

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20150313004

周亚, 朱琳, 冯剑丰, 等. 应用生物配体模型对铅和镉及其混合物联合毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(4): 47-54

Zhou Y, Zhu L, Feng J F, et al. Validation of the biotic ligand model (BLM) to Pb and Cd, and their mixtures [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(4): 47-54 (in Chinese)

## 应用生物配体模型研究铅和镉及其混合物联合毒性

周亚, 朱琳\*, 冯剑丰, 杨光

南开大学环境科学与工程学院 污染过程与环境基准教育部重点实验室 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071

收稿日期: 2015-03-13 录用日期: 2015-04-30

**摘要:** 为探讨生物配体模型(BLM)对金属混合物的适用性,以莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)为研究对象,以藻体内短时间( $\leq 60$  min)生物积累量为指标,研究了Pb和Cd对莱茵衣藻的联合毒性作用。结果表明:Pb和Cd单独暴露下,藻体内生物积累过程可用米门方程(Michaelis-Menten equation)来描述。计算得到Cd传输位点的最大吸收通量 $J_{\max}$ 为 $(8.312 \pm 0.034) \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,该位点的半饱和系数(米门系数) $K_M = (1.012 \pm 0.032) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,稳定常数 $K_{Cd} = 0.988 \times 10^6 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ ; Pb传输位点的 $J_{\max}$ 为 $(1.28 \pm 0.039) \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,该位点的 $K_M = (3.56 \pm 0.34) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , $K_{Pb}$ 为 $2.81 \times 10^6 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ 。Cd和Pb的竞争实验中,当固定Cd的浓度,其吸收通量随Pb的增加而显著降低;固定Pb的浓度,其吸收通量随Cd的增加略有降低。这表明Pb和Cd可能存在相同的传输位点,且Pb对传输位点的结合能力要远大于Cd。在低浓度Pb和Cd的混合暴露溶液中,短时间内藻对Pb的生物积累量会远大于Cd。研究结果表明BLM可用于描述低浓度下Cd和Pb的竞争关系。

**关键词:** 莱茵衣藻; 重金属; Pb; Cd; 联合毒性; 生物配体模型

文章编号: 1673-5897(2015)4-047-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Validation of the Biotic Ligand Model (BLM) Predicting Pb, Cd and Their Mixtures Toxicity

Zhou Ya, Zhu Lin\*, Feng Jianfeng, Yang Guang

Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China

Received 13 March 2015 accepted 30 April 2015

**Abstract:** In order to explore the applicability of biotic ligand model (BLM) to metal mixture, *Chlamydomonas reinhardtii* was chosen as a testing organism, and the bioaccumulation was used as the index to investigate the joint toxic effects of Cd and Pb. The results indicated that for the individual Cd or Pb exposure, Cd bio-uptake was well described by a Michaelis-Menten equation with the constants:  $J_{\max} = (8.312 \pm 0.034) \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $K_M = (1.012 \pm 0.032) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_{Cd} = 0.988 \times 10^6 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ ; Pb bio-uptake was described by the equation with the constants:  $J_{\max} = (1.28 \pm 0.039) \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $K_M = (3.56 \pm 0.34) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_{Pb} = 2.81 \times 10^6 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ . In the competition experiment of Cd and Pb, we found that the maximum influx rate ( $J_{\max}$ ) of Cd (Pb) decreased with

基金项目: 国家自然科学基金(21277076); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07501-003)

作者简介: 周亚(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学, E-mail: zhouxiaoya0910@126.com;

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zhulin@nankai.edu.cn

the increase of Pb (Cd) concentration, and the competition between Pb and Cd can be described by BLM. The results suggested that Cd and Pb were likely to share a common bio-uptake pathway, and in a short period ( $\leq 60$  min), the combination ability of Pb to bio-uptake pathway was greater than Cd in the low mixed solution of Pb and Cd.

**Keywords:** *Chlamydomonas reinhardtii*; heavy metal; Pb; Cd; joint toxicity; biotic ligand model (BLM)

生物配体模型 (biotic ligand model, BLM) 是一种定量评价生态系统中水化学特性对于金属形态和生物有效性影响的工具<sup>[1]</sup>。BLM 的概念框架是对鱼鳃络合模型 (gill surface interaction model, GSIM) 和自由离子模型 (free-ion-activity model, FIAM) 的改进与完善<sup>[2]</sup>, 用于预测环境中金属生物毒性的机理性模型。BLM 的一个基本原理是将金属的毒性和生物配体上金属的积累联系在一起<sup>[3]</sup>, 应用平衡地球化学模型框架, 考虑自由金属离子与自然存在的阳离子 (如  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ) 的竞争, 以及与非生物配体 (如: 溶解性有机碳, 氯化物, 碳酸盐, 硫化物等) 和生物配体 (结合位点或毒性作用位点) 的结合关系。

BLM 认为当细胞膜生物配体上结合的金属超过一定限度时产生生物效应, 进而通过计算结合到配体上的金属量, 以预测金属的毒性 (如  $\text{LC}_{50}$ )。BLM 是稳定状态模型, 以结合在生物细胞表面作用位点 (即生物配体, BL) 上的金属量为基础参数。模型假定, 在吸收过程中, 金属首先与生物膜表面的位点结合, 之后通过结合位点的传输进入到生物体内, 其中有效的吸收产生毒性作用。并假设生物积累的金属与生物的效应相关, 在配体上结合的金属量与吸收通量之间有一定的比例关系<sup>[4]</sup>。

目前, BLM 已经被用于预测和解释多种单一金属 (Ag、Cd、Cu、Ni、Co、Pb 和 Zn 等) 对多种水生生物 (如鱼类、大型溞和单胞藻等) 的生态毒理学效应, 并且金属种类与受试生物的范围还在不断扩大<sup>[5]</sup>。美国环保局 (US EPA)<sup>[6]</sup> 和欧盟化学品管理局 (ECB)<sup>[7]</sup> 已经将 BLM 用于淡水系统中来推导铜的水质基准。欧盟也启动了一项欧盟水环境框架导则, 要求所有的欧盟成员国确保他们所有的内陆和外海水环境质量在 2015 年达到一个好的水体质量, 在该框架导则中特别推荐运用 BLM 评价重金属的生物慢性毒性, 并作为校准水环境质量基准值的一个有效手段<sup>[8]</sup>。但现实环境中, 金属的污染常是多来源、多种类的复合污染。金属之间可能存在拮抗、相加或协同作用, 同时也可能受到自然条件及本身理化性质的影响, 其作用机制相当复杂, 如张融等<sup>[9]</sup> 以大

型蚤为研究对象, 以蚤体内的金属硫蛋白 (MT) 含量为毒性指标, 研究了重金属 Cd 和 Zn 对大型蚤的联合毒性作用, 在不同实验条件下所得到的结果相互矛盾。因此, 本研究试图在解释其机制的基础上给出毒性的预测, 以量化金属混合物对生物的影响, 并将 BLM 的方法推广到混合物联合作用的研究。Niyogi 和 Wood<sup>[10]</sup> 在关于 BLM 的综述中, 也指出了利用 BLM 的方法评价多种金属联合毒性是未来研究的发展方向。Veltman 等<sup>[11]</sup> 试图将 BLM 的理论与金属的生物积累动力学相结合。然而, 由于金属联合毒性实验数据的缺失, 将该方法真正应用于对金属混合物评价的研究还非常有限。因此, 需要更多的研究以评价 BLM 对预测联合毒性的潜力。

Pb 和 Cd 由于人类活动的影响在自然环境中广泛存在, 并且具有较大的毒性, 属于重要的优先控制污染物。Pb 是一种典型的非必需毒性金属元素, 即使在很低浓度下也可产生生物积累<sup>[12]</sup>。已经有平衡模型成功应用于铅积累研究的先例<sup>[13]</sup>。Cd 也是典型的毒性元素, 会对人体呼吸道产生刺激, 并可积存于肝或肾脏, 形成生物富集<sup>[14-15]</sup>。Pb 和 Cd 同为二价有毒重金属, 之前已有研究成功运用生物配体模型预测  $\text{Ca}^{2+}$  离子存在条件下, Pb 和 Cd 对土壤中费氏弧菌的联合毒性<sup>[16]</sup>, 而 BLM 模型对于水生生物的联合毒性的适用性还不清楚。本论文拟通过研究绿藻中 Pb 和 Cd 生物积累的相互影响, 验证 BLM 模型对于金属混合物联合毒性的适用性。研究的一个基本假设是在金属混合物中, 与金属在暴露溶液中的浓度相比, 富集在金属传输位点上金属的量能更准确地预测毒性效应, 并假设 2 种金属具有相同的传输位点<sup>[17-18]</sup>。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 培养条件

实验选取淡水单胞藻莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 作为受试生物。藻种购于中科院水生生物研究所, 采用 SE 培养基培养, 培养条件为:  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 12 h (光): 12 h (暗), 5 000 lx<sup>[19]</sup>。首先将藻种先接种在含 1.5% 琼脂的固体培养基培养 7 d, 而后转接至 SE 培养基中, 连续培养 5 d 后, 使藻的浓

度达到 $(1\sim 3)\times 10^6$  cells·mL<sup>-1</sup>,再将一定体积的藻转接到新的 SE 培养基中,使其稀释浓度达到 $1\times 10^5$  cells·mL<sup>-1</sup>。继续培养 3 d 后,观察藻的浓度,若达到 $(1\sim 3)\times 10^6$  cells·mL<sup>-1</sup>,认为藻已达到其对数生长期的中后期,则该批藻类可用于实验。

### 1.2 单金属的生物积累实验

生物积累实验选取处于对数生长中后期的藻 $(1\sim 3)\times 10^6$  cells·mL<sup>-1</sup>,将藻液导入 50 mL 离心管中,离心 $(3\ 200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}, 4\ \text{min})$ 后倒掉上清液,再反复 2 次用 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES, Sigma)作为缓冲液,使藻悬浮后重新离心并弃掉上清液,将藻液用缓冲液浓缩至 50 mL 用于生物积累实验。MES 缓冲液的离子强度为 $10^{-2}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,并含有 $10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (为保护藻类细胞壁的完整)<sup>[20]</sup>,并用 $0.6\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{HNO}_3$ 将缓冲液的 pH 调至 6.0。

#### 1.2.1 Cd 的生物积累实验

暴露溶液中 Cd 的浓度范围为 $6\times 10^{-8}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $1\times 10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1),暴露溶液体积为 450 mL。根据设定浓度,计算出所需母液的(Cd,  $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )含量,进行配置。每次配置,预留 5 mL 的暴露溶液,用 ICP-MS 进行浓度的测定,测得的结果为暴露溶液浓度。浓度范围的选取既要保证对藻较低的抑制率,同样还要能够获得足够的金属累积量以便于测量,另外还要考虑到容器壁的吸附及人为操作误差等因素。暴露时间为 60 min,分别于  $t=0, 10, 20, 30, 40, 50, 60$  min 时取样。取样时,先取 10 mL 的暴露溶液于离心管中,再加入 0.2 mL  $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EDTA/MES(pH=6)终止生物积累<sup>[20]</sup>(每次试验取 3 次平行样,每组重复 2 次),摇匀后进行过滤取样。

#### 1.2.2 Pb 的生物积累实验

暴露溶液中 Pb 的浓度范围为 $3\times 10^{-8}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $5\times 10^{-6}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1),最低浓度小于地表水一类水质标准( $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,地表水环境质量标准 GB3838—2002),最高浓度近似我国污水排放标准( $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,污水综合排放标准 GB18466—2005)。其他条件同 2.2.1。

### 1.3 Cd 与 Pb 的生物积累实验

浓度范围选取 2 种金属最大吸收速率的浓度范围附近,固定 Cd(Pb)的浓度( $1\times 10^{-6}, 5\times 10^{-6}, 8\times 10^{-6}, 1\times 10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),改变竞争金属离子 Pb(Cd)的浓度( $1\times 10^{-6}, 1.6\times 10^{-6}, 3\times 10^{-6}, 5\times 10^{-6}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),分别观察不同浓度的竞争离子对前一金属吸收速率的影响。暴露溶液体积为 450 mL,暴露时间 60 min(每次试验取 3 次平行样,每组重复 2 次)。用  $0.5\ \text{mL}\ 0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EDTA/MES(pH=6)终止生物积累,摇匀后分别取 10 mL 进行过滤取样。

对于藻体内积累的金属含量,将样品用真空泵经  $0.45\ \mu\text{m}$  硝化纤维滤膜过滤,并用  $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EDTA 对滤膜进行冲洗,以去除藻体表面的金属。取出滤膜放入 15 mL 的离心管中,加入  $300\ \mu\text{L}\ 65\%$ 的浓硝酸,放置  $85\ ^\circ\text{C}$ 水浴锅中  $4\sim 5\ \text{h}$ ,至滤膜完全溶解,后加水稀释至总体积 10 mL。用 ICP-MS 分别对藻体内和滤液中的金属进行浓度测定。

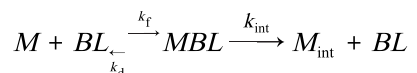
### 1.4 BLM 模型与数据分析

BLM 应用中的基本公式及参数

$$J_{\text{int}} = k_{\text{int}} \{M-R_{\text{cell}}\}$$

$J_{\text{int}}$ :金属吸收通量( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ );  $k_{\text{int}}$ :吸收速率常数( $\text{min}^{-1}$ );  $\{M-R_{\text{cell}}\}$ :富集到生物敏感位点上金属的量( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ )。

金属和生物配体间的相互作用过程可描述为:



可简化表述为: $\{MBL\} = K_{M-Rs} \{BL\} \{M\}$

$M$ :溶液中的自由金属离子; $BL$ :生物膜上的生物配体; $k_f, k_d, k_{\text{int}}$ :金属同生物配体的络合、解离及吸收速率常数; $K_{M-Rs}$ :金属和生物配体的反应平衡常数。

如果考虑其他阳离子的竞争作用:

$$\{CBL\} = K_{C-Rs} \{BL\} \{C\}$$

$C$ :与金属竞争的阳离子; $K_{C-Rs}$ :该阳离子和生物配体的反应平衡常数。 $K_{M-Rs}$ 、金属在生物配体上的累积量、以及 $EC_{50}/LC_{50}$ 值,通常是通过金属累积量、金属膜通量、金属毒性试验结果并结合多元非线性

表 1 暴露溶液中 Cd、Pb 的浓度

Table 1 The concentration of Cd and Pb in the exposure solution

金属离子 Metal ion	浓度/(mol·L <sup>-1</sup> ) Concentration/(mol·L <sup>-1</sup> )								
Cd <sup>2+</sup>	$6\times 10^{-8}$	$1\times 10^{-7}$	$2\times 10^{-7}$	$5\times 10^{-7}$	$1\times 10^{-6}$	$3\times 10^{-6}$	$5\times 10^{-6}$	$8\times 10^{-6}$	$1\times 10^{-5}$
Pb <sup>2+</sup>	$3\times 10^{-8}$	$5\times 10^{-8}$	$1\times 10^{-7}$	$5\times 10^{-7}$	$8\times 10^{-7}$	$1\times 10^{-6}$	$1.6\times 10^{-6}$	$3\times 10^{-6}$	$5\times 10^{-6}$

性回归方法、Langmuir 等温吸附方程、Michaelis-Menten 方程求得。

$$J_{\text{int}} = J_{\text{max}} \frac{[M^{n+}]}{K_M + [M^{n+}]} \quad (1)$$

其中,  $J_{\text{max}}$ : 饱和时的金属吸收通量;  $K_M$ : 米氏常数, 即半饱和常数;  $[M^{n+}]$ : 溶液中自由金属的平衡浓度。

假设金属通过生物膜的传输过程是限制因素, 那么金属与生物配体间的络合稳定常数( $K_{M-Rs}$ )可通过  $K_M$  的倒数来求:

$$K_M = \frac{k_{\text{int}} + k_d}{k_f}$$

若  $k_{\text{int}} \ll k_d$ , 方程可写为:

$$K_M = \frac{k_d}{k_f} = \frac{1}{K_{M-Rs}} \quad (2)$$

在稳定条件下, 可将米氏常数的倒数, 即  $K_{M-Rs}$ , 作为亲和力常数, 来描述金属与质膜上的吸收位点间的相互作用。另外, 当有竞争性阳离子存在时, 其竞争效应可通过公式(3)描述:

$$J_{\text{int}} = \frac{J_{\text{max}} [M^{n+}] K_{M-Rs}}{[M^{n+}] K_{M-Rs} + [C^{n+}] K_{C-Rs} + 1} \quad (3)$$

$K_{C-Rs}$ : 与金属  $M^n$  竞争相同富集位点金属  $C^n$  的亲和力常数;  $[C^{n+}]$ : 竞争金属离子的浓度。通过测定滤液中溶解金属的浓度进行数据标准化, 如果质量平衡的计算结果低于或高于最初配制浓度的 20%, 说明取样或测试过程有误, 则舍去该数据。实验结果以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  sd) 表示, 采用 ORIGIN 8.6 统计分析软件进行统计检验和数据分析。

## 2 结果与讨论 (Results and discussion)

### 2.1 Cd、Pb 单独暴露下的生物积累

在 60 min 的短期暴露中, 藻细胞体内积累的单一金属随时间呈线性增加 (图 1)。这表明 Cd 和 Pb 的生物积累在 60 min 内可以通过稳定的吸收通量 ( $J_{\text{int}}$ ) 来描述。暴露溶液中测得的重金属浓度通常会低于配置浓度, 这是由于低浓度下, 金属往往会吸附到容器及藻表面。测定结果显示, 金属在绿藻体内的生物量可以很好地用米门方程进行描绘 (图 2 和图 3)。由公式 1 计算出 Cd 传输位点的最大吸收通量  $J_{\text{max}}$  为  $(8.312 \pm 0.034) \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 该位点的半饱和系数 (米门系数)  $K_M = (1.012 \pm 0.032) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在自由离子浓度为  $6 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 吸收通量随自由离子浓度的增加呈现

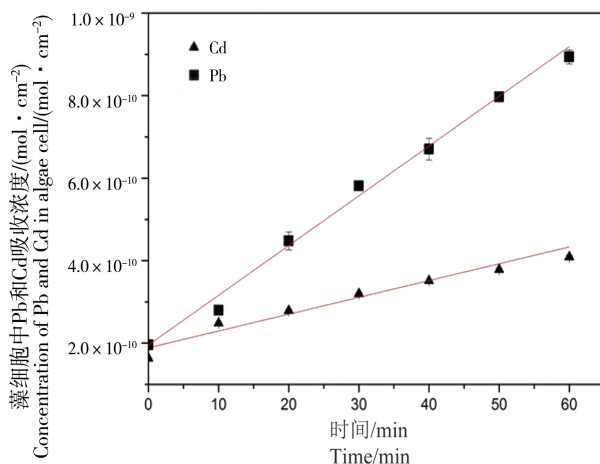


图 1 pH=6.0,  $[M]_{\text{tot}} = 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  藻细胞吸收的 Cd 和 Pb 随时间的变化

Fig. 1 Cellular Pb and Cd as a function of time (pH 6.0,  $[M]_{\text{tot}} = 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for experiments performed with a single metal

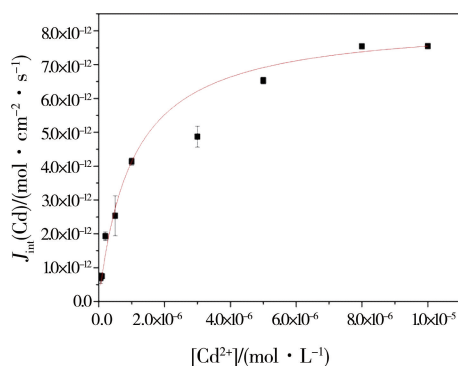


图 2 Cd 单独存在时浓度与吸收通量的关系  
Fig. 2 The relationship between concentration and absorption flux when Cd exists alone

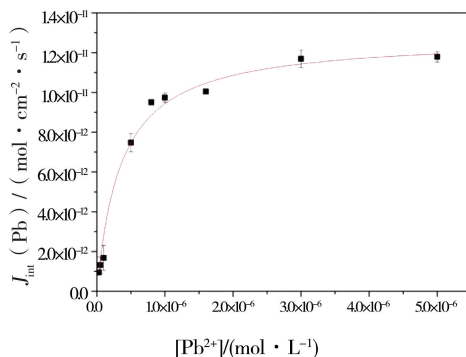


图 3 Pb 单独存在时浓度与吸收通量的关系  
Fig. 3 The relationship between concentration and absorption flux when Pb exists alone

线性增加; 当自由离子的浓度增加至  $1 \times 10^{-6}$  到  $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围后, 吸收通量呈现饱和的趋势, 吸收通

量几乎不变。

由公式 2 得到  $K_{Cd} = 0.988 \times 10^6 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ 。这与 kola 等<sup>[22]</sup>运用生物配体模型,研究莱茵衣藻对单金属 Cd 在  $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内,得到的稳定常数相似( $10^6 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ )。

同样,用米门方程计算出 Pb 传输位点的最大吸收通量  $J_{\max}$  为  $(1.28 \pm 0.039) \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,该位点的  $K_M = (3.56 \pm 0.34) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在自由离子浓度为  $3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度范围内,吸收通量值呈线性增加;当自由离子浓度增加到  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围后,吸收通量几乎不变,在稳定条件下,由公式 2 可求得 Pb 金属传输的  $K_{pb}$  为  $2.81 \times 10^6 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ ,这与前人研究莱茵衣藻对单金属 Pb 在  $5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内,得到的稳定常数相近<sup>[19]</sup>。

相比其他二价金属,Pb 和 Cd 的稳定常数要明显大于  $\text{Ca}(10^{4.5} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1})$ <sup>[20]</sup>,  $10^{4.0} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ <sup>[21]</sup>,与  $\text{Cu}(10^{5.8} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1})$ <sup>[19]</sup>的稳定常数相似,比  $\text{Mn}(10^{7.0} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1})$ ;  $10^{7.1} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ <sup>[17]</sup>) 和  $\text{Zn}(10^{7.7} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1})$ ;  $10^{7.5} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ <sup>[17]</sup>) 的稳定常数低一个数量级左右。另外,有研究表明 Ni 和 Mg 可能存在相同的传输位点<sup>[22]</sup>,而 Ca 和 Cd 可能存在相同的传输位点<sup>[23]</sup>,这为我们探究 Pb 和 Cd 是否存在相同的传输位点提供了参考。

### 2.2 Pb 对 Cd 生物积累的影响

如图 4 所示,当 Cd 的浓度为  $8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,Cd 的吸收随 Pb 浓度的升高而

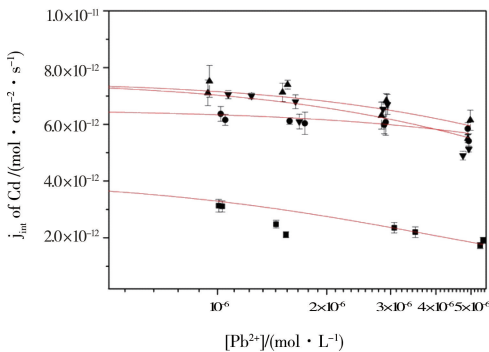


图 4 Pb 竞争对不同  $[\text{Cd}^{2+}]$  条件下 Cd 吸收通量的影响

注:  $[\text{Cd}^{2+}]$ :  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (■),  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (●),  $8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (▼),  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (▲)。

Fig. 4 Effect of Pb on Cd internalization fluxes

Note:  $[\text{Cd}^{2+}]$ :  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (■),  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (●),  $8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (▼),  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (▲)。

明显降低;当 Cd 的浓度低于  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,生物积累量受 Pb 浓度变化的影响较小。BLM 假设,细胞膜上有一定数量的活性位点可与金属结合,当金属浓度较低时,膜上有足够的活性位点,因而竞争金属不足以对目标金属的吸收通量产生明显影响。随着竞争离子浓度的增加,将会与目标金属竞争结合细胞膜上的活性位点,表现为竞争金属的吸收通量增加,而目标金属的吸收通量降低<sup>[24]</sup>。本研究表明 Pb 对 Cd 的吸收影响基本符合 BLM 的竞争机制假设,两者存在明显的竞争性。

根据 BLM 假设,在生物累积作用中,如果不同的金属有相同的活性结合位点,那么竞争关系可以通过以下公式进行描述:

$$J_{Cd} = J_{\max(Cd)} \frac{[\text{Cd}^{2+}] K_{Cd}}{[\text{Cd}^{2+}] K_{Cd} + [\text{Pb}^{2+}] K_{pb} + 1}$$

由图 4 拟合的曲线可得,2 种金属在不同浓度下,求得 Pb 对 Cd 结合位点的稳定常数及不同浓度条件下 Cd 的最大吸收通量 ( $J_{\max(Cd)}$ ) (表 2)。通过竞争实验求得的稳定常数与单金属短期暴露实验得到的参数接近,随着 Cd 离子浓度的增加,Pb 的稳定常数 ( $\text{Log} K_{pb}$ ) 增大,即 Pb 对 Cd 的竞争作用逐渐增强,也表明这 2 种金属在细胞膜的活性位点上产生了竞争作用,且 Pb 对 Cd 的竞争作用较强。

根据假设,在 2 种金属浓度相近的条件下,如果 2 种金属有共同的富集位点,则每种金属的吸收通量都会出现降低;相反,如果 2 种金属有各自不同的吸收位点,则不会出现吸收通量降低的现象<sup>[16]</sup>。由表 2 可得,在 Pb 存在的条件下,Cd 的吸收通量明显降低,当 Cd 的浓度为  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,吸收通量仅为非竞争条件下的 46%,说明 Pb 和 Cd 在绿藻细胞表面应该存在相同的富集位点,且 Pb 与细胞膜上位点结合的能力要远大于 Cd,因而导致 Cd 的吸收通量明显降低。

表 2 利用 BLM 公式拟合图 4 中的数据求出  $K_{pb}$  和  $J_{\max}$

Table 2 Applying BLM formula to fit the data in Figure 4 to obtain  $K_{Cd}$  and  $J_{\max}$

Cd 离子浓度 / ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	稳定常数 / ( $(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ )	最大吸收通量
The concentration of Cd / ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\text{Log} K_{pb} / ((\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1})$	$J_{\max(Cd)}$
$1 \times 10^{-6}$	2.09 (1.84~2.34)	$(3.83 \pm 0.23) \times 10^{-12}$
$5 \times 10^{-6}$	2.37 (2.15~2.59)	$(6.41 \pm 0.036) \times 10^{-12}$
$8 \times 10^{-6}$	2.48 (2.34~2.57)	$(7.28 \pm 0.017) \times 10^{-12}$
$1 \times 10^{-5}$	2.61 (2.53~2.66)	$(7.35 \pm 0.041) \times 10^{-12}$

### 2.3 Cd对Pb生物积累的影响

如图5所示,在随着Cd浓度从0增加到 $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>,Pb的吸收通量逐渐降低。当Cd浓度较低时,竞争离子没有显著降低Pb的生物累积量。虽然当Cd的浓度在较高浓度范围( $5 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>到 $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>)时,Pb的吸收通量会有所降低,但并不显著(t检验, $P > 0.05$ )。根据BLM假设,Cd对Pb的竞争作用可用如下公式进行描述,

$$J_{\text{Pb}} = J_{\text{max (Pb)}} \frac{[\text{Pb}^{2+}] K_{\text{Pb}}}{[\text{Pb}^{2+}] K_{\text{Pb}} + [\text{Cd}^{2+}] K_{\text{Cd}} + 1}$$

由图5拟合的曲线,2种金属在不同浓度下,可求得Cd对Pb结合位点的富集常数(表3)。从拟合图中可看出,Pb在不同的浓度条件下,竞争离子Cd对其竞争作用不显著,即使Cd的浓度范围从 $10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>升高至 $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>,对Pb最大吸收通量的影响仍很小(t检验, $P > 0.5$ )。Pb在 $1 \times 10^{-6}$ 到 $5 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>范围内,大约为国标V类水标准( $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的2到10倍,Cd在 $1 \times 10^{-6}$ 到 $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>范围内,大约为国标V类水标准( $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的10到100倍。绿藻在此范围内对Pb的生物富集量要明显大于Cd(t检验, $P \leq 0.05$ ),这也为更低浓度条件下,生物对2种重金属的竞争积累提供了一定的参考。从两者在非竞争条件下得到的稳定常数上看,Cd的稳定常数要小于Pb,最大吸收通量( $J_{\text{max}}$ )也要比Pb小0.5个数量级左右,即Pb与细胞膜上位点结合能力要比Cd更强,以致较高浓度的Cd仍不足以对较低浓度的Pb形成显著的竞争作用。这

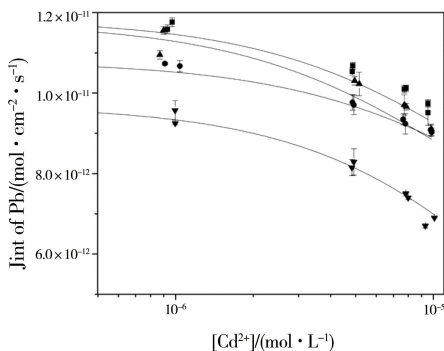


图5 Cd竞争对不同[Pb<sup>2+</sup>]条件下Pb吸收通量的影响

注:[Pb<sup>2+</sup>]:  $1 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>(▼),  $1.6 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>(●),  
 $3 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>(▲),  $5 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>(■)。

Fig. 5 Effect of Cd on Pb internalization fluxes.

Note: [Pb<sup>2+</sup>]:  $1 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>(▼),  $1.6 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>(●),  
 $3 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>(▲),  $5 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>(■)。

表3 利用BLM公式拟合图5中数据求出 $K_{\text{Cd}}$ 和 $J_{\text{max}}$

Table 3 Applying BLM formula to fit the data in Figure 5 to obtain  $K_{\text{Cd}}$  and  $J_{\text{max}}$

Pb离子浓度/(mol·L <sup>-1</sup> ) The concentration of Pb/(mol·L <sup>-1</sup> )	稳定常数/((mol·L <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> ) Log $K_{\text{Pb}}$ /((mol·L <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> )	最大吸收通量 $J_{\text{max(Pb)}}$
$1 \times 10^{-6}$	5.15 (5.05~4.25)	$(0.951 \pm 0.037) \times 10^{-11}$
$1.6 \times 10^{-6}$	4.41 (4.38~4.45)	$(0.984 \pm 0.017) \times 10^{-11}$
$3 \times 10^{-6}$	3.84 (3.83~3.85)	$(1.154 \pm 0.058) \times 10^{-11}$
$5 \times 10^{-6}$	3.94 (3.94~3.95)	$(1.181 \pm 0.019) \times 10^{-11}$

与单一金属试验结果相吻合。由表2可得不同浓度的Pb,在有竞争离子Cd的条件下的吸收通量。与无竞争离子条件相比,吸收通量没有发生太大的变化,即Cd对Pb在吸收位点上的竞争能力较弱,并不足以对Pb产生明显的竞争作用。

综上,金属对生物体的生物效应中,最先发生的就是生物累积,即生物需要先将金属从溶液中吸收到体内。Pb和Cd作为目标金属,最初的假设是这2种重金属很有可能具有相同的结合位点,进而探究2种金属对细胞膜上配体结合能力的差异。通过对Pb和Cd分别进行单金属的暴露试验,计算出各自的稳定常数。再固定1种金属浓度,改变另一种金属浓度的暴露试验,发现Cd与Pb应该存在相同的结合位点。由于Pb的稳定常数和吸收通量都明显大于Cd,可推测出Pb与活性位点的结合能力更强,不同浓度混合试验条件下的试验也验证了这点。即暴露溶液中若同时存在低浓度的Pb和Cd,绿藻会对Pb产生更多的生物积累,这也为进一步修订水质标准提供了一定的理论参考,表明了BLM可用于描述低浓度下Cd和Pb对莱茵衣藻的竞争关系。本实验仅考虑了不同浓度条件下的竞争,没有考虑存在其他阳离子(如Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>等)及有机配体条件下的竞争条件,因此模型仍需要进一步研究。

通讯作者简介:朱琳(1957—),男,教授,博士研究生导师,主要从事生态毒理学,环境生物学,海洋生态学等方面的研究。

### 参考文献 (References):

- [1] Di Toro D M, Allen H E, Bergman H L, et al. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20(10): 2383-2396
- [2] De Schampelaere K A C, Janssen C R. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia mag-*

- na: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH [J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(1): 48-54
- [3] Niyogi S, Wood C M. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(23): 6177-6192
- [4] Playle R C. Modelling metal interactions at fish gills [J]. *Science of the Total Environment*, 1998, 219(2-3):147-163
- [5] Slaveykova V I, Wilkinson K J. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model [J]. *Environmental Chemistry*, 2005, 2(1):9-24
- [6] US EPA. Aquatic life ambient freshwater quality criteria-copper [R]. Washington DC : Office of Water, 2007
- [7] Van S P, Vangheluwe M, Van H A, et al. European Union Risk Assessment Report: Copper, Copper ( II ) Sulphate-pentahydrate, Copper ( I ) Oxide, Copper ( II ) Oxide, Dicyclopentachloride Trihydroxide (Part 1) [M]// Voluntary Risk Assessment. Environmental Effects. Brussels, Belgium: European Copper Institute, 2007
- [8] 王春艳, 陈浩, 安立会, 等. BLM 预测水中重金属生物有效性研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2011, 34(8): 75-80
- Wang C Y, Chen H, An L H, et al. An updated review on biotic ligand model in predicting metal bioavailability in surface waters [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 34(8): 75-80 (in Chinese)
- [9] 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(3): 286-290
- Zhang R, Fan W H, Tang G, et al. A preliminary study on joint toxic effects of Cd and Zn on *Daphnia magna* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(3): 286-290 (in Chinese)
- [10] Niyogi S, Wood C M. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(23): 6177-6192
- [11] Veltman K, Huijbregts M A J, Hendriks A J. Integration of biotic ligand models (BLM) and bioaccumulation kinetics into a mechanistic framework for metal uptake in aquatic organisms [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(13): 5022-5028
- [12] 张永辉, 王龙昌, 周岩民, 等. 铅、镉联合暴露对公鸡生长早期生殖发育的影响[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6(2): 165-170
- Zhang Y H, Wang L C, Zhou Y M, et al. Effects of concurrent exposure to plumbum and cadmium on reproductive development in cocks [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(2):165-170 (in Chinese)
- [13] Puig S, Thiele D J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution [R]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6(2): 171-180
- [14] 詹杰, 胡德奇, 柳承希, 等. 镉对血管内皮细胞损伤及其致动脉硬化的毒理学机制[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(6): 633-638
- Zhan J, Hu D Q, Liu C X, et al. Damage of cadmium to vascular endothelial cells and its toxicity mechanism in atherosclerosis [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(6):633-638 (in Chinese)
- [15] 詹杰, 魏树和. 镉中毒的干预措施与机理分析[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(4): 354-359
- Zhan J, Wei S H. Methods of inhibiting cadmium toxicity and its mechanism: A review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(4): 354-359 (in Chinese)
- [16] An J S , Seulki J. Prediction of Cd and Pb toxicity to *Vibrio fischeri* using biotic ligand-based models in soil [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 203(204): 69-76
- [17] Worms I A M, Wilkinson K J. Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(12):4264-4270
- [18] Worms I A M, Parthasarathy N, Wilkinson K J. Ni uptake by a green alga. 1. Validation of equilibrium models for complexation effects [ J ]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(12): 4258-4263
- [19] Chen Z Z, Zhu L, Wilkinson K J. Validation of the biotic ligand model in metal mixtures: Bioaccumulation of lead and copper [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(9):3580-3586
- [20] Kolah H, Laglera L M, Parthasarathy N, et al. Cadmium adsorption by *Chlamydomonas reinhardtii* and its interaction with the cell wall proteins [J]. *Environmental Chemistry*, 2004, 1(3): 172-179
- [21] Hassler C S, Slaveykova V I, Wilkinson K J. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions [J]. *Limnology and Oceanography-Methods*, 2004, 2: 237-247
- [22] Kola H, Wilkinson K J. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modeling [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(9): 3040-3047
- [23] Lavoie M, Campbell P G C, Fortin C. Extending the biotic ligand model to account for positive and negative

- feedback interactions between cadmium and zinc in a freshwater alga [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(21):12129–12136
- [24] Paquin P R, Gorsuch J W, Apte S, et al. The biotic ligand model: A historical overview [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology and Pharmacology*, 2002, 133(1-2): 3–35
- [25] Worms I A M, Wilkinson K J. Ni uptake by a green alga. 2. Validation of equilibrium models for competition effects [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(12): 4264–4270
- ◆