

综述与专论

## 蚯蚓生物标志物在土壤重金属污染评价中的应用

曾燕燕<sup>1</sup>, 袁涛<sup>2</sup>, 申屠佳丽<sup>1</sup>, 沈东升<sup>1</sup>

(1 浙江工商大学环境科学与工程学院, 浙江杭州 310035;

2 浙江舟山市定海区环保局, 浙江舟山316000)

**摘要:**随着土壤重金属污染的加剧,单纯的化学分析方法已不能真实地判别出重金属是否会对环境产生不利影响,因此需要建立有效的生物评价体系来辅助评价。蚯蚓广泛分布于土壤中并处于食物链的底部,其生化指标的变化对重金属污染起到早期预警作用,已被广泛应用到土壤重金属污染评价中。本文简要概述了蚯蚓生物标志物的发展,着重阐述了几种重要的生物标志物(抗氧化酶系统、金属硫蛋白、基因表达),来评价土壤重金属污染水平及作用机理,并对未来的蚯蚓生物标志物研究和展望进行展望。

**关键词:**土壤;重金属污染;蚯蚓;生物标志物

中图分类号:X53

文献标识码:B

文章编号:1006-8759(2013)02-0009-05

### ASSESSING HEAVY METAL CONTAMINATION WITH EARTHWORM BIOMARKERS

ZENG Yan-yan, YUAN Tao, SHENTU Jia-li, SHEN Dong-sheng

(1. Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035;

2. Environmental protection bureau of Dinghai district zhoushan city, zhoushan 316000)

**Abstract:** As the increasing heavy metal contamination in soil, risk assessment of heavy metal should not only be based on the chemical analysis, which could not truly distinguish whether heavy metal was harmful to the environment. Thus, biological assessment system should be established to evaluate the risk caused by heavy metal pollution. Earthworms are widely spread in the soil ecosystem and at the bottom of food chain. The changes in earthworm biochemical could be applied as earlier indicators to discern heavy metal pollution. In this paper, the history of biomarkers and some kinds of earthworm biomarkers (e.g. antioxidant enzymes, metallothionein and gene expression) were discussed on heavy metal assessment and its action mechanism. Besides, the further study of earthworm biomarker was pointed.

**Keywords:** soil; heavy metal; earthworm; biomarkers

### 1 引言

土壤是生态系统的有机组成部分,是人类赖以生存和发展的基础。随着科学技术的进步和工业的发展,进入到土壤环境中的污染物,不论是总量还是种类都在持续不断的增加,如农药、多氯联

苯、重金属等。这些污染物具有致癌、致畸、致突变的特性,以及在环境中具有持久性,不仅可在土壤等介质中累积,而且也可在生物体内积累并通过食物链威胁人体健康。重金属不论是污染水体还是大气,最终都会回归土壤,造成土壤污染,成为土壤中长期存在的“毒瘤”。大量研究表明我国土壤重金属污染尤为严重,其来源主要有工业废水、城市垃圾、污水灌溉、汽车尾气、工业废弃物堆放等。据统计,目前我国受镉、砷、铬、铅等重金属污染的耕地面积将近 2000 万  $\text{hm}^2$ ,全国每年因重金

收稿日期:2012-12-26

基金项目:杭州市环境保护科研计划“典型农用土壤环境质量安全监测评价体系构建”(2011008);浙江省新苗人才计划“土壤重金属铅污染的蚯蚓分子标记物研究”(2012R408066)

第一作者简介:曾燕燕(1990-),女,1990年生,浙江玉环人,硕士研究生,主要从事土壤污染评价与生态毒性领域研究。

属污染的粮食高达 1 200 万 t, 每年因此损失至少 200 亿元<sup>[1]</sup>。因此, 土壤重金属污染仍是今后所要面对的一个至关重要的问题, 而定期监测土壤中的重金属, 也显得尤为重要。近年来, 国际组织和环境保护部门都一致认为单独的重金属含量检测不能预示有害物质对生态系统的真实效应<sup>[2]</sup>。因此, 污染土壤的生态安全评价和早期预警研究在国际上受到了高度的重视, 其中建立一种土壤生物早期预警风险评价体系具有重要的现实意义。

土壤污染检测诊断方法包括化学监测方法、传统毒理学分析方法、实验室毒性生物测定等方法。其中, 化学监测方法虽然能对环境或生物体内的污染物含量进行定量描述, 但仅凭含量无法反应污染物对生物的毒性效应<sup>[3]</sup>。实验室内进行的毒性生物测定会因实验条件和生物种类的限制, 难以真实反映污染物在实际环境中的生物毒性。传统的毒理学分析方法大都局限于检测单一的污染物, 但存在于自然环境中的许多污染物具有含量低, 体系复杂, 相互混合等特点, 而要检测和评价其对生物的遗传毒性效应, 需结合生态毒理学和化学方法进行评价<sup>[4]</sup>。由于以上这些方法具有一定的局限性, 近年来以快速、简便、灵敏为目的的遗传毒性检测方法正在广泛地开展, 而生物标记物研究则是其中研究的热点之一<sup>[5]</sup>。

所谓生物标志物, 是指通过测定直接或间接与环境暴露相关的生物机体在生理生化、细胞、行为、能量、代谢及分子等水平上的变化<sup>[4]</sup>。即: 生物标记物是衡量环境污染物的暴露—效应的生物反应。近年来, 多数学者对土壤中的无脊椎动物进行研究, 通过利用土壤无脊椎动物中的一些生物标志物来评价土壤环境中污染物的污染水平和生态风险。其中细胞或分子水平上的生物标志物作为早期预警指标而受到广泛的关注, 并成为国内外生态毒理学研究的热点之一<sup>[6]</sup>。周启星等人<sup>[7]</sup>的研究表明, 土壤无脊椎动物—蚯蚓在重金属胁迫的作用下表现出等级性, 随着土壤中重金属含量的增加, 蚯蚓的反应也是逐级增强的。不论重金属对蚯蚓的毒性作用有多复杂和严重, 其最早期的作用必然开始于生物个体的分子水平上。

不同于生物标志物从细胞或分子水平上进行研究, 早期土壤生态系统风险评价主要集中在土壤生物的个体死亡率  $LC_{50}$ 、生长速率、种群密度、群落结构、性别比例等水平上。该水平上的研究虽

能直观、真实地反应污染物对个体或整体生态系统的影响, 但当生物的生长、繁殖受阻, 甚至发生死亡后, 最终会破坏生态系统的平衡, 这种个体或系统水平上的研究就难以对污染物进行早期预警。因此, 利用生物标志物评价污染物在亚细胞或分子水平上的影响对于生态毒理评价具有重要的作用, 并且通过生物标志物能够表征土壤环境中某些特定污染物的暴露效应, 作为早期预警系统对土壤污染进行监测。

## 2 蚯蚓生物标志物的研究方法

蚯蚓广泛分布于陆地生态系统中, 占土壤生物量的 60~80%, 被视为是土壤动物区系的代表而被国内外多数学者采用, 作为土壤生态风险评价的模式生物来指示和检测土壤污染。蚯蚓在陆地生态系统中也发挥着重要的作用, 主要表现在改善土壤通透性等物理性状、促进土壤氮磷等养分循环与释放等方面。此外, 从生态学上来看, 蚯蚓属于陆栖无脊椎动物, 结构简单, 容易采集, 对污染物具有一定的耐性, 且处于陆地生态食物链的最底层, 对多数污染物比其他土壤动物敏感。因此蚯蚓十分便于研究和监测工作的进行, 可作为一种早期预警生物, 用来评价土壤污染状况和土壤环境质量<sup>[8]</sup>。

蚯蚓处于陆地食物链的底部, 是重金属最直接的受害者, 通过吸收将土壤中的重金属富集于体内, 进而通过食物链进行传递。蚯蚓可通过以下两种途径进行富集, 即被动扩散和摄食作用。被动扩散是指土壤中的重金属等污染物通过体表进入蚯蚓体内, 而摄食作用主要是指蚯蚓通过吞食污染土壤, 而将重金属等污染物富集于内脏器官中。利用蚯蚓生物标志物进行土壤生态风险评价, 最常用的方法是利用单一的蚯蚓物种进行毒性试验研究, 包括实验室染毒试验和田间试验。其中 OECD 将蚯蚓的实验室毒性研究进行标准化, 选用赤子爱胜蚓作为标准物种<sup>[9]</sup>。标准规定蚯蚓实验室染毒分为两种方法, 即为滤纸接触法和人工土壤法。通过这两种方法可以筛选出可行敏感的生物标志物, 为田间试验的进行和真实环境污染状况的评价奠定基础。其中, 滤纸接触法是通过成年赤子爱胜蚓在装有滤纸的玻璃瓶中与不同浓度梯度的化学品接触后来测定死亡率, 实验时间通常为 24 h 或 48 h。该方法具有快速、简便易行、用

药量少等优点,但也存在缺点,即仅能给出蚯蚓通过皮肤接触所产生的毒性信息,很难评估污染物在真实环境的影响。相对于滤纸接触法,人工土壤法的实验时间更长为 14 d,通过配置人工土壤尽可能模拟一个蚯蚓生活的真实环境,从而使试验结果尽可能真实的反应去染污在自然环境中的实际影响。

### 3 蚯蚓生物标志物评价土壤重金属污染

#### 3.1 利用抗氧化酶系统评价重金属污染水平

有研究表明重金属离子影响或阻断呼吸链、电子传递链、酶促反应等体内正常生理代谢,导致活性氧自由基增加,从而诱导抗氧化酶类活性增加。这些抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)等。抗氧化防御系统在参与活性氧的清除及机体的保护性防御反应中发挥了巨大的作用,对污染物的胁迫相当敏感,抗氧化酶活性的改变可以间接反映环境中有毒有害物质的存在,是分子水平上预报污染物对生态系统危害的敏感生物标记物。因此,抗氧化酶被作为指示环境污染的早期预警,近年来,尝试以这些抗氧化防御系统成分的变化作为污染胁迫的生物标记物研究,正在成为生态毒理学研究领域新的热点,并已被应用于评价和监测污染物对陆生生态系统内生物的毒性效应<sup>[6]</sup>。

超氧化物歧化酶(SOD)是最先与活性氧自由基作用的酶,是抗氧化应激酶系中一种重要的金属酶,它将超氧阴离子( $O_2^-$ )歧化为  $H_2O_2$  和  $O_2$ ,使过氧化氢酶(CAT)或过氧化物酶(POD)又可继续分解  $H_2O_2$ ,从而降低体内  $H_2O_2$  的浓度。SOD 作为生物体内一种以自由基为底物的酶,在清除氧自由基及保护机体免受氧化损伤方面具有重要作用。王晓蓉<sup>[6]</sup>等利用蚯蚓生物标志物来研究铅污染土壤,证明了低浓度促进、高浓度抑制 SOD 的活性。此外,赵学兰<sup>[10]</sup>还详细研究了温度、pH 值等因素对蚯蚓 SOD 活性的影响。

谷胱甘肽-S-转移酶作为第二阶段的解毒酶,可以催化污染物与谷胱甘肽(GSH)结合,生成极性的小分子物质,从而减轻污染物的毒害。研究发现<sup>[11]</sup>,Cu 在低于我国现行行业渔业水质标准时( $0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),就能对 GST 产生显著的诱导,表明 GST 对 Cu 反应敏感,有潜力成为指示 Cu 污染

的生物标志物。同时,杨晓霞<sup>[12]</sup>等研究了亚致死剂量 Cu 对蚯蚓 GST 活性的影响,结果表明 GST 对污染物 Cu 的响应模式为无显著变化→诱导→抑制,显著变化出现在 21d 染毒后。此外,许多学者还发现了铅、锌等重金属也能诱导蚯蚓体内 GST 的活性<sup>[13,14]</sup>。

过氧化氢酶(CAT)是一种酶类清除剂,能和谷胱甘肽过氧化物一起,分解 SOD 所产生的  $H_2O_2$ ,从而减轻机体的氧化损伤。多数研究表明,CAT 活性会随着重金属污染的上升而增强。宋玉芳等<sup>[12]</sup>也证明了 Cu 对蚯蚓产生了低浓度促进、高浓度抑制的现象。因此,CAT 活性的增加可以指示土壤重金属污染水平。

虽然抗氧化酶对重金属胁迫非常敏感,但却出现了在不同实验室和野外研究中产生不同结果的现象。Van der Oost<sup>[15]</sup>总结了 20 多个实验室的研究结果,发现 SOD 在污染胁迫下做出的响应并不都一致,60%多的实验室发现 SOD 活性并未发生变化,而 20%的实验室发现 SOD 产生诱导现象。对 CAT 的研究,有超过 50%的实验室未发现 CAT 活性发生显著变化。因此将 SOD、CAT 等抗氧化酶作为早期预警指标,需要考虑相关的环境因素诸如温度、溶解氧等的影响,因为环境的差异可能会导致酶活性的变化。

#### 3.2 利用金属硫蛋白评价重金属污染水平

重金属除了影响蚯蚓体内抗氧化酶活性的变化,同时也会引起蚯蚓蛋白水平的改变,其中金属硫蛋白的变化与重金属污染密切相关。金属硫蛋白(metallothionein, MT)的化学名称为金属硫组氨酸三甲基内盐,是一类普遍存在于生物体内的低分子量(6~7 kDa)、富含半胱氨酸、热稳定性、可诱导型非酶蛋白<sup>[16]</sup>。其中,MT 的最主要的特点是在转录水平上易被环境中的重金属所诱导,且与重金属浓度具有相关性,可以反映环境中的重金属污染水平。因此,通过监测蚯蚓体内 MT 含量变化,可预测重金属在土壤中的暴露情况及污染压力。目前,MT 作为重金属污染生物标记物的研究已逐渐成为环境科学、生物医学等研究领域的热点<sup>[17]</sup>。许多学者都证实了重金属能诱导金属硫蛋白在 mRNA 及蛋白质等水平上的表达<sup>[18,19]</sup>。Mason 等<sup>[19]</sup>也研究发现了 MT 能够发挥其生物解毒机制,调节重金属离子在细胞内的浓度,避免有害重金属对机体产生的潜在毒性。此外,还有研究报道,

金属硫蛋白也具有抵御氧化物损伤<sup>[20]</sup>的作用,重金属诱导合成的 MT 也可清除体内的自由基,使机体具有一定的氧化耐受性。

### 3.3 利用遗传毒性评价重金属污染水平

对重金属进行遗传毒性的研究能够真实的反应重金属所产生的生态风险。DNA 损伤会导致染色体突变、基因链的断裂、基因顺序的改变,最终会对生物体产生一些列的遗传毒性作用的症状<sup>[8]</sup>。单细胞凝胶电泳技术是检测 DNA 损伤常用的技术。单细胞凝胶电泳又称彗星实验,可以灵敏地反应重金属产生的遗传毒性。不同于传统的 Ames 实验,单细胞凝胶电泳技术对重金属离子进行检验时产生的假阴性效率较低。其中重金属产生的毒害越大,电泳图中的条带也会发生显著变化。Rajaguru<sup>[21]</sup>利用了这项技术检测了印度河中污染物所产生的遗传毒性效应,发现底泥中蚯蚓体腔细胞的 DNA 长宽比显著升高。除了检测蚯蚓 DNA 的损伤外,研究基因表达也是重要的一个方向,因为基因表达是蛋白水平监测的有力补充,因此,通过监测特异性基因片段能够有效地诊断土壤重金属污染水平。

在监测特异性基因片段之外,mRNA 水平作为细胞活性的一个缩影,也可用来评价土壤重金属污染水平。而目前,对于 mRNA 水平上应激反应的基因表达及翻译调控研究很少。其中,Zheng 等(2008)发现,蚯蚓体内 mRNA 翻译水平对 PAHs 污染水平的响应比传统指标更敏感,分子水平上的变化是污染物暴露条件下生物体的早期生物标志信号<sup>[22]</sup>。大量实践表明,环境污染导致的繁殖能力的破坏的分子途径可以追溯到排卵激素 Annetocin 基因的表达,1996 年由 Oumi 等<sup>[23]</sup>从蛋白质激素中提取的 Annetocin 基因填补了蚯蚓繁殖的分子学基础。Annetocin 基因是一种和蚯蚓侯爷催产素相关的多肽,是一种繁殖调控基因。Zheng 等<sup>[22]</sup>提出,由苯并(a)芘引发的蚯蚓 Annetocin 基因的超表达可能在很多方面会造成蚯蚓繁殖的干扰,如配子发育、结合体的成熟、幼年蚯蚓的成活率、性成熟等。翻译控制肿瘤蛋白(TCTP)是一种高度保留蛋白,在所有真核生物的 500 多种组织和细胞类型中广泛表达,被认为对细胞生长和分化中具有重要作用<sup>[24]</sup>,同时也是一种致瘤响应基因。污染物会通过促进癌症的发生导致生物体死亡从而来干扰其生殖和发育,因此,

在环境污染物生态风险评价时也应该考虑生殖毒性。

## 4 展望

根据以上所述,酶及基因等水平的蚯蚓生物标志物能在重金属污染中起到早期预警作用,通过蚯蚓生物标志物的灵敏变化,反应重金属污染水平,并揭示重金属对机体的作用机理。当前,蚯蚓生物标志物的研究正朝着实际性和应用性等方面发展。但是在现阶段的研究中,国内工作多数集中在单一重金属和高浓度胁迫的研究上,这显然与实际的土壤生态系统不同。在实际土壤中,重金属往往是多种复合,并且浓度也较低,因此,作为土壤生态风险早期预警系统,蚯蚓生物标志物的研究应以下几个方面进行加强。第一,加强多种金属复合污染的研究;第二,加强重金属亚致死剂量胁迫下长期定位的研究;第三,加强各生物标志物相互间的关系研究,并运用多种生物标志物来综合指示土壤重金属污染;第四,将室内研究与野外真实土壤环境相结合,加强蚯蚓生物标志物在野外真实环境中的早期诊断研究;第五,加强重金属对蚯蚓机体的微观致毒机理研究,揭示重金属的作用机理。

## 参考文献

- [1] 刘宛,李培军,周启星,等.污染土壤的生物标记物研究进展[J].生态学杂志,2004,23(5):150~155.
- [2] Cajarville MP,Bebianno MJ,Blasco J,et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula;a practical approach[J].Science of the Total Environment,2000,247(2-3):295~311.
- [3] Wang HL,Tao S. Application of biomarkers in water environment [J]. China Environ Sci,1999,19(5):421~426.
- [4] 刘宛,李培军,周启星,等.环境污染条件下生物体内 DNA 损伤的生物标记物研究进展[J].应用与环境生物学报,2005,11(2):251~255.
- [5] Theodorakis CK. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment [J]. Ecotoxicology, 2001, 10(4): 245~256.
- [6] 王秋丽.利用蚯蚓生物标记物研究铅污染土壤[M].南开大学,2007.
- [7] 宋玉芳,周启星,等.土壤重金属污染对蚯蚓的急性毒性效应研究[J].应用生态学报,2002,13(2):187~190.
- [8] 陈林华,刘维屏,等.蚯蚓生物标志在农药污染评价中的应用[J].浙江农业学报,2010,22(1):130~134
- [9] OECD Guideline for testing of chemicals NO.207,Earthworm a-

cute toxicity test [S].

[10] 赵学兰. 蚯蚓超氧化物歧化酶理化性质及其提取条件的研究[D].天津:天津师范大学,2006.

[11] 王晓蓉,罗义,等.分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评估中的应用[J].环境化学,2006,25(3):320~325.

[12] 杨晓霞,张薇,曹秀凤,等.亚致死剂量铜对蚯蚓P450酶和抗氧化酶活性的长期影响[J].环境科学学报,2012,32(3):745~750.

[13] 刘慧,王晓蓉,王为木,等.低浓度锌及其EDTA配合物长期暴露对鲫鱼肝脏锌富集及抗氧化系影响[J].环境科学,2005,26(1):173~176.

[14] Tuomas Lukkari, Mirka Taavitsainen, Markus Soimasuo, Aimo Oikari, Jari Haimi. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure [J]. Environmental Pollution. 2004, 129, 377~386.

[15] Van der Oost R, Beyer J Vermeulen N P E. Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: a Review [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003, 13: 57~149.

[16] Kagi J H R. Overview of metallothionein [J]. Methods Enzymol, 1991, 205: 613~626.

[17] 陈春,周启星.金属硫蛋白作为重金属污染生物标记物的研究进展[J].农业环境科学学报,2009,28(3):425~432.

[18] 陈春,周启星.金属硫蛋白作为重金属污染生物标志物的研

究进展[J].农业环境科学学报,2009,28(3):425~432.

[19] Mason A Z, Jenkins K D. Metal detoxification in aquatic organisms [M]// Tessier A, Turner D R, (Eds.). Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. John Wiley and Sons Ltd. London. 1995: 479~608.

[20] Covalletto M, Ghezzi A, Burlando B, et al. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus glnioprovincialis* [J]. Comp Biochem Physiol, Part C, 2002, 131(4): 447~455Z.

[21] Rajaguru P, Suba S, Palanivel M, et al. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline Comet assay on fish and earthworm tissues [J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2003, 41(2): 85~91.

[22] Zheng S. L., Song Y. F., Qiu X. Y., et al. Annetocin and TCTP expressions in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to PAHs in artificial soil. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 71: 566~573.

[23] Oumi T., Ukena K., Matsushima O., et al. Annetocin, an annelid oxytocin-related peptide, induces egg-laying behavior in the earthworm, *E. fetida*. J. Exp. Zool., 1996, 276: 151~156.

[24] Bommer U.A., Thiele, B.J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). Int. J. Biochem. Cell B., 2004, 36: 379~385.

(上接第 3 页)

展缓慢的主要原因是地方政府和公众的利益难以协调,根本原因是核电发展与放射性废物管理的国家职能的割离、核电发展经济效益与环境代价的割离,以及对放射性废物安全缺乏社会共识,因此应在选址规划中处置场所在区域进行经济和政策补偿,并将废物处置规划应列入核电厂规划中作为先决条件考虑,同时开展处置安全公众可接受性和处置决策方法的研究。

(2) 建立独立的放射性固体废物处置公司。目前国内的废物处置单位都属于某个核电集团单位,不利于从国家层面对固体废物处置工作进行统筹规划和实施。应建立独立于核电单位的放射性固体废物处置公司,并从法律上明确其作为放射性固体废物处置国家责任的实施者。

(3) 建立和完善放射性废物管理资金保证制度。完善的资金保证制度是处置场选址规划得以有效实施的基础,也是促使核电厂将废物送交处置的重要手段。资金应来自于处置费用的预提、废

物暂存保证金(随暂存量增大、暂存时间增加而增加)的预提和罚金等,主要用于废物处置的研发、处置场建造、运行、对当地公众的补偿等活动。建议设立由监管机构、核电主管部门等组成的基金管理委员会和核电单位组成的基金监督委员会,分别负责基金的使用管理和监督。

## 参考文献

[1] 中华人民共和国《乏燃料管理安全与放射性废物管理安全联合公约》第二次国家报告[R].北京,2011.

[2] GB14589-1993. 核电厂低、中水平放射性固体废物暂时贮存技术规范[S].

[3] 罗上庚.放射性废物管理处理与处置[M].中国环境科学出版社,北京,2007.

[4] 中华人民共和国国务院.放射性废物安全管理条例[G].2011-12-20.

[5]《中华人民共和国放射性污染防治法》,2003-06-28.

[6] 中华人民共和国国务院.关于我国中、低水平放射性废物处置的环境政策(国发[1992]45号),1992.