

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20141217001

郑丽萍, 王国庆, 林玉锁, 等. 贵州省典型矿区土壤重金属污染对蚯蚓的毒性效应评估[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2): 258-265

Zheng L P, Wang G Q, Lin Y S, et al. Evaluation of toxicity effects of heavy metal contaminated soils on earthworm (*Eisenia foetida*) in a mining area of Guizhou Province [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(2): 258-265 (in Chinese)

贵州省典型矿区土壤重金属污染对蚯蚓的毒性效应评估

郑丽萍^{1,2}, 王国庆^{1,2,*}, 林玉锁^{1,2}, 冯艳红^{1,2}, 吴春宇^{1,2}, 张亚^{1,2}

1. 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042
2. 国家环境保护土壤环境管理与污染控制重点实验室, 南京 210042

收稿日期: 2014-12-17 录用日期: 2015-01-27

摘要: 选取我国贵州省某矿区典型的重金属复合污染土壤开展 28 d 慢性毒性暴露试验,以蚯蚓体内 2 种抗氧化酶活性——过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)和金属硫蛋白(MT)含量为生物指标,评估了以上生物指标与土壤重金属含量的相关性,探讨该研究方法用于矿区土壤重金属生态风险评估的可行性。结果表明,CAT 和 SOD 在暴露周期内均出现先诱导后抑制的动态响应过程,表明蚯蚓通过提高 CAT 和 SOD 的活性来清除机体因污染胁迫而产生的自由基,以适应环境变化,在毒性缓解后,蚯蚓体内代谢产物的积累抑制了抗氧化酶活性,CAT 和 SOD 活性下降并趋于稳定。暴露于重金属污染亚致死浓度时,蚯蚓体内的 8-OHdG 含量随着暴露时间的延长显著降低,随着暴露浓度的增加,损伤存在由低到高的转变。在 28 d 暴露周期内,蚯蚓体内 MT 在重金属胁迫下发挥了解毒作用,MT 含量在蚯蚓暴露后第 7 天增加,随后逐渐降低。本文基于生物毒性试验综合评估了矿区典型重金属污染土壤的生态风险,研究结果对指导重金属复合污染土壤的修复与再利用具有重要意义。

关键词: 重金属;蚯蚓;抗氧化酶;8-羟基脱氧鸟苷;金属硫蛋白;生态风险评价
文章编号: 1673-5897(2015)2-258-08 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Evaluation of Toxicity Effects of Heavy Metal Contaminated Soils on Earthworm (*Eisenia foetida*) in a Mining Area of Guizhou Province

Zheng Liping^{1,2}, Wang Guoqing^{1,2,*}, Lin Yusuo^{1,2}, Feng Yanhong^{1,2}, Wu Chunyu^{1,2}, Zhang Ya^{1,2}

1. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection of China, Nanjing 210042, China

2. State Environmental Protection Key Laboratory of Soil Environmental Management and Pollution Control, Nanjing 210042, China

Received 17 December 2014 **accepted** 27 January 2015

Abstract: Typical soils contaminated by multiple heavy metals were collected from a mining area in Guizhou Province for 28 d chronic toxicity assay. Activity of antioxidant enzymes, i.e. catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), 8-hydroxy deoxyguanosine (8-OHdG) and metallothionein (MT) in the earthworm (*Eisenia foetida*) were determined to evaluate correlations between these indicators and soil heavy metal contents. Feasibility of using these indicators to assess ecological risk of heavy metal contaminated mining soils was investigated. Results showed that the activity of CAT and SOD in earthworms increased firstly, and were inhibited thereafter during the exposure duration. This might suggest that activity of CAT and SOD in earthworm was

基金项目: 贵州省重大科技计划课题(黔科合重大专项字[2012]6014 号); 2014 年环保公益性行业科研专项项目(201409041 和 201409042)

作者简介: 郑丽萍(1985 -), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为场地污染快速生物学诊断试验方法, E-mail: zlp@nies.org

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: wgq@nies.org

raised to remove free radicals caused by stress of heavy metal contamination so as to adapt to changes of the environment. The accumulation of metabolites in earthworms after alleviating of metal toxicity inhibited activity of antioxidant enzymes, which led to decrease in CAT and SOD activity. When exposed to sub-lethal heavy metal concentrations, content of 8-OHDG in earthworms showed significant decrease with exposure time. With increase in exposure concentrations, more serious damages on 8-OHDG were observed. Within the exposure duration of 28 days, MT in earthworm played a detoxification role under the stress of heavy metal contamination. MT contents increased after 7 days of exposure and decrease thereafter. This study performs a comprehensive evaluation on ecological risk of typical heavy metal contaminated soils of a mining area based on toxicity assay. Results of this study will be helpful to guide remediation of heavy metal contaminated soils as well as its reuse after treatment.

Keywords: heavy metal; earthworm; antioxidant enzymes; 8-OHDG; MT; ecological risk assessment

矿产资源是人类生产和生活的基本源泉之一,但矿产资源的开发在对国民经济发展起重要推动作用的同时,也带来了比较严峻的环境问题。矿山开采,特别是铅锌矿床、含硫多金属矿床的开采过程中,由于采矿废水和选矿废液的直接排放,废石和尾矿等固体废弃物的堆放和淋滤,使矿区土壤中富集大量的重金属。

矿区土壤重金属的污染可以使土壤质量下降,生态系统退化,农作物减产,还可能威胁到人体的健康,而我国以往的矿业开发工作大多只注重经济利益,对矿区土壤重金属的生态风险研究也相应落后。土壤中重金属的活动性、生物可利用性、毒性与重金属的形态有密切的关系^[1-2],仅仅采用重金属总量法来评估矿区土壤污染是不确切的。因此,研究矿区土壤重金属的综合生物毒性,尝试使用模式生物的多种特征指标联合评价矿区土壤的生态风险,正确评估矿区土壤的污染等级和程度,进行矿区生态重建的研究,正逐步成为矿区重金属风险评价的研究热点,有较强的实际应用价值。

在土壤毒性评价的诸多模式生物中,蚯蚓在土壤有机物质的分解转化上具有重要作用,同时其活动可以改善土壤的结构,增强土壤的透气和排水保水功能。因此在土壤中保持健康的蚯蚓生态种群对于土壤环境的保护具有重要价值。而从生态学上来看,蚯蚓处于陆地生态食物链的底部,对大部分杀虫剂和重金属都具有富集作用。这些被富集的化学物质可能并不对蚯蚓造成严重的伤害,但却可能影响食物链中更高级的生物。同时蚯蚓对某些污染物比许多其他土壤动物更为敏感,因此利用蚯蚓作为土壤环境的指示生物,可以提供一个保护整个土壤动物区系的安全域值。

人类活动所产生的化学品,尤其是工矿业化学

品,无论是重金属还是有机物实际大多是以复合污染的形式存在,需要我们探寻针对复合污染实际样品的合适的生物评价体系与方法,对修复前后土壤的综合毒性进行风险评估。不同于常规的人工外源添加单一重金属的方法,矿区土壤重金属污染一般是多种重金属的复合。因此,针对矿区土壤中重金属污染的生态风险评价,蚯蚓体内的特征生物标志物的选择与优化尤为重要。本研究选择了3种不同的信号通路,这3个信号通路中,氧化损伤是所有污染物高浓度暴露下的普遍适用的指标,MT是重金属的暴露标记,8-ODHG是DNA损伤标记,为遗传毒性水平的生物指标,以上3种信号通路可以从不同侧面联合反映复合重金属胁迫的生物毒性,有较强的实际应用价值。其中,抗氧化酶(SOD、CAT)是广泛接受的反映氧化胁迫的生物标志物。SOD是生物体内重要的抗氧化酶之一,可有效清除蚯蚓体内产生的超氧阴离子、终止自由基连锁反应;过氧化氢酶(CAT)是广泛存在于需氧微生物、动植物红细胞及某些组织细胞内的一种氧化还原酶,其主要功能是减少自由基和过氧化氢脂质的形成^[3-5];8-羟基脱氧鸟苷是DNA氧化损伤的修饰产物,在体内只通过DNA氧化损伤途径形成,且在体内稳定存在,不受饮食等因素影响^[6-7],从遗传毒性的角度评价重金属胁迫的影响;金属硫蛋白(MT)具有维持细胞金属含量动态平衡和重金属解毒作用双重机制。MT可作为重金属污染的生物标志物,在受到重金属胁迫时,细胞合成大量的金属硫蛋白将游离的重金属离子螯合,使细胞免受毒害^[8-10]。

贵州省位于我国西南,矿产资源丰富,采冶历史悠久,地表与地下水系发达,污染易迁移交织,冶炼区分布的广泛性造成了污染土壤的广泛性,历史遗留土壤重金属污染问题突出。本文研究土壤取自贵

州省某废弃冶炼厂周边的农田土壤作为暴露土壤,选择有针对性的模式生物蚯蚓对土壤污染状况进行生物评价,探讨所选生物指标对土壤重金属评价的可行性以及与土壤重金属含量的相关性,综合评价重金属复合污染对土壤的生态风险,并用于指导重金属复合污染土壤的修复与再利用工作。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 供试材料

土壤:(1)我国贵州省妈姑镇铅锌矿资源丰富,长期采冶导致土壤环境严重污染。致使重金属元素铅、锌、镉等进入大气、土壤、水体,附近的农田土壤、河流水体等受到不同程度的污染。本文研究土壤于2014年6月采自贵州省妈姑镇某废弃冶炼厂周边的农田表层土壤样品(0~20 cm),采样经纬度为北纬26°97'35",东经104°56'39"(图1),试验开始前对土壤进行风干,过20目筛。经测定该土壤样品pH 7.02,有机质含量37.16 g·kg⁻¹。该点位土样主要含有铜、锌、铅和镉4种重金属,具体浓度为:Zn 1 621.75 mg·kg⁻¹,Cu 408.75 mg·kg⁻¹,Pb 81 161.25 mg·kg⁻¹,Cd 8.49 mg·kg⁻¹)。

(2)采用 OECD 推荐的人工土壤(10% 泥炭、20% 高岭土、0.3%~1.0% 碳酸钙、70% 石英砂)。泥炭需磨细无肉眼可见的植物残柱,高龄土中高龄石含量在30%以上,碳酸钙采用分析纯粉末状试剂。风干的石英砂中50~200 μm 粒径的细砂含量在50%以上。采用小型电工搅拌机,混匀上述组分,加入去离子水使其含水量达到干重的35%左右,混合均匀,为逐步稀释法进行蚯蚓暴露试验备用。

蚯蚓:试验中所用蚯蚓为赤子爱胜蚓。应选择具有环带的2个月至1年大小的成蚓。同一个试验中所用的蚯蚓要来自同一生长环境,并且大小、蚓龄保持一致,蚓龄差别在4周以内。选择好的蚯蚓在用于试验前要先在所用的人工土壤环境中适应至少

1天的时间,在此期间应使用和在试验中一样的食物。10条蚯蚓为1组。然后在试验开始前随机分配到各个培养容器中。称重前蚯蚓要先用去离子水清洗干净,然后放到滤纸上吸去多余水分。清洗好后的每一条蚯蚓的重量应在250~600 mg之间。

1.2 试验设计

由于矿区重金属复合污染土壤中蚯蚓急性毒性试验的死亡率为100%,且矿区实际土壤研究区域不能采集到有严格浓度梯度的土壤样品,为科学评价该点位矿区土壤的生态毒性,采用污染土壤与人工土壤按一定比例混合的逐步稀释方法进行蚯蚓暴露实验。采用28 d慢性毒性试验法综合评价该区域点位土壤的生物毒性。在预试验的基础上,确定了供试土壤的暴露浓度,试验设1个对照和6个暴露水平。处理组编号分别为CK、S-1、S-2、S-3、S-4、S-5、S-6。试验用的土壤量为500 g,其中污染土壤与清洁土壤混合比例以及最终试验土壤样品中的重金属浓度见表1,由于实地污染土壤为复合污染土壤,其中也含有一定量的铜和锌。本暴露试验为亚急性毒性试验,暴露过程中各土样蚯蚓均未出现死亡。



图 1 采样点示意图
Fig. 1 Field sampling point

表 1 供试土壤重金属含量设置
Table 1 Concentrations of heavy metal in test soils

处理编号 Treatment number	Pb/(mg·kg ⁻¹)	Zn/(mg·kg ⁻¹)	Cd/(mg·kg ⁻¹)	Cu/(mg·kg ⁻¹)	污染土壤/g	人工土壤/g
					Contaminated soil/g	Artificial soil/g
CK	ND	ND	ND	ND	ND	500
S-1	116.13	162.18	0.85	40.88	50	450
S-2	232.25	324.35	1.70	81.75	100	400
S-3	348.38	486.53	2.55	122.63	150	350
S-4	464.50	648.70	3.40	163.50	200	300
S-5	580.63	810.88	4.24	204.38	250	250
S-6	696.75	973.05	5.09	245.25	300	200

蚯蚓的染毒及培养:试验时,调节土壤含水量为最大持水量的 60%,然后将污染场地土壤与清洁土壤混匀后放入塑料容器中。然后随机选择健康、环带明显、质量相近(250~600 mg)的清肠 24 h 的成体蚯蚓 10 条放入塑料容器中。用塑料薄膜封口,并用工具扎孔。将上述准备好的塑料容器一并放入人工气候箱中培养,箱中为标准实验条件:温度为 20℃±0.2℃,湿度为(75±7)%,光照 1 333 lx(间歇光照,即 12 h 光照、12 h 黑暗),并定期添加少量的水以保持基质的湿度。每周每个处理加入 20 g 干牛粪,分别于暴露 3、7、14、28 d 后将蚯蚓取出,记录存活状况后清肠 1 d 称重、测定酶活性,8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)和金属硫蛋白(MT),每一处理和对照各设 3 个重复。

1.3 分析测试

1.3.1 组织液的制备

采样时间分别为蚯蚓暴露后的第 3、7、14、28 天。每一处理的 3 个平行样各采集 1~2 条活蚯蚓,称重,加入蚯蚓体重 9 倍的生理盐水,快速将蚯蚓剪成数段,移入匀浆器,匀浆,制成 10% 的组织匀浆。将匀浆液转入 5 mL 离心管,2 500 r·min⁻¹,离心 10 min,提取上清液。样品提取液可立即用于测定蛋白质含量、酶的活性、8-羟基脱氧鸟苷和金属硫蛋白(MT)。

1.3.2 生物指标的测定

抗氧化酶活性的测定用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒,按说明书进行。CAT 采用紫外分光法。组织中的 CAT 在一定条件下,可以直接分解其底物过氧化氢(H₂O₂),使 H₂O₂在反应液中的浓度逐渐降低,相应的吸光度也逐渐下降。用紫外分光光度计在 405 nm 处测其吸光度。SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法,在 550 nm 波长下比色测定。通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生的超氧阴离子自由基(O₂^{·-}),后者经氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色,用可见光分光光度计在 550 nm 处测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度,通过公式计算可求出被测样品的 SOD 活力^[11-13]。蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定,蛋白质分子具有-NH₃⁺基团,当棕红色的考马斯亮蓝显色剂加入蛋白标准液或样品中时,考马斯亮蓝染料上的阴离子与蛋白-NH₃⁺结合,使溶液变为蓝色,通

过测定吸光度可计算出蛋白含量。每个处理设 3 组平行,每个平行重复测定 3 次。8-羟基脱氧鸟苷和金属硫蛋白(MT)均采用酶联免疫 Elisa 试剂盒方法(南京建成提供)测定。

1.3.3 数据处理

所有数据处理均采用统计分析软件 SPSS17.0 进行。以 3 个平行组数据的平均值±标准差(Means±SD)表示。采用单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 检验法,并以 P>0.05, P<0.05, P<0.01 分别表示没有影响(不显著)、差异显著和差异极显著水平。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 重金属对蚯蚓体内超氧化物歧化酶(SOD)的影响

图 2 为重金属作用下蚯蚓体内超氧化物歧化酶活性的变化情况。如图 2 所示,在重金属胁迫下第 3 天蚯蚓 SOD 活性与对照组相比高浓度处理组 SOD 活性有一定程度的抑制,第 7 天表现出对 SOD 显著的诱导效应(P<0.05),在 S-2 组, SOD 诱导程度达到最大,高浓度组 SOD 活性有所降低,但仍然高于对照组 SOD 活性值;在第 14 天,各处理组蚯蚓 SOD 活性表现为低浓度抑制,高浓度诱导的效应,在第 28 天,随着处理浓度的增加(除了 S-1 外)其他各组表现为抑制的效应。

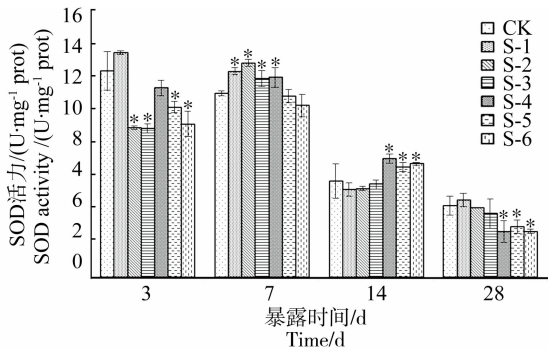


图 2 重金属污染土壤对蚯蚓体内 SOD 活性的影响

Fig. 2 Effects of heavy metal in soil on SOD activity in earthworm

本试验结果显示,重金属暴露 7 d 后蚯蚓体内 SOD 活性显著升高,说明重金属的胁迫或代谢过程产生了超氧阴离子^[14],从而诱发了 SOD 活性增加。在暴露的第 7 天时 SOD 的诱导效应最大。然而随着重金属的毒害作用蚯蚓细胞受到损伤, SOD 活性下降并趋于稳定。与此相似,冯涛等^[15]发现 B[a]P

(30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)胁迫下大弹涂鱼肝脏 SOD 活性在第 3 天显著升高,随后降至对照水平。另外,在本试验中处理组蚯蚓 SOD 活性与对照组相比产生了“抑制—诱导—抑制—抑制”的动态响应。这可能因为暴露初期重金属生物有效性较大其急性胁迫使 SOD 受到诱导,在暴露短时间内 SOD 活性显著升高,在毒性缓解后,重金属代谢产物的积累抑制了 SOD 酶活性,SOD 活性下降并趋于稳定。王重刚等^[6]发现 B[a]和芘暴露(50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)使梭鱼肝脏 SOD 活性主要表现为先抑制后诱导效应,而 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理组在暴露 7 d 后 SOD 未表现出诱导,而是抑制效应。这与本试验结果相似。

2.2 污染土壤对蚯蚓体内过氧化氢酶(CAT)的影响

图 3 为污染土壤对蚯蚓体内过氧化氢酶活性的变化情况。从图 3 可以看出,随着暴露时间的延长,对照的 CAT 变化范围为 4.71 ~ 7.34 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白,平均为 5.05 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白;而各处理蚯蚓 CAT 活性随着暴露时间的延长呈现先增高后降低,最后有一定恢复的趋势。在暴露的第 3 天,各实验组与对照组相比较有一定程度的降低,高浓度处理组 S-4、S-5、S-6 中蚯蚓 CAT 活性降低显著($P < 0.05$),第 7 天各处理组 CAT 活性受到显著诱导($P < 0.05$),随着处理组重金属浓度的增加,土壤中蚯蚓的 CAT 活力呈现增加的趋势,S-6 中蚯蚓的 CAT 活性最高;暴露的第 14 天,各处理组 CAT 活性与对照组相比均有一定程度的降低,尤其是高处理组的蚯蚓 CAT 活性受抑制明显($P < 0.05$),暴露的第 28 天时,各处理组蚯蚓 CAT 活性与第 14 天相比呈现增高的趋势,但仍然低于对照组,在暴露 28 d 周期内各处理组蚯蚓 CAT 活性呈抑制-诱导-抑制-抑制的变化趋势。

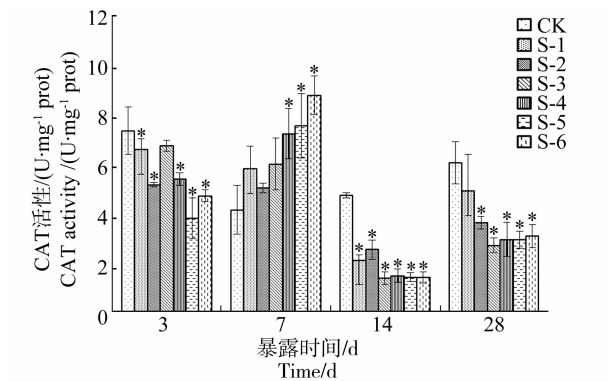


图 3 重金属污染土壤对蚯蚓体内 CAT 活性的影响
Fig. 3 Effects of heavy metal in soil on CAT activity in earthworms

CAT 可有效清除生物体内过量的过氧化氢,维持细胞内过氧化氢平衡,生物体内一种重要的抗氧化防御性功能酶,其活性成分或含量可受污染的胁迫而发生改变。本研究表明,在重金属低浓度处理时,蚯蚓体组织的 CAT 活性显著增加,表明蚯蚓通过提高 CAT 的活性来清除机体因污染胁迫而产生的自由基,以适应环境变化,保持体内平衡^[17]。随着处理浓度的增加,CAT 活性出现了不同程度的升高,在第 7 天时,S-6 组 CAT 活性诱导程度达到最大,高浓度处理组表现为强诱导响应,这可能与污染因素随着暴露时间的延长强烈诱导 CAT 活性,直至某一临界浓度使其 CAT 活性达到最大值有关^[18-19]。

2.3 重金属对蚯蚓体内 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHDG)的影响

图 4 为重金属作用下蚯蚓体内 8-羟基脱氧鸟苷含量的变化情况。如图 4 所示,在重金属胁迫下第 3 天各处理组蚯蚓 8-OHDG 含量与对照组相比有一定程度降低,第 7 天各处理组蚯蚓 8-OHDG 含量与对照组相比差异不明显;在暴露第 14 天各处理组蚯蚓的 8-OHDG 有显著的($P < 0.05$)降低,说明蚯蚓的 DNA 出现了一定程度的损伤;暴露第 28 天,各处理组蚯蚓 8-OHDG 含量仍低于对照组。说明随着暴露时间的延长,蚯蚓体内 DNA 损伤明显,在重金属胁迫下 8-OHDG 含量出现明显降低并较稳定的维持在一定水平。8-OHDG 能够衡量蚯蚓组织细胞内氧化应激水平,反映在重金属胁迫状态下细胞的内环境,且经代谢后在循环系统内稳定存在,蚯蚓组织液的 8-OHDG 水平可以为评价重金属对蚯蚓的生物胁迫提供更加直观、有效的信息。

Reinecke 等^[20]研究表明暴露于氯化镍的蚯蚓,

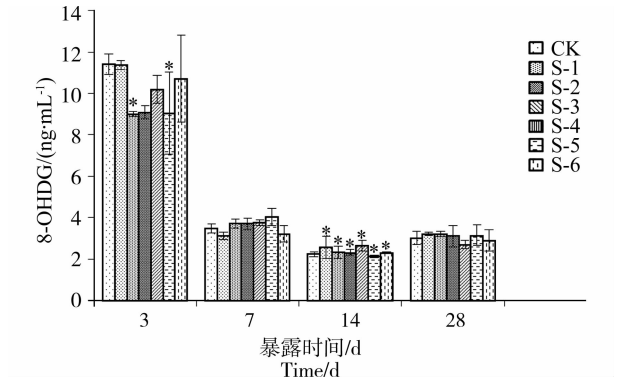


图 4 重金属污染土壤对蚯蚓体内 8-OHDG 含量的影响
Fig. 4 Effects of heavy metal in soil on 8-OHDG content in earthworm

重金属镍可以引起其 DNA 损伤,随着暴露浓度的增加,损伤有一个明显的由低到高的转变。该研究表明,暴露于镍化合物的土壤引起了无脊椎动物细胞 DNA 单链断裂,说明这种重金属具有潜在遗传毒性。细胞 DNA 的完整性是其功能正常发挥的重要前提,重金属胁迫会对 DNA 的完整性造成影响。完整性是对 DNA 链断裂程度的一种鉴定,细胞 DNA 完整性的损伤程度愈高,就意味着细胞核基因和线粒体基因的缺失、突变愈严重^[21]。

2.4 重金属对蚯蚓体内金属硫蛋白(MT)的影响

图 5 为重金属作用下蚯蚓体内金属硫蛋白(MT)含量的变化情况。如图 5 所示,在重金属胁迫下第 3 天各处理组蚯蚓体内金属硫蛋白(MT)含量与对照组相比变化不明显,第 7 天高浓度处理组中蚯蚓体内金属硫蛋白(MT)呈现一定程度的增高趋势,说明在重金属胁迫下蚯蚓体内出现了应激反应。随着暴露时间的延长,第 14 天与对照组相比,各处理组蚯蚓体内金属硫蛋白均出现一定程度的增高($P < 0.05$),蚯蚓体内细胞合成大量的金属硫蛋白将游离的重金属离子螯合,使细胞免受毒害。暴露第 28 天低浓度处理组 S-1、S-2 中蚯蚓体内金属硫蛋白仍然高于对照组,其他各组蚯蚓体内 MT 与对照组相比呈降低趋势。说明随着暴露时间的延长,蚯蚓体内金属硫蛋白发挥解毒作用后 MT 呈现降低趋势,恢复到正常水平。

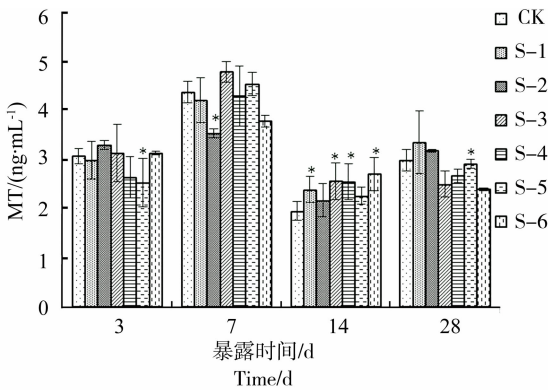


图 5 重金属污染土壤对蚯蚓体内 MT 含量的影响

Fig. 5 Effects of heavy metal in soil on MT content in earthworm

Brulle 等^[22]采用人工土壤法,将成熟赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)暴露于 $80、800\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 重金属镉中,通过克隆金属硫蛋白(MT)、过氧化氢酶(CAT)、钙调蛋白(Calm)、热休克蛋白(Hsp60、Hsp70)、丙酮酸

羧证实蚯蚓体内 MT 可作为环境重金属污染评估的主要生物标志物之一。Homa 等^[23]也通过研究发现,暴露于复合重金属污染外界环境下蚯蚓体内 MT-2 基因表达水平和蚯蚓个体繁殖数目存在很好地线性关系,强调指出蚯蚓体内 MT-2 转录表达水平作为生物标志物可很好的监控重金属污染(尤其是 Cd)的状况。Homa 等^[24]采用滤纸接触试验,将赤子爱胜蚓分别暴露于一定浓度 Zn、Cu、Pb、Cd 等重金属处理条件下,采用免疫细胞化学技术检测蚯蚓体腔组织中 wMT-2 的表达水平,研究表明除了暴露于 Pb 处理外,其他处理中 wMT-2 表达水平均有不同程度的上调。另外国内也有报道用陆地生态中昆虫类等体内 MT 作为环境重金属污染评估生物标志物的研究^[25]。

综上,可以得出以下结论:(1)在重金属复合污染的亚致死浓度暴露下,蚯蚓体内 2 种抗氧化酶(SOD 和 CAT)活性含量均对其产生了不同程度的响应,CAT 和 SOD 在暴露周期内均出现先诱导后抑制的动态响应过程。

(2)在重金属复合污染的亚致死浓度暴露下,蚯蚓体内的 8-羟基脱氧鸟苷和金属硫蛋白都出现了相应的响应机制,说明复合重金属胁迫可引起蚯蚓 DNA 损伤,蚯蚓体内 8-羟基脱氧鸟苷和金属硫蛋白(MT)可作为环境重金属污染评估的生物标志物,本文经过毒性评估研究发现该点位所处的区域土壤存在一定的生态风险。

(3)矿区重金属复合污染土壤的生态风险评价不能够单纯依靠一类指标进行评价,要根据重金属的特点结合多种生物指标进行综合评价。本文选择蚯蚓抗氧化酶系指标,8-羟基脱氧鸟苷(8-OHDG)和金属硫蛋白(MT)作为重金属复合污染土壤的综合生物评价指标体系,从细胞水平和 DNA 水平多方面有效的评价了某矿区实际重金属污染土壤对蚯蚓体内各项指标的影响,可用以指导矿区重金属生态风险评价以及矿区污染土壤的修复与再利用工作。

通讯作者简介:王国庆(1978-),男,江苏姜堰人,博士,副研究员,主要从事土壤环境风险评估与修复管理研究。

参考文献(References):

[1] 党志,刘丛强,尚爱安. 矿区土壤中重金属活动性评估方法的研究进展[J]. 地球科学进展,2001, 16 (1): 86 - 89
Dang Z, Liu C Q, Shang A A. Review of the mobility and bioavailability of heavy metals in the soil contami-

- nated by mining [J]. *Advance in Earth Sciences*, 2001, 16(1): 86 – 89 (in Chinese)
- [2] Cheng S. Heavy metal pollution in China: Origin, pattern and control [J]. *Environment Science and Pollution Research*, 2003, 10(3): 192 – 198
- [3] 郇多亚, 林玉锁, 贺静, 等. 土壤中 Cu 和 Pb 单一及复合污染对蚯蚓体内蛋白含量和 SOD 活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(5): 1985 – 1990
- Tai D Y, Lin Y S, He J, et al. Effect of Cu, Pb single and combined pollution on total soluble protein content and SOD activity of the *Eisenia foetida* earthworm in soils [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(5): 1985 – 1990 (in Chinese)
- [4] 刘嫦娥, 段昌群, 王旭, 等. 丁草胺和乙草胺对蚯蚓 CAT 和 SOD 活性的影响[J]. *环境化学*, 2008, 27(6): 756 – 761
- Liu C E, Duan C Q, Wang X, et al. Effect of butachlor and acetochlor in soil on antioxidant enzymes (SOD and CAT) in earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. *Environmental Chemistry*, 2008, 27(6): 756 – 761 (in Chinese)
- [5] 王飞菲, 郑梦梦, 刘树海, 等. 两种除草剂对蚯蚓的急性毒性及氧化胁迫效应[J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(6): 1210 – 1218
- Wang F F, Zheng M M, Liu S H, et al. Acute toxicity and oxidative stress of two herbicides on earthworm *Eisenia fetida* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(6): 1210 – 1218 (in Chinese)
- [6] Kautenburger R. Genetic structure among earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) from different sampling sites in western Germany based on random amplified polymorphic DNA [J]. *Pedobiologia*, 2006, 50(3): 257 – 266
- [7] 高玉楠, 杨靖, 宋沁馨, 等. 8-羟基脱氧鸟苷作为 DNA 氧化损伤标志物在疾病诊断中的应用[J]. *药学与临床研究*, 2012, 20(3): 223 – 228
- [8] 赵俊杰, 张高川, 葛滢, 等. 土壤锌镉单一及复合污染对蚯蚓金属硫蛋白含量的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(6): 1269 – 1272
- Zhao J J, Zhao G C, Ge Y, et al. Effect of Zn and Cd single and combined pollution on metallothionein content of earthworm in soils [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(6): 1269 – 1272 (in Chinese)
- [9] 陈春, 周启星. 金属硫蛋白作为重金属污染生物标志物的研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(3): 425 – 432
- Chen C, Zhou Q X. Researching advance in metallothionein and its biomarker of heavy metal contamination [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(3): 425 – 432 (in Chinese)
- [10] 孙红霞, 周强, 唐文成, 等. Ni^{2+} 在斜纹夜蛾幼虫中肠的积累并诱导金属硫蛋白表达[J]. *科学通报*, 2007, 52(22): 2613 – 2617
- [11] 郑丽萍, 林玉锁, 冯艳红, 等. 氯丹和灭蚊灵污染场地土壤对蚯蚓的毒性效应研究[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(10): 1024 – 1029
- Zheng L P, Lin Y S, Feng Y H, et al. Toxicity effects of chlordane and mirex contaminated soil on earthworm (*Eisenia foetida*) [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(10): 1024 – 1029 (in Chinese)
- [12] 薛银刚, 王晓蓉, 顾雪元, 等. 四溴双酚 A 对赤子爱胜蚓的急性毒性及抗氧化防御系统酶的影响[J]. *生态毒理学报*, 2009, 4(1): 93 – 100
- Xue Y G, Wang X R, Gu X Y, et al. Acute toxicity of tetrabromobisphenol A to earthworms *Eisenia fetida* and its effects on antioxidant defense system enzymes [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(1): 93 – 100 (in Chinese)
- [13] 吴尔苗, 王军良, 赵士良, 等. 菲和芘单一及复合污染对蚯蚓抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(5): 1077 – 1085
- Wu E M, Wang J L, Zhao S L, et al. Effect of single and combined pollution of Phe, Pyr on SOD, CAT activities and MDA content of *Eisenia foetida* in soils [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(5): 1077 – 1085 (in Chinese)
- [14] Vig E, Nemesok J. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprin carpio* [J]. *Journal of Fish Biology*, 1989, 35(1): 35 – 23
- [15] 冯涛, 郑微云, 洪万树, 等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏抗氧化酶活性影响的初步研究[J]. *应用生态学报*, 2001, 12(3): 422 – 424
- Feng T, Zheng W Y, Hong W S, et al. Effect of benzo(a)pyrene on antioxidant enzyme activities in *Boleophthalmus pectinirostris* liver [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(3): 422 – 424 (in Chinese)
- [16] 王重刚, 余群, 郁昂, 等. 苯并(a)芘和芘暴露对梭鱼肝脏超氧化物歧化酶酶活性的影响[J]. *海洋环境科学*, 2002, 21(4): 10 – 13
- Wang C G, Yu Q, Yu A, et al. Effect of benzo(a)pyrene and pyrene exposure on hepatic superoxide dismutase in *Mugil soleyi* [J]. *Marine Environmental Sciences*, 2002, 21(4): 10 – 13 (in Chinese)
- [17] 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 土壤低剂量芘污染对蚯蚓若干生化指标的影响[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(9): 2097 – 2103
- Zhang W, Song Y F, Sun T X, et al. Effects of low

- dosage pyrene pollution on biochemical characters of earthworm (*Eisenia fetida*) in soil [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(9): 2097 – 2103 (in Chinese)
- [18] 刘嫦娥, 段昌群, 王旭, 等. 丁草胺和乙草胺对蚯蚓 CAT 和 SOD 活性的影响[J]. 环境化学, 2008, 27(6): 756 – 761
- Liu C E, Duan C Q, Wang X, et al. Effect of butachlor and acetochlor in soil on antioxidant enzymes (SOD and CAT) in earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. Environmental Chemistry, 2008, 27(6): 756 – 761 (in Chinese)
- [19] 刘嫦娥, 段昌群, 王旭, 等. 阿特拉津和绿麦隆对赤子爱胜蚓组织抗氧化酶活性的影响[J]. 环境化学, 2008, 27(4): 436 – 443
- Liu C E, Duan C Q, Wang X, et al. Effects of atrazine and chlorotoluron on antioxidant enzymes in earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. Environmental Chemistry, 2008, 27(4): 436 – 443 (in Chinese)
- [20] Reinecke S A, Reinecke A J. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2004, 46(2): 208 – 215
- [21] 郑九嘉, 楼哲丰, 郑蔚虹, 等. 线粒体呼吸功能与精子活力、核 DNA 损伤的相关性分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(1): 34 – 40
- Zheng J J, Lou Z F, Zheng W H, et al. Analysis of mitochondria respiratory function associated with motility of sperm and nucleus DNA damage [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2012, 34(1): 34 – 40 (in Chinese)
- [22] Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C, et al. Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40: 2844 – 2850
- [23] Homa J, Olchawa E, Sturzenbaum S P, et al. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to medallions [J]. Environmental Pollution, 2005, 135(2): 275 – 280
- [24] Homa J, Olchawa E, Stürzenbaum S R, et al. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to medallions [J]. Environmental Pollution, 2005, 135(2): 275 – 280
- [25] 孙红霞, 周强, 唐文成, 等. Ni^{2+} 在斜纹夜蛾幼虫中肠的积累并诱导金属硫蛋白表达[J]. 科学通报, 2007, 52(22): 2613 – 2617