

赤子爱胜蚓谷胱甘肽和丙二醛含量变化指示 重金属污染土壤的生态毒性*

卜元卿^{1,2,3} 骆永明^{1,2,3†} 滕应^{1,2} 李振高^{1,2} 刘欣⁴

(1 中国科学院南京土壤研究所土壤与环境生物修复研究中心, 南京 210008)

(2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

(3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

(4 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要 为探讨赤子爱胜蚓谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量变化对重金属污染土壤生态毒性的指示作用,在试验室模拟条件下,利用人工土壤和自然土壤,研究了重金属含量与蚯蚓 GSH 和 MDA 含量变化的剂量效应关系。结果显示,在人工土壤试验中,Cu可诱导蚯蚓 GSH 和 MDA 含量上升,暴露 2 d、7 d、14 d后,Cu浓度与蚯蚓 GSH 含量的相关系数分别为 0.556、0.807和 0.775,与 MDA 含量的相关系数分别为 0.760、0.672和 0.544,均存在显著的剂量效应关系($p < 0.05$)。自然土壤试验结果显示,赤子爱胜蚓的 GSH 和 MDA 含量与土壤 Cu 全量的偏相关系数分别为 -0.830 ($p < 0.001$)和 -0.599 ($p < 0.05$),与 Cd 全量的偏相关系数分别为 -0.697 ($p < 0.05$)和 -0.690 ($p < 0.05$)。同时发现,赤子爱胜蚓 GSH 含量变化对土壤重金属响应的敏感性要高于 MDA。

关键词 生物指示物;谷胱甘肽;丙二醛;赤子爱胜蚓;土壤

中图分类号 X592 **文献标识码** A

土壤环境中重金属可与矿物结合而稳定存在,即使低浓度的重金属元素,也会由于长期积累而对生物体产生毒害作用^[1,2]。重金属可以刺激生物体产生大量活性氧,从而引起细胞和分子水平的氧化损伤,但生物体也具有抵抗氧化损伤的防御系统^[3,4],谷胱甘肽(Glutathione, GSH)就是防御脂质过氧化的重要小分子肽。丙二醛(Malondialdehyde, MDA)则是脂质过氧化的最终分解产物之一,因此 GSH 和 MDA 的含量变化可在分子水平上指示生物体的氧化损伤程度^[5,6]。毒理学研究表明^[7,8]生物体 GSH 和 MDA 含量变化对化学物质反应灵敏,且测定简便、不易受分析条件影响,常作为化学物质生态毒性的评价指标,但应用于指示重金属污染土壤环境还处在探索阶段^[9]。

土壤中蚯蚓与各种污染物密切接触,其在分子水平产生的反应是对污染物响应的早期结果,例如抗氧化酶、细胞色素 P450、金属硫蛋白等,利用这些指标监测和评价污染土壤环境质量,不仅可为保护

整个土壤生物区系提供一个相对安全的污染物浓度阈值^[10],而且在低浓度污染物慢性毒性的长期生物监测和生态风险预警中有重要意义^[11]。

Saint-Denis等^[11,12]、Rivera等^[13]和 Hu等^[14]分别研究了人工土壤中苯并[a]芘、醋酸铅、胺甲萘和邻苯二甲酸类驱虫剂对赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida andrei*)生理生化反应的影响,为污染物的生态毒性评价提供了重要的科学数据。虽然人工土壤与其他暴露介质(如滤纸)相比,与自然土壤最为接近^[15],然而人工土壤与复杂的自然土壤之间仍存在很大差异,其试验结果外推时常受到各种土壤环境因素制约,如土壤中的已知和(或)未知污染物及土壤 pH、有机质含量、阳离子交换量等^[16,17]。

因此,本研究在模拟条件下,首先通过人工土壤试验,研究 Cu 暴露浓度对赤子爱胜蚓 GSH 和 MDA 含量变化的动态影响,探讨蚯蚓的生物响应对 Cu 刺激是否均有敏感性和剂量效应关系;然后通过测定重金属污染土壤暴露前后蚯蚓的 GSH 和 MDA

* 国家自然科学基金重点项目(40432005)、国家重点基础研究发展规划项目(2002CB410810/9)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX32SW 2429)资助

† 通讯作者

作者简介:卜元卿(1977~),女,博士研究生,主要研究方向为污染土壤生态风险评估

收稿日期:2006-11-26;收到修改稿日期:2007-03-08

含量变化,研究土壤重金属全量及主要理化性质与生物指标间的作用关系,探讨其作为重金属污染土壤生态毒性指示物的应用价值,为土壤污染物生态毒性评价和环境污染生物监测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试蚯蚓

赤子爱胜蚓,购于南京某蚯蚓养殖场。暴露前置于清洁土壤预培养 7 d,选择体重为 0.5 g 左右,生殖带明显、体态相似的健康成蚓,无菌超纯水清洗后,放入铺有湿润灭菌纱布的玻璃皿中,在 (20 ± 2) °C 下,暗室培养 24 h 使蚯蚓清肠。

1.2 供试土壤

6个供试土壤采自浙江省台州市某污染地,均为水稻土,成土母质为老海积物,系统分类属淡色潮湿雏形土。供试土样为 0~20 cm 的表层 5 点混合样,新鲜土样拣出植物残体、砾石后,一部分土样于室内自然风干,研磨过筛 ($< 2\text{mm}$),供土壤基本理化性状和 Cu、Cd、Zn、Pb 全量测定;一部分土样过 2 mm 尼龙网筛后供生物试验使用。土壤样品经体积比为 4:1 盐酸、硝酸混合液消解,超纯水定容后,采用 POEMSR 等离子体光谱质谱仪 (ICP-MS) 测定土壤重金属全量。土壤 pH、总有机碳含量、阳离子交换量、全氮、全磷、全钾测定的方法依次为:酸度计法、重铬酸钾法、EDTA 铵盐速测法、高氯酸—硫酸消化法、高氯酸—硫酸铜铈比色法、火焰光度计法。

1.3 赤子爱胜蚓生态毒性研究的暴露方法

1.3.1 人工土壤试验 参照国际标准化组织 (ISO 11268 - 1) 方法^[18]略做修改。人工土壤由 70% 工业用沙、20% 高岭土和 10% 泥炭藓组成。每钵装 400 g 人工土壤和 20 g 牛粪,混匀后分别加入 CuSO_4 溶液,使各处理 Cu 浓度依次为 0、50、100、200、400 mg kg^{-1} 。各处理调节人工土壤含水量为 35%, pH 4.43~5.04 (与供试污染土壤一致),以上各处理平衡 28 d 后,每钵放入已清肠蚯蚓 50 头,单层纱布、牛皮纸封口,在牛皮纸上刺孔以保持正常通气, (20 ± 2) °C, 16/8 光暗交替培养 28 d。以土壤 Cu 浓度 0 mg kg^{-1} 作为空白对照,各处理重复 3 次,暴露 2 d、7 d、14 d 和 28 d 动态取样。

1.3.2 重金属污染农田土壤试验 陶瓷钵中分别装入 400 g 供试土样和 20 g 牛粪,混匀,调节土壤含水量为 35%,然后放入已清肠蚯蚓 50 头,纱布、

牛皮纸封口,在牛皮纸上刺孔以保持正常通气, (20 ± 2) °C, 16/8 光暗交替培养 14 d。每个土壤处理各重复 3 次。暴露前赤子爱胜蚓作为背景值对照。

1.4 赤子爱胜蚓的谷胱甘肽和丙二醛含量测定

蚯蚓样品称重后经液氮速冻,然后加入蚯蚓鲜重 9 倍的 PBS 缓冲液 (pH 7.4),研磨后将得到的 10% (w/v) 组织匀浆液, 9000 $\times g$ 离心 15 min,上清液于 -80 °C 保藏,以待分析。

谷胱甘肽 (GSH) 含量测定采用二硫代二硝基苯甲酸比色法,单位以每 mg 蛋白中能与二硫代二硝基苯甲酸反应 GSH 的 μg 表示;丙二醛 (MDA) 含量测定采用硫代巴比妥酸比色法,单位以每 mg 蛋白中能与硫代巴比妥酸反应的 MDA 的 nmol 表示;蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法。以上测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.5 数据处理

人工土壤试验中,各组数据以平均值 \pm 标准偏差表示;相同暴露时间的空白对照和处理组平均值进行多重比较;蚯蚓 GSH 和 MDA 含量分别与 Cu 暴露浓度进行相关性分析。污染土壤试验中,蚯蚓暴露前、后的 GSH 和 MDA 含量变化进行单因素方差比较分析, $p < 0.05$ 时差异显著;以土壤全磷、全钾和全氮为可控条件因子,蚯蚓的 GSH 和 MDA 含量分别与土壤重金属全量以及土壤主要理化性质进行偏相关分析。

2 结果与讨论

2.1 人工土壤试验中 Cu 暴露浓度对赤子爱胜蚓谷胱甘肽和丙二醛含量的影响

在相同暴露期内,随着 Cu 暴露浓度增加,处理组赤子爱胜蚓的 GSH 含量呈上升趋势 (表 1)。暴露 2 d 时,处理组蚯蚓的 GSH 含量显著高于空白对照组 ($p < 0.05$),但各处理组无显著差异;暴露 14 d 时,100 mg kg^{-1} 、200 mg kg^{-1} 、400 mg kg^{-1} 处理组蚯蚓的 GSH 含量均比空白对照组显著升高 ($p < 0.05$);当暴露时间延长至 28 d 时,蚯蚓 GSH 的最高含量出现在 200 mg kg^{-1} 处理组,较空白对照值增加了 33%,但差异不显著。

表 1 显示,处理组蚯蚓的 MDA 含量也随着 Cu 暴露浓度的增加而呈上升趋势。与空白对照相比,较高 Cu 浓度处理组 (200 mg kg^{-1} 和 400 mg kg^{-1}) 蚯蚓的 MDA 含量显著升高 ($p < 0.05$),暴露 14 d

时, 400 mg kg⁻¹处理组蚯蚓 MDA 含量较相应空白对照组升高 1.73 倍, 达到最高值。暴露期内, 较低 Cu 浓度处理组 (50 mg kg⁻¹和 100 mg kg⁻¹), 蚯蚓的 MDA 含量也呈上升趋势, 然而暴露 14 d 时, 50 mg kg⁻¹和 100 mg kg⁻¹处理组分别较空白对照值下降 8% 和 18%, 但均无显著差异。

Cu 暴露浓度与赤子爱胜蚓 GSH 及 MDA 含量的相关性分析显示, 蚯蚓在污染人工土壤暴露 2 d、7 d、14 d, 其 GSH 含量与 Cu 浓度的相关系数分别为 0.556、0.807 和 0.775, 存在良好剂量效应关系 ($p < 0.05$), 但暴露 28 d 时, GSH 含量与暴露浓度的相关程度降低 ($R = 0.360, p = 0.187$)。不同取样时间 (2 d、7 d、14 d、28 d) 下, 蚯蚓 MDA 含量与 Cu 暴露浓度的相关系数分别为 0.760、0.672、0.544 和

0.587, 相关程度均达到显著水平 ($p < 0.05$)。人工土壤中, 赤子爱胜蚓的 GSH 和 MDA 含量均与 Cu 暴露浓度存在良好的剂量效应关系, 对 Cu 暴露的最敏感响应时间为 2 ~ 14 d。这与 *Aporrectodea tuberculata*^[19]和 *Eisenia fetida andred*^[12]分别在 Cu/Zn 和 Pb 胁迫下的 GSH 和 MDA 含量变化研究结果一致。

暴露期末, 蚯蚓 GSH 和 MDA 含量与 Cu 浓度的相关程度降低, 推测其原因主要有两点: 一是 Cu 污染人工土壤虽已经过平衡处理, 但 Cu 与人工土壤颗粒之间仍存在吸附效应, 随着暴露时间延长, 生物可利用部分 Cu 的含量逐渐减少, 从而由 Cu 污染引起的蚯蚓氧化胁迫减弱; 二是过量涌入蚯蚓体内的 Cu 启动了其对污染物的防御和外排机制, 最终使蚯蚓体内生理代谢达到新的平衡状态。

表 1 人工土壤中 Cu 浓度对赤子爱胜蚓谷胱甘肽和丙二醛含量影响

Table 1 Effects of Cu concentration on levels of GSH and MDA in *Eisenia fetida* in the artificial soil tested

Cu 浓度 Cu concentration (mg kg ⁻¹)	谷胱甘肽 Glutathione ($\mu\text{g mg}^{-1}\text{prot}$)				丙二醛 Malondialdehyde ($\text{nmol mg}^{-1}\text{prot}$)			
	2 d	7 d	14 d	28 d	2 d	7 d	14 d	28 d
0	34.71 \pm 6.10b	37.40 \pm 6.87b	36.76 \pm 5.66b	42.18 \pm 12.09a	1.04 \pm 0.12b	1.25 \pm 0.21b	1.90 \pm 0.25b	1.81 \pm 0.62b
50	42.19 \pm 2.37a	41.38 \pm 4.24b	42.79 \pm 6.23b	48.83 \pm 2.36a	1.12 \pm 0.14b	1.31 \pm 0.46b	1.73 \pm 0.86b	1.88 \pm 0.04b
100	41.30 \pm 5.25a	47.77 \pm 7.96ab	57.93 \pm 5.77a	53.17 \pm 10.06a	1.20 \pm 0.15ab	1.64 \pm 0.19ab	1.55 \pm 0.02b	2.18 \pm 0.06ab
200	42.60 \pm 5.44a	54.18 \pm 7.52a	55.03 \pm 7.03a	56.36 \pm 9.79a	1.32 \pm 0.08ab	1.90 \pm 0.40a	1.87 \pm 0.35b	2.82 \pm 0.28a
400	45.68 \pm 2.94a	54.87 \pm 3.94a	58.31 \pm 6.13a	53.61 \pm 6.29a	1.33 \pm 0.04a	1.83 \pm 0.22ab	3.28 \pm 0.64a	2.49 \pm 0.87a

注: 表内结果以平均值 \pm 标准偏差表示 ($n = 6$); 同一列中相同字母表示相同暴露时间下差异不显著 ($p > 0.05$) Note: Results are expressed as means \pm standard deviations ($n = 6$); The same letters mean insignificant difference ($p > 0.05$) between the two the same in duration of exposure

2.2 重金属污染土壤暴露对赤子爱胜蚓谷胱甘肽和丙二醛含量变化的影响

2.2.1 污染土壤的主要理化性质和重金属含量

通常情况下水稻土的 pH 接近中性或偏碱性, 供试土壤的 pH 范围 4.20 ~ 5.66, 存在明显的酸化现

象。我国土壤环境标准规定土壤 pH < 6.5 时, Cu、Cd、Zn、Pb 的二级污染阈值分别为 50 mg kg⁻¹、0.30 mg kg⁻¹、200 mg kg⁻¹ 和 250 mg kg⁻¹^[20]。根据以上标准值, 6 个供试土壤均存在 Cu 和 Cd 污染, Samp. 1 和 Samp. 2 还存在 Zn 污染 (表 2)。

表 2 供试土壤主要理化性质及部分重金属含量

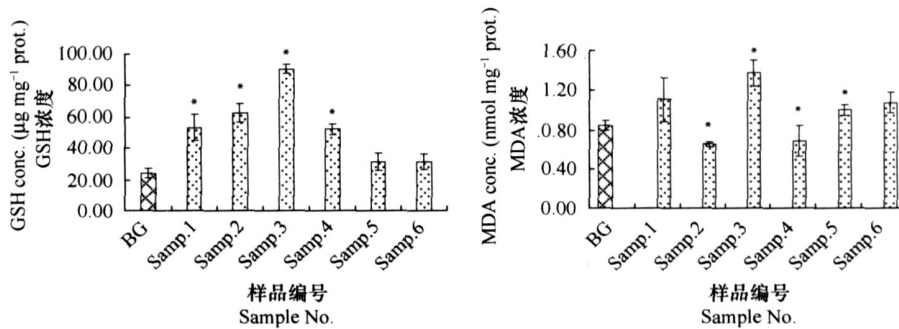
Table 2 Main physico-chemical properties and contents of some total heavy metals in the tested soils

样品编号 Sample No.	pH (H ₂ O)	总有机碳 Total organic C (g kg ⁻¹)	阳离子交换量 CEC (cmol kg^{-1})	全磷 Total P (g kg ⁻¹)	全钾 Total K (g kg ⁻¹)	全氮 Total N (g kg ⁻¹)	总量 Total content of heavy metals (mg kg ⁻¹)			
							Cu	Cd	Zn	Pb
Samp. 1	5.24	39.20	17.57	0.54	4.36	2.86	78	0.49	304	118
Samp. 2	5.66	48.07	18.42	0.91	4.58	3.53	98	0.58	230	96
Samp. 3	5.25	49.17	19.09	0.57	4.02	4.12	114	0.50	154	77
Samp. 4	4.35	50.49	20.67	0.79	4.52	3.12	183	7.42	147	49
Samp. 5	4.20	49.62	17.91	0.51	9.26	3.02	316	8.08	155	57
Samp. 6	4.23	39.11	18.85	0.38	4.04	3.12	338	9.88	141	65

2.2.2 赤子爱胜蚓的谷胱甘肽和丙二醛含量变化

图1和图1b分别是污染土壤暴露后赤子爱胜蚓的GSH和MDA含量变化结果。蚯蚓的GSH含量背景值为 $23.9 \mu\text{g mg}^{-1} \text{prot.}$,暴露14 d后,不同处理蚯蚓的GSH含量均有升高,其中Samp. 3处理组增加程度最大,为背景值的2.78倍,Samp. 1、Samp. 2和Samp. 4处理组也分别较背景值增加了

1.23倍、1.61倍和1.21倍,差异均达到极显著水平($p < 0.001$)。暴露前蚯蚓MDA含量为 $0.849 \text{ nmol mg}^{-1} \text{prot.}$;暴露后,Samp. 2和Samp. 4处理组蚯蚓的MDA含量分别降低了26%和19%,显著低于暴露前背景值($p < 0.001$);其他处理组蚯蚓的MDA含量分别有不同程度的升高,最高值出现在Samp. 3处理组,较背景值增加了61%,差异极显著($p < 0.001$)。



注:平均值 \pm 标准偏差($n=6$);BG:蚯蚓暴露前的背景值;*当 $p < 0.05$ 时处理组与背景值差异显著
 Note: Results are expressed as means \pm standard deviations ($n=6$); BG means background value before exposure; * Statistical significance versus background group before exposure, $p < 0.05$

图1 赤子爱胜蚓谷胱甘肽和丙二醛含量在污染土壤中的变化

Fig. 1 Changes in the levels of GSH and MDA in *Eisenia fetida* exposed to contamination of the soil

研究发现,Samp. 6土样的Cu、Cd全量是所有供试土样中最高,但暴露其中的蚯蚓GSH和MDA含量与背景值相比并无显著增加;GSH和MDA含量最高值均出现在Cu、Cd污染相对较轻的Samp. 3处理组;而污染土壤暴露后,Samp. 2和Samp. 4处理组蚯蚓MDA含量甚至显著下降。这些现象的解释,一是土壤中可能存在一些未知污染物影响蚯蚓GSH和MDA含量变化;二是生物响应作为污染物环境生态毒性效应的最终指示,是污染物、土壤环境因子间相互作用的综合反映,土壤Cu全量仅是众多影响因素之一。Heimbach^[22]研究发现暴露环境可以影响污染物的生物可利用性,进而改变其生

态毒性,以致出现与人工土壤试验完全不同的结果。

2.2.3 赤子爱胜蚓的谷胱甘肽和丙二醛含量与土壤环境因子关系 表3是赤子爱胜蚓的GSH和MDA含量与土壤重金属全量、土壤pH、总有机碳含量和阳离子交换量的偏相关分析结果。土壤Cu和Cd全量对赤子爱胜蚓的GSH和MDA含量有显著抑制作用;而土壤Zn全量对GSH和MDA含量则有显著刺激作用。土壤pH、总有机碳和阳离子交换量对蚯蚓MDA含量影响较大,而对GSH含量的影响较小,赤子爱胜蚓GSH含量变化对土壤重金属的响应敏感程度高于MDA。

表3 赤子爱胜蚓的GSH和MDA含量与供试土壤环境因子的偏相关结果

Table 3 Partial correlation between levels of GSH and MDA in *Eisenia fetida* and the main environment factors of the contaminated soil

生物指标 Biological parameters	偏相关系数 ¹⁾ Partial correlation coefficients ($df=13$)						
	Total Cu	Total Cd	Total Zn	Total Pb	pH	Organic C	CEC
谷胱甘肽 GSH	-0.830 ($p < 0.001$) **	-0.697 ($p = 0.004$) **	0.595 ($p = 0.019$) *	0.489 ($p = 0.064$)	0.471 ($p = 0.077$)	0.026 ($p = 0.927$)	-0.271 ($p = 0.328$)
丙二醛 MDA	-0.599 ($p = 0.018$) *	-0.690 ($p = 0.004$) **	0.725 ($p = 0.003$) **	0.721 ($p = 0.002$) **	0.720 ($p = 0.002$) **	-0.583 ($p = 0.023$) **	-0.690 ($p = 0.004$) **

1) 供试土壤的全磷、全钾、全氮作为条件控制因子。* $p < 0.05$ 时双尾测验差异显著; ** $p < 0.01$ 时双尾测验差异极显著 1) Total P, total K and total N as control factors of the tested soil. * 2-tailed significance at $p < 0.05$; ** 2-tailed significance at $p < 0.01$

在人工土壤试验中, Cu浓度增加可刺激赤子爱胜蚓的 GSH和 MDA 含量上升, 且生物指标的含量变化均与 Cu 浓度存在良好的正相关性; 而污染土壤试验中, Cu 浓度与蚯蚓 GSH 和 MDA 的含量则分别表现为显著的负相关关系。研究认为, 由于土壤组成复杂、理化性质多变以及可能存在的未知污染物, 使土壤重金属元素之间、污染物与各土壤环境因子之间产生多种交互作用, 这些作用最终导致复合污染土壤中 Cu 污染物对赤子爱胜蚓的生态毒性不同于单一污染时的研究结果。

3 结 论

本研究显示人工土壤暴露 2 d 后, 50 mg kg^{-1} 的 Cu 即可诱导赤子爱胜蚓的 GSH 含量显著升高 ($p < 0.05$); 在暴露期内, 蚯蚓的 GSH 和 MDA 含量随着 Cu 浓度的增加而升高, 存在显著的剂量效应关系。Cu-Cd 复合污染土壤暴露 14 d 后, 赤子爱胜蚓 GSH 和 MDA 含量变化不仅受到重金属污染物的影响, 而且也受到土壤环境条件的影响, 特别是 MDA 含量变化受到土壤 pH、总有机碳和阳离子交换量的显著影响 ($p < 0.05$)。人工土壤和污染土壤试验中, 赤子爱胜蚓的 GSH 含量变化对重金属污染物的反应敏感, 且受暴露环境因子影响较小、特异性强, 有潜力成为指示污染土壤生态风险的预警性生物标志物。

参 考 文 献

- [1] Fent K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 2004, 205 (3): 223 ~ 240
- [2] 武海涛, 吕宪国, 杨青, 等. 土壤动物主要生态特征与生态功能研究进展. *土壤学报*, 2006, 43 (2): 314 ~ 323. Wu H T, Lu X G, Yang Q, *et al*. Ecological characteristics and functions of soil fauna community (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43 (2): 314 ~ 323
- [3] Livingstone D R, Archibald S, Chipman K L, *et al*. Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda* from the North-Sea Marine. *Ecology Progress Series*, 1992, 91 (1): 97 ~ 104
- [4] 卜元卿, 骆永明, 滕应, 等. 铜暴露下赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 活体基因的损伤研究. *生态毒理学报*, 2006, 1 (3): 228 ~ 235. Bu Y Q, Luo Y M, Teng Y, *et al*. Detection of DNA damage in earthworm (*Eisenia foetida*) in vivo exposure to copper ion (In Chinese). *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2006, 1 (3): 228 ~ 235
- [5] Halliwell B, Gutteridge J M C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 1990, 86 (1): 1 ~ 85
- [6] Lehner A, Bailly C, Flechel B, *et al*. Changes in wheat seed germination ability, soluble carbohydrate and antioxidant enzyme activities in the embryo during the desiccation phase of maturation. *Journal of Cereal Science*, 2006, 43 (2): 175 ~ 182
- [7] Xiao N W, Jing B B, Ge F, *et al*. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*, 2006, 62 (4): 1366 ~ 1373
- [8] Osman A M, van Noort P C M. Comparison of key enzymes in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, the earthworm *Allolobophora chlorotica* and *Chironomus riparius* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 67 (2): 212 ~ 217
- [9] Wang M E, Zhou Q X. Joint stress of chlorimuron-ethyl and cadmium on wheat *Triticum aestivum* at biochemical levels. *Environmental Pollution*, 2006, 144 (3): 572 ~ 580
- [10] 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. *土壤学报*, 2005, 42 (1): 140 ~ 148. Gao Y, Luo Y M. Earthworms as bioindicators of soil pollution and their potential for remediation of contaminated soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42 (1): 140 ~ 148
- [11] Saint-Denis M, Narbonne J F, Amaud C, *et al*. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: Effects of benzo(a)pyrene. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31 (13): 1837 ~ 1846
- [12] Saint-Denis M, Narbonne J F, Amaud C, *et al*. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: Effects of lead acetate. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33 (3): 395 ~ 404
- [13] Ribera D, Narbonne J F, Amaud C, *et al*. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: Effects of carbaryl. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33 (7/8): 1123 ~ 1130
- [14] Hu X Y, Wen B, Zhang S Z, *et al*. Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 62 (1): 26 ~ 34
- [15] Amaud C, Saint-Denis M, Narbonne J F, *et al*. Influences of different standardized test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32 (1): 67 ~ 73
- [16] Tanaka Y. Ecological risk assessment of pollutant chemicals: Extinction risk based on population level effects. *Chemosphere*, 2003, 53 (4): 421 ~ 425
- [17] Edwards C A. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. *European Journal of Soil Biology*, 2002, 38 (3/4): 225 ~ 231
- [18] International Standard Organization (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. Geneva: ISO, 1998
- [19] Lukkari T, Taavitsainen M, Soimasuo M, *et al*. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: Differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environmental Pollution*, 2004, 129 (3):

377~386

- [20] 夏家淇, 蔡道基, 夏增禄, 等. GB 15618-1995土壤环境质量标准. 北京: 中国标准出版社, 2000. Xia J Q, Cai D J, Xia Z L, *et al*. GB 15618-1995 Environmental Quality Standard for Soils (In Chinese). Beijing: Standards Press of China, 2000
- [21] McLaughlin M J. Bioavailability of metals to terrestrial plants. In: Allen H E. ed. Bioavailability of Metals in Terrestrial Eco-

systems. Influence of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates. Pensacola, FL: SETAC Press, 2000. 39~67

[22] Heimbach F. A comparison of laboratory methods for toxicity testing with earthworms. In: Edwards C A, Neuhauser E F. eds. Earthworms in Waste and Environmental Management. The Hague: SPB Academic, 1988. 329~335

VARIATION OF GSH AND MDA LEVELS IN *EISENIA FETIDA* AS INDICATOR OF ECO-TOXICITY OF HEAVY METAL CONTAMINATED SOIL

Bu Yuanqing^{1,2,3} Luo Yongning^{1,2,3†} Teng Ying^{1,2} Li Zhengao^{1,2} Liu Xin⁴

(1 Soil and Environment Bioremediation Research Centre, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

(4 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract In order to explore potential of the variation of GSH and MDA levels in *Eisenia fetida* as bio-indicators in monitoring heavy metal contamination of soil, effect of copper on *Eisenia fetida* was studied using artificial soil and contaminated agricultural soil. Results show that the levels of GSE and MDA in *E. fetida* are significantly related to copper in the artificial soil, with correlation coefficients being 0.556, 0.807 and 0.775 between Cu concentration and levels of GSH and 0.760, 0.672 and 0.544 between Cu concentration and levels of MDA, respectively after exposure of the worms for 2, 7 and 14 days. Both showed close dose-effect relationship. In natural soil, partial relationship was found between Cu content and levels of GSH and MDA in the worms with correlation coefficients being -0.830 ($p < 0.001$) and -0.599 ($p < 0.05$), respectively, and between Cd content and levels of GSH and MDA in the worms as well, with correlation coefficients being -0.697 ($p < 0.05$) and -0.690 ($p < 0.05$), respectively. Moreover, it was also found that GSH level in the worms was more sensitive than MDA level to soil heavy metals.

Key words Bio-indicator; Glutathione (GSH); Malondialdehyde (MDA); *Eisenia fetida*; Soil