

郑丽莎, 史雅娟, 孟凡乔, 等. 2009. 硫丹对蚯蚓存活、生长和肠胃线粒体超微结构的影响 [J]. 环境科学学报, 29(6): 1283–1287

Zheng L S, Shi Y J, Meng F Q, et al. 2009. Effects of endosulfan on the mortality, growth and enterogastric ultrastructure of earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(6): 1283–1287

硫丹对蚯蚓存活、生长和肠胃线粒体超微结构的影响

郑丽莎¹, 史雅娟^{2*}, 孟凡乔¹, 张翔²

1. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094

2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

收稿日期: 2008-08-19

修回日期: 2008-12-16

录用日期: 2009-04-08

摘要: 通过人工土壤法对蚯蚓进行 14 d 的急性暴露, 研究了硫丹对蚯蚓存活、生长的影响; 试验结束后, 从硫丹剂量为 0.5 mg kg^{-1} 和 5 mg kg^{-1} 的处理中挑选蚯蚓制作超薄切片, 观察肠、胃部线粒体超微结构的变化。结果表明, 硫丹对蚯蚓有较强的毒性作用, 14 d 的 LC_{50} 为 6.52 mg kg^{-1} 。试验期间硫丹对蚯蚓的生长有显著的抑制作用, 生长抑制率随硫丹剂量和暴露时间增加而增大。蚯蚓肠胃部的线粒体对硫丹有较强的敏感性, 在非致死剂量下超微结构的损伤程度随硫丹剂量增加而加重。

关键词: 硫丹; 蚯蚓; 线粒体; 超微结构; 生态毒理

文章编号: 0253-2468(2009)06-1283-05

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Effects of endosulfan on the mortality, growth and enterogastric ultrastructure of earthworms (*Eisenia fetida*)

ZHENG Lisha¹, SHI Yajuan^{2*}, MENG Fanqiao¹, ZHANG Xiang²

1. College of Resources and Environmental Science, China Agricultural University, Beijing 100094

2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Science, Beijing 100085

Received 19 August 2008

received in revised form 16 December 2008

accepted 8 April 2009

Abstract To study the effects of endosulfan on mortality, growth and the ultrastructure changes of enterogastric mitochondria of earthworms (*Eisenia fetida*), earthworms were raised in artificial soil and examined after 14 days of acute exposure. The results showed that endosulfan had a lethal effect on earthworms with median lethal concentrations (LC_{50}) at 6.52 mg kg^{-1} for 14 days. Endosulfan inhibited the growth of earthworms during the test, and the inhibition rates increased with exposure time and endosulfan dosage. The ultrastructures of the enterogastric mitochondria were destroyed irreversibly after exposure to endosulfan, even at non-lethal doses. Changes in the ultrastructure of the enterogastric mitochondria were more sensitive indicators than LC_{50} values in assessing endosulfan injury to earthworms.

Keywords endosulfan; earthworm; mitochondria; ultrastructure; ecotoxicity

1 引言 (Introduction)

硫丹 (endosulfan) 是一种高毒性的有机氯杀虫剂, 具有较强的环境持久性, 在土壤中的半衰期为 15~26 d (明九雪等, 1998), 并且容易在动植物体内富集, 因此, 欧盟规定从 2005 年 12 月开始禁止使用

硫丹作为植物保护产品中的活性成分, 联合国规划署和日本也都制定了相关的残留限量。而自 20 世纪 90 年代初, 硫丹在我国大量生产和广泛应用后, 我国尚未对硫丹的残留量做出规定, 也未把硫丹列入食品的检测项目。

目前, 国内外学者对硫丹的毒理性质做了大量

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 40601089); 国家重点基础研究发展计划项目 (No. 2007CB407307); 中国科学院“知识创新工程”重大项目 (No. KZCX1-YW-06-05-02) 辽宁省教育厅项目 (No. 05 L196)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40601089), the National Basic Research Program of China (No. 2007CB407307), the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KZCX1-YW-06-05) and the Project of the Educational Department of Liaoning Province (No. 05 L196)

作者简介: 郑丽莎 (1984-), 女, E-mail: lisha_dream@163.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: yajuansh@cees.ac.cn

Biography: ZHENG Lisha (1984-), female, E-mail: lisha_dream@163.com; * Corresponding author, E-mail: yajuansh@cees.ac.cn

研究,但都集中在对大型动物(Wade *et al.*, 1997; Zhang 2006)、水生动物(Singh *et al.*, 1982)以及微生物(Tarar *et al.*, 1980)的毒性研究,对直接受影响的土壤动物的研究甚少;并且大都采用传统的生态毒理研究方法,如:LC₅₀、生殖能力、行为、种群变化等,这些方法虽然揭示了受试药品的毒性作用及对种群动态等影响,但难以提供非致死剂量下受试药品对生物体的损害及慢性影响(甘雅玲等, 2001).本研究中采用人工土壤法对蚯蚓进行14d急性暴露,观察硫丹对蚯蚓的存活、生长的影响,并通过电镜技术观察硫丹对蚯蚓肠、胃线粒体超微结构的影响,分别从蚯蚓个体水平和超微结构水平来研究硫丹对蚯蚓的毒性作用.

2 实验材料及方法 (Materials and methods)

2.1 试验蚯蚓和药品

赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)购于北京大地方通蚯蚓养殖厂.选用3个月月龄以上的健康成熟蚯蚓,有明显的环带,体长5~6cm,体重0.25~0.35g.试验前在人工土壤中适应24h.

硫丹原药,纯度为95%,由江苏安邦电化有限公司提供.

2.2 实验方法

2.2.1 急性毒性试验 本实验采用人工土壤为基质培养蚯蚓,按照OECD Guideline No. 207(OECD, 1984)规定的培养条件进行蚯蚓的急性暴露试验.其中人工土壤的配比为石英砂70%、高岭土20%、草炭10%,用蒸馏水调节湿度为35%,适当添加碳酸钙以调节pH值为7.0±0.2.

根据预实验结果,确定硫丹含量范围是0~20 mg·kg⁻¹.先将硫丹原药溶于丙酮,然后与人工土充分均匀混合,使每个处理的人工土中硫丹含量分别为:0.05, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 20.0 mg·kg⁻¹(湿重),每个处理设4个重复.待丙酮完全挥发后,选取身长、体重大致相当并已在空白人工土中适应24h的健康成熟蚯蚓,每10条为一组放于装有750g(湿重)上述人工土的1000mL大烧杯中,用塑料膜封口并扎孔,以确保空气的流通.然后把烧杯放在HPG-280H型人工气候箱内进行培养,保持箱内(20±2)℃恒温,相对湿度为80%~85%,强度为400~800lx的24h连续光照.分别在试验第4、7、10和14d将蚯蚓拣出、洗净,记录存活蚯蚓数量并称重,同时补充水分.

2.2.2 死亡率及生长抑制率 试验中蚯蚓头和尾部对强烈机械刺激无反应即视为死亡,由于蚯蚓死亡后身体有较强的自溶性,试验中蚯蚓数量减少可视为已经死亡(史雅娟等, 2006).蚯蚓在硫丹剂量为n mg·kg⁻¹人工土中培养t时间后的生长抑制率为:

$$I_n = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中, I_n 为蚯蚓在硫丹剂量为n mg·kg⁻¹人工土壤中培养t时间时的生长抑制率, W_0 和 W_t 分别为培养前和培养t时间后蚯蚓的平均体重(g).

2.2.3 超微结构观察 在急性毒性实验结束后分别从0.5 mg·kg⁻¹和5.0 mg·kg⁻¹的2个处理中各选取1条存活且身体没有发生严重溃烂的蚯蚓,清肠24h之后,用酒精麻醉、解剖,准确截取其胃、肠样品(为增加可比性,肠选取环带下部约2~10节处);样品长度约为2~3mm,放入戊二醛缓冲液中固定,经丙酮系列脱水,环氧树脂SPURR型包埋剂包埋、聚合,并用LEICAUC6型超薄切片机切片,厚度500~2700nm,醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,用日立H-7500型透射电镜观察、拍照.

2.3 数据处理

采用概率回归的方法根据蚯蚓14d的死亡率计算半致死剂量.对于蚯蚓的生长抑制率数据(必要的时候数据进行对数转换),在满足正态分布(Shapiro-Wilk test)和方差齐性(Levene's test)的前提下,采用方差分析(ANOVA)和多重比较(S-N-K test)分析处理之间的差异显著性;在方差非齐性的情况下采用Games-Howell检验来检验处理之间差异的显著性;采用Paired-sample-t test检验不同时间的生长抑制率之间的差异的显著性.所有统计采用SPSS 10.0软件完成.

3 结果 (Results)

3.1 硫丹对蚯蚓存活的影响

采用概率回归方法计算14d时蚯蚓的半致死剂量(LC₅₀),并据此来研究硫丹对蚯蚓存活的毒性作用.硫丹急性毒性试验中各培养阶段蚯蚓死亡率如表1所示,由表可知,随着培养时间的增加和硫丹剂量的增大,蚯蚓的死亡率增加.硫丹剂量为20.0 mg·kg⁻¹的处理中蚯蚓自培养7d后全部死亡.培养14d后,硫丹剂量为5.0 mg·kg⁻¹的处理中蚯蚓开始出现死亡,10.0 mg·kg⁻¹处理中的蚯蚓全部死亡.经回归分析可知,14d时硫丹对蚯蚓的半致死剂量为

6.52 mg·kg⁻¹, 95% 的置信区间为 6.03 ~ 6.99 mg·kg⁻¹.

目前,尚无正式颁布的农药对蚯蚓的毒性等级划分标准,通常认为 LC₅₀ > 10 mg·kg⁻¹的农药为低毒农药,LC₅₀为 1~10 mg·kg⁻¹的农药为中毒农药,LC₅₀ < 1 mg·kg⁻¹的农药为高毒农药(张壬午等,1986),可见硫丹对蚯蚓具有中等毒性作用。

表 1 硫丹急性毒性试验中蚯蚓平均死亡率

含量 / (mg·kg ⁻¹)	死亡率			
	4 d	7 d	10 d	14 d
0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0
2.5	0	0	0	0
5.0	0	0	5%	10%
7.5	0	5%	40%	70%
10.0	7.5%	55%	88%	100%
20.0	32.5%	100%	100%	100%

3.2 硫丹对蚯蚓生长的影响

在本试验的培养条件下,培养过程中对照组蚯蚓体重均有下降(图 1),这是由于试验蚯蚓购买于养殖场,养殖场的蚯蚓培养基质主要成分为腐熟牛粪,而人工土壤中草炭含量仅为 10%,实验前后培养环境差异过大而造成的。试验期间硫丹染毒处理中的蚯蚓生长一直处于抑制状态,除 10.0 mg·kg⁻¹处理 14d 时蚯蚓全部死亡,生长抑制率可达到 100%,其他暴露处理蚯蚓生长抑制率范围为 12.46% ~ 53.27%。

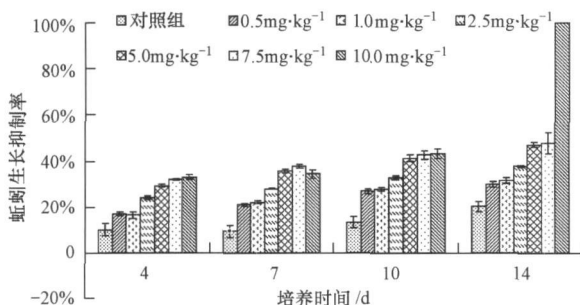


图 1 急性毒性试验中硫丹对蚯蚓生长影响

Fig. 1 Effect of endosulfan on growth of earthworms in acute toxicity tests

经 Shapiro-Wilk 正态分布检验,4、7、10d 的生长抑制率数据为正态分布,14d 的生长抑制率数据为对数正态分布,均满足进行方差分析的前提条件。

采用方差分析来分析不同浓度处理之间差异的显著性,结果表明,在 14 d 的实验期间内,硫丹对蚯蚓的生长抑制情况均存在显著的剂量效应关系(4 d $F = 45.143$, $p = 0.000$; 7 d $F = 52.537$, $p = 0.000$; 10 d $F = 43.863$, $p = 0.000$; 14 d $F = 17.170$, $p = 0.000$)。

对相同培养时间不同处理间蚯蚓生长抑制率进一步的多重比较(S-N-K test)表明,在第 4、7、10d 所有硫丹处理与空白处理都有显著差异(显著性差异水平 5%),经低含量(0.5 和 1.0 mg·kg⁻¹)、中等含量(2.5 mg·kg⁻¹)和高含量(5.0、7.5 和 10.0 mg·kg⁻¹)3 组硫丹处理的生长抑制率之间都有显著差异,表现出很好的剂量效应关系。第 14d 的生长抑制率由于方差非齐性,采用 Games-Howell 检验分析,结果表明,硫丹的剂量显著影响其生长情况;空白、低含量(0.5 和 1.0 mg·kg⁻¹)、中等含量(2.5 mg·kg⁻¹)、较高含量(5.0 和 7.5 mg·kg⁻¹)和高含量(10.0 mg·kg⁻¹)硫丹处理的生长抑制率之间都有显著差异。

由图 1 可见,蚯蚓暴露于硫丹处理中后生长迅速受到抑制,且随着暴露时间的延长生长抑制率增大;经 Paired-sample *t* test 检验,不同时间的生长抑制率之间具有显著差异($p < 0.000$)。

以上分析说明,蚯蚓生长同时受暴露时间和硫丹剂量 2 个因素的影响。其它研究也有类似的结果,如蚯蚓在林丹和溴氰菊酯处理后的人工土壤中暴露 14d 后,高剂量下的蚯蚓生长抑制率明显大于中低剂量下的抑制率,同时生长抑制率又受到暴露时间的影响,暴露时间越长生长抑制率也越大(Shi *et al.*, 2007)。除草剂异丙隆的毒性试验结果表明,剂量的增加(特别是 0.5 和 1.0 g·kg⁻¹ 2 个剂量之间)和暴露时间的延长都会使蚯蚓生长抑制率增大(Yahia Y Mosleh *et al.*, 2003)。

3.3 硫丹对蚯蚓肠道线粒体的影响

正常蚯蚓肠道线粒体大部分为短棒状或卵圆形,线粒体内膜向内部折叠成的嵴清晰可见,线粒体基质致密且分布均匀(图 2a)。培养 14d 后,暴露于剂量为 0.5 mg·kg⁻¹ 的硫丹中的蚯蚓肠道线粒体结构模糊,嵴不清楚或断裂,部分线粒体基质密度降低(图 2b);而暴露剂量为 5.0 mg·kg⁻¹ 硫丹中的蚯蚓肠道线粒体发生空泡化变性,基质电子密度严重降低,并略有肿大,嵴变短甚至消失,部分线粒体外膜破裂(图 2c)。可见蚯蚓肠道线粒体超微结构对

硫丹有较强的敏感性, 硫丹剂量为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 即可 对它们造成损伤, 随硫丹剂量的增加损伤程度加重.

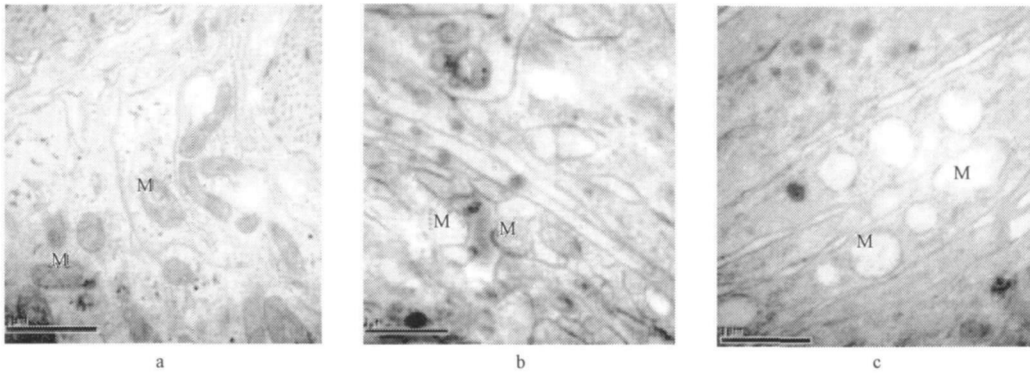


图 2 硫丹对蚯蚓肠道线粒体的影响 ($30000\times$) (M 指线粒体; a 为对照组肠道线粒体; b、c 分别为培养 14d 后硫丹剂量 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理中蚯蚓肠道线粒体)

Fig 2 Effects of endosulfan on intestinal mitochondria of earthworms ($30000\times$) (M stands for mitochondria; a Normal intestinal mitochondria; b, c are intestinal mitochondria of earthworms which were exposed to endosulfan at the levels of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 14 days)

3.4 硫丹对蚯蚓胃部线粒体的影响

正常蚯蚓胃部线粒体也为短棒状或卵圆形, 线粒体的嵴清晰可见, 且基质致密且分布均匀 (图 3a)。培养 14d 后, 暴露于剂量为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硫丹中的蚯蚓胃部线粒体结构模糊不清, 且线粒体发生比较严重的肿胀现象, 基质电子密度略有降低且分布不均匀, 有不定形的沉积物质产生 (图 3b); 而暴

露于剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硫丹中的蚯蚓的胃部线粒体略有肿胀, 大部分线粒体基质发生凝聚现象, 基质电子密度分布极不均匀, 已经开始出现空泡化变性, 嵴模糊不清 (图 3c)。可见硫丹对蚯蚓胃部线粒体造成损伤, 且损伤程度随硫丹剂量的增加而略有加重。表现出较好的剂量效应关系。

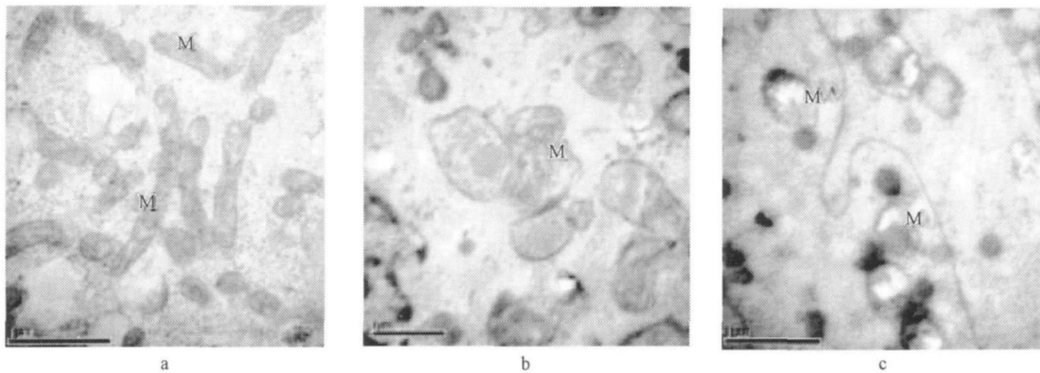


图 3 硫丹对蚯蚓胃部线粒体的影响 ($30000\times$) (M 指线粒体; a 为对照组胃部线粒体; b、c 分别为培养 14d 后硫丹浓度 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理中蚯蚓胃部线粒体)

Fig 3 Effects of endosulfan on gastric mitochondria of earthworms ($30000\times$) (M stands for mitochondria; a Normal gastric mitochondria; b, c are gastric mitochondria of earthworms which were exposed to endosulfan at the levels of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 14 days)

4 讨论 (Discussion)

蚯蚓是陆地生态系统的重要组成部分, 在促进土壤生物活性、提高土壤肥力、改善土壤结构等方面起着重要的作用, 并且蚯蚓对多种重金属、有机污染物均表现出反映指示和累积指示的特殊作用 (袁方曜等, 2002), 蚯蚓分布广泛、个体大, 与其

他土壤动物相比易于研究, 它的一些生命周期参数, 如生长抑制率、死亡率、繁殖能力等易于定量, 因此在评估土壤污染方面起着重要作用。本文采用人工土壤法对蚯蚓进行急性暴露试验, 结果表明, 14d 时硫丹对蚯蚓的 LC_{50} 为 $6.52 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 对蚯蚓具有中等程度的毒性作用。试验过程中硫丹对蚯蚓生长一直保持抑制状态, 且蚯蚓的生长抑制率随着

暴露时间的延长以及硫丹剂量的增加而加重。

本文对超微结构观察结果表明, 硫丹对蚯蚓肠道、胃部线粒体均有不同程度的损伤, 线粒体的损伤将影响蚯蚓肠、胃细胞能量的供应, 使肠胃蠕动缓慢, 并且会引起肠胃细胞凋亡, 从而降低肠胃对食物的吸收能力。这在一定程度上从微观方面解释了试验过程中蚯蚓生长受抑制的原因。肠道及胃部线粒体的受损程度随硫丹剂量的增加而加重, 从而引起蚯蚓对食物的吸收能力随硫丹剂量的增加而减弱, 这与蚯蚓生长抑制率随硫丹剂量增加而增大的结果一致。

试验结果表明, 暴露于剂量为 0.5 mg kg^{-1} 硫丹中 14d 后, 蚯蚓没有出现死亡现象, 但在此浓度下蚯蚓肠、胃线粒体的超微结构已经出现比较明显的受损症状。暴露于剂量为 50 mg kg^{-1} 硫丹中的蚯蚓死亡率仅为 10%, 但蚯蚓肠胃线粒体已经发生不可逆的空泡化样变, 可见在非致死剂量下蚯蚓的线粒体超微结构已经发生严重病变。这说明, 蚯蚓超微结构对硫丹毒性作用的反应要比死亡率更敏感。

由以上讨论可见, 硫丹对蚯蚓存活、生长以及肠胃线粒体等都有毒性作用, 在非致死剂量下蚯蚓生长受到抑制, 并且线粒体超微结构发生病变, 其受损程度随硫丹剂量的增加而加重。从一定程度来讲, 线粒体超微结构的损伤可以从微观方面解释非致死浓度下蚯蚓生长受抑制的原因。

5 结论 (Conclusion)

1) 硫丹对蚯蚓存活有较强的毒性作用, 14d 的半致死浓度为 6.52 mg kg^{-1} , 95% 的置信区间为 $6.03 \sim 6.99 \text{ mg kg}^{-1}$ 。

2) 硫丹对蚯蚓生长有抑制作用, 且生长抑制率随硫丹剂量和暴露时间的增加而增大。

3) 非致死剂量下, 硫丹引起蚯蚓肠道及胃部线粒体超微结构发生病变, 线粒体作为蚯蚓受损的指示要比死亡率更敏感, 并且病变程度随硫丹剂量的增大而加重。

责任作者简介: 史雅娟, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事化学品对土壤污染的生态效应和风险管理等方面的研究。
E-mail: yajuan@ricees.ac.cn

参考文献 (References):

Tanar J L, Salpekar C R. 1980 Relative tolerance of soil algae to some selected insecticides [J]. *Sci Cult* 46: 105—107
甘亚玲, 郭中伟. 2002 溴氰菊酯对蚯蚓超微结构的影响研究 [J]. *电子显微学报*, 21(5): 513—514

Gan Y L, Guo Z W. 2002 Study on the effect of Deltamethrin on the ultrastructure of earthworms [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 21(5): 513—514 (in Chinese)
郭永灿, 王振中, 张友梅, 等. 1997 重金属对蚯蚓胃肠道上皮细胞超微结构损伤的研究 [J]. *生态学报*, 17(3): 282—287
Guo Y C, Wang Z Z, Zhang Y M, et al. 1997. Effect of heavy metal pollution in soil on the mucosa epithelia cell ultrastructure injuring of earthworm's gastrointestinal tract [J]. *Acta Ecologica Sinica* 17(3): 282—287 (in Chinese)
Kokta C A. 1992. Laboratory test on sublethal effects of pesticides on *Eisenia fetida* [A] // Becker H, Edwards P J, Greig-Smith P W, et al. *Ecotoxicology of Earthworms* [C]. Andover, Hants: Interscept Press, 55—62
Martins M J, Hipolito-reis C, Azevedo I. 2001. Effect of fasting on rat duodenal and jejunal microvilli [J]. *Clinical Nutrition* 20(4): 325—331
明九雪, 钱范范, 申继忠. 1998 硫丹 (Endosulfan) 在苹果和土壤中的残留动态研究 [J]. *中国农业大学学报*, 3(3): 95—100
Ming J X, Qian C F, Shen J Z. 1998. Analysis for the Dynamic Situation of Endosulfan Residue in Apple and Soil [J]. *Journal of China Agriculture University*, 3(3): 95—100 (in Chinese)
Mosleh Y Y, Palacios S P, Couderchet M, et al. 2003. Effects of the herbicide isoproturon on survival, growth rate and protein content of mature earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and its fate in the soil [J]. *Applied Soil Ecology*, 23: 69—77
OECD. 1984. Guidelines for testing of chemicals. Test 207: Earthworm Acute Toxicity Tests [S]. Paris: Paris Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)
Shi Y J, Shi Y J, Wang X, et al. 2007. Comparative effects of Lindan and Deltamethrin on mortality, growth and cellulase activity in earthworms (*Eisenia Fetida*) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89: 3—38
史雅娟, 王昕, 吕永龙, 等. 2006 DDT 和三氯杀螨醇对蚯蚓的急性和亚急性毒性影响 [J]. *环境科学学报*, 26(5): 851—857
Shi Y J, Wang X, Li Y L, et al. 2006. Acute and subtle toxicological effects of DDT and dicofol on earthworms (*Eisenia foetida*) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* 26(5): 851—857 (in Chinese)
Singh B B, Naminj A A, Bull. 1982. Acute toxicity of thiodan to catfish (*Heteropneustes fossilis*) [J]. *Environ Contam Toxicol* 28: 122—127
Wade M G, Desaulniers D, Leingartner K, et al. 1997. Interactions between Endosulfan and dieldrin on estrogen mediated processes in vitro and in vivo [J]. *Report Toxicol* 11(6): 791—798
袁方曜, 王玢. 2002 有机磷污染农田中蚯蚓的生物指示研究 [J]. *山东农业科学*, 4: 57—60
Yuan F Y, Wang F. 2004. Study on biological indication of earthworms in farmland polluted by organophosphorus [J]. *Shandong Agricultural Sciences* 4: 57—60 (in Chinese)
国家环保局. 1990 化学农药环境安全评价试验准则 [J]. *农药科学与管理*, (4): 4—9
State Environmental Protection Agency. 1990. Environmental safety assessment experiment criteria of chemical pesticides [J]. *Pesticide Science and Administration*, (4): 4—9 (in Chinese)
Zhang X D, Zhou G H, Chen S J. 2006. Study of the toxic effect of Endosulfan on spermatogenic cell in mice and their mechanisms [J]. *Environ Occup Med*, 23(1): 34—37