

弱碱性农田土壤重金属污染对粉正蚓种群密度和生物量的影响研究

任梁, 艾世伟, 刘白林, 张迎梅*

(兰州大学生命科学学院, 甘肃省环境生物监测与修复重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 为了探讨弱碱性农田土壤重金属污染对粉正蚓 *Lumbricus rubellus* 种群密度和生物量的影响, 本研究于 2016 年 5—8 月, 选取以重金属 Cd、Pb、Zn、Cu 污染为主的甘肃省白银市四龙镇梁庄村和双合村的玉米农田作为实验样地, 同时以自然条件相近但相对无污染的永靖县尤塬村的玉米农田作为参照样地。本研究对比检测了实验样地与参照样地的重金属污染水平, 粉正蚓种群密度、抗氧化酶活力 (SOD、CAT 和 GSH-PX)、金属硫蛋白浓度和溶酶体膜损伤程度等指标。结果显示, 2 个实验样地粉正蚓抗氧化酶活力与参照样地的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但金属硫蛋白浓度极显著高于参照样地 ($P < 0.01$), 表明粉正蚓在受到重金属污染胁迫后产生了明显的应激反应; 与参照样地相比, 实验样地粉正蚓体腔细胞内中性红保留时间极显著缩短 ($P < 0.01$), 表明土壤重金属污染已导致粉正蚓溶酶体膜受损; 实验样地粉正蚓的种群密度和生物量与参照样地相比, 总体上显著 ($P < 0.05$) 甚至极显著 ($P < 0.01$) 下降。研究结果表明, 弱碱性农田土壤中粉正蚓种群密度与生物量显著低于相对无污染地区, 这可能与长期重金属污染导致粉正蚓溶酶体膜损伤、抗氧化酶活力不稳定以及对环境胁迫应激反应增强等有关。

关键词: 重金属污染; 粉正蚓; 种群密度; 生物量; 抗氧化酶; 金属硫蛋白; 中性红保留时间

中图分类号: Q958.113; Q959.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7083(2017)05-0507-06

Effects of Heavy Metal Pollution on the Population Density and Biomass of *Lumbricus rubellus* from Weak Alkaline Farmlands

REN Liang, AI Shiwei, LIU Bailin, ZHANG Yingmei*

(Gansu Key Laboratory of Biomonitoring and Bioremediation for Environmental Pollution, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To investigate the toxic effect of heavy metal on the population density and biomass of *Lumbricus rubellus* from weak alkaline farmlands, in this study, the maize farmlands of Liangzhuang and Shuanghe villages in Baiyin city (Gansu province), which were mainly contaminated by Cd, Pb, Zn, and Cu for a long time, were selected as the study sites, and the maize farmlands of Youyuan village in Yongjing county which had similar natural conditions but with relatively unpolluted area was selected as the control site. The heavy metal contamination levels between the polluted and the control sites, the population density and biomass, antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, GSH-PX), metallothionein (MT) concentration and lysosomal membrane damage degree of *L. rubellus* were comparatively studied. The results showed that there were no significant differences in the antioxidant activities of *L. rubellus* between the polluted and control sites, while extreme significantly higher MT concentration was found in the polluted sites ($P < 0.01$), indicating that *L. rubellus* from the polluted sites might be involved in stress responses; the test of neutral red retention time showed an extremely significant shortening in the coelomic cells of *L. rubellus* from the polluted sites ($P < 0.01$), this suggested that the lysosomal membrane was damaged; furthermore, the population density and biomass of *L. rubellus* were significantly ($P < 0.05$) or extremely declined ($P < 0.01$). According to the results of this study, we concluded that the significant decreased population density and biomass of *L. rubellus* from weakly alkaline sites might be related to the long-term heavy metal pollution which lead to the damage of lysosomal membrane, change of antioxidant activities and increased responses to the environmental stress.

Keywords: heavy metal pollution; *Lumbricus rubellus*; population density; biomass; antioxidant; metallothionein; neutral red retention time

收稿日期: 2017-04-08 接受日期: 2017-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41171391)

作者简介: 任梁 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 环境动物学, E-mail: renl2014@lzu.edu.cn

* 通信作者 Corresponding author, 女, 博士, 教授, E-mail: ymzhang@lzu.edu.cn

重金属污染导致耕作土壤质量下降的同时,对栖息在其中的土壤动物多样性和种群密度也会产生影响。污染土壤中重金属的种类、形态与生物自身对重金属的富集等密切相关(Li *et al.*,2010)。

蚯蚓属于大型土壤动物,在温带和热带的土壤动物群落结构中占据了主要的生物量,对改善土壤有机质组成以及疏松土壤起重要作用(Satchell,1983),同时,由于蚯蚓直接摄食土壤以及表皮通透性较高等,重金属元素也更易在蚯蚓体内富集(Nahmani *et al.*,2007)。基于此,蚯蚓成为研究重金属污染土壤的首选指示生物。有研究者发现,蚯蚓在受到重金属污染胁迫时不仅其生物量、种群密度和物种丰富度显著下降(Vandecasteele *et al.*,2004),且会出现体腔细胞溶酶体膜的损伤、乙酰胆碱酯酶活力下降等情况(Calisi *et al.*,2013)。但是,弱碱性农田土壤重金属污染条件下,蚯蚓种群密度以及相关生理生化指标会发生怎样的变化,尚未见相关研究报道。

本文选择甘肃省白银地区长期污灌农田为研究地点,选择相对无污染的甘肃省永靖县尤塬村为参照地,调查统计两地农田土壤中分布的唯一大型土壤动物粉正蚓 *Lumbricus rubellus* 的生物量与种群多样性,并分析其与粉正蚓抗氧化能力、金属硫蛋白水平以及体腔细胞中性红保留时间等的相关性,旨在研究重金属污染对农田土壤中粉正蚓的毒性效应,为今后开展污染土壤生物监测与修复提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究样地

研究地点位于甘肃省白银市四龙镇和临夏回族自治州永靖县,两地相距 110 km。白银市年均气温 9℃,年均降水量 250 mm,永靖县年均气温 9.5℃,年均降水量 260 mm,两地气候相似。本研究选取污染较严重的白银市四龙镇梁庄村(104°39′02″E,36°44′10″N)和双合村(104°36′58″E,36°46′69″N)的 2 块玉米农田作为实验样地,相对无污染的永靖县尤塬村(103°26′78″E,35°95′07″N)的玉米农田作为参照样地,每个样地面积均为 500 m²。

1.2 土样采集及分析

2016 年 5—8 月,每个样地随机选 3 处采集表层土壤(0~20 cm)并混合。土样带回实验室,用烘干法和电位法分别测定其含水量和 pH 值,剩余的土

壤样风干后磨碎过 20 目筛。用重铬酸钾容量法和土壤粒度快速测定法检测土壤样品中的有机碳含量及土壤粒度分布。

1.3 土壤重金属浓度测定

将 0.5 g 风干过 2 mm 筛后的土样置于 50 mL 的坩锅中,水润湿土样后加 10 mL 盐酸,低温开盖加热至内溶液为 3 mL 左右取下冷却。后依次加入 8 mL 硝酸、8 mL 氢氟酸和 6 mL 高氯酸,约 30 min 后开盖继续加热至内容物呈粘稠状。取下坩锅稍冷却后加入 1 mL 硝酸,并稀释定容至 25 mL,采用原子吸收光谱仪(FAAS,ZEEnit700P,Analytik Jena,Germany)进行重金属含量测定。

1.4 蚯蚓种群密度统计

在每个样地按梅花布点法选取 5 个样方,每个样方挖掘 80 cm × 80 cm × 20 cm 的耕层土壤,以手捡法收集其中所有蚯蚓。经鉴定,研究地只分布粉正蚓这一种寡毛纲 Oligochaeta 动物。将所采集到的粉正蚓进行统计、称量,并根据生殖环带鉴别其是否性成熟。

1.5 抗氧化酶活性测定

抗氧化酶活性采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒利用分光光度法进行测定(梁海燕等,2007)。实验用蚯蚓为采自 3 个样地的成年粉正蚓,每个样地随机收集 10 条成年粉正蚓并带回实验室,称量,平均体质量 0.45 g 左右。加入相当于蚯蚓体质量 9 倍的生理盐水,快速将蚯蚓剪成数段,移入匀浆器匀浆,将匀浆液转入 5 mL 的离心管,3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后,提取上清液用于蛋白定量和抗氧化酶活性测定。

1.6 金属硫蛋白浓度测定

金属硫蛋白(metallothionein, MT)浓度的测定采用上海酶联生物有限公司生产的蚯蚓金属硫蛋白 ELISA 试剂盒。将提取的组织匀浆上清液用酶联免疫法进行 MT 测定。

1.7 溶酶体膜稳定性测定

参照 Weeks 和 Svendsen(1996)的方法,用纤维针法提取蚯蚓体液,将提取到的 20 μL 体腔液与林格氏液混合后滴到载玻片上,细胞悬液在载玻片表面停留 1 min 后加上 80 μg · mL⁻¹ 的中性红工作液并封片,即刻置于 400 倍显微镜下观察,每 8~10 min 观察 1 次,不观察时放置于人工气候箱中。观察到视野中有超过 50% 的细胞被染成粉红色,停

止计时,这段时间称为中性红保留时间(neutral red retention time, NRRT),用来评价蚯蚓溶酶体膜的损伤程度。

1.8 数据处理

采用 SPSS 22.0 进行数据分析。所有数据测定 3 次平行,结果以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。使用单因素方差分析和 Duncan 检验法,显著性水平设为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 研究样地土壤理化性质与土壤重金属积累浓度

3 个研究样地的土壤 pH、有机碳、含水量、土壤粒度等基本理化性质和土壤重金属浓度见表 1。3 个研究样地均属于粉质和弱碱性土壤,土壤含水量总体差异无统计学意义,梁庄村 5—8 月土壤有机碳含量极显著高于尤塬村($P < 0.01$),双合村 5 月和 7 月土壤有机碳含量极显著高于尤塬村($P <$

0.01),且 2 个实验样地的 Cu、Zn、Pb、Cd 浓度均极显著高于参照样地($P < 0.01$)。

2.2 土壤重金属污染对粉正蚓种群密度、生物量和质量的影响

粉正蚓种群密度统计结果见表 2。在污染相对严重的双合村,5 月未见粉正蚓分布,6—8 月虽采集到粉正蚓,但其种群密度和生物量均极显著低于尤塬村($P < 0.01$);土壤污染次之的梁庄村,5 月和 7 月粉正蚓的种群密度显著低于尤塬村($P < 0.05$),其生物量在各月则极显著低于尤塬村($P < 0.01$);双合村和梁庄村农田土壤的成蚓体质量显著或极显著低于尤塬村($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);2 个实验样地的同期幼蚓比例均高于参照样地。

2.3 土壤重金属污染对粉正蚓抗氧化酶活性的影响

对粉正蚓 SOD、CAT 和 GSH-PX 酶活性的检测结果显示,各组之间差异无统计学意义(图 1)。

表 1 研究样地土壤理化性质与重金属浓度
Table 1 Physical and chemical properties of soil and heavy metal content

样地	时间	pH	有机碳/%	含水量/%	砂粒/%	粉粒/%	粘粒/%	重金属浓度/(mg · kg ⁻¹)			
								Cu	Zn	Pb	Cd
尤塬村	5 月	8.21 \pm 0.02	5.23 \pm 0.03	14.6 \pm 1.0	15.0 \pm 0.4	79.0 \pm 1.6	5.9 \pm 1.3	20.44 \pm 0.63	72.47 \pm 0.61	37.18 \pm 0.19	0.160 \pm 0.006
		8.17 \pm 0.07	6.73 \pm 0.40	14.3 \pm 0.5	15.2 \pm 0.5	80.3 \pm 0.6	4.5 \pm 0.1	20.88 \pm 1.28	71.27 \pm 0.94	35.61 \pm 1.32	0.156 \pm 0.010
	7 月	8.25 \pm 0.06	7.03 \pm 0.08	14.2 \pm 0.5	15.6 \pm 1.0	79.1 \pm 2.2	5.3 \pm 1.1	19.13 \pm 0.77	67.28 \pm 1.55	34.70 \pm 1.04	0.153 \pm 0.010
	8 月	8.15 \pm 0.06	8.62 \pm 0.33	15.2 \pm 0.9	15.3 \pm 0.4	80.4 \pm 1.1	4.3 \pm 0.7	22.10 \pm 0.10	68.98 \pm 0.68	39.99 \pm 0.17	0.158 \pm 0.003
梁庄村	5 月	8.13 \pm 0.05	6.98 \pm 0.06**	15.0 \pm 0.8	17.1 \pm 0.5	77.6 \pm 0.5	5.4 \pm 0.1	37.79 \pm 0.44**	161.67 \pm 0.77**	100.29 \pm 1.65**	1.60 \pm 0.02**
		8.12 \pm 0.02	8.76 \pm 0.14**	15.6 \pm 0.3	17.0 \pm 0.5	76.0 \pm 1.4	7.0 \pm 0.9	38.17 \pm 0.84**	161.98 \pm 0.91**	101.73 \pm 2.19**	1.61 \pm 0.02**
	7 月	8.19 \pm 0.04	8.25 \pm 0.10**	14.8 \pm 0.4	16.7 \pm 0.8	76.7 \pm 2.4	6.6 \pm 1.7	35.79 \pm 0.47**	141.26 \pm 1.02**	103.36 \pm 2.95**	1.59 \pm 0.04**
	8 月	7.96 \pm 0.08	10.07 \pm 0.03**	15.7 \pm 0.4	16.8 \pm 0.2	76.3 \pm 0.6	7.0 \pm 0.4	41.11 \pm 0.75**	161.43 \pm 0.50**	102.08 \pm 0.95**	1.53 \pm 0.04**
双合村	5 月	7.98 \pm 0.10	6.16 \pm 0.16**	14.2 \pm 0.8	17.1 \pm 0.3	76.7 \pm 1.7	6.2 \pm 1.8	99.46 \pm 0.07**	239.59 \pm 1.22**	164.27 \pm 4.08**	12.74 \pm 0.45**
		8.26 \pm 0.03	6.26 \pm 0.09	15.0 \pm 0.9	16.6 \pm 0.4	75.4 \pm 0.5	8.0 \pm 0.5	90.16 \pm 0.72**	221.03 \pm 0.58**	160.88 \pm 3.27**	13.01 \pm 0.12**
	7 月	8.09 \pm 0.10	9.26 \pm 0.13**	16.0 \pm 0.2**	16.9 \pm 0.7	76.6 \pm 0.9	6.5 \pm 0.2	89.28 \pm 1.50**	223.95 \pm 2.37**	164.83 \pm 3.67**	10.49 \pm 0.52**
	8 月	8.23 \pm 0.06	8.66 \pm 0.29	15.3 \pm 0.5	16.6 \pm 0.5	76.0 \pm 0.2	7.4 \pm 0.7	87.45 \pm 0.36**	220.82 \pm 0.48**	144.28 \pm 2.61**	10.34 \pm 0.21**

注 Notes: ** $P < 0.01$; 下同 the same below.

表 2 粉正蚓种群密度、生物量、成蚓质量和幼蚓所占比例
Table 2 Population density, biomass, adult mass and proportion of *Lumbricus rubellus* juveniles

样地	时间	种群密度/(n · m ⁻²)	生物量/(g · m ⁻²)	成蚓质量/g	幼蚓所占比例/%
尤塬村	5 月	9.1 ± 2.7	4.73 ± 1.51	0.70 ± 0.15 (n = 17)	41 (n = 12)
	6 月	18.4 ± 4.6	14.15 ± 5.52	0.95 ± 0.26 (n = 43)	27 (n = 15)
	7 月	22.5 ± 5.9	18.69 ± 5.89	1.03 ± 0.24 (n = 52)	28 (n = 20)
	8 月	24.1 ± 3.1	20.20 ± 2.87	0.98 ± 0.24 (n = 58)	23 (n = 18)
梁庄村	5 月	5.0 ± 2.7 *	1.36 ± 0.74 **	0.61 ± 0.04 * * (n = 2)	83 (n = 14)
	6 月	15.0 ± 4.2	5.35 ± 1.47 **	0.59 ± 0.08 * * (n = 16)	67 (n = 32)
	7 月	13.8 ± 6.8 *	6.41 ± 3.23 **	0.69 ± 0.12 * * (n = 20)	55 (n = 24)
	8 月	17.5 ± 9.4	8.87 ± 4.73 **	0.61 ± 0.11 * * (n = 36)	36 (n = 20)
双合村	5 月	—	—	—	—
	6 月	3.4 ± 3.2 * *	1.09 ± 1.06 **	0.63 ± 0.05 * (n = 2)	82 (n = 6)
	7 月	5.9 ± 3.2 * *	2.35 ± 1.33 **	0.71 ± 0.16 * * (n = 5)	74 (n = 14)
	8 月	6.9 ± 3.8 * *	2.84 ± 1.48 **	0.56 ± 0.06 * * (n = 10)	55 (n = 12)

注 Notes: * P < 0.05; — 未检出 not detected.

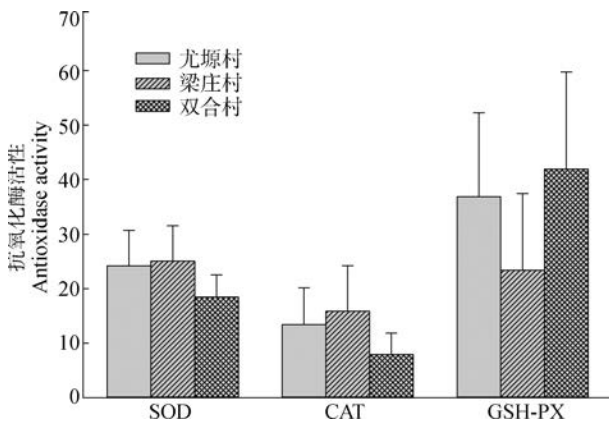


图 1 重金属污染对粉正蚓体内抗氧化酶活性的影响
Fig. 1 Effects of soil heavy metal on antioxidant activity of *Lumbricus rubellus*

SOD 活性: U/mgprot; CAT 活性: mgprot/mL; GSH-PX 活性: μmol · L/(mg · min).
SOD activity: U/mgprot; CAT activity: mgprot/mL; GSH-PX activity: μmol · L/(mg · min).

2.4 土壤重金属污染对粉正蚓 MT 浓度的影响

2 个实验样地农田土壤中粉正蚓体内 MT 浓度均极显著高于参照样地 (P < 0.01, 图 2)。

2.5 土壤重金属污染对粉正蚓溶酶体膜的影响

2 个实验样地农田土壤中粉正蚓体腔细胞内的 NRRT 均极显著低于参照样地 (P < 0.01, 图 3)。

3 讨论

3.1 土壤重金属污染对粉正蚓种群密度的影响

以往研究报道发现,在受重金属污染的华北代表性农田中,蚯蚓物种丰富度和种群密度都显著下降(袁方曜等,2004)。本研究结果显示,土壤重金属污染不仅显著影响粉正蚓的种群数量,而且显著

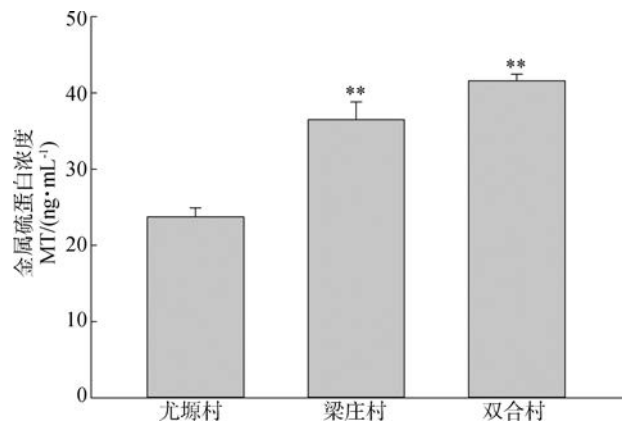


图 2 重金属污染土壤对粉正蚓体内 MT 浓度的影响
Fig. 2 Effects of soil heavy metal on MT concentration of *Lumbricus rubellus*

** P < 0.01; 下同 the same below.

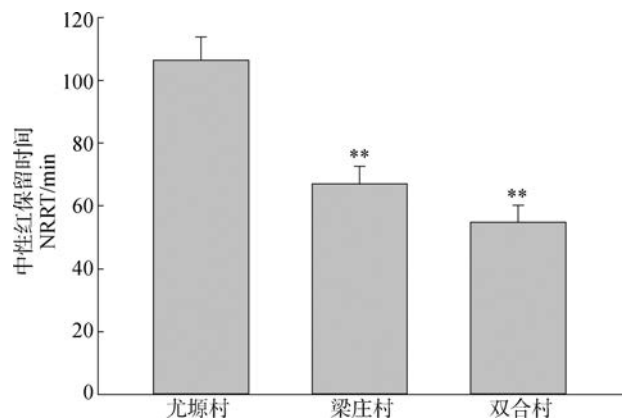


图 3 重金属污染土壤对粉正蚓溶酶体膜稳定性的影响
Fig. 3 Effects of soil heavy metal on lysosomal membrane stability of *Lumbricus rubellus*

影响其生长发育。2 个实验样地的粉正蚓幼体比例高于参照样地,可能与实验样地土壤有机质比参照

样地丰富有关,但随着幼蚓的发育,过量重金属在其体内的蓄积可能通过影响其体内消化酶的活力以及相应的生理生化功能,进而影响其生长繁殖,表现出实验样地成年粉正蚓平均体质量及种群生物量下降。王慧等(2008)也发现土壤 Cd 和 Zn 单一及复合染毒都会使蚯蚓的纤维素酶显著降低,说明重金属污染可影响成年粉正蚓的消化,进而导致其体质量增长速度减缓。

3.2 土壤重金属污染对粉正蚓抗氧化酶活性的影响

本研究发现,3个样地中粉正蚓的抗氧化酶活性差异均无统计学意义。室内相关研究发现,Cu、Zn、Pb 和 Cd 复合染毒会导致赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida* 组织内 SOD 活性发生“抑制-诱导-抑制-抑制”,CAT 活性出现先诱导后抑制的动态响应过程(郑丽萍等,2015)。Cr、Ag 和 Cu 对赤子爱胜蚓体内 GSH-PX 活力也呈现先诱导后减弱的趋势,这可能与重金属元素与 GSH-PX 的前体结合,减少了 GSH-PX 的生成有关(李超民等,2015)。总之,室内研究结果显示蚯蚓在重金属污染胁迫条件下,短时期内其抗氧化酶活力主要表现为被抑制现象,而本研究结果显示长期处于土壤重金属污染胁迫条件下的粉正蚓,其体内抗氧化酶活性则趋于适应性的新平衡状态。因此,本研究认为采用传统的蚯蚓酶活指标指示土壤环境污染程度的方法有待进一步规范。

3.3 土壤重金属污染对粉正蚓 MT 浓度的影响

污染地区粉正蚓体内的 MT 浓度显著高于未污染地区,说明粉正蚓在受到重金属污染胁迫时体内发生了应激反应,诱导体内产生 MT,将重金属离子螯合,清除体内自由基,对机体起到解毒作用。有研究发现,在室内条件下将蚯蚓暴露于不同浓度 Pb 或 Zn 的土壤中,28 d 后蚯蚓体内的 MT 水平显著升高(Maity *et al.*, 2011)。本研究结果与 Calisi 等(2013)对采自野外重金属污染条件下的陆正蚓 *L. terrestris* 的 MT 研究结果完全一致。说明 MT 浓度指标作为土壤重金属污染程度的标志物较为可靠。

3.4 土壤重金属污染对粉正蚓溶酶体膜的影响

对粉正蚓的体腔细胞进行中性红染色时,细胞内的溶酶体能很快吸收中性红染料,在光学显微镜下观察到的体腔细胞为透明椭圆形。如果中性红从

溶酶体中渗漏出来,在光学显微镜下观察到的体腔细胞为粉红色。因此,NRRT 缩短程度与溶酶体膜损伤程度一致,NRRT 常被作为溶酶体膜损伤程度的指示物。蚯蚓的体腔细胞主要分为组织黄细胞、嗜中性细胞、嗜酸性细胞和嗜碱性细胞,而这 4 类细胞均是蚯蚓细胞免疫的重要组成细胞。有报道发现 Pb 染毒后,赤子爱胜蚓的 NRRT 显著缩短,且 NRRT 与 Pb 浓度呈显著正相关性(王秋丽等,2007)。本研究中,实验样地粉正蚓的 NRRT 缩短,这一结果与 Gestel 等(2009)对受污染的洪泛平原环境中蚯蚓的 NRRT 情况一致。说明重金属污染可导致蚯蚓体腔细胞溶酶体膜受损,影响其免疫系统与机体正常的代谢活动,进而导致它们的生长和繁殖速率下降。

4 结论

在白银地区梁庄村和双合村农田土壤重金属 Cd、Pb、Zn、Cu 为主要污染的条件下,粉正蚓种群密度、生物量、成年粉正蚓的平均体质量均显著低于相对无污染地区,这可能与重金属污染致蚯蚓溶酶体膜损伤以及应激反应增强,粉正蚓体质状况下降、繁殖能力减弱有关,更为直接的原因及机理有待进一步研究。

致谢:感谢郭蕊同学在野外样方统计与采样过程中的帮助;感谢韩江媛同学在酶活测定与体腔细胞提取实验过程中提供的帮助。

参考文献:

- 李超民,胡吉林,赵丽,等. 2015. 重金属对蚯蚓体内金属硫蛋白和谷胱甘肽过氧化物酶的影响[J]. 浙江农业学报, 27(4): 544-548.
- 梁海燕,李银生,孙静,等. 2007. 铝离子污染胁迫对蚯蚓重要抗氧化酶活性的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 25(6): 551-555.
- 王慧,张玉龙,党秀丽,等. 2008. 土壤镉、锌污染对蚯蚓纤维素酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 17(2): 661-665.
- 王秋丽,朱琳,黄碧捷,等. 2007. 土壤铅污染对蚯蚓体腔细胞溶酶体的毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 26(5): 1874-1878.
- 袁方曜,王玢,牛振荣,等. 2004. 华北代表性农田的蚯蚓群落与重金属污染指示研究[J]. 环境科学研究, 17(6): 70-72.
- 郑丽萍,王国庆,林玉锁,等. 2015. 贵州省典型矿区土壤重金属污染对蚯蚓的毒性效应评估[J]. 生态毒理学报, 10(2): 258-265.
- Calisi A, Zaccarelli N, Lionetto MG, *et al.* 2013. Integrated biomarker analysis in the earthworm *Lumbricus terrestris*: application to the moni-

- toring of soil heavy metal pollution [J]. *Chemosphere*, 90(11): 2637-2644.
- Gestel CAMV, Koolhaas JE, Hamers T, *et al.* 2009. Effects of metal pollution on earthworm communities in a contaminated floodplain area; linking biomarker, community and functional responses [J]. *Environmental Pollution*, 157(3): 895-903.
- Li XY, Xu ZL, Wu JY, *et al.* 2010. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm *Eisenia fetida* in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure [J]. *Bioresource Technology*, 101(10): 3430-3436.
- Maity S, Roy S, Bhattacharya S, *et al.* 2011. Metallothionein responses in the earthworm *Lampito mauritii* (Kinberg) following lead and zinc exposure: a promising tool for monitoring metal contamination [J]. *European Journal of Soil Biology*, 47(1): 69-71.
- Nahmani J, Hodson ME, Black S. 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms [J]. *Environmental Pollution*, 145(2): 402-424.
- Satchell JE. 1983. Earthworm ecology in forest soils[M]// Satchell JE. Earthworm ecology from Darwin to Vermiculture. London: Chapman and Hall Ltd. : 161-170.
- Vandecasteele B, Samyn J, Quataert P, *et al.* 2004. Earthworm biomass as additional information for risk assessment of heavy metal biomagnification: a case study for dredged sediment-derived soils and polluted floodplain soils [J]. *Environmental Pollution*, 129(3): 363-375.
- Weeks JM, Svendsen C. 1996. Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper (pages 1801-1805) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(10): 1801-1805.