

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200929002

陈修才, 周世萍, 李惠娟, 等. 一种基于蚯蚓学习行为的神经毒性实验方法研究[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(1): 119-125

Chen X C, Zhou S P, Li H J, et al. An experimental method of neurotoxicity based on earthworm learning behavior [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(1): 119-125 (in Chinese)

一种基于蚯蚓学习行为的神经毒性实验方法研究

陈修才, 周世萍*, 李惠娟, 解思达, 熊张平, 杨广斌, 朱鑫泽

西南地区林业生物质资源高效利用国家林业与草原局重点实验室(西南林业大学), 昆明 650224

收稿日期: 2020-09-29 录用日期: 2020-12-20

摘要: 土壤生物的学习行为是一种综合性的神经高级活动, 对土壤中的神经毒性污染物生态风险监测具有重要价值。本研究设计了一套试验装置, 基于蚯蚓对白光刺激的厌恶本性, 通过振动-白光配对刺激, 对蚯蚓进行学习训练, 使蚯蚓领会借助加速移动阻止白光刺激的策略, 通过蚯蚓到达移动位移阈值的时间测定, 对蚯蚓的学习行为进行测试, 建立了蚯蚓的学习行为测试方法。采用建立的测试方法, 对土壤中东莨菪碱和毒死蜱诱导下蚯蚓的学习行为进行了测试, 结果表明, $1 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 东莨菪碱与 $4 \sim 12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 毒死蜱污染处理均对蚯蚓的学习能力造成了损伤, 污染浓度越高, 蚯蚓的学习能力损伤越严重。该测试方法可以快速有效地检测土壤污染导致的蚯蚓学习行为变化, 有望用于低浓度神经毒性农药污染土壤的神经毒性快速诊断。

关键词: 土壤污染; 蚯蚓; 神经毒性; 学习行为; 土壤环境质量; 诊断方法

文章编号: 1673-5897(2021)1-119-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

An Experimental Method of Neurotoxicity Based on Earthworm Learning Behavior

Chen Xiucui, Zhou Shiping*, Li Huijuan, Xie Sida, Xiong Zhangping, Yang Guangbin, Zhu Xingze
Key Laboratory of State Forestry Administration on Highly-Efficient Utilization of Forestry Biomass Resources in Southwest China (Southwest Forestry University), Kunming 650224, China

Received 29 September 2020 accepted 20 December 2020

Abstract: The learning behavior of soil organisms is a kind of comprehensive neural higher activity, which is of great value to the ecological risk monitoring of neurotoxic pollutants in soil. In order to establish learning behavior test method of earthworm, a set of test apparatus was designed in this paper based on earthworm's dislike of white light stimulation. Earthworms were trained to understand the strategy of preventing white light stimulation with fast moving through the vibration-white light pairing stimulus. Earthworm learning behavior was tested by determination of the time of earthworm arriving movement displacement threshold. Using the established test method, earthworms' learning behavior was tested under the influence of scopolamine and chlorpyrifos in soil. The results showed that the learning ability of earthworms was damaged by $1 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ scopolamine and $4 \sim 12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31860155); 云南省农业联合面上项目(2017FG001(-040)); 西南地区林业生物质资源高效利用国家林业和草原局重点实验室开放基金资助项目(2019-KF13)

第一作者: 陈修才(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为土壤生态毒理学, E-mail: 1969696357@qq.com

* **通讯作者** (Corresponding author), E-mail: kmzhoushiping@163.com

chlorpyrifos in soil. The higher the pollution concentration was, the more serious the learning ability of earthworms was damaged. This test method could quickly and effectively detect the change of earthworm learning behavior caused by soil pollution, and was expected to be used for the rapid diagnosis of neurotoxicity of low-concentration neurotoxic pesticides in contaminated soil.

Keywords: soil pollution; earthworm; neurotoxicity; learning behavior; soil environmental quality; diagnosis method

农业土壤环境质量状况的正确诊断和评价,是土壤污染管控修复,逐步改善土壤环境质量,保持土壤生态系统良性循环的重要管理依据。由于土壤性质和污染物种类的复杂多变,对土壤环境健康质量的诊断和评价,必须同时考虑土壤微生物、土壤动物和植物的异常变化。蚯蚓作为土壤动物区系的代表类群,利用蚯蚓生物标志物评价污染物对土壤环境的危害,从而对土壤健康质量进行诊断和评价已成为环境研究领域较受关注的研究热点之一^[1-5]。

由于有机磷和拟除虫菊酯类多数农药污染物均具有神经毒性,污染土壤的神经毒性可直接影响蚯蚓等土壤动物的神经行为状况,这种神经行为变化也可以反映土壤的健康质量状况。与乙酰胆碱酯酶这类神经毒性生理生化标志物相比,神经行为标志物的优点在于研究过程中可以对同一受试动物反复进行测试,同时研究可以涵盖神经损伤的开始、发展及恢复整个过程^[6]。学习行为是动物通过实践获得新信息从而改变之后的行为模式,是一种综合性的神经高级活动。动物的学习行为受神经系统支配,是一项比较敏感的行为指标,通过测试学习行为的功能变化,能够有效评价污染物对土壤动物的神经毒性及潜在危害,对土壤健康质量诊断评价具有重要的研究意义和应用价值。

在动物界所有的类群中,从单细胞动物到脊椎动物都存在学习过程。虽然蚯蚓的脑容量较小,但研究表明蚯蚓具备一定的学习能力。Yerkes^[7]首次通过实验证实了蚯蚓(*Allolobophora foetida*)的学习行为,随后的研究也表明,陆正蚓(*Lumbricus terrestris*)和赤子爱胜蚯蚓(*Eisenia foetida*)等不同种属的蚯蚓均具备一定的学习能力^[8-12]。目前常用的蚯蚓学习行为测试方法是迷宫实验,但该方法需要对蚯蚓进行大量训练,耗时较长,且训练和测试过程容易受蚯蚓分泌物的信息诱导,影响测试结果的准确性^[12],难以满足对土壤健康质量进行快速有效诊断的要求。有研究表明,蚯蚓对红光不敏感,厌恶白光,可以通过振动与白光的配对刺激诱导蚯蚓的学习行为^[13],但如何利用蚯蚓的学习行为,对污染土壤

的健康质量进行快速诊断,目前尚缺乏灵敏有效的测定方法。

针对此问题,本研究设计了一套试验装置,以红光作为照明光源,通过振动与白光配对刺激,对蚯蚓的学习行为进行诱导,在此基础上,通过对测定条件进行优化,建立了蚯蚓学习行为的测定方法,希望该方法能够应用于土壤神经毒性污染物的快速诊断,为农业土壤环境健康质量的诊断评价提供可行的测定方法。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验装置

实验装置为自制的学习行为测试装置(图1)。测试盒容积为45 cm×45 cm×25 cm。为便于观察和透气,测试盒为单面敞开的半封闭式结构,测试台位于测试盒底部,为模拟蚯蚓在土壤中的移动环境,测试台铺设圆形凸起(凸起高度为0.5 cm;相邻凸起的距离为3 cm)的塑胶垫,塑胶垫面积为40 cm×

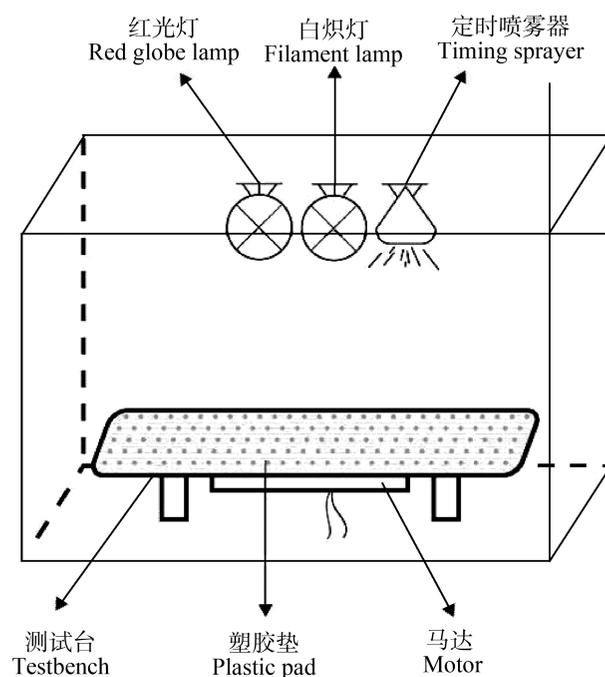


图1 蚯蚓学习行为的测试装置示意图

Fig. 1 Testing set for learning behavior of earthworm

40 cm;测试台底部设有振动马达,振动频率为180 Hz;测试台上方安装功率均为3 W的红色灯和白炽灯各1个,及可以定时控制的喷雾装置(喷雾量20 mL·h⁻¹)。其中,白炽灯安装于箱体顶部的中心位置,距白炽灯安装位置左右各1 cm处,分别安装红色灯和喷雾装置。安装后的红色灯和白色灯距测试台20 cm,测试时将蚯蚓放置于测试台的中心位置,红色灯作为测试的照明光源,白炽灯提供测试所需的白光刺激。

1.2 实验材料

供试生物为云南红河地区采集的皮质远盲蚓(*Amyntas corticis*),培养条件为:温度20℃;土壤含水量为田间最大持水量60%。挑选2~3月龄,体质量0.4~0.5 g,具有成熟环带的健康蚯蚓作为实验蚯蚓。

供试试剂:东莨菪碱(纯度>98%)与毒死蜱(纯度>98%)购自美国Sigma公司。

供试土壤:土壤采自昆明市官渡区农田2~15 cm耕作层。在采样地设5个采样点,取样后充分混合,得到实验用土样。土样风干后过1 mm筛备用。土壤类型为红壤,质地为粘壤土,pH为6.35,有机质含量为14.75 g·kg⁻¹,阳离子交换量为9.8 cmol·kg⁻¹,土壤经分析未检出毒死蜱和东莨菪碱。

1.3 蚯蚓学习行为测定方法建立

蚯蚓学习行为测定在暗室中进行。该方法是基于蚯蚓对白光刺激的厌恶本性,采用自制的测试装置,通过振动-白光配对刺激训练,使蚯蚓学习领会借助加速运动阻止白光刺激的策略。为实现上述目的,需要进行下列测试条件优化。

1.3.1 移动位移阈值确定

移动位移阈值是蚯蚓学习行为测定的关键。为了获得蚯蚓移动位移阈值的最佳参数,在多次预实验的基础上,筛选出可能的蚯蚓移动位移阈值6、8、9、10和12 cm,将其设定为测试条件,对其进行测试。设置4个测试组,每组10条蚯蚓,每次测试时,将1条蚯蚓放置于测试台,开启红色照明灯,适应10 min后对其分别进行振动、白光刺激各30 s,测定蚯蚓头部运动距离达到移动位移设定值的次数,根据测定数据计算蚯蚓头部运动距离达到移动位移阈值的到达率(A),计算公式为:

$$A = \frac{B}{C} \times 100\%$$

式中:B为30 s振动或光照刺激时蚯蚓头部运动距

离达到各移动位移设定值的次数;C为30 s振动或光照刺激时蚯蚓头部运动距离达到各移动位移设定值的次数总和。

1.3.2 蚯蚓学习行为测定条件优化

对蚯蚓的学习行为测定是通过30 s振动与30 s白光配对刺激进行,在多次预实验的基础上,发现影响蚯蚓学习行为测定的条件主要有休息恢复时间和学习周期,需要对这2个条件进行优化。

(1) 休息恢复时间

根据预实验筛选出可能的休息恢复时间为6、7、8、9和10 min,将其分别设定为休息恢复条件,每个条件设4个重复组,每组10条蚯蚓,对其进行条件优化。测试时,将1条蚯蚓放置于测试台,开启红色照明灯,适应10 min后对其进行包括30 s振动/30 s白光/30 s振动/30 s白光/30 s振动/30 s白光的1个周期学习测试。测试期间对蚯蚓的移动进行监控,如振动刺激期间,蚯蚓头部运动距离达到或超过移动位移阈值,则随后的白光刺激不出现,但振动刺激仍然持续;如白光刺激期间,蚯蚓头部运动移动达到或超过移动位移阈值,则立即关闭照明灯,停止白光刺激,待下一个振动刺激开始时继续进行循环刺激学习。分别测定每次振动和白光刺激时,蚯蚓头部运动距离达到或超过移动位移阈值的所需时间;学习结束后按照设置的休息条件进行恢复,再对蚯蚓进行学习测试(测试条件同上)。

(2) 学习周期

每个学习周期包括30 s振动/30 s白光/30 s振动/30 s白光/30 s振动/30 s白光,在预实验的基础上,筛选出1、2、3和4个学习周期作为学习条件,每个条件设4个重复组,每组10条蚯蚓。每个学习周期结束后,应按照(1)优化的休息恢复时间,让蚯蚓进行休息恢复后再进行下一周期的学习。休息期内关闭振动及白光,打开喷雾器进行喷雾待休息结束关闭。分别测定各训练周期内蚯蚓每次振动和光照刺激期间,头部运动距离达到或超过移动位移阈值的所需时间,根据测定数据,对学习周期进行优化。

1.3.3 蚯蚓的学习行为测定

东莨菪碱是动物学习障碍模型造模的代表药物^[13],因此,利用东莨菪碱和具有神经毒性的毒死蜱农药^[14]对测定方法进行了验证。在蚯蚓未表现出回避反应的浓度范围内分别设置3个浓度梯度:东莨菪碱处理组(1、2和3 mg·kg⁻¹)、毒死蜱处理组(4、8

和 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),按照实验土壤设计浓度计算东莨菪碱需要量,准确称量后将所需试剂用丙酮溶解后,搅拌均匀于 20 g 土壤中,待丙酮完全挥发后(无丙酮气味)再与 480 g 土壤混匀,放入 500 mL 培养瓶内,加入蒸馏水将土壤含水量调节为土壤田间最大持水量的 60% 。将清肠处理后的蚯蚓随机放入东莨菪碱处理和毒死蜱各浓度处理组中,每组放入 10 条蚯蚓,以保鲜膜封口(预留换气孔)。在温度为 $24 \text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度为 60% 条件下培养,以丙酮空白为对照组,每个浓度及对照设 4 个重复。染毒处理 1 d 后取出蚯蚓,采用本研究的测试装置及建立的蚯蚓学习行为测定方法,对蚯蚓的学习行为进行测定。

1.4 数据统计与分析

采用 SPSS 13.0 软件(SPSS Inc.)进行单因素方差分析和多重比较,对组间数据进行差异显著性分析,数据结果用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 的形式表示。

2 结果 (Results)

2.1 蚯蚓移动位移阈值确定

蚯蚓到达不同移动位移设定阈值的到达率(A)如图2所示,振动和白光刺激条件下,A均随着阈值设定值的增加而下降;相同设定阈值条件下,白光刺激条件下的A值均高于振动刺激的到达率,当设定阈值为 9 cm 时,白光刺激条件下蚯蚓的A值显著高于振动刺激条件下的A值($P < 0.05$),而其他设定阈值条件下,白光刺激时蚯蚓A值与振动刺激的A值均不存在显著差异($P > 0.05$),但设定阈值达到或超过 10 cm 时,蚯蚓在振动和白光刺激条件下的A值均呈现显著下降,原因可能与此阈值设定过高,振动或白光刺激时蚯蚓移动均难以达到有关。本研究选择移动位移设定值 9 cm 作为移动位移阈值。

2.2 休息恢复时间对蚯蚓学习行为的影响

不同休息恢复时间对蚯蚓的学习影响如图3所示,恢复时间为 $5 \sim 6 \text{ min}$,休息恢复后蚯蚓学习测试的到达移动位移阈值时间,显著高于恢复前学习测试的到达位移阈值时间($P < 0.05$);恢复时间为 $7 \sim 9 \text{ min}$,休息恢复后蚯蚓学习测试的到达位移阈值时间,与恢复前蚯蚓学习测试的到达位移阈值时间并无显著差异($P > 0.05$),表明蚯蚓经过 $7 \sim 9 \text{ min}$ 的休息后,体力已基本恢复,本研究选择 7 min 作为蚯蚓的休息恢复时间。

2.3 学习周期对蚯蚓学习行为的影响

不同学习训练周期对蚯蚓学习行为的影响如图

4所示。随着学习训练周期增加,蚯蚓的移动速度加快,到达移动位移阈值的时间不断缩短,当学习训练达到 3 个周期时,蚯蚓到达移动位移阈值的时间已显著低于训练 $1 \sim 2$ 个周期的到达移动位移阈值时间($P < 0.05$),但学习训练 3 个周期后,蚯蚓到达移动位移阈值的时间已基本稳定,与学习训练 4 个周期的蚯蚓到达移动位移阈值时间无显著差异($P > 0.05$),本研究选择 3 个训练周期作为蚯蚓的学习训练条件。

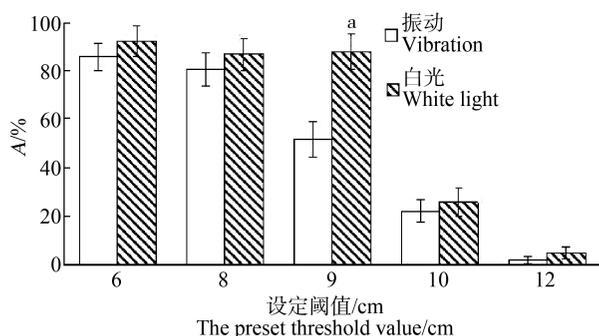


图2 不同移动设定阈值对蚯蚓到达率(A)的影响

注:直柱上方 a 表示同一设定阈值条件下,蚯蚓振动与白光刺激到达设定阈值的到达率(A)差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 Influence of the preset threshold value on the reaching rate (A) of earthworm

Note: The letter a above the column indicated that under the same threshold condition, the arrival rate of earthworm vibration and white light stimulation reaching the set threshold (A) was significantly different ($P < 0.05$).

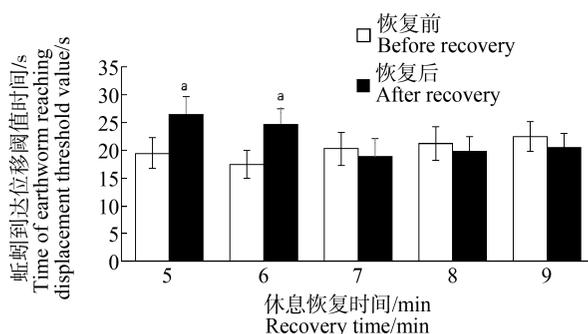


图3 不同休息恢复时间对蚯蚓学习行为的影响

注:直柱上方 a 表示休息恢复后的蚯蚓到达移动位移阈值时间与休息前存在显著差异($P < 0.05$)。

Fig. 3 Influence of recovery time on earthworm's learning behavior

Note: The letter a above the column indicated that there was a significant difference in the time of earthworm reaching the threshold of displacement after rest compared with that before rest ($P < 0.05$).

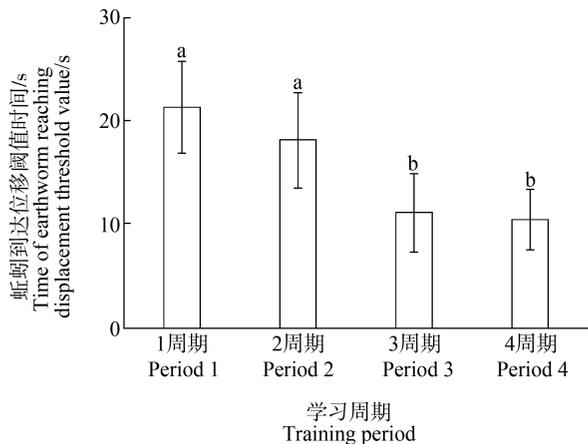


图 4 不同学习周期对蚯蚓学习行为的影响

注:直柱上方具有相同字母表示不同训练周期组间蚯蚓到达移动位移阈值的时间差异不显著,不同字母表示差异显著(P<0.05)。

Fig. 4 Influence of training period on earthworm's learning behavior

Note: The same letters above the column indicated that there was no significant difference in the time of earthworm reaching the displacement threshold between different training periods, but the different letters indicated that there was significant difference (P<0.05).

2.4 蚯蚓的学习行为测定

采用本研究建立的蚯蚓学习行为测定方法,对

东莨菪碱和毒死蜱暴露 1 d 后的蚯蚓学习行为进行了测定,结果如图 5 所示。东莨菪碱和毒死蜱不同暴露浓度组中蚯蚓到达移动阈值的时间均显著高于对照组,随着东莨菪碱和毒死蜱暴露浓度的增加,蚯蚓到达移动阈值的时间显著增加,表明东莨菪碱和毒死蜱处理均导致了蚯蚓的学习能力下降,暴露浓度越高,对蚯蚓的学习行为损伤越严重。

3 讨论 (Discussion)

污染物的毒性可直接影响土壤动物的行为,这种行为变化对污染物的毒性具有指示作用,因此可以通过土壤动物的行为变化来监测、评价污染物的生态风险。学习行为是动物借助于个体生活经历和经验使自身的行为发生适应性变化的过程,是一种综合性的神经高级活动,对土壤污染物神经毒性的生态风险监测具有重要价值,但由于缺乏蚯蚓学习行为测定的有效方法,在土壤生态毒性的监测评价中应用较少。

目前动物学习行为的测定主要采用迷宫实验方法^[15-19],这种测定方法主要测试的是动物的空间识别学习能力。采用这种方法对蚯蚓进行学习行为测试时,由于测试过程中蚯蚓会产生分泌物,蚯蚓在空间识别学习时会受到分泌物的信息干扰,需要对测

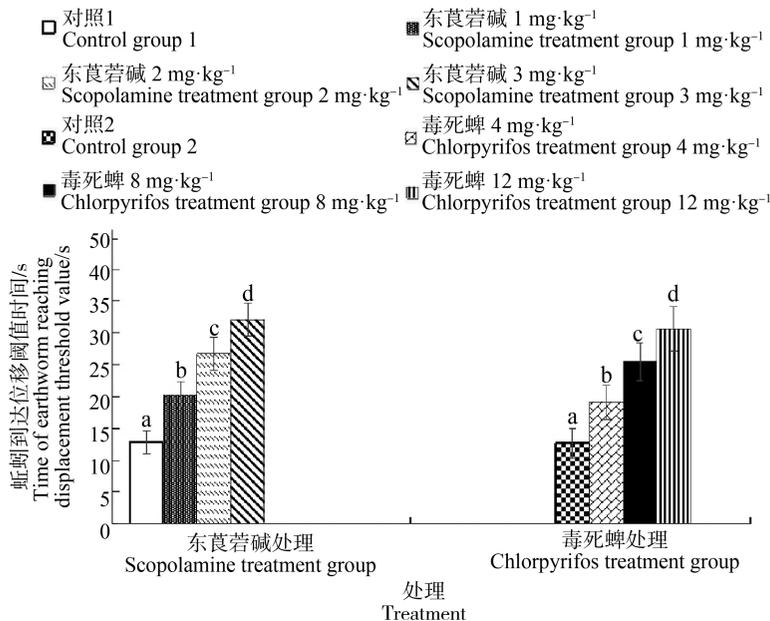


图 5 不同污染处理对蚯蚓学习行为的影响

注:直柱上方不同小写字母表示不同处理组间蚯蚓到达移动阈值时间差异(P<0.05)。

Fig. 5 Influence of recover procedures on earthworm's learning behavior

Note: Different lowercase letters above the column indicated that there was significant difference in the time of earthworm reaching the displacement threshold between different treatment groups (P<0.05).

试装置及时进行清理,否则会影响测试的准确性^[12]。本研究建立的蚯蚓学习行为测试方法是基于蚯蚓厌恶白光刺激的特性,采用振动与白光配对刺激对蚯蚓进行学习测试。学习过程中当蚯蚓移动加快,移动位移达到或超过移动阈值时,就不出现或停止白光刺激,如未达到移动阈值,则出现或继续白光刺激。通过振动、白光刺激的交替循环学习训练,使蚯蚓领会可以借助加速运动阻止白光刺激的策略。如蚯蚓通过学习已领会此策略,则在振动和白光刺激时,蚯蚓将会加快移动来阻止白光刺激,通过对其达到移动阈值的时间测定,就可以反映蚯蚓的学习行为变化,因此对蚯蚓的学习行为测试不受蚯蚓分泌物干扰的影响。

蚯蚓移动位移阈值是蚯蚓学习行为测定能否有效的关键。移动位移阈值设置过低,蚯蚓在振动刺激期间就能轻易达到,会导致蚯蚓难以进入随后的白光刺激学习;移动位移阈值设置过高,则蚯蚓在振动和白光刺激学习期间,因难以达到移动位移阈值,而不能领会可以通过加速移动阻止白光刺激的策略。移动位移阈值应是蚯蚓应激状态下能够达到的移动阈值,这样蚯蚓才能通过学习,领会加速移动阻止白光刺激的策略。

本研究的结果表明,当移动位移阈值设定为6~8 cm时,不同刺激条件下蚯蚓到达不同设定值的到达率并无显著差异($P > 0.05$)(图2),说明设定值过低,蚯蚓在振动刺激期间就能轻易达到;而当移动位移阈值设定为10~12 cm时,振动刺激条件下蚯蚓到达不同设定值的到达率为2.2%~22.2%(图2),白光刺激条件下蚯蚓到达不同设定值的到达率为5.8%~25.8%(图2),表明此阈值设定过高,振动或白光刺激时蚯蚓移动均难以达到设定值;当蚯蚓移动位移阈值设定为9 cm时,振动刺激时蚯蚓到达设定值的到达率显著低于白光刺激的到达率($P < 0.05$),说明9 cm的移动位移设定值是蚯蚓在应激状态下能够达到的移动阈值。

由于蚯蚓学习过程中的运动消耗较大,每个学习周期结束后应让蚯蚓进行休息恢复。本研究中,休息恢复时间为5~6 min,休息后学习测试的蚯蚓到达移动位移阈值时间,显著大于恢复前学习测试的蚯蚓到达移动位移阈值时间($P < 0.05$),这可能是由于休息时间不够,蚯蚓的运动消耗未能恢复,而导致测定时移动能力下降;休息时间为7~9 min,休息后蚯蚓学习测试的到达移动位移阈值时间,与休息

前的到达时间并无显著差异($P > 0.05$),表明蚯蚓经过7~9 min的休息后,运动消耗已基本恢复,能够进行下一周期的学习测试。

与迷宫实验相比,本研究建立的蚯蚓学习行为测试装置结构简单,测试方案蚯蚓易于领会。当学习训练达到3个周期时,蚯蚓到达移动位移阈值的时间已显著低于训练1~2个周期的到达移动位移阈值时间($P < 0.05$),说明蚯蚓经过3个周期的学习训练后已能领会到借助加速运动阻止白光刺激的策略,而采用迷宫实验对蚯蚓进行学习行为测试,一般需要对蚯蚓进行长时间的多次重复训练^[8-12]。李力和潘雷^[11]对蚯蚓(*Eisenia foetida*)学习行为的迷宫实验表明,蚯蚓需要80次以上的训练,才能进行学习测定,迷宫设置越难,需要的训练次数就越多。

为了验证本研究的装置及方法对蚯蚓学习行为的测试是否有效,笔者采用东莨菪碱和毒死蜱污染土壤对蚯蚓进行染毒处理,对染毒后的蚯蚓进行学习测试。东莨菪碱是常用的动物学习障碍模型造模药物,可以阻断大脑皮质、隔区及海马结构的乙酰胆碱结合位点,导致学习障碍^[13]。毒死蜱不仅具有神经毒性,而且是目前我国广泛使用且土壤污染较为严重的有机磷农药品种^[20-23],有研究表明,毒死蜱会造成动物的神经元损伤和学习障碍^[24]。本研究的测试结果表明,东莨菪碱和毒死蜱污染暴露均导致了蚯蚓的学习障碍,且污染浓度越高,对蚯蚓的学习行为损伤越严重,应用本研究建立的测试方法,染毒1 d后即可检测到蚯蚓学习行为的变化。与利用半致死浓度(LC₅₀)等常用的毒理学检测方法相比,不仅检测灵敏度大大提高,而且短期暴露后就可以检测,有望用于低浓度神经毒性农药污染土壤的神经毒性快速诊断。由于本研究采用的实验生物为皮质远盲蚓,未对其他品种的蚯蚓学习行为进行深入研究,考虑到不同品种的蚯蚓学习行为能力可能存在差异,该方法是否适合其他蚯蚓品种对低浓度神经毒性污染物污染土壤的毒性检测,还有待进一步研究,今后应加强此方面的研究工作。

通讯作者简介:周世萍(1968—),女,博士,教授,主要研究方向为土壤生态毒理学。

参考文献(References):

- [1] Bednarska A J, Choczyński M, Laskowski R, et al. Combined effects of chlorpyrifos, copper and temperature on acetylcholinesterase activity and toxicokinetics of the

- chemicals in the earthworm *Eisenia fetida* [J]. Environmental Pollution, 2017, 220(Pt A): 567-576
- [2] Calisi A, Lionetto M G, Schettino T. Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants [J]. Science of the Total Environment, 2011, 409(20): 4456-4464
- [3] Pelosi C, Barot S, Capowiez Y, et al. Pesticides and earthworms. A review [J]. Agronomy for Sustainable Development, 2014, 34(1): 199-228
- [4] Schreck E, Gontier L, Dumat C, et al. Ecological and physiological effects of soil management practices on earthworm communities in French vineyards [J]. European Journal of Soil Biology, 2012, 52: 8-15
- [5] Nusair S D, Abu Zarour Y S, Altarifi A A. Effects of dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans on acetylcholinesterase activity and histopathology of the body wall of earthworm *Eisenia andrei*: A potential biomarker for ecotoxicity monitoring [J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2017, 228(7): 1-11
- [6] Shiryayev N, Jouroukhin Y, Gozes I. 3R tau expression modifies behavior in transgenic mice [J]. Journal of Neuroscience Research, 2010, 88(12): 2727-2735
- [7] Yerkes R M. The intelligence of earthworms [J]. Journal of Animal Behavior, 1912, 2:322-352
- [8] Datta L E. Learning in the earthworm, *Lumbricus terrestris* [J]. The American Journal of Psychology, 1962, 75: 531-553
- [9] Abramson C I, Buckbee D A. Pseudoconditioning in earthworms (*Lumbricus terrestris*): Support for nonassociative explanations of classical conditioning phenomena through an olfactory paradigm [J]. Journal of Comparative Psychology, 1995, 109: 390-397
- [10] Kladt N, Hanslik U, Heinzel H-G. Teaching basic neurophysiology using intact earthworms [J]. The Journal of Undergraduate Neuroscience Education, 2010, 9: 20-35
- [11] 李力, 潘雷. 蚯蚓(*Eisenia foetida*)学习行为的研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2008, 36(1): 65-67
Li L, Pan L. Studies on the learning behavior of earthworm *Eisenia foetida* [J]. Journal of Shaanxi Normal University: Natural Science Edition, 2008, 36(1): 65-67 (in Chinese)
- [12] Rosenkoetter J S, Boice R. Earthworm pheromones and T-maze performance [J]. Journal of Comparative and Physiological Psychology, 1975, 88: 904-910
- [13] Wilson W J, Ferrara N C, Blaker A L, et al. Escape and avoidance learning in the earthworm *Eisenia hortensis* [J]. PeerJ, 2014, 2: e250
- [14] Jackson J J, Soliman M R. Effects of tacrine (THA) on spatial reference memory and cholinergic enzymes in specific rat brain regions [J]. Life Sciences, 1996, 58(1): 47-54
- [15] Kumar V, Bhat Z A, Kumar D. Animal models of anxiety: A comprehensive review [J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2013, 68(2): 175-183
- [16] Haller J, Aliczki M, Gyimesine Pelczer K. Classical and novel approaches to the preclinical testing of anxiolytics: A critical evaluation [J]. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2013, 37(10 Pt 1): 2318-2330
- [17] 宗绍波, 魏盛, 苏云祥, 等. 焦虑大鼠模型高架十字迷宫实验的复测信度检验及参数相关性分析[J]. 中国医药导报, 2011, 8(30): 5-7
Zong S B, Wei S, Su Y X, et al. Retest reliability test and parameter correlation analysis of elevated plus maze experiment for anxious rat model [J]. China Medical Herald, 2011, 8(30): 5-7 (in Chinese)
- [18] 孙世光, 孙蓉. 高架十字迷宫实验: 昆明小鼠状态焦虑动物模型的重测信度研究[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2016, 25(9): 784-790
Sun S G, Sun R. Elevated plus maze as an animal model of state anxiety in Kunming mice: Test-retest reliability [J]. Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science, 2016, 25(9): 784-790 (in Chinese)
- [19] Milner L C, Crabbe J C. Three murine anxiety models: Results from multiple inbred strain comparisons [J]. Genes, Brain, and Behavior, 2008, 7(4): 496-505
- [20] Horwood M A. Rapid degradation of termiticides under field conditions [J]. Australian Journal of Entomology, 2007, 46: 75-78
- [21] Singh B K, Walker A, Morgan J A, et al. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5198-5206
- [22] 杨益军. 2018 年中国(全球)毒死蜱市场现状及预测[J]. 农药科学与管理, 2019, 40(1): 18-24
Yang Y J. China's (global) chlorpyrifos market status and forecast in 2018 [J]. Pesticide Science and Administration, 2019, 40(1): 18-24 (in Chinese)
- [23] Singh N. Factors affecting triadimefon degradation in soils [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(1): 70-75
- [24] Gultekin F, Karakoyun I, Sutcu R, et al. Chlorpyrifos increases the levels of hippocampal NMDA receptor subunits NR2A and NR2B in juvenile and adult rats [J]. The International Journal of Neuroscience, 2007, 117(1): 47-62 ◆