应用生态学报 2013年12月 第24卷 第12期
Chinese Journal of Applied Ecology, Dec. 2013,**24**(12): 3581-3587

基于综合生物标志物响应指数法评估近岸海洋环境压力——以广西西部沿海为例*

邢永泽 周浩郎 吴 斌 阎 冰**
(广西红树林研究中心/广西红树林保护与利用重点实验室, 广西北海 536007)

摘 要 2011—2012年,在广西西部沿海设置5个站点,以野生文蛤作为指示生物进行3次采样监测.从个体、细胞和分子水平选择了钻沙所需时间、吞噬能力、溶酶体膜稳定性、血浆三价铁还原力、乙酰胆碱酯酶活性及彗星率6项指标,利用综合生物标志物响应指数模型(IBR),整合上述生物标志物指标,并转化为形象直观的星状图,对调查站点的环境状况进行风险评估.结果表明:各站点的综合生物标志物响应指数值(IBR/*n*)介于2.30~8.68,茅尾海的环境压力最大,北仑河口最小.虽然不同的生物标志物对污染压力的响应存在差异,但利用IBR可以有效区分文蛤所在区域的环境压力状况.利用生物标志物的监测结果与化学监测结果基本吻合.

关键词 文蛤 生物标志物 综合生物标志物响应指数 环境压力
文章编号 1001-9332(2013)12-3581-07 **中图分类号** X8 **文献标识码** A

Assessment of marine environmental stress based on the integrated biomarker response index model: A case study in west coast of Guangxi. XING Yong-ze, ZHOU Hao-lang, WU Bin, YAN Bing (*Guangxi Mangrove Research Center/ Guangxi Key Laboratory of Mangrove Conservation and Utilization, Beihai* 536007, *Guangxi*, *China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2013, **24**(12): 3581-3587.

Abstract: *Meretrix meretrix* were collected for 3 times from 2011 to 2012, at 5 stations along west coast of Guangxi and wild and used as a biological indicator for assessing the marine environmental stress. Six biomarkers at individual, cellular and molecular levels were selected, including time required to drill the sand, phagocytic ability, stability of lysosomal membrane, ferric reducing ability of plasma (FRAP), acetylcholinesterase activity (AChE), and comet rate. Utilizing the Integrated Biological Response Index (IBR) model, the above biomarkers were integratedly analyzed and the data were displayed by intuitionistic star plots to evaluate the environmental situation of the 5 stations. The results indicated that the biological response indices (IBR/*n*) of the 5 stations varied between 2.30 and 8.68. Maowei Sea had the highest environmental stress, whereas Beilun Estuary had the lowest. Although different biomarkers were different in response to pollution stress, IBR model could effectively distinguish environmental stress of a specific area. The results of biomarker monitoring were basically in agreement with those of chemical monitoring.

Key words: *Meretrix meretrix*; biomarker; integrated biomarker response index; environmental stress.

潮间带生活着种类众多的海洋生物,同时也是人类活动最为活跃的海陆过渡带,海边废土及垃圾的倾倒、工农业污水排放,让潮间带生物面临巨大的生存压力.目前,近岸海域环境监测主要依靠化学和生物监测两种方式[1].化学监测能够及时了解污染物的分布状况,但无法反映污染物对生物体及生物群落的影响.传统的生物监测通过调查种群结构、多样性等评估生态系统的状况,但生态系统的变化要几年或几代才能检测到,当效应最终变得清楚时,破坏程度可能已超出风险削减和补救措施能够挽回的限度,监测结果具有滞后性[2].相对而言,生物标志

*国家海洋公益性行业科研专项(201005012)、广西壮族自治区科技计划项目(桂科合1010019-23)、广西壮族自治区自然科学基金项目(2011GXNSFE018001)和广西科学院科研业务费项目(11YJ-24HS03)资助.
**通讯作者. E-mail: gxybing@outlook.com
2013-03-25收稿,2013-09-29接受.

物具有反应灵敏、与污染物剂量-效应关系明显等特点. 因此,可以选择潮间带有代表性的生物,通过综合分析多种生物标志物指标,对陆源性污染物对近岸水体的影响做出风险评估,作为传统近岸海域监测的有力补充,并对海洋环境变化做出早期预警[3-4].

本文选用广西沿海潮间带广泛分布且对污染物反应敏感的文蛤(*Meretrix meretrix*)作为指示生物[5-8],选择钻沙所需时间、吞噬能力、溶酶体膜稳定性、血浆三价铁还原力(ferric reducing ability of plasma, FRAP)、乙酰胆碱酯酶活性(acetylcholinesterase activity, AChE)、彗星率 6 个指标,通过在个体、细胞、分子水平分别检测有代表性的生物标志物指标,并借助综合生物标志物响应指数模型(integrated biomarker response, IBR)对调查区域环境压力做出真实可靠的风险评估.

1 材料与方法

1.1 样品采集

依据广西西部沿海工业情况及文蛤自然分布状况,共布设 5 个调查站位——北仑河口(BLHK)、防城港(FCG)、茅尾海(MWH)、钦州湾(QZW)和麻兰岛(MLD)(图 1),分别于 2011 年 11 月、2012 年 5 月、2012 年 11 月进行采样监测. 在上述地区采集个体大小相近的野生文蛤,装入生物采样箱中,立即运回实验室,24 h 内进行试验.

1.2 生物标志物检测

每个站点随机选取 30 个文蛤作为试验对象. 经测定,供试文蛤个体鲜质量(41.75±2.75) g,壳高(45.94±1.31) mm,壳长(54.55±1.51) mm,壳宽(28.78±1.05) mm. 在上述受试对象中,取 20 个文蛤用于检测钻沙率,参照 Moschino 等[9]的方法,统计 3 h 内 50% 的受试文蛤钻沙所需时间(RT_{50}),观察文蛤行为对污染压力的响应. 取 10 个文蛤,用一次性注射器从文蛤后闭壳肌中抽取 1.5 mL 血液用于下述测定.

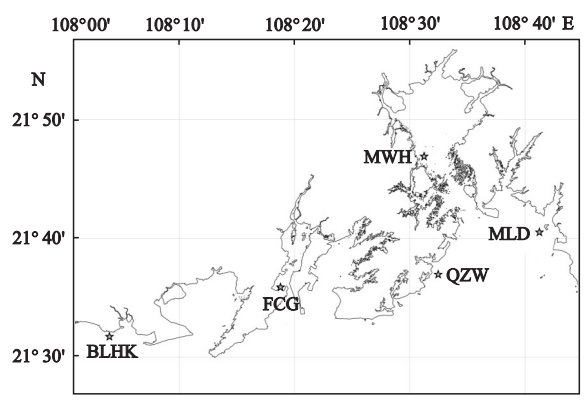


图 1 取样监测站点位置

Fig. 1 Sampling station locations.

BLHK:北仑河口 Beilun Estuary; FCG:防城港 Fangcheng Port; QZW:钦州湾 Qinzhou Bay; MWH:茅尾海 Maowei Sea; MLD:麻兰岛 Malan Island. 下同 The same below.

彗星率测定采用高建军等[10]改进的单细胞电泳法(single cell gel electrophoresis, SCGE),通过荧光镜检 200 个细胞核,计算彗星率,检测 DNA 损伤. 溶酶体膜稳定性采用中性红保持法(neutral red retention, NRR)进行测定[11-12],利用中性红浸染血细胞的溶酶体,通过记录 3 h 内受试细胞的中性红保持率降至 50% 的时间(NRRT),检测溶酶体受损伤程度. 吞噬能力测定采用改进的文献[13-14]的方法,将过量的经中性红染色的染色酵母聚糖悬液加入到血液中,通过镜检 200 个血细胞,计算酵母聚糖被吞噬率,检测细胞的免疫活性. FRAP 测定参照 Benzie 和 Strain[15]的方法,利用显色剂 Fe^{3+}-三吡啶三吖嗪(Fe^{3+}-TPTZ)可被样品中的还原物质还原为呈蓝色的 Fe^{2+}形式,并在 593 nm 处具有最大光吸收峰的特点,测定血液的总抗氧化活力强弱. AChE 活性测定采用 Gorun 等[16]改进的 Ellman 法,以碘化硫代乙酰胆碱(ATCI)为底物,5,5'-二硫双硝基苯甲酸(DTNB)为显色剂,反应产物在 412 nm 处有最大光吸收峰,检测水域中有机磷、氨基甲酸酯类杀虫剂及复杂污染物的响应. 血液中总蛋白含量采用 BCA 法测定[17].

1.3 综合生物标志物响应指数(IBR)

综合生物标志物响应指数是 Beliaeff 和 Burgeot[18]提出的一种综合运用多种生物标志物定性评估环境压力的工具. 模型首先计算每种生物标志物在各站位的平均值(X_i)以及所有站位该种生物标志物的总平均值(m)和标准差(s);然后将该标志物 X_i值进行标准化处理:$Y_i=(X_i-m)/s$, Y_i为标准化处理后的值. 如果标志物与污染呈正相关,则令 $Z=Y_i$,反之则 $Z=-Y_i$;各站位每种标志物的得分(绘图值)为 $A_i=Z+|\min|$, $|\min|$是 Z 值中最小值的绝对值;最终,某站位的 IBR 值为:$\sum_{i=1}^{N}(A_i+A_{i+l})/2(A_i+A_{i+1})/2$. 模型通过将相邻标志物的 A_i值所围成三角形的面积$[(A_i+A_{i+1})/2]$依次相加可以绘制成星状图,从而直观地反映某调查站位的 IBR 值. 由于 IBR 值与所选生物标志物指标数量(n)密切相关,将 IBR 值除以 n,以便于比较[19].

1.4　数据处理

采用 SPSS 15.0 软件对数据进行统计分析. 对数据的方差齐性进行 Levene 检验，然后运用 Tukey post-hoc 检验进行方差分析，显著性水平设定为 $\alpha = 0.05$. 如果方差不齐，则运用非参数 Kruskal-Wallis 检验.

2　结果与分析

2.1　不同监测站点的生物标志物

各生物标志物指标的 3 次监测结果（图 2）表明：2011 年 11 月，5 个监测站点的彗星率没有显著性差异；BLHK 采集文蛤的吞噬率（36.6% ±2.0%）和血浆三价铁还原力（FRAP）值（59.83 ± 1.11 μmol $FeSO_4 \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ pro）均显著低于其余 4 个站点；QZW 的乙酰胆碱酯酶活性（AChE）（0.071 ± 0.005 μmol ACTI $\cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ pro）显著低于其余 4 个站点；FCG、MWH 的中性红保持时间（NRRT）值（60±4.44 min）明显小于其余 3 个站点，MWH 的钻沙所需时间（RT_{50}）相对其他 4 个站点最长. 2012 年 5 月，5 个监测站点的彗星率没有显著性差异；在 BLHK，吞噬率（44.3% ±1.3%）显著低于其余 4 个站点；QZW、MWH 的 FRAP 值（65.05 ± 1.24 μmol $FeSO_4 \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ pro）显著低于其余 3 个站点；QZW 的 AChE 活性（0.04 ±0.004 μmol ACTI $\cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ pro）显著低于其余 4 个站点；MWH 的 NRRT 值（43.5±4.47 min）明显小于其余 4 个站点，QZW 的 RT_{50} 较其余 4 个站点所需时间最长. 2012 年 11 月，5 个监测站点的彗星率多数差异不显著；在 BLHK，吞噬率（33.4% ± 1.7%）和 FRAP 值（51.75±1.06 μmol $FeSO_4 \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ pro）显著低于其余 4 个站点；QZW 的 AChE 活性（0.079 ± 0.002 μmol ACTI $\cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ pro）显著低于其余 4 个站点；MWH 的 NRRT 值（30±5.47 min）小于其余 4 个站点，而 RT_{50} 明显高于其余 4 个站点.

2.2　综合生物标志物响应指数

2011 年 11 月，5 个监测站点 IBR/n 值顺序为：BLHK（2.30）< FCG（5.10）< MLD（5.71）< QZW（5.87）< MWH（6.99）（图 3）. 在 BLHK，彗星率、AChE、RT_{50}、NRRT 对 IBR 值贡献率相近，FRAP、吞噬率对 IBR 的贡献率相对较大. 在 FCG，彗星率、

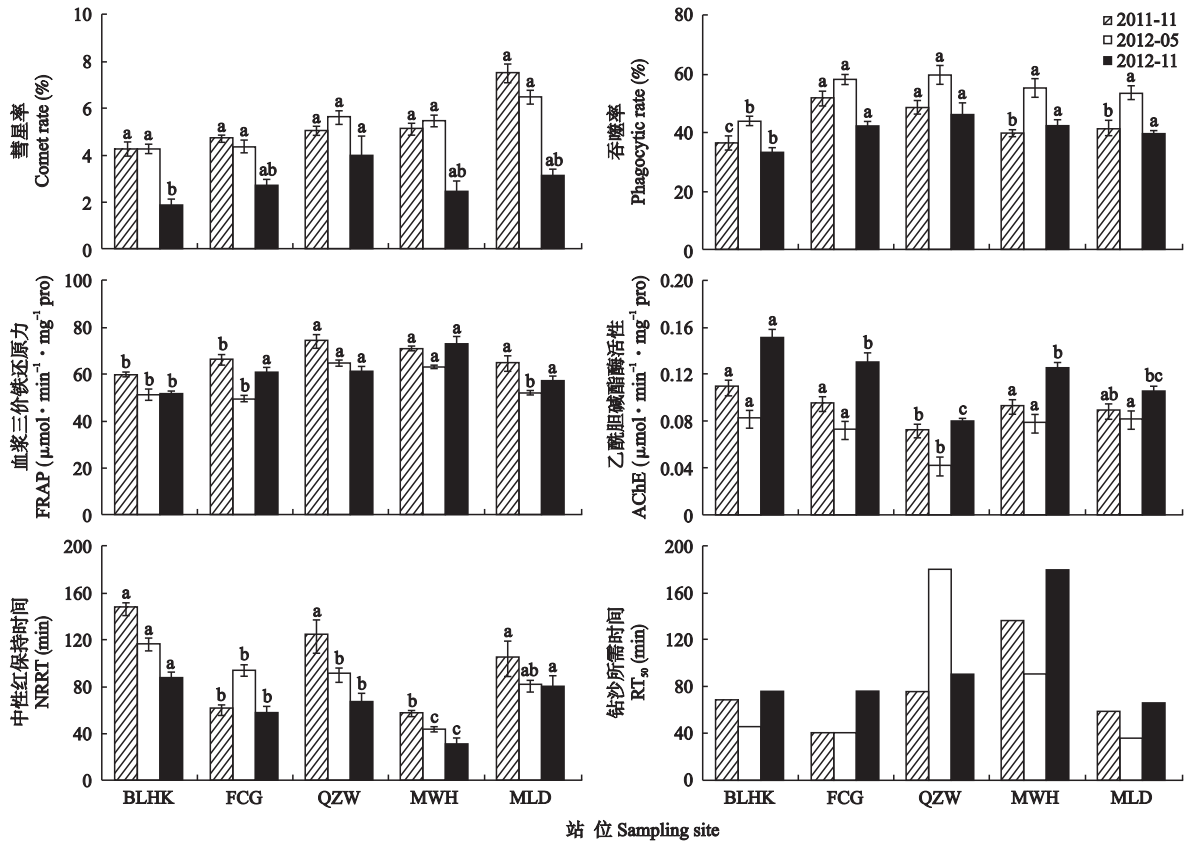


图 2　6 种生物标志物的监测值

Fig. 2　Monitoring values of 6 biomarkers.

不同小写字母表示相同监测时间不同站点之间差异显著（$P<0.05$）The lowercase letters indicated significant difference among different sites at the same time at 0.05 level.

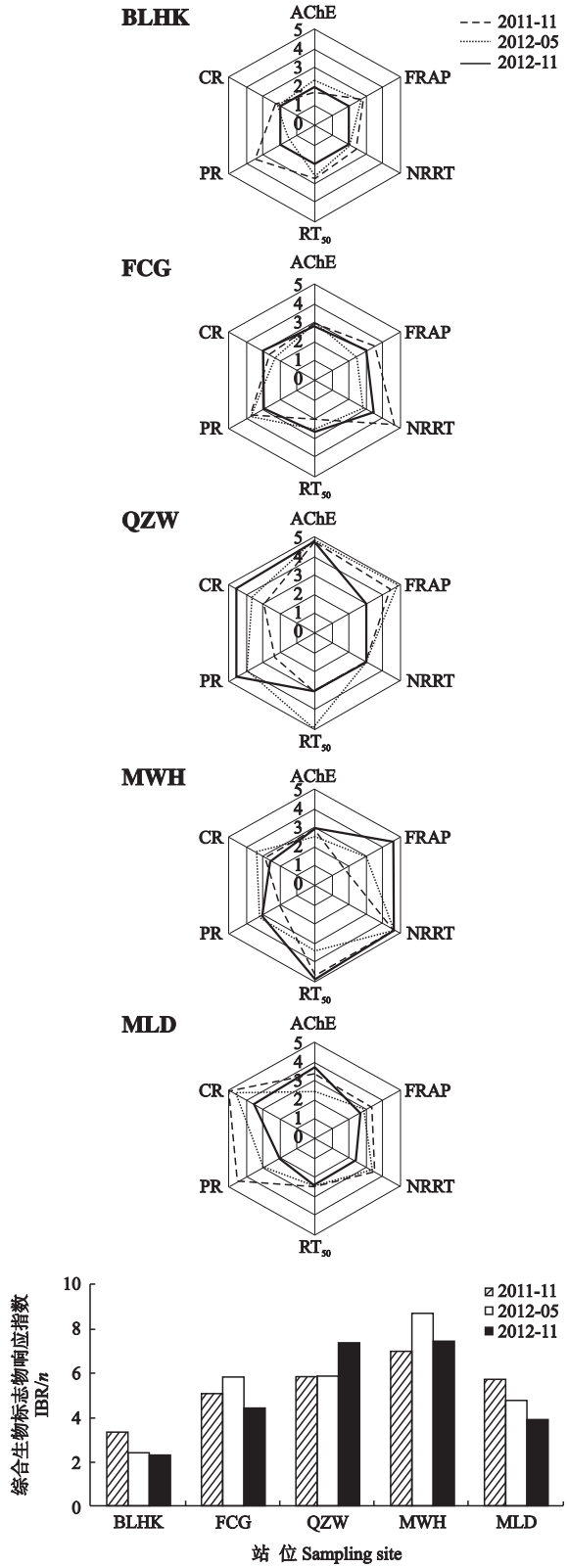


图 3 不同站点的综合生物标志物响应指数

Fig. 3 Integrative biomarker response index (IBR) at different sites.

CR: 彗星率 Comet rate; PR: 吞噬率 Phagocytic rate; FRAP: 血浆三价铁还原力 Ferric reducing ability of plasma; AChE: 乙酰胆碱酯酶活性 Acetylcholinesterase activity; RT_{50}: 钻沙所需时间 Time required to drill the sand; NRRT: 中性红保持时间 Neutral red retention time.

AChE、RT_{50}对 IBR 值的贡献率相近,NRRT、FRAP、吞噬率的贡献率较大. 在 QZW,AChE、FRAP 的贡献率相对较大,其余 4 个指标贡献率相近. 在 MWH,NRRT、RT_{50}的贡献率相对较大. 在 MLD,吞噬率、彗星率对 IBR 值贡献率较大,其余 4 个指标贡献率相近.

2012 年 5 月,IBR/n 值大小顺序为: BLHK(2.44)<MLD(4.74)<FCG(5.80)<QZW(5.89)<MWH(8.68). 在 BLHK,吞噬率对 IBR 值贡献率较小,其余 5 个指标的贡献率相近. 在 FCG,吞噬率对 IBR 值贡献率较大,其余 5 个指标的贡献率相近. 在 QZW,AChE、FRAP、RT_{50}贡献率较大. 在 MWH,NRRT 对 IBR 值贡献率较大,其余 5 个指标的贡献率相近. 在 MLD,彗星率对 IBR 值贡献率较大,其余 5 个指标的贡献率相近.

2012 年 11 月,IBR/n 值大小顺序为: BLHK(2.30)<MLD(3.91)<FCG(4.43)<QZW(7.38)<MWH(7.45). 在 BLHK、FCG,6 个生物标志物对 IBR 的贡献率相近. 在 QZW,AChE、彗星率、吞噬率对 IBR 的贡献率相对较大. 在 MWH,FRAP、NRRT、RT_{50}相对贡献率较大. 在 MLD,彗星率和 AChE 的贡献率较大,其余 4 个指标贡献率相近.

3 讨 论

3.1 指示生物的选择与采集

选择适合当地的指示生物是利用生物标志物监测海洋环境的关键步骤. 好的指示生物具有分布广泛、种群数量大、易于采集、大小适中、对污染压力反应敏感等特点. 目前,紫贻贝(*Mytilus edulis*)作为污染指示种已经在国际上得到广泛运用[20-22]. 针对具体环境,Broeg 和 Lehtonen[19]选用欧洲川鲽(*Platichthys flesus*)、绵鳚(*Zoarces viviparus*)及紫贻贝(*Mytilus edulis*)作为波罗的海沿岸指示生物. Hagger 等[23]选择普通滨蟹(*Carcinus maenas*)和紫贻贝(*Mytilus edulis*)作为西南英格兰沿岸的指示生物. 文蛤是广西沿海的广布种. 本文利用文蛤作为指示生物能够区分不同站点的污染压力,且跨年度的 3 次监测结果一致,说明文蛤作为本研究区的指示生物是合适的.

在自然环境中,生物体对污染压力的响应会受到季节、温度、营养条件、繁殖期、疾病等影响,某些生物标志物对污染压力的响应会随生物体自身或生物体所处外界环境的改变而发生变化. 本研究在样品采集时,避开了文蛤易发病及生殖季节,尽力消除生理因素对监测结果的影响. 在文蛤运输过程中,由

于生活环境的变化，对文蛤生理指标的影响仍不可避免，可能会使反映的压力值升高，因此采用生物采样箱控制温度、湿度，并采取防撞击措施，尽力降低对文蛤的人为胁迫.

3.2　生物标志物对环境压力的响应

本文 5 个监测站点的 3 次监测结果显示，BLHK 污染压力最小，MLD、FCG 污染压力处于中间水平，QZW 污染压力较重，MWH 污染压力最重（图 3）. 依据 2011 年国家及广西海洋质量公报[24-25]，BLHK 为二类水质，MLD 是三类水质，FCG、QZW 是四类水质，MWH 是劣四类水质，基于综合生物标志物响应指数法的监测结果与化学监测结果基本吻合.

不同的生物标志物对污染压力的响应存在差异. “三致”类污染物及血细胞的正常新陈代谢均会不同程度地导致彗星现象产生[26]. 彗星率监测显示，5 个监测站点大都处于较低水平，仅 MLD 的彗星率略高，表明不同地点虽然污染压力各异，但具有遗传毒性的污染物浓度较低，未对监测站位的野生文蛤造成影响或影响不明显. 血细胞吞噬作用是贝类最重要的防御手段[27]，吞噬能力对污染压力的响应曲线呈右开口钟形[28]. 吞噬能力监测结果显示，BLHK 的文蛤血细胞吞噬率明显低于其余 4 个监测站点. BLHK 的主要污染物是无机氮和活性磷酸盐，其余 4 个站点不同程度受到无机氮、石油类及化学需氧量的污染，推测文蛤对无机氮和活性磷酸盐有较高的耐受性. AChE 监测显示，QZW 的 AChE 活性受到明显抑制，而其余 4 个站点虽然海水水质差异较大，但 AChE 活性相近. 这可能与 QZW 站点在旅游度假区附近，受到表面活性剂及生活污水影响有关[29-30]. FRAP 监测显示，5 个监测站点的文蛤总抗氧化活力在 51.8 ~ 74.2 μmol $FeSO_4 \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$pro. 参考已有室内试验结果，在污染压力胁迫下 5 个站点 FRAP 值均高于正常水平. 虽然 3 次监测值对站位之间污染压力的区分力度不强，但仍可看出污染较重的 MWH、FCG 两地的 FRAP 值大于其余 3 个站点，依然与化学监测结果有一定的对应关系. 溶酶体是目前应用最广、结果最稳定的生物标志物. 研究发现，海洋贻贝溶酶体的变化可以反映出胁迫状态下整个细胞和生理反应约 80% 的变化状况[31-32]. 本文 NRRT 监测结果与海水水质有非常紧密的正相关性，显现出相似的特点. RT_{50}反映污染压力对文蛤行为的影响. 监测发现，一定范围内的污染胁迫对 RT_{50}影响并不明显，体现在 BLHK、FCG、MLD 等 3 个站点 RT_{50}相近. QZW、MWH 等两个站点的 RT_{50}值较高，显示随着污染压力的增大，贝类活动能力明显减弱. 此外，预实验发现贝类钻沙活动受温度影响十分显著，在适宜的温度范围内，随温度的升高而增大. 因此笔者严格控制文蛤钻沙时的水温，以消除干扰的影响.

生物标志物反映了指示生物在污染物胁迫下的早期受损状况. 依托综合生物标志物响应指数（IBR）模型，整合不同层次的生物标志物，经过一系列标准化处理，可以明确区分不同站点的污染压力强弱. 其作为海洋污染风险评估的辅助工具，可以提高评估的确定性. 由于近岸海域受到各种污染物的综合影响，本文在选择生物标志物时，优先选用了对复合污染物压力响应显著的种类，涵盖了从分子到个体各个水平，防止因指标单一造成的以偏概全. 本文同一地点的各个生物标志物对污染压力的响应结果各异，反映出污染压力在生物体不同层次的毒性效应存在差别. 从分子到个体水平，生物标志物对污染压力的响应时间及响应结果的可参考性会逐渐上升，但对特定污染物的可追溯性会逐渐下降[33]. 利用多层次生物标志物监测可以有效地整合污染物的生物效应，全面反映某一地区污染物的生物学效应，并可作为种群或群落水平对污染压力的早期预警[34-36].

3.3　生物标志物环境响应模型的应用

运用生物标志物模型是为了消除随机误差和随机变化，从而使生物标志物可以用于环境风险评价[37-38]. 比较目前已报道的多种生物标志物模型后发现，综合生物标志物响应指数（IBR）模型具有结果形象直观、不受生物标志物数量和类型限制、适宜在历史监测记录较薄弱的地区应用等优点. 通过比较 IBR 星状图可以直观地反映污染压力在生物体不同层级的毒性，建立生物标志物与污染压力的对应关系，揭示形成该压力的污染源. 该模型未考虑不同层级、种类的标志物对环境压力的敏感程度及权重关系，其所含标志物数量对最后结果中每一个生物标志物的权重有重要影响，因此模型中生物标志物种类的选择及数量与最后结果的可靠性呈正相关. IBR 星状图中标志物的排列顺序会影响 IBR 的值及图形形状. 为避免这个问题，应当预先设定好各个变量的顺序，使图像形状固定，从而使结果具有可比性. 但 Broeg 和 Lehtonen[19] 通过给 IBR/n 加入 SD 分析表明，随 n 数量的加大，SD 值会变小，显示当 n 值足够大时，星状图中生物标志物的排列顺序对 IBR 值的影响会降低，另外，随 n 值变大，每一个标

志物在 IBR 中的权重会降低.

利用综合生物标志物响应指数法评价海洋环境是丰富海洋监测方法的一种有益尝试. IBR 可以有效区分不同采样地点的污染风险,在环境风险评估方面有重要意义. 它还可以作为环境评估的早期筛选工具或作为环境评估中的一个参数,通过对生物标志物、化学及传统生物监测的综合运用,为待测环境提供全面可靠的风险评价依据.

参考文献

[1] Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China (中华人民共和国环境保护部). Specification for Offshore Environmental Monitoring. Beijing: China Environmental Science Press, 2009 (in Chinese)

[2] Wang S-H (王淑红). Study on the Evaluation of Environmental Stress in Xiamen Coastal Waters Using Multiple Biomarkers. PhD Thesis. Xiamen: Xiamen University, 2004 (in Chinese)

[3] Galloway TS, Sanger RC, Smith KL, *et al*. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environmental Science and Technology*, 2002, **36**: 2219-2226

[4] Hagger JA, Jones MB, Leonard DP, *et al*. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2006, **2**: 312-329

[5] Wang Q (王 清). Ecotoxicological Effects of Several Heavy Metals and Organic Pollutants on the Hard Clam *Meretrix meretrix*. PhD Thesis. Xiamen: Xiamen University, 2010 (in Chinese)

[6] Wang Q (王 清), Yang H-S (杨红生), Wang X-Y (王晓宇). The effects of cadmium and benzo[α]pyrene exposure on the immune function of *Meretrix meretrix* hemocytes. *Marine Sciences* (海洋科学), 2010, **34**(9): 82-84 (in Chinese)

[7] Wu X-Q (吴祥庆), Li X-Z (黎小正), Yang S-L (杨姝丽), *et al*. Residue level and distribution of organochlorinated pesticides and PCBs in *Meretrix meretrix* of Beihai coastal waters. *Marine Environmental Science* (海洋环境科学), 2011, **30**(2): 199-202 (in Chinese)

[8] Huang Z-Y (黄周英), Wang C-G (王重刚), Zuo Z-H (左正宏), *et al*. Effects of tributyltin on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in the gill of hard clam *Meretrix meretrix*. *Acta Scientiae Circumstantiae* (环境科学学报), 2005, **25**(10): 1408-1412 (in Chinese)

[9] Moschino V, Meneghetti F, Ros DL. Use of biomarkers to assess the welfare of the edible clam, *Ruditapes philippinarum*: May it be a tool for proving areas of origin? *Aquaculture International*, 2010, **18**: 327-337

[10] Gao J-J (高建军), Feng S-M (丰盛梅), Jin W-F (金慰芳). Improvement of Gel preparation on alkali single cell Gel electrophoresis. *Fudan University Journal of Medical Sciences* (复旦学报·医学版), 2004, **31**(3): 311-312 (in Chinese)

[11] Fernley PW, Moore MN, Lowe DM, *et al*. Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells. *Marine Environmental Research*, 2000, **50**: 451-455

[12] Xiao N-W (肖能文), Liu X-H (刘向辉), Li W (李薇), *et al*. Lysosome of *Eisenia fetida* as biomarker of soil pollution. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(3): 516-519 (in Chinese)

[13] Hannama ML, Bamber SD, Sundt RC, *et al*. Immune modulation in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to North Sea produced water. *Environmental Pollution*, 2009, **157**: 1939-1944

[14] Yao X-Z (饶小珍), Chen Y-S (陈寅山), Lin G (林岗). In vitro study on phagocytic ability of *Haliotis diversicolor supertexa* haemocytes. *Marine Fisheries Research* (海洋水产研究), 2007, **28**(2): 56-61 (in Chinese)

[15] Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, **239**: 70-76

[16] Gorun V, Proinov I, Baltescu V, *et al*. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations. *Analytical Biochemistry*, 1978, **86**: 324-326

[17] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, *et al*. Measurement of protein using bichinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985, **150**: 76-85

[18] Beliaeff B, Burgeot T. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, **21**: 1316-1322

[19] Broeg K, Lehtonen KK. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 2006, **53**: 508-522

[20] Dagnino A, Allen JI, Moore MN, *et al*. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*, 2007, **12**: 155-172

[21] Larraitz GA. Monitoring of the Prestige Oil Spill Biological Effects based on the Biomarker Approach: Mussel Watch from Galicia to Basque Coast. PhD Thesis. Biscay: University of Biscay, 2008

[22] ICES. Further Development of Guidance on Integrated Monitoring and Assessment of Chemicals and Biological Effects [EB/OL]. (2010-12-03) [2012-12-01]. http://www.ices.dk/sites/pub/PublicationReports/ICES Advice/2010/ICES ADVICE 2010 BOOK 1.pdf

[23] Hagger JA, Lowe D, Dissanayake A, *et al*. The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology*, 2010, **19**: 953-962

[24] State Oceanic Administration of the People's Republic of China (国家海洋局). Public Report of China Marine Environment in 2011 [EB/OL]. (2012-06-30) [2012-12-01]. http://www.soa.gov.cn/zwgk/hygb/

zghyhjzlgb/201211/t20121107_5528.html (in Chinese)
[25] The Oceanic Administration of Guangxi (广西海洋局). Public Report Marine Environment of Guangxi in 2011 [EB/OL] (2012-05-31) [2012-12-01]. http://www.gxoa.gov.cn/NewsView.aspx? id=5014 (in Chinese)
[26] Luo H (洛　昊), Liang B (梁　斌), Ma M-H (马明辉). Evaluation and detection of genotoxicity in main estuaries of Bohai Rim by comet assay. *China Environmental Science* (中国环境科学), 2013, **33**(1): 161-165 (in Chinese)
[27] Canesi L, Gallo G, Gavioli M, *et al*. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 2002, **57**: 469-476
[28] Hagger JA, Jones MB, Lowe D, *et al*. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, **56**: 1111-1118
[29] Guihermino L, Lacerda MN, Nogueira AJA, *et al*. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Daphia magna* acetylcholinnesterase by surfactant agents: Possible implications for contamination biomonitoring. *Science of the Environment*, 2000, **247**: 137-141
[30] Abdullah AR, Kumar A, Chapman JC. Inhibition of acetylcholinesterase in the Australian freshwater shrimp (*Paratya austrliensis*) by profenofos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1994, **13**: 1861-1866
[31] Allen JI, Moore MN. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research*, 2004, **58**: 227-232
[32] Moore MN, Allen IJ, McVeigh A. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research*, 2006, **61**: 278-304
[33] Lehtonen KK. Monitoring of Biological Effects of Contaminants in the Baltic Sea: Current Status and Outline for a Regional Monitoring Strategy. PhD Thesis. Helsinki: Finnish Institute of Marine Research, 2005
[34] Vasseur P, Cossu-Leguille C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*, 2003, **28**: 711-717
[35] Shaw JP, Dondero F, Moore MN, *et al*. Integration of biochemical, histochemical and toxicogenomic indices for the assessment of health status of mussels from the Tamar Estuary, U. K. *Marine Environmental Research*, 2011, **72**: 13-24
[36] Meng F-P (孟范平), Yang F-F (杨菲菲), Cheng F-L (程凤莲). Marine environmental assessment approaches based on biomarker index: A review. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2012, **23**(4): 1128-1136 (in Chinese)
[37] Broeg K, Westernhagen HV, Zander S, *et al*. The "Bioeffect Assessment Index" (BAI) concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, **50**: 495-503
[38] Bodin N, Burgeot T, Stanisiere JY, *et al*. Seasonal variation of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2004, **138**: 411-427

作者简介　邢永泽,男,1983 年生,硕士,助理研究员. 主要从事海洋生态毒理学研究,发表论文 5 篇. E-mail: xingshitou@hotmail.com

责任编辑　杨　弘