

# 利用稳定同位素示踪技术研究大型溞(*Daphnia magna*)对水环境中溶解性铜的吸收

范文宏\*, 赵春梅, 吴晨光

北京航空航天大学化学与环境学院环境科学与工程系, 北京 100083

**摘要:** 由于缺乏合适的放射性同位素, 生物对 Cu 的吸收以及 Cu 在生物体内的迁移转化等动力学研究一直较为匮乏. 论文以大型溞(*Daphnia magna*)为受试生物, 以稳定同位素  $^{65}\text{Cu}$  作为示踪剂, 研究了不同 Cu 浓度下, 大型溞对水相中 Cu 的吸收. 结果表明, 在低浓度下, 大型溞的吸收随着水相中 Cu 浓度的增加而增加. 随着水相中 Cu 浓度的升高, 大型溞的吸收逐渐趋于饱和. 水相吸收速率和 Cu 的暴露浓度符合米氏方程(Michaelis-Menten Function), 最大吸收速率  $I_{\max}$  为  $14.6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 米氏常数  $K_m$  为  $3.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 平均水相吸收速率常数  $k_u$  为  $1.23\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

**关键词:** 水相吸收; 大型溞; 铜

文章编号: 1673-5897(2009)3-359-07

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

## Study of the Uptake of Dissolved Copper in *Daphnia magna* by Use of Stable Copper Isotope Tracer Technique

FAN Wen-hong\*, ZHAO Chun-mei, WU Chen-guang

Department of Environmental Science and Engineering, Beihang University, Beijing 100083

Received 27 October 2008

accepted 28 November 2008

**Abstract:** Many researches were focused on the heavy metal pollution in aquatic environment. However, few were concerned about copper kinetic uptake due to no appropriate radioisotope available. In present study, stable isotope  $^{65}\text{Cu}$  was used to trace the uptake of dissolved copper in *Daphnia magna* under different concentrations. Results showed that with the increasing of Cu spiked concentration in water, the influx rate increased in initial stage, and then reached saturation, which followed Michaelis-Menten kinetics model. The maximum influx rate( $I_{\max}$ ) and the Michaelis constant( $K_m$ ) were  $14.6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  and  $3.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively, and the average value of influx rate constant( $k_u$ ) of Cu was  $1.23\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

**Keywords:** dissolved uptake; *Daphnia magna*; copper

收稿日期: 2008-10-27 录用日期: 2008-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 50678015); 北京市自然科学基金项目 (No. 8092019)

作者简介: 范文宏 (1971—), 博士, 副教授; \* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: fanwh@buaa.edu.cn

## 1 引言(Introduction)

近几十年来,重金属对水环境的污染问题受到持续的关注.水相吸收是研究水生生物累积重金属过程中最基础的一步(Yu and Wang, 2002).水环境中不同形态重金属对水生生物的毒性和生物累积性目前已有大量研究(Campbell, 1995; Van Leeuwen *et al.*, 2005).然而目前这些研究多较为简单,仅从物理化学角度进行研究而没有考虑生物对金属的吸收速率,且常采用过高的暴露浓度,因而与现场调查的结果常常有较大的差异(Wang and Fisher, 1997).动力学方法近年来得到快速发展,它不仅克服了以上研究的不足,还能够区分生物对重金属的不同吸收途径(水相和食物相),以及较准确地定量不同途径下金属的贡献.大型溞(*Daphnia magna*)位于食物链的中间环节,既可以通过水相也可以通过食物相不断累积重金属.大型溞对主要金属,包括Cd(Yu and Wang, 2002)、Zn(Guan and Wang, 2004)、Se(Yu and Wang, 2002)、Ag(Lam and Wang, 2006)、Ca(Tan and Wang, 2008)、Hg和MeHg(Tsui and Wang, 2004)的水相吸收都已得到深入的研究.然而值得注意的是,目前对金属Cu的研究主要集中于Cu对大型溞的毒性作用,如利用BLM模型预测Cu对大型溞可能产生的毒性,以及不同的环境因素(pH、水溶液的硬度以及水中溶解性有机物等)对Cu毒性的影响等(De Schamphelaere and Janssen, 2002; Butcher *et al.*, 2006),对生物累积Cu的动力学研究相对较少.对于生物来说,Cu是一种重要的金属元素.一方面Cu是生理活动所必需的元素;另一方面Cu过量会对生物体产生显著的毒害作用.因此利用合适的方法来研究Cu在生物体内的累积、迁移和转化十分必要.

重金属在生物体内的累积是多种途径共同作用的结果,其中涉及到的动力学参数有水相吸收速率常数 $k_u$ ,食物相同化率AE,排出速率常数 $k_e$ 等,因而对某一单独的吸收过程进行定量测定较为困难.放射性同位素示踪法使准确测定生物对金属的水相吸收速率成为可能,到目前为止绝大多数研究都采用放射性同位素示踪剂测定不同生物、不同金属的水相吸收速率(Wang and Fisher, 1997).但放射性废物的严格控制,实验人员的身体伤害等不足限制了该方法的应用范围.对于重

金属Cu而言,放射性同位素难以制备(如 $^{67}\text{Cu}$ )以及半衰期过短(如 $^{64}\text{Cu}$ )等问题制约了Cu在水生生物体内的动力学研究(Croteau *et al.*, 2004).随着近年来ICP-MS技术的发展,检测限的降低,准确测定背景值水平下低浓度的稳定同位素成为可能.将自然丰度低、成分单一的稳定同位素标记到暴露溶液中,改变溶液内稳定同位素之间的比值,通过ICP-MS测定其变化量,该方法具有较强的可操作性(Croteau *et al.*, 2004).

本文利用稳定同位素 $^{65}\text{Cu}$ 作为示踪剂,对暴露溶液进行标记,研究了不同暴露浓度下,大型溞对水相中Cu的吸收规律,测定了重要的生理参数——水相吸收速率常数 $k_u$ ,并对稳定性和放射性两种不同的方法进行了比较.本文对稳定同位素示踪法进行了积极探索,为利用稳定同位素研究生物体内重金属的迁移转化动力学提供了实验依据.

## 2 材料与方法(Materials and methods)

### 2.1 大型溞的培养

实验所用的大型溞种(*Daphnia magna*)取自香港科技大学生物系.采用孔径为 $1.2\mu\text{m}$ 的玻璃微纤维滤膜(Whatman GF/C, Maidstone, UK)过滤后的京密引水渠水作为培养液(大型溞的密度控制在 $10\text{mL}\cdot\text{daphnia}^{-1}$ ),放置于人工气候箱内培养,温度设置为 $(22\pm 1)^\circ\text{C}$ ,光照周期(白昼:黑夜)为14h:10h.将实验室培养的衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)作为食物每天定量喂给大型溞,出生1~3d的小溞,食物浓度为 $5\times 10^4\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;出生3d后的大溞,食物浓度为 $1\times 10^5\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ .每2d换1次水,每次换水时挑出小溞,以保证同一烧杯内溞的年龄相同.衣藻以WC medium作为培养液(Guillard and Lorenzen, 1972),在人工气候箱内与大型溞相同的环境条件培养,定期接种,接种过程无菌操作.作为食物的衣藻在曝气的条件下培养5d(对数生长期)即可收获,喂食前将衣藻离心以去除WC培养液,然后再悬浮于大型溞生活的培养液中.

水相吸收实验采用的培养液为人工配制的简化后的Elendt M7 (Samel *et al.*, 1999)(以下称为SM7,仅含 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 和KCl,去除EDTA、重金属以及维生素).

本实验所采用的示踪剂为稳定同位素 $^{65}\text{Cu}$ (纯度为99.2%,保存于2%  $\text{HNO}_3$ ),购自Isoflex公司

(San Francisco, USA). 利用电感耦合等离子体-质谱 ICP-MS(VGPQ2 TURBO 型)检测水样和生物样品中 <sup>65</sup>Cu 的浓度.

2.2 水相吸收实验

实验前将出生 14d 的大型溞放在无 <sup>65</sup>Cu 标记的 SM7 中约 2h, 以去除其肠道内残留的食物, 同时适应新的实验环境. 向 SM7 中加入 <sup>65</sup>Cu, 用 1mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 调节溶液的 pH 值至 8.0~8.4, 使其在溞适宜生存的范围内. 平衡 12h 后, 采用内标法利用 ICP-MS 检测 5 个实验组的 <sup>65</sup>Cu 实际浓度, 分别为 2.4、6.9、10.8、20.2 和 35.8μg·L<sup>-1</sup>. 将已清除肠道的大型溞暴露于 <sup>65</sup>Cu 标记过的 SM7 中, 密度为 10mL·daphnia<sup>-1</sup>. 在 2、4、8、12h 处分别从溶液中取出 10 只溞, 放入超纯水中清洗 1min, 以去除外壳上吸附较弱的 <sup>65</sup>Cu. 用滤纸吸干外壳表面的液体后, 放入已称重的 2mL 离心管内, 于 80℃ 下烘 12h. 烘干后称取离心管和溞的总重量后, 将离心管内的溞转移到 10mL 比色管中, 加入 1mL 68% HNO<sub>3</sub>, 在消解炉内于 110℃ 下消解直至溶液澄清透明, 将液体定容到 5mL. 用 ICP-MS 测定样品中 <sup>65</sup>Cu 的含量. 该实验每个浓度组内均有两个平行样.

大型溞体内累积的 <sup>65</sup>Cu 浓度计算方法(Croteau et al., 2004)如下:

(1) 计算一系列 Cu 标准溶液(用于校正 ICP-MS)中 <sup>65</sup>Cu 的相对丰度 p<sup>65</sup>

$$p^{65} = \text{Intensity} \left( \frac{{}^{65}\text{Cu}}{{}^{65}\text{Cu} + {}^{63}\text{Cu}} \right)_{\text{Standard}} \quad (1)$$

(2) 样品中 <sup>65</sup>Cu 的浓度[<sup>65</sup>Cu]

$$[{}^{65}\text{Cu}] = p^{65} \times [T^{65}\text{Cu}] \quad (2)$$

[T<sup>65</sup>Cu]: 由 <sup>65</sup>Cu 的信号强度而得到的总 Cu 的浓度(ICP-MS 可通过 Cu 的任何一种同位素得到该元素的浓度).

(3) 样品中 <sup>65</sup>Cu 的背景浓度[<sup>65</sup>Cu]<sub>0</sub>

$$[{}^{65}\text{Cu}]_0 = p^{65} \times [T^{65}\text{Cu}] \quad (3)$$

[T<sup>65</sup>Cu]: 由 <sup>65</sup>Cu 的信号强度而得到的总 Cu 的浓度.

(4) 大型溞从水环境中净累积的 <sup>65</sup>Cu 浓度 Δ[<sup>65</sup>Cu]

$$\Delta[{}^{65}\text{Cu}] = [{}^{65}\text{Cu}] - [{}^{65}\text{Cu}]_0 \quad (4)$$

2.3 干重浓缩因子(Dry weight concentration factor, DCF)、水相吸收速率(I)、水相吸收速率常数(k<sub>w</sub>)之间的关系

(1) 干重浓缩因子(DCF)表示单位干重的大型

溞吸收溶液体积的能力. 表达式如下:

$$DCF = \frac{\text{daphnia}({}^{65}\text{Cu intensity/g dry wt.})}{\text{water}({}^{65}\text{Cu intensity/L})} \quad (5)$$

(2) 水相吸收速率(Influx rate, I)为单位时间内每单位干重的大型溞从水环境中吸收金属的量, 表达式如下:

$$I = k_w \cdot C_w \quad (6)$$

I: 水相吸收速率, μg·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>(以干重计); k<sub>w</sub>: 水相吸收速率常数, L·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>(以干重计); C<sub>w</sub>: 水相暴露浓度, μg·L<sup>-1</sup>;

(3) DCF 和 k<sub>w</sub> 之间的关系可通过下式表达:

$$DCF = k_w \cdot t \quad (7)$$

DCF: 干重浓缩因子, L·g<sup>-1</sup>(以干重计); t: 水相暴露时间, h.

2.4 统计分析方法

实验结果以平均值 ± 标准误差 (mean ± standard error of the mean)表示, 采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行假设检验和数据分析.

3 结果(Results)

3.1 大型溞对溶解性铜的干重浓缩因子(DCF)

DCF 可反映大型溞吸收金属的能力, 在注入 ICP-MS 相同体积(eg., 20μL)的生物样和水样的条件下, 该参数由公式(5)计算而得. 由图 1 可以看出, 大型溞对金属 Cu 的 DCF 随暴露时间的增加而逐渐增加, 在暴露的 12h 内, 各暴露浓度下, 大型溞对 Cu 的吸收均未出现饱和现象(即趋势逐渐平缓, 直线斜率趋近于零). 此外, 相同时间内, 随着 Cu 暴露浓度的增加, 大型溞的 DCF 逐渐降低, 且各组间差异显著(p<0.05, one-way ANOVA).

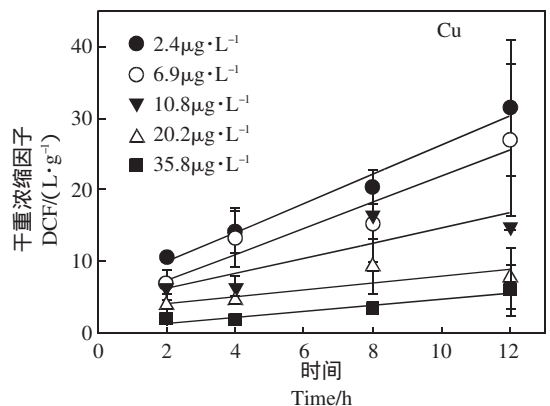


图 1 干重浓缩因子(DCF)随暴露时间的变化

Fig.1 Dry weight concentration factors(DCFs)of Cu in *Daphnia magna* after 12h of exposure in relation to time

### 3.2 大型溞对铜的水相吸收速率( $I$ )

由公式(6)和(7)可计算得到水相吸收速率( $I$ ,  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). 将水相吸收速率和 Cu 的暴露浓度进行回归,其曲线符合酶促反应动力学特征,即米氏方程(Michaelis-Menten Function). 由图2可以看出,在低暴露浓度下,吸收速率  $I$  与暴露浓度之间近似线性增加,随着 Cu 浓度的增加,水相吸收速率  $I$  趋向于稳定,  $I_{\text{max}}$  为  $14.6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 米氏常数  $K_m$ (半饱和常数)为  $3.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

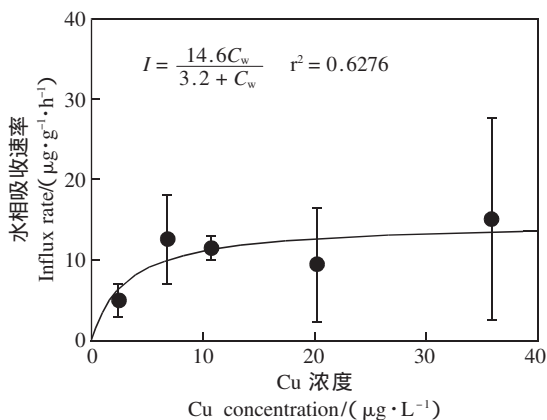


图2 水相吸收速率随溶液中 Cu 浓度的变化

Fig.2 Influx rate of Cu into *Daphnia magna* after 12h exposure in relation to dissolved Cu concentration

### 3.3 不同 Cu 暴露浓度下的水相吸收速率常数 $k_u$

由公式(6), 将 DCF 和时间  $t$  回归,可得到水相吸收速率常数  $k_u$ . 随着 Cu 浓度的增加,大型溞对 Cu 的  $k_u$  从  $2.04\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  降低到  $0.42\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 平均水相吸收速率常数为  $1.23\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 统计学检验表明,不同暴露浓度下的  $k_u$  值并不具备显著性差异 ( $p>0.05$ , T-Test). 动力学模型中水相吸收速率常数  $k_u$  可在不同的金属和不同的物种间进行比较(表1). 由表1可看出,对于大型溞而言,已研究的金属中,Hg 和 MeHg 的  $k_u$  值相对较高,Zn 和 Cd 的  $k_u$  值相对较低,Cu 的  $k_u$  值是 MeHg 的 2.7 倍. 不同物种对水相中 Cu 的吸收也差别较大,对于海洋桡足类动物 (*Acartia spinicauda* 和 *Temora longicornis*)  $k_u$  为  $0.21\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Chang and Reinfelder, 2002), 淡水蛤 (*Corbicula fluminea*) 在  $5.6\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu 中暴露 4d,  $k_u$  为  $0.009\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Croteau *et al.*, 2004).

表1 不同浓度短时间暴露下,大型溞对金属的吸收速率常数( $k_u$ )

Table 1 During a short uptake period, influx rate constants ( $k_u$ ) of different aqueous metals for *Daphnia magna*

金属	暴露浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$k_u/(\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	参考文献
Ag	0.008~0.9	0.045	Lam and Wang, 2006
Cd	0.7~20.0	0.062	Yu and Wang, 2002
Cu	2.4~35.8	1.23	本文
Hg	0.001~2.8	0.35	Tsui and Wang, 2004
MeHg	0.0005~0.7	0.46	Tsui and Wang, 2004
Se	1.3~20.9	0.0078	Yu and Wang, 2002
Zn	2.0~50.0	0.045	Yu and Wang, 2002

## 4 讨论(Discussion)

### 4.1 大型溞对铜的干重浓缩因子(DCF)随时间的变化

随着暴露时间的延长,大型溞对 Cu 的 DCF 不断增加(图1),表明大型溞在 12h 内对 Cu 进行持续的吸收. 该趋势与大型溞对 Cd、Zn 的水相吸收相比具有一致性(Yu and Wang, 2002),也有学者在 Ag、Hg 和 MeHg 的水相吸收研究中得到了类似的结论(Lam and Wang, 2006; Tsui and Wang, 2004). 但 Yu and Wang(2002)在研究中发现,大型溞在  $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd 或  $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn 的浓度下,暴露 3h 后吸收趋势明显趋于平缓,随着时间的延续,出现饱和的现象,对于 Zn 甚至有下降的趋势,该研究认为这可能是由于不同的金属之间物理化学性质的差异导致生物具有不同的生理反应. 重金属在体内的累积是大型溞吸收金属和排出金属两个过程共同作用的表现,饱和现象或下降趋势的出现,表明大型溞可能调节金属排出过程,增大排出量,使细胞内金属含量维持在稳定状态或出现下降趋势.

相同时间下,暴露于低浓度 Cu 下的大型溞 DCF 值较高,随着溶液中 Cu 浓度的升高,DCF 值逐渐降低. 这可能主要受生物对金属吸收能力的影响. Cu 穿过细胞膜需要蛋白质进行运载,随着水溶液中 Cu 浓度的增加,细胞膜上蛋白质的运载能力有限,金属结合位点已趋向于饱和,导致溶液中存在大量剩余的  $\text{Cu}^{2+}$ ,因而在高浓度下 DCF 降低(Croteau and Luoma, 2007). 该情况也同样存在于大型溞对 Hg 和 MeHg 的水相吸收中(Tsui and Wang, 2004)随着水溶液中 Hg 和 MeHg 浓度的增加,DCF 有明显的下降趋势,且在高浓度下,Hg 的 DCF 要显著低于 MeHg.



本实验中采用短时间暴露(12h),此过程中没有出现吸收饱和的现象. Hoang 等人(2008)将螺(*Pomacea paludosa*)的幼体暴露于含 Cu 3、6 和  $12\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的水体中,14d 后 Cu 在幼体内的累积量达到饱和. 这表明在低浓度 Cu 长期暴露下,也同样出现生物对金属的吸收能力降低,体内累积的重金属逐渐达到饱和的现象. 值得注意的是,在长期暴露的过程中,生物体在吸收水相重金属的同时排出代谢后的重金属,重金属在体内的累积并不是一个单独的吸收过程,而是吸收和排出的综合作用,与此同时,排出体外的金属存在被生物重复吸收的可能. 短时间暴露(12h),可减少 Cu 因生物水相代谢而排出体外,同时减少金属再次被生物吸收进入体内的可能,以保证  $^{65}\text{Cu}$  示踪独立的吸收过程.

#### 4.2 不同 Cu 暴露浓度下的水相吸收速率( $I$ )

低暴露浓度下,水相吸收速率  $I$  与暴露浓度  $C_w$  之间近似线性增加,这表明 Cu 可能通过被动扩散或易化扩散的方式穿过生物细胞膜. 研究发现金属中 Cu 与蛋白质的结合能力较强(Vašák, 1991),因此蛋白质协助扩散是 Cu 进入细胞内部的主要方式. 对于不同的金属来说,存在多种方式透过生物细胞膜. 载体运输模型(Carrier-mediated Transport Model)认为,金属先与细胞膜上的蛋白质配位体结合,然后于细胞内被释放(Williams, 1981). 此外金属的吸收途径还包括蛋白质通道运输、脂类渗透等. 研究表明,水生生物鳃的上皮组织细胞也可通过内吞作用(Endocytosis)吸收溶液中的 Fe(Ponka *et al.*, 1998). 对于双壳类动物来说,鳃是金属透过作用最强的区域(Wang and Fisher, 1997). 由于 Cd、Zn 和 Ca 同属于二价金属离子,因此大型溞除了通过被动扩散或易化扩散方式吸收 Cd 和 Zn 外,这两种金属也会通过 Ca 通道进入细胞内(Tan and Wang, 2008).

随着 Cu 暴露浓度的增加,水相吸收速率逐渐趋向于平缓,吸收达到饱和. 这种饱和现象在大型溞对其他金属的吸收上也较为常见,如 Ca(Wright, 1979)、Na(Sutcliffe, 1967)、Hg(Tsui and Wang, 2006)等. 这表明随着金属水相浓度的增加,大型溞体内具有自我调节的机制. 该调节机制可以通过酶反应动力学中 Michaelis-Menten 方程表示,  $I_{\max}$  为  $14.6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 米氏常数  $K_m$  (半饱和常数)为

$3.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,表明蛋白质酶运载金属 Cu 通过细胞膜的过程中,有一半达到饱和时的水相浓度为  $3.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,当水相浓度为  $6.9\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时已逐渐接近饱和. Tsui 和 Wang(2006)研究了 Hg 不同预暴露条件对大型溞吸收 Hg 的影响,结果发现出生 2d 的幼体于  $7\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Hg 中暴露 2d 后,  $K_m$  为  $(10.3\pm 6.7)\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,相比于同样出生 2d 在  $3\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Hg 下暴露 2d 的幼体降低了 90%. 这可能是由于 Hg 预暴露浓度的升高,降低了细胞膜表面蛋白质载体与 Hg 的亲合力. 不同金属对蛋白质的亲合力不同,导致金属之间的  $K_m$  差别也较大. 一般来说,金属离子中  $\text{Hg}^{2+}$  与蛋白质的亲合力最强(Vašák, 1991),其  $K_m$  值也相应较高. 本文中测定的 Cu 的  $K_m$  值是大型溞在无 Hg 预暴露下 Hg  $K_m$  值的 1/16. 此外, Glover 等(2005)研究表明胡敏酸可影响大型溞吸收水相中的 Na, 胡敏酸的存在大大提高了蛋白质酶对 Na 的运载能力,表现为  $I_{\max}$  增加,同时增加  $K_m$ , 可见改变水环境的物理化学条件会对参数的大小产生影响.

除了研究同种生物对不同金属的吸收之外,在不同种类生物之间也进行了广泛的研究. 在含  $0.48\sim 2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Ca 的水环境下,片脚类 *Gammarus pulex* 吸收水相中 Ca 的  $K_m$  值为  $12\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $I_{\max}$  为  $36\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Wright, 1979). Spry 和 Wood(1989)研究表明,增加水中 Ca 的浓度,可以提高鱼(Rainbow trout)吸收金属 Zn 的  $K_m$ ,但是却对 Zn 的  $I_{\max}$  影响不大,这表明 Ca 和 Zn 在进入生物体内的过程中存在相互的竞争. Yu 和 Wang(2002)将一系列金属暴露浓度和水相吸收速率进行双对数回归,得到两个参数之间的一个幂指数关系. 指数幂的大小可以反映相同金属暴露浓度下,生物吸收溶解性金属的快慢. 对于 Cd 和 Zn 来说,幂的大小在 1 左右(Cd: 0.946; Zn: 1.010),而 Se 则较低,为 0.345.

#### 4.3 不同 Cu 暴露浓度下的水相吸收速率常数 $k_u$

$k_u$  值的变化可能受多种环境因素的影响,增加水中溶解性有机碳的浓度或降低水的硬度,都可以使大型溞吸收 Cd 的  $k_u$  增大(Penttinen *et al.*, 1995),增加溶液的 pH 也可以促进大型溞对 Cd、Zn 和 Se 的吸收(Yu and Wang, 2002). 此外,  $k_u$  的差异也可能是由于采用的实验方法不同. 对于 Cd、Zn、Ag、Se、Hg 和 MeHg 可采用放射性同位素

示踪方法,该方法具有灵敏度高,定量准确且操作简便,可以对生物进行实时且无损伤检测等特点,但由于Cu的放射性同位素半衰期均非常短(半衰期最长的为 $^{67}\text{Cu}$ ,  $t_{1/2} = 2.58\text{d}$ ),因而对实验时间要求较严格.对于金属Cu来说,正是由于缺乏合适的放射性同位素,导致目前关于Cu对水生生物的动力学研究较少(Tsui and Wang, 2007).近几十年来,利用稳定同位素研究Cu在生物体内的迁移转化逐渐兴起.相比起放射性同位素示踪方法,稳定性同位素没有衰变现象,实验不受时间限制;不具有放射性,操作安全性高;且可以弥补一些重要元素因缺乏合适的放射性同位素而导致的研究缺陷.但是,稳定同位素示踪方法的灵敏性较差,实验操作和样品制备较为复杂(Croteau *et al.*, 2004).目前随着ICP-MS技术的发展,这种现状正逐渐改变.在生态学上,稳定同位素 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{34}\text{S}$ 可用于示踪食物链的传递,生物体组织内同位素比值的变化可反映食物类型的不同(Tieszen *et al.*, 1983),以及野生动物的迁徙和来源(Hobson, 1999).本文利用稳定同位素 $^{65}\text{Cu}$ 作为示踪剂,研究大型溞从水相中对Cu的吸收利用.该项研究目前在国内尚无人涉及.由于稳定同位素示踪法无法做到实时检测和对生物体的无损检测,因此生物的个体差异性导致的误差显得较为突出.另外,由于样品制备较为复杂,液体转移可能造成样品中Cu含量的损失,并且利用ICP-MS的检测限和灵敏性均不如放射性同位素检测器,以上原因可能导致数据结果与放射性同位素示踪法的结果差异较大.因此,下一步的任务是优化实验方法,尽量减小误差,提高稳定同位素示踪方法的准确性.

通讯作者简介:范文宏(1971—),女,博士,北京航空航天大学化学与环境学院环境科学与工程系副教授,主要从事水环境污染化学以及生态毒理学方面的研究.

## References

Butcher J, Diamond J, Berr J, Latimer H, Klaine S J, Hoang T, Bowersox M. 2006. Toxicity models of pulsed copper exposure to *Pimephales promelas* and *Daphnia magna* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(9): 2541–2550

Campbell P G C. 1995. A critique of the free-ion activity model [A]// Tessier A, Turner D R. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*[C]. Chichester: Wiley, 45–102

Chang S I, Reinfelder J R. 2002. Relative importance of dissolved versus trophic bioaccumulation of copper in marine copepods[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 231: 179–186

Croteau M N, Luoma S N, Topping B R, Lopez C B. 2004. Stable metal isotopes reveal copper accumulation and loss dynamic in the freshwater bivalve *corbicula* [J]. *Environmental Science & Technology*, 38(19): 5002–5009

Croteau M N, Luoma S N. 2007. Characterizing dissolved Cu and Cd uptake in terms of the biotic ligand and biodynamics using enriched stable isotopes [J]. *Environmental Science & Technology*, 41(9): 3140–3145

De Schampheleere K A C, Janssen C R. 2002. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: the effect of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH [J]. *Environmental Science & Technology*, 36(1): 48–54

Glover C N, Pane E F, Wood C M. 2005. Humic substances influence sodium metabolism in the freshwater crustacean *Daphnia magna*[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(3): 405–416

Guan R, Wang W X. 2004. Dietary assimilation and elimination of Cd, Se, and Zn by *Daphnia magna* at different metal concentrations [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(11): 2689–2698

Guillard R R L, Lorenzen C J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide C [J]. *Journal of Phycology*, 8: 10–14

Hoang T C, Rogevich E C, Rand G M, Frakes R A. 2008. Copper uptake and depuration by juvenile and adult Florida apple snails(*Pomacea paludosa*) [J]. *Ecotoxicology*, 17(7): 605–615

Hobson K A. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review [J]. *Oecologia*, 120: 314–326

Lam I K, Wang W X. 2006. Accumulation and elimination of aqueous and dietary silver in *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 64(1): 26–35

Penttinen S, Kukkonen J, Oikari A. 1995. The kinetics of cadmium in *Daphnia magna* as affected by humic substances and water hardness [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safe*, 30(1): 72–76

Ponka P, Beaumont C, Richardson D R. 1998. Function and regulation of transferrin and ferritin [J]. *Seminars in Hematology*, 35(1): 35–54

Samel A, Ziegenfuss M, Goulden C E, Banks S, Baer K N. 1999. Culturing and bioassay testing of *Daphnia magna* using ElenDt M4, ElenDt M7, and COMBO media [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43(1): 103–110

Spry D J, Wood C M. 1989. A kinetic method for the measurement of zinc influx *in vivo* in the rainbow trout, and the effects of waterborne calcium on flux rates [J]. *Journal of Experimental Biology*, 142: 425–446

Sutcliffe D W. 1967. Sodium regulation in the fresh-water amphipod, *Gammarus pulex* (L.) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 46: 499–518

Tan Q G, Wang W X. 2008. The influences of ambient and body calcium on cadmium and zinc accumulation in *Daphnia magna* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7): 1605–1613

- Tieszen L L, Boutton T W, Tesdahl K G, Slade N A. 1983. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implication for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet [J]. *Oecologia*, 57 (1-2): 32-37
- Tsui M T K, Wang W X. 2004. Uptake and elimination routes of inorganic mercury and methylmercury in *Daphnia magna* [J]. *Environmental Science & Technology*, 38(3): 808-816
- Tsui M T K, Wang W X. 2006. Acute toxicity of mercury to *Daphnia magna* under different conditions [J]. *Environmental Science & Technology*, 40(12): 4025-4030
- Tsui M T K, Wang W X. 2007. Biokinetics and tolerance development of toxic metals in *Daphnia magna* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(5): 1023-1032
- Van Leeuwen H P, Town R M, Buffle J, Cleven R F, Davison W, Puy J, Van Riemsdijk W H, Sigg L. 2005. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems [J]. *Environmental Science & Technology*, 39(22): 8545-8556
- Vařák M. 1991. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins [J]. *Methods in Enzymology*, 205: 452-458
- Wang W X, Fisher N S. 1997. Modeling metal bioavailability for marine mussels [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 151: 39-63
- Wang W X, Fisher N S. 1999. Delineating metal accumulation pathways for aquatic invertebrates [J]. *Science of the Total Environment*, 237/238: 459-472
- Williams R J. 1981. Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes [J]. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 294(1071): 57-74
- Wright D A. 1979. Calcium regulation in intermoult *Gammarus pulex* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 83: 131-144
- Yu R Q, Wang W X. 2002. Kinetic uptake of bioavailable cadmium, selenium, and zinc by *Daphnia magna* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(11): 2348-2355 ◆