

铜锈环棱螺对铅污染沉积物慢性胁迫的繁殖响应 和氧化应激反应敏感性

马陶武^{1,*}, 朱 程¹, 周 科¹, 刘 佳¹, 王子健²

(1. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000; 2. 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)

摘要: 利用底栖无脊椎动物进行沉积物毒性测试可以为沉积物质量评价提供直接的依据。铜锈环棱螺 (*Bellamya aeruginosa*) 在我国淡水水体中分布广泛, 具有重要的生态价值。对实验室培养的铜锈环棱螺进行环境相关水平铅加标沉积物 (39 ~ 433 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 的 42 d 暴露, 以评价该物种在 Pb 污染沉积物慢性胁迫下的繁殖响应和氧化应激反应敏感性。结果表明, 低浓度的铅对铜锈环棱螺的繁殖力没有影响, 当 Pb 浓度在中度污染水平以上 ($\geq 246 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 时, 繁殖力出现显著下降。较低浓度的铅 (66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 即可诱导肝脏抗氧化酶 SOD 和 CAT 的氧化应激, 但存在明显的性别差异, 雄性的敏感性高于雌性。高浓度的铅 (433 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 可致抗氧化酶的损伤。肝脏的谷胱甘肽 GSH 含量仅在最大 Pb 浓度时才出现显著下降。利用铜锈环棱螺的 42 d 繁殖测试可以反映中度铅污染沉积物的慢性毒性效应。肝脏 SOD 和 CAT 均可以作为沉积物中 Pb 慢性胁迫的潜在有效生物标志物, 雄性的 SOD 和 CAT 可以用作指示低水平 Pb 污染沉积物长期污染胁迫的敏感生物标志物, 在低浓度 Pb 胁迫下 GSH 的应激反应相对不敏感。

关键词: 沉积物; 铅; 铜锈环棱螺; 繁殖力; 氧化应激; 肝脏

文章编号: 1000-0933(2009)10-5350-08 中图分类号: Q178, Q958, X171 文献标识码: A

The reproductive reaction and oxidative stress responses sensitivity of *Bellamya aeruginosa* to the chronic exposure of lead-contaminated sediments

MA Tao-Wu^{1,*}, ZHU Cheng¹, ZHOU Ke¹, LIU Jia¹, WANG Zi-Jian²

1 College of Biology and Environmental Science, Jishou University, Jishou Hunan 416000, China

2 State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(10): 5350 ~ 5357.

Abstract: Sediment toxicity tests using benthic invertebrates can provide important evidence in the assessment of sediment quality. *Bellamya aeruginosa* is widely distributed as a dominant community member in aquatic ecosystems in China. In this study, adult *B. aeruginosa* from lab cultures were exposed for 42 d to sediments artificially spiked with lead (Pb) at environmentally relevant concentrations (39 – 433 $\mu\text{g g}^{-1}$) to evaluate their reproductive reaction and sensitivity of oxidative stress responses. The results showed that no reproductive toxicity was observed at relatively low Pb concentrations, whereas the fecundity was decreased significantly by 246 $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ or above. A relatively low Pb concentration (66 $\mu\text{g g}^{-1}$) led to significantly increased hepatopancreatic SOD and CAT activities with obvious differences between sexes; the oxidative stress responses of males to lead exposure were more sensitive than that of females. A high Pb concentration (433 $\mu\text{g g}^{-1}$) caused damage to the antioxidases. In contrast, glutathione (GSH) contents were only decreased significantly by the highest Pb concentration. The reproductive response of *B. aeruginosa* was indicative of the chronic toxicity of sediments moderately contaminated by Pb. While GSH was insensitive to the chronic stress of low concentrations of sedimental Pb,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20677021); 吉首大学科研基金资助项目

收稿日期: 2008-11-27; 修订日期: 2009-02-11

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: mtw922@163.com

hepatopancreatic SOD and CAT, especially in males, were potentially effective biomarkers indicating the chronic stress of low concentrations of sedimental Pb.

Key Words: sediment; lead; *Bellamya aeruginosa*; fecundity; oxidative stress; hepatopancreas

沉积物是水生态系统的重要组成部分,它一方面为水生生物提供生活场所和营养物质,另一方面又是各种有毒有害污染物的储存库。污染的沉积物不仅直接对水生生物的生长和繁殖以及整个群落结构等造成不利影响,而且有毒有害物质通过水生生物的富集,再经由食物链的传递作用对整个水生态系统以及人类健康构成潜在威胁^[1]。因此,对污染物而言,沉积物具有源和汇的双重作用,水体环境质量的变化与沉积物的环境质量存在着极为密切的关系^[2]。利用底栖无脊椎动物进行沉积物毒性测试可以为沉积物质量评价提供直接的依据^[3]。虽然国外已经建立了几种淡水沉积物毒性测试标准生物^[4, 5],但由于不同种类的底栖动物在地理分布、行为、生活方式和生理学特点等方面存在明显的差异,这些差异直接关系到毒性测试的敏感性和实验操作的可行性,目前许多研究正试图发展具有重要生态价值、实验室操作性强、对污染物敏感的底栖无脊椎动物作为淡水沉积物毒性测试生物^[6-8]。但在我国至今还没有建立一种用作淡水沉积物毒性评价的本土物种。铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)是属于腹足纲田螺科的淡水软体动物,该物种个体中等大小,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,是一种食碎屑者^[9]。该物种还是一些鱼类的食物,同时也被人们食用,在食物链中具有重要作用,因此,沉积物中污染物有可能通过该物种的生物富集作用转移到高营养级生物体内,最近的研究表明铜锈环棱螺对污染水体中的微囊藻毒素具有较强的富集作用^[10],因此,基于该物种的生物评价将有可能真实地反映沉积物的生态毒性。实验室培养结果表明该物种可以在实验室条件下成功培养,生命周期较短(4~5月),个体大小适中(成螺壳长在17 mm以上),实验操作方便。

铅(Pb)不是动物的必需微量元素,研究表明 Pb 慢性暴露可对水生动物产生多种毒性效应^[11-13],水环境中的 Pb 容易在水生动物体内富集^[14],并可能通过食物链的传递危害高营养级生物,其潜在的生态风险已经引起人们的广泛关注。水体沉积物的 Pb 污染主要源于各种工业生产活动,随着工业的发展,沉积物 Pb 的含量越来越高,已有的研究指出我国一些淡水水体沉积物中 Pb 的污染水平已经达到 160~490 mg·kg⁻¹^[15-19],远远超过沉积物质量指南中 Pb 的风险低值(ERL)47 μg·g⁻¹^[20],存在较大的生态毒性风险。但目前有关沉积物 Pb 污染对底栖无脊椎动物生态毒性的研究很少报道。本研究利用实验室培养的铜锈环棱螺进行 Pb 加标沉积物毒性测试,探讨铜锈环棱螺对 Pb 慢性暴露的繁殖响应和氧化应激反应的敏感性,为发展铜锈环棱螺作为沉积物毒性测试生物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 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);Pb(NO₃)₂、蔗糖、Tris、EDTA-2Na 以及其它试剂均为国产分析纯;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。

1.2 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⁻¹;总磷 TP 1147 mg·kg⁻¹)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,分析表明其具有相对较低的重金属背景值(Cr、Ni、Cu、Zn、Cd 和 Pb 的含量分别为 53.41、31.34、19.74、44.98、

$0.38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $19.97 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。按照 Pasteris 等的方法^[21]进行土壤的采集与处理:先用小木铲将 1~2 cm 的表层土壤去除,然后收集约 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 的尼龙筛对土壤进行过筛以去除粗颗粒。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。经过这种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。培养条件为:水温 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$;光照强度 28W 荧光灯;光照周期 12 h 白昼 12 h 黑暗;去氯自来水的水质为 pH 7.99、电导率 $267 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$,总氮 $0.41 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,碱度 $2.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,硬度 $78.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;上覆水的溶氧保持在 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上(通过调节水的循环速率实现)。在培养过程中,每个月更换 50% 的培养基质。成螺的驯化和培养密度为 150 只/缸⁻¹,雌雄比为 2:1(自然种群雌雄比为 2~3:1),适时收集同批出生的幼螺并转移到新培养缸中进行培养,密度为 500 只/缸⁻¹,2 个月后雌雄分开培养,密度调整为 300 只/缸⁻¹,4 个月后,密度调整为 150 只/缸⁻¹。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),质控分析显示,所检测到的有害重金属 Pb 为 $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (限量标准 5~10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)、Cd 为 $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (限量标准 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)、Cr 为 $0.27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (限量标准 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。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 $16 \text{ mg}\cdot\text{螺}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.3 沉积物的铅加标处理和毒性测试

Pb 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。Pb 加标系列标称浓度为:0、20、50、125、200 和 $500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重。该浓度范围涵盖了沉积物质量指南中 Pb 的风险低值(ERL) $47 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、可能效应浓度(PEL) $112 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、风险中值(ERM) $218 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和最低明显效应阈值(LAET) $450 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[20, 22]。按照 Simpson 等的方法^[23]对沉积物进行 Pb 加标处理,先用去离子水配制 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Pb 储备液(采用 Pb(NO_3)₂,以纯 Pb 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 Pb 储备液的量,然后按 1:1 的体积比在圆形玻璃缸中进行混合(Pb 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。加标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一次以使 Pb 在沉积物中达到均匀的分布^[24]。对照沉积物除不加 Pb 外按相同方式进行处理。实验开始前,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加到 5 个重复测试缸(4 L)中,然后小心地加满上覆水,尽可能减少对沉积物的扰动,将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,以建立氧化还原平衡。所用实验螺为 5 月龄、雌雄分开培养的成螺,雌、雄螺壳长分别为 (19.03 ± 1.19) 和 $(18.18 \pm 0.876) \text{ mm}$ 。实验开始时,先将所选实验螺随机分组,每组雌螺 10 只、雄螺 8 只,然后放入每个测试缸中,采用上覆水连续更新方式进行毒性测试^[24, 25],上覆水的更新通过多通道蠕动泵(重庆杰恒)来实现,更新速率为 $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 以维持测试缸中足够的溶氧($4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。对每个测试缸加盖尼龙网,中间留一个直径为 5 cm 的孔,供喂食之用。其它条件与培养条件相同。每天投喂一次,并收集每个测试缸中出生的小螺,计数后弃去。每天检查温度和溶氧,每隔 3d 检查 1 次硬度、碱度、电导、pH 和总氮^[4],暴露实验持续 42 d。在实验开始和结束时,收集每个处理的沉积物样品,采用盐酸-硝酸-高氯酸-氢氟酸消解法和火焰原子吸收法在 TAS-990 原子吸收分光光度计上测定沉积物中总 Pb 浓度。由于实验前后每个处理的沉积物中 Pb 实测浓度没有显著的变化,所以在实验结果中沉积物浓度以暴露前后沉积物 Pb 实测浓度的平均值表示,分别为 20、39、66、136、246、433 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重。

1.4 取样

实验结束后,对每个测试缸的沉积物进行过筛,计数存活和死亡(壳残留)的小螺,并累积每日的小螺数,计算雌螺的繁殖力;对于存活的实验螺,用钳子夹破螺壳,从内脏团中分离出肝胰脏,称重,立即放入液氮中保存备测。

1.5 肝胰脏中 SOD、CAT 和 GSH 的测定

所有指标的测定均以单个个体的肝胰脏样品进行,首先取肝胰脏样品,按 1g:4mL 加入含 $0.0001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA-2Na、 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 0.8% NaCl 的 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液,用玻璃匀浆器在冰浴中制成匀浆,于 4°C 、 $10000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,取上清液,即得 20% 匀浆,然后分别取适量样品稀释成

10% 和 1% 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;超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用羟胺法;过氧化氢酶(CAT)活性的测定采用紫外分光光度法;还原性谷胱甘肽(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 活性以活力单位表示(图 1 和图 2)。

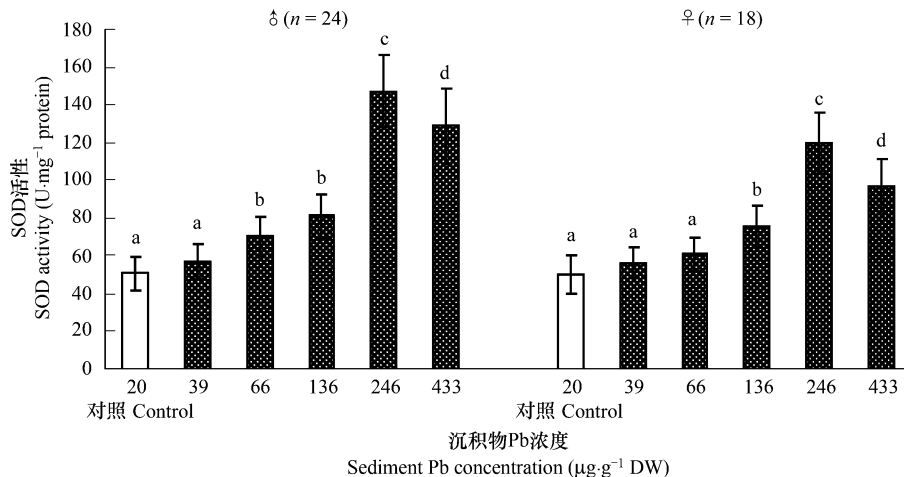


图 1 铅加标沉积物 42 天暴露后对铜锈环棱螺肝胰脏的 SOD 活性

Fig. 1 The hepatopancreatic SOD activities of *Bellamya aeruginosa* following 42-d exposure to the Pb-spiked sediments

处理间无相同字母者表示差异显著, $p < 0.05$, LSD 多重比较检验 Treatments without same letter differed significantly, $p < 0.05$, LSD multiple comparison test

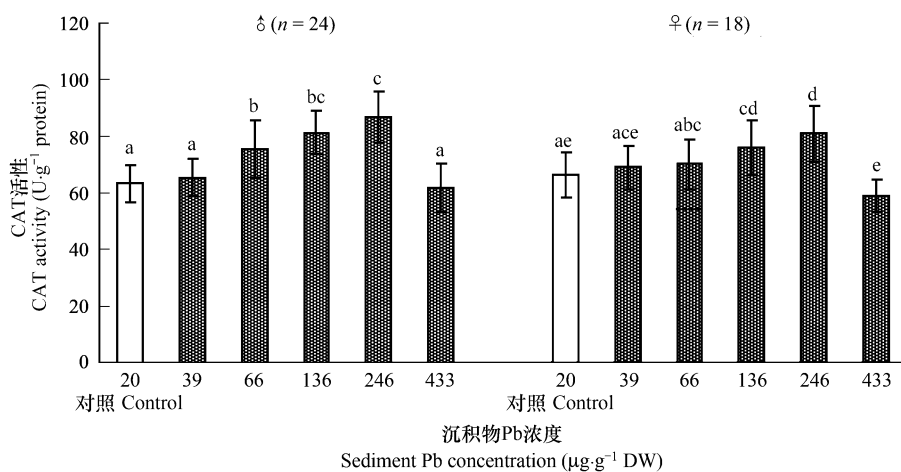


图 2 铅加标沉积物 42 天暴露后对铜锈环棱螺肝胰脏的 CAT 活性

Fig. 2 The hepatopancreatic CAT activities of *Bellamya aeruginosa* following 42-d exposure to the Pb-spiked sediments

处理间无相同字母者表示差异显著, $p < 0.05$, LSD 多重比较检验 Treatments without same letter differed significantly, $p < 0.05$, LSD multiple comparison test

1.6 统计分析

实验数据采用 SPSS13.0 进行统计分析,运用单因素方差分析(ANOVA)进行处理间的差异显著性比较。对于繁殖力指标,限于相对较少的数据样本,采用非参数 Mann-Whitney U 检验法分析对照组与处理组的差异显著性;对于其它指标,先进行正态分布检验并做适当的数据转换,然后利用多重比较检验法(LSD 检验)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 $\pm$ 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 铅加标沉积物对铜锈环棱螺繁殖力的影响

42 d 暴露实验结束后,每个处理组中雌螺存活数、出生的小螺数和繁殖力如表 1 所示。不同处理组中雌螺的存活率均在 90% 以上,高于美国环保局所推荐的沉积物慢性毒性测试中测试生物最低存活率标准(80%)^[4],表明 Pb 加标沉积物对铜锈环棱螺的 42 d 繁殖实验所采用的测试条件是可行的。本实验中,雌螺的繁殖力以实验结束时每个存活雌螺的平均产螺数来表示,当 Pb 浓度为 39、66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 136 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,各处理组雌螺的繁殖力与对照组相比均没有显著差异;在高浓度 Pb 胁迫下,雌螺的繁殖力显著下降,约为对照组的 50%,较高浓度的 Pb 明显抑制铜锈环棱螺的繁殖成效。

表 1 铅加标沉积物 42d 暴露后铜锈环棱螺的繁殖力

Table 1 Fecundity of *Bellamya aeruginosa* following 42-d exposure to Pb-spiked sediments

Pb 浓度($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) Lead concentration	雌螺存活数 Female surviving	出生的小螺数 Total offspring	繁殖力(产螺数/雌) Fecundity (offspring/female)
20(Control)	9.3 $\pm$ 0.6	47.1 $\pm$ 8.7	5.1 $\pm$ 1.0
39	9.7 $\pm$ 0.6	51.7 $\pm$ 8.4	5.4 $\pm$ 0.9
66	9.7 $\pm$ 0.6	56.8 $\pm$ 7.5	5.9 $\pm$ 1.1
136	9.3 $\pm$ 0.6	48.4 $\pm$ 4.9	5.2 $\pm$ 0.8
246	9.0 $\pm$ 1.0	23.8 $\pm$ 2.5	2.7 $\pm$ 0.3 *
433	10.0 $\pm$ 0.0	24.4 $\pm$ 5.0	2.4 $\pm$ 0.5 *

* 表示与对照组相比差异显著($p < 0.05$, Mann-Whitney U 检验) Indicates a significant reduction in offspring relative to the control, using Mann-Whitney U test ($p < 0.05$)

2.2 铅加标沉积物对铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 和 CAT 活性的影响

不同浓度的 Pb 加标沉积物对铜锈环棱螺慢性胁迫 42 d 后,雌雄两性肝胰脏中抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性随 Pb 浓度升高而变化的情况如图 1 和 2 所示。在对照组中,雌雄两性之间肝胰脏 SOD 活性($p = 0.911$)和 CAT 活性($p = 0.497$)均没有显著差异。对于 SOD,当 Pb 浓度 $\geq 66 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,雄性 SOD 活性与对照组相比表现为显著升高,但沉积物中低浓度 Pb 没有诱导雌性 SOD 活性显著升高,当 Pb 浓度 $\geq 136 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,SOD 活性才表现为显著升高;当 Pb 浓度达到 246 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,雌雄两性 SOD 活性均急剧升高,并达到最大值(147.06 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 和 119.51 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白),分别为对照组的 2.90 倍和 2.38 倍;在最大 Pb 浓度时,雌雄两性的 SOD 活性与其最大值相比均显著下降,但仍高于对照组,分别为对照组的 2.54 倍和 1.93 倍。

对于 CAT,当 Pb 浓度为 66、136 和 246 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,雄性 CAT 活性显著高于对照组,当 Pb 浓度为 136 和 246 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,雌性 CAT 活性显著高于对照组;当 Pb 浓度为 246 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,雌雄两性 CAT 活性均达到最大值,分别对照组的 1.37 倍和 1.22 倍,而且在最大 Pb 浓度处理组,雌雄两性的 CAT 活性均回落至与对照组相当的水平。

2.3 铅加标沉积物对铜锈环棱螺肝胰脏中 GSH 含量的影响

不同浓度的 Pb 加标沉积物慢性胁迫对铜锈环棱螺肝胰脏 GSH 含量的影响见图 3。当 Pb 浓度在 39 ~ 246 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间时,雌雄两性肝胰脏 GSH 含量与对照组相比均没有显著性差异,仅在最大 Pb 浓度时,GSH 含量显著低于对照组,分别下降了 31% 和 54%。

3 讨论

生物的种群动态对受损生态系统的风险评价具有重要的生态相关性^[26~28]。繁殖力是反映动物种群动态的关键指标,水生动物在长期污染胁迫下,繁殖力下降是其种群受损的重要指示。现有沉积物慢性毒性测试研究表明,在评价重金属污染沉积物对底栖动物种群水平的不良效应时,繁殖力是比生长和存活指标更为敏感的测试终点^[7,24,29]。Ringenry 等^[24]的研究显示 Pb 加标沉积物导致底栖端足类 *Elasmopus laevis* 繁殖力显著降低的最低浓度为 234 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,在本实验中,当沉积物中 Pb 浓度为 246 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,铜锈环棱螺的繁殖力出

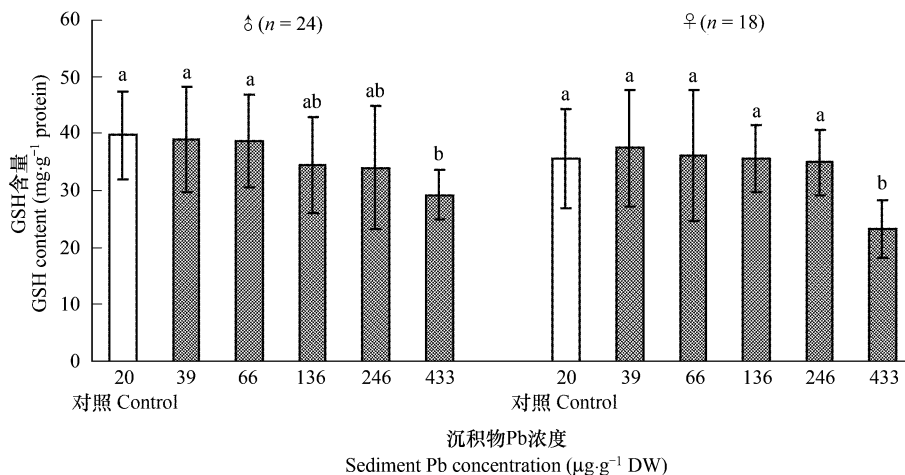


图3 铅加标沉积物 42 天暴露后对铜锈环棱螺肝胰脏的 GSH 含量

Fig. 3 The hepatopancreatic GSH contents of *Bellamya aeruginosa* following 42-d exposure to the Pb-spiked sediments

处理间无相同字母者表示差异显著, $p < 0.05$, LSD 多重比较检验 (Treatments without same letter differed significantly, $p < 0.05$, LSD multiple comparison test)

现显著下降,两者基本一致,而且与沉积物质量指南中 Pb 的风险中值 $218 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ [20] 接近。但需要指出的是,两种底栖动物的生命周期迥异 (*Elasmopus laevis* 的生命周期约为 1 个月,而铜锈环棱螺为 4~5 个月),两者所采用的测试策略也不同,前者采用的是幼体,本实验所采用的为成体,因此前者的繁殖力测试结果可能综合体现了 Pb 对性腺发育、性成熟、交配和胚胎发育等方面的影响,而本研究的测试结果只能体现 Pb 对动物的交配和胚胎发育等的影响。Lock 和 Janssen [30] 研究了 4 种重金属 Zn、Cd、Cu 和 Pb 对蚯蚓 *Enchytraeus albidus* 连续两代的繁殖毒性,结果表明全生命周期测试并没有提高对 4 种重金属胁迫的敏感性。对于铜锈环棱螺,采用未达到性成熟的个体是否可以提高 Pb 污染沉积物繁殖毒性测试的敏感性有待进一步研究。

抗氧化防御系统对活性氧具有清除作用,可以防止机体的氧化损伤,如果污染胁迫所致活性氧过多则会引起抗氧化防御系统的损伤,因此抗氧化防御系统成分的活性或含量的改变可以反映氧化胁迫的程度。抗氧化防御系统的关键酶——超氧化物歧化酶 SOD 和过氧化氢酶 CAT 已经被用作重金属诱导氧化应激的敏感生物标志物 [31],其中, SOD 主要将细胞内的超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 歧化为 H_2O_2 ,然后 CAT 将 H_2O_2 转化为 H_2O ,两者协调一致可以有效地清除活性氧。目前已知许多环境污染物可以引起一些水生动物体内活性氧水平升高,从而产生氧化应激反应 [32~34]。本研究表明,一定浓度的 Pb 加标沉积物长期暴露可致铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 和 CAT 出现明显的氧化应激反应,而且其活性随 Pb 浓度的增加而表现出基本协调一致的变化,但存在明显的性别差异, Pb 诱导雄性铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 和 CAT 活性显著升高的最低浓度为 $66 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,而对雌性的最低浓度为 $136 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,雄性的敏感性高于雌性。在较高浓度 Pb ($\geq 246 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 胁迫下, SOD 的应激反应比 CAT 更为强烈。在最大 Pb 浓度 ($433 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 处理组, SOD 和 CAT 活性均出现回落, CAT 活性仅维持在与对照组相当的水平,这说明细胞内过量的活性氧已经导致细胞及抗氧化酶的损伤,从而部分或全部抵消了自由基诱导的抗氧化酶活性的增强,使细胞清除活性氧的能力降低,这与贾秀英等 [35] 对两栖动物的研究结果基本一致。

谷胱甘肽 (GSH) 通常在动物的肝组织中含有最高,它是一种含巯基的非蛋白三肽,既作为抗氧化剂参与活性氧的清除,又是解毒酶系统的重要成员,通过其所含巯基与重金属结合进行解毒 [36]。肝组织中 GSH 水平的变化也常作为动物受重金属胁迫程度的生物标志物 [37]。研究表明,低浓度 Pb 长期暴露对鲫鱼肝脏 GSH 含量没有影响 [38],而高浓度 Pb 长期暴露则显著降低小鼠肝脏 GSH 的含量 [39, 40],本研究也得到了类似的结果,这说明 Pb 长期暴露对肝脏 GSH 的影响主要取决于其浓度。

4 结论

利用铜锈环棱螺成螺的繁殖测试可以反映沉积物中度铅污染胁迫的慢性毒性效应。就两种抗氧化酶对 Pb 的应激反应敏感性而言,铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 和 CAT 均可以作为沉积物中 Pb 慢性胁迫的有效生物标志物,尤其是雄性的 SOD 和 CAT 可以用作指示低水平 Pb 污染沉积物长期污染胁迫的敏感生物标志物,在低浓度 Pb 胁迫下 GSH 的应激反应相对不敏感。

References:

- [1] Adams W J, Kimerle R A, Barnett Jr J W. Sediment quality and aquatic life assessment. *Environmental Science & Technology*, 1992, 26(10): 1864—1875.
- [2] USEPA (United States Environmental Protection Agency). The incidence and severity of sediment contamination in surface waters of the United States. Office of Science and Technology, Washington, D C, EPA-823-R-04-007, 2004, 3.1—3.60.
- [3] Barber T R, Chappie D J, Duda D J, Fuchsman P C, Finley B L. Using a spiked sediment bioassay to establish a no-effect concentration for dioxin exposure to the amphipod *Ampelisca abdita*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1998, 17(3): 420—424.
- [4] USEPA (U. S. Environmental Protection Agency). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, second ed. Office of Research and Development, Duluth, MN and Office of Science and Technology, Washington, D C, EPA-600-R-99-064, 2000, 1—192.
- [5] ASTM (American Society for Testing and Materials). Test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. E/1706 95/b, 2000, 18—23.
- [6] Ducrot V, Cognat C, Mons R, Mouthon J, Garric J. Development of rearing and testing protocols for a new freshwater sediment test species: The gastropod *Valvata piscinalis*. *Chemosphere*, 2006, 62(8): 1272—1281.
- [7] Milani D, Reynoldson T B, Borgmann U, Kolasa J. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(4): 845—854.
- [8] Duft M, Schmitt C, Bachmann J, Brandelik C, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J. 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*. *Ecotoxicology*, 2007, 16(1): 169—182.
- [9] Chen Q Y, Song B G. A preliminary study on reproduction and growth of the snail, *Bellamya aeruginosa* (Veeve). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1975, 5(4): 519—534.
- [10] Zhang D, Xie P, Liu Y, Chen J, Liang G. Bioaccumulation of the hepatotoxic microcystins in various organs of a freshwater snail from a subtropical Chinese lake, Taihu Lake, with dense toxic microcystis blooms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26(1): 171—176.
- [11] Burden V M, Sandheinrich M B, Caldwell C A. Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Pollution*, 1998, 101(2): 285—289.
- [12] Ruby S M, Hull R, Anderson P. Sublethal lead affects pituitary function of rainbow trout during exogenous vitellogenesis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2000, 38(1): 46—51.
- [13] Pyatt A J, Pyatt F B, Pentreath V W. Lead toxicity, locomotion, and feeding in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). *Invertebrate Neuroscience*, 2002, 4(3): 135—140.
- [14] Ip C C M, Li X D, Zhang G, Wai O W H, Li Y. Heavy metal and Pb isotopic compositions of aquatic organisms in the Pearl River Estuary, South China. *Environmental Pollution*, 2005, 138(2): 494—504.
- [15] Shang Y N, Yin G, Yan Q S, Ni S J, Zhang C J. Lead pollution character of urban river sediments in Chengdu City. *Urban Environment & Urban Ecology*, 2005, 18(6): 40—42.
- [16] Ren N L, Ji S H, Zheng Y Y. Pollution characteristics of heavy metals in bottom sediments of the west lake of Chaozhou. *Guangdong Trace Elements Science*, 2007, 14(2): 47—50.
- [17] Duzgoren-Aydin N S. Sources and characteristics of lead pollution in the urban environment of Guangzhou. *Science of The Total Environment*, 2007, 385(1-3): 182—195.
- [18] Zhu Y L, Jiang J H, Huang Q, Sun Z D, Wang H J, Zhou Y K. Contents, distribution and correlation of Cd, Pb, Hg, As in water, sediment and organisms from East Dongting Lake and Datong Lake. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(4): 1377—1384.
- [19] Zhang F Y, Yan B X, Lu Y Z, Pan Y P, Xu Z G, Zhang F S. Distribution and potential ecological risk of Pb, As, Cr in Songhua River sediments. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(2): 726—730.
- [20] Long E R, MacDonald D D, Smith S L, Calder F D. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management*, 1995, 19(1): 81—97.
- [21] Pasteris A, Vecchi M, Reynoldson T B, et al. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae): a comparison of the 28-day reproductive bioassay with a 6-month cohort experiment. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65(3): 253—265.
- [22] MacDonald D D, Carr R S, Calder F D, Long E D, Ingersoll C R. Development and Evaluation of Sediment Quality Guidelines for Florida Coastal

- Waters. *Ecotoxicology*, 1996, 5(4): 253–278.
- [23] Simpson S L, Angel B M, Jolley D F. Metal equilibration in laboratory-contaminated (spiked) sediments used for the development of whole-sediment toxicity tests. *Chemosphere*, 2004, 54(5): 597–609.
- [24] Ringenary M J, Molof A H, Tanacredi J T, Schreiberman M P, Kostarelos K. Long-term sediment bioassay of lead toxicity in two generations of the marine amphipod *Elasmopus laevis*, S. I. Smith (1873). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26(8): 1700–1710.
- [25] Redmond M S, Scott J K, Swartz R C, Jones J K P. Preliminary culture and life-cycle experiments with the benthic amphipod *Ampelisca abdita*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1994, 13(8): 1355–1365.
- [26] McGee B L, Spencer M. A field-based population model for the sediment toxicity test organism *Leptocheirus plumulosus* II. Model application. *Marine Environmental Research*, 2001, 51(4): 347–363.
- [27] Chapman P M, Ho K T, Munns W R Jr, Solomon K, Weinstein M P. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 44(4): 271–278.
- [28] Manyin T, Rowe C L. Chronic exposure of *Leptocheirus plumulosus* to Baltimore Harbor sediment: Bioenergetic and population-level effects. *Marine Environmental Research*, 2006, 62(2): 116–130.
- [29] Gale S A, King C K, Hyne R V. Chronic sublethal sediment toxicity testing using the estuarine amphipod, *Melita plumulosa* (Zeidler): Evaluation using metal-spiked and field-contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(7): 1887–1898.
- [30] Lock K, Janssen C R. Multi-generation toxicity of zinc, cadmium, copper and lead to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Environmental Pollution*, 2002, 117(1): 89–92.
- [31] Geracitano L, Monserrat J M, Bianchini A. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (*Polychaeta Nereididae*) to copper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 277(2): 145–156.
- [32] Livingstone D R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(8): 656–66.
- [33] Atli G, Alptekin O, Tukul S, Canli M. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2006, 143(2): 218–24.
- [34] Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 64(2): 178–189.
- [35] Jia X Y, Dong A H, Ma X M. Affection of lead stress on antioxidant enzyme activities and malonyldialdehyde contents of *Bufo bufo gargarizans*. *China Environmental Science*, 2004, 24(2): 155–158.
- [36] Anderson M E. Glutathione and glutathione delivery compounds. *Advances in Pharmacology*, 1997, 38(1): 65–78.
- [37] Ruas C B G, Carvalho C d S, de Araújo H S S, Espíndola E L G, Fernandes M N. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(1): 86–93.
- [38] Chen L, Guo H Y, Shen H, Wang X R. Effect of trace lead on the antioxidant system of fish liver. *Environmental Chemistry*, 2002, 21(5): 485–489.
- [39] Pande M, Flora S J S. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of α -lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology*, 2002, 177(2-3): 187–196.
- [40] Liang J C, Wang C H, Zhang Y, Zhang C L, Wang C Q. DNA damage and changes of antioxidative enzymes in acetate lead poisoned mice. *Chinese Journal of Public Health*, 2006, 22(4): 457–458.

参考文献:

- [9] 陈其羽, 宋宝贵. 铜锈环棱螺繁殖和生长的初步研究. *水生生物学集刊*, 1975, 5(4): 519–534.
- [15] 尚英男, 尹观, 闫秋实, 倪师军, 张成江. 成都市河道表层沉积物(淤泥)铅污染特征. *城市环境与城市生态*, 2005, 18(6): 40–42.
- [16] 任乃林, 纪舜豪, 郑义阳. 潮州市西湖沉积物中金属元素的污染特性研究. *广东微量元素科学*, 2007, 14(2): 47–50.
- [18] 祝云龙, 姜加虎, 黄群, 孙占东, 王红娟, 周云凯. 东洞庭湖与大通湖水体沉积物和生物体中 Cd Pb Hg As 的含量分布及相互关系. *农业环境科学学报*, 2008, 27(4): 1377–1384.
- [19] 张凤英, 阎百兴, 路永正, 潘月鹏, 徐治国, 张丰松. 松花江沉积物中 Pb As Cr 的分布及生态风险评价. *农业环境科学学报*, 2008, 27(2): 726–730.
- [35] 贾秀英, 董爱华, 马小梅. 铅胁迫对蟾蜍抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响. *中国环境科学*, 2004, 24(2): 155–158.
- [38] 陈亮, 郭红岩, 沈红, 王晓蓉. 低浓度铅暴露对鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响. *环境化学*, 2002, 21(5): 485–489.
- [40] 梁建成, 汪春红, 张妍, 张春莲, 王程强. 醋酸铅染毒小鼠 DNA 损伤及体内抗氧化酶变化. *中国公共卫生*, 2006, 22(4): 457–458.