

试验研究

DOI:10.19965/j.cnki.iwt.2021-1280

开放科学(资源服务)
标识码(OSID):



典型工业园区废水处理过程的细胞毒性削减特征

程婉清,贾敏,陈玲,吴兵

(南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室,江苏南京210023)

[摘要] 工业废水组分复杂、污染严重,研究工业废水处理工艺的毒性削减能力对于水环境质量保障具有重要意义。融合污染物细胞毒性检测和分级分离方法,分析了2家典型工业园区污水处理厂沿程工艺段水样的毒性效应。结果表明,2座污水厂的进水都存在细胞增殖抑制、活性氧诱导、线粒体膜电位改变等毒性效应,出水中则不存在,且沿程部分处理工段水样毒性增强。但经高敏的转基因细胞株检测发现,2座污水厂出水都可诱导细胞内质网应激响应,具有潜在的生态污染风险。分级分离分析结果表明,臭氧与活性炭工艺显著降低了疏水性污染物的毒性;分馏样本的毒性检测结果与浓缩样本具有一定的差异性,表明污染物在不同混合比例下的联合毒性效应具有显著差异,相关致毒污染物类型及联合机理需深入分析。本研究可为工业园区废水的生物毒性效应及处理效率评估提供基础数据。

[关键词] 工业废水;细胞毒性;分级分离;HepG2细胞;Hela/CHOP细胞

[中图分类号] X832;X703.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-829X(2022)10-0065-06

Cytotoxicity reduction characteristics during wastewater treatment process in typical industrial park

CHENG Wanqing, JIA Min, CHEN Ling, WU Bing

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment,
Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Industrial wastewater has complex components and serious pollution, it is of great significance to study the toxicity reduction ability of industrial wastewater treatment process for water environment quality assurance. The cytotoxicity assays and fractionation analysis method were combined to analyze the toxic effects of water samples from two typical industrial park wastewater treatment plants. The results showed that the influent of both plants induced toxic effects on cell viability, induced intracellular reactive oxygen species and changed mitochondrial membrane potential, but the effluent did not have these above adverse effects. Meanwhile, the toxicity of wastewater in some treatment sections along the route was enhanced. However, the high-sensitivity transgenic cell line assay found that the effluent from both plants could lead to endoplasmic reticulum stress, which had potential ecological pollution risk. The result of fractionation analysis found that the ozone and activated carbon processes significantly reduced the toxicity of hydrophobic pollutants. Additionally, the results based on the fractionated samples were different from the original concentrated samples, indicating the combined toxic effects of pollutants were different under various mixing ratios. The types of toxic pollutants and the toxic mechanisms needed to be explored in depth. The results of this study provided basic data for the evaluation of biological toxicity and treatment efficiency of wastewater in industrial parks.

Key words: industrial wastewater; cytotoxicity; fractionation; HepG2 cell; Hela/CHOP cell

随着我国工业的快速发展和工业园区的集中建设, 中的污染物具有种类多样、难降解、毒性强等特点^[1-2], 园区水污染防治受到越来越多的关注。工业园区污水 且相当一部分污染物可通过食物链在生物体内富集,

[基金项目] 国家自然科学基金项目(22022604);江苏省自然科学基金项目(BK20200011);江苏省社会发展项目(BE2017709);南京大学卓越计划项目(ZYJH005)

对水生生态系统和人类健康构成重大威胁^[3]。目前,工业园区废水的污染水平主要通过理化参数评估,如COD、BOD、SS、电导率等^[4],但这些参数很难反映水中浓度低、毒性大的众多人工合成小分子污染物的浓度状况。近年来,基于色谱-质谱等的痕量化学分析技术在废水水质监测领域得到了快速发展,并在持久性有机污染物、内分泌干扰物、重金属等毒害污染物的定量检测中得到了广泛应用^[5-6]。但化学分析手段无法检测所有污染物,更无法确定污染物的联合毒性效应及其长期健康危害。因此,综合评价工业废水水质健康危害特征及变化规律成为净水技术革新及环境风险管控的关键。

生物毒性检测可确定污废水中污染物的综合毒性效应^[7-8],为有效评估水处理工艺技术的毒性削减能力和处理出水的安全性提供基础数据。急慢性毒性、遗传毒性检测方法等已被用于工业废水的生物毒性评估,具有快速、高通量、样品体积消耗少等优势,细胞毒性检测方法也受到越来越多的关注^[9-10]。但现有的生物毒性检测都基于浓缩水样的直接暴露,水体中不同物化特性污染物的生物毒性特征及贡献率仍不清楚。基于污染物亲疏水性特征对浓缩水样进行分级分离并分别确定其毒性效应,可能是解决这一科学问题的有效方法^[11-12],但相关研究在工业废水领域仍不多见。

本研究采用人源癌细胞及转基因细胞为受试生物,以细胞增殖抑制、活性氧诱导、线粒体膜电位变化及内质网应激等为细胞毒性靶点,选择典型工业园区污水处理厂为研究对象,研究了污水厂沿程的毒性效应变化,确定了不同极性馏分的毒性效应特征及其与工艺单元的相关性,为工业废水处理工艺的毒性削减能力评估提供基础数据。

1 实验部分

1.1 样品采集及前处理

选取江苏省2座工业园区污水处理厂(A厂和B厂)作为研究对象。2座污水处理厂的工艺流程简图及采样点见图1(黄色箭头表示采样点)。

废水采集后使用0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤去除大颗粒杂质;为实现高倍浓缩,采用固相萃取法浓缩水样^[13],使用OASIS HLB固相萃取柱对水样中有

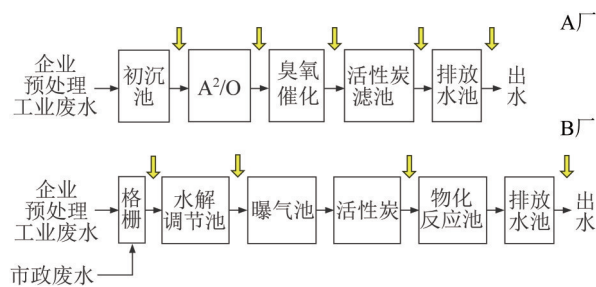


图1 污水处理厂工艺流程

Fig. 1 The processes of wastewater treatment plants

机污染物进行富集浓缩^[14];洗脱后氮吹洗脱液,使用二甲基亚砜(DMSO)水溶液将其复溶并转移至1 mL色谱小瓶中,浓缩液均在 -20°C 保存。

1.2 细胞毒性检测方法

1.2.1 细胞培养及传代

本研究采用人肝癌细胞HepG2细胞和团队自主构建的Hela/CHOP转基因细胞株为受试细胞。Hela/CHOP细胞株是稳定转染的CHOP启动子SEAP报告基因的Hela细胞体系,可检测细胞内质网早期应激响应。2种细胞都采用含有10%胎牛血清和双抗的DMEM培养基在 37°C 和5% CO_2 的细胞培养箱中培养,每2~3 d传代1次。

1.2.2 细胞增殖抑制毒性检测

细胞增殖抑制的测定采用CCK-8法^[15]。将HepG2细胞接种于96孔板中,接种密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$;培养24 h后,接种原水20倍浓缩样的受试水样;染毒24 h后弃去受试液,每孔加入100 μL 培养基和10 μL CCK-8储备液,在培养箱中孵育90 min。使用多功能酶标仪(Synergy H1, Bio-Tek)测定450 nm处的吸光度,用相对吸光度表示细胞存活率。实验设置对照组以去除实验本底值对实验造成的误差。

1.2.3 活性氧(ROS)诱导效应检测

采用DCFH-DA探针检测HepG2细胞内ROS水平^[16]。选取荧光探针Hoechst 33342对活细胞进行定量,将细胞种板培养24 h后,接种原水20倍浓缩样的受试水样,染毒24 h后弃去受试液,加入现配的DCFH-DA探针染液与Hoechst 33342探针染液。孵育20 min后弃去探针染液,用多功能酶标仪分别测定DCF(激发波长488 nm,发射波长346 nm)和Hoechst 33342(激发波长350 nm,发射波长460 nm)的荧光值,对每个孔细胞内活性氧水平通过Hoechst 33342进行标准化。

1.2.4 线粒体膜电位变化效应检测

采用JC-1试剂盒测定HepG2细胞线粒体膜电位的变化^[17],指示细胞早期凋亡效应。细胞接种原水20倍浓缩样的受试水样,染毒24 h后弃去受试液,加入100 μL JC-1工作液,孵育25 min。用多功能酶标仪测定红色(激发波长561 nm,发射波长590 nm)与绿色(激发波长488 nm,发射波长530 nm)荧光值,相对比值降低则指示膜电位下降。

1.3 细胞内质网应激效应检测

采用项目组自主构建的Hela/CHOP转基因细胞检测了内质网应激早期响应基因CHOP的表达变化。Hela/CHOP细胞使用原水样浓度进行染毒,染毒24 h后,一组取6孔、每孔吸取50 μL 暴露液混合于离心管中,10 000 r/min离心10 min,取上清液于65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min;孵育后加入到试剂盒配套的96孔板中,加入10 μL 待测上清液与50 μL SEAP反应底物,室温避光孵育30 min后,用多功能酶标仪检测。同时选取荧光探针Hoechst 33342对活细胞进行定量,每孔加入5 $\mu\text{g/mL}$ 的Hoechst 33342探针染液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育15 min,弃去探针染液,用Hanks缓冲液清洗多余的探针染液后,再加入50 μL Hanks缓冲液,使用多功能酶标仪检测Hoechst 33342的荧光值。SEAP活性=化学发光值/Hoechst 33342荧光值。

1.4 浓缩样分级分离及毒性检测

使用Waters e2695高效液相色谱仪进行有机污染物浓缩液的分馏,并用于后续的生物毒性测试^[18]。具体条件如下:Waters BEH C18色谱柱(D 4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.5 μm),流动相为水和甲醇。流动相梯度:初始,30%甲醇;5 min,30%甲醇;45 min,100%甲醇。每个馏分收集时间为5 min,每个样品分离到12个组分。收集的馏分氮吹至近干,用于生物毒性测定的组分,用水和DMSO复溶。复溶样品储存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 环境直至测试。

1.5 数据处理

毒理实验的数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,每个检测设定6个平行,毒理实验数据以相对空白对照的比值表示。使用Graphpad Prism 8.0作图,并对实验组与空白对照组进行单因素方差分析, $p<0.05$ 被认为存在统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 HepG2细胞毒性结果

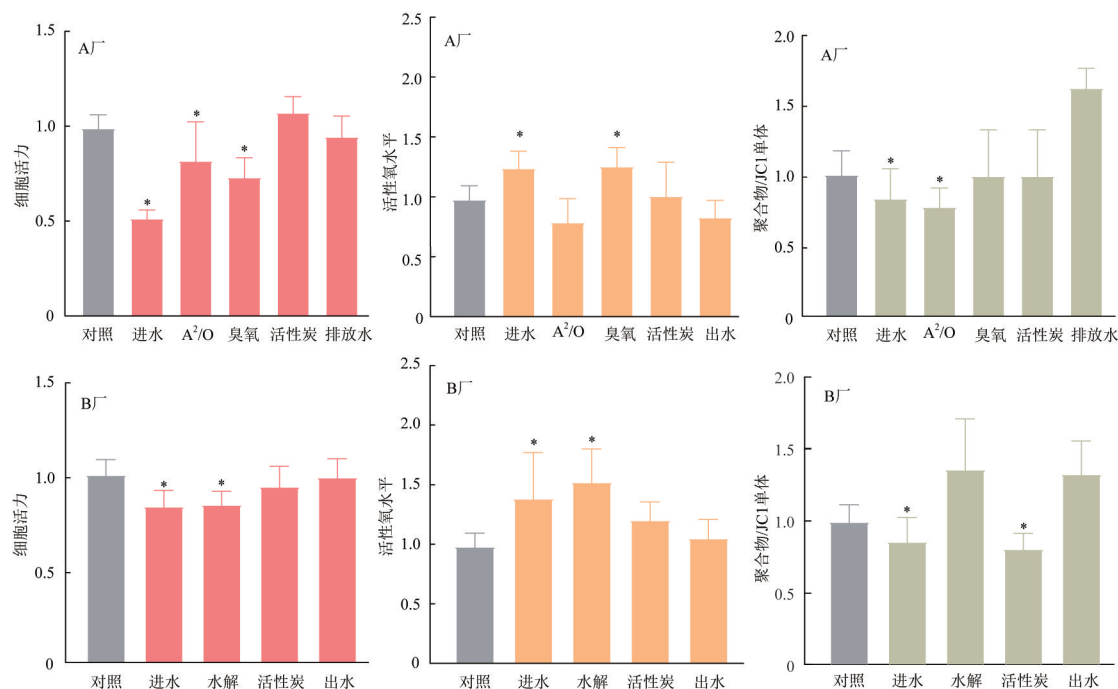
细胞毒性实验可以检测工业废水样本中多种已知和未知化合物的复合毒性,反映工业废水样本总体毒性效应^[19-20]。使用2座污水厂各工段出水浓缩液进行HepG2细胞染毒,暴露浓度为原水样的20倍。检测结果见图2。

由图2(a)可以看出,A厂进水暴露24 h后的细胞活力为57.48%,经臭氧处理后细胞活力上升至74.43%,活性炭工艺处理后细胞活力恢复至接近空白对照,说明臭氧+活性炭吸附工艺有效去除了污染物的细胞增殖毒性。B厂进水与水解段浓缩液对细胞增殖的抑制率分别为17.12%和16.4%,经活性炭处理后细胞活力明显上升。2座污水厂出水均未检测出细胞增殖毒性。

细胞内ROS水平与氧化应激状态密切相关。图2(b)中,在水样浓缩20倍情况下,A厂进水导致了HepG2细胞内ROS水平显著上升; A^2O 出水没有诱导细胞内ROS显著升高,但臭氧处理出水导致ROS水平明显升高。B厂进水与水解段出水也导致了HepG2细胞内ROS水平显著上升。A厂和B厂经活性炭处理后出水ROS水平降低,说明活性炭吸附工艺显著减弱了水样对HepG2细胞的氧化损伤效应。

细胞线粒体去极化是细胞凋亡的早期指示。图2(c)中,在水样浓缩20倍的情况下,A厂进水及生物处理出水显著降低了聚合物与JC1单体的比值水平,线粒体膜电位下降;臭氧氧化后此效应消失。B厂进水与活性炭段水样诱导了线粒体膜电位下降的现象。但2座污水厂的出水段都未出现显著性的线粒体膜电位变化。

基于HepG2的3种细胞毒性实验结果表明,污水处理沿程水质毒性总体呈下降趋势,其中A厂臭氧段水样暴露下细胞活力显著下降、ROS水平显著上升;B厂活性炭吸附段水样暴露下线粒体膜电位显著下降,这可能与高级氧化工艺段形成的有毒代谢产物有关。Qianyuan WU等^[21]使用HepG2细胞评估了废水臭氧氧化后的遗传毒性,同样发现臭氧氧化会使废水毒性增加。袁霞等^[22]使用发光细菌检测高级氧化工艺处理后水样毒性,发现处理后水样



*代表 $p < 0.05$,表示实验组与对照组间差异显著。

图2 目标水处理厂各工段出水的HepG2细胞毒性

Fig. 2 HepG2 cytotoxicity induced by the effluents of each section of target wastewater treatment plant

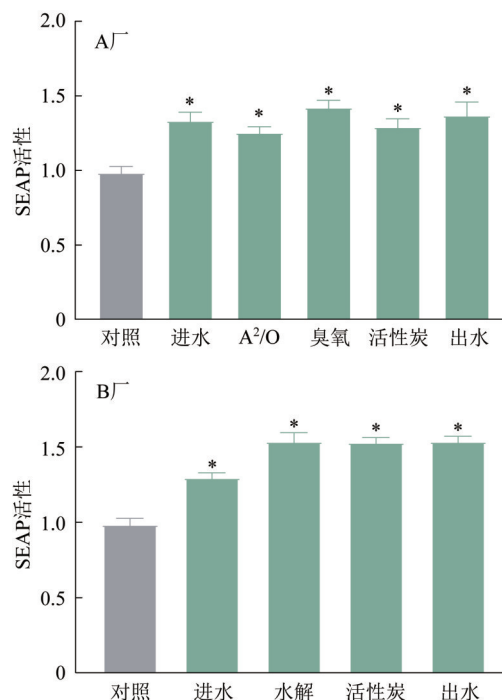
毒性高于处理前,具有潜在水质安全风险。以上研究结果与本研究均揭示应关注高级氧化工艺产生的副产物对水质安全性的影响。

2.2 HeLa/CHOP转基因细胞毒性结果

内质网应激是细胞机体受到刺激的先期反应之一。本研究采用项目组自主构建的HeLa/CHOP细胞,通过内质网应激早期响应基因CHOP的表达变化确定毒性效应,该方法具有灵敏度高特点。本研究中,在原水样浓度下,2座污水厂所有采样点水体的暴露均引起了SEAP活性的显著性提高(图3),表明细胞早期损伤的存在,最终出水仍存在一定的环境健康风险,且不同工段出水的毒性变化规律不明显。此外,与细胞增殖、细胞内ROS水平及线粒体膜电位等检测结果(浓缩20倍)相比,HeLa/CHOP转基因细胞的敏感性更高,且在不对水样进行浓缩的前提下即可进行毒性检测分析。

2.3 基于样品分级分离的细胞毒性结果

通过对原水样浓缩液的细胞毒性检测,初步评估了2座典型污水处理厂不同工段出水的毒性效应及变化规律,但仍无法获悉废水中引起毒性效应的物质特征。对浓缩样本按照亲疏水性将污染物进行分级分离,降低样品中物质的复杂程度。本研究通



*代表 $p < 0.05$,表示实验组与对照组间差异显著。

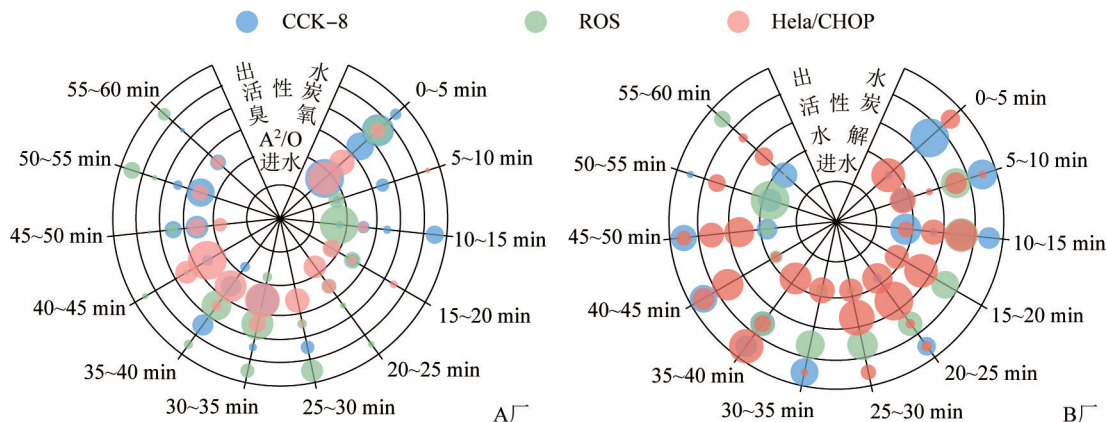
图3 基于HeLa/CHOP转基因细胞的内质网应激效应检测结果

Fig. 3 Detection results of endoplasmic reticulum stress in HeLa/CHOP transgenic cell lines

过液相色谱仪将原水样浓缩液按照亲疏水性分为12份(每5 min 1个馏分,先流出的馏分为高极性馏

分,再依次流出中极性与低极性馏分),并分别进行

了细胞毒性检测,结果见图4。



点的大小代表指标的效应强度,点越大,毒性效应越强。

图4 A厂和B厂水样分级分离馏分的细胞毒性结果

Fig. 4 Cytotoxicity results of water sample fractions from plant A and plant B

由图4可知,A厂进水0~5 min和10~15 min收集的馏分毒性效应较强;而A²/O及臭氧处理后高毒性馏分出现在30~45 min,经臭氧处理后,非极性高毒性馏分的毒性显著降低;活性炭吸附后,各馏分在各项检测结果中均表现出较小的毒性效应,代表A厂现有处理工艺能较好地去除废水中的致毒物质。基于以上结果可知,A厂进水致毒物质主要是高极性物质,且生化处理耦合深度处理能显著去除毒性组分,但在生化尾水中非极性馏分毒性开始增加,这一现象可能涉及到污染物在不同复合比例下的联合毒性变化,后续需要利用毒性效应介导的非靶向筛查技术对关键致毒物质进行深入解析,以便更有针对性地确定致毒组分。

与A厂相比,B厂的进水及沿程各工段的水质生物毒性变化更为复杂。进水的12个馏分的毒性均较大,表明其中的致毒物质成分种类多样。水解工段毒性效应显著的馏分集中在10~30 min馏出,非极性馏分段(30~60 min)的毒性不明显。经过活性炭吸附后,前30 min收集的馏分毒性效应有所减弱,后30 min收集的馏分毒性效应有所加强。出水前30 min收集的馏分毒性效应显著削减,但后30 min收集的馏分毒性效应仍没有得到完全削减。

结合A厂数据发现,臭氧氧化可能是生化尾水毒性削减的潜在有效技术。A厂与B厂污水处理沿程致毒组分有从高极性转向低极性的趋势,这一研究结果与陈玲等^[23]的类似,在常晋^[24]的研究中也发现了污水处理厂出水中极性有机物相较进水中有所减少的现象,揭示了污水厂沿程工艺对极性有机物

的去除。此外,分馏样本的毒性检测结果与原浓缩样本(图2)具有一定的差异性,可能是不同混合比例下联合毒性效应变化的原因,相关的致毒物质类型及机理仍需后续深入分析。

3 结论

本研究采用污染物分级分离与多维度细胞毒性检测相结合的方法评价了典型工业园区污水处理厂各工段的生物毒性削减规律。2家污水处理厂都显著降低了HepG2细胞毒性效应,但通过高敏的转基因细胞株仍能检出潜在的毒性危害。分级分离分析发现臭氧与活性炭工艺显著降低了疏水性污染物的毒性,分级分离过程可能还会改变污染物的联合作用模式,值得更深入的研究。本研究为工业园区废水生物毒性效应及处理效率的评估提供了基础数据,为净水技术创新及生态风险防控提供了科学依据。

参考文献

- [1] PRASSE C, STALTER D, SCHULTE-OEHLMANN U, et al. Spoil for choice: A critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies [J]. Water Research, 2015, 87: 237-270.
- [2] 王帅,王春艳,汪海鹏,等.工业废水的破坏性及污染治理对策研究[J]. 环境与发展, 2018, 30(12): 61-62.
WANG Shuai, WANG Chunyan, WANG Haipeng, et al. Study on the destruction of industrial waste water and countermeasures for pollution control [J]. Environment and Development, 2018, 30(12): 61-62.
- [3] WANG Wenjing, QING Xian, WANG Jun, et al. Bioaccumulation and potential risk of organophosphate flame retardants in coral reef fish from the Nansha Islands, South China Sea [J]. Chemosphere,

- 2022, 287: 132125.
- [4] TERNES T, JOSS A, OEHLMANN J. Occurrence, fate, removal and assessment of emerging contaminants in water in the water cycle (from wastewater to drinking water) [J]. *Water Research*, 2015, 72: 1-2.
- [5] FETTER E, KRAUSS M, BRION F, et al. Effect-directed analysis for estrogenic compounds in a fluvial sediment sample using transgenic cyp19a1b-GFP zebrafish embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 154: 221-229.
- [6] JAÉN-GIL A, FARRÉ M J, SÀNCHEZ-MELSIÓ A, et al. Effect-based identification of hazardous antibiotic transformation products after water chlorination [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(14): 9062-9073.
- [7] SOUSA J C G, RIBEIRO A R, BARBOSA M O, et al. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 344: 146-162.
- [8] MÜLLER M E, VIKSTROM S, KÖNIG M, et al. Mitochondrial toxicity of selected micropollutants, their mixtures, and surface water samples measured by the oxygen consumption rate in cells [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2019, 38(5): 1000-1011.
- [9] 朱冰清, 姜晟, 蔡琨, 等. 生物监测技术在工业废水监测领域的应用研究 [J]. *中国环境监测*, 2021, 37(1): 1-10.
- ZHU Bingqing, JIANG Sheng, CAI Kun, et al. Research and application of biological monitoring technology in the field of industrial wastewater monitoring [J]. *Environmental Monitoring in China*, 2021, 37(1): 1-10.
- [10] 张瑛, 王斯扬, 张锡龙, 等. 不同微藻对典型行业废水急性毒性响应的敏感性研究 [J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(3): 92-100.
- ZHANG Ying, WANG Siyang, ZHANG Xilong, et al. Comparative study on acute toxic effect response of four microalgae to typical industrial wastewaters [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(3): 92-100.
- [11] LIU Xiaokun, MA X Y, DONG Ke, et al. Investigating the origins of acute and long-term toxicity posed by municipal wastewater using fractionation [J]. *Environmental Technology*, 2020, 41(18): 2350-2359.
- [12] RAVNDAL K T, OPSAHL E, BAGI A, et al. Wastewater characterisation by combining size fractionation, chemical composition and biodegradability [J]. *Water Research*, 2018, 131: 151-160.
- [13] 周嘉伟, 何席伟, 张徐祥, 等. 水样生物毒性评估的样品前处理方法研究进展 [J]. *工业水处理*, 2021, 41(6): 25-34.
- ZHOU Jiawei, HE Xiwei, ZHANG Xuxiang, et al. Advance in sample extraction methods for biological toxicity assessment of water samples [J]. *Industrial Water Treatment*, 2021, 41(6): 25-34.
- [14] MONTES R, RODIL R, CELA R, et al. Determination of persistent and mobile organic contaminants (PMOCs) in water by mixed-mode liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(8): 5176-5183.
- [15] PENG Anping, GAO Juan, CHEN Zeyou, et al. Interactions of gaseous 2-chlorophenol with Fe³⁺-saturated montmorillonite and their toxicity to human lung cells [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(9): 5208-5217.
- [16] RAJNEESH, PATHAK J, CHATTERJEE A, et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) in cyanobacteria using the oxidant-sensing probe 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) [J]. *Bio-protocol*, 2017, 7(17): e2545.
- [17] SIVANDZADE F, BHALERAO A, CUCULLO L. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe [J]. *Bio-protocol*, 2019, 9(1): e3128.
- [18] MOSCHET C, PIAZZOLI A, SINGER H, et al. Alleviating the reference standard dilemma using a systematic exact mass suspect screening approach with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(21): 10312-10320.
- [19] ESCHER B I, ALLINSON M, ALTENBURGER R, et al. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(3): 1940-1956.
- [20] XIA Pu, ZHANG Xiaowei, ZHANG Hanxin, et al. Benchmarking water quality from wastewater to drinking waters using reduced transcriptome of human cells [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(16): 9318-9326.
- [21] WU Qianyan, YANG Lulin, DU Ye, et al. Toxicity of ozonated wastewater to HepG2 cells: Taking full account of nonvolatile, volatile, and inorganic byproducts [J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(15): 10597-10607.
- [22] 袁霞, 徐建业, 吕贞, 等. 卡马西平在UV/氯高级氧化工艺中的去除、转化与毒性评价 [J]. *环境化学*, 2021, 40(10): 3158-3170.
- YUAN Xia, XU Jianye, LÜ Zhen, et al. Removal, transformation and toxicity evaluation of carbamazepine by the UV/chlorine advanced oxidation process [J]. *Environmental Chemistry*, 2021, 40(10): 3158-3170.
- [23] 陈玲, 程婉清, 贾敏, 等. 毒性效应导向的集成电路废水关键致毒物质筛查 [J]. *工业水处理*, 2021, 41(6): 98-104.
- CHEN Ling, CHENG Wanqing, JIA Min, et al. Effect-directed analysis of key toxic substances in integrated circuit wastewater [J]. *Industrial Water Treatment*, 2021, 41(6): 98-104.
- [24] 常晋. 某A²/O工艺污水处理过程中有机污染物的转变特性 [D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2014.
- CHANG Jin. Study on the transformation characteristics of organic pollutants from an A²/O sewage treatment process [D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2014.
- [作者简介] 程婉清 (1998—), 硕士。电话: 18801588556, E-mail: MG1925006@smail.nju.edu.cn。通讯作者: 吴兵, 教授, 博士生导师。电话: 025-89680720, E-mail: bwu@nju.edu.cn。
- [收稿日期] 2022-08-14 (修改稿)