利用彗星试验检测 Cu^{2+} 对驯化蚯蚓的基因损伤*

徐 池 陈剑东 徐 莉 胡 锋 李辉信**
(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘 要 为研究 Cu^{2+} 对驯化蚯蚓的损伤影响,将赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)在非致死浓度(100 mg Cu^{2+} · kg^{-1})下驯化培养 2 周,以未驯化的蚯蚓为对照,测定 Cu^{2+} 对驯化及未驯化蚯蚓的急性毒性,并通过彗星试验(comet assay)观察铜胁迫下(400 mg · kg^{-1})驯化后蚯蚓基因损伤的动态变化。结果显示:14 d 时,Cu^{2+} 对驯化蚯蚓和未驯化蚯蚓的半致死浓度(LC_{50})分别为 321.83 ~ 542.45 和 230.83 ~ 342.91 mg · kg^{-1},驯化后蚯蚓的存活率得到显著提高。彗星试验结果表示:蚯蚓体腔细胞的尾长、尾部 DNA 含量以及尾矩呈非正态分布,在 11 和 14 d 时,驯化后的蚯蚓基因损伤程度明显比未驯化蚯蚓低。彗星试验是检测 Cu^{2+} 对蚯蚓活体基因损伤的有效手段,蚯蚓体的 DNA 损伤可以作为指示重金属污染物影响的生物标志物。

关键词 蚯蚓; Cu^{2+}; 驯化; 彗星试验; 基因损伤
中图分类号 X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)7-1791-07

Detection of Cu^{2+}-induced DNA damage of acclimated earthworms by comet assay. XU Chi, CHEN Jian-dong, XU Li, HU Feng, LI Hui-xin** (*College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(7): 1791-1797.

Abstract: To study the damage of Cu^{2+} to acclimated earthworms, *Eisenia fetida* was acclimated under the exposure to a non-lethal concentration of copper (100 mg Cu^{2+} · kg^{-1}) for two weeks, with the un-acclimated *E. fetida* as the control. The acute toxicity of Cu^{2+} to the acclimated and un-acclimated *E. fetida* was determined, and the DNA damage of acclimated *E. fetida* under Cu^{2+} stress (400 mg · kg^{-1}) was detected by comet assay. On day 14, the 50% lethal concentration (LC_{50}) of Cu^{2+} for acclimated and un-acclimated *E. fetida* was 321.83 - 542.45 and 230.83-342.91 mg · kg^{-1}, respectively, and the survival rate of acclimated *E. fetida* increased significantly. The comet assay showed that the tail length, tail DNA content, and tail moment of the earthworms were in non-normal distribution. On day 11 and day 14, the damaged level of DNA in acclimated *E. fetida* was much lower than that in un-acclimated *E. fetida*. The results indicated that comet assay was an effective way to detect the gene damage of living *E. fetida* under copper stress, and the DNA damage of *E. fetida* could be used as a biomarker to indicate the impacts of heavy metals pollutants.

Key words: earthworm; Cu^{2+}; acclimatization; comet assay; DNA damage.

蚯蚓作为陆地生态系统的重要组成部分,能够通过对生态系统中有机物质的分解转化,维持土壤的通气性,增进土壤肥力,并改善土壤结构(Langdon *et al.*,1999)。此外,蚯蚓作为指示土壤污染状况,评价土壤质量的受试材料,已被广泛应用于土壤污染的生态毒理评价。

Langdon 等(2005)对 3 种蚯蚓进行了铅的毒性试验,发现不同种类、不同地区的蚯蚓,其耐受性能存在着差异。已有不少研究发现生活在污染土壤中的蚯蚓会对环境产生耐受性(Posthuma & Van Straalen, 1993; Langdon *et al.*, 2002; Rozen, 2006)。Button 等(2010)在砷污染土采集到的耐性蚯蚓(*Lumbricus rubellus*),与生长于无污染土壤中的蚯蚓(*L. terrestris*)进行对比实验,发现耐性蚯蚓可以生物富集更高浓度的砷,而其 DNA 损伤程度却显著低

* 国家环保公益性项目(201009032)资助。
** 通讯作者 E-mail: huixinli@njau.edu.cn
收稿日期: 2011-12-31 接受日期: 2012-03-19

于普通蚯蚓。因而可将耐性蚯蚓接入污染土壤中，应用于土壤的重金属修复。但是由于矿区中耐性蚯蚓的数量有限，而其采集与繁殖也存在较大的难度，因此有研究者希望驯化适应能力强、繁殖快的赤子爱胜蚓，来提高蚯蚓耐重金属的能力。Gudbrandsen等(2007)将赤子爱胜蚓放于22 mg·kg^{-1}汞污染土壤中培养1周后，发现培养后的蚯蚓在高浓度汞污染土壤中的存活率显著提高，半致死浓度LC_{50}由未驯化时的170 mg Hg·kg^{-1}提高至545 mg Hg·kg^{-1}。目前对蚯蚓重金属耐性的研究仍处于起步阶段，仅在少数国外文献中可以看到(Piearce *et al.*, 2002; Gudbrandsen *et al.*, 2007; Langdon *et al.*, 2009)，且多侧重于蚯蚓体内酶的变化(Andre *et al.*,2010;Bernard *et al.*,2010)，从基因损伤角度观察驯化蚯蚓耐受性能的研究还很少。

彗星试验(comet assay)，又称为单细胞凝胶电泳试验(single cell gel electrophoresis, SCGE)，是一种快速、灵敏的检测单个细胞基因损伤的重要方法，常用来评价彗星试验结果的定量指标为：彗星尾长(tail length, TL)、尾部DNA含量(tail DNA content, TD)和尾矩(tail moment, TM)。已有研究证明通过彗星试验可以有效地确定蚯蚓染毒后体腔细胞的损伤水平(Reinecke & Reinecke, 2004)，近年来在环境毒理学领域得到广泛应用。

本实验以Cu^{2+}为研究物质，采用自然土壤法，将赤子爱胜蚓在非致死浓度(100 mg·kg^{-1})下进行驯化培养后，研究Cu^{2+}对驯化后蚯蚓及未驯化蚯蚓的急性毒性效应；并将驯化及未驯化的蚯蚓置于高浓度污染土(400 mg·kg^{-1})中，通过彗星试验来观察Cu^{2+}胁迫下驯化蚯蚓基因损伤的动态变化，以期为重金属污染的基因毒理诊断和环境污染检测提供研究方法。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

仪器包括：冷冻离心机(Sigma 3K30)、恒温磁力搅拌器(521-1型)、DYY-8C型稳压稳流电泳仪、DYY-Ⅲ型电泳槽、Leica DM5000B型显微镜。

实验试剂包括：低熔点琼脂糖(low melting agarose, LMA)，肌氨酸钠(N-lauroyl-sacosine sodium salt)购自Solarbio公司，愈创木酚甘油醚(guaiacolglyceryl ether)，吖啶橙(AO)，TritonX-100，二甲亚砜(DMSO)购自Sigma公司，无水乙醇，$CuSO_4 \cdot 5H_2O$等试剂均为分析纯。

磷酸缓冲液(PBS)：NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g, H_2O 800 mL，用HCl调节pH至7.4后，定容至1000 mL；体腔细胞提取液：5%乙醇，95%生理盐水，2.5 mg·mL^{-1} Na_2-EDTA，10 mg·mL^{-1}愈创木酚甘油醚；1.0%低熔点琼脂糖(无菌PBS配制)；细胞裂解液：2.5 mol·L^{-1} NaCl，100 mmol·L^{-1} Na_2-EDTA，10 mmol·L^{-1} Tris，1%肌氨酸钠，pH 10.0，临用前加入1% TritonX-100，10% DMSO，用前冷藏30～60 min；电泳缓冲液：300 mmol·L^{-1} NaOH，1 mmol·L^{-1} Na_2-EDTA，pH 13.0；吖啶橙溶液20 μg·mL^{-1}。

1.2 实验材料

1.2.1 蚯蚓 赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)，购于南京某蚯蚓养殖场。试验前，选择体重在0.4 g左右，具有明显环带、体态相似的健康成蚓，将其放在铺有纱布的培养皿中，纱布用无菌水湿润，置于20 ℃恒温箱中吐泥清空肠道24 h。

1.2.2 土壤 供试土壤为江苏南京市的黄棕壤(0～20 cm)，其理化性质为：pH 6.91，有机质含量9.94 g·kg^{-1}，全氮含量0.68 g·kg^{-1}，碱解氮54.05 mg·kg^{-1}，有效磷3.64 mg·kg^{-1}，速效钾90.12 mg·kg^{-1}。土壤风干后磨碎，过2 mm筛待用。

1.3 土壤污染方法

称取100 g过20目筛的风干土壤于塑料钵中，加入$CuSO_4 \cdot 5H_2O$，制成不同浓度的Cu^{2+}污染土壤，设置污染水平为50、100、200、300、400、600、800 mg·kg^{-1}，干湿交替培养45 d，使土壤中各形态重金属分配平衡。试验前调节含水量为田间最大持水量的60%～70%，每个浓度设置3个重复。

1.4 蚯蚓驯化

蚯蚓低浓度驯化(X)：在Cu^{2+}浓度为100 mg·kg^{-1}土中，每个盆钵加入5条赤子爱胜蚓，温室培养驯化14 d，温度控制在20～22 ℃。培养过程中保持土壤水分在田间持水量的60%～70%。设置10个重复。

未驯化蚯蚓(CK)：在干净土壤中，温室培养，培养方法同上。

1.5 急性毒性试验

1.5.1 试验设置 该试验采用自然土壤法。选择Cu^{2+}浓度为50、100、200、300、400、600、800 mg·kg^{-1}土作为试验土壤，将清肠后的驯化蚯蚓放入盛有污染土的塑料盆钵中，每个处理加入5条蚯蚓，以未驯

化的蚯蚓为对照,每个浓度设置 3 个重复,温室培养,实验温度控制在 20 ~22℃。

1.5.2　数据采集　在蚯蚓处理的 7 和 14 d 时,记录驯化蚯蚓以及未驯化蚯蚓的死亡数及中毒症状,蚓体对针刺无反应判为死亡。

1.6　彗星试验

1.6.1　实验设置　选择 Cu^{2+}浓度为 400 mg·kg^{-1}(染毒方法同 1.3)为试验土壤,每个盆钵加入 5 条驯化蚯蚓,以未驯化的蚯蚓为对照,温室培养。在蚯蚓处理的 1、3、5、7、11、14 d 进行破坏性采样,每钵采集两条蚯蚓。每个处理 3 个重复,共 36 个盆钵。

1.6.2　蚯蚓体腔细胞悬液的制备　取 1.5 mL Eppendorf 管,将蚯蚓放入管中,加入 1 mL 4 ℃生理盐水,浸泡 2 ~3 min,使蚯蚓排出体内杂物,重复 1 次。吸取 1 mL 体腔细胞提取液(extrusion medium,EM)于 Eppendorf 管,将洗净的蚯蚓放入管中,3 ~4 min 后提取液呈黄色,取出死亡蚯蚓,4 ℃ 3000 r·min^{-1}离心 10 min,除去上清液,加入 1 mL PBS 缓冲液(4 ℃),用移液枪轻轻吹打液面,洗涤细胞,同条件下离心,重复 2 次。

1.6.3　实验步骤

胶板制备:本实验改进高建军等(2004)提出的 96 孔聚苯乙烯培养板盖,利用 12 孔聚苯乙烯培养板盖来承载胶片,利用孔凸边形成的规则的圆形凹槽,进行单层铺胶。此方法更加利于后期荧光显微镜下观察,同时缩短了铺胶时间,胶面更平整,不易脱胶。

铺胶:将蚯蚓体腔细胞悬液与 1% LMA 按体积比 1∶3 混合均匀后,吸取 200 μL 平铺于预热的载胶片孔槽内(200 μL·$孔^{-1}$),铺胶后转入暗盒中,4 ℃冷藏 5 min,使胶固化。

裂解:将铺好的胶浸入新鲜配制的 4 ℃细胞裂解液中,裂解 2 h 后拿出,用 4 ℃预冷的蒸馏水冲洗 2 次。

解旋,电泳:将胶板置于新鲜配制的 4 ℃强碱电泳缓冲液中,使 DNA 解旋,浸泡 20 min 后开始电泳,电压设置为 20 V,200 mA。电泳结束后,将胶板浸入 pH 7.5 的 Tris-HCl 溶液中和,每次 5 min,重复 3 次。

乙醇脱水:取出已经中和的胶板,迅速置于 4 ℃无水乙醇中脱水 10 min,后置于空气中自然晾干。干燥好的胶板置于载玻片盒中,4 ℃冰箱保存,48 h 内观察。

染色:观察图像前,胶片用 100 μL 20 μg·mL^{-1}的 A.O 染色 10 min,用去离子水洗去多余染液。

1.6.4　图像采集和数据分析　荧光显微镜下观察 A.O 染色凝胶,放大倍数为 200 倍,通过 DFC310FX 彩色数码摄像机拍摄单细胞电泳图像。图像使用 CASP 彗星图像分析软件对细胞进行随机统计,每个样品统计 100 个。分析指标采用彗星尾长(TL)、尾部 DNA 含量(TD)和尾矩(TM)。

1.7　数据统计

试验结果采用 SPSS 16.0 数据处理软件进行统计分析。采用单因素方差分析评价处理之间的显著性差异,LC_{50}(半致死浓度)及置信区间通过 Probit 模块求得。彗星试验的数据经过 Explore 统计过程以及 Kolmogrov Smirnov Test 检验数据是否成正态分布,然后采用 Mann-Whitney *U* Tests 对驯化蚯蚓与未驯化蚯蚓的测量值进行显著性差异检验($P<0.05$),用 Spearman 非参数方法分析 Cu^{2+}暴露时间与蚯蚓体腔细胞尾部 DNA 含量和尾矩之间的相关性。

2　结果与分析

2.1　急性毒性试验结果

从图1可见,染毒7 d时,2组蚯蚓均在Cu^{2+}浓

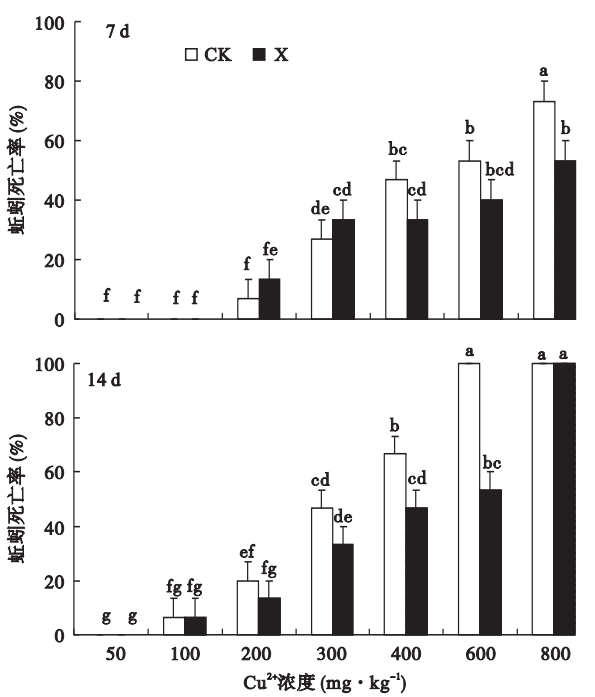


图1　Cu^{2+}浓度与驯化(X)以及未驯化蚯蚓(CK)死亡率的剂量-效应关系

Fig. 1　A dose-effect relationship between Cu^{2+} and its acute toxicity to acclimated earthworms (X) and non pre-exposed earthworms (CK)

数值为平均值±标准误;不同小写字母表示同处理时间段内不同处理组间的差异性显著($P<0.05$)。

度为200 mg·kg^{-1}时开始出现死亡现象,在Cu^{2+}浓度为800 mg·kg^{-1}时,未驯化蚯蚓的死亡率达到73.33%,而驯化蚯蚓的死亡率为53.33%,存在显著性差异。赤子爱胜蚓对Cu^{2+}的耐受性能个体间差异较大,200和300 mg·kg^{-1}的浓度对驯化蚯蚓的抑制作用较强,可能是由于驯化蚯蚓先期在100 mg·kg^{-1}土壤中存活了14 d,体内已经富集了部分Cu^{2+},短期内导致其死亡率略高于未驯化蚯蚓,但不存在显著性差异;当土壤中浓度超过400 mg·kg^{-1}时,Cu^{2+}对蚯蚓的抑制作用显著增强,驯化蚯蚓由于某种应激作用,其死亡率低于未驯化蚯蚓。

染毒14 d,随着Cu^{2+}浓度的增加,蚯蚓死亡率显著增大。在400和600 mg·kg^{-1}时,未驯化蚯蚓的死亡率显著高于驯化蚯蚓,在Cu^{2+}浓度为600 mg·kg^{-1}处,未驯化蚯蚓已经达到全部死亡,而驯化后蚯蚓的死亡率为53.33%。在最高染毒浓度组(Cu^{2+}浓度为800 mg·kg^{-1}),2种蚯蚓死亡率均为100%。

由表1可见,14 d时,Cu^{2+}对驯化蚯蚓及未驯化蚯蚓急性毒性的LC_{50}分别为321.83 ~ 542.45 mg·kg^{-1}及230.83 ~342.91 mg·kg^{-1},可见,经100 mg·kg^{-1}土中驯化培养后的蚯蚓对Cu^{2+}污染的耐性显著提高,其存活率也明显增加。

表1 Cu^{2+}对驯化蚯蚓(X)以及未驯化蚯蚓(CK)的急性毒性统计结果

Table 1 Acute toxicity statistical results of Cu^{2+} on acclimated earthworms (X) and non pre-exposed earthworms (CK)

处理	LC_{50}(mg·kg^{-1})			
	7 d	95%置信区间	14d	95%置信区间
未驯化蚯蚓	489.92	407.09 ~599.06	283.00	230.83 ~342.91
驯化蚯蚓	607.32	470.77 ~842.74	411.90	321.83 ~542.45

2.2 不同Cu^{2+}暴露时间下蚯蚓体腔细胞基因损伤的动态变化

设置Cu^{2+}浓度为400 mg·kg^{-1},观察14 d内驯化以及未驯化蚯蚓体腔细胞损伤的动态变化。获得蚯蚓体腔细胞的彗星试验图像。图2 a、b为未受损以及受损的蚯蚓体腔细胞彗星试验图片,采用分析软件CASP将细胞DNA的彗星试验图像转化为数字数据(Konca *et al.*,2003)。

不同采样时间(1、3、5、7、11、14 d),驯化蚯蚓(X)与未驯化蚯蚓(CK)的体腔细胞尾长、尾部DNA含量以及尾矩的数据结果见表2。随着Cu^{2+}暴露时间的延长,驯化及未驯化蚯蚓的细胞尾长、尾部DNA含量和尾矩都有明显的增加,并且具有很好的一致性,说明400 mg Cu^{2+}·kg^{-1}对这2种蚯蚓都具有一定的胁迫作用。从表2可见,驯化后蚯蚓的尾长变化范围在11.57 ~29.43 μm,尾部DNA百分比含量在1.39% ~10.62%,尾矩变化范围为0.25 ~4.55 μm,变化幅度小于对照组。驯化蚯蚓与未驯化蚯蚓3项指标均在14 d时达到最大值,说明暴露时间越长,Cu^{2+}造成的基因损伤越大。

在表2中,驯化蚯蚓在1 d时尾部DNA含量比未驯化蚯蚓略高,这可能是由于驯化蚯蚓在100 mg·kg^{-1}土壤中培养了2周,虽是非致死的浓度,但也对蚯蚓体造成了一部分损伤。随着暴露时间的延长,在第3天采样后,驯化后蚯蚓的尾部DNA含量开始低于未驯化蚯蚓,在11 d时驯化后蚯蚓体腔细胞与未驯化蚯蚓的尾部DNA含量分别为8.47%和9.93%,在14 d时分别达到10.61%和11.12%,存在显著性差异(P<0.05),这种差异同样存在于尾长以及尾矩中。实验结果说明经低浓度铜驯化后的蚯

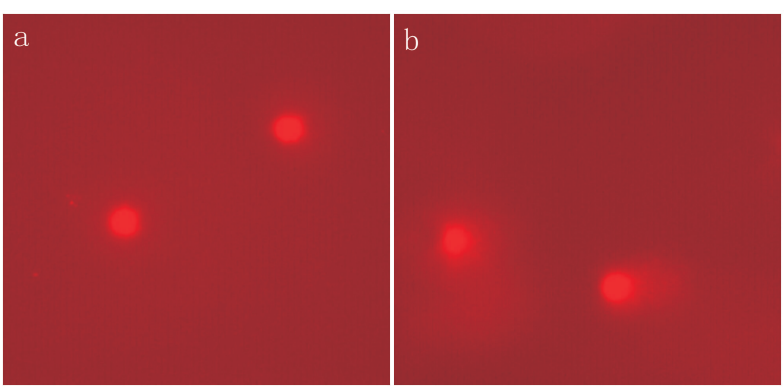


图2 蚯蚓的体腔细胞彗星试验图片

Fig. 2 Typical comet images of earthworms' coelomocytes cells

a未受损的蚯蚓体腔细胞彗星试验图片,b受损的蚯蚓体腔细胞彗星试验图片。

表 2　Cu^{2+} 暴露时间对驯化蚯蚓及未驯化蚯蚓体腔细胞基因损伤的动态影响

Table 2　Dynamic effect of exposed time with Cu^{2+} of the DNA damage on coelomocytes cells of acclimated earthworms (X) and non pre-exposed earthworms (CK)

Cu^{2+} 暴露时间(d)	尾长(μm)		尾部 DNA 含量(%)		尾矩(μm)	
	CK	X	CK	X	CK	X
1	10.52±0.83	11.57±0.75	0.96±0.13	1.39±0.16 *	0.14±0.03	0.25±0.04 *
3	12.26±0.88	12.36±0.74	1.50±0.20	1.42±0.15	0.31±0.06	0.26±0.04
5	18.38±1.48	15.35±1.24	3.81±0.40	2.61±0.25	1.11±0.17	0.62±0.09
7	28.72±1.82	25.92±1.75	8.32±0.76	7.44±0.65	3.50±0.42	2.66±0.34
11	30.03±1.66	26.59±1.64 *	9.93±0.66	8.47±0.59 *	3.77±0.43	2.85±0.32 *
14	34.55±2.28	29.43±2.05 *	11.12±0.88	10.62±0.83 *	5.57±0.76	4.55±0.65 *

数值为平均值±标准误,同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。* 表示与对照差异显著($P<0.05$)。

表 3　Cu^{2+} 污染下蚯蚓的暴露时间、尾长、尾部 DNA 含量以及尾矩的相关性(Spearman,$n=600$)

Table 3　Correlation among different time of exposed to Cu^{2+}, tail length, tail DNA percent and tail moment by comet assay

不同蚯蚓处理		Spearman 秩相关系数			
		Cu^{2+} 暴露时间(d)	尾长(μm)	尾部 DNA 含量(%)	尾矩(μm)
驯化蚯蚓(X)	Cu^{2+} 暴露时间(d)	1	0.457 * *	0.668 * *	0.612 * *
	尾长(μm)	0.457 * *	1	0.842 * *	0.931 * *
	尾部 DNA 含量(%)	0.668 * *	0.842 * *	1	0.978 * *
	尾矩(μm)	0.612 * *	0.931 * *	0.978 * *	1
对照(CK)	Cu^{2+} 暴露时间(d)	1	0.540 * *	0.718 * *	0.686 * *
	尾长(μm)	0.540 * *	1	0.837 * *	0.927 * *
	尾部 DNA 含量(%)	0.718 * *	0.837 * *	1	0.977 * *
	尾矩(μm)	0.686 * *	0.927 * *	0.977 * *	1

* * 在 0.01 水平上显著相关。

蚓在受胁迫环境下,细胞的受损程度比未驯化蚯蚓低,具有较强的耐受性能。

2.4　Cu^{2+} 暴露下蚯蚓基因损伤效应的评价参数选择

从表 3 可以看出,尾长、尾部 DNA 含量以及尾矩与 Cu^{2+} 暴露时间都存在显著正相关关系($P<0.01$),具有良好的时间-效应关系。在驯化蚯蚓的数据中,尾长、尾部 DNA 含量以及尾矩与 Cu^{2+} 暴露时间之间的相关系数分别为 0.457、0.688 和 0.612。尾部 DNA 含量与 Cu^{2+} 暴露时间的相关程度最高,这种情况也同样存在于未驯化蚯蚓的分析结果中,这可能是由于尾部 DNA 含量在反映蚯蚓体腔细胞损伤程度时,敏感度较高。在本实验中,通过与三项指标与 Cu^{2+} 暴露时间相关性分析,可以看到在评价蚯蚓体腔细胞损伤程度时,与暴露时间最敏感的指标依次为尾部 DNA 含量,尾矩以及尾长。因此评价细胞基因损伤时,采用尾部 DNA 含量更为精确。

此外,驯化蚯蚓的尾长与尾部 DNA 含量、尾矩之间的相关系数分别为 0.842 和 0.931,CK 的尾长与尾部 DNA 含量、尾矩的相关系数为 0.837 和 0.927(表 3),表明尾长与尾部 DNA 含量,尾矩之间都表现出显著正相关($P<0.01$)。

3　讨　论

由本研究可见,经驯化后的蚯蚓在高浓度的 Cu^{2+} 污染土壤中具有一定的适应性,与未驯化蚯蚓相比,驯化后蚯蚓受到的损伤明显较小,表现出一定的耐受性能。一般情况下,蚯蚓在受到 Cu^{2+} 胁迫时,体内氧自由基会不断生成,等氧自由基累积到一定浓度后,可导致脱氧核糖核酸链断裂,线粒体 DNA 缺失突变以及其他亚细胞结构的损害(Cooke *et al.*,2003;Song *et al.*,2009),从而使蚯蚓死亡。有研究发现,在高浓度重金属污染土壤中,驯化后蚯蚓的体内金属硫蛋白(MT)以及谷胱甘肽转移酶的含量均明显高于未驯化蚯蚓(Lukkari *et al.*,2004;Asensio *et al.*,2007),MT 是一类低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白的总称,其巯基(-SH)可以被重金属胁迫产生的活性氧化物质(ROS)氧化,形成二硫键(S-S)并释放出结合的金属离子,从而避免蛋白质结构和功能发生不可逆的改变(Demuynck *et al.*,2007;张高川等,2010),在重金属代谢和解毒中具有重要功能(Bernard *et al.*,2010),蚯蚓通过低

浓度重金属的短期驯化后,其代谢解毒能力可能得到增强(Posthuma *et al.*,1993)。

Button 等(2010)认为,这种耐性的产生是由于多组分反应机制的联合效应。当遇到高浓度污染时,耐性蚯蚓表现出一定的防御机制来抵抗基因损伤,使其能够更好地在高浓度污染环境中生存。在本实验中,驯化后蚯蚓在 Cu^{2+} 污染土壤中受到的损伤程度显著低于未驯化蚯蚓,这可能与蚯蚓自身的 DNA 修复以及对 Cu^{2+} 的外排能力有关,当 Cu^{2+} 浓度较高时,蚯蚓的外排能力增强,从而减少了蚯蚓在污染土壤中受到的胁迫(Ma,2005;卜元卿等,2006)。

彗星试验作为一种敏感的化合物遗传毒性测试手段,可对复杂混合体系的联合遗传毒性做出较为准确和快速的评价(Button *et al.*,2010)。彗星试验可以从分子水平上,清晰地观察到蚯蚓暴露过程中 DNA 的损伤变化,对实验数据的统计分析后,可准确地定量描述土壤中污染物造成的动物细胞 DNA 单链断裂(陈颖等,2005)。该方法的建立,对研究土壤中污染物的危害具有重要意义。

4 小 结

本实验将蚯蚓在 Cu^{2+} 浓度为 100 mg·kg^{-1} 土中驯化培养 2 周后,以未驯化的蚯蚓为对照,进行了急性毒性及彗星试验,得到以下结论:1)与未驯化蚯蚓相比,驯化后的蚯蚓在 Cu^{2+} 污染土壤中的存活率显著增加;2)通过彗星试验发现,驯化后蚯蚓的基因损伤程度明显比未驯化蚯蚓低,表现出一定的耐受性能。蚯蚓的尾部 DNA 含量,是指示重金属污染基因毒性变化最敏感的指标,其体腔细胞的 DNA 损伤可以作为指示污染物影响的生物标志物。

目前对驯化后蚯蚓表现出的低死亡率,低损伤的研究还很少,对于产生的这一现象的机理研究还并不明确。本实验仅以 Cu^{2+} 作为污染介质,蚯蚓对其他污染物是否具有驯化效应,还需进一步研究。

参考文献

卜元卿, 骆永明, 滕 应, 等. 2006. 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, **1**(3): 228-235.

陈 颖, 王子健, 2005. 用彗星试验检测土壤污染对蚯蚓活体基因损伤. 土壤学报, **42**(4): 577-583.

高建军, 丰盛梅, 金慰芳. 2004. 碱性单细胞凝胶电泳铺胶技术的改进. 复旦学报(医学版), **1**(3): 311-312.

张高川, 张春华, 葛 滢. 2010. 镉胁迫下蚯蚓金属硫蛋白氧化修饰的研究. 生态毒理学报, **5**(4): 558-562.

Andre J, Stürzenbaum SR, Kille P, *et al.* 2010. Metal bioaccumulation and cellular fractionation in an epigeic earthworm (*Lumbricus rubellus*): The interactive influences of population exposure histories, site-specific geochemistry and mitochondrial genotype. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**: 1566-1573.

Asensio V, Kille P, Morgan AJ, *et al.* 2007. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *European Journal of Soil Biology*, **43**: 233-238.

Bernard F, Brulle F, Douay F, *et al.* 2010. Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an "exposure/depuration" experimental scheme with field soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**: 1034-1045.

Button M, Jenkin GR, Bowman KJ, *et al.* 2010. DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use of the Comet assay. *Mutation Research*, **696**: 95-100.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, *et al.* 2003. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation and disease. *Faseb Journal*, **17**: 1195-1214.

Demuynck S, Grumiaux F, Mottier V, *et al.* 2007. Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **145**: 658-668.

Gudbrandsen M, Sverdrup L, Aamodt S, *et al.* 2007. Short-term pre-exposure increases earthworm tolerance to mercury. *European Journal of Soil Biology*, **43**: 261-267.

Konca K, Lankoff A, Banasik A, *et al.* 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **534**: 15-20.

Langdon CJ, Hodson ME, Arnold RE, *et al.* 2005. Survival, Pb-uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and a soil avoidance test. *Environmental Pollution*, **138**: 368-375.

Langdon CJ, Meharg AA, Feldmann J, *et al.* 2002. Arsenic-speciation in arsenate-resistant and non-resistant populations of the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Journal of Environmental Monitoring*, **4**: 603-608.

Langdon CJ, Morgan AJ, Charnock JM, *et al.* 2009. As-resistance in laboratory-reared F1, F2 and F3 generation off-

spring of the earthworm *Lumbricus rubellus* inhabiting an As-contaminated mine soil. *Environmental Pollution*, **157**: 3114-3119.

Langdon CJ, Piearce TG, Black S, *et al*. 1999. Resistance to arsenic-toxicity in a population of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Soil Biology & Biochemistry*, **31**: 1963-1967.

Lukkari T, Taavitsainen M, Soimasuo M, *et al*. 2004. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: Differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environmental Pollution*, **129**: 377-386.

Ma WC. 2005. Critical body residues (CBRs) for ecotoxicological soil quality assessment: Copper in earthworms. *Soil Biology & Biochemistry*, **37**: 561-568.

Piearce TG, Langdon CJ, Meharg AA, *et al*. 2002. Yellow earthworms: Distinctive pigmentation associated with arsenic- and copper-tolerance in *Lumbricus rubellus*. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**: 1833-1838.

Posthuma L, Van Straalen NM. 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **106**: 11-38.

Reinecke SA, Reinecke AJ. 2004. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **46**: 208-215.

Rozen A. 2006. Effect of cadmium on life-history parameters in *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae: Oligochaeta) populations originating from forests. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**: 489-503.

Song Y, Zhu LS, Wang J, *et al*. 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biology & Biochemistry*, **41**: 905-909.

作者简介　徐　池,女,1988 年生,硕士,主要从事污染生态学研究。E-mail: xuchinanjing@sina.com

责任编辑　刘丽娟