农业环境科学学报
JOURNAL OF AGRO-ENVIRONMENT SCIENCE
中文核心期刊/CSCD
请通过网上投稿系统投稿
网址：http://www.aes.org.cn

镉对土壤秀丽隐杆线虫的毒性效应

王鑫, 党秀丽, 赵龙, 侯红, 耿健, 敖翔

引用本文:
王鑫, 党秀丽, 赵龙, 侯红, 耿健, 敖翔. 镉对土壤秀丽隐杆线虫的毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(4): 778–786.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1033

王鑫, 党秀丽, 赵龙, 等. 镉对土壤秀丽隐杆线虫的毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(4): 778-786.
WANG X DANG X l, ZHAO L, et al. Toxic effects of cadmium on *Caenorhabditis elegans* in soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(4): 778-786.

镉对土壤秀丽隐杆线虫的毒性效应

王鑫[1,2], 党秀丽[1*], 赵龙[2], 侯红[2], 耿健[1], 敖翔[1]

(1.沈阳农业大学土地与环境学院, 农业农村部东北耕地保育重点实验室,土肥资源高效利用国家工程研究中心, 沈阳 110866; 2.中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012)

摘　要:为明确镉(Cd)对土壤无脊椎动物线虫的毒性效应及不同类型土壤中Cd的毒性差异,以生长量、生育率和繁殖量为评价终点,研究江西鹰潭红壤、江苏苏州水稻土、吉林长春黑土3种土壤中外源Cd对模式生物——秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的毒性效应。结果表明:以3种土壤总Cd含量推导出的Cd对秀丽隐杆线虫的生长毒性的EC_{50}(半数效应浓度)分别为54.37、197.54 $mg\cdot kg^{-1}$和287.02 $mg\cdot kg^{-1}$,对生育毒性的EC_{50}分别为7.07、77.41 $mg\cdot kg^{-1}$和103.09 $mg\cdot kg^{-1}$,对繁殖毒性的EC_{50}分别为5.75、13.84 $mg\cdot kg^{-1}$和85.94 $mg\cdot kg^{-1}$。通过毒性阈值可知,线虫的评价终点对Cd毒性的敏感性由高到低分别为繁殖、生育、生长。相关性分析表明,土壤pH、阳离子交换量、有机质、碳酸钙和锰氧化物含量是影响土壤中Cd毒性的主要因素。基于有效态Cd含量推导得出3种土壤中的Cd毒性阈值与基于总Cd含量的毒性阈值相比差异缩小,说明有效态Cd含量能够更好地解释不同土壤中Cd毒性的差异。

关键词:镉;有效态镉;毒性效应;秀丽隐杆线虫;土壤

中图分类号:X171.5　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1672-2043(2023)04-0778-09　　doi:10.11654/jaes.2022-1033

Toxic effects of cadmium on *Caenorhabditis elegans* in soils

WANG Xin[1,2], DANG Xiuli[1*], ZHAO Long[2], HOU Hong[2], GENG Jian[1], AO Xiang[1]

(1.College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, National Engineering Research for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, Key Laboratory of Arable Land Conservation in Northeast China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shenyang 110866, China; 2.State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: To determine the toxic effects of cadmium (Cd) on soil nematodes and the differences of Cd toxicity in different soils, the toxic effects of Cd on the model organism *Caenorhabditis elegans* were assessed in three soils (red soil in Yingtan, Jiangxi; paddy soil in Suzhou, Jiangsu; and black soil in Changchun, Jilin) using growth, fertility, and the number of offspring as evaluation endpoints. The median effect concentration (EC_{50}) values, expressed as the measured concentration of total Cd, for the growth of *C. elegans*, were 54.37, 197.54 $mg\cdot kg^{-1}$, and 287.02 $mg\cdot kg^{-1}$, respectively. The EC_{50} values for *C. elegans* fertility were 7.07, 77.41 $mg\cdot kg^{-1}$, and 103.09 $mg\cdot kg^{-1}$, respectively, and those for average number of offspring were 5.75, 13.84 $mg\cdot kg^{-1}$ and 85.94 $mg\cdot kg^{-1}$, respectively. The results showed that the number of offspring was a more sensitive evaluation endpoint than growth or fertility. Correlation analysis showed that soil pH, cation exchange capacity, organic matter, calcium carbonate content, and manganese oxide were the main factors affecting Cd toxicity in soil. Based on the $CaCl_2$-extracted Cd concentration, the differences in the Cd toxicity thresholds of the three soils were determined and indicated that the available Cd concentration may better explain the differences in Cd toxicity in different soils.

Keywords: cadmium; $CaCl_2$-extracted Cd; toxicity; *Caenorhabditis elegans*; soil

收稿日期:2022-10-16　　**录用日期:**2022-12-19

作者简介:王鑫(1997—),女,辽宁铁岭人,硕士研究生,主要从事生态毒理学研究。E-mail: wangxin1014@stu.syau.edu.cn
*__通信作者:__党秀丽　E-mail:dxl@syau.edu.cn

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFC1804603)
Project supported: The National Key Research and Development Program of China(2019YFC1804603)

随着我国经济的快速发展，工业化、城市化进程逐渐加快，土壤重金属污染日益严重。2014年环境保护部和国土资源部共同颁布的《全国土壤污染状况调查公报》显示全国土壤总超标率为16.1%，污染类型以无机型为主，Cd的点位超标率高达7.0%，位居所调查的污染物之首[1]。近30年来，我国土壤中的Cd含量急剧增加，年平均增加0.004 mg·kg^{-1}，远高于欧洲地区[2]。与其他重金属相比，Cd具有高生物毒性、强生物富集性、非生物降解性等特性，被认为是毒性最大的重金属之一[3]，其主要通过施肥、采矿和基础化工行业废物排放等途径进入土壤[4]。根据数年前的统计，株洲市正遭受严重Cd污染的农田土壤面积超过160 km^2，其中重度污染农田土壤面积达34.41 km^2，云南铅尾矿区周边土壤中Cd的含量最高，已经达到259.27 mg·kg^{-1}，严重超出了国家标准（GB 15618—2018），土壤Cd污染问题已不容忽视[5-6]。

近年来，国内外陆续开展了Cd对土壤环境中生态受体的毒性阈值研究，Cd对受试生物的剂量-效应关系可能随着土壤性质、测试终点的改变而发生变化。Zhang等[7]的研究表明赤子爱胜蚓（*Eisenia foetida*）在Cd污染土壤中暴露7 d的LC_{50}（半数致死浓度）为120.48 mg·kg^{-1}，但相关阈值研究依旧是基于有限的土壤环境生态受体。不同理化性质的土壤对Cd的吸附能力也不同，从而影响土壤中重金属的毒性，影响土壤吸附Cd的主要因素有土壤pH、阳离子交换量、黏粒含量、有机质含量等[8-9]。李彦祺[10]的研究表明不同土壤类型中Cd对秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）的毒性效应不同，在厦门水稻土中EC_{50}（半数效应浓度）为96.9 mg·kg^{-1}，而在泉州红壤中EC_{50}为28.7 mg·kg^{-1}，但两种土壤的理化性质差异不大。因此，开展基于不同土壤、不同测试终点的毒理学评价，对于Cd污染土壤的环境风险评价具有重要意义。

目前Cd对土壤无脊椎动物毒性的阈值研究主要集中在跳虫和蚯蚓，国外利用线虫开展生态毒理研究较早，但国内对线虫毒性的阈值研究较为不足[11]。秀丽隐杆线虫由于其生命周期短、易于大规模培养、成本低和对毒物敏感等特点[12-13]，被认为是评价污染物毒性的有力工具。秀丽隐杆线虫的发育、寿命、繁殖、应激反应和氧化损伤等一系列致死和亚致死终点已被开发，并用于毒性评估和体内毒理学研究[14]。有研究表明重金属Pb、Cd暴露可显著抑制矮小拟丽突线虫的繁殖、体长生长和产卵[15]。但相关研究多基于水体介质中重金属污染物对线虫的毒性，基于土壤介质中重金属污染物的线虫毒性试验相对缺乏[16]。因此，本研究以秀丽隐杆线虫为受试生物，选用3种理化性质各异的土壤（江西鹰潭红壤、江苏苏州水稻土和吉林长春黑土），研究外源Cd对线虫不同测试终点（生长、繁殖和发育）的毒性效应和阈值，并进一步探究影响Cd毒性的主要土壤理化性质，为土壤环境质量标准的修订提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤分别采集于中国江西省鹰潭市、江苏省苏州市和吉林省长春市的农田表层（0~20 cm）。土壤于自然条件下风干，剔除其中的石块和动植物残体后过2 mm筛备用。土壤pH采用酸度计（雷磁pHS-3C，上海精密科学仪器有限公司）测定，土水比为1∶2.5（m∶V），土壤中黏粒占比通过比重计法测定[17]；土壤中有机质含量采用重铬酸钾氧化法测定，田间持水量采用环刀法测定，碳酸钙含量采用中和滴定法测定[18]；土壤阳离子交换量采用氯化钡缓冲液法测定[19]；土壤非晶质锰氧化物、非晶质铁氧化物含量采用酸性草酸铵缓冲溶液浸提法测定[20]；晶质铁氧化物、晶质锰氧化物含量采用0.3 mol·L^{-1}$C_6H_5Na_3O_7$-1 mol·L^{-1}$NaHCO_3$-$Na_2S_2O_4$（V∶V∶m=40∶5∶1）浸提法测定[21]。土壤经过HCl-HNO_3-HF-$HClO_4$消解处理后，用电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）测定土壤中Cd的背景浓度[22]。供试土壤理化性质见表1。

表1 供试土壤理化性质

Table 1 Physicochemical properties of tested soils

项目 Item		鹰潭红壤 YT red soil	苏州水稻土 SZ paddy soil	长春黑土 CC black soil
pH		5.23±0.01	6.96±0.02	7.42±0.21
黏粒 Clay/%		38.56±0.12	21.76±0.21	36.18±0.36
有机质 Organic matter/(g·kg^{-1})		8.63±0.23	23.91±0.36	33.62±0.41
土壤颗粒组成/%	2~0.05 mm	19.73±0.02	9.08±0.15	13.84±0.26
	0.05~0.002 mm	41.72±0.21	69.16±0.54	49.99±0.36
	<0.002 mm	38.56±0.12	21.76±0.21	36.18±0.15
田间持水量 Water-holding capacity/%		22.15±0.47	25.14±0.58	24.27±0.36
碳酸钙 Calcium carbonate/(g·kg^{-1})		0.79±0.01	5.14±0.21	5.95±0.25
阳离子交换量 Cation exchange capacity/(cmol·kg^{-1})		3.98±0.11	15.60±0.45	20.20±0.36
非晶质锰氧化物 Amorphous manganese oxide/(g·kg^{-1})		0.15±0.40	0.22±0.06	0.66±0.54
非晶质铁氧化物 Amorphous iron oxide/(g·kg^{-1})		3.44±0.35	5.06±0.08	1.95±0.12

1.2 供试生物

大肠杆菌OP50株（尿嘧啶缺陷型-线虫食物来源）和野生型秀丽隐杆线虫N2株均由福建上源生物科技有限公司提供。将线虫投放在生长琼脂培养基（Nematode growth-medium，NGM）上，置于恒温气候箱中在(20±1) ℃条件下培养。

NGM制备方法为：称取0.25 g酪蛋白胨（BR生化试剂）、1.7 g琼脂粉（BR）和0.3 g NaCl（GR优级纯）于90 mL无菌水，121 ℃条件下高压灭菌，待冷却到55 ℃后加入无菌的0.1 mL 1 mol·L^{-1} $MgSO_4$、0.1 mL 1 mol·L^{-1} $CaCl_2$、0.25 mL 1 mol·L^{-1} KH_2PO_4[用KOH调整pH至(6.0±0.2)]和0.1 mL 5 g·L^{-1}胆固醇乙醇溶液，用无菌水定容至100 mL并充分混匀后，倒入培养皿冷却备用。

大肠杆菌菌液制备方法为：通过在Luria-Bertani（LB）琼脂培养板上划线培养大肠杆菌OP50后，挑取单克隆大肠杆菌菌落至含有100 mL LB液体培养基的锥形瓶中，于恒温振荡培养箱中37 ℃、160 r·min^{-1}条件下培养14 h，然后使用紫外分光光度计测定菌液光密度，至600 nm波长下吸光值（OD_{600}）为1.1~1.2，用于线虫的培养、NGM板的涂布和后续线虫毒性试验。

LB固体培养基：称取1.0 g胰蛋白胨（BR）、0.5 g酵母抽提物（BR）、1.5 g琼脂（BR）和1.0 g氯化钠（GR）放入锥形瓶中，加超纯水至100 mL，高压灭菌，然后将其倒入灭菌后的培养皿中自然冷却至室温，得到LB固体培养基。

LB液体培养基：称取0.5 g胰蛋白胨（BR）、0.5 g酵母抽提物（BR）和0.5 g氯化钠（GR）放入锥形瓶中，加超纯水至100 mL，高压灭菌后得到LB液体培养基。

Ludox悬浮液：50 mL Ludox TM-50悬浮液（购于上海宇灿生物科技有限公司）加超纯水至150 mL，配制成Ludox悬浮液，用于胶体悬浮法分离土壤中线虫。

K-medium缓冲液：称取3.1 g氯化钠（GR）、2.4 g氯化钾（GR）于锥形瓶中，加入1 000 mL去离子水，在121 ℃高压灭菌20 min，室温保存。

为减少线虫个体差异可能对试验的影响，试验前需要进行线虫的同步化培养。待NGM表面分布大量产卵的成虫时，将成虫以K-medium缓冲液冲洗至离心管并洗去其体表残余的大肠杆菌，向离心管内加入碱性裂解液（5% NaClO和2.5 mol·L^{-1}NaOH）以裂解线虫身体获得虫卵。用缓冲液多次冲洗虫卵表面多余的裂解液后，将虫卵置于含有3 mL缓冲液的培养皿中，培养16 h后即可获得年龄同步的第一阶段线虫幼虫。

1.3 土壤中Cd的添加

试验选用的试剂为氯化镉（$CdCl_2·2.5H_2O$，分析纯试剂）。在外源Cd添加前，对供试土壤进行紫外灭菌处理，消除土壤本身存在的线虫或虫卵。通过向土壤中喷施氯化镉母液向土壤中添加外源Cd，每个土壤设置6个Cd含量，分别为0（对照）、5、10、100、150、300 mg·kg^{-1}，每个浓度设置4个平行，对照组仅添加去离子水，将土壤充分搅拌至均匀。将制备完毕的Cd污染土壤置于烧杯中，期间通过称重法补充去离子水以维持土壤含水量为田间持水量的55%~60%。土壤样品老化7 d后进行线虫毒性试验和总Cd、有效态Cd浓度的测定。

1.4 土壤中线虫的毒性试验

毒性试验根据国际标准ISO10872指南[23]和Sácca等[24]的方法进行。称取0.5 g老化7 d的风干土壤至孔板中，加入100 μL重悬于K-medium缓冲液的大肠杆菌菌液作为线虫的食物来源，向土壤中补充K-medium缓冲液使土壤含水量保持在田间持水量的80%~90%，以保证试验期间土壤水分满足线虫生长发育需求。使用直径为0.1 mm的玻璃点样毛细管向12孔板内的土壤中添加10条线虫后用封口膜密封，将孔板置于恒温培养箱中，在(20±1)℃的黑暗条件下培养96 h。培养结束后，向每个孔板中加入0.5 mL孟加拉红染色剂，再将孔板放于70 ℃恒温干燥箱中加热10 min杀死全部线虫以终止试验，通过Ludox™离心悬浮法将孔板中的所有线虫回收于培养皿中，每个处理4次重复。

回收的线虫置于显微镜（100倍）下测量线虫的体长以计算线虫的生长量。生长量计算公式：

$$G=T_1-T_2 \tag{1}$$

式中：G为生长量，μm；T_1为试验结束时的线虫体长，μm；T_2为线虫初始体长，本研究取50条第一阶段线虫幼虫的平均体长作为线虫的初始体长，即(235.2±6.5)μm。

置于显微镜（40倍）下观察线虫的繁殖情况。繁殖量计算公式：

$$R=\frac{I_1}{I_2} \tag{2}$$

式中：R为繁殖量；I_1为线虫成虫繁殖的数量，条；I_2为试验投放的线虫个体数量，条。

置于显微镜（40倍）下观察具有生育能力的线虫个体数量（线虫体内虫卵个数≥1，则表示具有生育能力）以计算线虫的生育率。生育率计算公式：

$$F=\frac{F_1}{F_2}\times 100\% \tag{3}$$

式中：F为生育率，%；F_1为具有含卵线虫的线虫个体数量，条；F_2为引入试验的线虫个体数量，条。

1.5 土壤总Cd和有效态Cd的测定

土壤总Cd含量的测定方法：准确称取0.25 g土壤样品于微波消解罐中，加入3 mL硝酸、3 mL盐酸、2 mL氢氟酸及2 mL双氧水，将消解罐置于微波消解仪中进行消解。消解完毕后冷却至室温，加入1 mL高氯酸，置于电子控温加热器中，加热除酸至消解液剩余1 mL左右，将消解液转移至50 mL容量瓶中，用2%稀硝酸溶液定容至标线[25]。同时测定空白和土壤标样，通过电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）测定滤液中Cd的含量。

土壤中有效态Cd含量的测定方法[26]：称取5 g过2 mm尼龙筛网的风干土壤于离心管中，加入25 mL 0.1 mol·L^{-1}的$CaCl_2$溶液，于25 ℃恒温水浴振荡器中250 r·min^{-1}条件下振荡12 h，将离心管置于离心机中4 000 r·min^{-1}条件下离心8 min后过0.45 μm滤膜，通过电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）测定滤液中Cd的含量。

1.6 数据处理与分析

通过Logisitic方程拟合实测总Cd含量和有效态Cd含量与线虫各个毒性评价终点之间的剂量-效应关，并计算EC_{50}：

$$y=\frac{a}{1+\left(x/x_0\right)^b} \tag{4}$$

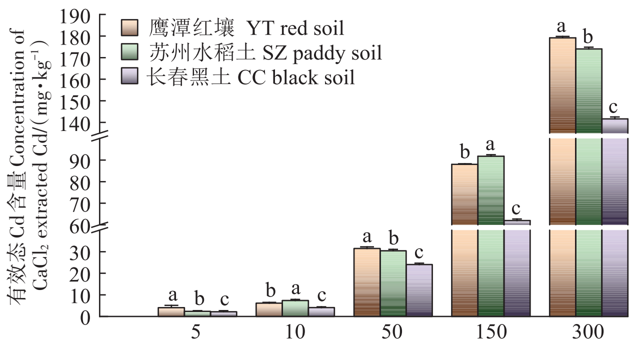
以计算Cd对线虫繁殖毒性的EC_{50}为例，式中：y为线虫的繁殖量；x为实测总Cd含量或有效态Cd含量，mg·kg^{-1}；a为对照组中线虫的繁殖量；x_0为EC_{50}值，mg·kg^{-1}；b为方程拟合过程中所产生的斜率参数。Cd对线虫生育毒性或生长毒性的EC_{50}计算方式同上，将y替换为生育率或生长量，a替换为对照组中线虫的生育率或生长量。

Logisitic方程的拟合通过Sigmaplot 14.0软件进行，利用OriginPro 2019和Excel 2020软件进行图和表的制作，相关性分析和单因素方差分析通过SPSS 22.0软件进行。

2 结果与分析

2.1 土壤中有效态Cd含量

土壤中Cd的毒性在很大程度上取决于其生物有效性，重金属的有效态含量能够较好地反映生物的可利用性和毒性。总体上看，3种土壤中的有效态Cd含量均随外源Cd含量的增加而增加，但相同外源Cd含量下，不同土壤中有效态Cd含量存在显著差异（图1）。理论总Cd含量为300 mg·kg^{-1}时，江西鹰潭红壤、江苏苏州水稻土和吉林长春黑土中有效态Cd含量最高，分别达到170.36、165.01 mg·kg^{-1}和132.64 mg·kg^{-1}，有效态Cd的提取比例由低到高分别为吉林长春黑土44%、江苏苏州水稻土55%、江西鹰潭红壤56%。



不同小写字母表示同一理论总Cd含量下不同土壤类型间差异显著（P<0.05）。

Different lowercase letters indicate significant differences among different soil treatments with the same theoretical concentration of total Cd（P<0.05）.

图1 土壤中有效态Cd含量

Figure 1 Concentration of $CaCl_2$ extracted Cd in soil

2.2 Cd对线虫毒性的效应及阈值

根据ISO 10872指南中有关线虫毒性试验的有效性标准，进行相应的毒性试验结果检验。由表2可见，本研究中线虫毒性测试结果符合有效性标准要求。

2.2.1 Cd对线虫生长的影响

选择Logistic方程分别拟合土壤中实际测得的总Cd含量、有效态Cd含量与秀丽隐杆线虫生长量间的剂量-效应关系，结果如图2所示。3种土壤中线虫的生长量均随着Cd含量的增加逐渐降低，但下降趋势

表2 毒性测试有效性

Table 2 Toxicity test validity

参数 Parameter	对照组试验有效标准 Valid criteria for control group test	毒性测试结果 Toxicity test result
回收率 Recovery rate/%	80~110	80~120
生长变异系数 Growth coefficient of variation/%	≤15	1~12
生育变异系数 Fertility coefficient of variation/%	≤15	3~5
繁殖变异系数 Reproduction coefficient of variation/%	≤30	8~20

存在差异。江西鹰潭红壤、吉林长春黑土、江苏苏州水稻土中理论总Cd含量分别达到10、50、150 mg·kg^{-1}时，线虫的生长量相较于对照组开始出现显著降低（P<0.05）；理论总Cd含量提高至300 mg·kg^{-1}时，吉林长春黑土中线虫的生长量达到503.06 μm，而江西鹰潭红壤和江苏苏州水稻土线虫的生长量分别仅为122.30、379.80 μm。基于实测总Cd含量计算得出，江西鹰潭红壤、江苏苏州水稻土和吉林长春黑土中Cd对线虫生长毒性的EC_{50}分别为54.37、197.54 mg·kg^{-1}和287.02 mg·kg^{-1}，最大值是最小值的5.28倍；基于有效态Cd含量计算得出，Cd对线虫生长毒性的EC_{50}分别为24.60、116.60 mg·kg^{-1}和145.15 mg·kg^{-1}，最大值是最小值的5.90倍。

2.2.2 Cd对线虫生育的影响

由图3线虫生育率与实测总Cd和有效态Cd含量的剂量-效应关系可知，理论总Cd含量于0~5 mg·kg^{-1}的范围内时，3种土壤中线虫的生育能力均未受到Cd毒性的影响（P>0.05）；理论总Cd含量达到10 mg·kg^{-1}时，江西鹰潭红壤中线虫的生育开始受到明显的抑制（P<0.05），生育率降为0，而吉林长春黑土中线虫的生育未受到显著的毒性影响（P>0.05）；理论总Cd含量达到50 mg·kg^{-1}时，江苏苏州水稻土和吉林长春黑土仍有60%和73%的线虫具有生育能力。基于实测总Cd含量计算得出，江西鹰潭红壤、江苏苏州水稻土和吉林长春黑土中Cd对线虫生育毒性的EC_{50}分别为7.07、77.41 mg·kg^{-1}和103.09 mg·kg^{-1}，最大值是最小值的14.58倍；基于有效态Cd含量计算得出，Cd对线虫生长毒性的EC_{50}分别为5.20、39.97 mg·kg^{-1}和47.80 mg·kg^{-1}，最大值是最小值的9.19倍，较基于总Cd含量得到的毒性阈值差异缩小。

2.2.3 Cd对线虫繁殖量的影响

由图4线虫繁殖量与实测总Cd和有效态Cd含量的剂量-效应关系可知，3种土壤中江西鹰潭红壤理论总Cd含量达到5 mg·kg^{-1}时线虫的繁殖受到显著的毒性抑制（P<0.05），而江苏苏州水稻土和吉林长春黑土理论总Cd含量均达到50 mg·kg^{-1}时线虫的繁殖才

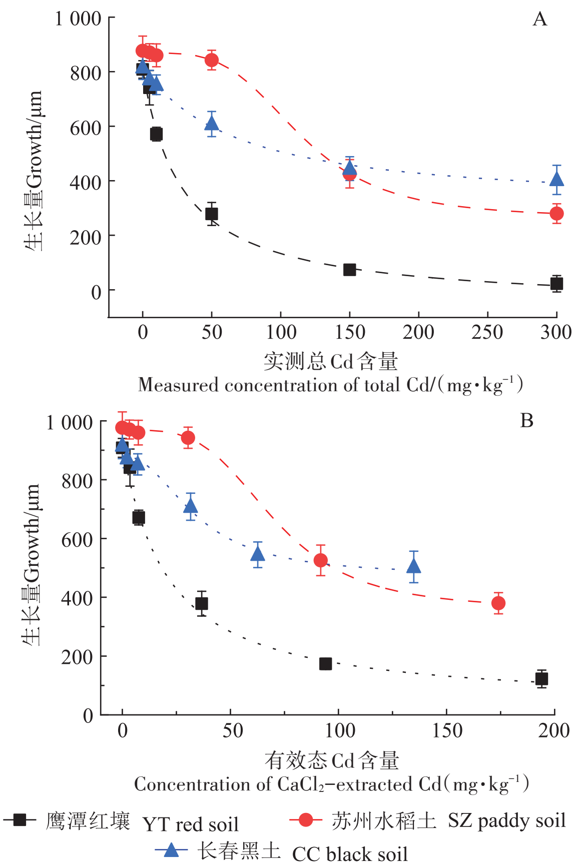


图2 线虫生长量与实测总Cd和有效态Cd含量的剂量-效应关系

Figure 2 Dose-response relationships of the growth of *C. elegans* with the measured concentrations of total Cd and $CaCl_2$-extracted Cd

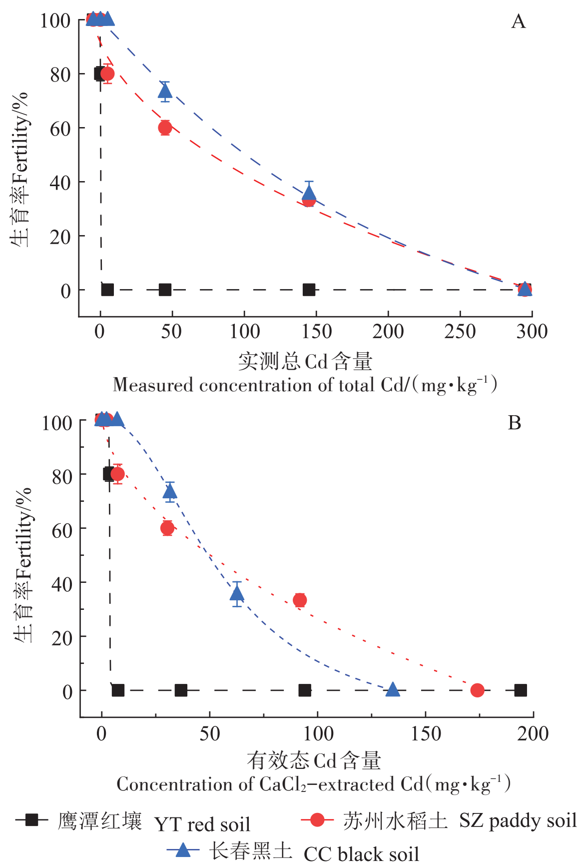


图3 线虫生育率与实测总Cd和有效态Cd含量的剂量-效应关系

Figure 3 Dose-response relationships of the fertility of *C. elegans* with the measured concentrations of total Cd and $CaCl_2$-extracted Cd

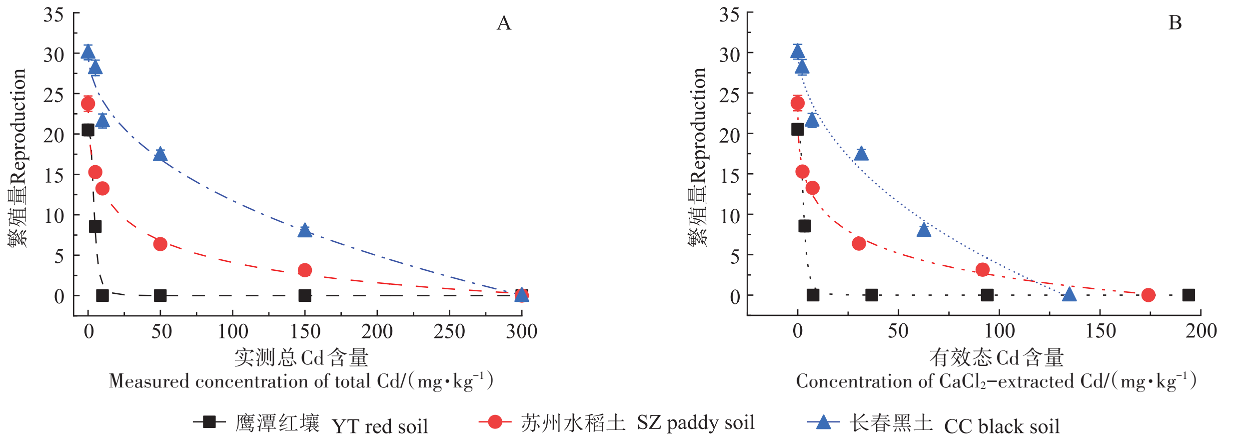


图4 线虫繁殖量与实测总Cd和有效态Cd含量的剂量-效应关系

Figure 4 Dose-response relationships of the reproductive number of *C. elegans* with the measured concentrations of total Cd and $CaCl_2$-extracted Cd

开始出现明显的降低(P<0.05);理论总Cd含量提高至150 mg·kg^{-1}时江西鹰潭红壤中几乎没有新的线虫后代个体产生,而吉林长春黑土中每条线虫仍然能产生10.2条后代个体。基于实测总Cd含量计算得出,江西鹰潭红壤、江苏苏州水稻土和吉林长春黑土中Cd对线虫繁殖毒性的EC_{50}分别为5.75、13.84 mg·kg^{-1}和85.94 mg·kg^{-1},最大值是最小值的14.94倍;基于有效态Cd含量计算得出,Cd对线虫繁殖毒性的EC_{50}分别为3.14、7.67 mg·kg^{-1}和37.25 mg·kg^{-1},最大值是最小值的11.86倍,较基于总Cd含量得到的毒性阈值差异缩小。

2.3 土壤理化性质与Cd毒性阈值间的相关性

基于Cd含量推导的线虫毒性的EC_{50}值如表3所示。通过相关性分析探究土壤理化性质中影响Cd毒性的主导因素,分析结果如表4所示,pH、土壤碳酸钙含量和阳离子交换量与线虫生长量和生育率的EC_{50}呈显著正相关关系,非晶质锰氧化物和晶质锰氧化物与基于繁殖的EC_{50}呈显著正相关关系,有机质含量和线虫的生长、发育和繁殖的EC_{50}均呈显著正相关关系。以上结果表明,土壤pH、有机质含量、碳酸钙含量、阳离子交换量及非晶质和晶质锰氧化物含量是影响土壤中Cd毒性的主要因素。pH主要通过影响Cd在土壤中形态的分布从而影响土壤Cd的生物有效性,碱性土壤的生物有效性通常较低,对生物产生的毒性效应较小[27]。阳离子交换量比较高的土壤中重金属离子的吸附量更高,会吸附土壤环境中更多的Cd,以降低土壤Cd的生物有效性。土壤有机质是组成土壤固相的重要成分,可以通过与土壤中的重金属

表3 基于实测总Cd和有效态Cd含量推导的Cd对线虫毒性的EC_{50}

Table 3 The EC_{50} values of Sb for the toxicity of *C. elegans* based on the concentration of measured total Cd and $CaCl_2$-extracted

评价终点 Evaluation endpoint		土壤类型 Soil type		
		鹰潭红壤 YD red soil	苏州水稻土 SZ rice soil	长春黑土 CC black soil
基于总Cd含量 Based on concentration of total Cd	生长量 Growth/μm	49.37 (35.11~73.62)	197.54 (24.60~268.56)	287.02 (208.0~366.95)
	繁殖量 The reproductive numberg	5.75 (0.64~29.15)	13.84 (1.81~25.86)	85.95 (21.79~150.12)
	生育率 Fertility/%	7.07 (4.93~36.21)	77.41 (4.93~149.89)	103.09 (80.50~125.69)
基于有效态Cd含量 Based on concentration of $CaCl_2$-extracted Cd	生长量 Growth/μm	24.60 (13.91~35.28)	116.60 (73.56~159.64)	145.15 (46.47~243.83)
	繁殖量 The reproductive numberg	3.14 (0.54~23.83)	7.67 (0.08~15.26)	37.25 (4.87~69.22)
	生育率 Fertility/%	5.20 (5.18~36.21)	39.97 (0.32~79.64)	47.80 (39.42~57.18)

注:括号内数值为EC_{50}值的95%置信区间。

Notes: The values in brackets are the 95% confidence interval of EC_{50} values.

表4 土壤理化性质与Cd毒性阈值间的相关性

Table 4 Correlation between threshold of Cd toxicity to *C. elegans* and soil physicochemical properties

项目 Item	生长 Growth	繁殖 The reproductive numberg	生育 Fertility
pH	0.999**	0.805	0.999**
黏粒 Clay/%	-0.413	0.266	-0.463
碳酸钙 Calcium carbonate/($g\cdot kg^{-1}$)	0.997*	0.712	0.999**
阳离子交换量 Cation exchange capacity/($cmol\cdot kg^{-1}$)	0.999*	0.793	0.995*
非晶质锰氧化物 Amorphous manganese oxide/($g\cdot kg^{-1}$)	0.782	0.999**	0.765
有机质 Organic matter/($g\cdot kg^{-1}$)	0.992**	0.888*	0.985**
非晶质铁氧化物 Amorphous iron oxide/($g\cdot kg^{-1}$)	-0.207	-0.786	-0.153
晶质铁氧化物 Free iron oxide/($g\cdot kg^{-1}$)	-0.758	-0.848	-0.789
晶质锰氧化物 Free manganese oxide/($g\cdot kg^{-1}$)	0.832	0.999**	0.808

注:*表示相关性显著(P<0.05),**表示相关性极显著(P<0.01)。

Note: * indicates significant correlation at P<0.05, ** indicates a highly significant correlation at P<0.01.

发生沉淀、吸附、螯合等作用,来降低土壤中重金属的有效性[28]。碳酸钙除本身具有一定的吸附作用外,还可能影响反应体系的平衡系数,降低土壤中有效态Cd的含量,从而影响Cd的生物毒性[29]。锰氧化物对土壤中Cd的吸附和净化能够降低Cd的毒性,其含有变价元素并带有表面电荷,具有良好的表面活性,对土壤中的重金属具有良好的吸附净化能力,从而可以降低土壤Cd的毒性[30]。

3 讨论

线虫的生长分为3个时期:胚胎期、幼虫期和成虫期,其中幼虫期要经过4次发育蜕皮(L_1~L_4)[31],国际标准ISO 10872中关于土壤秀丽隐杆线虫的毒性试验涉及其整个生命周期,因此可以通过此方法研究Cd对土壤线虫的毒性影响。本研究结果表明,线虫的毒性评价终点对Cd毒性的敏感性由低到高分别为生长量、发育率和繁殖量。Boyd等[32]的研究发现,于20 ℃的培养条件下线虫体长达到1 110~1 150 μm时开始产卵。如果线虫生长受到毒性的抑制而停留在L4(1 100~1 150 μm)期以前,则不能达到生育所需的阶段,就会影响线虫的发育能力,所以Cd对线虫生育的影响可能是线虫生长受到抑制的附加效应。正如本研究结果所示,在3种土壤中Cd对秀丽隐杆线虫生长毒性的EC_{50}远高于生育的EC_{50},因此线虫的生育能力对Cd毒性的敏感性高于生长量。Schertzinger等[33]的研究表明,当检测到重金属Pt对线虫繁殖产生抑制时,没有观察到其对生育能力的抑制。宋子杰等[34]的研究表明理论总Sb含量达到4 800 $mg\cdot kg^{-1}$时,鹰潭红壤中线虫的生育并没有受到完全的抑制,但是没有新的线虫后代产生。本研究中当吉林长春黑土理论Cd含量达到50 $mg\cdot kg^{-1}$时线虫繁殖受到明显抑制,而线虫的生育未受到显著的毒性影响,可能是Cd对线虫虫卵的损害以及生育毒性的附加效应共同造成的,从而导致线虫的繁殖对污染物毒性的敏感性高于生育和生长。

土壤理化性质可以通过影响土壤中重金属Cd的有效态含量,进而影响Cd的毒性和生物有效性,从而对Cd的毒性阈值产生影响[35]。在添加相同含量的外源Cd时,有效态Cd含量在不同土壤上存在明显的差异,以0.1 $mol\cdot L^{-1}$ $CaCl_2$为提取剂,外源添加含量相同时,两种土壤中有效态Cd含量相差近5.8倍,其中尤溪地区有效态Cd占比高达78%[28]。本研究结果表明土壤pH、阳离子交换量、有机质,碳酸钙和锰氧化物是影响土壤中Cd毒性的主要因素。刘海龙等[36]比较18种土壤中Cd对赤子爱胜蚓急性毒性阈值的EC_{50},发现不同土壤毒性差异显著,在鹰潭红壤和保定潮土中两者之间相差约200 $mg\cdot kg^{-1}$,其发现土壤pH和有机质含量与EC_{50}呈显著正相关关系。在碱性条件下,土壤表面带的负电荷较多,而Cd带有正电荷,故Cd^{2+}在碱性土壤上的吸附量比在酸性土壤上的吸附量大,所以Cd对动植物的毒性一般随pH的增大而降低[37]。本研究中江西鹰潭红壤pH最低,在添加相同含量外源Cd时,土壤中交换态、水溶态Cd的含量增加,即增加了土壤中有效态Cd的含量,从而导致江西红壤中Cd表现出对线虫最高的毒性。阳离子交换量和有机质含量对土壤中重金属离子的吸附和沉淀具有重要影响。其含量越高,负电荷量越高,通过静电吸引而吸附的金属离子也越多[38]。铁锰氧化矿物含有变价元素并带有表面电荷,具有良好的表面活性,对土壤中的重金属具有良好的吸附净化功能。本研究选取的吉林长春黑土锰氧化物含量较高,为外源添加的Cd提供了充足的吸附点位和净化功能,从而表现出较低毒性[39]。有研究结果表明碳酸钙的添加可以显著提高土壤pH,使土壤吸附Cd的能力增强,碳酸钙也可水解后生成重碳酸根离子,再进一步电离生成的碳酸根离子可与重金属离子相结合形成难溶的碳酸盐物质,从而减低了土壤中Cd的生物有效性[40]。该结果同样能够解释吉林长春黑土具有最低的有效态Cd含量。

从生态风险评价角度来看，金属总量与其对环境造成的生态风险并不一定成比例，而形态含量及其比例才是关键因素。有研究表明土壤有效态Cd与蚯蚓体内富集系数的相关性高于土壤中全量Cd的相关性[41]。宋子杰等[42]的研究表明提取态Sb含量同样能够较好地解释不同土壤中Sb对线虫繁殖毒性的显著差异，其研究结果显示基于不同土壤中总Sb含量计算的线虫繁殖毒性的EC_{50}差异高达2.6倍，而基于磷酸氢钠提取态Sb含量计算的EC_{50}差异降低至2.0倍。本研究结果中基于总Cd含量计算的繁殖毒性最大差异可达到14.94倍；基于有效态Cd含量计算线虫繁殖的最大毒性差异降至11.86倍。说明土壤中重金属的有效态含量可以较好地解释不同土壤中重金属的生物毒性的差异。随着外源Cd与土壤接触时间的延长，Cd的可浸提性、生物有效性和毒害作用逐渐降低，本研究只关注了3种土壤老化7 d后有效态Cd和毒性的变化，今后应研究土壤性质和更长老化时间对Cd毒性的影响。

4　结论

（1）由江西鹰潭红壤、江苏苏州水稻土和吉林长春黑土中Cd对线虫的EC_{50}差异可知，线虫的3个毒性评价终点对Cd毒性的敏感性由低到高分别为生长量、生育率、繁殖。

（2）pH、阳离子交换量、有机质、碳酸钙及非晶质锰和晶质锰氧化物含量的增加可以降低3种土壤中Cd对线虫生长、生育、繁殖的毒性，是影响土壤中Cd毒性的主要因素。

（3）有效态Cd含量能够更好地表达不同土壤类型中Cd的生物有效性，并解释江西鹰潭红壤、江苏苏州水稻土和吉林长春黑土中Cd对线虫毒性的差异，3种土壤中吉林长春黑土有效态Cd含量最低，对线虫产生的毒性效应也最小。

参考文献：

[1] 环境保护部，国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报[J]. 资源与人居环境，2014：26-27.　The Ministry of Environmental Protection, The Ministry of Land and Resources. Communiqué on the national soil pollution survey[J]. *Resources and Habitat*, 2014：26-27.

[2] SONG Y, LI W L, XUE Y T, et al. Impact of industrial pollution of cadmium on traditional crop planting areas and land management：a case study in northwest China[J]. *Land*, 2021, 10：1034.

[3] QI F, FU T, GAO H, et al. Review on cadmium pollution from sewage irrigation in farmland soil[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2022, 38：10-20.

[4] 孟龙，黄涂海，陈謇，等. 镉污染农田土壤安全利用策略及其思考[J]. 浙江大学学报（农业与生命科学版），2019, 45（3）：263-271. MENG L, HUANG T H, CHEN J, et al. Safe utilization of farmland soil with cadmium pollution：Strategiesand deliberations[J]. *Journal of Zhejiang University：Agriculture and Life Sciences*, 2019, 45（3）：263-271.

[5] 黄卫，庄荣浩，刘辉，等. 农田土壤镉污染现状与治理方法研究进展[J]. 湖南师范大学自然科学学报，2022, 45（1）：49-56.　HUANG W, ZHUANG R H, LIU H, et al. Recent advances of the current situation and remediation methods of cadmium contamination in paddy soil[J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2022, 45（1）：49-56.

[6] 刘义富，毛昆明. 云南部分矿区及尾矿土壤和植物Cd污染调查分析[J]. 土壤通报，2011, 42（6）：1486-1490.　LIU Y F, MAO K M. Investigation and analysis of Cd contamination in soil and plants of some mining areas and tailings in Yunnan[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2011, 42（6）：1486-1490.

[7] ZHANG L H, HE N, CHANG D, et al. Does ecotype matter? The influence of ecophysiology on benzo a pyrene and cadmium accumulation and distribution in earthworms[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2018, 121：24-34.

[8] 马喆，王美娥，霍彦慧，等. 场地土壤重金属镉和铅复合污染毒性阈值的推导及其应用[J]. 生态毒理学报，2021, 16（5）：259-270.　MA Z, WANG M E, HUO Y H, et al. Derivation of toxicity threshold for combined pollution of cadmium and lead in site soil and its application[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, 16（5）：259-270.

[9] JOHANSEN J L, DAVID M F, EKELUND F, et al. Wood ash decreases cadmium toxicity to the soil nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 172：290-295.

[10] 李彦祺. 闽南地区红壤与水稻土外源硫对土壤动物镉胁迫的影响[D]. 泉州：华侨大学，2020.　LI Y Q. Effects of exogenous sulfur on soil animal cadmium stress in red soil and rice soil in southern Fujian[D]. Quanzhou：Huaqiao University, 2020.

[11] LEE S, KIM Y, CHOI J. Corrigendum to "Effect of soil microbial feeding on gut microbiome and cadmium toxicity in *Caenorhabditis elegans*"[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 187：109777.

[12] QU M, HE C, LAI H, et al. Exposure to nanopolystyrene and its 4 chemically modified derivatives at predicted environmentalconcentrations causes differently regulatory mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chemosphere*, 2022, 305：135498.

[13] FOX B W, PONOMAROVA O, LEE Y-U, et al. *C. elegans* as a model for inter-individual variation in metabolism[J]. *Nature*, 2022, 607：571-577.

[14] HARRIST W, ARNABOLDI V, CAIN S, et al. Worm base：A modern model organism information resource[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48：762-767.

[15] 郝伟，姜勇，李琪，等. 重金属铅、镉对矮小拟丽突线虫（*Acrobeloides nanus*）的亚急性毒性作用[J]. 生态毒理学报，2008, 3（2）：139-143.　HAO W, JIANG Y, LI Q, et al. Subacute toxic effects of lead and cadmium on the Nematode *Acrobeloides nanus*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3（2）：139-143.

[16] 葛峰，徐坷坷，刘爱萍，等. 国外土壤环境基准研究进展及对中国的启示[J]. 土壤学报，2021, 58（2）：331-343.　GE F, XU K K, LIU A P, et al. Progress of the research on soil environmental criteria in other countries and its enlightenment to China[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58（2）：331-343.

[17] 杜森, 高祥照. 土壤分析技术规范[M]. 二版. 北京:中国农业出版社, 2006. DU S, GAO X Z. Technical specifications for soil analysis[M]. 2nd Edition. Beijing:China Agricultural Press, 2006.

[18] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社, 2008. BAO S D. Soil agrochemical analysis[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2008.

[19] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业科技出版社, 2000. LU R K. Methods of soil agrochemical analysis[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.

[20] DOHRMANN R, KOMADEL P, BUJDAK J, et al. Cation exchange capacity methodology Ⅱ:Amodified silver-thiourea method[J]. *Applied Clay Science*, 2006, 34(1/2/3/4):38-46.

[21] FAN J, WANG Y, CUI X, et al. Sorption isotherms and kinetics of Sb(Ⅴ) on several Chinese soils with different physicochemical properties[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2012, 13(2):344-353.

[22] 国家环境保护局. 土壤质量 铅、镉的测定石墨炉原子吸收分光光度法:GB/T 17141—1997[S]. 北京:中国标准出版社, 1998. National Environmental Protection Agency. Graphite furnace atomic absorption spectrophotometric method for the determination of lead and cadmium in soil quality:GB/T 17141—1997[S]. Beijing:China Standard Publishing House, 1998.

[23] International Organization for Standardization. ISO10872, Water and soil quality-Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda)[S]. Geneva, Switzerland, 2020.

[24] SÁCCA M L, FAJARDO C, COSTA G, et al. Integrating classical and molecular approaches to evaluate the impact of nanosized zero-valent iron(nZVI) on soil organisms[J]. *Chemosphere*, 2014, 104:184-189.

[25] 焦二虎. 石墨炉原子吸收法测定土壤中铅、镉、钴、锑、铍[J]. 化学分析计量, 2020, 29(2):95-97. JIAO E H. Determination of lead, cadmium, cobalt, antimony and beryllium in soil by graphite furnace atomic absorption spectrometry[J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2020, 29(2):95-97.

[26] 颜世红, 吴春发, 胡友彪, 等. 典型土壤中有效态镉$CaCl_2$提取条件优化研究[J]. 中国农学报, 2013, 29(9):99-104. YAN S H, WU C F, HU Y B, et al. Optimization of $CaCl_2$ extraction of available cadmium in typical soils[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(9):99-104.

[27] 黄爽, 张仁铎, 张家应, 等. 土壤理化性质对吸附重金属镉的影响[J]. 灌溉排水学报, 2012, 31(1):19-22. HUANG S, ZHANG R D, ZHANG J Y, et al. Effect of soil physicochemical properties on the adsorption of heavy metal cadmium[J]. *Journal of Irrigation and Drainage*, 2012, 31(1):19-22.

[28] 余淑娟, 高树芳, 屈应明, 等. 不同土壤条件下镉对番茄根系的毒害效应及其毒害临界值研究[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(4):640-646. YU S J, GAO S F, QU Y M, et al. Toxic effects of cadmium on tomato roots under different soil conditions and its toxic threshold value[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(4):640-646.

[29] 汪洪, 周卫, 林葆. 碳酸钙对土壤镉吸附及解吸的影响[J]. 生态学报, 2001, 21(6):932-937. WANG H, ZHOU W, LIN B. Effect of calcium carbonate on adsorption and desorption of cadmium in soils[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(6):932-937.

[30] 侯秀, 王祖伟. 铁锰氧化矿物添加对土壤镉有效态及生物效应的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(11):2313-2317. HOU X, WANG Z W. Influence of Fe-Mn oxides in contaminated soil on bioavailability and effective form of Cd[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(11):2313-2317.

[31] YARYCHKIVSKA O, SHAHAHM S. Development or disease: Caspases balance growth and immunity in *C. elegans*[J]. *Developmental Cell*, 2020, 53:259-260.

[32] BOYD W A, MCBRIDE S J, RICE J R, et al. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 245:153-159.

[33] SCHERTZINGER G, ZIMMERMANN S, GRABNER D, et al. Assessment of of sublethal endpoints afterchronic exposure of the nematode *Caenorhabditis elegans* to palladium, platinum and rhodium[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 230:31-39.

[34] 宋子杰, 党秀丽, 赵龙, 等. 锑对土壤中秀丽隐杆线虫的毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(9):1917-1925. SONG Z J, DANG X L, ZHAO L, et al. Toxic effects of antimony on *Caenorhabditis elegans* in soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(9):1917-1925.

[35] 董继鑫, 王晓燕, 郑袁明, 等. 不同土壤类型中外源汞对白符跳(Folsomia candida)的毒性[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(5):978-985. DONG J X, WANG X Y, ZHENG Y M. et al. Toxicity of mercury to springtail *Folsomia candida* in typical Chinese soils[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(5):978-985.

[36] 刘海龙, 王玉军, 宣亮, 等. 土壤基本理化性质对外源镉蚯蚓慢性毒性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(2):225-233. LIU H L, WANG Y J, XUAN L, et al. Effects of soil physico-chemical properties on chronic toxicity of cadmium to earthworm *Eisenia fetida*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(2):225-233.

[37] CHEY Y, HU C, DENR D, et al. Factors affecting sorption behaviors of tetracycline to soils: Importance of soil organic carbon, pH and Cd contamination[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 197:110572.

[38] 王巍然, 林祥龙, 侯红, 等. 我国20种典型土壤中锌对白符跳虫的毒性阈值及其预测模型[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(4):766-773. WANG W R, LIN X L, HOU H, et al. Toxicity threshold and prediction model for zinc in soil-dwelling springtails in Chinese soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(4):766-773.

[39] ADHIKAR T, SINGH M V. Sorption characteristics of lead and cadmium in some soils of India[J]. *Geoderma*, 2003, 114(1):757-762.

[40] 钟倩云, 曾敏, 廖柏寒, 等. 碳酸钙对水稻吸收重金属(Pb、Cd、Zn)和As的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(4):1242-1248. ZHONG Q Y, ZENG M, LIAO B H, et al. Effects of $CaCO_3$ addition on uptake of heavy metals and arsenic in paddy fields[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(4):1242-1248.

[41] 瑟竞. 赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)抗氧化系统对土壤有效态镉响应的研究[D]. 广州:华南农业大学, 2017:11. SE J. Study on the response of the antioxidant system of *Eisenia fetida* to soil active state cadmium[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017:11.

[42] 宋子杰. 锑对土壤秀丽隐杆线虫的毒性效应及阈值研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2022:36. SONG Z J. Toxicity effects and ecological thresholds of antimony to soil-dwelling Caenorhabditis elegans[D] Shenyan: Shenyang Agricultural University, 2022:36.