浙 江 农 林 大 学 学 报，2013，**30**(5)：662 – 668
Journal of Zhejiang A & F University

喷施 Bt 杀虫剂对土壤微生物生物量和多样性的影响

陈梦扬[1]，魏　健[1]，葛高波[1]，孙　铭[1]，冯秀智[1]，吴可人[1]，李永春[1,2]，徐秋芳[1,2]

（1. 浙江农林大学　环境与资源学院，浙江 临安 311300；2. 浙江农林大学　浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室，浙江 临安 311300）

摘要：应用氯仿熏蒸法和聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术研究了菜地土和松林土喷施苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis*(Bt)杀虫剂后，土壤微生物量和细菌群落结构及多样性的变化特征。研究结果表明：菜地土喷施 Bt 杀虫剂后，土壤微生物量呈现先减少后增加再减少的变化趋势；松林土喷施 Bt 杀虫剂后，土壤微生物量碳则呈现出增加的趋势；2 种土壤均在喷施 1 315 g·hm^{-2} 的 Bt 杀虫剂后，微生物量碳达到最大值。微生物群落结构分析表明，菜地与松林土壤变性梯度凝胶电泳(DGGE)图谱带型有较大的差异，菜地土壤细菌群落具有更高的丰富度。土壤类型是决定微生物群落结构相似性的关键因素，Bt 杀虫剂梯度喷施并不足以形成新的群落结构。菜地土喷施 Bt 杀虫剂后微生物多样性指数显著上升($P<0.05$)，而松林土则表现出显著下降($P<0.05$)或不变的趋势。图 3 表 3 参 20

关键词: 土壤学；苏云金杆菌(Bt)杀虫剂；土壤微生物量；细菌群落结构；多样性指数
中图分类号：S154.3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**2095-0756(2013)05-0662-07

Soil microbial biomass and biotic diversity with Bt insecticide

CHEN Mengyang[1], WEI Jian[1], GE Gaobo[1], SUN Ming[1], FENG Xiuzhi[1], WU Keren[1], LI Yongchun[1,2], XU Qiufang[1,2]

(1. School of Environmental and Resources Science, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Environmental safety assessment of soil microbial is essential for development and application of Bt insecticide. To analyze the effects of Bt insecticide on soil microbial in vegetable and pine forest soils, a chloroform fumigation-extraction method and a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)were used to assess microbial biomass and the bacterial community after spraying insecticide Bt with three concentration gradients. Results indicated that, after spraying Bt insecticide at 375, 1 315, and 2 255 g·hm^{-2}, soil microbial biomass carbon(MBC)for vegetable soil, significantly decreased, increased and then decreased ($P<0.05$), respectively; whereas, for a pine forest soil, when spraying at concentration gradients of 1 315, 2 255 g·hm^{-2}, MBC significantly increased ($P<0.05$). Compared with the samples without spraying Bt, MBC for both vegetable soils and pine forest soils reached a maximum at 1 315 g·hm^{-2} of Bt. Also, compared to pine forest soils, DGGE patterns for vegetable soils revealed a higher richness in the bacterial community. After spraying Bt insecticide on vegetable soils, soil bacterial community diversity indices significantly increased ($P<0.05$), but for pine forest soils they significantly decreased ($P<0.05$) or were unchanged with different concentration gradient. In this study, soil types were a key determinant of soil bacterial community structure, and spraying Bt insecticide did not lead to new community structures. [Ch, 3 fig. 3 tab. 20 ref.]

Key words: soil science; Bt insecticide; soil microbial biomass; bacterial community structure; diversity

收稿日期：2012-12-21；修回日期：2013-02-27
基金项目：国家自然科学基金资助项目(31200473)；浙江农林大学人才启动基金资助项目(2012FR10)
作者简介：陈梦扬，从事土壤微生物学研究。E-mail: ChenMY1993@126.com。通信作者：李永春，讲师，博士，从事土壤与环境微生物学研究。E-mail: yongchun101@hotmail.com

indices

虫害是制约农作物高产、稳产的重要因素。全球每年因虫害所造成的农业生产损失约占农作物总产量的 15%[1]。生物农药由于对病虫害防治效果好，对人畜安全无毒或低毒，无残留，不易污染环境而受到人们的青睐[2]。生物农药对病虫害特异性强，不杀伤害虫的天敌和其他有益的生物；其活性成分为自然界本身存在的物质，自然界有其顺畅的降解途径，不会破坏生态平衡[3]。生物农药中 Bt 的研发是最成功的，在微生物防治害虫的实践中占有极其重要的地位[4]。Bt 杀虫剂是细菌性杀虫剂苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* 的简称，至今已证明该菌对 10 个目 522 种昆虫具有不同的致病力，尤其是对鳞翅目 Lepidoptera 幼虫特别有效[5]。此外，Bt 还是当今研究最多、用量最大的杀虫细菌，它占据了生物农药 90%以上的市场，仅国内其应用面积就达到 300 万 hm^2 以上[6]。由于中国对生物农药的安全问题没有统一的标准，生产企业自定产品标准，都自认为生物农药是安全无毒的。这种思想容易使生物农药在安全控制方面产生新的问题[7-8]。在生物农药应用过程中一些有关于生态安全的问题还有待于进一步研究，特别是对地下生态系统的影响。农药对土壤微生物的影响，已成为不少国家评价农药生态安全的一个重要指标[9]。土壤微生物对所生存的微环境十分敏感，可对土地利用方式的改变以及人为干扰等做出反应[10-11]。有研究表明，Bt 蛋白进入土壤后，会产生有杀虫活性的结合态 Bt 蛋白，而且不易被土壤微生物分解；保留在土壤中的这些较低浓度的 Bt 蛋白可能会对非靶标生物产生不利影响，即对土壤中微生物也可能产生一定影响[12]。正因为如此，研究 Bt 杀虫剂施用对地下生物的影响最好的指标就是土壤微生物。但施用 Bt 杀虫剂后对土壤微生物量和微生物群落结构的影响至今鲜见报道。本研究选取典型的菜地土壤和松林土壤，通过喷施不同浓度梯度的农药，研究微生物量碳和微生物群落结构及多样性变化特征，为 Bt 杀虫剂施用后地下生物安全评价提供直接的理论依据。

1　材料与方法

1.1　土壤采集与理化性质测定

采样地点分别为浙江省临安市太湖源镇和锦城镇。2 个乡镇均属于中纬度北亚热带季风气候区，四季分明，气候温和，雨水充沛(年降水量为 1 420.0 mm)，多年平均气温 15.8 ℃。7 月最热，1 月最冷。历年平均日照时数为 1 939.0 h，无霜期 234 d。2 个取样地区土壤为粉砂岩母质上发育的红壤土类，林地土壤取自一片有约 50 a 历史的松林地，农田土取自临安市郊蔬菜生产基地。上述取样地点在近期内均未使用过同类杀虫剂。在各取样点按 5 点法分别采集 0~20 cm 的表层土壤样品，样品分别采集后带回室内稍微风干后充分混匀，过 2 mm 钢筛并分成 2 份，一份新鲜土样供土壤微生物量碳测定使用，农药喷施以及冷冻干燥后置于-20 ℃保存用于 DNA 提取等，另一份风干处理后用于土壤总有机质、全氮、碱解氮、全磷等质量分数的测定。土壤理化性质测定参照文献[13]进行。土壤基本理化性质见表1。

表 1　农田和林地土壤基本理化性质

Table 1　Physical and chemical characteristics of vegetable soils and pine forest soils

土壤	pH(H_2O)	有机质/($g\cdot kg^{-1}$)	全氮/($g\cdot kg^{-1}$)	碱解氮/($mg\cdot kg^{-1}$)	全磷/($g\cdot kg^{-1}$)
菜地土	5.99	4.14	0.73	107.8	0.569
松林土	4.55	2.78	0.34	46.2	0.038

1.2　Bt 杀虫剂喷施处理

购买市售宁农牌苏刹(烟台金诺生物工程有限公司)苏云金杆菌可湿性粉剂(16 000 ×16.67 $\mu kat\cdot g^{-1}$)，根据使用说明，该 Bt 杀虫剂使用剂量范围为 375~2 255 $g\cdot hm^{-2}$。据此分别设置 3 个喷施处理： 375 (T_1)，1 315(T_2)和 2 255(T_2) $g\cdot hm^{-2}$，并以不喷施农药只喷无菌双蒸水为对照(T_0)。采集土壤时测定所取土样平均容重，计算出本研究中所需喷施 Bt 杀虫剂的量为：0.144，0.506，0.867 $\mu g\cdot g^{-1}$ 土壤。将上述过筛的新鲜土壤称取 50 g 置于灭菌培养皿中，并用无菌双蒸水溶解 Bt 粉剂，按照上述处理每个培养皿喷施 3 mL 药剂，同一类型土壤各个处理设置 3 次重复。喷施结束后置于 25 ℃培养箱中培养，中间定期向每块培养皿补充等量无菌双蒸水，以使土壤湿度保持在 60%的田间最大持水量。在上述条件下培养

7 d 后，作为待测样品进行分析测定。

1.3 土壤微生物量碳测定与土壤总 DNA 提取

土壤微生物量碳采用氯仿-直接提取法[14]，对照土壤和熏蒸后土壤用 0.5 mol·L^{-1} 硫酸钾提取(土∶水=1∶5)，滤液中碳质采用 TOC-V_{CPH} 有机碳分析仪测定。土壤微生物量碳(B_c)以熏蒸和未熏蒸土壤 0.5 mol·L^{-1} 硫酸钾提取液中碳质量分数之差乘以系数得到，B_c=2.64E_c，其中 E_c 为熏蒸土样与未熏蒸土样提取液碳质量分数之差。所有测定均设 3 次重复。

采用 PowerSoil™ Total DNA Isolation Kit 试剂盒提取土壤总 DNA，称取 0.5 g 于-20 ℃保存的土壤样品，按试剂盒说明书进行土壤 DNA 提取，提取后的 DNA 样品保存于-20 ℃。

1.4 土壤总细菌的聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)分析

采用一对通用引物 F338-GC 和 518 r 扩增细菌 16S rDNA 基因 V3 区的一段长约 260 bp 的片段，F338-GC:5′-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′；518r:5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′，使用 Bio-Rad 公司的 PTC-200 对土壤总 DNA 进行扩增。50.0 μL 反应体系如下：10×聚合酶链式反应(PCR)，缓冲液 5.0 μL，氯化镁(25.0 mmol·L^{-1}) 3.0 μL，三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTP，2.5 mmol·L^{-1})1.0 μL，引物(10.0 μmol·L^{-1})各 0.5 μL，*Taq* DNA 聚合酶(5 × 16.67 nkat) 0.2 μL，模板 DNA 1.0 μL，用无菌双蒸水补足至 50.0 μL。反应参数：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 1 min，50 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。取 3.0 μL PCR 反应产物用 15.0 g·kg^{-1} 的琼脂糖凝胶进行电泳，检测产物及其长度。

使用 DCode™ Universal Mutation Detection System(Bio-Rad)，在变性剂梯度为40%~60%的 80 g·kg^{-1} 聚丙烯酰胺凝胶上进行变性梯度凝胶电泳。电泳前对 PCR 产物定量、校正，使上样量一致。在 60 ℃，80 V 条件下电泳 13 h 后，SYBR green I 染色 30 min，染色结果用 Gel Doc™ EQ(Bio-Rad)凝胶成像系统成像，使用 Quantity One4.4 软件(Bio-Rad)进行图像分析。

1.5 数据处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理，单因素方差分析比较各处理之间的差异显著性(P<0.05)。利用 Quantity One 4.4 软件进行图谱分析时，主要采用未加权算术平均对群法(UPGMA，unweighted pair-group method using arithmetic averages)对变性梯度凝胶电泳(DGGE)图谱进行聚类分析。一般认为相似值高于 0.60 的 2 个群体具有较好的相似性。使用 CANOCO 4.5.1 软件 (Microcomputer Power，Ithaca，USA)对 DGGE 揭示的细菌群落结构进行降趋势对应分析 (detrended correspondence analysis，DCA)[15]。使用 Shannon 多样性指数(H)，Margalef 丰富度指数(D)以及 Pielou 均匀度指数(E)对土壤细菌微生物群落多样性进行分析[16]，其计算公式为：$H=-\sum(n_i/N)\ln(n_i/N)$；$D=(S-1)/\ln N$；$E=H/\ln S$。其中：n_i 为每条电泳条带光密度峰值，N 是同一泳道中所有条带光密度峰值总和。电泳条带光密度的峰值通过分析软件 Quantity one 进行读取。S 为每一泳道总的条带数。

2 结果与分析

2.1 Bt 杀虫剂的施用对土壤微生物量碳的影响

表 2 为分别对菜地土和松林土喷施 Bt 杀虫剂后其微生物量碳的变化特征。对菜地土而言，随着 Bt 杀虫剂喷施比例的增加，微生物量碳变化并没有呈现出线性增加或减少的趋势；与未施用杀虫剂的对照 T_0 相比，T_1 使得土壤中微生物碳显著下降(P<0.05)，T_2 使得土壤中微生物量碳显著增加(P<0.05)，但 T_3 并没有明显差异。而对松林土而言，随着 Bt 杀虫剂喷施比例的增加，微生物量碳变化总体上表现出增加的趋势，但仍然呈现出非线性的变化特征；与未施用杀虫剂的对照相比，T_1 施用并没有使土壤中微生物量碳显著增加，但 T_2 和 T_3 的施用均显著增加土壤中微生物量碳 (P<0.05)；且与菜地土壤类似，T_2 的微生物量碳达到一个最高峰。施用不同剂量的 Bt 杀虫剂后，导致了土壤微生物活性不同程度的增加或减弱，从而导致微生物量碳上升和下降。

土壤微生物量碳与有机碳的比值能较好地表征土壤碳的动态变化。比值越大，说明有机碳周转速率越快。据 Zeller 等[17]研究报道，土壤微生物量碳占有机碳的比例范围为 0.27%~7.00%。本研究所选取的土壤及其喷施 Bt 杀虫剂后，该结果也处于此范围内，属于正常值。由表 2 可以看出，对菜地土而言，

表 2　施用 Bt 杀虫剂后土壤碳变化

Table 2　Change of soil carbon content after spraying Bt insecticide

土壤	喷施比例	样品编号	微生物量碳/(mg·kg^{-1})	(微生物量碳:有机碳)/%
菜地土	T_0	TVK	117.31 ± 10.08 b	2.83
	T_1	TV1	82.66 ± 0.18 c	2.00
	T_2	TV2	175.38 ± 13.43a	4.24
	T_3	TV3	86.80 ± 7.13bc	2.34
松林土	T_0	TPK	36.85 ± 2.27 c	0.89
	T_1	TP1	57.40 ± 7.53bc	1.39
	T_2	TP2	113.84 ± 16.04 a	2.75
	T_3	TP3	89.47 ± 18.05 ab	2.16

说明：同列不同字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。

除了 T_2 外，喷施农药后土壤微生物量碳/有机碳的比值均降低，可见 Bt 杀虫剂的施用抑制了土壤微生物的生长代谢作用，从而降低了有机碳的周转速度。就松林土壤而言，施用 Bt 杀虫剂后土壤微生物量碳/有机碳的比值均升高，表明 Bt 杀虫剂的施用显著促进了土壤微生物的生长代谢作用，从而增加了有机碳的周转速度。

2.2　Bt 杀虫剂的施用对土壤细菌群落结构的影响

2.2.1　*Bt 杀虫剂施用后菜地土和松林土细菌群落的 DGGE 带谱分析*　土壤微生物总 DNA 经过 PCR 扩增后，均获得特异性较强的 16S rDNA V3 区目标条带。对 PCR 产物进行 DGGE 分析，Quantity one 软件能识别肉眼无法看清和区分的条带图谱，结果见图 1。从图 1 中可以看出，菜地土壤与松林土壤 DGGE 图谱带型有较大的差异，菜地土壤细菌群落具有更高的丰富度。统计结果表明：松林土壤及其喷施 Bt 杀虫剂处理后，4 个处理样品平均有 32 条带，且喷施农药前后样品条带数没有明显差异；菜地土壤及其喷施 Bt 杀虫剂处理后，4 个处理样品平均有 41 条带，但喷施农药后样品平均条带数(45)显著多于未喷施的空白对照(38)($P<0.05$)。可见，对菜地土壤而言，农药的喷施增加土壤中细菌的优势条带数目。

图 1　松林土和菜地土喷施 Bt 杀虫剂后细菌 16S rDNA 扩增片段的 DGGE 分析结果

Figure 1　DGGE analytical results of 16S rDNA fragment of bacterial communities from soil samples for vegetable soils and pine forest soils after spraying Bt insecticide

2.2.2　*Bt 杀虫剂施用后土壤细菌群落结构的相似性分析*　以菜地土壤 T_3 处理的 1 号样品为基准，应用 Quantity one 软件定量分析 DGGE 图谱，与基准样品相似度越高，说明细菌群落结构越相似。结果表明：菜地土壤类型的各处理样品与其有更高的相似性，表明重复性较好。菜地土各处理样品与松林土各处理样品之间的相似度最低。通过未加权算术平均对群法(UPGMA)进行聚类分析表明，同一类型土壤的样品各自被聚为一大类(图 2)，且菜地土和松林土各自 12 个样品相似值分别为 0.63 和 0.66，而 2 种土壤类型之间相似值只有 0.55。说明同一类型土壤 4 个处理 12 个样品间的相似度，高于不同类型土壤样品之间的相似度，土壤细菌的群落在同一土壤类型下比较稳定，也表明 Bt 杀虫剂的喷施对土壤细菌群落

的影响并不大。

图 2 松林土和菜地土喷施 Bt 杀虫剂后细菌 16S rDNA 扩增片段的 DGGE 条带图谱的聚类分析

Figure 2 Cluster analysis of 16S rDNA fragment of bacterial communities from soil samples for vegetable soils and pine forest soils after spraying Bt insecticide

2.2.3 Bt 杀虫剂施用后土壤细菌群落的降趋对应分析(DCA) 为更进一步考察土壤样品间细菌群落的相对相似度，本研究又进行基于 DGGE 条带位置和相对光密度值的降趋势对应分析(DCA)。如图 3，松林土壤喷施 Bt 杀虫剂后，土壤微生物群落仍然比较相似，且与菜地土各处理的 12 个样品截然分开。菜地土喷施农药的各处理样品间微生物群落相似性较高，但与未喷施农药的空白对照有一定差异，表明喷施农药对菜地土壤细菌群落造成了一定影响。此外，2 种土壤在喷施 Bt 杀虫剂后都表现出一致的规律，即不同梯度的 Bt 杀虫剂喷施并未能使其细菌群落结构形成明显差异，也进一步证实 Bt 杀虫剂并不是决定土壤细菌群落结构的关键因素。

1~12 号样品为松林土壤喷施 Bt 杀虫剂的处理，13~24 样品为菜地土壤喷施 Bt 的处理

图 3 松林土和菜地土喷施 Bt 杀虫剂后细菌 16S rDNA 扩增片段的 DGGE 条带图谱的 DCA 分析

Figure 3 DCA of 16S rDNA fragment of bacterial communities from soil samples for vegetable soils and pine forest soils after spraying Bt insecticide

2.3 Bt 杀虫剂的施用对土壤细菌群落多样性的影响

Shannon 指数反映了群落中物种的变化度或差异度，受样本总数和均匀度的影响。一般来说，物种丰富度高且分布较均匀的群落的 Shannon 指数较高[18]。对菜地土和松林土喷施不同浓度梯度的 Bt 杀虫剂后，分析土壤的 DGGE 条带并进行香农多样性指数(Shannon index)计算(表 3)，结果表明菜地土喷施 Bt 杀虫剂后多样性指数显著上升($P<0.05$)，而松林土喷施 Bt 杀虫剂后，T_1 和 T_2 的多样性指数显著下降($P<0.05$)，但 T_3 却未见明显变化。

表 3　喷施 Bt 杀虫剂后菜地土和松林土细菌群落结构多样性指数

Table 3　Diversity indices of soil bacteria community of vegetable soils and pine forest soils after spraying Bt insecticide

土壤	样品	Shannon 指数	丰富度	均匀度	土壤	样品	Shannon 指数	丰富度	均匀度
菜地土	TVK	3.62 ± 0.01 b	0.99 a	3.50 ± 0.03 c	松林土	TPK	3.41 a	0.98 ± 0.01 ab	2.92 ± 0.02 a
	TV1	3.8 a	0.99 a	4.06 ± 0.01 a		TP1	3.37 ± 0.01 b	0.97 b	2.90 ± 0.01 a
	TV2	3.79 ± 0.01 a	0.99 a	4.02 ± 0.02 a		TP2	3.35 ± 0.01 c	0.97 b	2.84 ± 0.03 a
	TV3	3.76 ± 0.02 a	0.99 a	3.91 ± 0.05 b		TP3	3.40 ± 0.01 a	0.98 a	2.91 ± 0.03 a

说明：同行不同字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。

3　结论与讨论

微生物源杀虫剂对非靶标生物并无不良影响，但对地下生物安全的评价尚无系统和全面研究的报道。本研究选取典型的农田和林地土壤，在室内进行可控制条件下的不同比例 Bt 杀虫剂喷施处理，影响因素相对单一，力求真实反映 Bt 杀虫剂喷施对土壤微生物量、微生物群落结构以及多样性的影响。土壤微生物量能灵敏地反映环境因子、土地经营模式和生态功能的变化，土壤微生物量碳质量分数也是反映土壤品质变化的理想指标。本研究结果表明，喷施 Bt 杀虫剂后菜地和林地土壤微生物量碳均较不喷施的对照有显著变化，2 种土壤类型随 Bt 杀虫剂喷施比例的增加，微生物量碳均呈现出非线性的变化规律。一个非常有趣的现象是，T_2 对 2 种土壤类型的微生物量碳均显著高于未喷施的对照且达到峰值，由此也说明：经 T_2 处理后，土壤微生物活性显著增加，表明土壤生物学活性上升。但 2 种土壤类型在喷施 Bt 杀虫剂后，微生物量碳变化的趋势并不一致，表明土壤微生物受外界因素的影响程度与本身的结构和多样性有关，因此，2 种土壤出现不同的规律也是正常的。

细菌是土壤中多样性最丰富的微生物类群，占土壤微生物总数的 70%~80%[19]，在土壤养分循环中起着至关重要的作用。应用传统平板方法不能完整地反映土壤细菌的真实情况，所分离得到的微生物只占总量的 1%~5%[20]。近 10 a 来，随着现代分子生物学的发展，不经微生物分离培养步骤，直接从土壤中抽提总 DNA，分析其中 16S rDNA 的序列多态性的研究方法，有效克服了传统方法的缺点，能较好地揭示复杂的土壤微生物多样性。本研究对运用上述方法得到的 DGGE 图谱统计分析表明，菜地土壤细菌种群具有更高的丰富度。与松林土不同的是，菜地土喷施农药后，优势条带数显著增加，从一定程度上反映出土壤中细菌优势种群数目有所增加。从 DGGE 图谱相似性分析的结果看，菜地和松林土壤 2 种类型自身各处理之间有较好的相似性，且 2 种土壤类型细菌群落结构能够截然分开，可见影响微生物群落结构相似性的最主要因素仍然是土壤类型及地表植被。另外，同一种类型土壤相同处理的样品之间微生物群落结构存在一定的生物学变异，可见，喷施不同比例 Bt 杀虫剂，并未使同一类型的土壤形成不同的微生物群落结构。由此进一步证实，土壤微生物受外界因素影响程度与本身的群落结构和多样性有关。

从多样性指数来看，喷施 Bt 杀虫剂后菜地土壤细菌多样性指数均明显上升，松林土壤除喷施最高比例 Bt 杀虫剂的处理多样性指数未见明显变化外，其余 2 个喷施比例的样品细菌多样性指数均显著下降。从 2 种土壤的理化性质来看，松林土壤酸度较高且相对贫瘠，可见土壤自身的特性影响到喷施 Bt 农药后的细菌多样性指数。已有的研究表明，施加生物农药(Bt 和苦参碱)的土壤中微生物(细菌、真菌)数量和种类丰富程度，要相对次于未施加生物农药的土壤。但其研究方法仅限于可培养菌落的形态和数量，今天看来该方法有很大的局限性。因此，本研究的结果应引起我们的高度重视，即是说 2 种类型的土壤，喷施 Bt 杀虫剂后多样性指数变化的趋势截然不同，故而不能对生物农药特别是 Bt 杀虫剂对地下微生物的影响一概而论。

参考文献：

[1]　李海燕，朱延明，马凤鸣. 植物抗虫基因工程的研究进展[J]. 东北农业大学学报，2003，**31**(4)：399 – 405.
LI Haiyan，ZHU Yanming，MA Fengming. Progress on transgenic insect resistance plants [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2003，**31**(4)：399 – 405.

[2] 白成，刘丽平，鄢小宁，等. 苏云金芽孢杆菌的概况及其研究进展[J]. 热带农业科学，2012，**32**(8)：33 – 38.
BAI Cheng，LIU Liping，YAN Xiaoning，*et al*. A profile of *Bacillus thuringiensis* and research progress on it [J]. *Chin J Trop Agric*，2012，**32**(8): 33 – 38.

[3] 徐汉虹，张志祥，程东美. 生物农药的发展优势及存在问题[J]. 世界农药，2004，**26**(2)：5 – 10.
XU Hanhong，ZHANG Zhixiang，CHENG Dongmei. Status and developing prospects of biopesticide research and application [J]. *World Pestic*，2004，**26**(2): 5 – 10.

[4] 张玲. Bt 杀虫剂研究进展[J]. 中国生物工程杂志，2005 (增刊)：91 – 94.
ZHANG Ling. The current research of Bt insecticide [J]. *Prog Biotechnol*，2005(supp): 91 – 94.

[5] 沈萍. 微生物学[M]. 北京：高等教育出版社，2000：56.

[6] 袁兵兵，张海青，陈静. 微生物农药研究进展[J]. 山东轻工业学院学报，2010，**24**(1)：45 – 49.
YUAN Bingbing，ZHANG Haiqing，CHEN Jing. Research advance on microbial pesticides [J]. *J Shandong Inst Light Ind*，2010，**24**(1): 45 – 49.

[7] 薛福连. 怎样使用生物农药 Bt[J]. 湖北植保，2005(3)：33.
XUE Fulian. How to use the biological pesticide Bt [J]. *Hubei Plant Prot*，2005(3): 33.

[8] 张玮玮，李红梅，弓爱君，等. Bt 生物农药毒力效价检测方法综述[J]. 化学与生物工程，2009，**26**(11)：12 – 15.
ZHANG Weiwei，LI Hongmei，GONG Aijun，*et al*. Review on assays of toxicity of Bt biopesticide [J]. *Chem Bioeng*，2009，**26**(11): 12 – 15.

[9] 朱南文. 乐果对土壤中酶活性和微生物数量的影响[J]. 上海环境科学，1997，**16**(4)：43 – 47.
ZHU Nanwen. Effect of dimethoate on the activities of enzymes and the amount of microorganisms in soil[J]. *Shanghai Environ Sci*，1997，**16**(4): 43 – 47.

[10] BELL T，NEWMAN J A，SILVERMAN B W，*et al*. The contribution of species richness and composition to bacterial services [J]. *Nature*，2005，**436**: 1157 – 1160.

[11] MADSEN E L. Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes [J]. *Nat Rev Microbiol*，2005，**3**: 439 – 446.

[12] 王洪兴，陈欣，唐建军. 转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响[J]. 生态学报，2004，**24**(1)：89 – 94.
WANG Hongxing，CHEN Xin，TANG Jianjun. Influence of the straw decomposition of Bt transgenic rice on soil culturable microbial flora [J]. *Acta Ecol Sin*，2004，**24**(1): 89 – 94.

[13] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京：中国农业出版社，1999：30 – 38.

[14] VANCE E D，BROOKES P C，JENKISON D C. An extraction method for measuring soil microbial biomass C [J]. *Soil Biol Biochem*，1987，**19**: 703 – 707.

[15] TER BRAAK C J F，SMILAUER P. *CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination* (Version 4. 5)[M]. New York: Microcomputer Power，2002.

[16] 张金屯. 数量生态学[M]. 北京：科学出版社，2004：90.

[17] ZELLER V, BARDGETT R D，TAPPEINER U. Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: A study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps [J]. *Soil Biol Biochem*，2001，**33**: 639 – 649.

[18] MAGURRAN A E. *Ecological Diversity and Its Measurement*[M]. Princeton: Princeton University Press，1988：192.

[19] 黄昌勇. 土壤学[M]. 北京：中国农业出版社，2000：50 – 51.

[20] AMANN R I，LUDWIG W，SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*，1995，**59**: 143 – 169.