

# 土壤污染生态毒理诊断方法研究进展<sup>①</sup>

王开来, 苗峰, 史柯, 郭兆浩, 程景颢, 陈燕\*

(山东农业工程学院资源与环境工程学院, 济南 250100)

**摘要:** 土壤污染诊断研究对土壤污染预警和土壤污染修复效果评价具有重要的指导意义。近年来土壤污染日趋严重, 污染类型呈现出复合型和多样化的趋势, 传统的化学诊断法由于指标单一、样品前处理复杂且费用高已不能满足全面诊断土壤污染及评价土壤健康状况的要求。与传统的化学法相比, 土壤污染生态毒理学诊断由于其灵敏度高、检测指标多样、响应快且能够从微观角度反映污染物胁迫效应, 成为目前土壤污染诊断领域的热点。本文综合分析国内外文献, 介绍了基于植物、动物、微生物、细胞、分子等不同层次的诊断方法并对其优缺点作了评价, 同时也对其未来发展前景做出了展望。

**关键词:** 土壤生态毒理学; 生物标记物; 分子诊断; 组学

**中图分类号:** X53      **文献标识码:** A

随着社会经济的发展, 越来越多的外源性污染物通过大气、水体、生物等多种途径进入土壤环境, 当其含量超过土壤环境容纳量时就会引起土壤组成、结构、功能以及理化性质的恶化, 进而导致土壤环境质量、土壤肥力质量和土壤健康质量下降, 甚至威胁人类和其他生物的生存与发展。据 2014 年《全国土壤污染状况调查公报》, 全国土壤环境状况总体不容乐观, 土壤污染呈加剧趋势, 部分地区土壤污染严重超标, 总体主要具有以下特点: 污染类型的多样化, 呈现新老污染并存、无机有机复合型污染; 污染途径的多样化, 大气沉降、工业三废、农业污水灌溉、畜牧养殖、农药施入, 以及城市垃圾等多途径污染;

控制的难度化, 由传统的污灌型向大气沉降型双向污染、点源向面源加速延伸<sup>[1-2]</sup>。目前我国土壤污染防治面临的形势十分严峻, 土壤污染诊断面临许多新的挑战, 单纯依靠传统的化学方法进行土壤污染诊断, 已不能满足当前形势的需要, 不断改进诊断方法成为土壤修复和土壤安全利用领域研究的热点<sup>[3-4]</sup>。

近年来土壤污染生态毒理诊断法受到国内外研究者的广泛关注并得以迅速发展。它通过外源污染物对受试生物(植物、动物、微生物)在分子、细胞、器官、个体、种群及群落等不同生命层次上的胁迫效应来评估土壤的污染程度。该方法阐明了有毒物质对生

命有机体的危害机理, 建立了污染物对受试生物的剂量-效应模型, 集合了土壤中不同食物链生物对化学品的整体毒性效应, 能够为土壤污染风险评估提供较详细的信息, 同时也能为土壤污染修复提供可靠的依据。本文就土壤生态毒理学常用的诊断方法进行综述和展望。

## 1 陆生生物生态毒理学诊断

### 1.1 高等植物法

高等植物是生态系统中的生产者, 利用其生长状况来诊断土壤污染, 是土壤污染生态毒理学诊断常用的方法。其原理是通过土壤污染物对植物形态、结构、生理生化、遗传、生长等特性的影响, 对种群数量、群落结构和功能以及生物多样性的改变, 获取相关信息来表征土壤污染情况<sup>[5-6]</sup>。目前常采用土壤栽培(包括室外大田试验和室内栽培)、水培、滤纸法等研究方法, 从污染物的剂量-反应关系、混合污染毒性与土壤营养物质浓度水平的关系等方面, 探索污染物在植物体内的迁移、积累和转化规律<sup>[7-8]</sup>。符博敏等<sup>[9]</sup>通过根伸长抑制试验发现, 土壤中的恩诺沙星与 Cu 的复合污染对白菜和西红柿两种作物的根伸长和芽伸长具有明显的抑制作用, 且恩诺沙星与 Cu(100、300 mg/kg)复合污染对根及芽伸长抑制效应均表现

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2016CB25)和全国大学生创新创业计划训练项目(201714439007)资助。

\* 通讯作者(ychen0612@163.com)

作者简介: 王开来(1996—), 男, 山东枣庄人, 主要从事环境毒理学研究。E-mail: 1252235420@qq.com

为协同作用。虽然该方法能够为重金属和抗生素复合污染土壤的早期诊断与治理提供科学依据,但此方法灵敏度低,受试植物的生长易受各种环境因素的影响,且试验周期长,操作复杂需配合精密仪器进行检测,不适合土壤污染的现场快速灵敏检测<sup>[10]</sup>。

## 1.2 动物诊断法

**1.2.1 陆生无脊椎动物毒性试验** 陆生无脊椎动物处于陆地食物链的底层,繁殖能力强,分布广,且能最大限度地接触土壤中的有害物质,其生命活动和代谢活动与土壤环境有着密切的联系,在评估土壤质量和化学污染物潜在的毒性方面具有显著优势<sup>[11]</sup>。陆生无脊椎动物种类繁多,研究者常以蚯蚓(*Eisenia fetida*)、线虫和跳虫为指示生物,利用它们的成长试验、回避行为试验和繁殖试验来评价污染土壤的生态毒性<sup>[12]</sup>。Sillapawattana 和 Schäffer<sup>[13]</sup>研究了蚯蚓对吡虫啉的毒性响应, Demuynck 等<sup>[14]</sup>研究了蚯蚓对重金属与有机物复合污染土壤的回避行为,这些研究表明大部分有机物、重金属的单一或复合污染均对蚯蚓产生毒害效应。虽然,目前以蚯蚓为生物标记物的研究已经日臻完善,但蚯蚓作为指示生物在污染场地的实际应用方面研究较少,且缺乏相应的评估标准。与其他无脊椎动物相比,跳虫中的白符跳对污染物更为敏感,刘玉荣等<sup>[15]</sup>研究发现抑菌灵对赤子爱胜蚯蚓的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)高于 1 000 mg/kg,而对白符跳的 LC<sub>50</sub> 值仅为 0.072 mg/kg。虽然跳虫的种群以及群落结构、物种组成的动态变化反映了真实土壤环境的生态效应,可以更切实地对土壤污染状况进行毒性评价,但是其种群和群落结构的分布易受土壤理化性质和气象因素的影响。Dai 等<sup>[16]</sup>研究了重金属对白符跳抗氧化酶及回避反应的影响,发现白符跳体内 Cd 含量的变化和抗氧化酶活性变化一致,其回避率和重金属含量呈正相关关系,可用来评价土壤重金属的毒性效应;但该研究同时指出土壤的理化性质会影响白符跳的抗氧化酶活性,因此在利用该生物进行土壤污染指示时应该充分考虑这些因素的影响<sup>[16]</sup>。

**1.2.2 土壤原生动物毒性试验** 土壤原生动物泛指生活在土壤或土壤表面凋落物中的自由生活原生动物,由于其个体简单、易于培养、繁殖速度快、分布不受地域限制、对极端环境适应性强且能够在很短的时间做出响应,是重金属和农药污染物毒性诊断较为理想的模式生物<sup>[17]</sup>。常见的土壤原生动物主要有 4 类:纤毛虫类、异养鞭毛虫类、裸肉足虫类和有壳肉足虫类。黄敦奇等<sup>[18]</sup>通过研究废弃农药厂污染土壤中原生动物的数量和种类发现,鞭毛虫、纤毛虫等原

生动物的数量和土壤全氮含量呈正相关,肉足虫数量与土壤全磷含量有明显的正相关,且污染场地中长期残留的有机氯农药对土壤原生动物数量有明显的抑制作用。Zhang 等<sup>[19]</sup>研究了梨形四膜虫(*Tetrahymena pyriformis*)对 Cu、Cd、Cr(III)和氯苯复合污染的毒性响应,发现重金属和对氯苯对四膜虫的毒害具有拮抗效应,而重金属与邻氯苯, Cu 和 1,2,4-三氯苯则有协同作用。然而原生动物在土壤监测中也有很多不足之处,主要表现在:原生动物受土壤理化性质和其他环境因子的影响较大;种类多,鉴定困难,只能粗略地估计原生动物的数量,无法把采样时活动的和形成包囊的数量区分开来;数量大,计数费时,常会过高或过低地估计原生动物的个体丰度<sup>[20]</sup>。此外分类学上的欠缺也是阻碍土壤原生动物作为指示生物的瓶颈<sup>[21]</sup>。

## 2 水生生物毒理学诊断方法

### 2.1 藻类试验

藻类由于其培养方便、个体小、繁殖快、灵敏度高而被列入经济合作发展组织(OECD)标准水毒性监测体系,但是受藻类自身生存环境的制约应用到土壤污染生态毒理诊断的研究较少,目前多集中在田间持水量较高的南方水稻田中可持久性有机污染物(POPs)的生态毒理评估。黄健等<sup>[22]</sup>对已登记的 36 种除草剂进行了藻类急性毒性试验,发现抑制植物细胞分裂和作用于植物叶绿体的除草剂 72 h-EC<sub>50</sub>( $1.01 \times 10^{-3} \sim 2.5$  mg/L)对绿藻毒性远大于以人工合成植物生长素 72 h-EC<sub>50</sub>(3.34 ~ 143 mg/L)为代表的除草剂;此外,在作用方式相同的情况下,旱田获得登记的除草剂对藻类的毒性高于水稻田上获得登记的除草剂对藻类的毒性。目前大多数研究都是通过分析土壤提取液对污染土壤毒性进行评价,忽视了土壤原生环境对藻类的影响,检测结果会出现一定的偏差<sup>[23]</sup>。

### 2.2 发光菌试验

发光细菌是一种灵敏度比较高的菌种,在正常的生存环境下,细菌的荧光酶催化荧光素释放出肉眼可见的蓝绿荧光;但当受到外界不良影响时,发光菌的发光强度减弱且其强度的变化与污染物剂量或毒性强度呈剂量-反应线性关系,基于此可进行污染物毒性评价<sup>[24]</sup>。国内外对发光细菌的研究比较早,目前常用明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)、费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)、青海弧菌(*Vibrio qinghaiensis*)对环境污染物进行检测。其中青海弧菌(*Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67)是我国学者从青海湖的青海裸

鲤(*Gymnocypris przewalskii*)体表分离出来的一种天然发光特性好、无致病性的淡水型发光菌,以该细菌为指示生物,可建立应用于水环境样品的发光毒性测试方法。Xu 等<sup>[25]</sup>对比研究了青海弧菌与明亮发光杆菌和费氏弧菌对土壤中爆炸污染物提取液的急性毒性响应,发现青海弧菌对不同浓度 TNT 提取液的响应最敏感,且响应受暴露时间长短的影响最小,更适合作为土壤爆炸污染物的急性毒性指示生物。另外,常用方法还有 Microtox 检验法<sup>[26]</sup>,但是该法对样品的 pH(6~8)要求较高,超出 pH 范围会影响试验的效果。

### 2.3 大型蚤毒性试验

大型蚤作为一种常用的测试生物,具有易培养、世代短、易繁殖、产量多等优点,在工业废水、土壤及城市污泥毒性监测方面多有应用。目前,大型蚤(*Daphnia magna*)是一些国际组织(如 OECD 和 ISO)正式签署的唯一一种用于毒性试验的淡水无脊椎动物,常用其死亡率、繁殖率和运动抑制率来诊断土壤污染程度。然而蚤毒性试验前处理比较复杂、灵敏度低、试验时间长且关于污染胁迫对大型蚤新陈代谢系统的研究较少,对蚤毒性试验还需做进一步研究<sup>[27-29]</sup>。

## 3 土壤微生物毒性诊断法

### 3.1 微生物群落检测法

微生物群落功能的差异性对环境变化十分敏感,能够在很短的周期内做出反应,常常被用作土壤生态系统变化和土壤健康状况的早期预警和敏感指标<sup>[30]</sup>。微生物群落功能的差异通常是用反映微生物群落对含碳底物代谢功能多样性的群落水平生理特征(CLPP)来表征。目前检测土壤微生物生物量和群落结构的方法主要有磷脂脂肪酸(PLFA)分析方法、Biolog 微平板法、多重底物诱导呼吸(multi-SIR)、MicroResp<sup>TM</sup> 方法<sup>[31-33]</sup>。Chapman 等<sup>[34]</sup>通过将 MicroResp<sup>TM</sup> 与 Biolog 平板法和 multi-SIR 法对比发现, MicroResp<sup>TM</sup> 既保留了 Biolog 平板法简单易于操作和 multi-SIR 法利用全土的优势,同时也改进了 Biolog 平板法依赖土壤悬浮液提取物和细胞后续生长状况以及只能测定可培养微生物的限制和 multi-SIR 法自动化程度低、操作繁琐等缺点,是一种简单快捷有效的方法,常用来研究长期施肥和耕作制度对土壤微生物群落生理水平的影响。虽然有研究者也将土壤微生物生物量和群落结构做为评价土壤重金属生态毒性的生物学指标<sup>[34]</sup>,但是土壤水分、土壤 pH 以及土壤稀释液的浓度和稀释液中的干扰物质都

会对试验结果造成影响<sup>[35]</sup>。

### 3.2 土壤酶活性检测法

土壤酶是土壤中产生专一生物化学反应的生物催化剂,对外源性污染物如重金属、有机污染物有明显的响应,常被用作土壤生态毒理学诊断的重要生物指标,目前主要通过监测土壤酶活性的抑制程度判断土壤污染程度,评价土壤健康质量<sup>[36-39]</sup>。Angelovičová 等<sup>[40]</sup>发现在 Cu、Zn、Pb 复合污染下,随着重金属含量的增加,土壤脲酶(URE)、酸性磷酸酶(ACP)的活性受到抑制,尤其土壤脲酶受 Pb、Zn 的抑制更为明显。Lipińska 等<sup>[41]</sup>通过测定芳基硫酸酯酶对多环芳烃(PAHs)的响应发现,在土壤弹性指数较小时,PAHs 可引起芳基硫酸酯酶持续的失调。虽然土壤酶能够比较客观地评价重金属复合污染和重金属-有机物复合污染,但是由于土壤酶活性受土壤性质的影响较大,酶活性与土壤重金属含量之间的定量关系仍未完全弄清,目前土壤酶活性还不能作为重金属有效性评价的重要方法。下一步需通过深入研究土壤性质和土壤类型的差异,建立定量模型,将其与土壤重金属污染的生态风险评估结合起来<sup>[42]</sup>,促进该方法的进一步发展。

### 3.3 土壤呼吸检测法

土壤呼吸作用强度是衡量土壤微生物活性的重要指标,其变化能够反映土壤微生物的活跃程度,可作为表征土壤肥力和土壤质量的重要生物学指标,但专门把土壤呼吸作用作为微生物活性指标用于土壤污染生态毒理学诊断的研究是近几年来才兴起的<sup>[43-44]</sup>。现阶段土壤呼吸测定方法主要有涡度相关法、静态碱液吸收法、静态密闭气室法、动态气室法和间接检测法。静态碱液吸收法是以土壤排放的 CO<sub>2</sub> 总量为指标,设备简单易于操作、实验可重复性强、适于空间异质性大的土壤,但该方法需人工采样,精确度不高。动态气室法虽然克服检测精度差的缺点,但是实验操作繁琐、技术要求高、设备比较昂贵;而间接检测法是通过测定土壤呼吸相关指标(如温度、水分及腺苷(ATP)含量等)推算土壤呼吸速率,只适合特定的生态系统,不具备普适性。自动气室法是在动态气室法的基础上发展起来的,在测量准确性、稳定性和使用性等方面都有所改进,受到众多研究者的青睐。周涵君等<sup>[45]</sup>利用该法发现外源添加 Cd 对根系土壤呼吸有明显抑制,其原因是 Cd 的毒害作用使土壤微生物活性显著降低且烟株根系生长缓慢,从而使土壤呼吸速率降低。随着对土壤的地域差异以及对土壤复合污染研究的逐渐深入,土壤呼吸检测法不失

为一种良好的土壤生态毒理诊断方法。

### 3.4 土壤氮循环检测法

土壤氮循环是评价污染物对土壤微生物生态风险的重要指标,主要包括固氮作用、硝化作用、反硝化作用和氨化作用<sup>[46]</sup>,其中氨氧化作用是全球氮循环的中心环节。土壤氨氧化细菌和古菌(AOB、AOA)是进行氨氧化作用的主要微生物,都含有编码氨单加氧酶(AMO),该酶是硝化反应中氨氧化的关键酶,可将氨转化为亚硝酸盐,对土壤环境因子的变化具有潜在的指示作用<sup>[47]</sup>。李平等<sup>[48]</sup>发现向土壤中添加 Cu、Cd 等重金属离子会抑制土壤的硝化作用、反硝化作用和矿化作用,其原因主要是 AOA 和 AOB 活动受到重金属的抑制,难以进行氨氧化。此外,有研究表明有机磷、有机碳,全氮等土壤理化性质可以通过改变 AOA 和 AOB 的丰度,从而进一步影响土壤氨氧化作用,今后,为防止土壤理化性质对毒理试验的干扰,可采用控制土壤理化性质线性影响的偏相关分析方法进行研究<sup>[49]</sup>。

## 4 细胞水平上的生态毒理学诊断

### 4.1 微核试验

微核试验是一种新型的土壤污染生态毒理学诊断方法,其原理是外界土壤中有毒物质对受试生物产生毒害作用,导致其细胞染色体丢失或断裂,从而在细胞质中形成一个或多个微小核,通过观测出现的微核率来判断污染土壤的生态毒性,具有方便、快捷、高效等优点<sup>[50]</sup>,多用来检测水体污染状况和水体的致突变性。由于其微核率和染色体畸变率与农药、重金属等毒物的剂量有较好的相关性,近年来以蚕豆根尖微核试验为代表的实验方法在土壤生态毒理学诊断方面逐渐引起人们的重视。王兴明等<sup>[51]</sup>在评价煤矿区土壤重金属风险时发现,相对于蚕豆发芽率和根伸长试验,蚕豆根微核试验对重金属更为敏感。但这类方法仍涉及一些重要的方法学问题值得深入探讨和研究,比如传统的试验方法,注重观察记录处于细胞分裂间期的微核细胞,忽视了分裂期细胞的遗传损伤,没有要求记录和统计上述的染色体畸变,没有要求记录有丝分裂相的细胞数等。因此,下一步还需着重培养对污染物敏感的蚕豆品种,并结合其他手段,提高微核判断的准确度,以便更好地服务于环境监测和风险评价等领域<sup>[52]</sup>。

### 4.2 溶酶体中性红法

随着近年来对溶酶体结构和功能的深入研究发现,溶酶体是亚细胞水平上有毒物质的特殊靶点。蚯

体腔细胞内的溶酶体由于其成本低、样品处理简单、观察效果好,是目前最常用的生物标志物<sup>[53-54]</sup>。溶酶体对中性红具有很强的亲和性,蚯蚓体腔细胞内的溶酶体能很快地积累中性红染料,当有毒物质进入受试生物的细胞内时,其溶酶体膜受到损伤,导致溶酶体膜通透性改变,失去稳定性,中性红染料逐步渗透到细胞质中,根据细胞溶酶体膜中性红保持时间建立剂量-效应关系来诊断土壤污染程度。该方法具有良好的稳定性和准确性,常被用作土壤污染的早期预警<sup>[55]</sup>。Wang 等<sup>[56]</sup>采用该方法分析了土壤中不同砷化物的毒性,结果表明 As(III)>As(V)>单甲基胂酸盐(MMA)>二甲基胂酸盐(DMA)。Lee 等<sup>[57]</sup>也通过该方法做了关于砷毒性的试验,同样得到了相似的结果。马静静<sup>[58]</sup>等通过叠加污染的方式模拟 PHAs 在土壤中的积累,发现 PHAs 的毒性与中性红保留时间存在明显的正相关关系。然而针对低剂量污染物的毒性诊断不明显,需结合其他多指标和多时段的检测,增强指示的灵敏度和有效性。

### 4.3 单细胞凝胶电泳试验

单细胞凝胶电泳试验又称彗星试验,是近几年发展起来的一门 DNA 检验技术,以其快速、简单、灵敏度高而受到广泛的关注<sup>[59]</sup>。高曦等<sup>[60]</sup>利用蚕豆为研究对象,以菲为 PAHs 代表物,开展彗星试验研究,以 Olive 尾动量(OTM)作为 PAHs 污染的 DNA 损伤效应评价参数,研究发现在 0~0.6 mg/L 菲污染胁迫下,蚕豆根尖细胞内的 DNA 受到明显的损害,且 DNA 损伤程度与菲胁迫呈正相关。公新忠等<sup>[61]</sup>采用彗星试验研究了 6 种不同浓度梯度(1 000、800、600、400、200、100  $\mu\text{mol/L}$ )的轴胁迫对大豆和玉米幼苗细胞的 DNA 损伤程度,发现 1 000  $\mu\text{mol/L}$  和 800  $\mu\text{mol/L}$  对大豆和玉米幼苗细胞 DNA 的损伤情况较严重,其他浓度不明显。

## 5 生物标记法

### 5.1 解毒酶系生物标记法

解毒酶是一类具有重要生理功能的代谢酶系,广泛存在于动物、植物和微生物体内。它们易受外源污染物诱导或抑制而使其含量或活力显著增加或降低,且污染物毒性与其含量或活力之间具有显著相关性<sup>[62]</sup>,常作为毒物毒性诊断的生物标记物用于环境污染的早期诊断。目前用于土壤生态毒理诊断的解毒酶主要有细胞色素酶(CytP450)和谷胱甘肽 S 转移酶(GSTs)。杨晓霞等<sup>[63]</sup>通过研究蚯蚓细胞色素 P450 酶系不同亚酶对土壤中芘或苯并[a]芘的响应发现,芘或苯并[a]

芘暴露导致蚯蚓 CYPs 总量、CYP1A1 及 CYP2C9 活性的变化不同,提出了利用 CYPs 总量与 CYP1A1 活性结合或与 CYP2C9 活性结合来诊断土壤芘污染或苯并[a]芘污染较为准确有效。赵欢等<sup>[64]</sup>发现细胞色素 P450 基因表达与苯并[a]芘诱导浓度和诱导时间呈正相关。Sillapawattana 等<sup>[65]</sup>从分子水平上研究了白符跳(*Folsomia candida*)中 GSTs 对吡虫啉的毒性效应,该试验为烟碱类农药毒理学试验提供了可借鉴的经验。据现有的报道,大多数研究集中在有机磷和有机氯为代表的农药方面,对其他有机污染物和重金属毒性的研究相对较少,且大多数试验仅仅停留在剂量-毒性的关系上,并没有进行分子生物学水平上的研究。此外这些研究还仅停留在实验室阶段,并没有真正用于实际污染场地的预警和监测。

## 5.2 抗氧化防御系统的生物标记法

抗氧化防御系统是动物体内重要的活性氧物质清除系统,当受试的好氧生物受到土壤外源污染物的胁迫时,体内的活性氧物质会增加,随着受试生物暴露时间的延长,当机体细胞内活性氧物质累积过多时,会对细胞造成伤害,严重时会导致细胞死亡。在长期的进化过程中,需氧生物形成了一套抗氧化防御体系,以减缓活性氧的损伤攻击。生物体内抗过氧化物的酶系有超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等,它们含量的维持和提高是生物体耐受污染胁迫的物质基础之一,可作为指示污染土壤毒性的敏感生物标记物。唐浩等<sup>[66]</sup>发现 Hg 污染胁迫对蚯蚓的 SOD、GSH-PX 的活性具有抑制作用,而对 CAT 的影响无明显规律。张聪等<sup>[67]</sup>发现 Pb 对蚯蚓体内的 SOD、CAT、POD 的活性均有抑制作用,并且 CAT 和 SOD 在 Pb 胁迫下的活性变化趋势基本一致。此外,不同重金属污染胁迫对蚯蚓抗氧化酶活性的影响是不同的,通过研究重金属复合污染对蚯蚓的抗氧化酶活性的影响发现,Pb 和 Cd-Cu-Pb 对 SOD 活性产生的影响最为显著,而 Cd 和 Cu 对谷胱甘肽硫转移酶(GST)和磷酸酯酶(AP)的活性产生的影响比较明显<sup>[68]</sup>。虽然受外源污染物胁迫后机体抗氧化系统中抗氧化酶的活性会有显著变化,但它们的改变却很难得到良好的剂量-反应线性关系,例如高浓度的污染物对酶活性的抑制并不明显。

## 5.3 热休克蛋白生物标记法

热休克蛋白(HSP)是机体受到外源污染物以及不良理化环境刺激后产生的一种应激蛋白,广泛存在于各类生物体内,并在生物体内发挥着重要的生理功

能。作为一类高度保守的蛋白质,它可以提高受试细胞的耐受性,对生物细胞具有保护和修复作用,可作为评价外源污染物整体胁迫效应和污染程度的早期毒理学指标<sup>[69-70]</sup>。按照分子量可将其分为 4 个家族:HSP60、HSP70、HSP90 和 HSP100。其中 HSP70 是 4 个家族中最为保守的,对亚砷酸、重铬酸盐、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、五氯酚和林丹等污染物的胁迫响应十分显著,作为生物指标物在土壤生态毒性早期诊断方面具有很大的潜力<sup>[71]</sup>。Wang 等<sup>[72]</sup>发现蚕豆中 HSP70 的含量在 Pb 胁迫诱导下从原来的 125 mg/kg 上升到 1 000 mg/kg,比 SOD、POD、APX、CAT 等标记物对 Pb 的响应更敏感。Ezemaduka 等<sup>[73]</sup>以小分子热休克蛋白(sHSP)为生物标记物,采用蛋白质免疫杂交方法,实现了重金属污染物的定量检测。

## 5.4 胆碱酯酶标记法

胆碱酯酶是一类专一性比较高的酶,分为乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶。其中乙酰胆碱酯酶对氨基甲酸酯类农药和有机磷农药具有显著的灵敏性和较高的专一性而获得了广泛的关注和应用<sup>[74]</sup>。汪鹏鹏等<sup>[75]</sup>在研究辛硫磷和敌百虫协同污染对斑马鱼乙酰胆碱酯酶活性抑制时发现,胆碱酯酶不仅与单一污染具有明显的剂量-效应关系,而且与复合污染也具有明显的剂量-效应关系,且响应更为灵敏。此外,有学者基于乙酰胆碱酯酶修饰电极制成了灵敏度高、选择性好以及干扰小的电化学酶传感器,实现了农产品和土壤样品中有机磷农药的高选择高灵敏检测<sup>[76-77]</sup>。

## 6 组学在生态毒理学上的应用

土壤污染的生态毒理学诊断不仅仅局限于对单一受试物种或生物标记物的检测,还可以从更宏观的群落结构、生态系统和更微观的代谢、遗传水平上评价<sup>[78]</sup>。随着分子生物学的发展,应用宏基因组学、宏转录组学、宏蛋白组学和代谢组学技术研究土壤微生物的生态功能,揭示土壤微域环境对微生物的影响机制,在评价污染土壤生态毒理学方面具有巨大的潜力。当前组学在土壤生态毒理学诊断上的应用主要表现在 4 个方面。

宏基因组学是在微生物基因组学的基础上发展起来的,它是将环境中全部微生物的遗传信息看作一个整体,通过对微生物群落上 DNA 多态性的测量,分析污染胁迫对微生物群落结构和种群多样性的毒性效应,解决了大部分微生物因不能分离培养而难于研究的问题<sup>[79]</sup>。高通量测序和基因芯片技术是宏基因两大关键技术,与其他传统技术相比,具有很高的

准确性、全面性及较高的信息深入程度。夏围和贾仲君<sup>[80]</sup>对比了高通量测序和传统的变性梯度凝胶电泳(DGGE)指纹图谱技术,发现高通量测序无论是在检测的灵敏度还是在测量微生物的丰度,以及优势种筛选中都要优于 DGGE;然而 DGGE 能够更加直观地比较和分析微生物群落结构的变化规律,这是高通量测序技术的不足之处。与高通量测序相比,基因芯片技术具有污染物干扰和群落主要物种干扰较小的优点<sup>[81]</sup>,有学者将其应用到石油烃污染土壤微生物的生理活性和群落结构的研究中<sup>[82]</sup>。然而基因芯片技术不能够发现新的物种,也不能直接表征微生物的群落多样性和丰富度,随着 16S rDNA 测序技术的成熟,这一点将会得到改善。因此,在今后的研究中应该结合各种技术,取长补短促进土壤生态毒理学基因组学的发展。

宏转录组学是在宏基因组学之后兴起的一门新学科,利用 RNA-Seq 高通量测序技术分析受污染胁迫下的生物生理活性在时间序列上的动态变化,并获取所有可能的有毒物质对受试生物的胁迫的表达响应谱。该技术不仅具有宏基因组学技术的全部优点,而且能够对微生物群落结构及代谢、功能间的关系进行剖析和监测,可直接反映实时环境表达信息。其基本流程为:环境样品的采集与保存;总 RNA 的提取;mRNA 富集;cDNA 文库的建立;测序并获得大量的表达序列标签(EST)的序列,并对其进行基因功能的注释<sup>[83]</sup>。de Menezes 等<sup>[84]</sup>通过转录组学研究菲胁迫下土壤样品中微生物活性的变化,发现涉及芳香族化合物代谢及胁迫应答的转录产物显著增加。转录组学发展至今已经不在局限于土壤污染胁迫对微生物群落的影响,而是已应用到土壤污染对植物胁迫机制的研究中。Zhang 等<sup>[85]</sup>通过 RNA-Seq 研究了 Cd 胁迫下甘蓝型油菜籽中金属转运蛋白基因(MTGs),发现 270 个 MTGs 中有 202 个非冗余 MTGs,其中 108 个 MTGs 差异表达,68 个 MTGs 受到 Cd 显著的诱导作用。宏转录组学的研究工作目前尚处于初级阶段,仍存在环境样品 mRNA 含量低、腐植酸等干扰杂质多、rRNA 去除程度有限等诸多问题有待解决<sup>[83]</sup>。

宏蛋白质组学是应用蛋白质组学技术对微生物群落进行研究的一项新技术。通过研究外源化学毒物对生物体所产生的毒性效应及其导致的生物体内代谢通路的改变,可以更加全面地发现生物体内蛋白水平的细微变化及其变化之间的联系,为研究者分析污染物的毒性机制和生物体的关键蛋白防御机制提供了有力的手段。Zhang 等<sup>[86]</sup>使用蛋白质组学技术比较了蚯

蚓(*Eisenia Fetida*)对红壤中苯并[a]芘和 Cd 的毒性响应,发现苯并[a]芘暴露显著诱导氧化还原蛋白的表达,而 Cd 暴露主要诱导参与转录和翻译相关过程蛋白质的表达;此外,还发现苯并[a]芘能明显地诱导高水平的活性氧物质(ROS)。许多污染物的毒性效应和受试生物的体内蛋白有密切的关系,单纯的从基因组学和转录组学很难细致分析污染物的毒性机制,而基于蛋白水平上的蛋白质组学则具有无可比拟的优势,但是如何从环境中高效分离提取蛋白一直是制约蛋白质组学发展的一个瓶颈。因此,在未来的研究中应该注重寻找具有普适性、易于操作的蛋白提取技术<sup>[87-88]</sup>。

宏代谢组学是继基因组学、蛋白质组学、转录组学后出现的新兴“组学”。通过研究机体受刺激后体液或组织中内源性代谢物的动态变化规律,并结合生物信息统计方法,系统全面地揭示内因和外因作用于机体的毒性效应和机制,为发现新的生物标志物提供了新的途径<sup>[89]</sup>。Tang 等<sup>[90]</sup>通过研究红壤和潮土两种不同类型土壤下 Pb 和 Cd 胁迫对蚯蚓(*Eisenia Fetida*)代谢产物的影响,发现这两种 Pb 污染土壤中蚯蚓分泌物中氨基酸和核酸代谢物明显高于对照组,而甜菜碱和肌醇要低于对照组;而 Cd 污染红壤中蚯蚓的代谢产物变化较小,其中代谢产物较高的是一些氨基酸类物质、二甲胺、肌苷和 AMP(腺嘌呤核糖核苷酸),而组氨酸、甜菜碱、NADH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)和 NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)等要低于对照组。代谢组学作为一种相对年轻的技术,未来应该通过与其他组学及传统的毒理学检测方法相结合,建立一套系统的污染物代谢分析方法。

与传统的生态毒理诊断方法相比,利用组学在宏基因、宏蛋白、宏转录以及宏代谢水平上进行生态毒性检测具有无可比拟的优势。然而土壤生态毒理学组学仍然受到多种因素的制约,例如如何从海量数据获取准确客观的信息,以及如何避免在提取时土壤样品不受其他因素的影响等都是需要深入研究的问题。

## 7 展望

近年来,土壤生态毒理学诊断在土壤重金属、有机污染物检测等方面取得了很大的进步,在土壤环境基准/阈值及生态风险评估中也发挥了重要作用,同时也为后期高效合理的土壤污染修复提供了技术支撑和理论依据。目前土壤生态毒理学诊断方法正朝着以下几个方面发展:简单的剂量-效应关系已经不能满足检测的要求,从分子、基因、细胞水平上来探究低浓度甚至是痕量污染物的生态

毒性成为未来研究的重点；组学能够在基因水平上更深入地理解环境污染物的致毒机制，为生态毒理学寻找响应更为敏感的生物标记物提供可能，在传统的分析方法的基础上，多组学联合检测是未来土壤污染物生态毒理学诊断方法的发展方向之一；

传统的分析方法已经不能满足时代的需要，多学科交叉融合是未来土壤生态毒理学诊断方法研究和发展的大趋势，比如和电化学检测技术相结合制成灵敏度更高的生物传感器，同现代仪器分析技术相结合来提高诊断的准确性；应该加强对新型污染物的环境行为及毒理效应的研究，例如微塑料、塑料薄膜、纳米银、抗生素等；我国土壤种类众多，不同地区土壤之间的理化性质差异较大，因此，在进行土壤污染生态毒理学诊断时，还应该结合其他的评估方法，做到土壤污染评估的客观性。总之，随着土壤污染问题的日益突出，以及人们环保意识的增强，土壤生态毒理学诊断必将受到越来越多的环境科研工作者的重视。

#### 参考文献：

- [1] 环境保护部, 国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报[J]. 中国环保产业, 2014, 36(5): 10-11
- [2] 赵玲, 滕应, 骆永明. 中国农田土壤农药污染现状和防控对策[J]. 土壤, 2017, 49(3): 417-427
- [3] 陈保冬, 赵方杰, 张莘, 等. 土壤生物与土壤污染研究前沿与展望[J]. 生态学报, 2015, 35(20): 6604-6613
- [4] 陈卫平, 杨阳, 谢天, 等. 中国农田土壤重金属污染防治挑战与对策[J]. 土壤学报, 2018, 55(2): 261-272
- [5] Soil quality-Determination of the effects of pollutants on soil flora-Part 1: Method for the measurement of inhibition of root: ISO 11269-1: 2012[S]. (2012-02-22)
- [6] Soil quality-Determination of the effects of pollutants on soil flora-Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants: ISO 11269-2: 2005[S]. (2005-11-01)
- [7] Rmbke J, Insch S, Meier M. et al. General recommendations for soil ecotoxicological tests suitable for the environmental risk assessment of genetically modified plants. Integrated Environmental Assessment and Management, 2009, 6: 287-300
- [8] Wang C R, Gu X Y, Wang X R, et al. Stress response and potential biomarker in spinach (*Spinacia oleracea* L.) seedlings exposed to soil lead. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(1): 41-47
- [9] 符博敏, 岳林, 冯丹, 等. 恩诺沙星与 Cu 复合污染对白菜和西红柿根及芽伸长的抑制作用[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(5): 157-163
- [10] 李霁, 高超, 李捍东, 等. 污染场地土壤生态毒性诊断方法的筛选[J]. 环境污染与防治, 2017, 39(1): 106-110
- [11] 孙艳芳, 王国利, 刘长仲. 重金属污染对农田土壤无脊椎动物群落结构的影响[J]. 土壤通报, 2014, 45(1): 210-215
- [12] Capowiez Y, Dittbrenner N, Rault M, et al. Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing[J]. Environmental Pollution, 2010, 158(2): 388-393
- [13] Sillapawattana P, Schäffer A. Effects of imidacloprid on detoxifying enzyme glutathione S-transferase on *Folsomia candida* (Collembola)[J]. Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 2017, 24(12): 1-9
- [14] Demuyneck S, Lebel A, Grumiaux F, et al. Comparative avoidance behaviour of the earthworm *Eisenia fetida*, towards chloride, nitrate and sulphate salts of Cd, Cu and Zn using filter paper and extruded water agar gels as exposure media[J]. ecotoxicology and environmental safety, 2016, 129: 66-74
- [15] 刘玉荣, 贺纪正, 郑袁明. 跳虫在土壤污染生态风险评估中的应用[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(4): 323-330
- [16] Dai W, Ke X, Li Z, et al. Antioxidant enzyme activities of *Folsomia candida*, and avoidance of soil metal contamination[J]. Environmental Science and Pollution Research., 2017, 25
- [17] Popov A V, Vinokhodov D O, Rutto M V. Practical application of galvanotaxis of ciliated protozoan cells to automation of acute toxicity assay[J]. Russian Journal of General Chemistry, 2015, 84(13): 2489-2498
- [18] 黄敦奇, 史雅娟, 张强斌, 等. 污染场地中有机氯农药对土壤原生动物的影响[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(6): 603-608
- [19] Zhang T, Li X, Lu Y, et al. Joint toxicity of heavy metals and chlorobenzenes to *pyriformis Tetrahymena*[J]. Chemosphere, 2014, 104(4): 177-183
- [20] 王琦, 陈瑛, 吴忆宁, 等. 原生动物的环境毒理学研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2015, 31(5): 139-142
- [21] 刘凤, 滕洪辉, 任百祥, 等. 土壤污染的生态毒理诊断研究进展[J]. 应用生态学报, 2014, 25(9): 2733-2744
- [22] 黄健, 姜辉, 曲霓霓, 等. 36 种典型除草剂对绿藻的毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(4): 193-201
- [23] Chung M K, Hu R, Cheung K C, et al. Screening of PAHs and DDTs in sand and acrisols soil by a rapid solid-phase microalgal bioassay[J]. Ecotoxicology, 2007, 16(5): 429
- [24] Ribo J M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay[J]. Environmental Toxicology, 2015, 12(4): 283-294
- [25] Xu W J, Jiang Z M, Zhao Q L, et al. Acute toxicity assessment of explosive-contaminated soil extracting solution by luminescent bacteria assays[J]. Environ Science and Pollution Research, 2016, 23(22): 1-7
- [26] Zhang J, Liu S S. Time-dependent stimulations of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride on redox reactants and antioxidantases in *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 283: 568-573
- [27] Oh S, Yoon H, Jeong T, et al. Evaluation of remediation processes for explosive-contaminated soils: Kinetics and Microtox® bioassay[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2016, 91(4): 928-937

- [28] Asghari S, Johari S A, Lee J H, et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*[J]. *J. Nanobiotechnology*, 2012, 10(1): 1–11
- [29] Bownik A, Stepniewska Z, Skowroński T. Effects of ectoine on behavioural, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna*[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C*, 2015, 168: 2–10
- [30] 李光宇, 吴次芳. 土壤微生物研究在农田质量评价中的应用[J]. *土壤学报*, 2018, 55(3): 1–15
- [31] Creamer R E, Stone D, Berry P, et al. Measuring respiration profiles of soil microbial communities across Europe using MicroResp<sup>TM</sup> method[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 97: 36–43
- [32] Sassi M B, Dollinger J, Renault P, et al. The FungiResp method: An application of the MicroResp<sup>TM</sup> method to assess fungi in microbial communities as soil biological indicators[J]. *Ecological Indicators*, 2012, 23(4): 482–490
- [33] Brewer S, Techtmann SM, Mahmoudi N, et al. Co-extraction of DNA and PLFA from soil samples[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 115: 64
- [34] Chapman S J, Campbell C D, Artz R R. Assessing CLPPs using MicroResp<sup>TM</sup> - A comparison with biolug and multi-SIR[J]. *Journal of Soils & Sediments Protection Risk Assessment & Rem*, 2007, 7(6): 406–410
- [35] Wakelin S, Lombi E, Donner E, et al. Application of MicroResp<sup>TM</sup> for soil ecotoxicology[J]. *Environmental Pollution*, 2013, 179(179C): 177–184
- [36] Kassem A, Paolo N. *Methods in applied soil microbiology & biochemistry*[M]. UK: Academic Press, 1995: 1–4
- [37] Yang X, Liu J, Mcgrouter K, et al. Effect of biochar on the extractability of heavy metals (Cd, Cu, Pb, and Zn) and enzyme activity in soil[J]. *Environmental Science & Pollution Research International*, 2016, 23(2): 974–984
- [38] Yu B, Wang X, Yu S, et al. Effects of roxithromycin on ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in the rhizosphere of wheat[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 263–272
- [39] Alrumman S A, Standing D B, Paton G I. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity[J]. *Journal of King Saud University - Science*, 2015, 27(1): 31–41
- [40] Angelovičová L, Lodenius M, Tulisalo E, et al. Effect of heavy metals on soil enzyme activity at different field conditions in Middle Spis mining area (Slovakia)[J]. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 2014, 93(6): 670–675
- [41] Lipińska A, Kucharski J, Wyszowska J. Activity of arylsulphatase in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Water Air & Soil Pollution*, 2014, 225(9): 2097
- [42] Yu X, Wang M, Chen W. Quantitative assessment on soil enzyme activities of heavy metal contaminated soils with various soil properties[J]. *Chemosphere*, 2015, 139: 604–608
- [43] 夏月, 朱永官. 硝化作用作为生态毒性指标评价土壤重金属污染生态风险[J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(3): 273–279
- [44] Dai Y, Wu Y, Ding Q, et al. Oxygenated derivative is more influential than unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbon on ammonia-oxidizing archaea in an acidic soil[J]. *Journal of Soils & Sediments*, 2018: 1–8
- [45] 周涵君, 马静, 韩秋静, 等. 施用生物炭对土壤 Cd 形态转化及烤烟吸收 Cd 的影响[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(09): 351–359.
- [46] Anderson T H, Domsch K H, et al. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub>(qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such pH, on the microbial biomass of forestsoil[J]. *Soil Biology & Biochemistry* 25: 393–395
- [47] Joergensen R G, Brookes P C. Quantification of soil microbial biomass by fumigation-extraction[M]//Monitoring and assessing soil bioremediation. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005: 281–295
- [48] 李平, 郎漫, 李煜姝, 等. 施用猪粪条件下重金属对土壤氮素净转化的影响[J]. *土壤通报*, 2017, 48(2): 467–473
- [49] 洪晨, 邢奕, 司艳晓, 等. 铁矿区内重金属对土壤氨氧化微生物群落组成的影响 [J]. *中国环境科学*, 2014, 34(5): 1212–1221
- [50] 郭辰, 吕占禄, 钱岩, 等. 微核实验在环境健康综合监测中的应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(4): 590–595
- [51] 王兴明, 张瑞良, 王运敏, 等. 淮南某煤矿邻近农田土壤中重金属的生态风险研究[J]. *生态环境学报*, 2016, 25(5): 877–884
- [52] 王五香, 高丹, 廖芬, 等. 蚕豆根尖微核技术的方法学新论[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(3): 86–91
- [53] Wang Z F, Cui Z J, Xu X M. Lysosomal membrane response of the earthworm, *Eisenia fetida*, to arsenic species exposure in OECD soil[J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(28): 23498–23507
- [54] Svendsen C, Meharg AA, Freestone P, et al. Use of an earthworm lysosomal biomarker for the ecological assessment of pollution from an industrial plastics fire[J]. *Applied Soil Ecology*, 1996, 3(2): 99–107
- [55] Scott-Fordsmand J J, Weeks J M, Hopkin S P. Toxicity of nickel to the earthworm and the applicability of the neutral red retention assay[J]. *Ecotoxicology*, 1998, 7(5): 291–295
- [56] Wang B, Li Y, Ren N. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, 38(11): 4361–4367
- [57] Lee S, Maniquiz-Redillas M C, Kim L H. Settling basin design in a constructed wetland using TSS removal efficiency and hydraulic retention time[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, 26(9): 1791–1796
- [58] 马静静, 钱新春, 张伟, 等. 土壤菲多次叠加污染对蚯蚓的毒性效应[J]. *土壤学报*, 2015, 52(6): 1374–1382



- [59] 卞方杰, 邢美燕, 杨健, 等. 彗星试验技术在水生与土壤环境中的毒理学应用[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(3): 63–70
- [60] 高曦, 盛月慧, 高彦征, 等. 利用彗星试验研究菲对蚕豆 DNA 的损伤[J]. 生态与农村环境学报, 2014, 30(4): 515–520
- [61] 公新忠, 丁德馨, 李广悦, 等. 铈胁迫对大豆与玉米幼苗细胞 DNA 损伤的彗星试验研究[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(2): 418–425
- [62] Zhang W, Song Y F, Sun T H, et al. Establishment of method for cytochrome P450 of earthworms (*Eisenia fetida*) as a biomarker[J]. Environmental Science, 2006, 27(8): 1636–1642
- [63] 杨晓霞, 张薇, 龚久平, 等. 蚯蚓细胞色素 P450 酶系对土壤中芘或苯并[a]芘的响应[J]. 环境科学学报, 2017, 37(10): 4019–4025
- [64] 赵欢, 赵新达, 岳宗豪, 等. 苯并(a)芘对双齿围沙蚕抗氧化酶活性和细胞色素 P450 基因表达的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(4): 342–346
- [65] Sillapawattana P, SchãFfer A. Effects of imidacloprid on detoxifying enzyme glutathione S-transferase on *Folsomia candida* (Collembola)[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(12): 1–9
- [66] 唐浩, 刘钊钊, 李银生, 等. 土壤汞污染胁迫对蚯蚓体内几种抗氧化酶活性的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2017, 35(3): 17–23
- [67] 张聪, 刘征涛, 王婉华, 等. 铅对赤子爱胜蚓抗氧化酶活性的影响[J]. 环境科学研究, 2013, 26(3): 294–299
- [68] 王辉, 谢鑫源. Cd、Cu 和 Pb 复合污染对蚯蚓抗氧化酶活性的影响[J]. 环境科学, 2014, 35(7): 2748–2754
- [69] Lewis S, Handy R D, Cordi B, et al. Stress proteins (HSP's): Methods of detection and their use as an environmental biomarker[J]. Ecotoxicology, 1999, 8(5): 351–368
- [70] Pyza E, Mak P, Kramarz P, et al. Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 1997, 38(3): 244–251
- [71] Tong L, Wang X, You X, et al. Oxidative stress and gene expression of earthworm (*Eisenia fetida*) to clothianidin[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2017, 142: 489–496
- [72] Wang C, Yuan T, Wan X, et al. Lead-contaminated soil induced oxidative stress, defense response and its indicative biomarkers in roots of *Vicia faba*, seedlings[J]. Ecotoxicology, 2010, 19(6): 1130–1139
- [73] Ezemaduka A N, Wang Y, Li X. Expression of CeHSP17 protein in response to heat shock and heavy metal ions[J]. Journal of Nematology, 2017, 49(3): 334–340
- [74] Coye M J, Lowe J A, Maddy K T, et al. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: I. Cholinesterase activity determinations and II. Monitoring of intact pesticides and their metabolites[J]. Journal of Occupational Medicine Official Publication of the Industrial Medical Association, 1986, 28(8): 619–628
- [75] 汪鹏鹏, 张松林, 靳佳, 等. 辛硫磷和敌百虫协同抑制斑马鱼乙酰胆碱酯酶(AChE)活性[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 298–304
- [76] Zheng Y, Liu Z, Jing Y, et al. An acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquid functionalized graphene gelatin-modified electrode for sensitive detection of pesticides[J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2015, 210: 389–397
- [77] Mogha NK, Sahu V, Sharma M, et al. Biocompatible ZrO<sup>2</sup>-reduced graphene oxide immobilized AChE biosensor for chlorpyrifos detection[J]. Materials & Design, 2016, 111: 312–320
- [78] 何康信, 周启星. 污染胁迫下的分子生物标志物和分子诊断技术[J]. 农业工程学报, 2013, 29(7): 1–16
- [79] Sangwan N, Lata P, Dwivedi V, et al. Comparative metagenomic analysis of soil microbial communities across three hexachlorocyclohexane contamination levels[J]. Plos One, 2012, 7(9): e46219
- [80] 夏围围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价[J]. 微生物学报, 2014, 54(12): 1489–1499
- [81] Zhou J Z, He Z L, Yang Y F, et al. Highthroughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: Open and closed formats. MBIO, 2015, 6(1): e02288–14
- [82] Liang Y, Li G, Van Nostrand JD, et al. Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(2): 324–333
- [83] 蔡元锋, 贾仲君. 基于新一代高通量测序的环境微生物转录组学研究进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 401–410
- [84] de Menezes A, Clipson N, Doyle E, Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. Environmental Microbiology, 2012, 14: 2577–2588
- [85] Zhang X D, Meng J G, Zhao K X, et al. Annotation and characterization of Cd-responsive metal transporter genes in rapeseed (*Brassica napus*)[J]. Biometals, 2017(95): 1–15
- [86] Zhang L, Duan X, He N, et al. Exposure to lethal levels of benzo[a]pyrene or cadmium trigger distinct protein expression patterns in earthworms (*Eisenia fetida*)[J]. Science of the Total Environment, 2017, 595: 733–742

- [87] Keiblinger K M, Wilhartz I C, Schneider T, et al. Soil metaproteomics—Comparative evaluation of protein extraction protocols[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 54(15- 10): 14–24
- [88] 熊艺, 林欣萌, 兰平. 土壤宏蛋白质组学之土壤蛋白质提取技术的发展[J]. *土壤*, 2016, 48(5): 835–843
- [89] Whitfield Åslund M L, Simpson A J, Simpson M J. 1H NMR metabolomics of earthworm responses to polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in soil[J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(4): 836–846
- [90] Tang R, Ding C, Ma Y, et al. Metabolic responses of *Eisenia fetida* to individual Pb and Cd contamination in two types of soils[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 13110

## Research Advances in Eco-toxicological Diagnosis Methods of Soil Pollution

WANG Kailai, MIAO Feng, SHI Ke, GUO Zhaohao, CHENG Jinghao, CHEN Yan\*

(College of Environmental Science and Engineering, Shandong Agriculture and Engineering University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** Diagnosis of soil pollution has important guiding significance for early warning of soil pollution and evaluating the remediation effect. In recent years, soil pollution is becoming more and more serious and pollution type presents a complicated and diversified trend, so the traditional chemical method cannot meet the requirements of comprehensive diagnosis for soil pollution due to single detection index, complex pre-treatment, and high cost. Compared with traditional chemical methods, the ecotoxicological diagnosis of soil pollution, with high sensitivity, fast response time, combinative detection index, and the unique advantage of reflecting the pollutant stress effect from microscopic view, has become a hot spot in soil pollution diagnosis. In this paper, based on the domestic and foreign literatures, different levels of diagnostic methods based on plants, animals, microorganisms, cells and molecules are presented, the advantages and disadvantages of each method are pointed out, and the prospect is forecasted.

**Key words:** Soil ecotoxicology; Biomarkers; Molecular diagnosis; Omics