

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2012.03.009

6 种重金属对赤子爱胜蚓的急性毒性效应与风险评价

吴声敢, 王彦华, 吴长兴, 陈丽萍, 苍涛, 俞瑞鲜, 安雪花, 李岗, 赵学平*

省部共建国家重点实验室培育基地“浙江省植物有害生物防控重点实验室”, 农业部农药残留检测重点实验室, 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, 浙江杭州 310021

摘要:【背景】近年来,土壤重金属污染问题日益凸显,对生态环境、食品安全和人体健康构成了严重威胁,其急性毒性尚未明确。【方法】采用滤纸接触法和人工土壤法测定了铜(Cu^{2+})、锌(Zn^{2+})、镍(Ni^{+})、镉(Cd^{2+})、铅(Pb^{2+})和锰(Mn^{2+})等6种重金属对赤子爱胜蚓的急性毒性效应,并参照欧盟指令91/414/EEC标准评价了其环境风险。【结果】滤纸接触法48 h测定结果表明,6种重金属对蚯蚓的 LC_{50} 为 $3.17(2.53 \sim 3.81) \sim 90.42(69.45 \sim 140.47) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,其毒性次序为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ 。人工土壤法14 d测定结果表明,6种重金属对蚯蚓的 LC_{50} 为 $1347(1236 \sim 1453) \sim 6936(6144 \sim 8930) \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其毒性次序为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 。风险评价结果显示, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Mn^{2+} 等6种重金属的暴露比(toxicity/exposure ratio, TER)分别为3.37、4.46、8.68、1428、13.87和5.85。【结论与意义】6种重金属对土壤动物蚯蚓均具有潜在的毒性效应。 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{+} 、 Mn^{2+} 等4种重金属对赤子爱胜蚓存在急性毒性风险,而 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对赤子爱胜蚓的急性毒性风险水平是可接受的。该评价结果可为我国制定基于风险的土壤环境质量标准提供依据。

关键词: 重金属; 赤子爱胜蚓; 急性毒性; 风险评价

Acute toxicological effects and risk assessment of six heavy metals on the earthworm, *Eisenia foetida*

Sheng-gan WU, Yan-hua WANG, Chang-xing WU, Li-ping CHEN, Tao CANG, Rui-xian YU, Xue-hua AN, Gang LI, Xue-ping ZHAO*

State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Plant Pest Control, MOA Key Laboratory for Pesticide Residue Detection, Institute of Quality and Standard for Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China

Abstract: 【Background】The problem of heavy metal contamination in soil is recognised as a especially serious threat to the environment, food safety and human health. Acute toxicity data are not available for all heavy metals. 【Method】The acute toxicity effects of copper (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}), nickel (Ni^{+}), cadmium (Cd^{2+}), lead (Pb^{2+}) and manganese (Mn^{2+}) to the earthworm, *Eisenia foetida* Savigny, were determined by using the filter paper contact method and the artificial soil method. The environmental risk was assessed according to the Directive 91/414/EEC of the European Community. 【Result】The results of filter paper contact method at 48 h showed that the LC_{50} values of 6 heavy metals to *E. foetida*, were in the range of $3.17(2.53 \sim 3.81) \sim 90.42(69.45 \sim 140.47) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, and the toxicity order was $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. When using the artificial soil method, after 14 d exposure, the acute toxicity of 6 heavy metals to *E. foetida* (LC_{50}) was $1347(1236 \sim 1453) \sim 6936(6144 \sim 8930) \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and the toxicity order of the six metals was $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$. The toxicity/exposure ratio (TER) of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} and Mn^{2+} were 3.37, 4.46, 8.68, 1428, 13.87 and 5.85, respectively. 【Conclusion and significance】All 6 heavy metals had potential toxic effects on the earthworm. Based on the environmental quality standard for soils of China, the data of environmental risk assessment showed Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{+} and Mn^{2+} had potential acute risk to *E. foetida*, and the acute risk of Cd^{2+} and Pb^{2+} were acceptable. The results may provide useful reference information for China to develop risk-based environmental quality standard for soils.

Key words: heavy metal; *Eisenia foetida*; acute toxicity; risk assessment

随着市场经济的高速发展,人类对重金属的开采、冶炼、加工及商业制造等工业活动日益增多,造成许多重金属如铅、汞、镉、钴等大量进入大气、水体和土壤中,引起严重的环境污染,致使重金属污染事件频发。如 2005 年的广东北江韶关段镉严重超标事件,2006 年的湘江湖南株洲段镉污染事故,2009 年的湖南省浏阳市镉污染事件,“血铅超标”事件已涉及陕西、安徽、河南、湖南、福建、广东、四川、湖南、江苏、山东等省(叶铁桥,2012)。当前,我国重金属污染正由大气、水体向土壤转移,土壤重金属污染已进入一个“集中多发期”,对居民身体健康和农产品安全构成严重威胁。因此,对污染土壤进行毒理诊断和生态风险评价已成为环境科学工作者研究的焦点之一。

蚯蚓是常见的杂食性环节动物,在土壤生态系统中具有极其重要的地位,常被作为土壤污染的指示动物,广泛用于土壤生态毒性研究(刘廷凤等,2009)。其中,赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida* Savigny 因生活周期短、繁殖力强、易于饲养等特点而被广泛应用,是国际标准化测试方法中推荐的模式生物(周娟等,2008; ISO, 1993、1998; OECD, 1984、2004)。目前,有关土壤污染物对蚯蚓影响的研究主要集中于农药和重金属方面(赵学平等,2011; Bigorgne *et al.*, 2010; Ma & Bonten, 2011; Natal-da-Luz *et al.*, 2011; Udovic & Lestan, 2010; Wang *et al.*, 2012)。但在重金属污染的研究中,同一试验所选重金属种类较少(1~2 种),且试验条件各不一样,从而使得各重金属之间的生态效应可比性较差。已有研究表明,不同品种的蚯蚓对重金属的耐受性和累积能力不同(刘德鸿等,2005);不同形态的重金属对蚯蚓的影响也有差异(李许明等,2007; Bigorgne *et al.*, 2010);重金属在不同类型的自然土壤中对蚯蚓的毒性效应差异较大(解冬利等,2011; 周娟等,2008),人工土壤中黏土比例不同也影响重金属对蚯蚓的毒性效应(Owojori *et al.*, 2009b、2010);土壤有机质含量、温度、盐度等特性也影响重金属对蚯蚓的毒性效应(Khan *et al.*, 2007; Ming *et al.*, 2012; Natal-da-Luz *et al.*, 2011; Owojori *et al.*, 2008, 2009a)。此外,前人在研究过程中所采用的试验方法也不一致,有滤纸接触法(陈志伟等,2007)、人工土壤法(乔文鹏等,2007)和自然土壤法(宋玉芳等,2002; 解冬利等,2011; 周娟等,2008)。

因此,在比较不同重金属对蚯蚓的毒性效应时,蚯蚓品种的选择和试验方法的标准化显得尤为重要。

本文以模式生物赤子爱胜蚓为试验对象,采用 OECD 推荐的化学品对蚯蚓急性毒性的标准测定方法——滤纸接触法和人工土壤法(OECD, 1984)研究铜(Cu^{2+})、锌(Zn^{2+})、镍(Ni^{+})、镉(Cd^{2+})、铅(Pb^{2+})和锰(Mn^{2+})等 6 种重金属对蚯蚓的急性毒性效应,并根据欧盟指令 91/414/EEC 标准(EEC, 1991)对其环境风险进行评价,旨在明确重金属对蚯蚓的剂量—效应关系,为土壤污染暴露的早期预警提供依据,同时为我国制定土壤环境质量标准提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试生物 试验所用的赤子爱胜蚓由浙江大学动物科学学院蚯蚓养殖场提供。试验时选择 2 月龄以上、体重为 300~600 mg、环带明显且大小一致的健康成蚓。

1.1.2 供试重金属 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (99%, AR), 由浙江杭州萧山化学试剂厂提供; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99.5%, AR), 由温州市化学用料厂提供; $\text{NiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (98%, AR), 由上海精细化工科技有限公司提供; $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (99%, AR), 由上海金山亭新化工试剂厂提供; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (99%, AR), 由温州市化学用料厂提供; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99%, AR), 由上海试剂二厂提供。

1.2 试验方法

1.2.1 滤纸接触法 (1)向底部铺有一层滤纸的烧杯中加入少量蒸馏水,以刚浸没滤纸为宜。将蚯蚓放在滤纸上,用塑料薄膜封口,并用解剖针将塑料薄膜扎孔,将烧杯放入温度 19~21 °C、湿度 80%~85% 的恒温箱中清肠 1 d。(2)在直径 9 cm 的培养皿中垫入直径为 11 cm 的一层滤纸(滤纸包住培养皿边缘)。取用蒸馏水配制的一定浓度的药液 2 mL 于滤纸上,其中, Cu^{2+} 处理水平为 24.57、12.29、6.14、3.07、1.54、0.77 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, Zn^{2+} 处理水平为 49.15、24.58、12.29、6.14、3.07、1.54 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, Ni^{+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 的处理水平一样,均为 196.59、98.30、49.15、24.57、12.29、6.14 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。(3)将清肠后的蚯蚓冲洗干净,用滤纸吸去多余的水分后放入培养皿中(每皿 1 条),用塑料薄膜封口,用解剖针将塑料薄膜扎孔后置于温度 19~21 °C、湿度 80%~85% 的

恒温箱中黑暗培养。每个处理设 10 个重复,每个培养皿为 1 个重复。以不含药剂的处理为空白对照组。处理后 24 和 48 h 调查并记录蚯蚓中毒症状和死亡数,以蚯蚓前尾部对机械刺激无反应视为死亡。

1.2.2 人工土壤法 (1) 根据 OECD 推荐的标准方法配制人工土壤 (OECD, 1984), 分别将泥炭藓、高岭土、石英砂和碳酸钙按重量比 10: 20: 68: 2 加入搅拌机中,充分混匀后待用。(2) 将药剂用蒸馏水溶解后与 500 g 人工土壤混匀,并加入蒸馏水保持含水量 35% 左右。(3) 将上述含药剂的人工土壤放入 500 mL 玻璃标准瓶中,再向玻璃标准瓶中放入 10 条在未经农药处理的人工土壤中驯养 24 h 的蚯蚓。用塑料薄膜封口,用解剖针将塑料薄膜扎孔后置于温度 19 ~ 21 ℃、湿度 80% ~ 85% 的恒温箱中连续光照培养(光照度为 400 ~ 800 lx)。每种重金属设 6 个浓度,其中, Cu^{2+} 和 Ni^{+} 处理水平为 3000、2250、1688、1266、949.2、711.9 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, Zn^{2+} 处理水平为 3750、2813、2109、1582、1187、889.9 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, Cd^{2+} 处理水平为 2400、1800、1350、1013、759.4、569.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, Pb^{2+} 处理水平为 9375、7031、5273、3955、2966、2224 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, Mn^{2+} 处理水平为 5127、3845、2884、2163、1622、1217 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每个浓度设 3 个重复,同时以不含药剂的处理为空白对照组。试验第 7 和 14 天调查并记录蚯蚓中毒症状和死亡数,以蚯蚓前尾部对机械刺激无反应视为死亡。

1.2.3 数据处理 采用 DPS 9.50 软件中专业统计下的生物测定方法来计算重金属对蚯蚓的毒力回归方程、 LC_{50} 及其 95% 置信限 (唐启义, 2010), 并以 LC_{50} 的比率测定法进行差异显著性分析。当 2 个比较组的 LC_{50} 比率的 95% 置信限包含 1 时,认为其差异不显著 (唐启义, 2010)。

2 结果与分析

2.1 滤纸接触法

将蚯蚓放入含有重金属的滤纸后,其中毒症状:身体变软、充血,环带肿大,有黄色液体渗出;有断裂现象,有的断裂多节,滤纸上有血迹。试验中,空白对照组中的蚯蚓没有异常症状和死亡情况。

滤纸接触法测定结果 (图 1、表 1) 表明,在所有暴露时间下,随着重金属浓度的增大,蚯蚓的死亡率不断上升,且随着暴露时间的延长,蚯蚓的死亡率也不断升高。6 种重金属对蚯蚓的急性毒力回归方程

的 p 值均大于 0.05,表明所求的毒力回归曲线是合适的。暴露 24 h 时,重金属对蚯蚓的急性毒性顺序为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ 。暴露 48 h 时, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 等 6 种重金属对蚯蚓的最低致死浓度分别为 1.54、3.07、12.29、12.29、24.57、49.15 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$; LC_{50} 分别为 3.17、8.99、22.99、23.41、48.21、90.42 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,其急性毒性顺序为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$,与 24 h 时的毒性次序基本一致。其中, Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{+} 及 Zn^{2+} 等 5 种重金属对蚯蚓的急性毒性结果 (48 h LC_{50}) 与 Neuhauser *et al.* (1985) 的报道相一致,而 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对赤子爱胜蚓的急性毒性均低于陈志伟等 (2007) 的报道结果,这可能与赤子爱胜蚓的体重和所加药量有关。

6 种重金属 LC_{50} 的差异显著性结果表明, Ni^{+} 与 Cd^{2+} 对蚯蚓的急性毒性无明显差异,其他比较组均存在明显差异 (表 2)。其中, Cu^{2+} 与 Mn^{2+} 之间的差异最大, Cu^{2+} 对蚯蚓的急性毒性是 Mn^{2+} 的 28.5 倍 (48 h) (表 1)。

2.2 人工土壤法

蚯蚓接触含有重金属的土壤后,有出血现象,周围土壤可见明显红染;环带肿大,有黄色液体渗出,身体萎缩、糜烂,体节有断裂现象。试验中,空白对照组中的蚯蚓没有异常症状和死亡情况。

人工土壤法测定结果 (图 2、表 3) 表明,蚯蚓的死亡率随着染毒时间的延长和重金属浓度的增大而上升。6 种重金属对蚯蚓的急性毒力回归方程的 p 值均大于 0.05,表明所求的毒力回归曲线是合适的。染毒 7 d 时,6 种重金属对蚯蚓的急性毒性次序为 Cd^{2+} 、 $\text{Cu}^{2+} \geq \text{Ni}^{+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 。染毒 14 d 时,同一重金属不同浓度下蚯蚓的死亡率表现出上升的趋势, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 等 6 种重金属对蚯蚓的最低致死浓度分别为 949.2、1582、1266、1013、5273、2163 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; LC_{50} 分别为 1347、2232、1735、1428、6936、3410 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,表明 6 种重金属对蚯蚓的急性毒性顺序为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$,与染毒 7 d 时的顺序基本一致。其中, Pb^{2+} 对蚯蚓的急性毒性结果 (14 d LC_{50}) 与 Neuhauser *et al.* (1985) 的测定结果一致,而 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{+} 及 Zn^{2+} 等 4 种重金属的急性毒性结果 (14 d LC_{50}) 均存在较大差异。这可能

是因为两者都使用 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 进行试验,而其他 4 种重金属盐则不同。乔文鹏等(2007)采用人工土壤法测得 Cd^{2+} 对赤子爱胜蚓的 LC_{50} (14 d)为 $952.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 低于本研究结果。这可能由培养试验中所用草炭和高岭土的构成不同所造成。

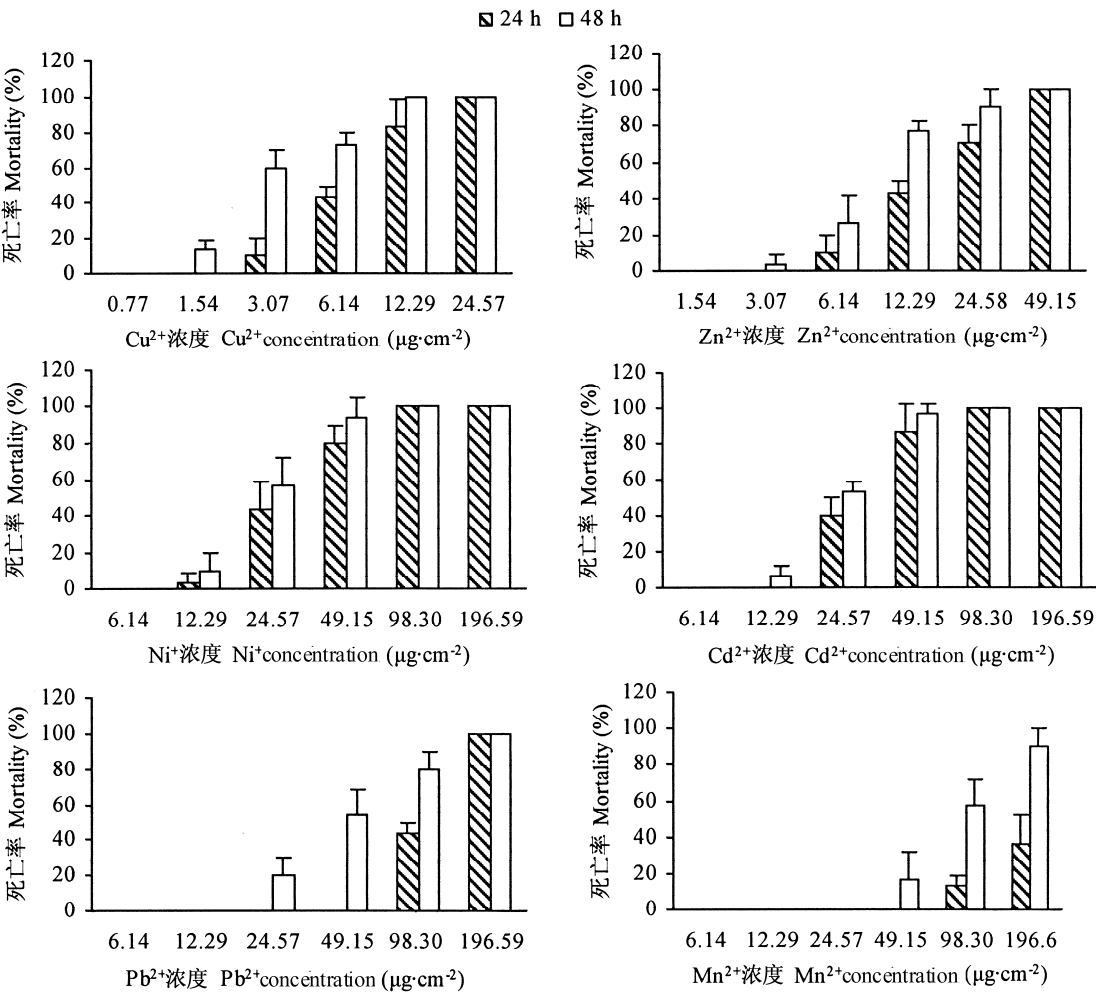


图 1 蚯蚓在不同浓度重金属中暴露 24 和 48 h 的死亡率 (滤纸接触法)
Fig.1 Mortality of the earthworm *E. foetida* after exposure for 24 ~48 h (using the filter paper contact method) to six heavy metals at different concentrations

表 1 6 种重金属对蚯蚓的急性毒性 (滤纸接触法)
Table 1 The acute toxicity of six heavy metals to the earthworm *E. foetida* measured by filter paper contact method

暴露时间 Exposure time (h)	重金属 Heavy metal	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	95% 置信限 95% confidence limits ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	相关系数 Correlation coefficient	p
24	Cu^{2+}	$Y = 1.6135 + 4.0937X$	6.72	5.61 ~ 8.61	0.9723	0.9460
	Zn^{2+}	$Y = 0.7923 + 3.6002X$	14.75	12.10 ~ 19.42	0.9634	0.5798
	Ni^{+}	$Y = -1.5594 + 4.4849X$	29.01	24.00 ~ 34.01	0.9803	0.8397
	Cd^{2+}	$Y = -3.1418 + 5.5585X$	29.16	24.34 ~ 33.64	0.9675	0.8465
	Pb^{2+}	$Y = -19.6954 + 12.3102X$	101.41	—	0.8275	0.9982
	Mn^{2+}	$Y = -2.8784 + 3.3103X$	239.86	119.48 ~ 2157.73	0.8431	0.9388
48	Cu^{2+}	$Y = 3.2514 + 3.4888X$	3.17	2.53 ~ 3.81	0.9661	0.2407
	Zn^{2+}	$Y = 1.5023 + 3.6669X$	8.99	7.51 ~ 10.81	0.9806	0.6878
	Ni^{+}	$Y = -1.5135 + 4.7840X$	22.99	18.00 ~ 27.23	0.9781	0.9954
	Cd^{2+}	$Y = -2.6057 + 5.5538X$	23.41	18.33 ~ 27.48	0.9807	0.9990
	Pb^{2+}	$Y = -0.8500 + 3.4756X$	48.21	40.09 ~ 60.62	0.9662	0.6388
	Mn^{2+}	$Y = -2.8386 + 4.007X$	90.42	69.45 ~ 140.47	0.9379	0.9691

表 2 6 种重金属对蚯蚓急性毒性的差异显著性分析(滤纸接触法)

Table 2 Significance test of the acute toxicity of six heavy metals to the earthworm *E. foetida* by the filter paper contact method

比较组 Comparison	暴露 24 h After 24 h exposure		暴露 48 h After 48 h exposure	
	LC ₅₀ 比率	95% 置信限	LC ₅₀ 比率	95% 置信限
	Ratio of LC ₅₀	95% confidence limits	Ratio of LC ₅₀	95% confidence limits
Cu ²⁺ : Zn ²⁺	0.4555	0.3570 ~ 0.5813	0.3526	0.2741 ~ 0.4537
Cu ²⁺ : Ni ⁺	0.2316	0.1840 ~ 0.2915	0.1379	0.1088 ~ 0.1749
Cu ²⁺ : Cd ²⁺	0.2304	0.1851 ~ 0.2869	0.1354	0.1076 ~ 0.1705
Cu ²⁺ : Pb ²⁺	0.0662	0.0547 ~ 0.0802	0.0658	0.0509 ~ 0.0849
Cu ²⁺ : Mn ²⁺	0.0280	0.0186 ~ 0.0423	0.0351	0.0273 ~ 0.0450
Zn ²⁺ : Ni ⁺	0.5084	0.4004 ~ 0.6455	0.3912	0.3097 ~ 0.4941
Zn ²⁺ : Cd ²⁺	0.5058	0.4025 ~ 0.6355	0.3841	0.3062 ~ 0.4817
Zn ²⁺ : Pb ²⁺	0.1454	0.1188 ~ 0.1780	0.1865	0.1449 ~ 0.2400
Zn ²⁺ : Mn ²⁺	0.0615	0.0405 ~ 0.0933	0.0995	0.0778 ~ 0.1271
Ni ⁺ : Cd ²⁺	0.9949	0.8036 ~ 1.2317 *	0.9819	0.7960 ~ 1.2111 *
Ni ⁺ : Pb ²⁺	0.2861	0.2377 ~ 0.3442	0.4768	0.3760 ~ 0.6046
Ni ⁺ : Mn ²⁺	0.1209	0.0804 ~ 0.1820	0.2542	0.2020 ~ 0.3200
Cd ²⁺ : Pb ²⁺	0.2875	0.2422 ~ 0.3413	0.4856	0.3857 ~ 0.6115
Cd ²⁺ : Mn ²⁺	0.1216	0.0812 ~ 0.1819	0.2589	0.2072 ~ 0.3236
Pb ²⁺ : Mn ²⁺	0.4228	0.2867 ~ 0.6236	0.5332	0.4157 ~ 0.6840

* 表示 LC₅₀间差异不显著。* indicate no significant difference between the data.

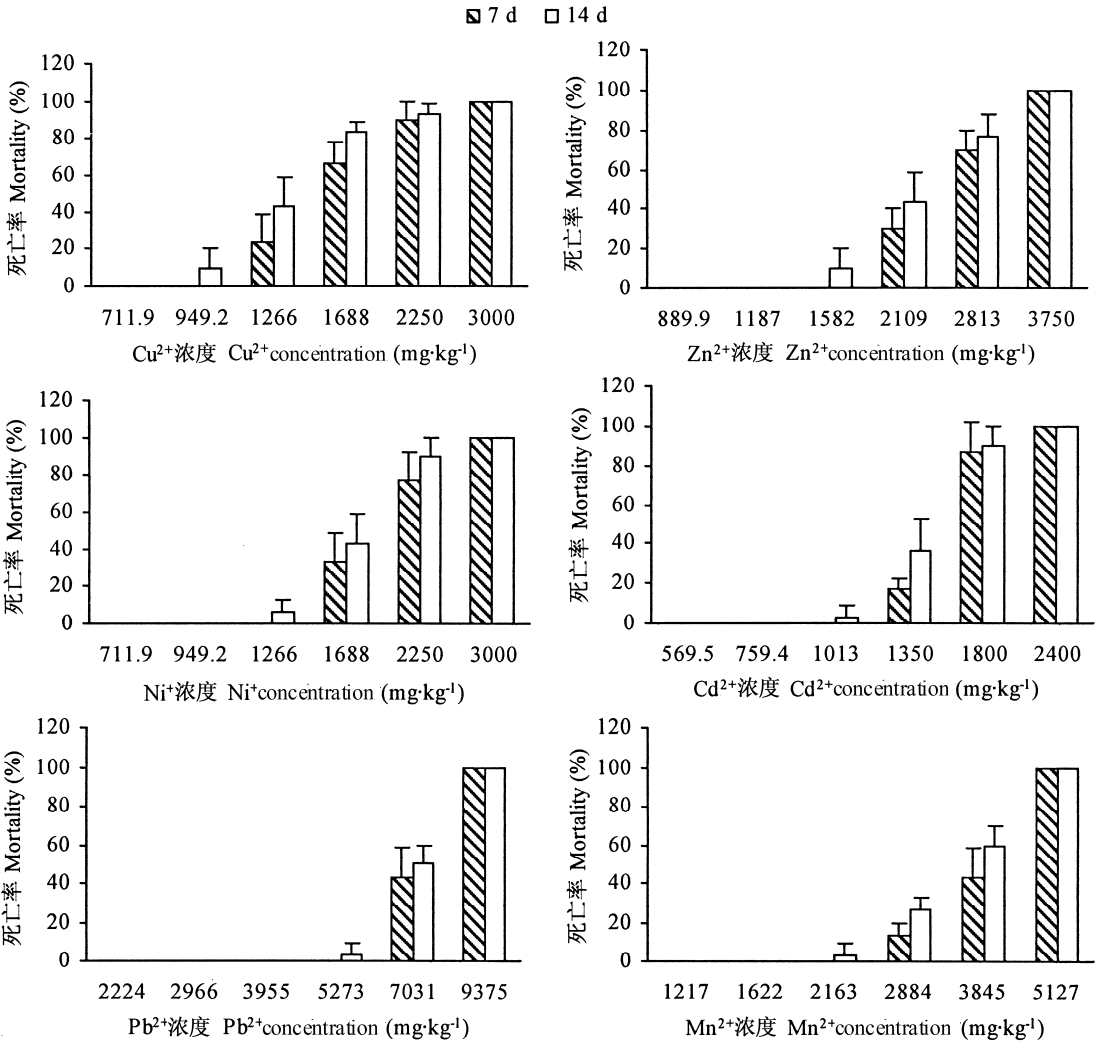


图 2 蚯蚓在不同浓度重金属中暴露 7 和 14 d 的死亡率(人工土壤法)

Fig. 2 Mortality of the earthworm *E. foetida* after exposure for 7 ~ 14 days (using the artificial soil method) to six heavy metals at different concentrations

表 3 6 种重金属对蚯蚓的急性毒性结果 (人工土壤法)

Table 3 The acute toxicity of six heavy metals to the earthworm *E.foetida* by the artificial soil method

暴露时间 Exposure time (d)	重金属 Heavy metal	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LC ₅₀ (mg·kg ⁻¹)	95% 置信限 95% confidence limits (mg·kg ⁻¹)	相关系数 Correlation coefficient	p
7	Cu ²⁺	Y = -25.1468 + 9.4449X	1555	1450 ~ 1685	0.9731	0.7787
	Zn ²⁺	Y = -34.3877 + 11.6303X	2436	2234 ~ 2804	0.9284	0.6650
	Ni ⁺	Y = -34.7397 + 12.1229X	1897	1748 ~ 2166	0.9316	0.7620
	Cd ²⁺	Y = -48.9563 + 16.9217X	1544	1419 ~ 1804	0.9331	0.9992
	Pb ²⁺	Y = -109.2510 + 29.6554X	7123	-	0.8275	0.9982
	Mn ²⁺	Y = -39.4318 + 12.4355X	3741	3353 ~ 4543	0.9119	0.3392
14	Cu ²⁺	Y = -20.9197 + 8.2823X	1347	1236 ~ 1453	0.9724	0.7574
	Zn ²⁺	Y = -25.7924 + 9.1951X	2232	2064 ~ 2488	0.9678	0.8174
	Ni ⁺	Y = -32.3531 + 11.5310X	1735	1618 ~ 1921	0.9780	0.9953
	Cd ²⁺	Y = -35.3846 + 12.8009X	1428	1329 ~ 1599	0.9773	0.9983
	Pb ²⁺	Y = -60.9818 + 17.1777X	6936	6144 ~ 8930	0.9065	0.9309
	Mn ²⁺	Y = -30.0774 + 9.9290X	3410	3110 ~ 3943	0.9571	0.5816

6 种重金属 LC₅₀ 的差异显著性结果表明,Cu²⁺ 与 Cd²⁺ 对蚯蚓的急性毒性无明显差异,其他比较 组的差异最大,Cu²⁺ 对蚯蚓的急性毒性是 Pb²⁺ 的 5.1 组均存在明显差异(表 4)。其中,Cu²⁺ 与 Pb²⁺ 之间 倍(14 d)(表 3)。

表 4 6 种重金属对蚯蚓急性毒性的差异显著性分析 (人工土壤法)

Table 4 Significance test of the acute toxicity of six heavy metals to the earthworm *E.foetida* by the artificial soil method

比较组 Comparison	暴露 7 d After 7 d exposure		暴露 14 d After 14 d exposure	
	LC ₅₀ 比率	95% 置信限	LC ₅₀ 比率	95% 置信限
	Ratio of LC ₅₀	95% confidence limits	Ratio of LC ₅₀	95% confidence limits
Cu ²⁺ : Zn ²⁺	0.6386	0.5807 ~ 0.7022	0.6036	0.5440 ~ 0.6698
Cu ²⁺ : Ni ⁺	0.8200	0.7464 ~ 0.9008	0.7765	0.7035 ~ 0.8572
Cu ²⁺ : Cd ²⁺	1.0076	0.9227 ~ 1.1002 *	0.9434	0.8564 ~ 1.0392 *
Cu ²⁺ : Pb ²⁺	0.2184	0.2014 ~ 0.2368	0.1943	0.1772 ~ 0.2129
Cu ²⁺ : Mn ²⁺	0.4158	0.3786 ~ 0.4566	0.3951	0.3567 ~ 0.4377
Zn ²⁺ : Ni ⁺	1.2841	1.1747 ~ 1.4036	1.2865	1.1688 ~ 1.4161
Zn ²⁺ : Cd ²⁺	1.5779	1.4529 ~ 1.7136	1.5629	1.4229 ~ 1.7166
Zn ²⁺ : Pb ²⁺	0.3420	0.3173 ~ 0.3686	0.3218	0.2945 ~ 0.3517
Zn ²⁺ : Mn ²⁺	0.6511	0.5959 ~ 0.7114	0.6546	0.5925 ~ 0.7231
Ni ⁺ : Cd ²⁺	1.2288	1.1326 ~ 1.3331	1.2148	1.1125 ~ 1.3265
Ni ⁺ : Pb ²⁺	0.2663	0.2474 ~ 0.2867	0.2502	0.2303 ~ 0.2717
Ni ⁺ : Mn ²⁺	0.5071	0.4645 ~ 0.5535	0.5088	0.4631 ~ 0.5590
Cd ²⁺ : Pb ²⁺	0.2875	0.2422 ~ 0.3413	0.2059	0.1901 ~ 0.2231
Cd ²⁺ : Mn ²⁺	0.1216	0.0812 ~ 0.1819	0.4188	0.3820 ~ 0.4591
Pb ²⁺ : Mn ²⁺	0.4228	0.2867 ~ 0.6236	2.0339	1.8649 ~ 2.2181

* 表示 LC₅₀ 间差异不显著。* indicate no significant difference between the data.

2.3 风险评价

根据欧盟指令 91/414/EEC 中的要求(EEC,1991), 蚯蚓的风险评价计算公式为 TER = LC₅₀ (mg·kg⁻¹)/ PEC(mg·kg⁻¹)。式中,TER 为暴露比(toxicity/ exposure ratio), PEC 为环境预测浓度(predicted environmental concentration)。风险评价时的 TER 临界值为 10,当 TER 小于临界值时,表示存在不可接受

的较大风险,数值越小,风险越大;当 TER 大于临界值时,表示风险是可以接受的,数值越大,风险越小(EEC,1991)。

为了评价重金属对蚯蚓的最大风险性,本文选择我国土壤环境质量标准规定中的三级标准值作为其 PEC,即 Cu²⁺、Zn²⁺、Ni⁺、Cd²⁺ 及 Pb²⁺ 等 5 种重金属的 PEC 分别为 400、500、200、1.0、500 mg·kg⁻¹ (国家环境保护局,1995)。由于我国土壤环境质量

标准中未规定 Mn^{2+} 的限值,本文中 Mn^{2+} 的 PEC 采用中国土壤元素环境背景值的平均值,即 $583\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (魏复盛等,1991)。

以人工土壤法中 14 d 的毒性结果来计算 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Mn^{2+} 等 6 种重金属的 TER,

分别为 3.37、4.46、8.68、1428、13.87 和 5.85 (表 5)。这表明 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{+} 、 Mn^{2+} 等 4 种重金属对赤子爱胜蚓存在急性毒性风险,而 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对赤子爱胜蚓的急性毒性风险水平是可接受的。

表 5 6 种重金属对蚯蚓的风险评价结果

Table 5 Summary assessment of the toxicity to six heavy metals to the earthworm *E. foetida*

重金属 Heavy metal	14 d LC_{50} ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	环境预测浓度 Predicted environmental concentration (PEC) ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	暴露比 Toxicity/exposure ratio (TER)	重金属 Heavy metal	14 d LC_{50} ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	环境预测浓度 Predicted environmental concentration (PEC) ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	暴露比 Toxicity/exposure ratio (TER)
Cu^{2+}	1347	400	3.37	Cd^{2+}	1428	1.0	1428
Zn^{2+}	2232	500	4.46	Pb^{2+}	6936	500	13.87
Ni^{+}	1735	200	8.68	Mn^{2+}	3410	583	5.85

3 结论与讨论

本研究测定了 6 种重金属在实验室条件下对蚯蚓的急性毒性水平,结果表明,6 种重金属对土壤动物蚯蚓均具有潜在的毒性效应。该结果只能从一个侧面反映 6 种重金属对环境生物的效应和毒性,而难以全面、准确地反映其实际毒害风险。近年来,随着经济的迅速发展,我国面临的土壤安全问题日趋严重,重金属污染超标的面积日益增大。由于重金属在位于食物链底端的蚯蚓体内具有较强的富集性,可在食物链中逐级富集,从而威胁高级生物的健康。因此,有必要进一步研究重金属对蚯蚓的慢性毒性和蓄积毒性。

本文采用滤纸接触法和人工土壤法分别测定了 6 种重金属对蚯蚓的急性毒性。滤纸接触法测得重金属对蚯蚓的急性毒性顺序为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$, 48 h LC_{50} 分别为 3.17、8.99、22.99、23.41、48.21、90.42 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$;人工土壤法测得重金属对蚯蚓的急性毒性顺序为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, LC_{50} (14 d) 分别为 1347、2232、1735、1428、6936、3410 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。这 2 种方法所得的毒性顺序存在差异,可能是由于在滤纸接触法中,重金属直接黏附于滤纸表面,生物可利用性高,且蚯蚓体表直接与污染物接触,吸收量大,吸收速率快。但滤纸接触法所显示的只是通过皮肤接触所产生的毒性信息,很难评估污染物对环境的真实影响;而人工土壤法能够尽可能模拟蚯蚓生活的真实环境,从而使试验结果尽可能真实地反映污染物在自然界中的实际影响。然而,在人工

土壤法中,供试物通过接触对蚯蚓产生的毒性不仅取决于供试物的固有毒性,而且与环境介质的组成、供试物在土壤中的行为(如土壤胶体吸附和有机质吸附等)及其在蚯蚓体内的代谢动力等密切相关。因此,在进行污染物对蚯蚓的急性毒性试验时,要根据实际环境中蚯蚓与污染物的接触方式选择合适的暴露方法。

由于人工土壤法能够尽可能模拟蚯蚓生活的真实环境,以其测定的 LC_{50} 作为重金属毒性评价的依据比滤纸接触法更加客观、准确,故本试验采用人工土壤法测定的 14 d LC_{50} 进行环境风险评价。结果表明, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{+} 、 Mn^{2+} 等 4 种重金属对赤子爱胜蚓存在急性毒性风险,而 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对赤子爱胜蚓的急性毒性风险水平是可接受的。因我国土壤环境质量标准(国家环境保护局,1995)中未规定 Mn^{2+} 的限值,故在土壤环境质量标准修订中应考虑 Mn^{2+} 对土壤动物的风险性。本次风险评价中所用 PEC 为我国土壤环境质量三级标准值,但在土壤重金属超标即未达到土壤环境质量三级标准的区域,重金属含量会更高,对蚯蚓造成的急性毒性风险将更大。因此,建议有关部门加强对重金属的监测,尤其在重金属排放超标的地方,以确保环境生物的安全。

参考文献

陈志伟,李兴华,周华松. 2007. 铜、镉单一及复合污染对蚯蚓的急性毒性效应. 浙江农业学报, (1): 19.

国家环境保护局. 1995. GB 15618-1995 土壤环境质量标准. 北京: 中国标准出版社.

李许明,李福燕,郭彬,陈柳燕,张黎明,漆智平. 2007.

- Pb 对赤子爱胜蚓的影响. 中国农学通报, 23(9): 1–6.
- 刘德鸿, 刘德辉, 成杰民. 2005. 土壤 Cu、Cd 污染对两种蚯蚓种的急性毒性. 应用与环境生物学报, (6): 706–710.
- 刘廷凤, 刘振宇, 孙成. 2009. Cu^{2+} 与草甘膦单一及复合污染对蚯蚓的急性毒性研究. 环境污染与防治, 31(6): 3–6.
- 乔文鹏, 乔玉辉, 孙振钧. 2007. 氯化镉、马拉硫磷和乙草胺对赤子爱胜蚓的单一急性毒性. 农业环境科学学报, 26(B10): 514–518.
- 宋玉芳, 周启星, 许华夏, 任丽萍, 孙铁珩, 龚平. 2002. 土壤重金属污染对蚯蚓的急性毒性效应研究. 应用生态学报, 13(2): 187–190.
- 唐启义. 2010. DPS 数据处理系统. 2 版. 北京: 科学出版社.
- 魏复盛, 陈静生, 吴燕玉, 郑春江. 1991. 中国土壤环境背景值研究. 环境科学, 12(4): 12–19.
- 解冬利, 周娟, 王备新, 蒋金炜, 李发生, 颜增光. 2011. 不同类型土壤中外源镍对赤子爱胜蚓的急性毒性. 生态毒理学报, 6(1): 31–36.
- 叶铁桥. 2012. 重金属污染事件频发. 中国青年报, 2012–02–01(07).
- 赵学平, 王彦华, 吴声敢, 俞瑞鲜, 吴长兴, 陈丽萍, 苍涛, 王强. 2011. 10 种常用农药对赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 的急性毒性效应. 生态毒理学报, 6(4): 435–440.
- 周娟, 颜增光, 蒋金炜, 汤清波, 李发生. 2008. 几种典型土壤中铜对赤子爱胜蚯蚓的毒性差异比较研究. 生态毒理学报, 3(4): 394–402.
- Bigorgne E, Cossu-Leguille C, Bonnard M and Nahmani J. 2010. Genotoxic effects of nickel, trivalent and hexavalent chromium on the *Eisenia fetida* earthworm. *Chemosphere*, 80: 1109–1112.
- EEC. 1991. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Communities*, 230: 1–32.
- ISO. 1993. ISO 11268-1: 1993. *Soil Quality—Effects of Pollutant on Earthworm (Eisenia fetida). Part 1: Determination of Acute Toxicity Using Artificial Soil Substrate*. Geneva: International Organization for Standardization.
- ISO. 1998. ISO 11268-2: 1998. *Soil Quality—Effects of Pollutant on Earthworm (Eisenia fetida). Part 2: Determination of Effects on Reproduction*. Geneva: International Organization for Standardization.
- Khan M A Q, Ahmed S A, Salazar A, Gurumendi J, Khan A, Vargas M and von Catalin B. 2007. Effect of temperature on heavy metal toxicity to earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida: Oligochaeta). *Environmental Toxicology*, 22: 487–494.
- Ma W C and Bonten L T. 2011. Bioavailability pathways underlying zinc-induced avoidance behavior and reproduction toxicity in *Lumbricus rubellus* earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 1721–1726.
- Ming H, He W, Lamb D T, Megharaj M and Naidu R. 2012. Bioavailability of lead in contaminated soil depends on the nature of bioreceptor. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 344–350.
- Natal-da-Luz T, Ojeda G, Pratas J, van Gestel C A and Sousa J P. 2011. Toxicity to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* of a metal mixture applied to soil directly or via an organic matrix. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 1715–1720.
- Neuhausser E F, Loehr R C, Milligan D L and Malecki M R. 1985. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biology and Fertility of Soils*, 1: 149–152.
- OECD. 1984. *Guideline for Testing of Chemicals No. 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests*. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development.
- OECD. 2004. *Guideline for Testing of Chemicals No. 222. Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development.
- Owojori O J, Reinecke A J and Rozanov A B. 2008. Effects of salinity on partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2385–2393.
- Owojori O J, Reinecke A J and Rozanov A B. 2009a. The combined stress effects of salinity and copper on the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology*, 41: 277–285.
- Owojori O J, Reinecke A J and Rozanov A B. 2009b. Role of clay content in partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 99–107.
- Owojori O J, Reinecke A J and Rozanov A B. 2010. Influence of clay content on bioavailability of copper in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 407–414.
- Udovic M and Lestan D. 2010. *Eisenia fetida* avoidance behavior as a tool for assessing the efficiency of remediation of Pb, Zn and Cd polluted soil. *Environmental Pollution*, 158: 2766–2772.
- Wang Y H, Cang T, Zhao X P, Yu R X, Chen L P, Wu C X and Wang Q. 2012. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79: 122–128.