



## 温度升高和游离余氯对泥蚶的氧化胁迫效应

陈琳<sup>1,2</sup>, 滕爽爽<sup>1</sup>, 胡高宇<sup>1</sup>, 肖国强<sup>1,2</sup>, 黄晓林<sup>1\*</sup>

(1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 温州市海洋生物遗传育种重点实验室, 浙江温州 325005;  
2. 浙江海洋大学, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江舟山 316022)

**摘要:** 为了研究核电站温排水污染对水生动物长期胁迫的影响, 实验通过室内模拟核电站温排水的游离余氯残留和温升效应, 研究了不同温度和不同游离余氯浓度耦合下对泥蚶的氧化胁迫效应。设置水温为 19 和 29 °C, 游离余氯浓度分别为 0.33 和 6.66 mg/L, 进行为期 20 d 的胁迫实验。结果显示: ①单一温升条件下, 温度升高可以显著影响泥蚶 ROS 水平。温度越高, ROS 水平越高。② 0.33 mg/L 浓度组泥蚶 ROS 水平和 DNA 损伤在第 20 天时显著升高, 19 和 29 °C 下分别为对照组的 2.2、2.9 倍和 1.8、2.2 倍; 细胞活性、SOD 活性、ATP 酶活性均下降; 6.66 mg/L 浓度组 ROS 水平在第 20 天时显著上升, 19 和 29 °C 下分别为对照组的 6.2、3.6 倍, DNA 损伤增加, 细胞活性、血细胞吞噬率和 ATP 酶活性下降, SOD 酶活性在第 20 天、29 °C 时降至最小值 (36.4±8.4) U/(mg·prot)。③双因素方差分析结果显示, 水温和游离余氯对泥蚶 ROS 水平、DNA 损伤、血细胞吞噬活性、ATP 酶活性具有显著交互作用。研究表明, 游离余氯能够显著增加泥蚶 ROS 水平和 DNA 损伤, 温度升高和游离余氯复合暴露对泥蚶造成更大的胁迫压力, 影响了其体内氧化响应相关生理过程, 余氯排放海域夏季相比冬季会对泥蚶产生更大的氧化胁迫。本研究可为温度升高和游离余氯复合污染中的海洋生物氧化胁迫毒性研究提供参考, 并且为生态风险评估提供科学依据。

**关键词:** 泥蚶; 核电站温排水; 温度升高; 游离余氯; 氧化响应; 活性氧; DNA 损伤

**中图分类号:** S 968.31; X 171.5

**文献标志码:** A

我国沿海地区核电站造成的环境污染主要表现为温升和余氯, 核电站原子核裂变产生的能量只有 30%~35% 转变为电能, 大量的废热通过冷却水排放到环境中<sup>[1]</sup>, 张露等<sup>[2]</sup>指出, 温排水排水口附近 0.1~0.2 km<sup>2</sup> 的范围会引起 7 °C 的温升, 2~3 km<sup>2</sup> 范围内会引起 4 °C 的温升。氯化在 20 世纪初就作为城市供水、生活污水及工业废水的消毒手段<sup>[3]</sup>。随着电力工业的发展, 氯化被广泛用于

核电站冷凝结系统的生物污损防治, 氯使用之后又排放于水体中。游离余氯具有强氧化性, 游离余氯污染会对海洋生物产生一系列有害的化学作用, 包括通过增加生物体内活性氧或自由基类物质的浓度, 导致机体氧化系统和抗氧化防御系统失衡, 从而引起生物体内强烈的氧化响应, 甚至造成显著的毒性影响<sup>[4]</sup>。

从 20 世纪 60 年代以来, 国外研究者就对温

收稿日期: 2021-12-29 修回日期: 2022-03-09

资助项目: 浙江省重点研发计划项目 (2019C02045); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-49); 台州市重大农业科技“揭榜挂帅”研发攻关计划 (NYJBGS202203)

第一作者: 陈琳 (照片), 从事海水养殖生态毒理研究, E-mail: 1163769119@qq.com

通信作者: 黄晓林, 从事海水养殖生态毒理研究, E-mail: xiaolinlh@hotmail.com



度升高和游离余氯的生态效应开展了大量研究<sup>[5-7]</sup>。我国自 80 年代以来也开展了相关研究<sup>[8-10]</sup>。朱英<sup>[11]</sup>研究了典型家用消毒剂对稀有鮰鲫 (*Gobiocypris rarus*) 毒性及酶活性的影响, 指出消毒剂 (有效成分为次氯酸钠, 含量 1.5%) 暴露浓度为 5.6~18 mg/L 胁迫 28 d 时, SOD 活性显著被抑制。Valarmathi 等<sup>[12]</sup>分别以氯化铜和氯的 LC<sub>50</sub> 值的 1/10 和 1/3 研究了相手蟹 (*Sesarma quadratum*) 耗氧和排氨, 发现第 1、7、14 和 21 天时, 氯化铜和氯对相手蟹耗氧率和排氨率的抑制效应随着浓度的增加而加强。晁敏等<sup>[13]</sup>发现温度和余氯对黑棘鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 胚胎孵化抑制具有协同毒性效应。叶利兰等<sup>[14]</sup>指出, 含氯制剂大量使用不仅会对单一水生物种造成影响, 对水生态系统的群落结构和生态演替也会产生影响, 进而影响水生态系统中的物质循环, 最终破坏水生态系统的平衡。Cao 等<sup>[4]</sup>指出, 即使在极低浓度的次氯酸钠浓度下, 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 和小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 细胞中的氧化应激也会增加。

泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 属软体动物门 (Mollusca) 双壳纲 (Lamellibranchia) 列齿目 (Taxodonta) 蚶科 (Arcidae) 泥蚶属 (*Tegillarca*), 是一种广温性双壳贝类, 一般分布在我国山东以南沿海地区。泥蚶长期栖息在固定的水域, 运动能力较差, 容易暴露在海洋污染物中, 无选择性的滤食特性使它们易受污染物的长期影响。目前, 国内外对余氯的研究主要集中在对生物个体的急性毒性上<sup>[8, 10, 13]</sup>, 本研究从细胞和分子水平上研究温度升高和游离余氯对以泥蚶为代表的滩涂贝类长期胁迫的氧化响应, 包括活性氧、细胞活性、细胞吞噬效率、DNA 损伤、SOD 活性和 ATP 酶活性等。以期为揭示海洋生物在温度升高和游离余氯复合污染中而导致氧化毒性提供线索, 并且为生态风险评估提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用的 2 龄泥蚶采自浙江省台州市三门县 (28°53'N, 121°36'E), 选择健康, 规格一致的个体, 初始湿重为 (10.54±1.46) g、壳长为 (21.66±1.65) mm、壳宽为 (20.69±1.03) mm、壳高为 (24.46±1.27) mm, 用高锰酸钾浸泡 5 min 消毒后放入水箱暂养, 暂养期间充气并升温达到实验所需

温度 (19、29 °C), 初始温度为 15 °C。将泥蚶分为 2 批, 每天升温 2 °C, 一批 2 天时达到 19 °C 之后并一直在该温度下暂养, 另一批 7 天时达到 29 °C, 暂养 3 d, 两批同时进行实验。每天早上 9:00 换水 1 次, 换水量为 100%, 投喂适量的亚心型扁藻 (*Platymonas subcordiformis*)。

实验所用海水为浙江省海洋水产养殖研究所清江基地经 24 h 以上沉淀和砂滤后的乐清湾海域 (121°E, 28°N) 天然海水。经检测, 海水本底不含余氯, 每次换水前 2 h, 将实验海水进行预处理, 达到实验所需的温度梯度 (19 °C、29 °C)。

### 1.2 实验设计

用蒸馏水将次氯酸钠 (NaClO 分析纯) 配置成浓度为 1.5 mg/mL 的母液, 现配现用, 通过预实验获得 2 龄泥蚶的游离余氯 96 h 半致死浓度为 66.6 mg/L, 由此设置长期胁迫实验浓度为 0.33 mg/L (0.005×LC<sub>50</sub>) 和 6.66 mg/L (0.1×LC<sub>50</sub>), 以砂滤后的海水为空白对照。结果展示中, 将 0.33 mg/L 作为低浓度组, 用 FRC1 表示; 将 6.66 mg/L 作为高浓度组, 用 FRC2 表示。我国东海近岸水域冬季和夏季平均水温分别约为 15 和 25 °C, 我国《海水水质标准》(GB3097—1997)<sup>[15]</sup>中规定: “第三类、第四类海域人为造成的海水温升不超过当时当地的 4 °C”, 故本实验设置 4 °C 的温升, 即以 19、29 °C 分别模拟冬夏两季温升情况。每个实验组设 3 个平行, 进行为期 20 d 的升温与游离余氯胁迫实验。实验期间日常管理, 保持充气、每天全量换水, 换水后, 立即投喂适量的亚心型扁藻, 待泥蚶摄食 1 h 后再加入游离余氯母液, 并保持温度在 (19.0±0.5) °C 和 (29.0±0.5) °C。

### 1.3 样品采集及处理

每个实验组投放 24 只泥蚶, 在胁迫后第 1、10、20 天进行取样, 从每个实验组中随机挑选 6 只泥蚶, 每个平行取 2 只。先用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 冲洗贝壳表面, 然后用 200 μL 的移液枪从泥蚶的外套膜腔中抽取血淋巴, 每只泥蚶约取 600 μL, 用于测定活性氧、细胞活性、细胞吞噬率和 DNA 损伤; 取泥蚶内脏团组织, 用生理盐水冲去表面血渍, 每只泥蚶内脏团约为 0.2 g, 擦拭干后保存于 1 mL 冻存管, 液氮速冻后置于 -80 °C 保存, 用于酶活性的测定。实验过程中操作人员严格遵守动物实验伦理规范, 并按照相

关的规章制度执行。

#### 1.4 实验方法

**余氯测定方法** 采取法国 PONSEL 便携式水质分析仪 (Multy8302) 及其配套试剂测定海水中的余氯含量 (国家环境保护标准 HJ586—2010, DPD 法, 量程 0.1~6.0 mg/L)。将市售次氯酸钠溶液 (A501944-0500, 生工生物工程上海股份有限公司) 用蒸馏水稀释  $10^5$  倍后, 用便携式水质分析仪 (Multy8302) 测得浓度为  $(1.50 \pm 0.02)$  mg/L, 即将市售次氯酸钠原液稀释 100 倍作为母液, 母液浓度为  $1.50 \times 10^3$  mg/L。设置实验浓度梯度为 0.33 mg/L 和 6.66 mg/L, 每天换水时分别添加 6.60 mL 和 133.2 mL 母液 (实验水体为 30 L)。

**活性氧的测定** 活性氧含量的测定采用 DCFH-DA 荧光法, 所用试剂盒购于碧云天生物科技有限公司。实验步骤按照说明书进行, 采用荧光显微镜 (Eclipse 80i, Nikon) 镜检、拍照。图片用 ImageJ 软件 (<http://imagej.nih.gov/ij/>) 进行测定分析, 具体分析步骤如下。

- ① 安装后首先打开 ImageJ;
- ② 打开图片: File→open (热键为 Ctrl+O);
- ③ 转换成 8 bit 的灰度图: Image→Type→8-bit;
- ④ 黑白反转: Edit→Invert (热键为 Ctrl+Shift+D);
- ⑤ 校正光密度: Analyze→Calibrate, 在弹出界面的 Function 选择 Uncalibrated OD, 并在界面左下方勾选 Global calibration, 然后点击右下角的 OK;
- ⑥ 选择测量单位 (一般选择像素, 如有明确的比例, 也可以选择相应单位): Analyze→Set scale, 点击后在弹出的界面中点击 click to Remove Scale, 并勾选 Global, 最后点击 OK;
- ⑦ 选择测量项目: Analyze→Set Measurements, 在弹出界面中选择所需测量的项目 Area、Integrated density, 并勾选 Limit to threshold, 选择后点击 OK;
- ⑧ 选择测量域值: Image→Adjust→Threshold (热键为 Ctrl+Shift+T), 滑动界面中间的滑块选择适合的域值, 使图片中的待测目标刚好全部被选中, 之后点击右下角的 Set;
- ⑨ 测量: Analyze→Measure (热键为 Ctrl+M 或直接按 M);
- ⑩ 记录数据并计算: 结果中的 Area 为细胞

在图中的面积, IntDen 是细胞的 IOD (光密度的总和)。结果界面中的数据可以复制到 Excel 等软件中进行计算, 同法测量多张图的平均光密度值后进行半定量比较。

$$\text{平均光密度} = \frac{\text{IntDen}}{\text{Area}} \quad (1)$$

**细胞活性的测定** 采用 MTT 法, 所用试剂盒购于碧云天生物科技有限公司 (C0009S)。实验步骤按照说明书进行, 并通过酶标仪 (Multiskan Go, Thermofish) 测定 570 nm 波长处的吸光值。

**血细胞吞噬率的测定** 血细胞吞噬率的测定根据 Cima 等<sup>[16]</sup> 的方法并加以改进。取 100  $\mu$ L 血淋巴与 100  $\mu$ L 阿氏液 (Solarbio) 等比例混合, 再加入 1  $\mu$ L 荧光微球 (invitrogena), 混合均匀。室温下放置 30 min 后冰浴 (4  $^{\circ}$ C) 1 h 终止反应, 然后加入 100  $\mu$ L 2.5% 戊二醛, 制作血涂片, 进行瑞氏染色。染色后的涂片置于 1 000 $\times$  显微镜 (Eclipse 80i, Thermofish) 下观察, 并统计吞噬率。每个样本均随机统计 3~5 次, 每次随机选取 100 个以上的血细胞用于统计。

**DNA 损伤的测定** DNA 损伤的测定采用彗星实验 (Comet Assay), 又称单细胞凝胶电泳实验 (SCGE), 所用试剂盒购自 Cell Biolabs 公司 (STA-351)。按照说明书进行实验, 采用荧光显微镜 (Eclipse 80i, Thermofish) 观察玻片、拍照、存取结果, 用 ImageJ 软件 (<http://wsr.imagej.net/distros/>) 分析泥蚶血细胞 DNA 的彗星图片, 测定彗星的荧光强度  $A$  和尾的荧光强度  $B$  及拖尾长度  $L$ 。每个试验样本均随机统计 3~5 次, 每次随机选取 100 个以上的血细胞用于统计。采用以下公式对 DNA 损伤进行计算:

$$\text{DNA 损伤} = \frac{\sum \frac{B}{A} \times L}{\text{总细胞数}} \quad (2)$$

**酶活性的测定** 超氧化物歧化酶 (SOD) 的测定采用黄嘌呤氧化酶法, 三磷酸腺苷酶 ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) 的测定采用化学比色法。以上所需试剂盒购自索莱宝生物科技有限公司 (BC0175、BC0065)。样品总蛋白含量的测定使用碧云天 BCA 试剂盒 (P0012)。

SOD 活性的计算公式:

$$\text{抑制百分率} = (\text{DA空白} - \Delta\text{A测定}) / \Delta\text{A空白} \times 100\% \quad (3)$$

使样本抑制百分率在 30%~70% 范围内

$$\text{SOD酶活性} = [\text{抑制百分率} / (1 - \text{抑制百分率}) \times V_{\text{反总}}] / (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times F \quad (4)$$

式中,  $V_{\text{反总}}$  表示反应总体积, 0.2 mL;  $V_{\text{样}}$  表示加入反应体系中的样本体积, 0.018 mL; Cpr 表示样本蛋白浓度, mg/mL;  $F$  表示样本稀释倍数。

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性的计算公式:

$$\text{ATP酶活性} = C_{\text{标准管}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) / (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{总}} / (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) / T \quad (5)$$

式中,  $C$  标准管表示标准管浓度, 0.5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ;  $V_{\text{总}}$  表示酶促反应总体积, 0.25 mL;  $V_{\text{样}}$  表示加入样本体积, 0.1 mL;  $T$  表示反应时间, 10 min。

## 1.5 数据分析

所得数据使用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 以独立样本  $t$  检验分析空白对照组在不同温度下的显著性差异。以单因素方差分析 One-Way ANOVA 检验相同温度下不同浓度组之间的显著性差异。采用 SPSS 22.0 统计软件的 Tukey 氏或

Dunnett 氏 T3 多重比较方法分析不同处理组和空白组之间的差异显著性, 当  $P < 0.05$  时统计具有显著差异。以双因素方差分析 Two-Way ANOVA (SPSS 22.0 软件) 检验温度升高、游离余氯这两个因素相互作用是否显著影响泥蚶的氧化胁迫效应,  $P < 0.05$  为差异显著。而后采用 Origin Pro 2019 软件进行画图。

## 2 结果

### 2.1 温度升高对泥蚶氧化响应指标的影响

独立样本  $t$  检验结果表明, 在第 1 和 10 天, 温度升高对泥蚶 ROS 水平无显著影响 ( $P > 0.05$ ) (表 1); 在第 20 天, 温度升高对泥蚶 ROS 水平有显著影响 ( $P < 0.05$ )。温度越高, ROS 水平越高。第 1、10 和 20 天随着水温升高, 泥蚶血细胞吞噬率均有上升趋势, 但结果表明温度升高对泥蚶血细胞吞噬率均无显著影响 ( $P > 0.05$ )。在第 1、10 和 20 天, 温度升高对泥蚶细胞活性、DNA 损伤、SOD 活性、ATP 酶活性均无显著影响 ( $P > 0.05$ )。

表 1 独立样本  $t$  检验: 温度升高对泥蚶氧化响应指标的影响

Tab. 1 Independent-sample  $t$  tests: effect of temperature rise on oxidative response indexes of *T. granosa*

氧化响应指标 oxidative response index	取样时间/d sampling time	19 °C	29 °C	$P$ 值 $P$ value
活性氧水平 relative ROS level	1	100.0 $\pm$ 25.3	113.7 $\pm$ 10.0	0.057
	10	100.0 $\pm$ 37.7	144.8 $\pm$ 18.2	0.137
	20	100.0 $\pm$ 7.5	193.0 $\pm$ 14.1	0.001*
细胞活性 cell relative activity	1	100.0 $\pm$ 6.6	101.2 $\pm$ 5.0	0.806
	10	100.0 $\pm$ 5.9	98.0 $\pm$ 5.3	0.678
	20	100.0 $\pm$ 12.5	94.7 $\pm$ 5.6	0.540
吞噬率/% the phagocytic rates	1	28.40 $\pm$ 4.40	33.24 $\pm$ 2.06	0.232
	10	30.94 $\pm$ 2.33	35.03 $\pm$ 3.46	0.238
	20	29.02 $\pm$ 3.35	33.13 $\pm$ 2.55	0.240
DNA损伤 DNA damage	1	100.0 $\pm$ 19.5	97.9 $\pm$ 13.0	0.882
	10	100.0 $\pm$ 11.9	99.7 $\pm$ 3.4	0.974
	20	100.0 $\pm$ 23.1	98.2 $\pm$ 10.3	0.910
SOD活性/(U/mg prot) SOD activity	1	97.54 $\pm$ 9.23	92.23 $\pm$ 17.59	0.563
	10	81.11 $\pm$ 7.25	80.72 $\pm$ 7.70	0.936
	20	86.51 $\pm$ 18.73	83.48 $\pm$ 11.67	0.767
ATP酶活性/(U/mg prot) ATPase activity	1	0.90 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.08	0.701
	10	0.98 $\pm$ 0.15	1.16 $\pm$ 0.07	0.052
	20	1.13 $\pm$ 0.13	1.07 $\pm$ 0.09	0.418

注: 活性氧水平、细胞活性、DNA损伤均采用相对值计(无单位), \*表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: relative ROS level, cell activity and DNA damage extent were measured in relative value (no unit), \* indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ).

## 2.2 温度升高和游离余氯对泥蚶 ROS 水平的影响

19 °C 时, 低浓度组和高浓度组泥蚶 ROS 水平第 1、10 天和对照组相比无显著差异 ( $P>0.05$ ), 第 20 天和对照组相比显著升高 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的 2.2 倍和 6.2 倍 (图 1)。29 °C 时, 低浓度组泥蚶 ROS 水平第 1、10 天和对照组相比无显著差异 ( $P>0.05$ ), 第 20 天和对照组相比显著升高 ( $P<0.05$ ), 为对照组的 2.9 倍。高浓度组泥蚶 ROS 水平第 10 和 20 天和对照组相比显著升高 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的 2.1 和 3.6 倍。

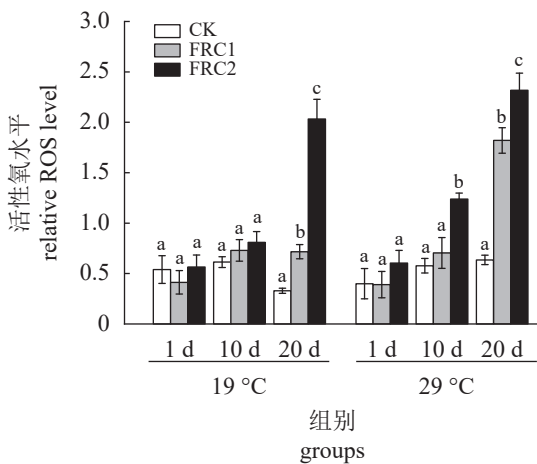


图 1 温度升高和游离余氯对泥蚶活性氧水平的影响

CK 空白对照组, FRC1. 0.33 mg/L 浓度组, FRC2. 6.66 mg/L 浓度组。同一温度、时间, 不同浓度下, 不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同。

Fig. 1 Effect of temperature rise and free residual chlorine on the ROS level in *T. granosa*

CK. blank control group, FRC1. 0.33 mg/L group, FRC2. 6.66 mg/L group; different letters indicate significant differences for different concentrations at the same temperature and time ( $P<0.05$ ), the same below.

双因素方差分析结果显示, 第 1 和 10 天, 温度升高和游离余氯对泥蚶 ROS 无交互作用, 温度升高 (1 d:  $P=0.001$ ; 10 d:  $P=0.000$ ) 和游离余氯 (1 d:  $P=0.035$ ; 10 d:  $P=0.001$ ) 皆为主效应。第 20 天, 温度升高和游离余氯浓度对泥蚶 ROS 具有显著交互作用 ( $F=21.708$ ,  $P=0.000$ ) (表 2)。

## 2.3 温度升高和游离余氯对泥蚶细胞活性的影响

19 °C 时, 低浓度组泥蚶细胞活性第 20 天和对照组相比显著降低 ( $P<0.05$ ), 为对照组的 76.1%; 高浓度组泥蚶细胞活性第 10、20 天和对照组相比显著降低 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的

63.1% 和 54.2%。29 °C 时, 低浓度组泥蚶细胞活性第 1 天和对照组相比无显著差异 ( $P>0.05$ ), 第 10、20 天和对照组相比显著降低 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的 80.0% 和 70.0%; 高浓度组泥蚶细胞活性在第 10、20 天显著降低 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的 58.4% 和 45.2% (图 2)。

双因素方差分析结果显示, 第 1、10 和 20 天, 温度升高和游离余氯对泥蚶细胞活性无显著交互作用。第 1 天时无主效应, 第 10、20 天时, 温度升高 (1 d:  $P=0.020$ ; 10 d:  $P=0.001$ ) 和游离余氯 (1 d:  $P=0.000$ ; 10 d:  $P=0.000$ ) 皆为主效应 (表 2)。

## 2.4 温度升高和游离余氯对泥蚶血细胞吞噬率的影响

19 °C 时, 第 1、10 和 20 天对照组泥蚶的血细胞吞噬率呈现出波动变化, 为 (28.4%±4.4%)~(30.9%±2.3%) (图 3)。低浓度组泥蚶血细胞吞噬率和对照组相比均无显著差异 ( $P>0.05$ )。高浓度组泥蚶血细胞吞噬率在第 10、20 天和对照组相比显著降低 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的 56.6% 和 60.0%。29 °C 时, 第 1、10 和 20 天对照组泥蚶血细胞吞噬率呈波动变化, 为 (33.1%±2.6%)~(35.0%±3.5%)。低浓度组泥蚶血细胞吞噬率和对照组相比均无显著差异 ( $P>0.05$ )。高浓度组泥蚶血细胞吞噬率均显著低于对照组 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的 33.0%、44.9% 和 45.8%。

双因素方差分析结果显示 (表 2), 第 1 天, 温度升高和游离余氯对泥蚶血细胞吞噬活性具有显著交互作用 ( $F=8.106$ ,  $P=0.005$ ); 第 10 和 20 天, 温度升高和游离余氯对泥蚶血细胞吞噬活性无显著交互作用, 浓度为主效应 (10 d:  $P=0.000$ ; 20 d:  $P=0.000$ )。

## 2.5 温度升高和游离余氯对泥蚶 DNA 损伤的影响

19 °C 时, 低浓度组泥蚶 DNA 损伤第 20 天和对照组相比显著升高 ( $P<0.05$ ), 为对照组的 1.8 倍 (图 4, 图 5)。高浓度组泥蚶 DNA 损伤第 1、10 和 20 天和对照组相比均显著升高 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的 2.3、2.6 和 6.0 倍。29 °C 时, 低浓度组泥蚶 DNA 损伤均升高, 第 1 和 20 天显著升高 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的 1.5 和 2.2 倍。高浓度组泥蚶 DNA 损伤第 1、10 和 20 天和对照组相比均显著升高 ( $P<0.05$ ), 分别为对照组的 2.7、4.5 和 8.1 倍。

表 2 温度升高和游离余氯对泥蚶氧化响应指标的影响

**Tab. 2 Effects of temperature rise and free residual chlorine on oxidative response index of *T. granosa***

氧化响应指标 oxidative response	取样时间/d sampling time	因子/交互 factor/interaction		
		温度升高 temperature rise	余氯浓度 residual chlorine concentration	温度×浓度 temperature×concentration
活性氧水平 relative ROS level	1	$F=16.259$	$F=3.752$	$F=0.104$
		$P=0.002^*$	$P=0.054$	$P=0.902$
	10	$F=43.623$	$F=22.737$	$F=5.648$
		$P=0.000^{**}$	$P=0.000^{**}$	$P=0.019^*$
	20	$F=95.411$	$F=286.470$	$F=21.708$
		$P=0.000^{**}$	$P=0.000^{**}$	$P=0.000^{**}$
细胞相对活性 cell relative activity	1	$F=0.002$	$F=1.483$	$F=0.035$
		$P=0.967$	$P=0.266$	$P=0.966$
	10	$F=8.123$	$F=67.235$	$F=2.210$
		$P=0.015^*$	$P=0.000^{**}$	$P=0.152$
	20	$F=7.749$	$F=83.356$	$F=0.279$
		$P=0.017^*$	$P=0.000^{**}$	$P=0.761$
吞噬率/% the phagocytic rates	1	$F=0.380$	$F=26.698$	$F=8.106$
		$P=0.549$	$P=0.000^{**}$	$P=0.006^*$
	10	$F=0.779$	$F=24.002$	$F=0.787$
		$P=0.395$	$P=0.000^{**}$	$P=0.477$
	20	$F=0.004$	$F=30.539$	$F=1.300$
		$P=0.950$	$P=0.000^{**}$	$P=0.308$
DNA损伤 DNA damage	1	$F=1.694$	$F=95.471$	$F=1.403$
		$P=0.217$	$P=0.000^{**}$	$P=0.283$
	10	$F=20.290$	$F=160.119$	$F=26.059$
		$P=0.001^*$	$P=0.000^{**}$	$P=0.000^{**}$
	20	$F=41.253$	$F=958.444$	$F=28.287$
		$P=0.000^{**}$	$P=0.000^{**}$	$P=0.000^{**}$
SOD活性/(U/mg prot) SOD activity	1	$F=0.134$	$F=13.550$	$F=6.550$
		$P=0.717$	$P=0.000^{**}$	$P=0.005$
	10	$F=1.019$	$F=6.418$	$F=1.016$
		$P=0.323$	$P=0.006^*$	$P=0.377$
	20	$F=0.503$	$F=18.020$	$F=0.473$
		$P=0.485$	$P=0.000^{**}$	$P=0.629$
ATP酶活性/(U/mg prot) ATPase activity	1	$F=0.131$	$F=5.729$	$F=0.029$
		$P=0.721$	$P=0.009^*$	$P=0.971$
	10	$F=0.208$	$F=46.131$	$F=11.536$
		$P=0.653$	$P=0.000^{**}$	$P=0.000^{**}$
	20	$F=0.039$	$F=60.863$	$F=0.815$
		$P=0.845$	$P=0.000^{**}$	$P=0.455$

注: \*表示差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ).

Notes: \* indicates a significant difference ( $P<0.05$ ), \*\* indicates an extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

双因素方差分析结果显示, 第 1 天, 温度升高和游离余氯对泥蚶 DNA 损伤无显著交互作用, 浓度为主效应 ( $P=0.000$ )。第 10 和 20 天, 温度升高和游离余氯对泥蚶 DNA 损伤具有显著交互作用 ( $F=26.199$ ,  $P=0.000$ ;  $F=31.440$ ,  $P=0.000$ ) (表 2)。

## 2.6 温度升高和游离余氯对泥蚶 SOD 活性的影响

19 °C 时, 第 1、10 和 20 天对照组泥蚶体内 SOD 活性呈波动变化, 范围为  $(81.1\pm 7.3)\sim(97.5\pm 9.2)$  U/mg prot, 低浓度组泥蚶 SOD 活性第 1 天和

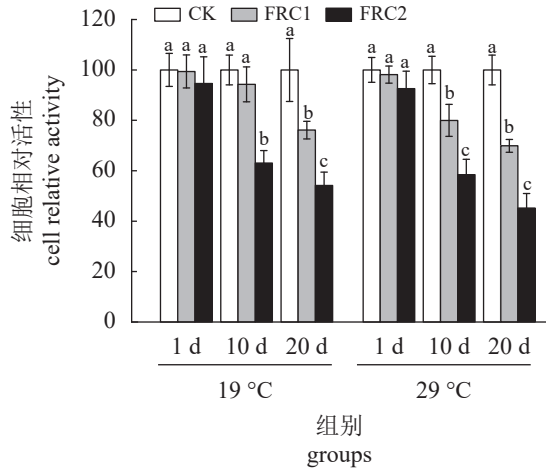


图 2 温度升高和游离余氯对泥蚶细胞活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature rise and free residual chlorine on the cell activity in *T. granosa*

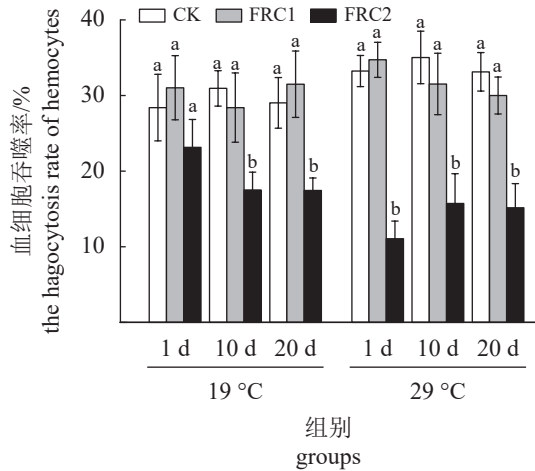


图 3 温度升高和游离余氯对泥蚶血细胞吞噬率的影响

Fig. 3 Effect of temperature rise and free residual chlorine on the phagocytic rates of hemocytes in *T. granosa*

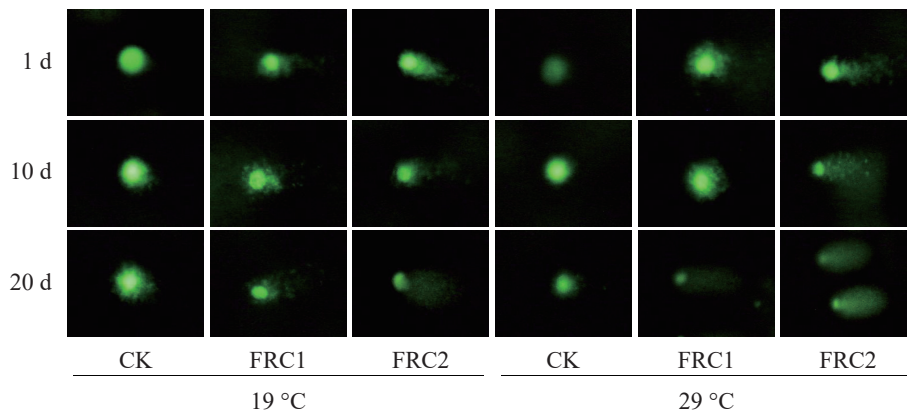


图 5 彗星实验图片

Fig. 5 Pictures from comet assay

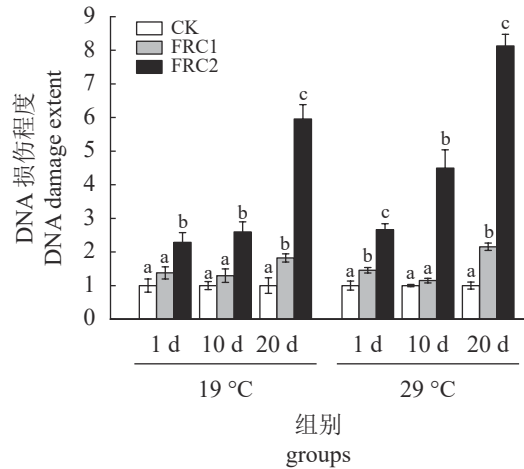


图 4 温度升高和游离余氯对泥蚶 DNA 损伤的影响

Fig. 4 Effect of temperature rise and free residual chlorine on the DNA damage in *T. granosa*

对照组相比显著降低 ( $P < 0.05$ ), 为对照组的 55.6% (图 6)。高浓度组 SOD 活性在第 20 天时显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 为对照组的 55.4%。29 °C 时, 第 1、10 和 20 天对照组泥蚶体内 SOD 活性呈波动变化, 范围为  $(80.7 \pm 7.7) \sim (92.2 \pm 17.59)$  U/mg prot, 低浓度组泥蚶 SOD 活性与对照组相比差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。高浓度组 SOD 活性均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 在胁迫末期 (20 d) 时降至最小值, 仅为对照组的 43.6%。

双因素方差分析结果显示 (表 2), 第 1、10 和 20 天, 温度升高和游离余氯对泥蚶 SOD 活性均无显著交互作用。第 10 天时无主效应, 第 1 和 20 天时, 主效应为游离余氯 (1 d:  $P = 0.001$ ; 20 d:  $P = 0.000$ )。

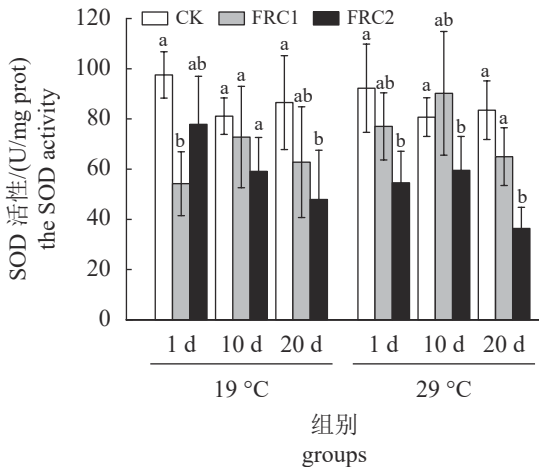


图 6 温度升高和游离余氯对泥蚶 SOD 活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature rise and free residual chlorine on the SOD activity in *T. granosa*

## 2.7 温度升高和游离余氯对泥蚶 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响

19 °C 时, 第 1、10 和 20 天对照组泥蚶体内 ATP 酶活性呈波动变化, 为  $(0.90 \pm 0.08) \sim (1.13 \pm 0.13)$  U/mg prot, 低浓度组泥蚶 ATP 酶活性在第 20 天时显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 为对照组的 70.8% (图 7)。高浓度组 ATP 酶活性均在第 10 和 20 天时显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 在胁迫末期 (20 d) 降至最小值, 仅为对照组的 51.9%。29 °C 时, 第 1、10 和 20 天对照组泥蚶体内 ATP 酶活性呈波动变化, 为  $(0.92 \pm 0.08) \sim (1.16 \pm 0.07)$  U/mg prot, 低浓度组泥蚶 ATP 酶活性在第 1、10 和 20 天均低于对照组。高浓度组 ATP 酶活性均显著低于对

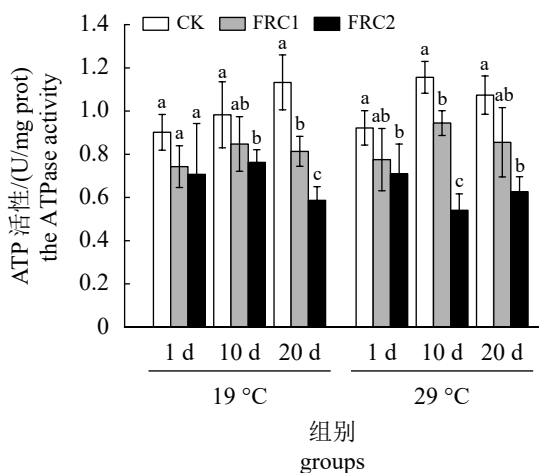


图 7 温度升高和游离余氯对泥蚶 ATP 酶活性的影响

Fig. 7 Effect of temperature rise and free residual chlorine on the ATPase activity in *T. granosa*

照组 ( $P < 0.05$ ), 在第 10 天时降至最小值, 仅为对照组的 46.7%。

双因素方差分析结果显示, 第 10 天, 温度升高和游离余氯对泥蚶 ATP 酶活性具有显著交互作用 ( $F=11.536, P=0.000$ ); 第 1 和 20 天, 温度升高和游离余氯对泥蚶 ATP 酶活性无显著交互作用 (表 2), 主效应为游离余氯 (1 d:  $P=0.006$ ; 20 d:  $P=0.000$ )。

## 3 讨论

### 3.1 温度升高对泥蚶的氧化胁迫效应

温度升高会诱导生物体产生 ROS, 激活 SOD 活性, ROS 积累过多会导致生物氧化应激<sup>[17]</sup>。本研究中, 19 和 29 °C 下, ROS 水平在第 20 天时显著升高, SOD 活性及其他氧化响应指标未见显著变化, 可能的原因: ①泥蚶是一种广温性双壳贝类, 适宜生长温度为 13~30 °C<sup>[18]</sup>, 对温度的适应范围较广。19~29 °C 时, 泥蚶未产生显著的 SOD 活性及其他氧化响应指标变化。廖一波等<sup>[19]</sup>对 4 种主要经济贝类的热耐受研究中, 也指出泥蚶 > 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) > 缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) > 贻贝 (*Mytilus edulis*), 在夏季自然起始水温为 28 °C 时, 泥蚶的 48 h 临界热最大值 (CTMax, critical thermal maxima) 为 39.3 °C。②蚶类有一定的自我调节能力<sup>[20]</sup>, 温度对机体造成的影响会随着时间延长而逐渐恢复。本研究中泥蚶在开始游离余氯胁迫前进行了升温暂养, 使泥蚶处于 19 和 29 °C 下, 其体内 SOD 活性及其他氧化响应指标可能已恢复至平衡状态。

### 3.2 游离余氯对泥蚶的氧化胁迫效应

游离余氯对泥蚶 ROS 水平的影响 游离余氯即次氯酸钠是一种强氧化剂, 当生物体处于游离余氯胁迫环境时, 机体可通过产生 ROS, 如  $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{NO}$  等代谢外源伤害, 此过程会伴随由未成对电子构成的自由基, 过量的自由基会造成机体的过氧化胁迫, 进而诱发氧化损伤, 造成毒性影响<sup>[21]</sup>。已有研究中发现, 菲和镉单一及复合污染能诱导毛蚶体内 ROS 含量的增加及 GSH 含量、GST 活性的降低<sup>[22]</sup>。 $\text{H}_2\text{O}_2$  处理人神经母细胞瘤系 SH-SY5Y 后, 细胞生存率明显下降, 细胞内 ATP 和 GSH 含量显著下降, 细胞产生了较高的氧化反应<sup>[23]</sup>。在极低浓度的  $\text{NaClO}$  胁迫下, 铜绿微囊藻和小球藻细胞内的 ROS 也会增加, 氯



可穿透细胞氧化色素, 干扰光合作用, 影响酯酶活性<sup>[4]</sup>。因此, ROS 生成及其含量增加和氧化作用有关<sup>[21-22]</sup>。本研究中随着游离余氯胁迫时间的延长, 泥蚶体内的 ROS 水平升高, 高浓度组 ROS 增量整体显著高于对照组, 存在时间-效应关系和剂量-效应关系, 表现出较强的毒性影响潜力和氧化胁迫反应。

**游离余氯对泥蚶 SOD 活性的影响** SOD 作为抗氧化系统中的重要指标, 在维持机体氧化与抗氧化平衡中起着关键作用<sup>[24]</sup>。它可以催化超氧阴离子与氢离子反应生成过氧化氢, 从而解除活性氧对机体的损伤<sup>[25]</sup>。有研究表明, 当受到外界环境干扰时, 低浓度毒物可使生物体内的 SOD 活性升高, 此种现象称为“毒物兴奋效应”<sup>[26]</sup>, 高浓度毒物则呈现出抑制 SOD 活性趋势。在本研究所设置的浓度下, 在暴露的开始阶段, 泥蚶 SOD 活性呈下降趋势, 随着暴露时间延长, 游离余氯浓度越高, SOD 活性越小。游离余氯胁迫下, 泥蚶体内产生大量的 ROS, 一方面与细胞内的 SOD 产生反应, 迅速消耗 SOD; 另一方面, ROS 会诱导产生 SOD, 推测诱导产生的 SOD 低于消耗量, 因此 SOD 活性下降。在对其他水产动物 SOD 活性的研究中, 也发现类似现象, 斑马鱼 (*Danio rerio*) 暴露于氧化乐果, SOD 活性降低<sup>[27]</sup>。随着氯氰菊酯浓度的增加, 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) SOD 活性急剧下降<sup>[28]</sup>。淡水双壳贝类被转移到污染地时, 其体内 SOD 活性显著下降<sup>[29]</sup>。推测 SOD 活性在面临氧化性较高的毒物时, 敏感值较低, 在较低的毒物浓度下, SOD 活性呈现出被抑制的趋势。

**游离余氯对泥蚶 ATP 酶活性的影响**  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶又称三磷酸腺苷酶, 是一种广泛存在于真核动物中的膜蛋白酶<sup>[30]</sup>, 能将三磷酸腺苷 (ATP) 催化水解为二磷酸腺苷 (ADP) 和磷酸根离子, 可为生物提供能量, 在维持体内  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  浓度跨膜运输平衡过程中发挥重要作用。ATP 酶活性是表征细胞活力和毒物学工具的一个重要指标, 而且 ATP 酶是有机氯毒物的目标酶<sup>[25]</sup>, ATP 酶属于一种细胞膜蛋白, 其三维结构的维持高度依赖于所结合的脂, 细胞膜的流动性也保证了 ATP 酶起作用, 因此脂的破坏将导致酶的结构改变, 细胞膜结构或流动性改变会导致 ATP 酶损失或者活性下降。在本研究中, 游离余氯胁迫使泥蚶体内

产生大量的活性氧自由基, 使生物膜产生脂质过氧化, 破坏了生物脂的生物功能, 从而影响 ATP 酶活性。

**游离余氯对泥蚶血细胞吞噬率的影响** 本研究发现泥蚶血细胞的细胞活性下降、ROS 水平升高、ATP 酶活性下降。这三个生理生化指标的变化可能是造成泥蚶血细胞吞噬率下降的原因。首先, 游离余氯胁迫使泥蚶血细胞细胞活性显著下降。吞噬是一个完全依赖细胞的生理活动过程, 细胞的生理状态会直接影响吞噬效率。当细胞的活性下降, 其表面的受体识别能力下降、细胞膜内陷, 进而导致吞噬活性的下降。其次, 强氧化性是游离余氯最显著的特点, 一旦进入机体, 会诱导机体产生大量的 ROS, 对血细胞造成伤害。泥蚶的血细胞细胞膜是典型的磷脂双分子膜, 含有大量不饱和脂肪酸, 这些不饱和脂肪酸极易受到强氧化物的侵蚀而导致正常功能受损<sup>[31]</sup>。正常的吞噬过程离不开细胞膜包裹内吞步骤, 这一步骤十分依赖细胞膜的伸展功能, 因此游离余氯引起泥蚶体内 ROS 的升高很可能是血细胞吞噬率下降的原因之一。第三, 游离余氯胁迫使泥蚶体内 ATP 酶活性下降。吞噬是依赖能量的生理活动过程, ATP 酶活性会直接影响吞噬效率, 供能不足导致吞噬活性下降。

**游离余氯对泥蚶 DNA 损伤的影响** 有研究表明, 毒性物质胁迫可以通过产生 ROS 进而造成 DNA 损伤<sup>[32-35]</sup>, 本研究结果也证实了这一现象。1  $\mu\text{mol/L}$  1-硝基苊染毒下, 人肺上皮细胞 A549 内 ROS 显著增加, 导致 DNA 损伤, 且呈现剂量-效应关系<sup>[32]</sup>。BDE-47 能够诱导斑马鱼胚胎、幼体产生氧化响应, ROS 是诱发胚胎发生 DNA 损伤的导火索, 且损伤程度伴随着 ROS 水平的升高而升高<sup>[34]</sup>。另外, 在杨金辉<sup>[35]</sup>的研究中发现, 蚯蚓的 DNA 损伤与液体离子 PF6 和 CL 的浓度和处理时间存在剂量-效应和时间-效应关系, 与本研究结果一致。在慢性和亚慢性胁迫时, 如果产生的 ROS 自由基太多或者由于抗氧化剂太少, 就会造成慢性的永久损伤<sup>[36]</sup>。ROS 自由基中的羟自由基可修饰碱基, 对胸腺嘧啶的 5, 6-双键进行加成, 形成胸腺嘧啶自由基。ROS 自由基还会造成键的断裂, 自由基从 DNA 的戊糖夺取了氢原子, 使之在 C4 位置形成具有未配对电子的自由基, 然后, 此自由基又在  $\beta$ -位置发生键的断裂<sup>[37]</sup>, 造成 DNA 损伤。

### 3.3 温度升高和游离余氯联合对泥蚶的氧化胁迫效应

目前, 多数研究主要关注单一环境压力对海洋生物的影响, 多重压力下的耦合效应往往产生更大的环境压力, 这类研究同样值得关注。本研究以泥蚶为对象, 开展多重压力耦合效应研究, 旨在阐明温度升高和游离余氯联合对泥蚶的氧化胁迫作用。研究结果显示, 温度升高和游离余氯联合胁迫作用时, 对泥蚶 ROS 水平、血细胞吞噬率、DNA 损伤、ATP 酶活性均产生了显著交互作用, 温度的升高加剧了游离余氯对泥蚶的氧化胁迫。但对细胞活性、SOD 活性无显著交互作用, 说明温度升高和游离余氯之间的交互关系会因指标的不同而有所不同。在不同温度下, 汞对草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 的毒理学影响研究中, 发现温度和汞对 PK 和 CAT 这两种酶活性产生了显著交互作用, 但对 SOD 和 MT 等活性无显著交互作用<sup>[38]</sup>, 也证明了多重压力下的耦合效应往往产生更大的环境压力。总体来说, 温度越高, 可能会使游离余氯的毒性作用增强, 从而产生更大的生物毒性, 故在余氯排放海域, 夏季会比冬季对泥蚶产生更大的氧化胁迫。

综上, 单一温度升高胁迫下, 只在第 20 天时对泥蚶体内 ROS 水平造成显著影响, 温度越高, ROS 水平越高。游离余氯能对泥蚶体内产生一定程度的氧化胁迫, 刺激泥蚶产生大量 ROS, 通过激活和消耗一定量的 SOD 和 ATP 酶来消除过量的 ROS, 但是, 过量的 ROS 可造成细胞活力下降、细胞吞噬率下降、DNA 损伤等一系列氧化还原反应。温度升高和游离余氯联合胁迫作用时, 温度的升高加剧了游离余氯对泥蚶的氧化胁迫作用。本研究可为揭示海洋生物在温度升高和游离余氯复合污染中而导致的氧化胁迫毒性提供线索, 并且为生态风险评估提供科学依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 杰弗里 G. 艾科尔兹. 核动力的环境问题 [M]. 李国鼎, 译. 北京: 原子能出版社, 1985.  
Eichholz G G. Environmental aspects of nuclear power[M]. Li G D, trans. Beijing: Atomic Energy Press, 1985 (in Chinese).
- [2] 张露, 黄莹莹, 陈雪初, 等. 电厂温排水对铜绿微囊藻生长影响的模拟研究[J]. 中国环境科学, 2015, 35(4): 1181-1186.  
Zhang L, Huang Y Y, Chen X C, et al. Simulation study on effects of thermal discharge from an electric power plant on *Microcystis aeruginosa*[J]. China Environmental Science, 2015, 35(4): 1181-1186 (in Chinese).
- [3] 尹伊伟, 温晓艳, 吕颂辉, 等. 不同温度下氯对水生生物的毒性及制订渔业水质标准的探讨[J]. 生态科学, 1992, 11(2): 41-49.  
Yin Y W, Wen X Y, Lü S H, et al. Toxic effects of chlorine on aquatic organisms at different temperatures and proposals for the development of fishery water quality standards[J]. Ecological Science, 1992, 11(2): 41-49 (in Chinese).
- [4] Cao S, Zhang D, Teng F, et al. Inhibitory effects of ultra-low-dose sodium hypochlorite on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*: differences in sensitivity and physiology[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 774: 145638.
- [5] Macêdo L P R, Dornelas A S P, Vieira M M, et al. Comparative ecotoxicological evaluation of peracetic acid and the active chlorine of calcium hypochlorite: use of *Dugesia tigrina* as a bioindicator of environmental pollution[J]. *Chemosphere*, 2019, 233: 273-281.
- [6] Heath A G. Toxicity of intermittent chlorination to freshwater fish: influence of temperature and chlorine form[J]. *Hydrobiologia*, 1977, 56(1): 39-47.
- [7] Eppley R W, Renger E H, Williams P M. Chlorine reactions with seawater constituents and the inhibition of photosynthesis of natural marine phytoplankton[J]. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 1976, 4(2): 147-161.
- [8] 林可椒, 高宏伟, 严安生. 余氯对鳊鱼苗的急性毒性试验[J]. 淡水渔业, 1991, 21(3): 24-25.  
Lin K J, Gao H W, Yan A S. Acute toxicity of residual chlorine to *Siniperca chuatsi*[J]. Freshwater Fisheries, 1991, 21(3): 24-25 (in Chinese).
- [9] 江志兵, 曾江宁, 陈全震, 等. 热冲击和加氯后亚热带海区浮游植物细胞数量的动态变化[J]. 植物生态学报, 2008, 32(6): 1386-1396.  
Jiang Z B, Zeng J N, Chen Q Z, et al. Dynamic change of phytoplankton cell density after thermal shock and chlorination in a subtropical bay in China[J]. Journal of Plant Ecology, 2008, 32(6): 1386-1396 (in Chinese).

- [10] 吴杨平, 陈爱华, 张雨, 等. 余氯对大竹蛭稚贝的毒性及半致死浓度研究[J]. 水产科技情报, 2018, 45(3): 158-161.  
Wu Y P, Chen A H, Zhang Y, *et al.* Studies on the toxicity and medium lethal concentration of residual chlorine to juvenile *Solen grandis*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2018, 45(3): 158-161 (in Chinese).
- [11] 朱英. 典型家用消毒剂对稀有鮡鲫毒性及酶活性影响[J]. 环境科学与技术, 2019, 42(7): 51-56.  
Zhu Y. Toxicity and enzyme activity effects of typical family-use disinfectants on rare minnow[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 42(7): 51-56 (in Chinese).
- [12] Valarmathi S, Azariah J. Impact of two sublethal concentrations of copper chloride and chlorine on the excretory products of crab *Sesarma quadratum* (Fabricius)[J]. Turkish Journal of Zoology, 2002, 26(4): 357-361.
- [13] 晁敏, 王云龙, 沈新强. 水温和余氯对黑棘鲷仔鱼存活的影响[J]. 海洋科学, 2011, 35(12): 48-55.  
Chao M, Wang Y L, Shen X Q. Effects of temperature and residual chlorine on the survival of black porgy *Acanthopagrus schlegelii* larvae[J]. Marine Sciences, 2011, 35(12): 48-55 (in Chinese).
- [14] 叶利兰, 甘春娟, 陈垚, 等. 疫情防控期间含氯消毒剂大量使用对水生生物的影响综述[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(5): 644-648.  
Ye L L, Gan C J, Chen Y, *et al.* Effect of chlorinated disinfectants usage on aquatic organism during the epidemic control: a review[J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(5): 644-648 (in Chinese).
- [15] 国家环境保护局. 海水水质标准: GB 3097—1997[S]. 北京: 环境科学出版社, 2004: 1-3.  
National Environmental Protection Agency. Marine water quality standard: GB 3097 —1997[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2004: 1-3 (in Chinese).
- [16] Cima F, Matozzo V, Marin M G, *et al.* Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): Morphofunctional characterisation[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(8): 677-693.
- [17] 李大鹏, 刘松岩, 谢从新, 等. 水温对中华鲟血清活性氧含量及抗氧化防御系统的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 327-332.  
Li D P, Liu S Y, Xie C X, *et al.* Effects of water temperature on serum content of reactive oxygen species and antioxidant defense system in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(3): 327-332 (in Chinese).
- [18] 朱泽闻, 徐立蒲, 吴信忠, 等. 泥蚶血细胞的形态结构特征及部分免疫功能[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1494-1504.  
Zhu Z W, Xu L P, Wu X Z, *et al.* Morphological, structural characteristics and phagocytic and enzymatic activities of haemocytes in blood clam *Tegillarca granosa*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(10): 1494-1504 (in Chinese).
- [19] 廖一波, 陈全震, 曾江宁, 等. 四种主要经济贝类的热忍受研究[J]. 海洋通报, 2007, 26(1): 50-54.  
Liao Y B, Chen Q Z, Zeng J N, *et al.* Thermal tolerance of four commercial shellfishes[J]. Journal of Marine Science Bulletin, 2007, 26(1): 50-54 (in Chinese).
- [20] 薛素燕, 王金叶, 李加琦, 等. 温度对魁蚶能量代谢及抗氧化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(3): 573-583.  
Xue S Y, Wang J Y, Li J Q, *et al.* Effects of temperature on energy metabolism and antioxidant enzyme activities of *Scapharca broughtonii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(3): 573-583 (in Chinese).
- [21] 贾连群, 杨关林, 任路, 等. 化瘀祛痰方药对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导人脐带静脉内皮细胞氧化应激保护作用的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(9): 44-45,64.  
Jia L Q, Yang G L, Ren L, *et al.* Effect of Huayuqutan recipe on oxidation stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in EA. hy926 cells[J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2011, 18(9): 44-45,64 (in Chinese).
- [22] 阎波, 张欣, 张轲, 等. 菲和Cd<sup>2+</sup>单一及复合污染对毛蚶氧化胁迫效应的比较[J]. 海洋科学, 2021, 45(1): 44-53.  
Yan B, Zhang X, Zhang K, *et al.* Comparison of single and combined pollution effect of phenanthrene and cadmium on the oxidative pressure of *Anadara Subcrenata*[J]. Marine Sciences, 2021, 45(1): 44-53 (in Chinese).
- [23] 孙妍. n-3 多不饱和脂肪酸对细胞氧化应激及其毒性的调控机制 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.  
Sun Y. Effects of N-3 polyunsaturated fatty acids on oxidative stress-induced toxicity and the underlined mechanisms[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology,

- 2014 (in Chinese).
- [24] 钟蕾, 王子琴, 王金龙, 等. 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>对黄颡鱼幼鱼生长及肝脏功能的影响[J]. 水产学报, 2021, 45(10): 1775-1786.
- Zhong L, Wang Z Q, Wang J L, *et al.* Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on growth performance and liver function of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(10): 1775-1786 (in Chinese).
- [25] 于贞. 三种海洋滤食动物对有机磷农药的反应及降解[D]. 大连: 大连理工大学, 2011.
- Yu Z. Response and degradation of three marine filter feeders to organophosphorus pesticides[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2011 (in Chinese).
- [26] Stebbing A R D. Hormesis—The stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. *Science of the Total Environment*, 1982, 22(3): 213-234.
- [27] 张元园. 氧化乐果对斑马鱼的毒性作用 [D]. 青岛: 青岛科技大学, 2016.
- Zhang Y Y. Toxicity effect of omethoate to *Danio rerio*[D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2016 (in Chinese).
- [28] 商利新. 甲胺磷和氯氰菊酯对日本沼虾的毒性作用 [D]. 保定: 河北大学, 2004.
- Shang L X. Toxic effects of methamidophos and cypermethrin on *Macrobrachium nipponense*[D]. Baoding: Hebei University, 2004 (in Chinese).
- [29] Cossu C, Doyotte A, Jacquin M C, *et al.* Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, 38(2): 122-131.
- [30] 李忠帅, 马甦, 单洪伟, 等. 亚硝态氮胁迫下凡纳滨对虾体内亚硝态氮的积累与能量代谢响应[J]. 水产学报, 2021, 45(11): 1825-1834.
- Li Z S, Ma S, Shan H W, *et al.* Accumulation of nitrite and responses of energy metabolism exposed to nitrite stress in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(11): 1825-1834 (in Chinese).
- [31] 管晓帆. 纳米二氧化钛对泥蚶血细胞吞噬的影响及其作用机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- Guan X F. Effect and affecting mechanism of nTiO<sub>2</sub> on hemocytes phagocytosis of blood clam, *Tegillarca granosa*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [32] 尚羽, 蒋玉婷, 张玲, 等. 1-硝基芘和1, 2-萘醌的联合细胞毒性和致DNA损伤[J]. 环境科学, 2014, 35(11): 4345-4351.
- Shang Y, Jiang Y T, Zhang L, *et al.* Combined effects of 1-nitropyrene and 1, 2-naphthoquinone on cytotoxicity and DNA damage in A549 cells[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(11): 4345-4351 (in Chinese).
- [33] 李倩倩, 李光德, 闫晓彤, 等. 三氯卡班对蚯蚓的氧化胁迫及DNA损伤[J]. 生态毒理学, 2020, 15(6): 263-270.
- Li Q Q, Li G D, Yan X T, *et al.* Oxidative stress and DNA damage of triclocarban on earthworms[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15(6): 263-270 (in Chinese).
- [34] 赵雪松, 任新, 杨春维, 等. BDE-47对斑马鱼胚胎氧化应激与DNA损伤的毒性研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(12): 2280-2286.
- Zhao X S, Ren X, Yang C W, *et al.* Oxidative stress and DNA damage in zebrafish embryos exposed to BDE-47[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(12): 2280-2286 (in Chinese).
- [35] 杨金辉. 离子液体 [C<sub>8</sub>mim]PF<sub>6</sub> 和 [C<sub>8</sub>mim]Cl 对蚯蚓氧化胁迫及 DNA 损伤 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- Yang J H. Oxidative stress and DNA damage induced by ionic liquids[C<sub>8</sub>mim]PF<sub>6</sub> and [C<sub>8</sub>mim]Cl exposure in earthworm[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [36] Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?[J]. *The Lancet*, 1994, 344(8924): 721-724.
- [37] Saulsbury M D, Heyliger S O, Wang K Y, *et al.* Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells[J]. *Toxicology*, 2009, 259(1-2): 1-9.
- [38] 武艳华. 不同温度下汞对草鱼的毒理学影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- Wu Y H. Effects of different temperature on mercury-induced toxicology in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[D]. Chongqing: Southwest University, 2016 (in Chinese).

## Oxidative stress effect of temperature rise and free residual chlorine on *Tegillarca granosa*

CHEN Lin<sup>1,2</sup>, TENG Shuangshuang<sup>1</sup>, HU Gaoyu<sup>1</sup>, XIAO Guoqiang<sup>1,2</sup>, HUANG Xiaolin<sup>1\*</sup>

(1. Wenzhou Key Laboratory of Marine Biological Genetics and Breeding,  
Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource,  
Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China;  
2. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture,  
Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**Abstract:** To investigate the effects of warm waste water from nuclear power plants on the long-term stress of aquatic animals, the influence of free residual chlorine on the oxidative pressure of *Tegillarca granosa* under different temperature conditions were studied through laboratory simulation. Water temperatures were set as 19 and 29 °C, and two different gradients of free residual chlorine concentration were set as 0.33 mg/L and 6.66 mg/L. The results showed that: ① water temperature can significantly affect the ROS level. The higher the temperature, the higher the ROS level. ② the ROS level and DNA damage of *T. granosa* in 0.33 mg/L group were increased significantly on day 20, which were 2.2, 2.9 times and 1.8, 2.2 times higher than those in the control group at 19 and 29 °C, respectively; the cell activity, ATPase activity and SOD enzyme activity decreased significantly; the ROS level in the 6.66 mg/L group increased significantly on day 20, which was 6.2 and 3.6 times higher than that in the control group at 19 °C and 29 °C, respectively; the DNA damage increased; the cell activity, hemocyte phagocytosis rate and ATPase activity decreased; SOD enzyme activity decreased to the minimum value of (36.4±8.4) U/(mg prot) at 29 °C on day 20. ③ two-factor analysis of variance showed that water temperature and free residual chlorine had significant interaction on the parameters of ROS level, DNA damage, hemocyte phagocytosis rate and ATPase activity. The results indicate that free residual chlorine can significantly increase the ROS level and the DNA damage of *T. granosa*. The combined exposure of water temperature and residual chlorine, which caused greater stress pressure on *T. granosa*, affected the physiological processes related to oxidative stress. In the residual chlorine discharge area, greater oxidative stress would be faced by *T. granosa* in summer than in winter. This study can give a reference for studying oxidative stress toxicity of marine organisms exposed to warm water combined with residual chlorine, and provide scientific basis for ecological risk assessment.

**Key words:** *Tegillarca granosa*; warm drainage pollution of nuclear power plant; temperature rise; free residual chlorine; oxidative response; ROS; DNA damage

**Corresponding author:** HUANG Xiaolin. E-mail: [xiaolinnlh@hotmail.com](mailto:xiaolinnlh@hotmail.com)

**Funding projects:** Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2019C02045); Earmarked Fund for CARS (CARS-49); Taizhou Agriculture Major Science and Technology R & D Project (NYJBGS202203)