

分类号: X171.5

单位代码: 10363

秘 级: 公开

学号: 2210620134

5 种消毒副产物对萼花臂尾轮虫的毒性效应研究
TOXIC EFFECTS OF FIVE DISINFECTION BY-PRODUCTS ON
BRACHIONUS CALYCIFLORUS

学生姓名: 李锦程

指导教师: 徐晓平 (教授)

专 业: 环境科学与工程

研究方向: 城市水资源与水环境

论文答辩日期: 2024 年 5 月 29 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：李锦程

日期：2024年5月29日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密☒。

学位论文作者签名：李锦程

日期：2024 年 5 月 28 日

指导教师签名：徐晓平

日期：2024 年 5 月 28 日

5 种消毒副产物对萼花臂尾轮虫的毒性效应

摘 要

随着消毒剂的广泛使用，消毒剂与水中天然有机物和某些特定的污染物反应产生消毒副产物（DBPs），具有环境持久性、生物累积性和生物毒性。目前，在水环境中检测到越来越多的消毒副产物，这将威胁着水生生物安全。因此，开展关于消毒副产物对水生生物的影响具有重要意义。

二氯乙酸（DCA）是典型的含碳消毒副产物，二氯乙腈（DCAN）、氯乙酰胺（MCAcAm）、二氯乙酰胺（DCAcAm）和溴乙酰胺（MBAcAm）是一类新兴的含氮消毒副产物。轮虫是水生态系统中重要的一环，在水生态系统物质循环和能量传递过程中发挥重要作用。萼花臂尾轮虫（*Brachionus calyciflorus*）是开展水生态毒理学研究的模式生物，具有无性生殖和有性生殖两种方式，两种生殖方式可交替进行。选取淡水中常见的萼花臂尾轮虫为受试生物，研究了二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对萼花臂尾轮虫存活、种群增长、有性生殖和氧化应激指标的影响。

运用几率单位算法计算出二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对萼花臂尾轮虫的 24 h-LC₅₀ 分别为 73.63、42.44、12.49、23.12 和 2.46 mg/L，对萼花臂尾轮虫的 24 h 急性毒性大小：溴乙酰胺 > 氯乙酰胺 > 二氯乙酰胺 > 二氯乙腈 > 二氯乙酸。

5 种消毒副产物对轮虫和种群增长有显著影响, 在 $20\ \mu\text{g/L}$ 的消毒副产物暴露下, 二氯乙酸显著提高了轮虫的 2 d 种群增长率, 氯乙酰胺显著抑制了轮虫的 2 d 种群增长; 在 $200\ \mu\text{g/L}$ 的消毒副产物暴露下, 除二氯乙酰胺外, 其他处理组均对轮虫的 2 d 种群增长率均无显著影响, 可能是在环境浓度下轮虫对不同消毒副产物暴露反应程度不一样。种群增长主要是发生在轮虫的无性生殖阶段, 部分浓度下 2 d 的种群增长率并未发生显著变化, 可能是由于暴露时间较短有关。

萼花臂尾轮虫受到污染物胁迫后, 会主动改变繁殖方式, 将由无性生殖转变为有性生殖。在 $10\ \mu\text{g/L}$ 浓度下, 5 种消毒副产物对轮虫的有性生殖参数均无显著影响; $200\ \mu\text{g/L}$ 氯乙酰胺和 $20\ \mu\text{g/L}$ 溴乙酰胺均显著提高了轮虫种群的 OF/NOF (携卵雌体数/不携卵雌体数), $20\ \mu\text{g/L}$ 二氯乙酰胺则显著降低了轮虫种群的 OF/NOF; $200\ \mu\text{g/L}$ 二氯乙酸显著提高了轮虫种群的 MF/AF (携卵雌体数中混交雌体数/非混交雌体数); $200\ \mu\text{g/L}$ 氯乙腈、二氯乙酰胺和 $20\ \mu\text{g/L}$ 溴乙酰胺均显著提高了轮虫种群的 MR (混交率); $20\ \mu\text{g/L}$ 二氯乙酸、溴乙酰胺和 $200\ \mu\text{g/L}$ 二氯乙腈、二氯乙酰胺均显著提高了轮虫种群的 FR (受精率)。

休眠卵的产生标志着轮虫有性生殖的结束, 休眠卵能够保护轮虫免受外界环境变化的影响, 提高环境适应能力。二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对轮虫的休眠卵产量均有显著性影响: $20\ \mu\text{g/L}$ 和 $200\ \mu\text{g/L}$ 二氯乙腈、二氯乙酰胺显著增加了萼花臂尾轮虫 7

d 休眠卵产量；10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 氯乙酰胺和溴乙酰胺显著增加了萼花臂尾轮虫 7 d 休眠卵产量。

污染物暴露会诱导轮虫体内产生过量的活性氧物质，攻击轮虫的氧化应激系统，影响轮虫体内抗氧化系统。二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺均促进了 SOD(超氧化物歧化酶)、CAT(过氧化氢酶)活性和 GSH(还原型谷胱甘肽)含量。不同浓度对轮虫氧化应激的影响不同，10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙腈和溴乙酰胺的处理组中轮虫 SOD 酶活性显著提高，20 $\mu\text{g/L}$ 暴露下，除二氯乙酰胺外其余均显著促进 SOD 酶活性，200 $\mu\text{g/L}$ 下，仅有二氯乙酸和氯乙酰胺促进了 SOD 酶活性，其余均未有显著影响；200 $\mu\text{g/L}$ 的氯乙酰胺和溴乙酰胺抑制轮虫 POD(过氧化物酶)活性，三种浓度下 DCAN 对 GSH 含量影响不显著。10 $\mu\text{g/L}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ 暴露下，二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 MDA(丙二醛)含量均未有显著影响；200 $\mu\text{g/L}$ 暴露下，二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 MDA 含量均有显著促进；这变化表明，在 10 $\mu\text{g/L}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ 浓度下，5 种消毒副产物引起了轮虫的氧化应激，而在 200 $\mu\text{g/L}$ 浓度下，不仅诱导了氧化应激，还造成了氧化损伤。

水环境中消毒副产物往往不止一种，多种消毒副产物对轮虫的毒性还未有研究。二氯乙酸和二氯乙腈分别作为典型的含碳消毒副产物和含氮消毒副产物，二氯乙酰胺在卤乙酰胺中具有代表性，选择这三种消毒副产物联合暴露对轮虫的种群增长、有性生殖和氧化应

激的影响。在二氯乙酰胺+二氯乙腈的浓度组合下,除 OF/NOF 指标, MF/AF、MR 和 FR 等指标相较于对照组均显著增加;在二氯乙酰胺+二氯乙酸的浓度组合下,显著降低了萼花臂尾轮虫的 OF/NOF 值。而在二氯乙腈+二氯乙腈的浓度组合下,对萼花臂尾轮虫的有性生殖指标影响均不显著;在 10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酰胺+二氯乙腈和二氯乙酰胺+二氯乙腈+二氯乙酸两种浓度组合下,均显著提高了休眠卵产量。二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露影响了萼花臂尾轮虫的有性生殖,显著提高了 CAT 酶活性,但对 MDA 含量影响不显著,表明轮虫受到了氧化应激,体内的抗氧化系统降低了污染物对轮虫的氧化损伤。

关键词: 萼花臂尾轮虫, 消毒副产物, 种群增长, 有性生殖, 氧化应激

TOXIC EFFECTS OF FIVE DISINFECTION BY-PRODUCTS ON *BRACHIONUS CALYCIFLORUS*

ABSTRACT

With the widespread use of disinfectants, disinfectants react with natural organics in water and certain specific contaminants to produce disinfection by-products (DBPs), which are environmentally persistent, bioaccumulative, and biotoxic. Currently, more and more disinfection by-products are detected in the aqueous environment, which will threaten the safety of aquatic organisms. Therefore, it is important to carry out research on the impact of disinfection by-products on aquatic organisms.

Dichloroacetic acid and dichloroacetonitrile are typical carbon-containing disinfection by-products and nitrogen-containing by-products, respectively, and haloacetamide is an emerging class of nitrogen-containing disinfection by-products. Rotifers are an important part of the aquatic ecosystem and play an important role in the material cycle and energy transfer process of the aquatic ecosystem. *Brachionus calyciflorus* is a model organism for aquatic ecotoxicology research, with parthenogenesis and sexual reproduction, and the two reproductive modes can be carried out alternately. In this study, the effects of dichloroacetic acid,

dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide and bromoacetamide on the survival, population growth, sexual reproduction and oxidative stress of *Brachionus calyciflorus*, which are commonly found in freshwater, were studied.

The 24-h-LC₅₀ of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide and bromoacetamide against rotifers were 73.63, 42.44, 12.49, 23.12 and 2.46 mg/L, respectively, and the 24-h acute toxicity to rotifers was calculated as bromoacetamide > chloroacetamide > dichloroacetamide > dichloroacetonitrile > dichloroacetic acid.

The five disinfection by-products had a significant effect on the population growth of rotifers and the population, dichloroacetic acid significantly increased the population growth rate of rotifers on the 2nd day under the exposure of 20 µg/L disinfection by-products, and chloroacetamide significantly inhibited the population growth rate of rotifers on the 2nd day, and under the exposure of disinfection by-products at 200 µg/L, except for dichloroacetamide, the other treatment groups had no significant effect on the population growth rate of rotifers on the 2nd day, which may be due to the different reactivity of rotifers to different disinfection by-product exposure at environmental concentrations. The population growth mainly occurred in the asexual reproduction stage of rotifers, and the population growth rate did not change significantly at 2 days at some concentrations, which may be related to the short exposure time.

When rotifers are stressed by pollutants, they will actively change their reproductive mode and change from asexual reproduction to sexual reproduction. In this study, the effects of five disinfection by-products on the sexual reproduction of rotifers were studied, and the five disinfection by-products had no significant effect on the sexual reproductive parameters of rotifers at a concentration of 10 $\mu\text{g/L}$. 200 $\mu\text{g/L}$ chloroacetamide and 20 $\mu\text{g/L}$ bromoacetamide significantly increased the OF/NOF of rotifer populations, 20 $\mu\text{g/L}$ dichloroacetamide significantly decreased the OF/NOF of rotifer populations, 200 $\mu\text{g/L}$ dichloroacetic acid significantly increased the MF/AF of rotifer populations, 200 $\mu\text{g/L}$ chloroacetonitrile, Dichloroacetamide and 20 $\mu\text{g/L}$ bromoacetamide significantly increased the mixing rate of rotifer populations, and 20 $\mu\text{g/L}$ dichloroacetic acid, bromoacetamide and 200 $\mu\text{g/L}$ dichloroacetonitrile and dichloroacetamide significantly increased the fertilization rate of rotifer populations.

The production of dormant eggs marks the end of sexual reproduction in rotifers, and dormant eggs can protect rotifers from changes in the external environment and improve environmental adaptability. Dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide and bromoacetamide had significant effects on the dormant egg production of rotifers: 20 $\mu\text{g/L}$ and 200 $\mu\text{g/L}$ dichloroacetonitrile and dichloroacetamide significantly increased the 7-day dormant egg production of rotifers, while 10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$ and 200 $\mu\text{g/L}$ chloroacetamide and bromoacetamide signi-

ificantly increased the 7-day dormant egg production of rotifers.

Pollutant exposure can induce the production of excessive reactive oxygen species in rotifers, which attack the oxidative stress system of rotifers and affect the antioxidant system in rotifers. Dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide and bromoacetamide all promoted SOD, CAT enzyme activities and GSH content. The effects of different concentrations on oxidative stress of rotifers were different, the SOD enzyme activity of rotifers was significantly increased in the treatment group of 10 $\mu\text{g/L}$ dichloroacetonitrile and bromoacetamide, and the SOD enzyme activity was significantly increased except dichloroacetamide under 20 $\mu\text{g/L}$ exposure, and only dichloroacetic acid and chloroacetamide promoted SOD enzyme activity at 200 $\mu\text{g/L}$, and the rest had no significant effect; 200 $\mu\text{g/L}$ Chloroacetamide and bromoacetamide inhibited the POD enzyme activity of rotifers, and DCAN had no significant effect on GSH content at the three concentrations. Dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide and bromoacetamide had no significant effect on the MDA content of rotifers under 10 $\mu\text{g/L}$ and 20 $\mu\text{g/L}$ exposures, and dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide and bromoacetamide at 200 $\mu\text{g/L}$ exposures significantly enhanced the MDA content of rotifers. At Low concentration, it not only induces oxidative stress, but also causes oxidative damage.

There is often more than one disinfection by-product in the aqueous environment, and the toxicity of multiple disinfection by-products to rotifers has not been studied. Dichloroacetic acid and dichloroacetonitrile were typical carbon-containing disinfection by-products and nitrogen-containing disinfection by-products, respectively, and dichloroacetamide was representative among haloacetamides, and the combined exposure of these three disinfection by-products was selected for the effects of combined exposure on population growth, sexual reproduction and oxidative stress of rotifers. Under the concentration combination of dichloroacetamide + dichloroacetonitrile, except for the OF/NOF index, the MF/AF, MR and FR indexes were significantly increased compared with the control group, and the OF/NOF value of rotifers was significantly decreased under the concentration combination of dichloroacetamide + dichloroacetic acid. However, the concentration combination of dichloroacetonitrile + dichloroacetonitrile had no significant effect on the sexual reproduction indexes of rotifers, but the concentration combination of dichloroacetamide + dichloroacetonitrile and dichloroacetamide + dichloroacetonitrile + dichloroacetic acid significantly increased the dormant egg production. The combined exposure of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile and dichloroacetamide affected the sexual reproduction of rotifers and significantly increased the activity of CAT enzyme, but had no significant effect on MDA content, indicating that rotifers were

subjected to oxidative stress, and the antioxidant system in the body reduced the oxidative damage of pollutants to rotifers.

Li Jin Cheng (Environmental Science and Engineering)

Supervised by Prof. Xu Xiao Ping

KEY WORDS: *Brachionus calyciflorus*, disinfection by-products, population growth, sexual reproduction, oxidative stress

目录

摘 要	I
ABSTRACT.....	V
第 1 章 绪 论	1
1.1 消毒副产物的研究进展	1
1.1.1 常见的消毒方式	1
1.1.2 消毒副产物	4
1.1.3 消毒副产物的危害	5
1.2 轮虫的生态毒理学研究	7
1.3 研究内容和技术路线	9
1.3.1 研究内容	9
1.3.2 技术路线	11
第二章 实验材料与方法	12
2.1 实验仪器与材料	12
2.1.1 实验药剂与仪器	12
2.1.2 斜生四链藻的培养	14
2.1.3 轮虫的采集与培养	15
2.2 实验设计	16
2.2.1 急性毒性和生殖实验	16
2.2.2 氧化应激实验	17
2.2.3 联合暴露实验	18
2.3 数据处理	19
第三章 5 种消毒副产物对萼花臂尾轮虫生殖的毒性影响	20
3.1 消毒副产物对轮虫的急性毒性和生殖的影响	21
3.1.1 5 种消毒副产物对轮虫的急性毒性	21
3.1.2 消毒副产物对轮虫种群增长的影响	24
3.1.3 消毒副产物对轮虫有性生殖的影响	24

3.1.4 消毒副产物对轮虫休眠卵产量的影响	26
3.2 讨论	27
3.3 本章小结	30
第四章 5种消毒副产物对萼花臂尾轮虫氧化应激效应的影响	31
4.1 消毒副产物对轮虫氧化应激的影响	32
4.1.1 消毒副产物对轮虫体内抗氧化酶和抗氧化剂的影响	32
4.1.2 消毒副产物对轮虫体内脂质和总抗氧化能力的影响	36
4.2 讨论	38
4.4 本章小结	40
第五章 消毒副产物对萼花臂尾轮虫联合毒性影响	41
5.1 消毒副产物联合暴露对萼花臂尾轮虫种群增长的影响	42
5.2 消毒副产物联合暴露对萼花臂尾轮虫有性生殖的影响	42
5.3 消毒副产物联合暴露对萼花臂尾轮虫氧化应激的影响	44
5.4 讨论	50
5.5 本章小结	52
总结与展望	53
参考文献	55
攻读学位期间发表的学术论文目录	65
致谢	66

中英文对照表

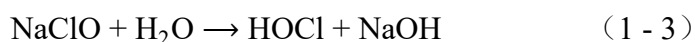
缩略词	英文全称	中文全称
DBPs	disinfection by-products	消毒副产物
NOM	natural organic matter	天然有机物
HAAs	haloacetic acids	卤乙酸
DBPs	disinfection by-products	消毒副产物
HANs	haloacetonitrile	卤乙腈
DCA	dichloroacetic acid	二氯乙酸
DCAN	dichloroacetonitrile	二氯乙腈
THMs	trihalomethanes	三卤甲烷
C-DBPs	carbon-containing disinfection by-products	含碳消毒副产物
N-DBPs	nitrogenous disinfection by-products	含氮消毒副产物
HAcAms	haloacetamides	卤乙酰胺
HNMs	halogenated nitromethanes	卤代硝基甲烷
NAs	nitrosamines	亚硝胺
MDA	malondialdehyde	丙二醛
ROS	reactive oxygen species	活性氧
SOD	superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
CAT	catalase	过氧化氢酶
POD	peroxidase	过氧化物酶
GSH	glutathione	还原型谷胱甘肽
T-AOC	total antioxidant capacity	总抗氧化能力
DCAcAm	dichloroacetamide	二氯乙酰胺
LC ₅₀	lethal concentration 50%	半致死浓度
MCAcAm	monochloroacetamide	氯乙酰胺
MBAcAm	monobromoacetamide	溴乙酰胺
EPS	extracellular polymers	胞外聚合物
THMs	trihalomethanes	三卤甲烷
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液

第 1 章 绪 论

1.1 消毒副产物的研究进展

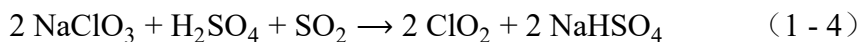
1.1.1 常见的消毒方式

中国《生活饮用水卫生标准（GB 5749 - 2022）》中明确规定饮用水出厂水质必须满足或高于国标中 97 项指标，其中包括 43 项常规指标和 54 项扩展指标^[1]。为了达到水质标准，大部分水厂采用氯化消毒的方式来保证饮用水安全^[2]。目前，消毒方式主要分为化学方式和物理方式，化学消毒包括液氯、氯胺、二氧化氯、臭氧和阳离子表面活性剂法；物理消毒包括紫外线消毒、超声波和冰冻法；其中中国主要以液氯、二氧化氯、氯胺、臭氧和紫外线消毒。18 世纪末，科学家发现液氯对生物细胞具有强氧化性，并成功制备出液氯，而后液氯于 19 世纪初期在饮用水厂开始应用^[3,4]。液氯具有持续消毒时间长、使用简单、成本低的特点，在水处理工艺中能够有效降低疟疾伤寒病的流行病暴发，其消毒原理反应如式（1 - 1）至（1 - 3）^[5]。



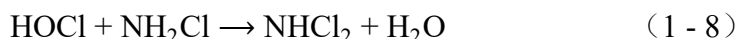
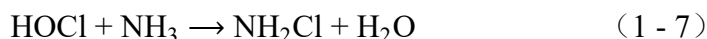
液氯溶于水后发生水解反应，产生具有强氧化性的次氯酸分子（HClO），HClO 在水中易发生电离反应生成次氯酸根离子（OCl⁻）。HClO 和 OCl⁻都能通过离子交换方式进入细胞，高效杀死水中微生物，但无法有效灭活隐孢子虫卵囊^[6,7]。在液氯消毒过程中，HClO 起主要作用，但 HClO 容易受到 pH 变化的影响从而影响消毒效果，同时消毒过程中还会产生具有致癌消毒副产物三卤甲烷（THMs）和卤乙酸（HAAs）^[8,9]。二氧化氯消毒相对液氯消毒具有更好的杀菌消毒效果和稳定性，但其成本较高，二氧化氯气体本身不稳定，储运比较危险，同时消毒过程中产生无机消毒副产物 ClO²⁻、ClO³⁻^[10,11]。二氧化氯本身不会反应

生成 THMs, 但如果二氧化氯被氯离子污染, 就会形成 THMs^[12]。二氧化氯主要通过氯酸钠和硫酸或者氯与亚氯酸钠, 原理如式 (1-4) 至 (1-6)



在使用氯化消毒养殖海水过程中, Wang 等研究发现, 养殖海水氯化过程中形成了大量的 Br-DBPs, 和毒性更大的含氮溴化消毒副产物, 这些消毒副产物易在海洋生物中累积, 这对水生态系统和自然环境具有潜在的危害^[13]。

氯胺消毒相比氯化消毒具有穿透能力强, 持续时间长, 能显著改善水体的色度和气味^[14]。氯胺消毒中起主要作用的是一氯胺(NH_2Cl), 而二氯胺(NHCl_2)和三氯胺(NCl_3)异味较大。氯胺主要是游离氯和氨/铵盐原位反应产生其原理反应如式如式 (1-7) 至 (1-9)^[15]。当水中氯会与有机氮或类蛋白氮(胺)缓慢反应生成有机氯胺, 有机氯胺形成过程缓慢, 消毒能力低于无机氯胺, 其原理如式 (1-10)^[16,17]。



目前, 氯胺常用于二次消毒, 来提高管网中余氯含量, 在一些发达国家氯胺被当作主要的消毒剂使用, 但研究发现, 氯胺的使用减少含碳消毒副产物的生成, 却产生毒性更大的含氮消毒副产物^[18]。在水中相比于液氯较稳定, 次氯酸钠和硫酸氨制备氯胺, 技术成熟, 储运设施简单, 运行管理方便, 成为目前大多数国家最常用消毒方式^[19]。臭氧主要攻击细胞壁和细胞膜中的脂肪酸双键, 导致细胞通透性发生改变, 细胞内容物泄露到水中, 达到灭活细菌的作用, 臭氧还能够攻击病毒的蛋白质外壳, 使病毒不会被易感细胞吸收进来^[20,21]。臭氧能

够有效去除水中细菌、病毒和藻类，降低水体浊度和气味，有效灭活各种细菌，但臭氧在水中不稳定，在 pH 7.6 和 14.6℃ 下的半衰期约为 40 分钟，在较高温度下的半衰期约为 10 ~ 20 分钟，在紫外线的条件下，臭氧的半衰期约为 2 ~ 5 分钟^[22]。常用于预氧化和深度处理工艺，通常与氯消毒联用，但当水中含有一定量的溴离子时，生成溴酸盐和 THMs，在消毒过程中臭氧需要现场制备，成本较高。紫外线对水中病原体、虫卵消毒效果好，杀菌后不会残留，但通常不单独使用，对水中有机物无法去除，一般和氯消毒联用^[23]。几种常用的消毒方式见表 1-1。

表 1-1 几种常用的消毒方式比较

Table 1-1 Comparison of several commonly used disinfection methods

种类	消毒效果	储运与操作	应用范围	缺点
液氯	消毒效果好，在水中存在较稳定	简单，消毒成本低	广泛，成本低	对有机微污染物如抗生素去除能力差，生成大量 C-DBPs 如 THMs、HAAs
二氧化氯	对原生动物（隐孢子虫和贾第虫）消灭能力强	不易储运，浓度高时容易爆炸	地下水和出厂水二次消毒	成本较高，产生较多无机副产物氯酸盐和亚氯酸盐
氯胺	消毒作用时间长，对微生物生长抑制强	现用现配	主要用于有机物含量高的水体，大型集中式供水	需要较长的接触时间才能达到消毒效果，产生含氮消毒副产物
臭氧	对有机物藻类的去除效果好，消毒迅速，广泛	现场制备，存在泄露风险，使用受限	广泛，主要用于原水中有机污染物较多的城市	当水中有溴离子容易生成溴酸盐类消毒副产物，成本较高，消毒持续性较差
紫外线	短时间内灭活水中病原体，消毒迅速广泛	设备较贵，紫外灯罩易结垢，需要定期维护	需要与其他消毒方式联用	不具有持久消毒能力，水中悬浮物浊度较大时对消毒效果影响较大，对水中 COD 去除效果较差，后续管网易受污染

目前，氯消毒具有成本较低、运行简单、杀菌能力强等特点，在水厂中广泛应用，但使用单一的氯消毒会与有机物反应产生大量的 C-DBPs。为了达到更好的消毒效果，大部分水厂采用紫外+氯/氯胺/二氧化氯、紫外+臭氧+氯/氯胺、臭

氧+氯/氯胺,在原水有机污染物较多时,比如夏季高藻、高浊时,采取预氧化工艺可以减少后续工艺负荷^[24]。但这些措施运行过程中,会产生较多的 C-DBPs,引起潜在环境风险。考虑到大型城市市政管网错综复杂,管壁生物膜主要由细菌及其胞外聚合物(EPS)组成,这一类物质富含多糖和蛋白质等高含氮量的有机物,于管道中余氯反应生成具有高毒性的 N-DBPs,如二氯乙腈(DCAN)和二氯乙酰胺(DCAcAm)等^[25]。

据《2022 中国生态环境状态公报》^[26]报道,对全国流域地表水中的 3629 个国家控水质断面进行了持续监测,2022 年流域主要江河中具有 I 类水质仅为 9.0%, II~III 类为 78.9%, III 类以下为 12.1%。在全国 1890 个国家地下水环境质量考核点位中, V 类水占 22.4%, 主要超标物为铁、硫酸盐和氯化物。在开展营养状态监测的 204 个重要湖泊(水库)中,轻度和中度富营养状态湖泊(水库)中占比 29.9%, 这些数据表明我国水源安全形势依旧严峻。对饮用水消毒净化过程中,消毒剂与水中有有机物反应生成具有对人体潜在危害的消毒副产物。

1.1.2 消毒副产物

1974 年, Rook 等首次在以地表水为水源氯化消毒处理后的市政供水系统中检测到三卤甲烷, 其最高浓度范围为 37 - 150 $\mu\text{g/L}$ ^[27,28]。1976 年, 美国环境保护署(U.S.EPA)调查全美饮用水发现三卤甲烷广泛存在。卤代乙酸(HAAs)和三卤甲烷(THMs), 约占卤化消毒副产物总量的 50~75%, 和有机卤化物总量的 25~50%^[29]。Symons 等在一些国家的饮用水中 THMs 含量高达 311 $\mu\text{g/L}$ ^[30]。在日常用水活动(如饮水、洗涤、淋浴、洗澡和游泳)中摄入、吸入和皮肤吸收可导致广泛暴露 THMs。基于暴露于 DBPs 对健康的潜在不利影响, 欧盟、美国和其他国家(例如澳大利亚和中国)已经对四种 THMs 进行了监管。

THMs 的暴露途径是口服, 吸入和皮肤接触等途径, 从而监测和检测的 THMs 已成为强制性的, 以确保公众的针对其致癌性和非致癌性健康与公共供水有关的风险。THMs 部分已被多个国家管控, 我国《生活饮用水卫生标准》(GB/T 5749 - 2022)中规定三氯甲烷、一氯二溴甲烷、二氯一溴甲烷和三溴甲烷的限值分别为 0.06 mg/L、0.1 mg/L、0.06 mg/L 和 0.1 mg/L。美国环境保护署

规定三卤甲烷最大污染浓度限值为 0.08 mg/L。

非挥发性的卤代乙酸是另一种广泛存在饮用水的 DBPs, 包括一氯乙酸、一溴乙酸、二氯乙酸、二溴乙酸、三氯乙酸等。其中以二氯乙酸和三氯乙酸的含量最高, 分别占饮用水中卤代乙酸总量的 33 %和 40 %^[31]。魏晓婷对天津于桥水库中的二氯乙酸检测浓度在 2.8 ~ 10.1 $\mu\text{g/L}$, 三氯乙酸的检测在 2.0 ~ 9.5 $\mu\text{g/L}$ ^[32]。虽然 HAAs 在水体中仅有微量级别, 但由于 HAAs 大多具有急慢性毒性和细胞毒性, 对人体健康有潜在不利影响, 中国自来水中二氯乙酸和三氯乙酸的限值分别为 50 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$; 加拿大分别为 40 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$; 日本分别为 30 $\mu\text{g/L}$ 和 300 $\mu\text{g/L}$ ^[33]。

近年来, 饮用水厂大部分采用高锰酸钾预氧化或者臭氧预氧化, 以及通过使用氯胺来替代液氯等方式, 来减少水厂出水中受管控的 C-DBPs, 但使用氯胺作为消毒剂, 当水中天然有机物和污染物较多时, 会生成更多的 HANs、HNMs 和卤乙酰胺 (HAcAms) 等 N-DBPs。HANs 主要包括溴乙腈、氯乙腈、二溴乙腈、二氯乙腈、三氯乙腈和溴氯乙腈。Muellner 等发现美国饮用水厂中的 HANs 高达 14.0 $\mu\text{g/L}$ ^[34]。Williams 等对加拿大 53 座使用氯/氯胺消毒的水厂出水进行消毒副产物的检测, 发现 97 %的水样中存在二氯乙腈^[35]。考虑到 HANs 具有较高的毒性, 世界卫生组织规定了二氯乙腈的含量最高为 20 $\mu\text{g/L}$ ^[36]。

卤乙酰胺是一类新兴含氮消毒副产物, 其分子具有很强的极性和亲水性, 且挥发性较差, 难以去除^[37]。自 2002 年在美国一项饮用水安全调查中被首次检出后, 卤乙酰胺陆续在世界各国的饮用水、污水和再生水, 甚至在一些游泳池中被检测到, 其浓度范围一般在 0.1 ~ 14.0 $\mu\text{g/L}$ ^[38-41]。国内也有相关报道, 粤港澳大湾区的供水管网中检测到的卤乙酰胺浓度为 0.41 ~ 3.34 $\mu\text{g/L}$ ^[42]。无锡市饮用水厂出水和末梢水中检出的卤乙酰胺浓度为 0.137 ~ 3.288 $\mu\text{g/L}$ ^[43]。研究表明, 氯代乙酰胺在检出的卤乙酰胺中占比最大, 其次是溴代乙酰胺^[44]。

1.1.3 消毒副产物的危害

DBPs 具有潜在的遗传毒性、生殖毒性、发育毒性和致癌性。毒理学研究发现, 通过口服给药暴露于 THMs 已被证明会导致大鼠的胎儿毒性, 包括体重,

体长和存活率降低^[45]。Cao 等对我国 1184 名孕妇血液样本检测 THMs 含量，其中三氯甲烷（TCM）的检出率占比为 92.5%，中位数浓度为 50.70 ng/L，发现妊娠晚期体内 THMs 暴露升高可能会对胎儿生长产生不利影响^[46]。人们通常暴露于饮用水中的 DBP 混合物，其中可能包括其他对胎儿生长毒性更大的 DBP，而不是 THMs^[47]。

Liu 等对 1876 个妊娠期的孕妇尿液中的二氯乙酸和三氯乙酸含量分别高达 96.2 ng/L 和 91.5 ng/L^[48]。Pereira 等通过在饮用水中添加二氯乙酸显著诱导小鼠肝细胞病变，增加肿瘤发病率^[49]。Amira 等发现低剂量和高剂量的二氯乙酸诱导雄性大鼠睾丸毒性^[50]。Chen 等发现二氯乙酸作为干扰内分泌的化学物质发挥作用，二氯乙酸可降低雄性小鼠睾丸中睾酮和雄激素受体中的睾酮水平，二氯乙酸诱导妊娠小鼠流产，增加妊娠小鼠血清中的促卵泡激素水平并降低雌二醇和孕酮水平，降低怀孕小鼠卵巢、子宫和胎盘中雌激素受体水平^[33]。Hassoun 等发现 410 mg/kg 的二氯乙酸通过管饲法每天给予小鼠，小鼠在 4 周后出现肝肿大的现象，具有诱导肝毒性和肝癌^[51]。

与 THMs 和 HAAs 相比，HANs 一类不受管制的 N-DBP，HANs 具有较高的细胞毒性和遗传毒性^[52,53]。研究发现，HANs 能抑制人肝肿瘤 HepG2 细胞增殖并诱导细胞凋亡，降低中国仓鼠卵细胞密度并造成 DNA 损伤，可造成免疫细胞如胸腺细胞和巨噬细胞受损^[54,55]。二氯乙腈可引起大鼠的星形胶细胞中蛋白质羰基化，抑制细胞中的蛋白酶活性，对怀孕小鼠口服二氯乙腈导致胎儿体重低，胎儿大脑皮层神经退行性变，氧化还原失衡以及诱导胎儿大脑皮层和小脑凋亡^[56]。

研究表明，卤乙酰胺的毒性远大于含碳消毒副产物且具有“三致”效应^[57,58]，其可诱导人肾胚细胞产生高含量的活性氧，损坏线粒体正常功能，导致细胞周期阻滞和凋亡^[59]；还可抑制小鼠胚胎细胞发育，导致流产和胎儿畸形，破坏机体正常能量代谢^[60,61]。经过暴露，斑马鱼脑组织中的卤乙酰胺积累量高于肠和鳃，体内氨基酸代谢出现紊乱，肝脏超氧歧化酶和过氧化氢酶水平增加，产生氧化应激^[62]。何梦婷等发现，溴乙酰胺可抑制斑马鱼胚胎神经发育相关基因的表达，提高其胚胎脑组织中活性氧水平^[63]。

1.2 轮虫的生态毒理学研究

轮虫约有 2000 种，是一类多细胞动物（约有 1000 个细胞）、体型较小，未分节的双侧对称假腔动物，大多数在 50 μm ~ 2000 μm 之间，具有多样化的形态，拥有不同的生活史策略，并占据了广泛的栖息地。轮虫的分布包括海洋、咸水和淡水，以及覆盖陆地苔藓和水合物土壤（湖沼）。轮虫在许多内陆水域（包括淡水和咸水）中发挥着重要的生态作用^[64]。由于它们的繁殖速度很快，它们可以很容易地达到每升水 1000 只以上的种群密度，偶尔会在浮游动物群落中占主导地位。轮虫的数量可能如此之多，尽管它们的体型很小，但它们占浮游动物总生物量的很大一部分；它们是微生物循环和更高营养水平之间的重要纽带。轮虫动物门（Phylum rotifera）分为单巢纲（Monogononta）和双巢纲（Digononta）^[65]。

单巢纲轮虫主要以细菌、藻类和微小无脊椎动物为食，同时又是枝角类、桡足类和鱼类的食物^[66]。单巢纲轮虫进行周期性的孤雌生殖，其中无性繁殖很普遍，但在某些情况下也会发生有性繁殖（图 1-1）。在没有雄性的情况下，无性生殖在轮虫生命周期中占主导地位，这种生殖方式可以在环境适宜时候产生很多轮虫。当轮虫受到外界环境的不良影响（如温度季节性变化、干旱、化学胁迫、捕食者过多时），就会转变生殖方式为有性生殖。无性繁殖的雌性被称为非混交雌体（amictic female），有性繁殖的雌性被称为混交雌体（mictic female）。非混交雌性产生二倍体卵（amictic eggs 无需精卵），通过减数分裂发育成混交雌体。混交雌性通过减数分裂产生单倍体卵。这些卵将孤雌生殖发育成单倍体雄性，但如果这些混交雌体受精，它们将产生二倍体休眠卵（resting eggs 休眠卵）。单倍体雄性比雌体明显体型小并且移动得更快，雄性一般没有消化系统，寿命很短。因此，产生休眠卵是从无性繁殖转向有性繁殖的结果。

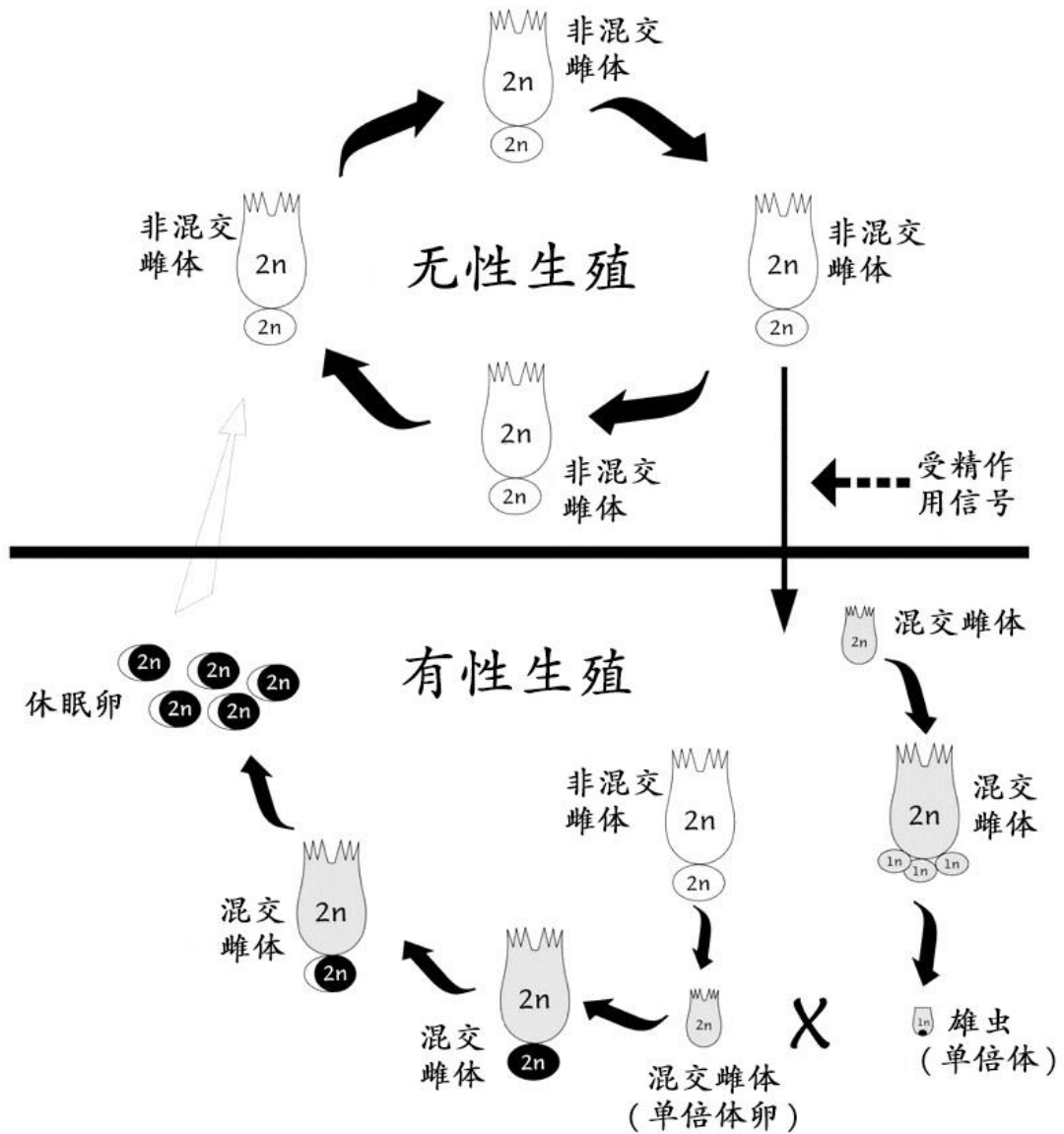
图 1-1 单巢纲轮虫生活史模式图^[67]

Figure 1-1 Life cycle pattern diagram of rotifer

轮虫普遍具有世代时间短、繁殖快、易于实验室培养、培养成本低和对污染物敏感等特点,常被用来评估污染物的环境毒性和生态风险。Gallardo 等用海洋中常见的褶皱臂尾轮虫来研究 8 种脊椎动物和无脊椎动物激素对种群增长的影响,发现 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、生长激素 (Growth

hormone, GH)、人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)和5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)暴露下显著提高了种群增长, 雌二醇(estradiol-17 β , E2)则抑制种群增长^[68]。Gyung 等采用轮虫 24 h 死亡率和 48 h 轮虫种群生长抑制实验比较了染料废液、工业废液、养殖和皮革加工废液中的污泥提取物的毒性大小^[69]。González-Pérez 等用墨西哥湾水生生态系统中常见的轮虫 *Plationus patulus* 和 *Brachionus havanaensis* 分别测定三氯生的 24 h 的中位致死浓度(24 h-LC₅₀) 300 $\mu\text{g/L}$ 和 500 $\mu\text{g/L}$, 并在亚致死浓度的三氯生暴露下, 抑制轮虫的种群增长率, 降低了平均寿命^[70]。

淡水萼花臂尾轮虫是开展水生态毒理学研究的模式生物, 具有孤雌生殖和有性生殖两种方式, 两种生殖方式可交替进行。在一般情况下主要进行无性生殖, 这种方式能够迅速产生大量个体; 轮虫受到外界刺激时, 比如温度、盐度、污染物胁迫、种群密度和捕食者威胁等, 会转变生殖策略, 进行有性生殖, 来应对变化, 这种孤雌生殖方式可以让轮虫有更强的环境适应能力。

近年来, 利用萼花臂尾轮虫的有性生殖参数和氧化应激指标作为实验终点, 开展了多种新兴污染物毒性效应的评价工作^[71,72]。Preston 和 Snell 等开发了一种 96 h 的生殖测定法, 使用萼花臂尾轮虫来筛选潜在的内分泌干扰物, 发现氟他胺、睾酮和壬基酚分别在 1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 的浓度下抑制轮虫受精^[73]。

1.3 研究内容和技术路线

1.3.1 研究内容

萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)(图 1-2)是一种广温、浮游性轮虫, 分布广泛, 是臂尾属中常见的种类。



图 1-2 蓼花臂尾轮虫图

Figure 1-2 Picture of *Brachionus calyciflorus*

本文以淡水中常见的蓼花臂尾轮虫为对象,选取含碳消毒副产物二氯乙酸,含氮消毒副产物二氯乙腈和三种新兴的 N-DBPs 卤乙酰胺(氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺)作为污染物,综合评价这 5 种 DBPs 对轮虫的毒性效应:

(1) 采用 24 h 急性毒性暴露实验,选择二氯乙酸和二氯乙腈(1、10、20、40、80 和 100 mg/L),氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺(1、5、10、20、40 和 80 mg/L)。研究不同种类、不同浓度下对蓼花臂尾轮虫的 24 h 致死率影响,根据几率单位算法计算出 24 h-LC₅₀ 值,比较消毒副产物对蓼花臂尾轮虫的毒性大小。根据消毒副产物的环境浓度和 24 hLC₅₀ 值,设置三个浓度(10、20 和 200 μg/L),研究不同种类、不同浓度下消毒副产物对蓼花臂尾轮虫 2 d 种群增长率的影响。

(2) 采用 4 d 有性生殖和 7 d 休眠卵实验,设置三个浓度(10、20 和 200 μg/L),研究不同种类、不同浓度下消毒副产物对蓼花臂尾轮虫 OF/NOF、MF/AF、MR 和 FR 以及 7 d 休眠卵产量的影响。

(3) 采用氧化应激实验,设置三个浓度(10、20 和 200 μg/L),研究暴露 12 h 后对轮虫体内抗氧化应激系统的影响,研究消毒副产物在不同浓度暴露下

对抗氧化酶（超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶）活性、抗氧化剂（还原型谷胱甘肽）含量和丙二醛含量及总抗氧化能力的影响。

（4）采用种群增长、有性生殖和氧化应激实验，选择二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺等消毒副产物在环境浓度（10 $\mu\text{g/L}$ ）浓度下，研究联合暴露对萼花臂尾轮虫的 2 d 种群增长率、有性生殖参数和氧化应激指标的影响。

1.3.2 技术路线

本研究技术路线如图 1-3 所示

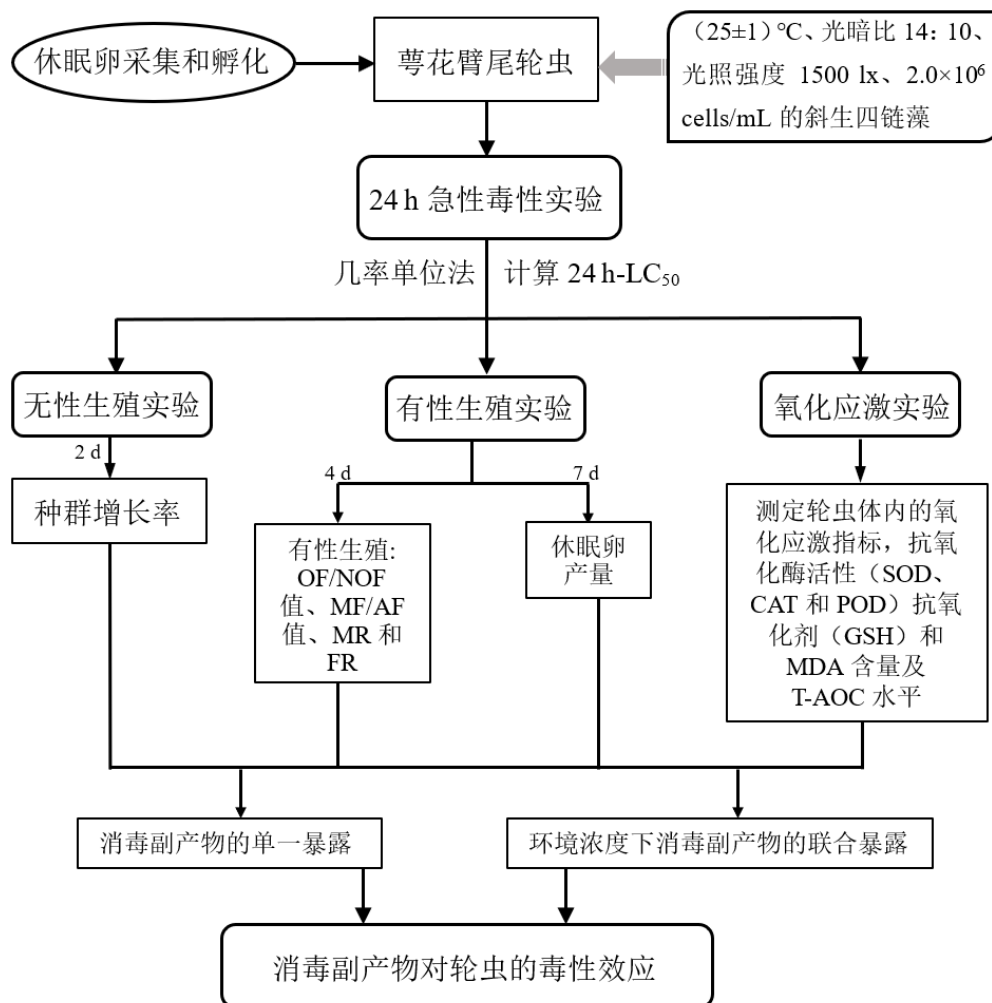


图 1-3 研究技术路线图

Figure 1-3 Technology roadmap for research

第二章 实验材料与方法

2.1 实验仪器与材料

2.1.1 实验药剂与仪器

实验过程中主要化学试剂见表 2-1.

表 2-1 主要化学试剂

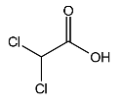
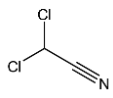
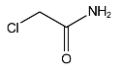
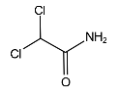
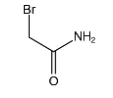
Table 2-1 Main chemical reagents

名称	纯度/规格	生产厂家
碳酸氢钠	AR/500g	国药集团化学试剂有限公司
二水硫酸钙	AR/100g	国药集团化学试剂有限公司
七水硫酸镁	AR/100g	国药集团化学试剂制药厂
氯化钾	AR/500g	国药集团化学试剂制药厂
硫酸铵	AR/250g	国药集团化学试剂制药厂
磷酸氢钾	AR/250g	国药集团化学试剂制药厂
无水氯化钙	AR/100g	国药集团化学试剂制药厂
无水磷酸氢二钠	AR/100g	天津市大茂化学试剂厂
磷酸二氢钾	AR/500g	成都市科龙化工试剂厂
氢氧化钠	AR/500g	上海阿拉丁生化科技有限公司
乙醇	AR/2.5L	中国国药化学试剂有限公司
三氯化铁	AR/100g	国药集团化学试剂有限公司
二氯乙酸	98%/25g	上海阿拉丁试剂有限公司
二氯乙腈	98%/25g	上海阿拉丁试剂有限公司
氯乙酰胺	99%/5g	上海阿拉丁试剂有限公司
二氯乙酰胺	≥99%/5g	天津希恩思生化科技有限公司
溴乙酰胺	≥98%/5g	上海阿拉丁试剂有限公司

本实验所用的二氯乙酸 (Dichloroacetic acid, DCA)、二氯乙腈 (Dichloroacetonitrile, DCAN)、氯乙酰胺 (Chloroacetamide, MCAcAm)、二氯乙酰胺 (Dichloroacetamide, DCAcAm) 和溴乙酰胺 (Bromoacetamide, MBAcAm) 等消毒副产物的理化性质见表 2-2。

表 2-2 二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺的理化性质

Table 2-2 Physical and chemical properties of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide, and bromoacetamide

名称	CAS 号	分子式	摩尔质量/ (g/mol)	溶解度/ (mol/L)	分子结构
二氯乙酸	79-43-6	$C_2H_2Cl_2O_2$	128.94	0.556	
二氯乙腈	3018-12-0	C_2HCl_2N	109.94	7.76	
氯乙酰胺	79-07-2	C_2H_4ClNO	93.51	0.957	
二氯乙酰胺	683-72-7	$C_2H_3Cl_2NO$	127.95	0.555	
溴乙酰胺	683-57-8	C_2H_4BrNO	137.964	1.160	

注：表中数据来源于 EPA CompTox Chemicals Dashboard 数据库 (<https://comptox.epa.gov/dashboard>)

实验过程中使用到的主要实验仪器见表 2-3。

表 2-3 主要实验仪器

Table 2-3 Main experimental instruments

仪器名称	生产厂家	型号
蔡康光学显微装置	上海蔡康光学仪器有限公司	XSP-8CC
手提式压力蒸汽灭菌器	上海申安医疗器械厂	DSX-280B
电子天平	德国赛多利斯集团	BL610
数显恒温水浴锅	江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司	HH-6
冷冻离心机	湖南可成仪器设备有限公司	H1-16KR
超纯水机	合肥宏科仪器有限公司	HK10958
智能光照培养箱	上海谷宁仪器有限公司	PGX-350C
体式显微镜	麦克奥迪实业集团有限公司	SMZ168
超净工作台	苏州安泰公司	SW-CJ-1F
鼓风干燥箱	上海三发科学仪器有限公司	DHG-9101
pH 计	上海仪电科学仪器股份有限公司	雷磁 PHS-3c
双光束紫外可见光分光光度计	北京普析通用仪器有限责任公司	TU-1901

2.1.2 斜生四链藻的培养

斜生四链藻 (*Tetradesmus obliquus*)。该藻采用水生 4 号 (HB-4) 培养液 (表 2-4) 在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下恒温培养, 光照强度 1500 lx, 光暗比 14: 10 的培养箱中培养, 每日摇晃藻瓶 4~6 次, 保证藻处于对数生长期, 在 4000 r/min 进行离心浓缩后, 置于 4°C 冰箱储存^[74]。

表 2-4 水生四号培养液配方

Table 2-4 HB-4 Formula

试剂	摩尔质量 (g/mol)	浓度 (mg/L)
NaHCO ₃	84.01	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.47	80
KCl	74.55	25
(NH ₄) ₂ SO ₄	132	200
K ₂ HPO ₄	174.18	15
无水 CaCl ₂	111.98	15
土壤培养液	/	2.5mL
A ₅	/	2.5mL
FeCl ₃ ·6H ₂ O (1.5%)	270.29	0.75mL

2.1.3 轮虫的采集与培养

受试所用的萼花臂尾轮虫，采自芜湖市镜湖水体沉积物中的休眠卵，在实验室孵化所得，所用轮虫培养基为美国环境保护局(US EPA)配方（表 2-5），在（25 ± 1）℃条件下恒温培养，光照强度 1500 lx，光暗比 14: 10 的培养箱中培养，经过多代单克隆培养后，种群建立并稳定培养。轮虫的食物为离心收集处于指数生长的斜生四链藻。

表 2-5 美国环境保护局(US EPA)配方

Table 2-5 U.S. Environmental Protection Agency Formula

试剂	摩尔质量 (g/mol)	浓度 (mg/L)
NaHCO ₃	84.01	96
CaSO ₄ ·2H ₂ O	172.14	60
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.47	60
KCl	74.55	4

2.2 实验设计

2.2.1 急性毒性和生殖实验

5 种消毒副产物用 EPA 培养液配置成 1000 mg/L 的母液用于急性毒性实验，于 4℃冰箱避光冷藏，实验所用测试液均采用新鲜配置的 EPA 培养液按比例稀释，均现用现配。

实验开始前，将轮虫置于温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱中预培养超过 14 d，光暗周期为 14（光）：10（暗），每 24 h 更换新鲜的轮虫培养液，并投喂密度为 2.0×10^6 cells/mL 的斜生四链藻，同时去除一部分个体，维持轮虫种群处于稳定增长期。

根据多次勘探试验结果，将二氯乙酸和二氯乙腈的浓度设置为 1、10、20、40、80 和 100 mg/L，氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺的浓度设置为 1、5、10、20、40 和 80 mg/L，一组仅含有 EPA 培养液的空白对照。实验在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、无光照的恒温培养箱中进行，实验开始前，提前挑选出 200~300 只个体相当且均携带非混交卵的轮虫雌体，置于 50 mL 的玻璃杯中（含 30 mL EPA 培养液和密度为 2.0×10^6 cells/mL 的斜生四链藻）。在 4 h 后随机挑选 10 个大小相近的轮虫幼体放入容量为 6 mL 的玻璃杯中，并加入 5 mL 测试液（不含斜生四链藻），每个测试浓度设置 4 个重复；经过 24 h 暴露后，在显微镜下对每个玻璃杯中死亡轮虫计数，实验期间不投喂斜生四链藻。

根据急性毒性实验结果和环境检出浓度，5 种消毒副产物的浓度均设置为 10、20 和 200 $\mu\text{g/L}$ ，另设一组空白对照组，每组设置 8 个重复。随机选取 3 个龄长小于 4 h 且大小相近的轮虫幼体，放入 6 mL 玻璃杯中，加入 5 mL 的测试液（含密度为 2.0×10^6 cells/mL 的斜生四链藻）。实验在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、无光照的恒温培养箱中进行，每 12 h 悬浮沉积在玻璃杯底部的食物，每 24 h 更换新鲜的测试液，实验进行至 48 h，对每个玻璃杯中存活的轮虫进行计数。实验至 96 h 后，对不同种类雌体轮虫进行计数，雌体鉴别方法参考文献^[75]；168 h 后，对混交雌体携带休眠卵和落入玻璃杯底部的休眠卵进行计数。

2 d 种群增长率 (r) 计算公式:

$$r=(\ln N_t - \ln N_0)/t \quad (2-1)$$

式中: N_t 和 N_0 分别为实验结束和开始时的轮虫总个数; t 为时间, 该实验中 t 取 2 d。

4 d 有性生殖参数包括 OF/NOF (携卵雌体数/不携卵雌体数)、MF/AF (携卵雌体数中混交雌体数/非混交雌体数)^[76]、MR (混交率, 种群中混交雌体数/雌体总数)、FR (受精率, 轮虫种群中受精的混交雌体数/混交雌体总数)。7 d 休眠卵产量 (5 mL 测试液中轮虫在 7 d 内所产休眠卵的总数)^[77]。

2.2.2 氧化应激实验

5 种消毒副产物浓度和空白对照的设置与有性生殖实验中相同。从预培养的试管中随机挑取约 10000 只轮虫放入 50 mL 烧杯中, 加入 25 mL 测试液 (不含食物), 每个浓度设置 4 个重复。实验在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、无光照恒温培养箱中进行, 实验期间不投喂食物。暴露 12 h 后, 用 $25\ \mu\text{m}$ 的滤网收集轮虫并用 EPA 培养基清洗, 收集好的轮虫样品保存于 -80°C 冰箱中, 待检测用。

将轮虫样品转移至玻璃匀浆器中加入预冷的磷酸缓冲液, 0°C 下冰浴匀浆 5 min 后转移至 1.5 mL 离心管中, 于 $10\ 000\ \text{g}$ 、 4°C 下离心 10 min, 离心结束后收集上清液用于测定相关酶活性和蛋白含量。选取超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、过氧化氢酶 (CAT) 活性、过氧化物酶 (POD) 活性和还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量作为氧化应激指标, 选取丙二醛 (MDA) 含量来衡量细胞脂质过氧化化水平, 同时检测总抗氧化能力 (T-AOC)。具体检测步骤按照 SOD 试剂盒 (索莱宝生物科技有限公司, 北京, BC0170), CAT 试剂盒 (索莱宝, BC0205), POD 试剂盒 (索莱宝, BC0090), GSH 试剂盒 (索莱宝, BC1175), MDA (索莱宝, BC0025), T-AOC 试剂盒 (索莱宝, BC1315) 等说明进行。具体测定原理如下:

(1) SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶的测定

使用用于生成超氧自由基阴离子的黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶 (XO) 评估 SOD 活性。使用硝基蓝四唑 (NBT) 作为超氧化物形成的指标。SOD 与 NBT 竞争超氧自由基, 可以通过测量 $550\ \text{nm}$ 处的吸光度来监测 NBT 的还原程度, NBT 的

抑制与 SOD 的量成正比。酶活力单位表示为 U/mg prot。

CAT 在一定条件下能直接分解过氧化氢使其浓度下降,使反应溶液 240 nm 下的吸光度随反应时间而下降,根据吸光度的变化率可计算出 CAT 活性。酶活力单位表示为 U/mg prot。

POD 催化 H_2O_2 氧化愈创木酚(邻甲氧基苯酚, guaiacol) 氧化形成 4-邻甲氧基苯酚,该产物在 470 nm 处有特征光吸收。酶活力单位表示为 U/mg prot。

(2) GSH 和 T-AOC 的测定

谷胱甘肽能和 2-硝基苯甲酸反应产生 2-硝基-5-巯基苯甲酸和谷胱甘肽二硫化物(GSSG)。2-硝基-5-巯基苯甲酸为黄色产物,在波长 412 nm 处具有最大光吸收。GSH 含量单位为 $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ 。

在酸性环境下,细胞内许多抗氧化物质可以还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪(Fe^{3+} -TPTZ)产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ,的能力反映了总抗氧化能力,该产物在 593nm 有特征光吸收。T-AOC 单位为 $\mu\text{mol}/\text{mg prot}$ 。

(3) MDA 的测定

丙二醛(MDA)在酸性和高温条件下,可以与硫代巴比妥酸(TBA)缩合,生成棕红色的三甲川(3,5,5-三甲基恶唑-2,4-二酮),其最大吸收波长在 532 nm。进行比色后可估测样本中 MDA 的含量。MDA 单位为 $\text{nmol}/\text{mg prot}$ 。

2.2.3 联合暴露实验

选取二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺,将三种消毒副产物在环境浓度下进行二元暴露和三元暴露,分别为 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙酰胺+10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙腈、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙酰胺+10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙酸、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙腈+10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙酸和 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙酰胺+10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙腈+10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 二氯乙酸,另设一组空白对照组,每组设置 8 个重复。随机选取 3 个龄长小于 4 h 且大小相近的轮虫幼体,放入 6 mL 玻璃杯中,加入 5 mL 的测试液(含密度为 $2.0 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ 的斜生四链藻)。实验在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、无光照的恒温培养箱中进行,每 12 h 悬浮沉积在玻璃杯底部的食物,每 24 h 更换新鲜的测试液,实验进行至 48 h,对每个玻璃杯中存活的轮虫进行计数。实验至 96 h 后,对不同种类雌体轮虫进行计数。168 h 后,对

混交雌体携带休眠卵和落入玻璃杯底部的休眠卵进行计数。2 d 种群增长率(r)的计算公式、4 d 有性生殖和 7 d 休眠卵产量的计算见 2.2.1 节。

选取二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺,将三种消毒副产物在环境浓度下进行二元暴露和三元暴露,分别为 10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酰胺+10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙腈、10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酰胺+10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酸、10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙腈+10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酸和 10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酰胺+10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙腈+10 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酸,另设一组空白对照组。从预培养的试管中随机挑取约 10000 只轮虫放入 50 mL 烧杯中,加入 25 mL 测试液(不含食物),每个浓度设置 4 个重复。实验在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、无光照恒温培养箱中进行,实验期间不投喂食物。暴露 12 h 后,用 25 μm 的滤网收集轮虫并用 EPA 培养基清洗,收集好的轮虫样品保存于 -80°C 冰箱中,待检测用。轮虫体内的 SOD、CAT、POD、GSH、T-AOC 和 MDA 的测定步骤见 2.2.2 节。

2.3 数据处理

数据处理、分析和拟合在 Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件中完成,绘图在 Origin 2023 软件中完成。采用概率单位法(PROBIT, Probability unit)计算 5 种消毒副产物对轮虫 24 h-LC₅₀(24 h 半数致死浓度),经正态分布和方差齐性检验后,2 d 种群增长率指标、有性生殖指标、氧化应激指标、采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和多重比较(LSD test)法,比较处理组与对照组数值之间的差异显著性,设定 $P < 0.05$ 为显著性水平。

第三章 5 种消毒副产物对萼花臂尾轮虫生殖的毒性影响

急性实验可以在短时间内评估污染物毒性大小，通常以半数致死浓度作为实验终点，这种测试方法避免了繁琐的连续培养，在研究污染物对水生生物的急性毒性应用广泛^[78]。近年来，轮虫常用于水环境中污染物的毒性大小评估，具有低成本、世代时间短、易培养和对污染物敏感等特点。Snell 等用海水中常见的褶皱臂围轮虫作为受试对象，采用 24 h 急性毒性暴露实验研究了六种化合物的急性毒性，这种方法快速、灵敏、高度可重复、易于实验操作^[79]。种群增长率是衡量对污染物毒性大小的一个很好指标，因为它整合轮虫生活史特征之间潜在的复杂相互作用，包括生殖率和死亡率^[80]。

萼花臂尾轮虫作为淡水生态系统中的组成部分，在物质循环和能量流动过程中发挥重要作用，研究污染物对萼花臂尾轮虫的毒性影响具有重要意义。目前，萼花臂尾轮虫的快速评价污染物毒性已被美国材料与实验协会（ASTM）列为美国国家标准^[81]。近年来，国内外许多学者以萼花臂尾轮虫为受试生物，开展了许多急性毒性实验。黄林等采用萼花臂尾轮虫研究两种杀虫剂氯氰菊酯和溴氰菊酯对轮虫的急性毒性，采用机率单位算法计算出氯氰菊酯和溴氰菊酯的 24 h-LC₅₀ 分别为 3376.87 $\mu\text{g/L}$ 和 594.56 $\mu\text{g/L}$ ^[82]。Snell 等采用萼花臂尾轮虫对 28 种污染物进行急性毒性评价，并计算出 24 h-LC₅₀，来比较污染物的毒性大小^[83]。刘红玲等研究了含溴阻燃剂双酚 A 和四溴双酚 A 对大型溞幼体和斑马鱼胚胎的急性毒性，发现这两种污染物均具有高毒性^[84]。邢军以斑马鱼、剑尾鱼和孔雀鱼为受试生物评估了苯、苯酚和氯苯的毒性，对三种鱼的毒性大小均为氯苯 > 苯酚 > 苯^[85]。

二氯乙酸和二氯乙腈作为被管制的消毒副产物，在各类消毒后的水体中广泛存在，而且在实际水环境中具有较高的检出率^[88]。卤乙酰胺作为一类未监管的消毒副产物，随着氯胺的使用，水中的含氮有机物增加以及供水管网中管壁生物膜的存在，导致水体中的卤乙酰胺总量增加^[25,43]。目前针对二氯乙酸和二氯乙腈的毒性研究主要集中在啮齿类动物和小型鱼类，对水生无脊椎动物中轮虫的研究暂无，尤其是，氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对水生无脊椎动物

的急性毒性研究较少。本章以萼花臂尾轮虫为受试生物，研究含碳消毒副产物中生成量较大的二氯乙酸和含氮消毒副产物中二氯乙腈和三种卤乙酰胺（氯乙酰胺、二氯乙酰胺、溴乙酰胺）采用 24 h 急性毒性暴露和生殖实验，研究了这 5 种 DBPs 对萼花臂尾轮虫的存活、繁殖和 2 d 种群增长率、有性生殖指标和休眠卵产量的影响。

3.1 消毒副产物对轮虫的急性毒性和生殖的影响

3.1.1 5 种消毒副产物对轮虫的急性毒性

暴露于 10 mg/L 二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺 24 h 后，典型个体体型状况如图 3-1 所示。在显微镜下观察发现，5 种消毒副产物导致轮虫死亡后体内器官明显萎缩、分解，身体呈透明状，特别是在溴乙酰胺处理组中该特征更显著。

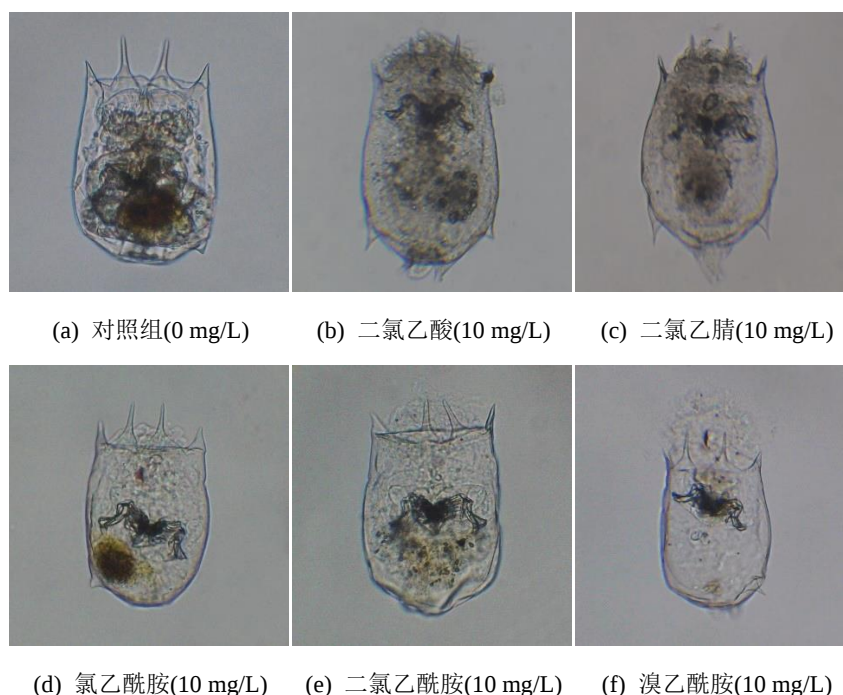


图 3-1 暴露于 10 mg/L 二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺 24 h 后的萼花臂尾轮虫体态

Figure 3-1 Morphological changes of *Brachionus calyciflorus* after exposure to 10 mg/L dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide, and bromoacetamide for 24 h

暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 24 h 的死亡率和 24 h-LC₅₀ 如图 3-2 所示。二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对萼花臂尾轮虫的 24 h-LC₅₀ 分别为 73.63、42.44、12.49、23.12 和 2.46 mg/L，测试浓度与致死率之间呈现明显的剂量-效应关系 ($R^2 \geq 0.87$)。二氯乙酸作为含碳消毒副产物，其对萼花臂尾轮虫的 24 h-LC₅₀ 高于含氮消毒副产物二氯乙腈。不同浓度卤乙酰胺均提高了轮虫的死亡率；而相同浓度下，溴乙酰胺对轮虫致死作用比氯乙酰胺、二氯乙酰胺更明显；暴露于 20 mg/L 溴乙酰胺的轮虫死亡率为 100%，而暴露于 80 mg/L（最高浓度）氯乙酰胺、二氯乙酰胺中轮虫死亡率分别为 80% 和 70%。

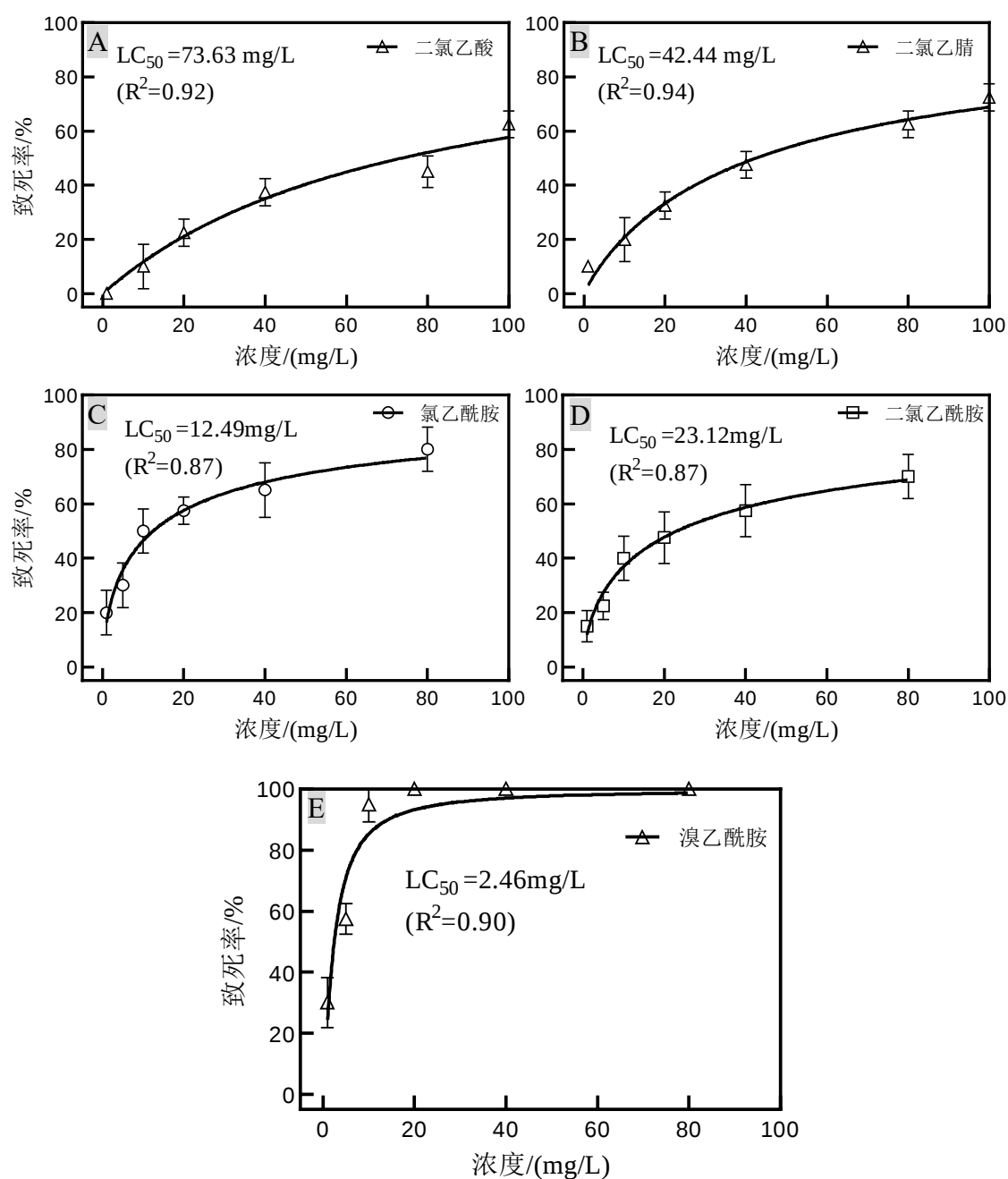


图 3-2 暴露于不同浓度的二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺 24 h 后的蓼花臂尾轮虫致死率

Figure 3-2 Mortality of *Brachionus calyciflorus* after exposure to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide, and bromoacetamide for 24 h

3.1.2 消毒副产物对轮虫种群增长的影响

不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对萼花臂尾轮虫 2 d 种群增长率的影响如图 3-3 所示。由图 3-3 可见，与对照相比，在 10 $\mu\text{g/L}$ 的消毒副产物暴露下，对轮虫的 2 d 种群增长率均无显著影响 ($P > 0.05$)；在 20 $\mu\text{g/L}$ 的消毒副产物暴露下，二氯乙酸显著提高了轮虫的 2 d 种群增长率 ($P < 0.05$)，氯乙酰胺显著抑制了轮虫的 2 d 种群增长 ($P < 0.05$)；在 200 $\mu\text{g/L}$ 的消毒副产物暴露下，除二氯乙酰胺外，其他处理组均对轮虫的 2 d 种群增长率均无显著影响 ($P > 0.05$)。

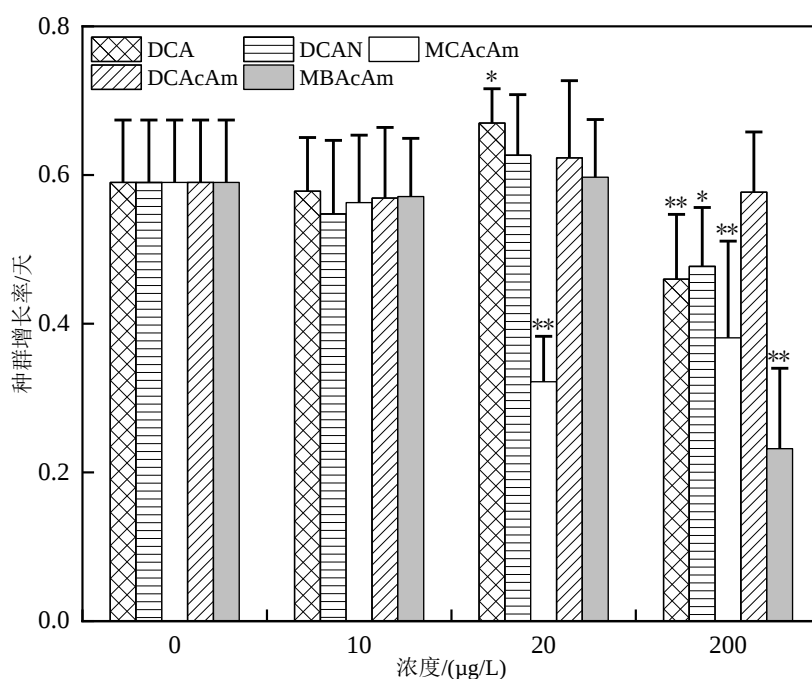


图 3-3 暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 2 d 种群增长率

Figure 3-3 Two-day population growth rate of *Brachionus calyciflorus* exposed to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloroacetamide, and bromoacetamide

3.1.3 消毒副产物对轮虫有性生殖的影响

不同浓度的二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对萼花

臂尾轮虫 4 d 有性生殖参数的影响如表 3-1 所示。

与对照相比,在 10 $\mu\text{g/L}$ 浓度下,二氯乙腈、二氯乙酸、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对轮虫的有性生殖参数均无显著影响 ($P > 0.05$)。200 $\mu\text{g/L}$ 氯乙酰胺和 20 $\mu\text{g/L}$ 溴乙酰胺均显著提高了轮虫种群的 OF/NOF ($P < 0.05$), 20 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酰胺则显著降低了轮虫种群的 OF/NOF ($P < 0.05$); 200 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酸显著提高了轮虫种群的 MF/AF ($P < 0.05$); 200 $\mu\text{g/L}$ 氯乙腈、二氯乙酰胺和 20 $\mu\text{g/L}$ 溴乙酰胺均显著提高了轮虫种群的 MR ($P < 0.05$); 20 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酸、溴乙酰胺和 200 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙腈、二氯乙酰胺均显著提高了轮虫种群的 FR ($P < 0.05$)。

表 3-1 暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 4 d 有性生殖参数

Table 3-1 The reproductive parameters of *Brachionus calyciflorus* in four days exposed to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichl-oroacetamide, and bromoacetamide

项目	浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	OF/NOF	MF/AF	MR	FR
Control	0	0.757 $\pm$ 0.149	0.607 $\pm$ 0.289	0.152 $\pm$ 0.041	0.275 $\pm$ 0.127
	10	0.793 $\pm$ 0.461	0.606 $\pm$ 0.156	0.157 $\pm$ 0.068	0.338 $\pm$ 0.157
DCA	20	0.82 $\pm$ 0.309	0.487 $\pm$ 0.135	0.142 $\pm$ 0.04	0.404 $\pm$ 0.07*
	200	0.776 $\pm$ 0.261	0.858 $\pm$ 0.292*	0.191 $\pm$ 0.04	0.437 $\pm$ 0.121*
DCAN	10	0.94 $\pm$ 0.475	0.574 $\pm$ 0.226	0.162 $\pm$ 0.073	0.22 $\pm$ 0.169
	20	0.676 $\pm$ 0.25	0.746 $\pm$ 0.149	0.167 $\pm$ 0.039	0.315 $\pm$ 0.155
	200	1.123 $\pm$ 0.535	0.81 $\pm$ 0.076	0.227 $\pm$ 0.05**	0.335 $\pm$ 0.085
MCAcAm	10	0.844 $\pm$ 0.218	0.684 $\pm$ 0.215	0.178 $\pm$ 0.041	0.208 $\pm$ 0.180
	20	0.782 $\pm$ 0.093	0.680 $\pm$ 0.283	0.169 $\pm$ 0.040	0.408 $\pm$ 0.155
	200	1.492 $\pm$ 0.247**	0.641 $\pm$ 0.315	0.219 $\pm$ 0.064**	0.301 $\pm$ 0.093
DCAcAm	10	0.816 $\pm$ 0.178	0.711 $\pm$ 0.313	0.179 $\pm$ 0.044	0.261 $\pm$ 0.130
	20	0.539 $\pm$ 0.101*	0.553 $\pm$ 0.286	0.120 $\pm$ 0.049	0.379 $\pm$ 0.188
	200	0.886 $\pm$ 0.250	0.700 $\pm$ 0.284	0.183 $\pm$ 0.038	0.544 $\pm$ 0.148**
MBAcAm	10	0.706 $\pm$ 0.269	0.735 $\pm$ 0.104	0.170 $\pm$ 0.036	0.313 $\pm$ 0.123
	20	1.101 $\pm$ 0.453*	0.794 $\pm$ 0.459	0.199 $\pm$ 0.044*	0.497 $\pm$ 0.107**
	200	0.626 $\pm$ 0.075	0.519 $\pm$ 0.217	0.127 $\pm$ 0.030	0.331 $\pm$ 0.159

注:表中数据为平均值 $\pm$ 标准差; *和**分别表示与对照组有显著差异 ($P < 0.05$) 和极显著差异 ($P < 0.01$)。

3.1.4 消毒副产物对轮虫休眠卵产量的影响

不同浓度的二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对萼花臂尾轮虫 7 d 休眠卵产量的影响如图 3-4 所示。二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对轮虫的休眠卵产量均有显著性影响 ($P < 0.05$)。与对照相比, 20 和 200 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙腈显著增加了萼花臂尾轮虫 7 d 休眠卵产量, 分别从 7.125 增加至 9.875 和 12.375 ($P < 0.05$); 10、20 和 200 $\mu\text{g/L}$ 氯乙酰胺显著增加了萼花臂尾轮虫 7 d 休眠卵产量, 分别从 7.125 增加至 13.125、10.75 和 31.25 ($P < 0.05$); 20 和 200 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酰胺显著增加了萼花臂尾轮虫 7 d 休眠卵产量, 分别从 7.125 增加至 9.875 和 19.375 ($P < 0.05$); 10、20 $\mu\text{g/L}$ 溴乙酰胺显著增加了萼花臂尾轮虫 7 d 休眠卵产量, 分别从 7.125 增加至 16.625 和 15.75 ($P < 0.05$)。

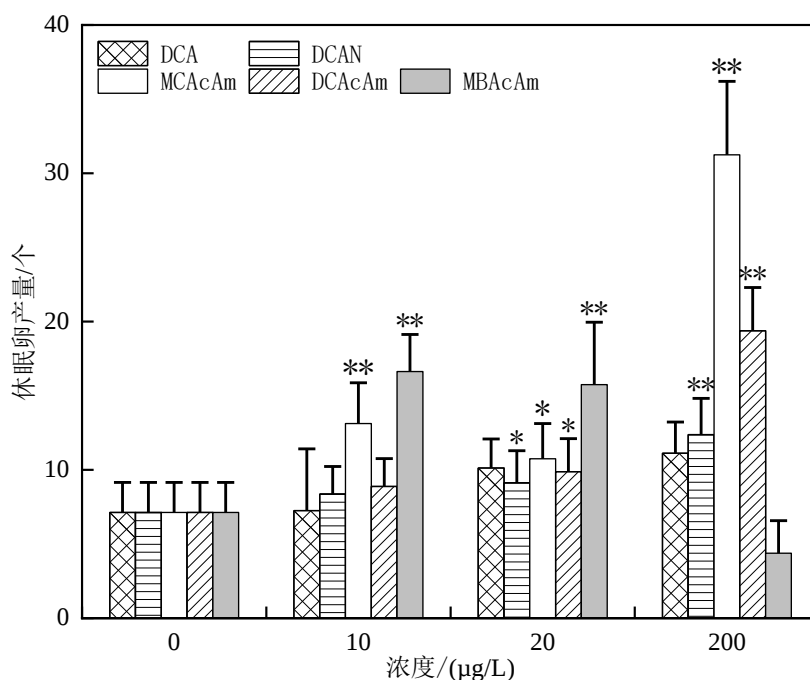


图 3-4 暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 7 d 休眠卵产量

Figure 3-4 Seven-day resting eggs production of *Brachionus calyciflorus* exposed to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloro-acetamide, and bromoacetamide

3.2 讨论

淡水萼花臂尾轮虫可通过快速无性繁殖建立单克隆种群，对重金属、有机化合物和农药等较为敏感，适合用作评价外界物质对淡水生态系统的生态风险，其中，污染物对轮虫急性半数致死浓度例如，Snell 等提出的轮虫 24 h-LC₅₀ 标准测试方法简单易行，避免了繁琐的连续培养，已广泛用于评价污染物对轮虫的急性毒性作用^[79]。研究显示，二氯乙酰胺对大鼠肾细胞和遗传毒性的 LC₅₀ 分别为 6390 mg/L 和 431 mg/L^[58]，对斑马鱼成鱼的 LC₅₀ 为 315 mg/L^[86]，均远大于本研究中此类物质对萼花臂尾轮虫的 LC₅₀，表明相比大鼠肾细胞和斑马鱼成鱼而言，萼花臂尾轮虫对卤乙酰胺类物质更加敏感，更适合用作监测此类物质的毒性影响。急性毒性实验结果显示，四种含氮消毒副产物的 24 h-LC₅₀ 值均低于含碳消毒副产物二氯乙酸，这说明本文中的二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺的毒性均大于含碳消毒副产物二氯乙酸。这与 Muellner 等的研究结果一致^[34]。

卤乙酰胺是目前饮用水消毒副产物的研究热点之一。在新修订《生活饮用水卫生标准》(GB 5749-2022) 中，三卤甲烷、卤乙酸和溴酸盐等消毒副产物被纳入控制指标并规定了限值，然而却不包括卤乙酰胺类物质。已有研究显示，卤乙酰胺的细胞毒性和遗传毒性分别是卤乙酸的 99 倍和 19 倍，急性遗传毒性和慢性细胞毒性分别是卤乙酸的 12 倍和 142 倍^[57]；卤乙酰胺类典型代表二氯乙酰胺比磺胺甲恶唑对斑马鱼的毒性更强^[87]，毒性风险高于二氯甲烷^[58]。由于我国地表水源中有机物和溶解性氮含量普遍较高，水厂绝大多都采用氯和氯胺的消毒方式，为卤乙酰胺类含氮消毒副产物的产生提供了很大可能，在出厂饮用水和经过长距离的输送管网中，均报道发现一定浓度的该类物质存在^[25,88]，因此，其环境和生态风险值得关注，特别是低剂量、长期暴露对环境生物的影响。

研究发现，消毒副产物卤代乙酸的毒性与取代的氯原子数有关，一氯乙酸对小鼠无致癌性，二氯乙酸和三氯乙酸会增加小鼠肝肿瘤的患病率，且溴代乙酸的毒性大于氯代乙酸^[89]。本研究中，三种卤乙酰胺对萼花臂尾轮虫急性毒性大小依次是溴乙酰胺>氯乙酰胺>二氯乙酰胺，这与 Plewa 等研究此类物质对中

国仓鼠卵巢细胞毒性的结论基本一致,表明卤乙酰胺的毒性同样受到氯原子数、卤代元素种类的影响^[57]。Plewa 和 Attene-Ramos 等的研究证明,卤乙酰胺的毒性遵循 $I > Br > Cl$,造成这样的毒性差异主要由烷基卤化物中卤素的离开倾向决定^[57,90]。本实验中,二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺的半数致死浓度均远高于实际环境浓度,在实际环境浓度下一般不会产生致死效应,因此,要正确评价低剂量消毒副产物对轮虫毒性影响,还需进一步开展研究。

种群增长率是最能体现轮虫环境适应能力的综合表现指标^[91],暴露污染物后轮虫种群增长率的改变能直接反映污染物对轮虫种群的毒性结果,被认为是最敏感的毒性实验终点。Snell 和 Moffat 对比研究发现,2 d 蓼花臂尾轮虫种群增长测试要比七天网纹溞 (*Ceriodaphnia dubia*) 生殖测试对污染物更加敏感,且测试工作量可减少近 70 %^[92],适合用于评价苯酚、五氯苯酚钠和铜等 11 种污染物对轮虫慢性毒性影响;同样,氟他胺联合睾酮、溴酸盐和聚苯乙烯微塑料等对蓼花臂尾轮虫的慢性毒性测试也证明了两天的种群增长率是一个敏感的指标^[93-95]。然而,Janssen 等也曾指出,轮虫三天测试得到的种群增长率比两天更接近最大值^[96]。在轮虫幼体经过两天污染物暴露后,轮虫种群主要是由轮虫母体和 F1 代组成,且在实验开始时,实验所用的轮虫幼体均为出生 4 h 以内的非混交雌体,在受到污染胁迫后,轮虫会调整自己的生存策略。本研究中,在 200 $\mu\text{g/L}$ 浓度下,只有二氯乙酰胺对轮虫的 2 d 种群增长率无显著影响,其它处理组中的两天的种群增长率与对照均有显著抑制,200 $\mu\text{g/L}$ 的溴乙酰胺暴露下对轮虫的 2 d 种群增长率抑制影响最大的,这可能是由于溴乙酰胺的 24 h- LC_{50} 值最低,急性毒性最大。在 20 $\mu\text{g/L}$ 浓度下,只有氯乙酰胺对轮虫的 2 d 种群增长率有显著抑制影响,溴乙酰胺却无显著影响,表明该指标对评估二氯乙酰胺类物质并非最佳选择。

在本实验中,二氯乙酸在 20 $\mu\text{g/L}$ 下促进了轮虫的 2 d 种群增长率,而在 200 $\mu\text{g/L}$ 下抑制了轮虫的 2 d 种群增长率。这种呈现出低浓度促进,高浓度抑制的现象和 Tian 等使用睾酮和氟他胺对蓼花臂尾轮虫 2 d 种群增长率的影响效果类似^[93]。这种现象在毒理学研究中称之为毒物兴奋效应,即在低浓度刺激生物

机体发生反应，高浓度下抑制生物机体反应，这种现象产生的原因是内环境稳态受到一定程度的破坏后导致的过度补偿效应，可以看成生物的一种适应性反应，在生物细胞水平、组织水平、个体水平和群体水平广泛存在^[97]。

单巢纲轮虫（如萼花臂尾轮虫）进行有性生殖是该类生物适应环境变化的重要生存和进化策略，而混交雌体产生是轮虫启动有性生殖的开始。因此，可通过分析轮虫种群混交雌体的比例来评估有性生殖的水平，进而评价污染物对轮虫的不利影响。研究发现，1.5 mg/L 纳米 TiO₂ 和 0.01 和 10 mg/L 1 μ m 聚苯乙烯微塑料显著提高了萼花臂尾轮虫种群的混交率^[98,99]，而 1、100 和 200 mg/L KBrO₃ 则显著降低了该值^[94]。本研究中，200 μ g/L 氯乙酰胺和 20 μ g/L 溴乙酰胺处理组中，轮虫种群的 OF/NOF 和混交率较对照明显升高，表明该两个处理组中，轮虫已经感知到外界胁迫的压力，开始主动调整生殖策略以适应环境的变化，最终七天休眠卵产量的显著提高也进一步验证了轮虫繁殖策略调整的成功。

值得注意的是，在 10 μ g/L 浓度下，二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺均对萼花臂尾轮虫的 OF/NOF、MF/AF、MR 和 FR 无显著影响，前文中的 2 d 种群增长率也未有显著影响。这可能是在较低浓度下，对轮虫的影响未能明显表现出来，但随着暴露时间的延长，对轮虫的休眠卵产量造成了影响。有性生殖通常被假设发生在高种群密度下，以实现混交雌体的高受精率，因为雄性与混交雌体的相遇概率会很高^[100]。然而种群密度并不一定和受精机会有关。当种群数量过低时，轮虫会在有性生殖和无性生殖之前权衡，在有性生殖后，通常表明未来的种群数量减少。抑制有性生殖可以重新开始无性生殖阶段，如果环境条件允许，轮虫会在开始有性生殖之前增加种群数量。在本研究中，在 10 μ g/L 下轮虫的种群增长率未受到抑制，有性生殖也未受到显著影响，但是增加了氯乙酰胺和二氯乙酰胺的休眠产量，这表明即使在低浓度的消毒副产物长时间暴露下，会对轮虫产生影响

周期性孤雌生殖中有性生殖是偶发性的，这种方式完全保留了重组在产生多样化后代方面的优势，同时最大限度地降低了产生雄性的成本。在无性生殖周期内，产生的雌体偶尔会与雄虫产生有性生殖，形成休眠卵。雄虫的寿命只有 1.5~2 d，而且混交雌体在出生后几个小时内受精成功才会产生休眠卵，若未

成功受精则会产生单倍体雄虫^[101]。虽然雄虫可以使多个混交雌体产生的卵子全部受精发育成休眠卵，但 Serra 等发现雄虫会优先与非常年轻的混交雌体（出生 2 h 左右）交配^[102]。在本研究中，200 $\mu\text{g/L}$ 溴乙酰胺暴露下，对轮虫的混交率、受精率和休眠卵产量未产生显著影响，可能是溴乙酰胺抑制了混交雌体的发育和雄虫的产生。

经过产生混交雌体、孵化雄虫、成功受精和产卵等一系列过程而形成的休眠卵是轮虫有性生殖的最终产物，对轮虫保种、繁殖和种群扩张等均有重要意义^[103]。轮虫毒理学研究中，休眠卵产量常被看作是比其它有性生殖参数对污染物更为敏感的指标^[78]。研究证实，2.0 和 2.5 mg/L 纳米 TiO_2 、0.01 和 10 mg/L 0.5 μm 聚苯乙烯微塑料以及 0.001、0.01、1 和 10 mg/L 的 KBrO_3 能显著提高休眠卵产量，而 100 和 200 mg/L KBrO_3 则显著降低了该值^[94,98,99]。本研究中，在 15 个处理组中，有 9 个的休眠卵产量都显著高于对照组，其对测试液的敏感程度明显高于其它有性生殖指标，适合用作评价消毒副产物对萼花臂尾轮虫有性生殖的影响。一般认为，成功受精是轮虫休眠卵形成的关键步骤，但其产量还受到其它环境因素和轮虫种类的影响^[104]。本研究中，大部分处理组中受精率虽与对照组都无显著差异，但却大多高于对照，最高上升了 97.81%，推测这可能是导致多数处理组休眠卵产量显著高于对照的直接原因。

3.3 本章小结

在急性毒性实验中，10 mg/L 浓度暴露下，5 种消毒副产物均导致轮虫体内器官萎缩、分解，身体呈透明状。5 种消毒副产物对萼花臂尾轮虫的急性毒性大小：溴乙酰胺>氯乙酰胺>二氯乙酰胺>二氯乙腈>二氯乙酸。5 种消毒副产物对轮虫的 2 d 种群增长率、有性生殖参数和 7 d 休眠卵产量等指标的影响中，7 d 休眠卵产量是最为敏感的指标。

第四章 5 种消毒副产物对萼花臂尾轮虫氧化应激效应的影响

氧化应激是机体活性氧成分与抗氧化系统之间平衡失调引起的一系列适应性的反应^[105]。在外源刺激下，细胞受到胁迫，细胞内产生大量高活性分子如活性氧、活性氧中间体和氧自由基等，当活性氧产生量超过机体承受范围，就会攻击机体大分子物质，损害细胞内的蛋白质、脂类和核酸，破坏细胞中溶酶体和线粒体，导致酶失活、细胞脂质过氧化^[106]。抗氧化剂一般分为抗氧化酶和低分子量抗氧化剂。主要的抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)等。最重要的低分子量抗氧化剂包括维生素 C、维生素 E、类胡萝卜素、类黄酮、谷胱甘肽和其他抗氧化剂^[107]。

研究表明，当受到外源刺激后，生物体内的抗氧化系统就会发挥作用。SOD 是生物体抗氧化应激系统的关键酶之一，能够将活性氧自由基降解为水和过氧化氢。过氧化氢不带电荷，可以穿过生物膜，而且过氧化氢是一种强氧化剂，过氧化氢的主要来源是由 SOD 催化的超氧化物自由基歧化反应形成的，但在黄嘌呤氧化酶、葡萄糖氧化酶等氧化酶催化的反应中也可以形成。CAT 广泛存在动植物和微生物细胞中，过氧化氢酶将两个过氧化氢分子分解成两个水分子和一个氧分子，CAT 对体内低浓度的过氧化氢去除效率较低，但对高浓度的过氧化氢有较高的去除能力^[108]。POD 能够催化机体内的脂质过氧化物、减轻污染物对机体的损伤，再细胞内的信号传递、代谢、免疫调节中发挥重要作用。GSH 作为非酶抗氧化剂具有抗氧化、解毒的功能，GSH 分子能够将几种重要的抗氧化剂再生，例如维生素 E 和维生素 C 的自由基，使其恢复到其活性非自由基形式^[109]。目前，研究污染物暴露下生物体内氧化应激指标的变化来研究污染物的毒性机制成为热点。

本研究中，第三章分别研究了二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫个体的急性毒性、种群增长和有性生殖的影响。为进一步研究二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对萼

花臂尾轮虫氧化应激的影响，5 种消毒副产物暴露下对轮虫体内 SOD、CAT、POD 等抗氧化酶活性和 GSH 抗氧化剂的含量、总抗氧化水平和脂质过氧化水平进行测定。

4.1 消毒副产物对轮虫氧化应激的影响

4.1.1 消毒副产物对轮虫体内抗氧化酶和抗氧化剂的影响

不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫的 SOD 酶活性影响如图 4-1 所示。由图分析，二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺均促进了 SOD 酶活性。在 10 $\mu\text{g/L}$ 中二氯乙腈和溴乙酰胺对 SOD 酶活性有促进作用，溴乙酰胺的促进更加显著；20 $\mu\text{g/L}$ 暴露下，除二氯乙酰胺外其余均显著促进 SOD 酶活性，其中二氯乙酸对 SOD 酶活性促进效果最大；200 $\mu\text{g/L}$ 下，仅有二氯乙酸和氯乙酰胺促进了 SOD 酶活性，其余均未有显著影响。

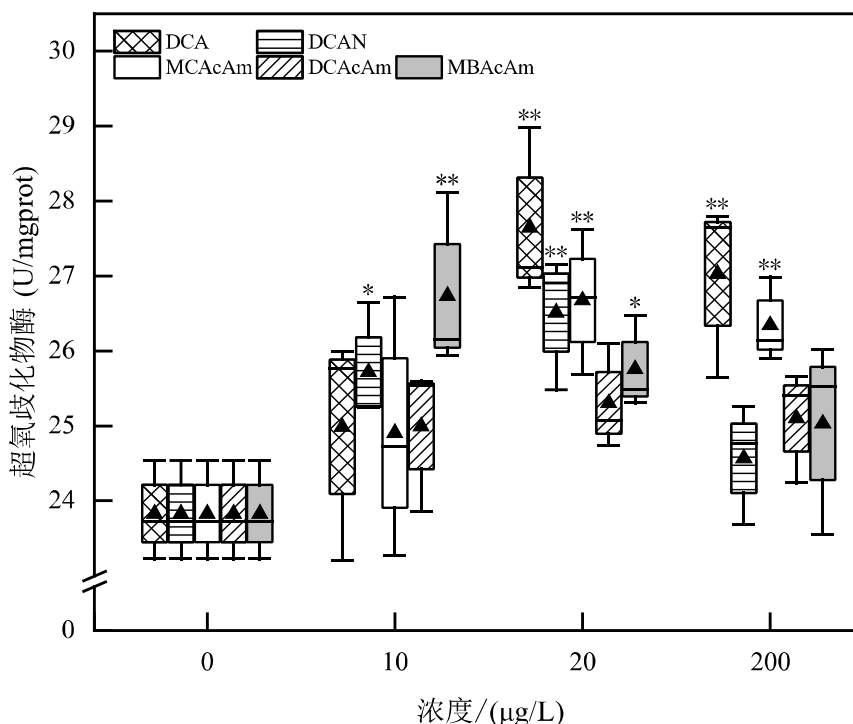


图 4-1 暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 SOD 的活性

Figure 4-1 SOD activity of *Brachionus calyciflorus* exposed to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloro-acetamide, and bromoacetamide

不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 CAT 酶活性的影响如图 4-2 所示。由图分析，10 $\mu\text{g/L}$ 暴露下，均对 CAT 酶活性产生显著影响，其中溴乙酰胺对 CAT 酶活性促进效果最大；20 $\mu\text{g/L}$ 暴露下，均对均对 CAT 酶活性产生显著影响，其中溴乙酰胺对 CAT 酶活性促进效果最大；200 $\mu\text{g/L}$ 暴露下，二氯乙酸、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺显著促进了 CAT 酶活性，而二氯乙腈对 CAT 酶活性促进不显著。

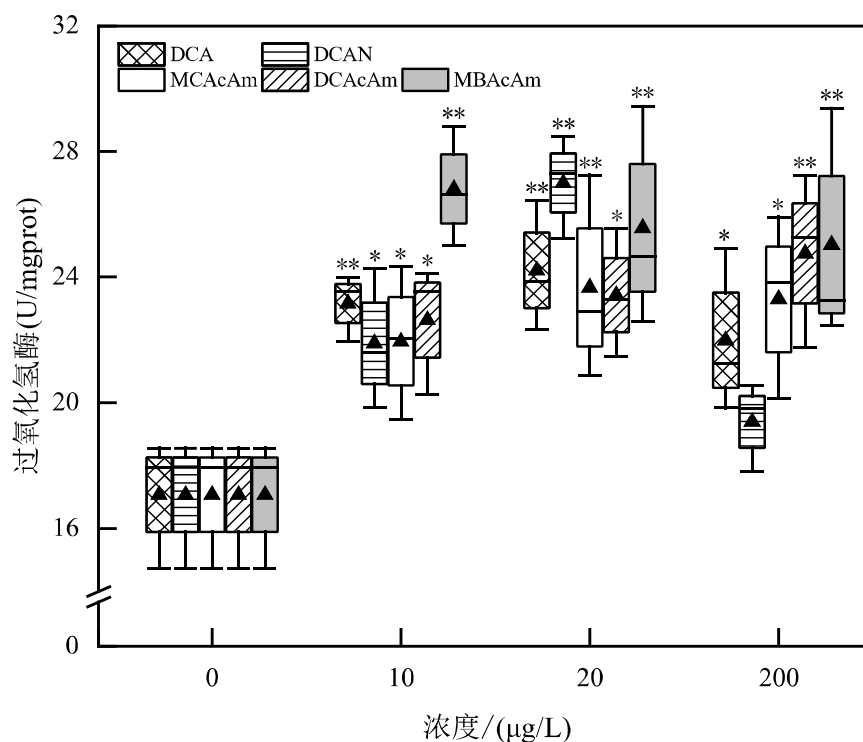


图 4-2 暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 CAT 的活性

Figure 4-2 CAT activity of *Brachionus calyciflorus* exposed to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloro-acetamide, and bromoacetamide

不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 POD 酶活性的影响如图 4-3 所示。由图分析，10 µg/L 和 20 µg/L 暴露下，二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫的 POD 酶活性无显著影响；200 µg/L 暴露下氯乙酰胺和溴乙酰胺对萼花臂尾轮虫的 POD 酶活性有显著影响，其中溴乙酰胺对 POD 酶活性抑制最大。

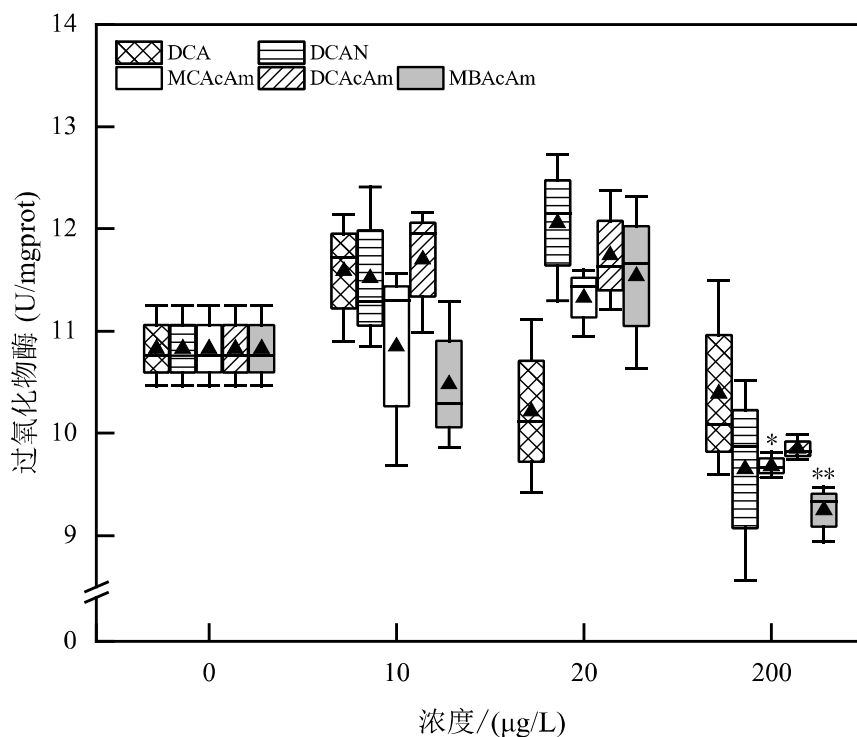


图 4-3 暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 POD 的活性

Figure 4-3 POD activity of *Brachionus calyciflorus* exposed to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloro-acetamide, and bromoacetamide

不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 GSH 含量的影响如图 4-4 所示。由图分析，10 µg/L 暴露下，二氯乙酸和氯乙酰胺均显著促进了萼花臂尾轮虫 GSH 含量；20 µg/L 暴露下，氯乙酰胺和二氯乙酰胺均显著促进了萼花臂尾轮虫 GSH 含量；200 µg/L 暴露下，氯乙酰胺和溴乙酰胺均显著促进了萼花臂尾轮虫 GSH 含量；其余组对萼花臂尾轮虫 GSH 含量无显著影响。

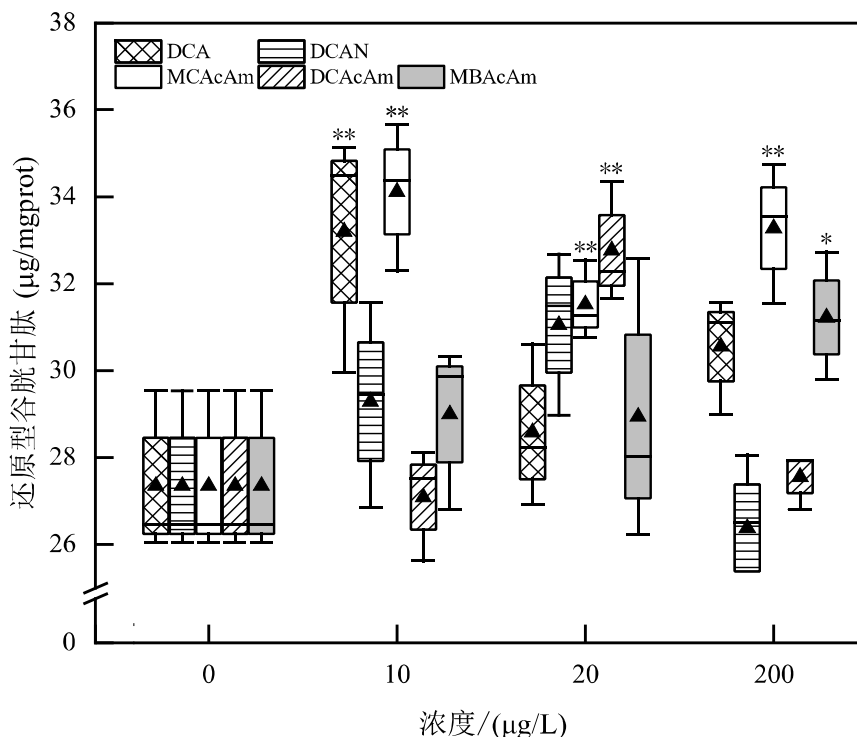


图 4-4 暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 GSH 的含量

Figure 4-4 GSH content of *Brachionus calyciflorus* exposed to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloro-acetamide, and bromoacetamide

4.1.2 消毒副产物对轮虫体内脂质和总抗氧化能力的影响

不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 MDA 含量的影响如图 4-5 所示。由图分析，10 $\mu\text{g/L}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ 暴露下，二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 MDA 含量均未有显著影响；200 $\mu\text{g/L}$ 暴露下，二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 MDA 含量均有显著促进，溴乙酰胺暴露下，萼花臂尾轮虫 MDA 含量最大。

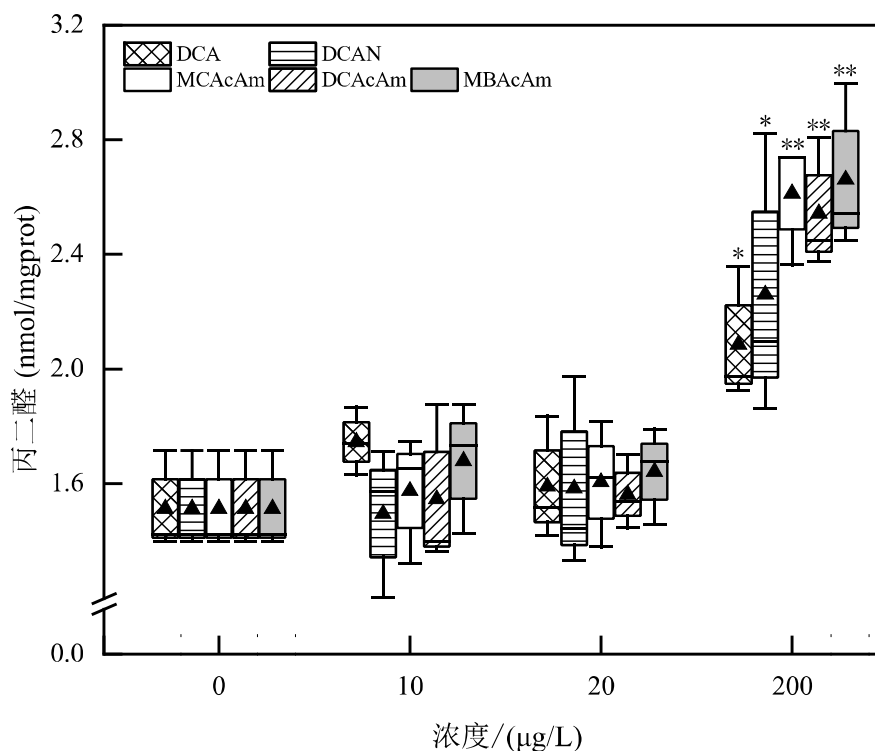


图 4-5 暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 MDA 的含量

Figure 4-5 MDA content of *Brachionus calyciflorus* exposed to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloro-acetamide, and bromoacetamide

不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 T-AOC 的影响如图 4-6 所示。由图分析，10 µg/L 暴露下，二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 T-AOC 均未有显著影响；20 µg/L 和 200 µg/L 暴露下，二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺暴露下对萼花臂尾轮虫 T-AOC 含量均有显著促进，20 µg/L 二氯乙酰胺暴露下，萼花臂尾轮虫 T-AOC 水平最高。

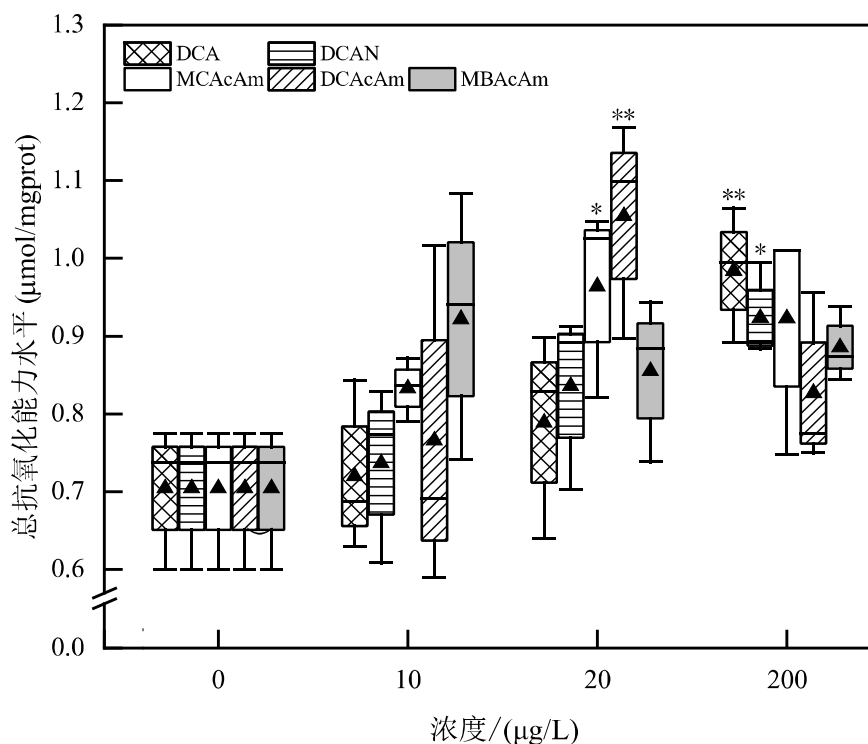


图 4-6 暴露于不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺中萼花臂尾轮虫 T-AOC

Figure 4-6 T-AOC level of *Brachionus calyciflorus* exposed to different concentrations of dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile, chloroacetamide, dichloro-acetamide, and bromoacetamide

4.2 讨论

ROS 是细胞增殖、分化、迁移、凋亡和坏死的重要参与者。低至中等水平的 ROS 对于维持许多重要的生理功能、氧化还原稳态和关键转录因子的调节是必要的。相反，ROS 的过量产生会导致氧化还原稳态被破坏，进而导致氧化应激和 ROS 介导的对所有重要生物分子（包括 DNA、蛋白质和膜）的损伤，最终引起细胞代谢紊乱和功能失常，甚至造成机体死亡^[110]。在超氧阴离子的大量产生过程中可能发生 SOD 的诱导。因此，SOD 活性的增加表明机体内 ROS 的增

加。此外, CAT 活性的升高可能是由于对产生的自由基的适应性反应。因此, SOD 和 CAT 活性的增加可以作为消除反应性自由基的保护反应^[111]。目前, 水生生物已具备较完善的抗氧化应激系统来保护自身受到 ROS 引起的氧化损伤。在本研究中, 消毒副产物暴露下不同程度地诱导或抑制了轮虫体内抗氧化酶的活性和非酶抗氧化剂的含量, 然后不同的氧化应激指标对消毒副产物的响应不同。

在受到内源性或外源性刺激时, 轮虫可通过提高体内 SOD、CAT 和 POD 的活性和 GSH 的含量来减少面临的氧化损伤^[112]。研究发现, 250 $\mu\text{g/L}$ 盐酸氟西汀显著提高了轮虫 SOD 和 GSH 活性^[113], 300 $\mu\text{g/L}$ 0.05 μm 轮胎磨损颗粒显著提高了轮虫 SOD 和 CAT 活性^[114], 80 $\mu\text{g/L}$ 多溴联苯醚显著提高了轮虫 MDA 含量^[115]。本研究中, 轮虫受到不同浓度二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺和溴乙酰胺胁迫后, 监测到的抗氧化酶指标值均较对照有所上升, 部分浓度组上升显著, 表明轮虫已经启动了氧化应激反应, 试图来保护自身免受伤害。抗氧化酶代表一种防御机制, 负责活性氧 (ROS) 的解毒。SOD-CAT 系统提供了对氧毒性的第一道防线。SOD 被认为是最活跃的酶之一, 其活性足以将超氧阴离子歧化为过氧化氢 (H_2O_2) 在细胞氧化应激期间产生^[116]。值得注意的是, CAT 活性在所有处理组均显著高于对照, 表现最为活跃; 而 POD 含量在 200 $\mu\text{g/L}$ 处理组中均显著下降, 呈现出完全不同的响应模式和指标特异性, 其内在机理值得进一步研究。

谷胱甘肽是一种关键分子, 它通过共轭反应和氧化损伤来保护细胞免受异种生物化合物的细胞毒性作用, 通过向氧化还原系统中谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 提供电子供体来发挥作用: GPX 利用来自两个 GSH 分子的两个电子来实现过氧化物的还原解毒, 过氧化物被氧化成 GSSG^[117]。Cui 等研究发现, 0.15 mg/L 金属镉离子暴露下, 诱导褐牙鲈仔鱼体内的 GSH 含量上升, 可降低细胞受到的氧化损伤^[118]。在本研究中, 除二氯乙腈外, 其余消毒副产物均显著提高了 GSH 含量, 可能是萼花臂尾轮虫体内的 GSH 对二氯乙腈的暴露不敏感。也有研究表明, 二氯乙酸可以通过影响内源性抗氧化防御酶和脂质过氧化来诱导肝脏和肾脏组织的氧化应激, 诱导睾丸组织中的氧化应激, 表现为抗氧化酶活

性和脂质过氧化水平的改变以及 GSH 水平的降低^[50]。

Wang 等发现，阻燃剂四溴二苯醚（BDE-47）可诱导褶皱臂尾轮虫（*B. plicatilis*）体内过量产生活性氧（ROS），破坏轮虫卵巢超微结构，抑制个体产卵和种群增长^[119]。理论上，SOD 等抗氧化酶是轮虫清除 ROS 的第一道防线，若该防御机制失效或者氧化压力超过耐受阈值时，膜脂过氧化将形成 MDA^[120]。因此，MDA 是氧化伤害后的指标，其含量上升意味着细胞已经受到明显的氧化伤害。本研究中，5 种消毒副产物 10 $\mu\text{g/L}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ 处理组中 MDA 水平与对照基本一致，而 200 $\mu\text{g/L}$ 处理组中的 MDA 水平均显著高于对照，超过 64 % 以上，表明轮虫抗氧化机制在低浓度组中成功建立并发挥作用，而在高浓度组中则未见成效。推测可能原因有二，一是高浓度组过量产生 ROS 已经超过抗氧化酶的处理能力，无法被及时清除所致。二是某些抗氧化酶在高浓度组中的含量虽然显著增加，但其作用发挥受到抑制且效果不尽相同。因此，要解释卤乙酰胺对轮虫氧化应激毒性效应的作用机制，特异性氧化应激指标的筛选工作还有待进一步深入研究。

4.4 本章小结

本章研究了 5 种消毒副产物单独暴露下对萼花臂尾轮虫氧化应激效应的影响，探究了消毒副产物对萼花臂尾轮虫毒性作用的机制。消毒副产物暴露干扰了轮虫体内抗氧化酶活性和抗氧化剂，结果发现 CAT 指标相较于其他指标更为敏感。轮虫受到胁迫后，体内氧化应激的平衡受到破坏，影响正常的生理功能，对轮虫的生殖过程产生影响，促进向有性生殖方式转变。

第五章 消毒副产物对萼花臂尾轮虫联合毒性影响

二氯乙酸和二氯乙腈分别是水体中常见的含碳消毒副产物和含氮消毒副产物，其对生物的影响已有较多报道^[49,50,53]。但对于这两种常见消毒副产物的研究大都集中在单一毒性方面，而在实际水环境中往往存在不只一种消毒副产物污染，当二者联合暴露时，可能会产生和单独暴露下不同的效应。

近年来，污染物联合暴露对生物的影响研究越来越多。Kim 等研究金属镍离子和与两者类型的微塑料对水生生物大型蚤的单一和联合暴露，结果发现，镍离子单独暴露下的毒性和分别于两种类型的微塑料联合暴露的毒性均不相同，相比于镍离子的单独暴露^[121]。Virginia 等使用斑马鱼胚胎研究了三种多环芳香族化合物在低浓度下进行单一化合物暴露和二元混合物暴露，结果发现相比于单一暴露，二元混合物暴露对斑马鱼胚胎心血管发育和功能具有更高的毒性^[122]。研究证实，当存在另一种污染物时，一种污染物对生物体的毒性会发生变化。

二氯乙酰胺在饮用水中检出率远高于氯乙酰胺和溴乙酰胺等卤乙酰胺，Gao 等研究三种苯酚类抗生素在臭氧化后产生了更多的二氯乙酰胺，而在氯化后增加了水中二氯乙酸的产量^[123]。王智志等研究了砷和二氯乙酰胺对海拉细胞的联合毒性效应发现，砷和二氯乙酰胺联合暴露增加了细胞毒性、增强了氧化应激和 DNA 损伤^[124]。

前文中，研究了二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺单一暴露对轮虫的存活、种群动态、有性生殖和氧化应激等多种指标的影响，反映了轮虫的生命活动情况。但只研究单一消毒副产物对萼花臂尾轮虫的影响不能有效评价环境中的消毒副产物毒性效应。

为了探究不同种类消毒副产物的联合毒性，本章以萼花臂尾轮虫为研究对象，选取二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺这三种典型的消毒副产物，在环境浓度下进行联合暴露对萼花臂尾轮虫的种群增长、有性生殖和氧化应激指标的复合影响，为评估它们对水生生态系统的影响提供一定参考。

5.1 消毒副产物联合暴露对萼花臂尾轮虫种群增长的影响

二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫 2 d 种群增长率的影响如图 5-1 所示。由图可见，与对照相比，单独暴露和联合暴露均对轮虫的 2 d 种群增长率均无显著影响 ($P > 0.05$)。

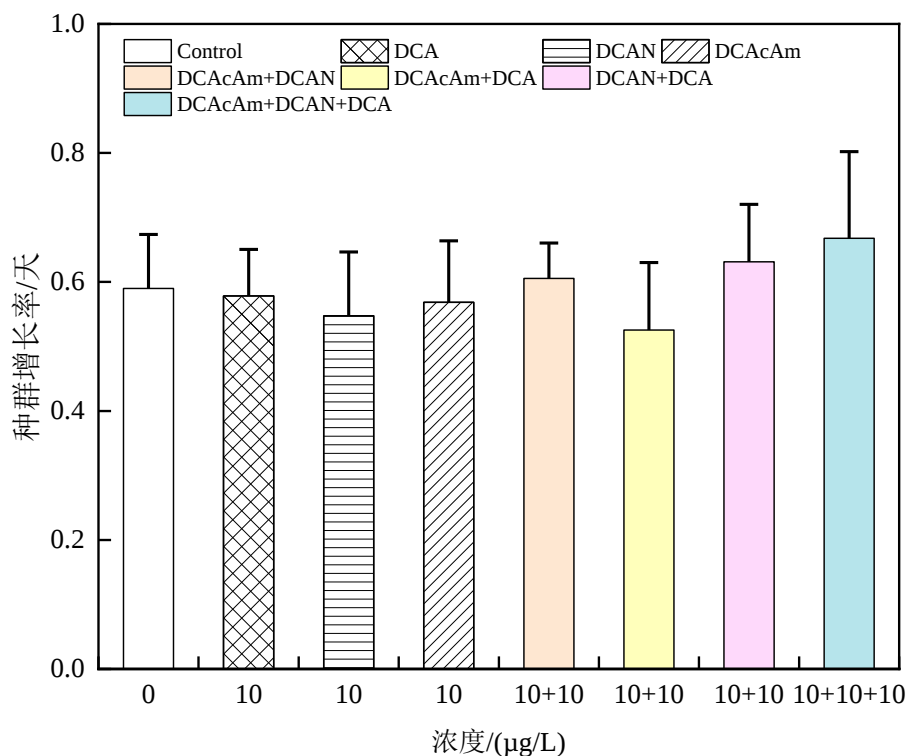


图 5-1 暴露于二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺中萼花臂尾轮虫 2 d 种群增长率

Figure 5-1 Two-day population growth rate of *Brachionus calyciflorus* exposed to dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile and dichloroacetamide

5.2 消毒副产物联合暴露对萼花臂尾轮虫有性生殖的影响

二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫 4 d 有性生殖参数的影响如表 5-1 所示。

表 5-1 暴露二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺中萼花臂尾轮虫 4 d 有性生殖参数

Table 5-1 The reproductive parameters of *Brachionus calyciflorus* in four days exposed to chloroacetamide, dichloroacetamide and bromoacetamide

项目	浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	OF/NOF	MF/AF	MR	FR
对照组	0	0.757 $\pm$ 0.149	0.607 $\pm$ 0.289	0.152 $\pm$ 0.041	0.275 $\pm$ 0.127
DCAcAm	10	0.816 $\pm$ 0.178	0.711 $\pm$ 0.313	0.179 $\pm$ 0.044	0.261 $\pm$ 0.130
DCAN	10	0.94 $\pm$ 0.475	0.574 $\pm$ 0.226	0.162 $\pm$ 0.073	0.22 $\pm$ 0.169
DCA	10	0.793 $\pm$ 0.461	0.606 $\pm$ 0.156	0.157 $\pm$ 0.068	0.338 $\pm$ 0.157
DCAcAm+DCAN	10+10	0.86 $\pm$ 0.143	0.808 $\pm$ 0.162*	0.203 $\pm$ 0.025*	0.407 $\pm$ 0.068*
DCAcAm+DCA	10+10	0.517 $\pm$ 0.172*	0.763 $\pm$ 0.217	0.144 $\pm$ 0.049	0.251 $\pm$ 0.143
DCAN+DCA	10+10	0.622 $\pm$ 0.24	0.592 $\pm$ 0.048	0.139 $\pm$ 0.035	0.226 $\pm$ 0.127
DCAcAm+DCAN +DCA	10+10+10	0.785 $\pm$ 0.276	0.736 $\pm$ 0.065	0.183 $\pm$ 0.043	0.418 $\pm$ 0.06*

注：表中数据为平均值 $\pm$ 标准差；*和**分别表示与对照组有显著差异 ($P < 0.05$) 和极显著差异 ($P < 0.01$)

消毒副产物单独暴露和二氯乙腈+二氯乙酸的暴露下对轮虫的 4 d 有性生殖参数均未有显著影响。在二氯乙酰胺+二氯乙腈的浓度组合下，除 OF/NOF 指标，MF/AF、混交率和受精率等指标相较于对照组均显著增加 33.11 %、33.56 % 和 48.11 %；在二氯乙酰胺+二氯乙酸的浓度组合下，显著降低了萼花臂尾轮虫的 OF/NOF 值；在二氯乙酰胺+二氯乙腈+二氯乙腈的浓度组合下，显著提高了萼花臂尾轮虫的受精率。

二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫 7 d 休眠卵产量的影响如图 5-2 所示。与对照组相比，在二氯乙酰胺+二氯乙腈和二氯乙酰胺+二氯乙腈+二氯乙酸两种浓度组合下，均显著提高了休眠卵产量，分别提高了约 78.95 %和 52.63 %；而单独暴露和二氯乙腈+二氯乙酸暴露下，对萼花臂尾

轮虫休眠卵产量的影响不显著。

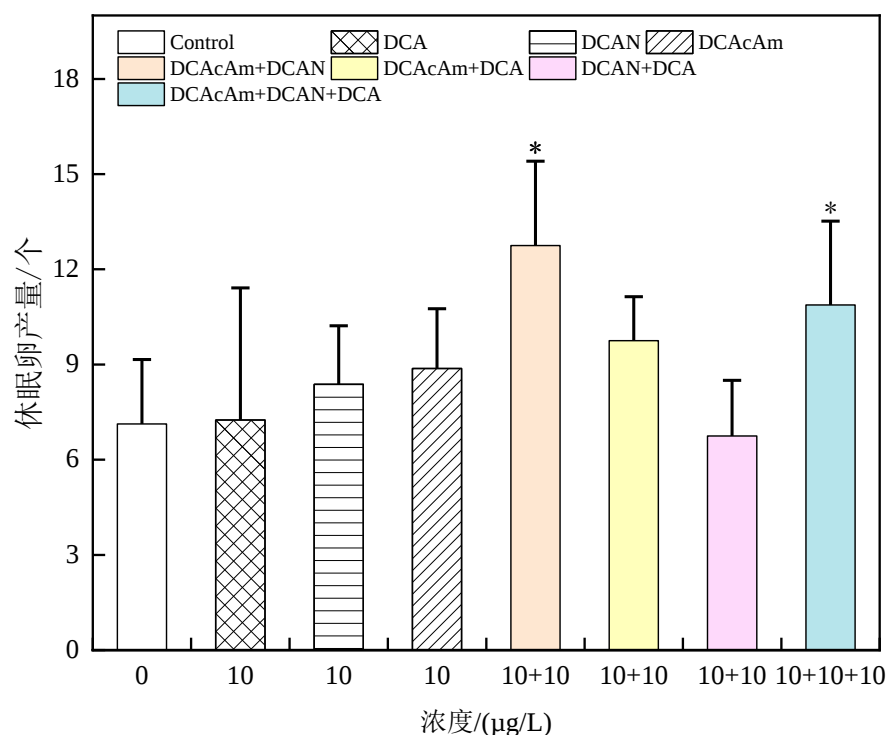


图 5-2 暴露于二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺中萼花臂尾轮虫 7 d 休眠卵产量

Figure 5-2 Seven-day resting eggs production of *Brachionus calyciflorus* exposed to dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile and dichloroacetamide

5.3 消毒副产物联合暴露对萼花臂尾轮虫氧化应激的影响

二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫的 SOD 酶活性影响如图 5-3 所示。由图可知，在二氯乙酰胺+二氯乙腈的浓度组合下，显著提高了萼花臂尾轮虫的 SOD 酶活性，而在二氯乙酰胺+二氯乙酸和二氯乙腈+二氯乙酸两种浓度组合下，对萼花臂尾轮虫的 SOD 酶活性影响均不显著；在单独暴露中，三种消毒副产物均未对轮虫的 SOD 酶活性有显著影响。

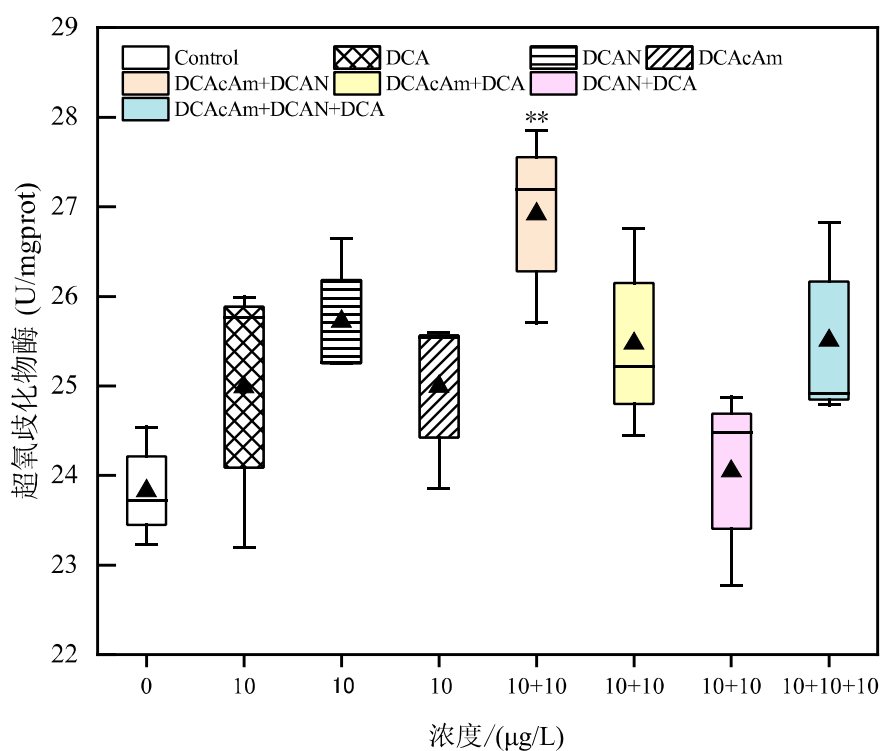


图 5-3 暴露于二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺中萼花臂尾轮虫 SOD 的活性

Figure 5-3 SOD activity of *Brachionus calyciflorus* exposed to dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile and dichloroacetamide

二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫的 CAT 酶活性影响如图 5-4 所示。由图可知，相比于对照组，三种浓度联合暴露和单独暴露，均显著提高了萼花臂尾轮虫的 CAT 酶活性。

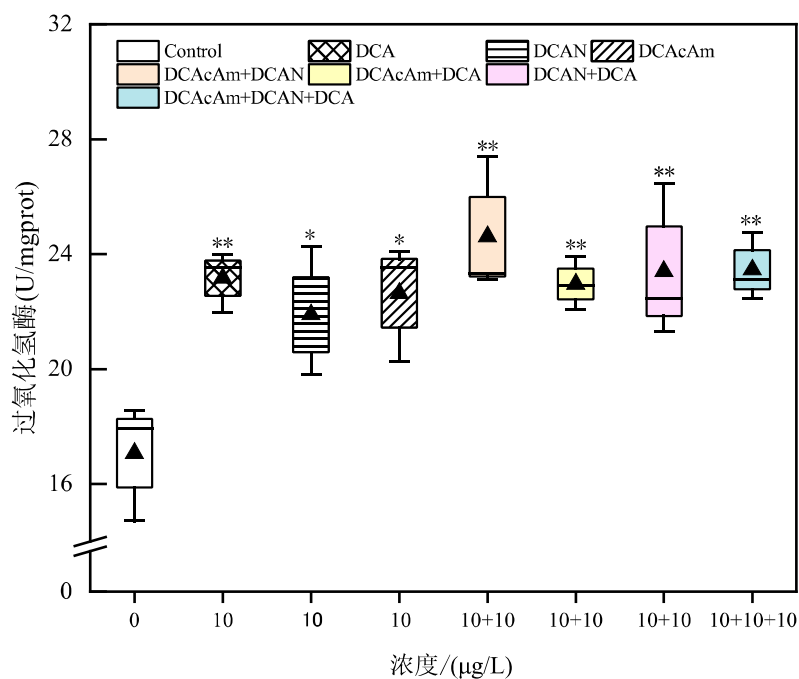


图 5-4 暴露于二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺中萼花臂尾轮虫 CAT 的活性

Figure 5-4 CAT activity of *Brachionus calyciflorus* exposed to dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile and dichloroacetamide

二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫的 POD 酶活性影响如图 5-5 所示。由图可知，相比于对照组，三种浓度联合暴露和单独暴露下，对萼花臂尾轮虫的 POD 酶活性影响均不显著。

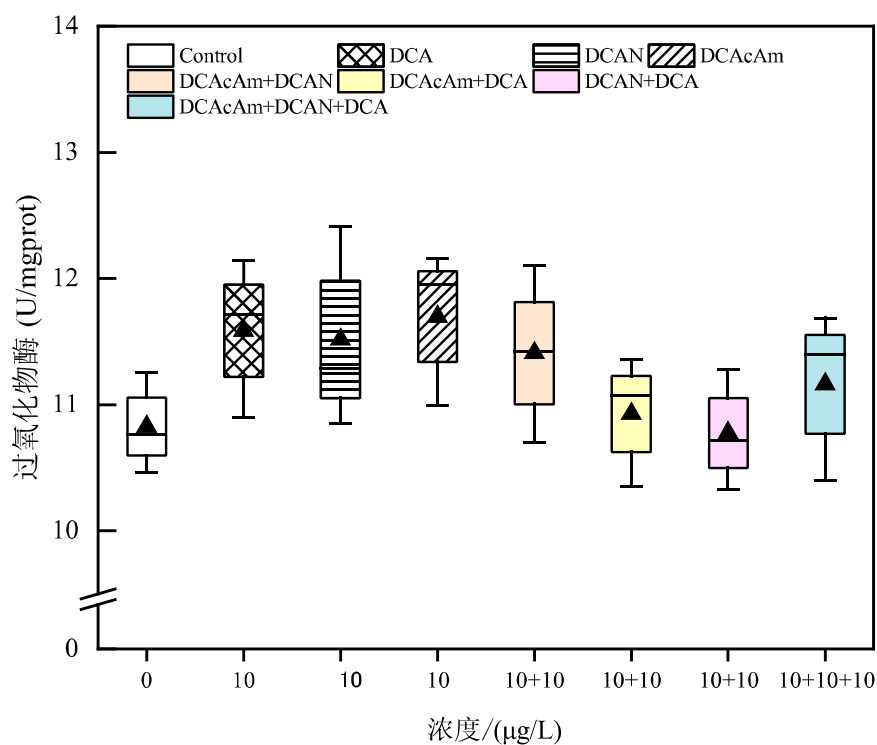


图 5-5 暴露于二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺中萼花臂尾轮虫 POD 的活性

Figure 5-5 POD activity of *Brachionus calyciflorus* exposed to dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile and dichloroacetamide

二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫的 GSH 含量影响如图 5-6 所示。由图可知，相比于对照组，在三种浓度联合暴露和单独暴露中，仅有在二氯乙酸暴露下对萼花臂尾轮虫的 GSH 含量影响显著。

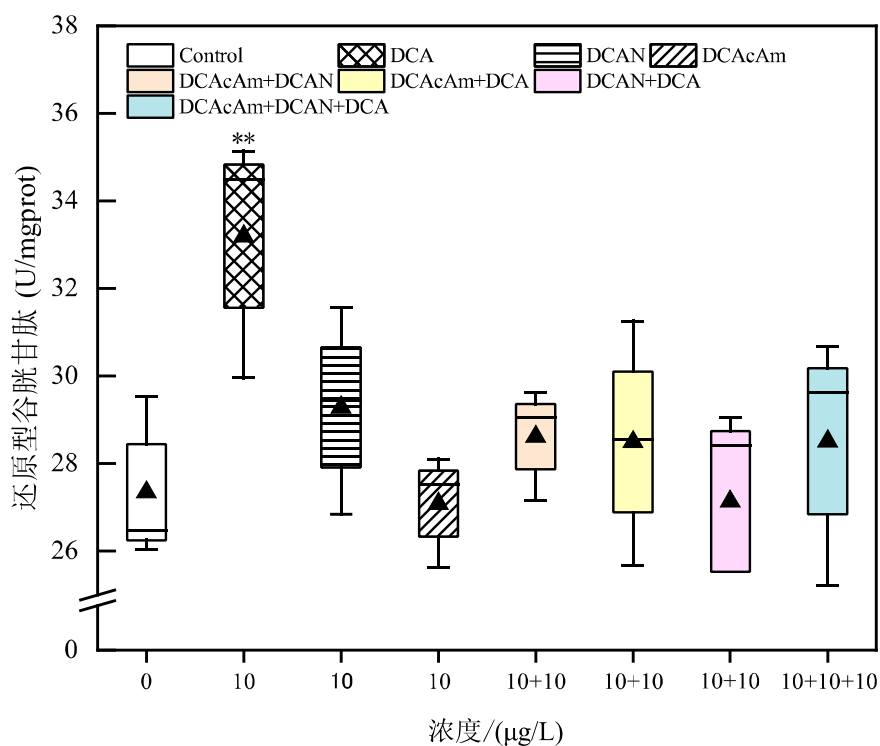


图 5-6 暴露于二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺中萼花臂尾轮虫 GSH 的含量

Figure 5-6 GSH content of *Brachionus calyciflorus* exposed to dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile and dichloroacetamide

二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫的 MDA 含量影响如图 5-7 所示。由图可知，相比于对照组，在三种浓度联合暴露和单独暴露中，对萼花臂尾轮虫的 MDA 含量影响均不显著。

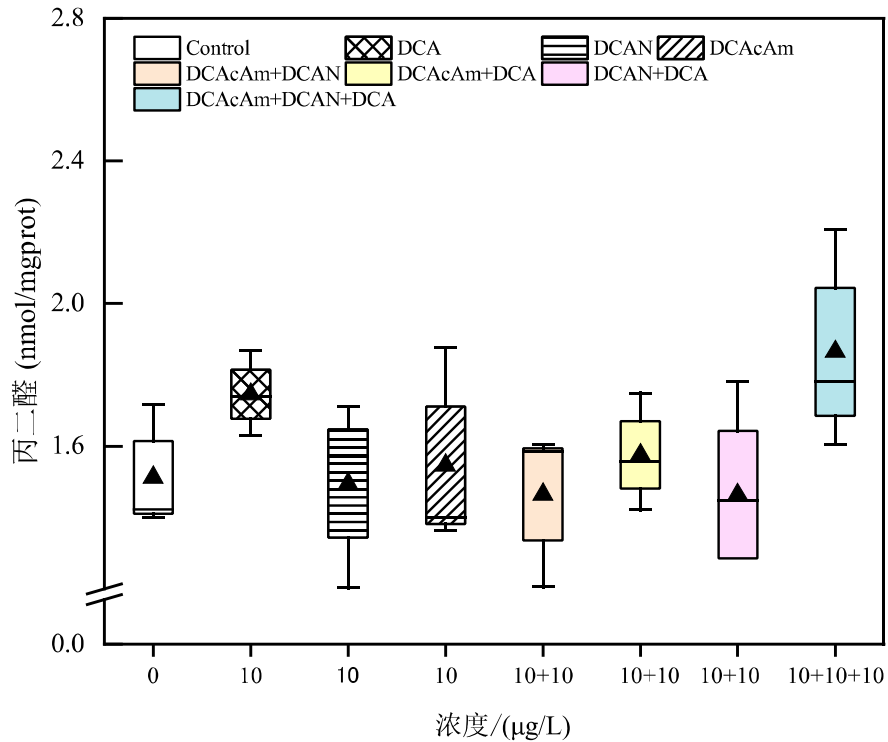


图 5-7 暴露于二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺中萼花臂尾轮虫 MDA 的含量

Figure 5-7 MDA content of *Brachionus calyciflorus* exposed to dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile and dichloroacetamide

二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫的 T-AOC 水平影响如图 5-8 所示。由图可知，相比于对照组，在二氯乙酰胺+二氯乙腈联合暴露下，显著提高了萼花臂尾轮虫的 T-AOC 水平，而其余联合暴露和单独暴露中对萼花臂尾轮虫的 T-AOC 水平影响均不显著。

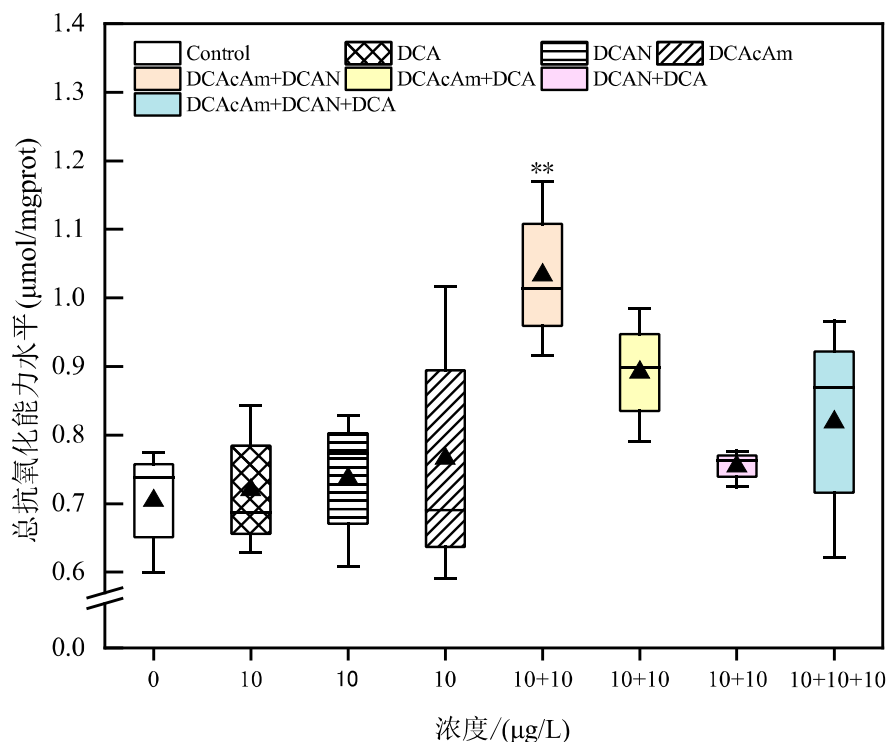


图 5-8 暴露于二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺中萼花臂尾轮虫 T-AOC 水平

Figure 6-8 T-AOC level of *Brachionus calyciflorus* exposed to dichloroacetic acid, dichloroacetonitrile and dichloroacetamide

5.4 讨论

DBPs 的浓度和种类主要与消毒剂的类型、接触反应时间、温度、pH 值以及水体中有机前体物的浓度和种类等有关。二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺主要由于水体中使用氯化消毒（液氯、二氧化氯、氯胺等）产生，二氯乙酰胺在卤乙酰胺消毒副产物中含量占比大和检出率高，二氯乙酰胺通常被视为代表性的卤乙酰胺^[125,126]。本章中，研究了二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫的 2 d 种群增长、4 天有性生殖、7 d 休眠卵产量和氧化应激指标的影响。在 2 d 种群增长实验中，三种消毒副产物联合暴露和 10 μg/L 的单独暴露下对萼花臂尾轮虫均未有显著影响，这可能是污染物浓度较低，对轮虫的影响不明显。

轮虫的有性生殖是从出现混交雌体开始，混交雌体产生雄虫，成功受精后

产生休眠卵。轮虫休眠卵的产生往往受到诸多因素的影响如混交雌体百分比、雌雄个体的识别和混交雌体的受精率等在暴露过程中，从非混交雌体到混交雌体和雄虫，最后产生休眠卵，这个过程经历了几个世代，才会产生休眠卵。一些学者发现 7 d 休眠卵产量相比于 4 d 有性生殖对某些污染物更加敏感，7 d 休眠卵产量更适合作为轮虫有性生殖的终点^[127]。在本研究中，三种消毒副产物暴露对轮虫的有性生殖有着不同程度的影响，二氯乙酸和二氯乙腈联合暴露下对轮虫的整个有性生殖过程均未产生显著影响，三元联合暴露也仅对受精率指标有显著影响。和单独暴露相比，二氯乙酰胺+二氯乙腈和二氯乙酰胺+二氯乙酸的联合暴露下，产生的生殖毒性更大。

H_2O_2 是最简单的具有氧-氧单键的过氧化物，广泛存在各种生物中，其主要来源是由 SOD 催化的超氧化物自由基歧化反应形成的，但在黄嘌呤氧化酶、葡萄糖氧化酶等氧化酶催化的反应中，氧也可以由双电子还原形成^[128]。 H_2O_2 作为一种非自由基反应性物质，可以很容易地穿过膜，在活细胞之间扩散，并可能缓慢氧化许多生物分子和化合物。高浓度的 H_2O_2 可以攻击一些产生能量的系统如线粒体，使糖酵解酶甘油醛-3-磷酸脱氢酶失活^[129]。过氧化氢酶是重要的抗氧化酶之一，它通过破坏细胞过氧化氢产生水和氧气，在相当大的程度上减轻氧化应激，在生长因子诱导的信号转导、维持硫醇氧化还原稳态和线粒体功能中起着重要作用。Liu 等使用纳米二氧化钛在模拟阳光下对萼花臂尾轮虫的暴露，显著提高了 CAT 酶的含量^[130]。在本研究中，三种联合暴露均显著提高了轮虫体内的 CAT 酶活性，可能是污染物暴露引起细胞中产生过量的 H_2O_2 ，进而引起 CAT 酶活性提高；在单独暴露中，三种污染物同样显著提高轮虫体内的 CAT 酶活性，表明轮虫体内的 CAT 酶活性是评估消毒副产物毒性的敏感指标。

在本研究中，三种污染物暴露下均未发现 MDA 显著升高，可能是由于污染物暴露产生的 ROS 和过氧化氢，激活了轮虫体内的抗氧化应激系统，提高了 SOD、CAT 酶活性和 T-AOC 水平，将 ROS 清除至正常水平，并未对轮虫细胞膜产生严重的破坏。抗氧化应激系统受到污染物暴露的影响，导致轮虫生殖功能紊乱，长期暴露下，对轮虫的发育、繁殖和存活产生不利影响。Guo 等研究发现在 2,2',4,4'-四溴联苯醚（BDE-47）暴露下，低浓度时轮虫通过线粒体自噬，

阻止受损的线粒体产生高水平的 ROS, 缓解了 ROS 诱导的氧化应激^[131]。因此, 关于在污染物暴露下, 轮虫面对过量 ROS 的保护机制和产生的生理功能方面的问题, 还需要进一步的研究。

5.5 本章小结

本章研究了 10 $\mu\text{g/L}$ 的二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露下对萼花臂尾轮虫种群增长, 有性生殖和氧化应激效应的影响。相较于单独暴露, 3 种消毒副产物联合暴露对轮虫的有性生殖、休眠卵产量和抗氧化酶有显著影响, 其中单一暴露和联合暴露均提高了 CAT 酶活性。3 种消毒副产物联合暴露下, 引起了轮虫氧化应激, 但由于暴露浓度较低, 并未对轮虫造成严重氧化损伤。

总结与展望

氯化是一种有效的消毒过程，可以阻止水传播疾病。然而，在饮用水消毒过程中，消毒剂与水中有机物反应会产生一系列消毒副产物，水厂出水中残留的消毒剂会在配水管网中继续和管壁生物膜等有机物持续反应生成更多的消毒副产物，这严重威胁生物的健康，对消毒副产物的评估和检测成为当下急需解决的问题。本文以自然水体中常见的淡水萼花臂尾轮虫为受试动物，研究了消毒副产物中具有代表性的含碳消毒副产物二氯乙酸和含氮消毒副产物二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺对萼花臂尾轮虫的急性毒性、种群增长、有性生殖和氧化应激的影响。本研究发现：

（1）含氮消毒副产物的急性毒性大于含碳消毒副产物，二氯乙腈的急性毒性小于三种卤乙酰胺，急性毒性由大到小为：溴乙酰胺大于氯乙酰胺大于二氯乙酰胺大于二氯乙腈大于二氯乙酸。二氯乙酸对轮虫的种群生长率由显著影响，低浓度下（20 $\mu\text{g/L}$ ）提高了种群增长率，高浓度下（200 $\mu\text{g/L}$ ）降低了种群增长率。氯乙酰胺在 20 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 均显著抑制了种群增长率，高浓度下除二氯乙酰胺，其余均显著抑制了种群增长率；

（2）二氯乙酸、二氯乙腈、氯乙酰胺、二氯乙酰胺和溴乙酰胺的暴露均使得萼花臂尾轮虫的生殖方式发生转变，200 $\mu\text{g/L}$ 氯乙酰胺和 20 $\mu\text{g/L}$ 溴乙酰胺均显著提高了轮虫种群的 OF/NOF，20 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酰胺则显著降低了轮虫种群的 OF/NOF，20 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙酸、溴乙酰胺和 200 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙腈、二氯乙酰胺均显著提高了轮虫种群的受精率。轮虫主动调整生殖策略以适应环境的变化；

（3）10、20 和 200 $\mu\text{g/L}$ 氯乙酰胺，20 和 200 $\mu\text{g/L}$ 二氯乙腈和二氯乙酰胺以及 10 和 20 $\mu\text{g/L}$ 溴乙酰胺均显著增加了轮虫 7 d 休眠卵产量，该指标对二氯乙腈和三种卤乙酰胺的毒性最敏感，是评价二氯乙腈和卤乙酰胺对萼花臂尾轮虫有性生殖影响的合适指标。

（4）5 种消毒副产物单一暴露下，均显著提高了轮虫的 SOD 和 CAT 酶活性，其余氧化应激指标除 POD 酶外普遍上升，表明轮虫已经启动了氧化应激反应保护自身免受伤害；在 200 $\mu\text{g/L}$ 处理组中，轮虫 MDA 水平均显著高于对照，

轮虫受到明显的氧化损伤。

(5) 二氯乙酸、二氯乙腈和二氯乙酰胺联合暴露影响了萼花臂尾轮虫的有性生殖, 显著提高了 CAT 酶活性, 但对 MDA 含量影响不显著, 表明轮虫受到了氧化应激, 体内的抗氧化系统降低了污染物对轮虫的氧化损伤。

本研究选取典型的消毒副产物, 采用多种实验方法研究了消毒副产物对萼花臂尾轮虫的毒性效应, 但未对转录组水平变化进行研究, 对消毒副产物对轮虫的毒性作用和轮虫自身的解毒机制研究不够深入。在实际水环境中, 消毒副产物往往存在很多种, 研究多种因素对轮虫的影响这将有利于更全面了解消毒副产物。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.《生活饮用水卫生标准》GB5749-2022 ICSC51 [S]. 中华人民共和国国家标准, 2022.
- [2] 吕佳, 岳银玲, 张岚. 国内外饮用水消毒技术应用与优化研究进展 [J]. 中国公共卫生, 2017, 33(03): 428-432.
- [3] RICHARDSON S D. Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(10): 666-684.
- [4] DEHGHANI M, SHAHSAVANI S, MOHAMMADPOUR A, et al. Determination of chloroform concentration and human exposure assessment in the swimming pool [J]. Environmental Research, 2022, 203: 111883.
- [5] Chemistry of Aqueous Chlorine [M]. White's Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants. 2009: 68-173.
- [6] 金涛, 唐非. 饮用水氯化消毒副产物及其对健康的潜在危害 [J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(03): 255-258.
- [7] SIMPSON K L, HAYES K P. Drinking water disinfection by-products: an Australian perspective [J]. Water Research, 1998, 32: 1522-1528.
- [8] KOOL J L, CARPENTER J C, FIELDS B S. Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease [J]. Lancet (London, England), 1999, 353(9149): 272-277.
- [9] NISSINEN T K, MIETTINEN I T, MARTIKAINEN P J, et al. Disinfection by-products in Finnish drinking waters [J]. Chemosphere, 2002, 48(1): 9-20.
- [10] 颜金良, 颜勇卿, 王立. 二氧化氯消毒饮用水中毒副产物污染的初步研究 [J]. 中国预防医学杂志, 2006, (06): 513-515.
- [11] 晋日亚, 刘欣欣, 乔怡娜, 等. 二氧化氯消毒研究进展 [J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(02): 138-142.
- [12] AIETA E M, BERG J D. A Review of Chlorine Dioxide in Drinking Water Treatment [J]. American Water Works Association, 1986, 78(6): 62-72.
- [13] WANG J, HAO Z, SHI F, et al. Characterization of Brominated Disinfection Byproducts Formed During the Chlorination of Aquaculture Seawater [J]. Environmental science & technology, 2018, 52(10): 5662-5670.
- [14] 赵玉丽, 李杏放. 饮用水消毒副产物: 化学特征与毒性 [J]. 环境化学, 2011, 30(01): 20-33.
- [15] JAFVERT C T, VALENTINE R L. Reaction scheme for the chlorination of ammoniacal water [J]. Environmental science & technology, 1992, 26(3): 577-586.

- [16]TARAS M J. Effect of Free Residual Chlorination on Nitrogen Compounds in Water [J]. American Water Works Association, 1953, 45(1): 47-61.
- [17]TSUAN HUA F. Behavior of organic chloramines in disinfection [J]. Water Pollution Control Federation, 1966, 38(4): 614-628.
- [18]SEIDEL C J, MCGUIRE M J, SUMMERS R S, et al. Have utilities switched to chloramines? [J]. American Water Works Association, 2005, 97(10): 87-97.
- [19]路凯, 井海宁, 李士英, 等. 美国大、中型水厂饮水消毒调查报告 [J]. 环境与健康杂志, 2001, (03): 179-182.
- [20]HUNT N K, MARIÑAS B J. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone [J]. Water Research, 1997, 31(6): 1355-1362.
- [21]SCOTT D B, LESHER E C. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli* [J]. Bacteriology, 1963, 85(3): 567-576.
- [22]CHEEMA W A, KAARSHOLM K M S, ANDERSEN H R. Combined UV treatment and ozonation for the removal of by-product precursors in swimming pool water [J]. Water Research, 2017, 110: 141-149.
- [23]胡玲, 戚雷强, 舒诗湖, 等. 供水管网加氯模式的现状与多级消毒发展 [J]. 中国给水排水, 2015, 31(02): 18-21.
- [24]张静, 宋利先, 彭宇华, 等. 浅谈高锰酸盐预氧化净水技术发展历程与研究进展 [J]. 环境科学学报, 2023, 43(12): 1-10.
- [25]程冬馨, 司杰, 钟转有, 等. 供水管网生物膜有机物的二氯乙腈与二氯乙酰胺生成特性 [J]. 环境科学学报, 2020, 40(02): 497-503.
- [26]中华人民共和国生态环境部. 《2020 中国生态环境状况公报》, 2020.
- [27]BELLAR T A, LICHTENBERG J J, KRONER R C. The Occurrence of Organohalides in Chlorinated Drinking Waters [J]. American Water Works Association, 1974, 66(12): 703-706.
- [28]ROOK J J. Formation of Haloforms during Chlorination of Natural Waters [J]. Acta Polytechnica, 2002, 42(2): 234-243.
- [29]KRASNER S W, WEINBERG H S, RICHARDSON S D, et al. Occurrence of a New Generation of Disinfection Byproducts [J]. Environmental science & technology, 2006, 40(23): 7175-7185.
- [30]SYMONS J M, BELLAR T A, CARSWELL J K, et al. National Organics Reconnaissance Survey for Halogenated Organics [J]. American Water Works Association, 1975, 67(11): 634-647.
- [31]RODRIGUEZ M J, SERODES J, ROY D. Formation and fate of haloacetic acids (HAAs) within the water treatment plant [J]. Water Research, 2007, 41(18): 4222-4232.

- [32]魏晓婷. 于桥水库典型消毒副产物及其前体物研究 [D]; 天津大学, 2017.
- [33]CHEN W, WANG X, WAN S, et al. Dichloroacetic acid and trichloroacetic acid as disinfection by-products in drinking water are endocrine-disrupting chemicals [J]. *The Journal of Hazardous Materials*, 2024, 466: 133035.
- [34]MUELLNER M G, WAGNER E D, MCCALLA K, et al. Haloacetonitriles vs. regulated haloacetic acids: are nitrogen-containing DBPs more toxic? [J]. *Environmental science & technology*, 2007, 41(2): 645-651.
- [35]WILLIAMS D T, LEBEL G L, BENOIT F M. Disinfection by-products in Canadian drinking water [J]. *Chemosphere*, 1997, 34(2): 299-316.
- [36]World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality, Fourth edition. Geneva, 2011.
- [37]DING S, CHU W, KRASNER S W, et al. The stability of chlorinated, brominated, and iodinated haloacetamides in drinking water [J]. *Water Research*, 2018, 142: 490-500.
- [38]BOND T, TEMPLETON M R, MOKHTAR KAMAL N H, et al. Nitrogenous disinfection byproducts in English drinking water supply systems: Occurrence, bromine substitution and correlation analysis [J]. *Water Research*, 2015, 85: 85-94.
- [39]KOSAKA K, OHKUBO K, AKIBA M. Occurrence and formation of haloacetamides from chlorination at water purification plants across Japan [J]. *Water Research*, 2016, 106: 470-476.
- [40]RICHARDSON S D, DEMARINI D M, KOGEVINAS M, et al. What's in the pool? A comprehensive identification of disinfection by-products and assessment of mutagenicity of chlorinated and brominated swimming pool water [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(11): 1523-1530.
- [41]CARTER R A A, JOLL C A. Occurrence and formation of disinfection by-products in the swimming pool environment: A critical review [J]. *Journal Of Environmental Sciences(China)*, 2017, 58: 19-50.
- [42]甄伟前, 焦佳佳, 李忠禹, 等. 城乡供水管网中消毒副产物的浓度水平与分布规律 [J]. *环境科学学报*, 2023, 43(03): 186-194.
- [43]周闰, 杨丽, 吴宇伉, 等. 无锡市不同生活饮用水中两类消毒副产物三卤甲烷及卤乙酰胺的浓度比较 [J]. *环境与职业医学*, 2023, 40(04): 456-461.
- [44]HUANG H, ZHU H, GAN W, et al. Occurrence of nitrogenous and carbonaceous disinfection byproducts in drinking water distributed in Shenzhen, China [J]. *Chemosphere*, 2017, 188: 257-264.
- [45]RUDDICK J A, VILLENEUVE D C, CHU I, et al. A teratological assessment of

- four trihalomethanes in the rat [J]. Journal of environmental science and health Part B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes, 1983, 18(3): 333-349.
- [46] CAO W C, ZENG Q, LUO Y, et al. Blood biomarkers of late pregnancy exposure to trihalomethanes in drinking water and fetal growth measures and gestational age in a chinese cohort [J]. Environmental Health Perspectives, 2016, 124(4): 536-541.
- [47] RICHARDSON S D, PLEWA M J, WAGNER E D, et al. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research [J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2007, 636(1): 178-242.
- [48] LIU C, WANG Y-X, CHEN Y-J, et al. Blood and urinary biomarkers of prenatal exposure to disinfection byproducts and oxidative stress: A repeated measurement analysis [J]. Environment International, 2020, 137: 105518.
- [49] PEREIRA M A. Carcinogenic activity of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid in the liver of female B6C3F1 mice [J]. Fundamental and Applied Toxicology, 1996, 31(2): 192-199.
- [50] EL AREM A, LAHOUAR L, SAAFI E B, et al. Dichloroacetic acid-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of date fruit extract [J]. Bmc Pharmacology & Toxicology, 2017, 18(1): 17.
- [51] HASSOUN E A, CEARFOSS J, SPILDENER J. Dichloroacetate- and trichloroacetate-induced oxidative stress in the hepatic tissues of mice after long-term exposure [J]. Journal of Applied Toxicology, 2010, 30(5): 450-456.
- [52] LARSON J L, BULL R J. Metabolism and lipoperoxidative activity of trichloroacetate and dichloroacetate in rats and mice [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1992, 115(2): 268-277.
- [53] XUE B, DAI K, ZHANG X, et al. Low-concentration of dichloroacetonitrile (DCAN) in drinking water perturbs the health-associated gut microbiome and metabolic profile in rats [J]. Chemosphere, 2020, 258: 127067.
- [54] 翟璐, 梁海荣, 罗皓. 二氯乙腈诱导 HepG2 细胞凋亡及机制研究 [J]. 实用预防医学, 2018, 25(10): 1153-1156.
- [55] KISHIDA T, AKIYOSHI K, ERDENEDALAI E, et al. Cellular adverse actions of dibromoacetonitrile, a by-product in water bacterial control, at sublethal levels in rat thymocytes [J]. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA, 2018, 51: 145-149.
- [56] ESMAT A, KHALIFA A E, EL-DEMERDASH E, et al. Dichloroacetonitrile

- Induces Protein Modifications in Cortical Astrocyte Cell Line CTX-TNA2 and Alterations in Fetal Mouse Brain [J]. The FASEB Journal, 2012, 26(S1): 674.2-.2.
- [57]PLEWA M J, MUELLNER M G, RICHARDSON S D, et al. Occurrence, synthesis, and mammalian celcytotoxicity and genotoxicity of haloacetamides: an emerging class of nitrogenous drinking water disinfection byproducts [J]. Environmental science & technology, 2008, 42(3): 955-961.
- [58]YANG F, ZHANG J, CHU W, et al. Haloactamides versus halomethanes formation and toxicity in chloraminated drinking water [J]. The Journal of Hazardous Materials, 2014, 274: 156-163.
- [59]CHEN Y, XU T, YANG X, et al. The toxic potentials and focus of disinfection byproducts based on the human embryonic kidney (HEK293) cell model [J]. Science of the Total Environment, 2019, 664: 948-957.
- [60]ZHANG C, DONG X, YIN X, et al. Developmental toxicity of 2-bromoacetamide on peri- and early post-implantation mouse embryos in vitro [J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2023, 252: 114612.
- [61]DENG Y, ZHANG Y, ZHANG R, et al. Mice in vivo toxicity studies for monohaloacetamides emerging disinfection byproducts based on metabolomic methods [J]. Environmental science & technology, 2014, 48(14): 8212-8218.
- [62]金玲敏, 陆雨晨, 李其闯, 等. 二氯乙酰胺对斑马鱼不同组织的毒性效应 [J]. 环境科学与技术, 2018, 41(S1): 20-23.
- [63]何梦婷, 王伟, 许洁, 等. 氧化应激参与溴乙酰胺致斑马鱼胚胎神经发育毒性 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38(06): 586-592.
- [64]GILBERT J J. Rotifer ecology and embryological induction [J]. Science, 1966, 151(3715): 1234-1237.
- [65]WALLACE R L. Rotifers: exquisite metazoans [J]. Integrative And Comparative Biology, 2002, 42(3): 660-667.
- [66]WALLACE R L, SNELL T W. Chapter 8 - Rotifera [M] THORP J H, COVICH A P. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Third Edition). San Diego; Academic Press. 2010: 173-235.
- [67]DENEKAMP N Y, THORNE M A S, CLARK M S, et al. Discovering genes associated with dormancy in the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis* [J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 108.
- [68]GALLARDO W G, HAGIWARA A, TOMITA Y, et al. Effect of some vertebrate and invertebrate hormones on the population growth, mictic female production, and body size of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* Müller [J]. Hydrobiologia, 1997, 358(1): 113-120.

- [69] PARK G S, LEE S H, PARK S Y, et al. Ecotoxicological evaluation of sewage sludge using bioluminescent marine bacteria and rotifer [J]. *Ocean Science Journal*, 2005, 40(2): 91-100.
- [70] GONZÁLEZ-PÉREZ B K, SARMA S S S, CASTELLANOS-PÁEZ M E, et al. Multigenerational effects of triclosan on the demography of *Platyonus patulus* and *Brachionus havanaensis* (ROTIFERA) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 147: 275-282.
- [71] LIANG Y, ZHOU Y, WANG Y, et al. Use of physiological activities to estimate the population growth of rotifer (*Brachionus calyciflorus*) under the stress of toxic *Microcystis* and nitrite [J]. *Chemosphere*, 2021, 285: 131419.
- [72] XUE Y H, SUN Z X, FENG L S, et al. Algal density affects the influences of polyethylene microplastics on the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. *Chemosphere*, 2021, 270: 128613.
- [73] PRESTON B L, SNELL T W, ROBERTSON T L, et al. Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine disruptors [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19(12): 2923-2928.
- [74] 黎尚豪, 朱惠, 夏宜琤, 等. 单细胞绿藻的大量培养试验 [J]. *水生生物学报*, 1959, 000(004): 462-472.
- [75] XI Y L, CHU Z X, XU X P. Effect of four organochlorine pesticides on the reproduction of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26(8): 1695-1699.
- [76] RADIX P, SEVERIN G, SCHRAMM K W, et al. Reproduction disturbances of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) for the screening of environmental endocrine disruptors [J]. *Chemosphere*, 2002, 47(10): 1097-101.
- [77] 黄林, 刘昌利, 韦传宝, 等. 氯氰菊酯和溴氰菊酯对萼花臂尾轮虫生殖的影响 [J]. *生态学报*, 2011, 31(24): 7632-7638.
- [78] 张根, 陈宝锐. 轮虫生态毒理学测试指标的敏感性研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2022, 33(03): 855-864.
- [79] SNELL T W, PERSOONE G. Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 1989, 14(1): 65-80.
- [80] FORBES V E, CALOW P. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, 18(7): 1544-1556.
- [81] American Society of Testing and Materials (ASTM). Standard guide for acute toxicity test with the rotifer *Brachionus*: Annual book of ASTM standards, section

- 11-water and environmental technology [S]. American Society of Testing and Materials, West Conshohocken, Pennsylvania, 1998. 837-843,
- [82]黄林, 刘昌利, 韦传宝, 等. 两种拟除虫菊酯类杀虫剂对蓼花臂尾轮虫的急性毒性研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(23): 14172-14174.
- [83]SNELL T W, MOFFAT B D, JANSSEN C, et al. Acute toxicity tests using rotifers. IV. Effects of cyst age, temperature, and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* [J]. Ecotoxicology and environmental safety, 1991, 21(3): 308-317.
- [84]刘红玲, 刘晓华, 王晓祎, 等. 双酚 A 和四溴双酚 A 对大型溞和斑马鱼的毒性 [J]. 环境科学, 2007, (08): 1784-1787.
- [85]邢军. 苯、氯苯、苯酚、4-氯酚对斑马鱼、孔雀鱼、剑尾鱼的急性毒性 [J]. 生态环境学报, 2011, 20(11): 1720-1724.
- [86]曹文平, 赵鑫, 王国祥, 等. 消毒副产物二氯乙酰胺的去除特性及对斑马鱼的毒性 [J]. 中国环境科学, 2017, 37(03): 1073-1081.
- [87]张健, 刘玉兰, 张冬, 等. 水体中二氯乙酰胺以及磺胺甲恶唑对斑马鱼的毒性研究 [J]. 环境科技, 2015, 28(06): 34-39.
- [88]周亚男, 王芬, 李亚静, 等. 饮用水中九种卤乙酰胺的高效液相色谱-三重四级杆质谱测定方法 [J]. 环境化学, 2017, 36(03): 614-620.
- [89]GILLER S, LE CURIEUX F, ERB F, et al. Comparative genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water [J]. Mutagenesis, 1997, 12(5): 321-328.
- [90]ATTENE-RAMOS M S, WAGNER E D, PLEWA M J. Comparative human cell toxicogenomic analysis of monohaloacetic acid drinking water disinfection byproducts [J]. Environmental science & technology, 2010, 44(19): 7206-7212.
- [91]HALBACH U, SIEBERT M, WESTERMAYER M, et al. Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1983, 7(5): 484-513.
- [92]SNELL T W, MOFFAT B D. A 2-D Life Cycle Test With the Rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1992, 11(9).
- [93]TIAN J, LIU L, HAN Y, et al. Effects of testosterone and flutamide on reproduction in *Brachionus calyciflorus* [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 6569.
- [94]XU X, CHEN T, XIE A, et al. Chronic Effects of Bromate on Sexual Reproduction of Freshwater Rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2021, 106(2): 270-277.
- [95]陈涛, 徐晓平, 李彬彬, 等. 聚苯乙烯微塑料和纳米塑料对蓼花臂尾轮虫有性生殖的毒性影响 [J]. 环境科学研究, 2022, - 35(- 5): - 1306.
- [96]JANSSEN C R, PERSOONE G, SNELL T W. Cyst-based toxicity tests. VIII.

- Short-chronic toxicity tests with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. Aquatic Toxicology, 1994, 28(3): 243-258.
- [97] 刘天天, 靳洪涛, 王爱平. 毒物兴奋效应及其对毒理学和医药研究的影响 [J]. 毒理学杂志, 2016, 30(01): 78-83.
- [98] 李猛, 黄荣, 席贻龙, 等. 纳米 TiO₂ 暴露对萼花臂尾轮虫种群动态的影响 [J]. 生态毒理学报, 2020, 15(06): 234-242.
- [99] XUE Y-H, SUN Z-X, FENG L-S, et al. Algal density affects the influences of polyethylene microplastics on the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. Chemosphere, 2021, 270: 128613.
- [100] SERRA M, SMITH H A, WEITZ J S, et al. Analysing threshold effects in the sexual dynamics of cyclically parthenogenetic rotifer populations [J]. Hydrobiologia, 2011, 662(1): 121-130.
- [101] SERRA M, APARICI E, CARMONA M J. When to be sexual: sex allocation theory and population density-dependent induction of sex in cyclical parthenogens [J]. Journal of Plankton Research, 2008, 30(11): 1207-1214.
- [102] GÓMEZ A, SERRA M. Mate choice in male *Brachionus plicatilis* rotifers [J]. Functional Ecology, 1996, 10: 681-687.
- [103] 席贻龙, 曹明, 黄祥飞. 萼花臂尾轮虫有性生殖、种群增长和休眠卵产量间的关系 [J]. 应用生态学报, 2002, (12): 1649-1654.
- [104] POURRIOT R, SNELL T W. Resting eggs in rotifers [J]. Hydrobiologia, 1983, 104(1): 213-224.
- [105] RAY P D, HUANG B-W, TSUJI Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. Cellular Signalling, 2012, 24(5): 981-990.
- [106] PRIETO I, MONSALVE M. ROS homeostasis, a key determinant in liver ischemic-preconditioning [J]. Redox Biology, 2017, 12: 1020-1025.
- [107] AHMAD I, PACHECO M, SANTOS M A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal) [J]. Chemosphere, 2006, 65(6): 952-962.
- [108] NANDI A, YAN L J, JANA C K, et al. Role of Catalase in Oxidative Stress and Age-Associated Degenerative Diseases [J]. Oxidative Medicine And Cellular Longevity, 2019, 2019: 9613090.
- [109] ABBASI A, CORPELEIJN E, GANSEVOORT R T, et al. Circulating peroxiredoxin 4 and type 2 diabetes risk: the Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease (PREVEND) study [J]. Diabetologia, 2014, 57(9): 1842-1849.
- [110] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, et al. Oxidative stress, aging, and

- p>diseases [J].
- Clinical Interventions In Aging*
- , 2018, 13: 757-772.
- [111] CHEUNG C C, ZHENG G J, LI A M, et al. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 52(3-4): 189-203.
- [112] JIAN X, TANG X, XU N, et al. Responses of the rotifer *Brachionus plicatilis* to flame retardant (BDE-47) stress [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 116(1): 298-306.
- [113] BYEON E, PARK J C, HAGIWARA A, et al. Two antidepressants fluoxetine and sertraline cause growth retardation and oxidative stress in the marine rotifer *Brachionus koreanus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2020, 218: 105337.
- [114] SHIN H, SUKUMARAN V, YEO I C, et al. Phenotypic toxicity, oxidative response, and transcriptomic deregulation of the rotifer *Brachionus plicatilis* exposed to a toxic cocktail of tire-wear particle leachate [J]. *The Journal of Hazardous Materials*, 2022, 438: 129417.
- [115] SHA J, JIAN X, YU Q, et al. Exposure to BDE-47 and BDE-209 impaired antioxidative defense mechanisms in *Brachionus plicatilis* [J]. *Chemosphere*, 2022, 303(Pt 2): 135152.
- [116] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M C. *Free Radicals in Biology and Medicine* [M]. Oxford University Press, 2015.
- [117] IKEDA Y, FUJII J. The Emerging Roles of γ -Glutamyl Peptides Produced by γ -Glutamyltransferase and the Glutathione Synthesis System [J]. *Cells*, 2023, 12(24): 2831.
- [118] CUI W, CAO L, LIU J, et al. Effects of seawater acidification and cadmium on the antioxidant defense of flounder *Paralichthys olivaceus* larvae [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 718: 137234.
- [119] WANG B, GUO Y, ZHOU B, et al. A possible speculation on the involvement of ROS and lysosomes mediated mitochondrial pathway in apoptosis of rotifer *Brachionus plicatilis* with BDE-47 exposure [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 787: 147315.
- [120] GAO Y-S, CHEN Y-K, WANG Q-J, et al. L-carnitine can improve the population growth and anti-stress ability of rotifer (*Brachionus rotundiformis*) under ammonia stress [J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100622.
- [121] KIM D, CHAE Y, AN Y-J. Mixture Toxicity of Nickel and Microplastics with Different Functional Groups on *Daphnia magna* [J]. *Environmental science & technology*, 2017, 51(21): 12852-12858.
- [122] CUNHA V, VOGS C, LE BIHANIC F, et al. Mixture effects of oxygenated

- PAHs and benzo[a]pyrene on cardiovascular development and function in zebrafish embryos [J]. *Environment International*, 2020, 143: 105913.
- [123] GAO L, LI Y, YAO W, et al. Formation of dichloroacetic acid and dichloroacetamide from phenicol antibiotic abatement during ozonation and post-chlor(am)ination [J]. *Water Research*, 2023, 245: 120600.
- [124] 王智志,陈玲,张徐祥,等.砷和二氯乙酰胺对 HepG2 细胞的联合暴露毒性效应[J].*南京大学学报(自然科学)*,2020,56(05):719-728.
- [125] CHU W, KRASNER S W, GAO N, et al. Contribution of the Antibiotic Chloramphenicol and Its Analogues as Precursors of Dichloroacetamide and Other Disinfection Byproducts in Drinking Water [J]. *Environmental science & technology*, 2016, 50(1): 388-396.
- [126] ZHANG Y, SUN H J, ZHANG J Y, et al. Chronic exposure to dichloroacetamide induces biochemical and histopathological changes in the gills of zebrafish [J]. *Environmental Toxicology*, 2019, 34(7): 781-787.
- [127] 赵兰兰, 席贻龙, 黄林, 等. 邻苯二甲酸酯类物质对萼花臂尾轮虫种群增长和有性生殖的影响 [J]. *动物学报*, 2007, (02): 250-256.
- [128] JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR S Y, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging [J]. *Archives of Toxicology*, 2023, 97(10): 2499-2574.
- [129] GULCIN İ, BUYUKOKUROGLU M E, KUFREVIOGLU O I. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin [J]. *Journal of Pineal Research*, 2003, 34(4): 278-281.
- [130] YANG L, XU J, GAO H, et al. Toxicity enhancement of nano titanium dioxide to *Brachionus calyciflorus* (Rotifera) under simulated sunlight and the underlying mechanisms [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 251: 114556.
- [131] GUO Y, LU N, HE Q, et al. Autophagy: A newly discovered protective mechanism in the marine rotifer *Brachionus plicatilis* in response to BDE-47 exposure [J]. *Aquatic Toxicology*, 2023, 259: 106536.

攻读学位期间发表的学术论文目录

[1] 典型卤乙酰胺类消毒副产物对萼花臂尾轮虫的毒性效应. **李锦程**, 徐晓平, 陈涛, 秦璇. 环境科学研究, 2024,37(04):919-928. DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2023.12.18.

[2] Adequate nutrient intake mitigate the toxic effects of bromate on the rotifer *Brachionus calyciflorus*. Tao Chen, Xiao-Ping Xu, **Jin-Cheng Li**, Kai-Yan Tao, Chang-Shuang Zhao. Environmental Science and Pollution Research, 2024, 31: 11727-11734.

[3] 聚苯乙烯纳米塑料和溴酸盐对萼花臂尾轮虫的联合毒性作用. 陶开燕, 徐晓平, 杨晓凡, 陈涛, 李彬彬, **李锦程**. 生态毒理学报, 2023, 18(05): 236-245.

致谢

送走冰河消融，万物复苏的二月，又送走草木萌发的三月，四月到来的时候，几乎已是春天的尾巴了。转眼间，踏入此间校园也七年了。四月芳菲伊始，花儿竞相绽放，到处都是一片欣欣向荣的繁荣景象。三年的时光飞转即逝，研究生学习生活即将结束了，此时此刻，万般言语缠绕在心头，却不知从何说起。撰写毕业论文不是为这段学习生涯画上一个美丽的句号，而是开启未来人生的一段新旅程。都说饮水思源，此刻的我，发自内心地感谢师长、朋友、家人对我的关爱，以及对于现在所拥有的一切。

特别感谢我的导师徐晓平老师，他是一位开明、不苟言笑、极富智慧的学者，能跟随他一起学习是我莫大的荣幸。我的毕业论文从选题、开题到完成论文老师给予了我最细致、耐心的指导和帮助，没有但老师的指导我不可能完成本文。在生活中，老师淡泊名利、豁达乐观的治学处世精神也深深影响着我，指引着我在人生的道路上不断前行。

其次我要感谢学院的各位老师对我知识的教育和启迪，从他们丰富、生动的授课中，我获得了大量的专业知识。同时，我非常感谢研究生阶段的师兄师姐、师弟师妹们和同学们，感谢他们曾经给予我的许多关心和鼓励！还要感谢毕业论文参考文献所列的所有专家和学者们，感谢他们对我写作这篇论文提供的莫大的帮助！

感谢远方的家人，他们一直是我生活中不可或缺的支柱。七年前，我带着理想也带着家人的嘱托来到了美丽的江城芜湖，回想大学时的青涩，研究生生活的忙碌，过去的种种都历历在目，在心里升起的已不仅仅是感动，现在就要离开心中仍有隐隐的不舍。一路走来，永远不会忘记我在校园度过了我人生美好也最重要的几年。