

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20211101001

马喆, 王美娥, 姜璐, 等. 场地实际重金属复合污染土壤生态毒性效应定量评价[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(4): 367-377

Ma Z, Wang M E, Jiang R, et al. Quantitative evaluation of ecological toxicity effect of real heavy metal combined pollution in site soil [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(4): 367-377 (in Chinese)

场地实际重金属复合污染土壤生态毒性效应定量评价

马喆^{1,2}, 王美娥^{1,*}, 姜璐¹, 陈卫平¹

1. 中国科学院生态环境研究中心, 城市与区域国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2021-11-01 录用日期: 2021-11-24

摘要: 场地实际重金属复合污染土壤生态效应定量评价是场地生态风险评估中的难点, 本研究耦合“自上而下”和“自下而上”复合污染联合效应评价的思路, 构建了由“有效生物标志物响应筛选-主导污染物识别-不同暴露类型/污染物种类联合效应估算”3个步骤组成的场地实际重金属复合污染土壤生态效应定量评价方法, 并以江苏省某废弃电镀污染场地为研究对象, 采用蚯蚓土壤微宇宙培养实验进行了方法验证。以蚯蚓组织丙二醛(MDA)含量、金属硫蛋白(MT)含量、过氧化氢酶(CAT)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性和还原型谷胱甘肽(GSH)含量等生物标志物为效应终点的分析结果表明, 蚯蚓对该场地的主要土壤重金属污染物包括 Cd、Cu、Zn、Ni、Pb 和 Cr 的富集能力表现为 Cd>Cu>Zn>Ni>Pb>Cr; 主成分分析结果表明, GSH 含量、CAT 活性和 MDA 含量为有效生物标志物, 重金属 Cd 和 Zn 为主导污染物。GSH 含量变化与土壤 Cd 总量及 Zn 的 DTPA 提取态含量之间存在多元线性关系; 蚯蚓 MDA 含量变化能够通过土壤 Cd 的 DTPA 提取态含量进行预测; CAT 活性变化能够通过 Zn 的土壤总量及蚯蚓生物累积量进行预测。针对场地实际污染土壤的性质及污染特征, 对3类有效生物标志物响应的半效应浓度(half effect dose, EC₅₀)估算的结果表明, 3类有效生物标志物的敏感性从高到低的顺序为: GSH>CAT>MDA; 不同元素以及不同类型暴露之间(如, 与 GSH 含量变化对应的土壤总 Cd 与 DTPA-Zn), 以及同一元素不同暴露之间(如, 与 CAT 活性变化对应的土壤总 Zn 与蚯蚓组织生物累积 Zn)都有可能存在交互作用, 而这些污染物暴露之间不存在暴露量变化的相关性。以上结果表明, 采用多元统计分析手段, 通过有效生物标志物响应、主导污染物的筛选以及联合效应估算, 能够实现野外实际土壤重金属复合污染, 生态效应的定量评价。

关键词: 重金属; 土壤复合污染; 生物标志物; 联合毒性效应估算

文章编号: 1673-5897(2022)4-367-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Quantitative Evaluation of Ecological Toxicity Effect of Real Heavy Metal Combined Pollution in Site Soil

Ma Zhe^{1,2}, Wang Meie^{1,*}, Jiang Rong¹, Chen Weiping¹

1. State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 1 November 2021 accepted 24 November 2021

Abstract: Quantitative evaluation of ecological effect of combined pollution of heavy metals in real site soil is

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1800505)

第一作者: 马喆(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学, E-mail: mazhe18@mails.ucas.ac.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: mewang@rcees.ac.cn

considered as a great issue in ecological risk assessment of contaminated sites. In this work, a quantitative ecological assessment approach for combined contaminated soil in field by heavy metals was developed based on “top-down” and “bottom-up” knowledge, which was made up of three steps, namely, “screening of effective biomarkers-identification of dominant pollutants-evaluation of joint effect of different exposure types/contaminants”. Finally, taking an abandoned electronic planting site in Jiangsu Province as a case, the developed approach was verified using soil microcosm of earthworm. Results of the experiment by taking the biomarkers including malondialdehyde (MDA), metallothionein (MT), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH) as effect endpoints, suggested that the bioaccumulation of main heavy metal contaminants including Cd, Cu, Zn, Ni, Pb and Cr by earthworms ranged in an order: Cd>Cu>Zn>Ni>Pb>Cr. Principal component analysis (PCA) revealed that GSH, CAT and MDA were screened as effective biomarkers, and heavy metals Cd and Zn were dominant contaminants. It was found that there was a significant multivariate linear relationship between the change of GSH and concentrations of total Cd and DTPA-Zn in soil. And the change of MDA could be predicted by DTPA-Cd in soil. The change of CAT activity was predictive by the total Zn in soil and the bioaccumulated Zn in earthworm. Evaluation of half effect dose (EC_{50}) based on the site-specific soil properties and heavy metal contamination characteristics revealed that the sensitivity of the 3 screened effective biomarkers ranged in an order: GSH>CAT>MDA. Interactions will occur in between different heavy metals and exposure types (e.g., between soil total Cd and DTPA-Zn corresponding to GSH change), and (or) in between different exposure types of the same heavy metal (e.g., between soil total Zn and bioaccumulated Zn corresponding to the change of CAT activity). While there is insignificant relationship in the change of concentrations between those contaminant exposures. It could be concluded in our work that the approach using multivariate statistics and made up of effective biomarker screening, dominant contaminant identification and joint effect evaluation was practicable in quantitative evaluation of ecological effect focusing on real soil heavy metal mixture pollution in field.

Keywords: heavy metals; soil combined contamination; biomarkers; joint toxicity effect evaluation

近年来,随着我国经济结构调整和经济增长方式转变,城镇工业企业搬迁遗留场地的土壤污染问题日益突出^[1]。原环境保护部2014年调查报告显示,我国工业废弃地点位超标率为34.9%,主要涉及矿山开采、有色金属冶炼、电镀、制革、化工生产和加工等行业^[2]。调查研究发现,电镀污染场地中镉(Cd)、铅(Pb)、铬(Cr)、铜(Cu)、锌(Zn)和镍(Ni)复合污染严重^[3-4]。复合污染的联合毒性效应定量评价是污染土壤生态风险评估的关键内容,尤其在场地风险评估中,场地特异性(site-specific)是必须要考虑的重要因子。

目前对复合污染生态效应的评价通常采用“自下而上”效应评价(bottom-up evaluation)方法,即根据污染物的作用方式,基于单一污染物毒性数据,采用浓度加合模型(concentration addition, CA)、独立作用模型(independent action, IA)或复合指数模型(combination index, CI)进行毒性效应定量估算。然而,这种方法需要大量毒性数据,并且由于毒性数据库中的数据大多来自实验室模拟试验,在外推到野

外实际污染土壤中往往会出现数量级的误差^[5]。与之相比,“自上而下”效应评价(top-down evaluation)方法通过原位污染土壤生物试验,结合生物致毒机理的分析,基于主导污染物识别结果,进行基质整体毒性效应评价,与实际土壤污染特征相关性较强,能够符合场地风险中场地特异性的要求^[6-7]。尽管如此,“自上而下”效应评价方法由于较难定量估算复合污染联合生态效应,同时缺乏统一的分析程序,其实际应用较少。

蚯蚓是土壤生态系统的重要组成部分,具有分布广、数量大和对污染物足够敏感等特点,常被用作土壤污染物毒性评价的模式生物^[8]。蚯蚓的污染物暴露通常是通过皮肤或者与皮肤相似的肠道暴露,暴露途径简单,毒性效应与蚯蚓体内暴露及土壤环境暴露有关^[9],同时,蚯蚓体内多种生物标志物如丙二醛(MDA)、金属硫蛋白(MT)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)等,与污染物暴露之间的胁迫-响应关系明显^[10-13]。目前蚯蚓的毒理试验在场地土壤污染生态风险评估、

污染物土壤环境质量标准与基准制定、污染场地修复效果评估等方面均有广泛应用^[14]。

本研究耦合“自下而上”与“自上而下”2种方法,采用多元统计分析手段,构建了既能够进行定量估算,又具有场地特异性的野外实际场地污染土壤的生态效应定量评价方法。并以江苏省某废弃电镀场地为研究对象,采用蚯蚓土壤微宇宙培养实验,进行野外实际重金属复合污染土壤的毒性效应定量评价。本研究旨在建立一套统一的野外实际污染土壤生态效应评价程序,为土壤污染生态风险评估提供技术支撑。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 研究场地描述及土壤样品采集

本研究土壤取自江苏省某废弃电镀场地,该电镀厂是长三角地区典型的电镀加工、金属和非金属表面处理企业,1985年建厂,包括电镀车间、硝酸锌生产车间及废水处理池,2014年关停,厂区废弃至今,现场环境较差,厂区呈正方形,边长50 m,面积2 500 m²,土地利用类型属于建设用地。依据《建设用地土壤污染状况调查技术导则》(HJ 25.1—2019)^[15],采用分区布点法,考虑场地功能分布,在电镀车间、废水处理池和硝酸银生产车间均布设样点,选取不同重金属污染程度的13个样点(S1~S13)进行研究。

每个土样采用五点混合采样法采集表层土壤(0~20 cm),将土壤样品装入自封袋中做好标记带回实验室。将带回实验室的土样置于干燥通风处自然晾干,土样去除石块及植物根系等杂物后碾磨,分别过10目和100目尼龙筛备用。

1.2 蚯蚓毒性效应实验

本实验的受试蚯蚓为赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*),购自天津惠裕德生物科技有限公司。实验前先将蚯蚓在人工培养箱里预培养14 d,培养箱温度设为(20±1)℃,湿度75%,光照20%。预培养后选取体质量200~300 mg发育好具有明显环带的成蚓进行微宇宙实验。

本研究采用室内土壤微宇宙实验。首先取500 g干土,加入一定量的去离子水使其含水量为35%,混合均匀后放入塑料烧杯中。然后在每个烧杯中放置15条蚯蚓,用保鲜膜封口,将保鲜膜上扎几个小孔,保证蚯蚓可正常呼吸同时减少土壤水分蒸发。将每个烧杯编号,放置于人工气候箱中(培养箱温度设定为(20±1)℃,湿度为75%,光照为20%,白天:黑

夜=12 h:12 h。根据采集到的土壤量,实验共设置13个处理(S1~S13),每个处理设置4个重复。培养14 d后,随机取出8~10条蚯蚓,经24 h滤纸清肠洗净后,测定蚯蚓体内重金属含量(干重)和酶活。本实验暴露过程中各土样蚯蚓的存活率均在80%以上。

1.3 土壤理化性质及重金属含量分析

1.3.1 土壤理化性质测定

土壤pH测定采用土水比1:2.5混合后用pHS-3C型pH计(上海仪电,中国)测定^[16]。土壤总有机碳采用盐酸预处理后,用元素分析仪ElementarVario EL III(Hanau,德国)直接测定^[17]。土壤阳离子交换量依据《土壤 阳离子交换量的测定 三氯化六氨合钴浸提-分光光度法》(HJ 889—2017)^[18]测定。土壤重金属有效态依据《土壤8种有效态元素的测定 二乙烯三胺五乙酸浸提-电感耦合等离子体发射光谱法》(HJ 804—2016)^[19],对2 mm风干土采用二乙烯三胺五乙酸(DTPA)浸提法测定。

1.3.2 重金属测定

土壤重金属测定:土壤重金属含量的测定采用HNO₃-HF-HClO₄-HCl四酸消解法^[20],采用ICP-MS(7500A,安捷伦,美国)测定样品中Cd、Ni、Cr和Pb含量,采用ICP-OES(Optima 8300,珀金埃尔默,美国)测定样品中Zn含量。每批样品设置3个空白对照组、10%样品的重复和3个标准物质,其中标准物质使用国家标准土壤物质GSS-27进行质量控制,回收率为83.0%~119%之间。

蚯蚓重金属累积含量测定:将待测蚯蚓放入有湿润滤纸的培养皿中,进行24 h吐泥,后用去离子水冲洗干净,冷冻干燥48 h,使用研钵磨碎后采用微波消解法(GB 5009.268—2016)^[21]在微波消解仪(Multiwave PRO, Anton Paar,奥地利)中进行消解,采用ICP-MS(7500A,安捷伦,美国)测定样品中Cd、Ni、Cr、Pb和Zn含量。每批样品设置3个空白对照组、10%样品的重复和3个标准物质,其中标准物质使用国家标准物质猪肝GBW10051(GSB-29)进行质量控制,回收率为85.1%~123%之间。

1.4 蚯蚓生物标志物响应测定

取清肠后蚯蚓3~4条,称量质量,液氮迅速冷冻,按照样品质量(g):缓冲液体积(mL)=1:9的比例加入PBS缓冲液(pH=7.4),4℃冰浴下使用组织研磨器充分研磨,将研磨好的10%组织匀浆经离心机2 000 r·min⁻¹离心10~15 min,离心后取上清液,置于-80℃冰箱保存。

蚯蚓生物标志物均使用试剂盒测定,严格按照试剂盒内说明进行操作。总蛋白选用 BCA 法,SOD 选用 WST-1 法,CAT 选用可见光法,GSH 选用微板法,MDA 和 MT 选用酶联免疫分析(ELISA 法)。总蛋白定量测定试剂盒(A045-3-2)、SOD 测定试剂盒(A001-3-2)、CAT 测定试剂盒(A007-1-1)和 GSH 测定试剂盒(A006-2-1)购自南京建成生物工程研究所,昆虫 MDA 酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(CD92025)和昆虫 MT 酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(CD92144)购自武汉纯度生物有限公司。

1.5 数据分析

1.5.1 有效生物标志物筛选

首先对生物标志物进行 KMO (Kaiser-Meyer-Olkin)检验和 Bartlett 检验,判断对其进行主成分分析(principal component analysis, PCA)的可行性。然后对生物标志物进行多元分析,通过 PCA 分析和聚类分析将不同样点分成多个组,并通过相似性分析 (analysis of similarities, ANOSIM)检验分组是否具有统计学意义。最后,采用 BVSTEP 方法筛选有效生物标志物,并对所筛选的有效生物标志物与第一主成分进行回归分析,得到有效生物标志物与蚯蚓健康状况的关系。

1.5.2 主导污染物识别

采用典范对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)确定生物标志物和污染物暴露指标之间的相关关系,采用方差膨胀因子法(variance inflation factor, VIF)对 CCA 建模中冗余环境因子进行选择^[22],最后根据 CCA 结果筛选出主导污染物。

1.5.3 数据分析

本研究采用 Microsoft Excel 2016 进行原始数据处理;采用 SPSS 24.0 对土壤理化性质和土壤重金属含量进行数据统计性描述,对蚯蚓生物标志物进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA);采用 Origin 2018 软件对蚯蚓生物标志物响应进行多元分析;采用 R 语言进行 ANOSIM 分析和 BVSTEP 分析;采用 Canoco5 软件进行 VIF 和 CCA 分析;采用 SPSS 24.0 进行多元回归分析;采用 Origin 2018 软件完成作图。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 土壤理化性质及重金属含量

如表 1 所示,13 个场地土壤样品的 Cd、Cr、Cu、Ni、Pb 和 Zn 等 6 种重金属总量和 DTPA 提取态含量变异较大,变异系数分别为 93.8% ~309%和 114%

表 1 供试土壤关键理化性质、重金属总量和 DTPA 提取态含量
Table 1 The total and DTPA extracted heavy metal concentration and the key physical-chemical properties of the tested soils

参数 Parameters		平均值±标准差 Mean±SD	变异系数(CV)/% Coefficient of variation (CV)/%
重金属总量/(mg·kg ⁻¹) Soil total heavy metal concentrations/(mg·kg ⁻¹)	Cd	4.74±14.7	309
	Cr	181±202	112
	Cu	96.9±98.9	102
	Ni	81.0±127	156
	Pb	100±94.2	93.8
	Zn	2 537±4 062	160
重金属 DTPA 提取态含量/(mg·kg ⁻¹) DTPA-extracted heavy metal concentrations/(mg·kg ⁻¹)	Cd	0.708±2.23	315
	Cr	0.0874±0.213	244
	Cu	8.80±15.1	172
	Ni	0.482±0.572	119
	Pb	9.06±14.6	162
	Zn	111±126	114
理化性质 Physical-chemical properties	pH	7.34±0.492	6.71
	CEC/(cmol·kg ⁻¹)	8.32±2.45	29.5
	SOC/%	0.781±0.429	54.9

注:CEC 为阳离子交换量;SOC 为土壤有机碳。
Note: CEC represents cation exchange capacity; SOC represents soil organic carbon.

~315%之间,其中土壤 Cd 和 Zn 的总量及 DTPA 提取态含量均较高。土壤 pH 值和 CEC 的变异较小,有机质含量整体较低,大多在 1% 以下。

2.2 蚯蚓组织重金属生物累积特征

蚯蚓组织重金属生物累积特征如图 1 所示,与以往研究结果一致^[23-24],蚯蚓对不同重金属的吸收和富集能力不同,对 6 种重金属的平均富集系数的大小顺序为: Cd>Cu>Zn>Ni>Pb>Cr。其中, Cu 和 Zn 的富集系数接近,这一现象与多数报道结果^[25-26]一致,这是因为 Cu 和 Zn 元素均为生物必需元素; Cr、Ni 和 Pb 的生物富集系数之间的差异也较小,并且这 3 种元素与 Cd、Cu 和 Zn 相比均明显较低,这主要是由于这 3 种元素在土壤中的生物有效性含量较低。同时,蚯蚓对 Cd 的 BCF 均值为 4.00,而其他元素 BCF 均值均<1,这是因为土壤中 Cd 具有较强的迁移性,易被蚯蚓吸收富集^[27-28]。譬如,本研究中 Cd 的 DTPA 浸提率为 7.71%~22.0%,明显高于其他 5 种元素;并且蚯蚓能够通过取食摄入和皮肤直接吸收 2 种方式吸收累积土壤中的 Cd,对于其他元素,取食摄入与土壤成分结合的重金属,是其进入蚯蚓组织的最主要方式^[29]。

此外,本研究采用了野外实际污染土壤,存在多金属复合污染现象,复合污染元素之间的相互作用能够影响生物的吸收和累积。Traudt 等^[30]在植物试验中发现,重金属 Ni、Cu 和 Cd 复合污染下,植物 *Lemna minor* 对这 3 种重金属的吸收均存在竞争作

用,但是进入植物组织内以后只有 Cu 与 Cd 之间存在着竞争作用。因此,在复合污染生态效应评价中必须考虑污染物的生物累积特征。

2.3 有效生物标志物筛选

对不同污染程度土壤样品培养下的蚯蚓生物标志物毒性响应进行单因素方差分析,结果如表 2 所示,6 种蚯蚓生物标志物响应均呈显著差异 ($P<0.01$)。对蚯蚓生物标志物毒性响应数据采用 KMO 检验和 Bartlett 检验,结果表明, KMO 为 0.503 (>0.5) 且 Bartlett 检验显著 ($P<0.01$),表明该数据可以采用 PCA 进行分析。PCA 和聚类分析结果(图 2(a))表明, PC1 和 PC2 的方差贡献率分别为 30.1% 和 23.6%; 不同样点土壤处理下生物标志物响应可以分为 3 个组,第 1 组(G1)包括 S3、S7、S8 和 S9,第 2 组(G2)包括 S2 和 S13,第 3 组(G3)包括 S1、S4、S5、S6、S10、S11 和 S12。对分组结果进行 ANOSIM 分析,结果表明 3 个分组的样点之间存在显著差异 ($P<0.01$)。而对 3 个组之间土壤重金属总量、DTPA 提取态含量以及蚯蚓生物累积浓度之间的污染物生物体内和体外暴露量进行比较分析发现,重金属 Cd 和 Zn 在 G1 的 3 类暴露指标与 G3 相比均显著较高 ($P<0.05$),与 G2 相比升高程度不显著;而其他的重金属在 3 个组之间均无显著差异(图 3)。因此可以认为,在 3 个组的样点土壤培养下蚯蚓健康状况由好到差的次序如下: G3>G2>G1; PC1 从左到右也因此体现了蚯蚓健康状况由差至好的趋势。

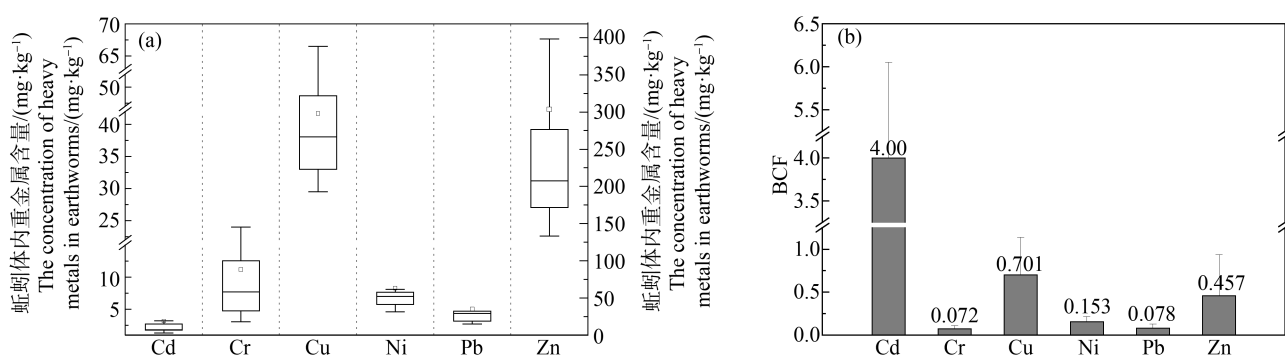


图 1 蚯蚓组织重金属的生物累积量 (a) 和生物富集系数 (BCF) (b)

注:图(a)中 Cd、Cr、Cu、Ni 和 Pb 采用左边的纵坐标, Zn 采用右边的纵坐标。

Fig. 1 The concentrations (a) and the bioconcentration factors (BCF) (b) of heavy metals in earthworms

Note: In Fig.(a), Cd, Cr, Cu, Ni and Pb correspond to the ordinate on the left, and Zn corresponds to the ordinate on the right.

通过 BVSTEP 法进行有效生物标志物筛选,结果表明, GSH、MDA 和 CAT 的组合与其他所有生物标志物的组合显著相关,因此,它们的组合可以视为

所有生物标志物响应的最小数据集。通过 3 个有效生物标志物响应与主成分 1 (PC1) 的回归分析结果(图 2(b)~(d))发现, GSH 和 MDA 含量随着蚯蚓健

健康状况的增加而显著降低($P<0.01$),而 CAT 活性随着健康状况的增加而显著增加($P<0.01$)。

2.4 土壤主导污染物识别

进一步采用 CCA 分析生物标志物响应与土壤重金属总量、DTPA 提取态含量和蚯蚓重金属生物累积量之间的相关性。采用 VIF 法对 CCA 建模中的冗余环境因子进行选择,结果表明只有 DTPA-Cu 和 DTPA-Pb 的 VIF 值 >10 (表 3),说明两者之间存在显著自相关关系($P<0.01$),而土壤重金属总量和蚯蚓生物累积量在 6 种重金属之间不存在多种共线性。因此仅对土壤重金属 DTPA 提取态含量与生物标志物响应的 CCA 分析中剔除了 DTPA-Cu。CCA 分析结果表明,首先,土壤重金属总量对生物标志物响应变化的相关性显著的为 Cu、Cd、Zn 和 Pb 元素,贡献率分别为 3.90%、54.0%、17.3% 和 11.8%;土壤重金属 DTPA 提取态相关性显著的元素为 Cr、Cd 和 Zn 元素,贡献率分别为 5.40%、53.8% 和 22.7%;蚯蚓生物累积重金属相关性显著的元素为 Cd、Cu 和 Zn 元素,贡献率分别为 41.1%、14.6% 和 28.2%(图 4)。

表 2 不同重金属污染程度的样点土壤中蚯蚓生物标志物响应的方差分析

Table 2 ANOVA of biomarker responses in earthworms treated with different levels of heavy metal contaminated site soil

生物标志物 Biomarkers	自由度(df) Degree of freedom (df)	F 值 F value	显著性(P) Significance(P)
总蛋白 Total protein	12	5.18	<0.01
SOD	12	4.67	<0.01
GSH	12	5.05	<0.01
MDA	12	5.70	<0.01
MT	12	7.32	<0.01
CAT	12	9.81	<0.01

注:SOD 表示超氧化物歧化酶;GSH 表示还原型谷胱甘肽;MDA 表示丙二醛;MT 表示金属硫蛋白;CAT 表示过氧化氢酶。

Note: SOD represents superoxide dismutase; GSH represents reduced glutathione; MDA represents malondialdehyde; MT represents metallothionein; CAT represents catalase.

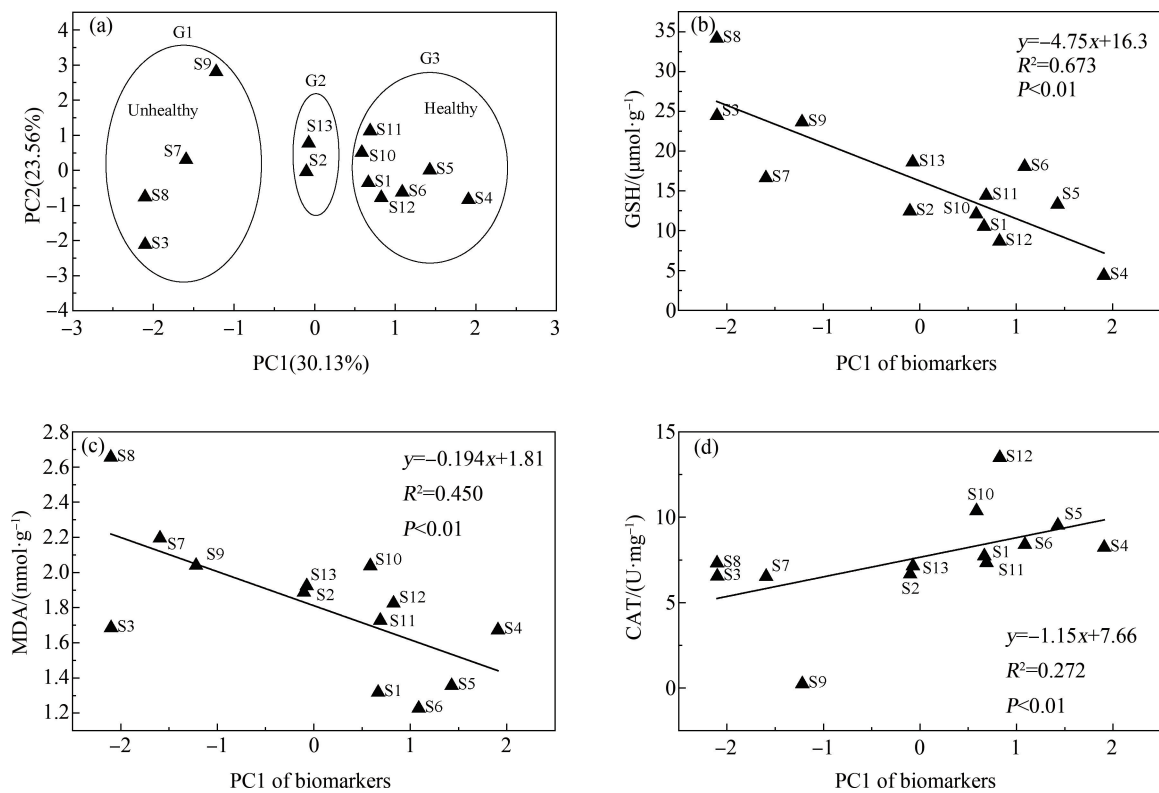


图 2 蚯蚓生物标志物响应的多元分析

注:(a) PCA 结合聚类分析;(b~d) 有效生物标志物 GSH、MDA、CAT 与第一主成分之间的回归分析结果。

Fig. 2 Multivariate analysis of biomarkers responses of earthworms

Note: (a) Principal component analysis (PCA) superimposed with cluster analysis; (b) ~ (d) Regression analysis between each effective biomarkers GSH, MDA and CAT and the first principle factor.

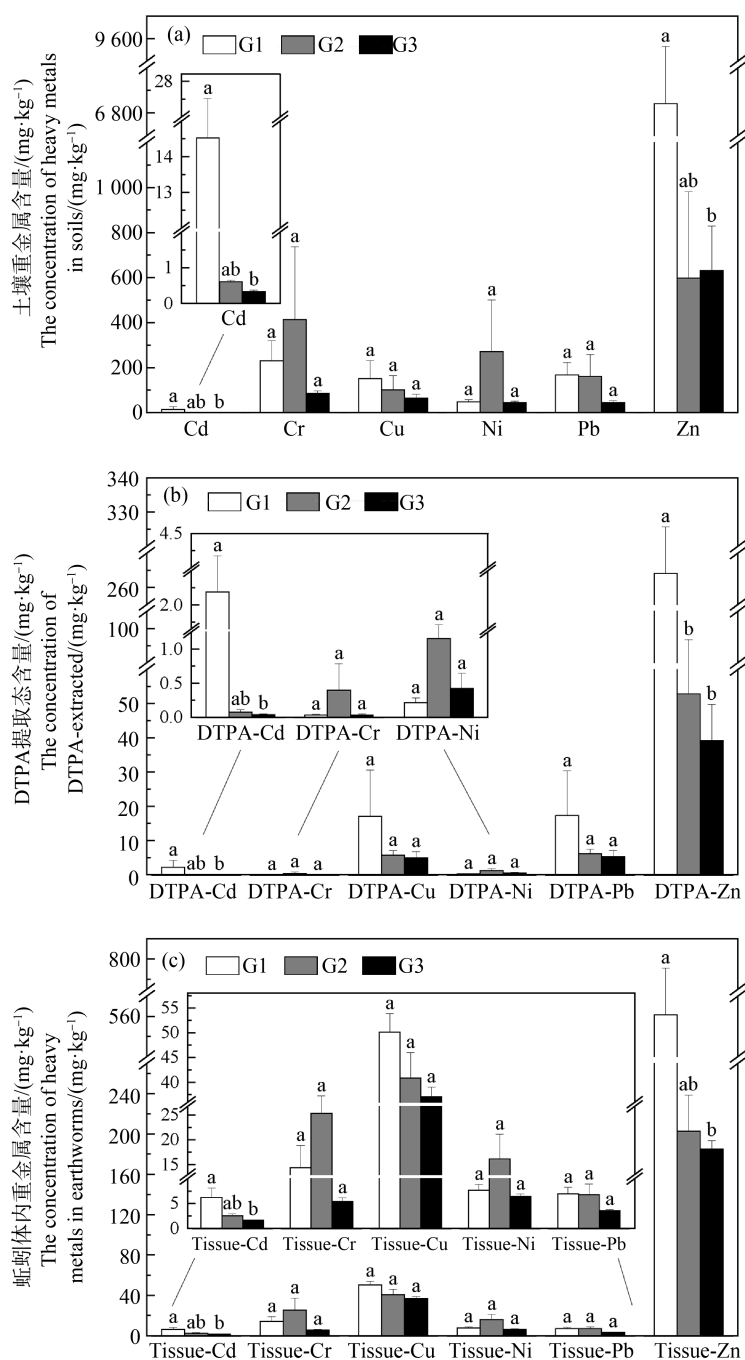


图3 不同样点分组(G1、G2、G3)之间重金属含量的比较

注:(a) 土壤总量;(b) DTPA 提取态含量;(c) 蚯蚓体内生物累积量的比较。

Fig. 3 Comparison in heavy metal concentrations among the three divided groups (G1, G2, G3)

Note: (a) Soil total heavy metal concentrations; (b) DTPA-extracted heavy metal concentrations;

(c) Earthworm bioaccumulation of heavy metal concentrations.

由此可见,重金属 Cd 和 Zn 对生物标志物响应变化的贡献率在 3 类暴露方式下均较高,综合以上 3 个组(G1、G2 和 G3)体内和体外重金属暴露量比较结果,可以认为重金属 Cd 和 Zn 为引起蚯蚓生物标志物响应变化的主导污染物。

2.5 重金属复合污染对蚯蚓生物标志物的毒性效应评价

对 3 类特征生物标志物响应,即,GSH、MDA 和 CAT 分别进行与主导污染物 Cd 和 Zn 的土壤总量、DTPA 提取态含量以及蚯蚓生物累积量的逐步回

归,结果如表 4 所示,蚯蚓 GSH 含量的变化与土壤 Cd 总量及 Zn 的 DTPA 提取态含量之间存在多元线性关系;蚯蚓 MDA 含量的变化能够通过土壤 Cd 的 DTPA 提取态含量进行预测;CAT 活性的变化能够通过 Zn 的土壤总量及蚯蚓生物累积含量进行预测。

由于蚯蚓的 GSH 含量和 CAT 活性的变化涉及 2 种类型的污染物暴露,因此基于表 4 的回归方程,进一步采用 CA 模型来综合计算 2 类暴露的复合半效应浓度^[31],结果如图 5 所示。以蚯蚓组织 GSH 含量变化为毒性效应终点的土壤 Cd 总量及 Zn 的 DTPA 提取态含量的复合半效应浓度(EC_{50mix})在各个

表 3 方差膨胀因子分析 (VIF)
Table 3 Variance inflation factor (VIF) analysis

环境因子 Environmental factors	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
土壤重金属含量 Total heavy metals in soil	3.24	7.26	4.15	3.97	1.50	3.53
DTPA 提取态重金属含量 DTPA-extracted heavy metals	4.03	1.77	508	1.27	497	5.23
蚯蚓重金属生物累积量 Bioaccumulated heavy metals in earthworms	2.26	4.56	1.61	4.95	5.52	3.97

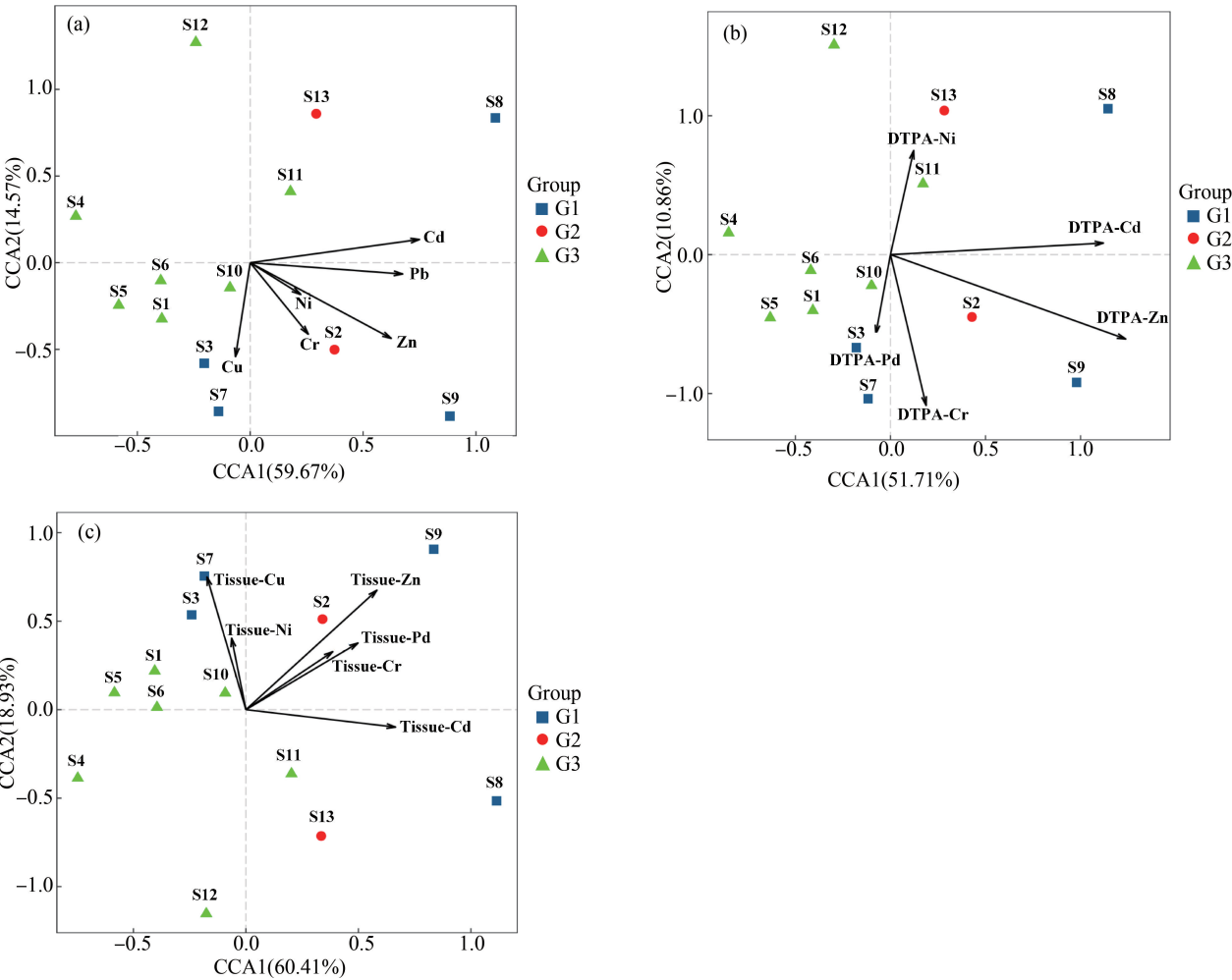


图 4 蚯蚓生物标志物响应与土壤重金属 (a)、土壤 DTPA 提取态含量 (b) 和蚯蚓重金属累积量 (c) 的 CCA 分析结果
Fig. 4 CCA analysis of biomarkers responses of earthworms and the concentration of heavy metals (a), the concentration of DTPA-extracted in soils (b), and the concentration of heavy metals in earthworms (c)

样点均低于实测浓度(图 5(a));以 MDA 含量变化为毒性效应终点的 EC_{50} 值在 S3、S7、S8 和 S9 等 4 个样点低于实测值(图 5(b));以蚯蚓组织 CAT 为毒性

效应终点的土壤 Zn 总量及蚯蚓生物累积含量的 EC_{50mix} 值在 S2、S3、S4、S7、S8、S9 和 S10 等 7 个样点低于实测值。以上结果一方面表明,3 类有效生物

表 4 有效生物标志物响应与重金属暴露的回归方程

Table 4 Regression equations between the responses of effective biomarkers and heavy metal exposures

生物标志物 Biomarker	回归方程 Regression equation	决定系数(R^2) Coefficient of determination (R^2)	P
GSH	$GSH=7.58\log(Cd)-2.89\log(DTPA-Zn)+19.3$	0.305	<0.01
MDA	$MDA=0.245\log(DTPA-Cd)+2.07$	0.251	<0.01
CAT	$CAT=-1.13\log(Zn)-2.98\log(Tissue-Zn)+17.2$	0.359	<0.01

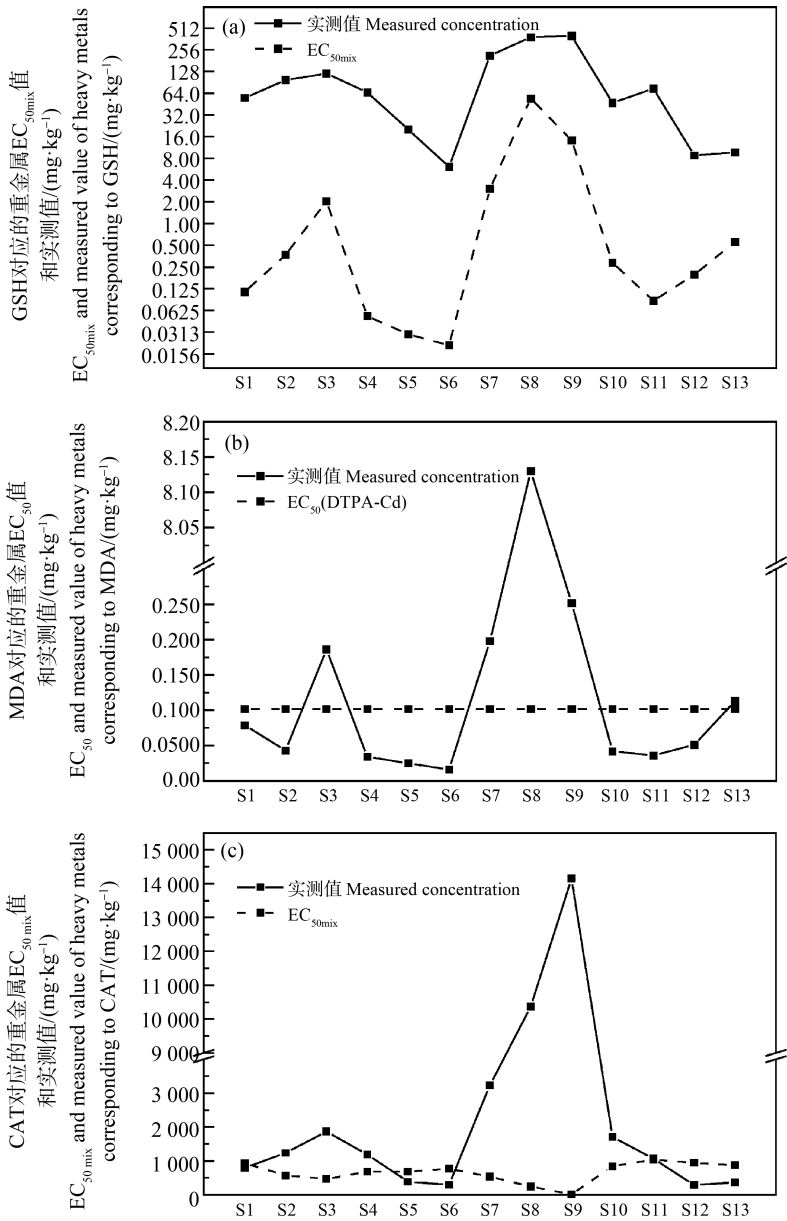


图 5 主导污染物暴露的 EC_{50} 值及其实测值的比较

Fig. 5 Comparison of calculated EC_{50} and measured concentration of dominant heavy metals

标志物的敏感性从高到低的顺序为: GSH>CAT>MDA。这 3 类生物标志物都与生物的抗氧化系统有关,其中 GSH 作为一种含有巯基基团的三肽,易与重金属离子结合,减轻重金属污染物对蚯蚓组织的损伤;此外,重金属污染物会造成蚯蚓体内活性氧(ROS)升高,GSH 作为一种重要的还原剂底物,在清除 ROS 的生化反应中起重要作用,并被氧化为氧化型谷胱甘肽(GSSG)^[12,32]。当 GSH 消耗量突然增高导致其含量下降时,作为一种对环境污染的应激机制,生物体会诱导合成更多的 GSH 作为反馈^[33]。另一方面,从主成分分析及多元回归分析的结果中可以发现,不同元素以及不同类型暴露之间(如,与 GSH 含量变化对应的土壤总 Cd 与 DTPA-Zn),以及同一元素不同暴露之间(如,与 CAT 活性变化对应的土壤总 Zn 与蚯蚓组织生物累积 Zn)都有可能存在交互作用,而这些污染物暴露之间不存在暴露量变化的相关性。尤其是土壤总 Zn 与生物累积 Zn 之间,由于 Zn 元素对生物的独特作用,导致蚯蚓的生物累积 Zn 与土壤总 Zn 含量之间的相关性不显著,但是 2 类暴露均与 CAT 活性变化有关。

综上所述,本研究结果表明,针对野外实际土壤重金属复合污染,采用多元统计分析手段,通过有效生物标志物响应、主导污染物的筛选以及联合效应估算,能够实现生态效应的定量评价。

通讯作者简介:王美娥(1975—),女,博士,副研究员,主要研究方向为生态毒理学。

参考文献(References):

- [1] 骆永明. 中国污染场地修复的研究进展、问题与展望[J]. 环境监测管理与技术, 2011, 23(3): 1-6
Luo Y M. Contaminated site remediation in China: Progresses, problems and prospects [J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2011, 23(3): 1-6 (in Chinese)
- [2] 中华人民共和国环境保护部和国土资源部. 土壤污染状况调查公报[J]. 中国环保产业, 2014(5): 10-11
- [3] 陈志良, 赵述华, 周建民, 等. 典型电镀污染场地重金属污染特征与生态风险评价[J]. 环境污染与防治, 2013, 35(10): 1-4, 11
Chen Z L, Zhao S H, Zhou J M, et al. Pollution characteristics and ecological risk assessment of heavy metals in contaminated site of a typical electroplating factory [J]. Environmental Pollution & Control, 2013, 35(10): 1-4, 11 (in Chinese)
- [4] 薛成杰, 方战强, 王伟. 电子废物拆解场地复合污染土壤修复技术研究进展[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(1): 103-108
Xue C J, Fang Z Q, Wang W. Review on remediation technology of composite polluted soil in electronic waste dismantling site [J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(1): 103-108 (in Chinese)
- [5] 王美娥, 丁寿康, 郭观林, 等. 污染场地土壤生态风险评估研究进展[J]. 应用生态学报, 2020, 31(11): 3946-3958
Wang M E, Ding S K, Guo G L, et al. Advances in ecological risk assessment of soil in contaminated sites [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(11): 3946-3958 (in Chinese)
- [6] Beyer J, Petersen K, Song Y, et al. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper [J]. Marine Environmental Research, 2014, 96: 81-91
- [7] Li X Z, Wang M E, Jiang R, et al. Evaluation of joint toxicity of heavy metals and herbicide mixtures in soils to earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. Journal of Environmental Sciences, 2020, 94: 137-146
- [8] 李勋之. 城市土壤重金属与环草隆复合污染对蚯蚓的生态效应研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018: 9-10
Li X Z. Ecological effects of combined pollution between heavy metals and siduron on earthworms in urban soils [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2018: 9-10 (in Chinese)
- [9] Davis B N K, French M C. The accumulation and loss of organochlorine insecticide residues by beetles, worms and slugs in sprayed fields [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1969, 1(1): 45-55
- [10] 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)
- [11] Li X Z, Wang M E, Chen W P, et al. Ecological risk assessment of polymetallic sites using weight of evidence approach [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 154: 255-262
- [12] 王坤. 蚯蚓对长期重金属污染土壤的生态适应性及其解毒机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2018: 66-86
Wang K. The ecological adaptability and detoxification mechanisms of earthworm in long-term heavy metal con-

- taminated soil [D]. Beijing: China Agricultural University, 2018: 66-86 (in Chinese)
- [13] Beaumelle L, Hedde M, Vandenbulcke F, et al. Relationships between metal compartmentalization and biomarkers in earthworms exposed to field-contaminated soils [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 224: 185-194
- [14] 颜增光, 何巧力, 李发生. 蚯蚓生态毒理试验在土壤污染风险评价中的应用[J]. *环境科学研究*, 2007, 20(1): 134-142
- Yan Z G, He Q L, Li F S. The use of earthworm ecotoxicological test in risk assessment of soil contamination [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, 20(1): 134-142 (in Chinese)
- [15] 中华人民共和国生态环境部. 建设用地土壤污染状况调查 技术导则: HJ 25.1—2019[S]. 北京: 中华人民共和国生态环境部, 2019
- [16] 中华人民共和国生态环境部. 土壤 pH 值的测定 电位法: HJ 962—2018[S]. 北京: 中国环境出版集团, 2018
- [17] International Organization for Standardization (ISO). Soil quality. Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis): ISO 10694—1995 [S]. Geneva: ISO, 1995
- [18] 中华人民共和国环境保护部. 土壤 阳离子交换量的测定 三氯化六氨合钴浸提-分光光度法: HJ 889—2017 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2017
- [19] 中华人民共和国环境保护部. 土壤 8 种有效态元素的测定 二乙烯三胺五乙酸浸提-电感耦合等离子体发射光谱法: HJ 804—2016[S]. 北京: 中国环境出版集团, 2016
- [20] 王美娥, 彭驰, 陈卫平. 宁夏干旱地区工业区对农田土壤重金属累积的影响[J]. *环境科学*, 2016, 37(9): 3532-3539
- Wang M E, Peng C, Chen W P. Impacts of industrial zone in arid area in Ningxia Province on the accumulation of heavy metals in agricultural soils [J]. *Environmental Science*, 2016, 37(9): 3532-3539 (in Chinese)
- [21] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中多元素的测定: GB 5009.268—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [22] Zuur A F, Ieno E N, Elphick C S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2010, 1(1): 3-14
- [23] 伏小勇, 秦赏, 杨柳, 等. 蚯蚓对土壤中重金属的富集作用研究[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(1): 78-83
- Fu X Y, Qin S, Yang L, et al. Effects of earthworm accumulation of heavy metals in soil matrix [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(1): 78-83 (in Chinese)
- [24] Nannoni F, Rossi S, Protano G. Soil properties and metal accumulation by earthworms in the Siena urban area (Italy) [J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 77: 9-17
- [25] Wang K, Qiao Y H, Zhang H Q, et al. Bioaccumulation of heavy metals in earthworms from field contaminated soil in a subtropical area of China [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 148: 876-883
- [26] Dai J, Becquer T, Henri Rouiller J, et al. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(1): 91-98
- [27] Ernst G, Zimmermann S, Christie P, et al. Mercury, cadmium and lead concentrations in different ecophysiological groups of earthworms in forest soils [J]. *Environmental Pollution*, 2008, 156(3): 1304-1313
- [28] 陈娴, 王晓蓉, 季荣. 蚯蚓(*Eisenia foetida*)对水稻土中 Cd 的富集及其氧化应激[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(8): 1464-1469
- Chen X, Wang X R, Ji R. Bioaccumulation and oxidative stresses of cadmium in earthworm *Eisenia foetida* in a paddy soil [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(8): 1464-1469 (in Chinese)
- [29] Becquer T, Dai J, Quantin C, et al. Sources of bioavailable trace metals for earthworms from a Zn-, Pb- and Cd-contaminated soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(8): 1564-1568
- [30] Traudt E M, Ranville J F, Meyer J S. Acute toxicity of ternary Cd-Cu-Ni and Cd-Ni-Zn mixtures to *Daphnia magna*: Dominant metal pairs change along a concentration gradient [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(8): 4471-4481
- [31] 徐小庆, 郭璞, 王晓静, 等. 浓度加和模型与独立作用模型在化学混合物联合毒性预测方面的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(4): 91-94
- Xu X Q, Guo P, Wang X J, et al. Progress on CA and IA models in combined toxicity prediction of chemical mixtures [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(4): 91-94 (in Chinese)
- [32] 王秋林, 王浩毅, 王树人. 氧化应激状态的评价[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(10): 2069-2074
- Wang Q L, Wang H Y, Wang S R. Assessment of the state of oxidative stress [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2005, 21(10): 2069-2074 (in Chinese)
- [33] van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13(2): 57-149