

重金属 Zn、Cu 和 Hg 对基因重组发光菌的综合毒性及其联合效应

周上洋^{1,3}, 赵建亮^{1,2*}, 黄国勇^{1,2*}, 应光国^{1,2}

(1. 中国科学院广州地球化学研究所//有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640;

2. 华南师范大学环境研究院, 广州 510631; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:分析了3种常见重金属(Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+})对基因重组发光菌(*E. coli* HB101 pUCD607)的单一毒性和不同质量浓度比条件下的联合毒性作用,并采用毒性单位法(Toxic Unit)、Marking相加指数法(Additional Index)和混合毒性指数法(Mixture Toxicity Index)来评价混合体系的联合毒性作用类型。 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 3种重金属离子对发光细菌的15 min半数效应浓度(EC_{50})分别为:4.24、5.99、2.27 mg/L。多元重金属离子混合体系主要呈现不同程度的拮抗作用,不同的评价方法对3种重金属离子的联合效应评价结果具有较好的一致性。上述重金属联合毒性作用研究结果可为重金属复合污染控制和生物毒性测试提供参考。

关键词:基因重组发光菌; 锌; 铜; 汞; 单一毒性; 联合毒性

中图分类号: X832

文献标志码: A

文章编号: 1000-5463(2018)01-0033-50

Toxicity and Joint Effects of Heavy Metals Zn, Cu and Hg to Recombinant Luminescent Bacterium

ZHOU Shangyang^{1,3}, ZHAO Jianliang^{1,2*}, HUANG Guoyong^{1,2*}, YING Guangguo^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Organic Geochemistry//Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. Environmental Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The toxicity of three common heavy metals (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+}) and their joint toxicity at different concentration ratios to the recombinant luminescent bacterium (*E. coli* HB101 pUCD607) were analyzed. The toxic effects of the metal mixtures were evaluated by the Toxic Unit, Marking Additional Index and Mixture Toxicity Index. The median effective concentrations (EC_{50}) of the three heavy metals Zn^{2+} , Cu^{2+} and Hg^{2+} were 4.24, 5.99 and 2.27 mg/L for 15 min, respectively. The mixed system of heavy metals mainly showed antagonistic effects in different degrees. The results of the three heavy metals by three evaluation approaches showed good consistency with each other. The joint toxicity of the heavy metals provides basic information for the control of heavy metal compounds and biological toxicity test.

Key words: gene recombinant luminescent bacteria; Zn; Cu; Hg; single toxicity; joint effect

随着我国工业化进程的发展,重金属污染成为人们日益关注的问题。工农业生产过程排放的废水中有害重金属离子浓度日益增加,如:锌、铜、汞、镉和铅等,对环境造成不同程度的污染。有关重金属及其离子毒害的机理研究主要集中于单个金属方面,而在自然环境中,重金属常常是以复合污染的形式出现,即环境中的重金属离子通常是多种离子同

时并存,其毒性也往往表现为多种重金属的协同、相加、独立和拮抗的综合毒性作用。利用生物测试可以直观反映重金属离子混合体系的综合毒性^[1]。生物毒性测试一般采用浮游生物、藻类、鱼类和发光细菌等作为指示生物,以其形态、运动和生理代谢情况的变化或死亡率来评价环境物质的毒性^[2-3]。

发光细菌生物测试是一种被广泛应用于毒性评

估的微生物专用检测方法. 这种生物测定已被成功应用于大量单个化学品的筛选和相对毒性的比较研究中^[4]. 本文采用基因重组发光菌(*E. coli* HB101 pUCD607)作为指示生物, 通过检测发光菌的发光强度, 计算发光抑制率, 并对发光菌的发光强度和重金属离子质量浓度作图, 确定3种重金属离子单独作用时的半数效应质量浓度(EC_{50})和混合体系中混合物的 EC_{50} . 并采用毒性单位法、Marking相加指数法和混合毒性指数法联合评价混合物的联合毒性作用类型.

1 实验部分

1.1 仪器与材料

1.1.1 实验仪器 主要仪器及用品包括多功能酶标仪(FLUOstar Omega, BMG Labtech, 德国)、高速台式冷冻离心机(3K15型, Sigma, 德国)、不同量程的单、多通道移液器(Eppendorf)、白色96微孔板(COSTAR 3922型, Corning, 美国)、恒温空气浴振荡摇床(SKY-211B型, 上海苏坤实业有限公司)、超净工作台(SW-CJ-2FD, 苏净安泰空气技术有限公司)、立式自动压力蒸汽灭菌锅(FD50A, 致微厦门仪器有限公司); 旋涡混合器(XW-80A, 上海精科实业有限公司)以及其他常规玻璃仪器.

1.1.2 实验试剂 主要试剂有胰蛋白胨(Thermo Fisher Oxoid, 英国)、酵母粉(Thermo Fisher Oxoid, 英国)、葡萄糖(AR, 江苏强盛)、NaCl(AR, 上海阿拉丁)、KCl(AR, 天津科盟)、硫酸卡那霉素(Amresco, 美国)、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (AR, 上海麦克林)、 $CuSO_4$ (Sigma-Aldrich, 美国)、 $HgCl_2$ (AR, 贵州铜仁利祥).

1.1.3 实验生物 基因重组发光菌*E. coli* HB101 pUCD607^[5]. 生物发光受抑制的程度可通过光电传感器检测, 从而推算毒性大小.

1.2 菌种的培养

1.2.1 工作液的配制 (1)含有30 $\mu\text{g/L}$ 卡那霉素的LB培养液: 将10 g胰蛋白胨、5 g酵母粉、10 g氯化钠、1 g葡萄糖溶于1 000 mL蒸馏水中. 调节pH至7. 在121 $^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌20 min; 待培养基温度降到55 $^{\circ}\text{C}$ 时加入100 μL 卡那霉素(0.3 g/L). (2)卡那霉素母液(0.3 g/L): 将3 mg卡那霉素溶于10 mL蒸馏水中, 单独过滤除菌, 分装于150 μL 离心管中, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存. 使用前取出, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 解冻后待用.

1.2.2 菌种培养 首先, 取*E. coli* HB101 pUCD607冻干管, 注意不能用手掌托瓶底, 应该用手指捏住瓶盖处, 加入0.5 mL灭菌LB培养液, 轻轻震荡后接入10 mL含30 $\mu\text{g/L}$ 卡那霉素的LB液体培养基中. 在摇床上于25 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min条件下培养12 h. 然后, 取100 μL 菌液到50 mL LB培养液中, 在摇床上于37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min条件下培养12 h, 发光值>100 000. 再将所得菌液在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以8 500 r/min离心5 min, 弃上清液. 按照体积比10:1, 将细菌重新悬浮在5 mL 0.1 mol/L KCl溶液中备用. 可根据实际需要扩大培养体系.

1.3 急性毒性 EC_{50} 的测定

1.3.1 单一重金属 EC_{50} 的测定 选择96孔微板为毒性实验载体, 以基因重组发光菌*E. coli* HB101 pUCD607为检测生物, 以重金属离子及其混合物对基因重组发光菌的发光抑制率为毒性指标, 以相对光单位(Relative Light Unit, RLU)为检测信号, 使用微板毒性分析(MTA)法^[6]进行 EC_{50} 的测定. MTA的实验设计如图1所示, 将96孔板第一竖列4个孔设计为4个空白对照样(用Milli-Q[®]水代替样品), 第2~12列设计为化学物质或其混合物的11个浓度梯度(其稀释因子为2倍). 每孔为1个平行样, 每4行为1组, 每个样品做4个平行样, 每孔加10 μL 2 mol/L KCl溶液和210 μL 样品溶液. 然后在微孔板振荡器上混匀1 min. 用多通道移液器从第一列开始往每孔加入30 μL 经过浓缩的菌液. 由于发光菌受时间影响较大且酶标仪扫描整块板的时间为45 s, 因此加入菌液时速度要快, 尽量在45 s内加完一整块板. 在向第一列加菌液时开始计时, 加完所有样品之后, 放置在微孔板振荡器上混匀1 min并暴露15 min, 最后, 在发光测试仪上测定各孔相对发光单位RLU.

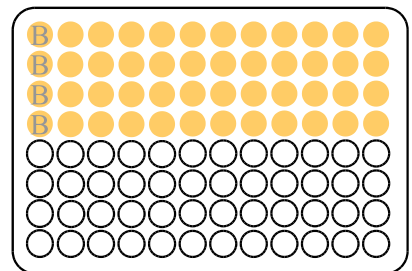


图1 微板毒性分析实验设计

Figure 1 Experimental design in the microplate toxicity analysis

通过第1列4个空白对照样的相对发光单位平均值(RLU_0)和各质量浓度4次平行相对发光单位

平均值(RLU)计算化学物质或混合物对基因重组发光菌发光的相对抑制率 $E(\%)$, 即抑制毒性:

$$E(\%) = \left(1 - \frac{RLU}{RLU_0}\right) \times 100. \quad (1)$$

1.3.2 联合重金属 EC_{50} 的测定 根据单一毒性的测试结果, 绘制各种重金属离子对发光菌作用的效应-剂量曲线, 以获得单一毒性 EC_{50} . 并将 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 的 3 种重金属溶液按直接均分射线法^[7](Direct Equipartition Ray, EquRay)配置二元混合体系(图2). 对于 X 和 Y 组成的二元混合物, 以 X 和 Y 的质量浓度为坐标轴的二维坐标平面上, 连接 x 轴和 y 轴上两组分的 EC_{50} 值; 在连接线段上选择 3 个等距离点 (A_1 、 A_2 、 A_3), 并从坐标原点出发, 通过等距离点作 3 条射线(记为 R_1 、 R_2 、 R_3); 选择稀释因子为 2 倍, 在每条射线上选择 11 个(不含原点)的质量浓度梯度点(每条射线上的混合物中 X 组分和 Y 组分的质量浓度比为常数); 应用 MTA 测试每条射线上各个混合物质量浓度梯度点的毒性效应, 进而构成一条具有固定质量浓度比常数的混合物的质量浓度-效应曲线(Concentration Response Curve, CRC), EquRay 可以均衡考察不同质量浓度的多条射线, 从而表征二元混合物中各组分的质量浓度变化.

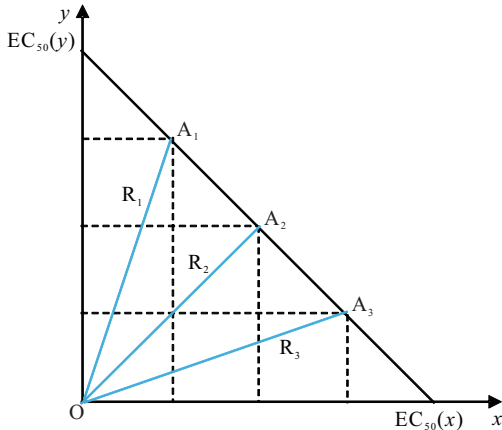


图2 直接均分射线法实验设计

Figure 2 Experimental design of direct equipartition ray

1.4 联合毒性评价方法

2 种及以上的污染物, 共同作用于生物体所产生的生物学效应为联合毒性效应, 可分为协同、相加、独立和拮抗 4 种作用类型. 目前, 有关联合毒性作用的判断方法有不同的分类方法和判断标准. 实验采用毒性单位法(TU)、Marking 相加指数法(AI)和混合毒性指数法(MTI)对这些类型的联合毒性作用进行定量判别和分析(表1).

表1 不同评价指数的联合作用类型判断标准

Table 1 Criteria for the judgment of joint effectiveness of different evaluation indexes

作用类型	协同作用	简单相加作用	独立作用	拮抗作用	部分相加作用
TU	$S < 1$	$S = 1$	$S = S_0$	$S > S_0$	$S_0 > S > 1$
AI	$AI > 0$	$AI = 0$	—	$AI < 0$	—
MTI	$MTI > 1$	$MTI = 1$	$MTI = 0$	$MTI < 0$	$0 < MTI < 1$

1.4.1 毒性单位法 毒性单位^[8]用于表示锌铜混合物对幼年大西洋鲑的联合毒性的化合物浓度. 1975年, MARKING^[9]将这一概念推广到混合物的相加作用:

$$TU = \frac{A_m}{A_i}, \quad (2)$$

其中, A_m 是混合物毒性中各组分的毒性 (LC_{50} 或 EC_{50} 值), A_i 是毒物 A 的毒性 (LC_{50} 或 EC_{50} 值). 对于包含 n 组分的混合物:

$$S = \sum_{i=1}^n TU_i, \quad (3)$$

$$S_0 = \frac{S}{(TU_i)_{\max}}. \quad (4)$$

根据各组分毒性单位之和 S 与 S_0 来评价混合物的联合作用类型.

1.4.2 相加指数法 在毒性单位概念的基础上, MARKING^[10]提出指数相加法. 当 $S \leq 1$ 时, 相加指数 $AI = 1/S - 1$; 当 $S > 1$ 时, $AI = 1 - S$.

1.4.3 混合毒性指数法 1981年, KÖNEMANN^[11]首次使用混合毒性指数评价多元混合物对鱼的联合毒作用, 将混合毒性指数 MTI 定义为:

$$MTI = 1 - \frac{\lg S}{\lg S_0}. \quad (5)$$

1996年, CHEN 等^[12]在研究化合物对细菌的毒性作用时, 对 MTI 进行了调整: 如果混合物中各组分为同等毒性, 则

$$MTI = 1 - \frac{\lg S}{\lg n}, \quad (6)$$

其中, n 为混合物中组分的种类.

2 结果与讨论

2.1 单一毒性作用分析

综合比较 3 种重金属离子对基因重组发光菌的急性毒性(图3), 曲线表现为典型的毒性质量浓度效应关系. 3 种重金属离子的质量浓度在 0.1~10 mg/L 范围内增长时, 对发光菌的抑制作用急剧上升. 重金属离子质量浓度超过 10 mg/L 时, 对发光菌

的抑制率范围达到 80%~100%。

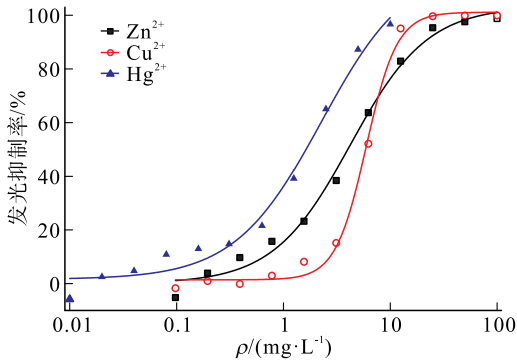


图 3 3 种重金属对发光细菌的急性毒性测试曲线

Figure 3 Acute toxicity curves of three heavy metals to the luminescent bacterium

3 种重金属离子对基因重组发光菌都有不同程度的抑制作用,对发光菌的 EC_{50} 分别为:4.24、5.99、2.27 mg/L,其中毒性作用强弱为: $Hg^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+}$,即 Hg^{2+} 的生物毒性最大.此结果与 CHO 等^[13]报道的相应金属毒性顺序完全一致; Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 的金属毒性顺序与文献[14]、[15]报道的顺序一致.

2.2 二元混合体系的联合毒性作用分析

9 种二元混合体系对发光细菌的急性毒性测试质量浓度效应曲线(图 4),其中,混合体系简称如 CuZn0.48 代表 $\rho(Cu^{2+}) : \rho(Zn^{2+}) = 0.48 : 1$ 的体系.9 种混合体系对基因重组发光菌都有不同程度的抑制作用,对发光菌的 EC_{50} 分别为:8.54、8.14、7.89、9.51、7.42、5.05、4.88、5.53、0.72 mg/L.

表 2 二元混合体系的 EC_{50} 值和联合毒性评价参数及作用类型

Table 2 Joint toxicity evaluating parameters and types for different binary systems

混合体系	$EC_{50}/(mg \cdot L^{-1})$	S	S_0	AI	MTI	作用类型
CuZn0.48	8.54	1.82	1.34	-0.82	-1.05	拮抗
CuZn1.44	8.14	1.59	1.99	-0.59	0.33	部分相加/拮抗
CuZn4.33	7.89	1.42	1.33	-0.42	-0.23	拮抗
ZnHg12.73	9.51	2.38	1.14	-1.38	-5.62	拮抗
ZnHg4.24	7.42	2.04	1.44	-1.04	-0.96	拮抗
ZnHg1.41	5.05	1.62	1.74	-0.62	0.13	部分相加/拮抗
HgCu0.49	4.88	1.25	1.79	-0.25	0.62	部分相加/拮抗
HgCu0.16	5.53	1.13	1.41	-0.13	0.64	部分相加/拮抗
HgCu0.05	0.72	0.13	1.08	6.69	27.50	协同

注:混合体系简称如 CuZn0.48 代表 $\rho(Cu^{2+}) : \rho(Zn^{2+}) = 0.48 : 1$ 的体系.

根据 9 组二元混合体系的 AI 值和 MTI 值,可判断其拮抗作用的强弱程度.由 AI 获得的排列顺序为 $ZnHg12.73 > ZnHg4.24 > CuZn048 > ZnHg1.41 > CuZn4.33 > CuZn1.44 > HgCu0.49 > HgCu0.16 > HgCu0.05$;由 MTI 获得的排列顺序为 $ZnHg12.73 > CuZn048 > ZnHg4.24 > CuZn4.33 > ZnHg1.41 > CuZn1.44 > HgCu0.49 > HgCu0.16 >$

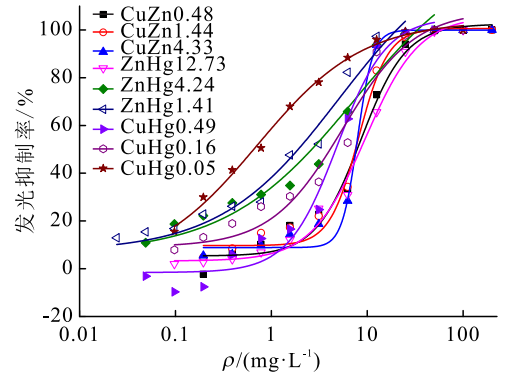


图 4 二元混合体系对发光细菌的急性毒性测试曲线

Figure 4 Acute toxicity curves of different binary systems to luminescent bacterium

综合比较 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 组成的二元混合体系对基因重组发光菌的联合毒性评价参数见表 2.2 种重金属离子以 3 种不同的质量浓度比混合时,除了 HgCu0.05 组以外,其余 8 组二元混合体系的 AI 均小于 0;在这 8 组二元混合体系中,CuZn0.48、CuZn4.33、ZnHg12.73 和 ZnHg4.24 的 $MTI < 0; S > S_0$.这 4 组二元混合体系均表现出拮抗作用.而 CuZn1.44、ZnHg1.41、HgCu0.49 和 HgCu0.16 的 $AI < 0$,显示为拮抗作用, $0 < MTI < 1; S_0 > S > 1$ 显示为部分相加作用.这可能是因为在相加指数法中没有部分相加作用的判据,因而将这种作用归于拮抗类型. HgCu0.05 组显示为协同作用. AI 越接近于 0,则毒性越接近相加作用;而 MTI 越接近于 0,则毒性越接近独立作用.

HgCu0.05. 2 种评价方法得到的顺序并不完全一致,这可能是因为不同毒性组合的联合毒性效应会随其主因子作用有所不同^[16];也可能是不同评价方法对重金属混合物毒性的评价结果也有所不同,表明混合物毒性评价结果与所选的评价方法有关^[15].

3 结论

应用基因重组发光菌 *E. coli* HB101 pUCD607 研究了 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 3 种重金属离子的单一毒性和二元混合体系的联合毒性. 实验表明:单一重金属离子对基因重组发光菌的毒性顺序为: $Hg^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+}$. 二元混合体系中 $\rho(H^{2+}g) : \rho(Cu^{2+}) = 0.05$ 的 HgCu0.05 组显示为协同作用,其余 8 组不同比例皆显示为不同程度的拮抗作用.

在重金属离子复合污染控制方面,有望利用拮抗作用来降低重金属离子的联合毒性作用. 因此,如何提高拮抗作用,对减少复合污染有一定意义.

在此研究基础上可进行多元重金属混合体系中联合毒性定量性质和结构-活性相关的分析,实现对混合毒性作用机制的定量研究,为重金属毒性的全生命周期影响评价奠定基础.

参考文献:

- [1] FAUST M, ALTENBURGER R, BACKHAUS T, et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-components -triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 56(1): 13-32.
- [2] BACKHAUS T, ALTENBURGER R, BOEDEKER W, et al. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri* [J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2010, 19(9): 2348-2356.
- [3] 彭强辉, 陈明强, 蔡强, 等. 水质生物毒性在线监测技术研究进展 [J]. *环境监测管理与技术*, 2009(4): 12-16.
PENG Q H, CHEN M Q, CAI Q, et al. Research development of on-line toxicity bio-monitoring technique of water quality [J]. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2009(4): 12-16.
- [4] RIBO J M, ROGERS F. Toxicity of mixtures of aquatic contaminants using the luminescent bacteria bioassay [J]. *Environmental Toxicology*, 2010, 5(2): 135-152.
- [5] WOUTERSEN M, BELKIN S, BROUWER B, et al. Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? [J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2011, 400(4): 915-929.
- [6] ZHANG Y H, LIU S S, SONG X Q, et al. Prediction for the mixture toxicity of six organophosphorus pesticides to the luminescent bacterium Q67 [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2008, 71(3): 880-888.
- [7] 窦容妮, 刘树深, 刘海玲, 等. 部分含 J-型剂量-效应关系二元混合物的毒性效应 [J]. *生态毒理学报*, 2010, 5

(4): 498-504.

- DOU R N, LIU S S, LIU H L, et al. Toxicities of binary mixtures including at least one component with J-shape dose-response curve [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 5(4): 498-504.
- [8] SPRAGUE J B, RAMSAY B A. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon [J]. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1965, 22(2): 425-432.
- [9] MARKING L L, DAWSON V K. Method for assessment of toxicity or efficacy of mixtures of chemicals [J]. *Center for Integrated Data Analytics Wisconsin Science Center*, 1975, 67: 1-8.
- [10] MARKING L L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures [J]. *Astm Special Technical Publication*, 1977, 634: 99-108.
- [11] KÖNEMANN H. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: a proposal for a quantitative approach and experimental results [J]. *Toxicology*, 1981, 19(3): 229-238.
- [12] CHEN J, LIAO Y, ZHAO Y, et al. Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity studies of heterocyclic nitrogen compounds [J]. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 1996, 57(1): 77-83.
- [13] CHO J C, PARK K J, IHM H S, et al. A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004, 20(2): 338-344.
- [14] 李彬, 李培军, 王晶, 等. 金属污染土壤毒性的发光菌法与斜生栅藻法诊断 [J]. *土壤通报*, 2003(5): 448-451.
LI B, LI P J, WANG J, et al. Toxicity assessment of soil contaminated by heavy metals using algae growth inhibition test and Photobacterium Phosphoreum Assay [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2003(5): 448-451.
- [15] 邓辅财, 刘树深, 刘海玲, 等. 分重金属化合物对淡水发光菌的毒性研究 [J]. *生态毒理报*, 2007(4): 402-408.
DENG F C, LIU S S, LIU H L, et al. Toxicities of selected heavy metal compounds and their mixtures to photobacteria (*Vibrio-tinghaiensis* sp.-Q67) [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007(4): 402-408.
- [16] 张亚旦, 徐亚同, 朱文杰. 用水水质标准中 14 种限制物质综合毒性研究 [J]. *安全与环境学报*, 2009, 9(2): 106-111.
ZHANG Y D, XU Y T, ZHU W J. Chemical element analysis and the risk assessment on the farm-use of sewage sludge in shenzhen [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2009, 9(2): 106-111.

【责任编辑:谭春林 责任校对:谭春林 英文审校:李海航】