

莫能菌素对蚯蚓(*Eisenia fetida*)活体 DNA 的损伤研究

王 轶¹, 张先勇¹, 刁晓平^{1,2*}, 杨 宝¹

(1.海南大学农学院, 海口 570228; 2.教育部热带生物资源重点实验室, 海口 570228)

摘 要:通过单细胞凝胶电泳实验研究了不同浓度莫能菌素暴露对赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)体腔细胞 DNA 的损伤,结果显示,50 mg·kg⁻¹ 莫能菌素处理组尾部 DNA 含量值最大、尾长值最大、Olive 尾矩值最大,分别为 34.539%、107.736 μm 和 29.354;随着莫能菌素暴露剂量的增加,尾部 DNA 含量、Olive 尾矩和尾长损伤频率增加;尾部 DNA 含量对莫能菌素暴露最为敏感,对照组和各处理组的尾部 DNA 含量之间均存在显著性差异($P<0.05$);对照组与 15、25、50 mg·kg⁻¹ 处理组的 Olive 尾矩和尾长损伤频率之间均存在显著性差异($P<0.05$);暴露浓度与尾部 DNA 含量、Olive 尾矩和尾长具有良好的剂量-效应关系($P<0.05$)。实验结果表明,蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤可作为指示莫能菌素影响的生物标志物,彗星试验是检测莫能菌素暴露对赤子爱胜蚓活体基因损伤的有效手段。

关键词:莫能菌素;彗星试验;蚯蚓;基因损伤

中图分类号:X503.223 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2011)05-0849-06

Effect of Monensin Exposure on DNA Damage in Earthworm(*Eisenia fetida*)

WANG Yi¹, ZHANG Xian-yong¹, DIAO Xiao-ping^{1,2*}, YANG Bao¹

(1.Agricultural College, Hainan University, Haikou 570228, China; 2.Key Laboratory of Tropic Biological Resources in Minister of Education, Haikou 570228, China)

Abstract: The effects of monensin on DNA damage in earthworm coelomocytes(*Eisenia fetida*) were studied at different exposure concentration by comet assay, which was also known as the single cell gel electrophoresis(SCGE) assay. The results showed that monensin could induce DNA damage of earthworm coelomocytes. The maximum value of tail DNA percent, tail length and olive tail moment were respectively 34.539%, 107.736 μm and 29.354 at the concentration of 50 mg·kg⁻¹. There were significant differences between the control and treatments (15、25、50 mg·kg⁻¹) in tail DNA percent ($P<0.05$). The significant dose-effect relationships were found among monensin concentration, tail DNA percent, OTM and tail length ($P<0.05$). DNA damage could be as biomarker to indicate the effect of monensin. The comet assay was a useful tool to analyze DNA damage of earthworm and apply in genotoxicity diagnose and biomonitoring of monensin in environment.

Keywords: monensin; comet assay; earthworm; DNA damage

彗星实验(Comet assay),又称单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis, SCGE),是一种在单细胞水平上检测 DNA 损伤的技术,它涉及当代生物学 3 大技术:离心、电泳和荧光显微镜技术^[1]。该技术由 Ostling 和 Johanson 首先建立,近年来发展迅速。彗星实验是一种简便、快速、灵敏、高效的测试手段,因其所需细胞少而成为科研工作者进行环境监测、流行病学调查

以及生态毒理学研究的有效工具。用蚯蚓体腔细胞来做单细胞凝胶电泳实验,是对彗星实验方法的发展和延伸^[2]。

土壤生物对土壤生态学的发展有着巨大的影响。蚯蚓作为土壤环境的指示生物广泛用于污染生态及重金属和农药的相关毒理学研究,赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)是目前研究土壤污染物各种生态毒性的标准模式无脊椎动物,因其容易获得、饲养方便、成本低、对毒性物质灵敏度高、又在土壤环境中生存,常作为受试材料被广泛用于土壤环境污染物的生态毒性评价^[3]。蚯蚓体腔细胞彗星实验可以非常灵敏地检测环境污染物对靶位和非靶位生物的遗传毒性效应。“蚯蚓彗星实验技术”是近年来国际上出现的全新的

收稿日期:2010-11-11

基金项目:海南省自然科学基金项目(807006);海南省教育厅科研项目(Hkj200724);海南省研究生科研创新项目

作者简介:王 轶(1983—),女,现为中国农业大学资源环境学院生态学专业博士研究生,主要从事兽药生态毒理效应研究。

E-mail:wangliaoliu@163.com

* 通信作者:刁晓平 E-mail:diaoxip@hainu.edu.cn

土壤环境生态毒性的评价技术^[4]。

为了评价莫能菌素对环境生物的潜在毒性效应,应用蚯蚓体腔细胞彗星实验研究了不同剂量的莫能菌素对蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤,以此评价莫能菌素酸的遗传毒性特征,从而对含莫能菌素饲料添加剂的安全性标准提供理论和技术依据,为评价莫能菌素的生态毒性寻找一种简便、快捷的科学方法。

1 材料与方法

1.1 实验蚯蚓与土壤

赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)由海南大学农学院动物科学实验室提供,选择 3 月龄以上,体重 300~400 mg,环带明显,健康成熟的蚯蚓作受试动物,各处理间蚯蚓的大小和重量基本相等。实验前先将蚯蚓置于实验土壤中饲养 24 h。

实验土壤为土表 20 cm 以下的清洁土壤,采自海南大学生命科学与农学院实习基地,其有机质含量为 29.93 g·kg⁻¹,速效磷含量为 1.76 mg·kg⁻¹,速效钾含量为 7.56 mg·kg⁻¹。实验前预先将土壤放在烘干箱中,80 ℃烘干 24 h,以去除土壤中的微生物。然后研细,过 2 mm 筛,保存备用。

1.2 实验仪器

上海博迅实业有限公司医疗设备厂 SPX-250C 型人工气候箱;日本 SHIMADZU 公司 AY220 型电子天平;美国 Millipore 公司 MilliQ 型纯水仪;上海精宏实验设备有限公司 DHG-9071A 型电热恒温干燥箱;金坛市大地自动化仪器厂 HH-S26s 型电热恒温水浴锅;日本 HITACHI 公司 CR22G II 型冷冻离心机;日本 Olympus IX71 荧光显微镜;北京六一仪器厂 DYY-7C 型电泳仪;可调式微量加样器(100~1 000 μL)。

1.3 实验试剂

莫能菌素(Monensin)原粉(批号 050505),纯度 98%,浙江海正药业公司生产。愈疮木酚甘油醚(Sigma),正常熔点琼脂糖(Oxodi)、低熔点琼脂糖(Premega)、毛载玻片(上海生工),Na₂EDTA,Tris,十二烷基肌氨酸钠,Triton-100,DMSO,NaOH。其余试剂为市售分析纯。

蚯蚓体腔细胞抽提液(EM):5%乙醇,95%生理盐水,2.5 mg·mL⁻¹ Na₂EDTA,10 mg·mL⁻¹ 愈疮木酚甘油醚,pH 7.3;2 mg·L⁻¹ SYBR green 水溶液。

苔盼蓝(0.4%):苔盼蓝 0.4 g,溶于 100 mL 生理盐水中,搅拌 10 min 左右,过滤,室温保存。

PBS 储液:氯化钠 8 g、氯化钾 0.2 g、磷酸氢二钠

1.15 g、磷酸二氢钾 0.2 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,高压、室温保存,临用前 10 倍稀释。

细胞裂解液:2.5 mol·L⁻¹NaCl,100 mmol·L⁻¹Na₂EDTA,10 mmol·L⁻¹Tris,1%十二烷基肌氨酸钠,1% Triton-100(临用前添加),10%DMSO,调节 pH 值至 10。

电泳缓冲液:临用前将 2 mmol·L⁻¹Na₂EDTA 和 600 mmol·L⁻¹NaOH 等体积混合,pH 值大于 13。

1.4 污染物对赤子爱胜蚓的暴露方法

实验设 1 个对照 CK,4 个暴露浓度(10、15、25、50 mg·kg⁻¹),每个处理为 3 次重复,每次重复 10 条蚯蚓。分别将 20 mL 不同浓度系列的莫能菌素溶液(溶于丙酮)与 500 g 土壤混合,充分混合 30 min 以上,待丙酮自然挥发 24 h 后,加入 100 mL 蒸馏水,平衡 48 h 后,转移到方形带盖的塑料盒中(盖上有孔)。然后选择健康、环带明显、重量相近(300~400 mg)的成体蚯蚓清肠 12 h 后称取初始体重,然后放入塑料容器中,每个容器放入 10 条,同时在容器表面加入 30 g 研细的无药物污染湿牛粪作为蚯蚓饵料。于人工气候箱中培养 21 d,箱中为标准实验条件:温度(20±1)℃,湿度 75%±2%,光暗比 12 h/12 h,定期喷射少量的水以保持基质的湿度。

1.5 蚯蚓体腔细胞的碱性单细胞凝胶电泳(SCGE)分析

碱性 SCGE 试验采用 Singh 等的方法,作适当修改,试验方法如下。

1.5.1 蚯蚓体腔细胞的提取及细胞悬液制备

参照 Eyambe 的方法^[5],把蚯蚓个体置于 4 ℃生理盐水中冲洗干净,分别移入离心管中,加 1 mL 的蚯蚓体腔细胞抽提液,浸泡 1.5 min,使细胞浓度达到 10⁶~10⁷个·mL⁻¹。取出蚯蚓,剩余溶液离心(3 000 r·min⁻¹,3 min)。用 PBS 缓冲液冲洗沉淀物后,离心(3 000 r·min⁻¹,3 min)待用。

细胞活力检测:取 1 滴细胞悬液加 1 滴苔盼蓝混匀,加至计数板内,高倍镜下镜检,活细胞为折光性良好的不着色细胞,死细胞被染成蓝色,胞体略膨大。

1.5.2 碱性 SCGE 试验的主要步骤

彗星实验按 Singh 报道^[6]的方法进行,操作在暗室(红色灯光)中进行,将正常熔点的琼脂糖 NMA 和低熔点琼脂糖 LMA 凝胶用 PBS 配制,水浴加热溶解后,分别在 60 ℃和 37 ℃恒温水浴。

(1) 第一层凝胶

在毛载玻片(75 mm×25 mm)的毛面上,滴上 100 μL 1.0%的 NMA,迅速盖上盖玻片,轻压盖玻片使凝

胶均匀铺开,然后在4℃下放置20 min,使凝胶完全固化。

(2)第二层凝胶

待第一层凝胶凝固后,移开盖玻片,滴加10 μL 细胞悬液与75 μL 0.7% LMA 的混合溶液到第一层凝胶面上,再次盖上盖玻片,轻压盖玻片使凝胶均匀铺开,将铺好胶的载玻片4℃下放置20 min,使凝胶完全固化。

(3)第三层凝胶

第二层凝胶固化后,移开盖玻片,将85 μL 0.7% LMA 滴在第二层凝胶面上,盖上盖玻片,4℃下放置20 min,使凝胶完全固化。

(4)裂解和电泳

将制备的凝胶放入冷的细胞裂解液中,4℃下裂解2 h,然后放入4℃蒸馏水中漂洗3 min,轻轻冲洗玻片上的残留液直到凝胶表面不粘滑为止,待充分洗去凝胶表面的盐分后于4℃保存,等待电泳。

将裂解好的胶板并排放置在水平电泳槽中的阳极端。将新鲜配置的电泳缓冲液倒入电泳槽,覆盖过载玻片约0.25 cm,盖上盖子,静置20 min,使双链DNA解螺旋。调节电泳液液面高度,在300 mA、25 V 下电泳20 min。

电泳完毕后,将玻片放置于染缸内,用pH 7.5、0.4 mol·L⁻¹ Tris-HCl 漂洗3次,每次间隔5 min,使凝胶呈中性。然后用乙醇脱水,放于4℃冰箱内,于1周内进行荧光分析。

观察时将载玻片用80 μL 2 mg·L⁻¹ SYBR green 溶液染色,盖上盖玻片,在荧光显微镜下观察。

1.5.3 碱性 SCGE 试验的图像采集和数据分析

在日本 Olympus IX71 荧光显微镜下观察 SYBR green 染色凝胶,放大倍数为400倍,拍摄单细胞电泳图像。然后,利用 CASP(从 <http://www.casp.of.pl/> 下载)彗星图象分析软件对实验所得的彗星图像进行数据分析,用 Excel 作图,检测指标包括 Olive 尾矩、彗尾 DNA 含量和彗尾长度。每条蚯蚓测量10个细胞,5条蚯蚓为1组,每组含50个细胞的测量数据。彗星实验测得的数据用 SAS8.1 统计分析软件分析各处理组之间差异是否有显著性。

2 结果与分析

利莫能菌素对蚯蚓体腔细胞的遗传毒性如表1和图1~图4所示。

由图1可见,莫能菌素处理的蚯蚓细胞经单细胞

表1 莫能菌素对蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤

Table 1 DNA damage of earthworm coelomocytes

exposed to monensin			
处理浓度 Concentration/ mg·kg ⁻¹	彗尾 DNA 含量 Tail DNA percent/ %	彗尾长度 Tail Length/ μm	Olive 尾矩 Olive time moment
0	0.162±0.016a	3.072±0.077a	0.120±0.036a
10	7.244±0.553b	9.753±2.430a	2.081±0.008a
15	14.414±0.961c	21.316±2.259b	6.649±0.087b
25	20.476±0.887d	73.515±7.153c	15.891±1.752c
50	34.539±7.187e	107.736±6.840d	29.354±2.387d

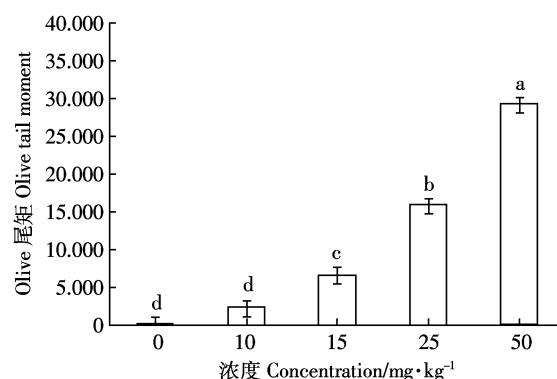
注:表中同列数值后标的字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different small letters within the same column indicated significant difference at 0.05 level.



图1 50 mg·kg⁻¹ 莫能菌素处理的蚯蚓体腔细胞形成彗星图形

Figure 1 The comet figure of an earthworm cell treated with monensin (50 mg·kg⁻¹)



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different small letters indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

图2 莫能菌素浓度与 Olive 尾矩(OTM)的关系

Figure 2 The changes of OTM caused by different concentrations of monensin

凝胶电泳后呈现因 DNA 分子损伤而形成的彗星图形,在荧光显微镜下可见浓集闪亮的头部和分散暗淡的尾部。

研究表明:不同浓度的莫能菌素均能引起蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤,表现为彗尾 DNA 含量的增

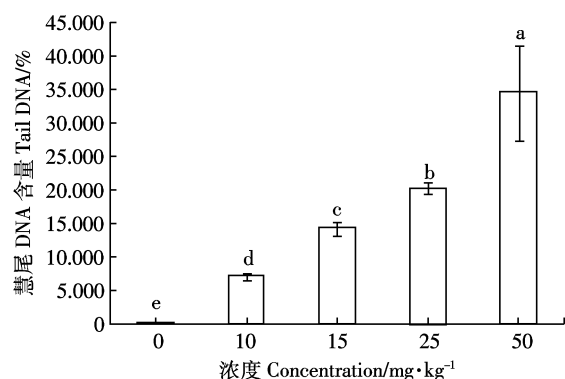


图3 莫能菌素浓度与彗尾 DNA 含量(TDNA)的关系

Figure 3 The changes of TDNA caused by different concentrations of monensin

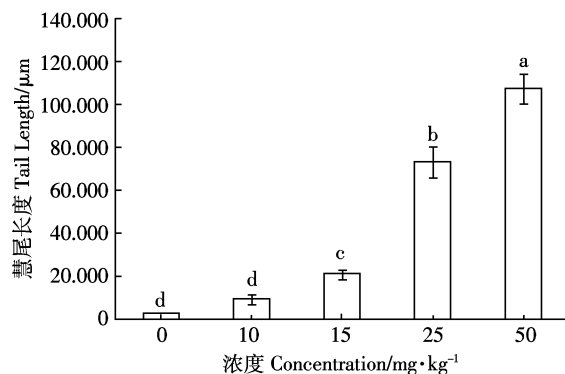


图4 莫能菌素浓度与彗尾长度(TL)的关系

Figure 4 The changes of TL caused by different concentrations of monensin

加、彗尾长度加长,Olive 尾矩增加。3 个指标具有很好的一致性,说明可以采用以上 3 个指标来反映蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤。彗尾 DNA 含量的最大值出现在莫能菌素浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的处理组,为 34.539% ;彗尾长度最大值也出现在该处理组,为 $107.736 \mu\text{m}$ 。各遗传指标的差异显著性结果不完全相同。莫能菌素对这 3 个指标的影响表现出很好的一致性,同时药物的染毒浓度与这 3 个指标间均有很好的相关性。在所测的 3 个指标中以彗尾 DNA 含量对莫能菌素的胁迫最为敏感,当莫能菌素达到 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时表现出最强的遗传毒性。

DNA 受到严重损伤时,细胞的个体差异变大,尾长、彗尾 DNA 百分含量和尾矩会受到强烈影响,本研究用均值表示的实验结果就可很好地表示莫能菌素对蚯蚓造成的遗传损伤。

3 讨论

兽药的广泛使用,必然对蚯蚓的生存、生长和繁

殖产生种种不利影响。因此,研究兽药对蚯蚓的毒性,特别是对分子生物标志物的影响,是评价兽药对生态环境安全性的一个重要指标。研究表明污染物能够破坏生物体内 DNA 分子的整体结构,引起基因缺失或改变从而导致细胞发生突变,因而 DNA 断裂水平的检验成为研究遗传毒性效应的重要标志物^[7]。

单细胞凝胶电泳实验(彗星实验)作为一种敏感的化合物遗传毒性测试手段,不仅可以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,而且也能根据毒性变化情况从侧面反应出污染物在环境中的降解变化规律^[8]。其实验原理可简单描述为:在强碱环境下,琼脂糖凝胶中的细胞膜、核膜及其他生物膜结构受到破坏,导致生物膜内的蛋白质、RNA 及其他成分进入凝胶而扩散至电泳液中,由于核 DNA 分子量较高,不能进入凝胶而留在原位。受损的 DNA 片段带负电,在电场力的作用下向阳极移动,形成彗星状图像,而未损伤的 DNA 停留在核中形成圆形荧光团。因此,DNA 损伤越严重进入彗星尾部的 DNA 就越多,表现为尾长和尾部荧光强度增加^[9]。目前评价彗星实验结果常用的定量指标主要有:尾长、“彗尾”DNA 含量和尾矩。其中,尾长(Tail length, TL)是指“彗星”核心到尾部的距离;“彗尾”DNA 含量(Tail DNA content, TD)是指“彗星”尾部 DNA 荧光强度与“彗星”头、尾部总荧光强度的比值;尾矩则是尾长和“彗尾”DNA 含量的乘积^[10]。

据报道^[11]阿散酸降解后能导致 DNA 损伤,其尾矩与损伤程度保持较好的线性关系,故 DNA 含量、尾矩、尾长等参数能较好地反映蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤。本实验结果也印证了这个结论。

有人认为凝胶会限制 DNA 的迁移从而影响尾长和尾矩的测量值,从而倾向于用尾部 DNA 百分含量来表示实验结果,但由于细胞和化合物类型的不同,尾长并不能很好地表现出线性的剂量-效应关系^[12]。从本研究的结果来看,尾长、尾矩和尾部 DNA 百分含量均能够反映良好的线性的剂量-效应关系。有研究表明,剂量效应的明显程度与化合物的种类有关^[13-14]。

从本研究结果可以得出,随着莫能菌素暴露剂量的升高,处理组蚯蚓体腔细胞遗传损伤指标均呈上升趋势。这可能是由于环境中莫能菌素浓度的增加导致进入蚯蚓体内的莫能菌素浓度上升,而大量涌入体内的莫能菌素有可能导致蚯蚓清除体内活性氧自由基的能力下降,解毒能力减弱,从而造成基因损伤加剧^[15-17]。

对于不同浓度的莫能菌素暴露剂量,用“彗星”尾矩、尾长和尾部 DNA 百分含量表示的 DNA 损伤程度与遗传毒性物质莫能菌素的浓度基本呈线性关系。

彗星实验的各指标分别从某一方面反映了莫能菌素的毒性作用,在应用生物标志物进行环境监测时,不能简单地依靠某一两种标志物进行评价,应该采用多种指标进行综合评价,死亡率是从个体水平上反映污染物毒性的指标,而 DNA 损伤是遗传指标^[18-21],生态系统是一个复杂的体系。目前只证明部分物质具有明显的遗传毒性作用,随着畜牧业的发展,兽药使用频繁,鉴于化学仪器分析技术存在一定的局限性,要将所有的遗传毒性物质完全检出,有一定的难度,而且即便检出,也难以确切反映其毒性效应^[22-24]。

采用彗星实验技术检验蚯蚓活体暴露过程中 DNA 损伤水平,并结合统计学分析方法对“彗星”尾矩、尾长等参数表示的实验数据进行分析,能够更为准确地定量描述污染物造成动物细胞 DNA 的损伤,因此彗星实验将会成为未来检验污染物对环境遗传毒性效应的有效方法^[2]。

4 结论

莫能菌素暴露浓度与尾部 DNA 含量、Olive 尾矩和尾长具有良好的剂量-效应关系,蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤可作为指示莫能菌素影响的生物标志物,彗星试验是检测莫能菌素暴露对赤子爱胜蚓活体基因损伤的有效手段。

参考文献:

- [1] Juliana DS, Thales RODF, Jorge RM, et al. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2000, 23(1): 241-245.
- [2] Reinecke SA, Reinecke AJ. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms [J]. *Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 46: 208-215.
- [3] 颜增光, 何巧力, 李发生. 蚯蚓生态毒理试验在土壤污染风险评估中的应用[J]. *环境科学研究*, 2007, 20(1): 134-142.
YAN Zeng-guang, HE Qiao-li, LI Fa-sheng. The use of earthworm ecotoxicological test in risk assessment of soil contamination[J]. *Research of Environmental Science*, 2007, 20(1): 134-142.
- [4] 周启星, 王美娥. 土壤生态毒理学研究进展与展望 [J]. *生态毒理学报*, 2006, 3(1): 1-11.
ZHOU Qi-xing, WANG Mei-e. Researching advancement and prospect of soil ecotoxicology[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2006, 3(1): 1-11.
- [5] Eyma GS, Goven AJ, Fitzpatrick LC, et al. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies[J]. *Laboratory Animals*, 1991, 25: 61-67.
- [6] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells[J]. *Experimental Cell Research*, 1988, 175: 184-191.
- [7] 杨红莲, 蔡磊明, 谢明, 等. 彗星实验在农药安全评价中的应用[J]. *农药*, 2004, 43(12): 532-533.
YANG Hong-lian, CAI Lei-ming, XIE Ming, et al. Use of the comet assay in evaluating pesticide safety[J]. *Agrochemicals*, 2004, 43(12): 532-533.
- [8] Lee RF, Steinert S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals[J]. *Mutation Research*, 2003, 544: 43-64.
- [9] 林爱军, 耿春女, 朱永官. 单细胞凝胶电泳技术及在土壤生态毒理学中的应用[J]. *生态学杂志*, 2005, 24(8): 975-979.
LIN Ai-jun, GENG Chun-nv, ZHU Yong-guan, et al. Single cell gel electrophoresis technique and its applications in soil ecotoxicology[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(8): 975-979.
- [10] Lee E, Oh E, Lee J, et al. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies[J]. *Toxicological Sciences*, 2004, 81: 121-132.
- [11] 孔志明, 孔琛. 阿散酸及其降解产物对鱼和蚯蚓的遗传毒性[J]. *环境科学与技术*, 2007, 30(4): 11-13.
KONG Zhi-ming, KONG Chen. Genotoxicity effects of arsanilic acid and its degradation products on carp and earthworm[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 30(4): 11-13.
- [12] Mitchelmore CL, Chipman JK. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring[J]. *Mutation Research*, 1998, 399: 135-147.
- [13] Siu WHL, Cao J, Jack RW, et al. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the greenlip mussel (*Perna viridis*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 66: 381-392.
- [14] Poul JM, Huet S, Godard T, et al. Lack of genotoxicity of potassium iodate in the alkaline comet assay and in the cytokinesis block micronucleus test, comparison to potassium bromate[J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42: 203-209.
- [15] Jensen J, Diao XP, Hansens A. Single- and two-species tests to study effects of the anthelmintics ivermectin and morantel and the coccidiostat monensin on soil invertebrates[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(2): 316-323.
- [16] Bigorgne E, Cossu-Leguille C, Bonnard M, et al. Genotoxic effects of nickel, trivalent and hexavalent chromium on the *Eisenia fetida* earthworm [J]. *Chemosphere*, 2010, 80(9): 1109-1112.
- [17] Giovanetti A, Fesenko S, Cozzella ML, et al. Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium[J]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2010, 101(6): 509-516.
- [18] Button M, Jenkin GRT, Bowman KJ, et al. DNA damage in earthworms from contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use

- of the comet assay [J]. *Mutation Research-genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2010, 696(2):95-100.
- [19] Otomo PV, Reinecke SA. Increased cytotoxic and genotoxic tolerance of *Eisenia fetida*(Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure[J]. *Ecotoxicology*, 2010, 19(2):362-368.
- [20] 陆开宏, 张双玲, 张春景, 等. 应用彗星试验研究产毒微囊藻喂食暴露对铜锈环棱螺肝细胞 DNA 的损伤 [J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(6):1079-1085.
- LU Kai-hong, ZHANG Shuang-ling, ZHANG Chun-jing, et al. Detection of DNA damage in liver cells of *bellamya aeruginosa* induced by microcystins with comet assay[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(6):1079-1085.
- [21] Sforzini S, Dagnino A, Saggese L, et al. Use of an expert system for biomarkers' data integration to assess the level of stress syndrome in *Eisenia Andrei* exposed to dioxin-spiked soils[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Amolecular & Integrative Physiology*, 2009, 154(1):s24-s24.
- [22] Song Y, Zhu LS, Wang J, et al. DNA damage and effects on antioxidant enzymes in earthworm(*Eisenia fetida*) induced by ztrazine[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41(5):905-909.
- [23] Bonnard M, Eom IC, Morel JL, et al. Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia fetida*[J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2009, 50(1):60-67.
- [24] Manerikar RS, Apte AA, Ghole VS. In vitro and in vivo genotoxicity assessment of Cr(VI) using comet assay in earthworm coelomocytes[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008, 25(1):63-68.