

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220803002

李哲, 尹勇, 薛琦, 等. 2,4-DCP 对若蚓期、成蚓期赤子爱胜蚓毒性效应研究[J]. 生态毒理学报,2023,18(4): 486-498 Li Z, Yin Y, Xue Q, et al. Toxic effect of 2,4-DCP on *Eisenia fetida* at growth stage and adult stage [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(4): 486-498 (in Chinese)

2,4-DCP 对若蚓期、成蚓期赤子爱胜蚓毒性效应研究

李哲1, 尹勇2, 薛琦2, 汪昱翰1, 苏星1, 张文艺1,*

常州大学环境科学与工程学院,常州 213164
 江苏龙环环境科技有限公司,常州 213031
 收稿日期:2022-08-03 录用日期:2022-10-25

摘要:广泛使用的2,4-二氯酚(2,4-DCP)是一种常见的难降解有机物,在土壤中有一定的残留。为研究其急性毒性效应,分别 以生长阶段为若蚓期、成蚓期的赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为受试生物,采用滤纸接触法和两室趋避试验探讨不同暴露剂 量2,4-DCP 对蚯蚓的急性毒性响应。结果表明,滤纸法测得若蚓期蚯蚓24 h、48 h 和 72 h-LC₅₀ 分别为 80.71、76.20、73.64 μg· cm⁻²,而成蚓期蚯蚓的分别为 82.88、77.63、74.65 μg·cm⁻²,略高于若蚓期;蚯蚓的中毒现象表现为部分环节肿大并渗血、躯体 颜色变透明、躯体萎缩与断节等。两室趋避试验表明,当土壤中2,4-DCP 浓度为 10 mg·kg⁻¹时,清洁土壤中蚯蚓占比高于总数 的 80%,即表现出明显的趋避行为。蚯蚓组织切片显微观察结果表明,70.74 μg·cm⁻²浓度暴露下蚯蚓表皮结构受损,黄色细 胞破裂,而 88.42 μg·cm⁻²浓度暴露下蚯蚓表皮严重溃烂坏死,纵肌细胞间隙扩大,黄色细胞和肠上皮细胞发生破裂、变性并与 肠壁分离;滤纸法暴露 24 h 时,蚯蚓体内蛋白质含量、SOD 活性和 CAT 活性随 2,4-DCP 暴露剂量呈现先上升后降低趋势,表 现出较明显的低剂量刺激和高剂量抑制效应;低浓度 2,4-DCP 胁迫下,若蚓体内的蛋白质含量、SOD 活性和 CAT 活性显著高 于成蚓;长时间高浓度暴露下的若蚓体内 SOD 活性、CAT 活性几乎均低于成蚓。蚯蚓在若蚓期、成蚓期这 2 个生长阶段 对 2,4-DCP 表现出不同的应激效应,其耐受能力也存在差异。 关键词: 2,4-DCP;赤子爱胜蚓;急性毒性;酶活性;组织病理学

文章编号:1673-5897(2023)4-486-13 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

Toxic Effect of 2, 4-DCP on *Eisenia fetida* at Growth Stage and Adult Stage

Li Zhe¹, Yin Yong², Xue Qi², Wang Yuhan¹, Su Xing¹, Zhang Wenyi^{1,*} 1. School of Environmental Science and Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China 2. Jiangsu LongHuan Environmental Technology Co. Ltd, Changzhou 213031, China **Received** 3 August 2022 accepted 25 October 2022

Abstract: The widely used 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) is a common refractory organic material and has some residuals in the soil. To investigate its acute toxic effect, *Eisenia fetida*, which was at the growth and adult stages of development, was taken as the test organism, and the acute toxic response of earthworms to 2,4-DCP at different doses of exposure was investigated by means of the filter paper contact method and the two-compartment avoid-ance test. The results showed that the LC₅₀ measured by filter paper method was 80.71, 76.20, 73.64 μ g·cm⁻² re-

基金项目:常州滨江化工园区场地污染形成机制与沿江搬迁化工场地污染管控体系科技示范项目(CE20215010)

第一作者:李哲(1998—),男,硕士研究生,研究方向为生态毒理学,E-mail: 1060317113@qq.com

^{*} 通信作者(Corresponding author), E-mail: zwy@cczu.edu.cn

spectively at 24, 48 and 72 h at growth stage, and 82.88, 77.63, 74.65 μ g·cm⁻² respectively at adult stage, which was slightly higher than that at growth stage. In the earthworm poisoning phenomenon, some of the links are swollen and bleeding, the color of the body becoming transparent, the body shrink, and the broken segments. In the two-compartment avoidance test, when the concentration of 2,4-DCP in the soil was 10 mg \cdot kg⁻¹, the earthworm comprised more than 80% of the total number in the clean soil that exhibited significant avoidance behavior. In 70.74 μ g·cm⁻² concentration group, earthworm epidermis structure damaged, chloragogenous tissue ruptured, while in 88.42 μ g·cm⁻² concentration group, earthworm epidermis was severely ulcerated and necrotic, the cellular lacunae widened in the longitudinal muscles, and the chloragogenous tissue and intestinal epithelial cells ruptured, degenerated, and separated from the intestinal walls. In earthworms, protein content, SOD activity, and CAT activity initially increased and then decreased with 2,4-DCP exposure dose during 24 h exposure by the filter paper method, showing a significant low-dose stimulation and high-dose inhibition effect. The protein content, SOD activity, and CAT activity of growing earthworms under low-concentration 2,4-DCP stress were significantly greater than those of adults. Under long-term exposure to high concentrations, the activity of SOD and CAT in the growing-stage earthworm body is almost less than that of adult earthworms. Earthworms have been shown to have different response to stress of 2,4-DCP in the growth and adult stages, and their tolerance is also different. Keywords: 2,4-DCP; Eisenia fetida; acute toxicity; enzymatic activity; histopathology

2,4-二氯酚(2,4-DCP)是典型的酚类污染物,被 广泛运用于农药、印染、石油化工、炼油、医药、机械 制造和有机合成等诸多行业^[1-2]。作为农业用除草 剂或由于工业生产过程中储存、处置不善,2,4-DCP 会通过废水、泄漏、大气沉降等途径进入环境中^[3]。 2,4-DCP 具有很强的毒性,进入环境后会对动、植物 造成不同强烈的毒害作用,由于其在水和土壤中半 衰期长,难以被降解,易在机体中累积,直接或间接 地影响人类健康^[4-5]。

蚯蚓作为一种生物量大的无脊椎动物,在自然 净化中起关键因素^[6],其取食、排泄等生理活动对土 壤中有机质的分解和矿化循环起重要作用,有"土 壤生态工程师"的美誉^[7]。蚯蚓是一种对外来污染 物敏感的生物^[8-9],体内的抗氧化酶活性和蛋白质等 指标可及时反映各种化学品(重金属、有机物)的毒 性效应,故具有评价土壤污染生态毒理的作用^[10-11]。

有关重金属及有机物对蚯蚓的毒性效应已有很 多研究^[12-13],但因蚯蚓大小、蚯蚓种类及测试方法不 同,结果也存在差异。自然界中,由于生物处于不同 年龄,其对污染物的敏感程度也不同。王勤等^[14]调 查了白纹伊蚊对常用杀虫剂的抗性,结果表明各地 白纹伊蚊幼虫对杀虫剂很敏感,而白纹伊蚊成蚊则 具有不同程度的抗药性;黄轶等^[15]在研究生态毒性 数据质量评估时提出,以鱼和虫为试验对象时,幼鱼 和幼虫通常对环境更敏感,而这在对蚯蚓的相关研 究中鲜有报道。本研究采用滤纸接触法和两室趋避 试验,揭示2,4-DCP 对赤子爱胜蚓(若蚓期、成蚓期) 2个生长阶段的毒性效应,可为深入研究2,4-DCP 对蚯蚓及其生物生态系统的影响提供理论依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 供试蚯蚓和试剂

试验蚯蚓为赤子爱胜蚓(Eisenia fetida),购自河 南石家庄某蚯蚓养殖场,于温度(23±2)℃、空气湿 度70%、光暗比12h:12h的实验室条件预驯养14 d后,挑选色泽红润、活力强的蚯蚓,以无明显生殖 环的蚯蚓为若蚓组,体质量为150~250mg;有明显 生殖环的蚯蚓为成蚓组,体质量350~500mg,分别 代表蚯蚓生长过程的2个重要阶段(图1)。2,4-DCP (CAS号120-83-2,纯度99.5%)由润友化学有限公司



图 1 赤子爱胜蚓若蚓组 150~250 mg(a)和 成蚓组 350~500 mg(b) g. 1 *Fisania fatida* 150、250 mg in the growth sta

Fig. 1 *Eisenia fetida* 150 ~ 250 mg in the growth stage earthworms group (a) and 350 ~ 500 mg in the adult stage earthworms group (b)

提供,为白色结晶性粉末,分子式 C₆H₄Cl₂O。试验 所用丙酮等试剂均为分析纯。

1.2 供试土壤

土壤采集于常州市滨江化工园区无污染的林地,去除石子树枝等杂物后自然风干,过10目筛备用。经测定,该土壤 pH 为7.52±0.17,有机质含量(17.69±1.08) g·kg⁻¹,其中未检出2,4-DCP。

1.3 试验方法

1.3.1 蚯蚓清肠

将蚯蚓放于培养皿中,清水洗去表皮泥土及排 泄物,纱布擦干多余水分。随后将蚯蚓置于经蒸馏 水打湿的滤纸上,黑暗环境下清肠1d。

1.3.2 滤纸法染毒及 2,4-DCP 浓度设计

滤纸染毒参考 OECD No.207 方法[16],称 0.5 g 的 2,4-DCP 溶于 40 mL 丙酮中制成 12.5 g·L⁻¹的 2,4-DCP 丙酮溶液,取若干直径 9 cm 培养皿,用移 液枪吸取 4 mL 丙酮于各培养皿中,再分别吸取 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 μL 的2,4-DCP丙酮溶液于各培养皿中,即得70.74、 72.95,75.16,77.37,79.58,81.79,84.00,86.21,88.42, 90.63 µg·cm⁻²这 10 个浓度梯度(空白对照组不添 加),放入裁剪好的滤纸使其刚好浸泡在培养皿底 部。考虑 2,4-DCP 具有挥发性,待丙酮挥发完全后 即在每个培养皿中滴加4 mL 蒸馏水以保持滤纸完 全湿润,随后于培养皿中投加5条若蚓期或成蚓期 的蚯蚓,用带小孔的塑料薄膜封住,橡皮筋固定,放 于温度(23±2)℃、空气湿度70%、黑暗的培养箱中, 每组试验3个平行,24、48和72h观察蚯蚓状态及 死亡情况,若针头刺激蚯蚓头部和尾部均无反应则 认定死亡。

1.3.3 土壤染毒和两室趋避试验设计

土壤染毒方法参考 OECD No.222 方法^[17]:取 600 g风干后的土壤于若干带盖塑料盒中,分别吸 取 96、240、480、720、960、1 200 μL 浓度为 12.5 g・ L⁻¹的 2,4-DCP 丙酮溶液于各塑料盒中土壤表面,待 丙酮挥发后通过搅拌和盖上盖子摇晃的方式使土壤 与 2,4-DCP 混合均匀,即得浓度为 2、5、10、15、20、 25 mg·kg⁻¹的 2,4-DCP 污染土壤。

两室趋避试验参考 ISO 17512-1 方法^[18]:取长 16.5 cm、宽 11.9 cm、高 6.2 cm 的带盖塑料盒,于塑 料盒中间插入一厚度 0.5 cm 隔板,两侧分别放入清 洁土壤和不同浓度 2,4-DCP 染毒土壤 600 g,控制含 水率为 35% 后抽出隔板并投 12 条蚯蚓于原隔板处

缝隙中,盖上盖子防止蚯蚓逃逸,在盖子上扎若干2 mm 左右孔洞以保持通风,48 h 后计算两侧的蚯蚓 个数,处于原先隔板处的蚯蚓按半条计算,每组试验 设3个平行。

1.3.4 蚯蚓组织切片制备

根据试验过程中所观察的蚯蚓形态学变化,采 用苏木精-伊红染色制备蚯蚓组织切片以观察 70.74 μg·cm⁻²和 88.42 μg·cm⁻²浓度下滤纸法暴露 24 h 时蚯蚓表皮和肠道细胞变化。具体操作为:蚯蚓用 0.86%(*m*:*V*)NaCl 溶液冲洗后,放于培养皿中,加入 少量蒸馏水,滴入无水乙醇麻痹蚯蚓后,将蚯蚓拉直 放于滤纸上,吸干表面水分用刀片于生殖环后1 cm 处切取 0.5 cm 放于 10%(*V*:*V*)福尔马林溶液中固 定 24 h。在自动脱水机中脱水后,石蜡包埋,切片机 切成 5 μm 左右切片,在 200 倍数光学显微镜(Axio-Vert.A1)下观察组织变化情况。

1.3.5 蚯蚓体内蛋白质含量、SOD 活性、CAT 活性 测定

通过计算得出半致死浓度(LC₅₀)后,于亚致死 浓度13.26、26.52、39.79、53.05、66.32 µg·cm⁻²条件 下,分别于24、48 和72 h 对蚯蚓进行蛋白质含量、 SOD 活性和 CAT 活性测定,测定均采用南京建成 提供的试剂盒。在生化分析之前,先用蒸馏水清洗 蚯蚓表面。加入蚯蚓质量9倍体积的0.86%(*m*:*V*) NaCl 溶液,于4℃下搅碎。随后将匀浆液以4000 r ·min⁻¹离心10 min。保留上清液以测定蛋白质含 量、SOD 活性和 CAT 活性,酶活性单位为 U·mg⁻¹, 以单位蛋白质量计。

1.3.6 数据处理

使用 SPSS 27.0 软件对实验数据进行统计分析。采用 Probit 概率单位回归法算出各浓度梯度及时间下 2,4-DCP 对蚯蚓的 LC₅₀ 值和置信区间。数 值以平均数±标准差呈现,对同一时间不同浓度梯 度暴露下蚯蚓各项生物指标进行单因素方差分析 (ANOVA),若有显著差异则进行 LSD 多重比较来检 验组间差异显著性, P<0.05、P<0.01 表示差异显著。 统计图均由 Origin 2022 软件绘制。

2 结果(Results)

2.1 2,4-DCP 对蚯蚓的急性毒性

各浓度梯度下若蚓、成蚓死亡情况数据分别见 表1、表2。

将表1、表2数据使用 SPSS 27.0 中 Probit 程序

进行回归性分析,结果如表 3 所示。当 2,4-DCP 浓 度为 70.74 μg·cm⁻²时,24 h 内蚯蚓均无死亡现象, 48 h 时发现若蚓期蚯蚓出现个别死亡现象。随 着 2,4-DCP 浓度的升高,蚯蚓的死亡率逐渐上升,当 浓度高于 88.42 μg·cm⁻²时,24 h 后几乎无存活蚯 蚓。由 SPSS 软件算出,若蚓期蚯蚓 24 h、48 h、72 h 的 LC₅₀ 分别为 80.71、76.20、73.64 μg·cm⁻²,成蚓期 蚯蚓 24 h、48 h、72 h 的 LC₅₀ 分别为 82.88、77.63、 74.65 μg·cm⁻²,略高于若蚓期,表明蚯蚓在不同生 长阶段对 2,4-DCP 的耐受度略有差异。

					0	U							
	浓度/(µg·cm ⁻²) Concentration/(µg·cm ⁻²)	24 h 死亡数 24 h death number		48 h 死亡数 48 h death number			72 h 死亡数 72 h death number			死亡率/%			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	_	Mortality/%	0
	СК	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	68.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	70.74	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	6.67	6.67
	72.95	0	0	0	1	2	1	1	3	3	0	26.67	46.67
	75.16	1	1	2	1	2	3	3	4	5	26.67	40	80
	77.37	2	1	1	3	4	3	4	4	5	26.67	66.67	86.67
	79.58	2	4	3	3	4	4	5	5	5	60	73.33	100
	81.79	3	2	1	5	5	3	5	5	5	40	86.67	100
	84.00	2	4	3	5	5	5	5	5	5	60	100	100
	86.21	3	4	5	5	5	5	5	5	5	80	100	100
	88.42	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100	100	100

	表1 2,4-DCP 滤纸接触法若蚓死亡情况
Table 1	Death of earthworms of growth stage by 2,4-DCP filter paper contact method

注:CK为空白对照组,2,4-DCP表示2,4-二氯酚。

Note: CK is the blank control group, and 2,4-DCP stands for 2,4-dichlorophenol.

浓度/(µg·cm ⁻²)	24 h 死亡数 24 h death number		48 h 死亡数 48 h death number			72 h 死亡数 72 h death number			死亡率/%			
Concentration/($\mu g \cdot cm^{-2}$)	1	2	3	1	2	3	1	2	3		Mortanty/70)
СК	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70.74	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6.67
72.95	0	0	0	1	1	2	1	3	2	0	26.67	40
75.16	1	0	1	2	2	3	4	2	5	13.33	46.67	73.33
77.37	2	1	1	3	2	2	3	5	3	26.67	46.67	73.33
79.58	1	1	2	2	3	3	4	4	4	26.67	53.33	80
81.79	2	3	3	3	5	3	5	5	5	53.33	73.33	100
84.00	2	3	2	4	4	5	5	5	5	46.67	86.67	100
86.21	3	4	4	5	4	5	5	5	5	73.33	93.33	100
88.42	3	2	5	5	5	5	5	5	5	66.67	100	100
90.63	4	5	4	5	5	5	5	5	5	86.67	100	100
92.84	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100	100	100

表 2 2,4-DCP 滤纸接触法成蚓死亡情况

Table 2 D	Death of	earthworms	of a	dult s	stage 1	by 2	,4-DCP	filter	paper	contact	method
-----------	----------	------------	------	--------	---------	------	--------	--------	-------	---------	--------

注:CK 为空白对照组。

Note: CK is the blank control group.

如图 2 所示,随着 2,4-DCP 浓度升高,蚯蚓接触 滤纸的反应产生显著变化。空白对照组(图 2(a))中, 蚯蚓未发生中毒和死亡现象; 2,4-DCP 暴露浓度为 70.74~75.16 μg·cm⁻²时,虽蚯蚓无明显死亡现象, 但滤纸周围出现可见的黄色液体,个别蚯蚓出现浮 肿现象(图 2(b)),且蚯蚓多出现在滤纸边缘和底部, 具有明显逃避行为(图 2(c));当 2,4-DCP 浓度为 77.37~79.58 μg·cm⁻²时,蚯蚓出现蜷缩现象(图 2 (d)),并且死亡数目明显增多; 当浓度为 81.79~ 86.21 μg·cm⁻²时蚯蚓出现部分环节肿大、躯体颜色 变透明、躯体萎缩、断节等现象并大幅度出现死亡 (图 2(e)、图 2(f));当浓度达到 88.42~92.48 μg·cm⁻² 时基本均出现生殖环等环节肿大并渗血现象且死亡 时间显著缩短(图 2(g));试验还发现当 2,4-DCP 暴露 浓度高于 92.84 μg·cm⁻²时,蚯蚓的反应为不停扭动 并排出大量黄色液体后死亡(图 2(h))。

2.2 蚯蚓对 2,4-DCP 污染土壤的趋避效应

两室趋避性试验结果如图 3 所示,由图 3 可知, 若蚓和成蚓对试验中各浓度 2,4-DCP 污染土壤的趋 避性结果无明显差异。空白对照组中,两室均为清 洁土壤,设定此时蚯蚓于两室土壤中分布均匀。随 着污染土壤中 2,4-DCP 浓度升高,清洁土壤中蚯蚓

表 3 滤纸接触法测得 2,4-DCP 对若蚓和成蚓的 LC50

Table 3 LC_{50} of 2,4-DCP on growth and adult stage earthworm measured by filter paper contact method

阶段 Stage	接触时间/h Contact time/h	毒性回归方程 Toxicity regression equations	卡方值 Chi- square	显著性 Sig.	LC ₅₀ (95% 置信限)/(µg·cm ⁻²) LC ₅₀ (95% CL)/(µg·cm ⁻²)
若蚓	24	<i>Y</i> =32.841 <i>x</i> -62.626	3.062	0.801	80.712(77.735 ~ 83.860)
Growth stage	48	<i>Y</i> =43.829 <i>x</i> -82.484	0.709	0.994	76.196(73.882 ~78.482)
earthworms	72	<i>Y</i> =72.249 <i>x</i> -134.896	0.880	0.927	73.636(71.692 ~75.407)
成蚓	24	Y = 29.619x - 56.822	1.917	0.983	82.881(79.926 ~ 85.929)
Adult stage	48	Y = 33.204 x - 62.757	1.663	0.976	77.630(74.593 ~ 80.195)
earthworms	72	<i>Y</i> =48.936 <i>x</i> -91.659	2.137	0.830	74.650(72.316 ~76.759)



图 2 2,4-DCP 滤纸接触法蚯蚓中毒现象照片

注:(a) 空白对照组(即正常的蚯蚓);(b), (c) 70.74~75.16 µg·cm⁻²浓度组;(d) 77.37~79.58 µg·cm⁻²浓度组;(e),

(f) 81.79~86.21 μg·cm⁻²浓度组;(g) 88.42~92.84 μg·cm⁻²浓度组;(h) 92.84 μg·cm⁻²以上浓度组。

Fig. 2 Photos of earthworm poisoning by 2,4-DCP filter paper contact method

Note: (a) CK; (b), (c) $70.74 \sim 75.16 \ \mu g \cdot cm^{-2}$ concentration group; (d) $77.37 \sim 79.58 \ \mu g \cdot cm^{-2}$ concentration group; (e), (f) $81.79 \sim 86.21 \ \mu g \cdot cm^{-2}$ concentration group; (g) $88.42 \sim 92.84 \ \mu g \cdot cm^{-2}$ concentration group; (h) $92.84 \ \mu g \cdot cm^{-2}$ above concentration group.





Fig. 3 The repellency of growth stage earthworms (a) and adult stage earthworms (b) from soils contaminated by 2,4-DCP at different concentrations



图 4 蚯蚓表皮和肠道细胞组织变化图

注:(a), (d) 空白对照组(即正常的蚯蚓体壁和肠道结构);(b), (e) 70.74 μg·cm⁻²浓度暴露 24 h 蚯蚓表皮和肠道结构;(c), (f) 88.42 μg·cm⁻² 浓度暴露 24 h 蚯蚓表皮和肠道结构;EP 表示表皮,CM 表示环肌,LM 表示纵肌,IE 表示肠上皮细胞,CT 表示黄色细胞。

Fig. 4 Changes in the epidermis and intestinal cells of earthworms

Note: (a), (d) The body wall and intestinal structure of earthworm in CK; (b), (e) Epidermis and intestinal structure of earworms exposed to 70.74 μg·cm⁻² for 24 h; (c), (f) Epidermis and intestinal structure of earworms exposed to 88.42 μg·cm⁻² for 24 h; EP means epidermis; CM means circular muscle; LM means longitudinal muscle; IE means intestinal epithelium; CT means chloragogenous tissue.

的占比逐渐增大,蚯蚓的趋避性越明显。污染土壤 中2,4-DCP浓度达到10 mg·kg⁻¹时,处于清洁土壤 中的蚯蚓数目达到投放总数的80%。于15 mg· kg⁻¹及以上浓度的2,4-DCP污染土壤中,也可观察 到少数蚯蚓,其大多出现在原先隔板的缝隙处和污 染土壤中靠近原先隔板处的土壤表面,并具有和滤 纸法染毒相似的中毒症状。

2.3 2,4-DCP 对蚯蚓细胞组织的影响 暴露于 2,4-DCP 中的蚯蚓体壁和肠道组织细胞 结构变化见图 4。如图 4(a)和图 4(d)所示,空白对照 组中蚯蚓体壁和肠道组织细胞具有规则和完整的细 胞结构。如图 4(b)和图 4(c)所示,暴露于 70.74 µg· cm⁻²和 88.42 µg·cm⁻²浓度下 24 h 蚯蚓体壁组织细 胞结构,与空白对照组相比,蚯蚓表皮受损,结构完 整性消失,部分环肌出现细胞形态和肌纤维组织的 消失和坏死,细胞间隙扩大,在纵肌也观察到相同变 化,但环肌和纵肌变化均不明显(图 4(b))。如图 4(c) 所示,蚯蚓表皮出现严重的溃烂和坏死,部分部位的 上皮细胞近乎完全分解,与空白对照组比较,其表 皮、纵肌的组织和染色特征均有显著变化,大面积坏 死,横肌萎缩,纵肌出现大量空隙,结构完整性发生 彻底变化。同时,如图4(e)和图4(f)所示,蚯蚓的黄 色细胞和肠上皮组织也发生了组织病理学变化。在 暴露于70.74 µg·cm⁻²和88.42 µg·cm⁻²浓度下24 h 蚯蚓肠道组织细胞结构变化图中,可以观察到黄色细 胞发生明显破损,细胞开始破裂并失去形状,但肠上 皮细胞未受明显影响(图4(e))。随着浓度的升高,黄 色细胞和肠上皮细胞均出现坏死迹象,且与空白对照 组相比,黄色细胞和肠上皮细胞彻底变性,肠上皮细 胞几乎完全坏死,绒毛变疏松并与肠壁分离(图4(f))。 2.4 2,4-DCP 对蚯蚓体内蛋白质含量的影响

如图 5 所示,各浓度 2,4-DCP 暴露下,若蚓期和 成蚓期蚯蚓接触滤纸 24 h时,其体内的蛋白质含量 均高于空白对照组,随浓度增加呈现先上升后降低 的趋势,且均于 39.79 µg·cm⁻²浓度达到峰值,与空 白对照组具有显著差异(*P*<0.01);低浓度(13.26 µg· cm⁻²、26.52 µg·cm⁻²)暴露下,若蚓体内蛋白质含量 高于成蚓,可见在试验前 24 h内若蚓比成蚓对低浓 度 2,4-DCP 表现更敏感。48 h和 72 h蚯蚓体内的 蛋白质含量随浓度增加无明显规律性,同一浓度下 24、48 和 72 h之间差异随着浓度升高而增大,中、高 浓度(39.79 µg·cm⁻²、53.05 µg·cm⁻²)暴露下其变化 幅度明显高于低浓度。

2.5 2,4-DCP 对蚯蚓体内 SOD 活性的影响 试验期间蚯蚓体内 SOD 活性变化见图 6。如 图 6(a)所示,3 个时间段若蚓体内 SOD 活性随浓度 升高均呈现出先上升后下降的趋势。24 h 时,低浓 度(13.26 µg·cm⁻²、26.52 µg·cm⁻²)暴露下,若蚓体内 SOD 活性显著高于空白对照组(P<0.05),而高浓度 (53.05 µg·cm⁻²、66.32 µg·cm⁻²)则显著低于空白对 照组(P<0.01),表现出明显的低剂量刺激和高剂量抑 制效应。随着暴露时间的延长,各浓度下蚯蚓体内 SOD 活性总体呈现下降趋势。成蚓体内 SOD 活性 变化见图 6(b),其总体变化规律与若蚓相似,暴露 于 13.26 µg·cm⁻²和 39.79 µg·cm⁻²浓度下 24 h 时,若蚓体内 SOD 活性高于成蚓,而高浓度(53.05 µg·cm⁻²、66.32 µg·cm⁻²)暴露下各时间段却均低 于成蚓。

2.6 2,4-DCP 对蚯蚓体内 CAT 活性的影响

由图 7 可知,各浓度 2,4-DCP 暴露下,蚯蚓体内 CAT 活性基本均高于空白对照组,表明 2,4-DCP 激 发了蚯蚓体内的 CAT 活性。同浓度梯度下,48 h 时 CAT 活性均高于 24 h,而 48 h 后大多有所下降。若 蚓体内 CAT 活性变化如图 7(a)所示,试验的 3 个时 间段若蚓体内 CAT 活性随浓度升高均呈现先上升后 降低趋势,24 h 于 53.05 μg·cm⁻²达到峰值,而 48 h 和 72 h 于 39.79 μg·cm⁻²处达到峰值,均与空白对照组 具有显著差异(*P*<0.01)。成蚓体内 CAT 活性变化如 图 7(b)所示,其各时间段变化趋势与若蚓相似,24 h 成蚓体内 CAT 活性达到峰值处的 2,4-DCP 浓度与 若蚓相同,但 48 h 和 72 h 达到峰值处浓度高于若 蚓,为 53.05 μg·cm⁻²。



图 5 若蚓(a)和成蚓(b)体内蛋白质含量的变化

注:与对照组相比差异显著,*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。

Fig. 5 Changes of protein content in growth stage earthworms (a) and adult stage earthworms (b)

Note: Compare with the control, there is significant difference; * represents P<0.05, and * * represents P<0.01.





注:与对照组相比差异显著,*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。

Fig. 6 Changes of SOD content in growth stage earthworms (a) and adult stage earthworms (b) Note: Compare with the control, there is significant difference; * represents P < 0.05, and ** represents P < 0.01.



图 7 若蚓(a)和成蚓(b)体内 CAT 活性变化



Fig. 7 Changes of CAT content in growth stage earthworms (a) and adult stage earthworms (b) Note: Compare with the control, there is significant difference; * represents P < 0.05, and * * represents P < 0.01.

3 讨论(Discussion)

2,4-DCP 作为农药、除草剂和杀虫剂的主要合成原料之一,在我国被广泛使用,已普遍存在于农业 土壤和自然水体中。Fan 等^[19]和 Gao 等^[20]对近几年 来我国地表水 2,4-DCP 的污染状况进行了调查,其 中 2,4-DCP 在黄河、淮河和海河等流域中被频繁发 现,具有不容忽视的潜在健康风险。目前,已有较多 文献报道了 2,4-DCP 对水生动物的毒性效应, Tsukazawa 等^[21]的研究表明,斑马鱼幼鱼暴露于 2,4-DCP 浓度为 2.5 mg·L⁻¹的水体中 5 d 时,可观察到 脂质积累和 ROS 诱导;Hu 等^[22]发现,2,4-DCP 可通 过干扰性激素合成来诱导鱼类雌性化。但目前关于 2,4-DCP 对土壤环境中生物的影响却鲜有报道,蚯 蚓作为评价土壤环境的指示生物,其表现出的毒性 效应对 2,4-DCP 污染的早期预警和生态危险评估具 有重要作用。

本研究采用滤纸接触法和两室趋避试验观察了 2,4-DCP 对若蚓期和成蚓期 2 个生长阶段赤子爱胜 蚓的毒性效应。滤纸接触法可使蚯蚓与滤纸上的污 染物直接接触,从而快速、准确地评估出毒物对细胞 的毒性效应^[23]。两室趋避试验则可以灵敏地反映出 蚯蚓对污染物的趋避响应,已广泛用于各种土壤污 染评估中。

蚯蚓的很多感官细胞对化学刺激非常敏感,在 滤纸接触试验中,污染物附着在滤纸的表面,并经由 蚯蚓的皮肤进入体腔,被输送至躯体的各个部位,从 而引起中毒^[24]。试验过程中,随着 2,4-DCP 浓度的 增加,蚯蚓出现了浮肿、蜷缩、生殖环等部分环节肿 大并渗血、躯体萎缩、断节、黄色液体渗出和躯体颜 色变透明等现象。主要原因为 2,4-DCP 在与蚯蚓皮 肤接触后,与体腔内的细胞发生交互作用,从而产生 上述现象。蚯蚓流出的黄色液体和血水,很有可能 是体腔液中的一种成分,受到污染物刺激后,从角质 膜的小孔中排出,浮肿、蜷曲等反应都是蚯蚓对抗外 来污染物的自身防御机制^[25]。

蚯蚓与潜在的致命和非致命源接触时,会产生 巴普洛夫条件反射,从而避免污染,这就是所谓的 "趋避"[26]。土壤生态风险评价中,蚯蚓对污染物的 趋避效应较于急性毒性更为敏感,可快速诊断环境 风险[27]。相关研究表明,趋避实验中,若清洁土壤中 的蚯蚓数高于投加总数的80%,即趋避行为明显, 该污染浓度下不宜蚯蚓生存^[28]。本次两室趋避实验 中,当土壤中2,4-DCP浓度达到10 mg·kg⁻¹时,清洁 土壤中若蚓和成蚓的比例均高于80%,即表现出明 显的趋避行为;蚯蚓接触到各浓度 2,4-DCP 污染土 壤的48h内,做出了不同程度的趋避响应,土壤中 2,4-DCP浓度越高,蚯蚓的趋避性越强;若蚓和成蚓 对各浓度2,4-DCP的趋避性结果无明显差异,但试 验过程中发现,48 h 后于高浓度梯度下(20 mg· kg^{-1} 、25 mg·kg⁻¹),隔板缝隙处仍然存在一些蚯蚓, 其中若蚓较多,导致高浓度梯度下若蚓趋避性小于 成蚓。此现象表明,若蚓趋避恶劣环境及生存能力 可能不及成蚓。

近年来,蚯蚓的组织病理学改变在毒理学中的 应用日益广泛。组织细胞的改变依赖于机体对损伤 的修复能力、污染物的性质以及接触的持续时间^[29]。 表皮是抵抗外界污染的首要防线,一旦上皮细胞受 到损伤,污染物很可能会堆积在表皮并侵入到生物 的躯体里^[30-31]。本试验中发现,同一时间下,随 2,4-DCP 浓度增加,蚯蚓表皮先于环肌和纵肌发生损 伤,暴露浓度越高,蚯蚓表皮呈现出的损伤越大。目 前已有研究证明,金属对暴露在污染土壤中的蚯蚓 造成损伤,主要是透过表皮并在蚯蚓的环肌和纵肌 中积累^[32-33]。本试验中,70.74 μg·cm⁻²浓度 2,4-DCP 暴露下,蚯蚓表皮观察到明显损伤,环肌和纵 肌变化均不显著,而随浓度升高(88.42 μg·cm⁻²)则 出现蚯蚓表皮丧失完整性结构、环肌萎缩和纵肌处 空隙增多等现象,具有与之相似效应。众所周知,肠 道在吸收消化营养物质和维持蚯蚓足够的生物量方 面起着重要作用,肠组织中的黄色细胞具有排泄功 能,并参与氮代谢,除了可以积累外源物质外,还可储 存糖原和脂肪^[34]。相关研究表明,蚯蚓的黄色细胞不 仅是聚集重金属的主要部位,也可以累积有机污染 物^[35-36],此外,黄色细胞在受到污染物损害后,也会降 低其贮存污染物的能力^[37]。本研究中,随着 2,4-DCP 暴露浓度和时间的增加,蚯蚓的黄色细胞层和肠上皮 细胞均发生明显退化,且高浓度暴露下,黄色细胞和 肠上皮细胞出现松散并脱落的现象,与 Zhang 等^[38] 研究多氯联苯(PCB)暴露下产生的结果相似。

蚯蚓遭受不良因素的迫害后,其躯体的各机能 都会受到损伤,这种情况下,体内会产生一些应激蛋 白,导致体内蛋白质含量增加^[39-40],这也是本试验中 低浓度(13.26 µg·cm⁻²、26.52 µg·cm⁻²)、短时间(24 h)内蚯蚓体内蛋白质增加的原因。本试验中,若蚓 和成蚓体内蛋白质含量于 24 h 时随浓度升高均呈 现出先上升后降低趋势,且低浓度长时间(48 h、72 h)与高浓度(53.05 µg·cm⁻²、66.32 µg·cm⁻²)短时间 处数值相似,表明蚯蚓体内蛋白质受到2,4-DCP影 响具有浓度与时间的综合作用。随着暴露时间的延 长,蚯蚓的许多器官功能受到损害,破坏了体内蛋白 质的合成途径^[40],故各浓度下蚯蚓体内的蛋白质含 量大多随时间呈现出不同程度的下降趋势。而48 h 和72h时各浓度下蚯蚓体内蛋白质含量相较于空 白对照组无明显规律性,且个别浓度下两者差异性 较大,这缘于长时间暴露下蚯蚓机体功能受损,体内 环境紊乱,代谢活动不正常导致^[41-42]。

活性氧(ROS)一般由正常的新陈代谢过程生成,在正常环境中,ROS的生成和消失维持着一个动态的平衡^[43-44]。但是,一旦有机体接触到环境污染,就会破坏这种动态平衡^[45]。SOD是一种在超氧阴离子向 H₂O₂转化过程中起着关键作用的金属酶,是蚯蚓抗御 ROS 的首要防御机制^[46]。图 6 中,低浓度 2,4-DCP 处理 24 h 导致蚯蚓 SOD 活性增加,而高浓度暴露下却抑制了 SOD 活性,表明在低浓度 2,4-DCP 处理 24 h 内,蚯蚓体内的 SOD 能够保护细胞免受 ROS 的损伤,此时蚯蚓体内具有清除 ROS 的能力。随着暴露浓度和时间的增加,蚯蚓体内 SOD 活性显著低于对照组,表现出明显的抑制作

用,表明达到一定浓度或时间,超过了蚯蚓的自我修 复能力,最后被 ROS 破坏,反映出蚯蚓自我修复体 系的缺陷^[47]。经过 SOD 催化超氧阴离子向 H₂O₂ 的转化过程后,H₂O₂等自由基在其他重要酶如 CAT 等的作用下被清除^[48]。CAT 存在于线粒体、过 氧化物酶体和细胞质中,可将 H₂O₂分解为 H₂O 和 O₂^[49]。在本研究中,各浓度下所有时间段 CAT 活性 几乎均高于空白对照组,说明在 2,4-DCP 的诱导下, 蚯蚓体内 CAT 活性呈激活状态。24 h 各浓度下 CAT 活性均低于 48 h,表明 24 h 内蚯蚓所受 2,4-DCP 应激产生的 H₂O₂ 少于 48 h。66.32 μ g·cm⁻², 表明高浓度暴露下 CAT 活性相对受到抑制,与 SOD 变化相似,这缘于此时细胞内存在大量的 H₂O₂,导 致 CAT 的大量消耗和清除能力下降所致^[50]。

本试验中各生物标志物关系如图 8 所示,蚯蚓 与 2,4-DCP 接触后,首先表现出趋避行为,当无法回 避污染时,2,4-DCP 通过蚯蚓的表皮进入到蚯蚓体 内,2,4-DCP 浓度越高,蚯蚓短时间内受到的刺激越 大,这时体内产生大量的 ROS,同时分泌出大量的 应激蛋白以缓解环境压力。为消除体内多余的 ROS,蚯蚓体内的抗氧化酶系统(SOD 和 CAT 等)被 激活,使躯体免受 ROS 的损伤。低水平暴露下 2,4-DCP 引起的氧化应激可被蚯蚓的抗氧化系统平衡 和缓解,但当暴露浓度过高或时间较长时,蚯蚓体内 的抗氧化系统便不足以完全消除大量的 ROS,并受 到抑制,从而造成细胞损伤,使机体的适应性和健康 程度下降,进而引起中毒现象。



图 8 各生物标志物关系图 Fig. 8 Relationship diagram of biomarker

史志明^[51]研究发现,蚯蚓处于不同生长阶段时, 其体内的抗氧化酶系统也存在差异。本研究中,在 低浓度 2,4-DCP 胁迫下,若蚓体内蛋白质含量、SOD 活性和 CAT 活性均高于成蚓,表明较于成蚓,若蚓 体内的抗氧化系统更容易被激活。低浓度长时间暴 露下,若蚓和成蚓的 SOD 活性、CAT 活性与对照组 相比基本无显著差异,表明若蚓和成蚓的抗氧化系 统均可以缓解低浓度 2,4-DCP 胁迫造成的压力。而 在高浓度长时间的 2,4-DCP 胁迫下,若蚓体内 SOD 活性、CAT 活性却低于成蚓,表明若蚓的抗氧化系 统更易受到抑制。同时,由图 7 可知,成蚓于 48 h 和 72 h 体内 CAT 活性达到峰值处 2,4-DCP 浓度均 高于若蚓,峰值处的浓度即为蚯蚓体内 CAT 清除能 力最强时的浓度,而超过该浓度则存在不同程度的 抑制情况,同样可以证实上述观点。两室趋避试验 结果中,虽若蚓和成蚓表现出的趋避性差异不明显, 但面对高浓度 2,4-DCP 污染时,若蚓趋避恶劣环境 及生存能力却不及成蚓。目前,关于若蚓和成蚓及 蚯蚓其他生长阶段的研究尚少。当若蚓和成蚓处于 同一污染环境下,两者受到相同的环境污染胁迫时, 其体内要产生与污染程度相抗衡的解毒机制以避免 躯体受到损伤,由于若蚓体积相对成蚓小以及抗氧 化系统的差异,其体内产生的解毒效应需高于成 蚓,随着污染物浓度和暴露时间的增加,若蚓体内 的解毒机制便先于成蚓达到极限,出现崩盘局面, 从而使若蚓先于成蚓受到污染物的损伤。本试验 数据表明,若蚓期和成蚓期这2个生长阶段的蚯蚓 对2,4-DCP具有不同的应激效应,其耐受能力也存 在差异。

通信作者简介:张文艺(1968—),男,博士,教授,博士生导师, 主要研究方向为污染控制与生态修复。

参考文献(References):

- [1] Dubey M, Kumar R, Srivastava S K, et al. ZnO/α-MnO₂ hybrid 1D nanostructure-based sensor for point-of-care monitoring of chlorinated phenol in drinking water [J]. Materials Today Chemistry, 2022, 26: 101098
- [2] 杨柳,王名威,张耀斌.磁铁矿负载生物炭强化厌氧微 生物处理2,4-二氯苯酚废水[J].化工进展,2022,41(9): 5065-5073

Yang L, Wang M W, Zhang Y B. Magnetite-loaded biochar for enhanced anaerobic microbial treatment of 2,4-dichlorophenol wastewater [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2022, 41(9): 5065-5073 (in Chinese)

- [3] Fernandez M E, del Rosario Morel M, Clebot A C, et al. Effectiveness of a simple biomixture for the adsorption and elimination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide and its metabolite, 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), for a biobed system [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022, 10(1): 106877
- [4] Dubey M, Kumar R, Srivastava S K, et al. Visible light induced photodegradation of chlorinated organic pollutants using highly efficient magnetic Fe₃O₄/TiO₂ nanocomposite [J]. Optik, 2021, 243: 167309
- [5] Prabhu K, Malode S J, Kulkarni R M, et al. Electro-sensing base for hazardous pesticide 2,4-DCP and its quantification in real samples at ZnO@ Cu core-shell nanoparticles in the presence of cationic surfactant [J]. Materials Chemistry and Physics, 2022, 278: 125705
- [6] Zeb A, Li S, Wu J N, et al. Insights into the mechanisms underlying the remediation potential of earthworms in contaminated soil: A critical review of research progress and prospects [J]. The Science of the Total Environment, 2020, 740: 140145
- [7] 邵将,张宗鹏,谢宇震,等. 蚯蚓在生态毒理试验中的应用研究[J]. 农业与技术, 2020, 40(16): 24-26
 Shao J, Zhang Z P, Xie Y Z, et al. Study on the application of earthworm in ecotoxicological experiment [J]. Agriculture and Technology, 2020, 40(16): 24-26 (in Chinese)
- [8] He F L, Wan J Q, Chu S S, et al. Toxic mechanism on phenanthrene-triggered cell apoptosis, genotoxicity, im-

munotoxicity and activity changes of immunity protein in *Eisenia fetida*: Combined analysis at cellular and molecular levels [J]. The Science of the Total Environment, 2022, 819: 153167

- [9] 宋国欣. 现代生物技术在环境监测中的应用探究[J]. 科技风, 2021(18): 125-126
- [10] García-Gómez C, Babín M, García S, et al. Joint effects of zinc oxide nanoparticles and chlorpyrifos on the reproduction and cellular stress responses of the earthworm *Eisenia andrei* [J]. Science of the Total Environment, 2019, 688: 199-207
- [11] 郭佳歲,周世萍,刘守庆,等. 蚯蚓生物标志物在土壤 生态系统监测中的应用研究进展[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(5): 69-81
 Guo J W, Zhou S P, Liu S Q, et al. Advances in applica-

tion of earthworm biomarkers in monitoring soil ecosystem [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(5): 69-81 (in Chinese)

- [12] Tang W T, Wang G Y, Zhang S R, et al. Physiochemical responses of earthworms (*Eisenia fetida*) under exposure to lanthanum and cerium alone or in combination in artificial and contaminated soils [J]. Environmental Pollution, 2022, 296: 118766
- [13] Wu R L, Zhou T T, Wang J, et al. Oxidative stress and DNA damage induced by trifloxystrobin on earthworms (*Eisenia fetida*) in two soils [J]. Science of the Total Environment, 2021, 797: 149004
- [14] 王勤,侯春霞,程亚媛,等. 茂名市白纹伊蚊对常用杀 虫剂的抗性调查[J]. 中华卫生杀虫药械, 2021, 27(4): 318-320
 Wang Q, Hou C X, Cheng Y Y, et al. Resistance of *Aedes albopictus* to the commonly used insecticides in Maoming

City [J]. Chinese Journal of Hygienic Insecticides & Equipments, 2021, 27(4): 318-320 (in Chinese)

- [15] 黄轶, 闫振广, 张天旭, 等. 我国水质基准制定中生态 毒性数据质量评估方法研究[J]. 环境工程技术学报, 2021, 11(1): 122-128
 Huang Y, Yan Z G, Zhang T X, et al. Evaluation method of ecotoxicity data quality for deriving water quality criteria in China [J]. Journal of Environmental Engineering Technology, 2021, 11(1): 122-128 (in Chinese)
- [16] Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals No.207, Earthworm Acute Toxicity Tests [S]. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 1984
- [17] Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals No 222, Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/andrei*) [S]. Paris:

Organization for Economic Co-operation and Development, 2016

- [18] International Organization for Standardization. Draft: Soil Quality-Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behaviour-Part 1: Test with Earthworms (*Eisenia fetida/andrei*) [S]. Geneva: International Organization for Standardization, 2008
- [19] Fan B, Wang X N, Xie Z Y, et al. Aquatic life criteria & human health ambient water quality criteria derivations and probabilistic risk assessments of 7 benzenes in China [J]. Chemosphere, 2021, 274: 129784
- [20] Gao J J, Liu L H, Liu X R, et al. Levels and spatial distribution of chlorophenols - 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, and pentachlorophenol in surface water of China [J]. Chemosphere, 2008, 71(6): 1181-1187
- [21] Tsukazawa K S, Li L, Tse W K F. 2,4-dichlorophenol exposure induces lipid accumulation and reactive oxygen species formation in zebrafish embryos [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 230: 113133
- [22] Hu Y, Li D, Ma X, et al. Effects of 2,4-dichlorophenol exposure on zebrafish: Implications for the sex hormone synthesis [J]. Aquatic Toxicology, 2021, 236: 105868
- [23] Zhang L J, Hu C W, Wang W L, et al. Acute toxicity of multi-walled carbon nanotubes, sodium pentachlorophenate, and their complex on earthworm *Eisenia fetida* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 103: 29-35
- [24] Jeyaprakasam A, Muniyandi B, James A J P, et al. Assessment of earthworm diversity and pesticide toxicity in *Eudrilus eugeniae* [J]. Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 2021, 3: 23-30
- [25] Duo L, Wang Y L, Zhao S L. Individual and histopathological responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to graphene oxide exposure [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 229: 113076
- [26] 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
- [27] 刘嫦娥, 孟祥怀, 秦媛儒, 等. 乙草胺胁迫下蚯蚓活动 对土壤-作物系统影响研究[J]. 环境生态学, 2020, 2 (12): 8-14
 Liu C E, Meng X H, Qin Y R, et al. Effects of acetochlor stress on soil-crop system in the presence of *Eisenia foetida* [J]. Environmental Ecology, 2020, 2(12): 8-14 (in Chinese)
- [28] 李芬,林雪儿,黄慧雯,等. 探究蚯蚓对食用油污染土 壤的回避行为[J]. 中学生物教学, 2020(23): 67-69
 Li F, Lin X E, Huang H W, et al. Explore the avoidance

behavior of earthworms to edible oil contaminated soil [J]. Teaching of Middle School Biology, 2020(23): 67-69 (in Chinese)

- [29] Haschek W M, Rousseaux C G, Wallig M A, et al. Chapter 1-Toxicologic Pathology: An Introduction [M]//Haschek W M, Rousseaux C G, Wallig M A, et al. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Fourth Edition). Academic Press. 2022: 1-12
- [30] Adeel M, Shakoor N, Hussain T, et al. Bio-interaction of nano and bulk lanthanum and ytterbium oxides in soil system: Biochemical, genetic, and histopathological effects on *Eisenia fetida* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 415: 125574
- [31] Shi Y J, Shi Y J, Zheng L S. Individual and cellular responses of earthworms (*Eisenia fetida*) to endosulfan at environmentally related concentrations [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2020, 74: 103299
- [32] Wang G H, Xia X Q, Yang J, et al. Exploring the bioavailability of nickel in a soil system: Physiological and histopathological toxicity study to the earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 383: 121169
- [33] Adeel M, Ma C X, Ullah S, et al. Exposure to nickel oxide nanoparticles insinuates physiological, ultrastructural and oxidative damage: A life cycle study on *Eisenia fetida* [J]. Environmental Pollution, 2019, 254: 113032
- [34] 杨斌,徐阳,段睿洁,等. 氯氰菊酯对蚯蚓处理蔬菜废 弃物过程中的毒性效应研究[J]. 云南农业大学学报(自 然科学), 2021, 36(4): 640-647

Yang B, Xu Y, Duan R J, et al. Study on the toxic effect of cypermethrin on using earthworm to treat vegetable waste [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2021, 36(4): 640-647 (in Chinese)

- [35] Giovanetti A, Fesenko S, Cozzella M L, 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
- [36] Gautam K, Seth M, Dwivedi S, et al. Soil degradation kinetics of oxybenzone (benzophenone-3) and toxicopathological assessment in the earthworm, *Eisenia fetida* [J]. Environmental Research, 2022, 213: 113689
- [37] 段晓尘. 重金属和有机污染物对赤子爱胜蚓(Eisenia fetida)的生态毒理效应及机制差异[D]. 南京: 南京农业 大学, 2015: 76-78

Duan X C. Ecotoxicological effects and different mechanisms of heavy metal and organic pollutants on earthworm (*Eisenia fetida*) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015: 76-78 (in Chinese)

- [38] Zhang J Y, He M Y, Liu Y X, et al. Chlorine substitutiondependent toxicities of polychlorinated biphenyls to the earthworm *Eisenia fetida* in soil [J]. Journal of Environmental Sciences (China), 2023, 128: 171-180
- [39] 高晨昕, 朱艳, 郭梦炜, 等. 杀螟丹与 Pb 对赤子爱胜蚓的联合毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 212-222

Gao C X, Zhu Y, Guo M W, et al. Joint toxicity of cartap and Pb on earthworms (*Eisenia foetida*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 212-222 (in Chinese)

- [40] 王雪佳. 蚯蚓-高羊茅联合修复镉污染土壤研究[D]. 杨 凌: 西北农林科技大学, 2022: 27-29
 Wang X J. Study on the effect of combined remediation by earthworm-*Festuca arundinacea* on soil contaminated cadmium [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022: 27-29 (in Chinese)
- [41] 孙仕仙,陶瑞,张庆蛟,等.乐果和杀虫双污染对蚯蚓
 体内蛋白质含量的影响[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(2): 298-303

Sun S X, Tao R, Zhang Q J, et al. Effects of dimethoate and dimehypo pollution on protein content of earthworm[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(2): 298-303 (in Chinese)

[42] 王银翠,周国娜,张斌,等.油松毛虫取食和剪叶刺激 胁迫下油松的蛋白质表达差异分析[J].林业科学, 2016,52(8):68-75

Wang Y C, Zhou G N, Zhang B, et al. Difference in protein expression of *Pinus tabulaeformis* induced by *Dendrolimus tabulaeformis* feeding and leaf-cutting stimulation [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2016, 52(8): 68-75 (in Chinese)

- [43] Wen S F, Liu C, Wang Y W, et al. Oxidative stress and DNA damage in earthworm (*Eisenia fetida*) induced by triflumezopyrim exposure [J]. Chemosphere, 2021, 264(Pt 2): 128499
- [44] Cheng Y L, Zhu L S, Song W H, et al. Combined effects of mulch film-derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (*Eisenia*)

fetida) [J]. The Science of the Total Environment, 2020, 746: 141280

- [45] He F L, Liu Q, Jing M Y, et al. Toxic mechanism on phenanthrene-induced cytotoxicity, oxidative stress and activity changes of superoxide dismutase and catalase in earthworm (*Eisenia foetida*): A combined molecular and cellular study [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 418: 126302
- [46] Liu J B, Qin J J, Zhu L, et al. The protective layer formed by soil particles on plastics decreases the toxicity of polystyrene microplastics to earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. Environment International, 2022, 162: 107158
- [47] Li B, Song W H, Cheng Y L, et al. Ecotoxicological effects of different size ranges of industrial-grade polyethylene and polypropylene microplastics on earthworms *Eisenia fetida* [J]. The Science of the Total Environment, 2021, 783: 147007
- [48] Li M Y, Ma X X, Wang Y R, et al. Ecotoxicity of herbicide carfentrazone-ethyl towards earthworm *Eisenia fetida* in soil [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology, 2022, 253: 109250
- [49] Soares C, de Sousa A, Pinto A, et al. Effect of 24-epibrassinolide on ROS content, antioxidant system, lipid peroxidation and Ni uptake in *Solanum nigrum* L. under Ni stress [J]. Environmental and Experimental Botany, 2016, 122: 115-125
- [50] He F L, Li X X, Huo C Q, et al. Evaluation of fluorenecaused ecotoxicological responses and the mechanism underlying its toxicity in *Eisenia fetida*: Multi-level analysis of biological organization [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 437: 129342
- [51] 史志明. 菲在蚯蚓体内的分布及其对蚯蚓抗氧化防御体系的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2013: 59-71
 Shi Z M. Distribution of phenanthrene in earthworms and its effects on the anti-oxidant defence system of earthworm [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013: 59-71 (in Chinese)