闫艺萌,刘俊慧,马琳燕,等.聚乳酸微塑料与砷复合污染对蚯蚓的毒性效应 [J]. 中国环境科学, 2025,45(8):4646-4655.
Yan Y M, Liu J H, Ma L Y, et al. Toxicological effects of polylactic acid microplastics and arsenic co-contamination in earthworms [J]. China Environmental Science, 2025,45(8):4646-4655.

聚乳酸微塑料与砷复合污染对蚯蚓的毒性效应

闫艺萌,刘俊慧,马琳燕,冯晓雪,李柏村,李欣妍,曹秀凤,朱 丽,王志峰* (山东建筑大学市政与环境工程学院,山东 济南 250101)

摘要: 将赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)暴露于聚乳酸微塑料(PLA MPs,0.5% w/w)与不同浓度亚砷酸盐(As(Ⅲ),40 或 100mg/kg)的单一及复合污染土壤中 28d,分析蚯蚓体内 6 种生物标志物的响应特征和两种污染物的生物富集水平,以评估 PLA MPs 和 As(Ⅲ)的联合毒性效应及相关机制.生物富集分析结果显示,复合暴露组的 As(Ⅲ)生物富集量较单一 As(Ⅲ)暴露组平均下降 34.2%.生物标志物分析结果显示,随着暴露水平和时间的增加,蚯蚓体内出现显著的氧化应激响应.采用综合生物标志物响应指数(IBR)量化多种生化指标的综合毒性效应,在 PLA MPs 和 As(Ⅲ)的单一及复合污染组中均显示出显著的剂量-效应关系,且发现复合暴露组的 IBR 指数值较单一 As(Ⅲ)暴露组平均降低 28.8%.联合毒性评价结果表明,两者在不同 As 浓度暴露下的联合毒性效应均为拮抗作用.本研究揭示了 PLA MPs 与 As 复合污染对蚯蚓的毒性效应及其潜在机制,为评估此类联合毒性的风险提供了科学依据.

关键词: 蚯蚓；聚乳酸微塑料；砷；综合生物标志物响应指数(IBR)；联合毒性
中图分类号: X503.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2025)08-4646-10

Toxicological effects of polylactic acid microplastics and arsenic co-contamination in earthworms. YAN Yi-meng, LIU Jun-hui, MA Lin-yan, FENG Xiao-xue, LI Bai-cun, LI Xin-yan, CAO Xiu-feng, ZHU Li, WANG Zhi-feng* (School of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101, China). *China Environmental Science*, 2025,45(8): 4646~4655

Abstract: In this study, the earthworm *Eisenia fetida* was exposed to soils contaminated with polylactic acid microplastics (PLA MPs, 0.5% w/w) and arsenite (As(III), 40 or 100mg/kg) under single and co-exposure scenarios for 28 days. The responses of six selected biomarkers and the bioaccumulation levels of the two pollutants in earthworms were analyzed to evaluate the joint toxic effects and underlying mechanisms of PLA MPs and As(Ⅲ). Bioaccumulation results indicated that the bioaccumulation of As(III) in co-exposure groups decreased by an average of 34.2% compared to the single As(III) exposure groups. Biomarker analysis revealed significant oxidative stress responses in earthworms, which intensified with increasing exposure concentration and duration. The Integrated Biomarker Response index (IBR) was used to quantify the integrated toxic effects of multiple biomarkers, showing a significant dose-effect relationship in both single and co-exposure groups. Notably, the IBR values in co-exposure groups were reduced by an average of 28.8% compared to those in single As(III) exposure groups. Joint toxicity evaluation indicated antagonistic interactions between PLA MPs and As(III) at both arsenic exposure levels. These findings systematically elucidate the toxicological effects and potential mechanisms of PLA MPs and As co-contamination in earthworms, providing scientific evidence for ecological risk assessment of such combined toxicity.

Key words: earthworm；polylactic acid microplastics；arsenic；Integrated Biomarker Response index (IBR)；joint toxicity

聚乳酸(PLA)是由 D-2-羟基丙酸和 L-2-羟基丙酸构成的高分子聚合物[1],经玉米、小麦等作物淀粉发酵后开环聚合制备而成,因其优良的生物相容性和快速降解性,已大量应用于食品包装、纺织品和农用地膜等领域.然而,生物可降解塑料在实际降解过程仍可能产生未知的环境风险,近年的毒理学研究已证实了其对生物体的毒性作用[2-4].PLA MPs 可通过机械损伤、氧化应激等多种机制影响生物体的生理功能,如摄食、生长和繁殖能力等[5].土壤是微塑料污染的重要汇集地,塑料地膜的广泛使用及工业污泥的大量排放等因素使土壤中 PLA MPs 污染日益严重.砷(As)是一种天然有毒类金属元素,土壤 As 污染的主要来源包括含 As 矿物开采冶炼、化石燃料燃烧和含 As 农药使用等,具有持久性、生物累积

收稿日期: 2025-01-13
基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2023MD011);国家自然科学基金资助项目(41907351);山东省高等学校青创团队计划资助项目(2022KJ317)
* 责任作者, 副教授, wangzhifeng18@sdjzu.edu.cn

性和生物毒性等特征,长期暴露可致土壤肥力下降及生态平衡破坏,并通过食物链累积威胁人类健康.一项针对土壤 As 污染的研究显示,我国境内 As 污染超标点位已高达 2.7%[6],土壤 As 污染已成为亟待解决的环境问题.在农田土壤中,PLA 地膜作为一种环保型农业覆盖材料已逐步推广使用,并经破碎、裂解形成微塑料,可能与耕地土壤中存在的 As 污染物共存,构成复合污染.

近年来,关于微塑料和重金属复合污染的研究已有较多报道[7-9],且已有多项实验研究探讨了 PLA MPs 与 As 在土壤中的交互作用[10-11].此外,PLA MPs 作为一种可生物降解塑料,因其降解速度快及表面官能团的变化,被证实对重金属(As,Cr,Pb 等)有比传统塑料更强的吸附能力[12-13].因此,PLA MPs 可能通过改变土壤微环境,影响 As 的形态转化和迁移性,从而改变其生物可利用性和毒性.尽管已有研究关注 PLA MPs 或 As 在土壤中的毒性作用[14-17],但这些研究主要关注单一污染物毒性,而对于两者联合暴露的毒性效应研究尚未见报道.因此,开展土壤中 PLA MPs 与 As 复合污染的联合毒性效应研究,对于修正单一暴露与联合暴露风险阈值的偏差具有重要意义.

蚯蚓是土壤中生物量最大的无脊椎动物,因其易养殖、对毒物敏感且易富集污染物,成为土壤生态系统中的关键生物指示物种.蚯蚓可通过摄食土壤富集 MPs,并通过表皮渗透吸收溶解态重金属.持续暴露会诱导体内活性氧(ROS)积累,打破氧化−抗氧化平衡,激活抗氧化防御系统.初期应激阶段,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽 S−转移酶(GST)等抗氧化酶活性上升及谷胱甘肽(GSH)合成增强以清除过量 ROS.当污染物浓度或暴露时间超过阈值时,抗氧化系统失衡导致氧化应激,造成脂质过氧化终产物——丙二醛(MDA)积累[18].已有研究证实,蚯蚓暴露于 As 和 MPs 等污染物会触发抗氧化防御系统的反应,进而对其造成氧化损伤、营养和能量短缺、生长率和繁殖率下降以及肠道微生物群落结构与多样性变化等生态毒性效应[19-21].本研究选取赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为受试对象,研究其在 PLA MPs 与 As 单一及复合污染土壤中对微塑料的摄取和排泄特征,以及 As 在蚯蚓体内的生物富集.为评估复合污染对蚯蚓的联合毒性效应,测定蚯蚓体重变化率(WCR)及 5 种氧化应激生物标志物(SOD、CAT、GST、GSH 和 MDA),以反映蚯蚓在应对污染物压力时的毒性响应.在此基础上,计算综合生物标志物响应指数(IBR),将 6 种生物标志物整合以量化综合生物毒性效应,明确蚯蚓在单一和复合污染环境下的综合毒性压力.本研究旨在为评估此类复合污染对生态系统的长期影响提供科学依据,并为环境管理与污染控制策略的制定提供参考.

1　材料与方法

1.1　试剂与材料

药品试剂:亚砷酸钠($NaAsO_2$,≥90%),购自上海阿拉丁生化科技有限公司;无水乙醇(分析纯(AR)95%)、乙酸(分析纯(AR)100%),购自上海市宁波试剂有限公司;过氧化氢(分析纯(AR)30%)、硝酸(分析纯(AR)100%),购自天津市科密欧化学试剂有限公司;尼罗红(>98%),购自上海麦克林生化科技股份有限公司;生物标志物检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所.

测试生物:赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*),购自济南宏源蚯蚓养殖基地.实验前选用生殖环带发育良好、体重在 350~450mg、2~3 月龄的蚯蚓作为试验蚯蚓.

供试微塑料:聚乳酸微塑料(PLA MPs),购自上海润纮塑胶原料有限公司,呈不规则颗粒状.根据团队前期污染场地调查研究结果,将 PLA MPs 按照粒径范围筛选出①组(500~1000μm)、②组(50~500μm)、③组(<50μm).按照①②③组质量比为 4:3:0.02 的比例混合,PLA MPs 浓度设置为 0.5% w/w,以模拟真实土壤中的微塑料粒径和浓度分布特征.微塑料颗粒使用超纯水冲洗两次后,再用 70%乙醇漂洗一次,置于铝箔上经 40℃干燥后使用.

供试土壤:供试土壤于 2024 年 4 月取自济南市历城区山东建筑大学校园内试验田的 0~20cm 表层土,将取得土壤挑出植物残留物、石块和其他杂物后进行风干,风干后的土壤磨细过 2mm 筛后,存储在 4℃下备用.经测定,土壤各项理化指标均符合常规参考范围,土壤含水率为 1.9%,pH 值为(6.89±0.03),土壤有机质含量为 4.8%,阳离子交换量(CEC)为 19cmol(+)/kg,电导率(EC)为 150μS/cm,有机磷(Olsen−P)为 18mg/kg.

1.2　暴露实验

参照《土壤环境质量 农用地土壤污染风险管

控标准(试行)》(GB15618−2018)和典型污染土壤中的浓度[22],本试验中将 As(III)浓度设定为低浓度(40mg/kg 干重)和高浓度(100mg/kg 干重).依据团队前期场地调查结果和其他同类研究[23],将 PLA MPs 的浓度设定为 0.5% w/w.配制实验土壤时,将供试土壤分为若干份,每份称取 3kg,放入多孔蚯蚓培养盒(18cm×13cm×7cm)中,在土壤中加入适量 PLA MPs 和 As(Ⅲ)储备溶液,并用同样的方法制备不含污染物的清洁土壤作为对照组.实验过程中每日使用土壤水分传感器(METER Group,TEROS 12)监测含水率,波动超过±3%时通过喷洒去离子水或通风调节,确保含水率维持在(70%±3%).本研究共计 6 个处理组:空白对照组,PLA MPs 单独暴露组,As 40 单独暴露组,As 100 单独暴露组,以及 2 个复合暴露组(PLA MPs+As 40、PLA MPs+As 100).每个处理组设置 3 个平行.实验前,污染土壤需平衡 7d,并将蚯蚓置于实验室条件(80%环境湿度,12h 光照/12h 黑暗循环,光照 600lx,温度(20±2)℃)下适应两周.适应期结束后,将蚯蚓用超纯水冲洗后放入各处理组土壤中,每组 150 条.实验共持续 28d,分别在 7,14,21 和 28d 取样,每组取出 30 条健康状况良好、体重相近的蚯蚓,用超纯水清洗蚯蚓体表污垢后,放在湿润的滤纸上清肠 24h.其中,10 条蚯蚓用于测定蚯蚓体内及蚓粪中微塑料丰度,10 条蚯蚓用于测定蚯蚓体内 As 富集量,剩余蚯蚓用于生物标志物指标测定.在实验期间,每周投加一份不含污染物的干牛粪(10g).实验过程中未发现蚯蚓死亡.

1.3 指标测定

1.3.1 蚓粪及蚯蚓肠道内微塑料丰度测定 蚓粪及蚯蚓肠道内微塑料丰度测定参照 Oliveira 等[24]的方法,并加以改进.将蚯蚓置于湿润的滤纸清肠 24h 后,收集蚓粪,置于 60℃烘箱中烘干 15~20min,称重后按照质量体积比 1:20 加入 30%H_2O_2 和浓 HNO_3 1:1 的混合溶液,60℃水浴消解 10h;将蚯蚓解剖取出肠道组织后,收集称重并置于离心管中,按照同样的方法加入 H_2O_2−HNO_3 混合溶液,60℃水浴消解 5h.消解完成后,使用 1.2μm 玻璃纤维滤膜过滤,收集过滤物,保存在干净的玻璃皿中.在培养皿中加入 5mL 1mg/L 的尼罗红染液,室温避光静置 45min,使尼罗红与微塑料充分结合.染色结束后,通过滤膜过滤并用超纯水反复冲洗,在阴暗处静置晾干.采用倒置荧光显微镜(NIKON,尼康 TS2R−FL)拍照并记录微塑料形态和数量,观察记录并计算微塑料在蚯蚓肠道和蚓粪中的丰度.

1.3.2 蚯蚓体内 As 含量测定 将清肠后的蚯蚓放入冷冻干燥机干燥 72h,用玻璃研钵研磨成均匀的粉末状,过 2mm 筛网.采用微波消解法消解蚯蚓样品,准确称量 0.2g 的蚯蚓干样粉末置于聚四氟乙烯(PTFE)消解罐,依次向消解罐中加入 5mL HNO_2 和 2mL H_2O_2,静置 30min 充分反应后,放入微波消解仪器(Mars6,CEM,美国),参照文献中的微波消解程序将样品消解[25].消解结束后,使用赶酸仪(EHD−24,北京东航科仪仪器有限公司)赶酸至消解液剩余约 2.5mL,随后向消解液中加入超纯水并定容至 50mL,充分摇匀后保存在 4℃条件下待测.使用 ICP−MS(赛默飞 iCAP RQ ICP−MS)测定样品中的 As 含量.

1.3.3 生物标志物测定 将各组清肠完毕的 10 条蚯蚓称重测量并计算体重变化率(WCR,%).每个测试组中随机选择 5 条蚯蚓,合并后按照质量(g):体积(mL) = 1:9 的比例加入 9 倍体积生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,在 4000r/min 条件下离心 10min,并取 10%匀浆上清液待测.5 种氧化应激生物标志物均采用购自南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定.

1.3.4 IBR 指数计算 本研究采用 Beliaeff 和 Burgeot[26]构建的 IBR 方法,通过对 6 种生物标志物响应值进行整合,计算 IBR 指数值,以全面评估 As 和 PLA MPs 单一和复合污染对蚯蚓的综合毒性.具体计算过程如下:

(1)均一化:计算各暴露时间点各暴露组生物标志物的平均值 m_i',总平均值 M 和标准差 s,按以下公式进行均一化处理:

$$m_i' = (m_i - M)/s \tag{1}$$

式中:m_i'是标准化后的生物标志物值;m_i 是第 i 个生物标志物的原始测定值;M 是所有生物标志物测定值的总平均值;s 是所有生物标志物测定值的标准差.

(2)赋值:将标准化后的生物标志物值与对照组比较,标志物被诱导则令 $Z_i = m_i'$,被抑制则令 $Z_i = -m'$.定义$|m_{\min}|$为最小均一化值的绝对值,计算修正后的生物标志物得分:

$$B_i = Z_i + |m_{\min}| \tag{2}$$

式中:B_i是修正后的生物标志物得分;Z_i是标准化值的诱导/抑制方向调整值;$|m_{\min}|$为最小均一化值的绝对值.

(3)绘制星状图并计算 IBR 值:以 B_i 作为星状图辐射线长度,绘制六边形星状图.设相邻辐射线围成三角形面积为 A_i,IBR 值为所有三角形面积之和:

$$\mathrm{IBR} = \sum_{i=1}^{6} A_i \tag{3}$$

式中:IBR 是综合毒性效应的量化指标值;A_i 是第 i 个三角形面积.

1.4　数据统计与分析

本研究中所有实验数据均采用 SPSS 软件(SPSS Statistics 26)进行分析.实验设计三个平行样,生物体内的污染物富集及生物标志物响应情况均以平均值±标准差表示.通过单因素方差分析(ANOVA),选择 Tukey's post-hoc 多重比较检验和 Games-Howell 检验在 P<0.05 水平下进行差异显著性检验.采用 Origin 2019 进行图表绘制和数据可视化.

2　结果与讨论

2.1　蚯蚓肠道和蚓粪中的微塑料丰度

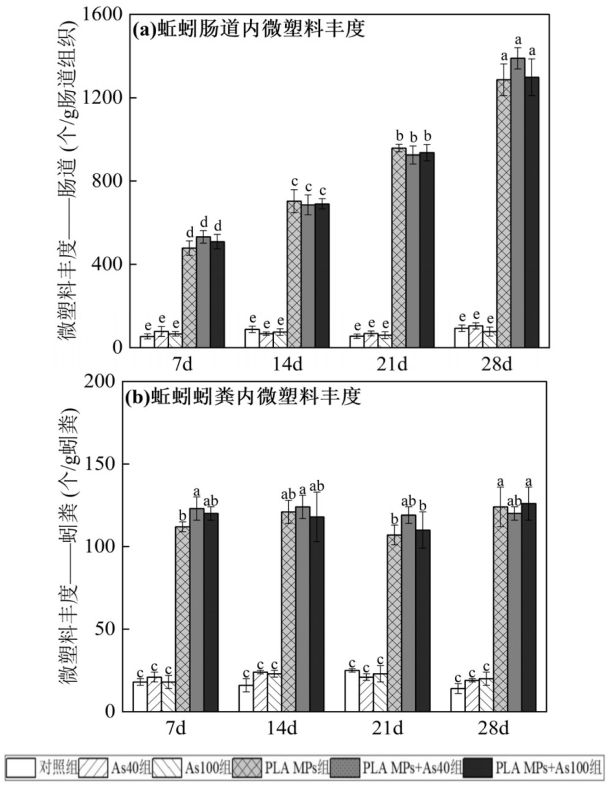


图 1　PLA MPs 与 As 单一及复合污染暴露后蚯蚓肠道和蚓粪中微塑料丰度随暴露时间的变化

Fig.1　Changes in the abundance of microplastics in the gut and casts of earthworms after exposure to single and combined contamination of PLA MPs and As over exposure time

不同字母上标表示彼此之间存在显著性差异(P<0.05).每个暴露时间点,各实验组设置 3 个平行

如图 1 所示,在暴露期间,对照组和 As 单一处理组的蚯蚓肠道和蚓粪中的微塑料丰度均处于较低水平,含 PLA MPs 处理组的微塑料丰度在蚯蚓肠道中随暴露时间延长而逐渐增加.在暴露 28d 时,PLA MPs、PLA MPs+As 40 及 PLA MPs+As 100 处理组的丰度值达到对照组的 13~15 倍.这表明 PLA MPs 在蚯蚓肠道内有明显的生物积累现象.含 PLA MPs 的处理组的蚓粪中微塑料丰度随暴露时间延长未出现显著变化,且远低于蚯蚓肠道内微塑料丰度,表明蚯蚓摄入的 MPs 难以通过排泄以减少其在肠道内的不断积累.复合污染组的微塑料丰度与单一 PLA MPs 处理组相比没有显著差异,表明在复合污染条件下,共存的 As 没有显著影响微塑料在蚯蚓肠道内的积累.因此在分析复合污染机理时,应重点关注 PLA MPs 对 As 生物有效性的影响.

2.2　蚯蚓体内 As 富集

如图 2 结果显示,As 处理组的 As 富集量明显高于对照组,且高浓度 As 处理组的 As 富集程度更显著.蚯蚓体内的 As 富集量随暴露时间延长而逐渐增加.在 28d 时,As 100 处理组蚯蚓体内总 As 含量最高,达到 698.72mg/kg.根据上述结果,Pearson 相关性分析揭示出蚯蚓体内 As 的生物富集与土壤 As 暴露时间和暴露水平之间存在明显正相关关系(P<0.05).耿宏佩等[27]同样发现蚯蚓体内总 As 含量与暴露时间及土壤 As 含量呈极显著的正相关关系(P<0.01),与本实验结果一致.与 As 单独暴露相比,共暴露于 PLA MPs 和 As(Ⅲ)的蚯蚓体内 As 浓度大都显著降低(P<0.05).这表明微塑料的存在可能降低了蚯蚓体内 As 的生物可利用度.PLA MPs 表面带电基团与 As(Ⅲ)之间的相互作用可能是导致 As 在蚯蚓体内的生物蓄积呈下降趋势的原因[28].PLA 在环境老化过程中表面生成的羧基和羟基可通过配位络合作用与 As(Ⅲ)的孤对电子结合,形成稳定的表面络合物(如-COO-As(OH)$_2^-$)[29-30];同时,羟基与 As(Ⅲ)的羟基之间可能通过氢键作用进一步提升吸附效率[31].此外,PLA 老化后表面粗糙度增加,可通过物理截留机制固定部分 As(Ⅲ)[32].上述机制导致 As(Ⅲ)被吸附于 PLA 表面,形成难溶的 PLA MPs-As 复合物,降低其生物可利用性.此类复合物难以穿透蚯蚓肠道上皮细胞膜,减少了蚯蚓通过摄食途径对 As(Ⅲ)的吸收和蓄积.这一结果可能会对两者复合污染的联

合毒性产生影响.

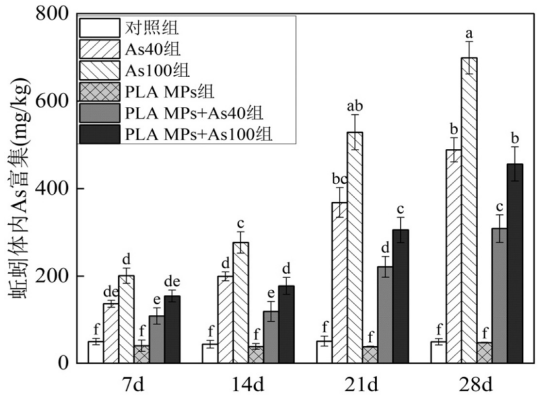


图 2 PLA MPs 与 As 单一及复合污染暴露后蚯蚓体内 As 含量随暴露时间的变化

Fig.2 Changes in arsenic content in earthworms after exposure to single and combined contamination of PLA MPs and As over exposure time

不同字母上标表示彼此之间存在显著性差异(P<0.05).每个暴露时间点,各实验组设置 3 个平行

2.3 生物标志物响应

图 3 显示了蚯蚓在 As(Ⅲ)和 PLA MPs 单一及复合污染组中暴露 28d 后的 6 种生物标志物响应变化.总体而言,在本研究暴露浓度下,单一 As(Ⅲ)暴露组中生物标志物的变化幅度较单一 PLA MPs 暴露组更为显著,高浓度 As 暴露组中生物标志物的变化幅度较低浓度 As 暴露组更为显著.此外,As(Ⅲ)-PLA MPs 复合暴露组的生物标志物变化幅度较单一 As(Ⅲ)暴露组明显降低.

体重变化是评估蚯蚓生长情况的重要指标,能够反映污染物对生物体生长发育的整体毒性影响.如图 3(a)所示,对照组的蚯蚓体重呈现稳定增长的趋势,而各处理组的 WCR 值虽然在前 21d 内有所上升,但始终低于对照组水平.在 28d 时,持续污染暴露导致除对照组外的各处理组中蚯蚓生长受到不同程度的抑制,甚至出现体重下降.在单一处理组中,高浓度 As 处理组对蚯蚓生长速度的负面影响最为显著,WCR 值仅为对照组的 36.9%.Langdon 等[33]研究发现蚯蚓的体重下降程度与 As 暴露剂量和持续时间呈正相关,且 As 可通过改变土壤物理化学性质(如 pH 值、氧化还原电位等)抑制蚯蚓摄食行为,降低蚯蚓对食物的摄入率.Wang 等[34]研究发现 As 暴露显著降低蚯蚓的呼吸速率和代谢活动,As 可通过抑制参与能量代谢的关键酶活性,导致 ATP 生成减少,从而抑制代谢功能.这些机制可能是导致蚯蚓体重显著下降的原因.此外,Wang 等[35]研究认为微塑料蓄积限制了蚯蚓吸收和利用营养物质,导致蚯蚓体重下降,这可能是本研究中 PLA MPs 组的 WCR 值相较对照组有所下降的原因.多个复合污染组的 WCR 值与 As 单一处理组相比没有显著差异,表明 PLA MPs 的加入未加剧 As 对蚯蚓的生长抑制作用.

蚯蚓暴露于污染物中受到伤害或应激时会产生活性氧(ROS),ROS 的失衡和积累会对生物组织和细胞结构造成氧化胁迫.抗氧化酶系统是蚯蚓抵制脂质过氧化影响的主要防御系统,其中 SOD、CAT 和 GST 是抗氧化酶系统的重要组成部分,SOD 是活性氧清除系统中首先发挥作用的抗氧化酶,生成 H_2O_2 中间产物;CAT 可以催化 H_2O_2 进一步分解成为 H_2O 和 O_2,以降低氧化应激压力;GST 通过激活谷胱甘肽(GSH)的硫原子为硫醇阴离子(GS^-),这种强亲核体能够攻击亲电化学物质,从而参与代谢和解毒电亲和性化学物质[36].在本研究中,这三种抗氧化酶的活性变化趋势整体上呈现出一定的正相关性.如图 3(b、c、d)所示,与对照组相比,实验初期各处理组的 SOD、CAT 和 GST 活性均有所上升,其中 As 100 处理组的活性最高,各指标较对照组提升 1.5~2.4 倍.酶活性的增加是对超氧阴离子自由基水平升高的直接反应[37],诱导蚯蚓产生更多的抗氧化酶以保护生物体免受氧化损伤.而当氧化应激达到一定程度时,毒性反应积累的大量活性自由基导致细胞正常代谢紊乱,进而抑制抗氧化酶的活性[38].因此,随着暴露时间的延长和暴露浓度的增加,各处理组的 SOD、CAT 和 GST 活性均表现出不同程度的抑制.已有研究表明,As 暴露诱导蚯蚓体内 ROS 积累,引发氧化应激,最终破坏线粒体功能,加剧能量代谢障碍[39],这一机制解释了 As 处理组抗氧化酶活性先升后降的现象.Liu 等[40]在聚苯乙烯与芘的共暴露实验中也有类似发现,各处理组 SOD、CAT 活性的变化趋势均表现为先上升后下降,与本研究结果相同.此外,研究发现暴露 28d 时,PLA MPs+As 处理组的活性低于 PLA MPs 处理组但高于 As 处理组,表明复合污染较 As 单一污染对蚯蚓造成的氧化应激毒性相对较轻.

GSH 作为一种关键的抗氧化剂,在细胞解毒机制中发挥着重要作用,它能有效防止体内重要酶蛋

白巯基的氧化失活,从而维护能量代谢和细胞功能的正常运行[41].如图 3(e)显示,在 7d、14d 暴露期间,各处理组的 GSH 含量水平均有所上升,尤其是 As 处理组的GSH含量水平显著高于对照组.在早期暴露阶段,As 和 PLA MPs 通过诱导活性氧(ROS)过量生成,显著加剧氧化应激.为应对这一压力,蚯蚓抗氧化防御系统被激活,具体表现为 GSH 合成增加,以中和 ROS 并缓解氧化损伤.Lu 等[42]研究结果表明,在氧化应激条件下 GSH 的消耗增加,导致 GSH/GSSG (氧化型谷胱甘肽)比例下降,为了维持氧化还原平衡,细胞会通过增加GSH的合成来响应氧化应激,这与本研究发现一致.随着暴露时间延长,蚯蚓体内的毒性效应逐渐累积而增强,GSH 被大量消耗以中和过量的 ROS,导致 GSH 含量下降.其中,高浓度 As 处理组的 GSH 含量水平最低,在 28d 时降至 51.98μmol/g,仅为对照组的 0.36 倍,这表明蚯蚓合成GSH的速率显著小于其消耗速率.而在复合污染组中,GSH 含量水平高于 As 单独处理组,这表明PLA MPs可能对As引起的蚯蚓毒性效应具有一定的抑制缓和作用.

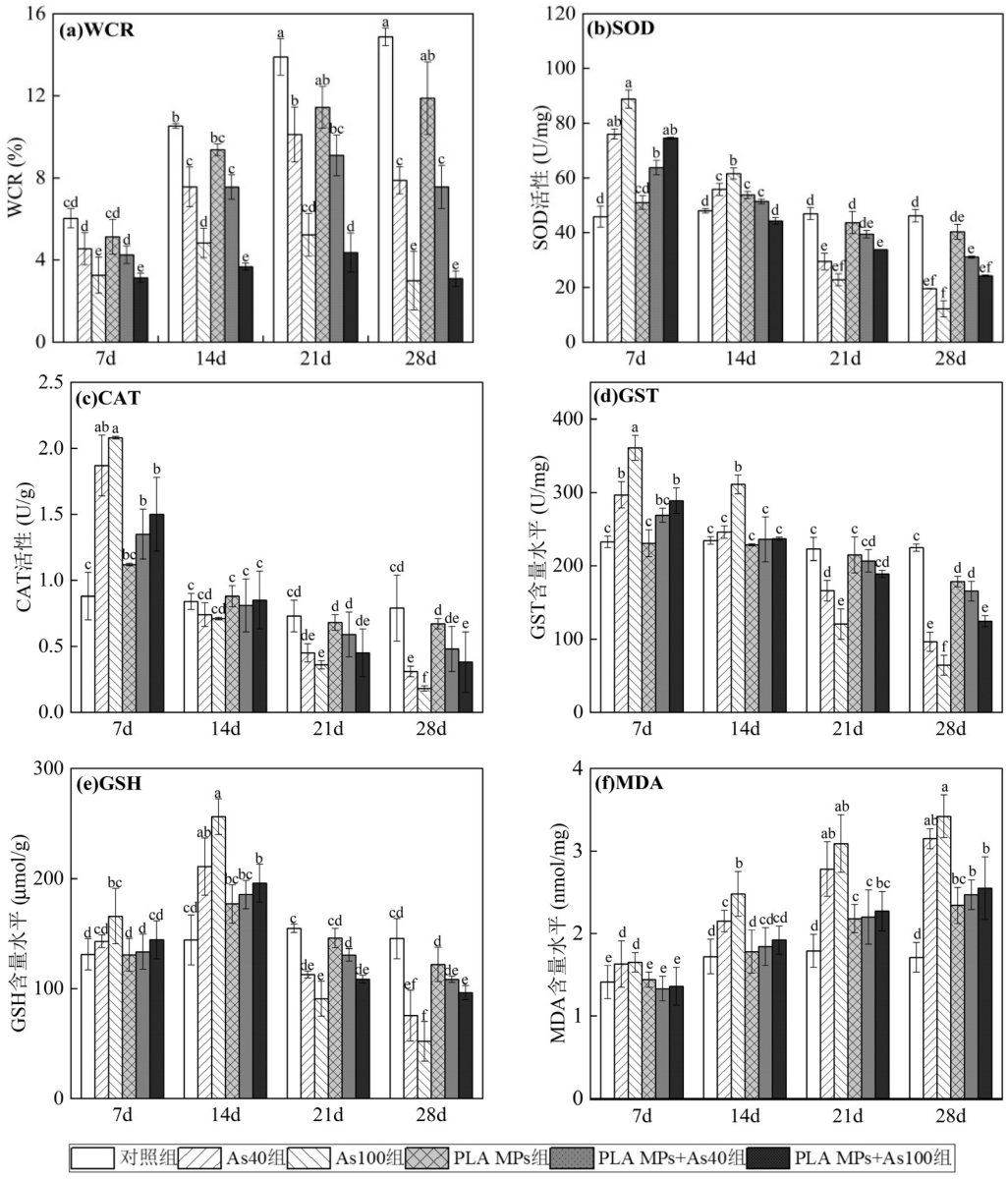


图 3　PLA MPs 与 As 单一及复合污染暴露后蚯蚓体内 6 种生物标志物的响应及变化特征

Fig.3　Response and change characteristics of six biomarkers in earthworms after exposure to single and combined contamination of PLA MPs and As

不同字母上标表示彼此之间存在显著性差异(P<0.05).每个暴露时间点,各实验组设置 3 个平行

MDA 是指示脂质过氧化的生物标志物,其含量水平升高通常与氧化损伤有关.如图 3(f)所示,各处理组中蚯蚓体内 MDA 含量均高于对照组,并且随暴露时间延长而增加.在实验早期阶段,复合污染组的 MDA 水平与对照组相比没有显著差异,这可能与抗氧化酶的干预和自我修复机制的激活有关.然而,随着暴露时间推移,ROS 的过度积累导致抗氧化系统的功能下降,脂质过氧化显著增加[43].在实验期间,复合污染组的 MDA 水平含量介于 PLA MPs 和 As 单一暴露组之间,这可能是因为蚯蚓体内微塑料对 As 具有较强的吸附作用,使得 As 难以解吸并进入蚯蚓消化液,从而降低了其生物有效性和对蚯蚓的毒性胁迫程度.这与前述对其他生物标志物的分析结论相一致,表明在复合污染情况下,氧化应激生物标志物的总体毒性响应程度较轻.

2.4　IBR 指数计算与联合毒性分析

图 4 为各生物标志物响应的得分星状图,图 5 为蚯蚓各处理组的 IBR 值.IBR 方法将多种生物标志物响应绘制成星状图并计算面积值,以评估不同暴露条件下的综合毒性效应和污染水平.

一般而言,多种生物标志物的变化幅度增大,会导致 IBR 值升高,表明该污染对生物体的综合毒性影响越严重[44].在本研究中,随暴露时间延长,IBR 值整体显示出先下降后逐渐上升的趋势.在暴露初期,蚯蚓因暴露于污染物中引发明显的氧化应激反应,导致 SOD、CAT、GST 活性和 GSH 含量显著升高,进而导致 IBR 值升高.但随着暴露时间推移,毒性逐渐累积,抗氧化酶活性受到不同程度的抑制,GSH 含量水平下降,氧化损伤程度加重,MDA 含量水平上升.因而从第 14d 之后,IBR 值随着暴露时间的延长逐渐升高,表明毒性影响随暴露时间延长愈发严重.此外,在本实验暴露水平下,单一 As(Ⅲ)处理组的氧化应激生物标志物变化水平均明显高于单一 PLA MPs 处理组,表明 As(Ⅲ)对蚯蚓的毒性强于 PLA MPs.高剂量 As(Ⅲ)暴露组的 IBR 值明显高于低浓度 As(Ⅲ)暴露组,表明毒性作用随暴露水平升高而增强,这种剂量-效应关系在聚乙烯(PE)和镉(Cd)对蚯蚓的共暴露实验中也有所体现[45].与单一 As(Ⅲ)暴露组相比,复合污染组的生物标志物变化水平和 IBR 值均明显较低,表明 PLA MPs 的加入可能降低了 As(Ⅲ)对蚯蚓的毒性影响,进而使得复合污染对蚯蚓的综合毒性作用有所减轻.

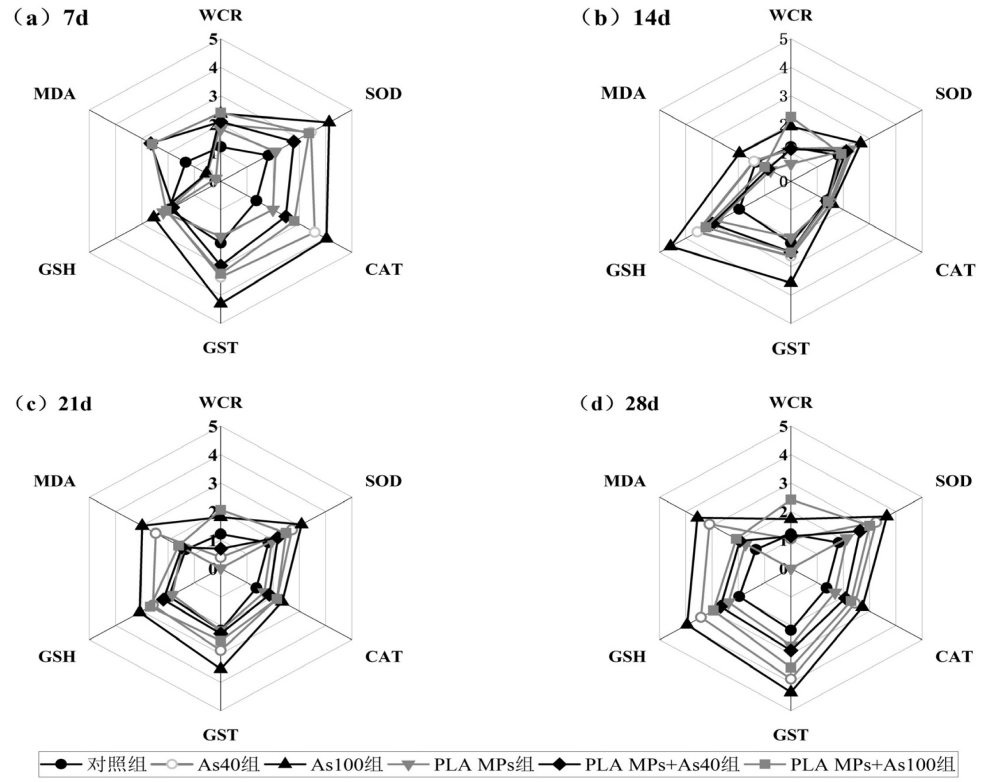


图 4　PLA MPs 与 As 单一及复合污染暴露后各处理组的 IBR 指数星状图

Fig.4　Star plots of the IBR index for each treatment group after exposure to single and combined contamination of PLA MPs and As

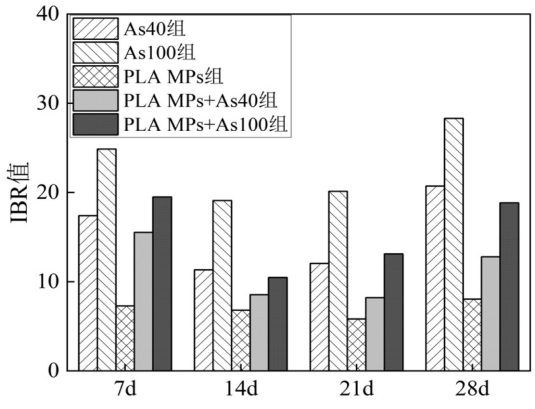


图 5 PLA MPs 与 As 单一及复合污染暴露后各处理组的 IBR 指数计算结果

Fig.5 Calculation results of the IBR index for each treatment group after single and combined pollution of PLA MPs and As

在本研究中,蚓粪及蚯蚓体内微塑料丰度结果表明,As 的加入并没有对 PLA MPs 的生物积累产生显著影响.然而蚯蚓体内 As 富集量变化显示,复合暴露组的 As 富集量显著低于单一 As 暴露组,PLA MPs 的共存显著减少了 As 的生物积累.这与以往微塑料和 As 共同暴露的研究结果一致.例如,Wang 等[46]发现,共暴露于聚乙烯(PE)纳米塑料和 As 后,蚯蚓体内组织中的 As 浓度显著低于单独暴露于 As 的浓度,在该团队的另一项研究中也报道了类似结果[47].在 6 种生物标志物中,蚯蚓体重变化率结果显示,复合污染组的 WCR 与 As 单一处理组相比没有显著差异,表明 PLA MPs 的加入并没有加剧 As 对蚯蚓的生长抑制作用.氧化应激生物标志物响应显示,在单独暴露组和复合暴露组中,随着暴露时间延长,3 种抗氧化酶活性均显现出“诱导-抑制”的变化趋势,这在微囊藻毒素(MCs)对蚯蚓的毒性效应中也有类似发现[48].这些酶的活性变化反映了细胞对氧化应激的反应,包括诱导阶段以增强抗氧化防御,随后可能由于负反馈机制而进入抑制阶段.同时,抗氧化酶的这些响应特征也与 GSH 含量变化和代表氧化损伤程度的 MDA 积累具有显著的相关性.而在复合污染情况下,氧化应激生物标志物的总体毒性响应程度低于单一 As 污染组,这表明 PLA MPs 的加入可能在一定程度上抑制了 As 引起的蚯蚓毒性效应.此外,IBR 的结果与所测生物标志物的响应特征相一致,在单一暴露组中,As 100 处理组的 IBR 值显著高于 As 40 处理组,表现出明显的剂量-效应关系;在复合暴露组中,其 IBR 值显著低于单一 As(Ⅲ)暴露组,进一步证明复合污染的综合毒性低于单一 As(Ⅲ)的污染毒性效应.

结合蚯蚓微塑料丰度、As 富集量和生物标志物总体响应程度以及 IBR 值变化分析推测,在本实验暴露水平下,As(Ⅲ)是对蚯蚓造成毒性影响的主要污染物,其中高浓度 As 暴露引起的毒性效应最为显著,而 PLA MPs 的共存可显著降低蚯蚓体内 As 浓度,进而可能抑制了毒性较强的 As(III)对蚯蚓的毒性,两者的联合效应表现为拮抗作用.PLA MPs 可能通过在蚯蚓消化道内形成物理屏障,减少了 As 与蚯蚓体内细胞的直接接触,从而减少了 As 的生物有效性和毒性.此外,PLA MPs 和 As 可通过表面官能团络合效应形成难溶复合物,降低其生物可利用性.已有研究表明,微塑料-重金属复合物因粒径增大或表面疏水性增强,难以穿透细胞膜,从而减少重金属的内化吸收[49].同时,生物体表面结合位点的争夺及解毒酶的活化可能是引发拮抗效应的另一重要因素[50].其他涉及微塑料与 As 复合污染的研究中也有类似结论,Dong 等[51]研究发现 As 和聚苯乙烯(PS)、聚四氟乙烯(PTFE)微塑料的相互作用降低了土壤中 As(III)和 As(V)的含量,进而导致 As 的生物有效性降低.然而,联合暴露下的交互作用也可能依赖于效应水平.牛晓宇等[52]研究发现,As(V)-PFOA 复合污染随着 As(V)浓度的增加从拮抗作用转变为协同作用.杨晓霞等[53]在 PE 微塑料与 Cd 联合暴露的研究中发现,复合污染在低效应水平下表现为拮抗作用,而高效应水平下表现为协同作用.在本研究中,低浓度和高浓度 As 分别与 PLA MPs 联合暴露下,As(Ⅲ)和 PLA MPs 的联合毒性效应均小于 As(III)的单一毒性效应,表现为拮抗作用,表明 PLA MPs 能够在不同水平 As(III)污染条件下降低 As 对蚯蚓的综合毒性效应.综上所述,PLA MPs 不仅具备优良的可生物降解特性,而且其在土壤中能有效降低 As 的蚯蚓生物毒性,这些特性使其成为一种理想的推广和应用材料,尤其在农业地膜等领域具有广阔的应用前景.后续研究将通过同步辐射 X 射线吸收精细结构谱(XAFS)和傅里叶变换红外光谱(FTIR)等技术,聚焦于 PLA MPs 与 As(III)相互作用的吸附解吸机制及界面行为解析,以阐明 PLA MPs 表面官能团对 As(III)的键合特性及其形态转化路径,揭示其降低 As 生物有效性的微观机理.同时,整合蚯蚓转录组学、代谢组学及

肠道菌群宏基因组学,系统解析污染物胁迫下宿主-微生物互作的解毒网络,挖掘关键基因与代谢产物的动态响应,以完善复合污染的生态风险评价体系,为可降解塑料的推广应用提供理论支撑.

3 结论

3.1 土壤中 As(III)和 PLA MPs 的共存对蚯蚓体内微塑料积累无明显影响,同时导致 As(Ⅲ)的生物富集量平均下降 34.2%.

3.2 As(III)对蚯蚓的毒性明显高于 PLA MPs,是对蚯蚓各生物标志物造成毒性影响的主要污染物.同时,在单一 As(III)及 As(III)-PLA MPs 复合暴露组中均观察到了明显的剂量-效应关系,复合暴露组的 IBR 指数值较单一 As(Ⅲ)暴露组平均降低 28.8%.

3.3 在不同水平 As(III)暴露下,As(Ⅲ)-PLA MPs 复合污染的蚯蚓联合毒性效应均表现出拮抗作用,PLA MPs 的共存能降低 As 对蚯蚓的毒性效应.

参考文献:

[1] Amjad A, Abidin M S Z, Alshahrani H, et al. Effect of fibre surface treatment and nanofiller addition on the mechanical properties of flax/PLA fibre reinforced epoxy hybrid nanocomposite [J]. Polymers, 2021,13(21):3842.

[2] Ali W, Ali H, Gillani S, et al. Polylactic acid synthesis, biodegradability, conversion to microplastics and toxicity: a review [J]. Environmental Chemistry Letters, 2023,21(3):1761-1786.

[3] Di Giannantonio M, Gambardella C, Miroglio R, et al. Ecotoxicity of polyvinylidene difluoride (PVDF) and polylactic acid (PLA) microplastics in marine zooplankton [J]. Toxics, 2022,10(8):479.

[4] Liu R, Liang J, Yang Y, et al. Effect of polylactic acid microplastics on soil properties, soil microbials and plant growth [J]. Chemosphere, 2023,329:138504.

[5] 邵雪纯,胡双庆,张 琪,等.聚乳酸微塑料及其复合污染的生物毒性效应与机制研究进展 [J]. 中国环境科学, 2023,43(2):935-945.
Shao X C, Hu S Q, Zhang Q, et al. Research progress on biotoxicological effects and mechanism of polylactic acid microplastics and their combined pollution [J]. China Environmental Science, 2023,43(2):935-945.

[6] Zhang X, Zhong T, Chen D, et al. Assessment of arsenic (As) occurrence in arable soil and its related health risk in China [J]. Environmental Geochemistry and Health, 2016,38:691-702.

[7] Li K, Wang F. Global hotspots and trends in interactions of microplastics and heavy metals: a bibliometric analysis and literature review [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023,30(41):93309-93322.

[8] Xie Y, Irshad S, Jiang Y, et al. Microplastic-mediated environmental behavior of metal contaminants: mechanism and implication [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2024,31(31):43524-43539.

[9] Zhu G, Yue K, Ni X, et al. The types of microplastics, heavy metals, and adsorption environments control the microplastic adsorption capacity of heavy metals [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023,30(33):80807-80816.

[10] Irshad M K, Aqeel M, Saleem S, et al. Mechanistic insight into interactive effect of microplastics and arsenic on growth of rice (*Oryza sativa* L.) and soil health indicators [J]. Science of The Total Environment, 2024,955:176875.

[11] Gong K, Liu T, Peng C, et al. Water-dependent effects of biodegradable microplastics on arsenic fractionation in soil: Insights from enzyme degradation and synchrotron-based X-ray analysis [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024,477:135275.

[12] 张芷晗,刘研萍,郭荣欣,等.微塑料对重金属 Cr(Ⅵ)和 Pb(Ⅱ)的吸附特征研究 [J]. 应用化工, 2024,53(2):262-267,272.
Zhang Z H, Liu Y P, Guo R X, et al. Characterization of the sorption of heavy metal Cr(VI) and Pb(II) by microplastics [J]. Applied Chemical Industry, 2024,53(2):262-267,272.

[13] An Q, Zhen Z, Zhong N, et al. Effects of biodegradable microplastics on arsenic migration and transformation in paddy soils: a comparative analysis with conventional microplastics [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024,469:134053.

[14] Alves P R L, da Silva E B, Cardoso E J B N, et al. Ecotoxicological impact of arsenic on earthworms and collembolans as affected by attributes of a highly weathered tropical soil [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018,25:13217-13225.

[15] Li Q, Yan J, Li Y, et al. Microplastics alter cadmium accumulation in different soil-plant systems: Revealing the crucial roles of soil bacteria and metabolism [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024,474:134768.

[16] Li Z, Yang Y, Chen X, et al. A discussion of microplastics in soil and risks for ecosystems and food chains [J]. Chemosphere, 2023,313:137637.

[17] Tang R, Lan P, Ding C, et al. A new perspective on the toxicity of arsenic-contaminated soil: Tandem mass tag proteomics and metabolomics in earthworms [J]. Journal of Hazardous Materials, 2020,398:122825.

[18] Sun W, Meng Z, Li R, et al. Joint effects of microplastic and dufulin on bioaccumulation, oxidative stress and metabolic profile of the earthworm (*Eisenia fetida*) [J]. Chemosphere, 2021,263:128171.

[19] Wang Z, Qi F, Shi Y, et al. Evaluation of single and joint toxicity of perfluorooctanoic acid and arsenite to earthworm (*Eisenia fetida*): A multi-biomarker approach [J]. Chemosphere, 2022,291:132942.

[20] Guo J J, Huang X P, Xiang L, et al. Source, migration and toxicology of microplastics in soil [J]. Environment International, 2020,137:105263.

[21] Trestrail C, Nugegoda D, Shimeta J. Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system [J]. Science of the Total Environment, 2020,734:138559.

[22] Zeng S, Yu H C, Ma J, et al. Identifying the status of heavy metal pollution of cultivated land for tradeoff spatial fallow in China [J]. Acta Pedologica Sinica, 2022,59(4):1036-1047.

[23] Chen P W, Hsiao M N, Xiao L W, et al. Adsorption behavior of heavy

metals onto microplastics derived from conventional and biodegradable commercial plastic products [J]. Science of the Total Environment, 2024,951:175537.

[24] Oliveira M, Almeida M. The why and how of micro(nano)plastic research [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019,114:196−201.

[25] Geiszinger A, Goessler W, Kuehnelt D, et al. Determination of arsenic compounds in earthworms [J]. Environmental Science & Technology, 1998,32(15):2238−2243.

[26] Beliaeff B, Burgeot T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002,21(6):1316−1322.

[27] 耿宏佩.砷在蚯蚓体内的富集与转化规律研究 [D]. 郑州:河南工业大学, 2023.
Geng H P. Arsenic accumulation and transformation by *Eisenia fetida* in arsenic−spiked soils [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2023.

[28] Zhang M, Zhang Y, Wang W, et al. Combined effects of microplastics and other contaminants on earthworms: A critical review [J]. Applied Soil Ecology, 2022,180:104626.

[29] Wang W, Yuan W, Chen Y, et al. Microplastics in surface waters of Dongting Lake and Hong Lake, China [J]. Science of the Total Environment, 2018,633539−633545.

[30] Li J ,Song Y, Cai Y. Focus topics on microplastics in soil: Analytical methods, occurrence, transport, and ecological risks [J]. Environmental Pollution, 2020,257:113570.

[31] Zhang Y, Gao T, Kang S, et al. Microplastics in glaciers of the Tibetan Plateau: Evidence for the long−range transport of microplastics [J]. Science of the total environment, 2021,758:143634.

[32] Liu G, Zhu Z, Yang Y, et al. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater [J]. Environmental Pollution, 2019,246:26−33.

[33] Langdon C J, Piearce T G, Meharg A A, et al. Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review [J]. Environmental Pollution, 2003,124(3):361−373.

[34] Wang Y, Wu Y, Cavanagh J, et al. Behavior and respiration responses of the earthworm *Eisenia fetida* to soil arsenite pollution [J]. Pedosphere, 2021,31(3):452−459.

[35] Wang L, Peng Y, Xu Y, et al. Earthworms' degradable bioplastic diet of polylactic acid: easy to break down and slow to excrete [J]. Environmental Science & Technology, 2022,56(8):5020−5028.

[36] Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2012,33(12):656−668.

[37] Li M, Liu Y, Xu G, et al. Impacts of polyethylene microplastics on bioavailability and toxicity of metals in soil [J]. Science of the Total Environment, 2021,760:144037.

[38] Xu K, Zhang Y, Huang Y, et al. Toxicological effects of microplastics and phenanthrene to zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Science of the Total Environment, 2021,757:143730.

[39] Wang Z, Cui Z, Liu L, et al. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to contaminated soil: Effects of arsenic species [J]. Chemosphere, 2016,154:161−170.

[40] Liu Y, Xu G, Yu Y. Effects of polystyrene microplastics on accumulation of pyrene by earthworms [J]. Chemosphere, 2022,296: 134059.

[41] Basu A, Saha D, Saha R, et al. A review on sources, toxicity and remediation technologies for removing arsenic from drinking water [J]. Research on Chemical Intermediates, 2014,40:447−485.

[42] Lu S C. Regulation of glutathione synthesis [J]. Current Topics in Cellular Regulation, 2001,36:95−116.

[43] Li S, Wang Z, Gao N, et al. Assessment of toxic effects of thallium on the earthworm *Eisenia fetida* using the biomarker response index [J]. Environmental Science: Processes & Impacts, 2024,26(8):1405−1416.

[44] Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations [J]. NeuroRx, 2004,1:182−188.

[45] Huang C, Ge Y, Yue S, et al. Microplastics aggravate the joint toxicity to earthworm *Eisenia fetida* with cadmium by altering its availability [J]. Science of the Total Environment, 2021,753:142042.

[46] Wang H T, Ma L, Zhu D, et al. Responses of earthworm *Metaphire vulgaris* gut microbiota to arsenic and nanoplastics contamination [J]. Science of the Total Environment, 2022,806:150279.

[47] Wang H T, Ding J, Xiong C, et al. Exposure to microplastics lowers arsenic accumulation and alters gut bacterial communities of earthworm *Metaphire californica* [J]. Environmental Pollution, 2019, 251:110−116.

[48] Cao Q, Steinman A D, Yao L, et al. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* to cyanobacteria toxins [J]. Scientific Reports, 2017,7(1):15954.

[49] Tourinho S P, Kočí V, Loureiro S, et al. Partitioning of chemical contaminants to microplastics: Sorption mechanisms, environmental distribution and effects on toxicity and bioaccumulation [J]. Environmental Pollution, 2019,252:1246−1256.

[50] Qu R, Liu J, Wang L, et al. The toxic effect and bioaccumulation in aquatic oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* after combined exposure to cadmium and perfluorooctane sulfonate at different pH values [J]. Chemosphere, 2016,152:496−502.

[51] Dong Y, Gao M, Qiu W, et al. Effect of microplastics and arsenic on nutrients and microorganisms in rice rhizosphere soil [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021,211:111899.

[52] 牛晓宇,薛维纳,李　帅,等.砷和全氟辛酸对赤子爱胜蚓的联合毒性效应 [J]. 中国环境科学, 2024,44(10):5855−5865.
Niu X Y, Xue W N, Li S, et al. Studies on the combined toxic effects of arsenic and perfluorooctanoic acid on the earthworm *Eisenia fetida* [J]. China Environmental Science, 2024,44(10):5855−5865.

[53] 杨晓霞,张雪梅,舒　晓,等.聚乙烯微塑料与镉联合暴露对赤子爱胜蚓的毒性效应及交互作用评估 [J]. 环境科学学报, 2024,44(7): 482−496.
Yang X X, Zhang X M, Shu X, et al. Toxic effects and interaction evaluation of polyethylene microplastics and cadmium combined exposure on earthworm *Eisenia fetida* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2024,44(7):482−496.

作者简介：闫艺萌(2004−),女,山东临沂人,本科生,主要从事土壤环境毒理学研究.Yanyimeng0616@163.com.