

动物生物标志物在土壤污染生态学研究中的应用*

李培军¹ 熊先哲 杨桂芬 刘宛 许华夏 台培东

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

【摘要】 应用陆栖无脊椎动物的生物标志物对土壤生态系统中污染物的暴露和效应进行评价日益受到重视,并取得了显著的研究进展.文中介绍了溶酶体、胁迫蛋白和金属硫蛋白(MTs) 3种主要生物标志物.体腔细胞内溶酶体膜稳定性用中性红保持时间(NRR)进行检测.胁迫蛋白类多采其中的Hsp70和Hsp60;金属硫蛋白不同同分异构体的定量分析可用于反映不同的金属污染胁迫.对3种生物标志物机理、特性、检测实例以及在污染土壤生态毒理诊断中的应用前景进行了评述.

关键词 生物标志物 溶酶体 胁迫蛋白 金属硫蛋白

文章编号 1001-9332(2003)12-2347-04 **中图分类号** X171.5 **文献标识码** A

Application of terrestrial invertebrates biomarkers in soil pollution ecology study. LI Peijun, XIONG Xianzhe, YANG Guifen, LIU Wan, XU Huaxia, TAI Peidong (Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China). - *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2003, 14(12): 2347~2350.

Biomarkers in terrestrial invertebrates play an important role in estimating either exposure or resultant effects of pollutants in soil ecosystem, which has received increasing attention and made significant progress. The present paper has drawn three important biomarkers, i. e., lysosomes, stress protein and metallothioneins (MTs). The lysosomal membrane stability of coelomocytes was assayed as neutral-red retention time (NRR-time) resulting from toxicant stress. Hsp70 and Hsp60 were commonly used in the stress protein families. The quantification methods of different isoforms of the metallothioneins could specifically indicate different metal contamination. The rationale, characteristics, and relevant exemplary case of assaying the biomarkers and their promising application to ecotoxicological diagnosing in soil contamination were discussed.

Key words Biomarkers, Lysosomes, Stress protein, Metallothioneins.

1 引言

陆栖无脊椎动物(terrestrial invertebrates)广泛分布在土壤生态系统中,是土壤动物的主要种类,对改良土壤结构和分解土壤有机物起着重要作用.陆栖无脊椎动物的生命活动及生理代谢状况在一定程度上反映了土壤的生态功能,因此可以应用于土壤生态功能评价研究以及对土壤污染状况和环境质量进行判定.特别是土壤无脊椎动物中的一些生物标志物对揭示土壤污染物的暴露(exposure)和效应(resultant effects)具有敏感性和准确性,某些生物标志物可对混合污染物的复合效应作出客观的判断.这是化学检测方法通常难以做到的.为此,土壤无脊椎动物生物标志物研究日益受到重视.欧洲联盟(European Union)启动了两项重大研究项目BIOPRINI(1994~1996)和BIOPRINT(1996~1999),组织许多国家科学家在这一领域开展了系统研究.现在,土壤无脊椎动物中生物标志物研究,继水生标志物之后,已取得了引人注目的进展.

生物标志物在土壤生态毒理研究中占有重要的位置^[1,23].关于生物标志物的概念,随着生态毒理学的发展,赋予了它更广泛的内涵,并且在分类上日趋完善. Walker^[47]和王海黎等^[48]都作了较为详细的论述.一般认为,生物标志物是当生物体暴露于各种环境逆境时,其体内组织、细胞以及

分子结构的反应,这些反应表现为特定的生物信号.在土壤生态系统中,它广泛用于土壤污染的生态毒理学诊断,可为土壤污染预防和修复提供依据.

应用生物标志物研究的土壤无脊椎动物包括蚯蚓(Earthworm)、线虫(Nematode)、等足类动物(Protozoa)、腹足动物(Isopods)、弹尾目昆虫(Collembans)等.主要生物标志物包括溶酶体、胁迫蛋白和金属硫蛋白等.不同的生物标志物常对应于不同供试动物.近年来,生物标志物研究在一些欧洲国家进展较快,本文拟就其研究现状及发展趋势予以论述.

2 溶酶体(Lysosomes)

溶酶体生物标志物的供试动物主要是蚯蚓.蚯蚓属于环节动物门寡毛纲(Oligochaeta)的一类低等动物,种类多达3000种以上,在土壤中分布广泛,是理想的供试动物^[40].蚯蚓体腔细胞内的溶酶体能很快的吸收、保持和积累中性红染料(CH₃)₂NCl₂H₅H₂(CH₃)(NH₂)HCl,受到胁迫的蚯蚓,其溶酶体膜的渗透性发生变化,并失去稳定性,染料就逐步泄

*国家自然科学基金项目(20277040)和中国科学院知识创新工程资助项目(KZCXZ-SW-416, SCXZD0103).

*通讯联系人.

2002-10-16收稿,2003-03-31接受.

露到周围的细胞质中. 根据中性红的保持时间 NRR (Neutral Red Retention) 可反映土壤污染对蚯蚓的毒害效应^[50].

在土壤无机污染诊断方面, Reinecke 等^[32]利用微宇宙实验装置添加 Pb、Zn 和 Cd, 对蚯蚓溶酶体的 NRR 进行测定, 研究时间历时 3 年. 结果表明, 清洁土壤中蚯蚓溶酶体的 NRR 值为 93.5 min, 而 Pb、Zn 和 Cd 处理后 NRR 明显缩短, 分别为 58.2、53.8 和 35.4 min. Scott-Fordsmand 等^[38]发现当土壤 Ni 浓度达 $85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, NRR 明显下降, 并显示剂量-反映关系. Scott-Fordsmand 等^[39]还发现, 溶酶体稳定性与 Cu 的形态和有效性密切相关, 以新加 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cu 和 70 年前污染田间土壤 $69 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cu 相比较, 经 NRR 的测定, 前者 NRR 比后者降低得更显著. Gupta^[19]利用 NRR 指标诊断土壤 Cd 污染. 对照土壤中蚯蚓溶酶体的 NRR 时间为 119 min, 随着土壤 Cd 处理浓度升高, NRR 呈直线下降. 不同种类的蚯蚓对重金属 Zn 的敏感性反应亦不同, 正红蚓和 *Aporrectodea caliginosa* 蚓比正蚓和赤子爱胜蚓, 在 NRR 方面更敏感^[7, 20, 41]. 而赤子爱胜蚓在土壤 Cu 浓度仅为 $40 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时 NRR 就发生显著变化^[43].

在有机污染物和农药方面, Booth 等^[6, 7]研究了有机磷杀虫剂对 *Aporrectodea caliginosa* 蚓的毒害作用. 在实验室和田间条件下, NRR 均具有明显的污染指示作用. Eason 等^[16]的研究表明, 一种名称为 Chloriprifos 的农药在浓度为 $125 \sim 2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 3 周时间内 NRR 的降低呈现明显的剂量-反映关系. Robidoux 等^[35]发现, 当 2, 4, 6 三硝基甲苯 (TNT) 在 $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 爱胜蚓 (*Eisenia andrei*) 的 NRR 开始降低. 2-氯乙酰胺也有类似的效应. Eason 等^[16]报道了苯并(a)芘 (BaP) 在 $20 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 爱胜蚓的 NRR 随剂量增加而呈明显下降趋势.

溶酶体生物标志物在土壤污染诊断方面具有如下特点: 1) 供试生物为蚯蚓, 具有来源广泛、易于管理的优点, 在污染生态和毒理监测方面应用广泛; 2) NRR 指标可广泛应用于土壤有机无机污染诊断. 该指标时间检测尺度小, 不易受自然气候条件以及诸多因素变化的影响, 具有较为明显的剂量-效应关系, 在环境风险评价和土壤监测中具有稳定性和准确性^[44]; 3) 同其它指标相比, NRR 指标对污染物敏感因而可作为早期预警生物标志物^[13, 33].

3 胁迫蛋白 (Stress protein)

胁迫蛋白又称热激蛋白 (Heat shock protein Hsp), 是由一系列不同分子量的蛋白谱系组成. 最初发现于果蝇, 由于升高温度的刺激而产生^[45], 随后发现, 这类蛋白亦可由化学物质以及组织伤害, 病菌感染等诸多因素诱发. 尽管它不具有特异性, 但是作为生物标志物仍受到重视^[26, 27]. 其中较为广泛利用的生物标志物是 Hsp70 ($66 \sim 78 \text{ kDa}$) 和 Hsp60 ($58 \sim 60 \text{ kDa}$).

污染物诱发的胁迫蛋白, 在各类土壤无脊椎动物中的表现各异, 但以线虫作为供试动物较为普遍.

土壤中线虫区系很多, 分布广泛^[4, 8, 25, 46]; 因而胁迫蛋

白作为土壤污染诊断的生物标志物具有良好条件. Kammen-ga 等^[22]研究线虫 (*Plectus acuminatus*) 体内诱发的 Hsp60 与土壤重金属污染的关系, 发现该指标对土壤重金属污染具有敏感性, 随着土壤中 Cd 和 Cu 浓度的增高, 线虫体内 Hsp60 含量亦相应增加. Nadeau 等^[30]研究了正蚓 (*Lumbricus terrestris*) 分别暴露在含有氯乙酰胺、五氯酚和重金属 (Pb、Cd、Cu 和 Hg) 的土壤中. 在污染胁迫下, 蚯蚓中肠组织中相应诱发出 Hsp70, 尽管存在着某些个体差异性, 但是总体上重复性好, 属于敏感的生物标志物. 土壤昆虫弹尾类动物 (*Folsomia candida*) 对二硝基酚类杀虫剂-地类酚 (dinoseb) 的暴露试验表明, 当土壤浓度分别为 10、15 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 实验开始两周后, 诱发的 Hsp70 一般呈增加趋势, 但不同浓度农药处理和重复之间有较大的变异性, 因此在使用这一生物标志物诊断和预报土壤二硝基酚类污染方面尚待进一步研究^[42]. Kohler 等^[24]利用等足类动物 (*Oniscus asellus*) 研究了 Hsp70 对有机污染胁迫的反应, 供试化学品包括苯并(a)芘 (BaP)、四氯二苯 (PCB52)、六氯环己烷 (gamma HCH) 和五氯酚 (PCP) 等 4 种污染物. 结果发现, Hsp70 对 PCP 和 gamma HCH 的污染胁迫比较敏感, 但对另外两种化合物反应迟钝. Pyza 等^[31]开展了蜈蚣 (*Lithobius mutabilis*) 诱发 Hsp70 的研究, 化学品包括不同浓度处理的杀虫剂乐果 (dimethoate) 和洗涤剂直链烷基苯磺酸钠 (LAS), 实验结果表明诱发的 Hsp70 含量与化学污染处理的种类和浓度无明显关系. 田间 Pb 和 Zn 污染地区和对照地区的蜈蚣试验结果表明, Hsp70 与土壤 Pb 和 Zn 污染无关, 而与田间的季节变化有关.

4 金属硫蛋白 (Metallothioneins)

金属硫蛋白是近年来兴起并颇受重视的生物标志物. 金属硫蛋白 (MTs) 是低分子量 ($6 \sim 7 \text{ kDa}$), 富含半胱氨酸的蛋白. 金属硫蛋白具有多种功能, 如维持生物体内必须元素 (如 Zn 和 Cu) 的生理平衡, 并对过量的 Cu、Cd 以及其它有毒元素起到解毒作用. 研究发现, 某些动物体内的金属硫蛋白含量随污染胁迫发生而提高, 从而为其作为生物标志物提供了可能. 该生物标志物的供试动物主要为腹足动物纲的软体动物如蜗牛和蛞蝓. Berge 等^[3]发现, 在短时间饲养含镉食物后, 蜗牛 (*Helix pomatia*) 肠的金属硫蛋白含量由 $300 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (组织湿重) 增加到 $750 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. 用蚯蚓作为供试动物的研究发现, 在实验室条件下, Cd 的暴露使得蚯蚓体内金属硫蛋白含量大幅度增加, 从而结合了高达 65% 进入体内组织的 Cd^[18]. 金属硫蛋白以不同的同分异构体形式存在, 不同的同分异构体可以反映不同重金属的胁迫^[2, 9-11, 17].

金属硫蛋白以陆栖腹足动物中的蜗牛和蛞蝓为供试动物, 可以对多种重金属污染胁迫作出诊断. 由于诱发的金属硫蛋白积累在腹足动物的肠中, 具有较长的保留时间. 其浓度不仅可以反映急性毒性、污染物长期作用的动态过程和累积情况, 还可以反映该动物对污染物胁迫的解毒机理与解毒容量. 因而该生物标志物具有多功能性^[12]. 除陆栖腹足动物

外,土壤中弹尾目昆虫(*Orchesella cincta*)中的金属硫蛋白也可作为重金属暴露的生物标志物^[21]。

4 应用前景

土壤无脊椎动物生物标志物在污染生态和毒理学的研究及应用方面,比水生生物的生物标志物的研究起步较晚^[14,15,36,37],亦不如植物性生物标志物应用的广泛^[28,29,49,51]。但由于这类生物标志物对某些特定污染物的敏感性、剂量-反应关系的准确性以及对复合污染评价的综合性,因而具有良好的应用前景。

在上述生物标志物的种类方面,溶酶体膜稳定性 NRR 的测定技术成熟,方法简便,适用于有机和无机污染物诊断,且较少受其它因素干扰。胁迫蛋白 Hsp70 和 Hsp60 易受各种环境因素的影响,在实验过程和样品制备方面需要进行改进,对测定结果要进行多元回归分析,以保证数据的可靠性。金属硫蛋白适用于土壤重金属污染诊断,具有很强的特异性。此外,土壤无脊椎动物其他的生理生化指标,如蚯蚓体内的组氨酸(histidine)也可能具有生物标志物的功能。

在供试动物方面,蚯蚓作为溶酶体生物标志物的供试动物适用于实验室和野外应用。Hsp70 和 Hsp60 标志物在野外研究多用线虫、腹足动物和弹尾类昆虫作为供试动物,在实验室条件下还可包括蚯蚓、原生动物。金属硫蛋白在野外研究中选择腹足动物,在实验室条件下还可包括线虫和蚯蚓等。总之,蚯蚓往往作为首选动物,其次是腹足动物和土壤昆虫等。

参考文献

- Behnisch PA, Hosoe K, Sakai S. 2001. Combinatorial bio/chemical analysis of dioxin and dioxin-like compounds in waste recycling, feed/food, humans/wildlife and the environment. *Environ Int*, **27**(6): 441~442
- Berger B, Hunziker PE, Hauer CR, et al. 1995. Mass spectrometry and amino acid of two cadmium-binding metallothionein isoforms from the terrestrial gastropod *Arianta arbustorum*. *Biochem J*, **311**(3): 951~957
- Berger B, Dallinger R, Thomaser A. 1995. Quantification of metallothionein as biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods. *Environ Toxicol Chem*, **14**(5): 781~791
- Bongers T, Ilijev Makulec K, Ekschmitt K. 2001. Acute sensitivity of nematode taxa to CuSO₄ and relationships with feeding-type and life-history classification. *Environ Toxicol Chem*, **20**(7): 1511~1516
- Booth LH, O'Halloran K. 2001. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem*, **20**(11): 2494~2502
- Booth LH, Heppelthwaite VJ, Webster R, et al. 2001. Lysosomal neutral red retention time as a biomarker of organophosphate exposure in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*: Laboratory and semi-field experiments. *Biomarkers*, **6**(1): 77~82
- Cikutovic MA, Fitzpatrick LC, Goven AJ, et al. 1999. Wound healing in earthworms *Lumbricus terrestris*: A cellular-based biomarker for assessing sublethal chemical toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol*, **62**(4): 508~514
- Cioci L K, Qiu L, Fredman QH. 2000. Transgenic strain of the nematode *Caenorhabditis elegans* as biomonitors of metal contamination. *Environ Toxicol Chem*, **19**(8): 2122~2129
- Dabrio M, Rodriguez AR, Bordin G, et al. 2002. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J Inorg Biochem*, **88**(2): 123~134
- Dallinger R. 1994. Invertebrate organisms as biological indicators of heavy metal pollution. *Appl Biochem Biotechnol*, **48**(1): 27~31
- Dallinger R. 1996. Metallothionein research in terrestrial invertebrates: Synopsis and perspectives. *Compar Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **113**(2): 125~133
- Dallinger R, Wang Y, Berger B, et al. 2001. Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail, *Helix pomatia*. *Eur J Biochem*, **268**(15): 4126~4133
- den Besten PJ, Tuk CW. 2000. Relation between responses in the neutral red retention test and the comet assay and life history parameters of *Daphnia magna*. *Mar Environ Res*, **50**(1~5): 513~516
- Downs CA, Dillon RT, Fauth JE, et al. 2001. A molecular biomarker system for assessing the health of gastropods (*Ilyanassa obsoleta*) exposed to natural and anthropogenic stressors. *J Exp Mar Biol Ecol*, **259**(2): 189~214
- Dunlap DY, Matsumura F. 1997. Development of broad spectrum antibodies to heat shock protein 70s as biomarkers for detection of multiple stress by pollutants and environmental factors. *Ecotoxicol Environ Saf*, **37**(3): 238~244
- Eason CT, Svendsen C, O'Halloran K, et al. 1999. An assessment of the lysosomal neutral red retention test and immune function assay in earthworms (*Eisenia andrei*) following exposure to chlorpyrifos, benzo-a-pyrene (BaP), and contaminated soil. *Pedobiologia*, **43**(6): 641~645
- Gehrig PM, You C, Dallinger R, et al. 2000. Electrospray ionization mass spectrometry of zinc, cadmium, and copper metallothioneins: Evidence for metal-binding cooperativity. *Protein Sci*, **9**(2): 395~402
- Gruber C, Sturzenbaum S, Gehrig P, et al. 2000. Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein. (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*. *Eur J Biochem*, **267**(2): 573~582
- Gupta SK. 2000. Neutral red retention by earthworm coelomocytes: A biomarker of cadmium contamination in soil. *Biomed Environ Sci*, **13**(2): 117~121
- Harreus D, Kohler H, Weeks JM. 1997. Combined non-invasive cell isolation and neutral-red retention assay for measuring the effect of copper on the Lumbricid *Aporrectodea rosea* (Savigny). *Bull Environ Contam Toxicol*, **59**(1): 44~49
- Hensbergen PJ, Nugroho RA, Donker MH, et al. 2000. Metallothionein bound cadmium in the gut of the insect *Orchesella cincta* (Collembola) in relation to dietary cadmium exposure. *Comparative Biochem Phys*, **125**(1): 17~24
- Kammenga JE, Oude-Breuil WJM, Arts MSJ. 1998. HSP60 as potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*. *Arch Environ Contam Toxicol*, **34**(3): 253~258
- Kille P, Sturzenbaum SR, Galay M, et al. 1999. Molecular diagnosis of pollution impact in earthworms: Towards integrated biomonitoring. *Pedobiologia*, **43**(6): 602~607
- Köhler H, Knodler C, Zanger M. 1999. Divergent kinetics of hsp70 induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (BaP, PCB52, gamma-HCH, PCP): Suitability and limits of a biomarker. *Arch Environ Contam Toxicol*, **36**(2): 179~185
- Liang W-J (梁文举), Shi Y (史奕), Steinberger Y. 2000. Research progress of nematode diversity in agroecosystem. *Chin J Appl Ecol (应用生态学报)*, **11**(supp.): 113~116 (in Chinese)
- Lewis S, Handy RD, Cordi B, et al. 1999. Stress proteins (HSP's): Methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, **8**(5): 351~368
- Lewis S, Donkin ME, Depledge MH. 2001. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquat Toxicol*, **51**(3): 277~291
- Liu W (刘宛), Li P-J (李培军), Zhou Q-X (周启星), et al. 2001. The research progress of plant cytochrome P450 enzymes and

- their relationship with xenobiotics. *Techniq Equip Environ Poll Contr*(环境污染治理技术与设备), **2**(5):1~9(in Chinese)
- 29 Liu W(刘宛), Sun T-H(孙铁珩), Zhou Q-X(周启星), et al. 2002. Chlorobenzene-stressing injury of the germination of soybean seed. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **13**(2):141~144(in Chinese)
- 30 Nadeau D, Corneau S, Plante I, et al. 2001. Evaluation for Hsp70 as biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress Chaperones*, **6**(2):153~163
- 31 Pyza E, Mak P, Kramarz P, et al. 1997. Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. *Ecotoxicol Environ Saf*, **38**(3):244~251
- 32 Reinecke SA, Reinecke AJ. 1999. Lysosomal response of earthworm coelomocytes induced by long-term experimental exposure to heavy metals. *Pedobiologia*, **43**(6):585~593
- 33 Reinecke SA, Helling B, Reinecke AJ. 2002 Lysosomal responses of earthworm (*Eisenia fetida*) coelomocytes to the fungicide and relation to life-cycle parameters. *Environ Toxicol Chem*, **21**(5):1026~1031
- 34 Riveros A, Zuniga M, Hernandez A, et al. 2002. Cellular biomarkers in native and transplanted populations of the mussel *Perumytilus purpuratus* in the intertidal zones of San Jorge Bay, Antofagasta, Chile. *Arch Environ Contam Toxicol*, **42**(3):303~312
- 35 Robidoux PY, Svendsen C, Sarrazin M, et al. 2002. Evaluation of tissue and cellular biomarkersto assess 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) exposure in earthworms: Effects-based assessment in laboratory studies using *Eisenia andrei*. *Biomarkers*, **7**(4):306~321
- 36 Schmidt H, Postthaus H, Busato A, et al. 1998. Transient increase in chloride cell number and heat shock protein expression (hsp70) in brown trout (*Salmo trutta fario*) exposed to sudden temperature elevation. *Biol Chem*, **379**(10):1213~1215
- 37 Scofield E, Bowyer RT, Duffy L K. 1999. Baseline level of Hsp70, a stress protein and biomarker, in halibut from the Cook Inlet region of Alaska. *Sci Total Environ*, **226**(1):85~88
- 38 Scott-Fordsmand JJ, Weeks JM, Hopkin SP. 1998. Toxicity of nickel to the earthworm and the applicability of the neutral red retention assay. *Ecotoxicology*, **7**(5):291~295
- 39 Scott-Fordsmand JJ, Weeks JM, Hopkin SP. 2000. Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Annelida), using neutral-red retention assay. *Environ Toxicol Chem*, **19**(7):1774~1780
- 40 Scott-Fordsmand JJ, Weeks JM. 2000. Biomarkers in earthworms. *Rev Environ Contam Toxicol*, **165**:117~159
- 41 Spurgeon DJ, Svendsen C, Rimmer VR. 2000. Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environ Toxicol Chem*, **19**(7):1800~1808
- 42 Staempfli C, Becker-Van Slooten K, Tarradellas J. 2002. Hsp70 instability and induction by a pesticide in *Folsomia candida*. *Biomarker*, **7**(1):68~79
- 43 Svendsen C, Weeks JM. 1997. Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure I. Link to ecological effects in a laboratory study with *Eisenia andrei*. *Ecotoxicol Environ Saf*, **36**(1):72~79
- 44 Svendsen C, Weeks JM. 1997. Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure II. Validation and applicability under field conditions in a mesocosm experiment with *Lumbricus rubellus*. *Ecotoxicol Environ Saf*, **36**(1):80~88
- 45 Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. 1974. Protein synthesis in the salivary glands of *D. melanogaster* relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, **84**:389~398
- 46 Urzelai A, Pastor J, Hernandez AJ. 2000. Biotic indices based on soil nematode communities for assessing soil quality in terrestrial ecosystems. *Sci Total Environ*, **247**(2~3):253~261
- 47 Walker CH. 1995. Biochemical biomarkers in ecotoxicology-some recent developments. *Sci Total Environ*, **171**:189~195
- 48 Wang H-L(王海黎), Tao S(陶澍). 1999. Application of biomarkers in aquatic environmental research. *Chin Environ Sci*(中国环境科学), **19**(5):421~426(in Chinese)
- 49 Wang X, Sun C, Gao S, et al. 2001. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosphere*, **44**(8):1711~1721
- 50 Weeks JM, Svendsen C. 1996. Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: A simple biomarker of exposure to soil copper. *Environ Toxicol Chem*, **15**(10):1801~1805
- 51 Xu H-X(许华夏), Li P-J(李培军), Liu W(刘宛), et al. 2002. Research process of cytochrome P450 in organisms. *Agror Environ Prot*(农业环境保护), **21**(2):188~191(in Chinese)

作者简介 李培军,男,1950年生,研究员,博士生导师,主要从事污染生态学和生态环境工程及生态毒理学方面的研究,发表论文70余篇。E-mail:Lipeijunzh@sina.com
