

高旋, 张晓楠, 李超, 朱红霞, 方婧. 生物质炭对土壤中蚯蚓的综合毒性作用评估及分子机制[J]. 土壤学报, 2026,

GAO Xuan, ZHANG Xiaonan, LI Chao, ZHU Hongxia, FANG Jing. Comprehensive Toxicity Assessment of Biochar on Earthworms in Soil and Its Molecular Mechanism[J]. Acta Pedologica Sinica, 2026,

## 生物质炭对土壤中蚯蚓的综合毒性作用评估及分子机制\*

高旋<sup>1,2</sup>, 张晓楠<sup>1</sup>, 李超<sup>1</sup>, 朱红霞<sup>3</sup>, 方婧<sup>1,2†</sup>

(1. 浙江科技大学环境与资源学院, 杭州 310023; 2. 浙江省废弃生物质循环利用与生态处理技术重点实验室, 杭州 310023; 3. 地质灾害防治与地质环境保护全国重点实验室, 成都理工大学, 成都 610059)

**摘要:** 生物质炭对土壤动物尤其是蚯蚓的潜在影响, 是评估其环境安全性的重要一环。尽管人们认识到生物质炭对蚯蚓可能产生一定的毒性效应, 但对于生物质炭制备条件如何调控其毒性, 以及毒性的具体来源仍缺乏系统认知, 这严重制约了低风险生物质炭的筛选与应用。以赤子爱胜蚓为受试对象, 综合利用个体存活率、酶活性、组织病理与转录组学指标, 系统探究了生物质来源(水稻秸秆和易腐垃圾)和热解温度(350 °C、500 °C和650 °C)对生物质炭毒性的影响, 并对比了生物质炭及其浸出液的毒性差异。结果表明, (1) 生物质炭对蚯蚓的毒性效应呈现显著的原料特异性与剂量依赖性。在2.5 g·kg<sup>-1</sup>剂量下, 易腐垃圾炭显著降低蚯蚓存活率, 而同剂量水稻秸秆炭无显著影响; 5 g·kg<sup>-1</sup>剂量下两者均表现出明显致死效应。(2) 氧化应激系统响应显示, 生物质炭激发了蚯蚓的抗氧化防御机制, 且氧化应激水平随热解温度升高而降低。综合生物标志物响应指数显示, 易腐垃圾炭的生态风险高于水稻秸秆炭, 且低温制备的生物质炭毒性风险更强。(3) 组织病理学发现, 生物质炭导致蚯蚓表皮和中肠损伤, 易腐垃圾炭造成的损伤更为严重。转录组学揭示生物质炭干扰了蚯蚓体内与蛋白质消化、细胞外基质互作及维生素吸收相关的关键通路。(4) 5 g·kg<sup>-1</sup>生物质炭浸出液虽具有一定毒性, 但其毒性水平低于生物质炭本体, 这说明全面评估生物质炭的生态安全性, 需同时考量其浸出液的化学组分毒性与其固体颗粒的物理特性风险。综上, 生物质炭对蚯蚓的毒性受原料、热解温度、剂量及组分等多重因素调控, 本研究结果可为生物质炭的环境风险评估及安全施用提供理论依据。

**关键词:** 易腐垃圾; 水稻秸秆; 生物质炭; 蚯蚓; 热解温度; 安全施用

中图分类号: X826 文献标志码: A

## Comprehensive Toxicity Assessment of Biochar on Earthworms in Soil and Its Molecular Mechanism

GAO Xuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiaonan<sup>1</sup>, LI Chao<sup>1</sup>, ZHU Hongxia<sup>3</sup>, FANG Jing<sup>1,2†</sup>

(1. School of Environment and Resources, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2. Key Laboratory of Recycling and Eco-treatment of Waste Biomass of Zhejiang Province, Hangzhou 310023, China; 3. State Key Laboratory of Geohazard Prevention and Geoenvironment Protection, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China)

**Abstract:** 【Objective】The potential impact of biochar on key soil animals, especially earthworms, is an important aspect in evaluating its environmental safety. Although previous studies have confirmed the toxic effects of biochar on earthworms, there is still a lack of

\*国家自然科学基金项目(42307490)、四川省自然科学基金项目(2024NSFSC0848)和浙江省高等教育教学改革项目(高等环境化学课程思政示范课程)共同资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 42307490), the Natural Science Foundation of Sichuan Province, China (No. 2024NSFSC0848), and the Higher Education Teaching Reform Project of Zhejiang Province, China (Demonstration Course of Ideological and Political Education in Higher Environmental Chemistry)

†通讯作者 Corresponding author, E-mail: rceesfangjing@126.com

作者简介: 高旋(1992—), 女, 河北衡水人, 博士研究生, 讲师, 主要从事污染物的环境行为研究。E-mail: gaouxuan@zust.edu.cn

收稿日期: 2025-10-24; 收到修改稿日期: 2026-01-23; 网络首发日期(www.cnki.net):

systematic understanding of how preparation conditions regulate its toxicity and the specific sources of toxicity. Thus, this restricts the screening and application of low-risk biochar. **【Method】**The effects of biomass sources (rice straw and perishable waste) and pyrolysis temperature (350 °C, 500 °C, and 650 °C) on the toxicity of biochar to earthworms were systematically investigated. Also, the toxicity differences between biochar and its extract solution were compared. Moreover, the common *Eisenia fetida* was used as the test subject, and multiple indicators were employed, such as individual survival rate, enzyme activity, histopathological observation, and transcriptomics, to evaluate the effect of biochar on the earthworm's survival. **【Result】**The main results indicated that: (1) The toxic effects of biochar on earthworms exhibited significant feedstock specificity and dose dependence. At an exposure dose of 2.5 g·kg<sup>-1</sup>, perishable waste biochar (PWB) significantly reduced the relative survival rate of earthworms, while the same dose of rice straw biochar (RSB) had no significant effect; when the dose increased to 5 g·kg<sup>-1</sup>, both types of biochar showed obvious lethal effects on earthworms. (2) The response of the oxidative stress system showed that biochar stimulated the antioxidant defense mechanism of earthworms. Moreover, as the pyrolysis temperature increased, the oxidative stress in the earthworms showed a decreasing trend. The integrated biomarker response further indicated that the ecological risk of PWB was higher than that of RSB, and the toxicity risk of biochar pyrolyzed at a lower temperature was stronger. (3) Histopathological analysis indicated that biochar can induce damage to the epidermis and midgut of earthworms, with the damage caused by PWB being more severe. Transcriptomics revealed that several key physiological pathways such as protein digestion and absorption, extracellular matrix (ECM)-receptor interaction, and vitamin digestion and absorption in earthworms, were affected under the exposure to biochar, and PWB induced more differentially expressed genes. (4) Biochar extract solution exhibited toxic tendencies to earthworms in the soil at a dosage of 5 g·kg<sup>-1</sup>, while the toxicity was lower than that of the solid biochar. This indicated that both the chemical composition toxicity of its extract solution and the physical characteristic risks of its solid particles should be considered for a comprehensive assessment of the ecological safety of biochar. **【Conclusion】**Based on the above results, the toxic effects of biochar on earthworms in the soil are influenced by multiple factors such as the feedstock, pyrolysis temperature, dosage, and components of biochar. Thus, this study provides an important reference for research aimed at better assessing the environmental risks of biochar and provides a theoretical basis for the safe application of biochar in soil.

**Key words:** Perishable waste; Rice straw; Biochar; Earthworm; Pyrolysis temperature; Safe application

生物质炭 (Biochar) 因其多孔结构、稳定、富碳及高吸附等特性, 已从传统的土壤改良材料, 迅速发展为一种具有多重应用价值的绿色材料。在农业领域, 它被广泛用于改良土壤结构、提升肥力与持水能力、钝化重金属及促进作物生长, 是“炭基农业”与可持续土壤管理的核心。在环境领域, 它是吸附水体及土壤污染物的有效修复材料。更为重要的是, 在“碳达峰碳中和”目标背景下, 生物质炭因其长达数百年的稳定固碳能力, 已被我国农业农村部列为十项重大引领性技术之一<sup>[1-3]</sup>。近年来, 随着生物质炭土壤应用的推广, 其生态安全性问题逐渐成为研究热点<sup>[4-7]</sup>。因此, 探究不同类型生物质炭施用的生态影响, 对于筛选相对安全的生物质炭和推动农业绿色转型具有重要意义。

蚯蚓作为土壤生态系统中的关键物种和公认的生态毒理学指示生物, 其对环境胁迫的敏感性使其成为评估生物质炭潜在风险的理想模型<sup>[8]</sup>。已有多项研究探讨了生物质炭对蚯蚓的毒性效应, 例如, Zhang 等<sup>[9]</sup>研究发现, 50 g·kg<sup>-1</sup> 的小麦秸秆炭未对蚯蚓的繁殖能力造成影响, 但会导致其体重下降, 并诱发了氧化应激和 DNA 损伤。Li 等<sup>[10]</sup>评估了苹果木屑炭对蚯蚓的潜在毒性, 发现 100 g·kg<sup>-1</sup> 和 200 g·kg<sup>-1</sup> 的生物质炭导致了蚯蚓的回避行为及体重显著减轻, 而在 10 g·kg<sup>-1</sup> 施用量时未观察到回避效应。Hale 等<sup>[11]</sup>将玉米秸秆炭施用于未受污染的土壤, 发现除 5 g·kg<sup>-1</sup> 的生物质炭外, 20 g·kg<sup>-1</sup> 和 50 g·kg<sup>-1</sup> 的生物质炭对蚯蚓体重均产生了负面影响。Han 等<sup>[12]</sup>研究发现, 水稻秸秆炭的添加量不超过 10 g·kg<sup>-1</sup> 时, 其对蚯蚓无生态毒性, 而较高添加量 (50 g·kg<sup>-1</sup>) 则会产生不良影响。然而, 现有研究多局限于生物质炭暴露下个体与生化水平的表观观测, 对蚯蚓响应胁迫的深层分子调控网络, 特别是关键信号通路尚未有系统性的揭示。

值得注意的是, 现有的研究主要集中在以纤维素/木质素为主的常见植物源生物质炭对土壤生物的毒性。事实上, 生物质炭的潜在生态风险通常源于两方面: 一是由原料引入的外源性化学污染物 (如重金属、有机污染物); 二是由热解工艺所决定的生物质炭自身固有物理化学特性 (如表面官能团、孔隙、pH 等),

后者可能导致直接的物理损伤或生理胁迫<sup>[13-14]</sup>。与水稻秸秆相比,易腐垃圾作为前驱体通常含有更高的重金属本底值与复杂的有机组分,其制备的生物质炭中污染物含量可能会与秸秆基生物质炭存在较大差异<sup>[15]</sup>,其潜在的生态风险,特别是对土壤关键生物的毒性效应,却研究甚少。此外,近期研究表明,热解温度可通过调控碳化程度、孔隙发育及官能团演化,显著影响生物质炭的稳定性,这可能引发不同的环境风险<sup>[16]</sup>。另有研究指出,不同热解温度会显著改变生物质炭浸出液中污染物的含量,这可能会影响其对土壤生物的毒性效应<sup>[9]</sup>。研究发现,随着热解温度从 350 °C 升至 650 °C,生物质炭浸出液中的自由基、芳香性有机物及金属离子含量呈现降低趋势<sup>[15]</sup>。考虑到生物质炭在中国自然土壤中广泛应用而种类各异的实际情况,有必要评估不同生产条件下生物质炭的生态安全性,这将为合理选择热解工艺提供理论依据。此外,现有关于生物质炭安全性的推荐施用量通常基于植物源生物质炭,并普遍认为低于 10 g·kg<sup>-1</sup> 的用量是安全的<sup>[17]</sup>。因此,本研究将生物质炭的施用量设定为 2.5 g·kg<sup>-1</sup> 和 5 g·kg<sup>-1</sup>,旨在模拟实际的田间推荐用量,即在低剂量暴露下,比较易腐垃圾炭和水稻秸秆炭对蚯蚓的毒性差异,从而为“安全”剂量提供更精细化的界定。

因此,本研究选取水稻秸秆和易腐垃圾 2 种生物质原料,在不同的热解温度(350 °C、500 °C 和 650 °C)下制备得到 6 种生物质炭,探究生物质炭及其浸出液对蚯蚓存活率的影响,并利用皮尔逊(Pearson)相关性分析考察生物质炭浸出液中污染物含量与存活率的相关关系。联合酶学分析进一步反映生物质炭对蚯蚓抗氧化系统的影响,并利用综合生物标志物响应指数(IBR)量化整体胁迫水平。同时,本研究结合病理观察和转录组测序,进一步阐明不同类型生物质炭诱导蚯蚓毒性的相关机制。本研究通过揭示热解条件与原料选择对生物质炭生态风险的影响机制,为农业环境中生物质炭的原料筛选与热解工艺优化提供实验依据,也可为施用前通过水洗等方式去除可溶性组分以降低毒性的实际措施提供理论支持,对推动生物质炭在农田系统中的安全使用具有一定参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

为模拟真实土壤生态环境,受试土壤(表层 0~20 cm)采自浙江省杭州市桐乡镇某试验农田土壤(潮土),预实验结果表明,该土壤中未检出生物质炭,将采集到的土样自然风干后过 100 目筛。供试蚯蚓为赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*),购自淮安市某蚯蚓生产基地。正式实验开始前,先将其在干净无污染的烧杯中清肠 1 d;随后选择大小相近、健康的成年蚯蚓,用超纯水清洗蚯蚓并擦干后开展试验(平均鲜物质量:每条 300~400 mg)。本研究所用的生物质炭分别是 350 °C、500 °C 和 650 °C 制备的易腐垃圾炭(PWB350、PWB500 和 PWB650)和水稻秸秆炭(RSB350、RSB500 和 RSB650)。生物质炭样品与超纯水按 1:25 (m:v)混合,置于恒温振荡器中,于 25 °C 下以 100 r·min<sup>-1</sup> 转速振荡 20 h。振荡结束后,在 4 000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 20 min,取上层清液,并用 0.45 μm 滤膜过滤,得到生物质炭浸出液。

采用多参数测试仪(雷磁 PHS-3C,上海)测定生物质炭浸出液的电导率(EC);生物质炭浸出液于 254 nm 波长处的特征紫外吸光度(SUVA<sub>254</sub>)是 254 nm 波长下的吸光度(OD<sub>254</sub>)与总有机碳(TOC)的比值,其中,OD<sub>254</sub>采用紫外分光光度计(DR6000,哈希公司,美国)测定,TOC含量采用 TOC 分析仪(TOC-L,岛津,日本)测定;生物质炭浸出液中羟基自由基(•OH)含量利用对苯二甲酸二钠(TPA)探针结合荧光分光光度计(Japan Hitachi F-4700,日立科学仪器公司,日本)测定;生物质炭浸出液中重金属离子含量采用电感耦合等离子质谱仪(PlasmaQuant MS,耶拿,德国)测定。

### 1.2 蚯蚓暴露实验

称取 200 g 供试土壤,于玻璃烧杯中加入不同添加量的生物质炭(2.5、5 g·kg<sup>-1</sup>)或其生物质炭浸出液(40 mL, 12.5 g·L<sup>-1</sup>、25 g·L<sup>-1</sup>)。混合均匀后于通风橱内静置 30 min 以上,各加入一定量的超纯水以保持土壤含水量为 400 g·kg<sup>-1</sup>。空白对照组中加入等体积的超纯水。再次搅拌均匀后,向每个组烧杯内加 10 条蚯蚓,用透气膜封口后置于培养箱(SPX-250,迈科诺,常州)内培养 28 d,每个处理设置 3 个重复。本研究采用 200 g 土壤/10 条蚯蚓的培养体系,旨在针对低剂量暴露下的早期毒性机制,通过适当增加单位土

壤中的生物密度,以更灵敏地检测生物效应,且所有处理组与对照组条件完全一致<sup>[18-19]</sup>。培养箱条件为:湿度 80%,温度 (25±1) °C,光照时间为白天/黑夜 12 h,光照强度 6 000 lx。每两天定时补充 5 mL 水以维持土壤湿度。待染毒暴露第 28 天时,收集各处理组中的蚯蚓,并用超纯水冲洗干净;在黑暗环境中将蚯蚓置于潮湿滤纸上过夜,使其排净肠道内容物;随后再次用超纯水冲洗干净,并用滤纸吸干其体表水分,以进行后续相关指标的测定。

### 1.3 蚯蚓个体生长指标的测定

记录各组存活蚯蚓的数量,计算蚯蚓存活率,再通过对比空白对照组蚯蚓的存活率得出对应实验组的相对存活率。相应数据计算公式如下:

$$\text{空白组/暴露组存活率}/\% = \frac{\text{空白组/暴露组蚯蚓存活数}}{\text{初始蚯蚓存活数}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{相对存活率}/\% = \frac{\text{暴露组蚯蚓存活率}}{\text{空白组蚯蚓存活率}} \times 100 \quad (2)$$

### 1.4 氧化应激相关指标的测定

称取 0.1 g 新鲜蚯蚓组织样品于 1.5 mL 微量离心管内,加入研磨珠及提取液,放入预冷的组织匀浆器 (F6/10, 净信, 上海) 中,冰浴匀浆 15~20 min,并于 8 000 g、4 °C 离心 10 min 后收集上清液。氧化应激相关指标,即超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、过氧化物酶 (Peroxidase, POD)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量采用试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 测定。

为防止污染物生态风险出现偏差性评估,本研究通过综合生物标志物响应指数方法构建多维度评价体系,其核心机制在于有机整合多维度生物标志物响应,突破传统单指标分析的局限性<sup>[20]</sup>。因此,本研究选取了 SOD、POD、CAT 和 MDA 共计 4 个分子生物标志物进行综合生物标志物响应 (Integrated biomarker response, IBR) 分析。首先对每个分子生物标志物的数据进行标准化,消除量纲差异,并通过雷达图表示各处理组生物标志物相对对照组的偏离程度,随后依据文献<sup>[21]</sup>所述方法,计算最终的综合生物标志物响应指数。

### 1.5 组织病理学观察方法

选取对照组与 2.5 g·kg<sup>-1</sup> 生物质炭暴露组蚯蚓,经无水乙醇麻醉后采用 4% (m:v) 多聚甲醛固定过夜,固定组织经梯度脱水及透明化处理,石蜡包埋后制备 5 μm 切片。切片经水化脱蜡后进行苏木精-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 双染,梯度乙醇脱水后采用中性树胶封片。使用光学显微镜 (Eclipse E100, 尼康, 日本) 观察蚯蚓表皮与中肠组织结构,并通过数字成像系统 (DSU3) 采集显微图像。用 Case Viewer 进行图像处理与分析。

### 1.6 转录组分析

选取对照组与 2.5 g·kg<sup>-1</sup> 生物质炭暴露组蚯蚓用于转录组测序,每个暴露组随机选取 2 条具有明显环带、体重大小相似的蚯蚓作为一个样品,蚯蚓过夜清肠后,用超纯水冲洗蚯蚓表面残留的土壤,吸水纸擦拭干净,随后用液氮迅速冷冻,在样品处理之前置于 -80 °C 冰箱保存。采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 抽提蚯蚓组织总 RNA 后,通过质量检测筛选合格样本 (A260/A280 值 1.8~2.0, RNA 完整性指数大于等于 6.5) 进行转录组研究。合格样本经 Illumina HiSeq Xten/NovaSeq 6000 测序系统构建 PE150 双端测序文库。原始测序数据经质控处理:剔除含接头、无插入片段或 N 碱基比例超 10% 的 reads,去除质量得分低于 20 的低质量碱基,过滤修剪后长度不足 20 bp 的序列,原始数据经过滤后获得高质量的测序数据<sup>[22]</sup>。

数据处理在美吉云平台 (<https://www.isanger.com/index>) 上完成。在统计分析步骤中,经 DESeq 鉴定 *P* 值小于 0.05 的基因被认为有差异表达。随后,对获得的差异表达基因开展京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析<sup>[23]</sup>。

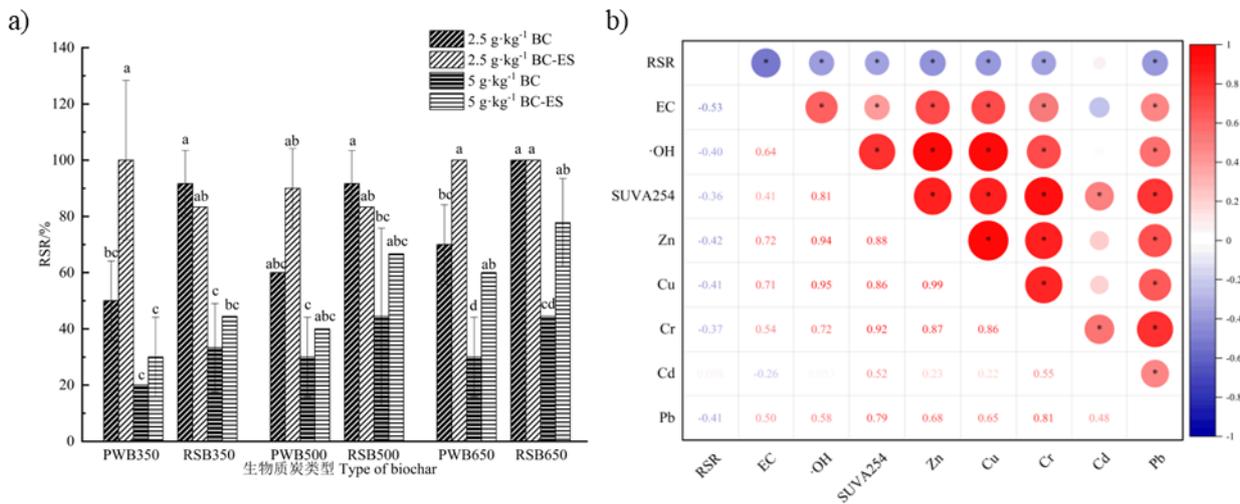
### 1.7 数据处理与分析

实验数据采用平均数±标准偏差 (mean ± SE) 表示。分别使用 Excel 2010 和 Origin 2024 软件进行数据处理和制图。统计分析使用 SPSS 19.0 进行, 利用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 来检测各组之间的显著性差异, 并用图基 (Tukey) 检验进行多重比较分析。当  $P < 0.05$  时, 判定存在显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生物质炭对蚯蚓存活率的影响

不同类型生物质炭及其浸出液胁迫下, 蚯蚓个体存活率如图 1a 所示。2.5 g·kg<sup>-1</sup> 暴露条件下, 三种热解温度制备的水稻秸秆炭均未显著影响蚯蚓的相对存活率。然而, 2.5 g·kg<sup>-1</sup> 易腐垃圾炭暴露组中蚯蚓相对存活率均低于 100%, 这表明与水稻秸秆炭相比, 易腐垃圾炭对蚯蚓具有更高的毒性作用。由此可以看出, 生物质炭对蚯蚓存活率的影响与生物质原料密切相关<sup>[24]</sup>。5 g·kg<sup>-1</sup> 的水稻秸秆炭和易腐垃圾炭暴露下显著影响蚯蚓的相对存活率, 且存活率显著低于 2.5 g·kg<sup>-1</sup> 的生物质炭暴露组, 这表明生物质炭对蚯蚓的影响具有剂量依赖效应。Shi 等<sup>[25]</sup>也发现蚯蚓的死亡率与生物质炭施用量呈明显的正相关关系。尽管有文献认为低于 10 g·kg<sup>-1</sup> 的生物质炭施用量是安全的<sup>[14]</sup>, 但本研究中 5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量下水稻秸秆炭和易腐垃圾炭对蚯蚓已显现毒性, 其原因可能在于生物质原料与热解工艺的不同。值得注意的是, 不同热解温度制备的生物质炭对蚯蚓相对存活率的影响无显著 ( $P > 0.05$ ) 区别。这表明, 在决定生物质炭的致死毒性方面, 生物质原料的种类是较热解温度更为关键的主导因素。



注: BC: 生物质炭; BC-ES: 生物质炭浸出液; PWB350: 350 °C易腐垃圾炭; PWB500: 500 °C易腐垃圾炭; PWB650: 650 °C易腐垃圾炭; RSB350: 350 °C水稻秸秆炭; RSB500: 500 °C水稻秸秆炭; RSB650: 650 °C水稻秸秆炭; RSR: 相对存活率; EC: 电导率; SUVA254: 254 nm 波长处的特征紫外吸光度。下同。图 a 中的不同字母按热解温度分组标注的显著性差异,  $P < 0.05$ , b 图中数字表示相关系数, \*代表显著相关 ( $P < 0.05$ )。Note: BC: biochar; BC-ES: biochar extract solution; PWB350: 350 °C perishable waste biochar; PWB500: 500 °C perishable waste biochar; PWB650: 650 °C perishable waste biochar; RSB350: 350 °C rice straw biochar; RSB500: 500 °C rice straw biochar; RSB650: 650 °C rice straw biochar; RSR: relative survival rate; EC: electrical conductivity; SUVA254: characteristic ultraviolet absorbance at 254 nm. The same below. In Figure a, values marked with different letters are significantly different grouped by pyrolysis temperature ( $P < 0.05$ ); In Figure b, the number represents the correlation coefficient and \* represents a significant correlation ( $P < 0.05$ ).

图 1 不同生物质炭对蚯蚓的毒性效应 (a) 及其与生物质炭浸出液中潜在污染物的相关性 (b)

Fig. 1 The toxic effects of biochars on *Eisenia fetida* (a) and their correlation with potential contaminants in the biochar extract solution (b)

5 g·kg<sup>-1</sup> 的水稻秸秆炭浸出液和易腐垃圾炭浸出液均显著 ( $P < 0.05$ ) 影响了蚯蚓的存活率。据报道, 生物质炭的自由基、芳香性和分子量较高的有机污染物及重金属等构成潜在的毒性风险<sup>[25]</sup>。此外, EC 直接反映了其含有的可溶性盐类, 高 EC 值, 即高盐度也被认为是造成蚯蚓渗透胁迫和毒性效应的重要原因之

—[26]。为了进一步了解生物质炭浸出液中污染物对蚯蚓存活率的影响，测定了生物质炭浸出液中污染物的含量，结果如表 1 所示。SUVA254 用于定性地指示生物质炭浸出液中有机物的芳香性和分子量。随着热解温度的升高，生物质炭浸出液中 SUVA254 及·OH、锌 (Zn)、铜 (Cu)、铬 (Cr)、镉 (Cd) 和铅 (Pb) 的含量呈现下降趋势；同一热解温度下，易腐垃圾炭浸出液中 SUVA254 及·OH、Zn、Cu、Cr 和 Pb 含量均高于水稻秸秆炭浸出液。本研究对生物质炭浸出液暴露下蚯蚓的存活率与相关污染物浓度进行了 Pearson 相关性分析，结果如图 1b 所示。生物质炭浸出液暴露下蚯蚓相对存活率与其 EC、·OH 浓度、SUVA254 以及 Zn、Cu、Cr 和 Pb 含量均呈显著负相关 ( $P < 0.05$ )。这表明，盐度、重金属、芳香性和分子量较高的有机污染物以及生物质炭诱导产生的·OH 对蚯蚓构成了很大风险。此外，2.5 g·kg<sup>-1</sup> 的生物质炭浸出液暴露下蚯蚓的相对存活率与生物质炭本体暴露组存在显著差异，这表明在较低暴露浓度下，生物质炭对蚯蚓的胁迫效应并非完全由其可溶性化学组分驱动。二者之间的毒性“差值”，很可能归因于生物质炭固体颗粒所引发的毒性效应。

表 1 不同原料和热解温度制备的生物质炭浸出液电导率 (EC) 及各污染物含量

Table 1 Electrical conductivity (EC) values and pollutant contents in biochar extract solution prepared from different feedstocks and pyrolysis temperatures

生物质炭类型 Type of biochar	EC/( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	SUVA254/ ( $\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ )	·OH/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Zn/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Cu/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Cr/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Cd/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Pb/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
PWB350	4 338a	1.9	13.9±0.4a	165.1±6.5a	78.5±3.2a	60.1±1.2a	2.1±0.2b	9.4±0.1a
PWB500	3 469b	1.6	11.1±0.1b	130.4±3.5b	61.8±1.5b	54.4±1.6b	1.6±0.2c	8.8±0.1b
PWB650	3 321c	0.1	8.2±0.1e	91.5±2.5d	43.4±1.4d	35.5±1.6c	1.5±0.4bc	8.6±0.2b
RSB350	1 358d	1.7	9.8±0.1c	117.7±2.2c	55.8±0.8c	57.6±1.4a	5.4±0.6a	9.2±0.2ab
RSB500	1 276e	0.7	9.6±0.1c	88.7±1.2d	42.0±0.2d	30.1±1.9d	1.4±0.2c	8.5±0.6b
RSB650	1 189f	0.1	8.9±0.1d	86.8±4.5d	43.4±2.0d	27.4±3.4d	1.4±0.2c	7.2±0.1c

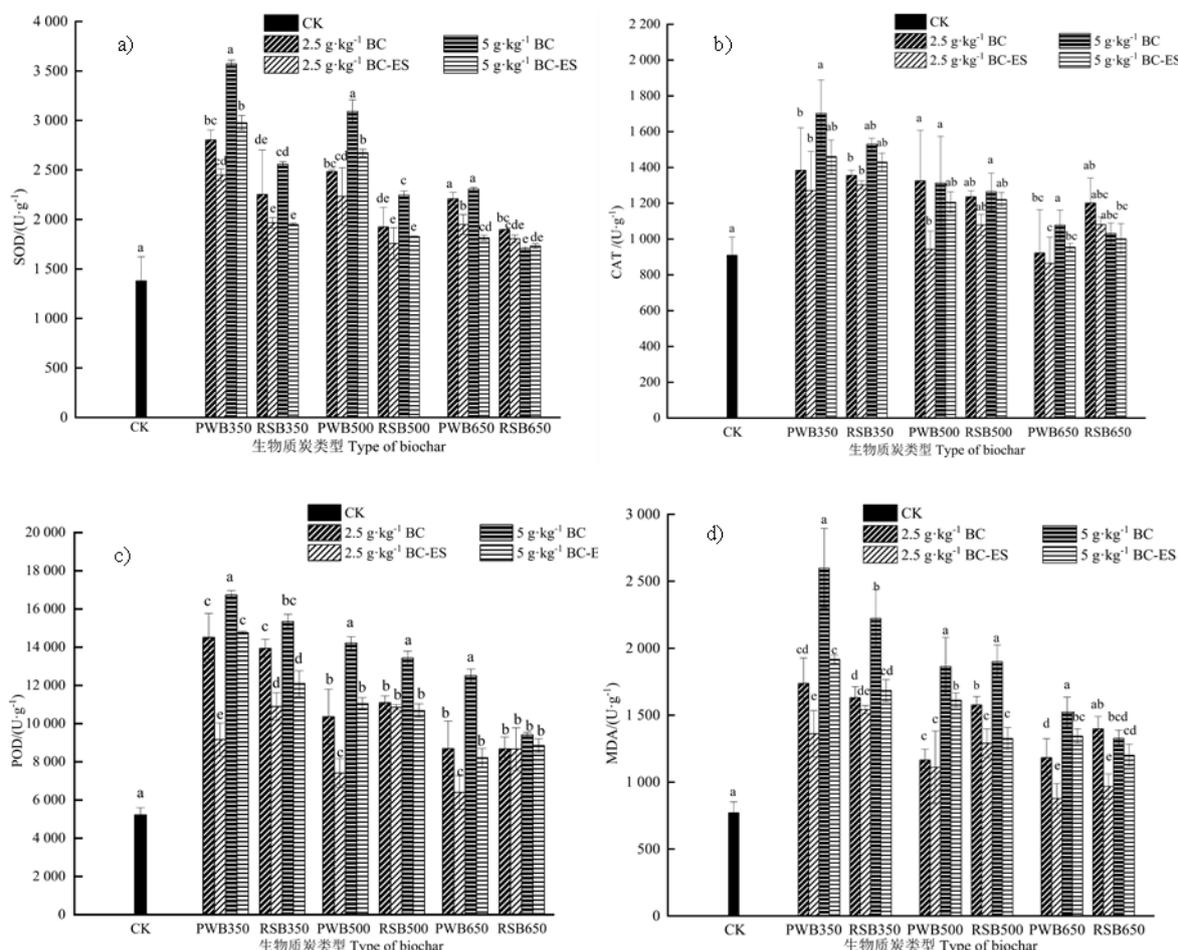
注：同列不同小写字母表示不同处理组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: Different letters in the same column indicate a significant difference between different treatments ( $P < 0.05$ ).

## 2.2 生物质炭对蚯蚓抗氧化酶活性及 MDA 含量的影响

各生物质炭暴露组中蚯蚓 SOD 酶、CAT 酶和 POD 酶活性均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 2a~图 2c)，这表明水稻秸秆炭和易腐垃圾炭均激发了蚯蚓的抗氧化防御机制[26]。CAT 酶和 POD 酶活性在易腐垃圾炭和水稻秸秆炭的同剂量暴露组间未表现出显著差异。相比之下，易腐垃圾炭暴露组中 SOD 酶活性均显著高于同剂量水稻秸秆炭暴露组。此外，5 g·kg<sup>-1</sup> 易腐垃圾炭暴露下蚯蚓体内 SOD 酶活性均高于 2.5 g·kg<sup>-1</sup> 暴露组，而不同水稻秸秆炭暴露剂量下，蚯蚓体内 SOD 酶活性无显著变化。上述结果表明，易腐垃圾炭触发了蚯蚓体内更为显著的氧化应激响应，且具有剂量依赖性。随着生物质炭热解温度的升高，蚯蚓体内三种抗氧化酶活性呈现降低趋势。各生物质炭浸出液暴露组中蚯蚓体内的 SOD 酶和 POD 酶活性及中低温度 (350 °C 和 500 °C) 制备的生物质炭浸出液暴露组中蚯蚓体内的 CAT 酶活性均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。这说明生物质炭浸出液的暴露同样引发了蚯蚓体内的氧化应激反应。

MDA 是细胞膜脂质过氧化的主要终产物之一，已成为衡量细胞膜损伤程度的通用指标[27-28]。本研究发现，各生物质炭暴露组的 MDA 含量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 2d)，表明生物质炭引发了蚯蚓体内的脂质过氧化反应，进而可能导致细胞膜结构与功能的损害[29]。其中，易腐垃圾炭暴露组中 MDA 含量与同剂量的水稻秸秆炭暴露组无显著差别，而 5 g·kg<sup>-1</sup> 易腐垃圾炭和水稻秸秆炭暴露下蚯蚓体内 MDA 含量均高于各自 2.5 g·kg<sup>-1</sup> 暴露组。这表明生物质炭对蚯蚓体内 MDA 含量的影响呈现出剂量依赖性。除此之外，MDA 含量随生物质炭热解温度的升高呈现降低趋势。除 2.5 g·kg<sup>-1</sup> 高热解温度 (650 °C) 制备的生物质炭浸出液暴露组外，其他生物质炭浸出液暴露组 MDA 含量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )，即中低温生物质炭浸出液的暴露会引起脂质过氧化，而高温生物质炭浸出液暴露胁迫诱导蚯蚓产生的氧化应激反应已被抗氧化防御系统缓解，并未造成脂质过氧化。这表明高温可能通过钝化生物质炭表面化学活性与改

善物理结构，系统性降低其生态毒性。此外，相较于单纯生物质炭浸出液暴露，生物质炭本体暴露在多个处理中诱导了显著更高的 MDA 积累，这进一步表明，生物质炭固体颗粒本身通过物理接触或界面相互作用，诱发或加剧了更强烈的氧化应激反应。



注：SOD：超氧化物歧化酶；CAT：过氧化氢酶；POD：过氧化物酶；MDA：丙二醛。下同。CK：对照组。图中按热解温度分组标注显著性，不同字母表示同一温度下不同处理组间的统计学差异， $P<0.05$ 。Note: SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase; POD: Peroxidase; MDA: Malondialdehyde. The same below. CK: The control group. The statistical significance in the figure is annotated by pyrolysis temperature groups. Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ) among different treatment groups under the same pyrolysis temperature.

图 2 不同生物质炭对蚯蚓体内抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响

Fig. 2 Effect of biochar on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in *Eisenia fetida*

### 2.3 生物质炭对不同生物标志物的综合毒性评估

本研究利用雷达图可视化呈现各处理组相对于对照组的生物标志物响应特征（图 3），以对照组作为基准零点，雷达图坐标的正向偏移反映生物标志物被激活或上调，负向偏移则表征其被抑制或下调。从图中可以看出，蚯蚓体内 SOD 对易腐垃圾炭暴露的响应最为敏感，而 MDA 对水稻秸秆炭暴露的响应最为敏感。综合生物标志物响应指数（IBR）能将不同生物标志物进行综合分析，反映环境污染物对生物体的影响，IBR 越大表明生物体所受影响越大<sup>[30-31]</sup>。不同类型生物质炭暴露条件下的 IBR 值如图 4 所示，在不同的热解温度、生物质原料、剂量和组分的生物质炭暴露条件下，蚯蚓表现出不同的风险值。5 g·kg<sup>-1</sup> 生物质炭暴露下的 IBR 值高于 2.5 g·kg<sup>-1</sup> 暴露组，这表明生物质炭对蚯蚓毒性效应存在剂量效应。同一暴露剂量下，易腐垃圾炭暴露下的 IBR 值明显大于水稻秸秆炭，表明易腐垃圾炭对蚯蚓的影响要大于水稻秸秆炭。对易腐垃圾炭和水稻秸秆炭而言，IBR 值均随着热解温度的上升而降低，这表明低温制备的生物质炭对蚯蚓的生态风险较高。生物质炭暴露组的 IBR 值均显著高于其相应的浸出液暴露组，表明生物质炭对蚯蚓的毒性不仅源于其浸出液，生物质炭颗粒本身也可能产生直接毒性作用。值得注意的是，生物质炭浸出液暴

露下的 IBR 值范围为 1.6~11.5，因此，在施用前去除生物质炭中的浸出液可有效降低其对氧化应激体系的影响。

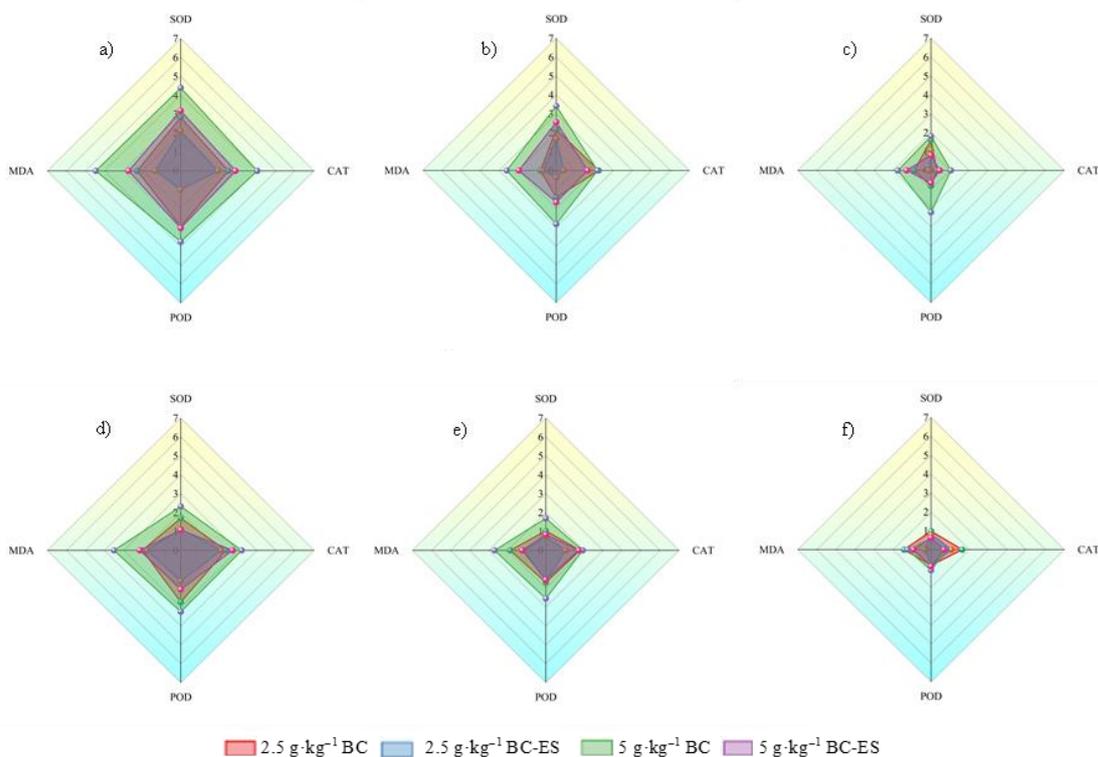


图 3 不同生物质炭暴露下各指标雷达图 (a-c 为 PWB350、PWB500 和 PWB650; d-f 为 RSB350、RSB500 和 RSB650)

Fig. 3 Radar plots of different biomarkers under different types of biochars (a-c for PWB350, PWB500, and PWB650, respectively; d-f for RSB350, RSB500, and RSB650, respectively)

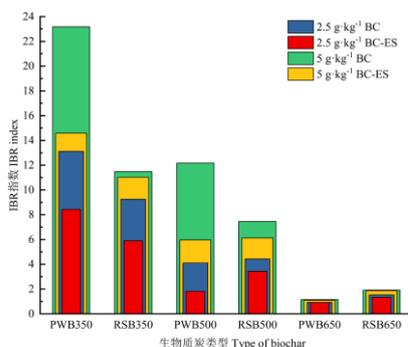


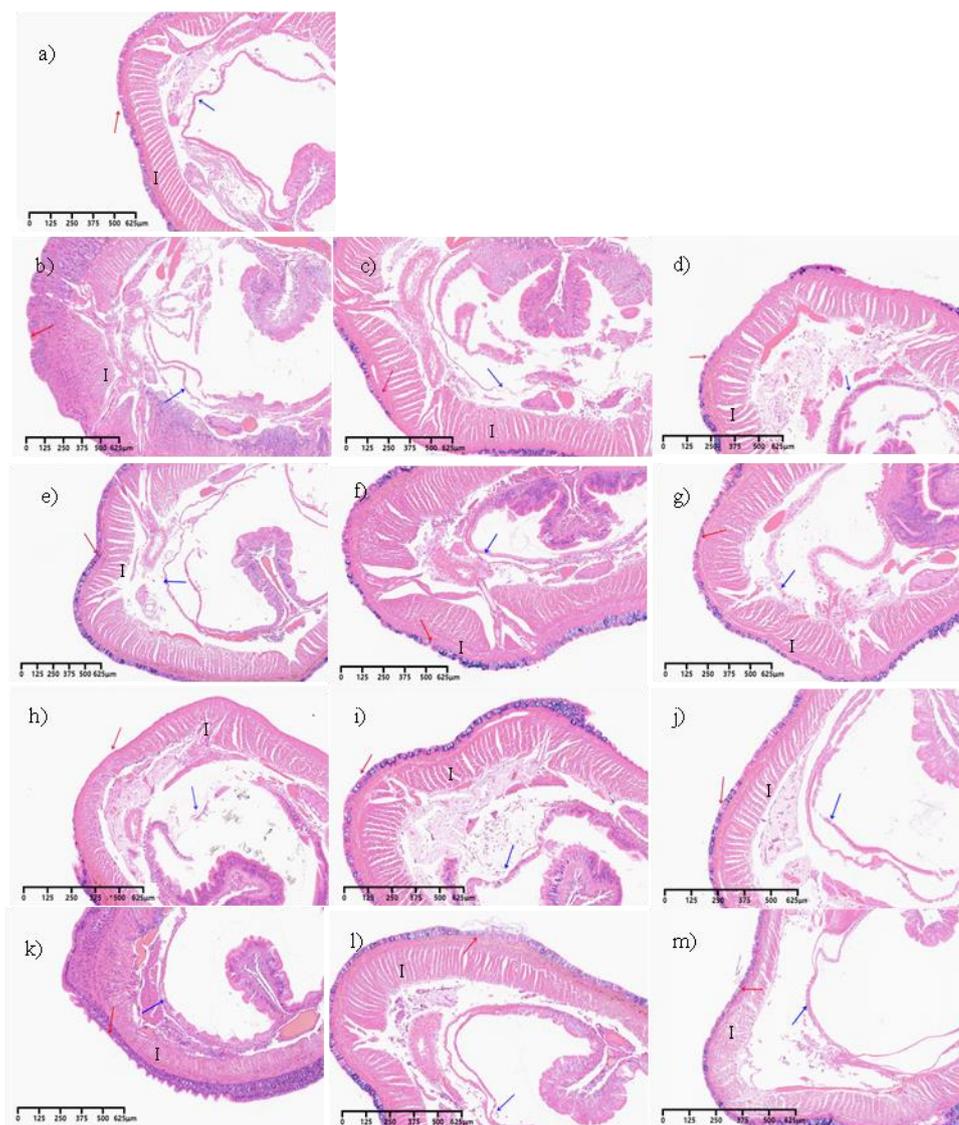
图 4 蚯蚓在不同生物质炭暴露下的综合生物标志物响应 (IBR) 指数

Fig. 4 The integrated biomarker response (IBR) index of different biochars on *Eisenia fetida*

## 2.4 蚯蚓组织病理学观察

为探明较低剂量生物质炭暴露是否可导致蚯蚓的早期组织病理学变化，暴露 28 d 后，选择对照和 2.5  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  生物质炭暴露组对蚯蚓表皮和中肠组织进行组织病理学观察 (图 5)。对照组的蚯蚓表皮细胞间质分布均匀且光滑，纵肌形状规则，中肠组织细胞紧密，结构完整，未发现明显的组织损伤 (图 5a)。生物质炭暴露显著影响了蚯蚓表皮和中肠组织结构的完整性。低温 (350  $^{\circ}\text{C}$ ) 热解的易腐垃圾炭和水稻秸秆炭暴露下，蚯蚓表皮组织发生了明显的凹陷与破碎 (图 5b, 图 5h)，并伴随着细胞间隙增大和中肠组织变薄、破碎等症状，而高温 (650  $^{\circ}\text{C}$ ) 热解的生物质炭仅造成了蚯蚓表皮的轻微损伤 (图 5d, 图 5j)。这可能是因为低温制备的生物质炭具有粗糙的表面，当蚯蚓通过皮肤接触或摄食这些颗粒时，可能对其体表的角质

层造成机械性磨损, 或对其消化道内壁造成物理性损伤<sup>[32]</sup>。值得注意的是, 热解温度对蚯蚓组织损伤程度的影响与上述氧化应激水平的变化(图 2)具有一致性, 这表明物理损伤可能破坏了组织完整性, 进而加剧了细胞层面的氧化应激。与水稻秸秆炭处理组相比, 易腐垃圾炭暴露组的组织损伤程度更为显著, 具体表现为蚯蚓表皮出现明显的凹陷、破碎, 中肠组织畸形细胞更多, 细胞排列更为混乱且松散。这可能是易腐垃圾炭诱导蚯蚓体内更强氧化应激的原因, 与其原料复杂性导致的特定表面性质或浸出液中存在微量污染物有关。此外, 与对照组相比, 生物质炭浸出液暴露下也出现了轻微的表皮破损和肠道皱缩现象(图 5e~图 5g, 图 5k~图 5m), 可见生物质炭浸出液会引发蚯蚓体内一定的组织损伤。这进一步表明蚯蚓组织损伤是浸出液化学毒性与颗粒物理毒性共同作用的结果。因此, 在评估生物质炭的生态安全性时, 需要同时考虑其浸出液的化学组分毒性与其固体颗粒的物理特性风险<sup>[15]</sup>。



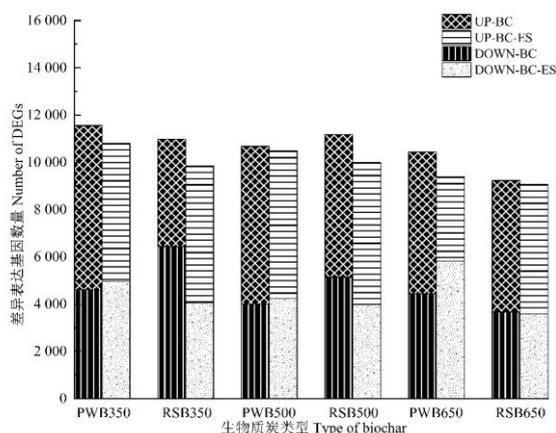
注: 红色箭头为表皮组织, 蓝色箭头为中肠组织, I 为蚯蚓纵肌。Note: Red -arrows: Epidermal tissue; Blue arrows: Midgut tissue; I: Longitudinal muscle.

图 5 不同生物质炭暴露下蚯蚓的组织病理图 (a 为对照组; b~d 为 PWB350、PWB500 和 PWB650 暴露组; e~g 为 PWB350-ES、PWB500-ES、PWB650-ES 暴露组; h~j 为 RSB350、RSB500 和 RSB650 暴露组; k~m 为 RSB350-ES、RSB500-ES 和 RSB650-ES 暴露组)

Fig.5 Histopathological sections of *Eisenia fetida* exposed to different biochars (a for the control group; b-d for PWB350, PWB500, and PWB650, respectively; e-g for PWB350-ES, PWB500-ES, and PWB650-ES, respectively; h-j for RSB350, RSB500, and RSB650, respectively; k-m for RSB350-ES, RSB500-ES, and RSB650-ES, respectively)

## 2.5 基于基因水平的蚯蚓毒性

与对照组相比,暴露于易腐垃圾炭和水稻秸秆炭后,蚯蚓体内差异表达的基因数量如图6所示。通过比较不同生物质原料生物质炭对基因表达的影响,可以看出在相同热解温度下,易腐垃圾炭诱导的差异表达基因数量较水稻秸秆炭更多。例如,350℃易腐垃圾炭和350℃水稻秸秆炭诱导的差异表达基因数量分别为11 555和10 980个。由生物质炭诱导的差异表达基因总数量随着其热解温度的升高而减少。例如,与对照组相比,在350℃易腐垃圾炭和650℃易腐垃圾炭暴露下,分别有11 555和10 439个差异表达基因,这表明高热解温度的生物质炭对蚯蚓基因表达影响较小。此外,由生物质炭浸出液引起的差异表达基因数量与生物质炭本体存在差异,这直接证实了生物质炭中可溶性化学组分(包括潜在污染物)干扰了蚯蚓的基因表达。二者在差异基因数量上的显著差距表明,生物质炭固体颗粒的物理存在及其界面效应也会对蚯蚓的基因表达产生影响。上述结果表明,生物质炭暴露会明显影响蚯蚓体内的基因表达,且影响程度与生物质炭的原料来源、热解温度及其组分密切相关。



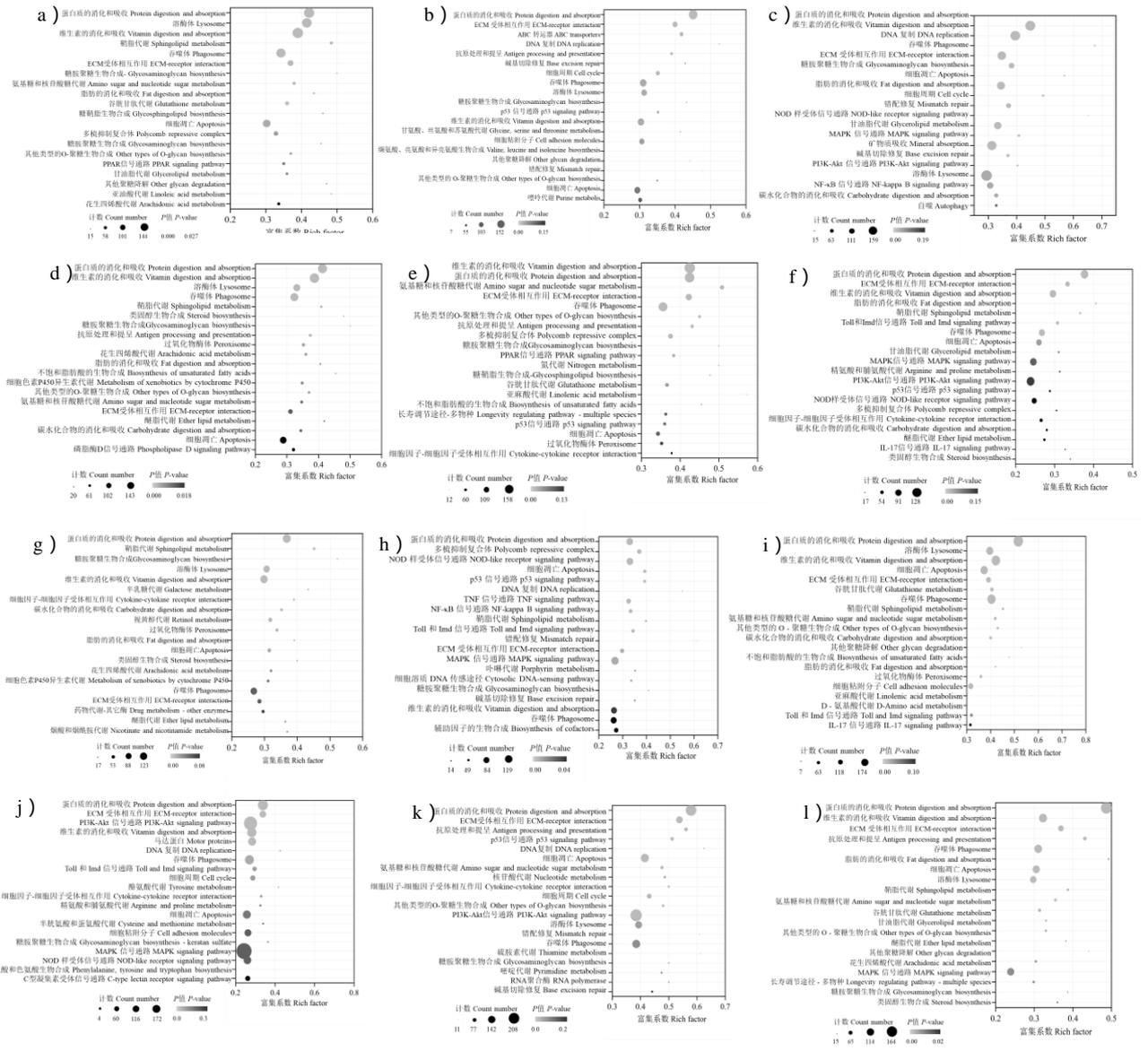
注: UP-BC: 生物质炭处理组中的上调基因; UP-BC-ES: 生物质炭浸出液处理组中的上调基因; DOWN-BC: 生物质炭处理组中的下调基因; DOWN-BC-ES: 生物质炭浸出液处理组中的下调基因。Note: UP-BC: Upregulated genes in the biochar treatment group; UP-BC-ES: Upregulated genes in the biochar extract solution treatment group; DOWN-BC: Downregulated genes in the biochar treatment group; DOWN-BC-ES: Downregulated genes in the biochar extract solution treatment group.

图6 不同生物质炭暴露下蚯蚓差异表达基因(DEGs)的堆积图

Fig. 6 A plot of differentially expressed genes (DEGs) in *Eisenia fetida* cultured with different types of biochars

为进一步了解差异表达基因的生物学功能,本研究对生物质炭暴露下差异表达基因进行KEGG富集分析,丰度前20的KEGG富集通路如图7a~图7f所示。由图中可以看出,各生物质炭暴露组差异表达基因均显著富集蛋白质消化与吸收通路,该通路是生物体获取必需氨基酸的核心途径,其功能依赖于肠道内胰蛋白酶、肽酶等水解酶的活性以及肠上皮细胞对氨基酸的高效转运,此功能的紊乱与蚯蚓存活率降低和组织病理学观察到的肠道损伤结果相吻合<sup>[30]</sup>。此外,细胞外基质(ECM)-受体相互作用和维生素消化与吸收通路在所有生物质炭本体暴露组中均显著富集。其中,ECM-受体相互作用通路参与细胞外基质与细胞间的信号传递,广泛涉及组织发育和免疫调节,其在生物质炭暴露组的普遍富集表明,生物质炭对蚯蚓的物理刺激是普遍存在的生物学效应<sup>[33]</sup>。维生素消化与吸收通路的富集则聚焦于脂溶性维生素的乳化、跨膜转运及肝脏储存过程,这是蚯蚓应对生物质炭诱导氧化应激的重要生理响应<sup>[34]</sup>。

生物质炭浸出液暴露下丰度前20的KEGG富集通路如图7g~图7l所示。上述ECM-受体相互作用通路和维生素消化与吸收通路未在部分生物质炭浸出液暴露组中富集,这表明相较于生物质炭本体,生物质炭浸出液对蚯蚓基因表达的影响显著减弱。因此,在施用前去除生物质炭中的浸出液亦可有效降低其对蚯蚓基因表达的影响。特别地,在低温制备(350℃)的易腐垃圾炭和水稻秸秆炭暴露下,特异性激活了蚯蚓体内谷胱甘肽代谢通路,通过谷胱甘肽过氧化物酶/还原酶协同清除自由基,该通路的强激活状态是低温生物质炭诱导高强度氧化应激的直接标志。



注: ECM: 细胞外基质; PPAR: 过氧化物酶体增殖物激活受体; p53: 肿瘤蛋白 p53; MAPK: 有丝分裂原活化蛋白激酶; NOD: 核苷酸结合寡聚化结构域; PI3K-Akt: 磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B; NF-κB: 核因子 κB; Imd: 免疫缺陷; IL-17: 白细胞介素-17; Note: ECM: extracellular matrix; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; p53: tumor protein p53; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; NOD: nucleotide-binding oligomerization domain; PI3K-Akt: phosphatidylinositol 3-kinase- protein kinase B; NF-κB: Nuclear factor kappa-B; Imd: immune deficiency; IL-17: Interleukin-17.

图 7 水稻秸秆炭和易腐垃圾炭及其浸出液与 CK 相比的差异表达基因京都基因组与基因组百科全书 (KEGG) (a. PWB350; b. PWB500; c. PWB650; d. RSB350; e. RSB500; f. RSB650; g. PWB350-ES; h. PWB500-ES; i. PWB650-ES; j. RSB350-ES; k. RSB500-ES; l. RSB650-ES)

Fig.7 Bubble diagram of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway of rice seedling under the exposure of PWB, RSB, PWB-ES, and RSB-ES (a. PWB350; b. PWB500; c. PWB650; d. RSB350; e. RSB500; f. RSB650; g. PWB350-ES; h. PWB500-ES; i. PWB650-ES; j. RSB350-ES; k. RSB500-ES; l. RSB650-ES)

### 3 结论

与易腐垃圾炭相比, 水稻秸秆炭表现出更好的安全性。生物质炭暴露对蚯蚓存活率的影响具有剂量及生物质原料依赖效应; 污染物定量数据与相关性分析共同表明, 蚯蚓存活率的下降与浸出液中的典型污染物(包括重金属、芳香性和分子量较高的有机污染物以及生物质炭诱导的 $\cdot\text{OH}$ )及盐度水平呈显著负相关, 这些可能是导致毒性差异的关键因素。生物质炭对蚯蚓氧化应激体系的影响与施加剂量、热解温度、生物质来源及暴露组分密切相关。低剂量、高热解温度下的水稻秸秆炭对蚯蚓抗氧化酶活性及MDA含量影响最小, 且去除生物质炭中的浸出液可有效降低生物质炭对氧化应激体系的影响。易腐垃圾炭暴露显著破坏了蚯蚓表皮和中肠组织结构的完整性; 而水稻秸秆炭对蚯蚓表皮及中肠组织的损伤程度较轻。此外, 生物质炭对蚯蚓基因表达的影响受其热解温度和生物质原料的调控, 其中, 低温热解的易腐垃圾炭所引起的基因表达扰动最为显著。综上, 生物质炭的毒性是原料与热解工艺共同影响的结果, 为保障土壤生态安全, 在农业实践中应优先选择如水稻秸秆一类的高热解温度生物质炭, 并关注其施用剂量, 同时建议通过预处理等方式减少可溶性污染物含量, 以最大限度地降低其对土壤关键生物如蚯蚓的潜在环境风险。

### 参考文献 (References)

- [1] Fang J, Jin L, Cheng L L, et al. Advancement in research on stability of biochar in the environment[J]. Acta Pedologica Sinica, 2019, 56(5): 1034-1047. [方婧, 金亮, 程磊磊, 等. 环境中生物质炭稳定性研究进展[J]. 土壤学报, 2019, 56(5): 1034-1047.]
- [2] Hoque M M, Saha B K, Scopa A, et al. Biochar in agriculture: A review on sources, production, and composites related to soil fertility, crop productivity, and environmental sustainability[J]. C-Journal of Carbon Research, 2025, 11(3): 50.
- [3] Chen Z W, Gao X, Hou Y C, et al. Removal of antibiotic resistance genes from water by biochar and its influencing factors[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2025, 42(2): 421-429. [陈志文, 高旋, 侯雨橙, 等. 生物质炭对水中抗生素抗性基因的去除及影响因素[J]. 农业资源与环境学报, 2025, 42(2): 421-429.]
- [4] Gao X, Meng Q K, Fang J, et al. Effects of particle size and pyrolytic temperature of biochar on the transformation behavior of antibiotic resistance genes[J]. Science of the Total Environment, 2023, 877: 162923.
- [5] Han H W, Buss W, Zheng Y Z, et al. Contaminants in biochar and suggested mitigation measures—A review[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 429: 132287.
- [6] Godlewska P, Ok Y S, Oleszczuk P. The dark side of black gold: Ecotoxicological aspects of biochar and biochar-amended soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 403: 123833.
- [7] Yao J Y, Wang H W, Fang J, et al. Distribution hotspots, formation mechanisms, and ecological effects of reactive oxygen species in soil and sediment: A critical review[J]. Environmental Science & Technology, 2025, 59(27): 13551-13565.
- [8] Domene X, Enders A, Hanley K, et al. Ecotoxicological characterization of biochars: Role of feedstock and pyrolysis temperature[J]. Science of the Total Environment, 2015, 512: 552-561.
- [9] Zhang Q M, Saleem M, Wang C X. Effects of biochar on the earthworm (*Eisenia foetida*) in soil contaminated with and/or without pesticide mesotrione[J]. Science of the Total Environment, 2019, 671: 52-58.
- [10] Li D, Hockaday W C, Masiello C A, et al. Earthworm avoidance of biochar can be mitigated by wetting[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2011, 43(8): 1732-1737.
- [11] Hale S E, Jensen J, Jakob L, et al. Short-term effect of the soil amendments activated carbon, biochar, and ferric oxyhydroxide on bacteria and invertebrates[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(15): 8674-8683.
- [12] Han J, Huang Y W, Meng J, et al. Exposure of earthworm (*Eisenia fetida*) to rice straw biochar: Ecotoxicity assessments for soil-amended programmes[J]. Science of the Total Environment, 2021, 794: 148802.
- [13] Chen X W, Wong J T, Ng C W, et al. Feasibility of biochar application on a landfill final cover—A review on balancing ecology and shallow slope stability[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(8): 7111-7125.
- [14] He D B, Luo Y M, Zhu B. Feedstock and pyrolysis temperature influence biochar properties and its interactions with soil substances: Insights from

- a DFT calculation[J]. Science of the Total Environment, 2024, 922: 171259.
- [15] Gao X, Li C, Zhang H Z, et al. Negative impacts of perishable waste biochar to *Escherichia coli* and exploring potential damage factors[J]. Science of the Total Environment, 2024, 933: 173170.
- [16] Ippolito J A, Cui L Q, Kammann C, et al. Feedstock choice, pyrolysis temperature and type influence biochar characteristics: A comprehensive meta-data analysis review[J]. Biochar, 2020, 2(4): 421-438.
- [17] Jia H T, Zhao Y Y, Deng H, et al. Significant contributions of biochar-derived dissolved matters to ecotoxicity to earthworms (*Eisenia fetida*) in soil with biochar amendment[J]. Environmental Technology & Innovation, 2023, 29: 102988.
- [18] Rashti M R, Hintz J, Esfandbod M, et al. Detecting microplastics in organic-rich materials and their potential risks to earthworms in agroecosystems[J]. Waste Management, 2023, 166: 96-103.
- [19] Raiesi F, Motaghian H R, Nazarizadeh M. The sublethal lead (Pb) toxicity to the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, *Oligochaeta*) as affected by NaCl salinity and manure addition in a calcareous clay loam soil during an indoor mesocosm experiment[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 190: 110083.
- [20] Yang F R, Ran L L, Yang M, et al. Study on the degradation of fenprothrin in soil and its toxic effect on earthworms[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024, 61(3): 794-801. [杨馥荣, 冉露露, 杨沐, 等. 甲氰菊酯在土壤中的降解及对蚯蚓的毒性效应研究[J]. 土壤学报, 2024, 61(3): 794-801.]
- [21] Zhao Y, Li X, Xu G R, et al. Multilevel investigation of the ecotoxicological effects of sewage sludge biochar on the earthworm *Eisenia fetida*[J]. Chemosphere, 2024, 360: 142455.
- [22] Thunders M, Cavanagh J, Li Y S. *De novo* transcriptome assembly, functional annotation and differential gene expression analysis of juvenile and adult *E. fetida*, a model oligochaete used in ecotoxicological studies[J]. Biological Research, 2017, 50(1): 7.
- [23] Chai L H, Yang Y J, Yang H Y, et al. Transcriptome analysis of genes expressed in the earthworm *Eisenia fetida* in response to cadmium exposure[J]. Chemosphere, 2020, 240: 124902.
- [24] Wang J, Yang Y X, Wu J Z, et al. The interaction between biochar and earthworms: Revealing the potential ecological risks of biochar application and the feasibility of their co-application[J]. Science of the Total Environment, 2024, 950: 175240.
- [25] Shi Z M, Yan J H, Ren X N, et al. Effects of biochar and thermally treated biochar on *Eisenia fetida* survival, growth, lysosomal membrane stability and oxidative stress[J]. Science of the Total Environment, 2021, 770: 144778.
- [26] Sharif F, Danish M U, Ali A S, et al. Salinity tolerance of earthworms and effects of salinity and vermi amendments on growth of *Sorghum bicolor*[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2016, 62(8): 1169-1181.
- [27] Alfei S, Pandoli O G. Biochar-derived persistent free radicals: A plethora of environmental applications in a light and shadows scenario[J]. Toxics, 2024, 12(4): 245.
- [28] Chen Y S, Fang Q H, Zhao Y P, et al. Studies on the toxicity of carbamazepine on *Chlamydomonas reinhardtii* and *Microcystis aeruginosa*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2025, 45(7): 433-440. [陈亚松, 房其昊, 赵云鹏, 等. 卡马西平对莱茵衣藻与铜绿微囊藻毒性效应研究[J]. 环境科学学报, 2025, 45(7): 433-440.]
- [29] Murphy M P, Bayir H, Belousov V, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and *in vivo*[J]. Nature Metabolism, 2022, 4(6): 651-662.
- [30] Barreto A, Luis L G, Paíga P, et al. A multibiomarker approach highlights effects induced by the human pharmaceutical gemfibrozil to gilthead seabream *Sparus aurata*[J]. Aquatic Toxicology, 2018, 200: 266-274.
- [31] Sanchez W, Burgeot T, Porcher J M. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20(5): 2721-2725.
- [32] He F L, Li X X, Huo C Q, et al. Evaluation of fluorene-caused 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.
- [33] Tso P, Kohan M J. Intestinal absorption of fat-soluble vitamins: Focus on transport proteins[J]. Annual Review of Nutrition, 2020, 40: 321-345.
- [34] Gavrilescu M, Holban A M. Earthworms as bioindicators of soil pollution: Mechanisms and applications[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 198: 110819.