

土壤锌 镉单一及复合污染对蚯蚓金属硫蛋白含量的影响

赵俊杰¹, 张高川¹, 葛 滢¹, 张春华²

(1. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学生命科学学院分子生物技术合作示范实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要: 蚯蚓金属硫蛋白(MT)是指示土壤污染程度的生物标志物。为揭示土壤镉(Cd)、锌(Zn)污染的生态效应,采用土壤染毒法,研究了 Cd、Zn 单一与复合污染对赤子爱胜蚓体内金属硫蛋白(MT)含量的影响。结果表明,无论是单一还是复合污染,Cd 都明显诱导了蚯蚓 MT 的合成,随着 Cd 胁迫浓度和时间的增加,蚯蚓 MT 的含量均显著上升。与 Cd 相比,单一 Zn 污染对 MT 的影响要小得多,胁迫 28 d 后 MT 含量才有升高。Cd、Zn 复合污染的效应在不同的 Cd、Zn 浓度组合下存在较大差异,同时也与暴露时间密切相关。当 Cd 处理为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,Zn 完全表现为拮抗作用;而在 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd 胁迫浓度下,Cd、Zn 复合对 MT 的影响随 Zn 浓度和暴露时间变化而出现不同的效应:当 Zn 为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,MT 表现出协同-拮抗-无影响的趋势,而在 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 Zn 处理下,MT 含量在 28 d 后显著下降。研究结果显示,蚯蚓 MT 是指示土壤 Cd 污染的有效指标,而 Zn 在一定程度上能缓解 Cd 对蚯蚓的毒害作用。

关键词: Cd; Zn; 单一及复合污染; 蚯蚓; MT

中图分类号: X503.223 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2009)06-1269-04

Effect of Zn and Cd Single and Combined Pollution on Metallothionein Content of Earthworm in Soils

ZHAO Jun-jie¹, ZHANG Gao-chuan¹, GE Ying¹, ZHANG Chun-hua²

(1.College of Resources and Environmental Sciences; 2.College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095 China)

Abstract: Metallothionein (MT) in earthworm may be used as a biomarker to indicate the soil quality. In this study, a bioassay was conducted to investigate the effects of single and combined applications of Cd and Zn in soil on the MT content in earthworm (*Eisenia fetida*). Results showed that Cd clearly induced the MT in earthworms with or without Zn applications to the soil. The MT content significantly rose with the concentration and time of Cd exposure. In contrast, single Zn treatment did not have a strong effect on the earthworm MT, which did not increase until the 28th day after the Zn exposure. The effects of Cd and Zn combined pollution differed among the various treatments and were closely related to the exposure time. When the soil was treated with $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd, Zn additions decreased the MT content in earthworms. However, the application of $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd in soil caused an increase of MT even in the presence of Zn. No constant effect on MT was observed for the lower Zn treatment ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) during the experimental period. In contrast, the addition of $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Zn counteracted the Cd toxicity by significantly decreasing the MT content at the end of the incubation. In summary, the results of this study suggest that the MT is a useful indicator for Cd pollution in soil, while the Cd toxicity to earthworm may be alleviated by Zn under certain conditions.

Keywords: Cd; Zn; single and combined pollution; earthworm; MT

随着工农业的发展,多种重金属污染物通过各种途径进入土壤,形成复合污染。在众多重金属中,Cd 和 Zn 同属 IIB 族,具有极为相似的化学特性,能在自

然界中共存并发生相互作用,因此 Cd、Zn 复合污染的生态效应已成为重金属污染研究的热点之一。

蚯蚓是土壤中重要的无脊椎动物,具有改善土壤结构、提高土壤肥力等功能,同时也是土壤污染程度的指示生物,其毒性试验已广泛应用于土壤污染的监测和评价^[1]。研究表明,在受到 Cd 胁迫时,蚯蚓体内的金属硫蛋白(MT)含量和基因表达大幅升高^[2-3],因而被公认为土壤 Cd 污染的生物标志物。MT 的分子量较低(6~7 kDa),富含半胱氨酸残基,对金属有高度

收稿日期:2009-01-31

基金项目:南京大学“污染控制与资源化研究”国家重点实验室开放课题基金(PCRRF07015)

作者简介:赵俊杰(1983—),男,山西汾阳人,硕士研究生,研究方向为土壤污染生态。

通讯作者:葛 滢 E-mail: yingge711@njau.edu.cn

的亲合力,具有多种功能,如维持生物体必需元素如 Zn 的生理平衡和解除有害元素如 Cd 的毒性等^[4]。

目前国内外有关重金属污染对蚯蚓 MT 影响的研究大多限于单一 Cd 污染^[2-3,5],而在 Cd、Zn 复合污染对蚯蚓 MT 的效应方面,目前仅有 Demuynck 等(2007)的报道^[6],其结果显示一定浓度以上的 Zn 能减少 Cd 对蚯蚓 MT 的诱导作用,而高浓度的 Cd、Zn 组合则导致 MT 的增加^[6],因此,Cd、Zn 共存的生态效应能通过蚯蚓 MT 的变化得到体现。不过,该试验测定的是胁迫 30 d 后蚯蚓 MT 的表达量,并未涉及 Cd、Zn 处理过程中 MT 的动态变化。为此,本文以赤子爱胜蚓为材料,在土壤染毒试验的不同阶段取样,研究 Cd、Zn 单一及复合污染下 MT 的动态变化规律,从而为土壤重金属污染控制及风险评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试蚯蚓

赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*),由南京某养殖场提供。挑选环带明显、体态相似的健康成蚓进行试验。

1.1.2 供试土壤

供试土壤为黄棕壤,采自南京市江宁区农田表层(0~15 cm)土壤。土壤的主要理化性状如下:pH 6.53(土:水=1:5),有机碳 4.04 g·kg⁻¹,≤0.01 mm 粘粒 19.78%,CEC 8.95 cmol·kg⁻¹。

1.2 试验方法

1.2.1 污染土壤样品制备

在培养盒(15.5 cm×10.3 cm×5.5 cm,含盖)中加 475 g 黄棕壤,25 g 牛粪,充分拌匀。本试验 Cd 浓度设置为 0、100、300 mg·kg⁻¹(分别以 Cd0、Cd100、Cd300 表示),Zn 浓度为 0、100、500 mg·kg⁻¹(分别以 Zn0、Zn100、Zn500 表示)。试验采用完全随机设计,包括 Cd、Zn 单一污染和复合污染共 9 个处理,每个处理设置 3 个平行(CK、Cd100、Cd300、Zn100、Zn500、Cd100+Zn100、Cd100+Zn500、Cd300+Zn100、Cd300+Zn500)。Cd、Zn 溶液分别由 CdCl₂·2.5H₂O 和 ZnSO₄·7H₂O 配置。向供试土壤中加入去离子水(对照)或 Cd/Zn 溶液(处理)175 mL,充分拌匀,然后陈化 28 d,在此期间保持土壤含水量为 35%。

1.2.2 蚯蚓的染毒和取样

蚯蚓用去离子水清洗干净后,放入未添加外源 Cd 的供试土壤(含 5%的牛粪)中驯养 3 d。然后将 15 g 左右的蚯蚓转入培养盒,加盖并在盖上扎孔,以保

证蚯蚓的正常呼吸。将培养盒放入温度为(20±1)℃,湿度为 75%±7%,光照强度为 30 μmol·m⁻²·s⁻¹(间歇光照,即 12 h 光照,12 h 黑暗)的培养箱中,处理 7、14、28 d 后分别取样,然后将蚯蚓清肠 24 h,去离子水冲洗干净,用滤纸吸干蚯蚓体表水分,随即用液氮冷冻,-70℃保存待测。

1.2.3 金属硫蛋白(MT)的提取及测定

取约 1 g 的蚯蚓,准确称量并记录重量,加入适量的 10 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)冰浴研磨,离心(10 000×g,4℃,Beckman Avanti J-25)10 min,取上清液在 80℃水浴加热 2 min,然后迅速冷却,离心(10 000×g,4℃)2 min;取出上清液定容到 10 mL,采用钼血红蛋白饱和法^[7]测定 MT。

1.3 数据分析

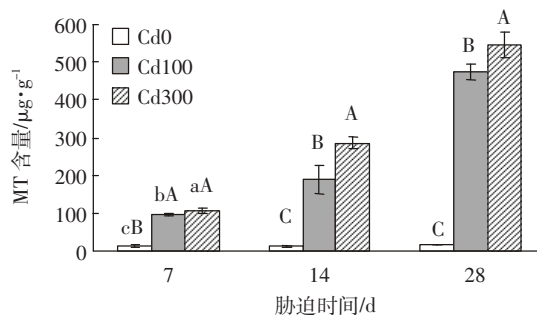
试验数据分析和作图分别采用 SPSS13.0 和 Excel 2003 软件。图中的数据均表示为 3 次平行测定的平均值±标准差。对于单一和复合污染下的 MT 数据,分别采用二因素和三因素完全随机试验的方差分析来判断主效应(Cd 浓度、Zn 浓度、暴露时间)及其交互作用的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 单一污染对蚯蚓 MT 的影响

2.1.1 Cd 单一污染下蚯蚓 MT 的变化

图 1 显示在不同 Cd 处理下 7、14 和 28 d 蚯蚓 MT 浓度的变化。暴露时间和 Cd 浓度对蚯蚓 MT 均有显著的影响(图 1)。当供试土壤加入 100 mg·kg⁻¹ Cd 时,7、14、28 d 的 MT 含量比对照分别增加了 7.2、15.6 和 30.5 倍;当外源 Cd 浓度增加至 300 mg·kg⁻¹ 时,MT 继续上升,增幅分别为 8.0、23.8 和 35.1 倍。由此可见,随着暴露时间的增加,低 Cd 和高 Cd 处理下的



不同大写字母表示同一胁迫时间不同处理下 MT 含量差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母表示 MT 含量差异显著($P < 0.05$),下同。

图 1 单一 Cd 污染下蚯蚓 MT 浓度的变化

Figure 1 Effect of single Cd pollution on the MT content of earthworm

MT 均呈上升趋势,且差异明显。土壤 Cd 单一污染下蚯蚓体内 MT 的响应与许多报道的结果一致^[2-3,8],证实了该蛋白对解除 Cd 毒害具有重要的作用。

2.1.2 Zn 单一污染下蚯蚓 MT 的变化

图 2 显示在不同 Zn 处理下 7、14 和 28 d 蚯蚓 MT 浓度的变化。与 Cd 相比,Zn 产生的毒性弱得多,7 d 和 14 d MT 浓度差别较小,Zn 的效应也不明显。当暴露时间延长到 28 d 时,Zn 处理表现出一定的效应,当土壤加入 100 和 500 mg·kg⁻¹ Zn 后,蚯蚓 MT 浓度分别为 41.1 和 37.9 μg·g⁻¹,极显著高于对照 ($P<0.01$),但两个 Zn 浓度之间的差异不显著 ($P=0.053$)。这些结果与 Demuyneck 等得到的有所不同,他们发现 Zn 要达到 1 500 mg·kg⁻¹ 后 MT 含量才明显高于对照。这可能是由于试验所用土壤和蚯蚓的性状等方面的差异造成的。由于蚯蚓能调控体内的 Zn 含量^[9],试验后期 Zn 处理和对照之间的差异可能是部分 MT 参与了 Zn 排出体外所致^[6]。

单一 Zn 胁迫对蚯蚓 MT 含量的影响远小于 Cd,这与两种金属在蚯蚓体内的代谢途径密切相关。Cd 依靠与 MT 结合累积在肠部,而过量的 Zn 则会向体外排出^[6]。另外,根据宋玉芳等的报道,当土壤锌为 1 500 mg·kg⁻¹ 时才达到蚯蚓的半数致死浓度^[10],因此可以推断,本试验中 Zn 的浓度不足以对蚯蚓产生毒害。

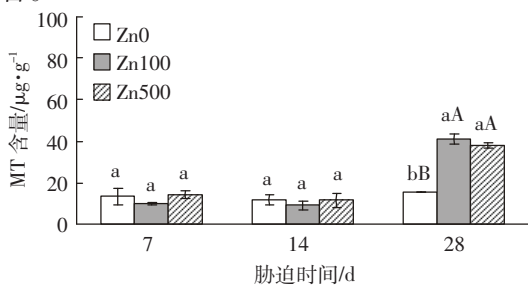


图 2 单一 Zn 污染下蚯蚓 MT 浓度的变化

Figure 2 Effect of single Zn pollution on the MT content of earthworm

2.1.3 方差分析

由表 1 可知,Cd、Zn 浓度、暴露时间和剂量均对蚯蚓 MT 含量的影响差异极显著 ($P<0.01$)。Partial Eta² 表示各因素在总变异中的比例,其值越大说明该因素对变异的贡献越大。在 Cd 单一污染下,各因素对总变异的贡献大小为 Cd 浓度 > 暴露时间 > 暴露剂量,而 Zn 单一污染下各因素对总变异的贡献的顺序为暴露时间 > 暴露剂量 > Zn 浓度。这说明在单一污染条件下,Cd 对蚯蚓 MT 的影响要比 Zn 大得多,而暴露时间也对 MT 的变化有重要的影响。

表 1 Cd、Zn 单一污染对蚯蚓体内 MT 含量影响的显著性分析
Table 1 Significant level analysis on the MT content of earthworm in the effect of Cd and Zn single pollution

因素	Cd 单一污染		Zn 单一污染	
	P	Partial Eta ²	P	Partial Eta ²
浓度	0.000	0.988	0.000	0.737
时间	0.000	0.984	0.000	0.957
暴露剂量	0.000	0.970	0.000	0.895

注:暴露剂量=浓度×时间,下同。

2.2 复合污染对蚯蚓 MT 的影响

2.2.1 蚯蚓 MT 浓度的变化

图 3 显示不同浓度的 Cd、Zn 组合以及不同暴露时间对蚯蚓 MT 浓度的影响。结果表明,不同浓度的 Cd、Zn 组合以及不同的暴露时间对蚯蚓 MT 均表现出不同的效应。随着暴露时间的延长,MT 浓度总体呈上升趋势,在 28 d 达到最大值,但不同 Cd、Zn 复合则对 MT 影响不尽相同。

当土壤外源 Cd 浓度为 100 mg·kg⁻¹ 时,两个 Cd、Zn 复合污染组合 (Cd100+Zn100、Cd100+Zn500) 中的蚯蚓 MT 含量明显低于单一 Cd 污染,且添加低、高浓度 Zn 的复合污染平均下降幅度分别为 32.5% 和 32.4% (图 3)。除 14 d 外,MT 含量均随 Zn 处理浓度的增加而减少,说明 Zn 对较低浓度的 Cd 具有拮抗作用,减轻了 Cd 的毒害。Demuyneck 等 (2007) 也报道了类似的结果^[6]。

与 Cd 单一污染相似的是,在所有的 Cd、Zn 组合中,当土壤 Cd 处理增加至 300 mg·kg⁻¹ 时,蚯蚓 MT 的含量进一步升高 (图 3)。但是,与较低 Cd 浓度 (100 mg·kg⁻¹) 下的复合污染不同的是,Zn 处理没有对 Cd 形成一致的拮抗作用,相反在一些情况下构成了协同作用,MT 含量高于单一 Cd 污染 (图 3)。造成毒性增强的原因主要是蚯蚓对 Cd 具有很强的富集能力^[2-3],在 300 mg·kg⁻¹ 的 Cd 浓度下,蚯蚓体内必须产生更多的 MT 来解毒。从 7 d 到 28 d 蚯蚓 MT 含量的变化趋势 (图 3) 可以看出,即使向土壤添加 500 mg·kg⁻¹ 的 Zn 也不能在短时间内有效地减少 Cd 对蚯蚓的毒害,直到试验结束时 MT 含量才比单一 Cd 污染的低。与其他报道相比较,本试验 Cd300+Zn500 的组合最终降低了蚯蚓 MT 含量,而 Demuyneck 等没有得到类似结果,Cd200+Zn500 的处理 30 d 后蚯蚓 MT 含量与单一 200 mg·kg⁻¹ Cd 处理几乎没有差别^[6]。

2.2.2 方差分析

表 2 总结了 Cd、Zn 复合污染下各主效应 (Cd 浓

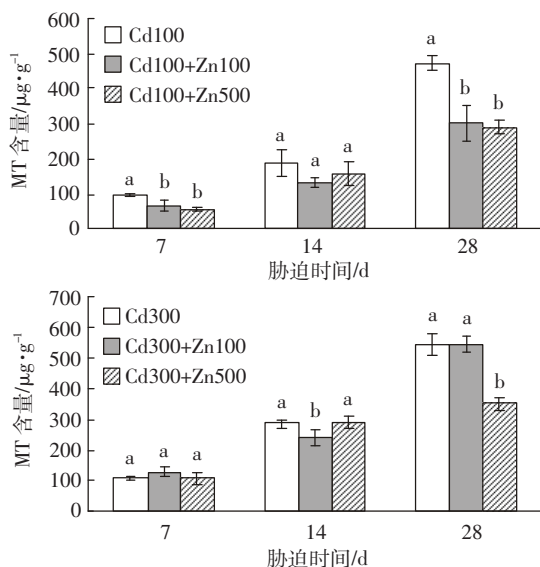


图3 Cd、Zn 复合污染对蚯蚓 MT 含量的影响

Figure 3 Effect of Cd and Zn combined pollution on the MT content of earthworm

表2 Cd、Zn 复合污染对蚯蚓 MT 影响的显著性分析

Table 2 Significant level analysis on the MT content of earthworm in the effect of Cd and Zn combined pollution

因素	P	Partial Eta ²
Cd 浓度	0.000	0.981
Zn 浓度	0.000	0.599
暴露时间	0.000	0.972
Cd 暴露剂量	0.000	0.938
Zn 暴露剂量	0.000	0.670
Cd 浓度 × Zn 浓度	0.000	0.636
Cd 浓度 × Zn 浓度 × 暴露时间	0.000	0.701

度、Zn 浓度、暴露时间)及其交互作用的差异显著性。与单一污染类似,各因素及其交互作用对蚯蚓 MT 含量的影响差异极显著($P<0.01$)。

由各因素及其交互作用的 Partial Eta² 可知,Cd 浓度对 MT 变异的影响最大,其次是暴露时间,然后是 Cd 暴露剂量和 3 个主效应的交互作用,而 Zn 浓度、Zn 暴露剂量和 Cd、Zn 交互作用的 Partial Eta² 均小于 0.7(表 2)。这意味着在本试验条件下,Cd 浓度、暴露时间是影响 MT 的主导因素,同时也说明,相比 Cd 而言,Zn 对 MT 的影响不大。

3 结论

(1) 土壤在 Cd 或 Zn 单一污染下,蚯蚓 MT 的变化存在很大差异,Cd 的毒害效应明显远强于 Zn。随着 Cd 浓度和处理时间的增加,蚯蚓体内的 MT 含量显著增加,剂量-效应关系十分明显;相比之下,土壤

Zn 处理对 MT 的影响很小。

(2) 当土壤以不同浓度 Cd 为背景与 Zn 构成复合污染时,蚯蚓 MT 的变化与浓度的组合和暴露时间密切相关。在土壤 Cd 浓度较低($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)时 Zn 对 Cd 存在拮抗作用;Cd 浓度较高($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)时,与 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 Zn 的复合污染对 MT 的效应表现为协同-拮抗-无影响,而与 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 Zn 的组合对 Cd 毒性存在缓解效应,但这种效应只有在试验后期才有所体现。方差分析表明,Cd 浓度、暴露时间和剂量是制约蚯蚓 MT 的主要因素。

参考文献:

- [1] 颜增光,何巧力,李发生. 蚯蚓生态毒理试验在土壤污染风险评估中的应用[J]. 环境科学研究, 2007,20(1): 134-142.
YAN Zeng-guang, HE Qiao-li, LI Fa-sheng. The use of earthworm ecotoxicological test in risk assessment of soil contamination[J]. *Research of Environment Sciences*, 2007,20(1): 134-142.
- [2] Demuyne S, Grumiaux F, Mottier V, et al. Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida*[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2006,144: 34-46.
- [3] Sturzenbaum S R, Geogiev O, Morgan A J, et al. Cadmium detoxification in earthworms: From genes to cells[J]. *Environ Sci Tech*, 2004, 38: 6283-6289.
- [4] 李培军,熊先哲,杨桂芬,等. 动物生物标志物在土壤污染生态学中的应用[J]. 应用生态学报, 2003,14(12): 2347-2350.
LI Pei-jun, XIONG Xian-zhe, YANG Gui-fen, et al. Application of terrestrial invertebrates biomarkers in soil pollution ecology study[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003,14(12):2347-2350.
- [5] 马宏宝,佟向军,李令媛,等. 镉诱导蚯蚓金属硫蛋白的分离纯化及其溶液构象的研究[J]. 生物物理学报, 1994,10(4): 529-536.
MA Hong-bao, TONG Xiang-jun, LI Ling-yuan et al. The isolation and purification, ultraviolet absorption, fluorescence emission, circular dichroism and scanning tunneling microscopy of metallothioneins from earthworm induced by cadmium[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1994,10(4): 529-536.
- [6] Demuyne S, Grumiaux F, Mottier V, et al. Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta) [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2007, 145: 658-668.
- [7] Eaton D, Cherian G. Determination of metallothionein in tissues by cadmium-hemoglobin affinity assay[J]. *Methods Enzymol*, 1991, 205: 83-88.
- [8] Ndayibagira A, Sunahara G I, Robidoux P Y. Rapid isocratic HPLC quantification of metallothionein-like proteins as biomarkers for cadmium exposure in the earthworm *Eisenia andrei*[J]. *Soil Biol Biochem*, 2007, 39: 194-201.
- [9] Spurgeon D J, Hopkin S P. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils[J]. *Appl Soil Ecol*, 1999, 11: 227-243.
- [10] 宋玉芳,周启星,许华夏,等. 土壤重金属污染对蚯蚓的急性毒性效应研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(2): 187-190.
SONG Yu-fang, ZHOU Qi-xing, XU Hua-xia, et al. Acute toxicological effects of heavy metal pollution in soils on earthworms[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(2): 187-190.