

甲基对硫磷对红壤地区土壤微生物数量的影响

曹慧¹ 崔中利^{1,2} 周育¹ 滕齐辉¹ 王兴祥² 李顺鹏^{1*}

(1 南京农业大学农业部环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095;

2 中国科学院南京土壤研究所 南京 210008)

摘要 有机 P 农药是我国最重要一种农药类型,在农业生产上使用广泛。采用室内模拟方法,研究了甲基对硫磷对红壤地区不同类群土壤微生物数量的影响。研究结果表明,甲基对硫磷对土壤微生物数量的影响随甲基对硫磷添加的浓度、微生物类群和培养时间的不同而变化。添加 100 mg/L 和 500 mg/L 浓度甲基对硫磷能明显增加土壤细菌的数量,细菌数量的最大值出现在第 10 天左右;低浓度甲基对硫磷对土壤微生物数量影响不大。平板混合菌体培养实验证明,甲基对硫磷通过抑制或者杀灭某些种类土壤细菌,从而大大促进土壤生态系统中部分种类细菌数量的增殖。

关键词 甲基对硫磷;土壤微生物;生物多样性;红壤

中图分类号 Q93; S154; X172

有机 P 农药是世界上产量和使用量最大的一种农药类型,我国目前使用的农药70%左右是杀虫剂,而杀虫剂中70%以上为有机 P 农药^[1]。这类农药具有高效、广谱、价格低廉、抗性发展慢等特点,在农业生产上一直被广泛施用。有机 P 农药的杀虫机理主要是抑制害虫体内胆碱酯酶的活性,因而也能引起其他生物中毒^[2]。在有机 P 农药施用量较大的农田生态系统中,作物害虫被广泛杀灭,污染生物物种增多,敏感生物物种减少,土壤动物的多样性明显下降^[3~5]。

有机 P 农药对土壤微生物种群和数量也会产生一定的影响,这种影响随农药的种类、浓度以及土

壤类型而变化^[6~9],概括起来有杀灭、抑制和刺激 3 种作用^[10]。本文采用室内模拟培养方法,研究甲基对硫磷 (Methyl parathion) 对红壤地区土壤微生物种群和数量的影响,并对这一影响的可能机理进行探讨。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤采自江西省余江县刘家站,分别为水田和旱地两种土地利用类型,土壤母质为第四纪红粘土,采样深度 0~20 cm。供试土壤基本理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of soils tested

土壤类型	pH (盐提)	含水量 (g/kg)	全 N (g/kg)	全 P (g/kg)	全 K (g/kg)	有机质 (g/kg)	水溶性有机 C (g/kg)
水田红粘土	3.98	304.8	1.30	0.52	11.85	24.57	0.17
旱地红粘土	4.41	214.9	1.32	0.67	11.43	20.99	0.19

1.2 试剂与培养基

甲基对硫磷为 50 % 的乳油剂型 (江苏化工农药集团有限公司生产)。培养基包括 LB 培养基、高氏培养基和马丁氏培养基,分别用于培养细菌、真菌和放线菌。培养基的配制见文献[11]。

1.3 试验方案设计

称取 10 g 新鲜土壤样品,加入混有不同浓度甲基对硫磷的无菌水 90 ml,30 摇床振荡培养。每种土壤类型设置 4 个处理: 土壤+水; 土壤+水+10 mg/L 甲基对硫磷; 土壤+水+100 mg/L 甲基对硫

中国科学院创新项目 (KZCX3-SW-417) 和中国科学院红壤生态试验站开放基金 (2001-K-01) 资助。

* 通讯作者 (lsp@njau.edu.cn)

磷；土壤+水+500 mg/L 甲基对硫磷。定期（0，1，4，10，30d）采集土壤悬液，测定微生物数量。

用少量无菌水洗脱平板中的微生物菌体，分别收集不同处理的微生物混合菌体。混合菌体分为两

份，一份不添加甲基对硫磷作为对照，另一份添加 500 mg/L 甲基对硫磷，分别加入 LB 培养基 5 ml，混合菌体于 30℃ 摇床振荡培养 24 h，采用光电比浊法计数。试验总体设计见图 1。

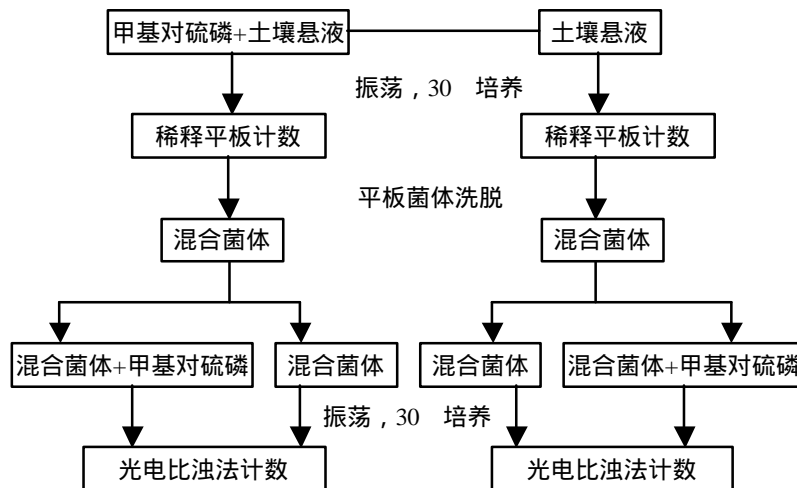


图 1 试验方案框架图

Fig. 1 Schematic map of the experimental design

1.4 微生物数量的测定^[7]

稀释涂布平板方法：对土壤悬液中的细菌、真菌和放线菌进行计数。

光电比浊法：混合菌液 10000×g 离心 5 min，弃上清中的甲基对硫磷，收集微生物菌体细胞，再用 5 ml 无菌水重悬。采用分光光度计进行光电比浊，用 600 nm 波长测定不同处理的细菌悬浮液的 OD 值。

2 结果分析

2.1 添加甲基对硫磷条件下土壤细菌的动态变化

从图 2 可以看出，添加农药甲基对硫磷后，水田红粘土和旱地红粘土两种土壤微生物数量的动态变化呈现一些共同的特点。首先，添加低浓度（10 mg/L）甲基对硫磷，土壤细菌的数量与对照处理相比没有明显的变化，并且这一数量从培养初始阶段到培养 30 天一直比较稳定；其次，添加高浓度（100 mg/L，500 mg/L）甲基对硫磷能明显增加土壤细菌数量。水田红粘土添加 100 mg/L 和 500 mg/L 甲基对硫磷农药培养 10 天后，细菌的数量与不加农药的对照相比变化明显，从 2.93×10^6 cfu/g 干土增加到 2.02×10^7 和 3.26×10^7 cfu/g 干土；旱地从 1.68×10^6 cfu/g 干土增加到 5.59×10^7 和 5.80×10^7 cfu/g 干土；并且，

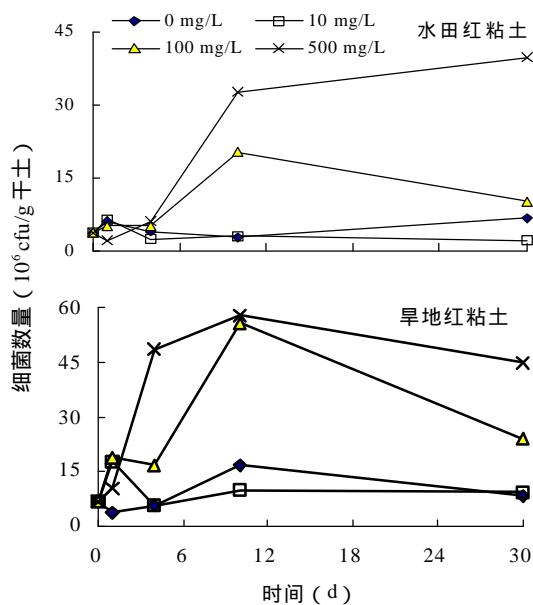


图 2 甲基对硫磷对土壤细菌数量的影响

Fig. 2 Effects of Methyl parathion on soil bacteria population

添加高浓度甲基对硫磷后细菌的数量总体上呈现由“低-高-低”的动态变化特征。

2.2 添加甲基对硫磷对土壤真菌和放线菌的影响

图 3 是两种土壤添加 100 g/L 甲基对硫磷与不添加甲基对硫磷的对照处理培养 10 天后的真菌数量。水田红粘土添加甲基对硫磷后，真菌数量略有增加，由 3.8×10^3 cfu/g 干土增加到 4.43×10^3 cfu/g 干

土；旱地红粘土相反，由 4.73×10^3 cfu/g 干土减少到 4.18×10^3 cfu/g 干土。

甲基对硫磷对土壤放线菌的影响不大。添加 100 mg/L 甲基对硫磷与对照处理培养 10 天后，两种类型土壤放线菌的数量介于 $(3.86 \sim 6.21) \times 10^4$ cfu/g 干土之间。由此看来，与土壤细菌不同，添加高浓度的甲基对硫磷并不能明显影响土壤真菌和放线菌的数量。

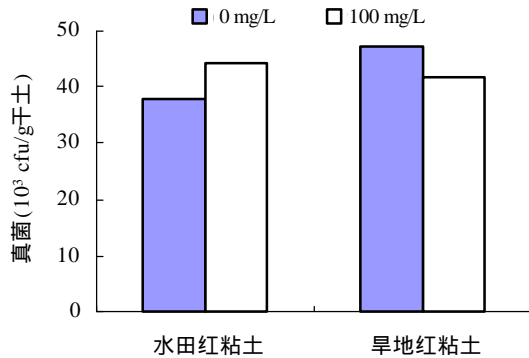


图 3 添加甲基对硫磷对土壤真菌数量的影响

Fig. 3 Effects of Methyl parathion on soil fungal population

2.3 甲基对硫磷对两种处理土壤混合菌体生长的影响

对 2.1 节中 0 mg/L 和 500 mg/L 甲基对硫磷处理的土壤悬液培养 10 天后获得的平板细菌混合菌体进行洗脱、收集，混合菌体再次设置添加 500 mg/L 和不添加甲基对硫磷两种处理，培养 24 h 后光电比浊计数，结果见表 2。

表 2 甲基对硫磷对平板混合菌体生长的影响 (OD_{600nm})

Table 2 Effects of Methyl parathion on mixed bacteria on Petri dishes (OD_{600nm})

土壤类型	混合菌体 A		混合菌体 B	
	处理 1	处理 2	处理 1	处理 2
水田红粘土	0.445	0.841	0.656	0.634
旱地红粘土	0.770	0.891	0.661	0.616

注：混合菌体 A 来自 0mg/L 甲基对硫磷对照平板，混合菌体 B 来自 500mg/L 甲基对硫磷处理平板；处理 1 不添加甲基对硫磷，处理 2 添加 500mg/L 甲基对硫磷。

添加高浓度甲基对硫磷能够增加土壤细菌的数量，这一情况的出现可能有两方面原因。第一，甲基对硫磷能够直接作为某些种类细菌的营养底物，利于某些种类土壤微生物的生长，从而使平板计数的土壤细菌数量与对照相比明显增加；第二，甲基对硫磷能够抑制或者杀灭某些种类土壤细菌，而这类细菌在土壤生态系统中具有对其他种类细菌的

“拮抗”作用。反过来说，这类细菌的减少有助于其他种类细菌的增殖。

从表 2 可以看出，无论是水田红粘土还是旱地红粘土，添加 500 mg/L 甲基对硫磷农药土壤悬液培养 10 天后而获得的混合菌体，再次加入同样浓度的甲基对硫磷，培养 24 h 菌体数量反而有所减少。这一结果说明，添加高浓度甲基对硫磷并不能直接增加土壤细菌的数量。来自对照平板上的混合菌体，再次添加 500 mg/L 甲基对硫磷农药，培养 24 h 后与对照处理相比菌体数量会有所增加，水田红粘土的菌体吸光值由 0.445 上升到 0.841，旱地也略有增加，这与土壤悬液细菌数量的变化是一致的。这意味着，在未污染土壤和混合菌体中添加高浓度甲基对硫磷增加土壤细菌的数量，可能首先抑制或者杀灭某些起“拮抗”作用细菌种类，从而有利于其他种类的细菌生长和繁殖。

3 讨论与结论

通过连续添加甲基对硫磷研究了红壤地区土壤微生物数量的变化，并对高浓度甲基对硫磷增加土壤微生物数量的机理进行了探讨。

(1) 甲基对硫磷对土壤微生物数量的影响随甲基对硫磷浓度、土壤类型、微生物类群和培养时间不同而变化。低浓度甲基对硫磷对土壤细菌影响不大，高浓度甲基对硫磷能明显增加土壤细菌的数量；甲基对硫磷对土壤真菌和放线菌数量影响不大。

(2) 高浓度甲基对硫磷并不能直接刺激土壤细菌的增殖，添加高浓度甲基对硫磷条件下土壤细菌数量增加的主要原因，是因为农药杀灭或者抑制了土壤生态系统中某些种类的微生物，而这些起“拮抗”作用微生物类群的减少，会反过来促进其他种类土壤细菌数量的增加。

(3) 土壤中微生物种类多、数量大，土壤中已培养的微生物种类不到其总数量的 1%^[12]，绝大部分为未培养的微生物类群。采用现代分子生物学技术，如变性梯度凝胶电泳 (DGGE)、16S rDNA 限制性片断长度多态性 (RFLP) 分析技术等，可进一步提高对土壤微生物多样性认识，有助于揭示污染环境土壤中微生物种类和数量变化的机理^[13]。

参考文献

- 王振中, 张友梅, 李忠武, 邢协加. 有机磷农药对土壤动物毒性的影响研究. 应用生态学报, 2002, 13 (12):

- 1663 ~ 1666
- 2 马瑾, 潘根兴, 万洪富, 祝坚. 有机磷农药的残留、毒性及前景展望. 生态环境, 2003, 12 (2): 213 ~ 215
- 3 Senapati BK. Ecotoxicological effects of malathion on earthworm. *Soil Biol. Biochem.*, 1992, 24 (12): 1719 ~ 1722
- 4 Fred Heimbach. Field tests on the side effects of pesticides on earthworms: Influence of plot size and cultivation practices. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 29: 671 ~ 676
- 5 Strauss DL, Chambers JE. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterase of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion, and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). *Aquat. Toxicol.*, 1995, 33, 311 ~ 324
- 6 陈中云, 闵航, 张夫道, 赵秉强. 农药污染对水稻田土壤硫酸盐还原菌种群数量及其活性影响的研究. 土壤学报, 2004, 41 (1): 97 ~ 102
- 7 姚斌, 徐建民, 张超兰. 甲磺隆对土壤微生物多样性的影响. 土壤学报, 2004, 41 (2): 320 ~ 322
- 8 李忠佩, 焦坤, 林心雄, 程励励. 施肥条件下瘠薄红壤的生物化学性状变化. 土壤, 2003, 35 (4): 304 ~ 310
- 9 Liao Min, Xie Xiaomei, Subhani A. Combined effect of nutrient and pest management on soil ecological quality in Hybrid Rice Double-Cropping System. *Pedosphere*, 2003, 13(2): 129 ~ 138
- 10 李顺鹏主编. 环境生物学. 北京: 中国农业出版社, 2002, 154 ~ 156
- 11 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999, 50 ~ 96
- 12 Vigdis T, Lisc O. Microbiol diversity and function in soil: from gene to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5: 240 ~ 245
- 13 马万里. 土壤微生物多样性研究的新方法. 土壤学报, 2004, 41 (1): 103 ~ 107

EFFECTS OF METHYL PARATHION ON SOIL MICROBIAL POPULATIONS IN RED SOIL REGION

CAO Hui¹ CUI Zhong-li^{1,2} ZHOU Yu¹ TENG Qi-hui¹ WANG Xing-xiang² LI Shun-peng¹

(1 Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008)

Abstract Organic phosphorus pesticide is the most important type of pesticides in China, and widely used in agriculture. In this paper, effects and mechanism of Methyl parathion on soil microbial populations in red soil region are studied. The results show that the effects of Methyl parathion on soil microbial populations changed with Methyl parathion concentration, microbial distribution and cultivating time. The total counts of soil bacteria were greatly increased as a result of addition of 100 mg/L and 500 mg/L Methyl parathion to soil suspension, and the maximum counts of bacteria were observed on day 10. While 10 mg/L Methyl parathion was added to soil suspension, the soil microbial populations changed slightly. The mixed bacteria on Petri dishes were washed in to tubes, then 0 mg/L and 500 mg/L Methyl parathion was added respectively, and the influence of Methyl parathion on mixed bacteria growth was investigated. This experiment revealed that cell concentration of mixed bacteria was affected by Methyl parathion, and the origins of mixed bacteria selected by Methyl parathion determined the cell concentrations. It is suggested that Methyl parathion increases bacteria populations in the soil ecosystem by way of restraining or killing some strains of soil bacteria.

Key words Methyl parathion, Soil microbe, Bio-diversity, Red soil