

马陶武, 周科, 朱程, 等. 2009 铜锈环棱螺对镉污染沉积物慢性胁迫的生物标志物响应 [J]. 环境科学学报, 29(8): 1750-1756

Ma T W, Zhou K, Zhu C, et al. 2009 Biomarker responses of *Bellamyia aeruginosa* to the chronic stress of cadmium-contaminated sediment [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(8): 1750-1756

# 铜锈环棱螺对镉污染沉积物慢性胁迫的生物标志物响应

马陶武<sup>1\*</sup>, 周科<sup>1</sup>, 朱程<sup>1</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 王子健<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 吉首大学生物资源与环境科学学院, 吉首 416000

<sup>2</sup> 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

收稿日期: 2008-11-12 修回日期: 2009-01-20 录用日期: 2009-05-18

**摘要:** 沉积物毒性测试是评价水生态系统中沉积物污染生态风险的重要手段. 建立合适的毒性测试生物是进行沉积物毒性测试的基本前提. 铜锈环棱螺 (*Bellamyia aeruginosa*) 在我国淡水水体中分布广泛, 具有重要的生态价值. 本研究将实验室培养的铜锈环棱螺暴露于不同含量的镉加标沉积物中 28 d 以评价该物种在镉污染沉积物慢性胁迫下生物标志物响应的敏感性. 结果表明, 除了谷胱甘肽 (GSH) 相对不敏感外, 壳长增长率、肝胰腺超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT)、以及肝胰腺和肾脏中的金属硫蛋白 (MT) 均表现出相对较高的敏感性, 可用作重金属污染沉积物慢性胁迫的有效生物标志物. 尤其是肝胰腺 SOD 和 CAT 可以用作指示低水平镉污染沉积物长期污染胁迫下的敏感生物标志物. 此外, 该物种的实验室培养和毒性测试操作容易进行, 可以考虑将铜锈环棱螺作为我国淡水沉积物毒性评价的候选物种.

**关键词:** 沉积物; 壳长增长率; 抗氧化防御系统; 金属硫蛋白; 肝胰腺; 肾脏

文章编号: 0253-2468(2009)08-1750-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Biomarker responses of *Bellamyia aeruginosa* to the chronic stress of cadmium-contaminated sediment

MA Taowu<sup>1\*</sup>, ZHOU Ke<sup>1</sup>, ZHU Cheng<sup>1</sup>, LU Jia<sup>1</sup>, WANG Zijian<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Biology and Environmental Science, Jishou University, Jishou 416000

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085

Received 12 November 2008; received in revised form 20 January 2009; accepted 18 May 2009

**Abstract** Sediment toxicity tests have become an important tool for assessing ecological risks of sediment contamination in aquatic ecosystems. A prerequisite for such tests is to identify satisfactory test species. In China, *Bellamyia aeruginosa* is widely distributed as a dominant community member in aquatic ecosystems. In this study, mature *B. aeruginosa* were exposed for 28 d to sediments artificially spiked with cadmium (Cd) to evaluate their response sensitivity as biomarkers to the chronic stress of Cd-contaminated sediment. The results showed that the shell length growth rate, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and metallothionein (MT), but not glutathione (GSH), were highly sensitive to Cd stress and hepatopancreatic SOD and CAT were especially sensitive to the chronic stress of low levels of sediment Cd. Additionally, *B. aeruginosa* was successfully cultured under laboratory conditions and readily handled in the toxicity tests, so this species is recommended as a potential candidate for the assessment of sediment toxicity in China.

**Keywords** sediment; shell length growth rate; antioxidant defense system; metallothionein; hepatopancreas; kidney

### 1 引言 (Introduction)

沉积物是水生态系统的重要组成部分, 它不仅为底栖动物提供食物来源和栖境, 而且也成为各种

污染物的储存库. 因此, 沉积物污染对水生态系统和人类健康构成了潜在的威胁 (Adams et al., 1992). 许多研究正通过沉积物的毒性测试来评价污染沉积物对水生态系统的生态毒理学效应

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 20677021); 吉首大学科研基金项目

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20677021) and the Science Foundation of Jishou University

作者简介: 马陶武 (1968—), 男, 博士; \* 通讯作者 (责任作者), E-mail: mtw922@163.com

Biography: MA Taowu (1968—), male, Ph. D.; \* Corresponding author, E-mail: mtw922@163.com

(Anderson et al., 2004), 但开展沉积物毒性测试的前提是建立合适的测试生物. 目前, 国外已经建立了几种淡水沉积物毒性测试标准生物, 如端足类淡水虾 (*Hyalella azteca*)、摇蚊幼虫 (*Chironomus tentans*)、夹杂带丝蚓 (*Lumbriculus variegatus*)和蜉蝣幼虫 (*Hexagenia limbata*) (USEPA, 2000; ASIM, 2003), 但由于它们个体小, 测试指标有限, 大多应用于急性毒性测试, 测试结果不能反映沉积物毒性 (特别是持久性有毒污染物) 的真实情况. 因此, 发展其它具有重要生态价值的底栖动物作为毒性测试生物十分必要. 已有研究显示, 腹足类软体动物对污染物具有较高的敏感性 (Oetken et al., 2005). 近期, 人们开始关注两种小型淡水腹足类: 盘螺科的鱼盘螺 (*Valvata piscinalis*) (Ducrot et al., 2006) 和觿螺科的新西兰泥蜗 (*Potamopyrgus antipodarum*) (Duft et al., 2007), 但它们均属于小型螺 (壳长仅 4 mm), 在我国较为少见. 目前, 国内虽有人针对萝卜螺 (宋志慧等, 1997) 做过化学物质的毒性测试研究, 但并不是基于沉积物的, 关于我国水体污染沉积物生态毒性风险评价的研究鲜见报道. 铜锈环棱螺 (*Bellamyia aeruginosa*) 是属于腹足纲田螺科的淡水软体动物, 个体大小中等, 以鳃呼吸, 雌雄异体, 卵胎生, 在我国淡水水体中分布广、数量大, 主要栖居在沉积物中, 以摄食沉积物中有机碎屑、细菌和藻类为生, 是一种沉积摄食者 (陈其羽等, 1975). 另外, 由于该物种是一些鱼类的食物, 同时也被人们食用, 在食物链中具有重要作用, 沉积物中污染物有可能通过生物富集作用转移到高营养级生物体内. 因此, 基于该物种的生物毒性评价将有可能反映沉积物生态毒性的实际情况. 最近的研究表明, 由富营养化所产生的微囊藻毒素可以在铜锈环棱螺体内富集至较高水平 (Zhang et al., 2007). 镉 (Cd) 是一种环境优先污染物, 随着工业的发展, 越来越多的 Cd 被排放到水环境中. 我国部分典型淡水水体沉积物中的 Cd 污染已达到较高水平 (马力等, 2007; 李仁英等, 2007), 存在较大的生态毒性风险. 在水生动物中, 大多数关于 Cd 毒性的研究是针对鱼类的 (杨丽华等, 2003; 张春丹等, 2006), 而有关软体动物的研究报道较少. 本研究利用实验室培养的铜锈环棱螺进行沉积物毒性测试, 探讨了 Cd 加标沉积物慢性胁迫下抗氧化防御系统几种生物标志物和金属硫蛋白 (MT) 的响应敏感性, 以期为进一步开展利用铜锈环棱螺进行污染沉积物的生

态毒理学评价提供重要依据.

## 2 材料与方法 (Materials and methods)

### 2.1 仪器与试剂

UV-757CRT 紫外可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); TGL-16M 台式高速冷冻离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司); TAS-990 原子吸收分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); CdCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、蔗糖、Tris、EDTA-2Na 以及其它试剂均为国产分析纯; 牛血红蛋白为上海国药集团化学试剂有限公司产品; 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽 (GSH) 和蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所.

### 2.2 实验动物的培养

实验培养所用的铜锈环棱螺为采自武汉植物园园内干净池塘的成螺. 螺的驯化和培养在自行设计的、光温氧可控的循环水培养系统中进行, 该系统主要包括培养缸和过滤系统. 其中, 每个培养缸的体积为 36 L (长×宽×高, 45 cm×30 cm×27 cm). 采用经过处理的无污染寡营养陆地土壤 (总有机碳 TOC 2.6%; 总氮 TN 1034 mg·kg<sup>-1</sup>; 总磷 TP 1147 mg·kg<sup>-1</sup>) 进行螺的实验室培养. 土壤采自湖南吉首市德夯自然保护区. 重金属背景值 (Cr Ni Cu Zn Cd 和 Pb 的含量分别为 53.41, 31.34, 19.74, 44.98, 1.38 和 18.91 mg·kg<sup>-1</sup>) 较低. 按照 Pasteris 等 (2003) 的方法, 稍加修改后对进行土壤的采集与处理. 用小木铲将 1~2 cm 的表层土壤去除, 收集约 20 cm 厚的土壤并去除杂物. 将收集的土壤在 80 °C 下烘干至恒重, 采用木质滚筒和陶瓷研钵研磨土壤, 然后用孔径为 150 μm 的尼龙筛进行过筛. 将所得土壤按 1:1 的体积比与去氯自来水混合并搅拌均匀. 所得泥浆在 4 °C 下静置 72 h, 然后去掉上覆水. 经过处理后的土壤具有与自然湿沉积物类似的外观特征和均匀程度. 培养缸中培养基质和上覆水的体积比为 1:4. 培养条件: 水温 (24±1) °C; 采用 28W 荧光灯进行照射; 光照周期 12 h:12 h (白昼:黑暗); 去氯自来水的水质为 pH 7.99, 电导率 267 μS·cm<sup>-1</sup>, 总氮 0.41 mg·L<sup>-1</sup>, 碱度 2.4 mmol·L<sup>-1</sup>, 硬度 78.4 mg·L<sup>-1</sup>; 上覆水的溶氧保持在 4 mg·L<sup>-1</sup> 以上.

成螺的驯化和培养密度为每缸 150 只 (即每 9 cm<sup>2</sup> 1 只), 雌雄比为 2:1 (自然种群的雌雄比为 2~3:1). 当成螺开始繁殖时, 从成螺缸中批量收集刚出

生的幼螺,转移到新培养缸中,密度为每缸 500只;2个月后雌雄分开培养,密度调整为每缸 300只;4个月后,密度调整为每缸 150只.培养所用饲料为三元牌观赏鱼饲料(北京三友创美饲料科技有限公司),每只幼螺、1月龄以上亚成螺和成螺的饲料投喂量分别为 2.6和 16 mg d<sup>-1</sup>.在培养过程中,每个月更换 50%的培养基质.本研究使用实验室培养的第 3代螺.

### 2.3 沉积物的镉加标处理和毒性实验方法

Cd加标所用沉积物的处理与实验动物培养所用人工沉积物完全相同. Cd加标系列标称含量为:0(对照)、1.5、25、100和 200 mg kg<sup>-1</sup>(以干重计).先用去离子水配制 1 g L<sup>-1</sup>的 Cd储备液(以纯 Cd计).加标前,先测定湿沉积物的干湿比,据此计算每个处理所需湿沉积物和相应 Cd储备液的量.然后按 1:1的体积比进行混合(Cd储备液的体积以去离子水补足),用干净的小木铲搅拌至少 1 h.玻璃缸在室温下储存 30 d.在储存期间,每隔 3d对加标沉积物充分搅拌 1次以使 Cd在沉积物中均匀分布(Simpson *et al.*, 2004).对照沉积物按相同方式进行处理.

按沉积物与上覆水体积比 1:4的比例,将每个处理的测试沉积物分别加到 5个重复测试缸(4 L)中.测试缸中加上覆水(去氯自来水)至满,加水过程尽可能减少对沉积物的扰动.所有测试缸置于一个水浴控温的有机玻璃容器中,静置 24 h,以建立氧化还原梯度.所用实验螺为刚刚达到性成熟的 4月龄左右的雌螺,壳长为(16.83 ± 1.18) mm.将所选实验螺随机分组,每组 10只,测量其壳长.然后放入各个测试缸中,采用上覆水连续更新的方式进行毒性测试.上覆水更新速率为 10 mL·m<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>,维持测试缸中足够的溶氧(4 mg L<sup>-1</sup>).其它条件与培养条件相同.每天投喂 1次,每隔 3 d检查 1次水质,暴露实验持续 28 d.

### 2.4 测定

2.4.1 沉积物中镉含量的测定 实验开始和结束时,采用盐酸-硝酸-高氯酸-氢氟酸消解法和火焰原子吸收法(董炜峰等, 2006)在 TAS-990原子吸收分光光度计上测定沉积物中总 Cd含量.

2.4.2 取样 实验后,对各个测试缸的沉积物进行过筛,测定螺的壳长并计算壳长增长率.取其肝胰脏和肾脏,将肝、胰脏平均分割为两部分,称重后,放入液氮中保存备测.

2.4.3 肝胰脏中 SOD、CAT 和 GSH 的测定 取肝每个螺的肝胰脏样品,每克肝胰脏样品加入 4 mL 0.01 mol L<sup>-1</sup>、pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液(0.0001 mol L<sup>-1</sup> EDTA-2Na, 0.01 mol L<sup>-1</sup> 蔗糖和 0.8% NaCl 混合而成),用玻璃匀浆器在冰浴中制成匀浆,于 4℃、10000 r min<sup>-1</sup>下离心 10 min,取上清液,即得 20%的匀浆.分别取 40和 20 μL 的匀浆稀释成 10%和 1%的匀浆液,置液氮中保存备测.蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法;SOD 活性的测定采用羟胺法;CAT 活性的测定采用紫外分光光度法;GSH 的测定采用 DTNB 显色法.具体测定操作和计算按南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书进行.其中, SOD 和 CAT 活性以活力单位(U·mg<sup>-1</sup>和 U·g<sup>-1</sup>,以蛋白计)表示.

2.4.4 肝胰脏和肾脏中 MT 的测定 由于肾脏样品较小,在制备样品时,将 5个测试缸的所有肾脏样品合并为 1个样品.取肝胰脏或肾脏样品,按每克加入 4 mL 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 8.6 的 Tris-HCl 缓冲液(含有 0.25 mol L<sup>-1</sup>蔗糖)的比例,用玻璃匀浆器在冰浴中制成匀浆.于 4℃、12000 r min<sup>-1</sup>下离心 1.5 h,取上清液,保存于 -20℃冰箱中备测.采用血红蛋白/镉饱和法测定 MT,参照 Kuroshima(1995)、林筑等(2001)和加春生等(2007)的方法,并加以修改:取匀浆上清液 100 μL,加入 100 μL 缓冲液和 20 μL 0.25 mg mL<sup>-1</sup> Cd 溶液,充分混匀,室温(20℃)下放置 10 min,再加入 100 μL 9% 牛血红蛋白,混匀后,100℃加热 2 min,冰上冷却;然后在 4℃、10000 r min<sup>-1</sup>下离心 5 min.将加入血红蛋白、沸水浴和离心的过程重复 2次,最后取上清液 1.0 mL,用石墨炉原子吸收法测 Cd 含量.按 1 mol MT 结合 7 mol Cd 以及 Cd-MT 的相对分子量为 7000 的换算原则(Hamilton *et al.*, 1987),将 Cd 含量换算成 MT 含量(μg g<sup>-1</sup>,以湿重计).

### 2.5 统计分析

实验数据采用 SPSS13.0 进行统计分析.对实验数据先进行正态分布检验并做适当的数据转换,然后利用单因素方差分析法(ANOVA)和多重比较检验法(LSD)进行组间差异显著性检验,差异显著性水平为 0.05.实验结果以平均值 ± 标准差表示.

## 3 结果(Results)

### 3.1 实验前后加标沉积物中镉含量的变化

实验前后加标沉积物中 Cd 含量的变化结果如

表 1 所示.从表 1 可以看出,暴露实验开始前,当 Cd 的加标含量小于或等于  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (以干重计),沉积物中 Cd 的实测含量(扣除背景值后)与加标含量基本一致;当加标含量为  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Cd 的实测含量稍低于加标含量.说明实验沉积物的 Cd 加标处理程序具有很好的加标效率.在高加标含量下,沉积物与 Cd 的结合容量可能已经达到饱和. 28 d 暴露实验结束后,沉积物样品中 Cd 的含量没有出现显著的下降(配对样本 *t* 检验,  $p = 0.12$ ),说明采用上覆水连续更新方式进行 Cd 加标沉积物毒性测试是可行的.因此,本文实验结果中沉积物的 Cd 含量以实验前后沉积物中 Cd 的实测含量平均值表示.

表 1 暴露实验开始时和结束时加标沉积物中 Cd 的实测含量 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,以干重计)

Table 1 Total particulate Cd concentrations ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  dry weight) in the sediments at the beginning and end of the test

加标含量	实验前 实测含量	实验后 实测含量	实验前后 实测平均值
0	1.38±0.18	1.39±0.26	1.38
1	2.63±0.29	2.58±0.40	2.61
5	6.28±0.42	6.13±0.31	6.21
25	26.69±0.97	24.90±0.60	25.80
100	103.90±2.87	103.38±1.43	103.64
200	189.69±2.69	186.75±1.64	188.22

### 3.1 镉加标沉积物对铜锈环棱螺生长的影响

实验条件下,不同 Cd 含量加标沉积物处理组均未出现死亡个体,螺壳长度都表现出增长趋势(见图 1).特别是在最低 Cd 含量 ( $2.61 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 处理下,螺壳的增长率 ( $4.05\% \pm 0.33\%$ ) 显著高于对照组 ( $2.49\% \pm 0.40\%$ );随着 Cd 暴露含量的增

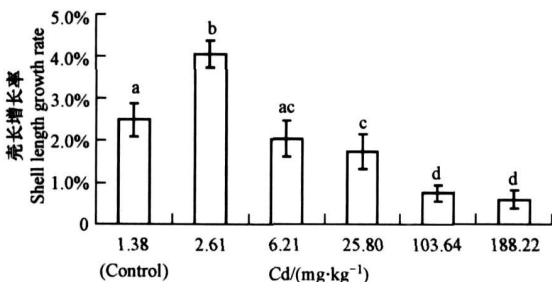


图 1 不同 Cd 含量 28d 暴露对铜锈环棱螺生长的影响(处理间无相同字母者表示差异显著,  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ,下同)

Fig. 1 Effects of various concentrations of Cd on the growth of *Bellanya aeruginosa* following 28d exposure (Treatments without same letter differed significantly  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ . The same below.)

加,壳长增长率开始下降.当 Cd 含量超过  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,生长速率显著下降.在高含量 Cd ( $103.64$  和  $188.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 作用下,壳长增长率出现较大幅度的下降,分别仅为对照组的 30.17% 和 24.05%.

### 3.2 镉加标沉积物对铜锈环棱螺肝胰脏中 SOD、CAT 和 GSH 的影响

不同 Cd 含量加标沉积物对铜锈环棱螺肝胰脏中 SOD、CAT 和 GSH 的影响如图 2 所示.从图 2 可以看出,28 d 暴露实验后,与对照组相比,除最低 Cd 含量处理组 ( $2.61 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 外,其它 Cd 含量处理组中铜锈环棱螺的肝胰脏 SOD 和 CAT 活性均表现为显著的升高. Cd 对 SOD 和 CAT 活性诱导的最低可观察效应含量均为  $6.21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,在此含量下, SOD 和 CAT 活性分别为对照组的 1.34 和 1.48 倍.当 Cd 含量为  $103.64 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, SOD 活性达到最大值 ( $51.41 \pm 5.21$ )  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,为对照组的 1.47

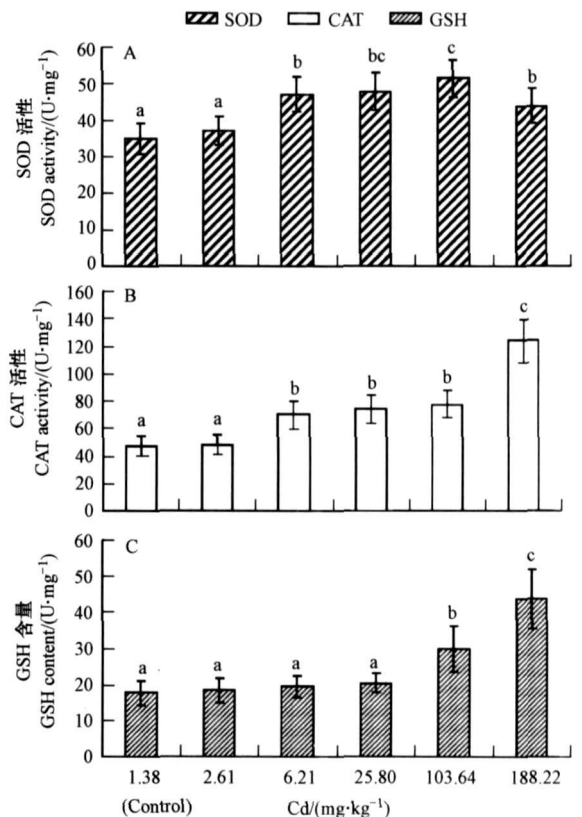


图 2 不同含量 Cd 28d 暴露对铜锈环棱螺肝胰脏超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽 (GSH) 的影响

Fig. 2 Effects of various concentrations of Cd on the hepatopancreatic superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione (GSH) of *Bellanya aeruginosa* following 28-d exposure

倍;在最大 Cd含量 ( $188.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )时, SOD 活性出现显著的下降,为  $(43.90 \pm 4.88) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,与最低可观察效应含量 ( $6.21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )时的 SOD 活性相当. 加标沉积物中 Cd对 CAT活性的影响呈现出与 SOD不同的变化趋势. 当 Cd含量为  $6.21$ 、 $25.80$  和  $103.64 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, CAT活性与对照组相比虽有显著升高,但不随 Cd含量的增加而升高,而是维持在相对稳定的水平(约为  $70 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ );在最大 Cd含量 ( $188.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )时, CAT活性表现为急剧升高,达到  $(123.90 \pm 15.81) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,为对照组的 2.6倍. 与对照组相比,低含量 Cd( $\leq 25.80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )对铜锈环棱螺肝胰脏 GSH水平没有显著影响;高含量 Cd( $103.64$ 和  $188.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )则显著提高肝胰脏 GSH水平 ( $(29.33 \pm 6.37)$ 和  $(43.75 \pm 8.18) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ),分别为对照组的 1.69和 2.48倍,对 GSH具有明显的诱导作用.

### 3.3 镉加标沉积物对铜锈环棱螺肝脏和肾脏中 MT水平的影响

不同含量 Cd加标沉积物对铜锈环棱螺肝胰脏和肾脏 MT水平的影响如图 3所示. 从图 3可以看出,随着 Cd含量的升高,肝胰脏和肾脏中 MT水平呈现不同的变化趋势. 在低含量 Cd( $2.61$ 和  $6.21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )时,螺的肝胰脏和肾脏组织中 MT的水平分别与其相应对照组 ( $(8.67 \pm 2.39)$ 和  $(7.30 \pm 1.40) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )相比均没有显著差异. 加标沉积物中

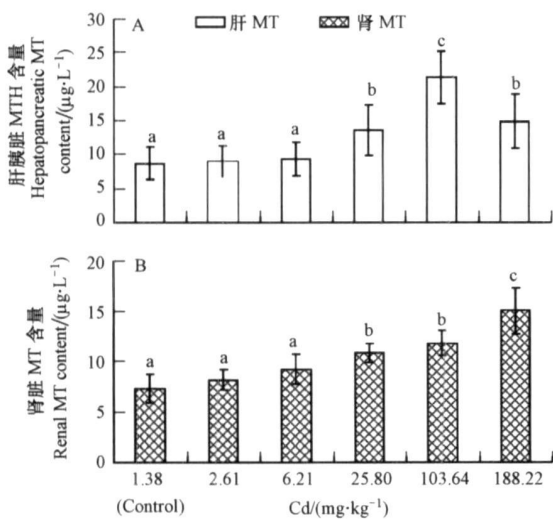


图 3 不同含量镉 28d 暴露对铜锈环棱螺肝脏和肾脏中金属硫蛋白 (MT)含量的影响

Fig. 3 Effects of various concentrations of Cd on the hepatopancreatic and renal metallothionein contents of *Bellamya aenuginosa* following 28d exposure

Cd对铜锈环棱螺肝胰脏 MT影响的最低可观察效应含量为  $25.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . 当 Cd含量超过  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,肝胰脏中 MT的水平显著高于对照组,且表现为先升高后下降的变化规律;当 Cd含量为  $103.64 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, MT水平达到最高值 ( $21.32 \pm 3.93) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  (以湿重计),为对照组的 2.46倍;在最大 Cd含量 ( $188.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )时, MT回落至与最低可观察效应含量 ( $25.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )相当的水平. 与肝胰脏相比,当 Cd含量超过  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,肾脏中 MT水平随 Cd含量的增加而持续升高,显著高于对照组;在最高含量的 Cd ( $188.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )作用下, MT达到  $(15.02 \pm 2.32) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,为对照组的 2.06倍.

## 4 讨论 (Discussion)

在本实验中,不同浓度 Cd处理组与对照组之间壳长增长速率的差异显著性比较结果表明,加标沉积物中 Cd对铜锈环棱螺壳长增长率抑制的最低可观察效应含量为  $25.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . 高于此含量,生长速率会快速下降,但高 Cd含量 ( $103.64$ 和  $188.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )处理组螺的摄食率并没有下降(没有出现食物残留). 因此,增长率的下降应该与氧化胁迫所导致的过多能量支出有关 (Mosleh *et al.*, 2007). Ducrot等 (2006)研究表明, Zn污染沉积物可以降低鱼盘螺 (*V. piscinalis*)的壳长增长率. 因此,螺的壳长增长率可以作为指示沉积物重金属污染慢性胁迫的有效生物标志物. Calabrese等 (2008)研究还发现,在低含量 Cd长期胁迫后,螺的生长速率显著升高,并出现明显的毒物兴奋效应,说明低含量 Cd对螺的生长具有刺激作用.

SOD和 CAT是生物体内抗氧化防御系统中的关键酶类,可以清除体内多余的活性氧,从而防止机体的氧化损伤. SOD主要将细胞内的超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^-$ )歧化为  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,然后 CAT将  $\text{H}_2\text{O}_2$ 转化为  $\text{H}_2\text{O}$ . 当机体受到外源性物质的氧化胁迫时,其活性会出现不同程度的改变. 因此, SOD和 CAT常作为指示环境污染胁迫的重要生物标志物 (Geracitano *et al.*, 2002). 在本研究中,沉积物中较低浓度 Cd ( $6.21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )即可诱导铜锈环棱螺肝胰脏 SOD和 CAT活性显著升高,二者对 Cd胁迫显示出较高的敏感性. 此外,高含量 Cd ( $188.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )导致 SOD活性回落至低含量 Cd ( $6.21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )处理时的水平,但没有观察到 CAT活性的下降. 因此, SOD

对 Cd胁迫的敏感性要高于 CAT.

GSH是一种含巯基的三肽,它可通过谷胱甘肽-S转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和谷胱甘肽还原酶(GR)对活性氧(如 $H_2O_2$ )的清除发挥一定的作用;同时可通过其所含巯基与重金属结合进行解毒.因此,Cd可能通过消耗细胞内的GSH来削弱机体的抗氧化能力(Anderson 1997).本研究表明,在环境相关水平( $2.61\sim 25.80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )Cd的长期胁迫下,GSH的响应并不明显,而在受到较高含量Cd( $103.64$ 和 $188.22\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )胁迫后GSH含量显著升高,这可能与机体内活性氧水平的高低有关.从图2可以看出,在Cd含量较低时,SOD和CAT活性的变化相对比较平缓,说明SOD和CAT可以有效地清除铜锈环棱螺体内所产生的活性氧,这时不需要消耗GSH;而在Cd含量较高( $188.22\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )时,SOD活性出现回落,说明此时铜锈环棱螺体内活性氧水平较高,这时CAT和GSH水平的显著升高有利于多余活性氧的清除.因此,在高含量Cd长期胁迫的情况下,GSH水平急剧升高可能是一种适应性调节(Kamiyama *et al*, 1995).

大多数研究表明,MT是一种可由重金属(如Cu、Zn和Cd)暴露诱导的胁迫相关蛋白.MT水平的升高意味着其与重金属结合容量的增加,从而增加对重金属解毒能力.因此,常被用作重金属污染胁迫的特异性生物标志物(Roesijadi 1994).在本研究中,当沉积物中Cd含量在 $25.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以上时,可显著诱导铜锈环棱螺肝胰腺和肾脏MT水平显著增加.但Cd含量过高时( $188.22\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),会导致肝胰腺MT水平有所回落,但并没有导致肾脏MT水平的回落.这说明肝胰腺中MT对Cd胁迫的应激性比肾脏要敏感,肾脏对高含量Cd的长期胁迫具有更大的耐受性.有研究表明,MT的诱导还与机体受到的氧化胁迫有关,MT在防止细胞膜受到自由基损伤中发挥抗氧化作用(Tate *et al*, 2002; Mosleh *et al*, 2007).在本实验中,高浓度Cd胁迫下,在肝胰腺中所诱导的较高水平的MT也可能与较强的氧化胁迫有关.

## 5 结论 (Conclusions)

1)利用Cd加标沉积物对铜锈环棱螺进行的慢性毒性测试结果显示,铜锈环棱螺的抗氧化防御相关生物标志物和金属硫蛋白(MT)对环境相关水平

Cd胁迫具有相对较高的敏感性.除GSH相对不敏感外,铜锈环棱螺的壳长增长率、SOD、CAT和MT均可用作重金属污染沉积物慢性胁迫的有效生物标志物,尤其是壳长增长率、肝胰腺SOD和CAT可以用作指示低水平Cd污染沉积物长期污染胁迫的敏感生物标志物.

2)铜锈环棱螺的实验室培养和毒性试验操作容易进行,可以考虑将铜锈环棱螺作为我国淡水沉积物毒性评价的候选物种.以后的研究是进一步探讨该物种对淡水沉积物中存在的持久性有毒污染物的急性和慢性敏感性,并发展一些敏感性的测试终点和生物标志物.

责任作者简介:马陶武(1968—),男,博士,副教授,研究方向:水生毒理学,环境生物学. E-mail: mtw922@163.com.

## 参考文献 (References):

- Adams W J, Kinler R A, Bamett Jr J W. 1992. Sediment quality and aquatic life assessment [J]. *Environ Sci Technol* 26: 1865—1875
- Anderson B, Nicely P, Gilbert K, *et al*. 2004. Overview of Freshwater and Marine Toxicity Tests: A Technical Tool for Ecological Risk Assessment [R]. California: California Environmental Protection Agency Office of Environmental Health Hazard Assessment Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section Ecotoxicology Unit 1—147
- Anderson M E. 1997. Glutathione and glutathione delivery compounds [J]. *Adv Pharmacol* 38: 65—78
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 2003. Test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates [R]. E1706—2002. Philadelphia, PA: ASTM, 18—23
- Calabrese E J. 2008. Homesis: Why it is important to toxicology and toxicologists [J]. *Environ Toxicol Chem*, 27(7): 1451—1474
- 陈其羽, 宋宝贵. 1975. 铜锈环棱螺繁殖和生长的初步研究 [J]. *水生生物学集刊*, 5(4): 519—534
- Chen Q Y, Song G B. 1975. A preliminary study on reproduction and growth of the snail *Bellamya aeruginosa* (Veeve) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 5(4): 519—534 (in Chinese)
- Ducrot V, Cognat C, Mons R, *et al*. 2006. Development of rearing and testing protocols for a new freshwater sediment test species: The gastropod *Valvata piscinalis* [J]. *Chemosphere* 62: 1272—1281
- 董炜峰, 蓝虹, 曹宇峰, 等. 2006. 常压消化体系-原子吸收分光光度法测定海洋沉积物中Cu、Pb、Zn、Cd、Cr [J]. *海洋环境科学*, 25(增刊1): 90—92
- Dong W F, Lan H, Cao Y F, *et al*. 2006. Determination of Cu, Pb, Zn, Cd, Cr in marine sediment by AAS under normal pressure digest system [J]. *Marine Environmental Science*, 25(Suppl. 1):

- 90—92 ( in Chinese)
- Duft M, Schmitt C, Bachmann J *et al*. 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals—an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* [ J ]. *Ecotoxicology* 16: 169—182
- Geracitano L, Monsemet J M, Bianchini A. 2002. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (*Polydora Nereididae*) to copper [ J ]. *Exp Marine Biol Ecol* 277: 145—156
- Hamilton S J, Mehrle P M, Jones J R. 1987. Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout [ J ]. *Trans Am Fish Soc* 116: 551—560
- 加春生, 李金龙, 徐世文. 2007. 镉致鸡血管氧化应激与金属硫蛋白含量的变化 [ J ]. *生态毒理学学报*, 2(2): 178—183
- Jia C S, Li J L, Xu S W. 2007. Effects of cadmium on oxidative stress and metallothionein of blood vessel in hens [ J ]. *Asian Journal of Ecotoxicology* 2(2): 178—183 ( in Chinese)
- Kamijana T, Miyakawa H, Li J P, *et al*. 1995. Effects of one-year cadmium exposure on livers and kidneys and their relation to glutathione levels [ J ]. *Res Commu Mol Pathol Pharmacol* 88: 177—186
- Kuroshima R. 1995. Hepatic metallothionein and glutathione levels in red sea bream [ J ]. *Comp Biochem Physiol* 110C(1): 95—100
- 李仁英, 杨浩. 2007. Cd 和 Zn 在滇池沉积物中的吸附-解吸特征 [ J ]. *土壤*, 39(2): 274—278
- Li R Y, Yang H. 2007. Adsorption and desorption characteristics of Cd and Zn in sediments of Lake Dianchi [ J ]. *Soils* 39(2): 274—278 ( in Chinese)
- 林筑, 任宏伟, 茹炳根. 2001. 鱼体内金属硫蛋白与水环境关系的研究 [ J ]. *北京大学学报(自然科学版)*, 37(6): 779—784
- Lin P, Ren H W, Ru B G. 2001. Study of metallothionein in fishes for Donghu aquatic environment [ J ]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis* 37(6): 779—784 ( in Chinese)
- 马力, 杨晓波, 边维勇, 等. 2007. 矿山开采对辽宁柴河流域生态环境的影响 [ J ]. *岩矿测试*, 26(4): 293—297
- Ma L, Yang X B, Bian W Y, *et al*. 2007. The Influence of mine exploitation on ecological environment of Chahe drainage area of Liaoning Province [ J ]. *Rock and Mineral Analysis* 26(4): 293—297 ( in Chinese)
- Mosleh Y Y, Paris-Pakcijs S, Ahmed M T, *et al*. 2007. Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta Tubificidae) [ J ]. *Chemosphere*, 67: 167—175
- Oeiken M, Nentwig G, Löffler D, *et al*. 2005. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I: The antiepileptic drug carbamazepine [ J ]. *Arch Environ Contam Toxicol* 49: 353—361
- Pasteris A, Vecchi M, Reynoldson T B, *et al*. 2003. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta Tubificidae): a comparison of the 28-day reproductive bioassay with a 6-month cohort experiment [ J ]. *Aquat Toxicol* 65: 253—265
- Roesijadi G. 1994. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals [ J ]. *Environ Health Perspect* 102 (Supplement): 91—95
- Simpson S L, Angel B M, Jolley D F. 2004. Metal equilibration in laboratory-contaminated (spiked) sediments used for the development of whole-sediment toxicity tests [ J ]. *Chemosphere* 54: 597—609
- 宋志慧, 陈天乙, 马维琦. 1997. 有机锡化合物对萝卜螺的毒性作用 [ J ]. *环境科学*, 18: 83—84
- Song Z H, Chen T Y, Ma W Q. 1997. Toxicity of organotin to *Radix plicatula* [ J ]. *Environmental Science* 18: 83—84 ( in Chinese)
- Tate D, Miceli M V, Newsome D A. 2002. Expression of metallothionein in human choroidretinal complex [ J ]. *Curr Eye* 24: 12—25
- USEPA (U. S. Environmental Protection Agency). 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, second ed [ R ]. EPA-600/R-99-064. Washington, DC: Office of Research and Development, Duluth, MN and Office of Science and Technology, 38—46
- 杨丽华, 方展强, 郑文彪, 等. 2003. 镉对鲫鱼鳃和肝脏超氧化物歧化酶活性的影响 [ J ]. *安全与环境学报*, 3(3): 13—16
- Yang L H, Fang Z Q, Zheng W B, *et al*. 2003. Experiment with effect of cadmium on activity of superoxide dismutase in gill and liver tissue of crucian [ J ]. *Journal of Safety and Environment* 3(3): 13—16 ( in Chinese)
- 张春丹, 黄福勇, 李祥云, 等. 2006. 镉胁迫条件下大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) 外周血微核标记及肝脏过氧化物酶标记的变化 [ J ]. *海洋与湖沼*, 37(1): 7—13
- Zhang C D, Huang F Y, Li M Y, *et al*. 2006. Cadmium-induced changes in the markers of erythrocyte microkern and peroxylases in liver of *Boleophthalmus pectinirostris* [ J ]. *Oceanologia et Limnologia Sinica* 37(1): 7—13 ( in Chinese)
- Zhang D W, Xie P, Liu Y Q, *et al*. 2007. Bioaccumulation of the hepatotoxic microcystins in various organs of a freshwater snail from a subtropical Chinese lake Taihu Lake with dense toxic microcystis blooms [ J ]. *Environ Toxicol Chem*, 26: 171—176