



研究报告

利用光合细菌进行微生物修复：一种降低辛硫磷在养殖水中积累的低成本方法

孙阳¹ 赵燕楠² 王浩¹ 吕利群^{*2}¹ 上海海洋大学国家水生动物病原库 上海 201306² 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室 上海 201306

摘要:【背景】中国是农业生产大国，渔林农牧占比庞大。有机农药无论在畜牧业还是水产养殖业都有广泛的应用。有机磷农药(Organophosphorus Pesticide, OP)是应用最广泛的有机农药，具有低毒和不易残留的优点。OP 在水体中大量积累可通过生物富集作用间接影响人体健康，由此产生的生殖毒性不容忽视。光合细菌作为环境友好型水体有益菌，部分菌种具有降解有机农药的功能。【目的】自上海海洋大学明湖中分离纯化得到一株光合细菌(编号 SPZ)。探究其对辛硫磷的耐受程度及降解效果，为养殖水体中有机磷农药的生物降解提供目的菌株。【方法】利用 16S rRNA 基因序列分析方法对目标菌株进行种属鉴定；利用紫外分光光度法测定分离菌株 SPZ 和标准菌株 ST 在不同接种量下的 OD_{660} 并测定实验周期内光合细菌在不同浓度辛硫磷中 OD_{660} 的变化趋势，以示辛硫磷对光合细菌的毒性作用；利用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)测定菌株对水体辛硫磷的降解能力；通过 HPLC 测定加热致死菌与活菌对水体辛硫磷的降解能力，确定菌株对辛硫磷的降解方式。【结果】16S rRNA 基因序列分析表明菌株 SPZ 与红假单胞菌属相似度高达 99% 以上，与沼泽红假单胞菌 ATCC 17001 菌株聚为一支，置信度为 100%；菌株 SPZ 与菌株 ST 的适宜接种量为 10%；菌株 SPZ 可耐受 100 mg/L 的辛硫磷，当浓度超过该值后，辛硫磷对光合细菌生长产生显著的抑制作用；当光合细菌进入生长稳定期后添加辛硫磷，1 d 时可相对降解辛硫磷(12.97%–26.69%，20.0 mg/L；24.25%–32.85%，2.0 mg/L；16.66%–34.59%，0.2 mg/L)，3 d 时可相对降解辛硫磷(46.63%–53.95%，20.0 mg/L；24.78%–30.34%，2.0 mg/L；31.92%–39.25%，0.2 mg/L)，5 d 时可相对降解辛硫磷(93.65%–97.72%，20.0 mg/L；67.69%–74.41%，2.0 mg/L；10.34%–24.27%，0.2 mg/L)。【结论】菌株 SPZ 作为一种常见光合细菌，能够有效去除水体中的辛硫磷农药，具有生物修复功能，在水产养殖和有机磷农药污染水处理中有广阔的前景。

关键词：光合细菌，辛硫磷，毒性，微生物修复

Foundation item: China Agriculture Research System (CARS-45-19)***Corresponding author:** E-mail: lqlv@shou.edu.cn**Received:** 15-03-2021; **Accepted:** 21-04-2021; **Published online:** 28-05-2021**基金项目：**国家现代农业产业技术体系(CARS-45-19)***通信作者：**E-mail: lqlv@shou.edu.cn**收稿日期：**2021-03-15; **接受日期：**2021-04-21; **网络首发日期：**2021-05-28

Microbial remediation with photosynthetic bacteria: a low-cost approach to reducing phoxim accumulation in aquaculture water

SUN Yang¹ ZHAO Yannan² WANG Hao¹ LYU Liqun^{*2}

¹ National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

² Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: [Background] China is a major agricultural producer, with a large proportion of fishery, forestry, agriculture, and animal husbandry. Organic pesticides are widely used in animal husbandry and aquaculture, particularly the organophosphorus pesticides (OPs) which feature low toxicity and little residue. OP indirectly affects human health through biological enrichment, and the resulting reproductive toxicity cannot be ignored. Photosynthetic bacteria are environmentally friendly beneficial bacteria in water, some of which can degrade organic pesticides. **[Objective]** We isolated a photosynthetic strain (No. SPZ) from the Minghu Lake of Shanghai Ocean University and tested its tolerance to and degradation of phoxim, aiming at provide a strain for the removal of OPs in aquaculture water. **[Methods]** The strains used in this study were identified by 16S rRNA gene sequencing. The OD_{660} of the isolated strain SPZ and the standard strain ST at different inoculum sizes was measured by UV spectrophotometry to determine the optimal inoculum size. The toxicity of phoxim to photosynthetic bacteria was determined based on the changing trends of OD_{660} of the bacteria exposed to phoxim at different concentration levels. The phoxim-degrading ability of SPZ and ST was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), and that of live and dead (from heating) SPZ was also detected (HPLC) to clarify the degradation mechanism. **[Results]** The 16S rRNA gene sequence analysis demonstrated that SPZ showed 99% similarity to *Rhodospseudomonas* and clustered with *Rhodospseudomonas palustris* ATCC 17001 (confidence: 100%). The optimal inoculation volume fractions of SPZ and ST were 10%. SPZ can tolerate 100 mg/L phoxim, and phoxim significantly inhibited the growth of the photosynthetic bacteria at the concentration > 100 mg/L. Phoxim was added to photosynthetic bacteria at logarithmic growth phase and the relative degradation of phoxim was 12.97%–26.69% (at 20.0 mg/L), 24.25%–32.85% (at 2.0 mg/L), and 16.66%–34.59% (at 0.2 mg/L) after 1 day, 46.63%–53.95% (at 20.0 mg/L), 24.78%–30.34% (at 2.0 mg/L), and 31.92%–39.25% (at 0.2 mg/L) after 3 days, and 93.65%–97.72% (at 20.0 mg/L), 67.69%–74.41% (at 2.0 mg/L), and 10.34%–24.27% (at 0.2 mg/L) after 5 days. **[Conclusion]** The common photosynthetic SPZ can effectively remove the phoxim in water. It has a broad application prospect in aquaculture and OPs-contaminated wastewater treatment.

Keywords: photosynthetic bacteria, phoxim, toxicity, microbial remediation

有机农药自问世以来便在农林牧渔疾病防控中扮演重要角色，我国是农业生产大国，在农药的制造、买卖、应用及进出口等各方面都有较高的占比^[1]。在众多农药中有机磷农药 (Organophosphorus Pesticide, OP) 是使用最为广泛的一种^[2]。OP 可以有效控制养殖虫害及鱼体寄生虫等有害病原微生物从而提高农牧产量，但

同时其大规模的应用也不可避免地通过鱼体及一些微生物的富集作用造成了一定的环境污染和健康问题。2020 年 2 月，我国出台相关文件，再次更新和规范了包括 483 种农药 7 107 项最大残留限量，有机磷农药在水产养殖中的使用规范及残留限量仍较为模糊^[3]。辛硫磷，化学式为 $C_{12}H_{15}N_2O_3PS$ ，结构式如图 1 所示，常用的商品

名有肟硫磷、倍腈松、倍氰松等。辛硫磷作为一种有机磷杀虫剂, 对机体有神经毒性、肝脏毒性、内分泌与生殖毒性及免疫系统毒性^[4-8]。有研究报道鱼类^[9]可大量富集水体中的有机磷, 这为有机磷农药的毒性传播埋下了隐患。目前已经报道的有机磷农药残留处理方法^[10]包括超声处理、吸附剂吸附等物理手段; 氧化分解、光化学降解、水解等化学手段; 基因工程细菌、降解酶和微生物等生物手段。以微生物降解法为主的生物降解手段在近年来因为成本低廉、安全无毒、对环境无二次污染^[11]等优点备受研究人员青睐。

光合细菌是一种较为古老且具备光能转化的原核微生物, 可以在嫌气缺氧条件下利用太阳能、光能和有机物进行不产氧光合作用^[12]。光合细菌因其独特的兼性厌氧生活方式, 可以在下层缺氧或者低氧的环境中发挥作用, 在调节改善水体环境^[13]、处理废水污水^[14]、改善水质提升鱼体抗病能力^[15-17]等方面均有一定报道。有研究表明, 光合细菌能够降解农药残留并且去除其毒性, 因此具有修复农药污染水体的应用潜力^[18-20]。

目前光合细菌对有机磷农药污染水体中的生物修复研究尚不完善, 其对辛硫磷的吸收降解

效果尚未见报道。因此本文以有机磷农药的微生物降解为切入点, 探讨常见水体有益菌光合细菌对有机磷农药辛硫磷的吸收降解作用, 以期光合细菌在处理有机磷污染水体中的应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

菌株 SPZ 分离自上海海洋大学校园湖明湖, 其 16S rRNA 基因 GenBank 登录号为 MW737687; 标准菌株沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)购于广东省微生物保藏中心, 产品编号为 GDMCC 1.167, 本文编号为 ST。

1.1.2 培养基

红螺菌科富集培养基^[21], 用于光合细菌的富集培养; HCH 光合培养基^[22], 用于光合细菌的扩大培养; 112 VAN Neil's Yeast Agar^[23], 用于活化标准菌株; 分离纯化培养基: 在 HCH 培养基基础成分中添加 1.5% 琼脂, 用于纯化光合细菌。所有培养基经 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

辛硫磷分析标准品(99%), Sigma 公司; 二氯甲烷(AR 级)、甲醇(HPLC 级), 国药集团化学试剂有限公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。Premix Taq 酶, 宝日医生物技术(北京)有限公司。液相色谱仪, 上海伍丰科学仪器有限公司; ODS-SP 色谱柱(规格为 5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm), GL Sciences 公司; 恒温光照培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 0.22 μ m 有机系针头式过滤器, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 光合细菌增殖培养

1.2.1 光合细菌的分离纯化

水样采集自上海海洋大学(临港校区)明湖及听涛桥上游, 距离湖面 0.3 m–0.5 m 深处。水样经 100 目尼龙网纱过滤后, 取 5 mL 至 50 mL 离心管, 补满红螺菌科富集培养基, 置于光照恒温培养箱中静置富集, 温度为 28–30 $^{\circ}$ C, 光照强度为 3 000 lx。

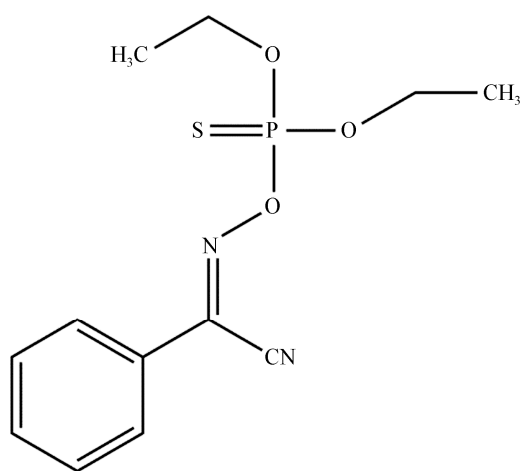


图 1 辛硫磷化学结构式

Figure 1 Chemical formula of phoxim

待液体呈现红色时重复上述富集操作,如此重复3次,使富集菌种成为优势菌种。菌种纯化采用双层平板厌氧法^[24],涂布得到红色菌落后进一步划线分离直至分离出单菌落。于无菌工作台中挑取单菌落,根据细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取细菌DNA,PCR引物为27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR反应条件:94℃ 10 min; 94℃ 60 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35个循环; 72℃ 5 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果经NCBI进行序列比对以确定其分类地位。纯化培养的菌株经甘油冷冻保存以备后续实验使用。

1.2.2 菌种复苏与扩大培养

取甘油冻存的菌株SPZ, 37℃水浴解冻后,转移至15 mL无菌离心管中,加满HCH光合培养基, 30℃、3 000 lx条件下复苏并扩大培养。对于菌株ST,依照说明书,使用112 VAN Neil's Yeast Agar培养基对冻干粉进行复苏,并进一步使用HCH光合培养基扩大培养。以上菌株每次扩大培养后均进行16S rRNA基因测序与比对,以保证菌种纯度。

1.2.3 菌种生长特性

对光合细菌进行生长曲线测定。在HCH光合培养基中,按照5%、10%和20% (体积分数)接种所得菌株,置于恒温光照培养箱中, 28℃、3 000 lx条件下培养,每隔12 h取样一次,于波长660 nm处测定其光密度,确定菌种的生长周期规律。

1.3 光合细菌与辛硫磷相互作用

1.3.1 实验设计

取辛硫磷标准品100 mg,先加适量甲醇溶解,转移至15 mL棕色离心管中,补加甲醇至10 mL,配成终浓度为10 mg/mL的辛硫磷标准储备液,再经稀释配成终浓度为1 mg/mL和0.1 mg/mL的标准贮备液。

为探究富集菌株SPZ对辛硫磷的耐受程度,

设置0、10、100、500、1 000 mg/L为高浓度组辛硫磷添加量,设置0.5、1.0、2.0和4.0 mg/L为低浓度组辛硫磷添加量。将菌株SPZ以10%进行接种培养,随后加入辛硫磷标准储备液使其浓度达到所设定浓度值,最适条件下培养,定时取样测定 OD_{660} ,取样前轻轻摇匀并静置10 min,以排除辛硫磷标准储备液引起的菌液浊度的变化。同时,为探究光合细菌对辛硫磷的营养利用,以不含碳源(处理组NC-1)和不含磷源(处理组NC-2)的培养基作为对照,依次用20.0 mg/L辛硫磷代替培养基中的碳源(处理组CI)和磷源(处理组PI),对比菌株SPZ在培养基中的生长情况。

根据辛硫磷对光合细菌的细胞毒性大小,设置高、中、低(20.0、2.0、0.2 mg/L)这3个辛硫磷添加浓度探究光合细菌对辛硫磷的降解效果。首先将光合细菌按最佳接种量接种至250 mL锥形瓶中, 30℃、3 000 lx光强下恒温培养至对数生长期末期(OD_{660} 为1.6),然后加入适当浓度的辛硫磷标准储备液,使其终浓度分别为20.0、2.0和0.2 mg/L,同时在等体积的空白培养基中加入辛硫磷标准储备液,使其浓度与实验组保持一致,每个浓度设置3个重复。将上述实验组 and 对照组置于恒温光照培养箱中,最适条件下培养并于第1、3、5天定时采样,每次采样各取20 mL,于-80℃低温冰箱保存备用。

1.3.2 样品的前处理

将样品统一室温溶解,1:1加入等量萃取剂二氯甲烷,上下缓慢颠倒混匀3-5 min,使二氯甲烷与样品充分混匀,置于4℃冰箱中低温静置30 min,待样品与二氯甲烷分层完全后吸出下层二氯甲烷,重复上述操作共2次,弃去上层水相后合并2次萃取所得溶液,室温下氮吹,加入2 mL流动相将吹干后的残渣复溶,漩涡振荡混匀,超声处理30 min,使用0.22 μ m有机系针头式过滤器过滤转移至棕色进样瓶中,以备HPLC检测。

1.3.3 色谱分析条件

流动相甲醇: 水=75:25 (体积比), 色谱柱 C18 分析柱(5 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm), 进样量 20 μL , 波长 280 nm, 柱温室温, 流速 1.0 mL/min。

1.3.4 标准曲线的建立

取辛硫磷标准品一支(规格为 100 mg), 先加适量甲醇溶解, 转移至 15 mL 棕色离心管中, 补加甲醇至 10 mL, 配成终浓度为 10 mg/mL 的辛硫磷标准储备液, 再经甲醇稀释配成终浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, 再进一步加入甲醇稀释成浓度为 100、50、20、10、1、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液, 所有标准工作液经 0.22 μm 有机系针头式过滤器过滤, 转移至棕色进样瓶中以备 HPLC 检测。

1.3.5 回收率和精密度

回收率: 于空白液体培养基中加入辛硫磷标准储备液, 使得空白液体培养基中辛硫磷的浓度分别为 0.2、2.0 和 20.0 mg/L, 摇晃混匀, 经 1.3.2 样品处理方法处理并转移至棕色进样瓶中以备 HPLC 分析检测。同时, 按照样品处理方法计算出浓缩后的理论浓度分别为 2.0、20.0 和 200.0 mg/L。取辛硫磷标准储备液, 用甲醇稀释成与浓缩后浓度对应的辛硫磷标准工作液浓度, 分别为 2.0、20.0 和 200.0 mg/L, 每个浓度 5 个重复, 进样 20 μL 作 HPLC 分析检测, 利用公式计算辛硫磷各浓度的添加回收率: 回收率 = $\frac{A_i}{A_s} \times 100\%$

式中, A_i 为培养基中辛硫磷的峰面积, A_s 为相应标准工作液中辛硫磷的峰面积。

精密度: 于空白液体培养基中加入辛硫磷标准储备液, 使得空白液体培养基中辛硫磷的浓度分别为 0.2、2.0 和 20.0 mg/L, 摇晃混匀, 经样品处理方法处理并转移至棕色进样瓶中进行 HPLC 分析检测。每批内各浓度重复测定 5 次, 得出辛硫磷的峰面积, 代入标准曲线回归方程计算实测浓度, 求出日内变异系数。在一周内连续进行 3 个批次测定, 根据峰面积分别计算出对应的辛硫磷实

测浓度, 求出日间变异系数。

1.3.6 相对降解率

因有机磷农药易发生光降解, 而光合细菌的培养需要提供适宜光照, 因此设置加药不加菌组为空白对照, 同时测定不同时间点实验加菌组与空白对照组中的辛硫磷浓度, 最终扣除空白对照组辛硫磷降解, 即得实验组辛硫磷降解率, 利用公式计算光合细菌在不同时间点对辛硫磷相对降解率: $A = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$

式中 A 表示相对降解率; A_0 表示空白对照组辛硫磷检测浓度; A_1 表示实验组辛硫磷所测浓度。

1.4 光合细菌对辛硫磷降解机制初探

分别在含有 20.0 mg/L 辛硫磷的 HCH 液体培养基中分别添加 10% 菌株 SPZ 和菌株 ST 活菌及加热致死菌悬液^[25], 同时设置添加 10% 无菌水为空白对照, 置于恒温光照培养箱, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 lx 条件下培养 96 h 后取样测定 OD_{660} 处吸光度和辛硫磷残留量。

1.5 数据的统计分析

用 GraphPad Prism 8 软件进行数据统计分析与作图, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行测序结果比对, 采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 分子生物学鉴定及系统发育分析

以细菌基因组 DNA 为模板、细菌 16S rRNA 基因为通用引物进行 PCR 扩增, 得到大小约为 1 500 bp 的片段。将 PCR 产物测序后, 测序结果利用 NCBI 进行 BLAST 分析, 结果显示, 菌株 SPZ 与标准菌株 ST 均归属于红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*)。采用邻接法构建系统发育进化树, 系统发育分析结果显示菌株 SPZ 和标准菌株 ST 同沼泽红假单胞菌 ATCC 17001 株 (*Rhodopseudomonas palustris* strain ATCC 17001) 聚为一支, 置信度均为 100% (图 2)。

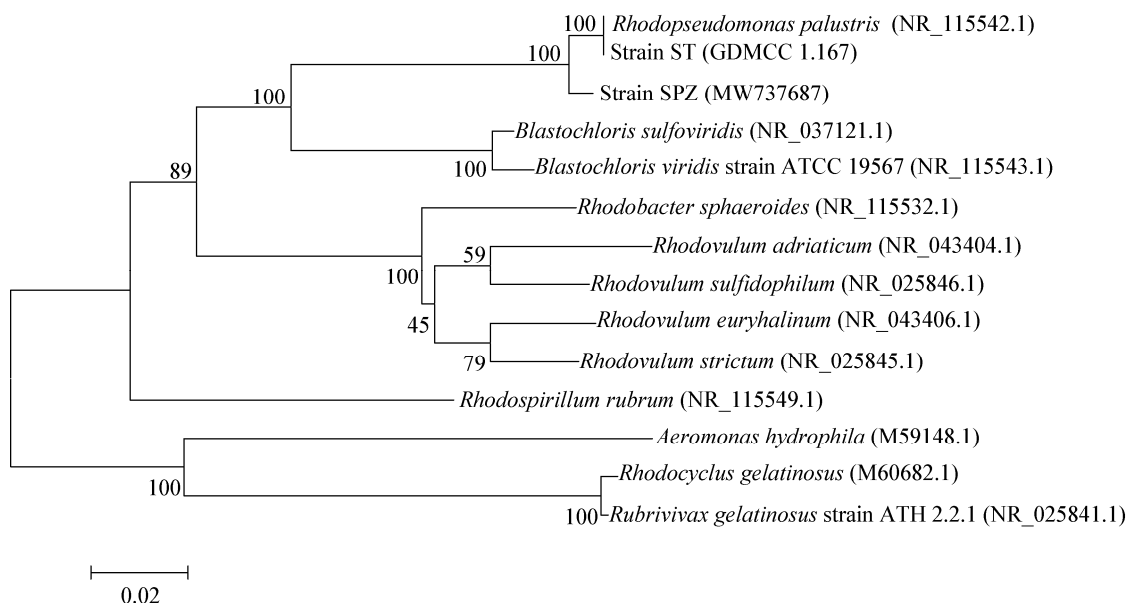


图2 菌株 SPZ 和 ST 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain SPZ and ST based on 16S rRNA gene sequences

注：括号中的序号表示细菌 16S rRNA 基因 GenBank 序列号；分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比；标尺意义为序列的差异度

Note: Sequence number in parentheses indicates the sequence number of GenBank of bacteria 16S rRNA gene; Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates; The meaning of the ruler is to show the degree of difference of the sequence

2.2 菌株的生长特性

2.2.1 菌株 SPZ 的生长规律

不同接种量下，菌株 SPZ 有相同的生长趋势（图 3），3 种接种量下菌株 SPZ 均在 72 h 进入对数生长期，进入稳定期时 10% 和 20% 接种量可使菌液 OD_{660} 值达到 1.6 以上，5% 接种量下 SPZ 菌液颜色呈现浅红色，稳定期 OD_{660} 值可达 1.2。144–240 h

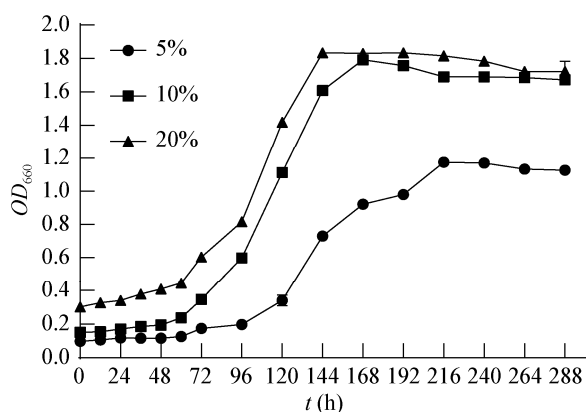


图3 不同接种量下菌株 SPZ 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of strain SPZ under different inoculum concentrations

内菌株 SPZ 处于稳定生长期，之后进入衰退期。

综上可知，菌株 SPZ 最适接种量为 10%，其生长周期为 7–10 d。

2.2.2 菌株 ST 的生长规律

菌株 ST 在 10% 和 20% 接种量下，均在 60 h 左右开始进入对数生长期，其中，20% 接种量下菌株 ST 在 144 h 进入稳定生长期， OD_{660} 值可达 1.8；10% 接种量下菌株 ST 在 60–168 h 逐渐攀升，在 192 h 进入生长稳定期，最大 OD_{660} 达 1.77；5% 接种量下菌株 ST 光密度值在 120 h 内缓慢攀升，在 192 h 时进入稳定生长期，最高 OD_{660} 达 1.16（图 4）。综上可知，菌株 ST 的最适接种量为 20%，该接种量下菌株 ST 可在较短时间内进入生长稳定期，10% 接种量下菌株 ST 对数生长期较长，但其稳定生长期时 OD_{660} 值与 20% 接种量无异。考虑到后续实验的连贯性，选择 10% 作为菌株 ST 的实验接种量。

2.3 辛硫磷对光合细菌生长的影响

2.3.1 低浓度辛硫磷对菌株 SPZ 生长的影响

如图 5 所示，各低浓度辛硫磷组中菌株 SPZ

显示出相似的生长趋势, 相比空白对照组, 低浓度辛硫磷对菌株 SPZ 有一定的促生长作用, 稳定生长期时 OD_{660} 值最高分别可达 1.08、1.05、1.07 和 1.13, 而同批次空白对照组 OD_{660} 最高可达 0.92。综上显示低浓度辛硫磷对菌株 SPZ 没有毒性且对其生长有一定促进作用。

2.3.2 高浓度辛硫磷对菌株 SPZ 生长的影响

在低浓度辛硫磷对光合细菌毒性实验的基础上, 进一步提高辛硫磷浓度。如图 6 所示, 10 mg/L

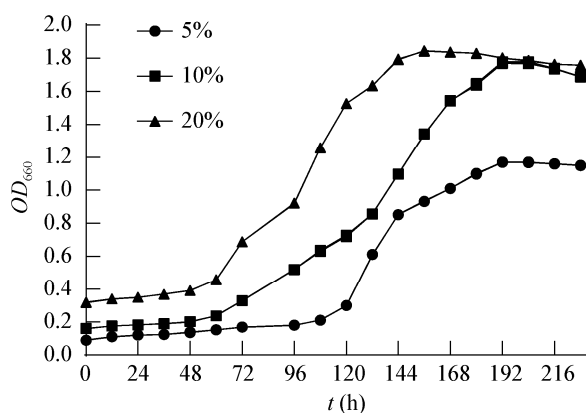


图 4 不同接种量下菌株 ST 的生长曲线
Figure 4 Growth curve of strain ST under different inoculums

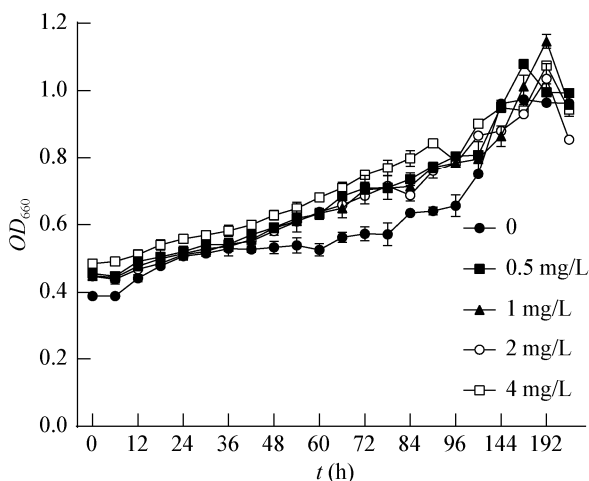


图 5 菌株 SPZ 在低浓度辛硫磷中的生长情况
Figure 5 Growth of strain SPZ in low concentration phoxim

辛硫磷处理下, 菌株 SPZ 在 180 h 内 OD_{660} 值呈现缓慢攀升趋势, 最大 OD_{660} 可达 1.9, 略高于同期空白对照组 OD_{660} 值, 随后进入生长衰退期。随着辛硫磷添加浓度的增加, 菌株 SPZ 生长趋势相近、但 OD_{660} 极值逐渐降低, 100、500 和 1 000 mg/L 添加浓度下 SPZ 最大 OD_{660} 值均显著低于空白对照组。综上显示高浓度辛硫磷对菌株 SPZ 生长产生显著抑制作用。

2.3.3 菌株 SPZ 对辛硫磷的营养利用

菌株 SPZ 对辛硫磷的营养利用情况如图 7 所

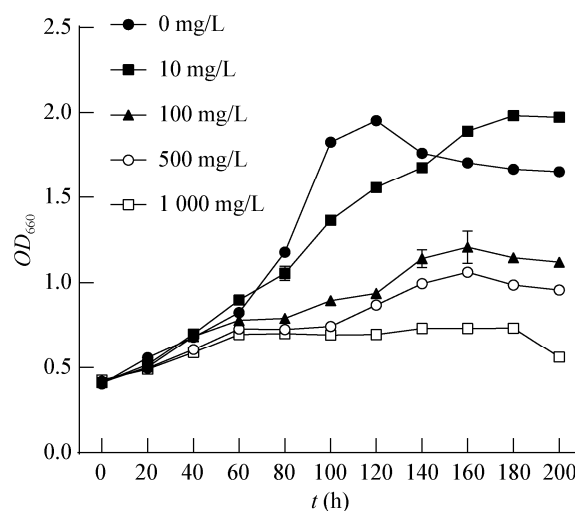


图 6 菌株 SPZ 在高浓度辛硫磷中的生长情况
Figure 6 Growth of strain SPZ in high concentration phoxim

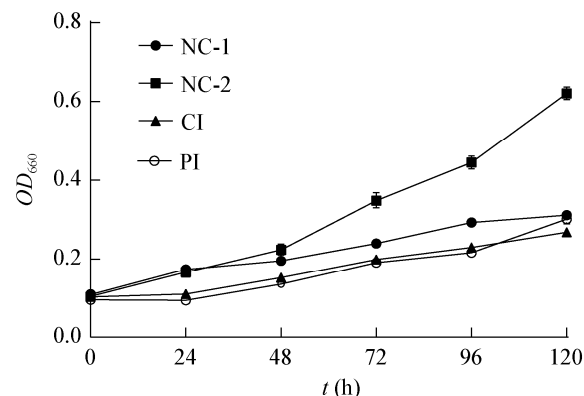


图 7 菌株 SPZ 对辛硫磷的营养利用情况
Figure 7 Nutritional utilization of phoxim by strain SPZ

示,在培养基缺少碳源的情况下,菌株 SPZ 基本上无法生长,在缺少磷源的情况下,其生长基本不受抑制,当添加辛硫磷作为唯一碳源或唯一磷源,菌株 SPZ 基本上无法生长。由曲线可以看出,辛硫磷不能作为菌株 SPZ 的唯一碳源,也无法作为菌株 SPZ 的唯一磷源。

2.4 光合细菌对辛硫磷降解效果

2.4.1 辛硫磷的标准工作曲线

以辛硫磷实测色谱峰面积为纵坐标(y),其单位为 $\text{mAU}\times\text{s}$;辛硫磷标准工作液浓度为横坐标(x),其单位为 $\mu\text{g/mL}$,绘制标准工作曲线。线性回归方程为 $y=46.305x-33.864$ ($R^2=0.999\ 9$)。在 $0.5\text{--}200\ \mu\text{g/mL}$ 范围内,辛硫磷保留时间为 $8.24\ \text{min}$,检测色谱峰面积与辛硫磷浓度呈较好的线性关系(图 8)。

2.4.2 回收率与精密度

由表 1 和表 2 可知,当添加浓度为 0.2 、 2.0 和 $20.0\ \text{mg/L}$ 时,辛硫磷在培养基中的添加回收率分别为 $84.82\%\text{--}92.75\%$ 、 $79.81\%\text{--}81.33\%$ 、 $80.12\%\text{--}84.02\%$ 。辛硫磷在培养基中的日内变异系数分别为 3.34% 、 0.93% 和 1.53% ;日间变异系数分别为 1.27% 、 3.97% 和 1.19% 。辛硫磷在培养基中的回收

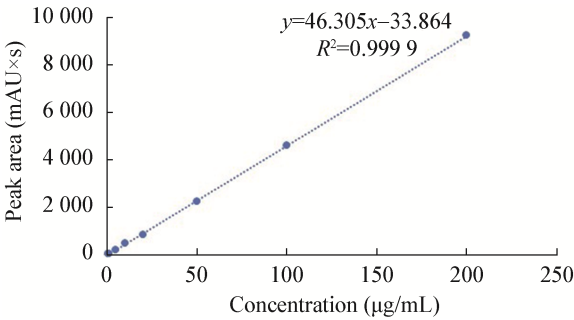


图 8 辛硫磷标准工作曲线
Figure 8 Standard curve of phoxim

率和变异系数均符合农药登记残留试验准则(中国),说明该法适用于水体中辛硫磷的回收。

2.4.3 菌株 SPZ 和菌株 ST 降解辛硫磷

图 9 所示为空白无机盐培养基中辛硫磷的降解情况,由实际检测浓度变化可以看出,辛硫磷在不添加光合细菌的情况下可自行降解一部分。就 $20.0\ \text{mg/L}$ 高浓度组而言,5 d 时辛硫磷浓度可降低到 $5.0\text{--}5.4\ \text{mg/L}$; $2.0\ \text{mg/L}$ 时可到 $0.57\ \text{mg/L}$ 左右; $0.2\ \text{mg/L}$ 时辛硫磷在 1 d 和 3 d 时实测浓度略有上升,分别为 $0.214\ 6\ \text{mg/L}$ 和 $0.207\ 2\ \text{mg/L}$,在 5 d 时浓度降低到 $0.15\ \text{mg/L}$ 左右。

表 1 培养基中的辛硫磷回收率

Table 1 Recovery rate of phoxim in culture medium

添加浓度 Added concentration (mg/L)	回收率 Recovery rate (%)					$\bar{X} \pm SD$
	1	2	3	4	5	
0.2	87.02	92.75	91.30	90.63	84.82	89.30 ± 3.28
2.0	80.38	79.81	80.88	80.22	81.33	80.52 ± 0.59
20.0	80.12	80.40	81.46	80.13	84.02	81.23 ± 1.66

表 2 培养基中的辛硫磷变异系数

Table 2 Variation coefficient of phoxim in medium

变异系数 Variation coefficient	添加浓度 Added concentration (mg/L)	实测浓度 Detected concentration (mg/L)					CV (%)
		1	2	3	4	5	
日内变异系数 Intra-day coefficient of variation	0.2	0.178 1	0.182 7	0.187 6	0.173 4	0.174 1	3.34
	2.0	1.644 1	1.658 1	1.630 3	1.619 2	1.647 9	0.93
	20.0	16.020 2	15.559 9	16.087 6	15.653 2	16.022 0	1.53
日间变异系数 Intra-day coefficient of variation	0.2	0.181 7	0.179 8	0.185 1	0.182 4	0.179 3	1.27
	2.0	1.499 4	1.567 6	1.579 2	1.436 5	1.566 0	3.97
	20.0	15.264 6	15.469 3	15.134 0	15.356 1	15.007 5	1.19

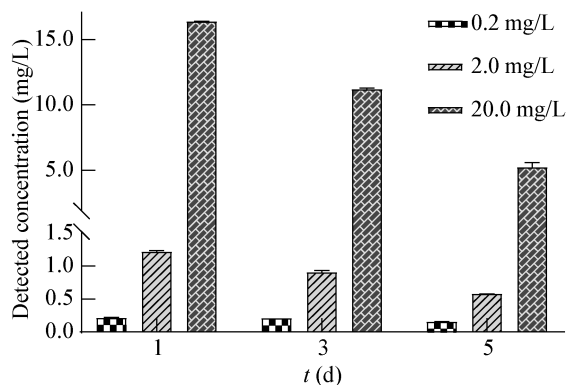


图 9 空白培养基中辛硫磷的降解

Figure 9 Degradation of phoxim in blank medium

图 10 为不同浓度辛硫磷在菌株 SPZ 实验组培养基中的降解情况, 由实际检测浓度变化可知, 20.0 mg/L 高浓度添加量下, 3 d 时辛硫磷浓度可降到 5.9–6.3 mg/L, 5 d 时锐减到 0.11 mg/L 左右; 2.0 mg/L 添加量下, 3 d 时辛硫磷浓度与 1 d 时浓度相差较小, 分别为 0.63–0.67 mg/L、0.87–0.92 mg/L, 相比之下, 5 d 时浓度下降明显, 可降解到 0.14–0.16 mg/L; 0.2 mg/L 添加量下, 1 d 时辛硫磷浓度降解到 0.13 mg/L 左右, 随后浓度基本保持不变。

图 11 为不同浓度辛硫磷在菌株 ST 实验组培养基中的降解情况, 由实际检测浓度变化可知, 20.0 mg/L 高浓度添加量下, 3 d 时辛硫磷可降解到

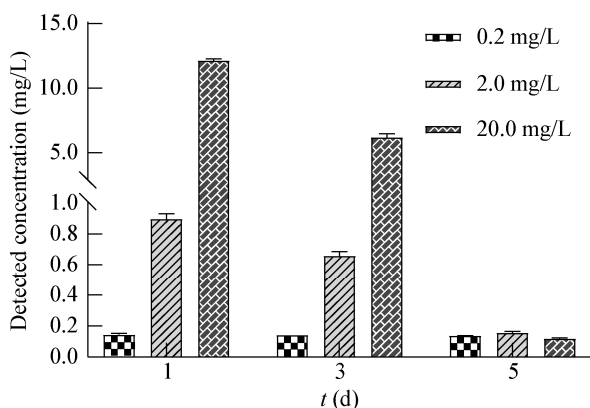


图 10 SPZ 实验组辛硫磷的降解

Figure 10 Degradation of phoxim by strain SPZ

4.8–5.1 mg/L, 5 d 时可降解至 0.28–0.33 mg/L; 2.0 mg/L 添加量下, 各时间点辛硫磷实测浓度与菌株 SPZ 实验组近似; 0.2 mg/L 添加量下, 1 d 时辛硫磷降解到 0.16 mg/L 左右, 随后浓度基本保持不变。

图 12 所示为菌株 SPZ 与菌株 ST 对辛硫磷的相对降解率分析, 由数据可以看出, 相对于空白对照组, 添加 20.0 mg/L 高浓度辛硫磷时, 实验组 3 d 时辛硫磷的相对降解率可达 46.63%–56.56%, 5 d 时的相对降解率可达 93.65%–97.72%; 添加 2.0 mg/L 中浓度辛硫磷时, 菌株 SPZ 对辛硫磷的相对降解率可达 74.41%, 菌株 ST 为 67.69%; 添加 0.2 mg/L 低浓度辛硫磷 5 d 时, 菌株 SPZ 在 1 d 时对辛硫磷的相对降解率最高, 为 34.59%, 在 5 d 时相对降解率最低, 仅为 10.34%左右, 而菌株 ST 在 1 d 时相对降解率最低, 仅为 21.78%, 在 3 d 时上升为 39.25%。综上可知, 菌株 SPZ 与菌株 ST 对高浓度辛硫磷均具有良好的降解效果, 但随着辛硫磷浓度的降低, 降解效果逐渐减弱。

2.5 光合细菌降解辛硫磷机制初探

辛硫磷在添加了菌株 SPZ 活菌、致死菌和无菌水的培养基中的降解情况如图 13 所示, 从数据可以看出, 加入活菌的体系中辛硫磷的峰面积减少值较无菌组显著增加, 较死菌组极显著增加。

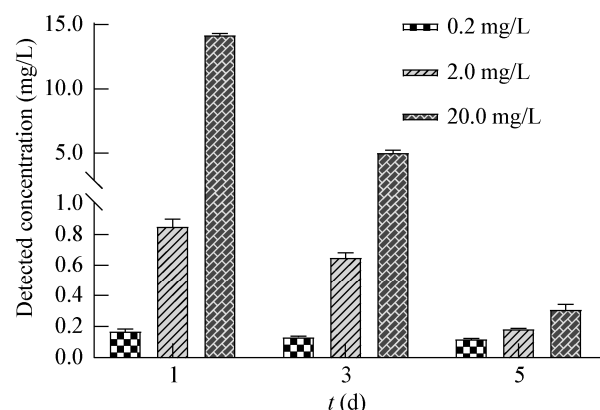


图 11 ST 实验组辛硫磷的降解

Figure 11 Degradation of phoxim by strain ST

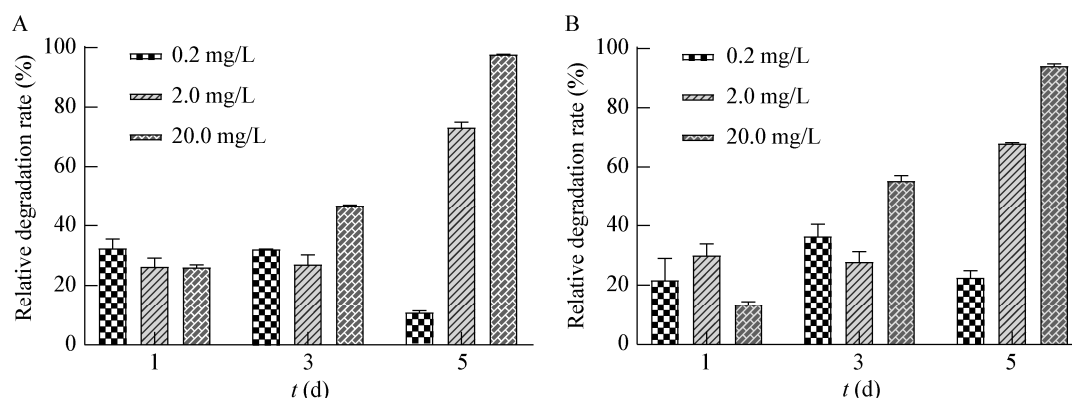


图 12 实验组辛硫磷的相对降解率

Figure 12 Relative degradation rate of phoxim by strains SPZ and ST

注: A: 菌株 SPZ 对辛硫磷的相对降解率; B: 菌株 ST 对辛硫磷的相对降解率

Note: A: Relative degradation rate of phoxim by SPZ strain; B: Relative degradation rate of phoxim by ST strain

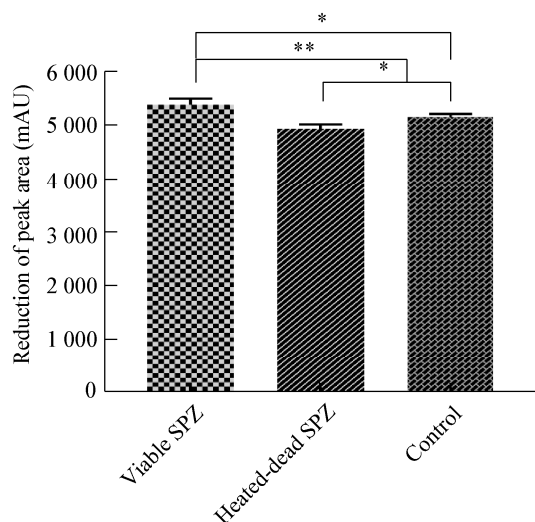


图 13 菌株 SPZ 降解辛硫磷机制初探

Figure 13 Degradation mechanism of phoxim by strain SPZ

注: *: $P < 0.05$, 差异显著; **: $P < 0.01$, 差异极显著

Note: *: $P < 0.05$, difference is significant at the 0.05 level; **: $P < 0.01$, difference is significant at the 0.01 level

3 讨论与结论

自 2007 年以来,我国全面禁止了甲基对硫磷、甲胺磷和磷胺等 5 种高毒性有机磷农药在畜牧养殖中的使用与销售。2008 年后,辛硫磷、毒死蜱等高效低毒的有机磷农药作为市面主导产品,代替了甲胺磷等高毒性有机磷农药,展现出良好

的应用前景。辛硫磷此类高效、低毒、低残留的广谱有机磷农药,对水生动物寄生虫疾病有良好的防控效果^[26]。虽然有机磷杀虫剂本身具有低毒且不易残留的特点,但是此类农药长期和大规模使用使得大量残留农药在水体和土壤中富集,一些中间代谢产物在较低的浓度便可对水生及陆生生物产生中等毒性^[27]。有研究报道^[28],低剂量的毒死蜱能够对雄性小鼠产生生殖毒性,而李宏辉等^[29]的实验结果也证明辛硫磷可导致成年雄性小鼠精子活率降低,畸形率增加。因此,积极找寻高效降解微生物,利用生物修复功能减少有机磷农药在水体及土壤中的积累具有深刻的现实意义。光合细菌作为一种水体有益菌,用途广泛且效益较高^[30-31],已有相关研究报道光合细菌能够降解水体有机农药,具有不可估量的应用潜力。

光密度趋势可以反映被测物质在一段时间内的生长趋势,被广泛应用于微生物研究中。本研究中通过定时测定光合细菌在 660 nm 波长处的 OD 值,确定了最佳接种条件为 10% (体积分数)。添加辛硫磷药物后,光合细菌菌液 OD 值的变化能够直观反映药物对光合细菌生长产生的作用。本研究表明,当辛硫磷添加浓度在 10 mg/L 以下时,其对光合细菌的生长表现为促进作用,光合细菌长势略

优于不加辛硫磷的空白组, 而浓度在 100 mg/L 以上时, 辛硫磷对光合细菌表现出明显的抑制生长作用, 随着浓度进一步增大, 生长期 OD_{660} 峰值继续减小。有研究表明, 光合细菌可能利用农药的主要成分作为外加碳源从而发挥对农药的吸收降解作用^[32-34], 本研究结果发现, 辛硫磷不能作为菌株 SPZ 的唯一碳源或者唯一磷源供其生长, 但当作为外加碳源时, 低浓度辛硫磷对菌株 SPZ 生长有一定促进作用。李乐^[18]研究了甲胺磷、氧化乐果和久效磷与光合细菌的相互作用, 发现经过高浓度有机磷农药驯化后, 光合细菌可耐受 1 000 mg/L 以内的有机磷农药, 光合细菌对农药的耐受程度受到农药种类、细菌种类、培养条件及菌种驯化等多种因素影响。

水体中有机农药的检测包括气相色谱、液相色谱、免疫测定、电化学检测等多种方法^[35]。高效液相色谱(HPLC)法具有分离效率高、选择性好和分析速度快等优点, 常搭配紫外检测器进行检测, 几乎可以分析水体中所有非挥发性有机农药。本研究中采用了 HPLC 法测定了不同时间点水体中辛硫磷的残留含量, 结果表明, 菌株 SPZ 对高浓度辛硫磷有理想的降解效果, 5 d 内可使 20.0 mg/L 的辛硫磷浓度降至 0.11 mg/L, 相对降解率最高可达 97.72%。当水体辛硫磷浓度减少至 0.2 mg/L 时, 菌株 SPZ 对辛硫磷相对降解率较低, 为 10.34%–24.27%。相比低浓度辛硫磷处理组, 菌株 SPZ 对高浓度辛硫磷有更好的降解效果, 这可能是因为高浓度农药为光合细菌生长提供了足量的外加碳源, 使其能够发挥理想的吸收降解作用, 而低浓度农药组因碳源不足, 使得生长平稳期的光合细菌在短期内进入生长衰退期进而无法发挥全部的分解能力。张德咏等^[36]从农药工厂废水中分离到一株光合细菌, 自培养初期开始加药, 7 d 时对 1 000 mg/L 和 500 mg/L 甲胺磷降解率分别达 49.6%和 65.2%; 李乐^[18]对光合细菌进行固定, 发现固定化光合细菌在 24 h 时对 1 000 mg/L 氧化乐果

有 63.02%的降解率, 4 d 时降解率可达 90.79%。李淑秀等^[37]测定了 6 种野生型微生物固定化菌体和酶提取物对对氧磷、甲基对氧磷和敌敌畏、毒死蜱等农药的水解效果, 发现嗜铬链霉菌(*Streptomyces phaeochromogenes*)固定化菌体及其酶提取物均可将 98%左右毒死蜱转化为其水解产物。固定化细菌可避免菌体流失、提高农药耐受, 因而可考虑进一步对光合细菌进行固定化处理, 从而更好地发挥微生物降解功能。

本研究通过比较相同条件下菌株 SPZ 活菌与其加热致死菌对辛硫磷的降解情况, 以 HPLC 法检测得到的药物峰面积减少值作为评判标准, 结果可以看出, 正常状态及加热致死状态下, 菌株 SPZ 均能促进水体中辛硫磷的降解, 活菌组辛硫磷降解较死菌组极显著增加, 说明除了菌体表面的物理吸附外, 菌株 SPZ 活菌对辛硫磷还存在更为主要的生物利用, 菌株 SPZ 主要是通过生化降解途径达到吸收降解辛硫磷的效果, 这一结果与史艳可^[38]的实验结果相类似。

辛硫磷作为广谱类有机磷杀虫剂, 其常用田间浓度为 0.2 mg/L 左右^[31]。根据 2017 年版兽药质量标准, 水产用辛硫磷含量为 100、200、500 g/L 时, 其水产用量分别为 0.100–0.120 mL/m³、0.050–0.060 mL/m³ 和 0.025–0.030 mL/m³^[39], 泼洒后水体辛硫磷浓度为 1.0–1.2 mg/L。在辛硫磷降解过程中, 去除水解与光解效应, 其中 80%左右的有机磷农药直接进入到水体环境中, 而且绝大部分经生物圈物质循环后将再次汇聚到水体中。本研究中利用常用田间浓度作为低浓度处理组, 以 10 倍和 100 倍田间浓度结作为中浓度与高浓度处理组, 结果发现, 当辛硫磷浓度处以上范围时, 光合细菌此类益生菌可在有机磷农药降解中发挥微生物降解优势从而加快高浓度有机磷向低浓度有机磷转化, 这对于发掘更高效的有机农药降解菌株、开发更适宜的降解条件具有指导意义。

REFERENCES

- [1] Qiu SN, Zhao QQ, Fang J, Shi BM. Research progress on the toxicity of organophosphorus pesticides on animals[J]. Feed Industry, 2020, 41(23): 58-64 (in Chinese)
邱胜男, 赵倩倩, 方静, 石宝明. 有机磷农药对动物毒性作用的研究进展[J]. 饲料工业, 2020, 41(23): 58-64
- [2] Wang W, He HW, Wang LP, Ning BK, Wang HY, Mao MZ, Wang CB, He QW, Xue C. Organic phosphorus pesticides and their development[J]. Agrochemicals, 2016, 55(2): 86-90 (in Chinese)
王威, 贺红武, 王列平, 宁斌科, 王海洋, 毛明珍, 王储备, 何琦文, 薛超. 有机磷农药及其研发概况[J]. 农药, 2016, 55(2): 86-90
- [3] Cui XY, Meng ZL, Liu ZK, Fan JX, Zhou WF. Detection of 35 pesticide residues in tea by GC-MS/MS and UPLC-MS/MS[A]//Chinese Chemical Society. Proceedings of the First Symposium on Agricultural Chemistry of the Chinese Chemical Society[C]. Chinese Chemical Society: Chinese Chemical Society, 2019 (in Chinese)
崔笑颜, 孟子琳, 刘子恺, 范嘉轩, 周文峰. GC-MS/MS 和 UPLC-MS/MS 法检测茶叶中 35 种农药残留[A]//中国化学会. 中国化学会第一届农业化学学术讨论会论文集[C]. 中国化学会:中国化学会, 2019
- [4] Pham B, Miranda A, Allinson G, Nugegoda D. Evaluating the non-lethal effects of organophosphorus and carbamate insecticides on the yabby (*Cherax destructor*) using cholinesterase (AChE, BChE), glutathione S-transferase and ATPase as biomarkers[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 143: 283-288
- [5] Mohamed WR, Mehany ABM, Hussein RM. Alpha lipoic acid protects against chlorpyrifos-induced toxicity in Wistar rats via modulating the apoptotic pathway[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2018, 59: 17-23
- [6] Chebab S, Mekircha F, Leghouchi E. Potential protective effect of *Pistacia lentiscus* oil against chlorpyrifos-induced hormonal changes and oxidative damage in ovaries and thyroid of female rats[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 96: 1310-1316
- [7] John EM, Shaik JM. Chlorpyrifos: pollution and remediation[J]. Environmental Chemistry Letters, 2015, 13(3): 269-291
- [8] Ogasawara N, Matsushima M, Kawamura N, Atsumi K, Yamaguchi T, Ochi H, Kusatsugu Y, Oyabu S, Hashimoto N, Hasegawa Y, et al. Modulation of immunological activity on macrophages induced by diazinon[J]. Toxicology, 2017, 379: 22-30
- [9] Shi WR. Distribution and inhibition of AChE of phoxim to crucian carp (*Carassius auratus*)[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese)
石旺荣. 辛硫磷在鲫鱼体内分布及对鱼体 AChE 活性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2011
- [10] Pei L, Zhang TB, Zhao N, Liu HM. Advance in application research and methods of organophosphorus pesticide degradation[J]. Environmental Engineering, 2011, 29(S1): 273-277,174 (in Chinese)
裴亮, 张体彬, 赵楠, 刘慧明. 有机磷农药降解方法及应用研究新进展[J]. 环境工程, 2011, 29(S1): 273-277,174
- [11] Li CQ, Wei SM, Wang RB, Chang GH, Sun HL. Research progress on microbial degradation of organophosphorus pesticides[J]. Journal of Green Science and Technology, 2019(10): 120-122 (in Chinese)
李春琴, 魏淑梅, 王瑞兵, 常国华, 孙海丽. 有机磷农药微生物降解的研究进展[J]. 绿色科技, 2019(10): 120-122
- [12] Zhang HH, Wang Y, Liu KW, Huang TL, Li N, Yang SY, Si F, Miao YT, Huang X, Zhang MY. Aerobic anoxygenic photosynthesis bacteria (AAPB) associated with aquatic ecosystems[J]. Journal of Lake Sciences, 2020, 32(6): 1585-1598 (in Chinese)
张海涵, 王燕, 刘凯文, 黄廷林, 李楠, 杨尚业, 司凡, 苗雨甜, 黄鑫, 张梦瑶. 水域生境好氧不产氧光合细菌 (AAPB)研究进展[J]. 湖泊科学, 2020, 32(6): 1585-1598
- [13] Chen Q, Zhang XX, Zhao H, Guan JF. Advance in research and application of microbial ecological agent in aquaculture[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2012, 18(3): 524-530 (in Chinese)
陈谦, 张新雄, 赵海, 官家发. 用于水产养殖的微生态制剂的研究和应用进展[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(3): 524-530
- [14] Zhang GM, Meng F, Cao KF, Zhi R. Research progress in resource recovery of wastewater by photosynthetic bacteria (PSB)[J]. Industrial Water Treatment, 2020, 40(3): 1-6 (in Chinese)
张光明, 孟帆, 曹可凡, 郅然. 光合细菌污水资源化研究进展[J]. 工业水处理, 2020, 40(3): 1-6
- [15] Lu JC, Huang XH, Li H, Fang RL. Effect of photosynthetic bacteria on water quality and anti-disease ability of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2009, 29(6): 87-91 (in Chinese)
陆家昌, 黄翔鸽, 李活, 方锐林. 光合细菌对养殖水质及凡纳滨对虾抗病力的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(6): 87-91
- [16] Zheng YT, Hu KH. Purification of water quality by immobilized photosynthetic bacteria for fish culturing[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6(4): 55-58 (in Chinese)
郑耀通, 胡开辉. 固定化光合细菌净化养鱼水质试验[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 55-58

- [17] Gong XW, Cai WQ, Ma JY. A study on improvement of S_{30} and PSB in water quality for *Trionyx sinensis* in greenhouse[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(2): 116-118 (in Chinese)
宫兴文, 蔡完其, 马江耀. 玉垒菌(S_{30})和光合细菌(PSB)对温室养鳖池水质改良作用的研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 116-118
- [18] Li L. Studies on the proliferation of photosynthetic bacteria and its degradation of organophosphate pesticides[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2006 (in Chinese)
李乐. 光合细菌的增殖培养及对有机磷农药的降解[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2006
- [19] Zhang LP, Zhang YX. Relieving to organophorus pesticide injury of *Hordeum vulgare* by photosynthetic bacteria[J]. Journal of Shanxi University: Natural Science Edition, 2005, 28(1): 94-97 (in Chinese)
张丽萍, 张义贤. 光合细菌对有机磷农药毒害大麦的缓解作用[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2005, 28(1): 94-97
- [20] Zhang WD, Liu P, Li EF, Xia XF, Liu J. Application of biotechnology to environment governance[J]. Journal of Chongqing Technology and Business University: Natural Science Edition, 2011, 28(4): 401-405 (in Chinese)
张文东, 刘鹏, 李二飞, 夏晓芳, 刘洁. 生物技术在环境治理中的应用[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2011, 28(4): 401-405
- [21] Lei YZ, Li KZ. Isolation and identification of one strain of photosynthetic bacteria and its ability to degrade formaldehyde[J]. Chinese Journal of Microecology, 2017, 29(3): 261-267 (in Chinese)
雷玉珠, 李昆志. 一株光合细菌的分离鉴定及其净化甲醛能力的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(3): 261-267
- [22] He CH. Research on separation, identification, growth conditions of photosynthetic bacteria and application pre-test[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2009 (in Chinese)
何春华. 光合细菌的分离鉴定和生长条件优化及应用初探[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2009
- [23] Carlozzi P, Pushparaj B, Degl'Innocenti A, Capperucci A. Growth characteristics of *Rhodospseudomonas palustris* cultured outdoors, in an underwater tubular photobioreactor, and investigation on photosynthetic efficiency[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(4): 789-795
- [24] Feng YZ, Lin XG, Wang YM. The paraffin wax overlay plate method for purple nonsulfur bacteria[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1435-1442 (in Chinese)
冯有智, 林先贵, 王一鸣. 紫色非硫细菌固体石蜡双层平板培养法[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1435-1442
- [25] Du LN, Wang B, Li G, Wang S, Crowley DE, Zhao YH. Biosorption of the metal-complex dye Acid Black 172 by live and heat-treated biomass of *Pseudomonas* sp. strain DY1: kinetics and sorption mechanisms[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 205: 47-54
- [26] Yang XL, Zhan J, Huang YP. Progress on research of toxic effect of organophosphorous pesticides on aquatic organism[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2002, 11(4): 378-382 (in Chinese)
杨先乐, 湛嘉, 黄艳平. 有机磷农药对水生生物毒性影响的研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(4): 378-382
- [27] Cao L, Xu L. Research progress in microbial degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 1158-1164 (in Chinese)
曹礼, 徐琳. 微生物降解 3,5,6-三氯-2-吡啶醇的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 1158-1164
- [28] Jiao LF, Yan CH, Zhao J, Jia L, He J, Peng SQ. Reproductive toxicity of low-level chlorpyrifos repeated exposure and its mechanisms in male rats[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2011, 25(6): 568-575 (in Chinese)
焦利飞, 闫长会, 赵君, 贾栗, 何俊, 彭双清. 低剂量毒死蜱重复染毒诱发雄性大鼠生殖毒性及其机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(6): 568-575
- [29] Li HH, Liu XF, Ma X, Zhang GQ. Toxic effects of phoxim and methomyl on male germ cells[J]. Journal of Northwest Medical University, 2009, 31(5): 582-584 (in Chinese)
李宏辉, 刘秀芳, 马潇, 张国奇. 辛硫磷和灭多威混配对雄性小鼠生殖细胞的毒性作用[J]. 宁夏医科大学学报, 2009, 31(5): 582-584
- [30] Zhao RH, Lu HF. Research progress of poly- β -hydroxybutyrate production by photosynthetic bacteria [J]. Chinese Journal of Microbiology, 201, 48(5): 1703-1716
赵芮晗, 卢海凤. 利用光合细菌生产聚- β -羟基丁酸酯的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1703-1716
- [31] Li XJ, Zhao X, Li JX, Zhu DS, Shi DH, Hu XM. Research and application progress of photosynthetic bacteria in environment fields[J]. Environmental Science and Management, 2016, 41(10): 32-35 (in Chinese)
李雪洁, 赵鑫, 李嘉欣, 朱得食, 石登焕, 胡筱敏. 光合细菌在环境领域的研究与应用进展[J]. 环境科学与管理, 2016, 41(10): 32-35
- [32] Guo RR, Xiang SN, Xia T, Chen ZB. Effects of photosynthesis bacteria on cypermethrin degradation[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2009, 27(4): 471-474 (in Chinese)

- 郭冉冉, 向少能, 夏婷, 陈章宝. 光合细菌对氯氰菊酯的降解作用[J]. 四川农业大学学报, 2009, 27(4): 471-474
- [33] Zhang C, Li JX. Mechanism of organic phosphorus pesticide degradation by microorganism[J]. Pesticide Science and Administration, 2006, 27(4): 29-33 (in Chinese)
- 张超, 李冀新. 微生物降解有机磷农药残留机理及菌种筛选研究进展[J]. 农药科学与管理, 2006, 27(4): 29-33
- [34] Li SX, Zhang XP, Zhao HQ. Application of a bacterial strain S3 to degrading several kinds of organophosphate pesticides[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2011, 38(2): 244-247 (in Chinese)
- 李淑秀, 张秀平, 赵海泉. 一株高效降解有机磷农药的菌株 S3 的应用研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(2): 244-247
- [35] Liu YC, Wang Y, Dong JK, Qin H, Zhang Y, Zhang K. Research progress on determination methods for organic pesticides in water[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2020, 39(5): 688-696 (in Chinese)
- 刘玉灿, 王颖, 董金坤, 秦昊, 张岩, 张坤. 水中有机农药分析方法研究进展[J]. 分析测试学报, 2020, 39(5): 688-696
- [36] Zhang DY, Tan XQ, Luo XW, Zhu CH, Luo YH, He MY, Dai JP, Zhang ZH, Liu Y. Isolation of photosynthetic bacteria HP-1 with degradation of organic-phosphorus insecticides and studies on its biodegradation ability and capacity of increasing growth[J]. Life Science Research, 2005, 9(3): 247-253 (in Chinese)
- 张德咏, 谭新球, 罗香文, 朱春晖, 罗源华, 何明远, 戴建平, 张战泓, 刘勇. 一株能降解有机磷农药甲胺磷的光合细菌 HP-1 的分离及生物学特性的研究[J]. 生命科学研究, 2005, 9(3): 247-253
- [37] Li SX, Zhang XP, Zhao HQ. Application of a bacterial strain S3 to degrading several kinds of organophosphate pesticides[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2011, 38(2): 244-247 (in Chinese)
- 李淑秀, 张秀平, 赵海泉. 一株高效降解有机磷农药的菌株 S3 的应用研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(2): 244-247
- [38] Shi YK. Preliminary study on degradation characteristics and drug resistance mechanism of oxytetracycline-degrading strain OTC-16[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2019 (in Chinese)
- 史艳可. 土霉素高效降解菌 OTC-16 的降解特性及耐药性初探[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2019
- [39] Yang XL, Guo WW, Sun Q. Food-safety and standard use of fishery drugs on aquatic products[J]. Chinese Journal of Fishery Quality and Standards, 2013, 3(4): 1-6 (in Chinese)
- 杨先乐, 郭微微, 孙琪. 水产品质量安全与渔药的规范使用[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(4): 1-6