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*

陈中云　闵　航-
(浙江大学生命科学学院, 杭州　310029)
张夫道　赵秉强
(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京　100081)

摘　要　在实验室条件下, 施用杀虫剂(呋喃丹)、杀菌剂(多菌灵)和除草剂(丁草胺)后, 对黄松稻田土壤、紫色稻田土壤和红壤稻田土的硫酸盐还原细菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)种群数量和硫酸盐还原活性的影响。结果表明, 紫色稻田土壤、黄松稻田土壤和红壤稻田土的 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性的范围分别为(66.83~127.81) × 10^4 cfu g^{-1}干土、(45.87~105.07) × 10^4 cfu g^{-1}干土和(3.81~61.62) × 10^4 cfu g^{-1}干土和 S^{-2}(7.14~11.57) μg $g^{-1}d^{-1}$干土、S^{-2}(6.84~9.07) μg $g^{-1}d^{-1}$干土、S^{-2}(1.91~6.67) μg $g^{-1}d^{-1}$干土, 且稻田土 SRB 种群数量和土壤硫酸盐还原活性之间具有正相关性。每 kg 干土中加入 1 mg 的丁草胺或呋喃丹, 能促进 SRB 的生长及其硫酸盐还原活性。1 kg 干土中加入 5 mg 的多菌灵、50 mg 的丁草胺或呋喃丹, 对 SRB 的生长和硫酸盐还原活性有明显的抑制作用。施用丁草胺和呋喃丹 7 d 时, 多菌灵 14 d 时, 对水稻田土壤的 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性的抑制影响最大, 然后逐渐减轻, 最后显示出某种程度的促进作用。

关键词　硫酸盐还原细菌; 硫酸盐还原活性; 农药污染; 水稻田土壤
中图分类号　X172　　文献标识码　A

施用农药是保持农业持续高产的重要手段, 我国的农药使用范围和使用量正逐年增加。当农药使用量过大, 超过了环境对农药的自然消解能力时, 农药的有害毒素就在土壤中积累, 最后通过食物链在人体中富积, 导致人类各种疾病的发生。农药残留量的增加也使病虫害的抗性迅速增强, 迫使农药的使用量愈来愈大, 环境的污染也愈来愈严重, 从而改变水稻田土壤中的生物平衡, 影响农药在水稻田土壤中的生物转化。

水稻生长需要充足硫元素, 每年约从土壤中获得的 S 为 8~17 kg hm^{-2}[1]。硫酸盐还原菌(Sulfate reducing bacteria, SRB)既是水稻田土壤中能降解农药的主要微生物菌群[2~4], 又是影响水稻田土壤硫循环的主要因素[5]。硫酸盐还原活性直接影响土壤硫元素的损失、转化, 水稻根系的伤害和环境的污染。本文通过在紫色稻田土壤、红壤稻田土和黄松稻田土壤中加入不同浓度的呋喃丹、多菌灵和丁草胺, 研究农药污染的水稻田土壤对 SRB 种群数量及其活性的影响, 以揭示农药污染对水稻田土壤 SRB 种群及其硫酸盐还原活性的生物效应。

1　材料和方法

1.1　土样采集和处理

土样采自: ①发育于湖积相过度地带浅海沉积物母质的浙江省农业科学院国家黄松土肥力与肥料效益监测基地的黄松稻田土壤(杭州), ②发育于侏罗纪中性紫色砂页岩母质的西南农业大学国家紫色土肥力与肥料效益监测基地的紫色稻田土壤(重庆北碚沙庙组), ③发育于冲积土母质的江西省进贤县文港乡的红壤稻田土等 0~20 cm 的表层耕作土。有关理化性状见表 1。土样去除明显的碎石、有机残留物后, 称取若干土(相当于 1 000 g 干土)放置于 1 300 ml 洁净塑料盒内, 然后加水至盒口, 在 28℃培养。

* 国家自然科学基金项目(30170030)和国家科技部社会公益研究专项资金项目中国土壤生物演化及安全预警系统研究(177-2-3)资助
- 通讯作者: Tel. 0571-86971287; E-mail: minhang@zju.edu.cn
作者简介: 陈中云(1963~), 男, 讲师, 主要从事微生物教学和科研工作
收稿日期: 2002-09-15; 收到修改稿日期: 2003-01-18

表 1 黄松稻田土壤、红壤稻田土、紫色稻田土壤的主要理化性状

Table 1 Main physicochemical properties of the soil samples

主要理化性状 The main physico-chemical properties		土壤名称 Name of soil		
		黄松稻田土 Huangsong paddy soil	红壤稻田土 Red earth paddy soil	紫色稻田土 Purple paddy soil
机械组成	2~ 0.01(mm)	54.97	60.18	40.80
Soil particle	0.01~ 0.001(mm)	23.54	25.76	31.72
size(%)	< 0.001(mm)	21.49	14.06	27.48
pH		7.1	5.9	7.7
容重 Density ($g\ cm^{-3}$)		1.17	1.08	1.36
孔隙度 Extent of porosity (%)		55.7	59.1	48.7
有机质 Organic matter ($g\ kg^{-1}$)		29.8	25.4	30.6
全氮 Total N ($g\ kg^{-1}$)		1.81	1.61	1.13
全磷 Total P ($g\ kg^{-1}$)		2.69	1.05	0.58
全钾 Total K ($g\ kg^{-1}$)		16.7	47.55	20.4
有效氮 Available N($g\ kg^{-1}$)		136	126	105
有效磷 Available P($g\ kg^{-1}$)		41.36	5.89	4.0
有效钾 Available K($g\ kg^{-1}$)		124	525	99
CEC ($cmol\ kg^{-1}$)		13.70	11.09	20.30

1.2 土样的农药处理

每种土样取若干盒, 分别加入呋喃丹、多菌灵和丁草胺, 不同农药的使用量见表 2, 加入农药后土样充分搅拌混匀, 在 28℃培养。分别在培养 0、7、14、21 和 28 d 时, 取土样测稻田土 SRB 的种群数量和硫酸盐还原活性。在整个培养时期内, 随时补水, 使水位始终保持相同水平。

表 2 农药处理量和农药使用国家标准值

Table 2 Application rates of pesticide and pesticides national standard for pesticide application

农药名称 Name of pesticide	国家标准的农药的最高用药量[6] Permissible application rate under the national standard ($mg\ kg^{-1}$)	本研究的农药使用浓度 Concentration of the pesticides used in the study ($mg\ kg^{-1}$)			
		1	2	3	4
呋喃丹 Carbofuran	0.50	0	1	10	50
多菌灵 Carbendazim	0.167	0	0.5	5	50
丁草胺 Butachlor	0.56	0	1	10	50

1.3 SRB 种群数量计数培养基的组成和配制

组成: Na_2SO_4 0.5 g L^{-1}, NH_4Cl 1 g L^{-1}, $CaCl_2$ 0.1 g L^{-1}, K_2HPO_4 0.5 g L^{-1}, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g L^{-1}, 半胱氨酸 0.5 g L^{-1}, 刃天青 0.002 g L^{-1}, 琼脂 20 g L^{-1}。另有 60%乳酸钠 6 ml, 矿质元素[7] 10 ml, 蒸馏水 984 ml, pH 7.0~ 7.3。

按 Hungate 厌氧操作技术配制 SRB 种群数量计数厌氧培养基。

1.4 培养和计数

每种土样按处理要求的时间, 分别取 5 g 稻田土, 加入装有 45 ml 无氧无菌生理盐水的 100 ml 血清瓶中振荡 10 min, 以 10 倍系列稀释法将土样悬液稀释。采用滚管法测定稻田土壤的 SRB 种群数量, 分别取 0.5 ml 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}和 10^{-6}的土样稀释液, 接种于 3 支装有 4.5 ml 已融化至 45~50℃的 SRB 固体培养基中, 并已加新配制的 10% 无菌无氧 $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ 4 滴, 立即滚管。在 30℃恒

温培养, 2 至 3 天后可见到厌氧试管内壁上出现黑色菌落。直至黑色菌落数不再增加后, 计数厌氧试管内黑色菌落的数量(黑色菌落数在 10~ 100 以内的厌氧试管作为计数试管)。

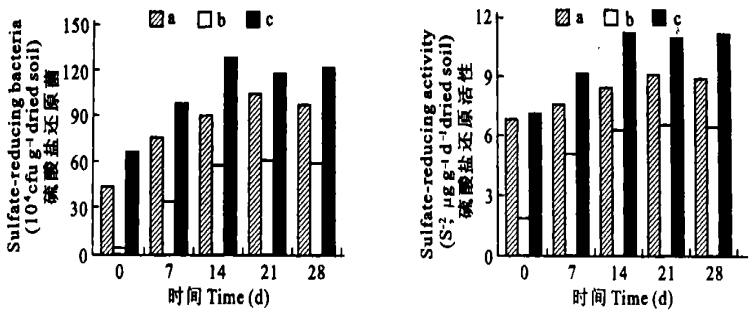
1.5　水稻田土壤硫酸盐还原活性的测定和计算

水稻田土壤硫酸盐还原活性的测定和计算见文献[8]。

2　结　果

2.1　土壤类型对水稻田土壤 **SRB** 的种群数量及其硫酸盐还原活性的影响

图 1 表明土壤类型对水稻田土壤的 SRB 种群数量及其硫酸盐还原活性影响。浸水培养 0 时, SRB 种群数量最小, 硫酸盐还原活性最低, 浸水培养 14 d 时, SRB 种群数量和硫酸盐还原活性分别达最大和最高值, 继续培养 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性都略有下降。紫色稻田土壤有机质含量最高, 粘性好和持水性强, 通气性差, SRB 种群数量最大, 硫酸盐还原活性最高, 其范围分别为(66.83~ 127.81) × 10^4 cfu g^{-1}干土和 S^{-2}(7.14~ 11.57) μg $g^{-1}d^{-1}$干土, 其次是黄松稻田土壤, 分别为(45.87~ 105.07) × 10^4 cfu g^{-1}干土和 S^{-2}(6.84~ 9.07) μg $g^{-1}d^{-1}$干土, 而红壤稻田土有机质含量最低, 持水性较差, 通气性较好, SRB 种群数量最小, 硫酸盐还原活性最低, 仅分别为(3.81~ 61.62) × 10^4 cfu g^{-1}干土和 S^{-2}(1.91~ 6.67) μg $g^{-1}d^{-1}$干土。



a. 黄松稻田土壤 Huangsong paddy soil; b. 红壤稻田土 Red paddy soil; c. 紫色稻田土壤 Purple paddy soil

图 1　土壤类型对水稻田土壤 SRB 的种群数量及硫酸盐还原活性的影响

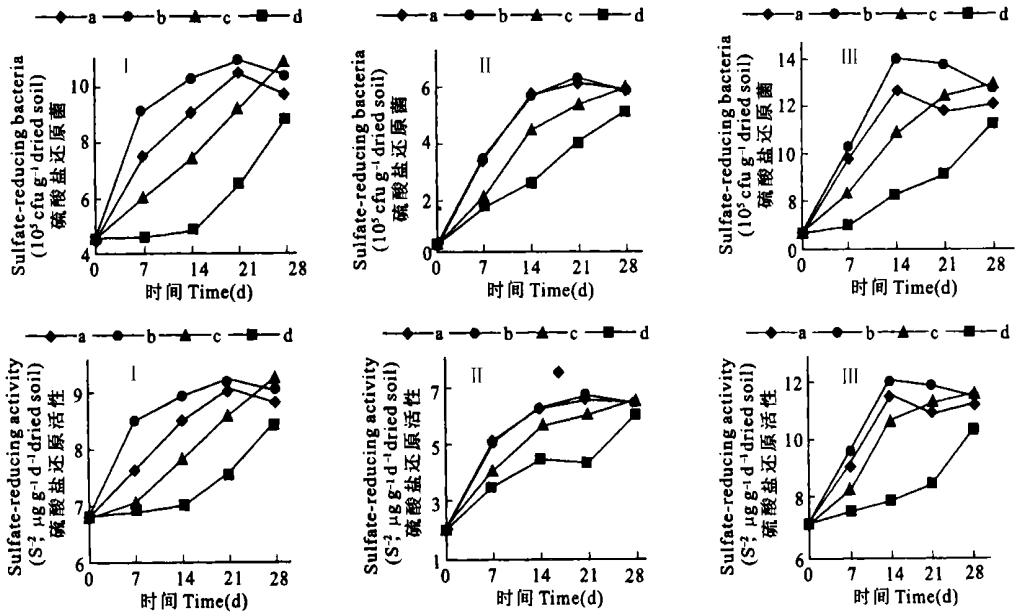
Fig 1　Effect of soil type on population and sulfate-reducing activity of SRB in paddy soils

2.2　呋喃丹污染对水稻田土壤 **SRB** 种群数量及硫酸盐还原活性的影响

图 2 显示在每 kg 干土中加 1 mg 呋喃丹时, 能促进黄松稻田土壤和紫色稻田土壤的 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性, 但对红壤稻田土的 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性几乎没有影响。呋喃丹加入量达 10 mg kg^{-1}干土时, 呋喃丹对 3 种稻田土壤的 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性都具有明显的抑制作用。在 7 d 时, 黄松稻田土壤、红壤稻田土和紫色稻田土壤的 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性分别下降 18%、39%、14% 和 8%、20%、9%。但随着时间延续, 呋喃丹对土壤 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性的抑制作用逐渐减弱, 至 21 d 时, 紫色稻田土壤的SRB 种群数量和硫酸盐还原活性不仅没有受到抑制, 反而有所增加, 分别为对照的 106% 和 104%。至 28 d 时, 黄松稻田土壤和红壤稻田土的 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性分别为对照的 112%、102% 和 105%、102%。呋喃丹的加入量继续增加至 50 mg kg^{-1}干土时, 对稻田土壤的 SRB 种群数量及硫酸盐还原活性抑制更强, 但影响趋势与加入量为 10 mg kg^{-1}干土的相同, 随着时间延续, 抑制强度也越来越弱。

2.3　多菌灵污染对水稻田土壤 **SRB** 种群数量及硫酸盐还原活性的影响

图 3 显示每 kg 干土中加入 0.5 mg 的多菌灵后, 3 种水稻田土壤 SRB 的种群数量和硫酸盐还原活性都受到抑制, 至 14 d 时, 多菌灵对黄松稻田土壤、红壤稻田土和紫色稻田土壤的 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性的抑制达到最大值, 分别达 12%、14%、17% 和 4%、5%、15%。继续培养时, 对土壤 SRB 种群和硫酸盐还原活性的抑制影响逐渐减弱, 至 28 d 时, 土壤 SRB 种群和硫酸盐还原活性恢复甚至超过对照水平。多菌灵的加入量继续增加, 多菌灵对水稻田土壤 SRB 种群和硫酸盐还原活性的抑制作用加强。1 kg 干土中加入 5 mg 时, 多菌灵对黄松稻田土壤、红壤稻田土和紫色稻田土壤的 SRB 种群数量和硫酸盐还原活性的抑制的最大值, 分别是 32%、50%、30% 和 13%、24%、27%。当每 kg 干土加入 50 mg 时,



Ⅰ. 黄松稻田土壤 Huangsong paddy soil; Ⅱ. 红壤稻田土 Red paddy soil; Ⅲ. 紫色稻田土壤 Purple paddy soil

a. 0 mg kg^{-1} dried soil; b. 1 mg kg^{-1} dried soil; c. 10 mg kg^{-1} dried soil; d. 50 mg kg^{-1} dried soils

图2 呋喃丹污染对水稻田土壤SRB的种群数量及硫酸盐还原活性的影响

Fig. 2 Effect of carbofuran on population and sulfate-reducing activity of SRB in paddy soils

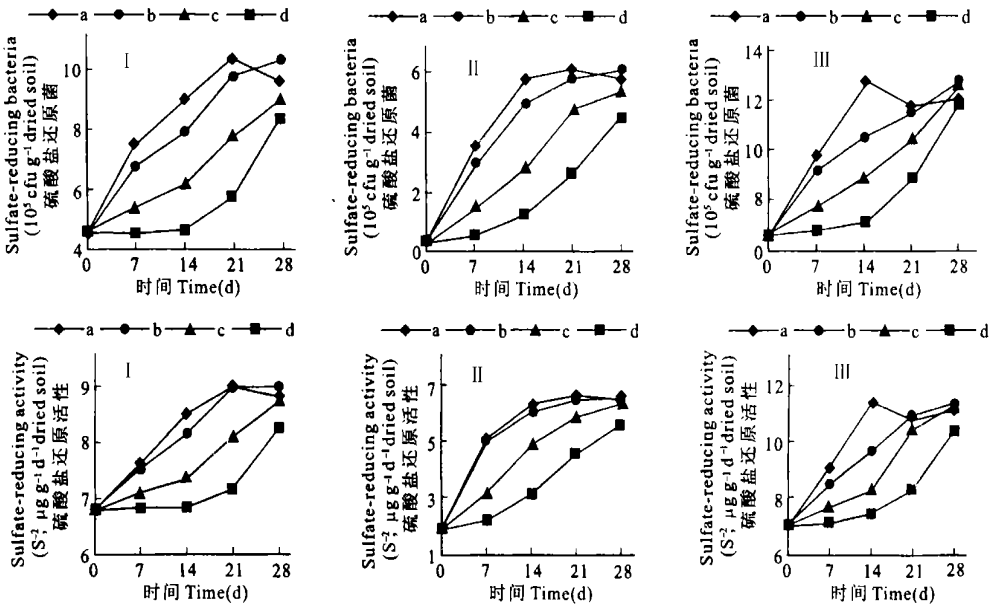
多菌灵对黄松稻田土壤、红壤稻田土和紫色稻田土壤的SRB种群数量和硫酸盐还原活性的抑制的最大值,分别是49%、77%、43%和19%、51%、34%。但至28 d时,抑制作用又减弱,这种变化趋势与加入0.5 mg kg^{-1}干土的基本相同,但抑制作用的时间和强度,随着加入量的增加而延长和加强。

2.4 丁草胺污染对水稻田土壤SRB种群数量及硫酸盐还原活性的影响

图4显示每kg干土中加入1 mg丁草胺,能促进水稻田土壤SRB生长和硫酸盐还原活性。当丁草胺加入量达10 mg kg^{-1}干土时,在7 d时,3种水稻田土壤SRB种群数量和硫酸盐还原活性都有不同程度的抑制,但随着培养时间的延长,抑制作用逐渐减弱,至21 d时,土壤的SRB种群数量和硫酸盐还原活性与对照相比,不仅没有下降,反而略有上升。1 kg干土中加入50 mg丁草胺后,3种水稻田土壤的SRB种群数量和硫酸盐还原活性都有明显的下降,以红壤稻田土的抑制作用最大,SRB的种群数量和硫酸盐还原活性仅为对照的50%和68%,其次是紫色稻田土壤为对照的70%和70%,最小为黄松稻田土壤为对照的80%和90%。土壤有机质含量可影响土壤微生物种群的数量,有机质含量高,土壤微生物的种群数量相对较高,为硫酸盐还原菌提供的相对丰富营养物质,而红壤有机质含量相对较低,受到的影响也最大。

3 讨 论

水稻田土壤的含水量是影响水稻田土壤SRB种群数量和硫酸盐还原活性的重要因素之一[8],持水性好的水稻田土壤的SRB种群数量和硫酸盐还原活性比持水性差的水稻田土壤高。水稻田土壤的有机质含量直接影响土壤中能利用复杂有机质为营养物质的微生物种群数量及其代谢活性,也间接地影响水稻田土壤的SRB种群数量和硫酸盐还原活性。水稻田土壤的黏性影响水稻田土壤对农药的吸附,在加入相同浓度农药时,黏性大的紫色稻田土壤比黏性弱的红壤稻田土,在土壤颗粒周围形成相对较高的有效浓度,因而受到的影响也相对较强。杀虫剂(呋喃丹)、杀菌剂(多菌灵)和除草剂(丁草胺)对3种水稻田土壤SRB种群数量和硫酸盐还原活性影响的差异,也与土壤的pH[9]、有机质含量、土壤的黏性和其他微生物种群数量有关。

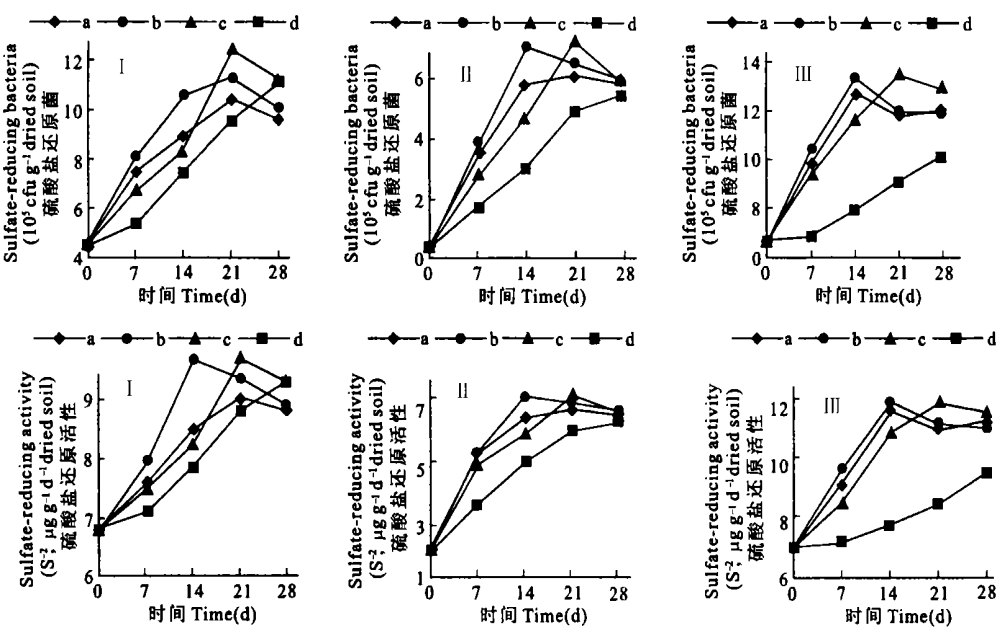


Ⅰ. 黄松稻田土壤 Huangsong paddy soil; Ⅱ. 红壤稻田土 Red paddy soil; Ⅲ. 紫色稻田土壤 Purple paddy soil

a. 0 mg kg^{-1} dried soil; b. 1 mg kg^{-1} dried soil; c. 10 mg kg^{-1} dried soil; d. 50 mg kg^{-1} dried soils

图 3　多菌灵污染对水稻田土壤 SRB 的种群数量及硫酸盐还原活性的影响

Fig 3　Effect of carbendazim on population and sulfate-reducing activity of SRB in paddy soils



Ⅰ. 黄松稻田土壤 Huangsong paddy soil; Ⅱ. 红壤稻田土 Red paddy soil; Ⅲ. 紫色稻田土壤 Purple paddy soil

a. 0 mg kg^{-1} dried soil; b. 1 mg kg^{-1} dried soil; c. 10 mg kg^{-1} dried soil; d. 50 mg kg^{-1} dried soils

图 4　丁草胺污染对水稻田土壤 SRB 的种群数量及硫酸盐还原活性的影响

Fig 4　Effect of butachlor on population and sulfate-reducing activity of SRB in paddy soils

致 谢 供试的浙江黄松水稻土壤、江西红壤水稻土、重庆紫色水稻土壤及其基础理化性状资料分别由浙江省农业科学院王胜佳副研究员、江西红壤站赖涛副研究员和西南农业大学石孝均副教授提供;供试农药由农业部环境保护科研监测所(天津)曹仁林研究员提供,在此一并致以诚挚的谢意。

参考文献

[1] Freney J R, Jacq V A, Baldensperger J F. The significance of biological sulfate cycle in rice production. *In*: Dommergues Y D, Diem H G. eds. Microbiology of Tropical soils and Plant Productivity. Martinus Nijhoff/W Junk Pub. The Hague 1982. 271~317

[2] Min H, Ye Y F, Chen Z Y, *et al*. Effect of Butachlor microbial population and enzyme activities in paddy soil. J. Environ. Sci. Health, 2001, 36(5): 581~595.

[3] Rath A K, Ramakrishnan, Rath A K, *et al*. Effect of pesticide on microbial biomass of flooded soil. Chemosphere, 1998, 37(4): 661~671

[4] Gevao B, Semple K T, Jones K C. Bound pesticide residues in soil: a review. Environmental Pollution, 2000, 108: 3~14

[5] Sylvie E, Bernard O, Jean L M. Evidence and quantification of thiosulfate reducers unable to reducer sulfate in ricefield soils. Eur. J. Soil Biol., 1998, 34(2): 69~74

[6] 国家技术监督局标准化司. 国家标准. 北京: 中国标准出版社, 1992. GB8321-1~87. The Department of National Standard. The National Standard of China (In Chinese). Beijing: The Standard Press of China, 1992. GB8321-1~87

[7] 钱泽澍, 闵航. 沼气发酵微生物学. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1986. Qian Z S, Min H. Microbiology for Methane Fermentation (In Chinese). Hangzhou: Zhejiang Sciences and Technique Press, 1986

[8] 陈中云, 闵航, 等. 水稻田土的硫酸盐还原活性测定方法的研究. 土壤通报, 2003, 34(5): 455~458, Chen Z Y, Min H, *et al*. Studies on measuration for sulfate reduction activity in paddy soil (In Chinese). China Journal of Soil Science, 2003, 34(5): 455~458

[9] Panades R, Ibarz A, Esplugas S. Photodecomposition of carbendazim in aqueous solutions. Wat. Res., 2000, 34(11): 2951~2954

EFFECTS OF PESTICIDE-CONTAMINATION ON POPULATION AND ACTIVITY OF SULFATE-REDUCING BACTERIA IN PADDY RICE SOILS

Chen Zhongyun Min Hang

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

Zhang Fudao Zhao Bingqiang

(Institute of Soil and fertilizer, Chinese Agricultural Academy, Beijing 100081, China)

Abstract Effects of pesticide-contamination on population and activity of sulfate-reducing bacteria(SRB) were investigated in three paddy soils, Huangsong paddy soil developed from shallow-marine deposit of intermediate lake deposit, Red paddy soil developed from alluvial deposit and Purple paddy soil developed from parent material of neutral purple sandstone and shale, 4 weeks after the soils were applied with insecticide (carbofuran), fungicide (carbendazim) and herbicide (butachlor) at different concentrations. The results showed that population and the sulfate-reducing activity of SRB in Purple paddy soil, Huangsong paddy soil and Red paddy soil ranged $(66.83\sim127.81)\times10^4$, $(45.87\sim105.07)\times10^4$, $(3.81\sim61.62)\times10^4$ cells per gram dried soil, respectively, and S^{-2} (7.14~11.57), (6.84~9.07), (1.91~6.67) $\mu g\ d^{-1}g^{-1}$ dried soil, respectively, and that the sulfate-reducing activity was positive relativity to the population of SRB in paddy soil. The population of SRB and the sulfate-reducing activity were increased by addition of carbofuran (1 mg kg^{-1} dried soil) or butachlor (1 mg kg^{-1} dried soil) in paddy soils, but significantly inhibited by addition of butachlor (50 mg kg^{-1} dried soil), carbofuran (5 mg kg^{-1} dried soil) and carbendazim (50 mg kg^{-1} dried soil) in paddy soil till 7 d, 14 d and 7 d, respectively. Then the inhibition effects of the contaminants were gradually attenuating. Eventually pesticide or metabolism of pesticide became contributive to the population of SRB and their sulfate-reducing activity.

Key words Sulfate-reducing bacteria; Sulfate-reducing activity; Pesticide-contamination; Paddy soil