

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017032005

李晓敏, 胡莹, 黄益宗, 等. 应用生物配体模型研究阳离子及 pH 值对水稻锌毒性的影响[J]. 环境化学, 2017, 36(8): 1724-1734.

LI Xiaomin, HU Ying, HUANG Yizong, et al. Effects of cations and pH in nutrient solution on zinc toxicity to rice (*Oryza sativa*) root elongation by the biotic ligand model[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(8): 1724-1734.

应用生物配体模型研究阳离子及 pH 值对水稻锌毒性的影响*

李晓敏¹ 胡 莹^{1**} 黄益宗² 刘云霞¹ 李 季¹

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085; 2. 农业部环境保护科研监测所, 天津, 300191)

摘 要 采用室内水培实验, 通过改变溶液中 pH 值及主要阳离子(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 和 K^{+})浓度研究锌对水稻的毒性, 建立了 Zn 对水稻根伸长毒性的生物配体模型(Biotic ligand model, BLM). 研究表明, 增加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 H^{+} 的活度均可以减缓 Zn^{2+} 对水稻根伸长的毒性, 而增加 Na^{+} 、 K^{+} 的活度对 Zn^{2+} 的毒性影响不大; 在低 pH(4.5—6.0)条件下, 主要是 Zn^{2+} 对水稻根伸长产生毒性, 在高 pH(6.5—8.0)条件下, Zn^{2+} 和 ZnOH^{+} 是主要的致毒形态. 根据生物配体模型理论估算的 Zn^{2+} 、 ZnOH^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 H^{+} 的生物配体络合的平衡常数分别为: $\lg K_{\text{ZnBL}} = 4.97$ 、 $\lg K_{\text{ZnOHBL}} = 5.30$ 、 $\lg K_{\text{CaBL}} = 2.96$ 、 $\lg K_{\text{MgBL}} = 3.30$ 和 $\lg K_{\text{HBL}} = 5.21$. 根据各平衡常数计算可得, 当 Zn 结合水稻的生物配体位点达到 73% 之后, 水稻根伸长的抑制率达 50% (即 $f_{50} = 73\%$). 利用上述参数建立的生物配体模型预测的 EC_{50} 值均在实测值的 2 倍变化范围之内, 表明生物配体模型可以有效地预测锌对水稻根伸长的急性毒性.

关键词 生物配体模型, 阳离子, pH, 水稻, Zn.

Effects of cations and pH in nutrient solution on zinc toxicity to rice (*Oryza sativa*) root elongation by the biotic ligand model

LI Xiaomin¹ HU Ying^{1**} HUANG Yizong² LIU Yunxia¹ LI Ji¹

(1. Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China;

2. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin, 300191, China)

Abstract: Acute toxicity of zinc (Zn) to rice (*Oryza sativa*) root elongation was investigated by changing the pH value and major cation (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} and K^{+}) concentrations to develop an appropriate biotic ligand model (BLM) in solution culture. The results showed that the toxicity of Zn^{2+} was reduced with increasing activities of Ca^{2+} , Mg^{2+} and H^{+} , while the activities of Na^{+} and K^{+} did not significantly affect the Zn^{2+} toxicity. The toxicity could be explained mainly by Zn^{2+} binding to a biotic ligand (BL) at pH from 4.5 to 6.0 and by the joint toxicity of Zn^{2+} and ZnOH^{+} at pH from 6.5 to 8.0. According to the biotic ligand model (BLM) concept, the conditional stability constants for the binding of Zn^{2+} , ZnOH^{+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} and H^{+} to the BL were $\lg K_{\text{ZnBL}} = 4.97$, $\lg K_{\text{ZnOHBL}} = 5.30$, $\lg K_{\text{CaBL}} = 2.96$, $\lg K_{\text{MgBL}} = 3.30$ and $\lg K_{\text{HBL}} = 5.21$, respectively. It was calculated that on average 73% of BL sites were occupied by Zn^{2+} when the rice root elongation was inhibited by 50% ($f_{50} = 73\%$). On the basis of these estimated parameters, the BLM developed in this study could predict EC_{50}

2017 年 3 月 20 日收稿 (Received: March 20, 2017)

* 国家自然科学基金 (21377152) 资助.

Supported by the National Nature Science Fund Project of China (21377152).

** 通讯联系人, Tel: 010-62849158, E-mail: huying@rcees.ac.cn

Corresponding author, Tel: 010-62849158, E-mail: huying@rcees.ac.cn

within a factor of 2 of the observed EC_{50} . It was implicated that Zn-BLM could predict reliably the toxicity of Zn to rice.

Keywords: biotic ligand model, cations, pH, rice, Zn.

随着工业化和城市化的飞速发展,土壤锌污染已成为不容忽视的环境问题.由于矿产开采和冶炼“三废”的排放、化肥农药施用及污水灌溉等导致我国土壤中 Zn 污染以不同程度快速蔓延,产生了严重的生态环境风险.刘春早等对湘江流域 72 个不同地点的土壤中的重金属进行测定,结果显示,相比于国家土壤环境质量二级标准,Zn 的超标率达 22.2%,Zn 重度污染占总超标率的 8.4%^[1].新乡市污水灌溉区土壤中 Zn 浓度是国家二级标准的 9.3 倍^[2].土壤中过量的锌可直接对植物产生危害,通常会阻碍植物的生长、代谢或者诱导植物的氧化性损伤^[3],高浓度的锌会引起植物叶片黄化^[4].Zn 浓度在 5.0—25 mmol·L⁻¹时,会引起水稻根尖细胞的死亡,抑制根生长^[5].虽然锌是人体必需微量元素之一,广泛分布于全身各组织器官,具有重要的生理功能和营养作用,但锌过量反过来也会危害人体的健康.污染土壤中的锌可能通过食物链途径进入人体,从而对人体健康造成危害.

通过生物测试来获得重金属的毒性数据是建立土壤环境质量标准的科学基础.植物毒性常常做为土壤生态风险评价的指标之一,主要毒性指标包括植物生长状况以及一些生理生化参数等都能很好地评价土壤重金属污染对植物的毒性.生物配体模型(biotic ligand model, BLM)可以将这些理化参数通过数据计算和模拟的方式定量地评价金属的生物毒性.生物配体模型具体是指外界环境中的自由金属离子在生物体内作用于生物位点,结合生成金属-配体(M-BL),当 M-BL 积累到一定阈值,金属则会产生生物毒性^[6].生物配体模型是在自由离子活性模型的基础上发展而来的,它最初主要应用于水体中研究生物配体与金属毒性的关系,近年来逐渐被应用于陆地生态系统,从而发展成为陆地生物配体模型(Terrestrial biotic ligand model, tBLM)^[7-9].陆地生物配体模型的主要依据是孔隙水中重金属浓度的高低决定了其生物毒性的大小,土壤生物吸收重金属的主要途径是通过土壤孔隙水^[10].因此,在生物配体模型下,可以通过模拟土壤孔隙水的水培实验预测重金属的生物毒性^[11].有研究者通过水培实验研究铜对生菜(*Lactuca sativa*)和大麦(*Hordeum vulgare*)的生物毒性,并用生物配体模型进行预测^[12-13].Lock 等^[14-15]通过水培实验研究发现 Mg^{2+} 和 K^+ 可以减缓 Co 和 Ni 对大麦的毒性.Ardestani 等^[16]研究结果表明,在简化的土壤溶液系统中,增加 Ca^{2+} 的浓度可以降低重金属 Cu 对跳虫(*Folsomia candida*)的毒性.

水稻是重要的粮食作物之一,世界上很多国家以大米为主食,中国是水稻的主要生产区,也是大米的消费区,因此选择水稻作为生物毒性测试指标更加具有现实意义.我国土壤中 Zn 的毒性阈值在不同测试物种间存在较大差异,目前已有利用大麦根伸长、西红柿及小白菜生长等毒性测试方法建立的基于土壤性质主控因子的 Zn 的毒性预测模型^[17-18],但利用水稻根伸长作为测试终点,研究 pH 值及阳离子对 Zn 的毒性影响的预测模型还未见报道.

本文采用室内水培实验,通过改变 pH 值及阳离子浓度研究锌对水稻幼苗根伸长的毒性,pH 值及共存的阳离子对锌毒性的影响,确定影响锌毒性的主控因子并将其作用具体量化,为验证锌的陆地生物配体模型、生态风险评价和质量标准制定提供科学依据.

1 材料与方法(Material and methods)

1.1 实验设计

锌的毒性实验共设置 5 组,Ca 组、Mg 组、Na 组、K 组和 pH 组.除 pH 组外,其他组的 pH 值均调至 5.50,每组实验中锌均有 6 个浓度梯度和 1 个空白对照,每个锌浓度 3 个重复.各离子浓度的设定参考土壤孔隙水中各离子的浓度^[19].每组实验中其他因素值最低且保持不变,只有该因素发生变化以判定其对锌毒性的影响,具体设计见表 1.

实验溶液用 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (分析纯)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (优级纯)、NaCl(优级纯)、KCl(优级纯)、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (优级纯)和去离子水配制,用 1 mol·L⁻¹的 HCl 溶液以及 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES, 2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid)(pH<7)与 3-(N-吗啡啉)丙磺酸(MOPS, 3-Morpholinopropanesulfonic acid)(pH≥7)调

节溶液 pH^[20-21].

表 1 供试溶液中不同处理的成分组成与浓度值

Table 1 Compositions and concentrations of the test media used in the various bioassay sets				
试验设置 Treatments	不同浓度 (mmol·L ⁻¹) 和 pH Different concentrations and pH	背景溶液组成 (mmol·L ⁻¹) 和 pH Background solution composition and pH		锌的浓度范围 Concentration range of Zinc/ (μmol·L ⁻¹)
Ca	0.2、1、2、5、10	Mg: 0.05 Na: 2.5	K: 0.08 pH: 5.50	0、10、50、100、200、500、1000
Mg	0.05、0.2、0.5、1、2	Ca: 0.2 Na: 2.5	K: 0.08 pH: 5.50	0、10、50、100、200、500、1000
Na	2.5、5、7.5、10、15	Ca: 0.2 Mg: 0.05	K: 0.08 pH: 5.50	0、10、50、100、200、500、1000
K	0.08、2.5、5、7.5、10	Ca: 0.2 Mg: 0.05	Na: 2.5 pH: 5.50	0、10、50、100、200、500、1000
pH	4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0	Ca: 0.2 Mg: 0.05	Na: 2.5 K: 0.08	0、10、50、100、200、500、1000

1.2 毒性实验

植物根伸长抑制试验参照 ISO 标准 (11269-1)^[22]. 水稻种子采用江西天涯种业的“株两优 1 号”, 挑选饱满大小一致的水稻种子经过 10% 双氧水消毒 10 min 用去离子水冲洗干净后, 将种子放在铺有湿润滤纸的培养皿中, 然后置于温度为 28 ℃ 的培养箱中发芽. 48 h 之后挑选根长约 0.5 cm 的水稻种子, 将种子移栽到培养灌中. 培养灌装有 500 mL 的受试溶液, 溶液上漂浮着厚度为 0.5 cm 且载有种子的白色泡沫板上, 每个泡沫板有 4 颗种子. 水稻根伸长抑制试验在可调控条件的温室内进行, 温室的设置条件为白天时长为 16 h, 温度为 28 ℃; 晚上时长为 8 h, 温度为 25 ℃. 水稻供试溶液每 2 d 更换 1 次, 生长 4 d 后测量最长根长. 相对于对照的根伸长百分比 (NRE) 依据公式 (1) 计算:

$$NRE = \frac{NRE_t}{NRE_c} \times 100\%$$

(1)

式中, NRE (net root elongation) 表示试验周期 4 d 内水稻的根伸长相对于对照处理的百分比 (%); NRE_t 是暴露于锌溶液中的根伸长 (cm); NRE_c 为空白对照溶液中的根伸长 (cm).

溶液中的 Zn²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Na⁺ 与 K⁺ 的浓度用 ICP-OES (Optima 8300 DV; PerkinElmer, USA) 测定, pH 值用 pH 计 (FE20; METTER TOLEDO) 测定, 金属离子的活度大小和形态分析用 Visual MINTEQ 3.0 软件实现.

1.3 数据分析及处理

Ca、Mg、Na、K 和 pH 不同设置组的 EC₅₀ 值采用公式 (2) 拟合计算^[23]:

$$y = \frac{a}{1 + \exp(b \times (\lg x - \lg EC_{50}))}$$

(2)

式中, y 表示相对于对照的水稻根伸长百分比 (NRE, %), x 表示自由 Zn²⁺ 的活度 (μmol·L⁻¹), EC₅₀ 表示相比对照组, 实验组的水稻根伸长受到 50% 抑制时的自由 Zn²⁺ 活度 (μmol·L⁻¹), a、b 为拟合常数.

实验中某些低浓度 Zn²⁺ 情况下, 会出现低剂量刺激效应即 Hormesis 效应, 这时 EC₅₀ 值采用公式 (3) 拟合^[23]:

$$y = \frac{100 \cdot (a + bx)}{1 + (1 + 2 \cdot \frac{b}{a} \cdot EC_{50}) \cdot \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^c}$$

(3)

式中, y 表示相比对照组, 实验组的水稻根伸长的百分比 (%), x 表示自由 Zn²⁺ 的活度 (μmol·L⁻¹), EC₅₀ 表示 50% 水稻根伸长受到抑制时的自由 Zn²⁺ 活度 (μmol·L⁻¹), a、b 和 c 为拟合常数. 此外, 当参数 b 的 95% 置信区间的值均大于 0 时, 才具有显著的 Hormesis 效应, 否则 Hormesis 效应不显著.

生物配体中具有生物活性的位点总含量为 [TBL] (mol·L⁻¹), 在本研究中 Ca²⁺、Mg²⁺、Na⁺、K⁺ 及 H⁺

可能会与 Zn^{2+} 产生竞争,因此 TBL 可以表示为:

$$[\text{TBL}] = [\text{ZnBL}] + \sum \text{MBL} + [\text{BL}]$$

(4)

式中, $[\text{ZnBL}]$ 表示自由 Zn^{2+} -BL 络合物浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); $[\text{MBL}]$ 表示参与竞争阳离子 M^{n+} -BL 络合物浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); $[\text{BL}]$ 表示没有被络合的配体浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

任何阳离子 M^{n+} 和配体络合反应达到平衡时,有以下方程:

$$K_{\text{MBL}} = [\text{M}^{n+}][\text{BL}] = [\text{MBL}]$$

(5)

式中, K_{MBL} 表示阳离子与生物配体络合平衡常数 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$); $[\text{M}^{n+}]$ 表示与生物配体络合的自由阳离子活度,比如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 和 H^{+} ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), n 表示阳离子的价态 ($n=1$ 或 2); $[\text{BL}]$ 表示没有被络合的配体浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

在生物配体模型中,自由 Zn^{2+} 络合配体占总配体的比例为 f_{ZnBL} ,可用以下公式表示:

$$f_{\text{ZnBL}} = \frac{[\text{ZnBL}]}{[\text{TBL}]} = \frac{K_{\text{ZnBL}}[\text{Zn}^{2+}]}{1 + K_{\text{ZnBL}}[\text{Zn}^{2+}] + \sum K_{\text{MBL}}[\text{M}^{n+}]}$$

(6)

当 50% 的生物受到抑制时,公式 (6) 可以改写为以下计算式:

$$\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+}) = \frac{f_{50}}{(1-f_{50})K_{\text{ZnBL}}} (1 + \sum K_{\text{MBL}}[\text{M}^{n+}])$$

(7)

式中, $\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ 表示水稻根伸长受到 50% 抑制时的自由 Zn^{2+} 的活度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); f_{50} 表示水稻根伸长受到 50% 抑制时与 Zn^{2+} 络合的配体占总配体的比例.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 阳离子和 H^{+} 对锌的生物毒性的影响

在 Ca、Mg、Na、K 和 pH 等 5 组实验设置中,水稻根伸长均随着 Zn 浓度梯度的增加而降低,高浓度的重金属 Zn 会对水稻产生毒性,抑制幼苗的根伸长(图 1).每组实验根据 logistic 或 Hormesis 公式拟合计算出不同阳离子或 H^{+} 浓度梯度下的 $\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ 及 95% 置信区间,组间 EC_{50} 的差异比较通过 LSD 法分析(表 2).由结果可知,随着阳离子浓度的增加,以水稻根伸长为测试终点的自由 Zn^{2+} 离子活度的 $\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ 的变化范围分别为 Ca^{2+} 组 41.24—156.04 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性增加了 3.78 倍, Mg^{2+} 组 62.33—159.34 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性增加了 2.56 倍(图 2a, 2b, 表 2).在 pH 实验组中, pH 值由 4.5 逐渐升高至 6.0 时, H^{+} 活度逐渐降低, $\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ 值也由 271.78 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著降低至 68.51 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2e, 表 2).

表 2 五组毒性实验设置及水稻根伸长的实测值 $\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$

Table 2 Compositions of test media used in 5 sets and observed $\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ values for rice root elongation

设置 Test	组成 Composition	浓度/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 pH 值 Concentration/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and pH	$\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	95% 的置信区间 95% confidence interval/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
Ca	0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+}	0.2	41.24 ^a	9.43—73.04
	2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na^{+}	1	78.27 ^{ab}	42.10—109.44
	0.08 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ K^{+}	2	92.39 ^{ab}	7.80—176.99
	pH 5.50	5	120.04 ^{bc}	7.46—232.63
		10	156.04 ^c	24.42—284.6
Mg	0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+}	0.05	62.33 ^a	5.98—118.68
	2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na^{+}	0.2	74.39 ^a	39.27—109.52
	0.08 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ K^{+}	0.5	92.02 ^a	70.52—113.52
	pH 5.50	1	128.51 ^b	94.78—162.23
		2	159.34 ^b	78.86—239.81
Na	0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+}	2.5	44.76 ^a	21.60—67.93
	0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+}	5	50.69 ^a	36.20—65.18
	0.08 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ K^{+}	7.5	50.40 ^a	15.91—84.89
	pH 5.50	10	52.83 ^a	27.91—77.74

续表2

设置 Test	组成 Composition	浓度/(mmol·L ⁻¹)和 pH 值 Concentration/(mmol·L ⁻¹) and pH	EC ₅₀ (Zn ²⁺)/ (μmol·L ⁻¹)	95%的置信区间 95% confidence interval/ (μmol·L ⁻¹)
		15	55.46 ^a	28.43—82.49
K	0.2 mmol·L ⁻¹ Ca ²⁺ 0.05 mmol·L ⁻¹ Mg ²⁺ 2.5 mmol·L ⁻¹ Na ⁺ pH 5.50	0.08	51.18 ^a	15.71—86.64
		2.5	53.74 ^a	21.47—86.00
		5	51.69 ^a	14.55—88.83
		7.5	49.79 ^a	11.86—87.73
		10	52.41 ^a	36.75—68.07
pH	0.2 mmol·L ⁻¹ Ca ²⁺ 0.05 mmol·L ⁻¹ Mg ²⁺ 2.5 mmol·L ⁻¹ Na ⁺ 0.08 mmol·L ⁻¹ K ⁺	4.5	271.78 ^a	152.92—390.64
		5.0	141.40 ^b	116.26—166.55
		5.5	110.62 ^b	56.05—165.20
		6.0	68.51 ^c	32.24—104.79
		6.5	47.12 ^c	21.99—72.24
		7.0	44.29 ^c	20.71—67.87
		7.5	40.68 ^c	25.61—55.75
		8.0	36.43 ^c	10.61—62.24

注:本表中组间差异分析方法为 LSD 法,Spss 20 软件实现,显著性水平为 95%。
Note: differences between the groups were tested by the analysis of LSD through Spss 20, and the level of significance was 95%.

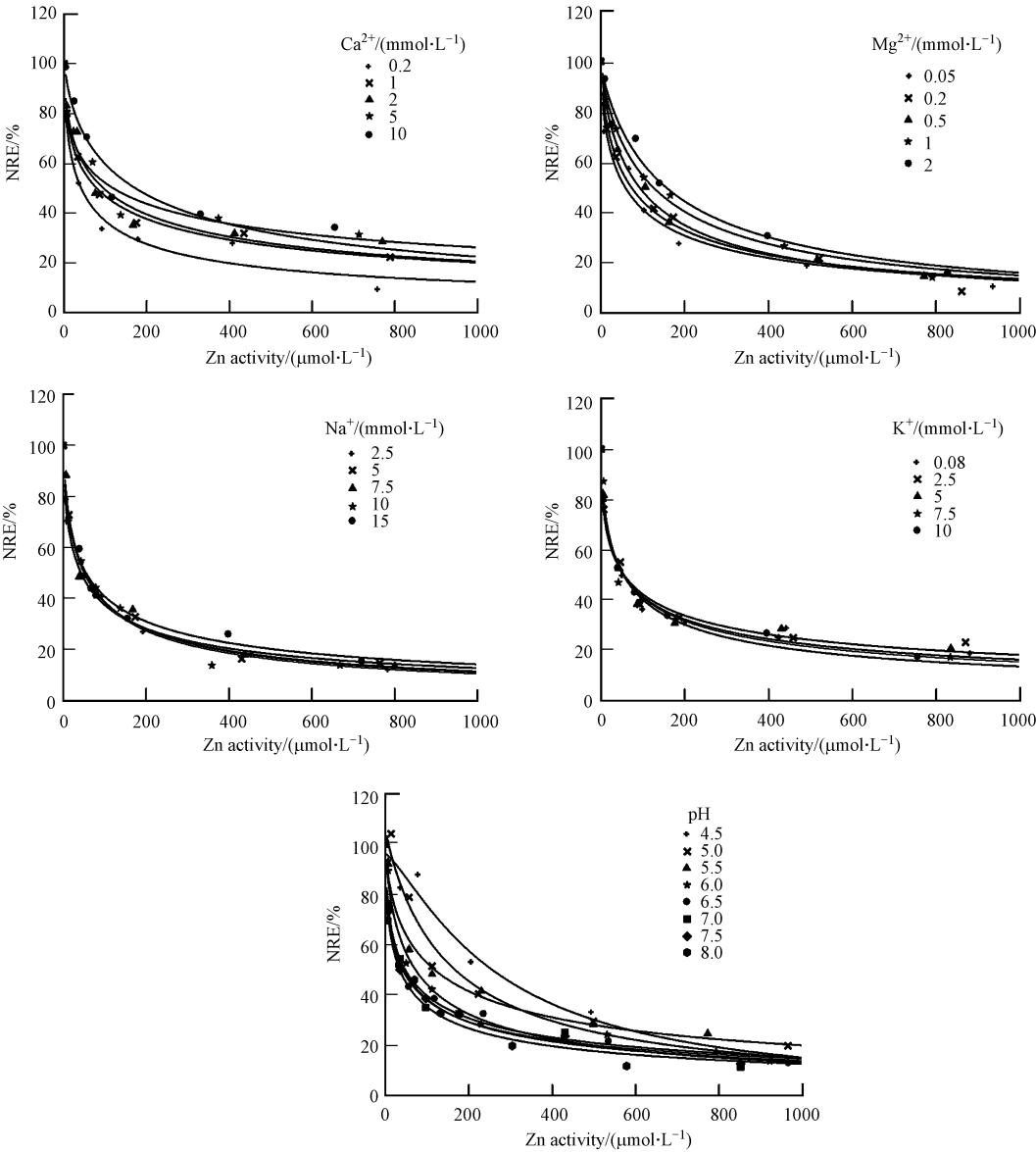


图 1 Ca²⁺、Mg²⁺、Na⁺、K⁺ 和 pH 处理中,水稻根伸长与锌活度之间的剂量效应曲线
Fig.1 Dose-response curves between rice root elongation and Zn²⁺ activity under the Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ and pH treatment

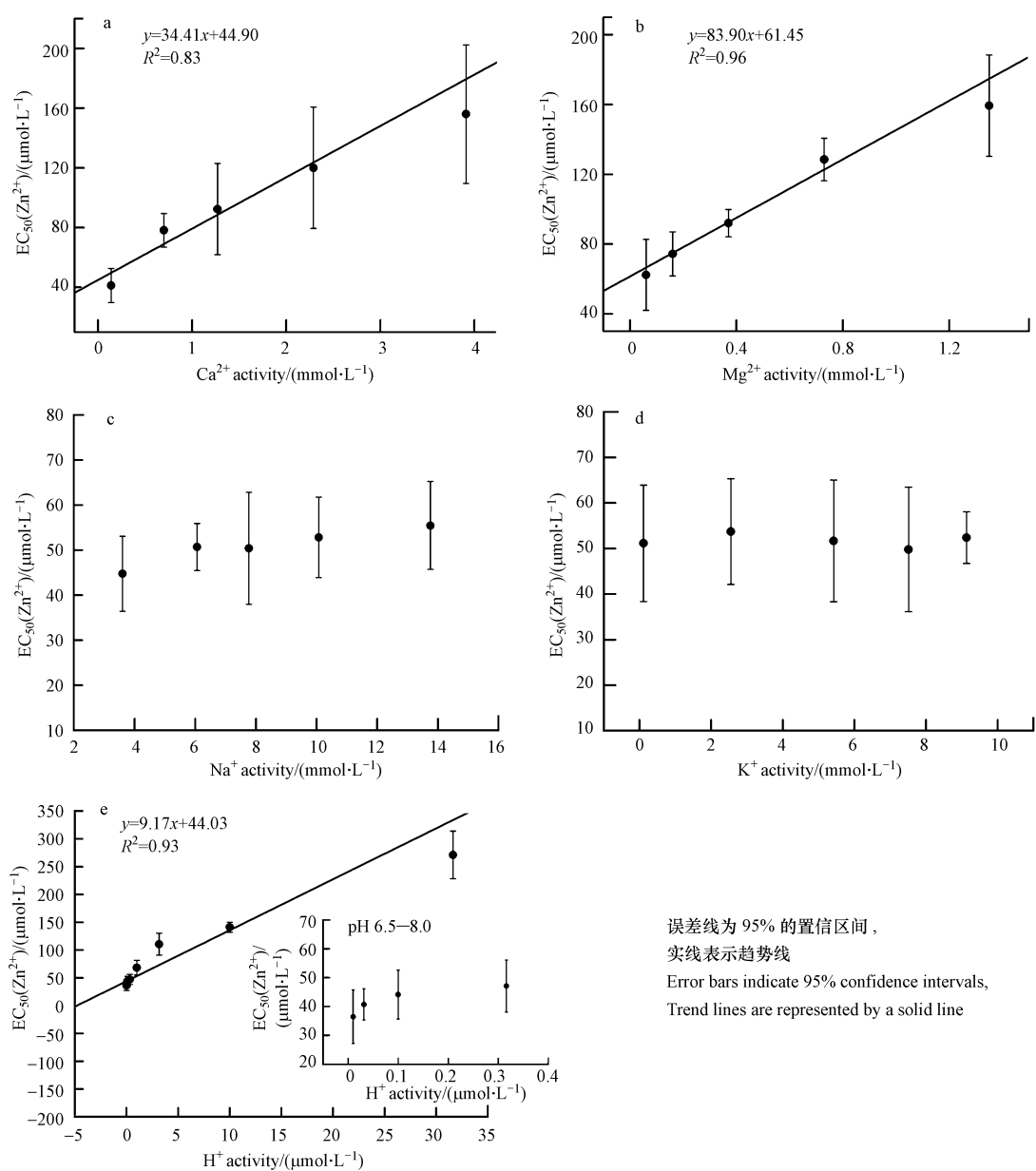


图2 水稻根伸长的 $EC_{50}(Zn^{2+})$ 与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 和 H^{+} 活度的线性关系

Fig.2 The linear relationship between $EC_{50}(Zn^{2+})$ for rice root elongation and the activities of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} and H^{+}

根据生物配体模型理论可知^[24],当金属的 EC_{50} 值随着某种因子的离子活度的增加而增加,并且两者之间呈显著的线性关系时,那么该因子对金属的生物毒性有抑制作用,它会同重金属离子竞争生物位点从而保护生物体.因此,通过 Zn^{2+} 与阳离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 和 H^{+} 之间的线性分析可知,适量增加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 H^{+} 的活度均可以减缓 Zn 对水稻根伸长的毒性,三者均可以在水稻幼苗期抑制 Zn 的生物毒性.而增加 Na^{+} 和 K^{+} 的活度, $EC_{50}(Zn^{2+})$ 值并未发生显著地变化(图 2c 和 2d,表 2),可知适量增加 Na^{+} 或 K^{+} 并不能减小 Zn 对水稻的毒性.

研究结果表明适当增加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 H^{+} 的活度可以在一定程度上抑制重金属 Zn 对水稻根伸长的毒性.类似的结果在之前的研究中也有报导,室内水培实验中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 H^{+} 活度的增加能够减缓 Zn^{2+} 对大麦 (*Hordeum vulgare*) 的根伸长毒性^[13].Pedler 等通过水培方式研究发现 Mg^{2+} 离子活度的增加降低 Zn^{2+} 对小麦 (*Triticum aestivum*) 和萝卜 (*Rahanus sativus*) 的毒性^[25]. Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 H^{+} 离子不仅可以减缓重金属 Zn 对植物的危害,还可以抑制多种重金属对生物的危害,比如它们能够减轻重金属 Cu 和 Ni 对大麦^[7,20-21] 和西红柿^[8] 的毒性,可以抑制重金属 Cd 对土壤生物蚯蚓的致死率^[26]. Na^{+} 和 K^{+} 对水稻没有明

显的保护作用,这一结果也和之前诸多研究结果类似^[27-28].

阳离子对重金属的毒性的抑制作用的机理,诸多文献中已报导过.首先,Wang 等^[29]认为,阳离子能通过电荷屏蔽和离子键结合来降低细胞膜表面电势的电负性,从而减少重金属离子在膜表面的活度,降低金属的生物毒性.其次,某些阳离子的化学结构或性质等类似于一些金属离子,当金属离子作用于生物时阳离子也可通过金属离子通道进入生物体抑制重金属毒性.Rogers 等^[30]研究发现在高浓度 Pb 的情况下,鱼类在吸收 Pb^{2+} 的同时会吸收大量的 Ca^{2+} 离子.再者,从更为微观的角度来讲某些情况下,当有竞争性阳离子存在时,生物体内有关重金属吸收的基因的表达会受到抑制.Chou 等^[31]研究通过定量 PCR 结果发现,在有 Mg^{2+} 存在的处理中,与 Cd^{2+} 吸收相关的基因 *OsIRT1*、*OsZIP1* 和 *OsZIP3* 的表达显著低于缺少 Mg^{2+} 的处理, Mg^{2+} 的存在降低了与 Cd^{2+} 吸收相关的基因的表达.

2.2 pH 对锌的生物毒性的影响

受试溶液中锌的形态会随着 pH 的变化而改变,而 Zn 的某些络合形态有可能对水稻根伸长产生影响.在 pH 值为 4.5—6.5 的条件下,溶液中锌的主要存在形态为自由离子 Zn^{2+} ,含量高于 90%;然而在 pH 值为 6.5—8.0 时,pH 的变化使得 Zn 在水溶液中的形态发生变化, Zn^{2+} 的离子活度逐渐降低至 73.63%, ZnHCO_3^+ 形态微量增加, ZnOH^+ 和 $\text{ZnCO}_3(\text{aq})$ 络合形态的活度逐渐增加(图 3),但是 ZnHCO_3^+ 和 $\text{ZnCO}_3(\text{aq})$ 在 $\text{pH} \leq 7.5$ 时的活度值过低(均小于 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)可以忽略不计.只有络合态 ZnOH^+ 的形态百分比由 0.03% 增加至 7.19%,活度值在 $\text{pH} \geq 6.5$ 时高于 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.因此在 pH 实验中, ZnOH^+ 是有可能对水稻根产生毒性的唯一络合形态.根据生物配体模型理论^[13],如果 ZnOH^+ 对水稻幼苗产生毒性的话,那么 $1/\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ 和 $\text{ZnOH}^+/\text{Zn}^{2+}$ 两者之间应该具有良好的线性关系.根据图 4 可看出,在 pH 值为 6.5 到 8.0 时两者之间存在良好的线性关系($R^2=0.89$),因此可以判断 ZnOH^+ 对幼苗期水稻根生长具有一定的毒性(图 4 和公式 11).因此,在低 pH(4.5—6.0)条件下,主要是 Zn^{2+} 产生毒性, H^+ 与 Zn^{2+} 产生竞争抑制其毒性;在高 pH(6.5—8.0)条件下,此时 H^+ 对水稻根伸长的保护作用几乎为 0, Zn^{2+} 和 ZnOH^+ 是主要的致毒形态.但是在 pH 值为 6.5—8.0 时 $\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ 没有显著性降低,这是由于 Zn^{2+} 从 pH 6.5 的 93.72% 降至 pH 8.0 的 73.63%,降低幅度高达 20.09%;与此同时 ZnOH^+ 从 0.29% 增至 7.19%,增长幅度仅为 6.9%(图 3).而其他含锌形态比如 $\text{ZnCO}_3(\text{aq})$ 和 ZnHCO_3^+ 等约占 13%,这部分含锌形态对水稻的生物毒性很低,不会对水稻根伸长产生抑制.因此,在高 pH 环境中,对水稻根伸长起毒性作用的含锌形态 Zn^{2+} 和 ZnOH^+ 的含量之和实际上降低至 80%,所以水稻根伸长受到的毒性并未显著增加,即 EC_{50} 值未显著性降低(图 2e,表 2).

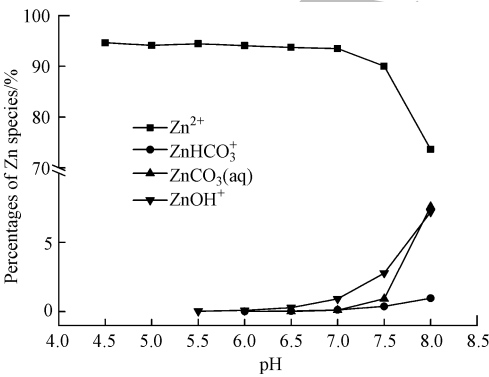


图 3 不同 pH 值(4.5—8.0)条件下溶液中 Zn 形态的变化

Fig.3 Variation of Zn species (% distribution) in the pH range of 4.5 to 8.0

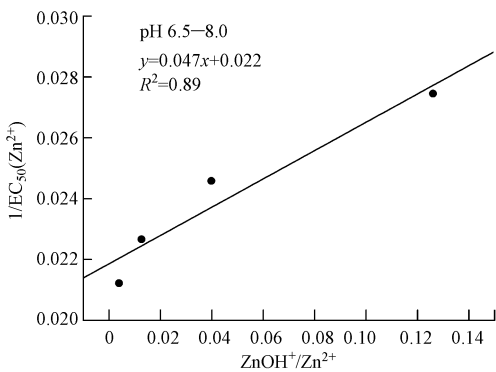


图 4 在 pH6.5—8.0 值条件下, $\text{ZnOH}^+/\text{Zn}^{2+}$ 的比值与 $1/\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ 之间的线性拟合关系

Fig.4 The fitted linear relationship between $\text{ZnOH}^+/\text{Zn}^{2+}$ ratio and $1/\text{EC}_{50}(\text{Zn}^{2+})$ in the pH range of 6.5—8.0

一直以来,pH 的变化与植物的生长情况及重金属的生物毒性息息相关.在适宜植物生长的低 pH 条件下,由于 H^+ 的自由活度较高可以有效地抑制重金属 Zn 的毒性.而在高 pH 条件下,除自由离子对生物致毒外,重金属的其它形态也可能会有有一定的毒性,所以在不同 pH 条件下量化重金属的毒性需要考虑可能的致毒形态.Wang 等通过研究 $\text{Zn}^{[13]}$ 和 $\text{Cu}^{[32]}$ 对大麦根伸长的作用发现,在高 pH 条件下除 Zn^{2+} 和

Cu²⁺外 ZnHCO₃⁺ 和 CuOH⁺也可以抑制大麦的根伸长.但是本研究中 ZnHCO₃⁺ 在溶液中未显著增加,并且对水稻根伸长没有毒性作用,络合形态只有 ZnOH⁺产生毒性.ZnOH⁺不仅可以对水稻产生毒性,也可以抑制水蚤的生长^[33-34].在高 pH 环境下,络合形态重金属具有生物毒性是常见的现象,但具体的致毒形态和毒性强度因金属和生物的实际情况而定,目前并没有统一的定论.

2.3 模型推导及参数计算

以上结果分析可知,Ca²⁺、Mg²⁺和 H⁺离子与 Zn²⁺竞争生物位点从而减缓 Zn 对水稻根伸长的毒性,同时络合态 ZnOH⁺会结合在生物位点上对水稻产生毒性,因此将这几种因子添加到生物配体模型中,则公式(6)可以转化为公式(8):

$$f_{ZnBL} = \frac{K_{ZnBL} [Zn^{2+}] + K_{ZnOHBL} [ZnOH^{+}]}{1 + K_{ZnBL} [Zn^{2+}] + K_{ZnOHBL} [ZnOH^{+}] + K_{CaBL} [Ca^{2+}] + K_{MgBL} [Mg^{2+}] + K_{HBL} [H^{+}]}$$

(8)

由络合平衡公式 Zn²⁺+OH⁻=ZnOH⁺可得:

$$[ZnOH^{+}] = K_{ZnOH} \times [Zn^{2+}] \times [OH^{-}]$$

(9)

其中,K_{ZnOH}为络合平衡常数.将公式(9)代入到公式(8)中,f_{ZnBL}设定为f₅₀,[Zn²⁺]设定为EC₅₀(Zn²⁺)可以得出本研究锌对水稻毒性的 EC₅₀(Zn²⁺)计算公式(10):

$$EC_{50}(Zn^{2+}) = \frac{f_{50}}{(1-f_{50})} \cdot \frac{1 + K_{CaBL} [Ca^{2+}] + K_{MgBL} [Mg^{2+}] + K_{HBL} [H^{+}]}{K_{ZnBL} + K_{ZnOHBL} \cdot K_{ZnOH} [OH^{-}]}$$

(10)

公式(10)可以进一步转化为:

$$\frac{1}{EC_{50}(Zn^{2+})} = \frac{(1-f_{50})}{f_{50} (1 + \sum K_{XBL} [X^{n+}])} (K_{ZnBL} + K_{ZnOHBL} \cdot \frac{[ZnOH^{+}]}{[Zn^{2+}]})$$

(11)

其中,将 Ca²⁺、Mg²⁺和 H⁺的 3 项之和合并为 ΣK_{MBL}[Mⁿ⁺],n=1 或 2,且由该公式可推断在 pH 值为 6.5 至 8.0实验中,若络合形态 ZnOH⁺对水稻幼苗的根伸长有毒性,那么 1/EC₅₀(Zn²⁺) 和 [ZnOH⁺]/[Zn²⁺]两者之间符合线性关系.

计算 Ca²⁺/Mg²⁺阳离子或 H⁺与生物位点的配体常数 K 值可根据公式(7),此时 ZnOH⁺含量极低对水稻根伸长的作用可忽略,因此根据图 2 中 EC₅₀(Zn²⁺)与竞争性阳离子(以 Ca²⁺为例)的线性关系分析可得到斜率与截距如下^[24]:

$$Intercept_{Ca} = \frac{f_{50}}{(1-f_{50}) K_{ZnBL}} (1 + K_{MgBL} [Mg^{2+}] + K_{HBL} [H^{+}])$$

(12)

$$Slope_{Ca} = \frac{f_{50}}{(1-f_{50}) K_{ZnBL}} K_{CaBL}$$

(13)

$$\frac{Slope_{Ca}}{Intercept_{Ca}} = \frac{K_{CaBL}}{1 + K_{MgBL} [Mg^{2+}] + K_{HBL} [H^{+}]} = R_{Ca}$$

(14)

此时[Mg²⁺]和[H⁺]的数值均为在 Ca 处理中 Mg²⁺和 H⁺的离子活度,那么对于 Mg 和 pH 处理也通过拟合直线的斜率与截距的比值计算出 R_{Mg}和 R_H,再将这些各个处理的计算公式进行转化就可以得到矩阵形式,如下:

$$\begin{pmatrix} 1 & -R_{Ca} [Mg^{2+}] & -R_{Ca} [H^{+}] \\ -R_{Mg} [Ca^{2+}] & 1 & -R_{Mg} [H^{+}] \\ -R_{H} [Ca^{2+}] & -R_{H} [Mg^{2+}] & 1 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} K_{CaBL} \\ K_{MgBL} \\ K_{HBL} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} R_{Ca} \\ R_{Mg} \\ R_{H} \end{pmatrix}$$

(15)

根据 De Schamphelaere 等^[24]的生物配体模型理论,对公式(15)进行矩阵计算,求出 K_{CaBL}、K_{MgBL}和 K_{HBL}之后取对数值 lgK.在 Zn 对水稻的毒性实验中 Ca²⁺、Mg²⁺和 H⁺的生物配体络合平衡常数分别为:lgK_{CaBL}=2.96,lgK_{MgBL}=3.3 和 lgK_{HBL}=5.21.然后根据公式(8),对 K_{ZnBL}进行不同取值,计算出相应的 f_{ZnBL}值,然后将 f_{ZnBL}与水稻根伸长的对数 lg(RE/(100-RE))做线性拟合分析,当 K_{ZnBL}越接近真实值时,f_{ZnBL}值和 lg(RE/(100-RE))之间的线性关系越好^[24].计算结果可知:当 lgK_{ZnBL}=4.97,f₅₀=73%时,f_{ZnBL}值和 lg(RE/(100-RE))之间的线性关系最好(R²=0.89)(图 5).再结合公式(11)和图 4 可计算出,拟合

直线的斜率/截距= $K_{ZnOHBL}/K_{ZnBL}=2.14$,由此可得 $\lg K_{ZnOHBL}=5.30$.因此最终确定竞争性阳离子的配体络合常数为 $\lg K_{CaBL}=2.96$, $\lg K_{MgBL}=3.30$ 和 $\lg K_{HBL}=5.21$;重金属 Zn^{2+} 自由离子的配体常数为 $\lg K_{ZnBL}$ 为 4.97, $ZnOH^{+}$ 的配体常数为 $\lg K_{ZnOHBL}$ 为 5.30;当水稻根伸长被锌抑制达 50%时,需结合 73%的水稻生物配体位点($f_{50}=73\%$);阳离子 Na^{+} 和 K^{+} 并不能减缓锌对水稻的毒性,因此两者的配体络合常数为 0.

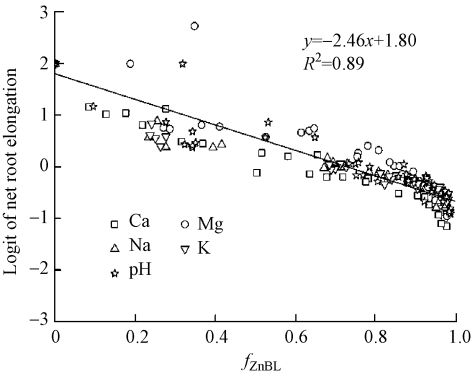


图 5 锌结合的生物配体与总配体的比值 f_{ZnBL} 与水稻根伸长的对数 $\lg RE/(100-RE)$ 之间的线性关系

Fig.5 Linear relationship between the ratio of the biotic ligand sites occupied by Zn (f_{ZnBL}) and the logit of the percent rice root elongation

重金属与植物的络合平衡常数因金属和植物种类不同差别较大.本研究以水稻根伸长做为测试终点,所得到的 Zn 及阳离子与生物配体的络合常数也与以大麦^[13]、菠菜^[27]和生菜^[28]为测试终点的结果不同(表 3).王学东等^[35]研究 Cu 对大麦的毒性中估算 Cu^{2+} 、 $CuOH^{+}$ 和 Mg^{2+} 的生物配体络合平衡常数分别为 $\lg K_{CuBL}=6.57$ 、 $\lg K_{CuOHBL}=7.03$ 、 $\lg K_{MgBL}=3.00$;而 Luo 等^[36]研究的 Cu 对小麦的毒性的络合平衡常数估算 $\lg K_{CuBL}$ 、 $\lg K_{CaBL}$ 和 $\lg K_{MgBL}$ 分别为 6.28、2.43 和 3.34;Cheng 等^[12]研究 Cu 对生菜的毒性,估算 Cu^{2+} 、 H^{+} 及 Ca^{2+} 的络合平衡常数分别为 $\lg K_{CuBL}=11.29\pm0.10$ 、 $\lg K_{HBL}=6.80\pm0.12$ 和 $\lg K_{CaBL}=8.49\pm0.30$.

表 3 Zn^{2+} 与其他阳离子的生物配体络合常数比较

Table 3 Binding constants for Zn and other cations in organisms. The $\lg K$ values are in $L\cdot mol^{-1}$

参数	水稻(本研究) <i>Oryza sativa</i>	大麦 ^[13] <i>Hordeum vulgare</i>	菠菜 ^[27] <i>Spinacia oleracea</i>	生菜 ^[28] <i>Lactuca sativa</i>
$\lg K_{ZnBL}$	4.97	4.06	8.7	4.0
$\lg K_{CaBL}$	2.96	1.99	—	—
$\lg K_{MgBL}$	3.30	3.72	—	—
$\lg K_{HBL}$	5.21	4.27	5.8	—
$\lg K_{NaBL}$	—	—	—	—
$\lg K_{KBL}$	—	2.62	—	—
$\lg K(\text{other species})$	5.30($ZnOH^{+}$)	5.15($ZnHCO_3^{+}$)	—	—
f_{50}	0.73	0.38	—	0.42

此外,不同的植物种类对不同的重金属毒性的敏感程度也有很大的差异,大麦根伸长受到 50%抑制时,自由 Cu^{2+} 络合配体占总配体的比例为 66%^[35];小麦则需要 43.6%的生物配体位点被 Cu^{2+} 所占据^[36].大麦根伸长受到 50%抑制时自由 Zn^{2+} 络合配体占总配体的比例为 38%^[13],生菜则需要 42%的生物配体位点被 Zn 占据^[28],本研究中水稻根伸长受到 50%抑制时 Zn^{2+} 需要络合 73%的生物配体位点,说明水稻根系对 Zn 的毒害的耐受性较好,也说明重金属对植物的毒性作用因物种的差异而不同.本试验研究了各种阳离子及不同 pH 值影响下的 Zn 对水稻根伸长的毒性,获得了更多详实的数据,相信会对今后生物配体模型的研究与应用提供有效的参考及应用价值.

2.4 EC_{50} 值的预测

根据上述参数建立生物配体模型,由公式(10)预测金属锌对水稻根伸长的 $EC_{50}(Zn^{2+})$.将预测值与实测值的 $EC_{50}(Zn^{2+})$ 比较,可知预测值基本都在实测值的 2 倍的变化范围内(图 6),预测值与实测值的

一致性较好.因此,在该研究中生物配体模型能够较准确地预测金属锌对水稻根伸长的急性毒性,该研究结果可为生物配体模型应用于土壤中提供参考依据.

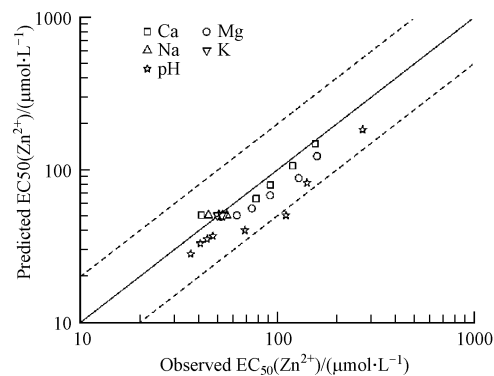


图 6 生物配体模型预测的 $EC_{50}(Zn^{2+})$ 与实测值之间线性拟合
实线表示 1:1 直线,虚线表示预测值均在与实测值的 2 倍变化范围之内

Fig.6 Linear fitting relationship between the predicted and observed $EC_{50}(Zn^{2+})$ based on the BLM developed in the present study. The solid line represents the curve of $y=x$, and the dashed lines indicate a factor of 2 between observed and predicted $EC_{50}(Zn^{2+})$ values

3 结论 (Conclusion)

- (1)增加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 H^{+} 的活度均可以减缓锌对水稻根伸长的毒性,而增加 Na^{+} 和 K^{+} 的活度对锌的毒性影响不大.
- (2)在低 pH (4.5—6.0) 条件下,主要是 Zn^{2+} 产生毒性, H^{+} 与 Zn^{2+} 产生竞争抑制其毒性;在高 pH (6.5—8.0) 条件下,此时 H^{+} 的对水稻根伸长的保护作用几乎为 0, Zn^{2+} 和 $ZnOH^{+}$ 是主要的致毒形态.
- (3)通过 Zn 毒性实验的研究数据并结合生物配体模型理论,可得出锌的 EC_{50} 预测公式为:

$$EC_{50}(Zn^{2+}) = \frac{f_{50}}{(1-f_{50})} \cdot \frac{1 + K_{CaBL}[Ca^{2+}] + K_{MgBL}[Mg^{2+}] + K_{HBL}[H^{+}]}{K_{ZnBL} + K_{ZnOHBL} \cdot K_{ZnOH}[OH^{-}]}$$

所有预测的 EC_{50} 值均在实际观测值的 2 倍变化范围之内,即生物配体模型可以良好地预测重金属锌对水稻根伸长的急性毒性.

参考文献 (References)

[1] 刘春早,黄益宗,雷鸣,等. 湘江流域土壤重金属污染及其生态环境风险评价[J]. 环境科学, 2012, 33(1): 263-268.
LIU C Z, HUANG Y Z, LEI M, et al. Soil contamination and assessment of heavy metals of Xiangjiang River basin[J]. Environmental Science, 2012, 33(1): 263-268 (in Chinese).

[2] 朱桂芬,张春燕,王建玲,等. 新乡市寺庄顶污灌区土壤及小麦重金属污染特征的研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(2): 263-268.
ZHU G F, ZHANG C Y, WAGN J L, et al. Investigation of heavy metal pollution in soil and wheat grains in sewage-irrigated area in Sizhuangding Xinxiang City[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(2): 263-268 (in Chinese).

[3] PRASAD K, PARDHA S P, SHARMILA P. Concerted action of antioxidant enzyme and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea* [J]. Environmental and Experimental Botany, 1991, 42(1): 1-10.

[4] EBBS S D, KOCHIAN L V. Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: Implications for phytoremediation[J]. Journal of Environmental Quality, 1991, 26(3): 776-781.

[5] CHANG H B, LIN C W, HUNAG H J. Zinc-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots[J]. Plant Growth Regulation, 2005, 46(3): 261-266.

[6] 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.

[7] THAKALI S, ALLEN H E, DI TORO D M, et al. A terrestrial biotic ligand model. 1. Development and application to Cu and Ni toxicities to barley root elongation in soils[J]. Environmental Science & Technology, 2006a, 40(22): 7085-7093.

[8] THAKALI S, ALLEN H E, DI TORO D M, et al. Terrestrial biotic ligand model. 2. Application to Ni and Cu toxicities to plants, invertebrates, and microbes in soil[J]. Environmental Science & Technology, 2006b, 40(22): 7094-7100.

- [9] 王学东, 马义兵, 华璐, 等. 环境中金属生物有效性的预测模型研究进展[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(3): 193-202.
WAGN X D, MA Y B, HUA L, et al. Advances in biotic ligand model to predict the bioavailability of metals in environments[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2006, 1(3): 193-202 (in Chinese).
- [10] VAN G C, RADEMAKER M, VAN S N. Biogeochemistry of pollutants in soils and sediments[M]. Springer Berlin Heidelberg, 1995, Berlin.
- [11] VAN G C. Ecological risk assessment of contaminants in soil[M]. Springer US, 1997, New York.
- [12] CHENG T, ALLEN H E. Prediction of uptake of copper from solution by lettuce (*Lactuca sativa* Romance)[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20(11): 2544-2551.
- [13] WANG X D, LI B, MA Y B, et al. Development of a biotic ligand model for acute zinc toxicity to barley root elongation[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73(6): 1272-1278.
- [14] LOCK K, DE SCHAMPHELAERE K C, BECAUS S, et al. Development and validation of a terrestrial biotic ligand model predicting the effect of cobalt on root growth of barley (*Hordeum vulgare*)[J]. Environmental Pollution, 2007a, 147(3): 626-633.
- [15] LOCK K, VAN E H, DE SCHAMPHELAERE K C, et al. Development of a biotic ligand model (BLM) predicting nickel toxicity to barley (*Hordeum vulgare*)[J]. Chemosphere, 2007b, 66(7): 1346-1352.
- [16] ARDESTANI M, VERWEIJ R, VAN G C. 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(15): 405-413.
- [17] 林蕾, 陈世宝, 程旺大, 等. 基于不同终点测定土壤中 Zn 的毒性阈值及其田间验证[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(3): 548-555.
LIN L, CHEN S B, CHENG W D, et al. Toxicity thresholds (EC_x) of Zn in soils as determined by different endpoints and its validations in fields[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(3): 548-555 (in Chinese).
- [18] 魏威, 梁东丽, 陈世宝. 土壤中外源锌对不同植物毒性的敏感性分布[J]. 生态学杂志, 2012, 31(3): 538-543.
WEI W, LIANG D L, CHEN S B. Plant species sensitivity distribution to the phytotoxicity of soil exogenous zinc[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(3): 538-543 (in Chinese).
- [19] OORTS K, GHESQUERE U, SWINNEN K, et al. Soil properties affecting the toxicity of CuCl₂ and NiCl₂ for soil microbial processes in freshly spiked soils[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25(3): 836-844.
- [20] LI, B, ZHANG X, WANG X D, et al. Refining a biotic ligand model for nickel toxicity to barley root elongation in solution culture[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(6): 1760-1766.
- [21] ANTUNES P M, KREAGER N J. Development of the terrestrial biotic ligand model for predicting nickel toxicity to barley (*Hordeum vulgare*): Ion effects at low pH[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2009, 28(8): 1704-1710.
- [22] ISO/11269-1. Soil quality-determination of the effects of pollutants on soil flora-Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth[S]. 2012.
- [23] LI B, ZHANG H, MA Y B, et al. Influences of soil properties and leaching on nickel toxicity to barley root elongation[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(3): 459-466.
- [24] DE SCHAMPHELAERE K A, JANSSEN C R. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH[J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36(1): 48-54.
- [25] PEDLER J F, KINRAIDE T B, PARKER D R. Zinc rhizotoxicity in wheat and radish is alleviated by micromolar levels of magnesium and potassium in solution culture[J]. Plant and Soil, 2004, 259(1-2): 191-199.
- [26] LI L Z, ZHOU D M, LUO X S, et al. Effect of major cations and pH on the acute toxicity of cadmium to the earthworm *Eisenia fetida*: Implications for the biotic ligand model approach[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 55(1): 70-77.
- [27] DEGRYSE F, SHAHBAZI A, VERHEYEN L, et al. Diffusion limitations in root uptake of cadmium and zinc, but not nickel, and resulting bias in the Michaelis constant[J]. Plant Physiology, 2012, 160(2): 1097-1109.
- [28] LE T T Y, VIGVER M G, HENDRIKS A J, et al. Modeling toxicity of binary metal mixtures (Cu²⁺-Ag⁺, Cu²⁺-Zn²⁺) to lettuce, *Lactuca sativa*, with the biotic ligand model[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, 32(1): 137-143.
- [29] WANG P, DE SCHAMPHELAERE K A, KOPITKE P M, et al. Development of an electrostatic model predicting copper toxicity to plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(2): 659-668.
- [30] ROGERS J T, WOOD C M. Characterization of branchial lead-calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Journal of Experimental Biology, 2004, 207(5): 813-825.
- [31] CHOU T S, CHAO Y Y, HUANG W D, et al. Effect of magnesium deficiency on antioxidant status and cadmium toxicity in rice seedlings[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(10): 1021-1030.
- [32] WANG X D, MA Y B, HUA L, et al. Identification of hydroxyl copper toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) root elongation in solution culture[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2009, 28(3): 662-667.
- [33] STANTORE R C, MATHEW R, PAQUIN P R, et al. Application of the biotic ligand model to predicting zinc toxicity to rainbow trout, fathead minnow, and *daphnia magna*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, 2002, 133(1-2): 271-285.
- [34] CLIFFORD M, MCGEER J C. Development of a biotic ligand model for the acute toxicity of zinc to *Daphnia pulex* in soft waters[J]. Aquatic Toxicology, 2009, 91(1): 26-32.
- [35] 王学东, 马义兵, 华璐, 等. 铜对大麦 (*Hordeum vulgare*) 的急性毒性预测模型-生物配体模型[J]. 环境科学学报, 2008, 28(8): 1704-1712.
WANG X D, MA Y B, HUA L, et al. Development of biotic ligand model (BLM) predicting copper acute toxicity to barley (*Hordeum vulgare*)[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(8): 1704-1712 (in Chinese).
- [36] LUO X S, LI L Z, ZHOU D M. Effect of cations on copper toxicity to wheat root: Implications for the biotic ligand model[J]. Chemosphere, 2008, 73(3): 401-406.