)
 - 3.1 水资源状况 (32)
 - 3.2 水生植物概述 (33)
 - 3.3 逆境胁迫对水生生物的影响 (34)
 - 3.4 水生植物在治理水体污染中的应用 (39)

**第二部分 乙草胺、氟磺胺草醚和氯嘧磺隆降
解菌的分离、鉴定及生长特性的研究**

- 4 除草剂降解菌的分离与筛选 (49)
 - 4.1 供试试剂 (49)
 - 4.2 培养基 (49)
 - 4.3 试验方法 (50)
 - 4.4 结 果 (53)
 - 4.5 讨 论 (55)

5	除草剂降解菌的形态观察	(58)
5.1	供试试剂	(58)
5.2	培养基	(58)
5.3	方 法	(59)
5.4	结 果	(62)
6	除草剂降解菌的生理生化试验	(65)
6.1	供试试剂	(65)
6.2	培养基	(65)
6.3	试验方法	(67)
6.4	结 果	(70)
7	除草剂降解菌生长特性试验	(72)
7.1	试剂与材料	(72)
7.2	方 法	(72)
7.3	结 果	(74)
8	通过 16S rRNA 序列鉴定菌种	(82)
8.1	16S rRNA 技术在细菌分类鉴定研究中的应用	(82)
8.2	试剂与材料	(87)
8.3	试验方法	(87)
8.4	结 果	(91)
8.5	讨 论	(100)
8.6	小 结	(105)

第三部分 抗除草剂胁迫水生植物皇冠草的研究

9	乙草胺、氯嘧磺隆胁迫对皇冠草生理生化特性的影响 ...	(109)
9.1	皇冠草	(109)
9.2	植物材料及处理方法	(110)
9.3	供试药品及配制	(110)
9.4	试验方法	(110)

9.5 结 果	(121)
9.6 讨 论	(141)
10 皇冠草细胞色素 P450 基因相似序列的研究	(146)
10.1 细胞色素 P450 酶系及其除草剂抗性	(146)
10.2 细胞色素氧化酶 P450 基因相似序列研究	(153)
10.3 结 果	(156)
10.4 讨 论	(164)
10.5 小 结	(166)
参考文献	(167)

第一部分 概 述

1 除草剂的使用及市场现状

1.1 除草剂的产业概况及在我国的使用情况

农药的使用是保证农牧业增产的基本手段,农药自诞生以来,在消灭农作物的病虫害、保证粮食稳步增产以养活不断增长的世界人口上功不可没。据联合国粮农组织(FAO)估计,全世界每年因病、虫、草害损失的粮食达35%,损失的棉花达33.8%。农药使用起码可挽回损失的30%~40%(王波等,2006)。我国是农业大国,每年平均发生病虫害27~28亿 hm^2 ,据农业部门统计,由于使用农药,我国平均每年挽回粮食2500万t、棉花40万担、蔬菜800万t、果品330万t,减少直接经济损失300亿元。农药按其防治对象可分为杀虫剂、杀菌剂、除草剂、杀螨剂、杀鼠剂、杀线虫剂、植物生长调节剂等。自2,4-D于1946年开始使用以来,除草剂工业已有50多年的发展史。迄今科学家已成功地开发出了一大批选择性除草剂。除草剂作为现代农业生产体系的重要组分,是农田除草技术中最可靠、最经济的手段(欧晓明等,2000)。

1.1.1 除草剂产业概况

全球农药市场持续增加,农药市场销售额高达300亿美元左右,年增长1.2%。其中除草剂为150亿美元左右,占销售额的50%。随着中国农业现代化的发展和农业劳动力的逐步转移,栽培耕作方式趋向于规模化和集约化,对农药的需求量显著增加。其中,除草剂近年来的增长率远高于杀虫剂和杀菌剂的发展水

平, 约占到农药产量比重的 1/3。目前全国农田化学除草面积已达 0.53 亿 hm^2 次左右, 较 1980 年增加了 10 多倍。上市的除草剂有效成分约为 100 个分属磺酰脲、酰胺、三氮苯等 20 大类, 除草剂产业发展迅速 (苏少泉, 2003)。

近年来沙尘暴频繁出现, 研究表明沙尘的主要来源是农田土壤, 生态保护和环境安全要求农田耕作模式向少动土的保护性耕作转变, 全国正在进行大范围推广。保护性耕作是种植业发展的趋势, 而除草是其中的关键技术环节, 除草剂产业有着巨大的潜力。据化工部权威人士分析, 预计今后除草剂的需求将以每年 200 万 hm^2 次的速度增加, 中国需除草剂 6.7 万 ~ 8.6 万 t, 占农药需求总量的 30% ~ 40%, 未来十年全国化学除草面积可能会增加 0.31 亿 hm^2 (苏少泉, 2003), 除草剂产业潜力巨大。

目前全世界生产的除草剂品种达 300 多个, 总的趋势是向着高效、低毒、强选择性, 杀草谱广的方向发展, 归纳起来有如下特点 (梁丽娜等, 2005):

剂型的多样化。近年来, 市场上出现了控制释放剂、高浓度颗粒剂、胶悬剂、大粒剂等新剂型。可以说, 一种好的药剂要取得成功, 一半在于制剂的研究。

使用方法多种多样。使用技术是发挥药效的关键问题。目前喷雾方式的革新, 施药器械的改进, 以及用药方法的完善, 可以用最少的药剂发挥最大的除草效果。

使用面积迅速扩大。随着耕作方式由人力、畜力向机械耕作方式转变, 劳动力的减少, 杂草危害加剧, 农田化学除草的面积也在迅速扩大, 增长速度快。以美国为例除草剂销售量 1984 年上升到农药总量的 66%。其后由于引入超高效除草剂酰胺类及其他化合物, 用量有所下降, 但仍超过杀虫剂、杀菌剂。

混用与增效剂的普及。为了取长补短, 使用方式日益趋向除草剂之间、除草剂与其他农药间的混用及增效剂的应用。这样能降低用量, 提高和延长药效, 降低残留, 增强对气候条件的适应

性，扩大杀草谱，提高对作物的安全性。

1.1.2 中国主要作物除草剂的使用情况

中国农药市场先后有近百个除草剂产品，使用面积前 20 位的产品占到全国农田化学除草总面积的 75% 左右，磺酰脲类、苯氧羧酸类、三嗪类和酰胺类除草剂是市场的主流品种。磺酰脲类除草剂以苄嘧磺隆、甲磺隆的制剂最多；苯氧羧酸类除草剂主要有 2, 4-D、2 甲 4 氯等；三嗪类除草剂主要有莠去津、扑草净、西草净制剂；酰胺类除草剂包括乙草胺、丁草胺等（苏少泉，2004）。其中，甲磺隆、莠去津、绿磺隆、咪唑乙烟酸、氟磺胺草醚和氯嘧磺隆等长残效除草剂占到除草总面积的 15% 左右。

1.1.2.1 水稻

水稻主要使用的除草剂品种有丁草胺、二氯喹啉酸、吡嘧磺隆、苄嘧磺隆和甲磺隆等，其中丁草胺的使用面积占到水稻播种面积的 25%；二氯喹啉酸、吡嘧磺隆均占到 10% 左右。丁草胺对鱼类和两栖类等水生生物毒害大，二氯喹啉酸杀草谱上存在缺欠，连续使用会造成千金子等杂草猖獗，同时能对阔叶作物造成明显伤害。根据杀草谱及安全性，待开发的品种有四唑嘧磺隆、醚磺隆及四唑酰草胺等（王险峰等，2003）。

1.1.2.2 小麦

小麦主要使用的除草剂品种有 2, 4-D 和苯磺隆，处理面积分别占小麦播种面积的 20% 和 25% 左右。2, 4-D 漂移后易对周围的阔叶类作物造成药害，苯磺隆连续施用易形成抗性杂草残留物对后茬作物有明显影响（王焕民，2003）。从目前的发展趋势来看，苯磺隆及其他短残留性磺酰脲除草剂品种仍将是麦类作物主要除草剂品种。

1.1.2.3 大豆

大豆主要使用的除草剂品种有咪唑乙烟酸、氟磺胺草醚、精

恶唑禾草灵和氯嘧磺隆。施用量均占大豆播种面积的 15% 左右，绝大部分为长残效除草剂，在作物连作和轮作农田中极易造成后茬作物药害、减产甚至绝收。今后值得开发的品种有氟噻乙草酯、氯氟苯醚、环氧嘧磺隆等（王险峰等，2003）。

1.1.2.4 玉 米

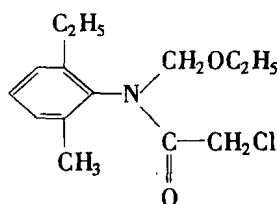
玉米主要使用的除草剂品种有莠去津、百草枯和乙草胺等，其中莠去津的处理面积占玉米播种面积的 15% 左右，对后茬作物危害显著，对地下水污染严重，连续使用耐药杂草增加迅速。值得考虑并生产的品种有硝磺酮、烟嘧磺隆、砒嘧磺隆、氯嘧磺隆和氟噻乙草酯等（王险峰等，2003）。

1.2 除草剂乙草胺、氯嘧磺隆及氟磺胺草醚概述

1.2.1 乙草胺简介

1.2.1.1 理化性质

乙草胺 (acetochlor) 也称禾耐斯，化学名称 2'-乙基-6'-甲基-N-(乙氧基)-2-氯代乙酰替苯胺 2-chloro-N-(etioxymethyl)-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)acetamide)，分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{ClNO}_2$ ，相对分子质量 269.77。化学结构式如下：



原药为淡黄色油状液体，性质稳定，不易挥发，不易光解，水中溶解度为 223 mg/L (25 °C)，可溶解在多种有机溶剂中，有

较高的熔点和沸点 (70 ℃, 200 ℃), 易被土壤中有有机物及粘粒吸附。

1.2.1.2 毒性

按我国农药毒性分级标准, 乙草胺属低毒除草剂, 对眼睛和皮肤有轻微刺激作用, 大鼠急性经口 LD_{50} 2 953 mg/kg, 虹鳟鱼 LC_{50} 0.45 mg/L, 其原药对大鼠、小鼠有致肿瘤作用, 被美国环保局定为 B-2 类致癌物 (沙家骏, 1999)。

1.2.1.3 作用特点

乙草胺是选择性芽前土壤处理除草剂, 由 2-乙基-6-甲基苯胺与甲醛反应生成相应的亚胺, 再与氯代乙酰氯加成, 然后与乙醇钠反应生成产品。主要用于玉米、大豆、棉花、花生、马铃薯等作物的杂草防除 (Breux E J, 1986; 沙家骏, 1999)。该除草剂土壤处理后具有很高的活性, 特别是对有机质含量高的土壤更为有效 (Hua R.M. et al., 1995; Mathew R. et al., 1996; Zhou S. et al., 1997), 对一年生禾本科杂草、部分阔叶杂草等具有较好的防除效果 (Capel P.D. et al., 1995)。禾本科杂草主要通过芽鞘吸收, 阔叶杂草是通过苗幼根、幼芽吸收, 从而抑制和破坏发芽种子细胞的蛋白酶, 抑制幼芽与幼根的生长, 刺激产生瘤状畸形, 致使杂草死亡, 用量为 1.6 ~ 2.1 kg/hm², 持效期 40 ~ 70 d (张玉聚, 2004)。

1.2.1.4 研究现状

乙草胺属氯乙酰胺类除草剂, 是我国使用最多的三种除草剂 (草甘磷、乙草胺和丁草胺) 之一 (胡笑行, 1998), 1971 年由美国 Monsanto 公司研制生产, 随后在世界大部分国家和地区取得注册和登记。我国于 20 世纪 80 年代初开始了乙草胺的研发工作, 为国内农资市场上最大吨位的除草剂产品。目前乙草胺作为一种旱田除草剂, 在我国旱田化学除草剂中已占有相当的地位, 其合成工艺得到不断改进 (夏兴林等, 2006; 王淑菊等, 2007; 高翠丽等, 2007), 除草效果也得到了广泛的试验验证 (Jablonkai I.,

2003; 孙晓清, 1996; 李国林等, 1998; 何永福等, 2007)。

尽管氯乙苯胺类除草剂是作为低毒、高效、性能优良的农药被开发出来的, 但是如果使用不当会对后茬作物或蔬菜造成药害, 药害症状出现于作物萌芽与幼苗期 (陈国参等, 2002)。土壤施用乙草胺达 0.1 mg/kg 时就可对青菜造成危害, 且危害程度随浓度的增加而增强 (陈良燕等, 2001); 乙草胺可加重大豆根腐病的发生 (陈立杰等, 1999), 对萌发期水稻的呼吸有抑制作用 (冉梦莲等, 1999), 对油菜、大豆、向日葵等也都有药害作用 (黄春艳等, 2000; 黄春艳等, 2002; 黄春艳等, 2003)。乙草胺除了对作物具有潜在危害之外 (张玉聚等, 2000; 李美等, 2001), 由于乙草胺常年的大量施用, 对环境有着很大的危害 (Balnova A.M., 1997; Rebich R.A. et al., 2004; Postle J.K. et al., 2004; Curwin B. et al., 2005), 由乙草胺引起的土壤和水污染越来越引起人们的重视, 检测方法也不断精密 (Kahn B.B. et al., 2001; Ramesh A. et al., 2001; Vryzas Z. et al., 2002; Gustin C.A. et al., 2005; Shoemaker J.A. et al., 2006)。乙草胺对土壤微生物种群数量有一定的抑制作用, 抑制作用随浓度的提高而增强。药剂对土壤中细菌、真菌、放线菌生长均有一定的抑制作用 (Zhang H.W. et al., 2004; 于建垒等, 2000; 齐鸿雁等, 2002; 李新宇等, 2005), 研究表明, 乙草胺在土壤中吸附、迁移等行为对土壤结构有较大影响, 且乙草胺具有高渗滤性, 可以进入土壤深层、表面及地下水 (Balioova A.M., 2000; Liu W. et al., 2003; Taylor J.P. et al., 2005; 郑和辉等, 2001)。从而可能产生更严重的危害, 因为它被怀疑具有致癌性以及遗传毒性 (Ashby J. et al., 1997; 耿德贵等, 2000; 谢志浩等, 2003)。

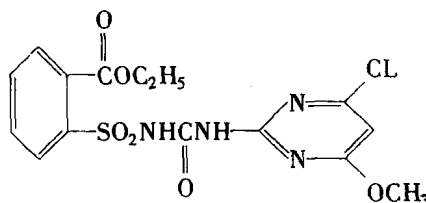
乙草胺降解的研究中, 光化学降解的相关报道较多 (Sandor M.W. et al., 1994; Liu S.Y. et al., 2005; Xu G. et al., 2007; 郑和辉等, 2001; 郑和辉等, 2002), 水解和电化学降解也有报道 (Friedman C.L. et al., 2016; 郑和辉等, 2001)。乙草胺生物降解

方面的研究国内外的报道很少, 现有报道主要是通过试验证明土壤微生物对乙草胺的降解作用 (Ye C.M. et al., 2002; 朱九生等, 2006) 及不同试验因子对乙草胺生物降解的影响等 (Cai X. et al., 2007; 朱九生等, 2004); 关于乙草胺降解菌株的分离鉴定, 除 Jun Xu 等 (2006) 从乙草胺污染土壤中分离出一株假单胞菌 LCa_2 外, 再无报道。

1.2.2 氯嘧磺隆简介

1.2.2.1 理化性质

氯嘧磺隆 (Chlorimuron-ethyl) 也称豆草隆、豆威、豆磺隆、氯嘧磺隆, 化学名称 2-(4-氯-6-甲氧基嘧啶-2-基氨基甲酰氨基磺酰基) 苯甲酸甲酯 [ethyl 2-(4-chloro-6-methoxypyrimidin-2-ylcarbamoyl sulfamoyl) benzoate], 分子式 $C_{15}H_{15}ClN_3O_5S$, 相对分子质量 414.5, 化学结构式如下:



纯品为白色固体粉末, 工业品为淡黄色粉末, 熔点 $185 \sim 187^\circ\text{C}$, $pK_a 4.2$, 不溶于酸, 溶于碱, 溶于二甲基甲酰胺、1,4-氧六环等, 在二氯甲烷中有中等溶解度, 微溶于丙酮、乙醇, 难溶于苯等非极性溶剂, 水中 (25°C) 溶解度为 11 mg/L (pH 值为 5), 1.2 g/L (pH 值为 7)。

1.2.2.2 毒性

雄、雌大白鼠急性经口 LD_{50} 分别为 5840 mg/kg 、 6810 mg/kg , 小白鼠急性经口 LD_{50} 6180 mg/kg , 大白鼠急性经皮 LD_{50} 大于 5000 mg/kg 兔急性经皮 LD_{50} 大于 2000 mg/kg , 对皮肤稍有刺激作