

钙镁钾离子混合物对水体中几种重金属离子毒性的影响及作用机理

张瑞雪, 王丹, 周彦宏, 张家欢, 李珊珊, 徐浩

(西安交通大学能源与动力工程学院, 710049, 西安)

摘要: 为明确水体中常见的钙镁钾离子混合物对重金属离子 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 和 Fe^{3+} 毒性的影响,以明亮发光杆菌 T3(*Photobacterium phosphoreum* T3)为受试生物,进行急性毒性测试并通过生化指标及核心发光基因表达量变化进行机理解析。结果表明:单一重金属离子对明亮发光杆菌 T3 的毒性大小为 $\text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Cr}^{6+}$,在添加不同浓度 Ca^{2+} - Mg^{2+} - K^{+} 混合液后重金属离子的毒性降低,当 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 K^{+} 质量浓度分别为 13.40、8.00 和 26.20 mg/L 时,联合毒性最弱;重金属离子质量浓度较低(< 2.0 mg/L)时,重金属离子与 Ca^{2+} - Mg^{2+} - K^{+} 混合液之间呈拮抗作用,并出现明显的兴奋刺激效应;随着重金属离子质量浓度的增加,联合作用逐渐转为加和作用; Ca^{2+} - Mg^{2+} - K^{+} 混合液的加入使细胞内活性氧质量下降,超氧化物歧化酶活性以及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸质量上升,使得菌体抗氧化能力增强,并刺激氧化还原反应来提升能量供应水平,从而降低金属离子的毒性。该研究可为实际水体中混合重金属离子的毒性评估和调控提供数据参考。

关键词: 重金属离子;联合毒性效应;兴奋刺激效应;明亮发光杆菌 T3

中图分类号: X826;TQ13 **文献标志码:** A

DOI: 10.7652/xjtub202411018 **文章编号:** 0253-987X(2024)11-0185-11

Effect and Mechanism of Calcium-Magnesium-Potassium Ion Mixtures on Toxicity of Heavy Metal Ions in Water

ZHANG Ruixue, WANG Dan, ZHOU Yanhong, ZHANG Jiahuan, LI Shanshan, XU Hao

(School of Energy and Power Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: In order to determine the effect of common calcium-magnesium-potassium ion mixtures in water on the toxicity of heavy metal ions, such as Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} , Cd^{2+} and Fe^{3+} , acute toxicity tests are carried out using *Photobacterium phosphorium* T3 as the tested organism. Mechanistic analysis is performed through biochemical indicators and changes in the expression levels of core luminescent genes. The results indicate that the toxicity of individual heavy metal ions to the bioluminescent bacterium T3 follows the order: $\text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Cr}^{6+}$. The toxicity of heavy metal ions decreases after the addition of different concentrations of Ca^{2+} - Mg^{2+} - K^{+} mixed solution, with the weakest combined toxicity observed when the mass concentrations of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and K^{+} are 13.40, 8.00, and 26.20 mg/L, respectively. Moreover, when the concentration of heavy metal ions is low (< 2.0 mg/L), an antagonistic effect is observed between the heavy metal ions and the Ca^{2+} - Mg^{2+} - K^{+} mixture, accompanied by

收稿日期: 2024-04-01。 作者简介: 张瑞雪(2000—),女,博士生;李珊珊(通信作者),女,副教授,博士生导师。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2019YFB2103003)。

网络出版时间: 2024-07-26

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/61.1069.T.20240725.1810.004>

a significant stimulating effect. As the concentration of heavy metal ions increases, the combined action gradually shifts towards an additive effect. The addition of Ca^{2+} - Mg^{2+} - K^{+} mixed solution leads to a decrease in intracellular reactive oxygen species levels, an increase in superoxide dismutase activity and the content of reduced nicotinamide adenine dinucleotide, enhancing the bacterium's antioxidant capacity and stimulating redox reactions to improve energy supply levels, thereby reducing the toxicity of metal ions. The study can provide data reference for the toxicity evaluation and regulation of mixed heavy metal ions in actual water bodies.

Keywords: heavy metal ions; combined toxicity; hormesis; *Photobacterium phosphoreum* T3

近年来,科技进步带来的工业迅速发展使水体质量不断恶化,中国生态环境部公布的《第二次全国污染源普查公报》中表示,2017 年全国重金属排放量 182.54 t,七大流域(长江、黄河、珠江、松花江、淮河、海河、辽河)重金属排放量 154.94 t。由于重金属无法被微生物降解,并且会通过食物链积蓄在人体内,因此重金属对生态环境及人类生活都产生了较为严重的影响^[1-3]。根据《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002), Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{3+} 作为污染影响程度较高的重金属离子值得被关注,其质量浓度都被要求在 1.0 mg/L 以下^[4]。作为保证天然水体渗透压必不可少的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 K^{+} ,受人类活动影响在水体中的浓度不断增加,这一方面会对生物造成不利影响,另一方面也会对重金属离子在生物体内的毒性产生影响^[5-8]。为此,选择合适的方式去探究 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 和重金属离子之间的相互作用是十分重要的。

发光细菌作为一类能够在生长过程中发出荧光的细菌,当其接触到有毒物质后,菌体的正常代谢及发光系统会受到影响,从而使发光强度发生变化,因此可以用发光细菌确定污染物的毒性^[9-10]。同时,通过检测菌体的生化指标及荧光素酶核心基因转录水平的变化可以进行毒理分析。对混合物进行毒性评估时,其联合毒性并不是简单的单一污染物的毒性加和,各物质之间的相互作用可以被分为拮抗作用、相加作用、协同作用和独立作用^[11-13]。为明确多种污染物的联合毒性类型,学者们提出了几种研究模型来预测污染物的联合毒性,主要包括浓度加和(CA)模型、独立作用(IA)模型和两阶段(TSP)模型。CA 模型和 TSP 模型更适合多组分混合体系的联合作用评价,但它们会存在不能预测的“盲区”。而 IA 模型作为根据各组分单独存在时在某浓度引起的效应计算得到该浓度下混合物的效应总和来确定具体的联合毒性效应的模型,其计算相对简便,适用性较强,故本文选择该

模型作为预测模型^[14-15]。

为探究 Ca^{2+} - Mg^{2+} - K^{+} 混合物对水体中的重金属离子 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{3+} 的毒性影响,本研究利用明亮发光杆菌 T3 (*Photobacterium phosphoreum* T3)作为毒性测试菌体,并利用 IA 模型预测联合毒性,判断混合物的联合毒性效应类型。进一步通过测定总蛋白(TP)、活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和基因转录水平等指标的变化来阐述重金属离子混合污染物的潜在机理,以期评价多种重金属离子混合污染的潜在风险提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验菌种选用明亮发光杆菌 T3 变种(实验室保藏菌种)^[16],待测金属化合物及标准液均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度不低于 99.9%,其余化学试剂为分析纯。

1.2 金属样品液的配制

单一重金属溶液的配制:设置实验浓度区间,最低质量浓度设为 0.1 mg/L, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{3+} 最高质量浓度分别设为 20、10、100、30、20 mg/L。金属液样品中添加质量分数为 3% 的 NaCl 溶液以保证菌体的发光亮度。

混合金属溶液的配制:根据单一 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 K^{+} 对菌体作用的浓度-效应曲线,利用等效效应固定浓度比射线法,按半抑制浓度等效效应固定浓度比配制 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 混合液(简称 CMK)。以 Mg^{2+} 为基准取菌体发光抑制率分别为 0%、50%、100% 时的浓度并计算 Ca^{2+} 、 K^{+} 的浓度,将其混合后作为低、中、高 3 种浓度混合液(简称为 LCMK、MCMK、HCMK),此时混合液总效应为 50%^[17-20],具体浓度设置见表 1。

表 1 不同浓度 CMK 混合液中各离子的浓度
Table 1 Concentration of each ion in the CMK mixture at different concentrations

离子	质量浓度/(mg·L ⁻¹)		
	LCMK	MCMK	HCMK
Ca ²⁺	6.72	13.40	20.14
Mg ²⁺	4.00	8.00	12.00
K ⁺	13.10	26.20	39.30

1.3 明亮发光杆菌 T3 的急性毒性检测

适宜条件下培养明亮发光杆菌 T3(简称 T3 菌)并在液体培养基中传代^[16],作为测试菌液待用,使菌液的光密度保持为 1.0 左右,此时相对发光值约为 1.5×10⁹。根据《水质急性毒性的测定发光细菌法(GB/T 15441—1995)》进行待测样的 15 min 急性毒性测试。测试菌液与待测样体积比为 1:2^[21]。

1.4 毒性机理相关指标的检测

将菌体破碎并离心(4℃,5 000 r/min)后取上清作为待测液。分别用试剂盒测定样品的总蛋白浓度、活性氧(ROS)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)含量。为更直观地指示各生化指标的变化,采用测试样品与空白对照的指标比(η)即相对质量或相对活性作为评价指标^[22],计算方法如下所示

$$\eta = P/P_0 \tag{1}$$

式中: P 为实验组生化指标质量或活性; P₀ 为对照组生化指标质量或活性。当 η>1 时,表示该生化指标含量或活性上升,反之则表示降低。

基于急性毒性检测方法,将测试体系等比例扩大至 30 mL。将菌体离心(4℃,5 000 r/min)洗涤后,用试剂盒依次进行菌体的总核糖核酸提取、反转录以及实时荧光定量聚合酶链式反应。以 16 S rRNA 为内参基因对目标基因的转录水平进行相对定量,通过 mRNA 相对表达量判断基因转录水平的变化,当 mRNA 相对表达量大于 1 时基因表达水平表现为上调,当 mRNA 相对表达量小于 1 时基因表达水平表现为下降^[23]。

1.5 数据处理

1.5.1 浓度-效应曲线拟合模型

采用发光抑制率来量化毒性效应。为了更好地评价测试样品的毒性,本研究选择拟合模型来计算半抑制浓度。通过使用软件 Graphpad Prism 9.0 选择四参数 Logistic(4PL)模型对实验数据进行非线性拟合,模型表达式为

$$Y = Y_{\min} + \frac{X^k(Y_{\max} - Y_{\min})}{X^k + C} \tag{2}$$

式中: Y 为样品引发的毒性效应; X 为样品浓度; Y_{max} 为样品引发的毒性效应最大值; Y_{min} 为样品引发的毒性效应最小值; k 为拟合曲线的斜率; C 为样品引发的毒性效应为 50%时的反应物浓度。

1.5.2 联合毒性评价方法

采用 IA 模型评价混合物联合毒性^[15],具体公式为

$$I(C_{\text{mix}}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - I(C_i)] \tag{3}$$

式中: I(C_{mix}) 为混合物总发光抑制率; n 为混合物中存在的组分总数; I(C_i) 为第 i 个组分单独存在且浓度为 C 时的发光抑制率。

根据实验数据以及式(3),计算混合物在不同浓度下的毒性效应预测值及 95%置信区间,利用 4PL 模型对 IA 模型预测数据(I(C_{mix}))和实测数据进行拟合,根据拟合所得的两条曲线的相对位置来评价混合物的联合毒性^[24](见图 1)。其中, a₁ ~ a₂ 浓度区间内,实测曲线位于 IA 预测曲线之上,联合毒性表现为协同作用;类似地,在 a₂ ~ a₃ 浓度区间内联合毒性表现为相加作用;在 a₃ ~ a₄ 浓度区间内联合毒性表现为拮抗作用。

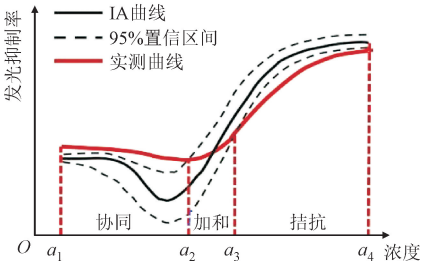


图 1 IA 模型评价联合毒性示意图
Fig. 1 Schematic diagram of the combined toxicity of IA model evaluation

1.5.3 显著性差异分析方法

实验结果以平均值±标准差来表示,并利用 Graphpad Prism 9.0 进行 t 检验,分析实验组和对照组是否存在显著性差异。当 P≤0.05 时表示有统计学差异, P≤0.01 表示有显著统计学差异, P≤0.001 表示有非常显著的统计学差异, P≤0.000 1 表示有极其显著的统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度 CMK 对重金属离子的急性毒性影响

2.1.1 添加 CMK 后重金属离子的毒性效应

Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺ 是天然水体中占比较大的 3 种离子,为了明确不同浓度的 CMK 混合液对其他重金

属离子毒性的影响,进行 15 min 急性毒性测试^[6]。测试结果表明,LCMK、MCMK 和 HCMK 对 T3 菌的发光抑制率均小于 0,分别为-18%、-26%和-19%,说明 3 种浓度的 CMK 混合液都会对 T3 菌产生发光

刺激作用,其刺激效应大小为 MCMK>LCMK≈HCMK。将毒性测试数据使用 4PL 模型进行拟合,其对应的浓度-效应曲线如图 2 所示。

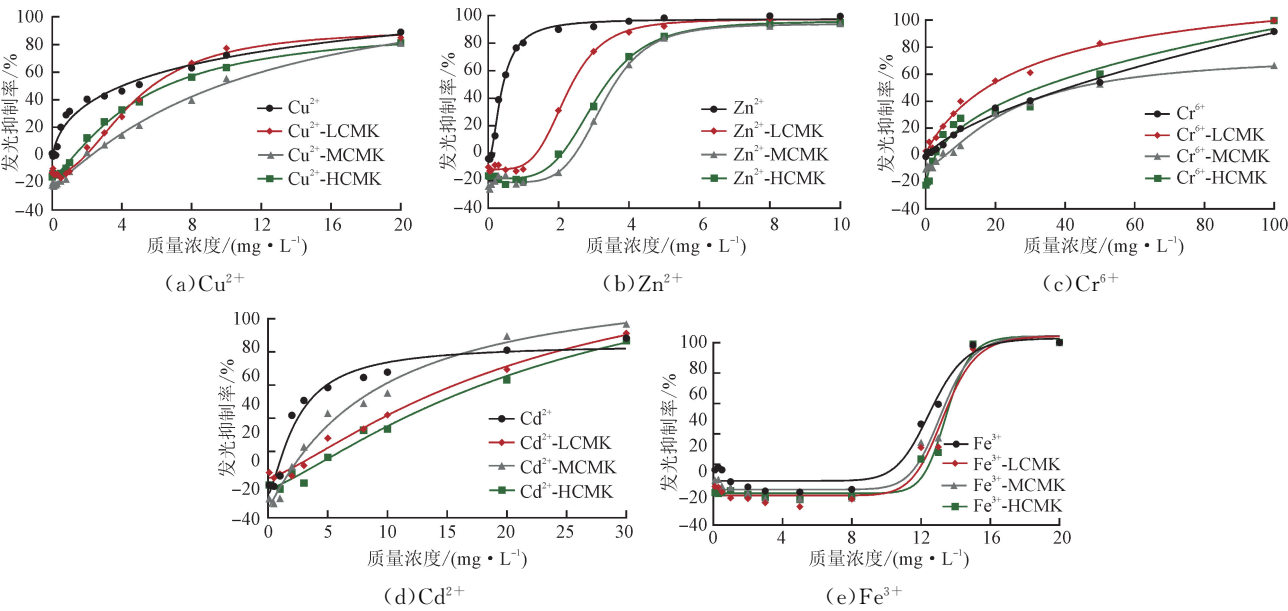


图 2 5 种重金属离子和不同浓度 CMK 共存时的浓度-效应曲线

Fig. 2 Concentration-effect curves of five heavy metal ions with different concentrations of CMK

5 种重金属离子添加 CMK 前后的半抑制浓度见表 2,可以发现,重金属离子单一毒性大小为 $Zn^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Fe^{3+} > Cr^{6+}$; 5 种重金属离子即使在浓度很低时也表现出抑制 T3 菌发光的毒性作用,但并没有呈现出浓度较低时刺激发光,而浓度较高时抑制发光的低促高抑的毒性兴奋效应 (Hormesis) 现象^[11]。对于同一重金属离子,在测试浓度范围内,发光抑制率随着浓度的增加而增加,直至抑制率达到 100%,此时毒性作用达到最大,表现出一定的浓度依赖性,但当不同浓度的 CMK 添加到重金属离子溶液后,各测试组均呈现出毒性兴奋效应。

表 2 5 种重金属离子添加 CMK 前后的半抑制浓度
Table 2 Half maximal inhibitory concentration values of five heavy metal ions before and after CMK addition

组别	半抑制浓度/(mg · L ⁻¹)				
	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Fe ³⁺	Cr ⁶⁺
M ⁿ⁺	4.00	0.43	3.48	12.33	42.13
M ⁿ⁺ -LCMK	5.76	2.38	12.37	13.26	17.60
M ⁿ⁺ -MCMK	9.56	3.58	7.43	13.05	42.23
M ⁿ⁺ -HCMK	6.51	3.35	14.31	13.41	32.63

注: Mⁿ⁺ 中 M 为金属, n 为金属离子的电荷数。

5 种重金属离子随浓度变化而产生的毒性效应变化趋势并不完全相同,其中 Cu²⁺、Zn²⁺ 和 Cd²⁺ 的

毒性效应变化趋势较为一致。添加钙镁钾离子混合物后的浓度-效应曲线均低于未添加钙镁钾离子混合物的曲线(图 2(a)、2(b) 和 2(d)),说明加入 CMK 后混合离子的半抑制浓度大于单一离子的半抑制浓度,对菌体的毒性降低。特别是在添加 MCMK 后,在重金属离子浓度较低(0.1 mg/L)时,Cu²⁺、Zn²⁺ 和 Cd²⁺ 均出现了明显的兴奋效应现象,此时的发光抑制率分别为-21.67%、-24.00%和-8.41%。添加 CMK 后各重金属离子的最大发光刺激效应与 CMK 混合液单一作用时相近,此时单一重金属离子的毒性较小,发光抑制率约为 0%,这与 Masoud 等的研究结果^[25]相似。类似地,在 Li 等对药物三七的研究中发现,一方面由于 Ca²⁺ 和 Cd²⁺ 具有相似的离子半径和相似的化学性质,二者会竞争吸附位点,当溶液中存在 Ca²⁺ 和 Cd²⁺ 时,Ca²⁺ 可以显著降低植物对 Cd²⁺ 的吸收,从而降低 Cd²⁺ 的毒性;另一方面 Ca²⁺ 后会促进 CC(钙通道蛋白)、ATP(腺嘌呤核苷三磷酸)酶和 CAXs(阳离子/H⁺ 反转运蛋白)活性的增加,从而有效增加 Cd²⁺ 的外排和解毒^[26]。

Cr⁶⁺ 的毒性效应变化趋势与上述 3 种重金属离子并不相同(图 2(c))。Cr⁶⁺ 与不同浓度的 CMK 混合液的半抑制浓度大小顺序为 Cr⁶⁺-MCMK≈Cr⁶⁺>Cr⁶⁺-HCMK>Cr⁶⁺-LCMK,说明加入 MCMK

后混合液的半抑制浓度大于单一离子的半抑制浓度,对菌体的毒性降低,这与 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 的结论一致;但加入 LCMK 和 HCMK 后混合液的半抑制浓度小于单一离子半抑制浓度,呈现为对菌体的联合毒性加强。这可能是因为 Cr^{6+} 质量与 CMK 之间竞争关系较小,毒性效应主要表现为独立作用^[26-27]。在分别添加 HCMK 和 MCMK 后, Cr^{6+} 质量浓度较低时同样出现兴奋效应,最大发光刺激效应分别为 -22.25% 和 -10.34% 。测试的重金属离子中, Fe^{3+} (图 2(e))在添加 CMK 混合液后毒性变化最小,各待测样的半抑制浓度大小为 $\text{Fe}^{3+}\text{-HCMK} > \text{Fe}^{3+}\text{-LCMK} > \text{Fe}^{3+}\text{-MCMK} > \text{Fe}^{3+}$,即加入 CMK 混合液后其半抑制浓度大于单一离子,对菌体的毒性降低。随着 Fe^{3+} 浓度的增加,对 T3 菌的毒性呈先降低后增加的趋势。值得注意的是,当 Fe^{3+} 质量浓度小于 9 mg/L 时,其浓度的变化对毒性的影响较小;当浓度在 $9\sim 16\text{ mg/L}$ 时, Fe^{3+} 毒性随浓度迅速增加。与 He 等^[27] 的研究类似,在 Caco-2 细胞中, Fe^{3+} 质量浓度低于 1.5 mmol/L 时,细胞可以使用内在的抗氧化酶(过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化酶)抵抗 Fe^{3+} 的氧化损伤, Fe^{3+} 质量浓度高于 1.5 mmol/L 时, Fe^{3+} 会降低细胞抗氧化基因的表达,同时能够与次氨基三乙酸脂结合诱导脂质过氧化,降低细胞的膜稳定性,进一步增加氧化损伤。

2.1.2 重金属离子与不同浓度 CMK 混合液的联合毒性类型

为了进一步评价 CMK 的存在对重金属离子毒性的影响以及 CMK 和重金属离子之间的联合毒性类型,利用 IA 模型计算添加 CMK 后的预期数值,并基于 4PL 模型对实测值和预期值进行拟合得到 IA 拟合曲线,如图 3 所示。

由图 3(a)~(c)可见, $\text{Cu}^{2+}\text{-LCMK}$ 的实测曲线与 IA 曲线有明显的交叉,表明联合作用类型随浓度的升高发生了变化,从低浓度时的拮抗作用转变为高浓度时的协同作用。这与图 2(a)中的结果一致,即 Cu^{2+} 浓度小于交叉点浓度(5.06 mg/L)时 LCMK 的添加会降低毒性,反之会增大毒性。 $\text{Cu}^{2+}\text{-MCMK}$ 和 $\text{Cu}^{2+}\text{-HCMK}$ 在整个测试浓度区间同样表现为拮抗作用,且这种拮抗作用的强度随着 Cu^{2+} 浓度的增加呈先增后减的趋势,其中 $\text{Cu}^{2+}\text{-MCMK}$ 表现出的拮抗作用强度最大,这与 MCMK 的添加降低毒性效果最大的结论一致。目前已有研究表明,水中 Ca^{2+} 浓度的增加可以降低 Cu^{2+} 对水生生物的毒性效应,这与转运蛋白之间的竞争性结合有关。Peter 等^[28] 的研

究表明,铜会竞争性地抑制钙结合位点,例如钙激活钾通道(K-Ca),当 Ca^{2+} 质量浓度为 $50\sim 100\text{ mg/L}$ 时,暴露在 Cu^{2+} 中的鲶鱼的死亡率下降。

对于 Zn^{2+} 与 Cd^{2+} 来说,在添加不同质量浓度的 CMK 之后,同样在整个测试浓度区间表现出明显的拮抗作用(图 3(d)~(i))。造成该结果的原因可能是 Zn^{2+} 在生物体内与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 之间存在竞争关系,这一结果与 Paylar 等^[29] 的研究一致,即水体中的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 能够降低暴露在 Zn^{2+} 下大型蚤的死亡率,与 Zn^{2+} 之间为拮抗作用,而 Cd^{2+} 会争夺 Ca^{2+} 通道。研究表明 Cd^{2+} 与 Ca^{2+} 在生物体内会有显著的拮抗作用,其原因是 Cd^{2+} 与 Ca^{2+} 的半径相似,因此会竞争 Ca^{2+} 结合位点,从而抑制 Cd^{2+} 被吸收^[30-31]。 Zn^{2+} 与 Cd^{2+} 拮抗作用强度的变化与 Cu^{2+} 一致,即随着重金属离子浓度的增加而先增加后减小,这一变化趋势与降低毒性效应的变化相符。观察其拮抗作用的强度可以发现, Zn^{2+} 与 Cu^{2+} 规律一致,添加 MCMK 表现出的拮抗作用的强度最大,在 1.8 mg/L 时对菌体的毒性降低的程度最大,为 115% ;而 Cd^{2+} 添加 MCMK 后表现出的拮抗作用的强度最小,这与添加 MCMK 后对毒性的降低效果表现一致。 Fe^{3+} 与不同浓度的 CMK 之间(图 3(j)~(l))同样表现为拮抗作用,拮抗作用的强度随着 Fe^{3+} 浓度的增加呈逐渐增加的趋势。与其他几种重金属离子相比,加入 CMK 混合液后带来的毒性变化较小,并且添加 MCMK 后拮抗作用的强度最低,降低毒性的效果也最差。

如图 3(m)~(o)所示, Cr^{6+} 与 LCMK 的联合毒性作用表现为协同作用,且协同作用的强度随着 Cr^{6+} 浓度的增加先增加后减小,说明混合液的毒性随之先增后减;添加 HCMK 后的实测曲线与 IA 曲线基本重叠,说明 Cr^{6+} 与 CMK 表现为简单的加和作用,与图 2(c)中的结论一致。这种差异究其原因可能是引起毒性作用的途径不同,通常 Cr^{6+} 经由磷酸盐通道进入细胞内,与 CMK 竞争关系较弱,在 LCMK 下, Cr^{6+} 主要集中在细胞膜附近并改变细胞膜的通透性并对菌体造成损伤;而随着 CMK 浓度的增加,在加入 MCMK 后由于 Mg^{2+} 能够降低磷酸盐含量并促进 Cr^{6+} 进入细胞内,此时 Cr^{6+} 与细胞内还原剂反应生成 Cr^{3+} ,因此混合液对菌体的毒性比单一金属离子的毒性低。添加 MCMK 后在整个浓度区间为拮抗作用,并且拮抗作用的强度也随着 Cr^{6+} 浓度的增加而先减后增,与其他浓度的 CMK 相比达到了最大的拮抗作用的强度^[32-34]。

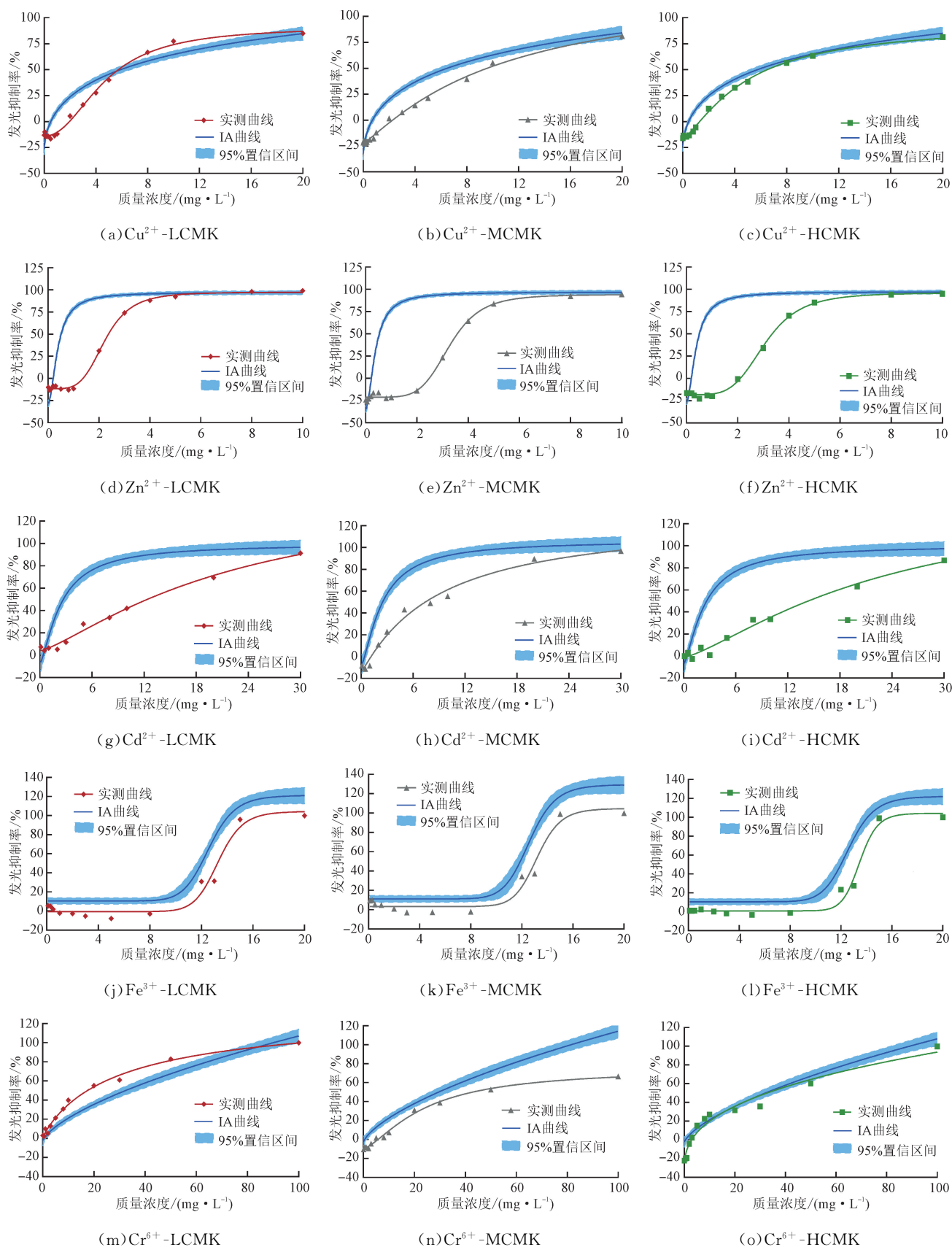


图 3 添加不同浓度 CMK 后各重金属离子毒性的实测曲线及 IA 曲线

Fig. 3 Measured and IA curves of the toxicity of each heavy metal ion after the addition of different concentrations of CMK

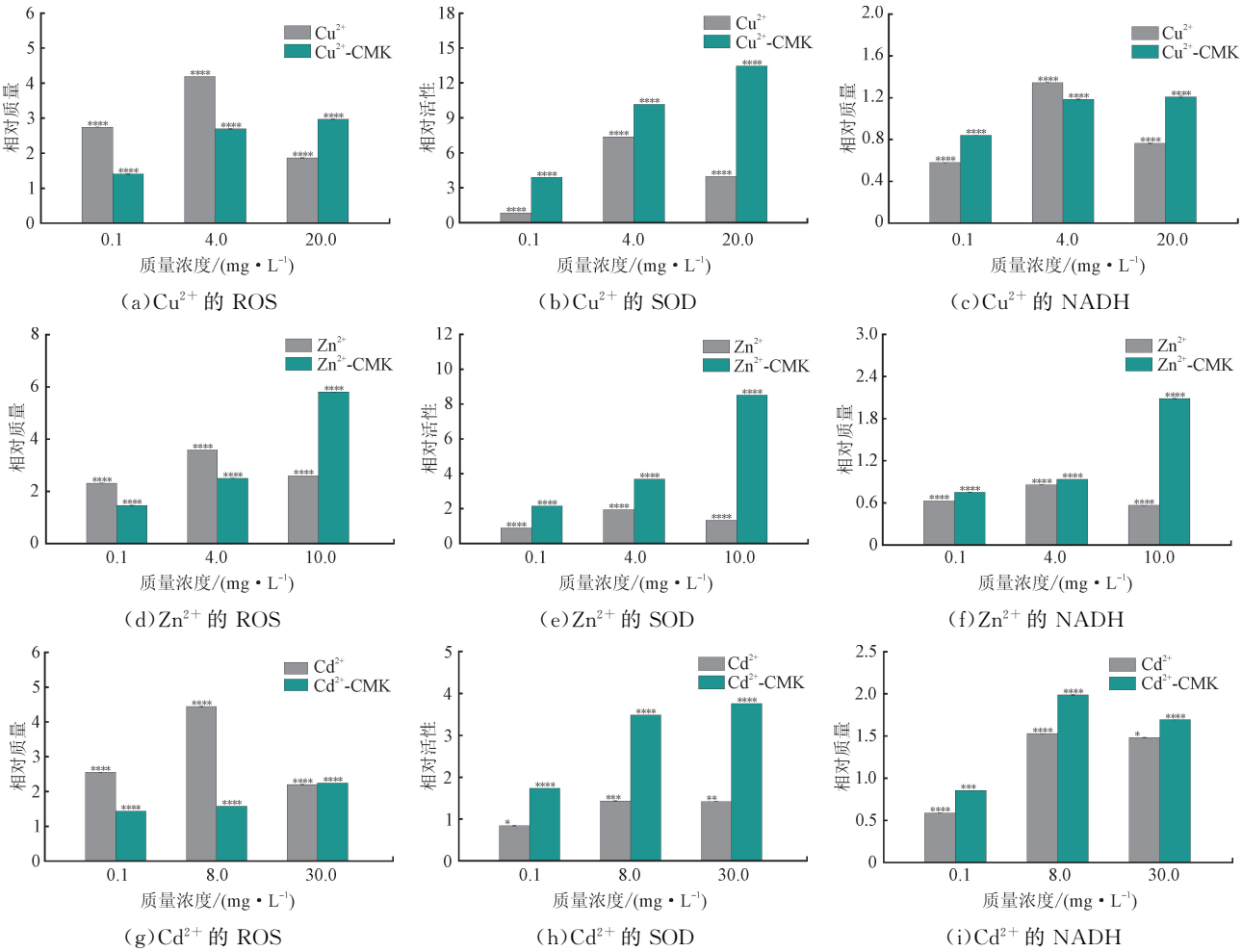
以上结果表明:添加 CMK 后混合液的毒性与单一重金属离子存在时相比毒性降低,其原因可能与转运蛋白之间的竞争性结合有关。同时 CMK 与低浓度的重金属离子共存时会产生兴奋效应现象,刺激 T3 菌发光;重金属离子浓度较高时,混合液引起的发光抑制率基本为 100%,毒性较大且 IA 拟合曲线与实测曲线的重合程度较高,表明此时 CMK 与测试重金属离子之间的相互作用较弱,更倾向于简单的加和作用。值得注意的是,MCMK 对重金属离子毒性的影响最大,因此为了进一步探究 CMK 混合液与重金属离子的联合毒性效应机理,选择添加 MCMK 进行后续的机理研究。

2.2 MCMK 影响重金属离子毒性的机理研究

2.2.1 添加 MCMK 后重金属离子对生化指标的影响

基于前面的实验结果,取重金属离子为 0.1 mg/L (低浓度),以及混合液毒性效应为 50%半抑制浓度和 100%全抑制浓度处重金属离子的浓度点测定添加 CMK 前后菌体内 ROS、SOD 和 NADH 等生化指标的变化,并通过总蛋白含量进行均一化。

添加 MCMK 前后各重金属离子对 T3 菌生化指标的影响如图 4 所示,图中 * 表示 $P\leq 0.05$, ** 表示 $P\leq 0.01$, *** 表示 $P\leq 0.001$, **** 表示 $P\leq 0.0001$ 。加入重金属离子后,T3 菌体内 ROS 的相对质量随着重金属离子浓度的增加呈先增后减的趋势,其中 Fe^{3+} 浓度变化导致的 ROS 相对质量变化微弱, η 最高仅为 1.27。当 5 种重金属离子质量浓度为 0.1 mg/L 时,添加 MCMK 后菌体内 ROS 的相对质量与未加 CMK 相比均下降,表明此浓度下 MCMK 的添加有利于降低菌体内的 ROS 相对质量。ROS 作为自然代谢过程中产生的分子,同样也是毒物的效应分子,当菌体周围存在污染有害物质时,ROS 会迅速增加,当抗氧化能力与其不平衡时会诱发氧化应激,并对菌体造成各种损伤^[35-36],意味着 ROS 的相对质量与毒性可能具有相关性,此时 ROS 相对质量的下降可能是图 2 在低浓度下出现兴奋效应现象的原因之一。在半抑制浓度处的浓度点,除 Fe^{3+} 外添加 MCMK 后菌体内的 ROS 相对质量降低,并且降低程度比低浓度下更为显著。浓度为全抑制浓度时与未添加 CMK 的菌体相比添加 CMK 后 ROS 相



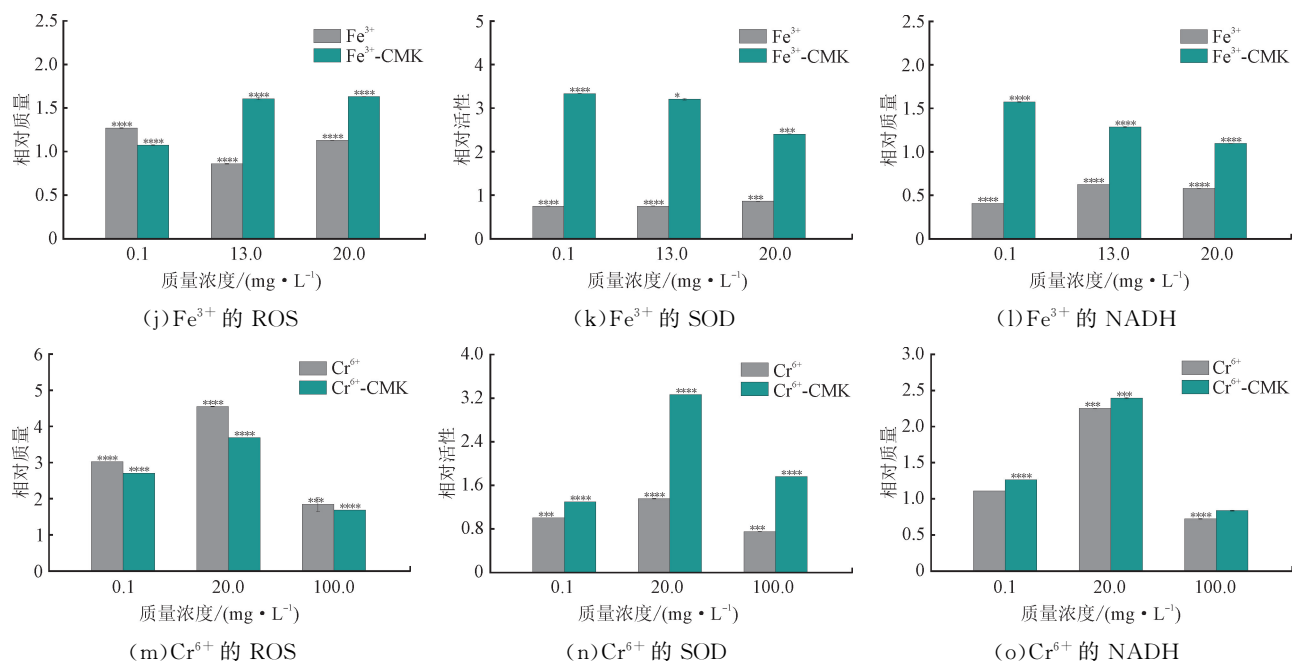


图 4 添加 MCMK 前后各重金属离子对 T3 菌生化指标的影响

Fig. 4 Effects of heavy metal ions on T3 biochemical indexes before and after MCMK addition

对质量明显上升,此时重金属离子与 MCMK 的相互作用类型为简单加和作用,毒性增加,而 Cr^{6+} 在此时引起的 ROS 相对质量从 1.84 降为 1.69 (图 4(m)),与前面的毒性变化一致。

SOD 作为生物体内抗氧化金属酶是 ROS 的清除剂之一,在机体氧化与抗氧化平衡中起到了重要作用^[32]。在未添加 CMK 时,T3 菌体内的 SOD 活性随着 5 种重金属离子浓度的增加先增后降,其变化趋势与 ROS 质量变化类似。5 种重金属离子在 0.1 mg/L 时的 η 约为 1,表明此时重金属离子的添加引起的变化微弱。添加 MCMK 后菌体的 SOD 活性都出现了明显的上升,并且在半抑制浓度处的 SOD 活性显著高于 0.1 mg/L 时的 SOD 活性。SOD 活性的上升,有利于降低细胞内的 ROS 质量,并减少由氧化应激反应所造成的细胞损伤,这与 ROS 的质量变化相关联。T3 菌接触浓度为全抑制浓度处的待测液后,SOD 活性同样大幅度的增加,但 ROS 质量反而上升,这种差异可能是因为 ROS 相对质量并非受 SOD 单独影响。特别地,全抑制浓度下 Cr^{6+} 的 SOD 活性涨幅弱于其他重金属离子 (图 4(n)),这可能是由于 Cr^{6+} 在胞内会被各类还原剂还原为 Cr^{3+} ,其中也包含了 SOD^[32]。从上述结果可以推测,SOD 活性的上升可能是重金属离子毒性被弱化的原因之一。

NADH 作为氧化还原反应的重要底物之一,同

时也是超氧化物和其他 ROS 形成的关键底物,能够在 NADH 氧化酶或线粒体的电子传递链中充当电子供体,而 ROS 能够打开线粒体通透性转换孔,允许 NADH 自由通过细胞质,因此 ROS 和 NADH 之间的相互作用对维持和破坏细胞内氧化还原稳态具有重要意义^[37]。在加入单一重金属离子后,NADH 相对质量变化同样呈先增加后下降的趋势,这与 ROS 相对质量和 SOD 活性在加入单一重金属离子后的变化相似。添加 MCMK 后,胞内的 NADH 相对质量上升,变化幅度与 SOD 活性的变化幅度相近,表明 CMK 的添加能够促进 NADH 的生成,猜测这也是重金属离子毒性能够被弱化的原因之一。

通过对 T3 菌生化指标的分析,诱导 ROS 产生引起氧化应激反应是重金属离子对 T3 菌的毒性作用的原因之一。添加 MCMK 后,菌体内的 NADH 相对质量增加,SOD 活性也大幅上升,这可能使得菌体的抗氧化能力增强,降低 ROS 的相对质量,降低重金属离子造成氧化损伤,最终呈现出毒性削弱现象。

2.2.2 添加 MCMK 后重金属离子对发光核心基因转录水平的影响

为了进一步探究 CMK 造成的毒性弱化现象之间可能的联系,对添加 MCMK 后金属离子对 T3 菌体内发光关键基因 *luxB* 的转录水平进行了测试,以信使核糖核酸 (mRNA) 的相对表达量来表示

luxB 的转录水平,结果如图 5 所示。

对于单一重金属离子存在时,Cu²⁺、Cd²⁺ 和 Fe³⁺ 对 T3 体内 *luxB* 的转录水平影响相似。随着重金属离子浓度的增加,*luxB* 转录水平呈先降低后增加的趋势,半抑制浓度处 *luxB* 的转录水平明显下调。单一 Zn²⁺ 处理后,*luxB* 转录水平随着重金属离子浓度的增加不断降低,并且质量浓度为 4 mg/L 和 10 mg/L 时其转录水平下降。添加 MCMK 后, *luxB* 的转录水平在低浓度重金属条件下明显降低,

只有在全抑制浓度下菌体的 *luxB* 转录水平升高。而 Cr⁶⁺ 则与之相反,在半抑制浓度(20.0 mg/L)处的转录水平呈最大值,并且在添加 MCMK 后, 0.1 mg/L 时的转录水平有所升高,与其他重金属离子的变化并不相同。将结果与菌体的发光响应相比较(图 2),*luxB* 转录水平与发光响应随重金属离子浓度的变化呈现的规律性并不对应,这表明重金属离子并不会通过改变核心发光基因 *luxB* 的表达水平来引起毒性。

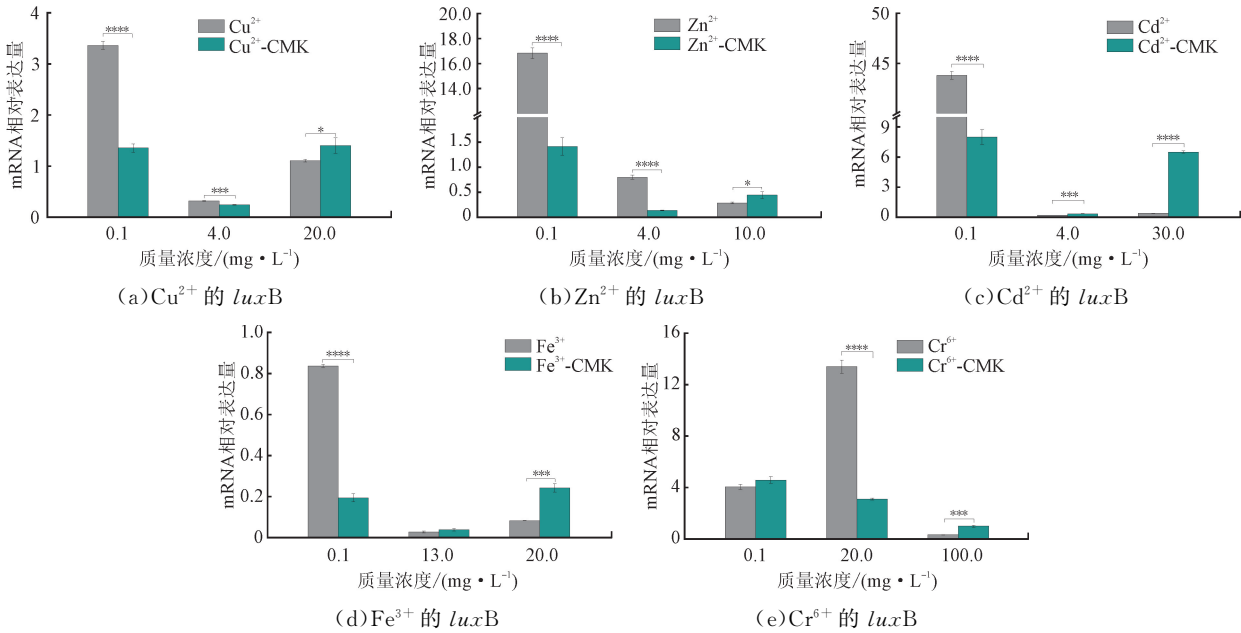


图 5 添加 MCMK 前后各重金属离子对 T3 菌的 *luxB* 转录水平的影响

Fig. 5 Effect of heavy metal ions on the *luxB* transcription level of T3 before and after MCMK addition

3 结 论

本研究基于明亮发光杆菌 T3 进行急性毒性测试,结合 T3 菌体内生化指标(ROS、SOD、NADH) 及发光核心基因转录水平的变化,探究 Ca²⁺-Mg²⁺-K⁺ 混合液对 Cu²⁺、Zn²⁺、Cr⁶⁺、Cd²⁺、Fe³⁺ 的毒性影响和联合毒性作用机理,主要结论如下。

(1)单一重金属离子对明亮发光杆菌 T3 的毒性大小为 Zn²⁺ > Cd²⁺ > Cu²⁺ > Fe³⁺ > Cr⁶⁺,重金属离子单独作用时没有兴奋效应现象,而在添加不同质量浓度 CMK 后则会出现明显的兴奋效应现象,其中添加 MCMK 后的兴奋效应现象最为显著。

(2)当重金属离子浓度较低(0.1 mg/L)时,其与 CMK 混合液呈现出拮抗作用,也就是 CMK 会降低单一重金属离子对菌体的损伤,毒性下降。拮抗作用的强度随着重金属离子浓度的增加而降低,

在高浓度下更倾向于简单的加和作用。

(3)一方面,CMK 与重金属离子之间可能存在竞争性结合转运蛋白的情况,从而降低重金属离子在菌体内的浓度;另一方面,添加 CMK 会促进菌体内的 ROS 质量下降,SOD 活性以及 NADH 质量上升,此时胞内的抗氧化功能增强,并刺激氧化还原反应的进行来提升能量供应水平,从而削弱重金属离子在菌体中的实际毒性水平。

水体中的 CMK 混合液在一定浓度下可能减弱重金属离子对菌体的实际毒性,这为水体中混合污染物的毒性研究及水环境健康评价提供了数据支撑和依据。

参考文献:

[1] AYODHYA D. Recent progress on detection of bivalent, trivalent, and hexavalent toxic heavy metal ions in water using metallic nanoparticles: a review [J].

- Results in Chemistry, 2023, 5: 100874.
- [2] HAMA AZIZ K H, KAREEM R. Recent advances in water remediation from toxic heavy metals using bio-char as a green and efficient adsorbent: a review [J]. Case Studies in Chemical and Environmental Engineering, 2023, 8: 100495.
 - [3] MISHRA S, SINGH A K, SINGH J K. Ferrous sulfide and carboxyl-functionalized ferroferric oxide incorporated PVDF-based nanocomposite membranes for simultaneous removal of highly toxic heavy-metal ions from industrial ground water [J]. Journal of Membrane Science, 2020, 593: 117422.
 - [4] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. 地表水环境质量标准: GB 3838—2002[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
 - [5] YU Zhenyang, ZHANG Jing, HOU Meifang. Time-dependent disturbances of chloride salts on overall red-ox reaction and luminescence in *Vibrio fischeri* [J]. Chemosphere, 2018, 199: 122-129.
 - [6] 黄丽, 朱治林, 唐新斋, 等. 2004—2016 年中国生态系统研究网络(CERN)台站水中八大离子数据集 [J]. 中国科学数据, 2020, 5(2): 106-118.
HUANG Li, ZHU Zhilin, TANG Xinzhai, et al. A dataset of eight ions in the water at stations of Chinese Ecosystem Research Network (CERN) during 2004-2016 [J]. China Scientific Data, 2020, 5(2): 106-118.
 - [7] BLOETSCHER F, POLSKY C, BOLTER K, et al. Assessing potential impacts of sea level rise on public health and vulnerable populations in southeast Florida and providing a framework to improve outcomes [J]. Sustainability, 2016, 8(4): 315.
 - [8] VASSALLO F, LA CORTE D, CANCELLA N, et al. A pilot-plant for the selective recovery of magnesium and calcium from waste brines [J]. Desalination, 2021, 517: 115231.
 - [9] LI Rongbing, REN Jiangtao, CHEN Jinxing, et al. Rapid and versatile colorimetric sensor based on luminescent bacterium for water comprehensive toxicity detection [J]. Sensors and Actuators: B Chemical, 2023, 390: 133958.
 - [10] 朱文杰, 郑天凌, 李伟民. 发光细菌与环境毒性检测 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009.
 - [11] AGATHOKLEOUS E, KITAO M, CALABRESE E J. Hormesis: a compelling platform for sophisticated plant science [J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(4): 318-327.
 - [12] AGATHOKLEOUS E, KITAO M, CALABRESE E J. Hormesis: highly generalizable and beyond laboratory [J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(11): 1076-1086.
 - [13] WANG Zhuang, ZHANG Fan, WANG Degao. Predicting joint toxicity of chemicals by incorporating a weighted descriptor into a mixture model: cases for binary antibiotics and binary nanoparticles [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 236: 113472.
 - [14] ANGULO-BEJARANO P I, PUENTE-RIVERA J, CRUZ-ORTEGA R. Metal and metalloid toxicity in plants: an overview on molecular aspects [J]. Plants, 2021, 10(4): 635.
 - [15] ALTENBURGER R, WALTER H, GROTE M. What contributes to the combined effect of a complex mixture? [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(23): 6353-6362.
 - [16] 王丹, 周彦宏, 白林明, 等. 明亮发光杆菌培养的响应面优化及其对常见金属离子的毒性评价研究 [J]. 环境科学学报, 2022, 42(5): 454-464.
WANG Dan, ZHOU Yanhong, BAI Linming, et al. Optimization of culture conditions of *Photobacterium phosphoreum* using response surface methodology and toxicity evaluation on metal ions [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(5): 454-464.
 - [17] BARAL U, DING Lin, CHAMLAGAIN D. Detrital zircon ages and provenance of Neogene foreland basin sediments of the Karnali River section, Western Nepal Himalaya [J]. Journal of Asian Earth Sciences, 2017, 138: 98-109.
 - [18] JIANG Liguang, YAO Zhijun, LIU Zhaoifei, et al. Hydrochemistry and its controlling factors of rivers in the source region of the Yangtze River on the Tibetan Plateau [J]. Journal of Geochemical Exploration, 2015, 155: 76-83.
 - [19] LI Zongjie, LI Zongxing, SONG Lingling, et al. Environment significance and hydrochemical characteristics of supra-permafrost water in the source region of the Yangtze River [J]. Science of the Total Environment, 2018, 644: 1141-1151.
 - [20] ZHANG Yahui, LIU Shushen, SONG Xiaoping, et al. Prediction for the mixture toxicity of six organophosphorus pesticides to the *Luminescent bacterium* Q67 [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 71(3): 880-888.
 - [21] 国家环境保护局, 国家技术监督局. 水质急性毒性的测定 发光细菌法: GB/T 15441—1995[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
 - [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative

- PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408.
- [23] YU Zhenyang, ZHANG Jing, CHEN Xiaoxue, et al. Inhibitions on the behavior and growth of the nematode progeny after prenatal exposure to sulfonamides at micromolar concentrations [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013(250/251): 198-203.
- [24] LI Yanwen, WU Xiaolian, MO Cehui, et al. Investigation of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics in vegetable farmland soil in the Pearl River Delta area, southern China [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 7268-7276.
- [25] ARDESTANI M M, VERWEIJ R A, VAN GESTEL C A M. The influence of calcium and pH on the uptake and toxicity of copper in *Folsomia candida* exposed to simplified soil solutions [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 261: 405-413.
- [26] LI Zuran, MEI Xinyue, LI Tao, et al. Effects of calcium application on activities of membrane transporters in *Panax notoginseng* under cadmium stress [J]. *Chemosphere*, 2021, 262: 127905.
- [27] HE Wanling, FENG Ying, LI Xiaoli, et al. Availability and toxicity of Fe(II) and Fe(III) in Caco-2 cells [J]. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 2008, 9 (9): 707-712.
- [28] KHOUNNAVONGSA N, IWAI C B. Influence of water hardness on ecotoxicology of copper on aquatic biota: implication for the revision of water quality standardization in Lao PDR [J]. *International Journal of Environmental and Rural Development*, 2016, 7(2): 12-17.
- [29] PAYLAR B, ASNAKE S, SJÖBERG V, et al. Influence of water hardness on zinc toxicity in *Daphnia magna* [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2022, 42(9): 1510-1523.
- [30] LIAO Gengze, WANG Peijun, ZHU Jiawei, et al. Joint toxicity of lead and cadmium on the behavior of zebrafish larvae: an antagonism [J]. *Aquatic Toxicology*, 2021, 238: 105912.
- [31] 桂雨婷. 钙添加对草鱼镉富集的拮抗作用机制研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
- [32] MONGA A, FULKE A B, DASGUPTA D. Recent developments in essentiality of trivalent chromium and toxicity of hexavalent chromium; implications on human health and remediation strategies [J]. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 2022, 7: 100113.
- [33] PUSHKAR B, SEVAK P, PARAB S, et al. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: a review [J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 287: 112279.
- [34] TER BRAAKE A D, TINNEMANS P T, SHANAHAN C M, et al. Magnesium prevents vascular calcification in vitro by inhibition of hydroxyapatite crystal formation [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 2069.
- [35] JI Xiaomeng, GUO Jiajia, MA Yeyun, et al. Quercetin alleviates the toxicity of difenoconazole to the respiratory system of carp by reducing ROS accumulation and maintaining mitochondrial dynamic balance [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2024, 484: 116860.
- [36] SUN Rongli, LIU Manman, XIONG Fei, et al. Polystyrene micro-and nanoplastics induce gastric toxicity through ROS mediated oxidative stress and P62/Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 912: 169228.
- [37] JIAO Yuting, JIANG Hong, WU Wentao, et al. Dual-channel nanoelectrochemical sensor for monitoring intracellular ROS and NADH kinetic variations of their concentrations [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 222: 114928.

(编辑 亢列梅)