

李莹, 李小艳, 周垂帆. 铜污染条件下生物炭对蚯蚓的生态毒理效应[J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27 (5): 1226-1232

Li Y, Li XY, Zhou CF. Ecologically toxic effect of biochar on earthworms under copper pollution [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2021, 27 (5): 1226-1232

铜污染条件下生物炭对蚯蚓的生态毒理效应

李莹^{1,2} 李小艳^{3,4} 周垂帆^{3,4}✉

¹福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 福州 350003

²福建省农产品质量安全重点实验室 福州 350003

³福建农林大学林学院 福州 350002

⁴南方红壤区水土保持国家林业和草原局重点实验室 福州 350002

摘要 为探究铜(Cu)污染下施用生物炭对蚯蚓生长和Cu富集的影响机制,将赤子爱胜蚯蚓(*Eisenia fetida*)暴露在包含铜污染和不同热解温度(300 °C和600 °C)和施用比例(1%和3%)的水稻生物炭的人工土壤中,进行为期45 d的亚急性毒性试验。结果显示,Cu胁迫下,施用生物炭均不同程度抑制了蚯蚓的生长,促进了蚯蚓对Cu的富集,加剧了蚯蚓的氧化应激,导致蚯蚓SOD、CAT活性和MDA含量增加,形态学损伤加剧。且300 °C生物炭处理下蚯蚓的Cu富集量相较于同一施用比例下600 °C生物炭处理分别提高了3.13%和28.04%。同时,生物炭施用导致土壤水溶态Cu含量迅速增加。相关分析表明,Cu胁迫下,蚯蚓Cu富集量与培养前土壤水溶态Cu含量显著相关,而土壤水溶态Cu含量与DOC含量之间呈显著相关。因此,在蚯蚓培养前,300 °C生物炭处理下土壤DOC含量和水溶态Cu含量均高于同一施用比例的600 °C生物炭处理,可能是导致培养结束后前者处理中蚯蚓Cu富集量相对更高的重要原因。此外,蚯蚓Cu富集量、培养前期土壤水溶态Cu含量与土壤pH之间无明显相关性,故pH的改变可能不是影响Cu形态变化的决定因素。本研究结果表明Cu污染下,生物炭施用导致土壤DOC含量升高可能会增加Cu的生物有效性,不利于土壤动物的生长,对土壤生态系统造成负面影响。(图4表2参38)

关键词 铜污染;生物炭;人工土壤;抗氧化酶;可溶性有机碳

Ecologically toxic effect of biochar on earthworms under copper pollution

Li Ying^{1,2}, Li Xiaoyan^{3,4} & ZHOU Chuifan^{3,4}✉

¹Institute for Agricultural Standard Testing Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

²Fujian Key Laboratory of Agro-products Quality and Safety, Fuzhou 350003, China

³College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

⁴Key Laboratory of Soil and Water Conservation State Forestry and Grassland Administration, Southern Red Soil Region, Fuzhou 350002, China

Abstract To explore the effects and mechanisms of biochar on the growth of earthworms and Cu enrichment under Cu pollution, the earthworm species *Eisenia fetida* was exposed to artificial soil containing Cu solution under different pyrolysis temperatures (300 °C and 600 °C) and application ratios (1% and 3%) of rice biochar. A 45-day subacute toxicity test of Cu and biochar on *E. fetida* was conducted. The results showed that the application of biochar inhibited the growth of *E. fetida* under Cu pollution. In addition, it significantly promoted Cu enrichment in *E. fetida*, exacerbated the oxidative stress of *E. fetida*, increased superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activity, and malondialdehyde (MDA) content, and induced morphological damage in *E. fetida*. The Cu concentration in *E. fetida* under 300 °C biochar treatment at 1% and 3% application rates increased by 3.13% and 28.04%, respectively, in comparison with the 600 °C biochar treatment. Further, biochar application resulted in a rapid increase in water-soluble Cu content. Correlation analysis showed that the Cu concentration in *E. fetida* was significantly correlated with the soil water-soluble Cu content prior to earthworm culturing. The soil water-soluble Cu content was significantly correlated with soil dissolved organic carbon (DOC) content. The soil DOC content and water-soluble Cu content at 300 °C biochar treatments at 1% and 3% application rates were higher than the 600 °C biochar treatments before the culture of *E. fetida*. This may be an important reason for the higher Cu enrichment in *E. fetida* in the 300 °C biochar treatments. In addition, no significant correlations were observed between Cu concentration in *E. fetida*, water-soluble Cu content, and soil pH. The change in soil pH caused by biochar application was possibly not the decisive factor affecting the morphological change of

收稿日期 Received: 2020-06-22 接受日期 Accepted: 2020-09-23

福建省自然科学基金面上项目(2020J01520)、国家自然科学基金面上项目(32071746)和福建农林大学林学高峰学科建设优秀青年培育工程项目(71201800727)资助 Supported by the Science Foundation of the Fujian Province (2020), the National Natural Science Foundation of China (32071746), and the Forestry Summit Discipline Construction Project of Fujian Agricultural and Forestry University (71201800727)

✉通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhouchuifan@163.com)

Cu. The results indicated that the increase in soil DOC content caused by biochar application may increase the bioavailability of Cu under Cu pollution, which is not conducive to the growth of soil animals and has a negative impact on the soil ecosystem.

Keywords copper pollution; biochar; artificial soil; antioxidant enzyme; dissolved organic carbon

铜(Cu)是动植物生长发育的必需微量元素,但过量的Cu会严重损害人或动植物的生长发育^[1].近年来,铜矿的开采、尾矿的堆积、工业废水的排放以及含Cu农药的使用等使得土壤中的Cu远超土壤自身的承载能力^[2],土壤Cu污染问题形势十分严峻.

通常,重金属Cu进入环境中后很难被微生物或化学方法去除^[3].近年来,作为环境友好型材料的生物炭在土壤改良和修复重金属污染土壤方面引起广泛关注^[4].生物炭具有孔隙结构好,比表面积大以及表面含氧官能团丰富等特性,可以通过物理吸附、离子交换、沉淀络合等一系列反应,促使土壤中的重金属从交换态向生物有效性较低的有机物结合态转化,以达到减轻污染程度的目的^[5-6].但也有研究发现,生物炭会通过影响土壤养分的利用和元素的生物利用度诱发有毒物质的产生^[7],同时,生物炭中的可溶性有机碳(DOC)也在一定程度能够增加Cu的迁移,从而对土壤生物产生不利影响^[8-9],但目前内在机制仍不明确.相较于生物炭对土壤环境的积极影响,生物炭可能导致的土壤生态系统风险所受到的关注则要少得多^[4].不同生物炭间表面结构、理化性质等差异显著导致生物炭对重金属污染土壤的影响机制更复杂.

蚯蚓是维持土壤肥力的重要生物,在土壤生态系统中发挥着许多重要而有益的功能,包括分解、营养矿化和土壤结构改良^[10-11].由于蚯蚓对污染物的反应比其他土壤动物更为敏感,因此,科学界也常把蚯蚓作为土壤监测的指示生物^[12].据报道,蚯蚓对包括Cu以内的重金属的具有较强的富集作用^[1],但高浓度的重金属会导致蚯蚓生存和繁殖能力的下降,甚至会导致种群灭绝.然而,目前尚不清楚Cu污染土壤当中施用生物炭对蚯蚓的生态毒理效应.

鉴于此,以赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)作为农业用地蚯蚓的模型生物,采用欧盟推荐的人工土壤法(OECD, No. 207),通过向人工土壤当中添加Cu溶液与不同热解温度和比例的生物炭后,进行45 d的亚急性毒性试验,观察Cu污染条件下,生物炭施用对蚯蚓生长和Cu富集的影响;通过探究人工土壤中蚯蚓对生物炭施用后的生理响应,评估Cu污染胁迫下生物炭对土壤Cu形态转化和蚯蚓Cu富集的潜在影响相关机制,为评价生物炭在土壤修复中的应用效果和生态风险提供依据.

1 材料与方法

1.1 供试生物

受试生物选择的蚯蚓(*Eisenia fetida*)购于福建省龙岩蚯蚓养殖场.实验前,选择2月龄以上、体重300-600 mg、环带明显且大小一致的健康成蚯蚓,用干净的牛粪饲养并在气

候培养箱进行暗培养一周(25℃,相对湿度60%-70%)^[13].

1.2 人工土壤和生物炭制备

人工土壤根据OECD标准(OECD, 2004)推荐的标准方法配制,分别将细磨泥炭、高岭粘土、石英砂(50-200 μm之间)按重量比10:20:70加入搅拌机中,充分混匀待用.利用碳酸钙调节pH到6.0±0.5,加入去离子水使土壤含水量保持在基质干重的25%左右.

将水稻秸秆用去离子水洗净后自然风干,粉碎后至于马弗炉内限氧热解炭化以获得生物炭(BC),其中,升温速率为20℃/min,热解时间为4 h,热解温度分别为300℃和600℃(分别标记为LB和HB).生物炭基本性质见表1.

1.3 试验设计

将125 mL的Cu[(Cu(NO₃)₂·3H₂O)]储存液(pH均用NaOH调节至6.0±0.1)添加到500 g人工土壤中,即使得土壤最终的Cu浓度为200 mg/kg.整个试验设置6个处理,分别为①人工土壤中未添加Cu和生物炭(CK),②人工土壤+200 mg/kg Cu(Cu),③人工土壤+200 mg/kg Cu+1%300℃生物炭(Cu+1%LB),④人工土壤+200 mg/kg Cu+3%300℃生物炭(Cu+3%LB),⑤人工土壤+200 mg/kg Cu+1%600℃生物炭(Cu+1%HB),⑥人工土壤+200 mg/kg Cu+3%600℃生物炭(Cu+3%HB).每个处理共设置3个重复;其中,1%和3%的生物炭施用量分别相当于10 g/kg和30 g/kg土壤.所有处理的土壤混合后分别置于圆柱形塑料容器中(规格为100 mm×85 mm×140 mm)静置7 d,以达到平衡.之后,将10只有明显环带的成熟蚯蚓称重后分别放入每个容器中(暴露实验前,蚯蚓置于潮湿滤纸上清肠24 h,以减少因吞食食物而带入体内的Cu),置于气候培养箱中进行45 d暗培养,温度控制20±2℃.容器上方盖有带孔的盖子以防止蚯蚓逃逸和水分流失.培养期间,每2 d通过称重进行水分补充.每周在土壤表面添加一次磨细的干牛粪,添加标准为每条蚯蚓0.5 g牛粪,分别在培养的第15、30和45天随机取出2条蚯蚓,清肠洗净称重后置于-70℃保存,直至进一步分析.

1.4 指标分析测定

蚯蚓相对失重率: $W_{Ln} = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100\%$
式中, W_{Ln} 表示蚯蚓相对失重率(%), W_0 表示蚯蚓初始质量(g), W_t 表示第t天的质量(g).

蚯蚓中Cu含量测定^[10-11]:将蚯蚓冷冻干燥后称重.至于5.0 mL的浓硝酸溶液中于120℃条件下消煮2 h,分3次加入1 mL过氧化氢,于150℃消煮1 h至溶液透亮,使机体氧化.溶液中Cu浓度采用原子吸收分光光度计(AAS, ZEE nit 700, Analytikjena, Germany)进行测定.

蚯蚓生化指标测定:将蚯蚓切成小块,加入0.86% NaCl

表1 水稻生物炭基本性质
Table 1 Basic properties of maize straw biochar

生物炭 Biochar	pH	灰分 Ash (w/%)	C/%	N/%	DOC/g kg ⁻¹	CEC/mol kg ⁻¹	Cu/mg kg ⁻¹	BET/m ² g ⁻¹
300℃	8.6	22.3	50.1	1.5	6.4	281.3	17.58	11.56
600℃	10.1	36.9	68.7	0.4	1.7	198.4	23.56	24.61

DOC: 可溶性有机碳; CEC: 阳离子交换量; BET: 比表面积.
DOC: Dissolved organ carbon; CEC: Cation exchange capacity; BET: Brunauer, emmett and teller.

冰浴后,用高速搅拌器(XHF-D,中国浙江)将混合物匀浆混合,离心(10 000 r/min, 10 min)获取上清液后用于测定超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量。每个实验重复3次。其中, SOD采用氮蓝四唑法^[14]测定, CAT参照Zhang等的方法^[15]进行测定,采用TBA比色法^[16]对MDA的含量进行测定,结果以每mg蛋白中硫代巴比妥酸产物(TBARS)的含量表示^[17]。

透射电镜(TEM)扫描^[18]:取1 cm左右的蚯蚓表皮,剪成1 mm³大小的碎片,在4 ℃的2.5%戊二醛溶液中固定,用0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.0)洗涤,再用1%锇酸固定,逐级乙醇、丙酮梯度脱水后埋入环氧树脂中。用Reichert超微切片机切片,采用柠檬酸铅-醋酸铀酰双重染色, JEM-2100型透射电镜成像。

分别取培养前(第0天)和培养结束后(第45天)的土壤进行理化性质测定:其中第0天土壤为施用生物炭但未开始蚯蚓培养的土样。土壤和生物炭pH测定采用电位法 $[m(\text{土}):m(\text{水})=1:5; m(\text{炭}):m(\text{水})=1:10]$;土壤和生物炭可溶性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)含量采用TOC分析仪(SHIMADZUTOC-VCPH/CPNAnalyzer日本岛津)测定^[19],其中, $m(\text{土}):m(\text{水})=1:25, m(\text{炭}):m(\text{水})=1:10$ 。水溶态Cu含量测定^[20]:称取2.00 g风干土于120 mL离心管中,加入30 mL去离子水,恒温下振荡2 h后离心过滤,浸提液中Cu浓度用原子吸收分光光度计测定。

1.5 数据分析

用SPSS 19.0软件(SPSS Inc., Chicago, IL)进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、多重比较和Pearson相关分析,用S-N-K法对处理间数据进行差异显著性分析。绘图用Origin 8.6 (OriginLab)进行。数据结果采用Mean ± SD的形式表示。

2 结果与分析

2.1 Cu污染条件下生物炭施用对蚯蚓生长和Cu富集的影响

45 d的亚急性实验后,不同处理下所有的蚯蚓都存活,无死亡出现。但包括CK在内的蚯蚓生长都受到抑制(图1a)。即使是CK处理,蚯蚓失重率也达15.99%,即培养后与培养前的蚯蚓体重质量差异显著($P < 0.05$),这可能是由于人工土壤中

本身缺乏更合适的食物。而暴露在含Cu胁迫下的蚯蚓失重率均显著高于CK($P < 0.05$),其中,单独Cu处理下的蚯蚓失重率为22.94%,暴露在Cu + 1% LB和Cu + 3% LB处理重的蚯蚓失重率分别为28.88%和25.82%,二者之间无显著性差异,但较单独Cu处理分别提高了25.91%和12.51%,而暴露在Cu + 1% HB和Cu + 3% HB处理下的蚯蚓体重各自损失了36.63%和28.44%,相比Cu处理分别提高了69.67%和23.99%。以上表明,生物炭的施用加剧了Cu胁迫对蚯蚓生长的抑制,其中,1%的生物炭处理作用更显著。

在整个培养期内,Cu胁迫下蚯蚓体内Cu富集均显著高于CK处理($P < 0.05$) (图1b)。单独Cu处理下,蚯蚓Cu含量逐渐增加并在30 d左右趋于稳定。但添加低温生物炭在培育初期即不同程度地促进了蚯蚓对Cu的富集,在Cu + 1% LB处理的第5天和第15天时,蚯蚓Cu含量分别较Cu处理提高了42.87%和42.40%,呈显著性差异($P < 0.05$)。培养结束后,同一施用比例下, LB处理下的蚯蚓Cu富集量高于HB处理。Cu + 1% LB和Cu + 3% LB处理下蚯蚓Cu含量相较于Cu处理分别提高了16.22%和42.07% ($P < 0.05$)。而高温生物炭处理下的蚯蚓Cu含量相较于Cu处理分别提高11.42%和10.96%,但仅Cu + 1% HB与Cu处理之间差异显著($P < 0.05$)。

2.2 Cu污染条件下生物炭对蚯蚓SOD、CAT活性及MDA含量的影响

对培养结束后不同处理下蚯蚓的SOD、CAT活性和MDA含量进行测定(图2)。结果表明,相较于CK, Cu的加入导致蚯蚓SOD活性、CAT活性、MDA含量均显著升高($P < 0.05$),说明Cu胁迫诱发蚯蚓氧化应激反应。与Cu处理相比,添加生物炭均不同程度增加了蚯蚓体内抗氧化酶活性或MDA含量,其中, Cu + 1% LB处理下蚯蚓的SOD、CAT活性和MDA含量、Cu + 1% HB处理下蚯蚓MDA含量以及Cu + 3% HB处理下CAT活性相较于Cu处理均呈显著性差异($P < 0.05$)。表明Cu胁迫下,施用生物炭导致蚯蚓氧化应激反应、脂质过氧化和细胞膜损伤加剧,其中,施用1% LB处理影响最为剧烈。

2.3 生物炭处理下Cu胁迫对蚯蚓表皮超微结构的影响

蚯蚓的外表面由角质层、表皮和表面附属物组成(图3)。角质层为非细胞层,主要由胶原纤维组成^[10-11](图3a)。蚯蚓表皮细胞由具有丰富的细胞器,包括线粒体、高尔基体和内质网组成。蚯蚓吸收土壤溶液中的重金属主要通过表皮^[10-11],因

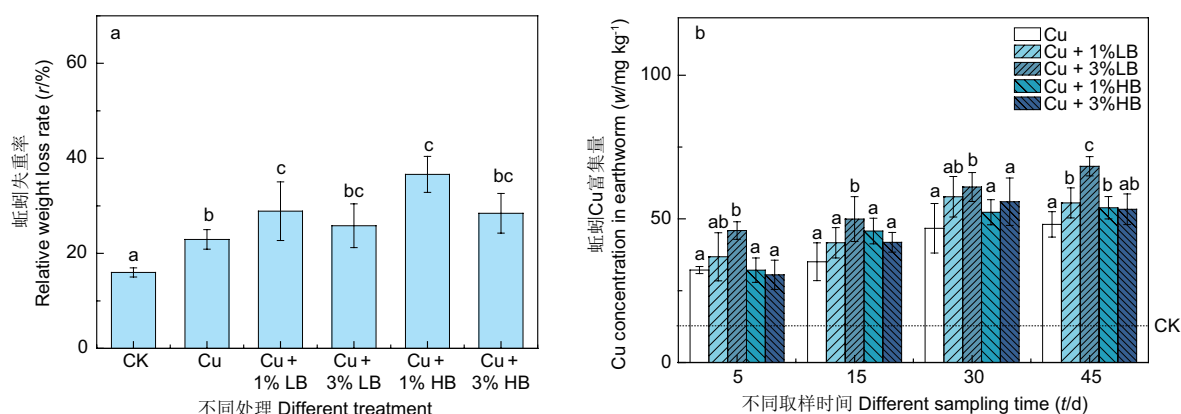


图1 不同处理下蚯蚓失重率和Cu富集量。不同小写字母表示在同一取样时间处理间差异显著($P < 0.05$)。竖线表示标准差($N = 3$)。LB: 300 ℃生物炭; HB: 600 ℃生物炭。

Fig. 1 Relative weight loss rates and Cu concentration of *Eisenia fetida* as exposed to different treatments. Data points with different letters are significantly different at the same sampling times ($P < 0.05$). Bars indicate standard deviation ($N = 3$). LB: 300 ℃ biochar; HB: 600 ℃ biochar.

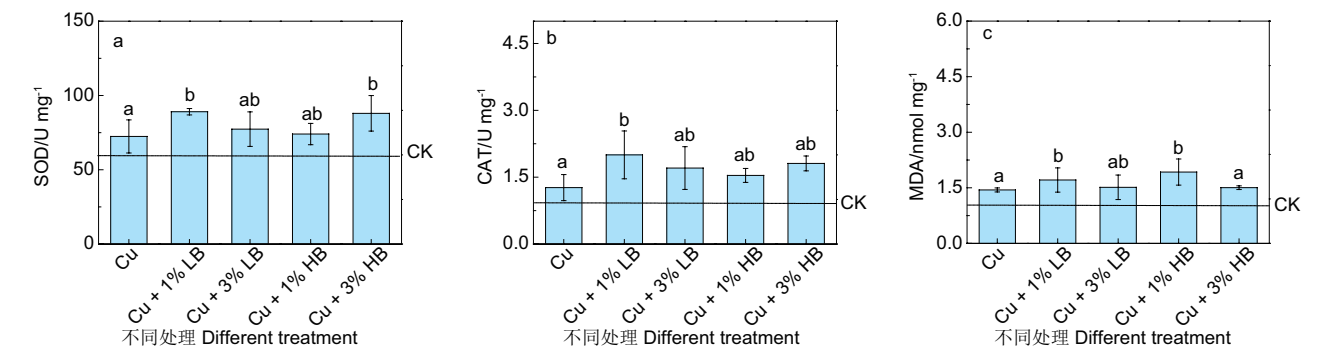


图2 不同处理下蚯蚓的生化指标差异. a. SOD活力; b. CAT活力; c. MDA含量; 不同字母表示在 $P < 0.05$ 条件下差异显著, 竖线表示标准差 ($N = 3$). LB: 300 °C生物炭; HB: 600 °C生物炭.

Fig. 2 Biochemical responses of *Eisenia fetida* exposed to different treatments. a. SOD activity; b. CAT activity; c. MDA content. Data with different letters are significantly different at the 0.05 level. Bars indicate standard deviation ($N = 3$). LB: 300 °C biochar; HB: 600 °C biochar.

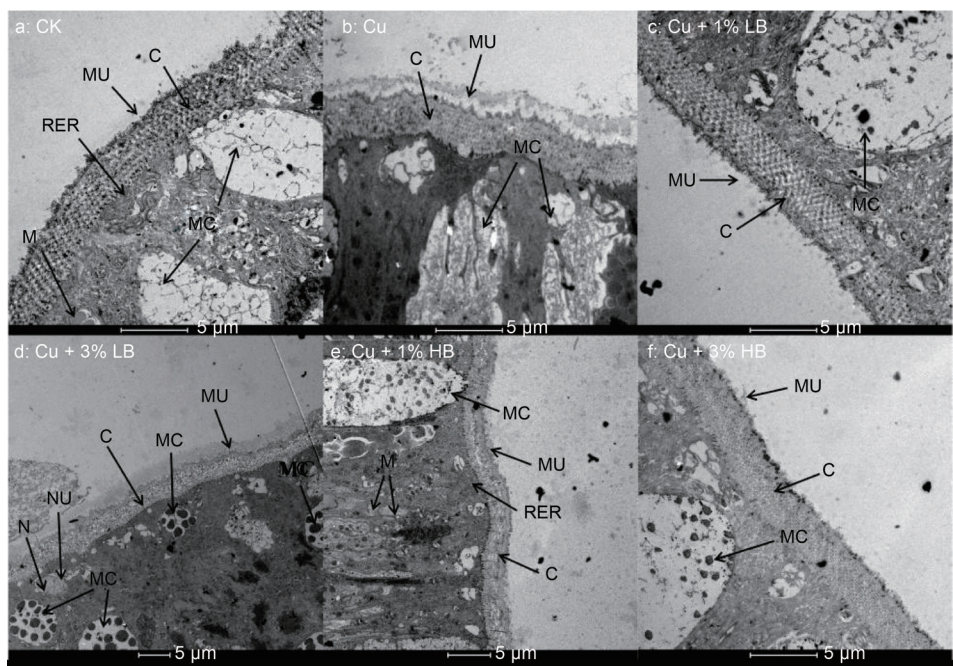


图3 不同处理下的蚯蚓部分表皮及表角质层超微结构. MU: 黏液; MC: 黏液细胞; E: 表皮; C: 表角质层; N: 细胞核; NU: 细胞核核仁; M: 线粒体; RER: 粗面内质网; SER: 滑面内质网.

Fig. 3 Skin ultrastructure of *Eisenia fetida* exposed to different treatments. MU: Mucus; MC: Mucous cells; E: Epidermis; C: Cuticle; N: Nuclear; NU: Nucleoli; M: Mitochondrion; RER: Rough endoplasmic reticulum; SER: Smooth endoplasmic reticulum.

此, 重金属胁迫下, 通常蚯蚓表皮结构首先受损. 通过透射电镜分析发现, Cu胁迫会导致蚯蚓角质层的异常, 出现明显的凹陷和增厚的现象, 排列不整齐, 并形成一定的溃疡面, 呈撕裂分散状; 表皮中的线粒体, 内质网, 高尔基体, 核糖体等细胞器减少, 表角质层与表皮之间的颗粒层增厚 (图3b-f). 生物炭的加入均在一定程度加剧了蚯蚓的应激症状 (图3c-f). 如: 在Cu + 3% LB生物炭处理中, 蚯蚓角质层的凹陷明显, 相对连续, 颗粒层增厚. 分泌泡内含有大量细丝状的物质和黏液, 表皮黏液细胞数目随直径增大而增多, 相对分散, 细胞器数量减少. 总的来说, 我们观察到生物炭处理加剧了Cu胁迫下蚯蚓的形态学损伤.

2.4 不同处理下土壤DOC含量、pH和水溶态Cu含量变化

对培养前后 (第0天和第45天) 土壤DOC和水溶态Cu含量进行测定, 结果如图4a所示. 所有处理45 d后的DOC含量均高于0 d, 这表明, 蚯蚓活动在一定程度可能促进了土壤有机质的分解, 同时, 牛粪的施用也会导致土壤DOC含量升高.

无论是第0天或第45 d, 生物炭处理下土壤DOC含量均不同程度高于CK和Cu处理, 且同一生物炭处理下, 土壤DOC含量随着生物炭施用比例的增加而增加. 第0天时, 施用低温生物炭后的土壤DOC含量显著高于CK和Cu处理 ($P < 0.05$).

第0天时, 同一生物炭处理, 水溶态Cu含量随着施用量的增加而增加. 相较于单独Cu处理, 生物炭施用均不同程度增加了土壤中水溶态Cu含量, 其中, 低温生物炭处理与Cu处理之间呈显著性差异 ($P < 0.05$) (图4b). 第45天后, 添加1%或3% HB处理其土壤可溶态Cu含量相较于Cu处理无显著性差异, 但添加LB处理 (1%或3%) 其土壤可溶态Cu含量则显著增加 ($P < 0.05$). 测定土壤pH后发现, 第0天时, 相较于CK和Cu处理, 施用生物炭均显著提高了土壤pH ($P < 0.05$), 其中施用高温生物炭处理下的土壤pH均要不同程度高于同一比例低温生物炭处理, 但无显著性差异; 培养结束后, 除Cu + 3% HB处理外, 其余处理之间pH均无显著性差异.

对第0天的土壤DOC含量、pH、水溶态Cu含量和培养结束后蚯蚓最终Cu富集量进行相关性分析 (表2), 结果表

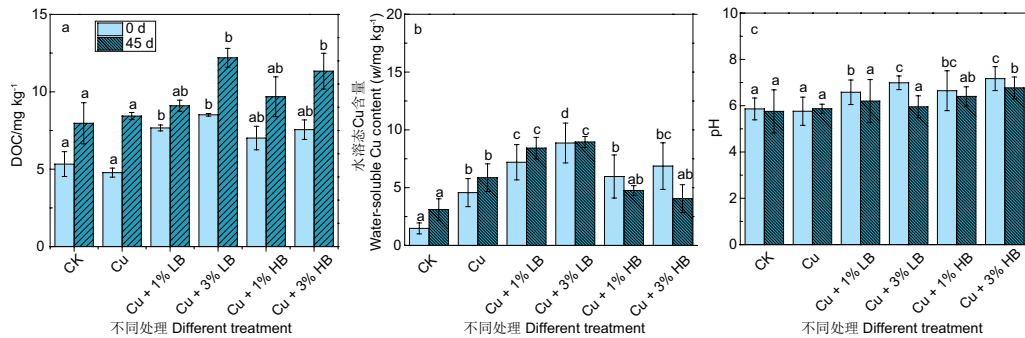


图4 不同处理下土壤DOC和水溶态Cu含量变化. a. 土壤可溶有机碳 (DOC) 含量; b. 水溶态Cu含量; c. 土壤pH. 同一取样时间内不同处理间不同字母表示在 $P < 0.05$ 条件下差异显著, 竖线表示标准差 ($N = 3$).

Fig. 4 Changes in contents of soil dissolved organic carbon (DOC) and water-soluble Cu from different treatments. a. Soil DOC content; b. Water soluble Cu content; c. Soil pH. Data with different letters are significantly different at the same sampling time ($P < 0.05$). Bars indicate standard deviation ($N = 3$).

明, 蚯蚓Cu富集量与水溶态Cu含量之间均有显著相关性 ($r = 0.879$), 而水溶态Cu含量与土壤DOC含量之间有显著相关性 ($r = 0.945$).

表2 土壤性质和蚯蚓Cu富集量的Pearson相关性分析

Table 2 The correlation between soil properties and Cu concentration in earthworm

指标 Index	蚯蚓Cu富集量 Cu concentration in earthworm	水溶态Cu含量 Water soluble Cu content	土壤DOC含量 Soil DOC content
pH	0.611	0.779	0.677
蚯蚓Cu富集量 Cu concentration in earthworm		0.879*	0.783
水溶态Cu含量 Water soluble Cu content			0.945*

**在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关; *在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关.

** Correlation is significant at the 0.01 level; * correlation is significant at the 0.05 level.

3 讨论

3.1 Cu胁迫下生物炭添加对蚯蚓Cu毒性的影响

研究表明, Cu胁迫下蚯蚓生长明显受到抑制, 这与Zhou等的结论^[11]一致. 后者发现, 蚯蚓死亡率和生长受抑程度随Cu浓度的增加而升高. 本研究发现, 施用生物炭对蚯蚓的生长有抑制作用. 即生物炭并不能成为蚯蚓的食物来源, 相反, 其可能通过抑制蚯蚓取食导致其减重^[20-21]. 此前, Zhang等也发现, 施加秸秆生物炭到土壤28 d后蚯蚓生长受到明显抑制^[22]. Liesch等报道, 施用生物炭后土壤pH值的快速增加或过度盐碱化以及氨的生成可能是导致蚯蚓的死亡率和失重率更高的主要原因^[23]. 本研究表明, Cu胁迫下导致蚯蚓体内Cu富集量明显升高, SOD、CAT活性和MDA含量显著增加, 这与Zhou等^[11]和Geracitano等^[24]的结论一致. 我们推测, 这可能是导致蚯蚓生长受到抑制的重要原因. 进一步分析发现, 生物炭施用导致蚯蚓体内Cu富集量的增加, 且除Cu + 3% HB处理外, 其余生物炭处理下蚯蚓Cu富集量相较于Cu处理均呈显著性差异 ($P < 0.05$). 这表明生物炭促进了蚯蚓对Cu的富集, 加剧了Cu对蚯蚓的毒性.

Cu的胁迫会增加蚯蚓活性氧 (ROS) 的积累, SOD酶通过与活性氧自由基反应将超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 分解为 H_2O_2 和 O_2 , 而CAT酶可以继续分解 H_2O_2 , 以减少脂质过氧化, 维持活

性氧化代谢平衡^[10-11], 从而使蚯蚓在一定程度上忍耐、减缓或抵抗逆境胁迫^[10-11], 但若抗氧化酶活性调节能力有限, 蚯蚓体内积累了过剩的氧自由基, 引起膜的过氧化^[10], 导致MDA含量增加. 本研究中, Cu胁迫下, 施用生物炭抑制了蚯蚓的生长, 显著促进了蚯蚓对Cu的富集, 加剧了蚯蚓的氧化应激, 导致蚯蚓SOD、CAT活性和MDA含量增加, 形态学损伤加剧, 这可能是导致生物炭存在下蚯蚓生长受到一致的重要原因. 但也有研究发现, 由于遭受高浓度的重金属胁迫, 蚯蚓酶系统难以完全补偿长时间的氧化应激, 故抗氧化酶活性初期略有增加, 随后则明显被抑制^[10, 25]. 本研究中, TEM结果证实, Cu胁迫导致蚯蚓表皮细胞结构的损伤, 而生物炭处理下这种损伤没有缓解, 甚至变得更为严重. 颗粒层增厚, 细胞器数量减少. 以上说明Cu污染的人工土壤中添加生物炭在一定程度上增加了Cu对蚯蚓的毒性.

3.2 生物炭添加增加Cu毒性的原因分析

重金属的生物毒性不仅与总暴露量有关, 还与其化合物的形态有关. 只有溶解态的化学物质才对蚯蚓具有生物可利用性^[26]. 本研究发现, 在CK和单独Cu处理中, 45 d后的土壤水溶态Cu含量相较于第0天显著增加, 表明蚯蚓的存在促进了Cu向水溶态转化, 这与周波的研究^[27]相一致. 后者发现, 蚯蚓可以通过降低污泥中还原性物质的量, 改变其氧化还原状态, 促进重金属活化. 同时, 蚯蚓活动过程中通过分泌大量带有活性基团的胶黏物质促进土壤重金属的活化^[28]. 本研究发现, 在培养前 (第0天), 生物炭处理下的水溶态Cu含量即高于Cu处理, 其中, Cu + 1% LB、Cu + 3% LB与Cu处理之间呈显著性差异 ($P < 0.05$). 这说明, 施用生物炭后, 土壤中 Cu^{2+} 立即向溶解态转变, 生物有效性增加. 这可能是生物炭处理后蚯蚓Cu富集增加的重要原因. 同时, 相关性分析表明, 蚯蚓Cu富集量与第0天土壤水溶态Cu含量显著相关. 相似地, 侯艳伟等探究鸡粪生物炭施入红壤后对土壤性质与重金属形态后发现, 生物炭能够增加土壤有机质, 提高Cu的生物有效性比例^[29]; 而张艺腾等则发现, 鸡粪生物炭可以明显增加土壤pH, 减少土壤有效态Cu含量, 从而减少植物对Cu的吸收^[5].

通常 Cu^{2+} 离子形态转变取决于其在土壤中的溶解沉淀、络合解离、吸附解吸平衡等一系列化学过程. 本研究中, 生物炭施用后土壤DOC含量均有不同程度的增加, 此前有研究发现, DOC作为活性小分子有机物对重金属具有螯合作用^[30], 可以作为载体促进重金属可以作为载体促进重金属在土壤中的运输, 从而提高土壤中Cu的迁移和生物有效性^[31]. Lehman

等也表明在任何氧化-还原条件下, DOC都能使Cu的迁移能力大增加^[32]。也有研究证实, 生物炭本身所包含的溶解性有机质富含丰富的有机官能团(如羧基、酚羟基等)或半醌自由基等^[33], 能通过直接与重金属发生络合和氧化还原作用从而改变土壤中的重金属生物毒性^[34]。因此, 本研究中生物炭施用后土壤DOC含量的增加可能是导致土壤水溶态Cu含量的升高的重要原因。DOC与重金属的相互作用能力与DOC的性质密切相关, 生物炭源BDOC的组成受原料类型和热解温度的控制^[35]。本研究发现, Cu胁迫下, 第0天, 施用低温生物炭后其水溶态Cu含量均高于同一比例下高温生物炭处理, 这可能与该时期低温生物炭处理后土壤DOC含量高于高温生物炭处理有关。Wei等也发现, 相较于高温生物炭($> 500\text{ }^{\circ}\text{C}$), 低温生物炭($\leq 500\text{ }^{\circ}\text{C}$)BDOC含量较高, 含氧官能团丰富且芳香性弱, 对Cu具有更大的络合能力, 更容易引发重金属随DOC迁移所带来的环境风险^[36]。因此, 我们考虑, 不同生物炭施用后土壤水溶态Cu含量变化差异是导致低温生物炭条件下蚯蚓Cu富集量较同一施用比例下高温生物炭处理更高的重要原因。唐行灿也发现, 相较于低温生物炭, 高温生物炭由于难以被土壤中的微生物所利用, 其处理下蚯蚓体内的Cu、Cd等重金属富集量要低于低温生物炭($300\text{ }^{\circ}\text{C}$)^[20]。同时, Wang等证实, 蚯蚓的存在也会削弱生物炭对重金属的固定作用^[37]。但此前李荭荭等却发现生物炭施加显著增加水稻土pH值和DOC含量, 降低土壤 CaCl_2 提取的有效态Cu含量, 使移动性较强的弱酸提取态和可还原态Cu转变成较稳定的可氧化态Cu, 从而降低Cu在土壤中的有效性^[3]。这一差异可能与生物炭、土壤性质以及培养条件息息相关。

前人研究^[20, 37]表明, 土壤pH是影响土壤重金属Cu有效性的重要因子, 生物炭提高土壤pH值从而加强对重金属的吸附

与离子交换作用, 同时, 生物炭灰分中的一些元素也会与重金属产生共沉淀, 从而降低重金属在土壤中的生物有效性。本研究发现, 尽管培养初期, 生物炭施用提高了土壤pH, 且pH随施用比例的增加而提高。但水溶态Cu含量和蚯蚓Cu富集量与pH之间的相关度不显著。因此, 我们考虑, 在本研究中, 生物炭施用对pH的改变并不是影响Cu形态变化的决定性因素。同时, 由于施用浓度和暴露时间的影响, 生物炭对蚯蚓的影响可能会出现相反的结果, 如Tammeorg等发现, 生物炭施用14 d后对蚯蚓产生明显的负面影响, 但田间试验开展4.5个月后, 生物炭改良后的土壤生物量和蚯蚓密度均最高^[38]。因此, 生物炭对蚯蚓种群的负面影响也可能随时间的延长而减弱。故长期的跟踪研究必不可少。

4 结论

本研究发现, 施用生物炭到Cu污染的人工土壤后, 促使土壤中的 Cu^{2+} 立即向溶解态转变, 从而增加了土壤中Cu的生物有效性, 促进了蚯蚓对Cu的富集, 对蚯蚓生长和抗氧化系统产生负面影响。其中, 生物炭施用后引发的土壤DOC的含量变化是决定土壤Cu生物有效性和蚯蚓Cu富集量的重要因素。研究结果证实, Cu污染下, 施用生物炭可能带来一定的环境风险, 须引起足够的重视。但本研究是基于室内较为理想条件下的短期试验, 且采用人工土壤, 减少了微生物以及外界环境的干扰, 但现实中, 生物炭对土壤Cu有效性的影响机制复杂, 可能受多种因素的影响, 且本研究培养期限也相对较短, 难以全面揭示Cu污染条件下生物炭对Cu生物有效性的影响机制。因此, 有必要通过建立长期野外定位试验, 以确定生物炭对土壤生态环境的长期影响。

参考文献 [References]

- 1 徐金玉, 王伟伟, 王惠, 张海燕. 铜污染土壤的生物修复研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, **36** (3): 471-480 [Xu JY, Wang WW, Wang H, Zhang HY. Progress in bioremediation of copper-contaminated soils [J]. *Chin J Biotechnol*, 2020, **36** (3): 471-480]
- 2 袁金红, 李靖锐, 张海燕. 植物铜转运蛋白的结构和功能[J]. 植物学报, 2016, **51** (6): 849-858 [Yuan JH, Li JR, Zhang HY. Structure and function of copper transporters in plants [J]. *Chin Bull Bot*, 2016, **51** (6): 849-858]
- 3 李荭荭, 赵明柳, 董海霞, 唐守寅, 王果. 生物炭对铜污染土壤的修复及水稻Cu累积的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2020, **36** (9): 1210-1217 [Li HH, Zhao ML, Dong HX, Tang SY, Wang G. Biochar reduced the soil Cu bioavailability and the accumulation of Cu in rice [J]. *J Ecol Rural Environ*, 2020, **36** (9): 1210-1217]
- 4 He L, Zhong H, Liu G, Dai Z, Brookes PC, Xu J. Remediation of heavy metal contaminated soils by biochar: mechanisms, potential risks and applications in China [J]. *Environ Pollut*, 2019, **252**: 846-855
- 5 张艺腾, 范禹博, 徐笑天, 张秀芳, 李明堂. 鸡粪生物炭对土壤铜和锌形态及植物吸收的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, **37** (11): 2514-2521 [Zhang YT, Fan YB, Xu XT, Zhang XF, Li MT. Effects of chicken manure-derived biochar on Cu and Zn speciation in soil and uptake by plant [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2018, **37** (11): 2514-2521]
- 6 王风, 王梦露, 许莹, 董旭, 虞娜, 张玉龙, 党秀丽. 生物炭施用对棕壤重金属镉赋存形态及油菜吸收镉的影响[J]. 农业环境科学学报, 2017, **36** (5): 907-914 [Wang F, Wang ML, XU K, Dong X, Yu N, Zhang YL, Dang XL. Effects of biochar application on cadmium transformation in brown soil and uptake by baby bokchoi [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2017, **36** (5): 907-914]
- 7 Delannoy M, Yehya S, Techer D, Razafitianamaharavo A, Richard A, Caria G, Baroudi M, Montargès-Pelletier E, Rychen G, Feidt C. Amendment of soil by biochars and activated carbons to reduce chlordecone bioavailability in piglets [J]. *Chemosphere*, 2018, **210**: 486-494
- 8 Ding J, Yin Y, Sun A, Lassen SB, Li G, Zhu D, Ke X. Effects of biochar amendments on antibiotic resistome of the soil and collembolan gut [J]. *J Hazard Mater*, 2019, **377**: 186-194
- 9 Ren X, Zeng G, Tang L, Wang J, Wan J, Feng H, Song B, Huang C, Tang X. Effect of exogenous carbonaceous materials on the bioavailability of organic pollutants and their ecological risks [J]. *Soil Biol Biochem*, 2018, **116**: 70-81
- 10 Panzarino O, Hyršl P, Dobeš P, Vojtek L, Vernile P, Bari G, Terzano R, Spagnuolo M, de Lillo E. Rank-based biomarker index to assess cadmium ecotoxicity on the earthworm *Eisenia andrei* [J]. *Chemosphere*, 2016, **145**: 480-486
- 11 Zhou C, Huang M, Yu J, Li Y, Liu A. The effect of low-molecular-weight organic acids on copper toxicity in *E. fetida* in an acute exposure system [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2017, **24** (9): 8805-8813

- 12 Sanchez-Hernandez J C. Earthworm Biomarkers in Ecological Risk Assessment [M]//Ware GW, Whitacre DM, Albert LA. Reviews of environmental contamination and toxicology: continuation of residue reviews. New York: Springer New York, 2006: 85-126
- 13 Arnold RE, Hodson ME, Comber S. Does speciation impact on Cu uptake by, and toxicity to, the earthworm *Eisenia fetida*? [J]. *Eur J Soil Biol*, 2007, **43**: S230-S232
- 14 Liu X, Zhang S, Wang J, Wang J, Shao Y, Zhu L. Biochemical responses and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) induced by ionic liquid [omim]PF₆ [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2016, **23** (7): 6836-6844
- 15 Zhang Q, Zhang G, Yin P, Lv Y, Yuan S, Chen J, Wei B, Wang C. Toxicological effects of soil contaminated with spirotetramat to the earthworm *Eisenia fetida* [J]. *Chemosphere*, 2015, **139**: 138-145
- 16 Xu D, Li C, Wen Y, Liu, W. Antioxidant defense system responses and DNA damage of earthworms exposed to *Perfluorooctane sulfonate* (PFOS) [J]. *Environ Pollut*, 2013, **174**: 121-127
- 17 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **71** (s1-2): 248-254
- 18 吴波. 参环毛蚓对重金属镉离子的生理响应及其变化规律的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010 [Wu B. The study on physiology response and change regularity of heavy metal cadmium ion in *Pheretima asperillum* [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2010]
- 19 王开峰, 彭娜, 何江, 吴礼滨, 林思武. 污泥生物炭中水溶性有机物的三维荧光光谱特征及其与铜的络合[J]. 环境科学与技术, 2017, **40** (10): 151-156 [Wang KF, Peng N, He J, Wu LB, Li SW, Characterization of sludge biochar -derived dissolved organic matter using three -dimension EEM fluorescence spectroscopies and its complexation by Cu [J]. *Environ Sci Technol*, 2017, **40** (10): 151-156]
- 20 唐行灿, 林亚楠, 陈金林, 张民. 生物炭对土壤固定铜及动植物行为的影响[J]. 广东农业科学, 2014, **41** (19): 47-51 [Tang XC, Lin YN, Chen JL, Zhang M. Effect of biochar application on immobilization of Cu by soil and behaviour of pakchoi and earthworm [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2014, **41** (19): 47-51]
- 21 Li D, Hockaday WC, Masiello CA, Alvarez PJJ. Earthworm avoidance of biochar can be mitigated by wetting [J]. *Soil Biol Biochem* 2011, **43** (8): 1732-1737
- 22 Zhang Q, Saleem M, Wang C. Effects of biochar on the earthworm (*Eisenia foetida*) in soil contaminated with and/or without pesticide mesotrione [J]. *Sci Total Environ*, 2019, **671**: 52-58
- 23 Liesch A, Weyers S, Gaskin J, Das K C. Impact of two different biochars on earthworm growth and survival [J]. *Ann Environ Sci*, 2010, **4**: 1-9
- 24 Geracitano LA, Bocchetti R, Monserrat JM, Regoli F, Bianchini A. Oxidative stress responses in two populations of *Laonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper [J]. *Mar Environ Res*, 2004, **58** (1): 1-17
- 25 Sanchez-Hernandez J C, Rios J M, Attademo A M, Malcevski A, Andrade Cares X. Assessing biochar impact on earthworms: Implications for soil quality promotion [J]. *J Hazard Mater*, 2019, **366**: 582-591
- 26 黄先飞, 秦樊鑫, 胡继伟. 重金属污染与化学形态研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2008 (1): 48-51 [Huang XF, Qin FX, Hu JW. Review on studies of heavy metal pollution and chemical speciation [J]. *Studies Trace Elements Health*, 2008 (1): 48-51]
- 27 周波, 唐晶磊, 代金君, 许欢, 杨小雪, 陈旭飞, 张池, 戴军. 蚯蚓作用下污泥重金属形态变化及其与化学生物学性质变化的关系[J]. 生态学报, 2015, **35** (19): 6269-6279 [Zhou B, Tang JL, Dai JJ, Xu H, Yang XX, Cheng XF, Zhang C, Dai J. Remediating effluent sludge with earthworms: changes in heavy metal speciation and associated chemical and biological properties [J]. *Acta Ecol Sin*, 2015, **35** (19): 6269-6279]
- 28 Peijnenburg W, Zablotzka M, Vijver M. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2007, **67**: 163-179
- 29 侯艳伟, 曾月芬, 安增莉. 生物炭施用对污染红壤中重金属化学形态的影响[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2011, **42** (4): 460-466 [Hou YW, Zeng YF, An ZL. Effects of the application of biochar on the chemical fraction of heavy metals in polluted red soil [J]. *J Inner Mongolia Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 2011, **42** (4): 460-466]
- 30 Uchimiya M, Lima I M, Klasson K T, Wartelle L H. Contaminant immobilization and nutrient release by biochar soil amendment: Roles of natural organic matter [J]. *Chemosphere*. 2010, **80** (8): 935-940
- 31 张彦. 太湖溶解性有机质对Cu的形态及生物有效性的影响[D]. 徐州: 中国矿业大学, 2013 [Zhang Y. Influence of DOM in Taihu lake on Cu species and bioavailability [D]. Xuzhou: China University of Mining Technology, 2013]
- 32 Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA. Hockaday WC, Crowley D. Biochar effects on soil biota-A review [J]. *Soil Biol Biochem*, 2011, **43** (9): 1812-1836
- 33 Fu H, Liu H, Mao J, Chu W, Li Q, Alvarez P, Qu X. Photochemistry of dissolved black carbon released from biochar: reactive oxygen species generation and phototransformation [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, **50** (3): 1218-1226.
- 34 Wu H, Dong X, Liu H. Evaluating fluorescent dissolved organic matter released from wetland-plant derived biochar: effects of extracting solutions [J]. *Chemosphere*, 2018, **212**: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.110
- 35 袁东海, 崔骏, 洪志强, 闻丽, 王京刚, 马文林, 李俊奇. 白洋淀沉水植物腐解溶解性有机物与重金属的相互作用[J]. 环境工程学报, 2016, **10** (5): 2184-2192 [Yuan DH, Cui J, Hong ZQ, Wen L, Wang JG, Ma WL, Li JQ. Interaction between dissolved organic matter released by macrophyte decomposition and heavy metal in Lake Baiyangdian [J]. *Chin J Environ Eng*, 2016, **10** (5): 2184-2192]
- 36 Wei J, Tu C, Yuan G, Bi D, Wang H, Zhang L. Pyrolysis temperature-dependent changes in the characteristics of biochar-borne dissolved organic matter and its copper binding properties [J]. *B Environ Contam Tox*, 2018, **103**: 1-6
- 37 Wang J, Shi L, Zhang X, Zhao X, Zhong K, Wang S, Zou J, Shen Z, Chen Y. Earthworm activities weaken the immobilizing effect of biochar as amendment for metal polluted soils [J]. *Sci Total Environ*, 2019, **696**: 133729
- 38 Tammeorg P, Parviainen T, Nuutinen V, Simojoki A, Vaara E, Helenius J. Effects of biochar on earthworms in arable soil: avoidance test and field trial in boreal loamy sand [J]. *Agric Ecosyst Environ*, 2014, **191**: 150-157