

# 高浓度三聚氰胺对萼花臂尾轮虫 生殖策略的影响

温新利<sup>①</sup> 席贻龙<sup>①\*</sup> 杨宇峰<sup>②</sup> 张根<sup>①</sup> 张勤<sup>①</sup> 胡玉海<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>安徽师范大学生命科学学院 安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室 芜湖 241000;

<sup>②</sup>暨南大学生命科学技术学院 广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室 广州 510632)

**摘要:**以萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)为受试动物,研究了不同浓度(400、800和1 200 mg/L)的三聚氰胺对萼花臂尾轮虫种群增长、有性生殖、个体大小和卵大小的影响。结果显示,三聚氰胺对萼花臂尾轮虫的24 h LC<sub>50</sub>值为2 627.00 mg/L。与空白对照组相比,800和1 200 mg/L的三聚氰胺显著降低了萼花臂尾轮虫种群增长率,提高了轮虫的休眠卵产量,增加了萼花臂尾轮虫的个体大小和卵大小。这表明在高浓度三聚氰胺作用下,萼花臂尾轮虫将更多的能量用于个体生长,并采取产出体积较大但数目较少的后代的生殖策略。当三聚氰胺浓度达到1 200 mg/L时,萼花臂尾轮虫种群的混交率和混交雌体数/非混交雌体数才显著上升。轮虫种群增长率随着三聚氰胺浓度的增大而减小,休眠卵产量却随之升高;混交雌体百分率、混交雌体数/非混交雌体数与三聚氰胺浓度间呈显著的曲线相关。

**关键词:**三聚氰胺;轮虫;种群增长率;有性生殖;个体大小;卵大小

**中图分类号:**Q494 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2011)01-62-06

## Effect of Melamine on the Reproductive Strategy of *Rotifer Brachionus calyciflorus*

WEN Xin-Li<sup>①</sup> XI Yi-Long<sup>①\*</sup> YANG Yu-Feng<sup>②</sup> ZHANG Gen<sup>①</sup>

ZHANG Qin<sup>①</sup> HU Yu-Hai<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>College of Life Sciences, Anhui Normal University, Provincial Key Laboratory of Biotic Environment & Ecological Safety in Anhui, Wuhu 241000;

<sup>②</sup>College of Life Sciences and Technology, Jinan University, Key Laboratory of Aquatic Eutrophication and Control of Harmful Algal Blooms of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** The effects of different concentrations (400, 800 and 1200 mg/L) of melamine on population growth, sexual reproduction, body size and egg size of rotifer *Brachionus calyciflorus* were investigated. The results showed that the 24 h LC<sub>50</sub> value of melamine to *B. calyciflorus* was 2 627.00 mg/L. Compared with the controls, melamine at 800 and 1 200 mg/L decreased significantly the population growth rate, but increased the resting egg production, body size and egg size, indicating that the rotifers allocate more energy for body growth, and produce bigger but less offspring at higher concentrations of melamine. Melamine at 1 200 mg/L increased

**基金项目** 国家自然科学基金项目(No. 30470323),安徽省高等学校省级优秀青年人才基金项目(No. 2009SQRZ029),动物学省级精品课程本科生创新基金项目,重要生物资源的保护和利用研究安徽省重点实验室专项基金项目,广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室开放基金项目;

\* 通讯作者, E-mail: ylx1965@yahoo.com.cn;

**第一作者简介** 温新利,男,博士研究生;研究方向:浮游动物生态学;E-mail: wwxinli1977@yahoo.com.cn。

**收稿日期:**2010-07-14, **修回日期:**2010-11-15

significantly the mictic rate and the ratio of mictic females/amictic females. With the increase of melamine concentration, the resting egg production increased, but the population growth rate decreased. The mictic rate and the ratio of mictic females/amictic females were curvilinear correlated with melamine concentration.

**Key words:** Melamine; Rotifer; Population growth rate; Sexual reproduction; Body size; Egg size

三聚氰胺(melamine)是三嗪类含氮的杂环有机化合物,又名蜜胺或氰尿三酰胺或三聚氰酰胺,主要作为化工原料被广泛应用于食品塑料容器、药物胶囊、木材装饰面板、涂料、纸张(如钞票和地图)、纺织、皮革、电气和一些化肥生产等行业,也是植物、畜禽杀虫剂环丙氨嗪的代谢物<sup>[1]</sup>。

鉴于对受试动物具有高的致死剂量、半致死浓度和  $EC_{50}$  值<sup>[2-4]</sup>,三聚氰胺被广泛认为属于低毒和实际无毒级物质<sup>[1-4]</sup>。2007 年 4 月美国发生的宠物“毒粮”事件引起食品界和饲料界的广泛关注,之后便出现了较多的有关三聚氰胺对动物影响的研究报道<sup>[5]</sup>;2008 年 9 月我国的“三鹿毒奶粉”事件再次为食品安全与饲料安全问题敲响警钟,使三聚氰胺成为饲料安全问题中备受关注的焦点。实际上,早有研究表明,在饲料中添加 10 g/d 三聚氰胺喂养绵羊(*Ovis aries*)39 d 的过程中,绵羊频繁地出现结石<sup>[6]</sup>;高剂量三聚氰胺(263 mg/kg)持续 2 年喂食雄性 B6C3F1 大鼠(*Rattus norvegicus*)会造成其膀胱结石,增加膀胱、尿道出现恶性肿瘤的风险<sup>[2]</sup>。这已说明了三聚氰胺对动物并非具有绝对安全性。目前,关于三聚氰胺对动物的影响研究主要集中在以哺乳类等脊椎动物为受试生物的急性毒性评价;但对其他动物,尤其是对动物的生殖和发育的影响报道非常少,因此很有必要进一步开展三聚氰胺对动物的慢性毒性和繁殖方面的影响研究<sup>[7]</sup>。

萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)具有分布广、繁殖快、世代时间短、对毒物的敏感性强等特点,是评价毒物对动物的生殖和发育影响的理想受试动物,目前已被广泛地应用于生态毒理学研究和水环境监测研究中。本文以其为受试生物,研究了三聚氰胺对其无性生殖、有性生殖、个体大小和卵大小的影响,为评估三

聚氰胺对动物的生殖和发育及对水生态系统的影响提供基础资料。

## 1 材料与方法

**1.1 轮虫的来源和预培养** 实验用萼花臂尾轮虫采集于芜湖市镜湖。在实验室内( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、自然光照条件下对轮虫进行“克隆”培养。每天投喂密度为  $2.0 \times 10^9$  cells/L 的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*),培养时间在 1 个月以上。所用的轮虫培养液采用曝气 72 h 的自来水,所用的饵料是由 HB-4 培养基培养的、处于指数增长期的斜生栅藻<sup>[8]</sup>,离心浓缩后使用。实验前,于( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内进行为期 1 周的预培养,所用容器为 10 ml 的玻璃刻度试管。预培养过程中,每天投喂密度为  $2.0 \times 10^9$  cells/L 的斜生栅藻并更换轮虫培养液一次,同时除去一部分个体使得轮虫种群始终处于指数增长期。

**1.2 急性毒性实验** 研究用三聚氰胺产自河南,白色粉末状物质,纯度为 99.8%,实验室内  $4^{\circ}\text{C}$  保存。三聚氰胺的水溶性很低, $23^{\circ}\text{C}$  时在水中的溶解度为  $3\ 240\ \text{mg/L}$ <sup>[9]</sup>, $26 \sim 27^{\circ}\text{C}$  时可达  $3\ 500\ \text{mg/L}$ <sup>[4]</sup>。本实验中,为保证三聚氰胺能够在  $25^{\circ}\text{C}$  下充分溶解,先用曝气自来水将三聚氰胺配制成  $3\ 000\ \text{mg/L}$  的母液,以尽量消除其在培养液中的悬浮颗粒。急性毒性实验共设置 6 个浓度梯度,分别为 500、1 000、1 500、2 000、2 500 和 3 000 mg/L,另设一个对照;每组 3 个重复。实验在容积为 5.0 ml 的特制玻璃杯中进行。实验时,在每个玻璃杯中放入龄长小于 2 h 的轮虫幼体 10 个,并向每个玻璃杯中加入 5.0 ml 特定浓度的三聚氰胺溶液;24 h 后,对每个玻璃杯里存活的轮虫进行计数,根据轮虫的死亡情况用 Probit 法计算半致死浓度(median lethal concentration, 24 h  $LC_{50}$ )<sup>[10]</sup>。

**1.3 3 d 种群增长和 4 d 休眠卵产量实验** 实验在容积为 15 ml 的玻璃试管中进行。在每个玻璃试管中放入龄长小于 2 h 的轮虫幼体 10 个,并添加配制好的各浓度三聚氰胺溶液至 10 ml,饵料为  $2.0 \times 10^9$  cells/L 的斜生栅藻。三聚氰胺浓度设置为 3 组,分别为 400、800 和 1 200 mg/L,并设 1 个对照组;每组均设 4 个重复。实验在温度为  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  的恒温培养箱中进行。实验过程中,每 12 h 悬浮沉积于试管底部的藻类食物,每 24 h 更换内含  $2.0 \times 10^9$  cells/L 斜生栅藻的测试液。72 h 后,对每个试管中轮虫的非混交雌体、混交雌体和不带卵雌体分别进行计数,然后全数返回原培养器皿继续培养 24 h,之后对混交雌体所携带的休眠卵及试管底部沉积的休眠卵进行计数。

**1.4 雌体类型的划分和鉴别** 与席貽龙等<sup>[11]</sup>的方法相同。

**1.5 虫体和卵的测量及有关参数的计算方法**

实验结束后,分别从对照组和 400 mg/L 处理组中随机挑取携带 1 个非混交卵的雌体 50 个,从 800 和 1 200 mg/L 处理组中挑取所有带 1 个非混交卵的雌体,5% 甲醛固定。在显微镜下分别测出每个个体的体长和卵的长轴与短轴的长度。

种群增长率:  $r = (\ln N_1 - \ln N_0) / t$ ,  $N_1$  和  $N_0$  分别为实验结束和实验开始时的种群密度,  $t = 3$  d。

混交雌体百分率:混交雌体数与总雌体数的比值;

混交雌体数/非混交雌体数:携卵雌体中混交雌体数与非混交雌体数的比值;

携卵雌体数/不携卵雌体数:携卵的雌体数与不携卵的雌体数的比值;

休眠卵产量:10 ml 培养液中的轮虫在 4 d 内所产的休眠卵数量;

轮虫个体体积:  $V_b = 0.15a^3$  ( $a$  为轮虫体长)<sup>[8]</sup>;

卵体积:  $V_e = [4/3 \times \pi \times (a^2b + ab^2)] / 16$  ( $a$  和  $b$  分别为轮虫椭圆形卵的长轴和短轴长度)<sup>[12]</sup>;

相对卵体积:轮虫所携带的卵体积与其个体体积的比值( $V_e/V_b$ )。

**1.6 数据的统计分析** 采用 SPSS 11.5 分析软件对数据进行分析,对所得数据作正态性检验后,对符合正态分布的各组数据通过单因素方差分析(one-way ANOVA)和多重比较(LSD 检验)分析各浓度组与空白对照组间以及各浓度组之间的差异显著性。

## 2 结果与分析

**2.1 急性毒性实验** 根据 24 h 后轮虫的致死情况,利用机率单位法得出三聚氰胺对萼花臂尾轮虫的 24 h  $LC_{50}$  值为  $2\ 627.00 \text{ mg/L}$  ( $Y = 3.865X + 3.379$ ,  $R^2 = 0.92$ ,  $P < 0.05$ )。

**2.2 三聚氰胺对萼花臂尾轮虫无性生殖和有性生殖的影响** 单因素方差分析结果表明,除携卵雌体数/不携卵雌体数外,三聚氰胺浓度对其他参数均有极显著的影响( $P < 0.01$ )。多重比较分析结果表明,与对照组相比,800 和 1 200 mg/L 的三聚氰胺极显著地降低了轮虫种群增长率,提高了种群的休眠卵产量;1 200 mg/L 的三聚氰胺极显著地增加了轮虫种群的混交雌体百分率和种群中混交雌体数/非混交雌体数(表 1)。

回归分析结果表明,轮虫种群增长率( $Y_1, /d$ )随着三聚氰胺浓度( $X, \text{mg/L}$ )的增大而减小,而轮虫休眠卵产量 [ $Y_4, \text{ind}/(4 \text{ d} \cdot 10 \text{ ml})$ ] 却随之升高;轮虫种群的混交雌体百分率( $Y_2, \%$ )、混交雌体数/非混交雌体数( $Y_3$ )与三聚氰胺浓度( $X, \text{mg/L}$ )间呈显著的曲线相关(表 2)。

**2.3 三聚氰胺对萼花臂尾轮虫个体大小、卵大小和相对卵大小的影响** 单因素方差分析结果表明,除相对卵大小外,三聚氰胺浓度对萼花臂尾轮虫的个体大小和卵大小均有极显著的影响( $P < 0.01$ )。多重比较分析(LSD)结果表明,与对照组相比,800 和 1 200 mg/L 的三聚氰胺极显著地增加了萼花臂尾轮虫的个体大小和卵大小( $P < 0.05$ )(表 3)。

表 1 不同浓度的三聚氰胺对萼花臂尾轮虫种群参数的影响 (Mean ± SE)

Table 1 Effects of different concentrations of melamine on the population parameters of *B. calyciflorus*

三聚氰胺浓度 Melamine concentration (mg/L)	种群增长率 Population growth rate (/d)	混交雌体 百分率 Mictic rate (%)	混交雌体数/ 非混交雌体数 Mictic females/ Amictic females	携卵雌体数/ 不携卵雌体数 Ovigerous females/ Non-ovigerous females	休眠卵产量 Resting egg production [ ind/(4 d·10 ml) ]
0	0.99 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.026 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.02	0.00 <sup>a</sup>
400	0.94 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.04	0.00 <sup>a</sup>
800	-0.26 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.60	8.25 ± 1.30 <sup>b</sup>
1 200	-0.17 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.16	12.75 ± 4.01 <sup>b</sup>

具有相同字母表示同一列数据的组间无显著差异。

The same letter indicates no significant differences among the groups in the column.

表 2 萼花臂尾轮虫种群参数与三聚氰胺浓度间的关系 (X, mg/L)

Table 2 Relationship between population parameter of *B. calyciflorus* and melamine concentration

参数 Parameters	回归方程 Regression equation	显著性检验 Significance test
种群增长率 Population growth rate	$Y_1 = -1.01X + 1.02$	$R^2 = 0.73, P < 0.001$
混交率 Mictic rate	$Y_2 = 0.54X^2 - 0.47X + 0.08$	$R^2 = 0.62, P < 0.01$
混交雌体数/非混交雌体数 Mictic females/amictic females	$Y_3 = 0.89X^2 - 0.74X + 0.10$	$R^2 = 0.53, P < 0.01$
休眠卵产量 Resting egg production	$Y_4 = 7.03X^2 + 3.19X - 0.60$	$R^2 = 0.62, P < 0.01$

表 3 不同浓度的三聚氰胺对轮虫的个体大小、卵大小及相对卵体积的影响 (Mean ± SE)

Table 3 Effects of melamine concentrations on body size, egg size and relative egg size of *B. calyciflorus*

三聚氰胺浓度 Melamine concentration (mg/L)	个体大小 (×10 <sup>6</sup> μm <sup>3</sup> ) Body size	卵大小 (×10 <sup>5</sup> μm <sup>3</sup> ) Egg size	相对卵体积 Relative egg size
0	1.66 ± 0.08 <sup>a</sup>	6.60 ± 0.78 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.008 <sup>a</sup>
400	1.71 ± 0.10 <sup>a</sup>	8.80 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.007 <sup>a</sup>
800	3.52 ± 0.25 <sup>b</sup>	10.29 ± 0.42 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.010 <sup>a</sup>
1 200	3.12 ± 0.23 <sup>b</sup>	10.57 ± 0.57 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.009 <sup>a</sup>

同表 1 注。The note same as table 1.

### 3 讨论

**3.1 三聚氰胺的毒性** 三聚氰胺对哺乳动物的急性毒性研究已有较多的报道,结果均显示三聚氰胺为无毒或弱毒物质<sup>[1]</sup>。以鱼类为受试动物评价三聚氰胺毒性的研究表明,三聚氰胺最大溶解度时的水溶液对花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 和吉富罗非鱼 (*GIFT Oreochromis niloticus*) 均未表现出急性毒性,96 h 的 LC<sub>50</sub> 值均大于 3 500 mg/L<sup>[4,13]</sup>。本研究

中,三聚氰胺对萼花臂尾轮虫的 24 h LC<sub>50</sub> 值 (2 627.00 mg/L) 已接近最大溶解度,表明三聚氰胺对萼花臂尾轮虫具有一定的毒性,但毒性较弱。总体上,与其他受试动物相比,萼花臂尾轮虫对三聚氰胺较敏感。

三聚氰胺通过在木材装饰面板、涂料、阻燃剂和化肥等工农业生产中的广泛应用而迁移进入自然环境,但目前尚无其在环境中残留的报道<sup>[14]</sup>;制造三聚氰胺的工业生产会导致低浓度的三聚氰胺进入水系,但其在日本河水中仅为

0.000 1 ~ 0.007 6 mg/L<sup>[14]</sup>。结合其他水生动物(如花鲈和吉富罗非鱼<sup>[4,13]</sup>)和本实验的结果看,自然水体中极低浓度的三聚氰胺几乎对水生动物不会产生毒性。

**3.2 三聚氰胺对轮虫无性生殖和有性生殖的影响** Janssen 等<sup>[15]</sup>指出,3 d 种群增长实验可作为生命表实验有效而可行的替代方法,用于监测毒物对轮虫生殖的影响。众多的研究均表明,种群增长率是用来监测水体污染物毒性的一个较敏感的指标。大多数水体污染物对轮虫种群增长的影响表现为抑制作用,少数污染物如除草剂草甘膦等则表现为促进作用<sup>[16-17]</sup>。本研究中,浓度较高(800 和 1 200 mg/L)的三聚氰胺显著降低了萼花臂尾轮虫的种群增长率,且种群增长率呈现负增长,显示出轮虫的种群增长率是监测三聚氰胺慢性毒性较为合适的指标。

由于包括萼花臂尾轮虫在内的单巢类轮虫的全部生命周期包括无性生殖(孤雌生殖)和有性生殖两个方面,而仅通过考察轮虫生命周期的一部分来评价污染物对轮虫生活史特征的影响通常会低估轮虫对污染物的敏感性<sup>[17]</sup>。为此,研究污染物对轮虫全部生命周期的影响越来越受到相关学者的关注。已有的研究发现,轮虫的有性生殖(以混交雌体百分率和休眠卵产量等为指标)通常比无性生殖(以种群增长率为指标)对污染物更敏感<sup>[18-24]</sup>;在与有性生殖相关的指标中,休眠卵产量比混交雌体百分率更敏感<sup>[17,19]</sup>。本研究结果发现,当三聚氰胺浓度超过 800 mg/L 时,轮虫的种群增长率显著下降,休眠卵产量显著增加,这与上述结果并不相符,其原因可能与本研究中设置的三聚氰胺浓度较低及污染物的种类等有关。但三聚氰胺浓度达到 1 200 mg/L 时,轮虫种群的混交率才显著上升,显示了轮虫休眠卵产量比混交雌体百分率更敏感。

Mast 等发现三聚氰胺进入 Fischer 344 大鼠体内后主要分布于血液、肝、肾和膀胱等器官,24 h 内几乎全部从尿液排出,组织内也无残留<sup>[25]</sup>;而余晓华等发现在饲喂较高浓度

(1 000 mg/kg) 时,鸡(*Gallus gallus domesticus*)体内三聚氰胺蓄积量逐渐增加,最高蓄积浓度为 16.465 mg/kg,但停药后代谢又非常快,呈现“富集快代谢快”的特点<sup>[26]</sup>。本研究中,高浓度的三聚氰胺(800 mg/L)显著降低了萼花臂尾轮虫的种群增长率,增加了休眠卵产量,这或许与高浓度的三聚氰胺在轮虫体内存在一定的蓄积量有关,但此推测有待进一步研究证实。

必须说明的是,本研究中,高浓度的三聚氰胺(800 和 1 200 mg/L)抑制了轮虫的无性生殖而促进了有性生殖,还可能与轮虫在渗透压调节过程中的能量消耗及调节能力有关。一般而言,淡水无脊椎动物可以通过调节使自身的体液渗透压保持相对稳定;当动物体自身处于低渗透压时,就需通过不断补充水分并把多余的盐分排出体外的调节方式保持渗透压相对稳定<sup>[27]</sup>。Lowe 等已证实与萼花臂尾轮虫同属的褶皱臂尾轮虫(*B. plicatilis*)是一种调渗动物<sup>[28]</sup>。随着培养环境中盐离子浓度在一定范围内的上升,与轮虫渗透压调节密切相关的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性随之线性上升;但轮虫种群增长率和繁殖力呈现先略微上升而后下降的趋势,这可能与轮虫在渗透压调节过程中消耗能量有关;当盐离子浓度很高时,轮虫的渗透压调节能力下降<sup>[28]</sup>。本研究中,高浓度的三聚氰胺会使萼花臂尾轮虫体内外产生很大的胶体渗透压差;轮虫的无性生殖及有性生殖受到影响一方面可能与萼花臂尾轮虫消耗很多能量来不断补水 and 排出毒物有关,另一方面也可能与在很高的三聚氰胺环境中轮虫渗透压调节能力下降相关。

**3.3 萼花臂尾轮虫的生殖策略** 一般认为,轮虫摄食所获得的能量主要用于个体体积的增长、繁殖后代以及呼吸等基本生理活动需要,而用于繁殖后代的能量可被轮虫用来产出体积较大但数目较少,或体积较小但数目较多的卵以最大限度地提高种群增长率<sup>[12]</sup>。本研究结果表明,高浓度(800 和 1 200 mg/L)的三聚氰胺使轮虫的个体体积和卵体积均显著增大,但使轮虫种群增长率显著降低,这说明在高浓度三

聚氰胺溶液中,蓼花臂尾轮虫用于个体生长的能量投入增加,且采取产生体积较大而数量较少的卵的生殖对策来减缓高浓度三聚氰胺对种群的毁灭性影响。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 高晓平. 三聚氰胺毒理学研究进展. 毒理学杂志, 2009, 23(4): 313-315.
- [ 2 ] Melnick R L, Boorman G A, Haseman J K, et al. Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1984, 72: 292-303.
- [ 3 ] IUCLID dataset substance ID: 108-78-1. Melamine. 18 Feb ed. European Commission; European Chemicals Bureau, 2000.
- [ 4 ] 刘海燕, 张伟, 薛敏, 等. 三聚氰胺对花鲈的急性毒性实验研究. *水生生物学报*, 2009, 33: 157-163.
- [ 5 ] US-FDA (US Food and Drug Administration) Interim melamine and analogues safety/risk assessment. [2007-10-26]. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/melamra.html>.
- [ 6 ] Clark R. Melamine crystalluria in sheep. *Journal South African Veterinary Medical Assoc*, 1966, 37: 349-351.
- [ 7 ] Skinner C G, Thomas J D, Osterloh J D. Melamine toxicity. *J Med Toxicol*, 2010, 6: 50-55.
- [ 8 ] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法. 北京: 科学出版社, 1991: 410-411.
- [ 9 ] 李晨. 三聚氰胺生产过程中固体废弃物的资源化基础研究. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2000.
- [ 10 ] Finley D J. Probit Analysis. 3rd ed. London: Cambridge Univ Press, 1971.
- [ 11 ] 席贻龙, 黄祥飞. 培养液更换对蓼花臂尾轮虫休眠卵形成的影响. *湖泊科学*, 2000, 12(1): 47-52.
- [ 12 ] Sarma S S S, Rao T R. Effect of food level on body size and egg size in a growing population of the rotifer *Brachionus patulus* Muller. *Arch Hydrobiol*, 1987, 111: 245-253.
- [ 13 ] 刘海燕, 张伟, 薛敏, 等. 三聚氰胺对吉富罗非鱼的急性毒性研究. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 33(5): 659-665.
- [ 14 ] WHO. Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid, Report of a WHO Expert Meeting in Collaboration with FAO and Supported by Health Canada, Ottawa, Canada, 1-4 December 2008. Geneva, 2009.
- [ 15 ] Janssen C R, Persoone G, Snell T W. Cyst-based toxicity test. VIII. Short-chronic toxicity test with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquat Toxicol*, 1994, 28: 243-258.
- [ 16 ] Janssen C R, Fernando M D, Persoone G. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. I. Conceptual framework and applications. *Hydrobiologia*, 1993, 255/256: 21-32.
- [ 17 ] Xi Y L, Feng L K. Effects of thiophanate-methyl and glyphosate on asexual and sexual reproduction in the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2004, 73: 644-651.
- [ 18 ] Preston B L, Snell T W. Full life cycle toxicity assessment using rotifer resting egg production: implications for ecological risk assessment. *Environ Pollut*, 2001, 114: 399-406.
- [ 19 ] Snell T W, Carmona M J. Comparative toxicity sensitivity of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environ Toxic Chem*, 1995, 14(3): 415-420.
- [ 20 ] Versteeg D J, Stanton D T, Pence M A, et al. Effects of surfactants on the rotifer *Brachionus calyciflorus* in a chronic toxicity test and in the development of QSARS. *Environ Toxic Chem*, 1997, 16(5): 1051-1058.
- [ 21 ] Preston B L, Snell T W, Roberston T L, et al. Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine disruptors. *Environ Toxic Chem*, 2000, 19: 2923-2928.
- [ 22 ] Preston B L, Snell T W. Full life cycle toxicity assessment using rotifer resting egg production: implications for ecological risk assessment. *Environ Pollut*, 2001, 114: 399-406.
- [ 23 ] Radix P, Severin G, Schramm K W, et al. Reproduction disturbances of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) for the screening of environmental endocrine disruptors. *Chemosphere*, 2002, 47: 1097-1101.
- [ 24 ] Marcial H S, Hagiwara A, Snell T W. Effect of some pesticides on reproduction of rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. *Hydrobiologia*, 2005, 546: 569-575.
- [ 25 ] Mast R W, Jeffcoat A R, Sadler B M, et al. Metabolism, disposition and excretion of [<sup>14</sup>C] melamine in male Fischer 344 rat. *Food Chem Toxicol*, 1983, 21(6): 807-810.
- [ 26 ] 余晓华, 孙泽祥, 吕燕, 等. GC/MS 法研究鸡体内三聚氰胺的残留及代谢规律. *浙江农业学报*, 2009, 21(4): 379-384.
- [ 27 ] 孙儒泳. 动物生态学原理. 3 版. 北京: 北京师范大学出版社, 2001: 81-84.
- [ 28 ] Lowe C D, Kemp S J, Bates A D, et al. Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Mar Biol*, 2005, 146: 923-929.