

蚯蚓(*Eisenia fetida*)细胞色素 P450 及抗氧化酶系对环境浓度苯并(a)芘的响应

王 磊^{1,2}, 宋玉芳¹, 张 薇³, 陈 朗^{1,2}, David Freestone⁴, M Leigh Ackland⁴

(1.中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016; 2.中国科学院研究生院, 北京 100049; 3.沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁 沈阳 110161; 4.Centre for Cellular and Molecular Biology, School of Life and Environmental Sciences, Deakin University, Melbourne 3125, Australia)

摘要:以赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为供试生物, 草甸棕壤为供试土壤, 以蚯蚓微体细胞色素 P450 含量、抗氧化酶系以及谷胱甘肽转移酶活性为指标, 进行了土壤中苯并(a)芘[B(a)P]暴露与酶活性的量-效关系研究。结果表明, 在接近沈抚灌区实地污染状况 B(a)P(0.1~2.0 mg·kg⁻¹)暴露下, 第 1、3、7 以及第 14 d 取样时, P450 和 SOD 有较好的响应, SOD 在第 1、3 d 显著升高, 而在第 7、14 d 时降低, P450 总体表现为低浓度 B(a)P 诱导下降低, 高浓度下升高的趋势。CAT、POD 以及 GST 的敏感性相对较差。比照其他 4 个指标, 蚯蚓 P450 的敏感性更为优异, 具有较好的应用前景。指标敏感性总体表现为: P450>SOD>CAT/POD>GST。

关键词: 土壤; 蚯蚓; P450; 抗氧化酶系; 苯并(a)芘[B(a)P]

中图分类号: X503.223 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2009)02-0337-06

Influence of Benzo(a) Pyrene on Cytochrome P450 and Antioxidant Enzymes in Earthworms(*Eisenia fetida*)

WANG Lei^{1,2}, SONG Yu-fang¹, ZHANG Wei³, CHEN Lang^{1,2}, David Freestone⁴, M Leigh Ackland⁴

(1.Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2.Graduated School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3.Department of Soil and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 4.Centre for Cellular and Molecular Biology, School of Life and Environmental Sciences, Deakin University, Melbourne 3125, Australia)

Abstract Earthworms are common in a wide range of soils and are one of the most suitable bioindicator organisms for identifying the presence of chemical pollutants in soils. Analyzing P450 enzyme activities in earthworms is a newly developed practice for soil pollution risk assessment. We investigated the effects of benzo(a)pyrene(B(a)P) at different concentrations and exposure times on the biochemical responses of the Cytochrome P450, superoxide dismutases(SOD), guaiacol peroxidases(POD), catalase(CAT)and Glutathione-S-transferases(GST)in the earthworm(*Eisenia fetida*). Results showed that low concentration of B(a)P(0.1~2.0 mg·kg⁻¹), similar to the real contamination condition of Shenfu irrigation area in Shenyang, caused P450 and SOD to change significantly. SOD increased after the 1st and 3rd day of treatment and decreased after one and two weeks of treatment. P450 generally exhibited a decrease in activity when treated with 0.1 mg·kg⁻¹ B(a)P and increased with higher doses of the pollutant. P450 exhibited a positive dose-response relationship to B(a)P, making it a useful tool for risk assessment work. Change to SOD activities indicated superoxide damage in earthworms. B(a)P caused CAT to change only after 7th days of treatment, indicating a delayed response of CAT. POD also had significant response in the 7th day and this indicated that B(a)P might damage the antioxidase system. In summary, P450 was more sensitive than the other four indicators and more suitable for the diagnosis of soil pollutants. The sensitivity of the indicators could be ranked in order of most to least effective as follows: P450>SOD>CAT/POD>GST.

Keywords soil; earthworm(*Eisenia fetida*); cytochrome P450; antioxidant; Benzo(a)Pyrene(B(a)P)

蚯蚓是土壤中普遍存在的动物, 约占土壤总生物

量的 60%~80%^[1], 蚯蚓通过体表及消化系统的接触, 直接暴露于土壤污染物中, 因此被作为土壤污染的指示生物^[2-3]。化学品生态毒理评价标准方法的建立, 也使得赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)成为最广泛使用的模式供试物种^[4-5]。

苯并(a)芘[B(a)P]具有极强的致癌性以及潜在的内分泌干扰作用, 在大气、土壤与海洋环境中普遍

收稿日期: 2008-03-28

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418503), 国家自然科学基金项目(20777077), 国家高技术研究发展计划 863 项目(2006AA06Z386)

作者简介: 王 磊(1982—), 男, 硕士研究生, 主要从事环境污染生态毒理学研究。E-mail: shengtaisuog@gmail.com

通讯作者: 宋玉芳 E-mail: Songyufang@iae.ac.cn

存在,其生态毒性诊断研究尤为重要。然而,常规的急、慢性毒理指标(如致死率、体重以及产茧量等)仅可对高剂量 B(a)P 污染产生剂量-效应毒性响应,很难对环境中的低浓度 B(a)P 污染的毒性产生指示^[6]。因此,对新的敏感生物标记物的研究成为低剂量 B(a)P 污染生态毒性诊断的必然需求。

细胞色素 P450(CYP)是重要的解毒酶,广泛分布于陆生或水生的微生物直至脊椎动物体内^[7-8]。P450 可以催化大量亲脂性外源物质,起到代谢解毒作用;这种功能决定了其活力可对外源污染物产生响应,低剂量污染物浓度与 P450 含量或活力之间具有显著相关性,这使得利用 P450 酶系指标进行的低剂量 B(a)P 生态毒理诊断成为可能^[9]。将 P450 用于水体的生态毒理研究近年来已有报道^[10-11],然而蚯蚓不同于水生生物,没有可供测试的肝脏,而蚯蚓特有的组织结构所带来的色素干扰阻碍了将 P450 指标应用于土壤污染生态毒理研究中。张薇等通过微粒体增溶、物理分离和解剖内脏等手段实现了蚯蚓微粒体的去干扰纯化,实现了以蚯蚓 P450 含量测定,为将该指标用于土壤低剂量 B(a)P 污染的生态毒理诊断提供了新的方法^[12]。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutases, SOD)、过氧化物酶(Guaiacol peroxidases, POD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和谷胱甘肽转移酶(Glutathione-S-transferases, GST)一直以来就是生态毒理研究的热点,已有大量将其应用于土壤、水体污染诊断的报道,但大多集中在重金属胁迫的响应研究^[13],对有机污染物,特别是低浓度 B(a)P 土壤污染诊断研究则少见报道。

本实验以赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为供试生物,草甸棕壤为供试土壤,以蚯蚓微粒体细胞色素 P450 含量、抗氧化酶系(SOD、POD、CAT)以及 GST 活性为指标,进行了土壤中 B(a)P 暴露与酶活性的量-效关系研究,同时比较了细胞色素 P450 及其他几个指标对于低浓度污染物的敏感性,旨在为低浓度 B(a)P 污染生态毒性诊断提供实验依据,进而为实地土壤的生态毒理诊断提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 药品与溶液配制

B(a)P 购于 Aldrich 公司(德国);牛血清白蛋白与考马斯亮蓝 G-250(分析纯)均购于上海生工;CO 购于沈阳市气体站,纯度 99.99%;其他药品均为市购

分析纯。

20%甘油溶液,0.15 mol·L⁻¹ KCl 溶液,匀浆缓冲液(250 mmol·L⁻¹ 蔗糖,50 mmol·L⁻¹ Tris pH 7.5,1 mmol·L⁻¹ DTT,1 mmol·L⁻¹ EDTA),保存缓冲液(250 mmol·L⁻¹ 蔗糖,50 mmol·L⁻¹ Tris pH 7.5,1 mmol·L⁻¹ DTT,1 mmol·L⁻¹ EDTA,20%甘油)。

1.2 仪器设备

岛津 UV2550 紫外双光束分光光度计;日立 CP.80MX 低温超速离心机,玻璃匀浆器,受控环境生长箱。

1.3 试验土壤和蚯蚓

赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)购自专业实验用蚯蚓供应商(天津)。选用 2~3 月龄,体重 300~500 mg,带有环带的健康蚯蚓供试。土壤采自中国科学院沈阳应用生态所实验站 0~20 cm 表层清洁土壤,理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of test soils

土壤类型	TP/%	TK/%	K-N/%	O-M/%	CEC/cmole·kg ⁻¹	pH
草甸棕壤	0.04	0.18	0.091	1.65	1.226	6.22

注:TP 为总磷,TK 为全钾,K-N 为凯氏氮,O-M 为有机质,CEC 为阳离子交换量。

1.4 土壤染毒试验

将一定浓度的 B(a)P 丙酮溶液与 500 g 土壤(过 1 mm 筛)充分混合,设计 4 种浓度 0.1、0.5、1、2 mg·kg⁻¹ 和 1 个空白对照。静置 48 h 以使丙酮充分挥发,加水至土壤最大持水量的 60%。加入 12 条已在人工条件下饲养 24 h 蚯蚓,置于 20℃±2℃,湿度为 80%的受控环境生长箱中连续光照培养。试验的第 1、3、7、14 d,从各处理组分别取出 2 条蚯蚓进行测定,各组均设 4 个平行样。

1.5 土壤中 B(a)P 的提取与测定

取 2~5 g(过 1 mm 筛)风干染毒土壤加入离心管,加入 25 mL 二氯甲烷超声提取 2 h。提取液以 2 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,上清液于旋转浓缩仪浓缩至 1 mL。浓缩液转至装有 1 g 硅胶的玻璃预柱中,以 1:1 二氯甲烷:正己烷淋洗,接收淋洗液 3 mL。用氮气吹脱至干,乙腈定容至 1 mL,B(a)P 分析采用高效液相色谱紫外检测法^[21]。

1.6 抗氧化酶系活性测定

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定,采用氮蓝四唑法^[14],以 560 nm 下的吸光值计算酶活性,单位为 U·mg⁻¹·pro,以 50%抑制率的酶量为一个酶活力单位。

过氧化物酶(POD)活性测定,采用愈创木酚法^[15],

470 nm 下测定吸光值单位为 $\Delta OD \cdot mg^{-1} \cdot pro \cdot min^{-1}$, 以每分钟吸光度变化值表示酶活力的大小。

过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外吸收法^[16], 以 240 nm 处吸光度变化速度计算活性, 单位 $U \cdot mg^{-1} \cdot pro \cdot min^{-1}$, 以 1 min 内 A240 减少 0.1 的酶量为一个酶活单位。

1.7 蚯蚓内脏 P450 的测定

蚯蚓体内 P450 含量的测定参照张薇、宋玉芳等建立的蚯蚓内脏 P450 测定方法, 应用连二亚硫酸钠还原细胞色素 P450 的 CO 差光谱进行^[12, 17-18]。

1.8 数据分析

利用 SPSS 13.0 对数据进行统计分析。对各组数据进行方差齐性检验, 应用单变量双因素方差分析(Univariate analyses)确定暴露时间和剂量两个因素及其交互作用对蚯蚓 P450 含量的影响。利用多重比较分析(Post-hoc comparison, Tamhane test)对各处理组间的均值进行差异显著性检验。采用污染物暴露剂量为因子, 进行单因素方差分析[One-way ANOVA, Dunnett's t-test(2-sided)]。

2 结果与讨论

2.1 土壤中 B(a)P 的含量测定

对供试土壤样品进行采样, 采用超声提取、高效液相色谱法分析各组土壤中 B(a)P 的实际浓度, 结果见表 2。

表 2 土壤中 B(a)P 的回收率

Table 2 Recovery of amended Benzo(a)pyrene from soil(n=3)

投加浓度/ $mg \cdot kg^{-1}$	回收浓度/ $mg \cdot kg^{-1}$
0.1	0.069
0.5	0.297
1	0.736
2	1.428

2.2 B(a)P 暴露下蚯蚓 P450 含量的诱导响应

由图 1 可见, B(a)P 暴露的第 1、3、7 和 14 d, P450 均在一定程度上产生动态响应。实验第 1 d 在 0.1 和 0.5 $mg \cdot kg^{-1}$ B(a)P 暴露水平下, 蚯蚓 P450 活性有所下降, 而 1~2 $mg \cdot kg^{-1}$ 时明显上升。类似变化在其他几个暴露阶段均有出现, 如第 3 d 0.1 和 0.5 $mg \cdot kg^{-1}$ B(a)P 胁迫下 P450 活性下降, 1~2 $mg \cdot kg^{-1}$ B(a)P 胁迫下 P450 活性明显上升; 第 14 d 0.1 $mg \cdot kg^{-1}$ B(a)P 暴露 P450 活性下降, 其他浓度下 P450 活性明显高于对照, 第 7 d 所有 B(a)P 浓度处理组 P450 活性下

降。但从总的变化趋势看, 诱导效应为主且较为明显。诱导时间对 P450 具有显著影响($P < 0.05$)。P450 最大升幅由第 1 d 的 34%、第 3 d 的 39% 直至增大为第 14 d 时的 88%。

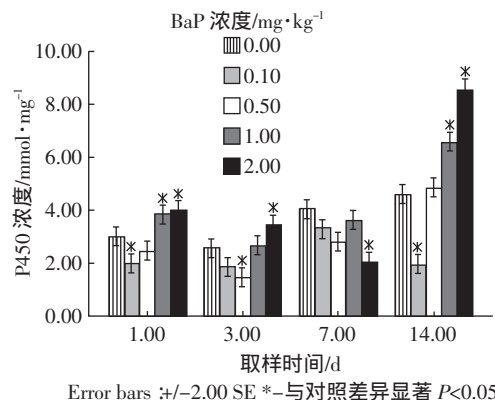


图 1 B(a)P 污染暴露下蚯蚓 CytP450 含量响应

Figure 1 CytP450 contents of earthworm with exposure of Benzo(a)Pyrene

2.3 B(a)P 暴露下蚯蚓谷胱甘肽转移酶(GST)含量的诱导响应

由图 2 可见, 在 B(a)P 的诱导下, 仅在第 7 d 及第 14 d 检测到 GST 活性的变化, 较对照变化幅度最大仅约 10%。

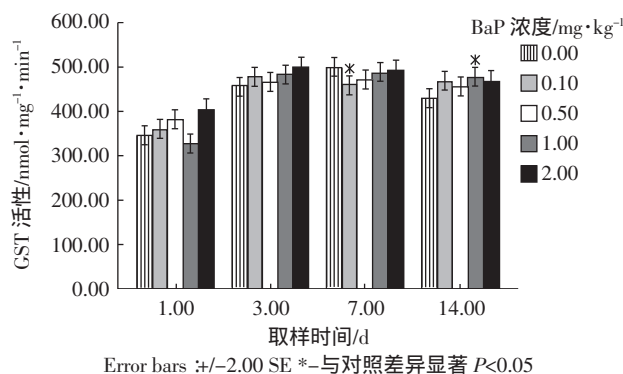
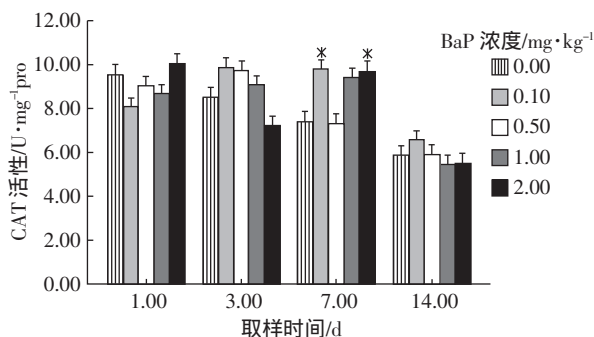


图 2 B(a)P 暴露下蚯蚓谷胱甘肽转移酶(GST)含量的诱导响应

Figure 2 Activities of GST enzyme of earthworm with Benzo(a)Pyrene

2.4 B(a)P 暴露下蚯蚓过氧化氢酶(CAT)含量的诱导响应

图 3 CAT 对 B(a)P 暴露的动态响应可见, 试验的第 1 d 和 3 d, 各处理组 CAT 活性有变化但不显著, 在第 7 d 多个处理组中 CAT 活性较对照显著升高($P < 0.05$)。第 14 d 取样时, 各处理组中 CAT 活性与对照基本相当。



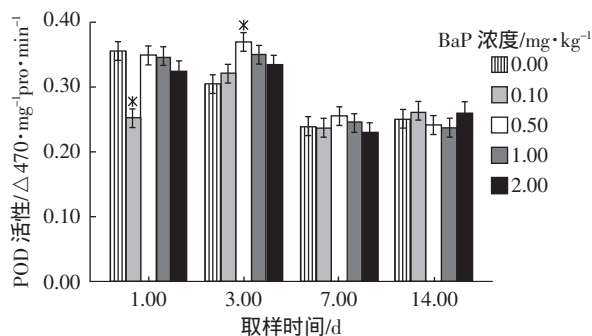
Error bars ± 2.00 SE *—与对照差异显著 $P < 0.05$

图3 B(a)P暴露下蚯蚓过氧化氢酶(CAT)含量的诱导响应

Figure 3 Activities of CAT enzyme of earthworm with Benzo(a)Pyrene

2.5 B(a)P暴露下蚯蚓过氧化物酶(POD)含量的诱导响应

由图4可见 B(a)P胁迫下 POD活性的变化及规律性均不显著,试验的第1d,多数 B(a)P浓度处理组蚯蚓的 POD活性与对照基本相当,仅 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组 POD活性显著降低。第3d时,各处理组蚯蚓 POD活性升高,但升高幅度与 B(a)P浓度不相关,例如, B(a)P为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时 POD酶活性的升幅最大(27%),而 B(a)P为1和 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时 POD酶活性反而有所减少。



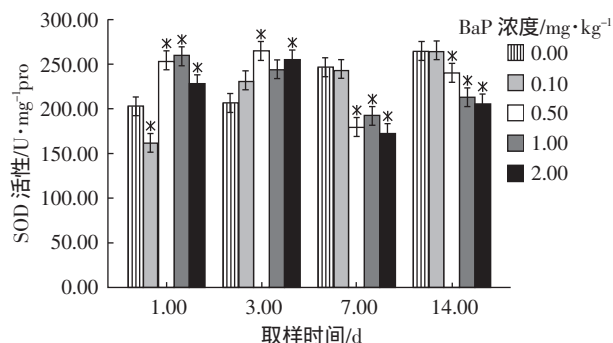
Error bars ± 2.00 SE *—与对照差异显著 $P < 0.05$

图4 B(a)P暴露下蚯蚓过氧化物酶(POD)含量的诱导响应

Figure 4 Activities of POD enzyme of earthworm with Benzo(a)Pyrene

2.6 B(a)P暴露下蚯蚓超氧化物歧化酶(SOD)含量的诱导响应

由图5可见,在 B(a)P胁迫下,蚯蚓体内 SOD产生一定响应,具体表现为:暴露1~3d,除 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ B(a)P处理组外, SOD酶活性整体升高,最大升幅分别为30%和29%,与对照差异显著。随着 B(a)P暴露时间的延长,在第7d和第14d,除 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ B(a)P胁迫下 SOD活性未产生显著变化外, $0.5 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$



Error bars ± 2.00 SE *—与对照差异显著 $P < 0.05$

图5 B(a)P暴露下蚯蚓超氧化物歧化酶(SOD)含量的诱导响应

Figure 5 Activities of SOD enzyme of earthworm with Benzo(a)Pyrene

B(a)P处理组中 SOD酶活性均显著降低($P < 0.05$)。

3 讨论

试验初期测定了土壤中苯并(a)芘的实际浓度,其目的是校正投加量。表2可见,土壤 B(a)P的回收率在59.3%~73.6%之间,这与土壤颗粒对 B(a)P的吸附作用有关。宋玉芳等的研究显示,回收率与多环芳烃的分子量大小有关。分子量较大的5~6环的多环芳烃在土壤中的吸附作用较强,容易形成不可提取性残渣,导致回收率低^[21],这也可能是这类持久性有机污染物难以被降解的原因之一。

由图1中 P450活性的变化趋势可以看出, B(a)P低剂量长期暴露促进了其在蚯蚓体内的解毒代谢作用。这与其他研究的结果相似^[6, 22-23]。郑森林等研究表明, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ B(a)P暴露对蚯蚓 Annetocin前体基因表达均有显著上调作用, B(a)P对蚯蚓生殖的影响比菲、芘、荧蒹更显著^[6]。由图1可见, B(a)P暴露与 P450活性之间存在一定的剂量-效应关系,但总体上波动性较大,规律不十分明显,可以从以下两个方面对本试验结果进行解释。

首先是 B(a)P的溶解度: B(a)P水溶性极低($0.05 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),几乎不溶于水,因此很可能因受试生物个体与土壤中 B(a)P存在接触问题,导致 P450响应的波动;其次, CYP450酶系总指标的波动性表现,可能与30多种同工酶(亚型)对 B(a)P的综合响应趋势不同有关,但在毒理学上,波动性变化是污染物对生物毒性效应的一种反映形式,有助于明确污染物的代谢过程。

由图1可见, 0.1 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 较低浓度 B(a)P胁迫下 P450活性较低,与对照相比降幅较大,以 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ B(a)P胁迫下的值为例,分别为37%、44%和

58% ,而在较高浓度下 ,P450 活性呈现诱导升高的趋势。细胞色素 P450 酶是药物代谢重要的酶系 ,参与各种内源性和外源性化合物在生物体内的代谢过程。因此 ,P450 酶的诱导在某种程度上指示 B(a)P 毒理活性变化的过程。

GST 是研究最广且最为重要的第二阶段酶之一 ,它可催化谷胱甘肽(GSH)和亲电性中间代谢物结合 ,使之成为水溶性化合物排出体外 ,起到解毒的作用 ;还可清除生物体内脂类过氧化物 ,保护生物体免受氧化损伤^[24]。B(a)P 诱导下 ,GST 活性的试验结果(图 2)表明 ,试验条件下 B(a)P 胁迫未造成蚯蚓体内显著的过氧化损伤。其他学者对蚯蚓 GST 与污染物的量效关系研究也表明 ,GST 对污染物的响应不敏感。Saint-Denis 等利用蚯蚓进行的 B(a)P 土壤污染诊断研究显示高浓度 B(a)P 诱导未观察到 GST 活性的显著变化^[25]。其他研究显示 GST 的变化较不规律。Ribera 认为污染物对 GST 活性没有显著影响^[26-27]。也有研究显示 ,GST 活性与受试污染物的响应关系与蚯蚓的采样部位有关^[28]。张薇等曾测定芘污染胁迫下 GST 的活性 ,结果显示 :在 0~0.96 mg·kg⁻¹ 芘污染诱导下 ,GST 在第 3 d 和第 14 d 分别表现出显著的升高或降低趋势 ,但在第 1 d、第 7 d 则与对照无显著差异 ,且变化规律性差^[23]。可见 GST 对 B(a)P 及其他多环芳烃污染物的响应性并不理想。

CAT 可有效清除生物体内过量的过氧化氢 ,维持细胞内过氧化氢平衡。CAT 活性仅在试验的第 7 d 产生显著变化 ,这说明 CAT 活性对低浓度 B(a)P 的响应具有延时性(即第 7 d 开始响应)和阶段性(即第 7 d 前后均无明显响应)。从污染物与生物体内的过氧化氢平衡角度分析可见 ,B(a)P 暴露并未造成蚯蚓体内过氧化氢的大量产生 ,这与先前的报道一致^[25]。张薇等的研究显示 ,蚯蚓 CAT 仅在试验的初期(第 1、3 d)对菲、芘胁迫有显著响应^[22] ,在后期(7、14 d)趋于稳定 ,可见 CAT 活性对不同多环芳烃暴露响应不同。从本试验及其他试验结果比较可见 CAT 对 B(a)P 的指示效应较菲、芘强 ,这一规律与三者的毒性强弱顺序吻合。

张薇的测定结果显示 ,菲、芘暴露下 ,蚯蚓的 POD 酶活性在试验的第 7 d 具有显著响应^[22] ,这与本试验中 POD 在试验第 3 d 呈现显著的诱导趋势略有时差(图 4) ,这证明 B(a)P 对 POD 酶的胁迫毒性效应较菲、芘更强^[23]。

由图 3 和图 4 可见 ,CAT 和 POD 活性在第 3 d

均表现为低浓度 B(a)P 诱导下升高 ,而高浓度下有所降低的趋势(呈现“钟型曲线” ,图 3、图 4)。Gastaldi 认为生物体对污染胁迫的这种响应对亚致死剂量污染物生态毒理诊断具有特别意义^[29]。

SOD 酶是惟一以 O₂ 自由基为底物的抗氧化酶 ,起平衡细胞内活性氧自由基总量 (Reactive Oxygen Species ,ROS)的作用。酶活性的高低基本反映生物体内的抗氧化能力^[30]。图 5 中 SOD 的变化趋势表明 ,B(a)P 可能造成了抗氧化防御酶系的损伤。有研究显示菲、芘及其他污染物胁迫下 ,蚯蚓和鱼的肝脏 SOD 酶活性响应较为敏感 ,且出现先诱导后抑制的趋势^[23] ,这与本试验结果一致^[31-32]。

4 结 论

P450 和 SOD 对 B(a)P 暴露响应较敏感 ,CAT ,POD 以及 GST 的敏感性较差。各指标敏感性总体为 :P450>SOD>CAT/POD>GST。

综合本试验及先前已获得的菲、菲试验结果显示 ,苯并(a)芘暴露的生态毒性大于芘和菲。

继前期进行的蚯蚓 P450 对土壤菲、芘暴露生态毒理研究之后 ,本试验进一步证实蚯蚓 P450 指标对低剂量多环芳烃污染响应的敏感性较好 ,为蚯蚓 P450 作为备选的土壤污染生态毒理诊断指标提供了依据。

参考文献 :

- [1] Bouche A. Earthworm species and ecotoxicological studies[C].//Greig-Smith P W, Becker H, Edwards P J, et al. Ecotoxicology of earthworms. Intercept, Andover, UK, 1992 20-35.
- [2] Didden Wam. Ecology of terrestrial Enchytraeidae[J]. *Pedobiologia*, 1993 37 2-29.
- [3] Van Brummelen T. Distribution and ecotoxicology of PAHs in forest soil[D]. PhD Thesis. University of Amsterdam, 1995.
- [4] OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. Test 207 :Earthworm, acute toxicity tests[R].//Organization for Economic Co-operation and Development(Ed.), OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 1984.
- [5] ISO, Standard number No. 11268-2. Soil quality :effects of pollutants on earthworms(*Eisenia fetida*). Part II. Method for the determination of effects on reproduction[R]. International Standard Organization, Geneva, Switzerland, 1998.
- [6] Zheng S, et al. Annetocin and TCTP expressions in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to PAHs in artificial soil[J]. *Ecotoxicol Environ Safe*, 2007, doi :10. 1016/j. ecoenv. 2007. 10. 025M.
- [7] Hodgson E. Microsomal monooxygenase[C].//Kurkurt GA, Gillbert LI, eds. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology,

11. Oxford Pergamon, 1985: 225–321.
- [8] 邱星辉, 冷欣夫. 棉铃虫幼虫加单氧酶活性的组织分布[J]. 生态学报, 2000, 20(2): 299–303.
- QIU Xing-hui, LENG Xin-fu. The tissue distribution of monooxygenase activities of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) [J]. *Acta Ecologica Sinica*. 2000, 20(2): 299–303.
- [9] Marina Camatini, Patrizia Bonfanti, Anita Colombo, et al. Molecular approaches to evaluate pollutants[J]. *Chemosphere*, 1998, 37(14–15): 2717–2738.
- [10] Aline Y O Matsuo, Evan P Gallagher, Mary Trute, et al. Characterization of phase I biotransformation enzymes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, 2008, 147(1): 78–84.
- [11] Tommy Andersson, Lars Förlin. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish[J]. *Aquatic Toxicology*, 1992, 24(1–2): 1–19.
- [12] Zhang Wei, Song Yu-fang, Sun Tie-heng. Earthworm cytochrome P450 determination and application as a biomarker for diagnosing PAH exposure[J]. *JEM*, 2006(8): 963–967.
- [13] Rajesh Kumar Tewari, Praveen Kumar, Parma Nand Sharma. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants[J]. *Planta*, 2006, 223: 1145–1153.
- [14] Luo Y, Zang Y, Zhong Y. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm, *Eisenia foetida*[J]. *Chemosphere*, 1999, 39(13): 2347–2356.
- [15] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学试验指导[M]. (第三版). 北京: 高等教育出版社, 2003: 123–124.
- ZHANG Zhi-liang, QU Wei-qing. Guidebook of phyto-physiology experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2003: 123–124.
- [16] 徐镜波, 袁晓凡, 郎佩珍. 过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度测定[J]. 环境化学, 1997, 16(1): 73–76.
- XU Jing-bo, YUAN Xiao-fan, LANG Pei-zhen. Ultra spectrom test of superoxide dismutases[J]. *Environmental Chemistry*, 1997, 16(1): 73–76.
- [17] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes[J]. *Journ BioI Chem*, 1964, 239(7): 2370–237.
- [18] 张 薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 蚯蚓细胞色素 P450 生物标记物方法研究[J]. 环境科学, 2006, 27(8): 1636–1642.
- ZHANG Wei, SONG Yu-fang, SUN Tie-heng, et al. Establishment of method for cytochrome P450 of earthworms (*Eisenia fetida*) as a biomarker[J]. *Chinese Journal of Environmental Science* 2006, 27(8): 1636–1642.
- [19] Silvia M Contreras-Ramos, Dioselina A Ivarez-Bernal, Luc Den-dooen. *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 141: 396–401.
- [20] Sverdrup L E, Nielsen T, Krogh P H. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility[J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36: 2429–2435.
- [21] Song Y F, Jing X, Fleischmann S, et al. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments[J]. *Chemosphere*, 2002, 48: 993–1001.
- [22] 张 薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 菲和芘对蚯蚓(*Eisenia fetida*)细胞色素 P450 和抗氧化酶系的影响[J]. 环境化学, 2007, 26(2): 202–206.
- ZHANG Wei, SONG Yu-fang, SUN Tie-heng, et al. Influence of Phenanthrene and Pyrene on cytochrome P450 and antioxidant enzymes in earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. *Environmental Chemistry*, 2007, 26(2): 202–206.
- [23] 张 薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 土壤低剂量芘污染对蚯蚓若干生化指标的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(9): 2097–2103.
- ZHANG Wei, SONG Yu-fang, SUN Tie-heng, et al. Effects of low dosage pyrene pollution on biochemical characters of earthworm (*Eisenia fetida*) in soil [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(9): 2097–2103.
- [24] George S G. Enzymology and molecular biology of phase xenobiotic-conjugating enzymes in fish [C]//Malins DC, Ostrander GK (Eds.), *Aquatic toxicology, molecular, biochemical and cellular perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, 1994: 37–85.
- [25] Saint-Denis, Narbonne J F, Arnaud C, et al. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* andrei exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 1837–1846.
- [26] 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: 1123–1130.
- [27] Nusetti O, Zapata-Vivenes E, Esclapes M M, et al. Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: *Amphinomidae*) exposed to used vehicle crankcase oil [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2005, 48: 509–514.
- [28] Gao Yu-hong, Sun Zhen-jun, Liu Yan-qin, et al. Effect of albendazole anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida* [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2007, 43: S246–S251.
- [29] Laura Gastaldi, Elia Ranzato, Flavia Capri, et al. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia Andrei* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, 2007, 146: 398–405.
- [30] Stefan I Liochev, Askar R Kuchumov, Serge N Vinogradov, et al. Superoxide dismutase activity in the giant hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 330(2): 281–284.
- [31] 冯 涛, 郑微云, 等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏还原型谷胱甘肽含量的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2001, 40(5): 1095–1099.
- FENG Tao, ZHENG Wei-yun, et al. Effect of benzo(a)pyrene on contents of reduced-glutathione in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris* [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2001, 40(5): 1095–1099.
- [32] 冯 涛, 郑微云, 等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏和卵巢还原型谷胱甘肽含量影响的比较研究[J]. 应用生态学报, 2001, 12(3): 422–424.
- FENG Tao, ZHENG Wei-yun, et al. Effect of benzo(a)pyrene on contents of reduced-glutathione in the liver and ovary of *Boleophthalmus pectinirostris* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(3): 422–424.