

铜、锌和铅对大型溞的联合毒性效应

夏 屿¹, 谢钦铭^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业农村部东海健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以大型溞为试验对象, 探究了铜、锌、铅三种重金属单一作用和两两联合作用对大型溞的毒性效应。结果表明: 在铜、锌、铅单独作用下, 大型溞的96 h半致死质量浓度分别是0.0576、0.3459和13.8100 mg/L; 大型溞的安全质量浓度分别是0.0006、0.0035和0.1381 mg/L。这三种重金属作用于大型溞的毒性大小为: 铜 > 锌 > 铅。通过非线性联合评价方法, 分别测定出三种重金属两两联合(Cu + Zn、Cu + Pb、Zn + Pb)作用下大型溞48 h实际致死率均高于理论致死率, 表明这三种重金属两两联合对大型溞的毒性效应表现为协同作用。

[关键词] 铜; 锌; 铅; 大型溞; 联合毒性

[中图分类号] X 52

The Joint Toxic Effects of Copper, Zinc and Lead to *Daphnia magna*

XIA Yu¹, XIE Qinming^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China)

Abstract: Therefore, it is necessary to study their combined toxicity to aquatic organisms. In this paper, *Daphnia magna* was used as an experimental organism to investigate the individual toxicity of Cu, Zn and Pb, as well as their combined toxic effect. The results showed that the 96-h LC₅₀ values for Cu, Zn and Pb in *D. magna* were 0.0576 mg/L, 0.3459 mg/L and 13.8100 mg/L, respectively. The safe concentrations (SC) of Cu, Zn and Pb in *D. magna* were 0.0006 mg/L, 0.0035 mg/L and 0.1381 mg/L, respectively. The toxicity level order of these three heavy metals to *D. magna* was Cu > Zn > Pb. Using the non-linear joint evaluation method, it was found that the actual 48-h lethality rates of pairwise combination of three heavy metals (Cu + Zn, Cu + Pb, Zn + Pb) to *D. magna* were higher than the theoretical lethal rates. This indicates that the toxic effect of the combination presence of these three heavy metal ions on *D. magna* exhibited a synergistic effect.

Keywords: copper; zinc; lead; *Daphnia magna*; joint toxicity

0 引言

重金属废水的过度和任意排放及不当处理^[1], 使得重金属成为水体环境的主要污染物。重金属具有持久性、高生物毒性、不可降解性和易在食物链传递累积的特点, 甚至在一定条件下, 还能与某

[收稿日期] 2023-03-11

[基金项目] 福建省科技重点引导项目(2021N0013); 福建省自然科学基金项目(2013J01136)

[作者简介] 第一作者: 夏屿, 从事水产养殖方向研究。通信作者: 谢钦铭, 副教授, 从事水域生态学方向研究。E-mail: qmxie@163.com

些有机物发生反应从而转化成毒性更大的金属-有机复合污染物^[2]。重金属污染正成为最严重的环境问题之一^[3-4]。研究发现, 90% 以上的水体沉积物重金属风险与铜、锌、铅等元素有关^[5]。而水生浮游动物能够净化水体, 链接水生食物链, 在水环境中起着非常关键的作用, 它们的种类和数量将会对水环境的结构与功能产生直接的影响^[6-7]。大型溞是水生浮游动物的代表, 具分布广、敏感性高、生存期短等特性, 常作为水生生物毒理学研究的标准试验生物, 被广泛应用于水生生物风险评估^[8-9]。研究水中残余污染物对大型溞类的毒害作用, 可以预测由其毒害导致的食物链高端有机体的潜在危险性大小^[10]。

最近几年, 研究者对单一金属的毒性进行了大量的研究。但是, 在自然界中, 经常是多种重金属同时存在, 而重金属的共存对生物的毒性效应与单一金属有着很大的区别, 当它们共同作用于生物体时, 往往会发生与单一重金属污染物完全不同的联合毒性效应^[11]。Biesiner 等^[12]通过研究证实, 当重金属按照各自安全浓度两两配比时, 重金属混合物均会对大型溞的生殖造成显著影响, 这表明重金属处于混合状态时单一金属的安全浓度并不适用。此外, 国内外学者开展了关于不同环境介质、水质参数等对重金属混合毒性的影响, 例如, 纳米水稳型富勒烯 $nC60$ 可增强 Zn-Cr 混合物对大型溞的联合毒性, 增加 pH、硬度和 DOC 可使 Cu-Cr 混合物对大型溞的联合毒性降低^[13]。目前, 作为联合急性毒性研究的重点, 重金属联合作用方式主要有协同作用和拮抗作用两种方式, 但关于 Cu、Zn、Pb 这三种重金属两两联合对大型溞的毒性作用方式还鲜见报道。

人类和其他生物都会接触到不同来源、不同类型的各种环境污染物, 单一污染物在实际环境中并不存在^[14], 对多个重金属元素同时存在的复合毒性作用进行深入的研究是非常具有现实意义的。因此, 本研究以 Cu、Zn、Pb 为毒性物质, 先测定其单一作用下对大型溞 48、96 h 的半致死质量浓度 (LC₅₀) 的影响, 然后用非线性联合毒性评价方法, 探究三种重金属两两联合对大型溞的毒性作用, 以期为更加全面地评估水环境中重金属污染的生态风险提供参考依据。

1 试验材料

1.1 试验生物

试验用大型溞 (*Daphia magna*) 系采于厦门市集美区敬贤湖, 并经实验室连续培养三代以上的单克隆品系。斜生四链藻 (*Tetrademus obliquus*) 购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库, 经实验室多代驯化培养。

1.2 供试药品

CuSO₄ · 5H₂O (AR, 纯度大于 99%)、ZnSO₄ · 7H₂O (分析纯, 纯度大于 99%) 购自国药集团化学试剂有限公司。0.01 mol/L Pb(NO₃)₂ 标准滴定溶液购自厦门海标科技有限公司。以超纯水作为溶剂, 在试验开始前 1 h 进行配制, 并逐级稀释至试验所需的质量浓度。

2 试验方法

2.1 稀释水的配制

取 CaCl₂ · 2H₂O 11.76 g、MgSO₄ · 7H₂O 4.93 g、NaHCO₃ 2.59 g、KCl 0.25 g 分别用超纯水定容至四个 1 L 的容量瓶中。各取以上四种溶液 25 mL 于一容量瓶中稀释至 1 L。调节 pH, 使其稳定在 7.8 ± 0.2^[15]。

2.2 大型溞的培养

用稀释水培养大型溞, 培养温度为 (21 ± 1) °C, 溶解氧为 6 mg/L, 光暗周期 16 h/8 h。每周换水 3 次, 每次换水 2/3, 每天定时喂食斜生四链藻^[16]。

2.3 单一毒性试验

1) 预试验 在正式实验之前, 为确定各重金属试验质量浓度范围, 应进行预试验。先将大型溞

暴露于范围较广的重金属质量浓度系列中 24 h, 通过预试验找出大型蚤致死的质量浓度范围, 然后据此质量浓度范围设计出正式试验中各组重金属的质量浓度。

2) 正式试验 在预试验确定的重金属质量浓度范围内, 选取 6 个质量浓度值作为正式实验的染毒剂量, 每个质量浓度设 3 个平行组, 同时设置空白对照组。3 种重金属的质量浓度梯度设置如表 1 所示。试验在 90 mm 的培养皿中进行, 每个培养皿中加入用稀释水配置的 Cu、Zn、Pb 系列质量浓度溶液 20 mL, 放入出生 6~48 h, 大小一致且健康活力强, 同一母蚤后代的幼蚤 5 只。每组设置 4 个平行组, 试验结果按照总幼蚤数 20 只进行计算。暴露期间不换水、不喂食。试验开始后, 于 24、48、72、96 h 定时进行观察, 记录每个容器中仍能活动的大型蚤数。

2.4 联合毒性试验

基于单一重金属毒性试验的结果, 根据所得 48 h 时每种重金属与致死率的剂量效应曲线, 参照 Gao 等^[17]在探究重金属和抗生素对铜绿微囊藻的联合毒性时建立的联合毒性评价方法, 确定重金属两两联合的质量浓度。并且为了解重金属剂量顺序对大型蚤毒性的影响, 调换重金属 A、B 的剂量顺序重复试验 (如表 2 所示)。

LC_x 被定义为一种特定的重金属的质量浓度, 该质量浓度是基于单一重金属剂量效应曲线的死亡率 ($X\%$) 推导而出的。理论致死率是根据各种重金属的死亡率之和 (无协同或拮抗作用) 计算出的重金属联合作用下的死亡率。假设 A 和 B 两种重金属对于大型蚤的毒性是安全独立的, 若 C_1 浓度的重金属 A 产生的毒性效应与 C_3 浓度的重金属 B 产生的毒性是等效的, 对大型蚤的致死率均为 $X\%$, C_4 浓度的重金属 B 产生的毒性是 C_3 浓度的两倍, 则有: 两种重金属联合致死的理论致死率 = $A(C_1)$ 致死率 + $B(C_4 - C_3)$ 致死率 = $X\% + (2X\% - X\%) = 2X\%$ 。

表 1 单一重金属毒性试验质量浓度
Tab. 1 Toxicity test concentration of single heavy metal

| 重金属 | Cu | Zn | Pb |
|----------------------------------|------|-------|------|
| | 0 | 0 | 0 |
| | 0.05 | 0.096 | 11.0 |
| | 0.06 | 0.957 | 16.5 |
| 试验质量浓度 /($mg \cdot L^{-1}$) | 0.07 | 2.392 | 22.0 |
| | 0.08 | 4.784 | 27.5 |
| | 0.09 | 7.176 | 33.0 |
| | 0.10 | 9.568 | 38.5 |

表 2 联合毒性试验中重金属 A 和 B 的质量浓度
Tab. 2 Concentration of heavy metals A and B in mixed toxicity test

| 联合毒性试验 | 重金属 A 质量浓度 | 重金属 B 质量浓度 | 理论致死率 /% |
|--------|------------|---------------------------------|----------|
| 1 | LC_{10} | $\Rightarrow LC_{20} - LC_{10}$ | 20 |
| 2 | LC_{15} | $\Rightarrow LC_{30} - LC_{15}$ | 30 |
| 3 | LC_{20} | $\Rightarrow LC_{40} - LC_{20}$ | 40 |
| 4 | LC_{25} | $\Rightarrow LC_{50} - LC_{25}$ | 50 |
| 5 | LC_{30} | $\Rightarrow LC_{60} - LC_{30}$ | 60 |
| 6 | LC_{35} | $\Rightarrow LC_{70} - LC_{35}$ | 70 |
| 7 | LC_{40} | $\Rightarrow LC_{80} - LC_{40}$ | 80 |

2.5 数据处理

1) 大型蚤存活率 $A(\%) = (N - N_0)/N$ 。其中 N 代表大型蚤总个数, N_0 代表死亡的大型蚤个数。

2) 本试验采用概率单位法计算半致死质量浓度 (LC_{50}), 试验数据在 GraphPad Prism 9 软件中进行处理。将质量浓度转换为质量浓度对数值并作为横坐标, 以大型蚤的存活率作为纵坐标, 运用非线性函数 “log (inhibitor) vs. normalized response-variable slope” 进行拟合, 得到质量浓度效应曲线和方程及 LC_{50} 。

函数公式为: $Y = 100 / (1 + 10^{((\lg(LC_{50}) - M) \times S)})$ 。其中: M 为质量浓度对数值, $\lg(LC_{50})$ 为半抑制质量浓度对数值, S 为曲线的陡度。

3) 重金属毒性试验的实际死亡率: $I(\%) = 100\% - A$ 。

4) 安全质量浓度 = $LC_{50}(96h) \times 0.01$ 。

3 试验结果与分析

3.1 单一毒性试验

3.1.1 三种重金属对大型溞存活率的影响

图 1a 为 96 h 内暴露在不同质量浓度重金属 Zn 下的存活率变化情况。当 Zn 的质量浓度小于 2.392 mg/L 时, 大型溞的存活率虽然有所下降, 但 96 h 内不会全部死亡; 当质量浓度为 0.095 68 mg/L 时, 大型溞的存活率 24 h 内下降了 13.3%, 之后就不再变化, 至试验结束 (96 h) 一直保持在 86.7%; 当质量浓度为 0.956 8 mg/L 时, 到 96 h 时还有 20% 的大型溞存活; 而当质量浓度达到 2.392 mg/L 时, 大型溞 96 h 内全部死亡; 当质量浓度大于 2.392 mg/L 时, 大型溞 24 h 内不会全部死亡, 即使是 9.568 mg/L 的最高质量浓度组也仍有 6.7% 的存活率, 但 48 h 存活率将全部降为 0。可以看出, 大型溞的存活率随着 Zn 质量浓度的增加而减少; 并且除空白对照组外, 暴露在同一质量浓度下, 大型溞的存活率随着暴露时间的增加而下降; 但低质量浓度 (0.095 68 mg/L) 的 Zn 对大型溞生存并没有造成严重的威胁, 大型溞在短期 (96 h) 内暴露在此质量浓度下能够维持稳定的群体数量。

图 1b 为 96 h 内暴露在不同质量浓度重金属 Pb 下的存活率变化情况。当 Pb 质量浓度不高于 22 mg/L 时, 大型溞 48 h 存活率能保持在 80% 以上, 96 h 存活率仍能够达到 33% 以上; 在最低质量浓度组 (11 mg/L), 大型溞 48 h 存活率甚至高达 93.3%; 当 Pb 质量浓度达到 27.5 mg/L 及以上时, 大型溞 48 h 存活率有所下降, 但也维持在 40% 以上; 最高质量浓度 (38.5 mg/L) 组的大型溞 48 h 存活率为 13.3%, 仅比 22 mg/L 组降低了 20%。可以看出, 大型溞的存活率随着 Pb 质量浓度的增加而减少, 但与 Zn 相比, 其下降速率较为缓慢, 且在 96 h 内, 试验设置的所有质量浓度梯度组中, 大型溞均未全部死亡。除空白对照组外, 暴露在同一质量浓度下, 随着暴露时间的增加, 大型溞的存活率下降。

图 1c 为 96 h 内暴露在不同质量浓度重金属 Cu 下大型溞的存活率变化情况。当 Cu 的质量浓度

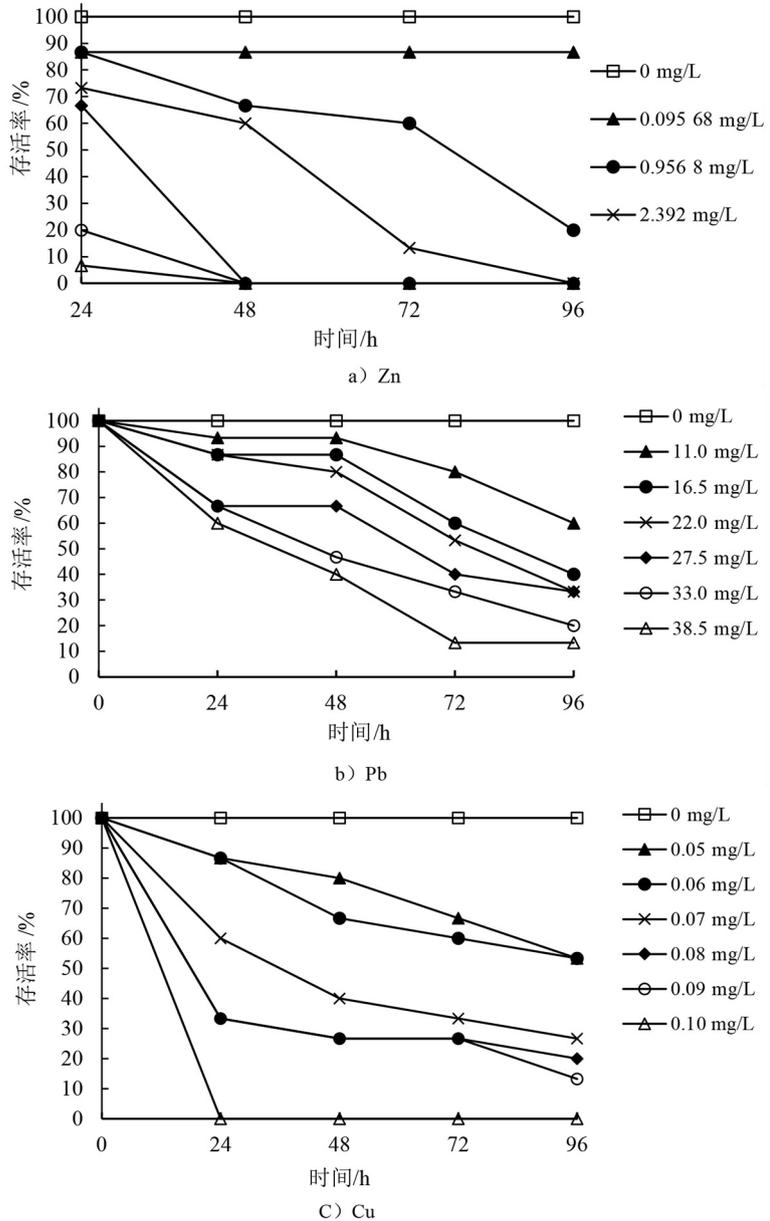


图 1 不同质量浓度 Zn、Pb、Cu 对大型溞存活率的影响

Fig.1 Effects of exposure to different concentrations of Zn, Pb and Cu on the survival rate of *Daphnia magna*

不超过 0.09 mg/L 时, 大型蚤的存活率随着 Cu 质量浓度的增加而减少, 但在此质量浓度范围内, 大型蚤 96 h 存活率仍有 13.3%。除空白对照组外, 暴露在同一质量浓度下, 随着暴露时间的增加, 大型蚤的存活率逐渐下降。但当质量浓度达到 0.10 mg/L, 大型蚤 24 h 存活率就已降为 0, 也就是说大型蚤在 24 h 内就已全部死亡。

3.1.2 三种重金属对大型蚤的单一毒性效应

三种重金属的质量浓度与大型蚤存活率的关系, 可用非线性函数 “log (inhibitor) vs. normalized response-variable slope” 拟合所得的回归方程、拟合系数 (R^2) 表示 (见表 3)。回归方程的拟合系数 (R^2) 均在 0.9 以上, 说明试验数据与该模型的拟合程度较好。

表 3 非线性拟合回归方程及拟合系数
Tab.3 Nonlinear fitting regression equation and fitting coefficient

| 重金属 | 暴露时间/h | 回归方程 | R^2 |
|-----|--------|--|--------|
| Cu | 24 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(-1.128 - M) \times (-6.998)]} \}$ | 0.9355 |
| | 48 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(-1.179 - M) \times (-5.710)]} \}$ | 0.9713 |
| | 72 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(-1.207 - M) \times (-4.215)]} \}$ | 0.9061 |
| | 96 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(-1.239 - M) \times (-4.524)]} \}$ | 0.9406 |
| Zn | 24 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(0.6786 - M) \times (-2.434)]} \}$ | 0.9109 |
| | 48 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(0.2922 - M) \times (-1.959)]} \}$ | 0.9307 |
| | 72 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(0.0493 - M) \times (-2.536)]} \}$ | 0.9745 |
| | 96 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(-0.4611 - M) \times (-1.538)]} \}$ | 0.9939 |
| Pb | 24 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(1.668 - M) \times (-1.897)]} \}$ | 0.9142 |
| | 48 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(1.522 - M) \times (-2.986)]} \}$ | 0.9807 |
| | 72 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(1.334 - M) \times (-2.144)]} \}$ | 0.9447 |
| | 96 | $Y = 100 / \{ 1 + 10^{[(1.140 - M) \times (-1.633)]} \}$ | 0.9841 |

如表 4 所示, 大型蚤的 LC_{50} 值均随着 Cu、Zn、Pb 暴露时间的增加而显著降低。暴露在 Cu、Zn、Pb 下 24 h 时, 大型蚤的 LC_{50} 值分别为 0.0745、4.7710、46.5900 mg/L; 暴露 96 h 时, 大型蚤的 LC_{50} 分别为 0.0576、0.3459、13.8100 mg/L, 与 24 h 时相比分别下降了 23%、93%、70%。可见, 随暴露时间的延长, 三种重金属中, Zn 对大型蚤的毒性增大得最为显著, 其次为 Pb, 最末为 Cu。说明, 三种重金属对大型蚤半致死率的影响力随时间而不同。

按照《美国华盛顿州化学品毒性分级标准》^[18]和《溢流急性活动抑制毒性分级标准》^[19], Cu 影响下大型蚤的 LC_{50} (48 h) 值为 0.0662 mg/L, 分别属于 X 级和极高毒物质; Zn 影响下大型蚤的 LC_{50} (48 h) 值为 1.9600 mg/L, 分别属于 A 级和高毒物质; Pb 影响下大型蚤的 LC_{50} (48 h) 为 33.2500 mg/L, 分别属于 C 级和中毒物质。

对大型蚤来说, Cu、Zn、Pb 的安全质量浓度分别为 0.0006、0.0035、0.1381 mg/L。结合两种毒性分级标准^[18-19], 这三种重金属对大型蚤的毒性影响大小为: 铜 > 锌 > 铅。说明重金属种类不同, 对大型蚤的毒性影响也不同, 在相同暴露时间下, 重金属种类对大型蚤的毒性影响起决定性作用。

表 4 三种重金属影响下大型蚤的 LC_{50} 值与安全质量浓度
 Tab. 4 Nonlinear fitting regression equation and fitting coefficient

| 重金属 | 暴露时间/h | $LC_{50}/(mg \cdot L^{-1})$ | 95% 置信区间 | 安全质量浓度/ $(mg \cdot L^{-1})$ |
|-----|--------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Cu | 24 | 0.0745 | 0.0673 ~ 0.0816 | 0.00058 |
| | 48 | 0.0662 | 0.0617 ~ 0.0705 | |
| | 72 | 0.0621 | 0.0515 ~ 0.0700 | |
| | 96 | 0.0576 | 0.0504 ~ 0.0631 | |
| Zn | 24 | 4.7710 | 2.1600 ~ 6.8960 | 0.00346 |
| | 48 | 1.9600 | 0.4064 ~ 3.8960 | |
| | 72 | 1.1200 | 0.7160 ~ 1.4820 | |
| | 96 | 0.3459 | 0.2540 ~ 0.4871 | |
| Pb | 24 | 46.5900 | 38.0000 ~ 78.8800 | 0.13810 |
| | 48 | 33.2500 | 31.0400 ~ 36.2900 | |
| | 72 | 21.5800 | 18.1200 ~ 25.1100 | |
| | 96 | 13.8100 | 12.2500 ~ 15.1800 | |

3.2 联合毒性试验

3.2.1 三种重金属两两联合对大型蚤的毒性作用

如表 4 所示, 暴露在 Cu、Zn、Pb 三种重金属下, 大型蚤 48 h LC_{50} 值分别为 0.0662、1.9600、33.2500 mg/L。计算出每种重金属影响 48 h 时, 大型蚤 $LC_{10} \sim LC_{40}$ 及 $(LC_{20} - LC_{10}) \sim (LC_{80} - LC_{40})$ 的值, 根据表 2 设置重金属两两联合时的质量浓度, 进行联合毒性试验。

图 2 是三种重金属两两联合 48 h 后理论抑制率与实际抑制率对大型蚤致死率影响的相互关系。可以看出, Cu + Zn、Cu + Pb、Zn + Pb 从低质量浓度到高质量浓度联合时, 对大型蚤所产生的毒性始终大于其理论 2X% 致死率, 也就是说重金属两两联合的毒性作用大于两种重金属单一毒性的简单相加作用, 说明三种重金属两两联合对大型蚤产生的毒性作用为协同作用。

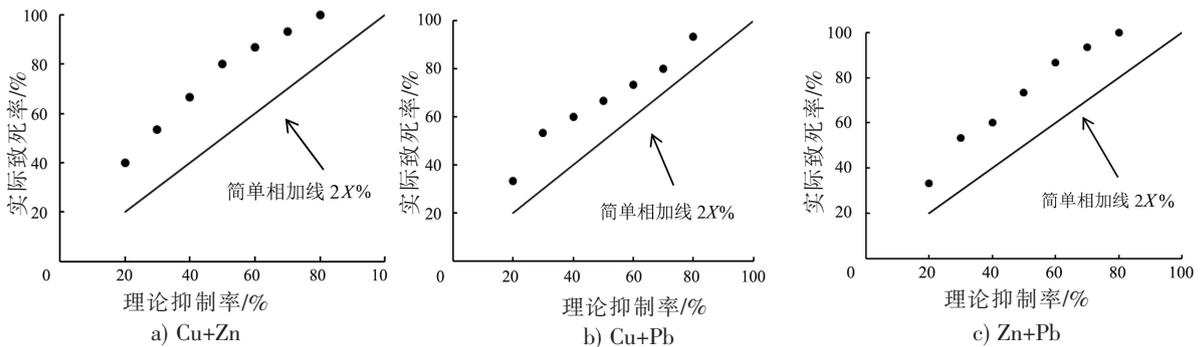


图 2 三种重金属两两联合的理论和实际毒性作用比较

Fig.2 Comparison of theoretical and practical toxicity of pairwise combination of three heavy metals

3.2.2 改变剂量顺序对联合毒性作用评价的影响

图 3 是不同剂量顺序的重金属两两联合毒性作用的比较。可以看出, 改变重金属两两联合的剂量顺序, 对大型蚤所产生的抑制仍然始终大于其理论 2X% 抑制率, 三种重金属两两联合对大型蚤产生

的毒性作用为协同作用。这一结果说明,重金属联合的剂量顺序,不会影响该方法的联合毒性作用评价结果。

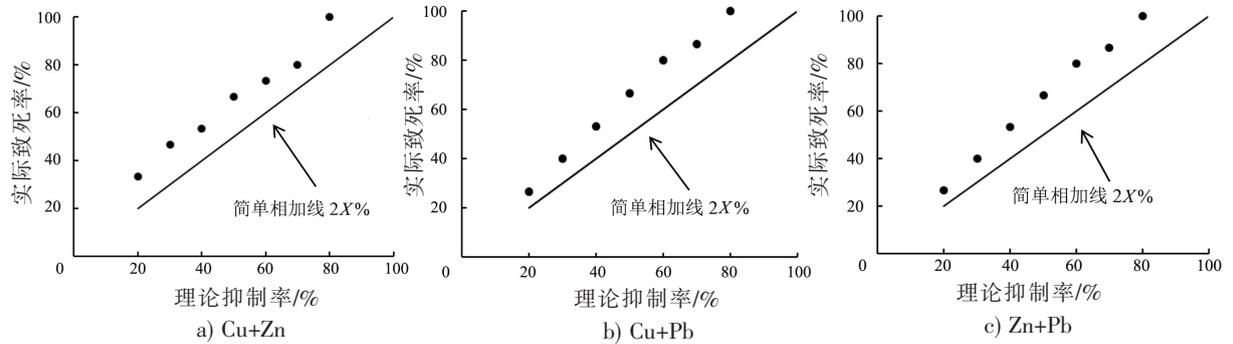


图3 不同剂量顺序的联合重金属理论和实际毒性作用比较

Fig.3 Comparison of theoretical and practical toxicity of mixed heavy metals with different dose order

4 讨论

4.1 单一重金属对水生生物的影响

重金属一旦被泄露到水体中,无法被水体中的微生物正常降解,也不能借助水体自净作用来消除金属污染的危害^[20]。重金属具有污染来源广泛、停留时间漫长,且具有累积和富集浓缩特性,容易沿食物链传递,污染后不易被察觉,以及难以恢复等特点^[21],对环境造成了严重的危害。重金属污染会随河流、湖泊、海洋等环境因素的作用,对水生生物正常的新陈代谢、组织器官的发育,以及产卵、洄游等造成一定的影响。比如,过量的重金属会让鱼在海里处于异常“兴奋”的状态^[22],使其挣扎直至死亡;当水体中的Cu、Pb、Zn、As含量过高时,还会对早期和发育期的动物造成畸形效应,导致哺乳类、爬行类动物的胚胎发育畸形^[23]。除此之外,重金属还是一种具有代表性的内分泌干扰素,它可以对水生动物的酶活性进行抑制,使机体的代谢功能下降,同时还会使一些生理生化指标发生变化,从而对水生动物的内分泌调节系统产生毒性影响^[24]。重金属在进入有机体之后,会进行富集浓缩,从而引起有机体内脂质发生一系列的反应,比如过氧化反应、遗传物质改变、碱基核糖基氧化等,进而导致某些细胞死亡或癌变^[25-27]。Hix等^[28]的研究结果显示,当DNA被铁离子诱导之后,产生的大量甲基自由基攻击时,会导致DNA高度甲基化。Pfohl-Leszkowicz等^[29]的研究也表明,重金属离子可以显著地抑制甲基转移酶的活性,重金属铅、铜以及锌离子等均能抑制5-甲基转移酶的活性。此外,因为重金属的污染,会对正常的水环境造成影响,在某种程度上,水生动物的基因突变率也会增加,这对生态平衡造成了潜在的威胁^[30]。在自然界中,重金属的存在形式是比较稳定的,很难被降解,所以,只需要微量的重金属就可以对生物体造成一定的伤害,并且通过食物链进行积累而影响水体中的其他生物,甚至是人类的安全与健康,从而对整个生态系统的结构与功能造成一定的影响。Cu、Zn、Pb三种重金属在中国主要地表水体中的含量分别为0.18~52.32、2.88~10504.00、0.11~155.00 $\mu\text{g/L}$ ^[31]。在本试验中Cu、Zn、Pb对大型溞的 LC_{50} 最小值分别为57.60、345.90、13810.00 $\mu\text{g/L}$ 。可以看出,Cu、Zn在自然水体中的质量浓度,足以对大型溞造成严重的危害。Pb在自然水体中的含量也超过了大型溞的24h安全质量浓度(138.10 $\mu\text{g/L}$),在水环境中也具有潜在的生态风险性,应当予以重视和加以控制。

由于各物种之间的生理机能不同,同种物质的毒性对不同物种来说差异较大,有时即使是相同营养级的不同物种,对同种物质的敏感性也存在明显差异。张才学等^[32]发现对壶状臂尾轮虫来说,重金属的毒性顺序为 $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Pb}$;陈娜等^[33]的研究表明重金属对水螅的毒性排序为 $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ag} > \text{Zn} > \text{Pb}$;张云龙等^[34]和杨丽华等^[35]的研究表明,对鲫鱼来说毒性排序为 $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cr}$;徐

善良等^[36]的研究表明重金属对多刺裸腹蚤的毒性大小为 $Cd > Cu > Pb > Zn$ 。这说明重金属离子对生物的毒性作用随受试生物种类的不同而呈现明显的差异。但影响重金属生物毒性的因素还有很多,如温度、pH、硬度、溶解氧、光、盐度、重金属的存在形态、有无其他金属或毒物同时存在等^[37]。Meng等^[38]和丁娟娟^[39]的研究结果也表明,当受试物种相同时,其他条件出现细微差别都将对 LC_{50} 值造成巨大的影响。在本试验中,除 Pb 外三种重金属对大型蚤的 48 h LC_{50} 均小于文献 [38-39] 中的试验结果,并且与文献 [38-39] 中 Pb 的毒性大于 Zn 的毒性的结论相反,这说明本试验所用大型蚤对 Cu、Zn 更为敏感,而对 Pb 更不敏感。这可能是由于文献 [38-39] 中试验所用的大型蚤分别来自于中国科学院武汉水生生物研究所实验室(山东)长期稳定培养的 62D. M 生物株,而本试验所用大型蚤为采于厦门市集美区敬贤湖,并于实验室连续培养三代以上的单克隆品系,大型蚤产地、试验地点以及大型蚤品系等都存在较大差异。Münzinger 等^[40]研究发现,在同一试验条件下不同产地的大型蚤对同一重金属的毒性大小会产生不同的结果,所以产地、蜕皮时间、生长阶段、营养状态、延迟效应等不同的大型蚤对重金属的毒性大小会产生更大的差异,这一结果也为以上猜想提供了理论支持。

4.2 重金属联合作用对水生生物的影响

在联合毒性实验中, Cu + Zn、Cu + Pb、Zn + Pb 三组的联合毒性均表现为协同作用,即重金属离子两两共存时,其相互作用增强了对大型蚤的毒性影响。目前,协同作用产生的毒性机制可能是重金属共同作用使细胞膜的通透性增加,从而导致毒性增强^[41]。Stewart 等^[42]认为重金属还可以对原生质膜中可溶性部分的通透性进行改变,进而对细胞膜进行破坏,导致膜体变得很脆弱,使重金属更容易进入,加重了对细胞的损害,因此呈现出协同作用。本实验中联合毒性表现出来的相互作用与毒物配比和暴露时间都没关系,只与毒物的组合有关,其中的联合作用机制有待进一步研究。多种污染物的联合作用具有一定的复杂性,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^[43]。此外,污染物暴露的浓度组合关系在一定条件下也起了更为直接的甚至决定性的作用^[44]。因此,对于水体污染的评价应从联合毒性的角度进行综合评价,深入研究多种污染物联合作用的影响,并探讨其相互作用机理,这是非常必要的,具有十分重要的实际意义。

5 结论

1) 大型蚤的存活率随着三种重金属质量浓度与暴露时间的增加而下降,表明质量浓度越高、暴露时间越长,三种重金属对大型蚤的毒害越强,说明重金属质量浓度与暴露时间对于评价污染物毒性具有关键性作用。

2) 铜、锌和铅对大型蚤的 96 h 半致死质量浓度 LC_{50} 分别是 0.057 6、0.345 9 和 13.810 0 mg/L; 铜、锌和铅对大型蚤的安全质量浓度 (SC) 分别是 0.000 58、0.003 46 和 0.138 10 mg/L。结合两种毒性分级标准,铜为 X 级(极高毒物),锌为 A 级(高毒物),铅为 C 级(中毒物)。因此,三种重金属对大型蚤的毒性大小为:铜 > 锌 > 铅。

3) Cu、Zn、Pb 对大型蚤的 LC_{50} 值均随着暴露时间的增加而显著降低,重金属种类对大型蚤的毒性起着决定性作用。

4) 三种重金属两两联合 (Cu + Zn、Cu + Pb、Zn + Pb) 对大型蚤的 48 h 时实际致死率均高于理论致死率,其两两联合对大型蚤的毒性有明显的协同效应,说明对大型蚤来说,两种重金属共存时的毒性大于重金属单一存在时的毒性。

[参 考 文 献]

[1] 邹照华,何素芳,韩彩芸,等. 重金属废水处理技术研究进展 [J]. 水处理技术,2010,36(6):17-21. DOI:10.16796/j.cnki.1000-3770.2010.06.005.

- [2] 傅海霞,刘怡,董志英,等. 抗生素与重金属复合污染的生态毒理效应研究进展 [J]. 环境工程,2016,34(4):60-63,104. DOI: 10.13205/j.hjgc.201604013.
- [3] MACEDA-VEIGA A, MONROY M, NAVARRO E, et al. Metal concentrations and pathological responses of wild native fish exposed to sewage discharge in a Mediterranean River [J]. Science of the Total Environment,2013,449: 9-19. DOI:10.1016/j.scitotenv.2013.01.012.
- [4] YOHANNES Y B, IKENAKA Y, NAKAYAMA S M M, et al. Organochlorine pesticides and heavy metals in fish from Lake Awassa, Ethiopia: insights from stable isotope analysis [J]. Chemosphere,2013,91(6): 857-863. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.047.
- [5] 陈明,蔡青云,徐慧,等. 水体沉积物重金属污染风险评价研究进展 [J]. 生态环境学报,2015,24(6): 1069-1074. DOI: 10.16258/j.cnki.1674-5906.2015.06.024.
- [6] LIU X J, NI I H, WANG W X. Trophic transfer of heavy metals from freshwater zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio reio* [J]. Water Research,2002,36(18): 4563-4569. DOI: 10.1016/S0043-1354(2)00180-X.
- [7] NG T Y, WANG W X. Dynamics of metal subcellular distribution and its relationship with metal uptake in marine mussels [J]. Environ Toxicol Chem,2005,24(9): 2365-2372. DOI: 10.1897/04-637r.1.
- [8] SEDA J, PETRUSEK A. *Daphnia* as a model organism in limnology and aquatic biology: introductory remarks [J]. Journal of Limnology,2011,70(2): 337-344. DOI: 10.4081/jlimnol.2011.337.
- [9] 尹东鹏,赵文. 重金属对大型蚤生态毒理学研究进展 [J]. 大连海洋大学学报,2020,35(4):631-636. DOI: 10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-203.
- [10] 刘冉,曹志会,赵月,等. PFOA 和 PFOS 对大型蚤急性毒性试验研究 [J]. 安全与环境工程,2015,22(4):51-55,74. DOI:10.13578/j.cnki.issn.1671-1556.2015.04.009.
- [11] 苏永红,唐柱云,曾科. 重金属联合毒性研究进展 [J]. 现代农业科技,2007(10):174-175,178. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5739.2007.10.122.
- [12] BIESINGER K E, CHRISTENSEN G M, FIANDT J T. Effects of metal salt mixtures on *Daphnia magna* reproduction [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,1986,11(1):9-14.
- [13] 余言想,魏华,陶贤继,等. 纳米水稳型 C60 (nC60) 促进 Zn^{2+} 和 Cr^{6+} 在大型蚤体内的吸收、抗氧化性和急性毒性 [J]. 生态毒理学报,2014,9(3):569-577.
- [14] 张融,范文宏,唐戈,等. 水体中重金属镉和锌对大型蚤联合毒性效应的初步研究 [J]. 生态毒理学报,2008(3):286-290.
- [15] PELTIER W H, WEBER C I. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms: EPA-821-R-02-012 [S]. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, 2022.
- [16] ADIB H, ZEINI, AKEL M. The effect of algal food on growth and reproduction of *Daphnia magna* (Cladocera Daphniidae) under experiments conditions [J]. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies,2020,41(5): 249-263.
- [17] GAO C, GAO L, DUAN D F, et al. Evaluating combined toxicity of binary heavy metals to the cyanobacterium microcystis: a theoretical non-linear combined toxicity assessment method-science direct [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019,187. DOI:10.1016/j.ecoenv.2019.109809.
- [18] 张丽颖,黄启飞,王琪,等. 危险废物分级管理方法研究 [J]. 环境污染与防治,2006(1):34-36.
- [19] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京:中国环境科学出版社,2002:38-47.
- [20] 张家铜,刘佳麟. 水体重金属污染的危害及其治理 [J]. 山东工业技术,2019(8):35. DOI: CNKI:SUN;SDGJ.0.2019-08-032.
- [21] 洪亚军,冯承莲,徐祖信,等. 重金属对水生生物的毒性效应机制研究进展 [J]. 环境工程,2019,37(11):1-9. DOI: 10.13205/j.hjgc.201911001.
- [22] 李海芹,王静. 重金属废水污染及其处理方法研究 [J]. 中国资源综合利用,2017,35(12):51-52,58.
- [23] 励建荣,李学鹏,王丽,等. 贝类对重金属的吸收转运与累积规律研究进展 [J]. 水产科学,2007(1):51-55. DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.2007.01.015.
- [24] 赵红霞,詹勇,许梓荣. 重金属对水生动物毒性的研究进展 [J]. 江西饲料,2003(2):13-18. DOI: 10.3969/j.issn.

1008-6137. 2003. 02. 006.

- [25] WAISBERG M, JOSEPH P, HALE B, et al. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis [J]. *Toxicology*, 2003, 192(2/3): 95-117. DOI: 10.1016/S0300-483X(3)00305-6.
- [26] THOMAS R E, LINDEBERG M, HARRIS P M, et al. Induction of DNA strand breaks in the mussel (*Mytilus trossulus*) and clam (*Protothaca staminea*) following chronic field exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from the Exxon Valdez spill [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 54(6): 726-732. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2007.01.009.
- [27] PAN L, REN J, JING L. Effects of benzo(k) fluoranthene exposure on the biomarkers of scallop *Chlamys farreri* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 141(3): 248-256. DOI: 10.1016/j.cca.2005.07.005.
- [28] HIX S, AUGUSTO O. DNA methylation by tert-butyl hydroperoxide-iron (II): a role for the transition metal ion in the production of DNA base adducts [J]. *Chem Biol Interact*, 1999, 118(2): 141-9. DOI: 10.1016/S0009-2797(99)00079-4.
- [29] PFOHL-LESZKOWICZ A, BALDACINI O, KEITH G, et al. Stimulation of rat kidney, spleen and brain DNA (cytosine 5)-methyltransferases by divalent cobalt ions [J]. *Biochimie*, 1987, 69(11): 1235-1242. DOI: 10.1016/0300-9084(87)90151-9.
- [30] 于天宇, 胡思雨. 水体重金属污染现状及治理方法概述 [J]. *建筑与预算*, 2019(6): 75-78. DOI: 10.13993/j.cnki.jzyys.2019.06.019.
- [31] 乔爽, 王婷, 张倩, 等. 长江源区重金属分布特征及生态风险评价 [J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2022, 58(2): 297-307. DOI: 10.13209/j.0479-8023.2022.007.
- [32] 张才学, 郑文凯, 林玉凤, 等. 4种重金属离子及其联合液对壶状臂尾轮虫的急性毒性试验 [J]. *湛江海洋大学学报*, 2005, 25(1): 56-59.
- [33] 陈娜, 郝家胜, 王莹, 等. 铜、铅、镉、锌、汞和银离子复合污染对水螅的急性毒性效应 [J]. *生物学杂志*, 2007(3): 32-35.
- [34] 张云龙, 袁娟, 陈丽萍, 等. 三种重金属对鲫鱼苗的急性毒性和联合毒性试验 [J]. *河北渔业*, 2011(2): 24-27. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6755.2011.02.006.
- [35] 杨丽华. 重金属(镉、铜、锌和铬)对鲫鱼的生物毒性研究 [D]. 广州: 华南师范大学, 2003.
- [36] 徐善良, 王丹丽, 叶静娜, 等. 4种重金属离子对多刺裸腹蚤的联合毒性效应 [J]. *生物学杂志*, 2011, 28(3): 21-25. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2011.03.021.
- [37] 赵全举. 重金属毒性的影响因素分析 [J]. *新疆环境保护*, 2002(4): 38-40. DOI: 10.3969/j.issn.1008-2301.2002.04.010.
- [38] MENG Q J, FENG Q Y, WU Q Q, et al. The acute and chronic toxicity of five heavy metals on the *Daphnia magna* [C]// The 2nd International Conference on Bioinformatics & Biomedical Engineering. Shanghai: IEEE, 2008: 4555-4558.
- [39] 丁婵娟. 铜、铅、锌对大型蚤毒性效应研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2013.
- [40] MÜNZINGER A, MONICELLI F. A comparison of the sensitivity of three *Daphnia magna* populations under chronic heavy metal stress [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1991, 22(1): 24-31. DOI: 10.1016/0147-6513(91)90043-0.
- [41] GERHARDT A. Review of impact of heavy metals on stream invertebrates with special emphasis on acid conditions [J]. *Water, Air & Soil Pollution*, 1993, 66(3): 289-314. DOI: 10.1007/BF00479852.
- [42] STEWART AR, MALLEY D F. Effect of metal mixture (Cu, Zn, Pb, and Ni) on cadmium partitioning in littoral sediments and its accumulation by the freshwater macrophyte *Eriocaulon septangulare* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999(3). DOI: 10.1002/ETC.5620180311.
- [43] 邹佩贞, 张淑玲, 易捷仪. 几种重金属离子对光倒刺鲃胚胎发育的毒性 [J]. *动物学杂志*, 2008(4): 7-12. DOI: 10.13859/j.cjz.2008.04.020.
- [44] 周启星, 程云, 张倩茹, 等. 复合污染生态毒理效应的定量关系分析 [J]. *中国科学: C 辑*, 2003, 33(6): 8. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7232.2003.06.011.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)