

摘要

本文以浮游动物大型水蚤作为研究对象,以生物体内金属积累量、金属硫蛋白(MT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性以及吸收、同化作用等作为测试指标,利用同位素示踪技术、生物化学技术以北京市不同功能水体作为研究案例,系统研究了水体中重金属污染物质的生物毒性、生物有效性,主要研究内容包括:

(1)调查了北京市不同功能的三条代表性河流(清河:纳污排洪;京密引水渠:供水水源;小月河:景观用水)的水质和急性毒性状况,并运用主成分分析方法探讨了毒性产生的原因;(2)采用实验室模拟方法研究了受金属 Cd、Cu、Zn 污染水体的生物积累、生物标志物的诱导作用,并探讨了这些生物毒性指标之间的相互关系,在此基础上,研究了水环境中有机络合剂对水体中 Cu 的毒性作用的影响;(3)在国内首次建立了利用稳定同位素 ^{65}Cu 作为示踪剂研究金属对大型水蚤的生物有效性的方法,对大型水蚤暴露的溶液和食物进行标记,研究了大型水蚤对水相中 Cu 的吸收、食物相同化和生物的生理排出过程,建立了生物能量动力学模型。

通过以上的研究,得到如下主要结论:1)京密引水渠水质一般,生物毒性很低,能够满足饮用水源水使用要求,但须加强管理;清河水质较差,生物毒性极高,可作为纳污排洪功能水体使用;小月河总体水质一般、毒性不高,符合景观用水的要求;水样生物毒性与 Cl^- 、Ca、K、Li、Mn、Na、Cr、Ni 等指标有关;内梅罗水质指数与 NO_2^- 、 Cl^- 、K、Na、Ni 等指标有关,说明水质的优劣并不能反映水体综合毒性的大小,结合化学指标和毒理学指标共同评价水体污染更为合理;2)大型水蚤体内积累的重金属含量(Body burden)、MT 的含量会随着水环境中的重金属浓度的升高而升高;SOD 的活性会随着水环境中的重金属浓度的升高、暴露时间的延长(0-72h)而呈现出先升高后下降的峰值变化;3)大型水蚤体内金属积累量(Body burden)与 MT 含量之间存在着显著的正相关关系,与 SOD 的活性之间存在显著的负相关关系;以大型水蚤体内的 MT 含量、body burden/MT 的比值来指示水体受到重金属的污染程度具有一定的应用前景;4)Zn 和 Cd 两种金属的联合暴露结果表明,两种重金属之间的联合作用在低浓度时表现为毒性增加的协同作用;在中等浓度时表现为近似相加作用;在高浓度时表现为拮抗作用;5)有机络合剂能显著的改变 Cu 在水体中的形态分布,有效的减少了大型水蚤体内重金属含量(Body burden)以及诱导的 MT 含量,并且络合态的 Cu 也对大型水蚤产生了一定的毒性;6)大型水蚤对水相中的铜的吸收与水相中铜的浓度具有显著的线性相关关系,受净化作用的影响很小,吸收速率常数为 $0.302 \pm 0.188 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$;大型水蚤对食物重金属的同化率(AE)为 $(17.2 \pm 2.33)\%$,生理循环速率常数 k 为 0.50 d^{-1} ;大型水蚤对铜的排出速率常数 k_e 为 0.277 d^{-1} ,

根据以上参数定量比较了大型水蚤在水体中水相吸收与食物相吸收的重要性,结果表明水相吸收是大型水蚤体内铜积累的主要途径。

关键词: 重金属; 金属硫蛋白; 超氧化物歧化酶; 有机络合剂; 稳定同位素示踪;
生物积累; 生物有效性; 生物毒性

Abstract

In the present study, body burden, metallothionein (MT), superoxide dismutase (SOD), uptake and assimilation of zooplankton, *Daphnia magna* using as testing organism, were determined with stable isotope tracing technology and biochemical methods to study the biotoxicity and bioavailability of trace metals in aquatic environment. Several functional rivers in Beijing were investigated and the main contents of researches were as follows: (1) Three representative rivers with different functions in Beijing (Qing River: waste drainage; Jingmi Diversion Canal: water supply; Xiaoyue River: recreational water) were investigated on water quality and acute toxicity. The reasons for toxicity were discussed with principal component analysis; (2) Bioaccumulation and biomarker induction of Cd, Cu and Zn in polluted water were evaluated with experimental simulations and the relationships among these biotoxicity indicators were probed. Basing on the knowledge, the influences of organic chelants to Cu toxicity were investigated in aquatic environment; (3) The stable isotope ^{65}Cu was used as a tracer for the first time in domestic researches to study Cu bioavailability in daphnids. With labeling the exposure medium and food of daphnids, the uptake from the dissolved phase, assimilation, efflux and bioenergetic-based kinetic model were investigated.

Through the researches mentioned above, the main conclusions were included as follows: (1) With extremely low toxicity, Jingmi Diversion Canal could be used as drinking water supplies; however, water management should be paid more attentions because of the fair water quality. Qing River which had bad water quality and high biotoxicity could be used for dredging and dewatering. Xiaoyue River was qualified to be a recreational one for its fair water quality and low toxicity. Cl⁻, Ca, K, Li, Mn, Na, Cr and Ni could affect the toxicity of water. Water quality evaluated by Nemer index had the relationship with NO₂⁻, Cl⁻, K, Na and Ni, which indicated that water quality classification could not fully reflect toxicity of water. It was much more reasonable to evaluate water quality by combining chemical and toxic indicators; (2) The body burden accumulated and MT induced in daphnids were increased with increasing metal concentrations in aquatic environment. The activities of SOD increased initially and then decreased with the increase of metal concentrations in the duration of 72 h; (3) The body burden in daphnids had significantly positive correlation with MT induced by metal, whereas it had a negative correlation with the activities of SOD. It was feasible to applied quantity of metallothionein and body burden/MT ratio to indicate the polluted degree of trace metals in waters; (4) With the combined exposure of Cd and Zn, the toxicity was synergistic at the low concentration, approximately additive at the medium concentration and antagonistic at the high concentration of

Cd and Zn; (5) The organic chelants significantly affected the speciation of Cu in waters and Cu combined with organic chelants was also toxic to daphnids; (6) The uptake from the dissolved phase was significantly affected by Cu concentration in the medium and less influenced by efflux. The uptake rate constant from the dissolved phase was $0.302 \pm 0.188 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, Cu assimilation efficiency was $17.2 \pm 2.33\%$, the physiological turnover rate constant was 0.50 d^{-1} , and the efflux rate constant was 0.277 d^{-1} . The relative fractions of waterborne and dietborne uptake could be quantified with the kinetic parameters. The results demonstrated that the uptake from the dissolved phase was the main uptake route of Cu accumulation in daphnids.

Key words metal; metallothionein; superoxide dismutase; organic complex agents; stable isotopes trace; bioaccumulation; bioavailability; biotoxicity

独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得北京工业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本文所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签名: 张勇 日期: 09.03.01

关于论文使用授权的说明

本人完全了解北京工业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

(保密的论文在解密后应遵守此规定)

签名: 张勇 导师签名: 佘陈海 日期: 09年3月5日

第1章 绪论

50年代以来,随着工农业的发展,各类化学物品进入市场并转入环境。目前在美国化学文摘中登记的化学物质已超过2000万种,进入环境的有数万种,此外,每年全球市场还要增加1500-2000种新的化学物质。这些化学物质都会对环境以及人类健康构成极大的危害。随着日本的水俣镇和富山神通川发现了“水俣病”和“骨痛病”,人们从而确认水中的重金属污染物可以通过食物链传递进入人体并对人类造成严重的危害。重金属污染是近年水环境污染的公害之一,且形势十分严峻。重金属是一类典型的环境污染物,普遍存在于岩石、土壤、大气、水体和生物体内,并不断的进行自然环境中的迁移循环。

随着全球经济的迅速发展,重金属通过矿山开采、金属冶炼加工、化工废水的排放、农药化肥的滥用,生活垃圾的弃置等人为污染及地质侵蚀、风化等天然源形式进入水中,而重金属污染又具有易被生物富集、并有生物放大效应、且毒性大等特点,因此水中的重金属污染不仅污染了水环境,也严重危害了人类及各类生物的生存。目前淡水资源日益枯竭,而人类对淡水的需求量却在日益增加,未加处理的大量废水污染了水环境,严重影响了水生生态结构和水资源的有效利用。近几年来,我国水体重金属污染日益加重,重金属在水环境中不能被微生物降解,只能发生各种形态之间的相互转化及分散和富集过程而进行重金属迁移。因而,当水环境中重金属浓度升高时,水体中的重金属就会对水生生物产生毒害的作用,对水生生态环境和生物安全造成严重危害。

重金属是指密度4.0以上的约60种元素或密度在5.0以上的45种元素。砷、硒是非金属,但是它的毒性及某些性质与重金属相似,所以将砷、硒列入重金属污染物范围内。环境污染方面所指的重金属主要是指生物毒性显著的汞、镉、铅、铬以及类金属砷,还包括具有毒性的重金属锌、铜、钴、镍、锡、钒等污染物。

甲壳类动物对水环境的变化反应十分灵敏,当水环境中的重金属达到一定浓度时,就会引起一系列中毒反应,例如行为异常、生理功能紊乱、组织细胞病变等等,直至死亡。大型水蚤(*Daphnia magna*)是一类重要的甲壳类动物,在水生生态系统之中分布广泛,在水生食物链中具有极其重要的位置,在毒理学和生态风险评价中具有重要的价值。因此,随着重金属毒理的研究越来越为人们所重视,全面而深入的研究和揭示重金属离子对大型水蚤毒性效应的影响不仅具有重要的理论意义,而且具有重要的实际意义。

重金属离子对甲壳动物毒性效应的研究主要包括致死浓度、机体的累积以及在亚致死浓度下的生化效应等。目前,国内外学者对水生生态系统中的重金属污染进行了广泛而深入的研究,并取得了重要的成果。为进一步推动重金属污染的理论研究与防治,本论文针对主要重金属元素(Cd和Zn、Cu)以及淡水水生生

态系统中重金属污染对大型水蚤产生的生物毒性作用,分别从大型水蚤的半数致死、抑制浓度(LC₅₀, EC₅₀)、体内的重金属含量(Body burden)、MT含量和体内的SOD活性四方面以及它们之间的联系全面阐述了重金属离子对大型水蚤致毒解毒的生化效应。

1.1 水环境污染现状

随着人口的增加,工农业生产建设的不断发展,水环境污染问题已十分突出,严重制约着流域社会、经济和环境的可持续发展。目前,我国主要流域水系中,湖泊水资源总量达6380亿m³,地下水可开采量2900亿m³,占我国城镇饮用水水源的70%以上,国民生产总值占全国的80%以上。我国沿海海水资源也非常丰富,我国海岸线长达18000多公里,全国人口的1/3集中在沿海省市,工农业总产值占有量更是达到了全国的60%以上。我国主要水资源的保护直接涉及我国今后人口健康素质的变化和国家经济的发展状况,因此有必要从国家安全性的战略角度重视水资源的环境保护问题。虽然我国水资源总量居世界第六位,但是我国人均水资源占有量只有2300m³,约为世界平均水平的1/4,排在第121位,是世界上13个贫水国之一。从总体上看,随着经济的快速增长,水环境质量总体上仍在下降。以城市为中心的环境污染仍然呈恶化的趋势,具体表现为地表水污染普遍,特别是流经城市的河段有机污染严重;湖泊富营养化问题突出;地下水受到点状或面状污染,水位持续下降,加剧了水资源的供需矛盾;生态破坏加剧的趋势尚未得到有效控制。根据我国近年来对全国109700公里河流进行的评价,我国河流长度有70.6%被污染,污染程度已相当严重。2006年,全国七大水系的411个地表水监测断面中有27%为劣V类水质,基本丧失使用功能。在七大水系中,海河流域污染最为严重,长江流域污染相对较轻。

水环境污染分为化学性污染(污染物质为化学物品而造成的水体污染)、物理性污染(不溶性悬浮物质污染、热污染、放射性污染)和生物性污染(生活污水)三大类,其中最具代表性的是无机、有机污染和重金属污染。各种无机污染物如强酸、强碱等;各种有机污染物如有机农药、多环芳烃、芳香烃等;和各种重金属Cu、Cd、Hg、As和Pb等;如重金属在其危害环境方面的特点是:微量浓度即可产生毒性(一般为1~10mg·L⁻¹);在微生物作用会转化为毒性更强的有机金属化合物(如洋—甲基汞);可被生物富集,通过食物链进入人体,造成慢性路线。亲疏重金属元素(Hg、Cd、Pb、Zn、Sn、Cu、As等)与人体组织某些酶的巯基(-SH)有特别大的亲合力,能抑制酶的活性。重金属对环境造成的污染已经屡见不鲜,如水俣病、骨痛病以及2000年在罗马尼亚发生的多瑙河污染。目前重金属如Cu、Cd、Zn、Hg和Pb等污染已经严重威胁到了水生生物和人类的健康。

根据水质的优劣其功能用途也不同,环境水体按功能可分为纳污排洪河道用水、娱乐景观用水、供水水源用水。随着水环境污染的日益加重,各水体的原有功能逐渐丧失,已不能再被人们所利用。北京市位于华北平原的西北边缘,地处海河流域,有永定、潮白、北运、大清、蓟运河五大水系,共有大小河流 80 多条。作为原北京市供水水源地的官厅水库因受到有机污染,富营养化现象严重,已在 1997 年停止使用,退出了作为北京水源供水地的行列。而在近几年,密云水库也受到了不同程度的污染,如果不加强保护,势必会造成严重后果。

1.2 污染水体对水生生物的急性毒性

水体是化学品进入环境后的一个重要的归宿地,化学品进入水体后,会对水生生态系统造成影响,其影响的大小与化学品对水生生物的毒性有关,化学品对水生生物的毒性数据可以通过水生生物毒性试验而得到。因此,以水生生物为受试对象的毒性试验在评价水环境受到的污染程度方面起着重要作用。根据受试对象的不同,生物毒性试验大致分为:藻类毒性试验、蚤类毒性试验、鱼类毒性试验等等。

藻类是水体的初级生产者,它对生态系统的平衡和稳定起着十分重要的作用。其种类的多样性和生产量直接影响水生生态系统的结构和功能。在水生毒理学研究中,藻类因其个体小、繁殖快、对毒物敏感等诸多优点越来越受到广泛的应用。不同的污染物质对藻类的致毒效应有所不同,重金属的毒性效应主要表现在影响其生长代谢,抑制光合作用,导致细胞畸形及改变天然环境中种群的组成等方面。例如,汞浓度大于 $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,盐藻的生产率和生产量大幅度降低,在亚致死浓度下,表现为藻细胞体积增大,运动能力丧失^[1]。在氯化镉作用下,淀粉核小球藻、镰型纤维藻和四尾栅藻等线粒体结构明显变化,在线粒体间产生浓颗粒和空胞^[2]。关于有机毒物对藻类的影响研究较少,主要集中在有机毒物对藻生长的抑制和光合作用的影响的方面。有些物质在较低浓度时对藻的生长表现为促进作用,例如多氯联苯 PCB 在 $8\times 10^{-5}\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对蛋白核小球藻, $4\times 10^{-5}\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对斜生栅藻均表现为轻微的刺激生长作用;但在较高的浓度下却导致藻叶绿体解体,细胞结构不完整,破碎细胞残体增高^[3]。

大型水蚤(*Daphnia*,甲壳纲枝角目)是国际上普遍采用的标准毒性试验生物。过去的几十年,大型水蚤的毒理试验得到了广泛的发展,在国内外积累了大量的研究。Eastmond 研究了受多环芳烃污染水体对水蚤的影响,观察了多环芳烃在水蚤体内的积累和排除^[4]。VillegasNavarro 和 Santiago 等人利用大型水蚤测试处理过的工业废水和未经处理的医院排水的 LC50,并对其毒性进行对比^[5]。曲克明^[6]等研究了化纤废水中主要污染物对大型水蚤的急性毒性及联合毒性作用,有毒化学物质对蚤类的损伤表现在对蚤类生殖和生长过程及对子孙性别发育过程

产生干扰等方面。大型水蚤在胚胎期暴露于阿特拉津中会导致性别向雄性分化,在 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 即可以检出^[7]。邻苯二甲酸二丁酯(DBP)对大型水蚤(*Daphnia magna*)的毒性试验表明,低浓度的 DBP 对蚤的生长繁殖有一定的刺激作用,高浓度时对蚤的生长繁殖有抑制作用^[8]。王连生等用大型水蚤研究了 47 种芳烃类有机物结构与活性相关的模式参数研究,从理论上表述了有机物生物活性效应取决于有机物与生物靶分子的结合量和反应过程中靶分子含量,得出芳烃类有机物分子对生物活性的贡献顺序,给出了多元优化方程^[9]。靳立军等研究了取代苯甲醛衍生物的定量结构-活性关系(QSAR),发现其毒性主要取决于苯环上取代基的 Hammett 电效应常数^[10]。

鱼类是水生生态系统的消费者,在食物链上与人类的关系最密切。因此鱼类也常作为水生生物毒性试验的受试对象。目前,对鱼类的研究主要集中于分子水平,尤其是应用生物标志物来评价物质的毒性。乙酰胆碱酯酶(AchE)是通常所用的生物标志物,低浓度的有机磷和氨基甲酸盐会抑制 AchE,导致乙酰胆碱在中心类胆碱神经键的聚集。然而,鱼体能够比较容易地解毒,体内的 AchE 抑制只有在毒物相对较高的浓度下才会被检测出来^[11]。另外,还有采用卵黄蛋白原^[12]、MT^[13]作为毒物毒性试验的生物标志物,均取得了良好的效果。

1.3 水体重金属污染

重金属(Heavy metals)是一类典型的环境污染物,主要是指汞(Mercury, Hg)、镉(Cadmium, Cd)、铅(Lead, Pb)、铬(Chromium, Cr)和类金属砷(Arsenic, As)等生物毒性显著的重元素,也指具有一定毒性的一般重金属如锌(Zinc, Zn)、铜(Copper, Cu)、钴(Cobalt, Co)、镍(Nickel, Ni)、锡(Sin, Sn)等。在这些重金属中,以 Hg 毒性最大, Cd 次之, Pb, Cr, As 也有相当毒性。水体重金属污染主要是指水体中汞(Hg)、铬(Cr)、铅(Pb)、镉(Cd)、锌(Zn)、铁(Fe)、镍(Ni)、锆(Ge)、锰(Mn)、铜(Cu)、钴(Co)等金属离子的浓度超过了一定的浓度标准而引起的。自然水体中重金属原有的浓度一般是不会对其中的水生生物构成威胁,水体重金属污染主要是人类活动所造成,重金属普遍存在于岩石、土壤、大气、水体和生物体内,并不断地进行自然环境中的迁移循环,其含量虽然均低于 0.1%或属于痕量,但污染危害在局部地区却相当明显。水体中的重金属污染主要是冶金、金属加工、机器制造、有机合成及其它工业排放含重金属废水造成的,存在于岩石以及粘土矿物中的重金属,也可通过风化、火山爆发、风暴、生物转化等自然作用进入土壤、大气、水体及生物体中。另外,大气镉尘、铬尘的沉降和雨水对地面的冲刷,都可以使重金属进入江河湖泊水体,使水体受到污染。重金属在水体中不能被微生物降解,只能发生各种形态之间的相互转化及分散和富集过程而进行重金属迁移。水体对重金属离子及其化合物有一定的净化作用,这种作用是水体、淤泥及生物群落等

物理、化学、生物多因素共同作用的结果^[14,15]。

重金属既可以溶解态的形式存在,同时也可以与水中的颗粒物相结合,随着水流作机械运动。在此过程中,重金属与介质之间不断发生化学和生物化学反应,如吸附—解吸、沉淀—溶解、络合作用、水解作用和生物富集等。当水环境条件保持不变时,重金属一旦与沉积物结合,就很难释放出来。但当水环境条件发生变化时,与沉积物结合的重金属有可能出现二次释放,从而产生生态毒性。进入水环境的重金属对水生生物的生长、新陈代谢、繁殖可直接产生危害,同时被生物富集吸收后进入食物链,通过营养级的传递,而最终危害到人类的健康。重金属能被生物吸收,并与生物体内的蛋白质和酶等高分子物质结合,产生不可逆转的变性,导致生理或代谢过程的障碍,或者与脱氧核糖核酸等相互作用而致突变。对不同的官能团,各种重金属有相对不同的亲和能力^[16]。有些重金属是生物体必需的微量营养元素,是细胞结构和酶化合物的重要组成部分,在机体代谢中有着重要的作用。如铜是血、肝等铜蛋白的组成部分,有30种以上的蛋白和酶中含有铜,它起着维持生命正常发育和新陈代谢的作用。锌也是多种酶的组成成分,还可以影响某些非酶的有机分子配位基的结构构型。机体内缺乏这些营养元素时,可引起器官功能下降,导致病变,如锌缺乏导致高密度脂蛋白下降,造成外周组织胆固醇清除障碍,铜缺乏可使胆固醇和甘油酯升高,引起高胆固醇血症^[17]。但当重金属浓度超过生物的生态幅度时又是有毒元素,可以引起生物中毒:如人体铜过量,肝内含铜量会增加数倍,超过忍受限度时,红细胞不能摄取全部铜,铜突然释放到血清内,结果发生溶血。摄入含有过量锌的食物和饮料会引起锌中毒。

另外,有些重金属不是生物体的必需元素,对生物体完全无益。如镉是一种半衰期很长(19至30年)的多器官、多系统毒物,也是一种重要的环境和工业毒物。镉可与含巯基、羟基及氨基的蛋白质分子结合,从而抑制一些酶系统的活性。此外,镉和巯基的亲合力比锌大,故可取代机体内含锌酶中的锌,使其失去功能。如长期摄入微量镉,通过器官组织中的积蓄可引起骨痛病。汞化合物也是非常有毒的物质,汞进入生物体内,与蛋白质中的巯基有高度的亲合力,它与巯基结合形成硫醇盐,可使一系列的含巯基酶的活性和蛋白质的合成受到抑制,致使功能发生变化而中毒。

1.4 重金属对大型水蚤的毒性作用

大型水蚤类对水环境的变化反应十分灵敏,当水体中的重金属达到一定浓度时,就会对大型水蚤产生毒性作用,抑制其生长,甚至死亡。大型水蚤类毒性实验是用来判断污染物毒性的简便而快速的方法,不仅用于测定化学物质毒性强度、测试水体污染程度、检查废水处理的有效程度,也为制定水质标准、评价环

境质量和管理废水排放提供环境依据。

目前,运用大型水蚤进行毒理试验来评价重金属对水环境造成的影响已得到了广泛而深入地研究,重金属对大型水蚤的毒性研究国内外报道已很多,涉及到多种金属污染物(铜、镉、铅、锌、汞、铬和砷等)^[18,19]。例如, Jin-Seok and Harold S.研究了铜化合物对大型水蚤的毒性作用^[20],朱丽和李爱贞在研究乐安江沉积物中重金属铜、铅、锌的形态对大型水蚤的影响中发现,三种重金属的生物可给态对大型水蚤的毒性最大,间接可给态次之,惰性态降低了其有害态对大型水蚤的毒性^[21]。

重金属对大型水蚤的毒性受环境中许多物理、化学以及生物因素影响,包括 pH 值、无机阴离子、水的硬度、其它金属离子、络合物及甲壳类自身因素等。在酸性条件下(pH 5-6),铅的毒性增强^[22]。可溶性有机物,如半胱氨酸、琥珀酸、谷胱甘肽可以降低重金属的毒性,磷酸盐和碳酸盐能降低铅的毒性,可能是由于形成难溶的铅盐的结果。水中络合物(自身代谢产物、天冬氨酸盐等等)可消除 Cd^{2+} 的致死作用^[23]。Penttinen 等研究了溶解的有机物(DOM)和水硬度对于 Cd 对大型水蚤毒性的影响,发现在软水中,DOM 对 Cd 起拮抗作用,而在硬水中(主要是 Ca^{2+} 的增加),由于 Ca^{2+} 与 Cd^{2+} 竞争在 DOM 上的键合位置使得参照和含 Cd 水中的毒性并无差别^[24]。修瑞琴等、高世荣等研究了大型水蚤对含锑冶炼碱渣的急性毒性实验,发现毒性较大^[25]。王珊珊和冯流研究了 5 种含锡有机化合物对大型水蚤的毒性效应,发现三丁基锡毒性最大,一丁基锡毒性最小^[26]。傅迎春等用相加指数法和毒性单位分析法研究了氟和砷,氟与硒对大型水蚤的毒性作用,发现两者均表现为拮抗作用^[27,28]。

重金属离子被大型水蚤体内组织吸收后,一部分可随血液循环到达各组织器官,妨碍组织细胞代谢过程而出现组织学的超微损伤。重金属对这些器官细胞结构的破坏无疑将影响到大型水蚤正常的呼吸、代谢、排泄和繁殖功能,从而导致其死亡。

重金属等污染物进入生物机体后,首先将导致机体一系列的生物化学变化,这些变化广义上说可分为两种:一种是用来保护生物体抵抗污染物的伤害,称之为防护性生化反应;另一种不起保护作用,称之为非防护性反应。防护性反应的机理是通过降低细胞中游离污染物的浓度,从而防止或限制细胞组成成分发生可能的有害反应,消除对机体的影响,如重金属诱导金属硫蛋白,超氧化歧酶等。非防护性生化反应有多种多样,其作用机理也多样化。非防护性生化效应的结果之一是产生对生物体有害的影响^[29]。

1.4.1 重金属对金属硫蛋白(Metallothionein, MT)的诱导

1957 年 Margoshe 和 Valle 首次在马肾中发现并分离出金属硫蛋白(Metallothionein, 简称 MT)^[30],以后发现 MT 广泛存在于各种生物体中。它是一

种位于胞浆的低分子蛋白,半胱氨酸含量极高,约30%,分子量一般在6000-7000道尔顿,对热稳定,金属含量高^[31]。MT对二价金属离子有极高的亲和力,因而在细胞内起着贮存必需的微量金属如Zn、Cu和结合有毒金属如Cd、Hg的作用,它与必需金属的结合起着调节这些金属在细胞内浓度的作用,而与有毒金属的结合则可以保护细胞器免受金属毒性影响。它的一个重要特点是可在转录水平上被环境中的金属所诱导,而且这种诱导与环境中的金属浓度有相关性,可以反映环境中金属的水平,因而是一种重要的分子生态毒理学指标。

高金属含量区域的生物MT的诱导已在无脊椎动物和鱼中得到了证实,拟鲤暴露于水体中浓度为 $100\mu\text{gL}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 时,肝中的MT和Cd浓度均增加^[32]。大型水蚤经水体暴露和摄食,Cu、Zn、Cd均可诱导MT的合成,水体暴露后的检测表明,大型水蚤体内的MT含量与水中金属含量相关性极密切,可以反映暴露的程度。Wang和Guan在2005年研究了经过相同的金属暴露实验,大型水蚤的两种克隆体体内MT变化量的比较以及这两种克隆体子代体内的MT的变化量结果的对比。他们发现,大型水蚤体内MT含量与暴露水平具有较为明显的相关性;并且来自北美的大型水蚤种要比来自中国武汉水生物所的大型水蚤种更加能够耐受金属的毒性,经过金属的诱导后,其体内MT的含量的平均水平要比中国武汉水生物所的高,这两种克隆体的第一子代、第二子代和第三子代也相应的表现出相同的变化水平^[33]。

另外,生物累积Cu、Zn和Cd的容量与其产生MT的能力是成正比的^[34],所以当摄入的重金属剂量超出MT的结合能力时,动物体便会出现中毒症状。

1.4.2 重金属对超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性的影响

重金属等污染物可导致水生生物体内自由基含量的增加,引起氧化胁迫(oxidative stress),因此抗氧化系统不仅可作为监测水体污染的生物标志物,也能从一个侧面揭示污染物对水生生物的毒性机制^[35,36]。SOD是广泛存在于水生生物体内的抗氧化防御性功能酶。近年来,国内外在人工和野外条件下,都开展了污染物对甲壳类动物抗氧化酶活性影响的研究工作,探讨以抗氧化酶作为污染监测指标的可能性^[37,38]。

SOD是生物体抗氧化酶系统的重要组成成分之一^[39]。按其结合的金属离子,SOD主要分为Fe-SOD、Mn-SOD和Zn-SOD^[40]。SOD几乎存在于所有动物的细胞中,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用。SOD能将机体内有毒的超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)转化成无毒的 H_2O 和 O_2 ,从而保证机体免遭自由基的危害。因此,在生物体内维持一定水平的SOD是相当重要的。

在正常的生理状态下,所有的需氧生物代谢产生的活性氧可被抗氧化防御系

统所控制,这个系统的关键组成是一些能够被氧应激诱导的酶类,SOD就是其中的一种^[41]。但当生物体受到重金属等污染物胁迫时,由于许多重金属具有氧化还原活性,可参与生物体内的氧化还原循环,产生大量的活性氧(O_2 , H_2O_2 等),这些活性氧可导致DNA断裂、脂质过氧化、酶蛋白失活等,从而引起生物体强烈的氧化应激反应^[42,43],使得一些能够被氧应激所诱导的酶类,如SOD等含量或活性发生变化,因而,这些酶的含量或活性变化可间接反映环境中氧化污染的存在,能够作为环境污染胁迫的指标^[44]。

当水生生物生活在受到重金属等污染物污染的水体环境中时,这个特殊环境的细微变化都将对它们的生理生化产生一系列的影响,比如体内SOD活性的显著变化^[45]。国内外已有一些科技工作者开展了旨在探讨以抗氧化酶作为水体污染监测指标的基础性工作,并取得了一定的研究成果。目前,重金属Cu、Zn、Cd、Pb对鱼类、蟹类、贻贝类等的研究较多^[46,47],并获得了有价值的观点。另外,也有学者研究了重金属Cd和Zn对大型水蚤(*Daphnia magna*)的SOD活性的影响,发现低浓度的金属对SOD活性具有一定促进作用,高浓度的两种金属都会降低大型水蚤体内SOD的活力,但两种金属对SOD活性的影响明显不同。

许多学者同时在研究中发现,SOD活性与污染物的相互作用关系并不稳定^[48,49],有的研究者在实验中观察到酶活性先升后降^[50],不同污染物作用的结果截然不同^[51],因此,以抗氧化防御系统参数作为水体污染的生物监测指标,还存在许多问题,还需要在更多的有代表性的水生生物和常见的污染物之间做更多的基础研究。

1.5 大型水蚤对重金属的积累和清除

大型水蚤通过吸收、吸附和摄食等途径,能从周围环境中积累、浓缩化学物,也可通过食物链的生物放大作用在体内蓄积。由于污染物性质稳定,不易分解,脂溶性强、与蛋白质或酶有较高的亲和力,被摄入动物体内后即溶于脂肪,很难分解排泄,就会长期残存在生物体内,随着摄入量的增加,这些物质在体内的浓度会逐渐增大。因此,尽管进入环境中的污染物即使是微量的,但由于其难降解和生物放大作用,也可通过食物链转移,使处于高位营养级的生物受到毒害,甚至威胁到人类健康。

当重金属离子进入大型水蚤体内时,一方面大型水蚤摄取重金属污染物,表现为重金属在大型水蚤体内的蓄积;另一方面大型水蚤发挥自身的解毒功能,将毒物向体外释放,以求保持内环境的稳定。因而重金属污染物在大型水蚤体内的蓄积、清除始终处于动态平衡状态。当大型水蚤生活于污染环境时,重金属污染物在大型水蚤体内蓄积占主导,一旦脱离污染环境则清除占主导。国内外学者对 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等重金属离子在大型水蚤体内的蓄积清除规律做过报道^[33],大

型水蚤对重金属离子都有比较强的吸收和蓄积能力,开始接触时蓄积速度较快,以后速度减慢,最终达到动态平衡。大型水蚤因种类、重金属污染物及生存条件相异,蓄积状况也相异。水体镉污染较其它重金属污染可对大型水蚤造成更持久、严重的影响。大型水蚤在受镉污染水域中,体内镉含量不断增加,甚至水中镉含量很低的情况下,大型水蚤体内镉含量亦可达到一定水平。大型水蚤个体存在差异时,重金属的积累和清除会有不同,但一般来讲,对重金属清除的趋势看,Ni和Cd较快,Cu和Pb较慢。重金属在大型水蚤体内的积累也受多种因素的影响,例如有研究者指出混合重金属离子(Cd和Zn)相互作用对两种重金属在大型水蚤体内积累有影响,在低浓度时表现为协同作用,随着浓度的升高,逐渐由相加作用变化为拮抗作用。另外,随着重金属离子种类的增加,相互作用会对其体内积累的影响变得更加显著,但此领域的相关研究还较少。

1.6 水体中重金属生物有效性研究

1.6.1 重金属生物有效性的概念

重金属的生物可利用性,也称作重金属的生物有效性,即是指通过物理接触或者食物形式的消化作用,而使重金属被生物利用转化的情况。这些重金属可以是各种形态的,比如溶解形式的,与各种介质如沉积物、土壤等结合形式的,或者生物形式的。

近几十年来,由于重金属在生物体内的累积可直接对生物产生毒性,人们越来越关注于水生生物对重金属的富集。而大量研究表明,重金属的毒性与生物有效性具有直接关系,确切说生物有效性是重金属毒性的前提。所以重金属的生物有效性是水生生物体内重金属累积的一个关键问题。

1.6.2 重金属生物有效性研究现状及趋势

由于重金属生物有效性是难以定量的,许多因素可以影响重金属生物有效性,包括生物的生理特征(如,重金属同化率、生物进食速率和方式、个体大小或年龄,以及繁殖条件)和重金属地球化学参数(如,水体中重金属在固液相的分配作用和重金属在环境中的形态)。此外还会受到水环境介质中物理化学因素的影响,如温度、盐度、溶解性有机碳(DOC)浓度,和总悬浮固体量(TSS)^[52]。因此难以预测重金属生物有效性以及不同相态间重金属的分配作用。

经验和模型都可用来解决重金属生物有效性的复杂性,仅仅利用经验方法肯定不能充分理解重金属累积的机理,因此,对生物有效性完善的研究需包括:

(1) 建立一个合理的概念模型以尽量描述重金属累积的途径,并且不能被假设的暴露常数和/或热动力学平衡(该模型同样应该能同时考虑控制重金属累积的生物和地球化学因素)所限制;

- (2) 模型中对参数的测量要在能够控制的条件下;
- (3) 参数的变化要在自然界中生物可能遇到的环境条件下检测;
- (4) 预测重金属浓度并且预测值能够与实际测量相比较;
- (5) 对影响重金属累积的因素进行灵敏性分析。

Morel 于 1983 年基于金属对生物的毒性取决于自由金属离子活度提出了预测金属毒性的自由离子活度模型 (Free Ion Activity Model FIAM)。FIAM 从理论上解释了金属对生物的有效性是取决于溶液中自由离子的浓度而不是金属总浓度,能很好的解释溶液中自由离子浓度与观测到的生物效应之间的关系。该方法的缺陷在于金属对生物体产生的毒性并不仅仅依赖于自由离子活度。研究表明,当水的硬度不同,即使水中自由金属离子活度相同,金属的生物毒性也不相同^[53,54]。此外,FIAM 仅假设单一相态的吸收,溶解相,该假设并不符合绝大多数水生生物对金属的吸收方式。

近来新发展的生物配位体模型 (Biotic Ligand Model BLM) 以化学平衡为理论基础,考虑了环境中溶解态金属和可结合的生物配位体 (如鱼鳃) 之间的相互作用。由于该模型测定生物特定位点上累积的溶解态金属浓度来反映金属的毒性,可以认为是对 FIAM 的发展。生物配体模型考虑了影响金属生物毒性的 3 个因素,即溶解态金属浓度、金属与生物特定位点的络合以及金属之间的竞争。相比其 FIAM 来说,BLM 不仅仅考虑了金属自身的地球化学因素,同时也将生物因素考虑进去,是一个进步。同时 BLM 也存在局限性,当水体的 $\text{pH} > 8$ 时,大部分金属-BLM 的预测效果都不好,即使 pH 不超出这个值,模型也存在着不能解释的情况。此外,BLM 假设金属 (通常为自由态金属离子) 及其生物配体络合物的浓度代表了金属的毒性,但研究发现一些亲脂性金属无机络合物如 HgCl_2 和 CH_3HgCl 可以通过被动吸收的形式直接跨过生物膜而对生物产生毒害^[55]。因此,该模型还需要进一步不断的发展。

当污染物暴露浓度随着时间和空间变化 (无稳定态) 时,生物能动力学模型 (Bio energetic-based Kinetic Model BK) 相比起以上所提到的模型来说更加合理。它从吸收、分布、新陈代谢和排泄方面描述了金属累积作用,充分考虑了生物吸收重金属的不同途径 (水相和食物相),通过测量一些重要的生理学参数,包括水相的重金属吸收速率常数 (k_a)、食物相的重金属同化率 (AE) 和重金属排出速率 (k_e),来研究水生生物对重金属的累积。该模型与 FIAM 和 BLM 一个明显的不同是,它考虑了生物通过进食的方式在体内累积重金属,即食物相的重金属对生物的毒害。该方法可以用来预测生物体内重金属的浓度^[56];区分不同吸收途径 (水相和食物相) 所占的比重^[57]。此外,该模型还能够预测重金属在食物链中的能级传递因子。但该模型同样存在缺陷,需要大量的数据,并且对每种水生生物来说没有一致的速率常数,不同的物种具有不同速率常数^[52]。

目前运用同位素示踪技术能够较准确的测定这3个动力学参数,由此建立的动力学模型已较准确得预测了实地采集的海洋蛤类 Se^[58], 桡足类 Cd, Zn, Ag, Co 和 Se^[59]和贻贝 Cd^[60]的浓度。Guan and Wang^[61]预测了大型水蚤在其整个生命过程中对 Cd 的累积。Wang et al.^[56,62]利用动力学模型预测过美国 South San Francisco Bay (SFB)和 Long Island Sound 两地海洋贻贝体内的五种重金属 Ag, Cd, Cr, Se, Zn 的浓度。根据实验室测定的参数建立的模型所预测的生物体内重金属浓度与实际环境中的浓度很接近。这表明,动力学模型能够合理的解释影响重金属在贻贝体内累积的主要因素,可以用来预测实际环境中水生生物群落的金属浓度^[63]。

利用动力学模型可以区分生物对重金属的吸收途径,水相和食物相的金属毒性有很大不同,因此定量区分金属不同吸收途径,对分别制定水体和沉积物质量标准具有较大的意义^[64,65]。目前动力学参数的研究范围涉及多种水生生物,多种金属,但由于没有合适的放射性同位素示踪剂,对生物体有重要作用的重金属 Cu 的研究十分缺乏,近年来,随着 ICP-MS 检测线的不断提高,已有一些研究利用稳定同位素⁶⁵Cu 作为示踪剂,测定双壳类水生无脊椎动物体内 Cu 的代谢^[66],但是对于大型水蚤这样一种国际公认的标准试验生物,目前尚无研究,本课题在一定程度上弥补该项空白。

1.6.3 动力学模型中参数的研究方法

定量不同的生物动力学参数(如:水相吸收,食物相同化和生物生理排出)和建立合适的动力学模型可预测大型水蚤体内重金属的含量,同时可区分污染物不同暴露途径的相对重要性^[70]。

1.6.3.1 水相吸收

目前已研究了短期暴露下成年大型水蚤对 Cd, Se, Zn, Ag, Hg 和 MeHg 的水相吸收。对重金属的长期暴露也同样进行了研究。短时间(8h)的暴露能尽量减少从大型水蚤体内排出的重金属进入水相,而导致再循环。Monson and Brezonik 发现 20h 内大型水蚤的幼虫对 MeHg 即可达到吸收平衡。为了避免食物颗粒与金属结合,在吸收实验过程中,暴露介质里不加入食物。同时,大型水蚤需要排空肠道内的食物(2h),以减少排泄物进入到暴露介质中。随着时间的变化,可得到大型水蚤对金属的生物浓缩因子;由生物对金属的吸收速率(I ; $\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)可计算出体内每种金属的浓度。吸收速率常数可通过一系列暴露浓度计算得出,已研究的金属中, ku 的变化超过两个数量级,范围在 Se $0.187 \text{ L g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 到 MeHg $11.04 \text{ L g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 。金属之间的差异可能是由于在运输过程中进入大型水蚤上皮细胞膜的速率不同而导致的。虽然在高浓度下,生物的水相吸收可能达到饱和,但通常假定 k_u 值与环境中金属的浓度无关^[67]。

环境中的很多因素都能够影响金属的 k_u 。例如, 增加溶解性有机碳的浓度和降低水的硬度都能提高大型水蚤体内 Cd 的 k_u ^[68]。另外, 增大 pH 和降低水相中 Ca 浓度可以促进大型水蚤对 Cd, Se 和 Zn 吸收, k_u 变大^[125]。但是, 增加水体中 Na 浓度, 可导致 Ag 的 k_u 降低, 可能是由于 Na 离子和 Ag 离子在生物体内竞争结合位点。通过测定大型水蚤软组织和外壳上的金属含量表明, 大型水蚤对金属的水相吸收也可能通过外壳的直接吸附。对于 Se, Hg 和 MeHg, 软组织是主要的吸收部位^[67,69]。对于 Cd 和 Zn, 短时间水相暴露后, 近 50% 的金属吸附在外壳上^[67]。

1.6.1.2 食物相同化, 排泄和生物放大作用

利用脉动喂食技术可测定大型水蚤对 Cd, Se, Zn, Cr, Ag, Hg, 和 MeHg 的食物相同化速率常数 AEs^[70], AE 与食物中 C 的浓度有显著的相关性^[68,170]。由于不同金属的 AE 变化较大, Reinfelder et al. (1998) 建议利用某一范围来表示 AE, 而不是某一具体准确的 AE 值。通过将一系列食物密度, 表示成 C 浓度 ($0.1-10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 水环境中, 金属的 AEs 与食物密度是成负相关的。对 7 种金属取对数进行线性回归, 类似的, 浮游动物对 C 的同化也是和食物密度成负相关关系^[128]。可能存在的一种情况是, 高食物密度会改变生物对食物的过滤作用, 降低食物中 C 和金属的肠道通过时间, 因此导致金属的同化率不高^[74]。比较不同金属之间由 AE 和食物浓度线性回归得到的斜率 (s), Ag 的 AE 受食物密度的影响最大, 而 Cd, Se, MeHg 和 C 受食物密度的影响相对较小, Zn, Hg 和 Cr 的 AE 介于其间^[71]。比较有意思的是, 当食物密度小于 $0.1\text{mgC}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, C 的 AEs 并没有继续增加^[72], 表明 $0.1\text{mgC}\cdot\text{L}^{-1}$ 已经接近于大型水蚤消化系统对食物的最佳处理能力。

不同金属之间 AE 的变化很大, 最高能达到 98% (MeHg), 最低可降到 1% (Ag)。出现这种巨大的差异可能是由于金属在大型水蚤肠道内从食物颗粒上的解吸过程控制金属的 AEs。那么, 解吸速率高的金属, AEs 会相对较高。另外一种解释是, 某些金属在穿过肠道时, 与其他金属相比, 量比较多和速度也相对较快, 因此 AEs 会相对较低。但是很难区分控制金属 AEs 的两个过程 (即, 肠道内金属从食物上的解吸和穿过肠道时被肠道上皮细胞吸收) 中哪一个是速度控制步骤。比较大型水蚤对 Hg 和 MeHg 的 AEs 可发现, Hg 的这两种形态与氯离子结合时具有近似的亲脂性 (即穿过肠道的能力)。因此, 和单质 Hg 相比, MeHg 从食物颗粒上的解吸速度较快导致它有较高的 AE。Mason et al.^[55] (1996) 发现, 海洋桡足类动物体内 Hg 和 MeHg 的 AEs 与这两种金属形态在硅藻细胞质内的含量有较大的相关性。这种类似的现象也同样出现在桡足类动物对其它金属的同化作用中^[73]。到目前为止, 这种细胞内消化假设并没有对大型水蚤和淡水藻类进行检验。另外, 大型水蚤体内金属的 AE 也没有用其它食物类型 (如, 细菌和

纤毛虫)检验过,因此,需要进一步研究对这些参数进行定量。

除了食物密度的影响,金属的 AEs 也受到食物中金属浓度的影响(但作用较微弱)。研究表明增加食物中重金属的浓度, Cd, Se, Ag, Hg 和 MeHg 的 AEs 会显著降低^[69,74,75,76],但是对于 Zn 来说,还没有发现这种关系,很可能是因为生物自身能调节 Zn 的吸收。这些研究表明,增加金属浓度能降低藻细胞内金属含量,这样能部分解释增加食物中金属浓度而导致金属 AEs 的降低(如, Cd)。对于其他因素,如营养物质和环境温度,对金属的 AEs,包括 Cd, Zn^[77], Hg 和 MeHg,没有明显的作用。用 P 含量较高的藻细胞喂大型水蚤,会降低 Se 的 AE。

测定成年大型水蚤体内 Cd, Se, Zn, Cr, Ag, Hg 和 MeHg 的排出速率常数 (ke ; $1 \cdot d^{-1}$),既可以通过水相金属累积也可以通过食物相金属累积。每一种途径(即水相和食物相), ke 值都不会因为食物密度,环境温度,生物年龄或食物中金属浓度而有较大的变化^[67,69,74,75,76,78,79]。在不同条件下对特定金属,大型水蚤体内对金属的排出会存在一种平衡,导致 ke 接近于常数。例如,较高的食物密度下,会加快繁殖速度(储存更多的能量),但每个幼体内 Se 的含量会降低。因此,对于低和高食物密度来说, Se 的总排出量仍然保持不变^[80]。

金属进入生物组织内后, ke 的大小决定了生物体排出金属的快慢^[81]。大型水蚤体内金属的排出过程包括,以液体形式排入到水相中;粪便;沉积到壳上,再通过脱壳的形式排出体外;通过繁殖传递给后代。浮游动物,如水蚤类和桡足类, ke 一般比大型底栖双壳类的高一个数量级,同时对水环境中重金属的再生有重要作用^[81]。

1.7 本研究立项依据、研究内容及意义

1.7.1 本研究立项依据

随着工农业及其他事业的发展,在生产或试验过程中排放的有毒物质(如重金属离子)必然对环境造成污染,尤其是对水体的污染更加严重。水蚤类作为水体中的主要生物就成了最直接的受害者,而且由于其在水生生物链中的重要作用,积聚在大型水蚤体内的有毒物质最后势必会通过生物放大作用进入人体内,从而对人类自身产生极大的危害。本研究所做的前期工作在调查北京市不同功能水体水质及毒性的基础上,通过模拟水体重金属污染如 Cu、Zn、Cd 污染,研究其对大型水蚤的生物毒性作用。重金属溶于水,有多种络合态,金属离子通常只占总可溶金属的一部分,是唯一能与细胞膜载体蛋白结合的部分,具有生物活性。此两种重金属在水中均以阳离子为主要存在形式。因此,本实验溶液中的 Cu、Zn、Cd 的总浓度可代表其离子浓度,此方法具有一定的可行性和相互之间

的可比性。

水蚤类是水体中的主要生物,对水环境中发生的物理、化学和生物性的各种变化,反映十分灵敏。水蚤类的毒性实验是研究水体中有毒物质对水蚤类不良影响的重要实验,通过水蚤类的毒性实验能够在一定程度上综合地反映出水体的污染情况,为环境保护提供有价值的信息。大型水蚤(本实验采用的是 *Daphnia magna*,取自中国预防医学科学院环境卫生所)由于取材容易,试验方法简便,繁殖周期短,实验室易培养,产仔量多,是一类很好的试验生物,且实验项目使用的参数在个体间相对恒定,可以为实验结果统计学处理提供方便,因此可以考虑选择其作为环境污染的指示生物,用来对水体环境中的重金属污染进行定期监测。大型水蚤受水中各种物质的影响很直接,通过对大型水蚤的研究或分析可以较好地反映所处水体的水质状况及是否受到污染。以往关于大型水蚤的研究主要集中于其作为测试环境污染物急性毒性等方面^[82],关于受到重金属污染水体对大型水蚤的生物毒性研究尚少见报道。

由于重金属对水生生态系统有严重的危害,因此能够准确而及时地反映水环境中重金属的含量以及对生物可能产生的毒性显得尤为重要。近几十年来,随着人们对重金属地球化学行为以及对生物体生理活动影响方面机理性认识的不断深入,已通过大量的研究建立不同的模型来不断提高实际环境中对金属浓度预测的准确性。在生态毒性方面,人们利用不同的水生生物体内和组织的重金属含量来监测水体中重金属污染物质的毒性效应和生态风险,采用的物种包括浮游植物、浮游动物、底栖类动物、鱼类等不同类型的生物物种^[83],在国际上积累了大量的数据,有的国家建立了相应的毒性效应数据库,例如加拿大、美国佛罗里达、澳大利亚与新西兰和中国香港等国家和地区,这些都为环境管理和环境质量的建立提供依据,同时也对科学的环境决策提供必要的理论基础,具有重要的环境学意义。我们研究的目的是在于更加完善和丰富重金属污染物的毒性效应和生态风险的检测。

1.7.2 研究内容与意义

本研究首先调查了北京市的水体分布情况,选择作为纳污排洪的清河、供水水源的京密引水渠、景观用水的小月河三条河流作为研究对象,共采集了三条代表性河流的 14 个水样,共测定了 33 项水质指标,运用内梅罗指数法和模糊数学综合评判法、大型水蚤和栅藻急性毒性测试法对三条河流的水质和急性毒性状况进行了评价,并运用主成分分析法简单探讨了毒性产生的原因,不仅可以反映水质状况及其污染程度,而且对于评价其水质功能的适当性,为水环境的保护和管理提供科学依据,都具有重要的现实意义。

在此基础上,以清洁样点所采集的水样作为背景,添加 Cd、Zn、Cu 模拟水体受到重金属的污染情况;以大型水蚤为试验生物,测定了 Cd、Zn、Cu 三种重

金属在大型水蚤体内的积累,研究了三种金属对大型水蚤体内 MT 含量和 SOD 活性的影响,并初步研究了水体中络合剂的存在对铜的毒性的影响,在此基础上在实验室建立了稳定同位素示踪技术,初步探讨了大型水蚤对水体中铜的生物有效性问题。进一步阐明重金属污染物对人类潜在的危害,为水环境质量保证提供必要的数据库,为制定预防性的管理措施,及时避免或减轻重金属污染物对水生生态系统造成的损害提供科学依据,并为水体受到重金属污染后的预警机制进行了资料积累。

1.7.3 本研究创新点

1)运用主成分分析方法对三条代表性河流的水质指标进行了主成分分析,找出水质指标的主要代表主成分,通过分析水质的主成分指标与内梅罗水质指数和急性毒性单位的相互关系,初步探讨了影响水质分级的因素和毒性产生的原因。

2)以大型水蚤机体作为研究对象,研究了在模拟条件下,天然淡水水体分别受到重金属 Cd、Zn、Cu 污染时,大型水蚤体内积累的重金属含量(Body burden)、MT 和 SOD 活性的诱导程度;测定了 Cd、Zn 两种重金属在大型水蚤体内的积累,研究了 Cd、Zn 联合暴露的情况下,对大型水蚤体内 MT 含量和 SOD 活性的影响;SOD 可作为 Cd、Zn 联合毒性评价的敏感指标。

3)利用同位素示踪实现了大型水蚤累积重金属 Cu 的 3 个生理学参数的测定,水相吸收速率常数 k_u 、食物相吸收速率常数 AE 及排出速率常数 ke ,并建立动力学模型。利用动力学模型从机理上分析 Cu 在大型水蚤体内的新陈代谢过程,预测实际环境中大型水蚤体内累积 Cu 的浓度,及主要的来源(水相或食物相)途径。并对实际环境中可能遇到的情况进行实验室模拟,分析不同的环境因素和生物生理因素对 Cu 生物有效性的影响。

第2章 北京市不同功能水体水质状况研究

水环境的健康状况和水质状况的优劣关系到城市建设的顺利发展,尤其是水系周边地区居民的身体健康。随着首都经济的迅猛发展,北京地区每年排放的大量含有重金属和有机污染物的工业废水通过各种途径进入北京市的大小河流,严重污染了北京市的水环境,致使北京部分水系已经丧失原有功能。有毒的污染物在水生生物中经富集作用而蓄积,达到一定浓度,成为浓缩毒物的载体,进而危及河流沿岸居民的日常生活。因而选取有代表性的河流进行水质状况研究,不仅可以反映当前水质状况及其污染程度,而且对于评价其水质功能的适当性具有重要的现实意义。

2.1 材料与方法

2.1.1 研究区域概况

清河位于市区北郊,流经圆明园、清河镇,在立水桥以东入温榆河,全长 23.8km,流域面积 150km²,主要承担北京市海淀区上地产业园、中关村园区等工业、生活废水接纳任务,系市区主要纳污排洪河道。京密引水渠位于市区西郊,上游水源为永定河河水,是近代北京市为解决城市供水水源而修建的一条人工沟渠,贯穿北京西部,是整个北京市供水水源地,系集中式生活饮用水水源一级保护区。小月河南起学院南路与长河暗渠相接,向北沿土城沟流经黄亭子,向东至祁家豁子再向北折入小月河故道,全长 10.25km,系人体非直接接触的娱乐用水区。

本文以清河、京密引水渠、小月河分别作为纳污排洪、水源供水、娱乐景观用水三种功能的代表水体,在清河、小月河、京密引水渠布设采样点进行水质检测与分析,同时对水质状况进行评价分级,判断水体是否能满足具体的功能需要。

2.1.2 水样的采集与保存

水样采集按照《水和废水监测分析》^[84]标准采样方法进行。根据各功能代表河流的地理特征、自然条件、污染历史等因素,于 2006 年 4-5 月对北京市具有不同功能的三条代表性河流(清河、京密引水渠、小月河)共 14 个监测断面进行水样采集,采用均匀布点法,用 GPS 定位仪对采样位置进行全球定位,沿各水流路线每条河流布置 4-5 个样点。清河段布点 5 个(天秀花园、水闸、箭亭桥、污水处理厂、建材超市),京密引水渠段布点 5 个(火器营桥、美林花园、玲珑公园、中央电视塔、八里庄),小月河段布点 4 个(北影、学知桥、牡丹园、经贸大)。

采样点如图 2-1 所示。



图2-1 三条代表性河流采样点分布图

Figure 2-1 The distribution of sampling points of the three rivers

2.1.3 水质指标的测定

将水样样品运回实验室后，立即测定水样 pH 值（雷磁 PHS-3C 型酸度仪）和 DO 值（便携式溶氧仪）。待测的水样密封保存于 4°C 的冰箱中尽快测量，水样中 F^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 、 HPO_4^{2-} 和 NO_2^- 含量采用 792BasicIC 型离子色谱测定；TOC 采用 APPOLO9000 型 TOC 仪进行测定，元素含量采用 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ 消解方法预处理，其中 Ca、Na 等常量元素利用 ICP-AES 测定，Cu、Zn、Cd 等微量元素含量采用 VG PQ2 TURBO 型 ICP-MS 测定。

2.1.4 水质评价方法的选择

目前用于水环境质量的综合评价有很多方法^[85]，如内梅罗指数法^[86]、最差因子判别法、有机污染综合指数评价法、主成分分析法、模糊综合评价法、人工神经网络模型、遗传算法等等，本文主要采用内梅罗指数法和模糊数学综合评价法对三种河流的水质进行了评价。

2.1.4.1 内梅罗指数法

内梅罗指数法^[86]是一种经典的水质评价方法，由于其数学步骤简单，具有诸多优点，也被许多研究者所青睐而得到广泛应用。

评价步骤如下：

(1) 选用内梅罗指数计算综合评分值 F，如下式 2-1 所示：

$$F = \sqrt{\frac{F_{\max}^2 + F_{\text{平均}}^2}{2}} \tag{2-1}$$

式中： $F_{\text{平均}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n F_i$ ， $F_i = \frac{C_i}{C_{\text{标}}}$ ，其中 C_i 为单项组分实测值， $C_{\text{标}}$ 为单项组

分标准值， n 为评价因子的个数； F_{\max} 为单项组分值 F_i 的最大值。

(2)根据 F 值按表 2-1 划分水质级别。

表2-1 水质分级表^[86]
Table 2-1 Water-quality classification^[86]

优良	良好	较好	较差	极差
<0.8	0.81~2.50	2.50~4.25	4.25~7.20	>7.20

2.1.4.2 模糊数学综合评判法

模糊数学综合评判法应用模糊数学理论，用隶属度描述水质分级界限，用隶属函数对各单项指标分别进行评价，经模糊矩阵复合运算，得出综合评价结果。该法考虑了水质级别界限的模糊性，针对各项水质参数在污染中的作用差异，分别给予不同的权重，使各指标在总体中的污染程度清晰化、定量化，较为真实地反映了各监测断面的综合水质状况。近年来在水质评价中得到广泛重视^[87,88]。

应用模糊数学综合评价一般可归纳为以下几步：

1)建立污染物各单因子指标的集合 $U=\{U_1, U_2, \dots, U_n\}$ ，元素 $U_i(i=1, 2, \dots, n)$ 为影响环境质量的各污染物的实测值。

2)建立水质分级标准集合 $K=\{K_1, K_2, \dots, K_m\}$ ，其中元素 $K_j (j=1, 2, \dots, m)$ 为某个污染物所对应的水质分级标准值。

3)建立模糊关系矩阵 R ，即 $R=[r_{ij}]$ 。

模糊关系矩阵在水质评价中，是反映评价因子对各级水质标准隶属度的一种转化关系。如果采用“降半梯形”计算隶属度： $r_{ij} (0<r_{ij}<1)$ ，即隶属度的解析式如式(2-2)为：

$$\mu(x) = \begin{cases} 1, \dots, 0 \leq x \leq a_1 \\ \frac{a_2 - x}{a_2 - a_1}, \dots, a_1 \leq x \leq a_2 \\ 0, \dots, a_2 \leq x \end{cases} \tag{2-2}$$

式中： a_1, a_2 代表相邻两级水质的标准值； X 代表水样中某因子的实测值。依次计算，即可得模糊关系矩阵 R ：

$$R = \begin{bmatrix} r_{11} & r_{12} & \cdots & r_{1m} \\ r_{21} & r_{22} & \cdots & r_{2n} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ r_{n1} & r_{n2} & \cdots & r_{nm} \end{bmatrix} \quad (2-3)$$

4)建立权重模糊矩阵 A

A 由各污染因子对环境污染的贡献, 以及多因子间的相互协同、拮抗作用对环境污染的影响, 做出权数分配构成的一个 n 维行向量(或称行矩阵), 即: $A=[W_1, W_2, \dots, W_n]$, 其中各污染因子的权重利用污染物浓度超标加权法计算, 计算公式见式(2-4)。

$$W_i = \frac{C_i}{\bar{C}_{io}} \quad (2-4)$$

式中: C_i 指某因子的实测值, \bar{C}_{io} 指某因子平均允许浓度值。计算所得的 $W_i \geq 0$ ($i=1, 2, \dots, n$), 为了进行模糊变换, W_i 值应满足归一化要求式(2-5), 即:

$$\sum_{i=1}^n W_i = 1 \quad (2-5)$$

若 W_i 不满足要求, 需采用式(2-6)进行归一化处理。

$$\bar{W}_i = \frac{W_i}{\sum_{i=1}^n W_i} \quad (2-6)$$

5)计算模糊综合评价矩阵 B

根据模糊变换原理(见式 2-7) 计算模糊综合评价矩阵 B。

$$B = A \times R \quad (2-7)$$

式中: $B = [b_1, b_2, \dots, b_m]$ 是综合评价结果;

$$b_j = \sum_{i=1}^n W_i \times r_{ij}; \quad j=1, 2, \dots, m. \quad (2-8)$$

如果综合评价结果 $\sum b_j \neq 1$, 应将它归一化, 归一化的模糊综合评价矩阵:

$$B' = [b_1/b, b_2/b, \dots, b_m/b] \quad (2-9)$$

$$\text{式中: } b = \sum_{i=1}^j b_m \quad (2-10)$$

2.2 结果与分析

2.2.1 水质分析

本论文测定了 14 个水样的 11 个基本理化指标(pH、DO、总碱度、氨氮、TOC、 Cl^- 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 SO_4^{2-} 、 F^- 、 PO_4^{3-})和 22 种金属(Al、Fe、Zn、Cr、Ni、Cu、Se 等)含量(附录 B)。与 GB3838-2002《地表水环境质量标准》^[89]中 III 类水质标准(表 2-2)比较可知, DO、BOD₅、 F^- 、氨氮、 NO_2^- 、 NO_3^- 、Fe 和 Zn 8 种水质指标含量超标或接近超标, 因此将其选为评价因子, 含量如表 2-3 所示。

2.2.2 内梅罗指数法评价结果

根据 GB3838-2002《地表水环境质量标准》^[89]中 III 类水质标准计算得到的 14 个水样的内梅罗指数以及水质分级情况列于表 2-4 中。从表中可以看出, 清河段水质总体较差, 箭亭桥断面水质情况较差, 污水处理厂、建材超市两个断面水质极差, 天秀花园、水闸两个断面水质较好; 京密引水渠段总体水质一般, 火器营桥、美林花园、玲珑公园和八里庄四个监测断面水质较差, 中央电视塔监测断面水质分级良好; 小月河总体水质一般, 北影监测断面水质极差, 经贸大学监测断面水质较差, 学知桥、牡丹园两个监测断面水质良好。

2.2.3 模糊数学综合评价结果

按照模糊数学综合评判法评价步骤^[90], 首先建立了评价因子集合为 $U=\{\text{DO}, \text{BOD}_5^{[91]}, \text{F}^-, \text{氨氮}, \text{NO}_2^-, \text{NO}_3^-, \text{总溶解性 Fe}, \text{总 Zn}\}$, 根据国家地表水水质标准(GB3838-2002)^[59]把地表水水质分为 5 级, 在此基础上建立水质分级标准集合 $K=\{K_1, K_2, \dots, K_5\}$, 利用模糊数学综合评判法计算所得评价结果见表 2-5。

分析表明, 清河段总体水质较差, NO_2^- 是主要污染物, 在天秀花园监测断面, NO_2^- 超标, 水质为 III 级, 水闸监测断面的水质较差, 为 IV 级水, 箭亭桥、污水处理厂、建材超市三个监测断面水质极差, 污水处理厂、建材超市两个监测断面 NO_2^- 严重超标数十倍, 水质达到 V 级; 京密引水渠段总体水质一般, 主要污染物为 NO_2^- 和 F^- , 火器营桥监测断面的主要污染物为 NO_2^- , 水质为 IV 级, 美林花园、玲珑公园、八里庄三个监测断面的水质为 V 级, 中央电视塔监测断面的水质较好, 为 II 级水; 小月河段总体水质一般, 主要污染物为氨氮与 BOD₅, 学知桥、牡丹园监测断面的水质为 IV 级水, 北影、经贸大监测断面的水质较差, 为 V 级水, 北影监测断面氨氮严重超标, 经贸大监测断面 BOD₅严重超标。

表2-2 地表水环境质量标准^[89] ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)Table 2-2 Environmental quality standard for surface water^[89] ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

因子	I	II	III	IV	V
DO \geq	7.5(饱和度90%)	6	5	3	2
BOD ₅ \leq	3 以下	3	4	6	10
F \leq	1.0 以下	1	1	1.5	1.5
氨氮 \leq	0.5	0.5	0.5	1.0	1.5
NO ₂ ⁻ (以 N 记) \leq	0.06	0.1	0.15	1	1
NO ₃ ⁻ (以 N 记) \leq	10 以下	10	20	20	25
Fe \leq	0.3 以下	0.3	0.5	0.5	1
Zn \leq	0.05 以下	1	1	2	2

表.2--3 水样中各评价因子的含量 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)Table2-3 Concentration of evaluating factors of water samples ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

序号	断面/因子	DO	BOD ₅	F	氨氮	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	Fe	Zn
1	天秀花园	10.34	4.613	0.442	1.368	2.23	12.05	0.12	0.05
2	水闸	8.10	7.269	0.477	0.198	2.53	2.03	0.11	0.09
3	箭亭桥	11.59	8.196	0.483	0.219	4.35	5.09	0.12	0.09
4	污水处理厂	8.14	9.574	0.833	0.320	13.24	3.19	0.21	0.11
5	建材超市	8.28	8.811	0.617	0.238	10.50	1.92	0.21	0.13
6	火器营桥	11.32	4.891	2.025	0.168	3.36	7.48	0.29	0.0007
7	美林花园	10.05	2.897	3.522	0.462	5.13	8.62	0.16	0.014
8	玲珑公园	7.68	3.985	2.081	1.569	3.94	7.17	0.16	0.1
9	中央电视塔	9.23	3.836	3.294	0.200	0	11.47	0.68	0.11
10	八里庄	8.65	4.442	3.453	0.158	3.45	9.06	0.19	0.06
11	北影	3.72	12.968	1.395	4.470	0	2.11	0.45	0.04
12	学知桥	6.37	9.566	1.697	0.484	0	2.36	0.27	0.03
13	牡丹园	6.99	8.049	0.881	1.361	0	7.21	0.59	0.04
14	经贸大学	5.48	26.164	1.669	1.021	0	1.67	0.79	0.13

表2-4 14个水样的内梅罗指数和水质分级

Table2-4 Nemerow Index and water quality classification of fourteen samples

河流	样点	内梅罗指数	水质分级	河流	样点	内梅罗指数	水质分级
清 河	天秀花园	3.31	较好	引	玲珑公园	5.81	较差
	水闸	3.71	较好	水	中央电视塔	2.41	良好
	箭亭桥	6.34	较差	渠	八里庄	5.07	较差
	污水处理厂	19.18	极差		北影	6.48	极差
京 密	建材超市	15.22	极差	小	学知桥	1.78	良好
	火器营桥	4.92	较差	月	牡丹园	2.04	良好
	美林花园	4.60	较差	河	经贸大学	4.76	较差

表2-5 利用模糊数学综合评价方法评价水质结果

Table2-5 qualification of water sample using fuzzle compound evaluation method

断面/标准	I	II	III	IV	V
天秀花园	0.247	0	0.301	0.219	0.233
水闸	0.299	0.001	0.088	0.424	0.188
箭亭桥	0.252	0.001	0	0.124	0.623
污水处理厂	0.194	0.001	0	0.017	0.788
建材超市	0.194	0.001	0	0.051	0.754
火器营桥	0.210	0	0.085	0.412	0.293
美林花园	0.244	0	0	0	0.756
玲珑公园	0.134	0.002	0.093	0	0.771
中央电视塔	0.172	0.619	0.022	0.106	0.081
八里庄	0.168	0.008	0.091	0.026	0.707
北影	0.008	0.019	0.094	0.152	0.727
学知桥	0.265	0.107	0	0.316	0.312
牡丹园	0.221	0.039	0	0.375	0.365
经贸大学	0.012	0.041	0.044	0.182	0.721

2.2.4 两种水质评价方法结果的比较

由以上两种水质评价方法得到的评价结果可以看出,用内梅罗指数法评价水质得到的分级结果与用模糊数学综合评判法评价水质得到的分级结果总体上是一致的,但个别监测断面存在差别。两种评价方法的比较如图 2-2 所示。

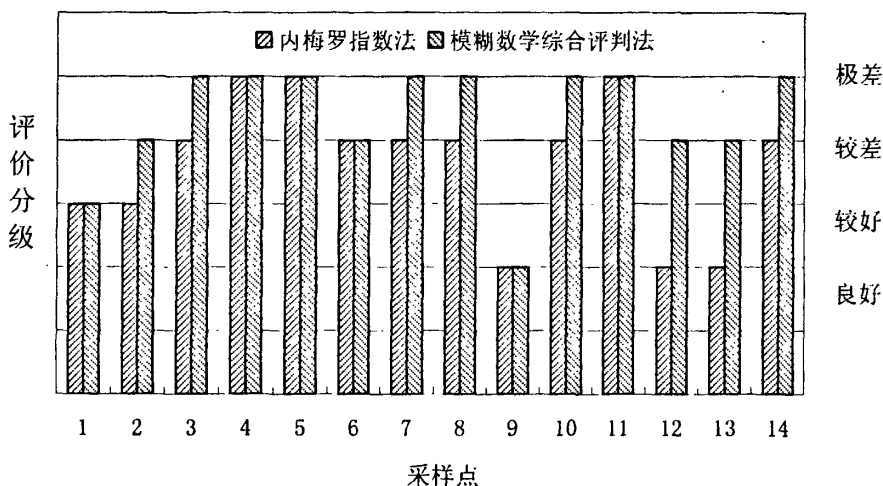


图2-2 两种水质评价方法的水质分级图

Figure2-2 water quality classification using two water quality evaluation method

由图 2-2 可以看出,清河段的天秀花园、污水处理厂、建材超市三个监测断面,京密引水渠段的火器营桥、中央电视塔两个监测断面,小月河段的北影检测断面两种水质评价方法的水质分级一致,小月河段的学知桥、牡丹园两个监测断面的水质分级相差较大。总体来讲,内梅罗指数法评价得到的水质分级要略好于模糊数学综合评判法所得结果。

两种水质评价方法结果存在差异的原因可能在于,两种评价方法的数学计算过程不同,内梅罗指数法只与指定的某一级水质标准进行比较,而模糊数学综合评判法则在此基础上,将所有 5 级水质标准均作为评价级别,更加真实地反映污染物。

第3章 北京市不同功能水体的急性毒性测定

大型水蚤的应用起始于1928年,美国科学家 Aimo Viehoveer 首先把水蚤试验技术应用在药理毒理学研究上,通过一系列的试验发现药物对水蚤的生理作用与对人类的生理作用一致,确认水蚤类是一种很好的试验生物^[92]。首次将水蚤类毒性实验应用在防止工业废水污染工作上的是英国的学者 Anderson,他认为水蚤类比鱼类更为敏感,先后报道了有关工业废水中25种毒物的毒性试验^[93]。

到了20世纪90年代,大型水蚤的毒理试验得到了更广泛的开展研究。在大型水蚤的急慢性毒性上,大型水蚤的生物测试技术已广泛的用于各种新有机物对环境和人体有生理影响的物质的测试。到了21世纪,研究学者们对大型水蚤的毒性试验向更纵深方向发展。除了急慢性、蓄积、联合、生长繁殖和应用方面等试验,还深入研究了在各种不同条件下毒物对大型水蚤在分子水平上的毒害。

大型水蚤(*Daphnia magna straus*)生活于自然水域,属于浮游甲壳类动物,是世界种。它具有生活周期短、繁殖快、经济、方便易得、对毒物敏感、易于在实验室培养等优点,加上其在水域生态系统中的重要性,因而得到众多国家的应用,已成为一种标准试验生物,广泛地用于水环境毒性研究中。大型水蚤毒性测试不仅可以评价工业废水、农药、化学毒品和水中沉积物对水环境的污染,为制定各种水质标准提供科学依据,而且可以作为监测手段控制水环境的污染。

本章利用斜生栅藻、大型水蚤作为受试生物检测了北京市不同功能代表性水体的急性毒性,并运用主成分分析法初步探讨了毒性产生的原因。

3.1 材料与方法

3.1.1 受试生物的选择与培养

3.1.1.1 斜生栅藻的培养

本实验所用斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)购自中国预防医学院环境卫生所藻种库。通过实验室多种培养基的筛选,选用 OECD 推荐的栅藻培养基培养斜生栅藻,培养基组成见表 3-1。栅藻适宜的 pH 为 6.8-8.6,但是在培养的过程中随着栅藻的繁殖,颜色由浅到深时,栅藻培养液的 pH 值会升高,并且变化幅度比较大,所以需要将配制的培养液用 HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 为 5-6 左右,用 250mL 或 500mL 的三角瓶装培养液,大约装三分之一体积,瓶口加松软棉团,再在高温下灭菌 15min。取培养好的接种液在无菌操作台上接种,使培养液成淡绿色。接种好的三角瓶瓶口加松软棉团(灭菌)以防污染,放在人工气候箱中培养,温度控制在 15-25⁰C,最适温度为 25⁰C,要求每天光照 8-16h,光照强度在 3000-4000Lux (用本实验室的 RXZ 型智能人工气候箱,开 6-7 盏 40 瓦的日光灯

基本上能达到这个范围), 连续静止培养。每天摇动 5-6 次, 约 2 周左右培养后藻液变为深绿色((pH 约为 7.8, 接近于试验的 pH 条件)就可以用于喂食。藻种要经常转接, 以防止老化, 一般 2 周左右就可以接种一次。

表3-1 栅藻培养基的组成
Table3-1 The components of *Scenedesmus obliquus*

无机物名称	培养基中的浓度(mg/L)	纯度
NaNO ₃	500	分析纯
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25	分析纯
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75	分析纯
K ₂ HPO ₄	75	分析纯
KH ₂ PO ₄	175	分析纯
NaCl	25	分析纯
EDTA-Na ₂	25	分析纯
KOH	25.5	分析纯
FeSO ₄ ·7H ₂ O	7.3672	分析纯
H ₃ BO ₃	11.42	分析纯
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.00882	分析纯
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.00144	分析纯
MoO ₃	0.00071	分析纯
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00157	分析纯
Co(NO ₃)·6H ₂ O	0.00049	分析纯

3.1.1.2 大型水蚤的培养

大型水蚤是国际公认的标准试验生物, 自从美国环保局(EPA)在 1978 年将大型水蚤定为毒性试验的必测项目, 建立了大型水蚤的毒性试验的标准方法后, 日本和许多欧洲国家也相继成立了自己的标准方法, 我国于 1991 年成立了自己的大型水蚤急性毒性测定方法。

大型水蚤(*Daphnia magna straus*)生活于自然水域, 属于是世界种。大型水蚤分类学如下: 大型水蚤系浮游生物(*Plankton*)→浮游动物(*Zooplankton*)→节肢动物门(*Arthropoda*)→甲壳动物纲(*Crustacea*)→鳃足亚纲(*Branchiopoda*)→双甲目(*Diplostraca*)→枝角亚目(*Cladocera*)→具枝角亚目(*B.suborder Eucladocera*)→盘肠蚤总科(*Superfamily chydoroide*)→蚤科(*Family Daphniidae*)→蚤属(*Daphnia*)→栉蚤亚属(*Ctenodaphnia*)→大型水蚤(种)(*Daphnia magna straus*)^[94]。

大型水蚤是一种浮游动物枝角类生物, 身体短小, 左右侧扁, 从侧面看略呈

长圆形，分为雌性与雄性，雌体 2.2~6.0 毫米。体色淡红或黄色，随外界条件的不同而变化。大型水蚤的结构见图 3-1 所示。

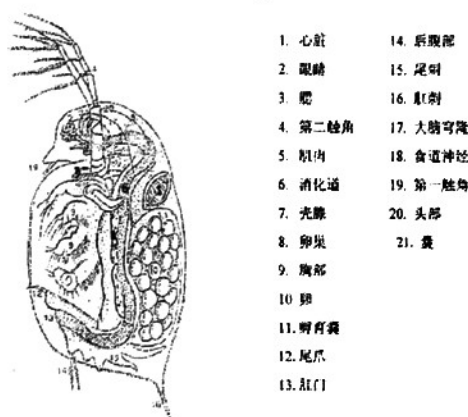


图3-1 大型水蚤结构示意图

Figure3-1 depict of *Daphnia magna* structure

大型水蚤体壳壳面有菱形花纹，后端有较短的壳刺。头部宽而低，头顶圆钝，无盔。吻部稍凸出，壳弧发达。复眼不大，位于头顶，单眼小，位于第一触角的正上方。躯干部由胸部与腹部合成，胸部有附肢而腹部无。有腹突，后腹部大，向后逐渐收削。肛门位于后腹部，有尾爪，尾爪上有栉刺，尾刚毛长在肛门后。第一触角在头部，短而粗，第二触角很大，能运动，分节，又叫大触角，分内肢外肢，上面长满了游泳刚毛。雄体小，体长 1.75~2.50 毫米，前腹角圆而凸出，壳刺很短，头部向下弯曲，复眼特大，吻钝。第一触角很长且粗，有一根刚毛，第一胸肢有一个钩及一个长鞭毛。腹突不明显。后腹部在肛门开口处有肛刺十多个左右，末背角呈大的侧突。输精管开孔于侧突之间。

试验大型水蚤(*Daphnia magna*)可以从其他试验室已有的纯种培养中挑取、引种，也可以从野外采集。野外采集的蚤要经分离、纯化，在显微镜下鉴定后，选择体大、健康的母体数个，用 50mL 小烧杯单个培养。选择繁殖量最大的一代为母蚤，单克隆化，使之成为纯品系。本实验所用大型水蚤(*Daphnia magna*)购自中国预防医学院环境卫生所蚤种库。培养条件如下：

a. 饵料：

蚤类喜食藻类、酵母及有机物碎屑等。藻类的营养价值高于其他食物，本实验用实验室培养的斜生栅藻作为大型水蚤的饵料。

b. 水质：

大型水蚤适合在淡水中生存，本实验室经过试验选用国际标准稀释水作为大型水蚤的培养液，培养液每周换水三次，每天饲以斜生栅藻，幼蚤定期被分离。

c.pH 值:

一般来讲 pH 在 6 到 10 范围内都能生存, 最适宜 pH 范围为 6.5-8.7 间, 水的 pH 不要波动太大。本实验室控制 pH 值在 7.8 ± 0.2 。

d.氧气:

一般水中溶解氧保持在 2mg/L 以上。本实验室配制好的培养液放置一天后, 其溶解氧基本上能达到要求。

e.光线:

光线对大型水蚤的生存是需要的, 完全(24h)黑暗对蚤生存不利, 一般实验室的自然采光足够, 但不能在阳光下直接照射。

f.水温:

大型水蚤的生存温度范围是 $9-30^{\circ}\text{C}$, 在 9°C 以下或 30°C 以上都容易造成蚤的死亡, 最适温度是 $15-20^{\circ}\text{C}$ 。在本实验室, 大型水蚤的培养温度控制在 $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 左右, 放在温度为 20°C 的人工气候箱中培养, 以保持培养的温度和试验的温度相一致。

g. 大型水蚤密度:

过挤对大型水蚤的生长繁殖是不利的。原则上每个蚤要求 2mL 水, 但如果想让大型水蚤生长繁殖良好, 10L 水中不要超过 200 个蚤, 如果想得到大量幼蚤, 1L 水中放入母体不要超过 50 个, 以 20-30 个为好。本实验室通常在 400mL 的培养液中放入 8-10 个母蚤。

h.蚤的食物:

保持足够的饵料是养好大型水蚤的重要条件, 本实验室用自己培养的斜生栅藻为大型水蚤的食物, 喂食浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 根据实验室经验为苹果绿色时的浓度为最佳浓度。

i.其它:

水深一般不宜超过 50cm。本实验室选用口径大, 不深的烧杯作为大型水蚤的容器。

3.1.2 生物急性毒性测定方法

生物测试能够弥补理化检测方法的不足, 因此在水污染研究中, 它已经成为监测和评价水体环境的重要手段之一。水生动植物毒性实验是水毒理学的一个重要组成部分, 用此方法直接测定受污染水体的急性毒性是研究水体污染的一种重要手段, 同时也为确定废水的安全排放量和制定废水排放标准提供科学根据。

3.1.2.1 斜生栅藻的急性毒性生长抑制测试方法

斜生栅藻是一种原植体植物, 是水体中的初级生产力。当重金属等污染物进入水体后, 斜生栅藻的生命活动将会受到影响, 生物量也会发生改变。通过测定

斜生栅藻的生物量,可评价有害物质对斜生栅藻生长的作用,反映对水体中初级生产营养级的影响以及对整个水生生态系统的可能的综合环境效应。确定藻类生长的指标较多,其中细胞数及光密度因应用简便,重复性好,不需昂贵仪器,应用最为普遍,是斜生栅藻毒性实验中的最主要的测试指标。

斜生栅藻生长抑制试验^[95]的目的是确定受试物对单细胞藻类生长的影响,可用于受试物对藻类短期暴露效应的初评。当暴露使斜生栅藻的生长率低于未经暴露的对照组时,称为藻生长抑制。单细胞藻类个体小,世代时间以小时计算,采用本方法可以在较短时间内得到受试物对斜生栅藻许多世代及在种群水平上的影响。将不同浓度的受试物加到处于对数生长期的斜生栅藻培养基中进行培养,每隔 24h 测定藻类种群浓度或生物量(重量),试验时间不少于 96h,与对照比较可确定生长抑制情况。

1)预试验(确定浓度范围)

为确定正式试验中受试物的浓度范围,需要进行预试验。预试验的浓度组按对数间距排布,最低浓度应为受试物检测下限,最高浓度应为饱和浓度。无需设平行样。如果预试验中在最高浓度测点,斜生栅藻的生长抑制低于 50%,或者在最低浓度测点中的生长抑制高于 50%,可不必再进行正式试验。如果有必要进行正式试验,可根据预试验的结果确定正式试验时受试物的浓度范围和浓度间距。

2)水样的正式试验

取出保存在 4°C 的水样,摇匀,将不同浓度的受试物加到处于对数生长期的斜生栅藻的培养物中,按照预试验所确定的浓度范围使用稀释水配成相应的实验液进行。试验开始后,每隔 24h,即在 24、48、72、96h,从每瓶中取样使用分光光度计测定光密度。以过滤的培养基分别作为背景和空白。试验开始和试验 96h 后,测定 pH 值。控制实验前后 pH 偏差小于 1 个单位。

3.1.2.2 大型水蚤的急性毒性测试方法

大型水蚤的急性毒性测试按照国际标准 ISO 6341:1996 《水质-大型水蚤运动抑制的测定》进行^[96]。

1)实验蚤的选育

选择体大、健康的母体数个,用 50mL 烧杯单个培养。选择繁殖量最大的一代为母蚤,单克隆化,使之成为纯品系。

2)灵敏性测试

在实验进行之前,必须对所用大型水蚤的 24 小时出生的幼蚤采取大型水蚤敏感性试验的检测。以规定的重铬酸钾为敏感性测定毒物,对大型水蚤进行 24h-EC50 (24h 半数运动受抑制试验)试验,评价本实验室的大型水蚤是否符合敏感性要求。按几何级数的浓度系列(等比级数)设计 6 个浓度: 0、0.8、1.2、1.6、2.0 和 2.5mg·L⁻¹, 试验用 50mL 烧杯,装 20mL 试验液,每个烧杯置蚤 5 个。每

个浓度 3 个平行。一组实验液设一空白对照，内装相等体积的稀释水。

24 小时之后，计算每个浓度中不活动的大型水蚤或死亡蚤占试验总数的百分比，并进行线性回归处理，获得 EC50 值。若值在 $0.9\text{--}1.7\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间，则符合 ISO 大型水蚤敏感性要求，可以作为标准试验生物进行毒理试验，对毒物进行评价。

3) 正式试验

正式试验之前，为确定试验浓度范围，必须先进行预备试验。预备试验浓度间距可宽一些(如 0.1、1、10)每个浓度至少置幼蚤 5 个，通过预试验找出被测物使 100% 大型水蚤运动受抑制的浓度和最大耐受浓度的范围，然后在此范围内设计出正式试验各组的浓度。如果原水样 (100% 浓度) 未发生死蚤现象，则不能计算出 EC50 值和 LC50 值。

然后按照 ISO 标准试验方法进行正式急性毒性实验，根据预试验得出的浓度范围设置 7 个等对数间距稀释比浓度(0、0.2、0.26、0.34、0.45、0.58、0.76 和 1)，设置一个空白对照，每个浓度平行 3 组，试验容器为 50 mL 烧杯，盛 20 mL 试验溶液，置蚤 5 只，水温 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ，光照周期为 16h 光照：8h 黑暗，中间不喂食，24 小时和 48 小时两次观察记录死亡或者活动受抑制的大型水蚤，分别得出 24h-EC50 和 48h-LC50。

3.2 结果与分析

3.2.1 斜生栅藻的急性毒性生长抑制测试结果

按照斜生栅藻生长抑制标准试验方法得到的每个样点中斜生栅藻生长的抑制率 (附录 C)，利用回归分析可计算得到栅藻的 96h-EC50 值，列于表 3-2 中。

3.2.2 大型水蚤急性毒性结果测定

大型水蚤的灵敏性测试结果如下图 3-2 所示。

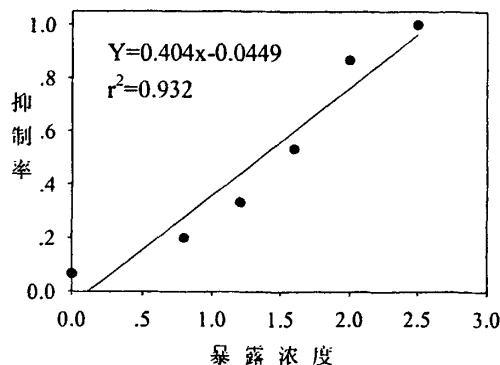


图3-2 大型水蚤灵敏性测试结果

Figure3-2 test result of *Daphnia magna* sensitive

根据大型水蚤的重铬酸钾灵敏性试验，由上图计算可得 24h-EC50 值为 1.349mg·L⁻¹，符合 ISO 大型水蚤敏感性要求(0.9-1.7 mg·L⁻¹)，可以作为标准试验生物进行毒理试验，对毒物进行评价。

按照 ISO 标准试验方法得到的每个样点中大型水蚤生长的抑制率、死亡率分别如附件 D 所示，由图计算可得 24h-EC50 和 48h-LC50 值，列于表 3-2 中。

表3-2 14个水样对斜生栅藻的96h-EC50及对大型水蚤的24h-EC50和48h-LC50值
Table3-2 96h-EC50 *Scenedesmus obliquus*&24h-EC50、48h-LC50 *Daphnia magna* of fourteen samples

河流	采样点	斜生栅藻 96h-EC50	大型水蚤 24h-EC50	大型水蚤 48h-LC50
京	火器营桥	nd	nd*	nd
密	美林花园	nd	nd	nd
引	玲珑公园	nd	nd	nd
水	中央电视台	nd	nd	nd
渠	八里庄	nd	nd	nd
清河	天秀花园	2.34	nd	nd
	水闸	1.109	0.560	0.216
	箭亭桥	1.424	4.050	2.170
	污水处理厂	2.030	0.458	0.264
	建材超市	0.959	1.348	1.100
小月河	北影	1.460	1.840	1.064
	学知桥	1.766	2.692	1.442
	牡丹园	1.467	1.029	0.891
	经贸大学	2.464	0.449	0.382

*nd 代表未测出

3.2.3 两种急性毒性测定方法的比较

统计学计算需要将 EC50 及 LC50 转化为急性毒性单位(Acute Toxic Unit, TUa)，公式^[97]如下式(3-1)所示：

$$TU_a = \frac{100}{LC_{50}} \text{ 或者 } TU_a = \frac{100}{EC_{50}} \quad (3-1)$$

将两种方法测得的急性毒性结果列于图 3-3 中, 参考表 3-3 中的毒性分级标准^[98], 综合两种生物毒性测试结果分析表明, 14 个水样的生物毒性单位水平处在 0~500 之间, A.Villegas 等人^[99]研究的纺织工业部门各阶段废水的毒性单位水平处在 2~960, 两者毒性水平相似, 具有一定的可比性。清河各采样点均检测出生物毒性, 总体生物毒性较强。京密引水渠五个采样点均未检测出生物毒性; 小月河大部分采样点生物毒性较高。三条河流的综合毒性大小为: 清河段>小月河段>京密引水渠。

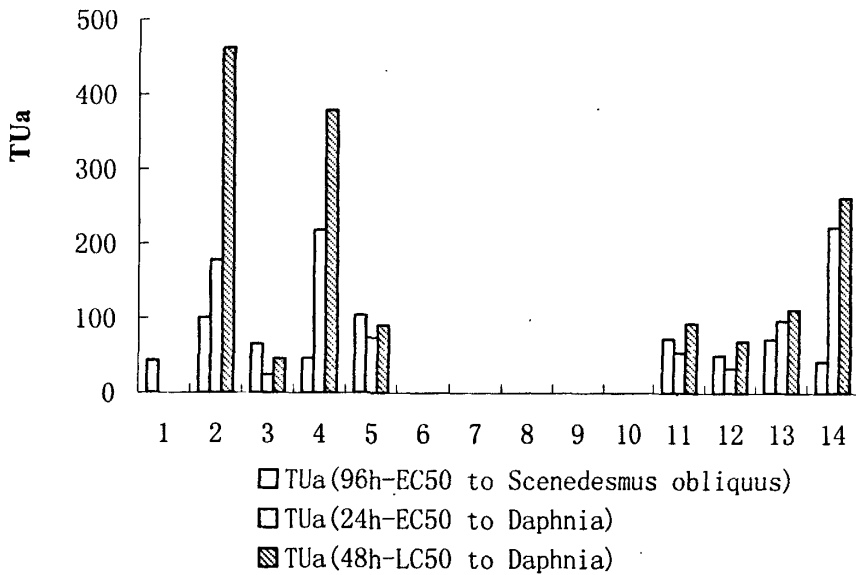


图3-3 两种毒性测试方法的急性毒性变化趋势
Figure3-3 trend of urgent for two toxicity test methods

表3-3 毒性分级标准^[98]
Table3-3 toxicity classification standard^[98]

毒性级别	极毒	高毒	低毒	无毒
EC50	<1	1~10	10~100	>100
LC50	<1	1~10	10~100	>100

各监测断面 48h-LC50 值均大于 24h-EC50 值(1, 6, 7, 8, 9, 10 除外), 两者变化趋势基本相似, 表明各监测断面水样(京密引水渠除外)存在潜在的生物毒性, 受试生物随着暴露时间的增加, 受到的毒性危害就越大。J.Garric 等^[100]研究城市污水处理厂出水的化学特性和毒性时也发现, 出水或者化学萃取成分的毒性会随着时间的延长而增加, 存在潜在毒性, 与我们的结果类似。

另外,两种生物毒性测试结果存在差异的原因可能在于,污染较为严重的监测断面可能会富含有机物,而有机物恰恰能为水生植物如斜生栅藻提供生长必要的养料,因而会对水生植物的生长产生促进作用,但同时反而会对水生动植物如大型水蚤的生长产生抑制,故两种生物毒性结果存在差异。

3.3 运用主成分分析法简单探讨水质毒性原因

主成分分析方法是把多个指标化为少数几个综合指标的统计分析方法。它找出几个综合因子(主成分)来代表原来众多的变量,使这些综合因子尽可能地反映原来变量的信息量,而且彼此之间互不相关。

3.3.1 主成分分析方法简介^[101]

3.3.1.1 主成分分析方法原理

主成分分析是设法将原来众多具有一定相关性(比如 P 个指标),重新组合成一组新的互相无关的综合指标来代替原来的指标。最经典的做法就是用 F_1 (选取的第一个线性组合,即第一个综合指标)的方差来表达,即 $\text{Var}(F_1)$ 越大,表示 F_1 包含的信息越多。因此在所有的线性组合中选取的 F_1 应该是方差最大的,故称 F_1 为第一主成分。如果第一主成分不足以代表原来 P 个指标的信息,再考虑选取 F_2 即选第二个线性组合,为了有效地反映原来信息, F_1 已有的信息就不需要再出现在 F_2 中,用数学语言表达就是要求 $\text{Cov}(F_1, F_2)=0$,则称 F_2 为第二主成分,依此类推可以构造出第三、第四,……,第 P 个主成分。

3.3.1.2 主成分分析数学模型

主成分分析是把多个指标化为少数几个综合指标的统计分析方法,依据主成分分析原理,主成分分析数学模型可按公式(3-2)~(3-4)构造:

$$F_1 = a_{11}ZX_1 + a_{21}ZX_2 + \cdots + a_{p1}ZX_p \quad (3-2)$$

$$F_2 = a_{12}ZX_1 + a_{22}ZX_2 + \cdots + a_{p2}ZX_p \quad (3-3)$$

……

$$F_n = a_{1n}ZX_1 + a_{2n}ZX_2 + \cdots + a_{pn}ZX_p \quad (3-4)$$

其中 $a_{1i}, a_{2i}, \cdots, a_{pi} (i=1 \dots n)$ 为 X 的协方差阵 Σ 的特征值多对应的特征向量, ZX_1, ZX_2, \cdots, ZX_p 是原始变量经过标准化处理的值,因为在实际应用中,往往存在指标的量纲不同,所以在计算之前须先消除量纲的影响,而将原始数据标准化,本文所采用的数据就存在量纲影响[注:本文指的数据标准化是指 Z 标

准化], 特征向量和相关系数矩阵分别如式(3-5)和式(3-6)计算可得。

$$A = (a_{ij})_{p \times m} = (a_1, a_2, \dots, a_m) \quad (3-5)$$

$$Ra_i = \lambda_i a_i \quad (3-6)$$

R 为相关系数矩阵, λ_i, a_i 是相应的特征值和单位特征向量, $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_p \geq 0$ 。

主成分分析主要步骤如下:

- (1) 指标数据标准化 (SPSS 软件自动执行);
- (2) 指标之间的相关性判定;
- (3) 确定主成分个数 m;
- (4) 主成分 F_i 表达式;
- (5) 主成分 F_i 命名;

3.3.2 主成分分析结果

本文对水样的 11 项基本理化指标(pH、DO、总碱度、氨氮、TOC、 Cl^- 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 SO_4^{2-} 、 F^- 、 HPO_4^{2-})和 22 种金属含量(Al、Fe、Mg、P、S、Zn、Cr、Ni、Cu、Se、Cd 等)共 33 项指标进行了主成分分析, 所有数据分析采用 SPSS13.0 软件进行。方差分解主成分的提取情况如表 3-4 所示。

表3-4 方差分解主成分提取分析
Table3-4 Picking analysis of major component

主成分 (Component)	初始特征值 (Initial Eigenvalues)		
	特征值	方差百分比	累计方差百分比
	Total	%of Variance	Cumulative %
1	13.146	39.835	39.836
2	6.903	20.917	60.752
3	3.166	9.593	70.345
4	2.937	8.900	79.245
5	1.695	5.136	84.381
6	1.443	4.373	88.754
7	1.086	3.291	92.045
8	0.790	2.301	94.265
...

主成分个数提取原则为主成分对应的特征值大于1的前m个主成分,从表3-4可知,本文可提取7个主成分。

7个主成分的初始因子载荷矩阵列于表3-5中,可以看出总碱度、TOC、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、Ca、K、Li、Mg、Mn、Na、P、S、Sr、Cr、Ni、Se、Cd在第一主成分上有较高载荷,氨氮、 NO_2^- 、 F^- 、Al、B、Fe、Si、Cu、Pb在第二主成分上有较高载荷,说明以上27项指标基本能够代替所有水质指标的信息。

表3-5 初始因子载荷矩阵
Table3-5 Original factors load matrix

	主成分						
	1	2	3	4	5	6	7
pH	-0.392	0.182	0.164	0.562	0.467	-0.133	-0.144
DO	-0.395	-0.537	0.382	0.117	0.239	0.524	0.020
总碱度	0.677	0.353	0.123	-0.330	-0.091	-0.086	-0.112
氨氮	0.060	0.428	-0.590	0.181	-0.312	-0.368	0.064
TOC	0.791	0.497	-0.175	-0.202	0.201	0.024	-0.042
Cl^-	0.872	-0.407	-0.066	-0.162	0.159	0.045	0.055
NO_3^-	-0.668	-0.028	0.458	0.298	-0.006	0.143	0.295
NO_2^-	0.149	0.671	0.155	-0.496	-0.271	0.036	-0.302
SO_4^{2-}	0.741	-0.311	0.147	0.464	-0.315	-0.012	0.009
F^-	-0.662	0.487	0.376	-0.291	0.073	-0.044	-0.088
HPO_4^{2-}	0.693	0.445	0.042	-0.214	0.421	0.165	0.027
Al	-0.147	0.797	-0.059	0.212	-0.205	0.432	-0.080
B	-0.133	0.478	-0.728	-0.183	-0.115	0.233	0.209
Ba	0.069	0.212	0.866	0.004	-0.169	0.154	-0.289
Ca	0.869	-0.397	-0.022	0.223	0.092	0.084	0.098
Fe	0.367	0.799	0.314	0.045	-0.078	-0.087	0.300
K	0.930	-0.179	-0.005	-0.246	0.144	0.009	-0.034
Li	0.857	-0.298	-0.100	0.336	0.094	0.011	-0.037
Mg	0.870	-0.266	0.027	0.378	-0.015	0.063	0.105
Mn	0.724	0.352	-0.020	-0.353	-0.024	0.219	-0.153

Na	0.863	-0.412	-0.053	-0.158	0.185	0.022	0.027
P	0.639	0.541	0.025	-0.238	0.390	0.141	0.005
S	0.807	-0.273	0.185	0.375	-0.278	-0.097	-0.048
Si	0.098	0.506	0.537	-0.031	0.056	-0.189	0.517
Sn	-0.301	-0.584	-0.499	0.125	0.430	-0.030	-0.043
Sr	0.721	-0.478	-0.006	0.439	0.074	0.123	0.152
主成分							
	1	2	3	4	5	6	7
Zn	0.573	-0.224	0.367	-0.376	0.276	-0.454	0.179
Cr	0.777	0.124	-0.057	-0.321	-0.230	0.376	0.191
Ni	0.863	-0.112	0.260	-0.011	-0.222	-0.217	-0.217
Cu	0.448	0.725	-0.067	0.214	0.117	-0.339	-0.257
Se	0.743	0.479	-0.134	0.226	-0.102	0.149	-0.073
Cd	0.611	0.583	0.001	0.476	-0.045	0.063	0.003
Pb	-0.105	0.574	0.036	0.386	0.320	0.074	-0.323

3.3.3 毒性原因初探

在环境系统中, 污染物与环境之间有着复杂的联系, 毒性的产生并不是由单一因素引起的, 而是多方面因素造成的。为了对毒性的原因进行初步的探讨, 找出影响水质与毒性的主要因素, 本文将主成分分析法得到的 27 个水质指标分别与急性毒性单位(acute Toxic Unit, TUa)和内梅罗指数作参数相关性分析(Pearson 相关系数), 结果如图 3-4 所示。

对比相关性分析结果可以看出, 毒性指标和内梅罗水质指数各自的影响因素并不完全相同。 NO_2^- 含量与内梅罗水质评价指数之间具有显著的相关关系, 相关系数为: 0.920, 说明 NO_2^- 含量超标严重, 对水质分级贡献较大, 而与生物毒性指标不具有相关性, 说明对水样的生物毒性贡献不大, 可能的原因在于本实验过程中试验时间较长, NO_2^- 由于不稳定而氧化为 NO_3^- , 毒性减小, 未对生物产生毒性作用。毒性单位与 K、Na、Li、Cr、Ni、Mn 的含量之间存在显著的相关关系。本文所研究样点的 Cr、Ni、Mn 含量不高, 均低于或接近水质标准, 因此在

水质分级中贡献不大,但是大量研究表明,较低的重金属含量也会对生物的生理活动产生一定的影响, Madoni^[102]发现镍在较低的浓度下 ($24\text{hLC50: } 0.95\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 就会对大型水蚤产生急性毒性作用, Al-yousuf 等^[103]发现当水体中少量的 Mn ($24\text{hEC50: } 15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 就会对大型水蚤的性别、身长存在一定的影响,具有一定的毒性。李爱琴^[104]等发现 Cr 在 $1.6\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 就会对大型水蚤有致毒作用,在 $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 就会对大型水蚤有致死作用,具有较强毒性。而 K、Ca、Na、Li 虽不属于有毒元素,但有报道表明,其含量的变化同样会对生物生理活动产生影响。

综上,内梅罗指数法与大型水蚤毒性测试评价的结果存在差异是由不同影响因素造成的, NO_2^- 超标会对水质分级产生较大影响,但在本实验中由于氧化分解对生物毒性贡献不大,而重金属虽然浓度很低,不会对水质分级产生贡献,却会对生物的生理活动产生影响。因此,研究水质时,不但要重视水质指标的监测,还应考虑与毒性评价结果。

3.4 小结

作为排洪纳污的清河大部分采样点生物毒性极高;京密引水渠作为北京市水源供水地生物毒性很低;小月河具有一定的生物毒性。生物毒性大小为:清河>小月河>京密引水渠。

主成分分析结果显示,总碱度、 TOC 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、Ca、K、Li、Mg、Mn、Sr、Cr、Ni、Se、Cd 等共 27 项指标能够代替所有水质指标信息。水样生物毒性与 Cl^- 、Ca、K、Li、Mn、Na、Cr、Ni 等指标有关;内梅罗水质指数与 NO_2^- 、 Cl^- 、K、Na、Ni 等指标有关。

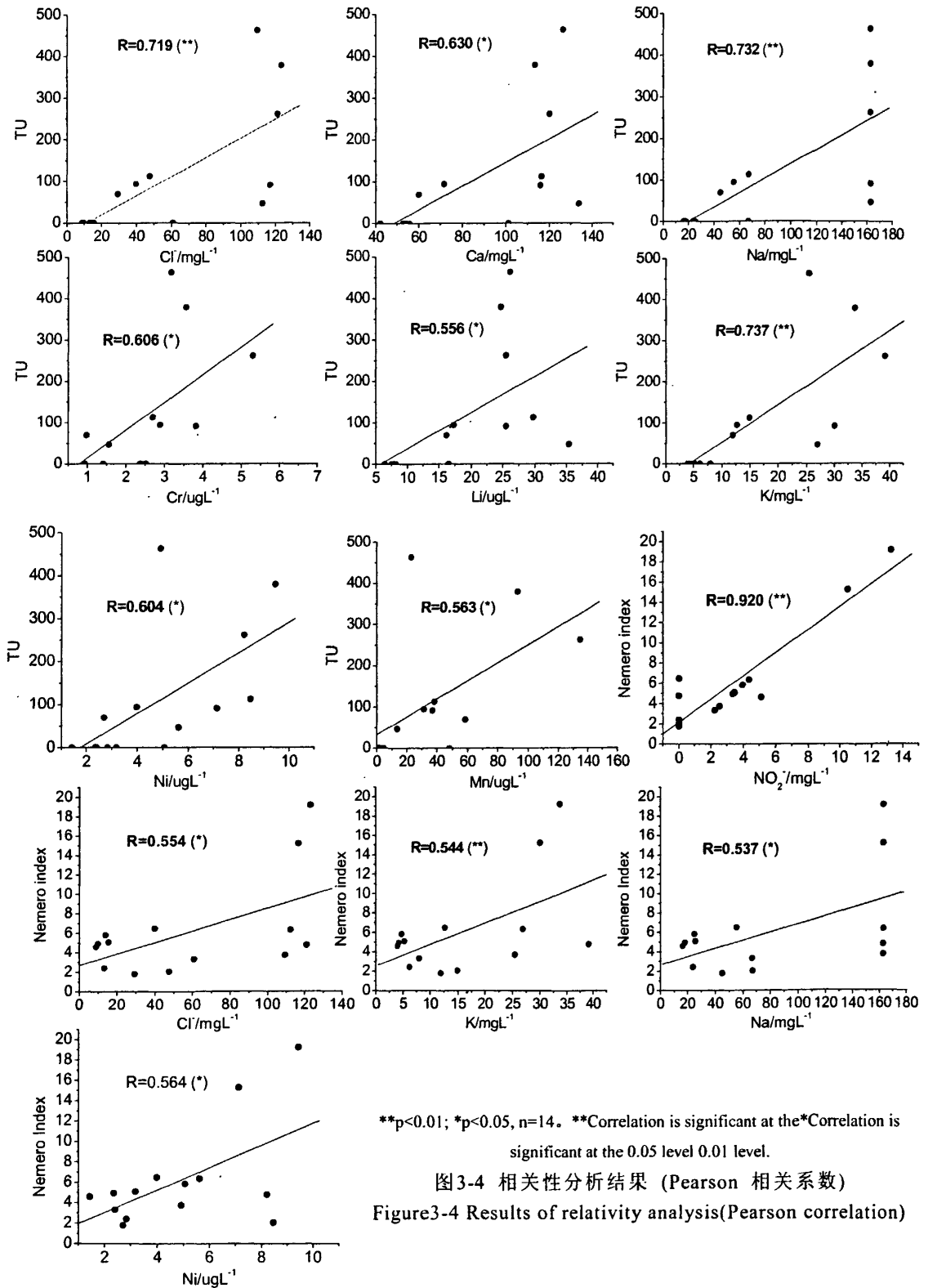


图3-4 相关性分析结果 (Pearson 相关系数)

Figure3-4 Results of relative analysis(Pearson correlation)

第4章 受重金属锌、镉污染水体的生物毒性研究

大型水蚤是淡水水体里重要的水生动物,在水生食物链里占据着极其重要的位置,对于痕量的重金属依然十分敏感,因而可以作为评价水体毒性的理想指示生物。当重金属由水体进入大型水蚤体内后,首先将导致机体一系列的生物化学变化,如重金属在大型水蚤体内的积累、金属硫蛋白和超氧化歧酶的诱导等。其体内的这些生物化学变化不但可以指示水体受到重金属受到污染的程度,还能够提供当水体受到重金属污染的预警。

Zn(Zinc)和 Cd(Cadmium)是典型的重金属元素,具有相似的化学特性,但二者在毒理学具有不同的特点。Zn 是生物体生命必需的元素,是生物体内多种酶合成的必要元素,参与植物的呼吸过程和氧化-还原过程,与叶绿素和生长素的合成有关。但是,过量的锌会伤害植物的根系,使根的生长受到阻碍。锌也是动物和人体的必需微量元素。在生物体内,锌既是许多酶的组成成分,又可以影响某些非酶的有机分子配位基的结构构型。然而,当环境浓度过高时同样会对水生生物产生毒性作用。而 Cd 是典型的毒性元素,镉可以和含羧基、氨基的蛋白质分子结合,从而抑制一些酶系统的活性,还可以引发以骨软化症为主体的病理变化,就是常说的“骨痛病”。但是当其在受到污染的环境中,两种金属都可以通过诱导生物体产生金属硫蛋白,超氧化歧酶等来提供抗氧化的能力,避免生物体受到影响,对于保护细胞具有十分重要的作用^[105,106]。

本章选取 14 个采样点中清洁的火器营桥样点作为背景,添加定量的 Zn 和 Cd 模拟水体受到重金属污染,以大型水蚤为受试生物,观察当大型水蚤受到重金属刺激时,体内相关的生理生化指标的变化,探讨它们之间存在的相互关系来指示水体受到的污染程度。可为评价重金属对水生生物的影响,制订废水排放浓度标准,防治污染等提供可靠的依据。

4.1 材料与方法

4.1.1 受试生物的培养

本研究所用大型水蚤为 62D.M 生物株,将大型水蚤进行纯化,选取同一母体出生的子代进行实验,经过长期的试验选用 OECD M₄ 培养基作为大型水蚤的培养液,每周换水三次,放在温度为(20±1)⁰C 的人工气候箱中以大烧杯进行培养,光照周期为 16h 光照, 8h 黑暗,每天饲以实验室培养的斜生栅藻,将斜生栅藻进行离心过滤以去除溶液介质,幼蚤定期被分离。斜生栅藻选用 OECD 推荐的培养基作为培养液,将培养基中含 Zn、Cd 和 EDTA 的成分剔除。所有试验用水均要在 20⁰C 经过 0.22μm 滤膜过滤方可使用。

4.1.2 Zn 和 Cd 浓度梯度的设定与受试生物的暴露

本实验选择将火器营桥(116°16'732E, 39°58'401N, 50m)采样点采集的水样作为背景, 添加 Zn 和 Cd 来模拟水体受到重金属的污染。经检测火器营桥监测点水样中的 Zn 和 Cd 的含量分别为 $0.08\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.007\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其他主要指标见表 4-1。实验重金属离子的来源为用高纯金属(99.99%)按照标准方法配置的 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 和 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 溶液。

表4-1 火器营桥水样主要参数
Table4-1 main parameter of water sampling for Huo-qi-yin Bridge

采样点	Cd 浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Zn 浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	pH	TOC($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	DO($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
HQYB	0.007 ± 0.00023	0.08 ± 0.0018	7.8	5.23	11.32

测量大型水蚤体内积累的 Zn 和 Cd (Body burden)以及 MT 的含量时, Zn 的实验梯度为: 10、20、50、100、200、500 和 $1000\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; Cd 的实验梯度为: 0.2、1、5、10、20、50 和 $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 测量两种金属联合暴露时大型水蚤体内 MT 的含量时, Zn 和 Cd 的联合实验浓度: 10+0.2、20+1、50+5、100+10、200+20、500+50 和 $1000+100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。所有实验梯度均设 2 个平行样, 并以不加重金属离子组为对照组。

实验在 500mL 的大烧杯内进行, 各梯度分别放健康的年龄相同的大型水蚤各 10~15 只, 实验条件基本相同, 采用静态法, 实验期间不换水。所有实验暴露时间均为 3 天, 测定 SOD 时, 实验开始后于 0、6、12、24、48 和 72h 取样; 测定大型水蚤体内负荷金属(Body burden)和 MT 的含量时不需要取样。

4.1.3 大型水蚤体内 Zn 和 Cd 积累量 (Body Burden)的测定

暴露结束后, 将每个浓度组的大型水蚤(10~15 只)放入干净的水中 1~2h, 使大型水蚤获得净化以排出内脏中多余的金属, 并记录死亡的大型水蚤个数。取出用双蒸水洗净, 放入试管在 80°C 烘干至恒重, 测量干重进行记录。干燥恒重后的样品用高纯 HNO_3 (优级纯, 68%)进行全量分解法消解, 将大型水蚤置于自制的消化管中, 加入约 2mL HNO_3 硝酸, 在 110°C 下消化直至溶液澄清透明。将消化得到的样品加入适量的 2%硝酸(优级纯)稀释, 定容至可测量的范围。

样品测定在中科院地球物理与地质所进行, 使用 VG PQ2 TURBO 型电感耦合等离子体-质谱连用 (ICP-MS)测定了样品中的 Zn 和 Cd 的含量。金属浓度以 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt 表示。

4.1.4 大型水蚤体内 MT 含量的测定

暴露结束后,将每个浓度组的大型水蚤(10~15只)放入干净的水中1~2h,使大型水蚤获得净化以排出内脏多余的金属。取出用双蒸水洗净,将大型水蚤表面的水分吸干,测量湿重进行记录。

MT 采用 Ag^+ /血红蛋白饱和法测定^[107,108],将大型水蚤小心移入 1.5mL 离心管中,加入 0.5mL 预冷的匀浆液($0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH=8.6 缓冲液),在冰浴中用超声波细胞破碎机进行破碎,然后在高速冷冻离心机中以 0°C 、 $16000\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 20min。取出上清液加入 0.5mL $20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Ag^+ 溶液。充分混合后室温下孵育 10-20min,加入 0.1mL 2%牛血红蛋白混合,放入沸水浴中加热 5min,冷却后,以 $1200\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5min。重复由加入 0.1mL 2%牛血红蛋白到以 $1200\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5min 的过程两次。将得到的混合液在 0°C 、 $16000\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 5min。取上清液加入高纯 HNO_3 (优级纯,68%)进行消化,向得到的透明液体加入适量的 2%硝酸(优级纯)稀释,定容至可测量的范围,使用 VG PQ2 TURBO 型电感耦合等离子体质谱连用(ICP-MS)测定样品中 Ag^+ 的浓度。MT 浓度以 MT 分子量为 7000 道尔顿和 1mol 的 MT 可结合 18 mol 的 Ag^+ (原子量为 108)计算。公式如式 4-1 所示:

$$\text{MT 含量} = C_{\text{Ag}^+} \times 7000 \div (18 \times 108) / ww \quad (4-1)$$

以每克湿组织中所含 MT 的毫克数表示($\mu\text{g MT}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight)。

4.1.5 大型水蚤体内超氧化歧酶(Superoxide dismutase, SOD)含量的测定方法

暴露结束后,取出大型水蚤,用预冷双蒸水洗净,用滤纸将大型水蚤表面的水分吸干,小心置于 1.5mL 的离心管中。加入 0.5mL 预冷的匀浆液($0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH=8.6 缓冲液),在冰浴中用超声波细胞破碎机进行破碎,然后在高速冷冻离心机中以 0°C 、 $16000\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 20min,取上清液采用改良的邻苯三酚自氧化测定法^[109-111]测定 SOD 的活性。取 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液(pH=8.6)4.5mL、双蒸水 4.2mL,立即加入 $0.3\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯三酚(以 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液作为溶剂配制),迅速摇匀倒入光径为 1cm 比色杯中,在波长 325nm 下,测量光密度值(O.D.),等数字变化均匀后,开始计数,每隔 30s 读一次数值,测定其 3min 内的反应速率,即 3min 内光密度 O.D.值的变化率。调整邻苯三酚的量使反应速率维持在 $0.070\cdot\text{min}^{-1}$,同时调整双蒸水的量,使反应液的总体积 $V_{\text{总}}$ 保持在 9.0mL。记录下这个使自氧化速率稳定为 $0.07\cdot\text{min}^{-1}$ 的邻苯三酚的量。测定 SOD 时,在试样管中取 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液(pH=8.6)4.5mL, SOD 酶样液 0.1mL,加入刚才记录的使自氧化速率为 0.07min^{-1}

的邻苯三酚的量,同时加入双蒸水使总体积保持不变,在波长 325nm 下,测定其 3min 内的反应速率即 $\Delta O.D._{325}min^{-1}$,根据酶活性单位定义来量化评估毒性大小。

酶活性单位定义为:每毫升反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50%的酶量定义为一个酶活性单位。酶活性单位的计算公式如下式 4-2 和 4-3 所示:

$$SOD \text{ 活性单位}(U)=\frac{\frac{0.07-\Delta O.D._{325}}{0.07}\times 100\%}{50\%}\times \frac{V_2}{V_1} \quad (4-2)$$

$$SOD \text{ 比活性单位}(U\cdot mg^{-1} \text{ 蛋白质})= SOD \text{ 活性单位}(U)/\text{蛋白质含量}(mg) \quad (4-3)$$

式中 Δ 的自氧化速率(min^{-1}); V_1 是酶样液体积 0.1mL, V_2 是反应液体总体积 9.0 mL。

4.2 结果与分析

4.2.1 大型水蚤体内重金属 Zn 和 Cd 的含量

大型水蚤体内重金属 Zn 和 Cd 的含量如图 4-1、图 4-2 所示。

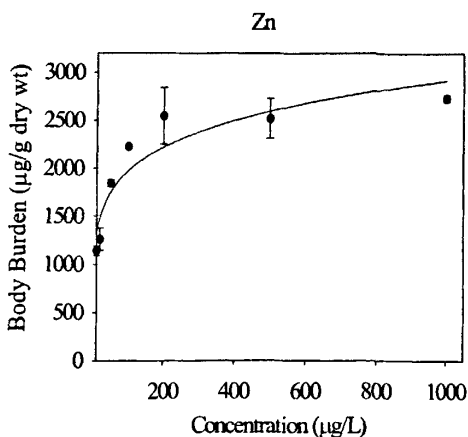


图 4-1 Zn 在大型水蚤体内的积累
Figure4-1Zn body burden within D.
magna

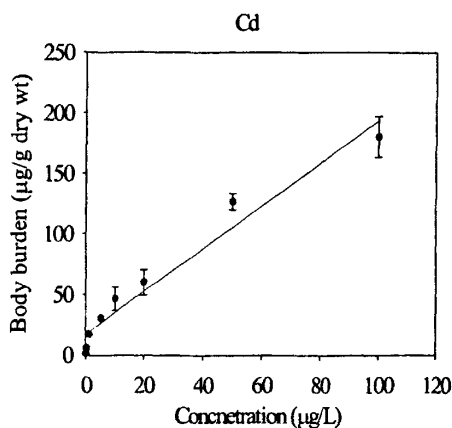


图 4-2 Cd 在大型水蚤体内的积累
Figure4-2Cd body burden within D.
magna

由图 4.1 和图 4.2 可以看出, Zn 和 Cd 在大型水蚤体内有明显的积累,其处理组与对照组之间的含量有显著的差异($p<0.01$)。Zn 和 Cd 在大型水蚤体内的背

景含量分别为 $1.48 \pm 0.24 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry wt}$ 和 $111.87 \pm 13.32 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry wt}$ 。Zn 在大型水蚤体内的积累随着暴露浓度的增加呈现出指数增加趋势，指数方程为： $Cb=904.207Cw^{0.170}$ ($r^2=0.943$, Zn)；而 Cd 在大型水蚤体内的积累随着暴露浓度的增加呈现线性增加，方程为： $Cb=17.632+1.760Cw$ ($r^2=0.956$, Cd)。Cw 代表金属的暴露浓度，Cb 代表重金属在大型水蚤体内的含量(Body burden)。

4.2.2 重金属 Zn 和 Cd 离子对大型水蚤体内 MT 的诱导程度

大型水蚤体内由 Zn 和 Cd 诱导的金属硫蛋白的含量分别如图 4-3 和图 4-4 所示。

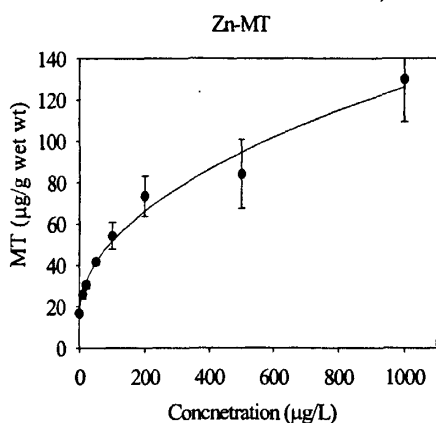


图 4-3 Zn 诱导的 MT 的含量
Figure 4-3 The MT content with Zn inducement

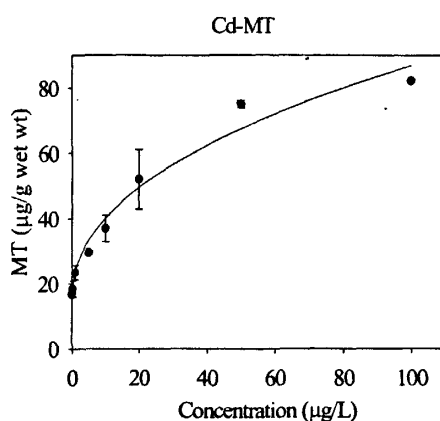


图 4-4 Cd 诱导的 MT 的含量
Figure 4-4 The MT content with Cd inducement

一般来讲，MT 的诱导与金属的暴露浓度、金属在生物体内的积累量具有一定的关系。由图 4-3、图 4-4 可知，在暴露期间，与对照组相比，大型水蚤体内 MT 含量呈显著变化($p<0.05$)，随着 2 种重金属离子浓度的升高而升高，呈现指数增加变化，指数方程为： $Cm=16.108+3.771Cw^{0.489}$ ($r^2=0.981$, Zn)、 $Cm=14.557+9.037Cw^{0.451}$ ($r^2=0.975$, Cd)。Cw 代表金属的暴露浓度，Cm 代表金属硫蛋白在大型水蚤体内的含量(MT)。

在单独暴露组中，大型水蚤体内由 Zn、Cd 诱导的 MT 含量要远远高于对照组的水平。大型水蚤体内由 Zn、Cd 诱导的 MT 含量分别处于 $25.87 \pm 2.12 \sim 130.09 \pm 20.59 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet wt}$ 、 $18.41 \pm 2.45 \sim 82.16 \pm 0.37 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet wt}$ 。

4.2.3 重金属 Zn 和 Cd 离子对大型水蚤体内 SOD 的诱导程度

大型水蚤体内超氧化歧酶活力的变化分别如图 4-5 和图 4-6 所示。

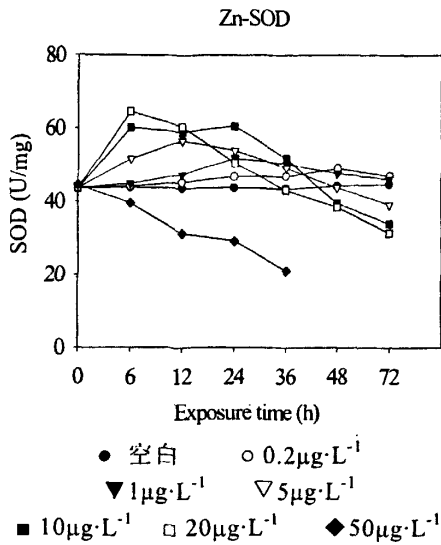


图4-5 由Zn诱导的SOD的含量

Figure 4-5 The SOD content with Zn inducement

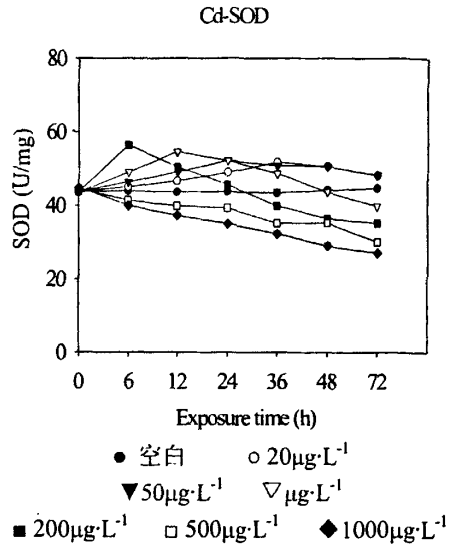


图4-6 由Cd诱导的SOD的含量

Figure 4-6 The SOD content with Cd inducement

由图 4-5 和图 4-6 可以看出, 在暴露期间(3d), 对照组基本无变化($p>0.05$, t -test), 与对照组相比, 由 Zn、Cd 各浓度组诱导的 SOD 随着时间的增加呈显著变化($p>0.05$, t -test)。由 Cd 的低浓度组诱导的 SOD 在初始阶段升高, 当达到最高值后随即下降, 呈现峰值变化。而 Cd 的高浓度组诱导的 SOD 随着时间的延长呈现下降趋势。由 Zn 各浓度组诱导的 SOD 也呈现出相似的变化(1000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组除外)。

4.2.4 Zn、Cd 联合暴露对大型水蚤体内 MT、SOD 的诱导程度

Zn 和 Cd 联合暴露对大型水蚤体内 MT、SOD 活力的变化分别如表 4-2、图 4-7 所示。

表4-2 联合暴露时大型水蚤体内的MT浓度

Table 4-2 The MT following *Daphnia magna* body burden co-exposure

暴露浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Zn&Cd-MT 浓度($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet wt)
空白	12.38 \pm 2.22
10Zn and 0.2Cd	67.47 \pm 4.10
20Zn and 1Cd	78.03 \pm 0.79
50Zn and 5Cd	95.61 \pm 2.10
100Zn and 10Cd	110.31 \pm 20.00
200Zn and 20Cd	132.16 \pm 2.51
500Zn and 50Cd	161.75 \pm 5.64
1000Zn and 100Cd	125.70 \pm 8.85

由表 4-2 可以看出, 在 Zn 和 Cd 联合暴露组中, 大型水蚤体内由 Zn 和 Cd 诱导的 MT 含量要远远高于对照组的水平, MT 随着联合浓度的升高呈现峰值变化, MT 含量处于 $67.47 \pm 4.70 \sim 161.75 \pm 5.64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet wt. 联合暴露组 MT 含量要高于两种金属单独暴露时的水平。

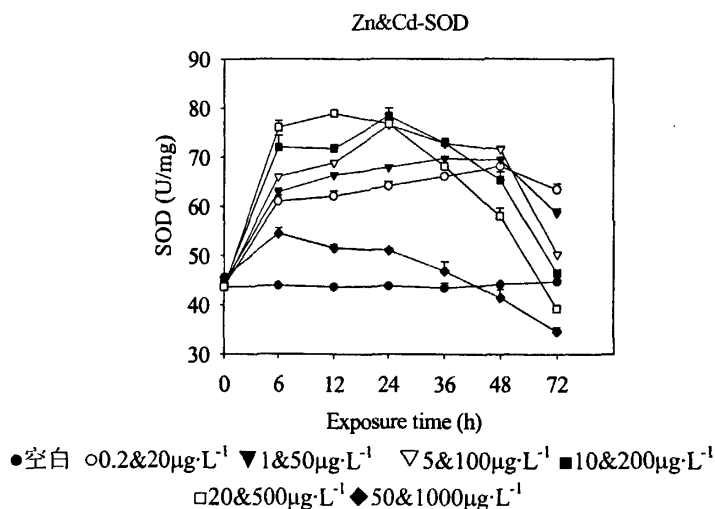


图4-7 Zn和Cd联合暴露条件下大型水蚤体内的SOD活性

Figure 4-7 The SOD activity following Zn and Cd co-exposure

从图 4-7 可以看出, 在暴露期间(3d), 对照组基本无变化($p>0.05$, t -test), 与对照组相比, 由 Zn 和 Cd 各浓度组诱导的 SOD 随着时间的增加呈显著变化($p>0.05$, t -test)。两种金属联合暴露的各浓度组诱导的 SOD 均呈现先升高后下降的峰值变化。比较 Zn、Cd 单独暴露与联合暴露时的结果, 可以得到 SOD 活力的大小为: Zn&Cd>Zn>Cd。

4.3 讨论

4.3.1 重金属 Zn 和 Cd 在大型水蚤体内的积累

对大型水蚤进行金属暴露,最为直接的效果就是可以导致重金属 Cd 和 Zn 在大型水蚤体内的积累。通过图 4-1 和图 4-2 我们可看出,大型水蚤体内积累金属的含量与暴露水平具有一定的比例关系。Cd 具有很好的正比例关系,而 Zn 则呈现出指数增长关系。存在这种差异的原因可能在于两种金属元素本身的不同,Cd 是大型水蚤非生命必需元素,毒性较大,并不能被大型水蚤转化利用,进入大型水蚤体内后即进行积累;而 Zn 是大型水蚤的生命必需元素,初期进入的 Zn 可以被转化为细胞成分而被大型水蚤所用,但随着 Zn 的不断进入,大型水蚤体内 Zn 的含量不断增加,当 Zn 的含量超出大型水蚤的忍耐负荷时,则不会再被利用从而累积起来。在许多生物体中,Zn 和 Cd 的暴露水平与组织里积累的金属含量均存在这样的比例关系^[112],比如甲壳类动物 *Litopenaeus vannamei*^[113]。尽管高浓度的金属暴露会对大型水蚤带来较强的毒性作用,比如抑制其生长,但是即使是在这种情况下,金属的暴露依然可以明显提升大型水蚤体内金属的积累程度^[114]。因此,当大型水蚤受到重金属污染时,其体内积累的金属含量并不能提供大型水蚤受到的危害程度,不能够指示重金属污染的程度。

4.3.2 重金属离子对大型水蚤体内 MT 含量的影响

当重金属进入生物体内,会诱导 MT 的产生。许多生物体都存在这样的现象。Moksnes 等报道在 Cd^{2+} ($0\text{--}2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 6d 时,凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量随着浓度的升高而显著升高^[112]。Manuela 等研究表明在 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 和 $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn^{2+} 作用(24 和 48h)下,卤虫(*Artemis parthenoBenetica*)机体 MT 含量随作用时间的延长显著增加,且 Cd^{2+} 诱导 MT 含量比 Zn^{2+} 的高^[115]。本研究表明大型水蚤在 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 作用下均可诱导产生 MT,且 MT 在 3d 内随重金属离子浓度的增加而升高,这与上述研究结果基本一致。这说明这两种重金属离子对大型水蚤机体 MT 含量的影响具有一定的剂量效应关系。

张克俭^[116]研究表明在低浓度 Zn^{2+} ($0.18\text{--}0.78\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用下,中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 肝胰脏的肝小管分泌细胞增多,吸收细胞数量减少,而高浓度 ($8.04\text{--}125.89\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 导致肝小管内分泌细胞胞体破裂,部分肝管破坏。在本实验中,我们推测 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 高浓度组 ($50\text{--}500\sim 100\text{--}1000\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 联合作用下,大型水蚤机体 MT 含量呈现一峰值变化的原因可能是由于重金属离子的过量侵入使大型水蚤体内的细胞活动紊乱,导致细胞胞体破裂,引起组织的伤害,而造成机体合成 MT 速度及含量的下降。

MT 能与多种重金属结合,而且当水环境受重金属污染,或者将重金属注入

动物体内, 均能诱导它的产生。重金属主要与体内新合成的 MT 相结合, 但当超过动物合成 MT 的速度和结合的能力时, 重金属即与大分子蛋白相结合, 抑制或使酶失活, 引起中毒症状^[117]。目前研究证明金属对 MT 的诱导反应是发生在转录水平, 通过位于 MT 基因 5-端的金属调节因子实现, 接触金属后, 由于 MT 基因转录速度增加而引起 MT mRNA 迅速增加。钙离子导体能在多种细胞中诱导 MT mRNA 表达, 而钙离子通道阻断剂和钙调素抑制剂则明显抑制上述诱导作用, 由此表明, MT 的诱导可能与钙通道的调节有关^[88]。本实验中大型水蚤机体 MT 含量在 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 以及两种金属联合暴露作用下被显著诱导升高, 两种重金属离子 Zn^{2+} (10、20、50、100、200、500 和 $1000\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 Cd^{2+} (0.2、1、5、10、20、50 和 $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 以及 Zn 和 Cd 的联合 (10&0.2、20&1、50&5、100&10、200&20、500&50 和 $1000\&100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 3d 后, MT 含量趋于稳定, 可能是因为金属离子以多种方式进入体内后, 机体细胞内金属调节因子增加了基因转录的速度而使 MT 合成速度增加, 当受到金属高浓度组的影响后, 细胞的钙离子通道可能被阻断, 使 MT 含量稳定在一个相对较高的水平。

许多金属离子在基因转录水平直接诱导 MT 合成, 这证明 MT 是维持细胞内金属稳态的快速应答和有效的反馈机制的一部分^[117]。王海黎等^[119]认为 MT 含量与水环境和体内组织中的重金属之间有显著的相关性, 并认为 MT 可以作为重金属暴露的生物标志物。虽然 MT 比常规检测重金属压力的指标 (成活率、增重率等) 具有更高的敏感性及早期的预警能力, 但同样有学者认为, MT 会受到自然因素如温度、盐度、蜕皮周期、性别、规格、饥饿等的影响, 这些因素的改变均会影响甲壳类动物机体对水环境中金属离子的吸收及在体内的累积, 而导致 MT 的改变^[114], 尤其在甲壳动物蜕皮期应用 MT 作为水环境的监测指标应慎重考虑。本研究结果表明, 两种重金属离子对大型水蚤 MT 的影响随浓度的升高显著变化, 表现出一定的剂量效应关系, 这说明 MT 可作为大型水蚤对重金属解毒作用的标志物, 但基于 MT 的作用机理, MT 不能作为机体受伤害的指标。因此, 本研究认为大型水蚤体内的 MT 含量作为受重金属污染水体重金属离子污染的监测指标具有一定可行性, 但同时还应综合考虑重金属离子对机体的伤害指标如抗氧化酶系统等。

4.3.3 重金属 Zn 和 Cd 离子对大型水蚤体内 SOD 含量的影响

当重金属进入生物体内, 会诱导 SOD 活力的变化。许多生物体都存在这样的现象。侯丽萍^[47]等研究表明在 Cd^{2+} (1.096、2.19、 $4.365\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 (6、12、24 和 72 h) 下, 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 鱼种肝组织 SOD 活力随 Cd^{2+} 浓度的增加呈现先短暂升高, 然后逐渐下降, 同一浓度随处理时间的延长, SOD 活力逐步下降的趋势。P. Siraj^[120]研究了暴露于 $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} (1、7、15d) 时, 莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 肝脏、肾脏 SOD 活力均较对照组高且呈上升趋势。

势, 30d 酶活力有所下降。本研究表明 2 种重金属离子低浓度组均表现为先升高而后降低的趋势, 高浓度 Zn^{2+} 对大型水蚤机体 SOD 活力和高浓度 Cd^{2+} 对大型水蚤机体 SOD 活力均表现为抑制作用, 且随时间延长抑制率增强, 其影响程度与重金属离子浓度相关, 联合暴露组亦具有相似的变化趋势。这说明两种重金属离子对大型水蚤机体 SOD 活力的影响具有明显的时间、剂量效应关系, 也反映出两种重金属离子对大型水蚤机体结构伤害程度。

水生生物受到环境刺激后会发生非特异性防御反应, 引发一系列代谢变化, 动员机体的代偿适应功能来抵抗和适应各种应激刺激, 产生应激适应; 若应激反应超过一定强度且机体不能适应时, 对机体组织结构造成伤害, 导致应激损伤。唐学玺^[121]等报道在($<0.08\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)葱作用下, 黑裙(*Sebastes fuscescens*)鳃丝和肾组织 SOD 活力高于对照组, 出现应激刺激。Stebbing^[122]认为毒物在低浓度下出现的这种增益现象, 是其在无毒情况下的刺激反应, 并把这一现象称为“毒物兴奋效应”。本实验在两种重金属离子(Zn^{2+} 和 Cd^{2+})作用下, 大型水蚤机体 SOD 在低浓度短时间内表现为促进作用, 与上述研究结果一致。张克俭^[116]研究表明在低浓度 Zn^{2+} ($0.18\text{--}0.78\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)作用下, 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)肝胰脏的肝小管分泌细胞增多, 吸收细胞数量减少, 而高浓度($8.04\text{--}125.89\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)导致肝小管内分泌细胞胞体破裂, 部分肝管破坏。在本实验中, 我们推测低浓度两种重金属的作用下大型水蚤机体内组织分泌细胞数量可能也会增多, 此时大型水蚤机体需要大量的溶酶体等参与解毒的吞噬作用, 随着实验时间的延长及浓度的增加, 重金属离子的过量侵入超出机体的解毒能力, 在细胞紊乱的活动中引起细胞的解体, 应激反应超过了机体适应范围, 从而组织结构受到伤害, SOD 活性受到了抑制, 产生的自由基 SOD 不能及时清除, 发生了应激损伤, 造成活性氧伤害。

所有需氧生物的生理过程均有自由基的产生与清除, 且两者之间存在平衡, 若失去平衡, 便会损伤机体引起病变。SOD 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力与其含量和活力有关, 当生物体受到轻度逆境胁迫时, SOD 活力往往升高, 而当受到重度逆境胁迫时, SOD 活力通常降低^[118]。本实验大型水蚤受 2 种重金属离子的胁迫, 机体通过酶系统和非酶系统反应, 还原产生活性氧和自由基, 机体代偿适应功能启动, SOD 活力受到应激刺激而升高, 从而维持自由基的平衡, 随重金属离子浓度的升高和作用时间的延长, 机体的应激反应超过一定强度而发生了氧化应激损伤。

依据本实验两种重金属离子对大型水蚤机体 SOD 活力的抑制和伤害程度, 可得出 2 种重金属离子对大型水蚤的伤害大小顺序为: $\text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。这种差别可能是 2 种重金属离子对大型水蚤机体诱导 SOD 活力变化的能力、酶亚基结合的数量、大型水蚤机体对重金属离子吸收和累积的不同及重金属离子浓度和致毒机理有关。 Cd^{2+} 是非必需金属, 对多种酶活力都有影响, 较低剂量就对生物有毒性

的影响, Zn^{2+} 通过结合到结构物上或通过抑制金属催化的脂质过氧化反应可使胞内原生质和内膜处于稳定状态^[123], 所以 Zn^{2+} 对机体的毒性较弱。

4.3.4 重金属 Zn 和 Cd 离子对大型水蚤的联合毒性作用

金属离子的联合暴露可对生物带来不同的作用, 主要分为: 相加、协同、拮抗、独立、增加 5 种作用。目前, 很少有学者利用 MT、SOD 活性等生物标志物来考察联合毒性与单一毒性的关系, 更缺少利用这些指标来判断相加、拮抗、协同关系的方法, SOD、MT 等指标与金属浓度有一定关系, 但与 EC50 等宏观指标存在差别, 直接利用“相加指数法”或“毒性单位法”评价有一定难度, 因此本文尝试采用混合毒性效应与单一毒性效应的加和进行比较, 初步研究重金属联合毒性效应问题。

4.3.4.1 重金属 Zn 和 Cd 联合暴露对大型水蚤体内 MT 含量的影响

从表 4-3 可以看出, 低浓度组($10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn 和 $0.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd~ $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn 和 $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd)暴露时 Zn 和 Cd 表现出协同作用, 表明两种金属离子对大型水蚤的联合毒性要比单独暴露时的毒性之和要大; 中间浓度组暴露时($200\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn 和 $20\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd~ $500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn 和 $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd) Zn 和 Cd 表现出近似的相加作用, 其毒性约等于两种金属离子单独暴露时毒性的加和作用; 高浓度组($1000\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn 和 $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd)暴露时 Zn 和 Cd 表现为拮抗作用, 表明联合暴露时的毒性作用要小于单独暴露时的毒性作用之和。

表4-3 利用MT为毒性指标的重金属Zn和Cd联合毒性作用机制

Table 4-3 Joint- biotoxicity mechanism Zn and Cd with MT as the biomarker

浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	-MT含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{wet wt})$		相互关系 (<,>,<=,>=)	联合毒性作用 机制
	Cd&Zn ^{a)}	Cd+Zn ^{b)}		
0 (对照)	12.38±2.22	16.72±0.52	—	—
0.2Cd&10Zn	67.47±4.10	44.28±0.24	>	协同作用
1Cd&20Zn	78.03±0.79	53.98±2.87	>	协同作用
5Cd&50Zn	95.61±2.10	71.12±1.45	>	协同作用
10Cd&100Zn	110.31±20.00	91.22±7.76	>	协同作用
20Cd&200Zn	132.16±2.51	125.47±13.32	≈	相加作用
50Cd&500Zn	161.75±5.64	159.08±12.56	≈	相加作用
100Cd&1000Zn	125.70±8.85	212.25±14.30	<	拮抗作用

注: 表中数据为平均值±标准差; a): 联合毒性效应; b): Cd和Zn单一毒性效应的加和

本研究发现, 以 MT 含量为生物标志物考察 Cd、Zn 的联合毒性, 在较低浓度时 Cd、Zn 表现为协同作用, 在中等浓度时表现为相加作用, 在较高浓度时表

现为拮抗作用。卢国栋等人也得到了类似的结论(卢国栋等, 2003): Cd 和 Zn 的联合暴露可以诱导大鼠体内 MT-1 和 MT-2 mRNA 的变化, 其联合毒性作用在不同暴露浓度和时间组表现也不同; 主要表现为 3 种联合作用: 相加、协同和拮抗^[124]。在重金属联合毒性研究中, 目前已提出一些机理来解释重金属的联合作用, 如 Gerhardt 等(1993)指出, 金属共存时, 可导致细胞膜通透性增加, 毒性增强, 产生协同作用; 而拮抗作用可由竞争点位理论(Competitive site theory)来解释: 金属离子进入细胞前先要与细胞表面的接受位点(Receptor site)结合, 金属共存时, 将会竞争接受位点, 产生拮抗作用(Vranken *et al.*, 1988)^[125]。本研究中 Cd、Zn 产生 3 种联合毒性作用主要原因在于在较低浓度条件下, MT 的螯合结点是不饱和的, Cd 和 Zn 不存在相互竞争均能与 MT 结合, 同时增加了细胞的膜通透性, 因此在低浓度下表现为协同效应; 而在较高浓度条件下, 由于 MT 的螯合结点逐渐饱和, 同时 Zn 原子是具有抗氧化能力物质诸如超氧化歧酶的必要组成成分, 对于保护细胞具有十分重要的作用(Powell, 2000; Cousins *et al.*, 1985)^[126, 127], 因此 Zn 原子在一定程度上阻碍了 Cd 的结合, 某种程度上降低了 Cd 的毒性伤害作用, 因此在较高浓度组表现为拮抗作用, 而中等浓度组作为一个临界过渡域表现出近似的相加作用。随着重金属联合浓度的升高, 大型水蚤体 MT 含量逐渐升高, 而在 100&1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 组 MT 含量有降低趋势, 这可能是因为 Cd 和 Zn 浓度均超过了对大型水蚤的 EC50 值, 已不适宜大型水蚤的生存, 在短时间内尚未引起 MT 的诱导与合成就已经发生了死亡现象, 因此导致 MT 含量有降低趋势。在实验过程中 100&1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 组确实观察到部分大型水蚤发生了死亡, 关于重金属共存对 MT 的影响机制尚需进一步研究和探讨。

综上所述, MT 与重金属具有高度的亲和性, 可作为单一重金属暴露的效应性标志物, 同时也可作为重金属 Cd、Zn 联合毒性评价的敏感指标。

4.3.4.2 重金属 Cd 和 Zn 联合暴露对大型水蚤体内 SOD 活性的影响

本研究选取第 36 小时大型水蚤体内的 SOD 活性作为毒性指标分析金属 Cd 和 Zn 联合毒性作用机制, 采用联合毒性效应与单一毒性效应的加和进行比较以分析重金属 Cd 和 Zn 联合暴露下的毒性作用机制, 结果列于表 4-4 中。

表4-4 利用第36小时SOD活性作为毒性指标的联合毒性作用机制
Table 4-4 Joint- biotoxicity mechanism with 36th h-SOD activity as the biomarker

浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	SOD活性/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)		相互关系 ($<, >, =, \approx$)	联合毒性作用 机制
	Cd&Zn ^{a)}	Cd+Zn ^{b)}		
空白 (control)	43.50	43.50	=	—
0.2Cd&20Zn	66.15	98.70	<	拮抗作用
1Cd&50Zn	69.81	101.16	<	拮抗作用
5Cd&Zn100	72.83	97.92	<	拮抗作用
10Cd&200Zn	72.97	91.65	<	拮抗作用
20Cd&500Zn	68.22	78.39	<	拮抗作用
50Cd&1000Zn	46.95	53.36	<	拮抗作用

注: a): 联合毒性效应; b): Cd和Zn单一毒性效应的加和

由上表 4-4 可以看出,联合作用下 SOD 的活性处于 $43.50\sim 72.96\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{wet wt}$ 之间,联合暴露时的毒性作用均要小于单独暴露时的毒性作用之和,即表现为拮抗作用。刘清等人发现 Cd 与 Zn 对发光菌的联合毒性呈拮抗作用^[128]。Otitoloju 研究了 Zn、Cu 和 Cd 两两组合对红树螺的的毒性,发现 Zn 可降低 Cu 和 Cd 的毒性效应^[129]。拮抗作用可由竞争点位理论(competitive site theory)来解释,该理论认为金属离子进入细胞前先与细胞表面的接受点(receptor site)结合^[125]。SOD 是生物体内抗氧化剂,抵制金属元素诱导的活性氧自由基增加,但是 Zn 和 Cd 对 SOD 的作用机理有较大差别,Zn 原子是具有抗氧化能力物质诸如超氧化歧酶的必要组成成分,对于保护细胞具有十分重要的作用^[126,127],Zn 没有像 Cd 一样表现出对 SOD 的抑制作用,相反有助于 SOD 的合成,因此 Zn 原子在一定程度上阻碍了 Cd 的结合,某种程度上降低了 Cd 的毒性伤害作用,总体上表现出拮抗作用。

综上所述,SOD 活性对重金属暴露敏感,可作为单一重金属暴露的效应性标志物,同时也可作为重金属 Cd、Zn 联合毒性评价的指标。但是污染物的联合毒性作用是一个很复杂的问题,其联合作用效应不仅与污染物组成有关,也与测试生物有关,联合作用效应的性质还与所暴露的剂量有关。对于联合作用的机理尚知不多,这些都有待于进一步研究。

4.4 相关生物毒性指标间的关系

4.4.1 大型水蚤体内金属含量(Body Burden)与 MT 的关系

金属硫蛋白可以提供结合金属所需的配位基,通过结合金属在大型水蚤体内进行储存,因此具有十分重要的作用。为了验证 MT 与体内金属积累(Body Burden)

之间是否存在某种关联, 本文计算了金属硫蛋白与体内金属积累(Body Burden)间的关系, 如图 4-8、图 4-9 所示。可以看出, 大型水蚤体内由 Cd 诱导的 MT 与体内积累的 Cd 含量具有显著的线性相关关系($r^2=0.954$, $p<0.05$)。Zn 则表现指数相关关系($r^2=0.966$, $p<0.05$)。两种金属表现略有不同, 相比 Cd 具有一定的滞后性。上述结果表明大型水蚤体内 MT 会随着体内积累的重金属含量(Body burden)的升高而升高。MT 作为受重金属污染水体的监测指标具有一定可行性。

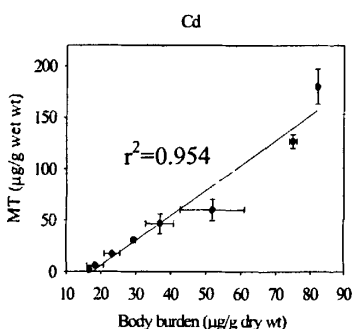


图 4-8 MT与Body burden的关系
(Cd)

Figure 4-8 the relationship between
MT and body burden(Cd)

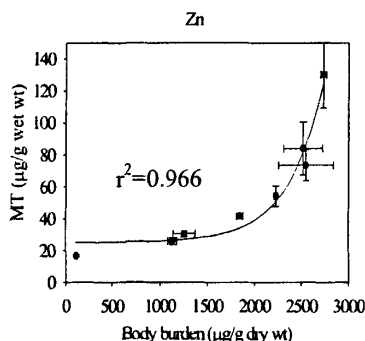


图 4-9 MT与Body burden的关系
(Zn)

Figure 4-8 the relationship between
MT and body burden(Zn)

4.4.2 大型水蚤体内金属含量(Body Burden)与 SOD 的关系

计算得到的 SOD 与体内金属积累(Body Burden)间的相关关系, 如图 4-10、图 4-11 所示。

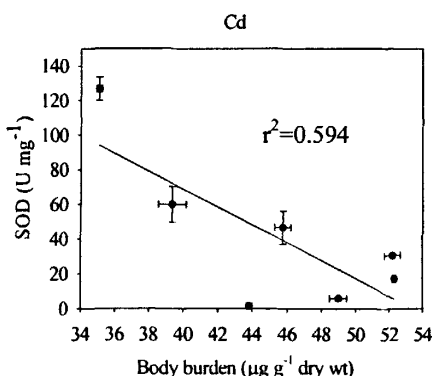


图 4-10 SOD与Bb的相关关系(Cd)
Figure 4-10 co-relation between
SOD and Bb(Cd)

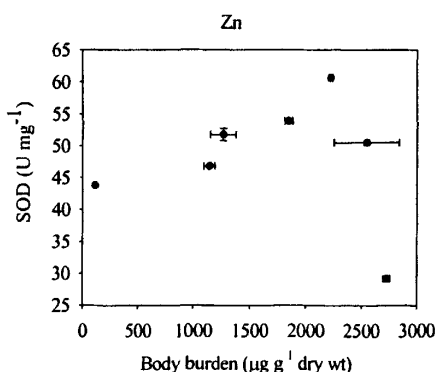


图 4-11 SOD与Bb的相关关系(Zn)
Figure 4-10 co-relation between
SOD and Bb(Zn)

由图 4-10、图 4-11 可以看出, 大型水蚤体内由 Cd 诱导的 SOD 与其体内积

累的 Cd 含量具有较为显著的负线性相关关系($r^2=0.594$, $p<0.05$)。大型水蚤体内 SOD 活力会随着体内积累的 Cd 含量(Body burden)的升高而降低。而由 Zn 诱导的 SOD 与其体内积累的 Zn 含量没有明显的关系。两者存在差异的原因可能在于大型水蚤机体对重金属离子吸收和累积的不同及重金属离子浓度和致毒机理有关。 Cd^{2+} 是非必需金属,对多种酶活力都有影响,较低剂量就对生物有毒性的影响,不会被大型水蚤机体转化为细胞组成成分所利用,从一开始就会抑制大型水蚤机体 SOD 活性。而 Zn^{2+} 对机体的毒性较弱, Zn^{2+} 通过结合到结构物上或通过抑制金属催化的脂质过氧化反应可使胞内原生质和内膜处于稳定状态^[123],同时 Zn 又是某些组织酶的组成成分之一,少量的可以被组织吸收转化而利用,所以可能由 Zn 诱导导致 SOD 的变化与 Zn 在大型水蚤体内积累的程度并无确定的关系。因此,将 SOD 作为受重金属污染水体的监测指标并不能指示水体受到的污染程度。

4.4.3 致死率与体内金属含量(Body Burden)/MT 比值的关系

由暴露实验得到的大型水蚤的致死率与 Zn、Cd 在大型水蚤体内积累的含量 (Body burden)和诱导的 MT 含量的比值的比值的关系如图 4-12、图 4-13 所示。

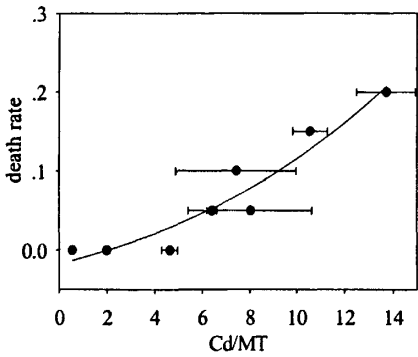


图4-12 死亡率与Cd/MT的关系
Figure 4-12 the relationship
between death rate and Cd/MT

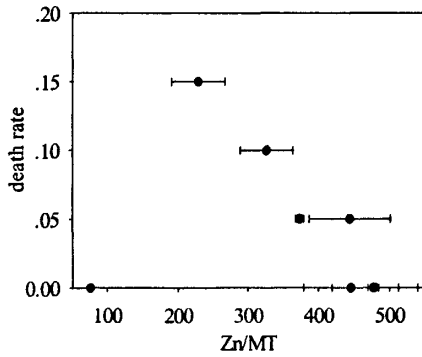


图4-13 死亡率与Zn/MT的关系
Figure 4-12 the relationship
between death rate and Zn/MT

由图 4-12 和图 4-13 可以看出,Cd 对大型水蚤的致死率与 Cd body burden/MT 比值呈指数关系趋势($y=-0.0998+0.0822x^{0.0963}$, $r^2=0.915$)。当 Cd/MT<6 时随着 Cd/MT 比值的增加,死亡率基本没有变化;而当 Cd/MT>6 时,随着 Cd/MT 比值的增加,致死率呈指数增加。有学者研究指出,一个 MT 分子最多可以结合 6 个 Cd^{2+} ,当 Cd^{2+} 过多进入生物体,与 MT 饱和,而又无其他解毒作用时,则 Cd^{2+} 对生物体表现为显著毒性作用。在本实验中,随着 Cd 在大型水蚤体内的积累,

Cd 与 MT 的结合逐步达到饱和而超过大型水蚤的生理耐受程度, 多余的 Cd^{2+} 并不能被解毒, 所以就会对大型水蚤产生毒性作用, 造成大型水蚤的死亡。而 Zn 对大型水蚤的致死率与 Zn body burden/MT 比值并无任何明显的关系。随着暴露浓度的升高 ($100\text{-}1000\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), MT 的浓度加速高于 Zn 的体内积累, 可以认为, 针对于 Zn 高浓度的暴露, MT 比 Zn 体内积累更加敏感。因此, 在高暴露浓度(非低)条件下, MT 可以作为 Zn 污染的有效指标。因此, 与金属体内积累或单一的 MT 指标相比, Cd/MT 比值可以更好的预测金属对大型水蚤的毒性。金属暴露方面的研究对于环境评估具有重要的潜在价值, 关注点应着眼于暴露的效果对于金属和生物组织是特定的, 二方面产生潜在的影响, 使结果更为复杂。

4.5 小结

当水体受到重金属污染时, 水环境中的生物如大型水蚤通过吸收或摄食作用, 体内就会积累重金属, 相应地发生生理化学变化, 如诱导 MT 和 SOD 等。大型水蚤体内积累重金属的含量并不能提供大型水蚤受到的危害程度, 因而不能够指示重金属污染的程度。SOD 作为受重金属污染水体的监测指标同样不能指示水体受到的污染程度。重金属 Cd body burden/MT 的比值可以很好的反映水体受到重金属 Cd 污染时对大型水蚤的毒性作用, 但由于重金属 Zn 并没有表现出的相似的结果, 所以以重金属的 body burden/MT 的比值作为受重金属污染水体重金属离子污染的监测指标来指示水体受到的污染程度同样具有局限性。而无论是由 Zn 还是由 Cd 诱导的 MT 与暴露浓度和大型水蚤体内积累的重金属含量 (body burden) 之间均具有较好的相关关系, 因此以 MT 作为受重金属污染水体重金属离子污染的监测指标是具有可行性。

水质分级的好坏并不能反映水质的综合毒性的大小, 结合化学指标和毒理学指标共同评价水质才更为合理。

第5章 受重金属铜污染水体的生物毒性 及生物有效性研究

铜是人体不可缺少的微量元素,主要存在于肌肉和骨骼内,其余分布在肝脏和血液中,微量存在于含铜的酶中。人体中30种以上的酶和蛋白质中均含有铜,这些酶缺乏铜就失去活性。含铜的酶能在体内把氧和氢直接转化为水,这是铜作为人体中独特的催化剂的又一奇特功能。铜是血液中一种不可缺少的重要成分,参与造血过程以及铁的代谢,铜还参与细胞色素铜蛋白和某些酶的合成,如催化酪氨酸转化为多巴,进而转化为色素,使毛发不发生病变^[130]。

虽然铜是生命活动所必需元素,但铜在生物体内积累值超过一定的阈值就会对生物体造成危害。特别是随着工农业的发展,矿山和冶金等工业中含铜废水中的排放,对各种生物的健康和生存构成了极大的威胁。目前已经证明铜具有抗生育作用,能够影响胎儿的正常发育,引起流产、死胎、畸胎、早产等现象;铜过剩可使血红蛋白变性,损伤细胞膜,抑制一些酶的活性,从而影响机体的正常代谢,并且还会导致心血管系统疾病^[131]。目前越来越多的人开始关注铜污染。在冶炼、金属加工、机器制造、有机合成及其他工业的废水中都含有铜,其中以金属加工、电镀工厂所排废水含铜量最高,每升废水含铜几十至几百毫克。这种废水排入水体,会影响水的质量。水中铜含量达 $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对水体自净有明显的抑制作用;超过 $3.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,会产生异味,超过 $15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,就无法饮用。铜对水生生物的毒性很大,有人认为铜对鱼类毒性浓度始于 $0.002\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,但一般认为水体含铜 $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对鱼类是安全的。在一些小河中,曾发生铜污染引起水生生物的急性中毒事件;在海岸和港湾地区,曾发生铜污染引起牡蛎肉变绿的事件。

在生物系统中,金属元素必须是以容易吸收的形式存在才具备生物有效性。例如有些元素在环境中很稀少(如钼)或很难溶解(如铝),所以不具备生物有效性。铜在地壳中的含量相对来讲是较丰富的,而且具有一定的可溶性,但它的生物有效性取决于一些环境因子,如pH、氧化还原电位、土壤沉积类型、水硬度、有机物含量等,这些因子的任何变化都会引起铜的存在形态和生物有效性,乃至对环境的毒性作用。

大型水蚤是淡水水体里重要的水生动物,在水生食物链里占据着极其重要的位置,对于痕量的重金属依然十分敏感,本章通过添加Cu模拟水体受到重金属的污染情况,以大型水蚤为试验生物,分别从大型水蚤体内的重金属铜含量

(Body burden)、MT含量、体内的超氧化物歧化酶(SOD)活性和不同浓度24h大型水蚤的死亡率4方面以及它们之间的联系全面阐述了铜离子对大型水蚤致毒解毒的生化效应,并研究了水体中不同络合剂对于铜的毒性的

影响,在此基础上,利用同位素示踪技术初步研究了水体中金属铜的生物有效性问题。研究结果为水环境质量保证提供必要的数据,为制定预防性的管理措施,及时避免或减轻重金属污染物对水生生态系统造成的损害提供科学依据。

5.1 材料和方法

5.1.1 大型水蚤在不同浓度铜溶液中的暴露及毒性指标的测定

根据国家水环境质量和大量的预实验结果,设置模拟 Cu 的污染浓度分别为: 10、20、50、100、200 和 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,采用向背景水体添加不同量的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 溶液(浓度为: 1000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 购自国家标准物质研究中心)的方式模拟,所有浓度的样品均设 2 个平行样,以不加重金属离子组为对照组。测量大型水蚤体内积累的 Cu (Body burden) 含量、MT 的含量以及超氧化歧酶的活力时,大型水蚤的暴露在 500mL 的大烧杯内进行,各浓度梯度分别放入健康的年龄相同的大型水蚤各 10~15 只,实验条件基本相同,采用静态法,实验期间不换水。所有实验暴露时间均为 3 天,测定 SOD 时,实验开始后于 0、6、12、24、48 和 72h 取样;测定大型水蚤体内金属含量 (Body burden) 和 MT 的含量时不需要取样。大型水蚤体内重金属含量 (Body Burden) 的测定(方法参见 4.1.2 节),大型水蚤体内 MT 含量的测定采用 Ag^+ /血红蛋白饱和法测定(方法参见 4.1.3 节),大型水蚤体内 SOD 活性采用的测定采用改进的邻苯三酚自氧化方法测定(方法参见 4.1.4 节),大型水蚤致死率测定选取 Cu 浓度梯度与 2.6 中叙述的浓度梯度一致,实验在 50mL 小烧杯中进行的,每个烧杯放入 10 只出生 24h 的幼蚤,设 3 个平行样,并以不加重金属铜离子组为对照组,48h 后记录各烧杯中死亡幼蚤的数量,计算致死率。

5.1.2 有机络合剂对水体中铜毒性影响的研究方法

根据文献报道,本节选择乙二胺、草酸、酒石酸、EDTA 和腐殖酸 5 种常见络合剂研究水体中有机络合剂对铜毒性的影响。以稀释水作为背景水样进行研究,稀释水的基本离子组成如表 5-1 所示。

表 5-1 稀释水基本离子组成 (单位: $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Table 5-1 The components of diluted water $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Na^+	Cl^-	SO_4^{2-}	HCO_3^{2-}
2.0	0.4	0.084	0.77	4.084	0.4	0.77

水体中加入的铜量为 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别在不同的暴露体系中加入乙二胺、草酸、酒石酸、EDTA 和腐殖酸使其浓度如表 5-2 所示。所有体系均设 2 组平行样, 并

以不加有机络合剂组为对照组。

表5-2 各暴露体系中铜及络合剂的含量

Table 5-2 The exposure system, the content of copper and complexing agent

	对照组	乙二胺	草酸	酒石酸	EDTA	腐殖酸
铜浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	3	3	3	3	3	3
络合剂浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0	2	2	2	2	-
络合剂浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	-	-	-	-	-	5

暴露实验在 500mL 的大烧杯内进行，实验开始时在各烧杯分别放健康的年龄相同的大型水蚤各 10~15 只，实验条件基本相同，采用静态法，实验期间不换水。所有实验暴露时间均为 3 天，暴露结束后取出大型水蚤进行称重，按前述方法测定大型水蚤体内的金属含量 (Body burden) 和 MT 的含量。暴露体系中 Cu 的形态分布利用 MINTEQA2 化学平衡软件计算。

5.1.3 利用稳定同位素示踪技术研究铜的生物有效性

本研究采用 ^{65}Cu 作为示踪剂，利用 ICP-MS 进行测量对水体中金属铜的水相吸收、食物相吸收及排除情况进行了初步研究。

5.1.3.1 水相吸收实验

实验前将出生 14d 的大型水蚤放在无 ^{65}Cu 标记的 SM7 中约 2h，以去除其肠道内残留的食物，同时适应新的实验环境。向 SM7 中加入 ^{65}Cu ，用 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调节溶液的 pH 至 8.0~8.4，使其在蚤适宜生存的范围内。平衡 12h 后，采用内标法利用 ICP-MS 检测 5 个实验组的 ^{65}Cu 实际浓度，分别为 2.4, 6.9, 10.8, 20.2 和 $35.8\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将已清除肠道的大型水蚤暴露于 ^{65}Cu 标记过的 SM7 中，密度为 $10\text{ mL}\cdot\text{daphnia}^{-1}$ 。在 2, 4, 8, 12h 处分别从溶液中取出 10 只蚤，放入超纯水中清洗 1min，以去除外壳上吸附较弱的 ^{65}Cu 。用滤纸吸干外壳表面的液体后，放入已称重的 2mL 离心管内，于 80°C 下烘 12h。烘干后称取离心管和水蚤的总重量后，将离心管内的水蚤转移到 10mL 比色管中，加入 1mL68% HNO_3 ，在消解炉内于 110°C 下消解直至溶液澄清透明，将液体定容到 5mL。用 ICP-MS 测定样品中 ^{65}Cu 的含量。该实验每个浓度组内均有两个平行样。

干重浓缩因子(Dry weight concentration factor DCF)表示单位干重的大型水蚤吸收溶液体积的能力，采用下式 (5-1) 计算：

$$DCF = \frac{\text{daphnia}(^{65}\text{Cu intensity/g dry wt.})}{\text{water}(^{65}\text{Cu intensity/L})} \quad (5-1)$$

式中 daphnia ($^{65}\text{Cu intensity} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry wt.}$) 表示注入 ICP-MS 20 μL 生物样的 ^{65}Cu 信号强度; water ($^{65}\text{Cu intensity} \cdot \text{L}^{-1}$) 表示注入 ICP-MS 20 μL 水样的 ^{65}Cu 信号强度。

水相吸收速率(I)为单位时间内单位干重的大型水蚤从水环境中吸收的金属量,采用下式(5-2)计算::

$$I = k_u \cdot C_w \quad (5-2)$$

式中 I 指水相吸收速率, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry wt} \cdot \text{h}^{-1}$; k_u 为水相吸收速率常数, $\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry wt} \cdot \text{h}^{-1}$; C_w 为水相暴露浓度, $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

DCF 和 k_u 之间的关系可通过下式表达:

$$DCF = k_u \cdot t \quad (5-3)$$

式中 t 为水相暴露时间, h。

5.1.3.2 大型水蚤对 Cu 的食物相吸收

衣藻的标记

在 WC 培养液中培养 10d 左右的衣藻,离心以去除初始的 WC 培养液。将离心后的衣藻再悬浮于已修正的 WC 培养液中(modified WC medium, 不含 Cu, Zn, 和 EDTA), 初始浓度为 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 同时向培养液中加入 ^{65}Cu 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。标记 3d 后, 将已标记的藻离心(3000 rpm), 用未标记的天然水再悬浮, 重复两次后, 在显微镜下用血球计数板对衣藻计数, 浓度为 $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将衣藻过滤到聚碳酸酯滤膜上, 消解后利用 ICP—MS 测定衣藻体内的 ^{65}Cu 含量。

食物相同化实验

采用脉动喂食方法进行测量, 取一定量已标记的衣藻作为食物依次加入到烧杯中, 加入大型水蚤, 使其在黑暗中进食 15min, 然后以同样的方法清洗 1min(见水相吸收实验)。喂食后将大型水蚤转移到干净的水和食物中, 净化持续 30h, 在此期间, 分别在 0, 12, 15, 18, 24, 30h 处取 10~15 只大型水蚤, 放入超纯水中清洗 1min, 以去除外壳上吸附较弱的 ^{65}Cu , 放入 10mL 比色管中。在每个时间点处, 均要完全更新水和食物, 以免大型水蚤排出的 ^{65}Cu 再通过水相和食物相进入体

内。将聚碳酸酯滤膜和各时间点处收集的大型水蚤在 1mL 68% HNO₃ 中 120 °C 下消解，具体方法与水相吸收实验相同。食物相同化率(AE, %)计算方法为 12h 后残留在大型水蚤体内的 ⁶⁵Cu 占食物相摄入 ⁶⁵Cu 总量的百分比。

5.1.3.3 大型水蚤对 Cu 的排出

按照食物相暴露的方法对衣藻进行 ⁶⁵Cu 标记。在不提供食物的情况下，将大型水蚤放在京密饮水渠水中 2~3h，以清除肠道内的食物。将大型水蚤放入已标记好的食物浓度为 $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的衣藻溶液中，每天用标记后的衣藻给大型水蚤喂食。3d 后将大型水蚤转移到无示踪剂标记的环境中开始排出过程，每隔 12h 取 10~15 只大型水蚤，同时给大型水蚤换水并加入食物，使浓度保持在 $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，排出时间为 3.5d。将各时间点处取出的大型水蚤按照水相和食物相吸收实验相同的方法进行消解，定容，用 ICP-MS 测定其体内 ⁶⁵Cu 的含量。排出速率常数 k_e 的计算方法与放射性实验相同。

5.1.3.4 生物体内 ⁶⁵Cu 浓度计算方法

计算一系列 Cu 标准溶液（用于校正 ICP-MS）中 ⁶⁵Cu 的相对丰度

$$p^{65} = \text{Intensity} \left(\frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{65}\text{Cu} + {}^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{Standard}} \quad (5-4)$$

样品中 ⁶⁵Cu 的浓度 [⁶⁵Cu]

$$[{}^{65}\text{Cu}] = p^{65} \times [T^{65}\text{Cu}] \quad (5-5)$$

[T⁶⁵Cu]: 由 ⁶⁵Cu 的信号强度而得到的总 Cu 的浓度（ICP-MS 可通过 Cu 的任何一种同位素得到该元素的浓度）。

样品中 ⁶⁵Cu 的背景浓度 [⁶⁵Cu]₀

$$[{}^{65}\text{Cu}]_0 = p^{65} \times [T^{63}\text{Cu}] \quad (5-6)$$

[T⁶³Cu]: 由 ⁶³Cu 的信号强度而得到的总 Cu 的浓度

大型水蚤从水环境中净累积的 ⁶⁵Cu 浓度

$$\Delta[{}^{65}\text{Cu}] = [{}^{65}\text{Cu}] - [{}^{65}\text{Cu}]_0 \quad (5-7)$$

5.2 水体中金属铜的生物毒性研究

5.2.1 大型水蚤体内金属铜的积累量 (Body Burden)

在不同浓度梯度 Cu 溶液中暴露 3 天后大型水蚤体内重金属 Cu 的含量如图 5-1 所示:

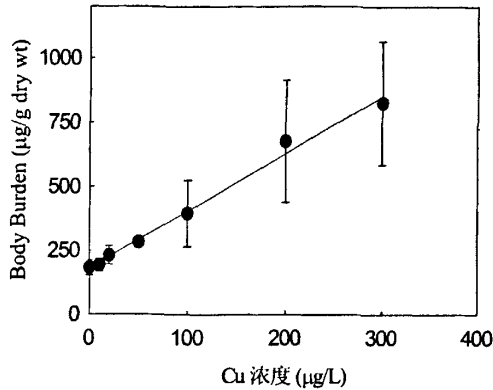


图5-1 不同浓度暴露下大型水蚤体内的金属积累量

Figure 5-1 The Cu body burden in *D.magna* following Cu exposure

由图 5-1 可以看出, 实验暴露 3 天后 Cu 在大型水蚤体内有明显的积累, 且随浓度的增加呈线性增长, 最低为 $184\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt, 最高达到 $800\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt。其方程为 $Cb = 2.2333Cw + 181.24$ ($R^2 = 0.9913$)。其中 Cw 代表金属的暴露浓度, Cb 代表重金属在大型水蚤体内的含量 (Body burden)。

对大型水蚤进行金属铜的暴露, 最为直接的效果就是可以导致金属铜在大型水蚤体内的积累。由于铜是大型水蚤体内血蓝蛋白以及多种酶所必需的微量元素, 且大型水蚤的食物斜生栅藻培养液中也含有一定浓度的 Cu^{2+} (见表 5-5), 所以原水暴露体系中大型水蚤也应有一定浓度 Cu 的积累。马桂云等研究了不同浓度的铜在鲫鱼体内的积累中表明暴露体系中铜浓度与鲫鱼体内铜的积累含量成正比例关系, 其中鱼鳃中铜的含量与环境中铜浓度呈线性关系^[132]。本实验中大型水蚤体内积累铜的含量与暴露水平完全呈线性关系, 相关系数达到了 0.9913, 这点与马桂云等的研究结论相类似。这也表明, 利用大型水蚤体内的 Cu 含量可在一定程度上反映水环境中铜的污染情况。

5.2.2 金属铜对大型水蚤体内 MT 的诱导程度

在不同浓度梯度 Cu 溶液中暴露 3 天后大型水蚤体内由 Cu 诱导的金属硫蛋白的含量如图 5-2 所示。

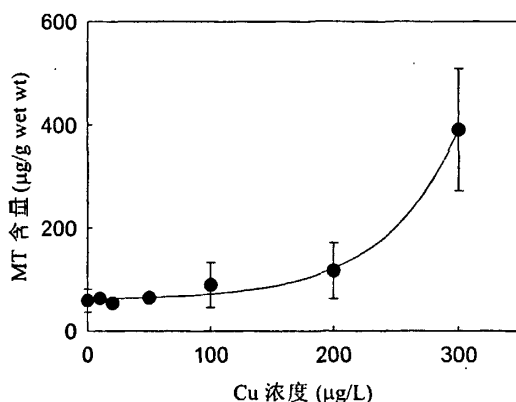


图5-2 不同浓度铜暴露下大型蚤体内的MT的含量

Figure 5-2 The MT concentration in *D. magna* following Cu exposure

一般来讲, MT 的诱导与金属的暴露浓度、金属在生物体内的积累量具有一定的关系。由图 5-4 可知, 经过 3d 时间的暴露, 与对照组相比, 低浓度暴露组中大型水蚤体内 MT 含量变化很小, 高浓度暴露组中大型水蚤体内 MT 含量则远远高于对照组水平; MT 含量随铜离子浓度升高而升高, 变化趋势呈指数增长, 方程为 $C_m = 60.4272 + 2.1234 \times 1.017^{C_w}$ ($r^2 = 0.995$, Cu), C_w 代表金属的暴露浓度, C_m 代表金属硫蛋白在大型水蚤体内的含量 (MT)。大型水蚤体内由 Cu 诱导的 MT 含量处于 $58.9 \sim 390.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet wt}$ 的水平。

Correia 等报道了 $4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 作用 2d 时, 钩虾 (*Gammarus locusta*) 体内 MT 含量是对照组的 136%, 且 6d 达最高值 (155%)^[133]。杨志彪在研究水体 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹的毒性中指出随 Cu^{2+} 浓度的升高中华绒螯蟹体内 MT 含量也随之升高^[134]。李娜在研究水体中 Cu^{2+} 对罗氏沼虾毒性作用时也得出了相同的结论^[135]。本实验暴露 3d 后大型水蚤体内 MT 的含量随着 Cu 的浓度呈上升趋势, 这一点与上述几项研究结果相一致。

因为铜是甲壳动物重要的营养素, 是合成血蓝蛋白的必须成分之一, 并对多种生长发育相关的生物酶的组成和功能有着重要意义。如图 5-2 所示, 初期大型水蚤将 Cu^{2+} 当作生物体所必须的元素合成了蛋白以及一些相关的酶, 当 Cu^{2+} 过量时大型水蚤为了减缓其毒性就使过量的铜与 MT 结合, 并随着铜浓度的升高逐步诱导合成新的 MT 与之结合, 所以铜浓度较小暴露体系中大型水蚤体内 MT 含量变化不明显, 当暴露体系浓度提高后大型水蚤体内 MT 的含量显著提高。在李娜所做的水体中 Cu^{2+} 对罗氏沼虾毒性作用^[135]的研究中也得出了和本实验相一致的结论。这也表明, 利用大型水蚤体内的 MT 含量可在一定程度上指示水环境中的铜污染情况。

5.2.3 金属铜对大型水蚤体内超氧化歧酶（SOD）活性的影响

在不同浓度梯度 Cu 溶液中暴露 3 天后大型水蚤体内由 Cu 诱导的超氧化歧酶活性的变化如图 5-3 所示。

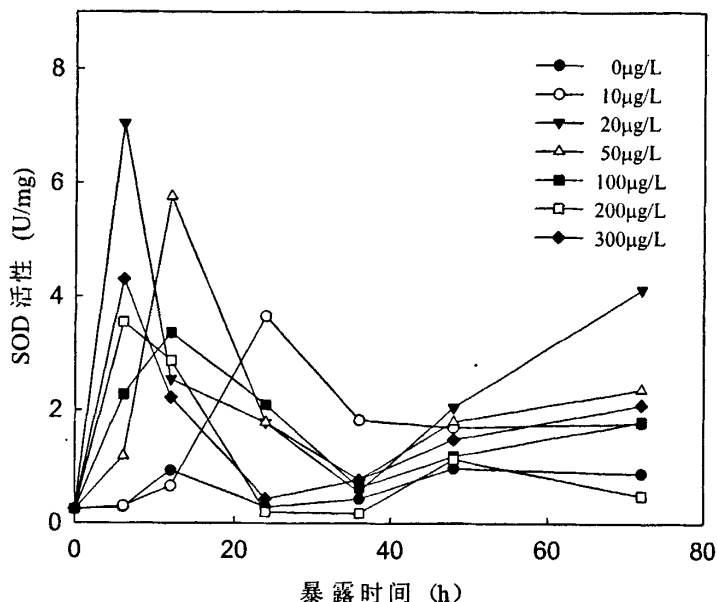


图5-3 不同浓度铜暴露下大型水蚤体内的SOD活性变化
Figure 5-3 The SOD activity in *D. magna* following Cu exposure

由图 5-3 看出，在暴露期间（3d）内对照组变化幅度比较小，其他所有浓度暴露组中大型水蚤体内超氧化歧化酶的含量均在初期有一个明显的上升阶段，随后下降，在 24h 或 36h 时出现最低值，随着时间的延长各暴露组中大型水蚤体内超氧化歧化酶的含量在对照组附近呈波动状态。超氧化歧化酶比活性最高点可达到 $7\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

所有需氧生物的生理过程均有自由基的产生与清除，且两者之间存在平衡，若失去平衡，便会损伤机体引起病变。SOD 清除 O_2^- 的能力与其含量和活力有关，当生物体受到轻度逆境胁迫时，SOD 活力往往升高，而当受到重度逆境胁迫时，SOD 活力通常降低^[136]。本实验大型水蚤受 Cu^{2+} 的胁迫，机体通过酶系统和非酶系统反应，还原产生活性氧和自由基，机体代偿适应功能启动，SOD 活力受到应激刺激而升高，从而维持自由基的平衡，随 Cu^{2+} 作用时间的延长，机体的应激反应超过一定强度而发生了氧化应激损伤。所以随暴露时间的延长大型水蚤体内超氧化歧化酶的活性下降到对照组水平。

5.2.4 大型水蚤死亡率结果分析

48h 暴露体系浓度与大型水蚤死亡率关系如图 5-4 所示:

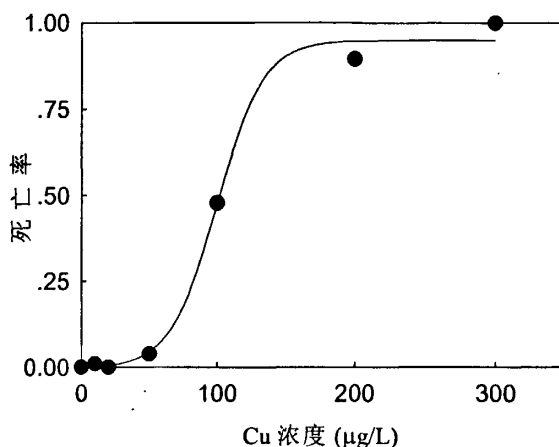


图5-4 不同浓度铜暴露下大型水蚤的死亡率

Figure 5-4 The death rate in *D. magna* following Cu exposure

由图 5-4 可以看出暴露体系中 Cu^{2+} 浓度梯度的变化与大型水蚤 48h 的死亡率呈现一定的计量关系, 随着 Cu^{2+} 浓度的升高死亡率由 0 升高到 100%, 但并不完全呈线性关系, 在 Cu^{2+} 浓度小于 $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时死亡率变化比较缓慢, 且死亡率比较小, 维持在 4% 以内。在 Cu^{2+} 浓度大于 $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 大型水蚤 (幼蚤) 迅速死亡, 在 Cu^{2+} 浓度为 $300\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时死亡率达到 100%。

吴永贵等在研究铜对隆线蚤 (*Daphnia carinata*) 致死效应时指出隆线蚤的死亡率与暴露溶液中 Cu^{2+} 的浓度与符合 Boltzmann 方程^[137], 所以本论文也将其做了 Boltzmann 函数的模拟, 其方程为 (5-8)。

$$\text{Death rate} = \frac{0.9532}{1 + e^{\left(\frac{C_{\text{W}} - 99.6749}{17.077}\right)}} - 0.004 \quad (R^2 = 0.995) \quad (5-8)$$

5.2.5 大型水蚤体内铜积累量与金属硫蛋白含量的关系

金属硫蛋白可以提供结合金属所需的配位基, 通过结合金属在大型水蚤体内进行储存, 因此具有十分重要的作用。为了验证 MT 与体内金属积累 (Body Burden) 之间是否存在某种关联, 本文计算了金属硫蛋白与体内金属积累 (Body Burden) 间的关系, 如图 5-5 所示:

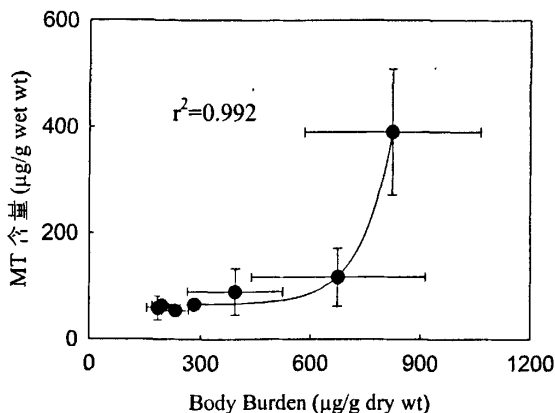


图5-5 大型水蚤体内Body Burden与MT的关系

Figure5-5 The relationship between body burden and MT in *D. magna*

由图 5-5 可以看出, 大型水蚤体内 Cu 诱导的 MT 与体内积累的 Cu 含量具有显著的指数相关关系 ($R^2=0.992$)。上述结果表明大型水蚤体内 MT 会随着体内积累的 Cu 含量 (Body burden) 的升高而升高; 在大型水蚤体内金属铜含量低于 $400\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt 的情况下 MT 的变化并不大, 说明铜作为大型水蚤体内必需的微量元素合成了血蓝蛋白及其他相关的酶; 当大型水蚤体内铜含量升高时大型水蚤体内的 MT 迅速升高, 说明大型水蚤合成了新的 MT 与过量的铜相结合。所以 MT 作为受重金属污染水体的监测指标具有一定可行性。

5.2.6 大型水蚤体内铜积累量与金属硫蛋白、死亡率的关系

在初期研究中, 人们采用水体中重金属浓度与各种环境标准对比来说明环境污染程度, 但是水体中金属的浓度由于没有考虑到生物学因素, 不能直接的反映出污染物对水生动物和人类的危害程度。在 70-80 年代人们采用生物积累、毒理学测试 (包括抑制率、死亡率等指标) 来反映污染物对生物的危害程度, 考虑到了生物因素, 目前被认为是较为直接的反映污染物质对生物体影响的指标。随着分子生物学的发展, 近年来人们采用 MT、SOD 等指标来说明污染物对生物的影响, 但是未能建立起明确的浓度——效应关系。本节通过研究生物体内铜含量、MT 与死亡率之间的关系, 初步探讨铜含量、MT 用于环境重金属污染指示的可能性。

在不同浓度梯度 Cu 溶液中暴露 3 天后大型水蚤体内铜含量 (Body Burden) 和 MT 与死亡率的关系分别如图 5-6 和图 5-7 所示:

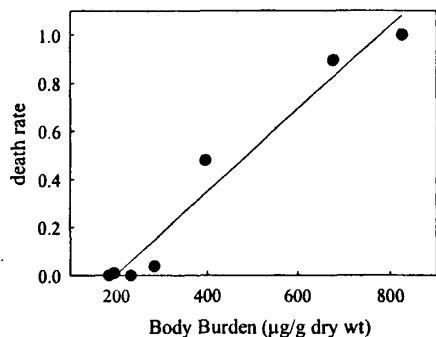


图5-6 大型水蚤体内金属积累量与死亡率的关系

Figure5-6 The relationship between body burden and death rate of *D. magna*

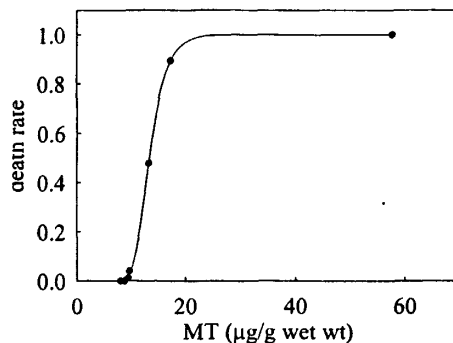


图5-7 大型水蚤体内 MT 含量与死亡率的关系

Figure5-7 The relationship between MT and death rate of *D. magna*

由图 5-6 和图 5-7 可以看出 Body Burden 与致死率之间存在比较好的线性关系，而 MT 与致死率之间却符合生态学里面的 Boltzmann 分布函数。由于大型水蚤体内的 Body Burden 和 MT 与致死率之间的显著相关关系，所以本研究认为大型水蚤体内铜含量、MT 作为受重金属污染水体重金属离子污染的监测指标具有一定可行性。

目前国际上学者较重视金属硫蛋白的形成与解毒机制的研究，有研究报道表明，1 个 MT 可与 6 个金属 Cd 离子结合，1 个 MT 可结合 18 个金属 Ag，这些机制的研究能够更好地为金属硫蛋白作为重金属污染的生物标志物的研究提供理论基础。

因此本论文初步分析了由暴露实验得到的大型水蚤的致死率与 Cu 在大型水蚤体内积累的含 (Body burden) 和诱导的 MT 含量的比值的关系。由于大型水蚤干—湿重之间有着良好的线性关系 (如图 5-8 所示)，所以本论文将 Cu Body Burden 的转化为湿重下的 Cu 的物质的量，将其与湿重下 MT 的物质的量的比值与致死率进行对比，它们的关系如图 5-8 所示。

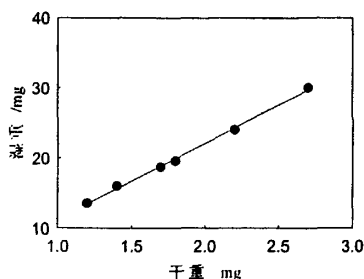


图5-8 大型水蚤干—湿重对照关系

Figure 5-8 *Daphnia magna* dry WT VS wet WT rate

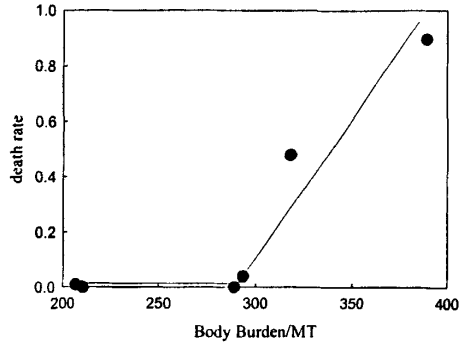


图5-9 大型水蚤体内MT与死亡率的关系
Figure5-9 Body Burden/MT – Death rate

由图 5-9 可以看出, Cu 对大型水蚤的致死率与 Cu body burden/MT 比值呈一定关系。当 $\text{Cu}/\text{MT} < 290$ 时随着 Cu/MT 比值的增加, 死亡率基本没有变化; 而当 $\text{Cu}/\text{MT} > 290$ 时, 随着 Cu/MT 比值的增加, 致死率呈线性增加。说明当 Cu^{2+} 过多进入生物体, 与 MT 饱和, 而又无其他解毒作用时, 则 Cu^{2+} 对生物体表现为显著毒性作用。在本实验中, 随着 Cu 在大型水蚤体内的积累, Cu 与 MT 的结合逐步达到饱和而超过大型水蚤的生理耐受程度, 多余的 Cu^{2+} 并不能被解毒, 所以就会对大型水蚤产生毒性作用, 造成大型水蚤的死亡。说明 Cu body burden/MT 的比值可以更好的指示水体受到重金属 Cu 污染的程度。

由于 Cu 是大型水蚤体内血蓝蛋白和其他一些酶的组成成分, 复杂性, 所以本实验还不能确定 MT 分子与 Cu 的结合机制, 但是可为 MT 与铜的结合机制的研究提供一个新的思路。

5.3 水体中有机络合剂对铜毒性的影响

5.3.1 水体中铜的形态分布

实验测定稀释水的 pH 为 7.8, 对照组溶液中的组分采用 MINTEQA2 软件进行化学平衡计算, 其中铜的各种形态分布如图 5-10 所示:

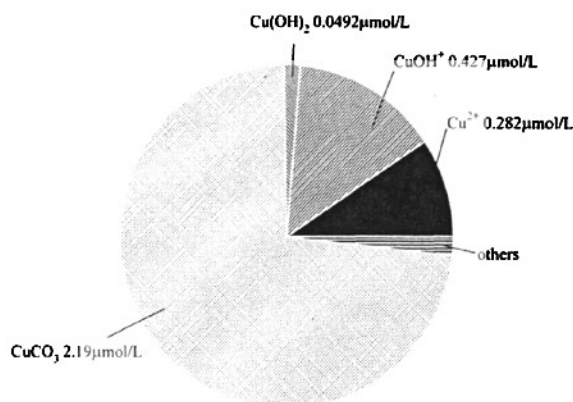


图5-10 对照组中Cu的形态分布

Figure 5-10 The control group in the form of the distribution of Cu

上图中仅仅给出了占铜总量 98.27% 的 4 种优势形态。由于稀释水的 pH 偏碱性，所以溶液体系中 CuCO_3 为最大的优势形态，占据总铜含量的 73%；其次 CuOH^+ 、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 以及 Cu^{2+} 三种形态总共占据了总铜的 25.27%；其余 1.73% 为铜的其他形态。

5.3.2 含络合剂暴露溶液中铜的形态分布

含有 EDTA 暴露组溶液中的组分亦采用 MINTEQA2 进行化学平衡计算，各组分含量如图 5-11 所示：

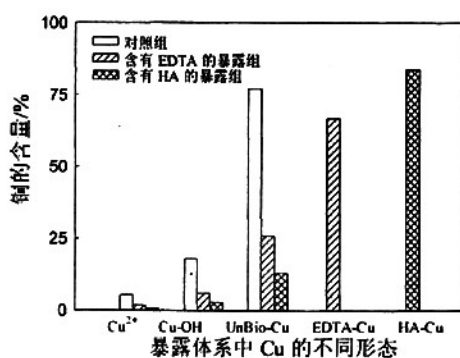


图5-11对照组、含有EDTA暴露组和腐殖酸暴露组中不同形态铜的含量

Figure 5-11 The different speciation of copper content in control group, EDTA exposed group and humic acid exposed group

上图中仅仅给出了占铜总量 98.27% 的 4 种优势形态。EDTA 基本全部都与

Cu 进行络合, 形成稳定的 $\text{Cu}(\text{EDTA})$; CuCO_3 占有铜总量的 24.5%; CuOH^+ 和 Cu^{2+} 占有总量的 7.9%; 剩余铜为其他形态。

由图 5-11 可以看出, 尽管偏碱性条件下有 OH^+ 以及 CO_3^{2-} 离子团的竞争, 实际暴露体系中 EDTA 几乎与 Cu 全部络合。陶澍等证实了这点对其他络合剂暴露体系也适用^[138]。

5.3.3 含有机络合剂暴露体系中大型水蚤体内重金属含量

含各种有机络合剂暴露体系中大型水蚤重金属铜含量如图 5-12 所示:

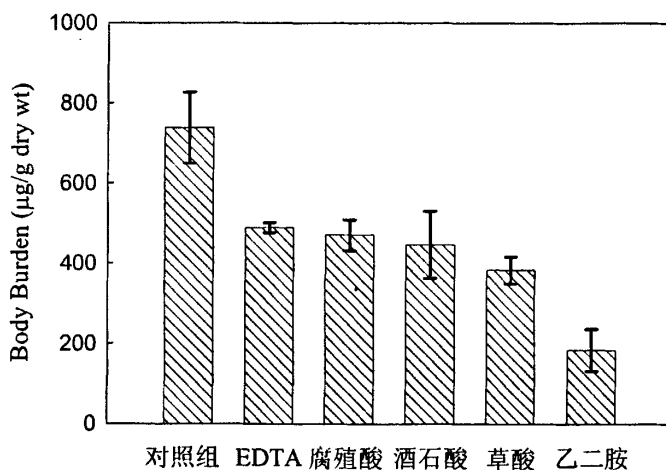


图5-12 含有不同络合剂水体中大型蚤体内铜积累量

Figure 5-12 The Cu body burden of *Daphnia magna* in exposed water with different complexing agents

由图 5-12 可以看出, 加入络合剂后大型水蚤体内铜的积累明显减少, 除乙二胺外的各种络合剂暴露体系中铜的积累接近同一水平, 维持在 $400\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt 左右, 与对照组所积累的铜含量 $750\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt 存在明显的差异。含有乙二胺的暴露体系中大型水蚤体内铜的积累偏低, 为 $200\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt 上下。

图中对照组暴露体系中的铜的浓度为 $190.5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其 Body Burden 含量为 $739\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt, 与前面实验浓度为 $200\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的数值十分接近 (Body Burden 含量为 $676\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt)。由于乙二胺本身带有毒性, 所以在含有乙二胺为络合剂的暴露体系中, 大型水蚤过早死亡, 这样就减缓了溶液中铜对大型水蚤作用的时间, 导致大型水蚤体内 Body Burden 的值偏低。

5.3.4 含有机络合剂的 Cu 溶液对大型水蚤体内 MT 的诱导程度

有机络合剂暴露体系中 MT 的含量如图 5-13 所示:

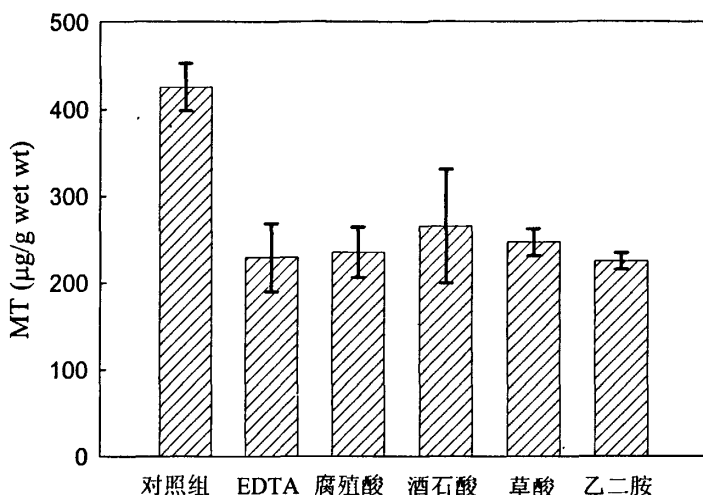


图5-13含有不同络合剂水体中大型蚤体内MT含量

Figure 5-13 The MT of *Daphnia magna* in exposed water with different complexing agents

由图 5-13 可以看出, 加入络合剂后大型水蚤体内 MT 的含量明显减少, 所有络合剂暴露体系中 MT 的含量均在同一水平, 维持在 $240\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet wt 左右, 与对照组所积累的铜含量 $440\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet wt 存在明显的差异。

由图 5-11 可知, 在含有络合剂暴露的溶液中非络合态铜的含量为对照组的 1/3 左右。又由图 5-2 可以得出在铜浓度小于 $3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对大型水蚤体内 MT 的诱导差别不大。在本实验中, 各种络合剂的暴露体系中铜对大型水蚤 MT 的诱导含量均大于对照组含量的 1/2, 这与前面实验所得出的结论一致。

5.3.5 含有机络合剂的暴露体系中 Body Burden 与 MT 的关系

含有机络合剂的暴露体系中 Body Burden 与 MT 的关系如图 5-14 所示:

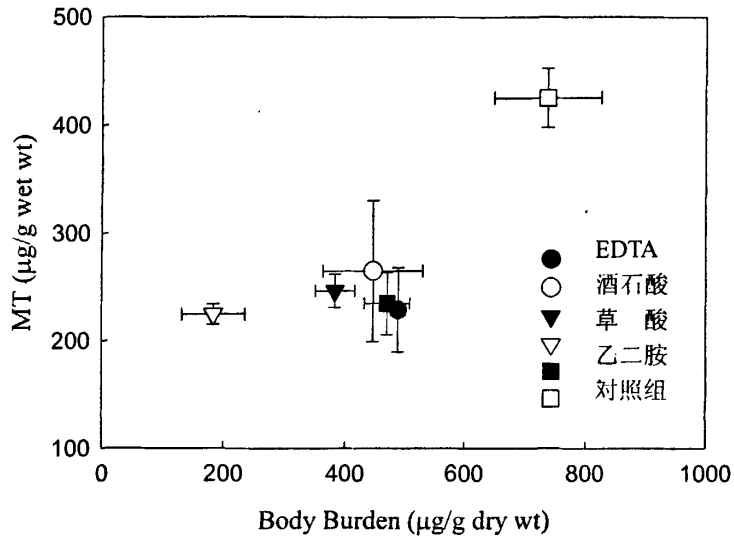


图5-14 不同络合剂水体中Body Burden与MT的关系

Figure 5-14 The relationship between body burden and MT with different complexing agents

由图 5-14 可知, 大体趋势为 MT 随 Body Burden 的增加而增加。与对照组相比, 除乙二胺暴露体系外, 其他有机络合剂暴露体系的点比较集中, 说明各种络合剂络合能力比较接近, 而乙二胺由于本身具有毒性, 从而使大型水蚤体内的 Body Burden 积累量偏低。

5.3.6 EDTA 络合态铜对大型水蚤的生物有效性

一般认为, 仅包括简单离子, 水合离子以及羟基络合物在内的游离态金属能被生物体吸收, 但对于络合态金属的生物有效性方面却不相同。通常认为, 各种有机配位体的金属无法穿透生物膜, 从而阻止了其被生物体所吸收^[139, 140], 但也有个别研究发现相反的现象^[141, 142]。

本课题以 EDTA 为例, 对含有 EDTA 的暴露体系有效态铜 (CuOH^+ 和 Cu^{2+}) 和对照组中的有效态铜 (CuOH^+ 、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 以及 Cu^{2+}) 同时进行归一化处理, 计算归一化的 Body Burden 和 MT, 经归一化后的 Body Burden 之间和 MT 之间的对照关系如图 5-15 所示。

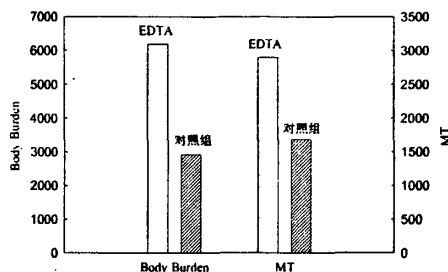


图5-15 经归一化后的Body Burden之间和MT之间的对照关系图

Figure 5-15 The relations compared different body burden and different MTs after normalization

如图 5-15 所示, 含有 EDTA 暴露体系中的单位有效态铜的 Body Burden 和 MT 都高于对照组中相对应的含量, 其中 Body Burden 的含量超过对照组的 2 倍, MT 的含量也明显高于对照组。

上述结果表明在 EDTA 暴露体系中有有效态的铜不仅仅是 CuOH^+ 和 Cu^{2+} 两种形态。在 EDTA 的暴露体系中肯定含有另一种铜的有效态存在, 且这种有效态铜是大量存在的。通过图 5-15 可以判断出对大型水蚤产生生物有效性的另一种铜的形态应该为与 EDTA 相络合的 Cu。龙爱民等在研究络合态铜对彩虹方头鱼的生物有效性中也曾指出络合态铜可被吸收^[143], 梁涛在研究铜对鱼的生物有效性中也得出了同样的观点^[144], 这与本实验所得出的结论相一致。

5.4 水体中金属铜的生物有效性研究

随着近年来 ICP-MS 技术的发展, 检测限的降低, 准确测定背景值水平下低浓度的稳定同位素成为可能。将自然丰度低、成分单一的稳定同位素标记到暴露溶液中, 改变溶液内稳定同位素之间的比值, 通过 ICP-MS 测定其变化量, 该方法具有较强的操作。因此利用稳定同位素示踪法研究 Cu 在生物体内的动力学成为一种发展趋势。

本节利用稳定同位素 ^{65}Cu 作为示踪剂, 对大型水蚤暴露的溶液和食物进行标记, 研究了不同暴露浓度下, 大型水蚤对水相中 Cu 的吸收规律, 测定重要的生理参数-水相吸收速率常数(Influx Rate Constant, k_u , $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)。对食物相同化和生物的生理排出过程进行研究, 测定了同化率(Assimilation Efficiency, AE, %)和排出速率常数(Efflux Rate Constant, k_e , $1\cdot\text{d}^{-1}$)。本节对稳定同位素示踪法进行积极

探索, 为利用稳定同位素研究生物体内重金属的迁移转化动力学提供实验依据。

5.4.1 大型水蚤对 Cu 的水相吸收

5.4.1.1 大型水蚤对溶解性铜的干重浓缩因子(Dry weight concentration factor DCF)

在注入 ICP-MS 相同体积(eg., 20 μL)的生物样和水样下, 由图 5-16 可以看出, 大型水蚤对金属 Cu 的 DCF 随暴露时间的增加而逐渐增加, 在一系列 Cu 浓度下暴露 12 h, 大型水蚤对 Cu 的吸收均未出现饱和现象(即趋势逐渐平缓, 直线斜率趋近于零)。此外, 随着 Cu 暴露浓度的增加, 相同时间内, 大型水蚤的 DCF 逐渐降低。

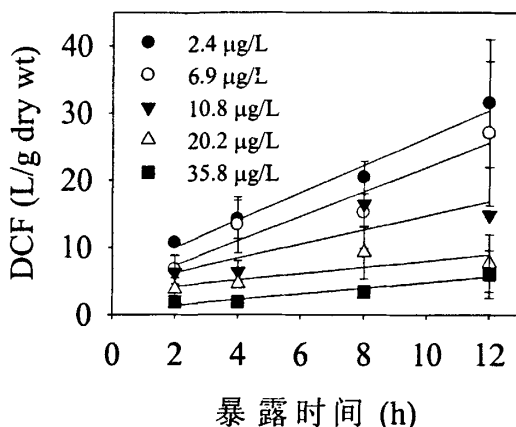


图5-16 干重浓缩因子(DCF)随时间的变化

Figure 5-16 Dry weight concentration factor (DCF) Change over time

DCF 随时间线性增加, 该趋势与放射性同位素示踪的结果具有一致性。相同时间点处, 暴露于低浓度 Cu 下的大型水蚤 DCF 值较高, 随着溶液中 Cu 浓度的升高, DCF 值逐渐降低($p < 0.05$, one-way ANOVA)。这可能主要受生物对金属吸收能力的影响。Cu 穿过细胞膜需要蛋白质进行运载, 随着水溶液中 Cu 浓度的增加, 细胞膜上蛋白质的运载能力有限, 金属结合位点已趋向于饱和, 导致溶液中存在大量剩余的 Cu^{2+} , 因而在高浓度下 DCF 降低^[145]。该情况也同样存在于大型水蚤对 Hg 和 MeHg 的水相吸收中^[69], 随着水溶液中 Hg 和 MeHg 浓度的增加, DCF 有明显的下降趋势, 且在高浓度下, Hg 的 DCF 要显著低于 MeHg。

本实验中采用短时间暴露(12 h), 与放射性示踪水相吸收过程(暴露 6 h)相同,

此过程中没有出现吸收饱和的现象。Hoang 等人^[146]将螺(*Pomacea paludosa*)的幼体暴露于含 Cu 3, 6 和 12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水体中, 14 d 后 Cu 在幼体内的累积量达到饱和。这表明在低浓度 Cu 长期暴露下, 也同样出现生物对金属的吸收能力降低, 体内累积的重金属逐渐达到饱和的现象。值得注意的是, 在长期暴露的过程中, 生物体在吸收水相重金属的同时排出代谢后的重金属, 重金属在体内的累积并不是一个单独的吸收过程, 而是吸收和排出的综合作用, 与此同时, 排出体外的金属存在被生物再吸收的可能。短时间暴露(12 h), 可尽量减少 Cu 因生物水相代谢而排出体外, 同时减少金属再次被生物吸收进入体内的可能, 以保证 ^{65}Cu 示踪独立的吸收过程。

5.4.1.2 大型水蚤对铜的水相吸收速率(Influx rate)

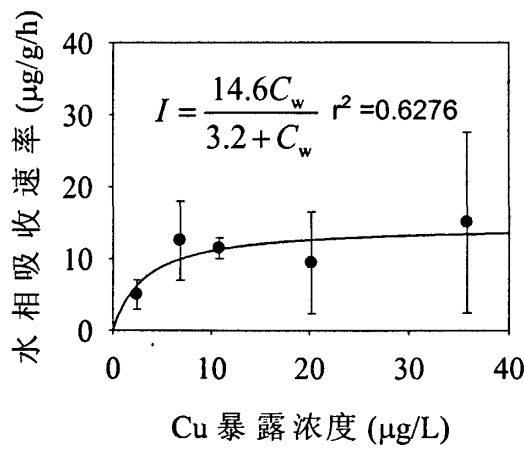


图5-17 水相吸收速率随溶液中Cu浓度的变化

Figure 5-17 Aqueous Influx rate with changes in the concentration of Cu

由公式(5-2)和(5-3)可计算得到水相吸收速率(Influx rate, I , $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ dry wt/h}$)。将水相吸收速率和Cu的暴露浓度回归, 其曲线符合酶促反应动力学特征, 得到米氏方程 (Michaelis-Menten Function) $I=14.6C_w/(3.2+C_w)$ 。由图5-17可看出, 在低暴露浓度下, 吸收速率 I 与暴露浓度之间近似线性增加, 随着Cu浓度的增加, 水相吸收速率 I 趋向于稳定, I_{\max} 为 $14.6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 米氏常数 K_m (半饱和常数)为 $3.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

水相吸收速率 I 随暴露浓度 C_w 先线性增加, 然后逐渐趋于平缓, 达到饱和。该现象在大型水蚤对其他金属的吸收上也较为常见, 如 Ca^[147, 148], Na^[149],

Hg^[150]。表明随着金属水相浓度的增加,大型水蚤体内具有自我调节的机制。该调节机制可以通过酶反应动力学中 Michaelis-Menten 方程表示, I_{\max} 为 $14.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 米氏常数 K_m (半饱和常数)为 $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明蛋白质酶运载金属 Cu 通过细胞膜的过程中,有一半达到饱和时的水相浓度为 $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 当水相浓度为 $6.9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 已逐渐接近饱和。Tsui and Wang^[150]研究了 Hg 不同预暴露条件对大型水蚤吸收 Hg 的影响, 结果发现出生 2 d 的幼体于 $7 \mu\text{g Hg}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露 2d 后, K_m 为 $10.3 \pm 6.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。相比于同样出生 2 d 在 $3 \mu\text{g Hg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下暴露 2 d 的幼体降低了 90%。这可能是由于 Hg 预暴露浓度的升高, 降低了细胞膜表面蛋白质载体与 Hg 的亲合力。不同金属对蛋白质的亲和力不同, 导致金属之间的 K_m 差别也较大。一般来说, 金属离子中 Hg^{2+} 与蛋白质的亲和力最强^[151], 其 K_m 值也相应较高。本文中测定的 Cu 的 K_m 值是大型水蚤在无 Hg 预暴露下 Hg K_m 值的 1/16。此外, 胡敏酸也可影响大型水蚤吸收水相中的 Na, 胡敏酸的存在大大提高蛋白质酶对 Na 的运载能力, 表现为 I_{\max} 增加, 同时增加 K_m ^[152], 可见改变水环境的物理化学条件会对参数的大小产生影响。除了研究同种生物对不同金属的吸收之外, 在不同种类生物之间也进行了广泛的研究。在含 $0.48\text{-}2.0 \text{ mg Ca}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水环境下, 片脚类 (*Gammarus pulex*) 吸收水相中 Ca 的 K_m 值为 $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, I_{\max} 为 $36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[147]。Spry and Wood^[153]研究表明, 增加水中 Ca 的浓度, 可以提高鱼(rainbow trout)吸收金属 Zn 的 K_m , 但是却对 Zn 的 I_{\max} 影响不大, 这表明 Ca 和 Zn 在进入生物体内的过程中存在相互的竞争。

5.4.1.3 不同 Cu 暴露浓度下的水相吸收速率常数 k_u

将 DCF 和时间 t 回归, 可得到水相吸收速率常数 k_u 。随着 Cu 浓度的增加, 大型水蚤对 Cu 的 k_u 平均值从 $2.04 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 降低到 $0.42 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 统计学检验表明, 不同暴露浓度下的 k_u 值并不具备显著性差异 ($P>0.05$, T-Test)。动力学模型中水相吸收速率常数 k_u 可在不同的金属和不同的物种间进行比较。对于大型水蚤来说, 在已研究的金属中, Hg 和 MeHg 的 k_u 值相对较高, Zn 和 Cd 的 k_u 值相对较低, 但大型水蚤在 Cu 的低暴露浓度下, k_u 值已是 MeHg 的 5 倍。而不同的物种对水相中 Cu 的吸收也差别较大, 对于海洋桡足类动物(*Acartia spinicauda* 和 *Temora longicornis*) k_u 为 $0.21 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Chang and Reinfelder, 2002)^[154], 淡水蛤 (*Corbicula fluminea*) 在 $5.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cu 浓度下暴露 4d, k_u 为 $0.009 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Croteau

et al., 2004)^[155]。

表5-3 不同浓度短时间暴露下, 大型水蚤对金属的吸收速率常数 (k_u)
Table. 5-3 During a short uptake period, dissolved uptake rate constants (k_u) of different aqueous metal for *Daphnia magna*.

金属	暴露浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	k_u ($\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	参考文献
Ag	0.008-0.9	0.045	Lan and Wang, 2006
Cd	0.7-20.0	0.062	Yu and Wang, 2002
Cu	2.4-35.8	1.23	本文
Hg	0.001-2.8	0.35	Tsui and Wang, 2004
MeHg	0.0005-0.7	0.46	Tsui and Wang, 2004
Se	1.3-20.9	0.0078	Yu and Wang, 2002
Zn	2.0-50.0	0.045	Yu and Wang, 2002

k_u 值的变化可能受多种环境因素的影响, 增加水中溶解性有机碳的浓度或降低水的硬度, 都可以使大型水蚤吸收 Cd 的 k_u 增大^[68], 增加溶液的 pH 也可以促进大型水蚤对 Cd, Zn 和 Se 的吸收^[67]。此外, 与放射性同位素示踪法测定的 k_u ($0.055 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) 相比, 该实验测定的 k_u ($1.23 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) 是其 22.4 倍。同样采用稳定同位素 (^{65}Cu) 示踪法, Chang and Reinfelder (2002) 测定了海洋桡足类 (*Acartia spinicauda* 和 *Temora longicornis*) 对 Cu 的 k_u 为 $0.21 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[154], Croteau et al. 将淡水蛤 (*Corbicula fluminea*) 在 $5.2 \mu\text{g Cu}\cdot\text{L}^{-1}$ 下暴露 4d, k_u 为 $0.009 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[155]。由此可见在相同的示踪示踪方法下, 不同的物种对水相中 Cu 的吸收也差别较大。对于 Cd, Zn, Ag, Se, Hg 和 MeHg 采用放射性同位素示踪方法, 该方法具有灵敏度高, 定量准确且操作简便, 可以对生物进行实时且无损伤检测等特点, 但由于 Cu 的放射性同位素半衰期均非常短 (半衰期时间最长的为 ^{67}Cu , $t_{1/2}=2.58 \text{ d}$), 因而对实验时间要求较严格。对于金属 Cu 来说, 正是由于缺乏合适的放射性同位素, 导致目前关于 Cu 对水生生物的动力学研究较少 (Tsui and Wang, 2007)。近年来, 利用稳定同位素研究 Cu 在生物体内的迁移转化逐渐兴起。相比

起放射性同位素示踪方法, 稳定性同位素没有衰变现象, 实验不受时间限制; 不具有放射性, 操作安全性高; 且可以弥补一些重要元素因缺乏合适的放射性同位素而导致的研究缺陷。但是, 稳定同位素示踪方法的灵敏性较差, 实验操作和样品制备较为复杂(Croteau et al., 2004)。目前随着 ICP-MS 技术的发展, 这种现状正逐渐改变。本文利用稳定同位素 ^{65}Cu 作为示踪剂, 研究大型水蚤从水相中对 Cu 的吸收利用。该项研究目前在国内尚无人涉及。由于稳定同位素示踪法无法做到实时检测, 和对生物体的无损检测; 因此生物的个体差异性导致的误差显得较为突出。另外, 由于样品制备较为复杂, 液体转移可能造成样品中 Cu 含量的损失, 并且利用 ICP-MS 的检测限和灵敏性均不如放射性同位素检测器, 以上原因可能导致数据结果与放射性同位素示踪法的结果差异较大。因此, 下一步的任务是优化实验方法, 尽量减小误差, 提高稳定同位素示踪方法的准确性。

5.4.2 大型水蚤对食物相 Cu 的同化作用

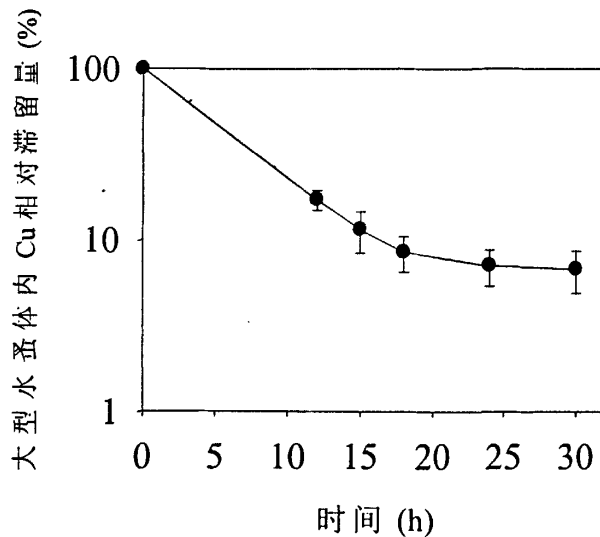


图5-18 大型水蚤体内相对残留量随时间变化曲线

Figure 5-18 Paracalanus relatively *Daphnia magna* body of residual time-varying curve

经过检测, 标记后衣藻中 ^{65}Cu 的浓度 C_f 为 $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。由图 5-18 中可以看出, 大型水蚤体内剩余 ^{65}Cu 的百分含量在 0~15 h 内快速降低, 此后在 15~30 h 内降低趋势逐渐平缓。从该变化趋势可以看出大型水蚤对食物的消化过程先是胞外消化, 未被吸收的 Cu 随着食物快速流失, 体内 Cu 含量迅速降低。进入肠道

的 Cu 进行胞内消化, 参与生理循环, 该过程速度较为缓慢。12 h 后通过进食而残留在大型水蚤体内的 ^{65}Cu 占食物相摄入 ^{65}Cu 总量的百分比, 即大型水蚤对食物相 Cu 的 AE (食物相同化率) 为 $17.2 \pm 2.33\%$ 。与放射性实验方法相比(^{67}Cu 标记下 AE 为 $15.9 \pm 2.2\%$), AE 并无显著差别。对于其他金属来说, 例如 Cd, 利用稳定同位素示踪法测定淡水腹足类生物(*Lymnaea stagnalis*)对 Cd 的 AE 为 $89 \pm 1\%$ ^[156], 而利用放射性示踪法测定海洋腹足类生物(*Nassarius teretiusculus*)的 AE 为 $84 \sim 94\%$ ^[157], 由此可见, 对于相同的金属和生物, 稳定同位素和放射性同位素示踪方法测定的结果之间并无显著差别, 稳定同位素可以较好地示踪金属在生物体内的迁移转化, 提供科学合理的实验结果。

5.4.3 大型水蚤对体内 Cu 的排出

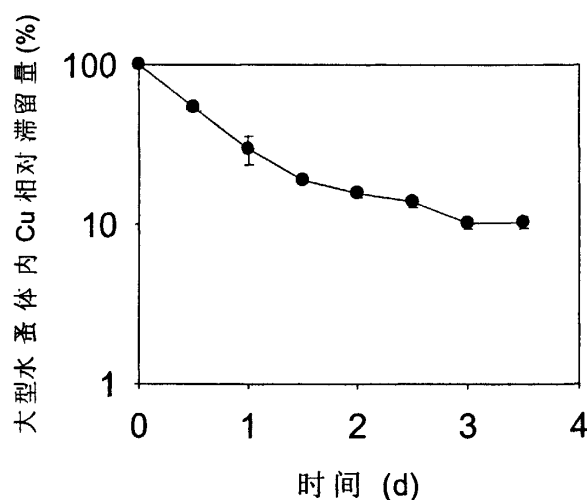


图5-19 大型水蚤体内铜相对滞留量随时间的变化

Figure 5-19 Paracalanus relatively *Daphnia magna* residual amount of copper the body changes with time

在食物浓度为 $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下, 0~2 d 内大型水蚤体内累积的 Cu 迅速排出, 2~3.5 d 排出速度略有减缓。3.5 d 时, Cu 在大型水蚤体内残留百分比为 $10.2 \pm 0.9\%$ (图 5-19)。排出速率常数 k_e 表示慢速阶段金属排出过程, Cu 的 k_e 为 $0.32 \pm 0.04/\text{d}$, 生物滞留半衰期($t_{1/2}$, d)为 $2.2 \pm 0.2 \text{ d}$ 。该结果与放射性方法测定的结

果较为近似。同样利用稳定同位素示踪法, Croteau et al. [155]研究淡水双壳类 (*Corbicula fluminea*)对 Cu 的排出, 24 d 后仍有 50%的 Cu 滞留于生物体内, 慢速交换相 k_e 为 $0.0038 \pm 0.054/\text{d}$ 。而海洋桡足类动物的 k_e 在 $0.05 \sim 0.08/\text{d}$ [154, 158], 已有研究表明 k_e 主要受生物生理条件控制, 不同的生物之间 k_e 不同, 大型水蚤对 Cu 的 k_e 远远大于双壳类生物, 是桡足类的 4~6 倍。

5.4.4 Cu 在大型水蚤中主要积累途径

5.4.4.1 Cu 的大型水蚤中积累模型建立

BE (bioenergetic-based toxicokinetic model BE) 模型从生物体能量需求方面描述了毒物的累积和流失, 常将动物作为单室来处理。该模型同时考虑地球化学因素 (如, 金属在水相和颗粒相之间的分配作用), 和生物化学因素对地球化学以及生物过程的影响。因此比较完善, 并允许在不同的实际条件下进行校正。

以生物能为基础的动力学模型, 可通过测量一些重要的生理学参数, 包括溶解相的重金属摄入速率、食物相的重金属同化率和重金属排出速率, 来研究双壳类动物对污染物的累积[64]。

假设动物从水中和食物中获取重金属, 并且重金属的吸收直接与从各种来源的输入成比例, 那么, 重金属生物累积作用可通过下面的一级等式来描述:

$$dC/dt = (\alpha_w \cdot FR \cdot C_w) + (AE \cdot IR \cdot C_f) - (k_e + g)C \quad (5-9)$$

其中 C 是 t 时间 (d) 下生物体内重金属浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), α_w 是溶解相中重金属吸收率, FR 是生物过滤速度 ($\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), C_w 是溶解相重金属浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), AE 是食物相重金属同化率 (%), IR 是生物进食速度 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), C_f 是食物中重金属浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$), ke 是重金属排出速率常数 (d^{-1}), g 是生物生长速率常数 (d^{-1})。

该等式可以写成

$$C_t = \frac{(\alpha_w \cdot FR \cdot C_w) + (AE \cdot IR \cdot C_f)}{(k_e + g)} [1 - \exp^{-(k_e + g)t}] \quad (5-10)$$

在稳定状态下, 等式可表示为

$$C_{ss} = \frac{(\alpha_w \cdot FR \cdot C_w) + (AE \cdot IR \cdot C_f)}{(k_e + g)} \quad (5-11)$$

当 C_f 不知道时, 可通过 C_w 来计算:

$$C_f = C_w \cdot K_d \quad (5-12)$$

这里 K_d 是重金属在食物颗粒表面的分配系数 ($L \cdot kg^{-1}$), 溶解相中重金属摄入速率可表示为

$$I_w = \alpha_w \cdot FR \cdot C_w = k_u \cdot C_w \quad (5-13)$$

I_w 是实验检测的溶解相吸收速率 ($\mu g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$), k_u 是溶解吸收速率常数 ($L \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$), 等于 $\alpha_w \cdot FR$ 。如果重金属的排出速率常数不同于溶解相和食物相的吸收速率常数, 则等式 (5-11) 可表示为

$$C_{ss} = \frac{(k_u \cdot C_w)}{(k_{ew} + g)} + \frac{(AE \cdot IR \cdot C_f)}{(k_{ef} + g)} \quad (5-14)$$

k_{ew} 是从溶解相获得的重金属排出速率常数 (d^{-1}), k_{ef} 是来源于食物相的重金属排出速率常数 (d^{-1})。

从公式中可以看出大型水蚤体内重金属的浓度主要取决于四个过程: 水相吸收, 食物相摄入, 生理排出和自身的生长。本实验就是为了简化 BE 模型进行的相关参数的研究。这里我们假设在稳定状态 (水相、食物相的吸收和排出相平衡) 下重金属的排出速率常数和溶解相和食物相的吸收速率常数相同, 则公式 (5-14) 可简化成

$$C_{ss} = \frac{(k_u \cdot C_w) + (AE \cdot IR \cdot C_f)}{(k_e + g)} \quad (5-15)$$

因为我们采用的是生长 14 天之后的成年大型水蚤, 而对于成年大型水蚤, 由于体形已经达到了最大, 所以 g 可以忽略^[65], 所以公式可以进一步简化为

$$C_{ss} = \frac{(k_u \cdot C_w) + (AE \cdot IR \cdot C_f)}{k_e} \quad (5-16)$$

根据实验结果, 将所得到的 k_u 、 k_e 和 AE 带入公式得到大型水蚤对水体中铜的积累模型

$$C_{ss} = \frac{(7.248 \cdot C_w) + (17.2 \cdot IR \cdot C_f)}{0.277} \quad (5-17)$$

再结合公式, 则在自然界的平衡状态下积累模型为

$$C_{ss} = \frac{C_w \times (7.248 + 17.2 \cdot IR \cdot BCF)}{0.277} \quad (5-18)$$

因此, 促进生物体内积累的单向流量很难在没有示踪剂方法学 (也就是用稳

定的金属和非金属)的情况下得到准确的结果,因为组织中的稳定金属的背景浓度和组织浓度强烈的可变性使得细小变化难以发现。在确定示踪金属动力学方面,控制稳定同位素比提供了放射性示踪剂的一种替代方法,还没有应用放射性核的一些固有缺点。Evans et al.描述了用Cd的稳定同位素跟踪生物积累的可行性。他们用Cd的两种稳定同位素同时测量Cd在石蚕幼虫中的吸收和散失。他们发现 ^{114}Cd 和 ^{113}Cd 在一定状态范围内独立作用,并且成功的区分了各个过程。

5.4.4.2 Cu 在大型水蚤中主要积累途径

$$f = k_u / (AE \times IR \times BCF + k_u) \quad (5-19)$$

由公式(5-19),可计算出通过水相暴露摄入的Cu占摄入总量的百分比。根据水相吸收和食物相同化实验中测定的参数 k_u ($1.23 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)和AE (17.2%),分别代入等式中。IR是生物的基本生理参数,对于同种生物在相同的食物浓度下,IR基本保持一致。由放射性示踪方法测得IR是食物浓度的函数。在BCF的变化范围在2000~100,000,水相吸收的相对比例的变化趋势如图5-19所示。

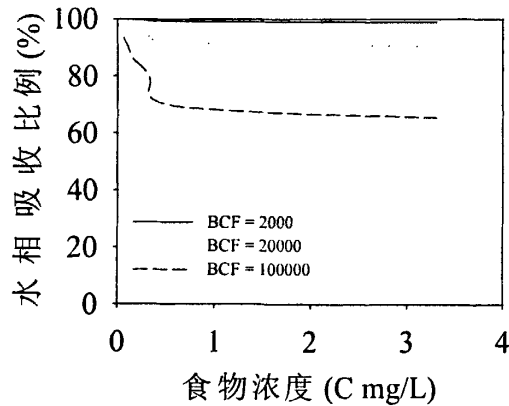


图5-20 不同BCF下,水相吸收百分比随食物浓度的变化曲线

Figure 5-20 Different BCF, the water absorption percentage changes with food concentration curve

从图5-20中可以看出,>50%的Cu通过水相吸收在大型水蚤体内累积的,食物相吸收并不是主要途径。这与其它生物对Cu吸收的研究结果有显著差别,桡足类,双壳类和腹足类水生生物对Cu的吸收主要通过食物相^[154, 144, 155, 158]。对于淡

水双壳类生物来说,当水环境中 Cu^{2+} 在 $0.1\sim 1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,体内30~99%的Cu来自于摄入的食物^[159]。同时利用稳定同位素(^{65}Cu)示踪和放射性示踪方法(^{67}Cu)得到的结果(主要来源于食物相)也有很大差别。将测定的参数进行比较可以发现,利用稳定同位素示踪测定的 k_a 较高($1.23\text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$),是放射性方法下 k_a ($0.055\text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)的22.4倍,而其他参数值(AE和 k_e)则相差不多。关于导致 k_a 差异的原因将于下文详细讨论。

5.5 小结

铜作为大型水蚤体内必需的微量元素合成了血蓝蛋白及其他相关的酶;当大型水蚤体内铜含量升高时大型水蚤体内的MT迅速升高,说明大型水蚤合成了新的MT与过量的铜相结合。所以MT作为受重金属污染水体的监测指标具有一定可行性。通过研究生物体内铜含量、MT与死亡率之间的关系,初步探讨铜含量、MT用于环境重金属污染指示的可能性。由于大型水蚤体内的Body Burden和MT与致死率之间的显著相关关系,认为大型水蚤体内铜含量、MT作为受重金属污染水体重金属离子污染的监测指标具有一定可行性。随着 Cu^{2+} 在大型水蚤体内的积累, Cu^{2+} 与MT的结合逐步达到饱和而超过大型水蚤的生理耐受程度,多余的 Cu^{2+} 并不能被解毒,所以就会对大型水蚤产生毒性作用,造成大型水蚤的死亡。说明Cu body burden/MT的比值可以更好的指示水体受到重金属 Cu^{2+} 污染的程度。

本论文以人工稀释水作为背景水样,通过化学平衡软件对铜的形态进行辅助分析,研究了4种有机络合剂(草酸、酒石酸、EDTA和腐殖酸)对大型水蚤体内铜的生物积累(Body burden, BBD)以及金属硫蛋白(Metallothionein, MT)诱导的影响。结果表明,有机络合剂能显著的降低大型水蚤体内生物积累以及诱导的MT含量,4种不同有机络合剂所产生的效果大体相同;有机络合态的铜也能对大型水蚤体内铜的Body burden以及MT的诱导产生一定的影响,说明有机络合态的铜也具有一定的生物有效性;在相同浓度条件下大型水蚤对腐殖酸络合态铜的生物有效性大于EDTA络合态铜。

以大型水蚤(*Daphnia magna*)为受试生物,以稳定同位素 ^{65}Cu 作为示踪剂,研究不同Cu浓度下,大型水蚤对水相中 Cu^{2+} 的吸收。结果表明,在低浓度下,

大型水蚤的吸收随着水相中 Cu^{2+} 浓度的增加而增加。随着水相中 Cu^{2+} 浓度的升高, 大型水蚤的吸收逐渐趋于饱和。水相吸收速率和 Cu 的暴露浓度符合米氏方程(Michaelis-Menten Function), 最大吸收速率 I_{max} 为 $14.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 米氏常数 K_m 为 $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 水相吸收速率常数 k_u 为 $1.23 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。本文利用稳定同位素 ^{65}Cu 对大型水蚤吸收水相 Cu 的动力学进行基础性研究, 目前国内尚无人涉及。

第6章 结论和展望

通过本论文的研究,得到以下主要结果:

1. 本文对所采集的3条代表性河流的14个样品的33项水质指标进行了测定和理化分析,通过内梅罗指数法、模糊数学综合评判法对3条河流14个样点的水质状况进行了评价,大型水蚤、斜生栅藻急性毒性测试法研究了3条河流14个样点的急性毒性状况,并运用主成分分析方法简单探讨了水质分级影响因素和毒性产生的原因,得到如下结果:

1) 利用内梅罗指数法和模糊数学综合评判法研究了北京市不同功能水体的水质状况,京密引水渠水质一般,能够满足饮用水源水使用要求,但须加强管理;清河水质较差,可作为纳污排洪功能水体使用;小月河毒性一般,符合景观用水的要求。

2) 利用大型水蚤急性毒性试验国际标准方法和 OECD 推荐的斜生栅藻的急性毒性生长抑制试验,研究了北京市不同功能水体对大型水蚤的 24h-EC₅₀、48h-LC₅₀ 和对斜生栅藻的 96h-EC₅₀, 总体急性毒性单位处于(0~500)。作为排洪纳污的清河大部分采样点生物毒性极高;京密引水渠作为北京市水源供水地生物毒性很低;小月河水具有一定的生物毒性。生物毒性大小为:清河>小月河>京密引水渠。

3) 利用主成分分析法和相关性分析研究了水质影响因素和毒性产生的原因,结果表明,水样生物毒性与 Cl⁻、Ca、K、Li、Mn、Na、Cr、Ni 等指标有关;内梅罗水质指数与 NO₂⁻、Cl⁻、K、Na、Ni 等指标有关。说明水质的优劣并不能反映水体综合毒性的大小,结合化学指标和毒理学指标共同评价水体污染更为合理。

2. 以大型水蚤机体作为研究对象,研究了模拟天然淡水水体受到重金属Zn、Cd污染时,Zn、Cd暴露对生物机体的毒性作用,测定了大型水蚤体内积累的重金属含量(Body burden)、MT和SOD的诱导程度,以及探讨了上述生物毒性指标间的相互关系。结果表明:

1) 大型水蚤体内积累的重金属含量(Body burden)会随着水环境中的重金属浓度的升高而升高,Zn积累的程度要比Cd积累的程度高;诱导的MT的含量也会随着水环境中的重金属浓度的升高而升高,Zn和Cd的诱导程度基本相同;诱导

的SOD会随着水环境中的重金属浓度的升高、暴露时间的延长(0-72h)而呈现出先升高后下降的峰值变化。此实验首次观察到重金属暴露初期,在大型水蚤的积累过程中,形成一个积累高峰,随后下降,其机制有待进一步研究。

2)联合暴露实验对大型水蚤的染毒的实验结果表明,Zn和Cd这两种重金属之间的联合作用在低浓度时表现为毒性增加的协同作用;在中等浓度时表现为近似相加作用;在高浓度时表现为拮抗作用。

3)相关生物毒性指标间的相互关系结果表明,MT与大型水蚤体内的金属含量(Body burden)具有显著的相关关系;SOD活性与大型水蚤体内积累的Cd含量(Cd body burden)具有显著的负相关关系,而由Zn诱导的SOD与大型水蚤体内积累的Zn含量(Zn body burden)并无任何明显的关系;Cd body burden/MT的比值与Cd对大型水蚤的致死率具有显著的相关关系,而Zn body burden/MT的比值与Zn对大型水蚤的致死率并没有明显的关系。因此以Cd诱导的MT含量、body burden/MT的比值来指示水体受到重金属Cd的污染程度具有一定应用前景。

3. 以大型水蚤机体作为研究对象,研究了天然淡水水体受到重金属 Cu 污染时,Cu 暴露对生物机体的毒性作用,测定了大型水蚤体内积累的重金属含量(Body burden)、MT 和 SOD 的诱导程度,以及探讨了有机络合剂对水体中铜毒性的影响,并且利用稳定同位素示踪方法研究大型水蚤对水体中铜的生物有效性。结果表明:

1)大型水蚤体内积累的重金属含量(Body burden)会随着水环境中的铜浓度的升高而升高,且呈线性关系;诱导的MT的含量也会随着水环境中的铜浓度的升高而升高,呈现指数关系;诱导的超氧化歧酶(SOD)会随着暴露时间的延长(0-72h)而呈现先增长后降低的波动变化,其机制有待进一步研究。

2)相关生物毒性指标间的相互关系结果表明,MT与大型水蚤体内的金属含量(Body burden)具有显著的相关关系;Cu body burden/MT的比值与Cu对大型水蚤的致死率具有显著的相关关系。因此以Cu诱导的MT含量、body burden/MT的比值来指示水体受到重金属Cu的污染程度具有一定应用前景。

3)以大型水蚤机体作为研究对象,对人工配制的含铜稀释水中添加不同络合剂,研究了络合剂对水体中铜的毒性,测定了大型水蚤体内的重金属(Body burden)以及MT的含量。结果表明:有机络合剂能显著的减小水体中铜元素的

生物有效性,不同的络合剂所产生的效果大体相同,但与EDTA相结合的Cu(EDTA)也对大型水蚤产生了一定的毒性。

4) 在12小时之内,大型水蚤对水相中的铜的吸收与水相中铜的浓度具有显著的线性相关关系,受净化作用的影响很小,得出的吸收速率常数为 $0.302 \pm 0.188 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;以衣藻为食物得出大型水蚤食物相同化率(AE)为 $(17.2 \pm 2.33) \%$,生理循环速率常数 k 为 0.50 d^{-1} ;大型水蚤对铜的排出速率常数 k_e 为 0.277 d^{-1} 。

5) 根据以上参数,得到大型水蚤对铜的积累模型为如下形式:

$$C_{ss} = \frac{C_w \times (7.248 + 17.2 \cdot IR \cdot BCF)}{0.277}$$

其中, C_{ss} 是大型水蚤体内铜的浓度($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), C_w 是溶解相重金属浓度($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), IR 是生物进食速度($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), BCF 是生物浓度系数($\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$)。

通过实地测定 C_w ,就可以利用该模型初步预测不同水环境中的大型水蚤体内铜的含量;

6) 定量比较了大型水蚤在水体中水相吸收与食物相吸收的重要性,结果表明食物相吸收是大型水蚤体内铜积累的主要途径。

展望:

1、评价水质功能的适当性,为水环境的保护和管理提供科学依据

水环境的健康状况和水质状况的优劣关系到城市建设的顺利发展,尤其是水系周边地区居民的身体健康。选取有代表性的河流进行水质状况研究,不仅可以反映当前水质状况及其污染程度,而且对于评价其水质功能的适当性具有重要的现实意义。运用内梅罗指数法和模糊数学综合评判法、大型水蚤和栅藻急性毒性测试法对三条河流的水质和急性毒性状况进行了评价,并运用主成分分析法简单探讨了毒性产生的原因,不仅可以反映水质状况及其污染程度,而且对于评价其水质功能的适当性,为水环境的保护和管理提供科学依据。

2、结合化学指标和毒理学指标共同评价水质才更为合理

当水体受到重金属污染时,水环境中的生物如大型水蚤通过吸收或摄食作用,体内就会积累重金属,相应的发生生理化学变化,如诱导MT和SOD等。大型水蚤体内积累重金属的含量并不能提供大型水蚤受到的危害程度,因而不能

够指示重金属污染的程度。SOD 作为受重金属污染水体的监测指标同样不能指示水体受到的污染程度。重金属 Cd body burden/MT 的比值可以很好的反映水体受到重金属 Cd 污染时对大型水蚤的毒性作用,但由于重金属 Zn 并没有表现出相似的结果,所以以重金属的 body burden/MT 的比值作为受重金属污染水体重金属离子污染的监测指标来指示水体受到的污染程度同样具有局限性。而无论是由 Zn 还是由 Cd 诱导的 MT 与暴露浓度和大型水蚤体内积累的重金属含量(body burden)之间均具有较好的相关关系;铜作为大型水蚤体内必需的微量元素合成了血蓝蛋白及其他相关的酶;当大型水蚤体内铜含量升高时大型水蚤体内的 MT 迅速升高,说明大型水蚤合成了新的 MT 与过量的铜相结合。因此以 MT 作为受重金属污染水体重金属离子污染的监测指标是具有可行性。

水质分级的好坏并不能反映水质的综合毒性的大小,结合化学指标和毒理学指标共同评价水质才更为合理。

3、利用稳定同位素研究生物体内重金属的迁移转化动力学提供实验依据

利用稳定同位素 ^{65}Cu 作为示踪剂,对大型水蚤暴露的溶液和食物进行标记,研究了不同暴露浓度下,大型水蚤对水相中 Cu 的吸收规律,测定重要的生理参数-水相吸收速率常数(Influx Rate Constant, k_u , $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)。对食物相同化和生物的生理排出过程进行研究,测定了同化率(Assimilation Efficiency, AE, %)和排出速率常数(Efflux Rate Constant, k_e , $1\cdot\text{d}^{-1}$)。本文利用稳定同位素 ^{65}Cu 对大型水蚤吸收水相 Cu 的动力学进行基础性研究,目前国内尚无人涉及。

参考文献

- 1 Bolanos L, Madrid VA, Ciencias F, et al. Differential toxicological response to Cd in *Anabaena* strain PCC-7119 growth with NO_3^- or NH_4^+ as nitrogen-source[J]. *J Plant Physiol*, 1992, 140: 345-349
- 2 沈佩芬, 章宗涉, 龚循炬, 等. 微型生物监测新技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1990, 138
- 3 聂湘平, 蓝崇钰, 林里, 等. 多氯联苯对蛋白核小球藻和斜生栅藻生长影响的研究[J]. *中山大学学报*, 2002, 41(1):68-71
- 4 Eastmond D.A., Gary. M.B., Mitton L.L.Toxicity, accumulation, and elimination of polycyclic aromatic sulfur heterocycles in *Daphnia magna*[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1984, 20(13): 105-111
- 5 VillegasNavarro A., Santiago M.R. Determination of LC50 from *Daphnia magna* in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents[J]. *Environment International*, 1997, 23(4): 535-540
- 6 曲克明, 袁有宪, 陈民山等. 化纤废水主要污染物对大型蚤的急性毒性及联合毒性作用[J]. *中国水产科学*, 2000, 7(1): 78-81
- 7 Dodson S.I., Merrit C.M., Torrentera L., et al. Dieldrin reduces male production and sex ratio in *Daphnia galeata mendotae*[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 1999, 15: 192-199
- 8 黄国兰, 孙红文, 高娟, 等. 邻苯二甲酸二丁酯对大型蚤(*Daphnia magna*)的毒性作用研究[J]. *环境化学*, 1998, 17(5): 428-433
- 9 王连生, 刘征涛, 周风帆, 等. 芳烃类有机物结构与活性相关的模式参数研究[J]. *环境科学*, 1994, 15(3): 7-10
- 10 靳立军, 王连生. 取代苯甲醛衍生物的定量结构-活性关系(QSAR)研究[J]. *环境化学*, 1999, 18(2): 127-130
- 11 Ibrahim H., Kheir R., Lewis J., et al. Comparison of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity in *Chironomus riparius* Meigen exposed to chemical-spiked sediments[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, 66(5): 603-610
- 12 Panter G.H., Hutchinson T.H._Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2004, 70(1): 11-21
- Livingstone D.R., Piee R.K. Mussele and environmental contaminations: bioaccumulation and physiological aspects[M]. Gosling (Eds). *The mussel mytilus: ecology, physiology, genetics and culture. Developments in aquatic and fisheries science*. Amsterdam:

- 13 Elsevier.1992, 25: 425-464
- 14 郝向英, 赵慧, 刘卫. 黄河中游主要重金属污染物的迁移转化[J]. 内蒙古环境保护, 2000, 12(3):27-28,10
- 15 陈志澄, 赵淑媛, 黄丽彬等. 稀土矿山水系中 Pb, Cd, Cu, Zn 的化学形态及其迁移研究[J]. 中国环境科学, 1994, 14(3):220-225
- 16 张笑一, 潘渝生. 重金属致毒的化学机理[J]. 环境科学研究, 1997, 10(2):45-19
- 17 何邦平, 陈杰, 刘小宇等. 锌铜与血脂水平及脂质过氧化关系的研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2002, 19 (3):66-680
- 18 Dave G. Effects of waterborne iron on growth, reproduction, survival and haemoglobin in *Daphnia magna*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1984, 78c(2): 433-438
- 19 Dave G. Effects of copper on growth, reproduction, survival and haemoglobin in *Daphnia magna*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1984, 78c(2): 439-443
- 20 Jin-Seok, Harold S. Aquatic toxicity evaluation of copper-complexed direct dyes to the *Daphnia magna*[J]. Dyes and Pigments, 2007, 73:127-132
- 21 朱丽, 李爱贞. 沉积物中重金属的形态对大型蚤的影响[J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 1999, 14(2): 166-170
- 22 王晓蓉. 环境化学[M]. 南京: 南京大学出版社, 1993
- 23 王俊, 张义生. 化学污染物与生态效应[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1993
- 24 Penttinen S., Kostamo A. Combined effects of dissolved organic material and water hardness on toxicity of cadmium to *daphnia magna*[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1998, 17(12): 2498~2503
- 25 高世荣, 修瑞琴. 大型蚤对氰渣、锑冶炼碱渣的毒性评价[J]. 环境科学, 1991, 12(6): 32~33
- 26 王珊珊, 冯流. 有机锡化合物的毒性效应及其影响因素[J]. 安全与环境学报, 2005, 5(3): 12-15.
- 27 傅迎春, 修瑞琴, 任改英, 等. 用大型水蚤来研究氟和砷离子对水环境的联合毒性作用[J]. 中国公共卫生学报, 1994, 13(4): 206~208
- 28 傅迎春, 修瑞琴, 许永香, 等. 氟与硒对大型蚤的联合毒性研究[J]. 中国环境科学, 1995, 15(4): 280~281
- 29 孔繁翔. 环境生物学[M]. 北京: 高教出版社, 2000
- 30 茹炳根. 第四届国际金属硫蛋白会议简介[J]. 生命科学, 1998, 10(3): 157 -158
- 31 Dziegiel P., Jelen M., Muszczynska B., et al. Role of metallothionein expression in non-small cell lung carcinomas[J]. Roczn Akad Med Białymst, 2004, 49 (Suppl 1): 43 -45
- 32 Bonwick GA. Hepatic metallothionein levels in roach (*Rutilus rutilus* L.) continuously exposed to water-borne cadmium[J]. Comp Biochem Physiol, 1991, 99C:119-125

- 33 Wang W.X. and Guan R. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76: 217-229
- 34 广东省海岸带和海涂资源综合调查大队, 广东省海岸带和海涂资源综合调查领导小组, 广东省海岸带和海涂资源综合调查报告[M]. 1987, 北京: 海洋出版社, 306
- 35 DiGiulio R.T., Clifford H., Evan P.G. Effects of Black Rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish[J]. *Aquatic Toxicology*, 1993, 26: 1-22
- 36 Winstone G.W., DiGiulio R.T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms[J]. *Aquatic Toxicology*, 1991, 19: 137-161
- 37 Burgeot T., Andrson B.G. Bioindications of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea[J]. *Marine Ecology*, 1996, 131: 125-141
- 38 Cossu C., Bazzaz M.B., Govindjee A. Glutathione reductase, seleniumdependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies[J]. *Ecotox Environ Safe*, 1997, 38: 122-131
- 39 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M]. 1989. 北京: 科学出版社
- 40 Marcel R., PedroBucCalderon. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems[M]. 1994. NewYork: Marcel Dekker, Inc
- 41 Peters L.D., Livingstone D.R. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot[J]. *Journal of Biology*, 1996, 49: 986-997
- 42 DiGiulio R.T., Washburn P.C., Wenning R.J., et al. Biochemical responses in aquatic animals, a review of determinants of oxidative stress[J]. *Environ Toxicol & Chem*. 1989, 8: 1103-1123
- 43 Lemairon P., Matthews A., Forlin L., et al. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics[J]. *Arch Environ Contour Toxicol*, 1994, 26: 191-200
- 44 Stegemen J.J., Brouwer M., Diulio R.T., et al. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effects [A]. 1992, Boca Raton, Florida: lewis publishers, 235-335
- 45 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. *海洋科学*, 1995, 4: 1-3
- 46 赵元凤, 吕景才, 李丹彤, 等. 海洋污染对毛蚶超氧化物歧化酶影响的研究[J]. *海洋学报*. 2003, 25(3): 77-82
- 47 侯丽萍, 马广智. 镉对草鱼鱼种肝组织 SOD 活性的影响[J]. *水利渔业*, 2003, 23(3): 14-15
- 48 Gabryelak T., Klekot J. The effects of paraquat on the peroxide metabolism enzymes in

- erythrocytes of freshwater fish species[J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985, 81C: 415-418
- 49 Vig E., Nemcsok J. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus Carpio* L[J]. *J.Fish.Biol*, 1989, 35: 23-25
- 50 Mater M.E., Richard T., DiGiulio R.T. Antioxidant enzyme activities and malonaldehydel, glutathione methemoglobin concentrations in channel fish exposed to DEF and N-butylmercaptan Caaompa[J]. *Chem and Physiol*, 1986, 85C: 427-432
- 51 Thomas P., Wofford H.W. Effects of cadium and Aroclor 1254 on lipid peroxidaation, glytathione peroxidase activity and selected antioxidants in Altantic croaker tissues[J]. *Aquat Toxicol*, 1993, 27: 159-178
- 52 Luoma S.N., Fisher N.S. Uncertainties in assessing contaminant exposure from sediments [A]. *Ecological Risk Assessments of Contaminated Sediments* [C]. SETAC Special Publishing Series; Pensacola, FL, 1997: 211-237.
- 53 Hunn J.B. Role of calcium in gill function in freshwater fishes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1985, 82(3): 543-547.
- 54 Meyer J.S., Santore R.C., Bobbitt J.P., et al. Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free-ion activity does not [J]. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33(6): 913-916
- 55 Mason R.P., Reinfelder J.R., Morel F.M.M. Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom [J]. *Environmental Science and Technology*, 1996, 30(6): 1835-1845.
- 56 Wang W.X., Griscom S.B., Fisher N.S. Bioavailability of Cr(III) and Cr(VI) to marine mussels from solute and particulate pathways [J]. *Environmental Science and Technology*, 1997, 31(2): 603-611.
- 57 Wang W.X., Fisher N.S. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates [J]. *Science of the Total Environment*, 1999, 237/238(30): 459-472
- 58 Luoma S.N., John C., Fisher N.S., et al. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways [J]. *Environmental Science and Technology*, 1992, 26(3): 485-492.
- 59 Fisher N.S., Stupakoff I., Sanudo-Wihelmy S., et al. Trace metals in marine copepods: A field test of a bioaccumulation model coupled to laboratory uptake kinetics data [J]. *Marine Ecological Progress Series*, 2000, 194: 211-218.
- 60 Ng T.Y.T., Wang W.X. Modeling of cadmium bioaccumulation in two populations of the green mussel *Perna viridis* [J]. *Environmetal Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(9): 2299-2305.
- 61 Guan R., Wang W.X. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics [J].

- Aquatic Toxicology, 2006, 76(3-4): 217-229.
- 62 Wang W.X., Fisher N.S., Luoma S.N. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis* [J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 140(1-3): 91-113.
- 63 Wang W.X., Fisher N.S. Modeling metal bioavailability for marine mussels [J]. Environment Contaminant Toxicology, 1997, 151: 39-63.
- 64 De Schamphelaere K.A.C., Janssen C.R. Effects of chronic dietary copper exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004, 23(8): 2038-2047.
- 65 Hook S.E., Fisher N.S. Sublethal effects of silver in zooplankton: Importance of exposure pathways and implications for toxicity testing [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20(3): 568-574.
- 66 Croteau M.N., Luoma S.N., Topping B.R., et al. Stable metal isotopes reveal copper accumulation and loss dynamic in the freshwater bivalve corbicula [J]. Environmental Science and Technology, 2004, 38(19): 5002-5009.
- 67 Yu R.Q., Wang W.X. Kinetic uptake of bioavailable cadmium, selenium, and zinc by *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002, 21(11): 2348-2355.
- 68 Penttinen S., Kukkonen J., Oikari A. The kinetics of cadmium in *Daphnia magna* as affected by humic substances and water hardness [J]. Ecotoxicology and Environmental Safe, 1995, 30(1): 72-76.
- 69 Tsui M.T.K., Wang W.X. Uptake and elimination routes of inorganic mercury and methylmercury in *Daphnia magna* [J]. Environmental Science and Technology, 2004, 38(3): 808-816.
- 70 Wang W.X., Fisher N.S. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: A synthesis [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1999, 18(9): 2034-2045.
- 71 Tsui M.T.K., Wang W.X. Biokinetic and tolerance development of toxic metals in *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, 26(5): 1023-1032.
- 72 Porter K.G., Gerritsen J., Orcutt J.D. The effect of food concentration on swimming patterns, feeding behavior, ingestion, assimilation, and respiration by *Daphnia* [J]. Limnology and Oceanography, 1982, 27(5): 935-949.
- 73 Reinfelder J.R., Fisher N.S. The assimilation of elements ingested by marine copepods [J]. Science, 1991, 251(4995): 794-796.
- 74 Xu Y., Wang W.X. Individual responses of trace-element assimilation and physiological turnover by the marine copepod *Calanus sinicus* to changes in food quantity [J]. Marine

- Ecological Progress Series, 2001, 218: 227-238.
- 75 Guan R., Wang W.X. Dietary assimilation and elimination of Cd, Se, and Zn by *Daphnia magna* at different metal concentrations [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2004, 23(11): 2689-2698.
- 76 Lam I.K.S., Wang W.X. Accumulation and elimination of aqueous and dietary silver in *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 2006, 64(1): 26-35.
- 77 Yu R.Q., Wang W.X. Biokinetics of cadmium, selenium and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna* [J]. *Environmental Pollution*, 2004, 129(3): 443-456.
- 78 Tsui M.T.K., Wang W.X. Maternal transfer efficiency and transgenerational toxicity of methylmercury in *Daphnia magna* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2004, 23(6): 1504-1511.
- 79 Tsui M.T.K., Wang W.X. Temperature influences on the accumulation and elimination of mercury in a freshwater cladoceran, *Daphnia magna* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 70(3): 245-256.
- 80 Lam I.K.S., Wang W.X. Transgenerational retention and maternal transfer of selenium in *Daphnia magna* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(9): 2519-2525.
- 81 Reinfelder J.R., Fisher N.S., Luoma S.N., et al. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach [J]. *Science of the Total Environment*, 1998, 219(2-3): 117-135.
- 82 程静, 等. 毒性鉴别评价方法对城镇污水处理厂去除水中有毒物质的分析实例[J]. *环境化学*, 2001, 20(5): 490-495
- 83 Chapman P.M., Wang F., Janssen C., et al. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: Binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1998, 55(10): 2221-2243.
- 84 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- 85 蔡建安, 张文艺. 环境质量评价与系统分析[M]. 合肥: 合肥工业大学出版社, 2003, 13-26
- 86 古朝君. 内梅罗指数法在地下水水质评价中的应用及存在问题[J]. *环境保护科学*, 2002
- 87 李进, 陈益滨, 师伟, 等. 模糊综合评价法在地下水水质评价中的应用[J]. *地下水*, 2006, 28: 4-6
- 88 刘秀花. 西安市地面水环境污染分析[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2006, 36: 157-160
- 89 国家环境保护局. 中华人民共和国地表水环境质量标准[S]. GB3838-2002, 2002
- 90 王鸿, 杰尤宾, 上官宗光. 模糊数学分析方法在水环境评价中的应用[J]. *水文*, 2005, 25(6): 30-32

- 91 奚旦立. 环境监测[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001
- 92 修瑞琴. 大型水蚤生物测试技术研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 1990, 17(6): 335-338
- 93 Anderson B.G. The toxicity thresholds of various substances were found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. *Sewage Works J*, 1944A, 16(6): 1156-1165
- 94 蒋燮治, 堵南山. 中国动物志: 节肢动物门、甲壳纲、淡水枝角类[M]. 北京: 科学出版社, 1979, P: 101-104
- 95 ISO. Water quality-Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* [S]. ISO 8692: 2004
- 96 ISO. Water quality-Determination of the acute toxicity of substance to *Daphnia* (*Daphnia magna* straus) [S]. ISO 6341: 1982
- 97 Marina I, Margherita L, Angela N, et al. Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach[J]. *Chemosphere*, 2003, 52:87
- 98 国家环境保护局. 水质 物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法[S]. GB/T 13266-91, 1992
- 99 A.Villegas N., Y.RammH R., M.S.Salvador S., et al. Determination of Wastewater LC50 of the Different Process Stages of the Textile Industry[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 48:56-61
- 100 J.Garric, B.Vollat, D.K.Nguyen, et al. Ecotoxicological and chemical characterization of municipal wastewater treatment plant effluents [J]. *Wat.Sci.Tech*, 1996, 6(33):83-91
- 101 于秀林, 任雪松. 多元统计分析[M]. 北京: 中国统计出版社, 1999, 8: 154
- 102 Madoni P. The acute toxicity of freshwater ciliates[J]. *Environmental Pollution*, 2000, 109(1): 53-59
- 103 Al-Yousuf M.H., El-Shahawi M.S., Al-Ghais S.M. Trace metals in liver, skin and muscle of *lethrinus lentijian* fish species in relation to body length and sex[J]. *The Science of the total Environment*, 2000, 256(2~3): 87-94
- 104 李爱琴, 唐宏建, 王阳峰, 等. 环境中铬污染的生态效应及其防治[J]. *中国环境管理干部学院学报*, 2006, 16(1): 75~78
- 105 S.R.Powell. The antioxidant properties of zinc, *J.Nutr.* 2000, 130: 1447S-1454S
- 106 R.J. Cousins, Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin, *Physiol. Rev.* 1985, 65: 238-309
- 107 Scheuhammer, A.M., Cherian, M.G. *Methods Enzymol.* 1991, 205: 78-83
- 108 [108]Scheuhammol/Ler A.M., Cherian M.G. Quantification of metallothioneins by a silver saturation method[J]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1986, 82: 417-425
- 109 邹国林, 胡文玉, 邱涛, 等. 几种超氧化物歧化酶测活方法灵敏度的研究[J]. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1997, 43(2): 233-237

- 110 李建武, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997, 318-323.
- 111 许秀珍, 梁山. 生物化学与分子生物学实验指导[M]. 广州: 暨南大学出版社, 2003, 72-75
- 112 Per-olav Moksnes, Ulf lindahl, Carl Haux. Metallothionein as a bioindicator of heavy metal exposure in the tropical shrimp, *Penaeus vannamei*: a study of dose-dependent induction[J]. Marine Environmental Research, 1995, 39: 143-146
- 113 Bossuyt B.T.A., Janssen C.R.. Comp. Biochem. Physiol. 2003, 136C: 253-264
- 114 Wang W.X., Guan R. Cd and Zn Uptake Kinetics in *Daphnia magna* in Relation to Cd Exposure History[J]. Environ. Sci. Technol, 2004, 38: 6051-6058
- 115 R.W. Olafson, A. Kearns, R.G. Sim. Heavy metal induction of metallothionein synthesis in the hepatopancreas of the crab *Scylla serrata*[J]. Comp. Biochem. Physiol, 1979, 62B:417-424
- 116 张克俭. 锌和氨氮对对虾肝胰脏的毒性作用[J]. 水产学报, 1993, 17 (1): 52-59
- 117 李永棋, 丁美丽. 海洋污染生态学[M]. 北京: 海洋出版社, 1991
- 118 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- 119 王海葬, 陶澎. 生物标志物在水环境研究中的应用[J]. 中国环境科学, 1999, 19 (5): 421-426
- 120 P.Siraj B., A.Usha R. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus*(*Tilapia*)[J]. Ecotoxicology Environmental Safety, 2003, 56: 218-221
- 121 唐学玺, 张培玉. 葱对黑鲷超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 217-220
- 122 Stebbing A.R.D. Hormesis the stimulation of growth by low levles of inhibition[J].Sci Tol Envir, 1982, 22 (1): 213-234
- 123 吴坚. 微量金属对海洋动物的生物化学效应[J]. 海洋环境科学, 1992, 10 (2): 58-64
- 124 Lu G.D., Hong F., Zhou Y.F. Environmental Occupation Medicine, 2003, 20:269-274
- 125 Vranken G, Tire C, Heip C. 1988. The toxicity of paired metal mixtures to the nematode *Monhystra disjuncta* (Bastian, 1865) [J]. Marine Environmental Research, 26(3): 161-179
- 126 Powell S R. 2000. The antioxidant properties of zinc [J]. Journal of Nutrition, 130: 1447S-1454S
- 127 Cousins R J. 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin [J]. Physisiological Reviews, 65: 238-309
- 128 刘清, 马梅, 董中华, 王子健. 1997. Cu 、Zn 、Cd 、Hg 对青海弧菌(Q67 菌株) 联合毒性作用的研究[J].中国环境科学,17: 301- 303
- 129 Otitoloju A A. 2002. Evaluation of the joint-action toxicity of binary mixtures of heavy

- metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus* var *radula* (L.) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 404-415
- 130 颜世铭. 微量元素医学精要[M]. 北京: 中国数字化出版社, 2002: 33-41.
- 131 常学秀, 文传浩, 王焕校. 重金属污染与人体健康[J]. 云南环境科学, 2000(01).
- 132 马桂云, 孙开进, 王京平, 唐婉莹. 混合重金属离子相互作用对 Cu 和 Pb 在鲫鱼体内积累的影响[J]. 光谱实验室, 2005, 22(05): 983-986.
- 133 Ana D. Correia, David R. Livingstone, M. Helena Costa. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*[J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54: 357-360.
- 134 杨志彪. 水体 Cu 对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)毒性作用机制的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2005.
- 135 李娜. 水体 Cu 对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)毒性作用机制的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2006.
- 136 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- 137 吴永贵, 熊焱, 林初夏. 铜对隆线趋光行为的抑制作用及其致死效应[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(5): 651-662.
- 138 陶澍, 骆永明, 曹军. 水生与陆生生态系统中微量金属的形态与生物有效性[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 119-135.
- 139 William G Sunda. Processes Regulating Cellular Accumulation and Physiological Effects: Phytoplankton as Model System[J]. *The Science of Total Environ*, 1998, 219: 165-181.
- 140 Welsh P G Parrott J L, Dixon D G et al. Estimating Acute Copper Toxicity to Larval Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) in Soft Water from Measurements of Dissolved Organic Carbon, Calcium, and pH[J]. *Can. J. Fisheries Aq. Sci*, 1996, 53: 1263-1271.
- 141 Holwerda A. Cadmium Accumulation and depuration in Anodonta Anatina Exposed to Cadmium Chloride or Cadmium EDTA[J]. *Environ. Contam. Toxicol*, 1988, 140: 373-380.
- 142 Tao S, Xu S P, Li B G et al. Bioavailability of Fulvic Acid Complexed Copper to Fish Gills[J]. *B. Env. Cont. Tax*, 2000, 64: 221-227.
- 143 龙爱民, 陶澍, 潘波, 刘国敬. 几种络合态铜对彩虹方头鱼的生物有效性[J]. 环境化学, 2001, 20(4): 320-325.
- 144 梁涛. 铜对鱼的生物有效性及有效态铜的长期监测方法研究[D]. 北京: 北京大学, 1998.
- 145 Croteau M.N., Luoma S.N. Characterizing dissolved Cu and Cd uptake in terms of the biotic ligand and biodynamic using enriched stable isotopes [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(9): 3140-3145.
- 146 Hoang T.C., Rogevich E.C., Rand G.M., et al. Copper uptake and depuration by juvenile and adult Florida apple snails (*Pomacea paludosa*) [J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17(7): 605-615.

- 147 Wright D.A. Calcium regulation in intermoult *Gammarus pulex* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1979, 83(1): 131-144.
- 148 Greenaway P. Calcium regulation in the freshwater mollusk, *Limnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata) I. The effect of internal and external calcium concentration [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1971, 54(1): 199-214.
- 149 Sutcliffe D.W. Sodium regulation in the amphipod *Gammarus duebeni* from brackish-water and fresh-water localities in Britain [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1967, 46(3): 529-550.
- 150 Tsui M.T.K., Wang W.X. Acute toxicity of mercury to *Daphnia magna* under different conditions [J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40(12): 4025-4030.
- 151 Vařák M. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins [J]. *Methods Enzymology Metallochemistry B*, 1991, 205: 452-458.
- 152 Glover C.N., Pane E.F., Wood C.M. Humic substances influence sodium metabolism in the freshwater crustacean *Daphnia magna* [J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2005, 78(3): 405-416.
- 153 Spry D.J., Wood C.M. A kinetic method for the measurement of zinc influx in vivo in the rainbow trout, and the effects of waterborne calcium on flux rates [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1989, 142(1): 425-446.
- 154 Chang S.I., Reinfelder J.R. Relative importance of dissolved versus trophic bioaccumulation of copper in marine copepods [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 231: 179-186.
- 155 Croteau M.N., Luoma S.N., Topping B.R., et al. Stable metal isotopes reveal copper accumulation and loss dynamic in the freshwater bivalve corbicula [J]. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(19): 5002-5009.
- 156 Croteau M.N., Luoma S. A biodynamic understanding of dietborne metal uptake by a freshwater invertebrate [J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(5): 1801-1806.
- 157 Wang W.X., Ke C.H. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 56(3): 153-165.
- 158 Ritterhoff J., Zauke G.P. Evaluation of trace metal toxicokinetics in Greenland Sea copepod and amphipod collectives from semi-static experiments on board ship [J]. *Polar Biology*, 1997, 17(3): 242-250.
- 159 Croteau M.N., Luoma S.N. Delineating copper accumulation pathways for the freshwater bivalve Corbicula using stable copper isotopes [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2005, 24(11): 2871-2878.

附录 A 现行的地表水环境质量标准的部分内容(mg/L)

	一级	二级	三级	四级	五级
pH	6.5~8.5	6.5~8.5	6.5~8.5	6.5~8.5	6~9
硫酸盐					
(以 SO_4^{2-} 计)	250 以下	250	250	250	250
≤					
氯化物					
(以 Cl^- 计) ≤	250 以下	250	250	250	250
溶解性铁 ≤	0.3 以下	0.3	0.5	0.5	1
总锰 ≤	0.1 以下	0.1	0.1	0.5	1
总铜 ≤	0.01 以下	1.0(渔 0.01)	1.0(渔 0.01)	1	1
总锌 ≤	0.05	1.0(渔 0.1)	1.0(渔 0.1)	2	2
硝酸盐					
(以 N 计) ≤	10 以下	10	20	20	25
亚硝酸盐					
(以 N 计) ≤	0.06	0.1	0.15	1	1
7.5					
溶解氧 ≥	(饱和率	6	5	3	2
90%)					
(COD_{Cr}) ≤	15 以下	15	20	30	40
生化需氧量					
(BOD_5) ≤	3 以下	3	4	6	10
氟化物					
(以 F 计) ≤	1.0 以下	1	1	1.5	1.5
硒(四价) ≤	0.01 以下	0.01	0.01	0.02	0.02
总 砷 ≤	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1
总 汞 ≤	0.00005	0.00005	0.0001	0.001	0.001

总 镉 ≤	0.001	0.005	0.005	0.005	0.01
铬(六价)≤	0.01	0.05	0.05	0.05	0.1
总 铅 ≤	0.01	0.05	0.05	0.05	0.1
氨 氮 ≤	0.5	0.5	0.5	1	1.5

附录 B 北京市不同功能水体的水质指标

表 1 (mg/L)

	pH	DO	TOC	总碱度 (以 CaCO ₃)	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	F ⁻
天秀花园	8.26	10.34	4.936	38.3	60.866	72.307	2.23	12.05	0.442
水闸	7.65	8.10	7.778	76.6	109.371	86.276	2.53	2.03	0.477
箭亭桥	8.63	11.59	8.770	81.7	112.396	87.986	4.35	5.09	0.483
污水处理 厂	7.49	8.14	10.245	141.4	123.342	95.683	13.24	3.19	0.833
建材超市	7.81	8.28	9.429	367.6	116.766	100.078	10.50	1.92	0.617
火器营桥	7.9	11.32	5.234	117.4	9.685	34.274	3.36	7.48	2.025
美林花园	8.2	10.05	3.1	86.8	8.757	25.759	5.13	8.62	3.522
玲珑公园	8.3	7.68	4.264	112.3	13.827	36.210	3.94	7.17	2.081
中央电视 塔	8.4	9.23	4.105	117.4	13.245	35.365	0	11.47	3.294
八里庄	8.6	8.65	4.753	112.3	15.425	37.193	3.45	9.06	3.453
北影	7.79	3.72	13.877	173.6	39.824	47.548	0	2.11	1.395
学知桥	8.84	6.37	10.236	142.9	29.399	46.439	0	2.36	1.697
牡丹园	8.46	6.99	8.613	188.9	47.505	153.441	0	7.21	0.881
经贸大学	7.97	5.48	27.998	382.9	121.068	71.829	0	1.67	1.669

表 2 (mg/L)

	HPO ₄ ²⁻	氨氮	Fe	Zn	Al	B	Ba	Ca	K	Mg
天秀花园	0.771	1.368	0.12	0.05	1.21	0.637	0.082	101.4	7.945	41.851
水闸	2.559	0.198	0.11	0.09	0.67	0.494	0.079	126.6	25.445	43.201
箭亭桥	3.552	0.219	0.12	0.09	0.92	0.416	0.087	133.8	26.905	46.641
污水处理厂	0.611	0.320	0.21	0.11	0.73	0.500	0.109	113.4	33.695	40.331
建材超市	1.504	0.238	0.21	0.13	0.71	0.492	0.099	115.8	30.025	43.871
火器营桥	0	0.168	0.29	0.0007	2.53	0.633	0.120	55.64	4.199	21.451
美林花园	0	0.462	0.16	0.014	1.53	0.697	0.104	42.08	3.948	15.941
玲珑公园	0	1.569	0.16	0.1	1.09	0.344	0.111	52.79	4.730	21.711
中央电视台塔	0	0.200	0.68	0.11	1.38	0.521	0.111	52.73	6.189	21.561
八里庄	0	0.158	0.19	0.06	1.14	0.447	0.131	54.11	5.251	22.031
北影	1.58	4.470	0.45	0.04	1.87	0.912	0.061	71.76	12.655	28.081
学知桥	0.489	0.484	0.27	0.03	1.55	0.799	0.065	60.02	11.935	26.831
牡丹园	0.386	1.361	0.59	0.04	1.93	0.422	0.135	116.3	14.925	54.201
经贸大学	18.581	1.021	0.79	0.13	1.89	0.620	0.125	120.1	39.125	47.141

表 3 (mg/L)

	Na	Li	P	S	Mn	Si	Sn	Sr	Ti
天秀花园	66.791	0.0165	0.172	38.836	0.0011	0.111	0.0991	2.244	0
水闸	162.611	0.0262	0.670	46.886	0.0231	0.277	0.0686	2.809	0
箭亭桥	162.911	0.0354	1.079	49.236	0.0135	0.305	0.0858	2.964	0.263
污水处理厂	162.911	0.0247	0.249	56.226	0.0933	0.464	0.0381	1.632	0
建材超市	162.911	0.0255	0.319	56.946	0.0371	0.280	0.0496	2.132	0
火器营桥	18.021	0.0079	0.009	19.466	0.0482	0.402	0.0534	0.351	0
美林花园	16.211	0.0064	0.034	15.906	0.0017	0.217	0.0191	0.272	0
玲珑公园	25.041	0.0075	0.0624	33.276	0.0016	0.235	0.0667	0.353	0
中央电视塔	24.001	0.0076	0.0295	21.486	0.0047	1.846	0.019	0.349	0
八里庄	25.801	0.0082	0.225	21.336	0.0024	0.309	0.0591	0.364	0
北影	55.381	0.0173	1.142	28.456	0.0314	0.424	0.0456	0.596	0
学知桥	44.841	0.0162	0.701	25.416	0.0585	0.400	0.08	0.640	0
牡丹园	67.211	0.0297	0.133	80.716	0.0385	0.757	0	2.787	0
经贸大学	162.611	0.0255	9.825	49.206	0.135	0.967	0.0038	1.783	0

表 4 (mg/L)

	Cr	Ni	Cu	Se	Cd	Pb
天秀花园	0.0024	0.0024	0.0007	0	0	0.0002
水闸	0.0032	0.0049	0.0024	0	0	0.0004
箭亭桥	0.0016	0.0056	0.0046	0	0.0001	0.0043
污水处理厂	0.0036	0.0095	0.0027	0	0	0.0004
建材超市	0.0038	0.0071	0.0021	0	0	0
火器营桥	0.0002	0.0004	0.0025	0	0	0.0032
美林花园	0.0024	0.0014	0.0014	0	0	0.0019
玲珑公园	0.0001	0.0051	0.0046	0	0	0.0016
中央电视塔	0.0014	0.0028	0.0034	0	0	0.0023
八里庄	0.0010	0.0032	0.0049	0	0	0.0026
北影	0.0029	0.0040	0.0079	0.0002	0.0001	0.0033
学知桥	0.0010	0.0027	0.0046	0.0003	0	0.0018
牡丹园	0.0027	0.0085	0.0068	0.0007	0.0002	0.0026
经贸大学	0.0053	0.0082	0.0090	0.0009	0.0002	0.0026

附录 C 北京市不同功能水体的栅藻 96h-EC50 计算

京密引水渠段:

通过预试验可知,原水样对栅藻没有抑制率,说明京密引水渠段对斜生栅藻基本不存在生物急性毒性。因而无法计算 96hEC50 值。

清河段:

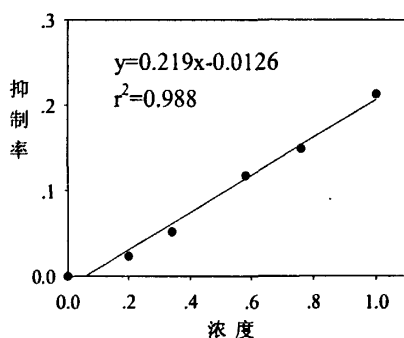


图 C.1 天秀花园 96h 抑制率

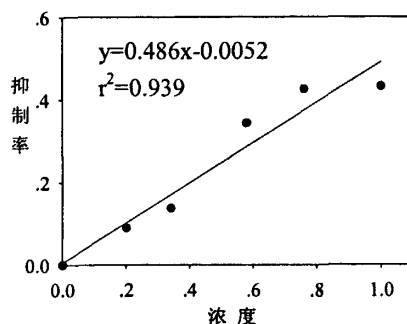


图 C.2 水闸 96h 抑制率

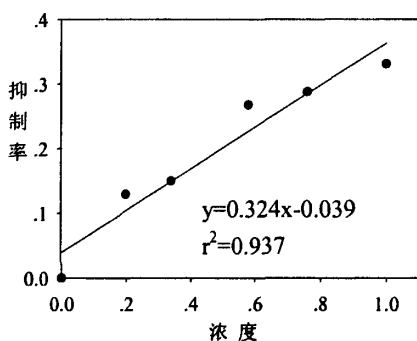


图 C.3 箭亭桥 96h 抑制率

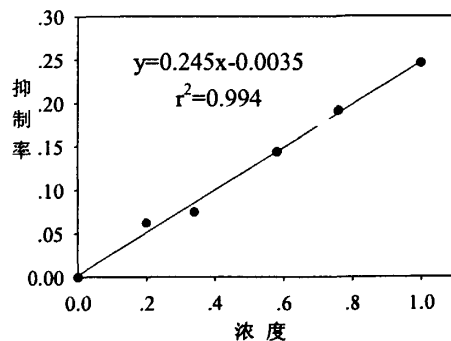


图 C.4 污水处理厂 96h 抑制率

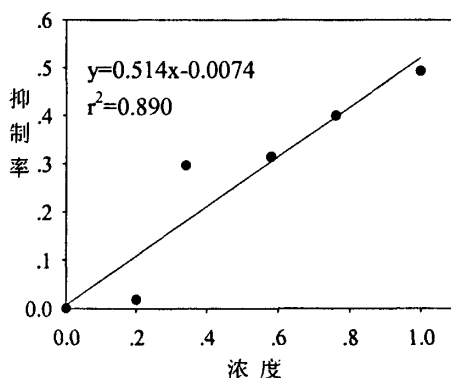


图 C.5 建材超市 96h 抑制率

小月河段:

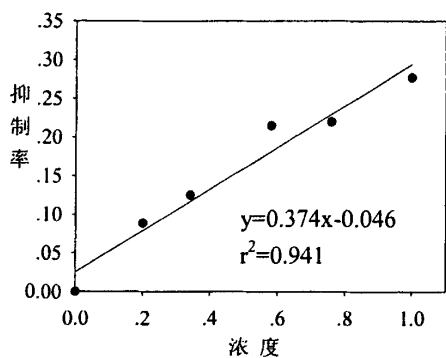


图 3.7 北影 96h 抑制率

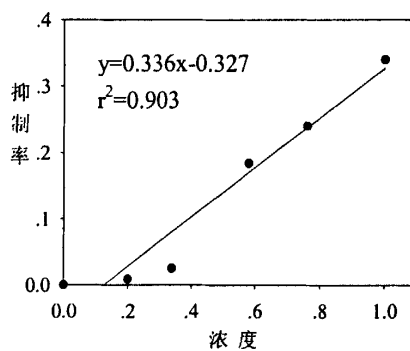


图 3.8 学知桥 96h 抑制率

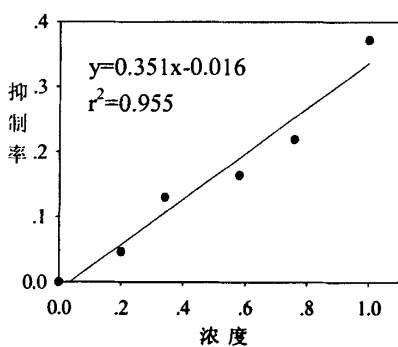


图 3.9 牡丹园 96h 抑制率

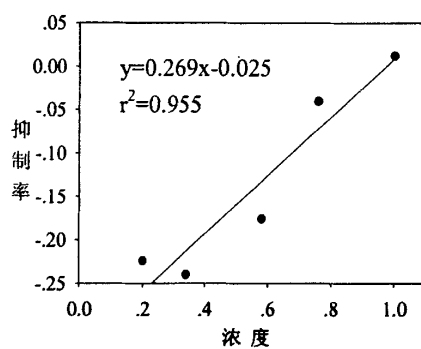


图 3.10 经贸大学 96h 抑制率

附录 D 北京市不同功能水体的大型水蚤的 24h-EC50 值和 48h-LC50 值计算

1)京密引水渠段:

通过预试验可知，原水样不能致死大型水蚤，说明京密引水渠段基本不存在生物急性毒性，对生物体没有急性毒性作用。因而无法计算 EC50 和 LC50 值。

2)清河段:

天秀花园：该监测断面 100%水样不能致死大型水蚤，说明该监测断面的生物急性毒性基本不存在。因而无法计算出 24h-EC50 值和 48h-LC50 值。

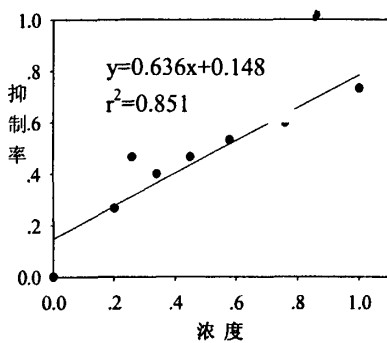


图 3.12 水闸 24h 抑制率

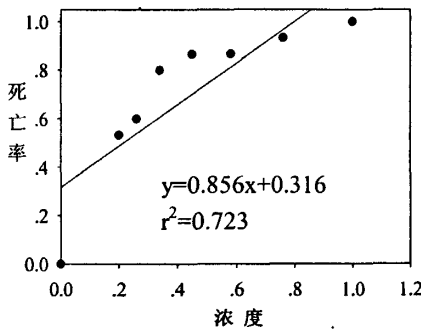


图 3.13 水闸 48h 死亡率

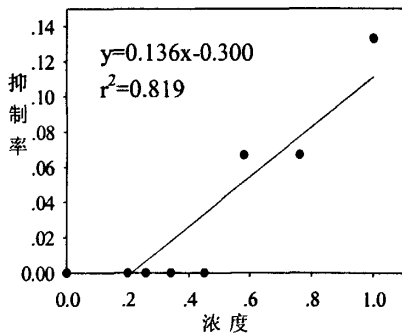


图 3.14 箭亭桥 24h 抑制率

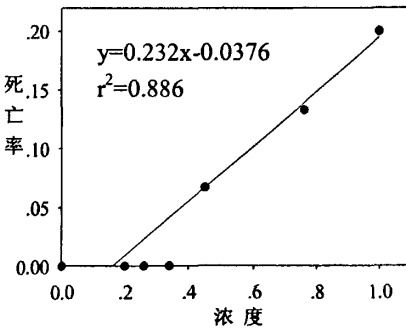


图 3.15 箭亭桥 48h 死亡率

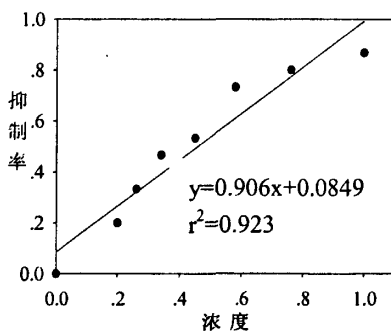


图 3.16 污水处理厂 24h 抑制率

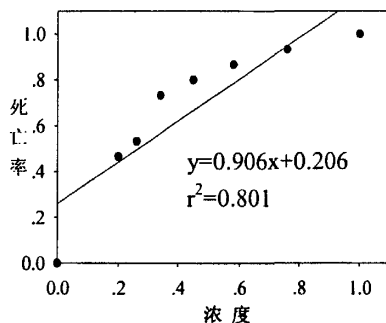


图 3.17 污水处理厂 48h 死亡率

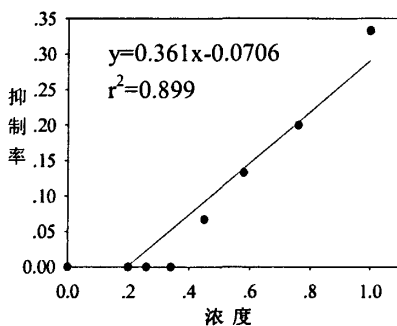


图 3.18 建材超市 24h 抑制率

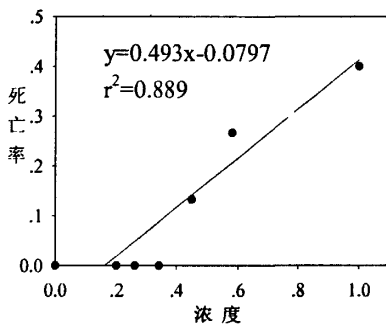


图 3.19 建材超市 48h 死亡率

3)小月河段

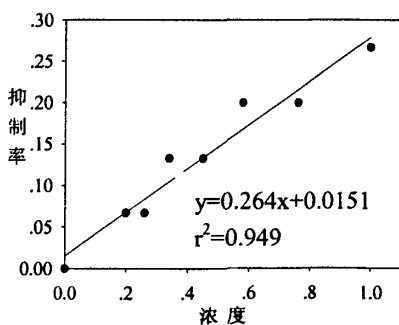


图 3.20 北影 24h 抑制率

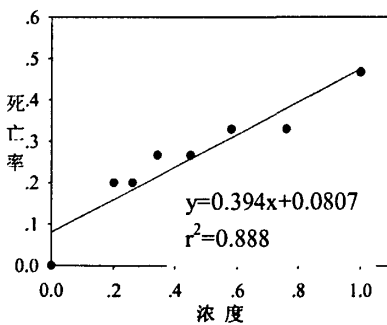


图 3.21 北影 48h 死亡率

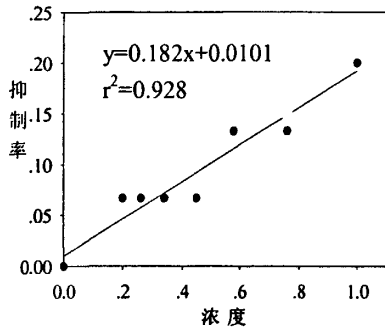


图 3.22 学知桥 24h 抑制率

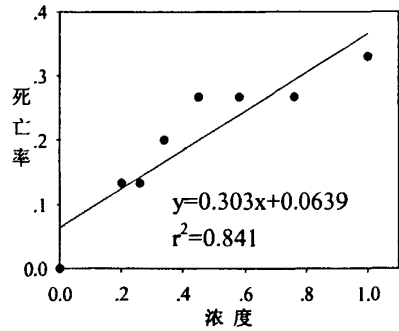


图 3.23 学知桥 48h 死亡率

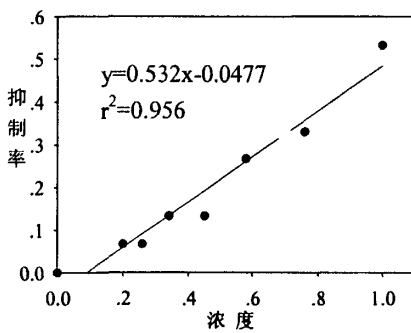


图 3.24 牡丹园 24h 抑制率

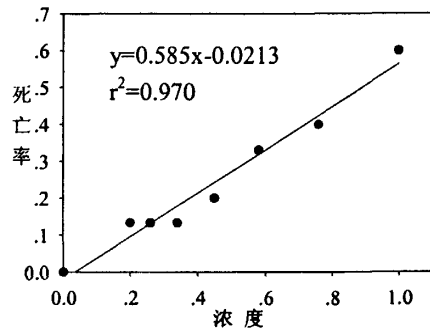


图 3.25 牡丹园 48h 死亡率

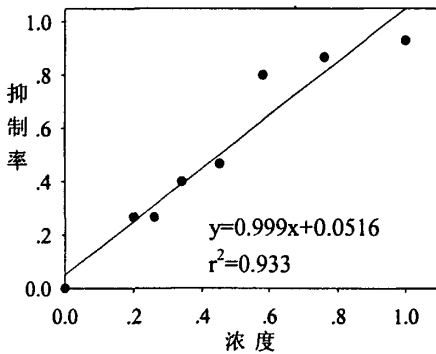


图 3.26 经贸大 24h 抑制率

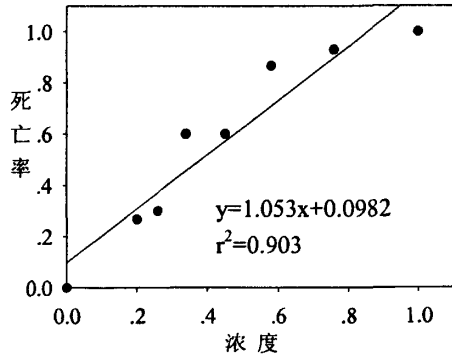


图 3.27 经贸大 48h 死亡率

1. 大型水蚤的培养方法

大型水蚤在培养时用经过 1.2 μ m 的 whatman GF/C 玻璃微纤维滤膜抽滤的京密饮水渠水作为培养介质，密度取约 10mL/只，即 1L 烧杯养 100 只蚤。大型水蚤培养时放在培养箱中，温度设置在 22.5℃，光照时间设置在 14h: 10h（白天: 黑夜）。以衣藻喂养，食物浓度为 1~2 $\times 10^5$ cell mL⁻¹。每天在一定时间喂食，每 2d 换一次培养水。喂食量在出生 1~3d，喂食衣藻浓度 5 $\times 10^4$ cells/mL，出生大于 4d 后，喂食衣藻 1~2 $\times 10^5$ cells/mL。要保证给大型水蚤喂食一次不可过多，因为藻密布水的表面会导致水中溶解氧的减少。尤其要注意出生 1~3d 的小蚤喂食不要超过 5 $\times 10^4$ cells/mL，食物密度过大会使小蚤不健康。为了达到相应的食物浓度，用血球计数板在显微镜下对衣藻计数。

大型水蚤需要分批喂养，同一批内都按同一龄计算。分批养时，第一批生的一般不要，这是由于数量不多，可能不太健康。一般用第二和第 3 批。

2. 衣藻的培养方法

衣藻的培养液 WC medium 配方如表 5.2，其中微量营养元素溶液（micronutrient solution）和维生素溶液（vitamin solution）的配方如表 5.3 和表 5.4 所示。WC medium 按照配方配好后，无需调 pH。

培养是同样放于培养箱中，温度设定在 22.5℃，光照时间设置在 14: 10（白天: 黑夜）。全过程需无菌培养。具体养藻流程如下：按照 WC medium 配方配培养液，然后用高压蒸汽灭菌锅灭菌。培养液冷却后就可以接种。接种需在超净工作台内进行，接种前可以先打开紫外灯灭菌 20~30min，接种时，关闭紫外灯。培养过程中不要曝气。

培养食物时接种过程与前面养藻流程相同，不过在接种之后需要曝气，以缩短其成熟时间。

表 5.2 WC medium 配方

溶液	元素	浓度 g/1000 mL	所取体积 mL
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Ca	36.8	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Mg	37	1
NaHCO ₃	NaHCO ₃	12.6	1
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	P	11.4	1

附录 D 北京市不同功能水体的大型水蚤的 24h-EC50 值和 48h-LC50 值计算

NaNO ₃	N	85	1
H ₃ BO ₃	H ₃ BO ₃	1	1
micronutrient solution *	—	—	1
vitamin solution **	—	—	1
distilled water	—	—	1000

表 5.3 微量营养元素溶液配方

成分	[g/1000 ml dist. H ₂ O]
Na ₂ EDTA	4.36
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3.15
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.18
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.006

表 5.4 维他命溶液配方

成分	[g/1000 mL]
thiamin HCl (维生素 B ₁)	0.1
Biotin (维生素 H)	0.0005

培养后的食物和接种剩余的衣藻冰箱中可保存 3 星期左右, 离心后的藻在冰箱中最多可保存 5 天, 以防变质。

攻读博士学位期间取得的学术成果

- 1 Rong ZHANG, Wenhong FAN, Jun CHEN, Rumeng SUN and Chunmei ZHAO
Bioavailability and Speciation of Cd, Pb, Cu, and Zn in Sewage Irrigated Soils in the
Southeastern Suburbs of Beijing .Materials Science Forum Vols. 610-613 2009
- 2 张融, 范文宏, 唐戈, 段勇, 赵春梅 重金属 Cd 和 Zn 对水生浮游动物大型蚤(*Daphnia magna*)联合毒性的研究初探 内蒙古大学学报(自然科学版) 2008 704-709
- 3 张融, 范文宏, 唐戈, 段勇, 赵春梅 水体中重金属镉和锌对大型蚤联合毒性效应的初步研究 生态毒理学报 2008,3 (3):286-290
- 4 范文宏, 张博, 陈静生, 张融, 邓宝山 锦州湾沉积物中重金属污染的潜在生物毒性风险评价 环境科学学报 2006.26 (6): 1000 – 1005
- 5 陈俊, 范文宏, 孙如梦, 张融 新河污灌区土壤中重金属的形态分布和生物有效性研究 [J]. 环境科学学报, 2007.27 (5): 831 – 837
- 6 范文宏, 唐戈, 段勇, 张融 运用主成分分析法评价北京市代表性河流的水质与毒性状况 生态毒理学报 2007.2 (1): 69-77

致谢

本研究论文是在导师任阵海院士、康天放教授、程水源教授的悉心指导下完成的。博士期间的几年中，得到了任院士、康教授的无私关怀和督促，使我顺利完成了博士论文。两位老师专业知识渊博，治学态度严谨，对待学生严格要求，为我们树立了求学和工作的榜样。值此论文完成之际，对两位老师表示衷心的感谢！

本文受国家自然科学基金项目“受重金属污染水体沉积物的生物毒性研究”（项目编号：50678015）的资助，特此感谢。

在本文研究过程中，得到了钟儒刚教授，范文宏老师的热忱帮助和建议，在此致以衷心的感谢！感谢陈东升博士和陈朝晖、赵秀勇、黄青、周颖、李玥等同学给予的各方面的指导和帮助，感谢唐戈、段勇、赵春梅等同学在相关试验中数据的整理和图形的绘制和分析等方面所做的大量的卓有成效的工作！感谢我的北工大2004级博士英语5班的全体同学，感谢环能学院2004级博士班的全体同学，是你们的帮助和鼓励以及奉献精神，陪伴我度过了这几年的博士学习生活，

感谢我的母亲给予我的学业上的无私支持和生活上的照顾，感谢我的同事和领导给予我学业上的鼓励、支持。

再次感谢在本文研究过程中所有曾给予我关心和帮助的家人、老师、同学和朋友！