

乙草胺与硫酸铜对黑土微生物的复合生态影响

张倩茹^{1,2}, 周启星^{1,3*}, 张惠文¹

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘要: 为了探究 2 种不同类型农药联合施用对土壤微生物的复合生态影响, 以除草剂乙草胺和杀菌剂硫酸铜为例, 采用传统毒理学方法和 BIOLOG 法对其进行评价. 结果表明, 乙草胺和硫酸铜的联合施用对细菌、放线菌和真菌活菌量以及土壤脱氢酶活性基本呈现急性抑制效应, 但随时间延长其作用逐渐减弱甚至发生逆转, 而对土壤底物诱导呼吸强度表现为明显促进. 利用 Shannon、Simpson 和 McIntosh 多样性指数模型和主成分分析法对 BIOLOG 数据进行分析, 表明 2 种农药的联合施用显著破坏了黑土微生物群落物种多样性的丰富度和均一性, 主成分分析法也表明土壤微生物群落碳源利用多样性发生了改变.

关键词: 乙草胺; 硫酸铜; 黑土; 微生物; 复合生态效应

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)04-0826-06

Combined Ecological Effects of Acetochlor and Copper Sulphate on Microorganisms in Phaeozem

ZHANG Qian-ru^{1, 2}, ZHOU Qi-xing^{1, 3}, ZHANG Hui-wen¹

(1. Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: In order to explore the combined ecological effects of acetochlor and copper sulphate on soil microorganisms, the traditional toxicological methods and BIOLOG were employed. The results indicate that the combined application of acetochlor and copper sulphate has acute inhibitory effects on the amount of culture-dependent viable bacteria, actinomycetes and fungi as well as soil dehydrogenase activity. These effects are gradually weakened and even reverse with the increase of exposure time. The change of the substrate-induced respiration (SIR) is significantly increased under the combined stress. The data of BIOLOG are subjected to the principle component analysis (PCA) and three index models such as Shannon, Simpson and McIntosh indexes. The results also indicate that the combined application of acetochlor and copper sulphate can destroy the richness and evenness of microbial community diversity in phaeozem. The changes of carbon utilization diversity of phaeozem microbial community are also showed by the pattern of PCA.

Key words: acetochlor; copper sulphate; phaeozem; microorganism; combined ecological effect

20 世纪 70 年代以来, 随着环境中污染物的种类和数量不断增加, 污染环境更多场合存在着 1 种以上的污染物^[1,2]. 乙草胺作为 1 种旱田除草剂已在东北黑土区广为使用, 是该地区使用最多的 1 种除草剂. 目前我国乙草胺的常规用量为 $1.13 \text{ L} \cdot \text{hm}^{-2}$ (在北方旱区则为 $1.5 \text{ L} \cdot \text{hm}^{-2}$), 土壤中乙草胺的长期积累量已经达 $38 \sim 256 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[3]. 无机杀菌剂的使用是某些重金属进入农田生态系统的 1 种途径, 其过量使用所产生的生物学毒性已被广泛认同^[4]. 以硫酸铜为主要成分的无机杀菌剂是我国第 1 个合成的化学农药, 其使用长达数十年之久, 特别是在东北黑土区铜已成为重金属污染的典型代表^[5]. 除草剂作为重要且常用的农用化学品, 其本身或降解产物有可能危害非靶标生物, 与某些重金属联合使用可能存在较大的生态风险, 如使用不当将会给土壤环境质量以及农产品安全带来不利影响^[3].

近几年来, 研究人员更多的是把研究的重点集中在单一有机或无机农用化学品对土壤生态系统组分的影响^[7-9], 而有关多种不同类型农用化学品联合使用对土壤生态系统组分所带来的生态学效应研究才刚刚开始^[10,11], 急切需要以不同角度阐述多种农用化学品对土壤生态系统的影响. 土壤微生物是维持土壤生物活性的重要组分, 其活性变化和群落结构改变能敏感地反映出土壤质量和健康状况, 是土壤环境质量评价不可缺少的重要生物学指标^[6]. 污染物对土壤微生物的生态影响主要表现在微生物

收稿日期: 2006-05-25; 修订日期: 2006-07-12

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(20225722); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418503); 中俄自然资源与生态环境联合研究中心及中俄合作研究(NSFC-RFBR)项目(20611120015)

作者简介: 张倩茹(1977~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为污染生态学与分子生态毒理学, E-mail: zqrsdb@yahoo.com.cn
* 通讯联系人, E-mail: zhouqixing2003@yahoo.com

数量、土壤酶活性、呼吸强度、能源代谢和群落异化等几个方面.本实验以乙草胺和硫酸铜为例,从微生物数量、土壤酶活性、呼吸强度、能源代谢等几方面对除草剂乙草胺和无机杀菌剂硫酸铜联合施用所产生的生态学效应进行研究.

1 材料与方法

1.1 供试土壤

Table 1 Physical and chemical characteristics of soil used in the study									
土壤类型	pH	有机质 /g·kg ⁻¹	全 N /g·kg ⁻¹	全 P /g·kg ⁻¹	全 K /g·kg ⁻¹	机械组成/%			最大田间持水量 /%
						砂粒	粉粒	粘粒	
清洁	6.6	37.8	2.56	0.61	26.0	33.8	39.6	26.6	38.5
污染	6.5	39.8	2.68	0.71	23.4	34.2	36.8	29.0	40.1

供试除草剂乙草胺,90%乳油剂,由美国孟山都公司提供.供试杀菌剂硫酸铜(CuSO₄)纯品,分析纯,北京化学试剂一厂.取上述风干清洁黑土,采用250 mg·kg⁻¹的乙草胺水溶液和300 mg·kg⁻¹的CuSO₄水溶液分别处理土壤,再将2种化学品以上述浓度同时处理土壤,保持含水量达土壤最大田间持水量的50%左右.置于20℃恒温培养箱中,避光培养3、6、9、12 d后进行微生物数量、脱氢酶活性、土壤呼吸强度和土壤中有效铜含量的测定,再对处理结束后的土壤进行 BIOLOG 实验,每一处理重复3次.

1.3 土壤微生物数量测定

采用微生物系列稀释平板计数法对各土壤样品中细菌、放线菌和真菌活菌数量进行测定,每一样品选定3个浓度梯度,每个浓度梯度3个重复,分别使用牛肉膏蛋白胨培养基、高氏一号合成培养基和马丁培养基.以土壤微生物生长数量指标(CFU)的自然对数和微生物数量变化百分率对各土壤样品进行评价.

1.4 土壤中有效铜含量

土壤中有效 Cu 含量采用 0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液提取(液:土=5:1),待测液用原子吸收分光光度法测定^[12].

1.5 土壤脱氢酶(DHA)活性测定

参照 Bert 等的方法^[7]测定,以单位重量干土在单位时间内产生的三苯基甲腈(TPF)量计算土壤脱氢酶活性,以脱氢酶活性的自然对数对各土壤样品进行评价.

1.6 土壤底物诱导呼吸强度(SIR)测定

取15 g土壤(干重),其中加入0.1%葡萄糖,平铺于250 mL广口瓶底部,调节含水量至田间持水量的50%左右.将一只25 mL小烧杯放在培养瓶内的

土壤采自中国科学院黑龙江海伦农业生态实验站(黑龙江省海伦县境内),采样地点定位47°27'N、126°55'E,耕作方式为小麦-玉米-大豆轮作.以叉花点式采样法,从5个不同位点分别采集8a以上未施过农药的对照田土壤及乙草胺、含Cu杀菌剂等农药施用多年的试验田土壤.采样深度0~20 cm,土壤基本理化性质见表1.

1.2 微宇宙试验

土壤上,吸取0.1 mol·L⁻¹ NaOH 标准溶液10 mL于小烧杯中.将瓶盖涂上凡士林油,以免漏气,于28℃培养.测定时,取出小烧杯,用煮沸法去除CO₂的蒸馏水将NaOH洗入50 mL三角瓶中,加入2 mL的1 mol·L⁻¹ BaCl₂溶液和2滴酚酞指示剂,用0.05 mol·L⁻¹标准盐酸溶液滴定至红色消失.另设不加土壤作空白对照.以CO₂量的自然对数对土壤样品进行评价.

1.7 土壤微生物碳源利用多样性测定

采用 BIOLOG^{CN}测试板(BIOLOG Inc., Hayward, CA)测定.称取10 g土壤样品加入到90 mL生理盐水中,1 600 r·min⁻¹振荡20 min,静置后系列稀释,取10⁻³梯度液150 μL于反应板中,每个土壤样品重复3次,将反应板与28℃恒温培养箱中,避光培养120 h,期间每隔24 h在Biolog 读数器(Hayward, USA)于590 nm 读数,记录吸光值.

1.8 统计分析

实验数据用 Origin 7.0 处理,微生物碳源利用多样性分析采用 SAS 8.0 实现.

2 结果与讨论

2.1 乙草胺和硫酸铜联合作用对黑土微生物数量的影响

利用传统微生物培养技术对微生物活菌数量进行考察.由图1可见,乙草胺与硫酸铜的联合施用 in 培养的前中期(3、6、9 d)对细菌的抑制作用明显强于各农药的单独施用,抑制率分别为93.15%、93.74%和34.65%;而在12 d时,两者的联合作用表现出显著的促进作用,抑制率为-69.2%,说明细菌区系中某些菌在大量生长,而各因子的单独作用仍

表现为抑制作用,但胁迫强度已明显降低.放线菌活菌数量结果也表现出与细菌相似的情况(图 2).培养前中期,两者联合施用的抑制作用显著且强于单独施用各农药,抑制率分别为 89.73%,93.0% 和 84.84%;12d 时,联合作用也表现出较低的促进作用,抑制率为 -13.92%.图 3 表示的是真菌活菌数量的变化情况.在培养前中期阶段,乙草胺和硫酸铜单独作用对真菌数量基本表现为促进作用,尤其以乙草胺 9 d 时显著,其 $\ln(\text{CFU})$ 为 12.93 ± 0.12 ,CFU 数量是对照的 20 余倍;但当两者同时作用时产生了

相反的效应,即抑制效应随时间的增长而逐渐提高,至第 9 d 产生显著差异 ($p < 0.05$) 抑制率为 43.65%.而到第 12d 抑制作用消失,促进效应占据上峰,抑制率变为 -138.68%.

由于乙草胺在土壤中的残留期较短,且易降解,它的存在使一些可以利用它的降解菌大量富集,从而其抑菌效应不如硫酸铜.当两者联合施用,短期急性毒害作用加强,黑土中大部分细菌表现为严重抑制效应,但随处理时间的不断延长,黑土中可以耐受和降解乙草胺的细菌由于竞争压力的减少,开始

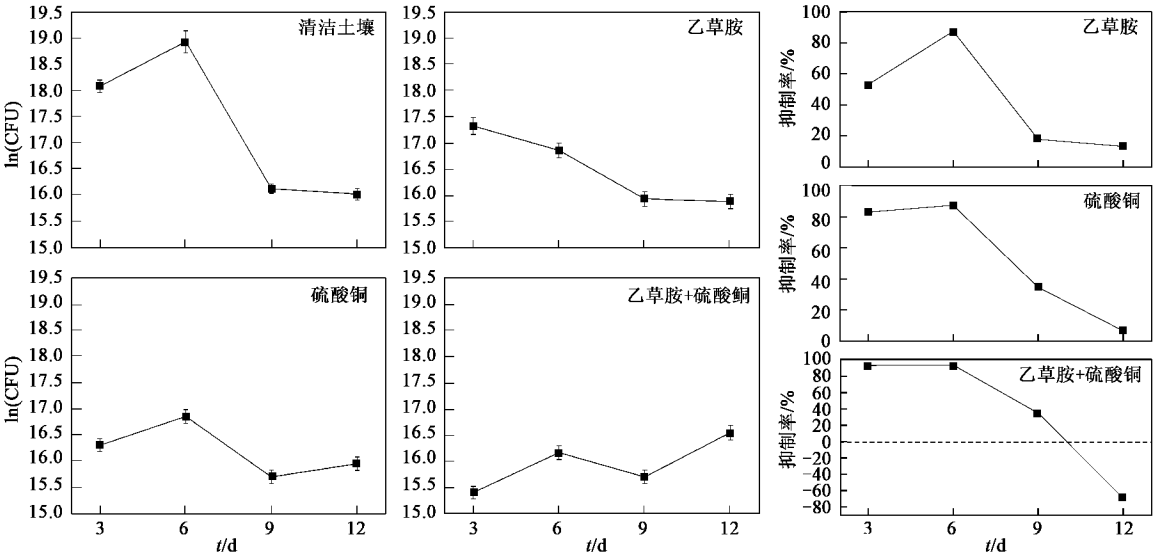


图 1 不同农药处理对细菌活菌数量的影响

Fig.1 Effects of different agrochemical treatments on viable bacterial counts in soil samples

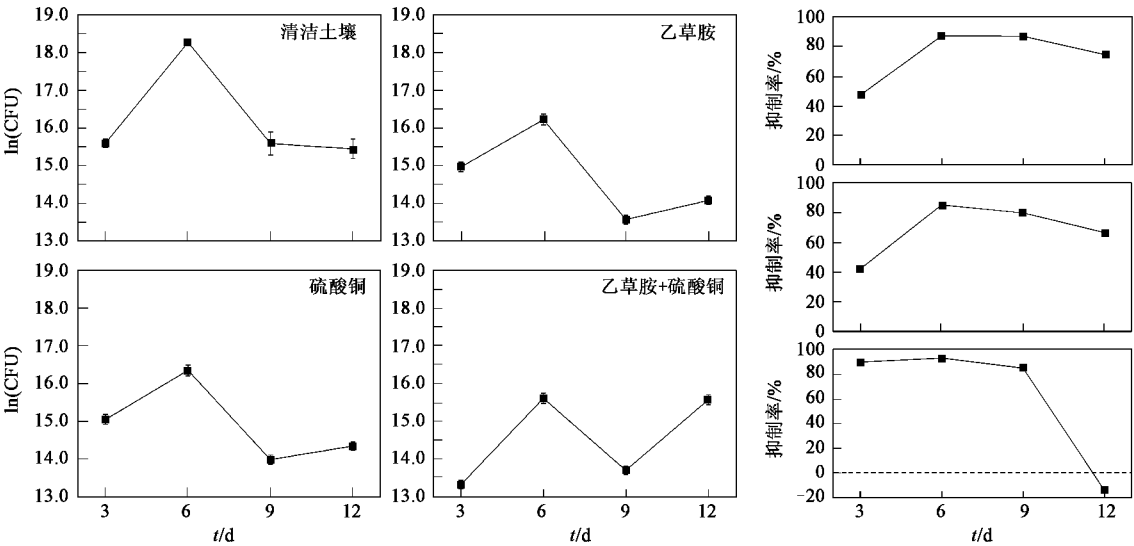


图 2 不同农药处理对放线菌活菌数量的影响

Fig.2 Effects of different agrochemical treatments on viable actinomycetes counts in soil samples

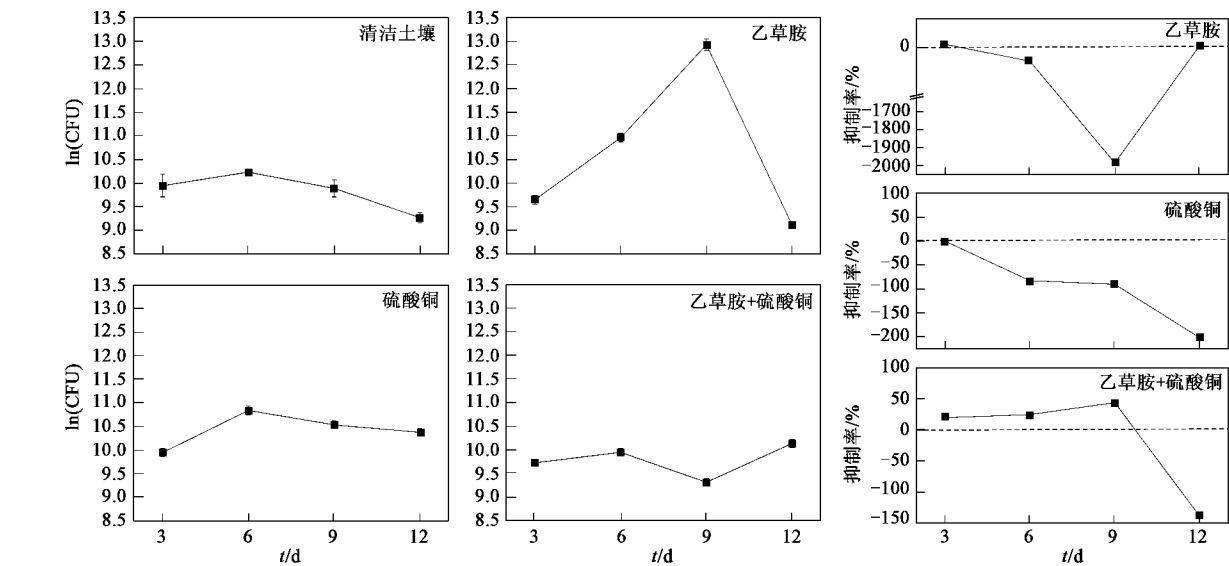


图 3 不同农药处理对真菌活菌数量的影响

Fig.3 Effects of different agrochemical treatments on viable fungi counts in soil samples

快速恢复生长,产生的代谢产物也为某些能够耐受重金属铜毒害的微生物提供了额外碳源,使得微生物对重金属的代谢作用、氧化-还原作用以及溶解作用均可能发生^[13],改变铜在土壤中的生物有效性,最终导致有效铜含量的降低(表 2).乙草胺、硫酸铜单独施用对真菌数量基本表现出显著的促进效应

($p < 0.05$),这与植物致病菌对波尔多液中的铜有抗性的结果相一致^[14].两者联合作用时只是在 12d 时表现出显著促进效应($p < 0.05$),其余时间仍显示为抑制效应.这一结果也提示了不同类型农药的联合施用可能会对某些植物致病菌有抑制效应,但确切的组合关系及具体用量仍需要进一步的研究加以证实.

表 2 供试土壤有效铜含量¹⁾/mg·kg⁻¹

Table 2 Available copper of treated soil samples/ mg·kg⁻¹

处理土壤	3 d	6 d	9 d	12 d
硫酸铜	2.377 ± 0.094	2.369 ± 0.358	1.829 ± 0.168 *	1.899 ± 0.064 *
乙草胺 + 硫酸铜	2.107 ± 0.063	2.409 ± 0.145	2.369 ± 0.105	1.428 ± 0.215 *

1) * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, 下同

2.2 乙草胺和硫酸铜联合作用对土壤脱氢酶活性的影响

脱氢酶是土壤中的主要酶类之一,它能够酶促有机物脱氢,起着氢中间传递体的作用.在土壤中碳水化合物和有机酸的脱氢酶比较活跃,并且脱氢酶只存在于活细胞内部^[15],与土壤微生物生物量和代谢功能密切相关,因此可以敏感地反映出土壤微生态环境的变化情况.图 4 显示乙草胺和硫酸铜单独及联合施用条件下脱氢酶活性随时间变化的情况.在处理的 3~9d,除乙草胺和硫酸铜联合施用土壤外,其他处理均表现出先降低后升高的态势.2 种农药的联合施用在整个处理期表现为脱氢酶活性的持续升高,与对照相比,只在处理第 3 d 乙草胺与硫酸铜联合施用对脱氢酶活性的影响较为显著($p < 0.05$),表现出明显的抑制效应,然后逆转为轻微的促进效应.从整个处理阶段看,硫酸铜单独作用使脱

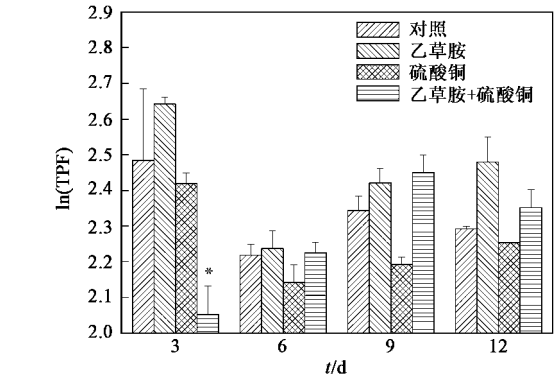


图 4 不同处理土壤中脱氢酶活性变化过程

Fig.4 Process of soil dehydrogenase in different treated soil samples

氢酶活性较对照产生轻微的抑制效应,乙草胺单独作用产生轻微的促进效应,而两者联合作用时由最初的显著抑制逐渐逆转为轻微促进,这表明以实验浓度联合施用 2 种农药具有短期急性毒性,但随时

间的延长毒害程度相对减轻.

2.3 乙草胺和硫酸铜联合作用对土壤呼吸强度的影响

土壤底物诱导呼吸强度作为土壤生物活性指标之一,能够在一定程度上反映土壤营养物的转化和供应能力,其呼吸速率变化及变化方向也反应了生态系统对胁迫的敏感程度和响应模式,是环境安全评价的一项重要指标.当土壤受到外来污染物污染时,微生物为了维持生存可能需要更多的能量,而使土壤微生物的代谢活性发生不同程度的响应.由图 5 可见,所有处理土壤的底物诱导呼吸强度随时间延长均表现为下降的态势,其中以乙草胺和硫酸铜联合施用以及硫酸铜单独施用下降趋势较为显著.特别是在处理的 3~9 d,由于微生物的代谢活动最活跃,土壤呼吸强度的下降态势较为明显.与对照相比,乙草胺和硫酸铜联合施用在处理 3~6 d 对土壤呼吸强度产生显著影响($p < 0.05$),表现出促进效应,分析其原因可能是由于易感菌群(主要是细菌群落)因 2 种农药联合施用的加强毒性而导致死亡,促使抗性菌群对其快速降解,从而造成土壤中 CO_2 量的增高^[16].另外,这可能也与土壤中有效铜含量有关(表 2).Chander 等^[17]研究认为,土壤中重金属浓度较高有利于微生物将更多的有机碳作为能量代谢,以 CO_2 的形式释放,而低浓度重金属的土壤中微生物能更有效地利用有机碳转化为生物量碳.

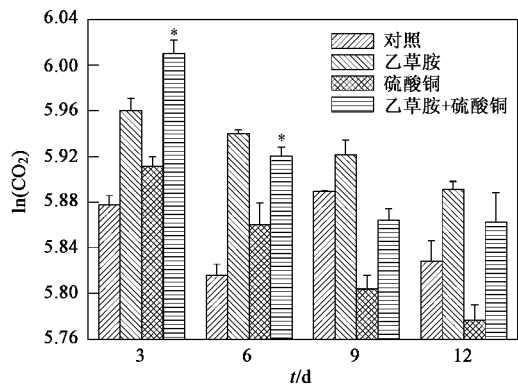


图 5 不同处理土壤中土壤底物诱导呼吸强度变化过程
Fig.5 Process of soil SIR in different treated soil samples

2.4 乙草胺和硫酸铜联合作用对土壤微生物代谢活性的影响

BIOLOG 研究法是通过测试微生物对单一碳源利用程度,来反映微生物群体水平的生理概貌^[18].利用不同的多样性指数可以分析土壤微生物群落的功能多样性,其中,Shannon 指数主要反映了群落中

的物种丰富度,Simpson 指数较多的反映群落中最常见的物种,而 McIntosh 指数则是群落物种均一性的衡量^[19,20].本试验采用 72 h 的数据,通过 Shannon、Simpson 和 McIntosh 多样性指数模型计算得到不同农药处理对土壤微生物群落功能多样性的影响(表 3).从表中可以看出,硫酸铜、乙草胺单独施用及两者联合施用对 Shannon、Simpson 和 McIntosh 多样性指数影响的趋势相似.与对照相比,单独施用硫酸铜和联合施用 2 种农药均不同程度地降低了土壤微生物群落多样性指数,其中 Shannon 和 Simpson 指数变化差异极显著($p < 0.01$).这表明单独施用硫酸铜和联合施用 2 种农药均破坏了土壤微生物群落的物种丰富度,并且对土壤微生物群落中最常见的物种产生了明显的抑制作用.而考察 McIntosh 指数发现,单独施用硫酸铜对土壤微生物群落的物种均一性破坏极显著($p < 0.01$),两者联合施用也同样显著影响物种均一性($p < 0.05$).分析原因可能是由于硫酸铜是 1 种常用杀菌剂,因此对微生物的毒性效应较乙草胺强,而两者的联合施用可以部分缓解毒害的程度.长期污染土壤与对照土壤相比,在 Shannon、Simpson 和 McIntosh 指数之间都存在着显著差异($p < 0.01$ 和 $p < 0.05$),这揭示出复合污染对土壤微生态系统产生了显著的影响,土壤微生物群落多样性和均一性被不同程度的破坏.

表 3 不同处理土壤微生物群落多样性变化
Table 3 Diversity variation of soil microbial communities from different treatments

处理	Shannon 指数	Simpson 指数	McIntosh 指数
清洁土	4.38 ± 0.015	74.52 ± 0.912	10.83 ± 0.166
乙草胺	4.36 ± 0.006	73.87 ± 0.877	10.58 ± 0.513
硫酸铜	4.32 ± 0.004 **	70.30 ± 0.511 **	10.22 ± 0.213 *
乙草胺 + 硫酸铜	4.33 ± 0.006 **	71.01 ± 0.163 **	10.46 ± 0.278 *
污染土	4.33 ± 0.005 **	70.40 ± 0.539 **	10.41 ± 0.067 *

主成分分析法(PCA)是常用分析多元向量的统计学方法,为了比较直观地反映微生物群落利用 95 种碳源的代谢特征,采用该方法来分析硫酸铜、乙草胺单独和联合施用对土壤微生物群落碳源利用情况的影响.由图 6 可以看出,硫酸铜、乙草胺单独和联合施用及污染土壤与对照在主成分 1 和 2 上均有很好地分离.其中,乙草胺和硫酸铜的联合施用及长期污染土壤与对照和乙草胺、硫酸铜单独施用呈现明显的空间分异,这表明农用化学品的施用对土壤微生物利用不同碳源产生了较大的影响,但所产生的效应针对不同微生物是不同的.对于某些能耐受铜胁迫的微生物来说,乙草胺可能作为碳源和能源被

利用,起到了缓解重金属毒性的作用.笔者通过PCR-DGGE研究法得出的结果中已证实长期污染土壤和联合施用农药的土壤中存在特殊种群,且有别于对照和单独施用农药的土壤^[10].因此,从这一角度来说,土壤微生物群落结构已发生改变,且体现在碳源利用多样性上,进而可能带来整个黑土农田生态系统的演变.

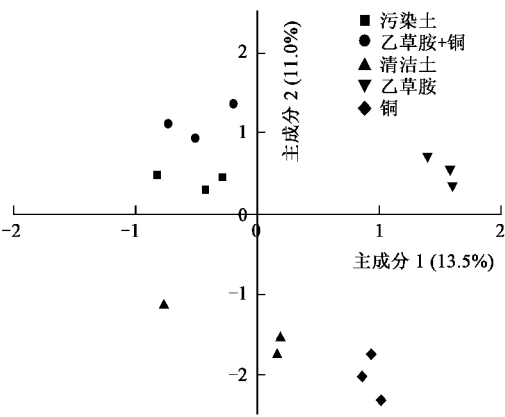


图6 不同处理土壤微生物碳源利用的主成分分析

Fig.6 Principal component analysis of utilization of carbon sources by microorganisms in different treated soil samples

3 结论

乙草胺、硫酸铜作为黑土区主要的农用化学品,其单独和联合施用对黑土农田微生态系统均产生了不同程度的影响.特别是两者联合施用对黑土微生物数量、微生物生理代谢以及微生物群落多样性等均产生有别于单独作用所产生的效应.两者联合作用对黑土农田系统中细菌、放线菌和真菌数量以及土壤脱氢酶活性在整个培养期具有急性抑制效应,但随处理时间的延长,其抑制效应逐渐减弱,甚至效应类型发生逆转;而对土壤呼吸强度的影响则表现为显著促进($p < 0.05$).硫酸铜单独施用和2种农药的联合施用均显著破坏了黑土微生物群落物种丰富度和均一性,主成分分析法也清楚地表明土壤微生物群落碳源利用多样性发生了改变.

参考文献:

[1] 周启星. 复合污染生态学 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1995.

[2] Zhou Q X, Cheng Y, Zhang Q R, *et al.* Quantitative analyses of relationships between ecotoxicological effects and combined pollution [J]. *Science in China Ser. C: Life Sciences*, 2004, **47**(3): 332 ~ 339.

[3] 周启星, 孙福红, 郭观林, 等. 乙草胺对东北黑土铅形态及

生物有效性的影响 [J]. *应用生态学报*, 2004, **15**(10): 1883 ~ 1886.

[4] 何振立, 周启星, 谢正苗. 污染及有益元素的土壤化学平衡 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1998.

[5] 梁继东, 周启星. 甲胺磷、乙草胺和铜单一与复合污染对蚯蚓的毒性效应研究 [J]. *应用生态学报*, 2003, **14**(4): 593 ~ 596.

[6] 孙铁珩, 李培军, 周启星, 等. 土壤污染形成机理与修复技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.

[7] Bert E, Kristin M, Friedrich V W, *et al.* Monitoring Impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**(8): 2814 ~ 2821.

[8] Fantroussi S E, Verschuere L, Verstraete W, *et al.* Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**(3): 982 ~ 988.

[9] 罗海峰, 齐鸿雁, 张洪勋. 乙草胺对农田土壤细菌多样性的影响 [J]. *微生物学报*, 2004, **44**(4): 519-522.

[10] 张倩茹, 周启星, 张惠文, 等. 乙草胺-铜离子复合污染对黑土农田生态系统中土著细菌群落的影响 [J]. *环境科学学报*, 2004, **24**(2): 326 ~ 332.

[11] Xiao H, Zhou Q X, Liang J D. Single and joint effects of acetochlor and urea on earthworm *Eisenia foetida* population in phaeozem [J]. *Environ. Geochem. Health*, 2004, **26**: 277 ~ 283.

[12] 鲁如坤. 土壤农业化学分析法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. 107 ~ 240.

[13] 王新, 周启星. 重金属与土壤微生物的相互作用及污染土壤修复 [J]. *环境污染治理技术与设备*, 2004, **5**(11): 1 ~ 5.

[14] 孙铁珩, 周启星, 李培军. 污染生态学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 307.

[15] Chu H Y, Zhu J G, Xie Z B, *et al.* Effects of lanthanum on dehydrogenase activity and carbon dioxide evolution in a Haplic Acrisol [J]. *Australian Journal of Soil Research*, 2003, **41**: 731 ~ 739.

[16] Soulas G, Chaussod R, Verguet A. Chloroform fumigation as a means of determining the size of specialized soil microbial populations: Applications to pesticide-degrading organisms [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 1984, **16**: 447 ~ 501.

[17] Chander K, Brookes P C. Synthesis of microbial biomass from added glucose in metal-contaminated and non-contaminated soils following repeated fumigation [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 1992, **24**: 613 ~ 614.

[18] Zabinski C A, Gannon J E. Effect of recreational impacts on soil microbial communities [J]. *Environmental Management*, 1997, **21**(2): 233 ~ 238.

[19] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement [M]. New Jersey: Princeton University Press, 1988. 141 ~ 162.

[20] Atlas R M. Diversity of microbial community [J]. *Advanced Microbiology Ecology*, 1984, **7**: 1 ~ 47.