



农药对海洋微藻中肋骨条藻的毒性效应及其生物降解

张子莲^{1,3*}, 陈秋兰⁵, 陈博^{2,4}, 董陶杰², 陈猛^{1,2†}

1. 近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 厦门 361102;
2. 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门大学环境与生态学院, 厦门 361102;
3. 福建省海洋碳汇重点实验室, 厦门大学海洋与地球学院, 厦门 361102;
4. 河北大学生命科学学院, 保定 071000;
5. 福建省泉州环境监测中心站, 泉州 362000

* 通讯作者, E-mail: zhangzilian@xmu.edu.cn

† 通讯作者, E-mail: mengchen@xmu.edu.cn

收稿日期: 2022-07-26; 收修改稿日期: 2022-12-27; 接受日期: 2023-01-09; 网络版发表日期: 2023-02-22

国家重点研发计划项目(编号: 2016YFA0601400)和国家自然科学基金项目(批准号: 42188102、42141003、41861144018)资助

摘要 农药危害人畜健康并对环境造成污染, 因此被认为是毒性污染物. 毒死蜱、乙草胺和三氯杀螨醇作为有机磷、酰胺和有机氯类农药的代表在农业中被广泛应用, 并在水生环境中被普遍检出. 然而, 农药对海洋微生物的毒性尚不明确. 本研究分析了农药对典型海洋微藻——中肋骨条藻的毒性效应. 用三种农药单独或联合处理中肋骨条藻, 通过分析处理过程中藻细胞密度和叶绿素 a 含量, 研究了农药对中肋骨条藻的毒性效应. 同时, 对培养基中氮/磷比的变化和农药的降解也进行了分析. 单一农药的急性毒性分析表明, 乙草胺对中肋骨条藻的生长具有最显著的抑制作用, 其次是三氯杀螨醇和毒死蜱. 乙草胺破坏了中肋骨条藻的细胞膜. 不同农药组合的联合毒性分析表明, 乙草胺加剧了三氯杀螨醇和毒死蜱的毒性. 相反, 三氯杀螨醇的存在降低了乙草胺和毒死蜱的毒性. 在中肋骨条藻生长后期, 培养基中氮/磷比明显升高, 但毒死蜱处理组培养基中氮/磷比值显著低于乙草胺和三氯杀螨醇处理组. 研究发现中肋骨条藻促进了农药的降解, 说明微藻可能有助于海洋环境中这些农药的去除. 然而, 农药对海洋微藻的毒性机制和农药在海洋中的最终去向仍需更深入的研究.

关键词 微藻, 农药, 毒性, 降解, 中肋骨条藻

1 引言

农药是现代农业系统中必不可少的化学物质, 其通过控制杂草、昆虫和植物病害来显著提高作物和粮食产量(Bondareva 和Fedorova, 2021). 全球每年农药使

用量约为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 吨(Jiao等, 2019). 中国是农业大国, 平均每公顷农药使用量约为全球平均水平的1.5~4倍(Zhang等, 2015; Lai, 2017). 农药一般针对目标生物而选用, 但是只有不到1%的农药能到达目标生物, 而大部分进入大气、土壤和水体中, 最终汇入海洋

中文引用格式: 张子莲, 陈秋兰, 陈博, 董陶杰, 陈猛. 2023. 农药对海洋微藻中肋骨条藻的毒性效应及其生物降解. 中国科学: 地球科学, 53(3): 644–655, doi: 10.1360/N072022-0213

英文引用格式: Zhang Z, Chen Q, Chen B, Dong T, Chen M. 2023. Toxic effects of pesticides on the marine microalga *Skeletonema costatum* and their biological degradation. Science China Earth Sciences, 66(3): 663–674, <https://doi.org/10.1007/s11430-022-1064-7>

(Vymazal和Březinová, 2015; Tsaboula等, 2019). 因此, 农药残留已成为水污染的主要原因之一(Sun等, 2019).

疏水性农药毒死蜱、乙草胺和三氯杀螨醇分别属于有机磷、氯乙酰胺和有机氯类农药, 因其生物活性高及成本低的特点被广泛用于农业生产(Hu等, 2020), 并且也广泛分布于水体环境(Xiao等, 2017; Lei等, 2018; Hu等, 2020; Li等, 2021). 在中国大连饮用水源碧流河水库的地表水中可检测到乙草胺, 最高浓度达到 61.9 ng L^{-1} (Dong等, 2019). 而对中国七个典型流域的农药分布开展的调查发现, 在80%以上的取样点中检测到包括乙草胺在内的五种农药, 平均浓度为 $5.62\sim 225.93\text{ ng L}^{-1}$ (Xu等, 2019). 在中国福建省第二大河流九龙江的水体和沉积物中普遍检测到三氯杀螨醇(Zheng等, 2016). 毒死蜱和三氯杀螨醇不仅分布于沿海表层海水中(Liu等, 2018; Ivorra等, 2019), 也在西太平洋的沉积物中被检测到(Ge等, 2021). 这些结果表明, 农药是环境中持久且难以降解的污染物.

虽然在环境中检测到的农药含量可能较低, 但是通过生物富集和生物放大作用, 其浓度可达到初始浓度的7万倍(Kim等, 2016), 并且施用后95%以上的农药可能会影响到水生无脊椎动物、两栖动物、鸟类、有益昆虫和宠物等非目标生物(Affum等, 2018). 例如, 毒死蜱可以改变鱼类和水生无脊椎动物群落, 从而影响生物的多样性(Affum等, 2018). 研究者以斑马鱼为模式生物研究了手性乙草胺的神经毒性, 结果表明, 乙草胺可以影响斑马鱼幼体的运动行为, 并在斑马鱼的早

期发育过程中诱发神经毒素(Sarangi等, 2019). 总体而言, 有关农药毒性的研究主要集中于高等生物.

硅藻是能进行光合作用的单细胞原生生物, 也是分布最广的微藻, 对海洋和淡水环境中的全球初级生产力和生物地球化学循环具有重要作用(Falciatore等, 2020). 然而, 有关农药对微藻毒性的研究较少. 微藻中肋骨条藻*Skeletonema costatum* (*S. costatum*)是一种浮游硅藻, 广泛分布于沿海水域. 中肋骨条藻已被用作模式微藻物种来分析聚苯乙烯颗粒及重金属汞等有机或无机污染物的毒性效应(Yi等, 2019; Zhang等, 2019; Ding等, 2019; Zhu等, 2020).

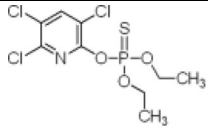
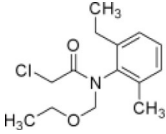
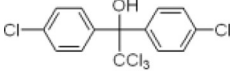
本研究利用三种具有代表性的农药(包括毒死蜱、三氯杀螨醇和乙草胺)来单独或联合处理中肋骨条藻, 分析了处理过程中微藻的细胞密度和叶绿素 a 含量, 以揭示农药对海洋微藻的毒性效应. 并分析了微藻对这三种农药的降解, 以阐释农药在海洋环境中的去向. 本研究系统分析了多种农药的毒性效应, 有助于更精准地评估农药的风险.

2 材料和方法

2.1 化合物和微藻种

农药毒死蜱、三氯杀螨醇和乙草胺购自Dr. Ehrenstorfer GmbH(德国), 其化学性质见表1. 其余化学试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司(中国). 微藻中肋骨条藻由厦门大学近海海洋环境科学国家重点

表 1 三种农药的理化性质

农药名称	CAS编号	化学名称	结构式	LogKow	水中的溶解度 (mg L^{-1} , 25°C)	沸点 ($^{\circ}\text{C}$)
毒死蜱	2921-88-2	O,O-二乙基-O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫代磷酸酯		3.78	1.4	375.9
乙草胺	34256-82-1	2'-乙基-6'-甲基-N-(乙氧甲基)-2-氯代乙酰替苯胺		5.19	223	391.5
三氯杀螨醇	115-32-2	1,1-双(4-氯苯基)-2,2,2-三氯乙醇		4.28	0.8	454.73

实验室海洋细菌与浮游植物收集中心提供。

2.2 中肋骨条藻的培养

海水取自厦门沿海, 用0.45 μm 滤膜过滤两次, 高温高压灭菌后用于制备 $f/2$ 培养基(Guillard和Ryther, 1962)。将中肋骨条藻以 $5 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ 的密度接种到培养基中, 在20 $^{\circ}\text{C}$ 及4500 Lx光强下培养, 光暗周期为14h光照及10h黑暗。培养期间每天摇动三角瓶一次。通过检测细胞密度(cells mL^{-1})和叶绿素 a 含量($\text{Chl-}a$, mg L^{-1})来分析培养期间中肋骨条藻的生长。所有实验均设有两次重复, 实验数据为两次重复的平均值。

2.3 三种农药对中肋骨条藻的毒性效应

2.3.1 急性毒性分析

利用培养实验分析了三种农药的单独急性毒性效应。培养实验是在250mL三角瓶中开展。将终浓度分别为0.1、0.3、0.4、0.5和0.6 mg L^{-1} 的毒死蜱, 0.01、0.025、0.05、0.1和0.25 mg L^{-1} 的乙草胺, 0.1、0.2、0.3、0.4和0.5 mg L^{-1} 的三氯杀螨醇添加至三角瓶中, 用氮气吹干, 以去除农药溶液中的甲醇, 然后加入培养基。以不添加农药的培养作为对照。在接种中肋骨条藻24、48、72和96h后采集样品, 分析细胞密度以监测微藻的生长。

按照Berkson Logit法计算24、48、72和96h的半抑制效应浓度(EC_{50})。通过公式(1)计算细胞生长速率 U_t ,

$$U_t = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}, \quad (1)$$

其中, U_t 是指是在时间 $t(\text{d})$ 时的细胞生长速率($\text{cells mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$); N_t 和 N_0 分别是在时间 t 和起始时间的细胞数量(cells mL^{-1})。

用公式(2)计算细胞生长抑制率 I (%) (Šepić等, 2003),

$$I = \frac{U_c - U_t}{U_c} \times 100. \quad (2)$$

其中, U_c 和 U_t 分别是对照和处理在时间 t 的细胞生长速率($\text{cells mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$)。

通过Logit变换将S形的量-效曲线转化为直线。用公式(3)计算浓度效应,

$$\text{Log} \frac{I_i}{100 - I_i} = A + B \text{Log} C_i. \quad (3)$$

其中, I_i 为处理组 i 中与农药浓度 C_i (mg L^{-1})对应的细胞生长抑制率(%). 将回归方程进行 F 检验, $p < 0.05$ 表明结果可靠。当抑制率为50%时, 用公式(3)计算 EC_{50} 和置信区间。

根据单一农药的毒性实验结果, 按照毒性单位(TU)将两种或三种农药以1:1或1:1:1的比例混合, 联合处理中肋骨条藻, 以分析农药的联合急性毒性效应。在本研究中, 农药组合的急性毒性实验采用了五个毒性单位(TU)梯度(0.05、0.1、0.3、0.5和0.70), 在此梯度下各农药的浓度分别为, 0.0286、0.0572、0.172、0.286和0.400 mg L^{-1} 毒死蜱, 0.007、0.014、0.042、0.070和0.098 mg L^{-1} 乙草胺, 及0.0215、0.0430、0.129、0.215和0.301 mg L^{-1} 三氯杀螨醇。将中肋骨条藻培养96h, 每24h取样检测细胞密度。实验设置两次重复, 取结果的平均值用于数据分析。

采用公式(4)(Marking, 1977), 通过相加指数法计算和评价农药组合的急性毒性效应,

$$S = \frac{C_1}{\text{EC}_{50,1}} + \frac{C_2}{\text{EC}_{50,2}} + \frac{C_3}{\text{EC}_{50,3}} + \dots + \frac{C_i}{\text{EC}_{50,i}}, \quad (4)$$

$$S \leq 1, AI = \frac{1}{S} - 1.0; S > 1, AI = 1.0 - S.$$

其中, S 是毒性效应的总和; C_i 和 $\text{EC}_{50,i}$ ($i=1, 2, 3, \dots, n$)分别表示混合物在半抑制效应时第 i 组分的浓度和第 i 个农药单独作用时的 EC_{50} 值。

通过计算 AI 值来评估农药的联合效应。 $AI > 0$ 说明农药之间存在协同作用, $AI < 0$ 说明存在拮抗作用, $AI = 0$ 说明存在相加作用。

2.3.2 慢性毒性分析

Pikula等(2019)曾用生物柴油处理海洋微藻7天, 以分析其慢性毒性效应。本研究在单个农药急性毒性分析的基础上, 用各农药在96h EC_{50} 值的0.1、0.5和1.0倍的浓度处理中肋骨条藻16天(整个生长周期), 以分析三种农药的慢性毒性效应。在培养期间, 每天取样检测微藻的细胞密度及叶绿素 a 含量。

2.4 农药的降解

以各个农药96h EC_{50} 值的0.1倍浓度作为初始浓度进行农药降解实验。在单个农药的降解实验中, 各农药的初始浓度分别为毒死蜱0.0572 mg L^{-1} 、乙草胺

0.014mg L⁻¹和三氯杀螨醇0.0430mg L⁻¹. 在两种农药混合的降解实验中, 各农药的初始浓度组合分别为毒死蜱0.0237mg L⁻¹和乙草胺0.0058mg L⁻¹、毒死蜱0.0405mg L⁻¹和三氯杀螨醇0.0304mg L⁻¹、乙草胺0.0080mg L⁻¹和三氯杀螨醇0.0245mg L⁻¹. 在三种农药混合降解实验中, 毒死蜱、乙草胺和三氯杀螨醇的初始浓度分别为0.0323、0.0079和0.0245mg L⁻¹. 在培养期间检测各处理培养基中农药的浓度.

2.5 分析方法

2.5.1 细胞密度分析和细胞形态学观察

为检测中肋骨条藻的细胞密度, 取1mL培养液在其中加入20μL Logul碘溶液以固定细胞, 在显微镜(Leica DME B/CA, 德国)下对细胞进行计数. Logul碘溶液是将1.0g碘和1.5g碘化钾溶解在装有25mL蒸馏水的棕色试剂瓶中制备而成. 用乙草胺(0.01、0.025、0.05、0.1、0.25mg L⁻¹)处理中肋骨条藻96h后采样, 在荧光显微镜(Axioskop40 FL, 德国)下观察细胞形态.

2.5.2 叶绿素 a 含量分析

取50mL中肋骨条藻培养液, 用0.45μm醋酸纤维素膜过滤收集细胞. 用10mL丙酮(90%)从醋酸纤维素膜上的细胞中提取叶绿素 a , 最后用分光光度法分析培养液中叶绿素 a 的含量(Brand等, 1981).

2.5.3 气相色谱-质谱法分析农药的浓度

为了分析培养基中农药的浓度, 在培养过程中不同时间点收集50mL培养液, 并用GF/F过滤器(直径: 47mm, 孔径: 0.7mm, 450°C下燃烧4h预处理)过滤. 向滤液中加入25μL浓度为5mg L⁻¹的替代标准品(磷酸三丁酯、丁草胺和四氯二苯砷)(Dr. Ehrenstorfer GmbH, 德国), 然后利用C18固相萃取柱(ENV118, Supelco, 美国)进行萃取. 用氮气吹干萃取柱30min, 然后用5mL甲醇洗脱. 洗脱液经氮气干燥后用1mL丙酮-己烷(1:1体积比)混合液溶解, 经0.22μm尼龙过滤器过滤, 用于后续分析.

用配备了DB-5MS毛细管柱(50m×0.25mm, 0.25μm)的气相色谱-质谱仪(Agilent7890-5975B, Agilent, USA)来测定农药浓度. 柱温箱起始温度设为80°C并保持2min. 随后以10°C min⁻¹的速度升至166°C后保持1min, 以2°C min⁻¹的速度升至178°C后保持4min, 以

2°C min⁻¹的速度升至186°C后保持5min, 以3°C min⁻¹的速度升至230°C后保持7min. 最后以8°C min⁻¹的速度升至300°C后保持20min. 传输线和电离源的温度分别为300°C和285°C. 载气为高纯度氦气, 流速为1.0mL min⁻¹, 进样口温度为260°C, 进样量为2.0μL.

2.5.4 培养基中活性磷和氮的分析

在培养期间检测了培养基中活性磷和氮的浓度变化, 其中活性磷酸盐浓度按照Ohashi等(1978)方法分析, 硝酸盐/亚硝酸盐浓度采用流动注射法(Johnson和Petty, 1983)检测.

3 结果和讨论

通过检测细胞密度和叶绿素 a 含量来监测中肋骨条藻的生长情况, 根据这两种检测的结果绘制出的生长曲线相似(图1). 接种后细胞密度和叶绿素含量均呈增长趋势, 无明显的缓慢生长期, 这可能与微藻具有良好的生长条件、较高的初始细胞密度(5×10^4 cells mL⁻¹)及培养基中有充足的养分等有关. 细胞密度在第12天达到最大值, 约为 1.33×10^6 cells mL⁻¹; 而叶绿素 a 含量在第14天达到最大值, 约为1.25mg L⁻¹, 略晚于细胞密度达到峰值的时间; 之后, 中肋骨条藻的生长迅速下降. 将中肋骨条藻暴露于农药后, 通过测定细胞密度和叶绿素 a 含量, 分析了农药对中肋骨条藻的毒性效应.

3.1 三种农药对中肋骨条藻的单一毒性效应

3.1.1 急性毒性效应

用不同浓度的三种农药分别单独处理中肋骨条藻, 分析了接种后96h之内的细胞密度的变化. 根据中肋骨条藻的生长曲线, 计算在接种后24、48、72和96h的EC₅₀值. 如图2所示, 毒死蜱对中肋骨条藻的EC₅₀值随培养时间延长而逐渐升高, 表明毒死蜱的毒性效应随培养时间延长而逐渐降低; 乙草胺和三氯杀螨醇对中肋骨条藻的EC₅₀值在24h到72h优势增加, 其后略有下降, 表明乙草胺和三氯杀螨醇的毒性效应呈先减少后增加的趋势. 在不同时间点三种农药的EC₅₀值之间存在显著差异 ($p < 0.05$), 并呈相同趋势: 毒死蜱>三氯杀螨醇>乙草胺. 结果表明, 中肋骨条藻对乙草胺最敏感, 对毒死蜱的耐受性最强.

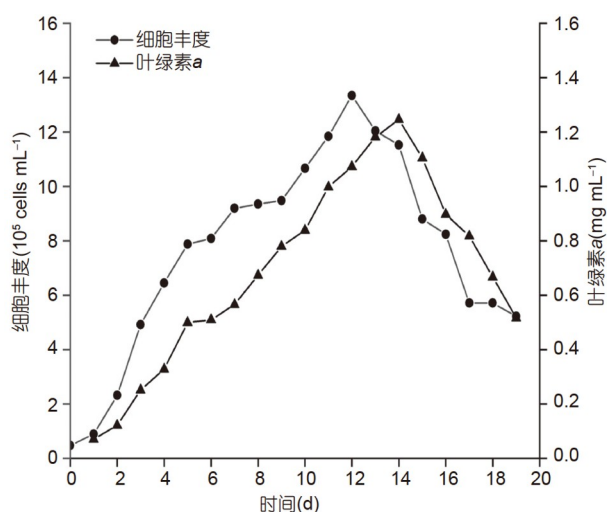


图1 中肋骨条藻*S. costatum*的生长曲线

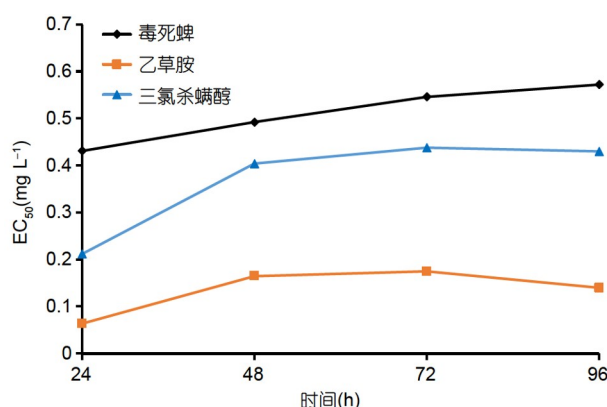


图2 三种农药对微藻*S. costatum*的急性毒性

毒死蜱、乙草胺和三氯杀螨醇的96h EC_{50} 值分别为0.572、0.140和0.430 mg L⁻¹。根据农药对藻类的毒性分级标准, 96h EC_{50} 值低于0.3 mg L⁻¹的为剧毒农药, 在0.3~3 mg L⁻¹之间的为中毒农药(Zhou等, 1996; Reyes等, 1999)。可见, 对于中肋骨条藻, 乙草胺具有剧毒, 而毒死蜱和三氯杀螨醇具有中等毒性。

3.1.2 慢性毒性效应

用三种农药分别处理中肋骨条藻, 每种农药的浓度为其96h EC_{50} 值的0.1、0.5和1.0倍。测定了中肋骨条藻的整个生长周期(16天)的细胞密度和叶绿素a含量(图3), 以分析农药的慢性毒性效应。其中, 毒死蜱的处理浓度为0.0572、0.286和0.572 mg L⁻¹。在

0.0572 mg L⁻¹浓度下, 细胞密度在培养的最初12天内与对照无显著差异, 而在12天后略低于对照; 在0.286 mg L⁻¹浓度下, 细胞密度在培养的前6天内低于对照, 而在培养后期显著高于对照; 在0.572 mg L⁻¹浓度下, 细胞密度在培养的前12天内低于对照, 而在培养后期显著高于对照(图3a)。该结果表明毒死蜱对中肋骨条藻的毒性随着培养时间的延长而降低。

乙草胺的处理浓度为0.014、0.07和0.14 mg L⁻¹, 其中, 在0.014 mg L⁻¹浓度处理下的细胞密度与对照无显著差异, 而在0.07 mg L⁻¹和0.14 mg L⁻¹浓度处理下的细胞密度低于对照。随着乙草胺浓度的增加, 中肋骨条藻生长期缩短(图3b)。三氯杀螨醇的处理浓度为0.043、0.215和0.43 mg L⁻¹。与乙草胺处理相似, 在高浓度(0.43 mg L⁻¹)处理下三氯杀螨醇对中肋骨条藻的生长造成了损害(图3c)。

三种农药对叶绿素a含量的影响与对细胞密度的影响相似。当三种农药的浓度为96h EC_{50} 值的0.1倍时, 中肋骨条藻的叶绿素a含量与对照无显著差异。当乙草胺和三氯杀螨醇的浓度为其96h EC_{50} 值的1.0倍时, 中肋骨条藻的叶绿素a合成几乎完全被抑制。而当毒死蜱浓度为其96h EC_{50} 值的1.0倍时, 中肋骨条藻的叶绿素a含量在生长后期高于对照。这些结果再次表明, 毒死蜱对中肋骨条藻的毒性效应可得到缓解, 但乙草胺和三氯杀螨醇的毒性效应是不可逆转的。

在三种农药中, 乙草胺是使用最广泛的除草剂之一, 对中肋骨条藻生长的毒性效应最强。用不同浓度的乙草胺 (0.01~0.25 mg L⁻¹) 处理96h, 可见中肋骨条藻的细胞形态发生了变化(图4)。如图4c所示, 一些细胞出现分裂和形态方面的异常。用浓度为0.25 mg L⁻¹的乙草胺处理96h, 中肋骨条藻的微藻细胞形状完全消失并聚成一团(图4e), 表明乙草胺破坏了中肋骨条藻的细胞膜。他人的研究表明乙草胺对液泡栅藻(*Scenedesmus vacuolatus*)的生长具有毒性(Junghans等, 2003)。乙草胺单独处理时, 液泡栅藻的生长受到抑制, EC_{50} 值为0.12 mg L⁻¹; 而乙草胺和其他七种除草剂联合处理时, 液泡栅藻的生长被完全抑制(Junghans等, 2003)。并有研究表明, 农药可以破坏藻类的细胞膜, 从而使农药分子更容易进入细胞, 干扰或破坏光合作用、呼吸作用和细胞分裂等生命过程(Stratton, 1989; Karen等, 2000)。最近有研究表明, 除草剂在环境浓度下对浮游植物具有毒性, 可以扰乱与硅藻的光合作用

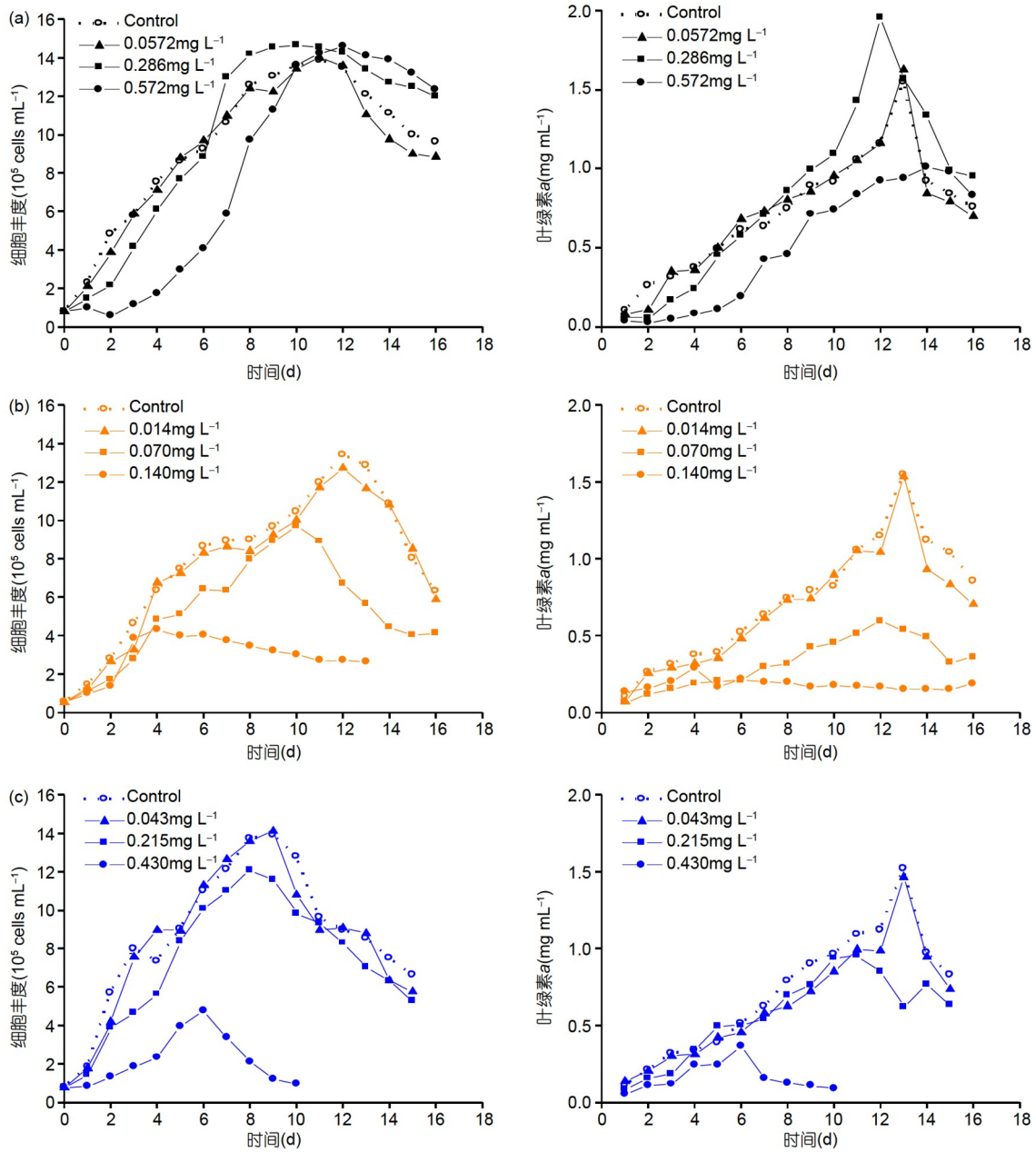


图 3 单一农药对中肋骨条藻的慢性毒性效应

(a) 毒死蜱; (b) 乙草胺; (c) 三氯杀螨醇. 将中肋骨条藻暴露于单一农药, 浓度为其96h EC_{50} 值的0.1、0.5和1.0倍

及碳代谢相关的多种代谢途径包括卡尔文循环、三羧酸循环及糖酵解/糖异生等(Yang等, 2019).

3.2 三种农药对中肋骨条藻的联合毒性效应

由于在环境中各种农药通常是共存的, 接下来分析了三种农药的联合毒性效应. 将中肋骨条藻暴露于

两种或三种农药(五个TU梯度). 所取得的结果与单一农药处理的结果相似(表2). 在每个时间点上, 四种组合的 EC_{50} 值之间存在显著差异 ($p < 0.05$). 处理24h的 EC_{50} 值最低, 96h EC_{50} 值是24h EC_{50} 值的2.2~3.9倍, 表明在上述四种组合处理下, 农药的毒性均随着处理时间的增加而减弱(表2).

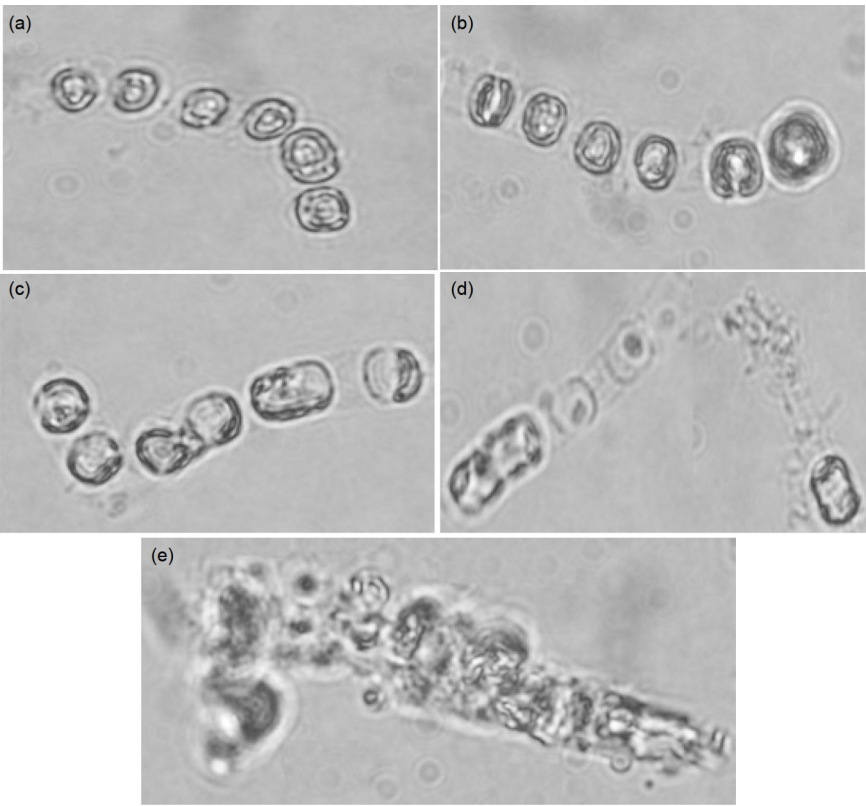


图 4 乙草胺对中肋骨条藻细胞形态的影响

(a)~(e)分别为用0、0.01、0.025、0.1和0.25mg L⁻¹的乙草胺分别处理中肋骨条藻96h, 在荧光显微镜下(放大100倍)观察细胞形态

表 2 三种农药对中肋骨条藻的联合毒性评价^{a)}

农药组合		培养时间			
		24 h	48 h	72 h	96 h
毒死蜱-乙草胺	EC ₅₀	0.185	0.266	0.353	0.414
	AI	1.703	0.88	1.833	0.208
	相互作用	S	S	S	S
毒死蜱-三氯杀螨醇	EC ₅₀	0.145	0.509	0.658	0.57
	AI	2.448	-0.018	-0.316	-0.14
	相互作用	S	A	A	A
乙草胺-三氯杀螨醇	EC ₅₀	0.271	0.684	0.614	0.708
	AI	0.845	-0.368	-0.228	-0.416
	相互作用	S	A	A	A
毒死蜱-三氯杀螨醇-乙草胺	EC ₅₀	0.223	0.299	0.405	0.564
	AI	0.495	0.115	-0.215	-0.692
	相互作用	S	S	A	A

a) EC₅₀为联合处理条件下中肋骨条藻的生长达到半数抑制效应时相应的毒性单位值(TU). A: 拮抗效应; S: 协同效应

根据相加指数法(Marking, 1977)对农药的联合效应进行了评估. 结果表明, 四种农药组合处理在24h后

均表现出协同效应(表2). 毒死蜱与乙草胺的组合在处理24、48、72和96h后均表现出协同效应. 毒死蜱与三

氯杀螨醇的组合以及乙草胺与三氯杀螨醇的组合在处理24h后表现出协同效应,但在处理48、72和96h后出现拮抗作用.三种农药联合处理组在24和48h后表现出协同效应,但在72和96h后出现拮抗作用.

在单独处理的情况下,三种农药对中肋骨条藻的毒性由大到小的顺序为:乙草胺>三氯杀螨醇>毒死蜱.在两种和三种农药的组合处理中,在低浓度下处理24h均表现出协同效应,表明中肋骨条藻存在应激反应.经较长时间(72h和96h)处理后,乙草胺与毒死蜱的组合表现出协同效应;三氯杀螨醇与乙草胺的组合以及三氯杀螨醇与毒死蜱的组合表现出拮抗效应.这些结果表明,三氯杀螨醇的存在降低了乙草胺和毒死蜱的毒性.在三种农药联合的情况下,处理24h和48h后表现出协同效应,处理72h和96h后表现出拮抗效应,表明三氯杀螨醇的减毒作用短期内弱于乙草胺和毒死蜱之间的协同效应,但经过较长的一段时间后这种减毒作用显得更强.这些结果说明,农药之间的协同或拮抗作用取决于藻类暴露于农药的持续时间和程度.类似的现象以前也有报道,例如,用除草剂Mikado和Viper对藻类*Pseudokirchneriella subcapitata*进行联合处理,在较低的浓度下二者表现出拮抗效应,而在较高的剂量下表现出协同效应(Marques等, 2012).然而,另一项研究用除草剂和有机磷杀虫剂(包括毒死蜱)联合处理*P. subcapitata*以探讨二者之间的联合作用,发现所分析的有机磷杀虫剂都没有增强除草剂的效果(Munkegaard等, 2008).这些结果说明,联合毒性效应非常复杂,并且可能因农药类型、农药浓度、暴露时间和所用的生物种类而异.一种农药对另一种农药的协同或拮抗效应被认为可能是由于农药的吸收、活性、降解或生物转化过程发生了变化(Cedergreen和Streibig, 2005).乙草胺与毒死蜱的协同机制以及三氯杀螨醇对乙草胺和毒死蜱的拮抗机制还有待进一步研究.

本研究以各农药96h EC_{50} 值的0.1、0.5和1.0倍的浓度对中肋骨条藻进行联合处理,在中肋骨条藻的整个生长阶段分析了农药的慢性毒性.结果表明,随着各农药组合中农药浓度的增加,中肋骨条藻的细胞密度逐渐降低(数据未展示).各农药在96h EC_{50} 值的0.1倍的浓度处理下中肋骨条藻生长速率与对照无显著差异;在96h EC_{50} 值的0.5和1.0倍的浓度处理下,中肋骨条藻的生长受到了显著的抑制.总体而言,在所有含两种或三种农药的处理中,除草剂乙草胺的存在增加了

联合毒性,可见乙草胺对中肋骨条藻具有高的毒性.三种农药单独或联合处理的毒性机制还需要进一步的研究.此外,有研究者观察到藻类物种间对除草剂的敏感性存在着较大的差异(Marques等, 2012).最近的一项研究表明,三嗪类除草剂显著改变了沿海水域浮游植物的群落结构,由于硅藻对阿特拉津比甲藻更敏感,使得沿海水域浮游植物的优势类群从硅藻变为甲藻(Yang等, 2021).海洋环境中多种农药对微生物自然群落的长期联合毒性效应还需要进一步研究.

3.3 农药处理过程中氮/磷比的变化

浮游植物的生长受无机营养盐的调节.海洋浮游植物对无机氮和磷的吸收基本遵循Redfield (16:1)比例,该比例常被用来评价浮游植物的生长条件 (Redfield, 1958).为了理解单一农药对中肋骨条藻的毒性效应在多大程度上受无机营养盐的影响,本研究用各农药96h EC_{50} 值的0.1倍的浓度来单独处理中肋骨条藻,这是因为在这个浓度下中肋骨条藻的生长几乎不受影响(图3).在培养期间分析了培养基中的氮/磷(N/P)比,以接种中肋骨条藻但未添加农药的培养组为对照(表3).

如表3所示,在不含中肋骨条藻的培养液中,乙草胺和三氯杀螨醇处理的N/P比相似且没有显著变化,而在含有有机磷农药毒死蜱的培养液中,N/P比在培养过程中显著下降(43%, $p<0.05$),表明毒死蜱没有了非生物降解.所有处理的N/P比在中肋骨条藻的指数生长期后期(7~14天)迅速增加,与在此期间中肋骨条藻的快速生长是一致的(图2).培养14天后,中肋骨条藻的生长急剧下降,可能与缺磷有关(Zhang等, 2012).此外,我们还发现中肋骨条藻生长的中后期(第7和10天)的毒死蜱处理组中培养基的N/P显著低于乙草胺和三氯杀螨醇处理组以及不添加农药的对照,推测毒死蜱被降解或转化为活性磷从而为中肋骨条藻提供养分.这也可以部分解释图3所示的结果:在毒死蜱处理组,中肋骨条藻生长后期细胞密度的下降速率显著低于其他两种农药处理组.

3.4 培养期间农药的降解

在培养过程中分析了培养基中农药的浓度.在接种中肋骨条藻的处理中,农药的降解速率常数(k)比不接种中肋骨条藻的对照高3.1~4.5倍,表明中肋骨条

表 3 培养期间中肋骨条藻培养液中的N/P比^{a)}

农药处理	农药浓度(mg L ⁻¹)	微藻	N/P					
			0 d	1 d	4 d	7 d	10 d	14 d
毒死蜱	0.057	—	28.74	28.58	27.87	25.39	19.22	16.31
		+	28.74	23.27	41.44	44.53	237.23	765.06
乙草胺	0.014	—	28.74	27.31	26.75	27.16	28.02	26.80
		+	28.74	19.34	39.18	211.86	267.94	874.60
三氯杀螨醇	0.043	—	28.74	28.67	29.01	28.73	26.96	28.10
		+	28.74	17.91	37.56	264.90	414.97	885.60
对照	0	+	28.74	19.26	41.20	217.49	339.27	950.13

a) “+”和“—”分别表示接种和未接种中肋骨条藻

表 4 不同条件下农药的降解动力学参数^{a)}

处理方式	农药	微藻	降解速率常数 k	半衰期(d)	贡献率(%)
单一暴露	毒死蜱	—	0.1285	5.4	/
		+	0.5619	1.23	77.1
	乙草胺	—	0.0164	42.27	/
		+	0.0689	10.06	76.2
	三氯杀螨醇	—	0.0383	18.1	/
		+	0.117	5.92	67.3
毒死蜱-乙草胺	毒死蜱	—	0.178	3.89	/
		+	0.4119	1.68	56.8
	乙草胺	—	0.029	23.9	/
		+	0.1292	5.36	77.6
毒死蜱-三氯杀螨醇	毒死蜱	—	0.1288	5.38	/
		+	0.5697	1.22	77.4
	三氯杀螨醇	—	0.0791	8.76	/
		+	0.1258	5.51	37.1
乙草胺-三氯杀螨醇	乙草胺	—	0.0626	11.07	/
		+	0.2337	2.96	73.2
	三氯杀螨醇	—	0.0424	16.34	/
		+	0.0899	7.71	52.8
毒死蜱-乙草胺-三氯杀螨醇	毒死蜱	—	0.0903	7.67	/
		+	0.3594	1.93	74.9
	乙草胺	—	0.0372	18.63	/
		+	0.1247	5.56	70.2
	三氯杀螨醇	—	0.0509	13.61	/
		+	0.1613	4.3	68.4
		—			
		+			

a) “+”和“—”分别表示接种和未接种中肋骨条藻

藻显著促进了农药的降解(表4)。在不接种中肋骨条藻的对照, 毒死蜱、乙草胺和三氯杀螨醇的半衰期分别为5.40、42.27和18.10天, 而在接种中肋骨条藻的处理

中三者的半衰期分别减少到1.23、10.06和5.92天。在单一农药处理情况下, 约67~77%的农药在培养体系中被降解。在三种农药中, 乙草胺降解最慢, 其次是三氯

杀螨醇, 降解最快的是毒死蜱, 与其毒性顺序相一致. 推测, 农药具有高毒性的部分原因可能与该农药具有较强的抗生物降解能力有关.

在联合暴露情况下三种农药的降解结果如表4所示. 毒死蜱的降解率不受三氯杀螨醇的影响, 而与乙草胺联合处理时略有下降, 在三种农药联合处理时达到最低. 乙草胺的降解率在与毒死蜱和三氯杀螨醇同时暴露时有所增加: 与三氯杀螨醇同时暴露时, 增加了3.4倍. 相反, 三氯杀螨醇的降解在与毒死蜱和乙草胺同时存在时受到了抑制(表4). 此结果可以在一定程度上解释三氯杀螨醇与毒死蜱以及乙草胺之间的拮抗效应(表2).

农药的降解以生物降解为主. 在单独或联合暴露时, 大约37~77%的农药降解是由生物降解导致的. 在研究除草剂(阿特拉津)在海水中的稳定性时也得到了类似的结果, 发现微生物是除草剂降解的主要因素(Yang和Zhang, 2020). 在未接种中肋骨条藻的对照中, 三种农药的浓度也有所下降, 说明除了生物降解以外, 化学水解及光降解等其他过程也可能导致农药的降解(Yuan等, 2018). 因此, 生物降解、化学水解和光降解都可能参与环境中农药的去除. 此结果与在毒死蜱单一暴露情况下的N/P比发生变化的结果是一致的(表3). 这些结果表明在培养期过程中农药的降解存在多种途径.

在所分析的三种农药中, 无论在单独还是联合暴露条件下, 乙草胺的半衰期都相对较长. 最近有关乙草胺在土壤中的降解研究发现, 乙草胺通过脱烷基化、羟基化、硫醇偶联反应产生了10种降解产物和8种乙草胺衍生物. 此外, 还鉴定了参与乙草胺降解的糖基化途径(Zhang等, 2021). 毒死蜱是使用最广泛的有机磷杀虫剂之一, 通常会降解为3, 5, 6-三氯-2-吡啶醇(TCP). TCP是水溶性的、有毒且在环境中的半衰期比毒死蜱更长(65~360天)(Fang等, 2019). 已从土壤中分离出一些可以降解毒死蜱或TCP的特殊微生物类群, 包括细菌和真菌(Zhang等, 2017; Fang等, 2019). 细菌菌株*Cupriavidus nantongensis* X1可以有效地将毒死蜱和TCP降解为3, 6-二羟基吡啶-2, 5-二酮(Fang等, 2019). 有报道指出, 白腐菌(*Trametes versicolor*)可降解毒死蜱和三氯杀螨醇(Hu等, 2020). 毒死蜱的转化产物为O, O-硫代磷酸二乙酯和磷酸二乙酯, 而三氯杀螨醇的降解产物为苯甲醛(Hu等, 2020). 最近有报道指

出, 主要由*Chlorella* sp.和*Scenedesmus* sp.组成的微藻体也能将毒死蜱转化为O, O-硫代磷酸二乙酯(Avila等, 2021). 中肋骨条藻通过何种途径降解农药以及降解产物对海洋微生物的毒性还有待进一步的研究. 这些农药的转化产物含有类似于富含羧基的脂环分子(carboxyl-rich alicyclic molecule, CRAM)的结构(Fang等, 2019; Zhang等, 2021). 这种结构是最古老的惰性溶解有机物(DOM)的代表形式(Lechtenfeld等, 2015). 推测在农药降解过程中产生和积累的难降解分子贡献于由微生物介导的碳封存(Jiao等, 2010). 最近的一项研究表明, 除草剂的确会改变由硅藻产生的有色溶解有机物(chromophoric dissolved organic matter, CDOM)的构成, 从而可能影响沿海水域碳封存的潜力(Yang和Zhang, 2020). 为了评估海洋中农药的生态风险和最终去向, 需要进一步研究海洋微生物降解及转化农药的过程和分子机制.

4 结论

三种广泛使用的农药对海洋微藻中肋骨条藻的毒性作用各不相同. 其中, 乙草胺的毒性最强, 毒死蜱的毒性最弱. 在联合暴露的情况下, 乙草胺的存在增强了三氯杀螨醇和毒死蜱的毒性, 而三氯杀螨醇的存在可以降低乙草胺和毒死蜱的毒性. 在培养期间, 部分农药被中肋骨条藻所降解. 本研究揭示了三种农药对海洋微藻中肋骨条藻的毒性, 并且明确了微藻对环境中农药去除的贡献. 然而, 有关海洋微藻降解农药的过程和分子机制仍需进一步的研究.

参考文献

- Affum A O, Acquah S O, Osae S D, Kwaansa-Ansah E E. 2018. Distribution and risk assessment of banned and other current-use pesticides in surface and groundwaters consumed in an agricultural catchment dominated by cocoa crops in the Ankobra Basin, Ghana. *Sci Total Environ*, 633: 630–640
- Avila R, Peris A, Eljarrat E, Vicent T, Blázquez P. 2021. Biodegradation of hydrophobic pesticides by microalgae: Transformation products and impact on algae biochemical methane potential. *Sci Total Environ*, 754: 142114
- Brand L E, Guillard R R L, Murphy L S. 1981. A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction

- rates. *J Plankton Res*, 3: 193–201
- Bondareva L, Fedorova N. 2021. Pesticides: Behavior in agricultural soil and plants. *Molecules*, 26: 5370
- Cedergreen N, Streibig J C. 2005. Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? *Environ Chem Toxicol*, 24: 1676–1683
- Sun C, Chen L, Zhai L, Liu H, Jiang Y, Wang K, Jiao C, Shen Z. 2019. National assessment of spatiotemporal loss in agricultural pesticides and related potential exposure risks to water quality in China. *Sci Total Environ*, 677: 98–107
- Ding L Y, He N N, Yang S, Zhang L J, Liang P, Wu S C, Wong M H, Tao H C. 2019. Inhibitory effects of *Skeletonema costatum* on mercury methylation by *Geobacter sulfurreducens* PCA. *Chemosphere*, 216: 179–185
- Dong W, Zhang Y, Quan X. 2019. Health risk assessment of heavy metals and pesticides: A case study in the main drinking water source in Dalian, China. *Chemosphere*, 242: 125113
- Falcitatore A, Jaubert M, Bouly J P, Bailleul B, Mock T. 2020. Diatom molecular research comes of age: Model species for studying phytoplankton biology and diversity. *Plant Cell*, 32: 547–572
- Fang L, Shi T, Chen Y, Wu X, Zhang C, Tang X, Li Q X, Hua R. 2019. Kinetics and Catabolic Pathways of the Insecticide Chlorpyrifos, Annotation of the Degradation Genes, and Characterization of Enzymes TcA and Fre in *Cupriavidus nantongensis* X1(T). *J Agric Food Chem*, 67: 2245–2254
- Ge M, Wang X, Yang G, Wang Z, Li Z, Zhang X, Xu Q. 2021. Persistent organic pollutants (POPs) in deep-sea sediments of the tropical western Pacific Ocean. *Chemosphere*, 277: 130267
- Guillard R R L, Ryther J H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol*, 8: 229–239
- Hu K, Peris A, Torán J, Eljarrat E, Sarà M, Blázquez P, Caminal G. 2020. Exploring the degradation capability of *Trametes versicolor* on selected hydrophobic pesticides through setting sights simultaneously on culture broth and biological matrix. *Chemosphere*, 250: 126293
- Ivorra L, Cardoso P G, Chan S K, Tagulao K, Cruzeiro C. 2019. Environmental characterization of 4,4'-dichlorobenzophenone in surface waters from Macao and Hong Kong coastal areas (Pearl River Delta) and its toxicity on two biological models: *Artemia salina* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 171: 1–11
- Jiao C, Chen L, Sun C, Jiang Y, Shen Z. 2019. Evaluating national ecological risk of agricultural pesticides from 2004 to 2017 in China. *Environ Pollut*, 259: 113778
- Jiao N, Herndl G J, Hansell D A, Benner R, Kattner G, Wilhelm S W, Kirchman D L, Weinbauer M G, Luo T, Chen F, Azam F. 2010. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: Long-term carbon storage in the global ocean. *Nat Rev Microbiol*, 8: 593–599
- Johnson K S, Petty R L. 1983. Determination of nitrate and nitrite in seawater by flow injection analysis1. *Limnol Oceanogr*, 28: 1260–1266
- Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M, Grimme L H. 2003. Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Manag Sci*, 59: 1101–1110
- Karen D J, Dancik J A, Skipper S L, Smink J A, Klaine S J. 2000. Influence of episodic exposures of chlorpyrifos to an estuarine cyprinodontid, *Fundulus heteroclitus*. *Mar Environ Sci*, 50: 125–125
- Kim K H, Kabir E, Jahan S A. 2016. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ*, 559: 525–535
- Pikula K S, Zakharenko A M, Chaika V V, Stratidakis A K, Kokkinakis M, Waissi G, Rakitskii V N, Sarigiannis D A, Hayes A W, Coleman M D, Tsatsakis A, Golokhvast K S. 2019. Toxicity bioassay of waste cooking oil-based biodiesel on marine microalgae. *Toxicol Rep*, 6: 111–117
- Lai W. 2017. Pesticide use and health outcomes: Evidence from agricultural water pollution in China. *J Environ Econ Manage*: 93–120
- Lechtenfeld O J, Hertkorn N, Shen Y, Witt M, Benner R. 2015. Marine sequestration of carbon in bacterial metabolites. *Nat Commun*, 6: 6711
- Lei F, Lu X, Tan J, Wang L, Chen J. 2018. Multiresidue determination and potential risks of emerging pesticides in aquatic products from Northeast China by LC–MS/MS. *J Environ Sci*, 63: 116–125
- Li H, Jiang W, Pan Y, Li F, Wang C, Tian H. 2021. Occurrence and partition of organochlorine pesticides (OCPs) in water, sediment, and organisms from the eastern sea area of Shandong Peninsula, Yellow Sea, China. *Mar Pollution Bull*, 162: 111906
- Liu L, Tang J, Zhong G, Zhen X, Pan X, Tian C. 2018. Spatial distribution and seasonal variation of four current-use pesticides (CUPs) in air and surface water of the Bohai Sea, China. *Sci Total Environ*, 621: 516–523
- Marking L L. 1977. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. In: Mayer, F L and Hamelink, J L, eds. *Aquatic toxicology and hazard evaluation*, Philadelphia: American Society for Testing and Materials. 98–108
- Marques C R, Gonçalves A M M, Pereira R, Gonçalves F. 2012. Ecotoxicological effects of Mikado® and Viper® on algae and daphnids. *Environ Toxicol*, 27: 685–699
- Munkegaard M, Abbaspoor M, Cedergreen N. 2008. Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae

- Pseudokirchneriella subcapitata* and the aquatic plant *Lemna minor*. *Ecotoxicology*, 17: 29–35
- Ohashi K, Yasu K, Suzuki C, Yamamoto K. 1978. A spectrophotometric study of phosphomolybdenum blue formed by the reaction of phosphate with a mixture of molybdenum (V) ($\text{Mo}_2\text{O}_4^{2+}$) and molybdenum (VI) and application to the spectrophotometric determination of small amounts of phosphates. *Cheminform*, 9: 3202–3205
- Redfield A. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *Am Sci*, 46: 205–221
- Reyes G G, Villagrana L. C, Alvarez G L. 1999. Environmental conditions and pesticide pollution of two coastal ecosystems in the Gulf of California, Mexico. *Ecotoxicol Environ Saf*, 44: 280–286
- Sarangi D, Stephens T, Barker A L, Patterson E L, Jhala A J. 2019. Protoporphyrinogen oxidase (PPO) inhibitor-resistant waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Nebraska is multiple herbicide resistant: Confirmation, mechanism of resistance, and management. *Weed Science*: 1–11
- Šepič E, Bricelj M, Leskovšek H. 2003. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. *Chemosphere*, 52: 1125–1133
- Stratton G W. 1989. Effect of the solvent acetone on membrane integrity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 42: 754–760
- Tsaboula A, Menexes G, Papadakis E N, Vryzas Z, Kotopoulou A, Kintzikoglou K, Papadopoulou-Mourkidou E. 2019. Assessment and management of pesticide pollution at a river basin level part II: Optimization of pesticide monitoring networks on surface aquatic ecosystems by data analysis methods. *Sci Total Environ*, 653: 1612–1622
- Vymazal J, Březinová T. 2015. The use of constructed wetlands for removal of pesticides from agricultural runoff and drainage: A review. *Environ Int*, 75: 11–20
- Xiao P, Liu F, Liu Y, Yao S, Zhu G. 2017. Effects of pesticide mixtures on zooplankton assemblages in aquatic microcosms simulating rice paddy fields. *Bull Environ Contam Toxicol*, 99: 27–32
- Xu M, Huang H, Li N, Li F, Wang D, Luo Q. 2019. Occurrence and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and pesticides in typical surface watersheds, China. *Ecotoxicol Environ Saf*, 175: 289–298
- Yang L, Li H, Zhang Y, Jiao N. 2019. Environmental risk assessment of triazine herbicides in the Bohai Sea and the Yellow Sea and their toxicity to phytoplankton at environmental concentrations. *Environ Int*, 133: 105175
- Yang L, Zhang Y. 2020. Effects of atrazine and its two major derivatives on the photosynthetic physiology and carbon sequestration potential of a marine diatom. *Ecotoxicol Environ Saf*, 205: 111359
- Yang L, Mou S, Li H, Zhang Z, Jiao N, Zhang Y. 2021. Terrestrial input of herbicides has significant impacts on phytoplankton and bacterioplankton communities in coastal waters. *Limnology Oceanography*, 66: 4028–4045
- Yi X, Wang J, Li Z, Zhang Z, Chi T, Guo M, Li W, Zhou H. 2019. The effect of polystyrene plastics on the toxicity of triphenyltin to the marine diatom *Skeletonema costatum*—Influence of plastic particle size. *Environ Sci Pollut Res*, 26: 25445–25451
- Yuan C, Chin Y P, Weavers L K. 2018. Photochemical acetochlor degradation induced by hydroxyl radical in Fe-amended wetland waters: Impact of pH and dissolved organic matter. *Water Res*, 132: 52–60
- Zhang C, Hu R, Shi G, Jin Y, Robson M G, Huang X. 2015. Overuse or underuse? An observation of pesticide use in China. *Sci Total Environ*, 538: 1–6
- Zhang J, Liu L, Ren L, Feng W, Lv P, Wu W, Yan Y. 2017. The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *J Hazard Mater*, 334: 121–131
- Zhang N, Xie F, Guo Q N, Yang H. 2021. Environmental disappearance of acetochlor and its bioavailability to weed: A general prototype for reduced herbicide application instruction. *Chemosphere*, 265: 129108
- Zhang X, Shi X, Zhang C, Han X. 2012. Nutrient characteristics in red-tide algal succession in Changjiang estuary and adjacent sea areas. *Mar Environ Sci* 31: 817–820
- Zhang Y, Wang J, Tan L. 2019. Characterization of allelochemicals of the diatom *Chaetoceros curvisetus* and the effects on the growth of *Skeletonema costatum*. *Sci Total Environ*, 660: 269–276
- Zheng S, Chen B, Qiu X, Chen M, Ma Z, Yu X. 2016. Distribution and risk assessment of 82 pesticides in Jiulong River and estuary in South China. *Chemosphere*, 144: 1177–1192
- Zhou J L, Fileman T W, Evans S, Donkin P, Mantoura R F C, Rowland S J. 1996. Seasonal distribution of dissolved pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the Humber estuary and Humber coastal zone. *Mar Pollution Bull*, 32: 599–608
- Zhu X, Zhao W, Chen X, Zhao T, Tan L, Wang J. 2020. Growth inhibition of the microalgae *Skeletonema costatum* under copper nanoparticles with microplastic exposure. *Mar Environ Res*, 158: 105005

(责任编辑: 王晓雪)