

化学提取法预测土壤中镉对蚯蚓的毒性效应

刘智敏, 顾雪元*, 王晓蓉, 汤佳昀, 罗 军

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

摘要:以赤子爱胜蚓为实验生物,通过慢性毒性实验研究了黑土中生物有效态镉(Cd)对蚯蚓的毒性效应。采用梯度扩散薄膜技术(DGT)、土壤溶液法、CaCl₂提取法和醋酸提取法分别测定土壤中的有效态Cd含量,研究蚯蚓体内活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、脂质过氧化物(MDA)和金属硫蛋白(MT)等生化指标在土壤Cd胁迫下的响应,进而探讨生物有效态Cd与蚯蚓毒性效应之间的相关性。结果表明,4种化学提取法获得的有效态Cd含量与蚯蚓体内Cd含量呈极显著相关($P < 0.01$)。通过综合比较毒性试验各种指标,获得黑土中4种化学提取法Cd对蚯蚓产生早期伤害的阈值范围:DGT-Cd 2.00~12.7 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、土壤溶液法Cd 0.388~2.04 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、HAc-Cd 0.813~2.90 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和CaCl₂-Cd 0.0292~0.0802 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,对应研究土壤中1.0~5.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的总Cd含量。利用指数吸收模型对4种有效态Cd含量和蚯蚓的生理生化指标进行拟合,具有良好的相关性,说明有效态Cd与蚯蚓的部分毒性效应之间存在剂量-效应关系。研究结果揭示了土壤有效态Cd-生物富集-毒性效应之间的关系,可为土壤污染的早期预警以及风险评价提供技术支撑。

关键词:土壤;化学提取法;有效态镉;蚯蚓;毒性效应

中图分类号:X503.223 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)10-1971-08 doi:10.11654/jaes.2013.10.010

The Relationship Between Chemical Extractable Cadmium Levels in Soils and Toxic Responses of Earthworms

LIU Zhi-min, GU Xue-yuan*, WANG Xiao-rong, TANG Jia-yun, LUO Jun

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

Abstract: The chronic toxic effect of cadmium (Cd) to earthworm (*Eisenia fetida*) was studied using pot experiments. The spiked Cd concentration ranged from 0.1 to 40 mg per kilogram soil and the bioavailability of Cd in soils was assessed by four chemical methods: extraction by water, 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂ solution, 0.11 mol·L⁻¹ HAc solution and Diffusive Gradient in Thin film (DGT) technique. The production of reactive oxygen species (ROS), activities of antioxidation enzymes, contents of lipid peroxidation product malonaldehyde (MDA) and metallothionein (MT) were monitored as biochemical responses of earthworms to Cd exposure. It was found that the bioavailable levels of Cd assessed by the four methods were all highly correlated with Cd accumulation in earthworms ($P < 0.01$). The addition of 1.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd could significantly induce the accumulation of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and the oxidative damage which was evidenced by the significant increase of MDA. In general, the toxicity threshold of Cd concentrations is found to be 1.0~5.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in the studied soil based on the biochemical responses of the earthworms to Cd exposure, corresponding to extractable Cd concentration in DGT-Cd 2.00~12.7 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, soil solution-Cd 3.88~20.4 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, HAc-Cd 0.813~2.90 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and CaCl₂-Cd 0.0292~0.0802 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Significant dose-effect relationships were found between the bioavailable Cd levels and the biochemical responses of earthworms. Our results suggested that the chemical extraction method may serve as a toxic diagnosis method for the risk assessment of heavy metals in soils.

Keywords: soil; chemical extraction; bioavailable Cd; earthworm; toxicity effect

收稿日期:2013-03-02

基金项目:欧盟科技合作专项(0911);国土资源公益性行业科研专项(201111021-03)

作者简介:刘智敏(1990—),女,硕士研究生,主要研究方向为土壤重金属污染和生态毒理学。E-mail:happytanf@hotmail.com

*通信作者:顾雪元 E-mail:xygu@nju.edu.cn

镉(Cd)是毒性极强的重金属元素之一,已被国际癌症研究署列为第一类致癌物质。Cd易吸附并积累在土壤表层,会对作物生长、发育产生不良影响,进而可通过食物链对人和动物的健康造成威胁。污染土壤中的Cd主要来自工业废水、污水灌溉、污泥农用以及磷肥施用等人为源^[1-2]。随着我国工农业经济的快速发展,土壤Cd污染形势不容乐观^[3],所以对于重金属Cd污染的土壤,建立早期诊断方法、判定污染状况、开展生态风险评价研究,都具有重要意义。

近年来研究发现,蚯蚓以摄食和皮肤接触的方式不断暴露于土壤污染物中,其生理代谢及生命活动在一定程度上反映了土壤的生态功能,以及污染物的综合毒性效应。因此,它们被优先推荐为监测和评价土壤污染的代表性指示生物^[4],研究重金属在蚯蚓体内的蓄积和毒性作用,可以为污染土壤的生态风险评估提供基础^[5-6]。已有研究表明,Cd暴露会对生物体产生毒性效应,诱导其体内产生活性氧自由基(ROS),包括 $O_2\cdot$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$,随后机体的防御系统将提供一系列保护措施来清除产生的活性氧,以达到解毒的目的。当超出机体抗氧化防御能力时,机体将处于氧化应激状态,进而造成不同程度(个体、细胞、分子水平)的氧化损伤^[2,7]。通过本实验室的前期研究发现,活性氧、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、脂质过氧化物(MDA)和金属硫蛋白(MT)等可以作为早期预警的敏感性指标^[8-12]。

在蚯蚓的生态毒理学试验中,通常采用土壤中重金属的总浓度作为暴露浓度,但已有研究表明毒性作用和生物有效态重金属关系更密切^[13-14]。如Belfroid等证实蚯蚓实际吸收的重金属来自土壤溶液和从土壤颗粒解吸到溶液的部分^[15]。重金属在土壤中的生物有效性和其化学形态及结合形式密切相关,受到土壤理化性质(如pH、有机质含量、黏度等)的影响^[16]。传统的对土壤中有效态金属的研究主要采用不同提取剂和提取条件的化学提取法,例如以 $CaCl_2$ 溶液作提取剂可以用 Ca^{2+} 交换以弱吸附力结合在土壤颗粒上的金属离子,并且 Ca^{2+} 在悬浮液中有较好的凝聚作用^[17];以EDTA作提取剂,络合能力强,可释放非硅酸盐结合态的金属,并与植物中的重金属含量有较好的相关性^[18];醋酸提取法是欧盟标准物质局制定的BCR连续提取法中的第一步,可以提取交换态和碳酸盐态的重金属^[19]。近年来出现的梯度扩散薄膜技术(DGT)是一种原位被动采样技术,它所提取的重金属浓度和土壤溶液中重金属浓度具有良好的相关性,同时还能反映

金属从土壤吸附相动态补充到溶液中的部分^[21],为测定土壤中的有效态重金属提供了新方法^[21-22]。

虽然化学提取法提取的有效态金属含量并非生物实际吸收的金属含量,但是它比土壤中金属总浓度更能反映与生物可利用态金属的关系,也与土壤中重金属的潜在生物毒性效应之间存在更密切的相关关系^[23]。R. Lanno等也提出用化学法提取的有效态重金属与蚯蚓蓄积或代谢活动之间可能具有相关性^[24]。然而目前有关重金属化学形态和生物毒性效应的研究还是彼此相对独立,鲜见相关的综合研究报道。鉴于此,本文基于Cd污染对赤子爱胜蚓的慢性毒性试验,同时采用土壤溶液、 $CaCl_2$ 提取法、醋酸提取法和DGT技术等方法,来提取土壤中的生物有效态Cd,研究生物有效态Cd-生物富集-毒性效应之间的关系,探讨通过化学提取法预测Cd暴露条件下蚯蚓的毒性效应,为土壤污染的早期预警以及评估判断提供基础。

1 材料与方法

1.1 土壤分析

1.1.1 供试土壤和Cd投加处理

供试土壤为典型农田黑土(0~20 cm)。土样风干后分别过2 mm筛和0.149 mm筛,备用。其基本理化性质为:pH 6.0(土:水=1:5),有机质含量 $28.6 g\cdot kg^{-1}$,CEC $42.2 cmol\cdot kg^{-1}$,粘粒19.4%($\leq 0.004 mm$)。

在土壤样品(过2 mm筛)中逐滴加入 $Cd(NO_3)_2$ 水溶液,用搅拌机搅拌均匀,使土壤中投加Cd浓度为0、0.1、0.5、1、5、10、40 $mg\cdot kg^{-1}$ 。供试药品 $Cd(NO_3)_2$ 为分析纯。老化期为6个月,使土壤中Cd的各形态分布均匀并达到平衡。

采用 $HNO_3-H_2O_2$ 消解法(USEPA 3050B)测定土壤总Cd含量^[25]:称取0.2 g在石英消解管中,加入10 mL 1:1的浓硝酸并置于石墨消解仪中,105 °C下加热2 h。待溶液体积减半后,将消解管移出冷却,缓慢加入1 mL 30% H_2O_2 ,再放回电热板加热15 min。待冷却后,用去离子水定容至50 mL,过0.45 μm 滤膜。用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)测定消解液中的Cd浓度。

1.1.2 DGT-Cd有效态含量的测定

实验所用DGT装置均按照DGT研究中心的指导准则制作,保存在4 °C的冰箱中,并通过抽样检验后用于试验。

称取80 g的土壤(过2 mm筛)放入塑料杯中,加入一定量超纯水使得含水量保持在田间最大持水量

的 60%,搅拌均匀后放置 2 d。之后继续加超纯水至田间最大持水量的 90%~100%,搅拌至细腻泥浆状,在恒定约 20 °C 的环境下放置 24 h。用塑料刮棒把每个土样分成均等的 3 份放在塑料培养皿中,并将表面抹平。实验开始前,取出制备好的 DGT 装置,在室温下放置过夜,使 DGT 装置的温度与实验环境温度一致,然后将其轻轻地旋转按进土壤表层。24 h 后取出 DGT,用去离子水冲洗表面,然后将装置拆卸,取出吸附膜,放入 1.5 mL 离心管中,用 1 mL 1 mol·L⁻¹ 的硝酸浸提 24 h。浸提液中的金属浓度经过适当稀释后,用 ICP-MS 法测定。

1.1.3 土壤溶液 Cd、CaCl₂-Cd 和 HAc-Cd 有效态含量的测定

待 DGT 装置移去后,将泥浆状土样转移到 50 mL 离心管内,离心以提取土壤溶液。

CaCl₂ 提取法:称取 2 g 土壤(过 2 mm 筛)于 50 mL 离心管内,加入 20 mL 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂ 溶液,在 20 °C 的环境下振荡 2 h。

HAc 提取法:称取 0.5 g 过 2 mm 筛的土样于 50 mL 离心管内,加入 20 mL 0.11 mol·L⁻¹ HAc 溶液,在 20 °C 的环境下振荡 16 h。

以上 3 种土壤溶液均在 3000 g 条件下离心 20 min 后提取上清液,过 0.45 μm 的滤膜,然后用 ICP-MS 法测定溶液中的 Cd 浓度。

1.2 毒性暴露试验

1.2.1 供试蚯蚓

赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*),国际试验标准蚓种,购自南京江浦蚯蚓养殖厂。暴露前于未添加 Cd 的黑土中预培养 14 d。然后选择体重 0.4~0.5 g、体态相似、具有明显环带的健康成蚓用于暴露实验。

1.2.2 毒性暴露试验设计

设置 7 个 Cd 浓度暴露组:0、0.1、0.5、1、5、10、40 mg·kg⁻¹(以投加浓度计),每个处理组设 3 个平行。在塑料花盆中装入 500 g 土壤,加入一定量的去离子水使得土壤湿度为田间最大持水量的 65%。待土壤平衡松弛 2 d 后在花盆中放入 10 条蚯蚓,并置于人工气候箱中培养 14 d。设置标准实验条件:温度为(20±1)°C,湿度为(75±1)%,光照为 1333 lx(间歇光照,即 12 h 光照,12 h 黑暗)。每隔 2 d 添加水以维持土壤湿度。暴露实验结束后,拣出所有蚯蚓,清洗干净后在培养皿中清肠 24 h。

1.2.3 蚯蚓体内自由基的测定

用预冷的生理盐水冲洗蚯蚓,并将其迅速剪成数

段。称取 0.1 g 置于塑料离心管内,加入 1 mL 现配的 50 mmol·L⁻¹ PBN 溶液,用手持式超微量匀浆机在冰浴条件下匀浆。静置 2~3 min,待匀浆液出现有机相与水相的分层后,取上层清液注入石英毛细管中,迅速放入液氮中保存(整个过程在氮气环境下进行,并避免氧气进入),使用电子顺磁共振仪测定(EPR, Bruker 公司, EMX 10/12)蚯蚓体内自由基水平。

1.2.4 蚯蚓粗酶液的提取

迅速称取已剪碎的蚯蚓,按照 1:4(m/V)的比例加入 50 mmol·L⁻¹ pH 7.6 的 Tris-HCl 缓冲液(1 mmol·L⁻¹ EDTA、1 mmol·L⁻¹ DTT、250 mmol·L⁻¹ 蔗糖),迅速匀浆。于 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 下离心 20 min,取上清液。蚯蚓粗酶液于-40 °C 冰箱中冻存。

1.2.5 抗氧化防御系统酶 GST 和 SOD 的测定

GST 活性测定:采用 Habig 法^[26]。活力单位定义为每毫克蛋白中,扣除非酶反应,每分钟催化 1 μmol GSH 氧化的酶量。

SOD 活性测定:采用邻苯三酚自氧化法^[27]。活力单位定义为每毫升反应液中,每分钟抑制反应液自氧化速率达 50% 的酶量。

1.2.6 脂质过氧化产物和蛋白氧化损伤的测定

脂质过氧化物(MDA)测定:采用 TBA 比色法^[28]。以每毫克蛋白中含 TBARS 的量即 TBARS nmol·mg⁻¹ 表示。

蛋白氧化损伤的测定参照 Levine RL 等和 Nemat Alla MM 等的方法^[29-30],计算羰基基团(PCO)的含量。

1.2.7 总蛋白测定

蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法^[31],以小牛血清白蛋白(BSA)作标准。

1.2.8 金属硫蛋白(MT)含量测定

金属硫蛋白(MT)的测定采用 Cd/血红蛋白饱和法^[32],并加以修改。取 200 μL 匀浆上清液,加入 20 μL 0.25 mg·mL⁻¹ 的 Cd 溶液,混匀后室温下放置 10 min,加入 200 μL 新配制的 2%(质量分数)牛血红蛋白,混匀,沸水浴反应 2 min,冰浴放置 5 min;然后在 4 °C、1000 r·min⁻¹ 下离心 5 min。将加入牛血红蛋白、加热、离心的步骤再重复两次,取上清液 100 μL,稀释一定倍数后,用石墨炉原子吸收法测定 Cd 浓度,计算结果用测定的 Cd 含量(μg Cd·g⁻¹)表示。

1.2.9 蚯蚓体内总 Cd 的测定

将清肠后的蚯蚓冰冻致死,于鼓风干燥箱中 105 °C 干燥 48 h 至恒重,在玛瑙研钵中研磨,并过 80 目筛。采用 HNO₃-H₂O₂ 消解法^[25]后用 ICP-MS 法测定蚯

蚓体内蓄积 Cd 含量。

1.3 数据处理

实验结果表示为平均数 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ SD) ($n=3$)。使用 SPSS 统计软件,用单因素方差分析法 (one-way ANOVA) 和多重比较检验法 (LSD) 进行组间显著性差异分析, $P<0.05$ 表明差异显著, $P<0.01$ 表明差异极显著。运用 Origin 8.0 作图。

2 结果与讨论

2.1 土壤中有效态 Cd 对蚯蚓体内 Cd 富集量的影响

表 1 列出 4 种方法获得的土壤有效态 Cd 和相应蚯蚓体内 Cd 富集量。由表 1 可知,有效态 Cd 含量随着外添加 Cd 浓度的增加而升高。DGT 技术提取的有效态 Cd 含量为 $0.149\sim 260\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 3 种传统化学提取法得到的有效态 Cd 含量为 $0.045\ 1\sim 26.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (土壤溶液)、 $0.024\ 4\sim 28.5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($0.11\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HAc 溶液) 和 $0.001\ 99\sim 0.658\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液)。

图 1 显示了蚯蚓体内 Cd 含量和 DGT-Cd、土壤溶液 Cd、HAc-Cd、 CaCl_2 -Cd 和总 Cd 之间的相关关系。由图 1 可以看出,4 种化学方法提取的有效态 Cd 含量与蚯蚓体内富集的 Cd 含量都具有极显著相关性 ($P<0.01$),总 Cd 含量与蚯蚓体内富集的 Cd 含量具有显著相关性 ($P<0.05$)。相关系数由大到小的顺序为 DGT (1.00) $>$ 土壤溶液 (0.999) $>$ CaCl_2 (0.996) $>$ HAc (0.993) $>$ 总浓度 (0.988),表明生物有效态 Cd 可以有效预测蚯蚓对 Cd 的富集能力,且效果优于总量法。由于实验设计浓度梯度跨度较大,有效态方法的优势不是很突出,但若在更多数据支撑的情况下,差异应该是较明显的。Vangestel、Belfroid 等的研究结果已表明土壤溶液的金属浓度与蚯蚓体内的蓄积浓度具有更好的相关性,明显优于总量法^[15,33-34]。Bade 等也

通过动力学试验证明 DGT 技术可以更有效地模拟赤子爱胜蚓对土壤中重金属 Pb、Zn、Cu 的吸收^[22]。对照组的蚯蚓体内蓄积 Cd 浓度为 $0.639\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,可能是在实验室驯养前其体内已蓄积了一定低浓度的 Cd。

2.2 Cd 对赤子爱胜蚓的生态毒性效应

图 2 显示蚯蚓体内活性氧 (ROS)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽硫转移酶 (GST)、脂质过氧化物 (MDA)、蛋白过氧化 (PCO) 和金属硫蛋白 (MT) 等指标在 Cd 胁迫下的响应。由图 2 可以看出,与对照组相比,活性氧自由基的信号强度随 Cd 暴露浓度升高而显著增加,在投加浓度 $1\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 即出现极显著性差异 ($P<0.01$),在投加浓度 $10\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组活性氧自由基的信号强度达到最高,是空白对照组的 2.44 倍,呈现极显著性差异 ($P<0.01$)。但在最高浓度 $40\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,信号强度开始降低,可能是过高浓度的 Cd 使蚯蚓体内合成自由基的细胞器受到了损伤,但和对照组相比仍具有显著性差异 ($P<0.05$)。Cd 暴露也能引起蚯蚓体内 MDA 和 PCO 含量的升高。与空白对照相比,MDA 含量在 $1\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组时就出现显著差异 ($P<0.05$),PCO 在投加浓度 $5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组出现显著差异 ($P<0.05$),表明在 Cd 的胁迫下引起了蚯蚓脂质过氧化并产生了蛋白损伤,使机体处于氧化应激状态。SOD 和 GST 作为抗氧化防御系统酶,随着暴露浓度的增加呈现升高趋势。其中 SOD 在外添加浓度 $0.1\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组即出现响应,这是因为 $\cdot\text{OH}$ 诱导了 SOD 含量的增加,但此时机体可能还未出现损伤。此外,Cd 暴露也诱导了蚯蚓体内 MT 的合成,随着 Cd 浓度增加,蚯蚓体内的 MT 含量显著上升,在投加浓度 $5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组开始出现显著性差异 ($P<0.05$),在最高浓度组达到空白对照组的 2.27 倍,说明金属硫蛋白对缓解 Cd 毒害具有重要作用。

表 1 土壤中的有效态 Cd、总 Cd 以及蚯蚓体内富集的 Cd 含量

Table 1 The concentrations of the four Cd extracting methods and total Cd in soils and Cd accumulated in earthworms

投加 Cd 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	总 Cd 含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	DGT-Cd 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	土壤溶液 Cd 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	HAc-Cd 含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	CaCl_2 -Cd 含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	蚯蚓体内 Cd 含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
0	0.100	0.149	0.451	2.44×10^{-2}	1.99×10^{-3}	0.639
0.1	0.209	0.209	0.515	3.64×10^{-2}	2.11×10^{-3}	0.680
0.5	0.586	0.736	1.71	0.175	5.78×10^{-3}	0.813
1	0.989	2.00	3.88	0.813	2.92×10^{-2}	1.02
5	5.00	12.7	20.4	2.90	8.02×10^{-2}	1.62
10	10.4	46.8	46.1	6.10	0.154	3.56
40	39.3	260	261	28.5	0.658	17.9

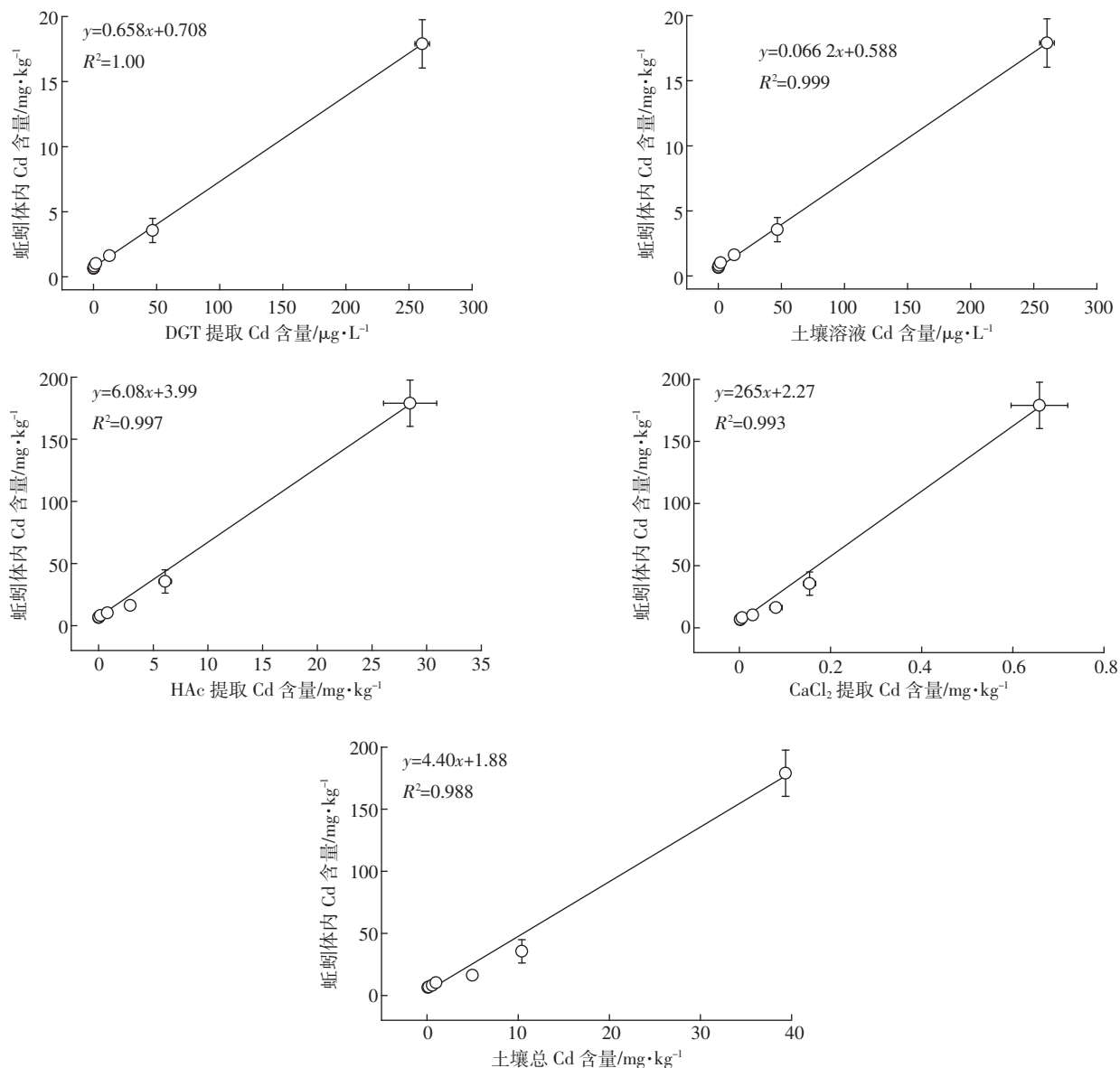


图1 蚯蚓体内 Cd 含量和土壤 Cd 含量(四种提取态 Cd 以及总 Cd)的相关性

Figure 1 The correlation between earthworm accumulated Cd level and extractable Cd(DGT-Cd, soil solution-Cd, HAc-Cd and CaCl₂-Cd) and total Cd concentration in soils

综合比较各生理生化指标,从有效态 Cd 的角度看,外源性 Cd 对黑土中蚯蚓产生早期伤害的阈值可能在 DGT-Cd 2.00~12.7 μg·L⁻¹、土壤溶液 Cd 3.88~20.4 μg·L⁻¹、HAc-Cd 0.813~2.90 mg·kg⁻¹ 和 CaCl₂-Cd 0.029 2~0.080 2 mg·kg⁻¹ 之间,对应于土壤中 1~5 mg·kg⁻¹ 总 Cd 浓度。超过此阈值的 Cd 污染土壤会导致蚯蚓产生氧化性损伤,进而影响土壤生态系统的安全。根据生物产生早期伤害的关键阈值,可以为生态风险早期诊断提供量化的判断,同时也为国家环境质量的修订、基准的制定提供参考和基础。此外,值得注意的是本研究的投加浓度设计间隔跨度较大,对有

效态 Cd 的阈值的判定尚不够精确,实际产生生化响应的浓度有可能比估计的阈值更为提前,今后需要更多的室内毒理试验和野外试验相结合进行更深入的研究。

2.3 有效态 Cd 与蚯蚓毒性效应的相关性

在生态风险评价中,幂函数拟合通常被用以对暴露-反应关系中的吸收进行建模:

$$C_b = a \times (C_x)^B \quad (1)$$

式中: a 和 B 都是拟合参数; C_b 表示生物体内的化学物质浓度,mg·kg⁻¹; C_x 表示污染土壤中的化学物质浓度,mg·L⁻¹,mg·kg⁻¹。

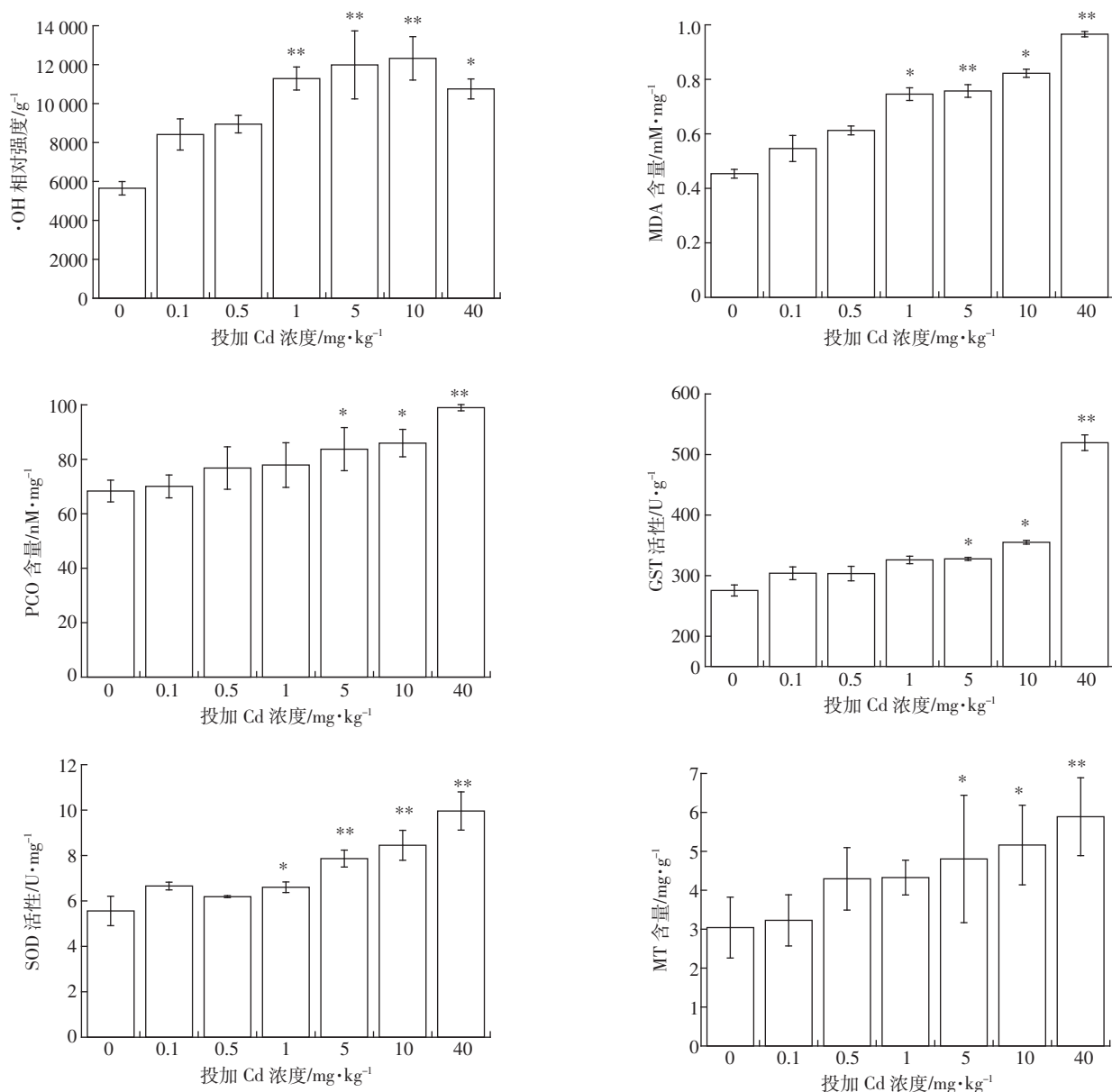


图2 Cd对赤子爱胜蚓的生态毒性效应

Figure 2 The biochemical responses of earthworm exposed to Cd

为了简化分析,将(1)进行指数转化,得到的线性回归模型可以表述为:

$$\lg C_b = a + B \times \lg C_x \quad (2)$$

将模型(2)应用于拟合有效态Cd含量和蚯蚓生理生化指标值,所得结果如表2所示。

拟合结果表明,4种化学方法所提取的有效态Cd可以较好地预测蚯蚓若干敏感生化指标。其中,DGT-Cd和各个指标都基本具有良好的相关性,尤其是和PCO含量($R^2=0.954$)、SOD活性($R^2=0.926$)和MT含量($R^2=0.911$)具有极显著的相关性。土壤溶液法在各生化指标上的拟合相关系数(R^2)略低于DGT

技术,说明蚯蚓可能吸收了一部分来自土壤固相解析补充到土壤溶液中的Cd。醋酸提取法对蚯蚓体内的MT含量和·OH自由基强度有较为突出的预测效果,相关系数分别为0.947和0.795。CaCl₂提取法也和PCO含量、MDA含量以及MT含量具有极强的相关性, R^2 分别为0.934、0.920和0.904。这表明化学提取的有效态重金属与蚯蚓的代谢活动之间存在剂量-效应关系。

在本次实验条件下,4种有效态提取法均具有较好的预测效果,但由于Cd投加浓度的设计跨度较大,四者之间未呈现明显差异,但以后可根据实际情

表 2 4 种提取态 Cd 和蚯蚓各生理生化指标的拟合参数(a , B)和相关系数(R^2)Table 2 The fitting parameters(a , B) and correlation coefficients(R^2) between extracted Cd levels and biochemical responses of earthworms exposed in Cd contaminated soils

项目		PCO	MDA	SOD	GST	MT	·OHa	·OHb
DGT-Cd	a	1.88	-0.208	0.819	2.49	0.592	3.95	3.95
	B	0.019 5	0.035 8	0.030 5	0.032 2	0.033 0	0.026 8	0.044 1
	R^2	0.954	0.903	0.926	0.752	0.911	0.421	0.678
土壤溶液 Cd	a	1.86	-0.240	0.792	2.46	0.652	3.93	3.91
	B	0.023 0	0.041 5	0.035 8	0.038 4	0.038 8	0.031 0	0.053 8
	R^2	0.967	0.902	0.922	0.752	0.904	0.402	0.687
HAc-Cd	a	1.91	-0.151	0.870	2.54	0.648	4.00	4.02
	B	0.020 9	0.038 7	0.032 7	0.034 3	0.036 9	0.031 8	0.049 3
	R^2	0.938	0.915	0.865	0.668	0.947	0.535	0.795
CaCl ₂ -Cd	a	1.99	0.007	1.00	2.68	0.791	4.12	4.22
	B	0.024 6	0.046 4	0.038 5	0.040 9	0.042 6	0.036 0	0.058 4
	R^2	0.934	0.920	0.876	0.700	0.904	0.480	0.752

注:由于合成自由基的细胞器在高浓度组受到严重损伤,·OHa 为包含所有浓度组的拟合结果($n=7$),·OHb 为不包括添加浓度 40 mg·kg⁻¹ 组的拟合结果($n=6$)。

况选用不同的方法。其中,土壤溶液法、CaCl₂ 提取法和醋酸提取法的成本低廉,操作简便。DGT 技术虽然成本较高,但和传统的化学提取法相比,它所提取的有效态重金属浓度不受土壤理化性质的影响,具有独特的模拟动力学过程。其最大的优点是能应用于原位测定,无需采集土壤样品以及前处理,因此在野外的大范围实验中具有极大的潜力。但是目前相关 DGT 的研究主要集中在植物,对土壤动物吸收重金属的预测还较少^[22]。由于蚯蚓在土壤中的活动以及体表的分泌物会不断影响污染物在土壤中的空间分布以及在土壤溶液中的浓度,需要更多类似 DGT 的“仿生”技术应用到生物有效态金属的预测与评估中。

3 结论

(1)应用 DGT、土壤溶液、CaCl₂ 和醋酸提取法获得的有效态 Cd 含量与蚯蚓体内 Cd 含量呈极显著相关($P<0.01$)。4 种方法均可以用来预测黑土中赤子爱胜蚓对 Cd 的吸收。

(2)基于生物有效态和多种生化指标,可以获得 Cd 对黑土中蚯蚓产生早期伤害的阈值,其范围可能在 DGT-Cd 2.00~12.7 μg·L⁻¹、土壤溶液 Cd 3.88~20.4 μg·L⁻¹、HAc-Cd 0.813~2.90 mg·kg⁻¹ 和 CaCl₂-Cd 0.029 2~0.080 2 mg·kg⁻¹ 之间。超过此阈值的 Cd 污染黑土会对蚯蚓产生毒性伤害。

(3)吸收模型的拟合分析结果表明,4 种有效态 Cd 与蚯蚓的部分毒性效应指标之间存在明显的剂

量-效应关系,说明化学法提取的有效态 Cd 浓度有希望能代替土壤总 Cd 作为蚯蚓的实际暴露浓度。

参考文献:

- [1] Williams P N, Lei M, Sun G, et al. Occurrence and partitioning of cadmium, arsenic and lead in mine impacted paddy rice: Hunan, China[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(3): 637-642.
- [2] McLaughlin M J, Parker D R, Clarke J M. Metals and micronutrients—food safety issues[J]. *Field Crops Research*, 1999, 60(1-2): 143-163.
- [3] 国家环境保护总局. 中东部地区生态环境现状调查报告[J]. 环境保护, 2003, 8: 3-8.
State Environmental Protection Agency. Investigation report of eco-environmental situation in China's mid-east regions[J]. *Environmental Protection*, 2003, 8: 3-8.
- [4] Cortet J, Gomot-De Vauflery A, Poinot-Balaguer N, et al. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects[J]. *European Journal of Soil Biology*, 1999, 35(3): 115-134.
- [5] Nahmani J, Hodson M E, Devin S, et al. Uptake kinetics of metals by the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated soils[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(10): 2622-2628.
- [6] Spurgeon D J, Svendsen C, Lister L J, et al. Earthworm responses to Cd and Cu under fluctuating environmental conditions: A comparison with results from laboratory exposures[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 136(3): 443-452.
- [7] Ranieri A, Castagna A, Scebbia F, et al. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(1): 45-54.
- [8] Shi H H, Wang X R, Luo Y, et al. Electron paramagnetic resonance evidence of hydroxyl radical generation and oxidative damage induced by tetrabromobisphenol A in *Carassius auratus*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2005,

- 74(4):365-371.
- [9] Sun Y Y, Yu H X, Zhang J F, et al. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure[J]. *Chemosphere*, 2006, 63(8):1319-1327.
- [10] Zhang J F, Shen H, Wang X R, et al. Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*[J]. *Chemosphere*, 2004, 55(2):167-174.
- [11] Xue Y, Gu X, Wang X, et al. The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A[J]. *Ecotoxicology*, 2009, 18(6):693-699.
- [12] 王晓蓉, 罗义, 施华宏, 等. 分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评价中的应用[J]. 环境化学, 2006, 25(3):320-325.
- WANG Xiao-rong, LUO Yi, SHI Hua-hong, et al. Application of molecular biomarkers in early diagnosis and ecological risk assessment for water and soil[J]. *Environmental Chemistry*, 2006, 25(3):320-325.
- [13] Sanchez-Martin M J, Garcia-Delgado M, Lorenzo L F, et al. Heavy metals in sewage sludge amended soils determined by sequential extractions as a function of incubation time of soils[J]. *Geoderma*, 2007, 142(3-4):262-273.
- [14] Sonmez O, Pierzynski G M. Assessment of zinc phytoavailability by diffusive gradients in thin films[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(4):934-941.
- [15] Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, et al. The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworm(*Eisenia-andrei*) experiments in soil[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1994, 13(1):93-99.
- [16] McLaughlin M J, Zarcinas B A, Stevens D P, et al. Soil testing for heavy metals[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2000, 31(11-14):1661-1700.
- [17] Conder J M, Lanno R P. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*[J]. *Chemosphere*, 2000, 41(10):1659-1668.
- [18] Sanders J R, McGrath S P, Adams T M. Zinc, copper and nickel concentrations in soil extracts and crops grown on 4 soils treated with metal-loaded sewage sludges[J]. *Environmental Pollution*, 1987, 44(3):193-210.
- [19] Ure A M, Quevauviller P, Muntau H, et al. Speciation of heavy-metals in soils and sediments—an account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the ber of the commission-of-the-european-communities[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1993, 51(1-4):135-151.
- [20] Bade R, Oh S, Shin W S. Diffusive gradients in thin films(DGT) for the prediction of bioavailability of heavy metals in contaminated soils to earthworm(*Eisenia foetida*) and oral bioavailable concentrations[J]. *Sci Total Environ*, 2012, 416:127-136.
- [21] Williams P N, Zhang H, Davison W, et al. Evaluation of in situ DGT measurements for predicting the concentration of Cd in Chinese field-cultivated rice: Impact of soil Cd:Zn ratios[J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(15):8009-8016.
- [22] Zhang H D W, Knight B, McGrath S. In situ measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT[J]. *Environ Sci Technol*, 1998, 32(5):7.
- [23] Burger J, Diaz-Barriga F, Marafante E, et al. Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2003, 56(1):20-31.
- [24] Lanno R, Wells J, Conder J, et al. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2004, 57(1):39-47.
- [25] USEPA(United States Environmental Protection Agency). Acid digestion of sediment, sludges, and soils(USEPA 3050B)[S]. Washington D C, USPEA, 1996.
- [26] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione-transferases – first enzymatic step in mercapturic acid formation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(22):7130-7139.
- [27] Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide-dismutase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47(3):469-474.
- [28] 向荣, 王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(3):241-242.
- XIANG Rong, WANG Ding-nian. Improvement of spectrophotometry method for malondialdehyde[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1990, 17(3):241-242.
- [29] Alla M M N, Hassan N M. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(4):202-210.
- [30] Levine R L, Williams J A, Stadtman E R, et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins[J]. *Oxygen Radicals in Biological Systems*, Pt C, 1994, 233:346-357.
- [31] Bradford M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2):248-254.
- [32] 马陶武, 周科, 朱程, 等. 铜锈环棱螺对镉污染沉积物慢性胁迫的生物标志物响应[J]. 环境科学学报, 2009, 29(8):1750-1756.
- MA Tao-wu, ZHOU Ke, ZHU Cheng, et al. Biomarker responses of *Bellamya aeruginosa* to the chronic stress of cadmium-contaminated sediment[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(8):1750-1756.
- [33] Belfroid A C, Sijm D T H M, Van Gestel C A M. Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates[J]. *Environmental Reviews*, 1996, 4(4):276-299.
- [34] Vangestel C A M, Ma W C. Toxicity and bioaccumulation of chlorophenols in earthworms, in relation to bioavailability in soil[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1988, 15(3):289-297.