

罗洁文,黄玫英,殷丹阳,等. 蚯蚓在土壤污染风险评价中的应用研究进展[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):24-29.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.006

# 蚯蚓在土壤污染风险评价中的应用研究进展

罗洁文,黄玫英,殷丹阳,周垂帆,吴鹏飞

(福建农林大学林学院,福建福州 350002)

**摘要:**蚯蚓是陆地生态系统中生物量最大的无脊椎土壤动物,是土壤中的重要生物,蚯蚓既能够反映土壤的污染状况,又能鉴定指示各种有害物质的毒性,因此被视为土壤区系的代表类群而被应用于指示、监测土壤污染和质量评价。随着生态环境污染和土壤质量的下降,蚯蚓生态毒理学研究得到国内外众多学者的重视,以蚯蚓作为土壤污染指示生物开展了大量的研究工作。蚯蚓在外源污染物胁迫下,其种群以及个体生理生化水平都会发生明显的变化。系统阐述蚯蚓在群落以及个体水平上的生态毒理学研究现状,指出目前蚯蚓毒理学研究存在的薄弱环节,并对今后的研究趋势进行了展望。

**关键词:**蚯蚓;土壤污染;生态毒理学;生物监测

**中图分类号:** S151.9<sup>+</sup>3;X174

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2016)08-0024-06

近年来,随着人口剧增以及经济的高速发展,人类活动导致的环境污染问题正不断加剧,并已成为严重影响人类可持续发展的突出问题。我国环境保护部与国土资源部于2014

收稿日期:2016-01-30

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2014BAD15B02);农业高校产学研合作科技重大项目(编号:2013N5002);福建省高校杰出青年科研人才培育计划(编号:2015);福建省自然科学基金(编号:2013J01073)。

作者简介:罗洁文(1991—),女,广东佛山人,硕士研究生,主要从事生态修复研究。E-mail:ellenlll@163.com。

通信作者:周垂帆,博士,讲师,主要从事水土保持与生态修复研究。

E-mail:zhouchufan@163.com。

年共同发布的《全国土壤污染状况调查公报》显示,全国土壤总点位超标率为16.1%,其中无机污染物超标点位占总超标点位的82%,从污染情况来看,重金属污染尤为严重<sup>[1]</sup>。土壤是污染物的“集散地”之一,土壤污染不仅导致土地质量退化,影响农产品安全,而且还可以通过淋溶作用污染地表水、地下水。土壤污染具有隐蔽性、累积性、滞后性等特点,一旦发生严重污染,往往造成不可逆转的严重后果<sup>[2]</sup>。土壤已成为影响生态环境、耕地质量、食品安全和人类健康的重要因素,是人类赖以生存的基础,土壤环境质量状况与人类息息相关。因此,研究土壤污染物对生物体的毒性作用,由此对环境生态风险早期诊断作出可靠的评估,以期对污染物的早期诊

[22]王 鹏,郭 丽. 响应面法优选蒲公英中绿原酸的提取工艺研究[J]. 北方园艺,2010(23):44-46.

[23]殷书平,梁引库,徐仲阳. 巨大型蒲公英绿原酸提取工艺研究[J]. 中国农学通报,2010,26(22):77-80.

[24]邵 琰,鄢 瑛,张会平. 蒲公英中咖啡酸提取工艺的研究[J]. 技术食品工程,2010(7):132-134.

[25]李喜凤,郝 哲,邱天宝,等. 反相高效液相色谱法测定蒲公英中齐墩果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):52-54.

[26]黄景怡,钟振声. 蒲公英生物碱提取工艺的研究[J]. 广东科技,2009(12):75-76.

[27]金艳梅,朱国军. 正交试验法研究蒲公英中总生物碱提取工艺[J]. 江苏农业科学,2009(3):329-330.

[28]赵坚华,权伍荣. 蒲公英保健饮料及其降血脂,降血糖作用研究[J]. 食品科技,2010(11):123-127.

[29]林争鸣. 蒲公英冰淇淋的研制[J]. 食品工业科技,2004(6):84-85.

[30]单程程. 蒲公英保健价值的研究与发展[J]. 黑龙江科技信息,2010(17):42.

[31]赵 昱,刘 衡,张成桂,等. 药用蒲公英产品的开发进展[J]. 国际药学研究杂志,2012,39(4):311-314,344.

[32]宋晓勇,刘 强,杨 磊,等. 蒲公英多糖提取工艺及抗菌活性

研究[J]. 中国药房,2010,21(47):4453-4456.

[33]宋晓勇,刘 强,王子华. 蒲公英多糖药理作用研究[J]. 中国药房,2009(27):2095-2097.

[34]陈景耀,吴国荣,王习达,等. 蒲公英黄酮类物质的抗氧化活性[J]. 南京师大学报:自然科学版,2005,28(1):84-87.

[35]沈敬华,杨丽敏,张林娜,等. 5种中药提取物抗肿瘤作用的研究[J]. 内蒙古医学院学报,2005,27(4):300-303.

[36]王月娇,沈明浩. 蒲公英对小鼠抗疲劳和降血脂及胃黏膜损伤恢复作用的试验[J]. 毒理学杂志,2009,23(2):143-145.

[37]梁桂英,付艳萍,栾 添. 蒲公英水提取液对小鼠抗疲劳作用的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(33):20402-20403.

[38]李东明. 奥美拉唑联合蒲公英治疗幽门螺旋杆菌的慢性浅表面胃炎58例临床疗效观察[J]. 中国医疗前沿,2009,14(12):28-30.

[39]华 扬. 蒲公英粥治疗胃病[J]. 农村新技术,2008(1):45-48.

[40]张卫明,吴国荣,马世宏,等. 蒲公英护肤作用研究[J]. 中国野生植物资源,2001,20(3):15-17.

[41]高建龙,孔汉文,于秀华. 蒲公英止痘膏的研制[J]. 中国野生植物资源,2001,20(3):26-28.

[42]马世宏,张卫明,赵伯涛,等. 蒲公英儿童浴液的研制[J]. 日用化学工业,1995(3):158-160.

断、早期预防和控制提供基础理论及技术支持。

土壤的污染程度可以通过环境调查和监测进行评价,评估和表征污染物生物效应的一种常见方法是生态风险评价,此方法主要以动物、植物和微生物作试验生物,蚯蚓便是其中的标准化测试物种之一。蚯蚓作为土壤污染的指示生物愈来愈受到重视,目前已被广泛应用于土壤污染的监测。有研究表明,蚯蚓组织中的农药和重金属含量可作为监测土壤污染的重要指标<sup>[3]</sup>。蚯蚓是土壤中普遍存在的无脊椎生物,是土壤系统中重要的组成部分,占土壤动物总量的 60% ~ 80%,长期暴露在土壤中,是陆生生物与土壤生物之间的纽带,是农田生态系统中土壤物质生物小循环中重要的一环<sup>[4]</sup>,被认为是适合对土壤中化学物质进行毒性测试的物种之一。蚯蚓既能反映土壤的污染状况,又能鉴定指示各种有害物质的毒性。目前,应用于土壤生态毒理试验的蚯蚓有十多种,其中最常用的是生活于腐殖质或富含有机质环境中的赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*),该蚯蚓由于容易在实验室养殖等优点被广泛应用于新化学品潜在毒性测试及污染土壤的风险评估。经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)和国际标准化联合会(International Organization for Standardization, ISO)分别制定了相关的蚯蚓生态毒性测试的标准方法,并积累了大量毒性测试数据<sup>[5]</sup>。美国测试与材料学会已公布了关于实验室开展蚯蚓生物富集研究的标准草案。有关蚯蚓生态毒性研究的 2 次国际学术会议均在丹麦举行,讨论与交流蚯蚓生态毒理学的发展,并在相关杂志出版了专辑<sup>[6]</sup>。许多研究发现,蚯蚓受到污染胁迫时,蚯蚓种群和群落会发生明显的变化,并且在蚯蚓微观水平上,如细胞、分子和生理生化水平上都会发生明显的变化。本研究在总结国内外相关研究的基础上,从外来污染物对蚯蚓种群、生化特性和个体的影响 3 个方面进行综述,分析蚯蚓生态毒理试验在土壤污染风险评价中的作用,以期对土壤污染监测和土壤环境质量评价的研究提供参考。

## 1 蚯蚓生态毒理学研究方法

蚯蚓生态毒理学是指利用蚯蚓作为目标载体,对环境中造成土壤污染的化学物质进行测试,根据这些化学物质对蚯蚓的毒害程度来评价其可能对生态系统及其组成的危害程度<sup>[7]</sup>。蚯蚓生态毒理学研究常用的方法有实验室毒理试验法和田间试验法,根据试验研究过程的长短或化学物质剂量的大小,蚯蚓的毒性试验可分为急性毒性试验、慢性毒性试验。急性毒理试验是通过简单、快速的方法测试有毒物对蚯蚓的毒性,从而对该毒物的生态毒性作出初步的判断。慢性毒理试验主要是研究有害化学残留物质对蚯蚓生殖、生理、代谢、染色体及基因等深层次的影响。该领域从分子、基因水平探讨污染物对土壤生态系统的污染状况,对土壤生态系统的早期快速诊断具有重要的意义。目前在低剂量污染物对蚯蚓长期效应的研究中,选用幼蚓作为指示生物来检测污染物对土壤生态系统的影响效果最显著。

### 1.1 室内模拟试验

在试验方法的选用中,实验室毒理试验法被广泛采用,常用的实验室试验方法主要有以下几种。

#### 1.1.1 滤纸接触法

通过将蚯蚓暴露在填充标准化滤纸的玻璃器皿中,与不同浓度的化学药品接触 48 h 后测定蚯蚓的死亡率,并可通过统计学方法得出半致死浓度(LC<sub>50</sub>)。滤纸接触法快速、简单可行,但是此方法仅能提供蚯蚓通过皮肤接触有害物质所产生的毒性信息,因此难以评估化学物质对环境的真实影响<sup>[8]</sup>。刘伟等采用滤纸接触法和土壤培养法研究毒死蜱(chlorpyrifos)、马拉硫磷(malathion)和氟戊菊酯(fenvalerate)对赤子爱胜蚓的急性毒性效应,从试验结果看,通过滤纸接触法测得这 3 种农药对蚯蚓的致死剂量小于土壤培养法,土壤培养法更接近自然状况下蚯蚓接触药品的方式,故以土壤培养法测定的 LC<sub>50</sub> 作为划分药物毒性等级的依据比滤纸接触法更为客观准确<sup>[9]</sup>。

1.1.2 溶液法 该方法一般用于急性毒性试验,主要是模拟土壤溶液中主要养分,即向溶液添加定量的钾(K)、钠(Na)、钙(Ca)、镁(Mg)等成分以及需要测定的污染物并把蚯蚓暴露于溶液中<sup>[10]</sup>。国内外已有较多报道,该方法具有快速、简便、暴露直接等优点,可用于毒物的初筛和毒性的快速鉴别。溶液法在重金属如镉(Cd)、铜(Cu)、锌(Zn)以及纳米 TiO<sub>2</sub>、ZnO 等毒物对蚯蚓的毒性效应中都有相关的应用<sup>[11-13]</sup>。

1.1.3 回避试验 回避试验是利用动物趋利避害本能的一种实验室毒理试验法,通过测定一定浓度某化学物质对蚯蚓个体行为的影响程度来判定其毒性<sup>[14]</sup>。国际标准化组织已于 2005 年公布了利用蚯蚓回避行为反应评价土壤环境质量的标准化试验方法,赤子爱胜蚓和安德爱胜蚓(*E. andrei*)是国际标准化组织指定的回避试验标准蚯蚓品种<sup>[15]</sup>。蚯蚓的回避试验具有操作简便、反应快速、灵敏度高和重现性好等优点。目前,蚯蚓回避试验已发现可适用于检测土壤中的原油、矿物油、多环芳烃等石油类污染物,功夫菊酯、代森锰锌、本菌灵、多菌灵等农药,锰、锌、铜或其他重金属的混合物等多种污染物,其敏感性高于急性毒性试验,也高于或至少等同于亚急性毒性试验中的生殖毒性试验<sup>[16]</sup>,因此,回避试验在污染土壤生态风险评价方面具有广阔的应用前景。

1.1.4 人工土壤试验 通过将成熟的赤子爱胜蚓或安德爱胜蚓(*E. andrei*)置于含有不同浓度供试化学品的人工土壤中培养 14 d,观察其行为和存活状况。通常情况下,人工土壤由 10% 苔藓泥炭细土(pH 值=6)、20% 高岭黏土(高岭土比例大于 50%)、69% 工业石英砂(含 50% 以上 0.05 ~ 0.20 mm 的细小颗粒)和 1% CaCO<sub>3</sub>(化学纯)组成<sup>[17]</sup>。利用这种复杂的人工土壤进行试验的主要目的是尽可能模拟蚯蚓生活的真实环境,从而使试验结果尽可能真实地反映污染物在自然界中的实际影响,这也是此方案最明显的优点。Zhou 等利用人工土壤法进行镉与草甘膦复合对蚯蚓的亚急性毒性试验,探讨草甘膦存在的条件下镉对蚯蚓的存活、生长、繁殖、生化指标等影响规律<sup>[18]</sup>。

1.1.5 人造土壤试验 这是用一种无定形水和改性的二氧化硅粉,并在其中加入直径为 1.5 ~ 2.0 cm 的玻璃球以代替人工土壤的试验方法,是根据上述人工土壤试验方法改进而得。此方法的优点是使用确切定义的物质作为基质,操作简便,其结果也更具有可比性,并且由于这种物质的化学惰性,基本上可以确定不会与试验容器及被测物质发生化学反应。所加入玻璃球一方面能创造一个类似土壤结构的环境,另一

方面能增加被测物质的接触面积。从试验的结果来看,与人工土壤试验一样也能较好反映污染物的真正影响。有研究者认为,相较于人工土壤试验,人造土壤试验方法更简便易行,更易于标准化<sup>[19]</sup>。如肖能文等就把人造土壤法应用于转基因棉中 *Bt* 毒蛋白 Cry1Ac 对蚯蚓生理水平的影响<sup>[20]</sup>。

### 1.2 田间毒理试验

严格意义上说,实验室试验方法并不是真正意义上的生态毒理学试验,但因其实用价值而得到重视和发展。实验室试验方法主要应用在蚯蚓个体水平及模拟环境中,而田间试验法在种群、群落调查及土壤系统的实地考察等方面都有所应用。目前,越来越多的蚯蚓毒理试验将微观的试验方法和宏观的调查分析结合在一起,在研究生化指标的同时,探讨污染物对蚯蚓种群或群落及整个土壤系统的生态效应,使试验结果对土壤的生态评价更具有指导性。

蚯蚓的田间生态毒理试验是指在实际的生态系统中直接测试某种化学物质对蚯蚓种群生态毒性的试验。由于试验直接在现实的土壤环境中进行,因而其结果也更直接地反映被测物质对环境的实际影响。与实验室试验方法相比,田间生态毒理试验有诸多的优点<sup>[19]</sup>,但是由于试验条件的复杂性,其试验结果常常不具有可比性;同时,试验方法和评价标准多样化,可用的数据是有限的。因此,尽管蚯蚓田间生态毒理试验在评价化学药品的生态毒性上很有价值,但仍需要更多研究者在试验方法的标准化和制定相关评价标准方面进行更深入的探讨。

## 2 蚯蚓种群对土壤污染物的响应

蚯蚓种群的生物多样性是伴随着蚯蚓对各种生态环境的适应而产生的<sup>[3]</sup>。许多有毒有害的物质通过各种途径进入土壤生态系统后,可导致蚯蚓及其他土壤动物种群的显著变化。在外源污染物胁迫下,耐污染强的优势种可能会表现出更高的优势度,一些对污染敏感的蚯蚓种群不能继续生存和繁衍,能够耐受污染物的种群保留下来,从而导致蚯蚓在密度和群落结构上发生明显的变化<sup>[21]</sup>。因此,在大多数情况下,蚯蚓种群密度、种类丰度和数量等参数,都是评价污染物对环境危害程度的重要工具。目前,关于土壤动物——蚯蚓的研究并未引起国内研究者的关注,国内外相关研究并不多。王振中等对湖南株洲清水塘金属冶炼工业区附近土壤中的蚯蚓种群种类和密度进行了研究,发现随着镉、砷、锌、铅、汞等重金属污染程度的增加,蚯蚓的种类明显减少,优势种以 3 种巨蚓科种为主<sup>[22]</sup>。换言之,重金属元素能在土壤动物体内积累,重金属在蚯蚓体内积累到一定的浓度后,对污染敏感的种类便不能继续繁殖和生存。Lukkari 等在芬兰选取不同重金属污染以及不同土壤特性的冶金工业区土壤中的蚯蚓进行研究,结果发现,距离污染源越近,蚯蚓的密度、数量和生物量都明显地下降<sup>[23]</sup>。Klok 等对荷兰和比利时洪水频发的河漫滩平原地区的工业污染区进行研究,结果表明,蚯蚓的密度和生物量都与 Cd、Cu、Zn 呈对数变换关系,随着重金属浓度的增加而降低,在高 Zn、高 Cd 含量的污染区仅有粉正蚓 (*Lambricus rubellus*) 能够存活<sup>[24]</sup>。另外,有研究表明,蚯蚓对农药十分敏感,低剂量的农药即可引起蚯蚓数量的减少<sup>[5]</sup>。张友梅等对农药和重金属污染区的蚯蚓调查结果表明,蚯蚓的种类

和数量随着土壤污染程度的增加而减少,重污染区蚯蚓的种类单一,均匀性降低,而清洁区则种类丰富,结构复杂,均匀性增加<sup>[25]</sup>。Céline 对农药和蚯蚓之间的关系进行研究发现,农药能破坏蚯蚓体内的酶活性,使其死亡率上升,繁殖力下降,进而对蚯蚓种群产生影响<sup>[26]</sup>。Santadino 等在研究除草剂草甘膦对蚯蚓种群的影响时发现,草甘膦剂量的增加明显地降低了蚯蚓的繁殖能力,慢性的毒性使得蚯蚓种群数量下降,甚至造成区域性的灭绝<sup>[27]</sup>。有研究还发现,污染物对蚯蚓的影响不仅存在于不同蚯蚓种类之间,还存在于同一蚯蚓的种内间<sup>[28]</sup>。以上研究所得出的结论能在一定程度上说明,蚯蚓种群密度、数量、空间分布等可以用于土壤生态系统污染的程度分析。然而实地调查污染土壤中的蚯蚓种群数量及种群结构不仅需要较多的人力物力,而且耗资、费时,想要获得更深入的、定量化的信息来描述土壤生态系统受污染的动态变化仍然需要更多的研究。

## 3 蚯蚓个体对土壤污染物的响应

### 3.1 蚯蚓个体对土壤污染物的富集作用

蚯蚓位于陆地生态食物链金字塔的底端,土壤中的污染物在蚯蚓体内富集后,可以在食物链中传递和生物放大,从而必将导致食物链的逐级富集,最终威胁人类的健康。蚯蚓主要通过被动扩散作用和摄食作用这 2 种途径富集土壤中的污染物,前者是污染物从土壤溶液透过体表进入蚯蚓体内;而后者则是土壤中的污染物通过蚯蚓的吞食作用进入到其体内,并在内脏器官内完成吸收。有研究通过测定重金属污染土壤中不同铅浓度梯度下蚯蚓在培养期内对铅的富集量表明,蚯蚓对铅有较强的富集作用,且随铅浓度的增加,蚯蚓体内的富集量也增加<sup>[29]</sup>。Langdon 等研究发现,3 种蚯蚓 (*L. rubellus*、*E. Andrei*、*A. caliginosa*) 对铅都有明显的吸收富集能力<sup>[30]</sup>。另外,蚯蚓对重金属的富集作用是具有一定选择性的,有学者在研究蚯蚓对重金属的最大富集量中发现,蚯蚓对 Zn、Cu、Pb、Hg 4 种重金属的吸收量由大到小为 Zn > Cu > Pb > Hg<sup>[31]</sup>。

### 3.2 蚯蚓的存活及行为对土壤污染物的响应

当蚯蚓与高剂量农药或其他污染物接触时,会产生逃避现象,最终会在短时间出现中毒症状,甚至死亡;长时间的低剂量作用则可能引起夏眠、粪便排放量减少等现象的发生。Reinecke 等研究发现,果园喷洒农药后,土壤中的蚯蚓种群密度明显降低<sup>[32]</sup>。有研究发现,蚯蚓暴露在不同浓度的 Cu<sup>2+</sup> 溶液中,部分表现出行为异常。随着时间延长,赤子爱胜蚓身体变柔软,环节肿胀,身体后段萎缩糜烂,甚至断裂,并失去逃避能力,直至死亡<sup>[33]</sup>。有学者研究发现,暴露在吡虫啉等杀虫剂中的蚯蚓粪便排出量显著减少,蚯蚓排便量因其测定简便、快速,已成为评估生物毒性的良好指标<sup>[26]</sup>。

### 3.3 蚯蚓生长、发育和繁殖对土壤污染物的响应

土壤中的外源污染物会对蚯蚓的生长发育和繁殖产生一定的负面效应。其中,生殖系统是动物体内对外源污染物反应最敏感、最容易受到不良环境因素影响的系统。重金属、农药等污染物进入蚯蚓体内会破坏蚯蚓的细胞组织结构从而影响蚯蚓的产卵能力和精子的形成过程。郭永灿等研究表明,在受农药污染土壤生活的蚯蚓因精子发生畸变、受精能力丧

失,而导致不育,敏感种类在农药污染区甚至无法繁衍<sup>[34]</sup>。另外,土壤中高浓度的镉、铜、铅、锌等能够影响蚯蚓种群密度、生存能力、体质量变化、性发育、产卵率、孵化率等重要指标。相关研究表明,赤子爱胜蚓暴露在 2 mg/kg 呋喃丹污染的土壤中,蚯蚓个体不能发育出环带和产卵<sup>[35]</sup>。相关研究发现,污水处理厂中的银纳米粒子和硝酸银均会对蚯蚓的繁殖产生影响,抑制其繁殖和生长<sup>[36]</sup>。

#### 4 蚯蚓重要生物标志物在污染物中期诊断中的作用

近年来,细胞或分子水平上的生物标志物作为污染物暴露和毒性效应的早期预警指标受到广泛关注,并成为国内外生态毒理学研究的热点之一<sup>[2]</sup>。而污染物对蚯蚓生化指标以及微观指标的影响也是目前蚯蚓生态毒理学的研究热点。随着土壤性质的变化,污染物的生物有效性(即产生毒性的能力)是不断变化的,而生物暴露于污染物后产生的生理、生化方面的反应是相对稳定的<sup>[21]</sup>。因此,利用蚯蚓的分子、生物化学和生理反应即生物标志物可以在指示半致死效应变得明显前,研究污染物对蚯蚓在个体水平上所产生的影响,对此进行的研究可完善土壤污染的早期预警系统并对土壤污染进行监测。目前被广受关注的蚯蚓微观指标主要包括:溶酶体膜的稳定性、DNA 的损伤作用、抗氧化防御系统、金属硫蛋白和免疫行为等。

##### 4.1 蚯蚓溶酶体膜稳定性

溶酶体又称溶体、溶小体,是单层膜的囊状胞器,内部含有数十种从高尔基体送来的水解酶,这些酶主要负责消化过程,也是有毒物质在亚细胞水平的特殊靶标。溶酶体可通过吞噬方式消化、溶解部分由于损伤而丧失功能的细胞器和其他细胞质颗粒或经细胞摄入的外源物质<sup>[16]</sup>。中性红染料能在蚯蚓体腔细胞内的溶酶体中很快地积累,当蚯蚓受到环境胁迫时,其溶酶体膜受到损伤,渗透性发生变化,随之失去稳定性,染料就逐步泄漏到细胞质中,因而可以利用中性红保留时间(neutral red retention time, NRRT)来表征溶酶体膜的稳定性,溶酶体膜的稳定性与污染物剂量具有良好的线性关系,并可以对土壤的污染情况起到早期预警作用。目前该方法已经应用到重金属、农药、石油烃、多环芳烃等土壤污染源的监测与评价中。Gupta 利用 NRRT 指标诊断土壤 Cd 污染,对照土壤中蚯蚓溶酶体的 NRRT 为 119 min,随着土壤 Cd 处理浓度升高, NRRT 呈直线下降<sup>[37]</sup>。在有机污染物和农药方面,张伟等的研究表明,将蚯蚓暴露于苯并[a]芘(B[a]P)污染的土壤,溶酶体膜的渗透性增加并失去稳定性, NRRT 呈现出随着培养时间的延长而增加的趋势<sup>[38]</sup>。Booth 等研究有机磷杀虫剂对 *Aporrectodea caliginosa* 的毒害作用表明,无论在实验室或田间条件下, NRRT 均具有明显的污染指示作用<sup>[39]</sup>。目前来说,同其他指标相比, NRRT 指标对污染物更为敏感,因此被作为污染物的早期预警生物标志物。

##### 4.2 蚯蚓 DNA 的损伤作用

DNA 是生物体内重要的大分子,也是生物体内重要的遗传物质, DNA 若发生超过其本身修复能力的损伤,则会影响 DNA 的结构和功能,导致细胞死亡或细胞突变。目前,毒物对蚯蚓 DNA 的损伤是蚯蚓分子生态毒理学研究的重要内容之一。当前对蚯蚓 DNA 的损伤作用主要通过单细胞凝胶电

泳(彗星实验)和 DNA 加合物进行分析<sup>[39-41]</sup>,由于这 2 种方法均可灵敏地表征农药、重金属、多环芳烃等污染物潜在的遗传毒性和早期暴露效应。因此,蚯蚓 DNA 损伤是用于检测污染物致癌、致畸、致突变效应的理想生物标志物<sup>[42]</sup>。曹佳等利用单细胞凝胶电泳技术研究发现,异噁草酮对土壤动物蚯蚓具有毒性作用,不同浓度异噁草酮的暴露均能引起蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤,表明 DNA 的损伤与异噁草酮呈现出很好的剂量-效应关系<sup>[43]</sup>。Espinosa-Reyes 等对墨西哥重要工业城市韦拉克鲁斯州某工业区附近持久性有机污染物(POPs)污染土壤中的蚯蚓进行彗星实验研究,发现蚯蚓 DNA 损伤显著高于实验室培养的蚯蚓,认为蚯蚓的 DNA 损伤能够很好地指示有机污染物对环境的影响<sup>[35]</sup>。

##### 4.3 蚯蚓的抗氧化防御系统

抗氧化防御系统作为活性氧的清道夫,在活性氧的清除以及机体的保护性防御中发挥着巨大的作用,该系统包括酶和非酶系统两大类<sup>[2]</sup>。污染物可以引起蚯蚓体内酶活性发生变化,有许多研究者提出可将蚯蚓体内酶活性作为生物标志物指示土壤污染,目前所研究的酶主要包括<sup>[36]</sup>:超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、乙酰胆碱酯酶(AChE)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽转移酶(GST)等。而非酶系统是指除抗氧化酶外,在机体保护防御过程中也发挥着不可替代作用的小分子抗氧化物质,这类物质包括谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(维生素 C)、 $\alpha$ -生育酚(维生素 E)等,特别是 GSH,这是有机体抵抗污染胁迫的第 1 道防线,在降低外源污染的生物毒性和清除活性氧中发挥着重要的作用。王辉等的研究表明,土壤中 Cd、Cu、Pb 复合污染对蚯蚓体内 SOD、GST 和碱性磷酸酶(AP)活性产生显著的诱导效应,酶活性与重金属含量及其持续时间密切相关<sup>[44]</sup>。Zhou 等研究也发现,单一 Cu 胁迫使蚯蚓体内 SOD、GSH、AChE 活性提高,并且明显高于毒性较低的草甘膦和空白对照<sup>[18]</sup>。李淑梅等研究废电池在土壤中对蚯蚓的可溶性蛋白和 SOD 活性的影响,结果表明蚯蚓 SOD 活性呈先上升后下降的趋势,随时间变化呈抛物线形<sup>[45]</sup>。虽然很多证据都表明蚯蚓对金属具有耐性,但是其中的耐性机理并不清楚,对这方面的研究也不多。目前在重金属污染方面存在着一种共识,即生物体暴露于重金属后,可能会受到氧化胁迫的威胁,为了避免受到伤害,生物体内某些与抗氧化相关的酶活性就会升高,缓解活性氧对生物体造成的危害<sup>[46]</sup>。由此可以看出酶与重金属之间存在着密切关系,酶活性的研究在蚯蚓对重金属耐性机制领域有重要作用。关于污染物对蚯蚓酶活性的影响方面的研究有很多,但是对酶活性的影响机制有待进一步研究。

##### 4.4 金属硫蛋白

金属硫蛋白是一种低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白,广泛存在于生物体内,并具有参与生物体内微量元素储存、运输和代谢、拮抗电离辐射、清除羟基自由基和重金属解毒等多种生物学作用。金属硫蛋白可在实验室或野外条件下由各种营养必需和非必需的有毒金属诱导合成<sup>[37]</sup>,它们被认为是可检测金属污染的生物标志物,具有很强的特异性。目前,蚯蚓的金属硫蛋白已成功应用于对镉、铜、锌等重金属暴露的评价。Gruber 等研究表明,在实验室条件下,暴露在重金属 Cd 中使得蚯蚓体内金属硫蛋白含量大幅度增加,并结合

了高达 65% 进入体内组织的 Cd<sup>[47]</sup>。Mustonen 等把不同种群的蚯蚓暴露在不同浓度的铜、锌污染中,比较发现,污染物浓度越高的环境下,蚯蚓体内金属硫蛋白含量越高<sup>[48]</sup>。在国内研究方面,陈春等通过土壤染毒培养试验,利用重金属 Cd 对蚯蚓(*E. foetida*)进行染毒,发现 Cd 可诱导蚯蚓体内的 MT mRNA 表达,其表达水平与 Cd 污染暴露呈现出剂量-效应和时间-效应关系<sup>[49]</sup>。另外有研究表明,金属硫蛋白对不同重金属敏感程度不一,相较于 Cu,对 Cd 胁迫的响应更为敏感;此外,金属硫蛋白对重金属的敏感度高于对农药的敏感度<sup>[36]</sup>。以上分析表明,可以利用蚯蚓的金属硫蛋白作为潜在分子标志物,诊断环境中的污染物及其暴露水平。

#### 4.5 免疫功能

为了适应不利的生存环境,蚯蚓体内进化产生了独特的抗菌与免疫系统,逐渐形成了防御病原细菌侵袭的有效机制。蚯蚓的免疫系统主要由体腔细胞组成,外源污染物进入蚯蚓体内可使蚯蚓体腔细胞的存活率及体腔细胞的噬菌细胞活性降低,因而体腔细胞可被用于指示土壤环境的污染状况。Hooper 等发现,当蚯蚓暴露在锌污染环境时,其免疫功能会受到抑制,并下降 20%<sup>[50]</sup>。李帅章等通过人工土壤法对赤子爱胜蚓进行铜与砷染毒,发现黏附细胞吞噬活性与细胞吞饮作用受重金属的影响而减弱,这说明重金属对蚯蚓中与免疫相关的体腔细胞影响较大<sup>[51]</sup>。国内外关于蚯蚓免疫功能的研究尚不多,将蚯蚓的免疫系统作为污染土壤风险评价的指标还有待研究。

#### 5 展望

在土壤生态毒理研究中,合适的生物标志物可作为环境评价的标准,为土壤污染物和毒理效应之间建立发生机制,而蚯蚓作为食物链底端的生物量最大的土壤动物类群,目前被认为是土壤污染的理想指示生物<sup>[52-54]</sup>。综上所述,蚯蚓应用于土壤污染的监测具有一定的前景。近年来,国内外运用蚯蚓监测土壤污染已有长足的发展,但是研究的深度和广度并不足。首先,通过实验室和田间试验可以较为准确地得出外源污染物对蚯蚓生理、生化以及个体和种群的影响程度,但是仍然需要不断筛选出敏感的生物标志物,由此建立生物标志物的响应情况与土壤污染下蚯蚓个体、种群变化之间的关系,从而对土壤生态污染程度进行研究、预警和治理。其次,除了有大量新型污染物进入土壤生态系统之外,土壤存在着多种现实问题,如复合污染不断增加、污染物累积的动态过程、污染物的迁移等。目前的研究中,关注热点有从单一污染物转向复合污染物,静态转向动态研究的趋势,使蚯蚓生态毒理研究不断得到完善。此外,在复杂的土壤生态系统中,有许多与污染无关的变量能够对不同的酶系统产生影响从而干扰生物标记物的反应,而最有效的生态毒理学指标也难以定量土壤环境中可能存在的复杂干扰因子<sup>[55]</sup>,目前还缺乏统一的、可比较的试验方法。同时,蚯蚓对污染物在生化上的响应复杂,具体机制尚未明确。因此,对生物标记物中不确定的混淆因子之间的交互作用进行估算,并逐步转向定量分析,完善机制的解释等方面也是蚯蚓生态毒理学研究的重要环节。

随着科学技术的发展,细胞生物学和分子生物学迅速发展,推动了分子水平上的蚯蚓生态毒理学的研究。如 DNA 损

伤的检测手段主要是通过彗星实验和 DNA-加合物分析,这些试验方法都存在费时和成本高的缺点,因此今后应进一步采用生理生态学、生物化学、分子生态学、生物地理学等方法,注重学科交叉,并依靠高效节约的新技术更深入地分析污染物对蚯蚓的作用,增加蚯蚓作为污染指示生物的可靠性。

#### 参考文献:

- [1] 安 婧,宫晓双,魏树和. 重金属污染土壤超积累植物修复关键技术的发展[J]. 生态学杂志,2015,34(11):3261-3270.
- [2] 王晓蓉. 污染物微观制毒机制和环境生态风险早期诊断[M]. 北京:科学出版社,2013.
- [3] Lee K E. Some trends and opportunities in earthworm research or: Darwin's children - the future of our discipline[J]. Soil Biology and Biochemistry,1992,24(12):1765-1771.
- [4] 李培军,熊先哲,杨桂芬,等. 动物生物标志物在土壤污染生态学研究中的应用[J]. 应用生态学报,2003,14(12):2347-2350.
- [5] Sanchez - Hernandez J C. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment[J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology,2006,188:85-126.
- [6] Li L Z,Zhou D M,Wang P,et al. Subcellular distribution of Cd and Pb in earthworm *Eisenia fetida* as affected by Ca<sup>2+</sup> ions and Cd - Pb interaction[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,2008,71(3):632-637.
- [7] 梁继东,周启星,孙福红. 蚯蚓在环境安全研究中的应用[J]. 生态学杂志,2006,25(5):581-586.
- [8] 周垂帆. 重金属和草甘膦复合污染生态毒理研究[D]. 南京:南京林业大学,2013.
- [9] 刘 伟,朱鲁生,王 军,等. 毒死蜱、马拉硫磷和氰戊菊酯对赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)的急性毒性[J]. 生态毒理学报,2009,4(4):597-601.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. Analytical Biochemistry,1976,72:248-254.
- [11] Arnold R E,Hodson M E,Comber S. Does speciation impact on Cu uptake by, and toxicity to, the earthworm *Eisenia fetida*? [J]. European Journal of Soil Biology,2007,43(1):S230-S232.
- [12] Li L Z,Zhou D M,Peijnenburg W J,et al. Uptake pathways and toxicity of Cd and Zn in the earthworm *Eisenia fetida*[J]. Soil Biology & Biochemistry,2010,42(7):1045-1050.
- [13] 胡长伟,崔益斌,李丁生,等. 纳米 ZnO 与 TiO<sub>2</sub> 对赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)的毒性效应[J]. 生态毒理学报,2011,6(2):200-206.
- [14] Belfroid A, Vanwezel A, Sikkenk M, et al. The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms(*Eisenia andrei*): experiments in water[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,1993,25(2):154-165.
- [15] 卜春红,高大文. 蚯蚓回避反应在生态毒理研究中的应用进展[J]. 农业环境科学学报,2006(增刊2):799-804.
- [16] 颜增光,何巧力,李发生. 蚯蚓生态毒理试验在土壤污染风险评估中的应用[J]. 环境科学研究,2007,20(1):134-142.
- [17] Spurgeon D J, Hopkin S P. Extrapolation of the laboratory - based OECD earthworm toxicity test to metal - contaminated field sites [J]. Ecotoxicology,1995,4(3):190-205.
- [18] Zhou C F, Wang Y J, Li C C, et al. Subacute toxicity of Copper and

- glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*) [J]. Environmental Pollution, 2013, 180: 71–77.
- [19] 邱江平. 蚯蚓及其在环境保护上的应用 II. 蚯蚓生态毒理学 [J]. 上海农学院学报, 1999, 17(4): 301–308.
- [20] 肖能文, 戈峰, 刘向辉. Bt 毒蛋白 Cry1Ac 在人造土壤中对赤子爱胜蚓毒理及生化影响 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(8): 1523–1526.
- [21] 高岩, 骆永明. 蚯蚓对土壤污染的指示作用及其强化修复的潜力 [J]. 土壤学报, 2005, 42(1): 140–148.
- [22] 王振中, 张友梅, 胡觉莲, 等. 土壤重金属污染对蚯蚓 (*Opisthopora*) 影响的研究 [J]. 环境科学学报, 1994, 14(2): 236–243.
- [23] Lukkari T, Taavitsainen M, Väisänen A, et al. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004, 59(3): 340–348.
- [24] Klok C, Goedhart P W, Vandecasteele B. Field effects of pollutants in dynamic environments. A case study on earthworm populations in river floodplains contaminated with heavy metals [J]. Environmental Pollution, 2007, 147(1): 26–31.
- [25] 张友梅, 王振中, 邢协加, 等. 土壤污染对蚯蚓的影响 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1996(3): 84–90.
- [26] Céline P. Pesticides and earthworms: a review [J]. Agronomy for Sustainable Development, 2014, 34(1): 199–228.
- [27] Santadino M, Coviella C, Momo F. Glyphosate sublethal effects on the population dynamics of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) [J]. Water Air and Soil Pollution, 2014, 225(12): 2207.
- [28] Terhivuo J, Pankkoski E, Hyvärinen H, et al. Pb uptake by ecologically dissimilar earthworm (*Lumbricidae*) species near a lead smelter in South Finland [J]. Environmental Pollution, 1994, 85(1): 87–96.
- [29] 寇永纲, 伏小勇, 侯培强, 等. 蚯蚓对重金属污染土壤中铅的富集研究 [J]. 环境科学与管理, 2008, 33(1): 62–64.
- [30] Langdon C J, Hodson M E, Arnold R E, et al. Survival, Pb – uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD – style toxicity test and a soil avoidance test [J]. Environmental Pollution, 2005, 138(2): 368–375.
- [31] 倪少仁. 蚯蚓对土壤重金属的富集作用研究 [D]. 兰州: 兰州交通大学, 2010.
- [32] Reinecke S A, Reinecke A J. The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 66(2): 244–251.
- [33] 周垂帆, 王玉军, 俞元春, 等. 铜和草甘膦对蚯蚓的毒性效应研究 [J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(8): 1077–1082.
- [34] 郭永灿, 王振中, 张友梅, 等. 重金属对蚯蚓的毒性毒理研究 [J]. 应用与环境生物学报, 1996, 2(2): 132–140.
- [35] Espinosa – Reyes G, Ilizaliturri C A, Gonzalez – Mille D J, et al. DNA damage in earthworms (*Eisenia* spp.) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico [J]. Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2010, 45(1): 49–55.
- [36] Calisi A, Lionetto M G, Schettino T. Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants [J]. Science of the Total Environment, 2011, 409(20): 4456–4464.
- [37] Gupta S K. Neutral red retention by earthworm coelomocytes: a biomarker of cadmium contamination in soil [J]. Europe PubMed Central, 2000, 13(2): 117–121.
- [38] 张伟, 郑彬, 马静静, 等. 土壤 B[a]P 多次叠加污染的生物有效性及对蚯蚓体腔细胞染色体和溶酶体的毒性效应 [J]. 应用与环境生物学报, 2014, 10(6): 1020–1026.
- [39] Booth L H, Heppellthwaite V J, Webster R, et al. Lysosomal neutral red retention time as a biomarker of organophosphate exposure in the earthworm *Aporreotodea caliginosa*: laboratory and semi – field Experiments [J]. Biomarkers, 2008, 6(1): 77–82.
- [40] de Lapuente J, Lourenco J, Mendo S A, et al. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives [J]. Frontiers in Genetics, 2014, 6(180): 180.
- [41] Vasseur P, Bonnard M. Ecogenotoxicology in earthworms: a review [J]. Current Zoology, 2014, 60(2): 255–272.
- [42] Reinecke S A, Reinecke A J. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 66(1): 92–101.
- [43] 曹佳, 刁晓平, 胡继业, 等. 异噁草酮对蚯蚓抗氧化酶活性及 DNA 损伤的研究 [J]. 农业环境科学学报, 2013(5): 925–931.
- [44] 王辉, 谢鑫源. Cd, Cu 和 Pb 复合污染对蚯蚓抗氧化酶活性的影响 [J]. 环境科学, 2014, 35(7): 2748–2754.
- [45] 李淑梅, 马克世, 李青芝. 废电池对蚯蚓体内可溶性蛋白和 SOD 活性的影响 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(6): 135–136.
- [46] Ribera D, Narbonne J F, Arnaud C, et al. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* andrei exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33(7/8): 1123–1130.
- [47] Gruber C, Stürzenbaum S, Gehrig P, et al. Isolation and characterization of a self – sufficient one – domain protein [J]. The FEBS, 2000, 267(2): 573–582.
- [48] Mustonen M, Haimi J, Väisänen A, et al. Metallothionein gene expression differs in earthworm populations with different exposure history [J]. Ecotoxicology, 2014, 23(9): 1732–1743.
- [49] 陈春, 周启星. 蚯蚓金属硫蛋白定量 PCR 检测方法及其分子诊断 [J]. 中国环境科学, 2011, 31(8): 1377–1382.
- [50] Hooper H L, Jurkschat K, Morgan A J, et al. Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix [J]. Environment International, 2011, 37(6, SI): 1111–1117.
- [51] 李帅章, 孙振钧, 王冲. 铜砷单一污染对蚯蚓体腔细胞的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(6): 2382–2386.
- [52] 陈建华, 卢敏, 蔡志斌. 维生素 C 拮抗草甘膦对蚯蚓急性毒性的作用 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 41–413, 425.
- [53] 许梦, 李旭, 丁鸿涛, 等. 蚯蚓堆置对农业和城市有机废弃物堆肥产品腐熟度的影响 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 356–359.
- [54] 李恒, 龙柱, 冯群策. 废纸脱墨污泥蚯蚓生物处理效应 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 358–360.
- [55] 周启星, 王美娥. 土壤生态毒理学研究进展与展望 [J]. 生态毒理学报, 2006, 1(1): 1–11.