ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第7期

Vol.35 No.7

2014

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第35卷 第7期
2014年7月15日

目　次

Cd、Cu 和 Pb 复合污染对蚯蚓抗氧化酶活性的影响

王辉[1,2], 谢鑫源[2*]
(1. 浙江工商大学环保设计研究院, 杭州 310005; 2. 浙江省工业环保设计研究院有限公司, 杭州 310005)

摘要: 采用蚯蚓毒性试验和均匀组合设计(Cd: 0 ~ 15 $mg·kg^{-1}$, Cu: 0 ~ 175 $mg·kg^{-1}$, Pb: 0 ~ 600 $mg·kg^{-1}$)方法, 以赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)为试验蚓种, 研究了土壤中重金属 Cd、Cu、Pb 复合污染对蚯蚓体内超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)和酸性磷酸酶(AP)活性的影响, 为重金属污染土壤的生物学诊断和风险评价提供科学依据. 结果表明, Cd、Cu、Pb 复合胁迫对蚯蚓 SOD、GST 和 AP 活性产生显著的诱导效应, 酶活性与重金属含量及其持续时间密切相关: 蚯蚓 SOD 活性在暴露前 8 d 因受重金属胁迫比第 0 d 增加了 7.4% ~ 240.5%, 之后因胁迫过强被抑制, 比第 8 d 下降了 19.4% ~ 69.7%. GST 活性则在暴露前 16 d 持续增加了 104.3% ~ 217.3%, 之后受抑制比第 16 d 下降了 1.2% ~ 40.3%. AP 活性随时间呈“促进-抑制-促进-抑制”变化, 在第 8 d 受胁迫比第 0 d 下降了 9.2% ~ 37.8%, 至第 16 d 产生适应比第 8 d 增加了 37.2% ~ 117.2%, 但最终因胁迫过强比第 16 d 下降了 24.3% ~ 34.0%. 回归分析表明, Pb 和 Cd-Cu-Pb 对 SOD 活性的产生影响最为显著, Cd 和 Cu 则显著影响了 GST 和 AP 活性.

关键词: 蚯蚓; 重金属; 复合污染; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽硫转移酶; 酸性磷酸酶
中图分类号: X503.22 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2014)07-2748-07 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.2014.07.044

Effects of Combined Pollution of Cd, Cu and Pb on Antioxidant Enzyme Activities of Earthworm in Soils

WANG Hui[1,2], XIE Xin-yuan[2]
(1. Institute of Environmental Protection Design & Research, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310005, China; 2. Institute of Zhejiang Environmental Protection Design & Research Co., Ltd., Hangzhou 310005, China)

Abstract: Recently, soil heavy metal contamination becomes more and more serious in certain areas in China. Adverse effect caused by heavy metals in contaminated soils has been a wide concern for many years. In this study, a bioassay experiment with the earthworm (*Eisenia foetida*) was conducted to investigate the effects of compound application of Cd, Cu and Pb in soil on surperoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) and acid phosphatase (AP) activity in earthworms. Through a method of greenhouse soil experiment, this study utilized a uniform design method of three factors and six levels (Cd: 0-15 $mg·kg^{-1}$, Cu: 0-175 $mg·kg^{-1}$, Pb: 0-600 $mg·kg^{-1}$) to research the physiological property and enrichment characteristics of earthworm in soils with Cd, Cu and Pb compound pollution. The activity of SOD, GST and AP were inhibited significantly under Cd, Cu and Pb compound pollution. And they were impacted by both time and heavy metal contents in the soil. Compared with the control sample, the activity of SOD increased by 7.4%-240.5% in the first eight days under the stress of heavy metals. But owing to the extremely severe stress, it was suppressed and descended by 19.4%-69.7%. Compared with the control sample, the activity of GST increased by 104.3%-217.3% in the first sixteen days under the stress of heavy metals. But owing to the extremely severe stress, it was suppressed and descended by 1.2%-40.3%. The activity of AP changed over time in a trend of “increase, decrease, increase, decrease”. Compared with the control sample, the activity of AP decreased by 9.2%-37.8% in the first eight days, then increased by 37.2%-117.2% in sixteenth days and decreased by 24.3%-34.0% to the last day. The analysis demonstrates that Pb and Cd-Cu-Pb is the dominant factor to the activity of SOD, while Cd and Cu were the dominant factors to the activity of GST and AP.

Key words: earthworm; heavy metal; combined pollution; superoxide dismutase; glutathione S-transferase; acid phosphatase

长久以来, 土壤一直是人类赖以生存的资本. 然而, 随着现代工业的蓬勃发展, 各类污染物肆意排放, 随即而来的是日趋严重的土壤污染问题. 其中土壤的重金属污染显得尤为严重, 已成为全球共同关注的问题之一[1].

目前, 土壤重金属污染往往是由多种元素构成的复合污染. 为有效地控制环境污染, 并对环境质量作出准确的评判, 国内外专家学者相继开展了对重金属复合效应的研究[2]. 土壤中多种金属元素的存在, 使得各元素本身及其特异性, 在元素与土壤界面之间产生交互作用, 从而使得重金属污染土壤的修复更加具有挑战性.

根据国内外现有的报道和研究发现[3], 有些品种的蚯蚓对重金属 Cd、Cu、Pb、Hg[4~6]等具有一定

收稿日期: 2013-11-11; **修订日期**: 2014-01-09
作者简介: 王辉(1980 ~), 男, 工程师, 主要研究方向为工业水处理及环境评价, E-mail: hp301@163.com
* 通讯联系人, E-mail: xxyuan1010@126.com

的富集能力和耐性,可以通过自身解毒和富集机制存活在污染土壤中,在一定程度上富集重金属,在数量上也有一定的优势. 如 Kennette 等[5]用蚯蚓(*Lumbricus terrestres* L.)在 Pb 含量为 100.00 $mg\cdot kg^{-1}$和 Zn 含量为14 600.00 $mg\cdot kg^{-1}$的复合污染土壤中进行培养实验,蚯蚓未表现出明显的死亡现象. 伏小勇等[6]通过模拟 Cu、Zn、Pb 和 Hg 复合污染土壤,研究微小双胸蚓(*Bimastus parvus*)对重金属的富集量,结果表明,蚯蚓对重金属的吸收顺序为:Zn > Cu > Pb > Hg,在其耐受范围内,表现出一定的耐性和富集能力.

为使蚯蚓能在可以接受的重金属含量范围内有效地富集重金属,需要对蚯蚓的身体机能作有效地了解. SOD、GST 和 AP 活性的诱导作用常常用来作为指示重金属的分子标记物.

因此,本研究采用土壤接触法,将蚯蚓暴露于含有 Cd、Cu、Pb 这 3 种重金属的土壤中 32 d,监测其体内 SOD、GST 和 AP 酶活性的变化, 旨在探讨土壤中 Cd、Cu、Pb 复合污染对蚯蚓体内上述酶含量或活性的剂量及时间效应,寻找适合的生物标记物,为 Cd、Cu、Pb 复合污染环境的长期诊断,以及环境监测标准的制定提供更为现实的科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试蚯蚓:所用蚯蚓为赤子爱胜蚓,购买自江苏某养殖场. 先预养 2 ~3 周,选择体重 200 mg 左右、具有环带的健康成蚓进行实验.

供试土壤:取自浙江省某重金属污染农田,采集深度为 0 ~20 cm,土样自然风干后,剔除植物残体和石块,研磨,过 2 mm 筛备用. 土壤的基本理化性质见表 1.

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of tested soils

项目	含量/$mg\cdot kg^{-1}$							pH 值
	总镉	总铜	总铅	有机质	碱解 N	速效 P	速效 K	
土壤	0.46	164.30	190.00	4 500.0	52.6	40.69	106.9	5.24

药品:$Cd(NO_3)_2\cdot 4H_2O$、$Cu(NO_3)_2\cdot 2H_2O$ 和 $Pb(NO_3)_2\cdot 3H_2O$,均为分析纯,购买自杭州华东医药.

1.2 方法设计

实验采用3 因素 6 水平均匀组合设计方案(见表 2),共 6 个处理,各处理浓度设计参照蚯蚓在单种重金属的生存极限浓度及《土壤环境质量标准》(GB 15618-1995). 实验采用高(17 cm) × 直径(20 cm) PVC 盆,每盆装土 2 kg,各处理重复 3 次. 实验采用 $Cd(NO_3)_2\cdot 4H_2O$、$Cu(NO_3)_2\cdot 2H_2O$ 和 $Pb(NO_3)_2\cdot 3H_2O$ 配成相应浓度的重金属溶液均匀混合到土壤中,同时设无重金属添加为空白对照处理(CK).

表 2 实验设计

Table 2 Design of experiment

处理设置	$\omega/mg\cdot kg^{-1}$		
	Cd	Cu	Pb
CK	0	0	0
1	0	35.00	240.00
2	1.50	105.00	600.00
3	3.00	175.00	120.00
4	6.00	0	480.00
5	9.00	70.00	0
6	12.00	140.00	360.00

1.3 蚯蚓处理

将蚯蚓放在空盆中吐土 24 h,保持一定湿度. 将清肠后的蚯蚓表面冲洗干净,用滤纸吸干表面水分,每个方盒中放入 200 条蚯蚓,补充蒸发掉的水分使土壤湿度保持 70% ~80%,在盆上盖上一层纱布以保证蚯蚓生活在湿度相对稳定的环境中,防止蚯蚓逃逸. 将处理盆放在 25℃ ±2℃,湿度为 80% 的温室中养 32 d. 每 2 d 随机交换方盒在温室中的位置. 在实验的第 2 d、第 4 d、第 8 d、第 16 d、第 32 d 分别取出体型差不多的蚯蚓 3 条做毒理实验,同时取土壤表面蚓粪和少量土壤保存. 观察并记录蚯蚓的存活情况、中毒症状及行为.

1.4 分析方法

(1)SOD 酶活力的测定 采集存活蚯蚓样品,称重,按质量体积比 1∶3加生理盐水制备成 10% 的组织匀浆,在控温低速离心机3 000 $r\cdot min^{-1}$,4℃时离心 10 min,然后取组织匀浆上清液,待测.

(2)GST 活性检测 参照高玉红等[7]方法,1 g 组织加 4 倍体积的 pH =7.40 缓冲液(0.25 $mol\cdot L^{-1}$ 蔗糖、10.00 $mmol\cdot L^{-1}$ Tris-HCl 及 1.00 $mol\cdot L^{-1}$ EDTA)用匀浆器制成匀浆,4 000 $r\cdot min^{-1}$离心 15 min,取上清液分别进行 AP 和 GST 活性测定. GST 活性检测采用1-氯 2,4-二硝基苯(CDNA)法. 还原型谷胱甘肽(GSH)与 1-氯 2,4-二硝基苯反应生成 2,4-二硝基-谷胱甘肽复合物(GS-DNB). 通过检测

该复合物生成量的高低反映 GST 活性的大小,以每分钟催化生成 1 nmol 产物为 1 个酶活性单位.

(3) AP 活性测定　样品与醋酸钠缓冲液混合(体积比 3∶7),37℃孵育 10 min,加入 1/2 混液(样品与醋酸钠缓冲液)体积的反应液Ⅰ(0.20 $mol \cdot L^{-1}$ 醋酸钠,12.00 $mmol \cdot L^{-1}$ 对-硝基苯酚钠,0.60 $mg \cdot mL^{-1}$ 牛血清白蛋白),37℃孵育 25 min 后,加入 4 倍反应液体积的终止液(1.00 $mol \cdot L^{-1}$ Tris,0.30 $mol \cdot L^{-1}$ 磷酸钾,pH 8.50),检测在 405 nm 的光密度值. 根据释放的对-硝基苯酚量计算 AP 活性.

(4) 蛋白质的检测　采用考马斯亮蓝 G250 蛋白定量法.

1.5 数据分析

用 SPSS(Standard Version 17.0, SPSSInc.)统计软件进行方差和相关分析.

2 结果与分析

2.1 Cd、Cu、Pb 复合胁迫对蚯蚓 SOD 活性的影响

由图 1 可见,蚯蚓暴露在 Cd、Cu、Pb 复合污染土壤中,各处理 SOD 活性随时间的变化呈现先上升后下降的趋势. SOD 活性在第 8 d 达到最高,与第 0 d 对照相比,各处理 SOD 活性分别增加了 196.1%、162.6%、201.2%、241.5%、232.9%、202.1% 和 150.8%; 第 8 d 之后,各处理 SOD 活性下降趋势明显. 第 32 d 的数据显示,各处理 SOD 活性均大于第 0 d 对照,分别为其 1.19、1.09、1.03、1.21、1.10 和 1.54 倍. 上述结果表明,复合污染能够显著增加蚯蚓体内 SOD 活性,当暴露时间 ≥8 d 后,蚓体内 SOD 活性大幅度下降. 这与众多研究结果相类似[8,9],如吴尔苗等[10]研究菲和芘复合污染对蚯蚓抗氧化酶活性的影响. 蚯蚓在遭受重金属复合污染的胁迫时,产生的氧自由基数量增加,为了消除氧自由基对蚯蚓造成的伤害,SOD 活性增加. 但随着暴露时间的延长,重金属抑制了 SOD 的活性,从而使得 SOD 活性下降.

各处理与对照(CK)相比,SOD 活性在各时间段的变化没有明显的规律,个别处理与空白对照形成显著差异($P < 0.05$),如暴露 2 d 的处理 2 ~4 号和 6 号,暴露 4 d 的处理 1 ~6 号,暴露 8 d 的处理 3 ~5 号,以及暴露 32 d 的处理 1 ~6 号,其活性均显著高于对照组; 而暴露 8 d 的处理 1 号和暴露 16 d 的处理 1 ~4 号,其活性均显著低于对照组,说明蚯蚓体内 SOD 活性的变化与暴露时间和土壤中重金属之间相互作用密切相关.

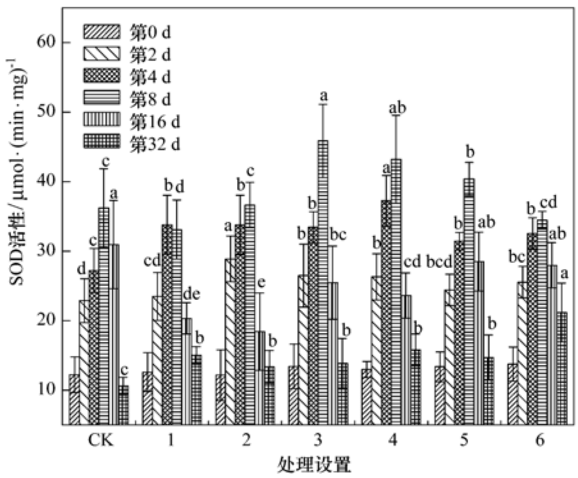

图 1 Cd、Cu、Pb 复合污染下蚯蚓体内 SOD 活性的变化

Fig. 1 Effects of the combination of Cd, Cu and Pb on SOD activity of earthworm

为更好地说明蚯蚓在不同培养时间段,3 种重金属及其交互作用对 SOD 活性的影响,设土壤中 Cd、Cu、Pb 含量为自变量 X_1、X_2、X_3,各元素交互项 Cd-Cu、Cd-Pb、Pb-Cu、Cd-Cu-Pb 设为 X_1X_2、X_1X_3、X_2X_3 和 $X_1X_2X_3$; 各时间段 SOD 活性为因变量 Y_1、$Y_2 \cdots Y_5$,基于 Cd、Cu、Pb 复合污染实验样品处理的数据为基础,建立多元回归方程. 回归分析表明(表 3),暴露第 2 d,在 Cd、Cu、Pb 及其相互作用(Cd-Cu、Cu-Pb、Cd-Pb、Cd-Cu-Pb)的影响下,Pb 对 SOD 活性的诱导表现为明显的抑制作用($P < 0.05$),Cu-Pb 对 SOD 活性产生明显的诱导作用,且对 SOD 活性影响占主导,说明 Cu-Pb 对 SOD 活性的诱导表现为协同作用,这与郃托娅等[8]、贾秀英等[11]研究的结果一致. 暴露第 4 d,Pb 对 SOD 活性产生明显的诱导作用,而 Cu-Pb 则表现为相反的抑制效应,说明随着 Pb 中毒时间的延长,蚯蚓对有毒物质进入体内产生代偿作用,此时,Cu-Pb 对 SOD 活性的诱导表现为拮抗作用. 由此可知,不同暴露时间,蚯蚓体内各重金属含量的不同导致重金属相互作用对 SOD 活性产生出不同的诱导效应,这与胡蓉等[12]的研究结果相类似.

在暴露第 8 d,Cu 和 Pb 对 SOD 活性的诱导均表现为抑制作用; 暴露第 32 d,Cd 对 SOD 活性产生诱导作用,Cd-Cu 对 SOD 活性的诱导表现为抑制作用. 总体上,Pb 和 Cd-Cu-Pb 为影响 SOD 活性的主要因数. 另一方面,在各暴露时间段,Cd-Cu-Pb 联合作用均显著增加了蚯蚓 SOD 的活性,由此表明多种重金属复合胁迫表现出的协同作用促使蚯蚓加大了对自身不良情况的解毒能力.

表 3　各时间段蚯蚓体内 SOD 活性与土壤中相应重金属元素之间的多元回归分析

Table 3　Multiple linear regression analysis between contents of heavy metals in the soil and SOD activities of earthworm in each time period

取样时间/d	多元回归方程	决定系数(R^2)
2	$Y_1 = 1.568 - 2.427X_3 + 5.776X_2X_3 + 0.151X_1X_2X_3$	0.710
4	$Y_2 = 21.933 + 7.856X_3 - 4.289X_2X_3 + 1.947X_1X_2X_3$	0.815
8	$Y_3 = 37.830 - 2.657X_2 - 6.395X_3 + 4.286X_1X_2X_3$	0.857
16	$Y_4 = 61.213 - 2.668X_3 - 11.726X_2X_3 + 5.459X_1X_2X_3$	0.714
32	$Y_5 = -1.270 + 2.422X_1 - 0.134X_1X_2 + 2.621X_1X_2X_3$	0.928

2.2　Cd、Cu、Pb 复合胁迫对蚯蚓 GST 活性的影响

谷胱甘肽硫-转移酶(GST)是广泛分布于各种生物体内的一组多功能同工酶，主要存在细胞液中，主要催化还原性谷胱甘肽(GSH)与内源性或外来有害物质的亲电子基团，增加其疏水性使其易于穿越细胞膜，并在被分解后排出体外，从而达到解毒的目的. 由图 2 可见，在复合污染条件下，蚯蚓体内 GST 活性随时间变化呈现先升后降的趋势，在第 16 d 达到最高，与第 0 d 对照相比，各处理 GST 活性分别增加了 104.3%、217.3%、69.8%、122.9%、213.5%、119.0%和128.0%；第 16 d 之后，各处理 GST 活性呈下降趋势. 第 32 d 的数据显示，各处理 GST 活性均大于第 0 d 对照，分别为其 1.74、1.89、2.07、2.20、1.82、1.50 和 1.85 倍. 上述结果表明，复合污染能够显著增加蚯蚓体内 GST 活性，当暴露时间 $t \geqslant 16$ d 后，蚓体内 GST 活性大幅度下降. 这可能由于蚯蚓自身的适应机制[13]，在复合胁迫初期，蚓体内 GST 活性升高以清除体内的类过氧化物和自由基，保护机体免受氧化损伤. 许多研究表明[14~16]，GST 对重金属比较敏感，容易被诱导，特别是对较低浓度的复合污染[7]. 在暴露 16 d 后，GST 活性显著受到抑制，这可能是重金属在体内长期积累，已经危害到蚯蚓的正常代谢，张薇等[17]将蚯蚓置于低剂量芘污染土壤 14 d 后，GST 活性在前期表现为诱导效应而后期表现为抑制效应.

各处理与对照(CK)相比，GST 活性出现明显的波动，部分达到显著差异($P < 0.05$)，如暴露2 d的处理1 ~2 号和4 号，暴露4 d的处理1 ~2 号和5号，暴露 8 d 的处理 1 号、3 ~6 号，暴露 16 d 的处理 1 ~2 号和 6 号以及暴露 32 d 的处理 1 ~4 号、6 号，其活性均显著高于对照组；而暴露 2 d 和 4 d 的处理6 号，暴露 8 d 的处理 3 ~4 号，暴露 16 d 的处理 2 号及暴露 32 d 的处理 5 号其活性均显著低于对照组，说明蚯蚓体内 GST 活性的变化与暴露时间和土壤中重金属及其交互作用密切相关.

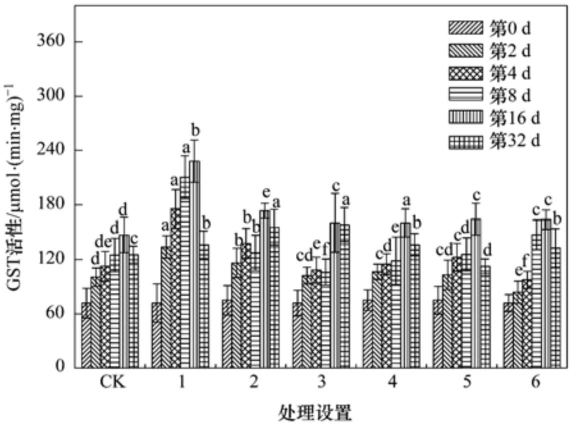

图 2　Cd、Cu、Pb 复合污染下蚯蚓体内 GST 活性的变化

Fig. 2　Effects of a combination of Cd, Cu and Pb on GST activity of earthworm

为更好地说明各培养时间重金属及其交互作用对 GST 活性的影响，设土壤中 Cd、Cu、Pb 重金属含量为自变量 X_1、X_2、X_3，各时间段 GST 活性为因变量 Y_6、$Y_7 \cdots Y_{10}$，建立多元回归方程. 表 4 为各时间段蚯蚓体内 GST 活性与土壤中相应重金属元素之间的多元回归分析.

回归分析表明(表 4)，各暴露时间，各因素作用大小排序分别为：Cd > Cu > Pb > Cd-Pb > Cd-Cu-Pb，

表 4　各时间段蚯蚓体内 GST 活性与土壤中相应重金属元素之间的多元回归分析

Table 4　Multiple linear regression analysis between contents of heavy metals in the soil and GST activities of earthworm in each time period

取样时间/d	多元回归方程	决定系数(R^2)
2	$Y_6 = 116.392 - 0.206X_1 - 0.036X_2 + 0.016X_3 - 0.002X_1X_3 - (1.596\text{E-}6)X_1X_2X_3$	0.659
4	$Y_7 = 155.440 + 0.790X_1 - 0.146X_2 + 0.031X_3 - 0.009X_1X_3 - (1.393\text{E-}5)X_1X_2X_3$	0.716
8	$Y_8 = 229.304 - 13.856X_1 - 0.361X_2 - 0.019X_3 + 0.043X_1X_2$	0.799
16	$Y_9 = 174.399 + 0.101X_2 - 0.017X_1X_2 + 0.015X_1X_3 - (2.488\text{E-}5)X_1X_2X_3$	0.875
32	$Y_{10} = 86.259 - 5.672X_1 + 0.219X_2 + 0.059X_3 - 0.012X_1X_2$	0.986

Cd > Cu > Pb > Cd-Pb > Cd-Cu-Pb, Cd > Cu > Pb > Cd-Cu, Cu > Cd-Cu > Cd-Pb > Cd-Cu-Pb, Cd > Cu > Pb > Cd-Cu,因此,在不同时间段,不同重金属及其交互作用对 GST 活性产生不同的影响. 在暴露第 2 d、第 8 d 和第 32 d,Cd 对 GST 活性的诱导表现为明显的抑制作用($P < 0.05$),第 4 d 则产生诱导作用; 在暴露前 8 d,Cu 均对 GST 活性的诱导表现为明显的抑制作用,第 16 d 则产生诱导作用,之后又产生抑制作用; 在暴露前 4 d,Cd-Pb 对 GST 活性的诱导表现为拮抗作用,之后则产生协同作用诱导产生 GST 活性. 同样的,Pb、Cd-Cu、Cd-Cu-Pb 对 GST 活性在不同暴露阶段表现出不同的诱导效应,其中 Cd 和 Cu 对 GST 活性的影响最为显著.

从以上分析可以看出,重金属及其交互作用对蚯蚓 GST 活性的影响变化波动较大,没有明显的规律可循. 这也跟 GST 作为生物体内代谢的第二阶段酶有关,它是间接通过 GSH 与亲电子的疏水化合物结合来清除自由基,GST 的活性与 GSH 的含量密切相关,而不同重金属对此的诱导能力不尽相同. 有研究表明,在 BaP 不同暴露时间和浓度处理下,*Eisenia fetida* GST 活性保持不变; Cd、Zn 复合胁迫则使其出现了抑制和诱导两种效应[18],因此重金属对蚯蚓 GST 活性的诱导机制复杂,还有待更深入地研究.

2.3 Cd、Cu、Pb 复合胁迫对蚯蚓 AP 酶活性的影响

酸性磷酸酶(AP)普遍存在于溶酶体中,被认为是溶酶体稳定性的标志酶,是检测重金属污染的可靠标志物[19]. 蚯蚓暴露在 Cd、Cu、Pb 复合污染土壤中,其体内 AP 活性随时间变化呈现先降后升再降的趋势. 在暴露 2 d 时,AP 酶活性增加(图 3),这可能是细胞防疫体系对异源物质的早期适应性反应,以减少异源物质对机体的损伤,这与 Rajalakshmi 等[20]报道的被重金属铜诱导的蚌类的反应基本一致. 随着暴露时间的增加,AP 活性下降,在第 8 d 达到最低,与第 0 d 对照相比,分别降低了 9.1%、16.6%、32.0%、35.8%、37.8%、16.8% 和 15.3%;第 16 d 又达到最高,分别为第 0 d 对照的 1.30、1.14、1.15、1.19、1.35、1.15 和 1.24 倍,这说明重金属对 AP 活性造成短期的抑制之后,蚯蚓适应了污染环境,增强了 AP 活性以抵抗不良环境. 但在之后 16 d 内,AP 活性又显著下降,这是因为重金属对蚯蚓产生的毒性反应超过了自身的防御系统所能适应的范围,导致酶结构遭到破坏. 该结果与高玉红等[7]研究阿苯哒唑对蚯蚓酸性磷酸酶、谷胱甘肽硫转移酶及腺三磷酶活性的影响结果相类似.

各处理与对照(CK)相比,AP 活性出现明显的波动,且部分与对照形成显著差异($P < 0.05$),如暴露 2 d 的处理 1 ~ 3 号、5 号,暴露 4 d 的处理 1 ~ 2 号,其活性均显著高于对照组; 而暴露 8 d 的处理 1 ~ 6 号,暴露 16 d 的处理 1 ~ 2 号和 5 号及暴露 32 d 的处理 1 号,其活性均显著低于对照组,说明蚯蚓体内 AP 活性的变化与暴露时间和土壤中重金属及其交互作用密切相关.

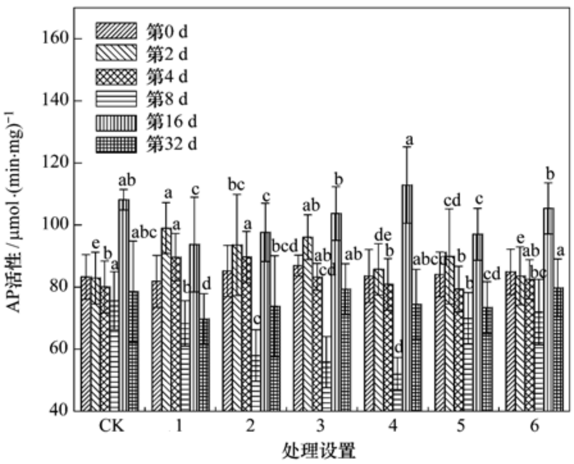

图 3 Cd、Cu、Pb 复合污染下蚯蚓体内 AP 活性的变化

Fig. 3 Effects of a combination of Cd, Cu and Pb on AP activity of earthworm

为更好说明各培养时间重金属及其交互作用对 AP 活性的影响,设土壤中 Cd、Cu、Pb 重金属含量为自变量 X_1、X_2、X_3,各时间段 GST 活性为因变量 Y_{11}、$Y_{12} \cdots Y_{15}$,建立多元回归方程. 表 5 为各时间段蚯蚓体内 AP 活性与土壤中相应重金属元素之间的多元回归分析.

表 5 各时间段蚯蚓体内 AP 活性与土壤中相应重金属元素之间的多元回归分析

Table 5 Multiple linear regression analysis between contents of heavy metals in the soil and AP activities of earthworm in each time period

取样时间/d	多元回归方程	决定系数(R^2)
2	$Y_{11} = 80.265 - 0.180X_1 + 0.050X_2 + (1.093E\text{-}5)X_2X_3 - (4.572E\text{-}6)X_1X_2X_3$	0.898
4	$Y_{12} = 83.525 - 1.315X_1 + 0.002X_2 + 0.002X_3 + 0.003X_1X_2 + (5.625E\text{-}6)X_2X_3$	0.670
8	$Y_{13} = 108.046 - 0.159X_2 - 0.056X_3 + 0.001X_1X_2 + 0.001X_1X_3$	0.969
16	$Y_{14} = 102.976 - 1.378X_1 + 0.021X_2 - 0.012X_3 + 0.004X_1X_3 - (7.754E\text{-}6)X_1X_2X_3$	0.714
32	$Y_{15} = 72.690 - 0.660X_1 + 0.027X_2 - 0.006X_3 + 0.001X_1X_3 - (1.261E\text{-}7)X_1X_2X_3$	0.888

回归分析表明(表 5),各暴露时间,各因素作用大小排序分别为:Cd > Cu > Cu-Pb > Cd-Cu-Pb,Cd > Cu > Pb > Cd-Cu > Cu-Pb,Cu > Pb > Cd-Cu > Cd-Pb,Cd > Cu > Pb > Cd-Pb > Cd-Cu-Pb, Cd > Cu > Pb > Cd-Pb > Cd-Cu-Pb,因此,在不同时间段,不同重金属及其交互作用对 AP 活性产生不同的影响. Cd 在各个时间段对 AP 活性表现为抑制作用,且影响最为显著; Cu 则对 AP 活性产生诱导作用. 这与 Saint-Denis 等[21]研究结果类似,Pb 对蚯蚓 AP 酶活力有抑制作用,可能由于 Pb 是生命非必需元素,而 Cu 则是生命必需微量元素,因此两者蚯蚓 AP 酶的活力影响不同.

蚯蚓暴露于土壤孔隙水的皮肤吸收被认为是主要的吸收途径[22]. 重金属在生物机体内的转运方式具有相似之处[23],Cd、Cu、Pb 在蚯蚓的生物配体结合点位上发生竞争作用. 类似地从本研究结果分析,在整个暴露过程中,Cd-Pb、Cu-Pb 及 Cd-Cu 对 AP 活性表现出显著的协同作用,Cd-Cu-Pb 对 AP 活性则产生拮抗作用.

3　结论

(1)Cd、Cu、Pb 复合胁迫对蚯蚓 SOD、GST 和 AP 活性产生了显著的影响,酶活性与重金属含量及其持续时间密切相关:蚯蚓 SOD 活性在暴露前 8 d 因受重金属胁迫比第 0 d 增加了 7.4% ~240.5%,之后因胁迫过强被抑制直至实验结束,比第 8 d 下降了 19.4% ~69.7%. GST 活性则在暴露前 16 d 持续增加了 104.3% ~217.3%,之后受抑制比第 16 d 下降了 1.2% ~40.3%. AP 活性在第 8 d 受胁迫产生早期适应性反应,比第 0 d 下降了 9.2% ~37.8%,第 16 d 则产生了短暂的适应,比第 8 d 显著增加了 37.2% ~117.2%,但最终因胁迫过强被抑制直至实验结束,比第 16 d 下降了 24.3% ~34.0%.

(2)回归分析表明,不同重金属及其交互作用在各时间段对蚯蚓酶活性产生了复杂影响:Pb 和 Cd-Cu-Pb 对蚯蚓 SOD 活性产生的诱导效应最为显著; Cd 和 Cu 则显著影响了 GST 和 AP 活性.

(3)不同暴露时间段,不同组合,蚯蚓体内各重金属含量不同,使得重金属交互作用对 SOD、GST 和 AP 活性产生的诱导效应不同,最终导致酶活性的变化复杂.

参考文献:

[1] Clemens S, Palmgren M G, Krämer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation [J]. Trends in Plant Science, 2002, **7**(7): 309-315.

[2] Zhao Q X, Gao Z M. Compound contamination and secondary ecological effects of Cd and As in soil-alfalfa ecosystems [J]. Journal of Environmental Sciences, 1994, **6**(3): 330-336.

[3] 宋玉芳, 周启星, 宋雪英, 等. 土壤整体质量的生态毒性评价[J]. 环境科学, 2005, **26**(1): 130-134.

[4] 张仲胜, 王起超, 吕宪国, 等. 锌冶炼-氯碱复合污染区昆虫中的重金属[J]. 环境科学, 2009, **30**(7): 2077-2081.

[5] Kennette D, Hendershot W, Tomlin A, *et al*. Uptake of trace metals by the earthworm *Lumbricus terrestris* L. in urban contaminated soils [J]. Applied Soil Ecology, 2002, **19**(2): 191-198.

[6] 伏小勇, 秦赏, 杨柳, 等. 蚯蚓对土壤中重金属的富集作用研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, **28**(1): 78-83.

[7] 高玉红, 孙振钧, 孙新胜, 等. 阿苯哒唑对蚯蚓(*Eisenia fetida*)酸性磷酸酶、谷胱甘肽硫转移酶及腺三磷酶活性的影响[J]. 生态学报, 2007, **27**(9): 3916-3921.

[8] 郇托娅, 林玉锁, 贺静. 土壤中 Cu 和 Pb 单一及复合污染对蚯蚓体内蛋白含量和 SOD 活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, **27**(5): 1985-1990.

[9] 杨晓霞, 张薇, 曹秀凤, 等. 亚致死剂量铜对蚯蚓 P450 酶和抗氧化酶活性的长期影响[J]. 环境科学学报, 2012, **32**(3): 745-750.

[10] 吴尔苗, 王军良, 赵士良, 等. 菲和芘单一及复合污染对蚯蚓抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响[J]. 环境科学学报, 2011, **31**(5): 1077-1085.

[11] 贾秀英, 董爱华. Cd 和 Cr(Ⅵ)单一及复合污染对鲫鱼组织过氧化物酶同工酶的影响[J]. 安全与环境学报, 2004, **4**(2): 19-21.

[12] 胡蓉, 唐正义. 镉和汞对赤子爱胜蚓超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, **34**(9): 11-15.

[13] Farombi E O, Adelowo O A, Ajimoko Y R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as Indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2007, **4**(2): 158-165.

[14] Roméo M, Hoarau P, Garello G, *et al*. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean [J]. Environmental Pollution, 2003, **122**(3): 369-378.

[15] Laszczyca P, Augustyniak M, Babczyńska A, *et al*. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland) [J]. Environment International, 2004, **30**(7): 901-910.

[16] Lukkari T, Taavitsainen M, Soimasuo M, *et al*. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure [J]. Environmental Pollution, 2004, **129**(3): 377-386.

[17] 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 菲和芘对蚯蚓(*Eisenia fetida*)细胞色素 P450 和抗氧化酶系的影响[J]. 环境化学, 2007, **26**(2): 202-206.

[18] 赵俊杰. 土壤镉、锌单一及复合污染对蚯蚓抗氧化系统的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2009. 33-36.

[19] Hønsi T G, Stenersen J. Activity and localisation of the lysosomal marker enzymes acid phosphatase, *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase, and β-galactosidase in the earthworms *Eisenia fetida* and *E. veneta* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2000, **125**(3): 429-437.

[20] Rajalakshmi S, Mohandas A. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, **62**(1): 140-143.

[21] Saint-Denis M, Narbonne J F, Arnaud C, *et al*. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate1 soil [J]. Biology and Biochemistry, 2001, **33**(3): 395-404.

[22] Vijver M G, Vink J P M, Miermans C J H, *et al*. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, **35**(8): 125-132.

[23] 李连祯, 罗小三, 周东美. 土壤溶液中 Ca^{2+} 降低 Cd^{2+} 对赤子爱胜蚓的毒性[J]. 中国环境科学, 2007, **27**(5): 681-685.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 35 No. 7

Jul. 15, 2014

CONTENTS

《环境科学》第 6 届编辑委员会

主　编：欧阳自远

副主编：赵景柱　郝吉明　田　刚

编　委：（按姓氏笔画排序）

万国江　王华聪　王凯军　王绪绪　田　刚　田　静　史培军

朱永官　刘志培　汤鸿霄　陈吉宁　孟　伟　周宗灿　林金明

欧阳自远　赵景柱　姜　林　郝郑平　郝吉明　聂永丰　黄　霞

黄　耀　鲍　强　潘　纲　潘　涛　魏复盛

环 境 科 学

（HUANJING KEXUE）

（月刊　1976 年 8 月创刊）

2014 年 7 月 15 日　第 35 卷　第 7 期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

（Monthly　Started in 1976）

Vol. 35　No. 7　Jul. 15，2014

主　管	中国科学院	**Superintended**	by	Chinese Academy of Sciences
主　办	中国科学院生态环境研究中心	**Sponsored**	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences，Chinese Academy of Sciences
协　办	（以参加先后为序） 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	**Co-Sponsored**	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment，Tsinghua University
主　编	欧阳自远	**Editor-in -Chief**		OUYANG Zi-yuan
编　辑	《环境科学》编辑委员会 北京市 2871 信箱（海淀区双清路 18 号，邮政编码：100085） 电话：010-62941102，010-62849343 传真：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http：//www. hjkx. ac. cn	**Edited**	by	The Editorial Board of Environmental Science（HUANJING KEXUE） P. O. Box 2871，Beijing 100085，China Tel：010-62941102，010-62849343；Fax：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http：//www. hjkx. ac. cn
出　版	科学出版社 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717	**Published**	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street， Beijing　100717，China
印刷装订	北京北林印刷厂	**Printed**	by	Beijing Bei Lin Printing House
发　行	科学出版社 电话：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com	**Distributed**	by	Science Press Tel：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com
订购处	全国各地邮电局	**Domestic**		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 （北京 399 信箱）	**Foreign**		China International Book Trading Corporation（Guoji Shudian），P. O. Box 399，Beijing 100044，China

中国标准刊号：ISSN　0250-3301 / CN　11-1895/X　　国内邮发代号：2-821

国 内 定 价：90. 00 元　　国外发行代号：M 205

国内外公开发行