

蚯蚓皮肤对钆标记纳米塑料的吸收与排出过程*

杨雨^{1,2}, 张军^{1,2}, 苏宇^{1†}, 季荣²

(1. 环境医学工程教育部重点实验室, 东南大学公共卫生学院, 南京 210009; 2. 水污染控制与资源绿色循环全国重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210023)

摘要: 纳米塑料 (Nanoplastics, NPs) 在土壤中积蓄可能危害蚯蚓健康。探明蚯蚓对 NPs 的吸收与排出过程是评估暴露风险的关键, 但复杂基质中 NPs 的量化难题制约了相关研究的进展。采用稀土元素钆标记的聚苯乙烯纳米颗粒为 NPs 代表材料, 实现了对 NPs 在蚯蚓体内的吸收、分布和排出动力学的定量分析。结果表明, 纳米尺度的塑料颗粒可跨越蚯蚓表皮屏障, 既能通过外表皮转运至器官组织, 又能从内表皮反向渗出, 且皮肤渗入率显著高于渗出率。皮肤在 NPs 代谢过程中主要发挥吸收功能, 特别是在蚯蚓进食减少或禁食状态下, 皮肤吸收成为其摄取和累积土壤中 NPs 的主要途径, 这归因于土壤中 NPs 对蚯蚓皮肤的持续暴露效应。本研究揭示了皮肤渗透作为蚯蚓摄入 NPs 的关键机制, 为完善土壤 NPs 生态风险评估模型提供了理论依据。

关键词: 纳米塑料; 钆标记; 蚯蚓; 吸收; 排出

中图分类号: X53 **文献标志码:** A

Dermal Uptake and Elimination of Europium-Labeled Nanoplastics in Earthworms

YANG Yu^{1,2}, ZHANG Jun^{1,2}, SU Yu^{1†}, JI Rong²

(1. Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. State Key Laboratory of Water Pollution Control and Green Resource Recycling, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: 【Objective】 The accumulation of nanoplastics (NPs) in soils poses potential threats to earthworm health. As key indicator species in soil ecosystems, earthworms play a crucial role in assessing the ecological risks associated with soilborne NPs. However, the quantification of NPs in complex biological and environmental matrices has remained a major challenge, limiting progress in this research field. Therefore, a comprehensive understanding of the absorption and excretion process of NPs by earthworms is essential for accurate exposure risk assessment. **【Method】** In this study, europium-labeled polystyrene nanoparticles were utilized as model NPs to quantitatively investigate the absorption, distribution, and excretion kinetics of NPs in earthworms. The organisms were exposed to the nanoparticles via three distinct administration routes: topical application onto the epidermis, direct injection into the body cavity, or introduction into the soil medium with or without oral exposure restriction (mouth sealing). **【Result】** Skin exposure experiments demonstrated that NPs were capable of penetrating the earthworm epidermal barrier, with absorption kinetics exhibiting a biphasic pattern: an initial rapid phase (0-3 h), primarily driven by concentration gradient-mediated passive diffusion, followed by a slower phase (3-24 h),

*国家自然科学基金项目 (22436002, 42177377 和 42477413) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22436002, 42177377 and 42477413)

†通讯作者 Corresponding author, E-mail: yusu@seu.edu.cn

作者简介: 杨雨 (2000—), 女, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 主要研究纳米塑料累积行为。E-mail: yy1612849968@163.com

收稿日期: 2025-06-03; 收到修改稿日期: 2025-08-04; 网络首发日期 (www.cnki.net):

<http://pedologica.issas.ac.cn>

significantly impeded by the resistance of the epidermal mucus layer and NP aggregation. Body cavity exposure studies revealed that NPs excretion via the skin also followed a biphasic pattern, characterized by rapid clearance ($28.7\% \pm 1.4\%$ within 3 h) and subsequent slow attenuation. The skin exudation rate was markedly lower than the penetration rate, indicating that the skin predominantly functions as an absorptive interface during NPs metabolism. Integrated sealing experiments further clarified the time-dependent shift in NPs uptake pathways: cutaneous absorption dominated during the early exposure phase (<3 h), accounting for 70.3%, whereas dietary intake became predominant after 24 h, contributing 62.5%. Notably, dermal penetration efficiency exhibited a clear dose-dependent trend, with NPs displaying organ-specific accumulation patterns in earthworms, the intestine being the primary target organ. These findings demonstrate that nanoscale plastic particles are capable of traversing the epidermal barrier of earthworms, undergoing trans-epidermal transport from the outer layer to internal tissues, as well as retrograde exudation from the inner epidermis. The significantly higher skin penetration rate compared to the exudation rate suggests that the epidermis primarily functions as an absorptive interface during NPs metabolism. Under conditions of reduced or ceased feeding activity, dermal absorption emerges as the predominant pathway for NPs uptake and accumulation in earthworms, which can be attributed to the prolonged dermal exposure to NPs in the surrounding soil environment. 【Conclusion】 This study highlights dermal penetration as a critical yet previously underestimated route for the uptake of NPs in earthworms, thereby providing a robust scientific basis for refining ecological risk assessment models of soilborne nanoparticles. It also contributes valuable theoretical insights into the biogeochemical cycling of NPs within soil ecosystems.

Key words: Nanoplastics; Europium labeling; Earthworms; Uptake; Elimination

微塑料 (Microplastics, MPs) 污染正通过多种途径侵入土壤环境^[1-2]。这些颗粒既可直接来源于制造的初级 MPs, 也可由使用中的塑料制品和管理不善的塑料垃圾因老化、磨损及生物作用形成的次级 MPs^[3-4]。农业活动 (如地膜更换、污水污泥施用)、工业与生活区的废弃物排放、地表径流及大气沉降是主要污染源^[5-6]。现有监测数据显示, 从高山苔原到工业区土壤中普遍存在聚苯乙烯 (Polystyrene, PS)、聚乙烯等多种类型的 MPs^[7-8], 其丰度呈现显著空间异质性, 含量范围为每千克土壤几毫克至几万毫克^[5,9]。随着 MPs 的持续排放和逐渐破碎, 土壤中纳米塑料 (Nanoplastics, NPs) 的数量预计会显著增加^[10]。MPs 向 NPs 的长期转化过程将伴随有毒化合物 (增塑剂、阻燃剂等添加剂及吸附污染物) 的不断释放和积累^[11-12], 从而加剧塑料污染的“毒性债务”效应^[13]。

相较于大尺寸 MPs, 纳米级尺寸 (<100 nm) 赋予 NPs 独特的长距离迁移潜力和跨膜渗透能力, 生物有效性高而有更高的生态风险^[14-15]。作为土壤生态系统的“工程师”, 蚯蚓通过消化道机械破碎作用促进 MPs 纳米化^[16-17], 并通过其生物扰动行为驱动 NPs 的垂向迁移^[18], 从而改变 NPs 在土壤中的赋存分布及环境行为。此外, 蚯蚓是评估土壤污染的重要指示生物, 在毒理学研究中显示出对 NPs 的高度敏感性。研究表明, 土壤中低浓度 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) NPs 暴露即可通过体腔细胞的内吞作用诱发抗氧化酶活性降低和活性氧积累^[19]; 而高浓度 ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 暴露则进一步加剧蚯蚓消化和免疫系统的损害^[19]。更值得关注的是, 由于 NPs 具有高比表面积, 其对多环芳烃等污染物的吸附能力增强。实验证实 NPs 作为载体可显著提高蚯蚓体内靶标物的积累浓度^[20-21], 并延长相关生物毒性的持续时间^[22]。

目前, 关于 NPs 与蚯蚓相互作用机制研究仍不清楚, 尤其是 NPs 通过不同途径进入和排出蚯蚓体内的动态过程尚未阐明。传统研究方法将蚯蚓暴露于含 NPs 的土壤中进行培养, 但这种方法难以量化区分摄食与皮肤吸收对 NPs 内化的相对贡献, 也无法明确肛门排泄和体表分泌在 NPs 排出过程中的差异。生理结构上, 蚯蚓体壁具有类似于哺乳动物肺泡膜的气体交换功能: 其角质层分布着密集的微孔 (主要为表皮腺和皮肾管的开口处), 允许氧气渗入表皮下的毛细血管网络, 同时实现二氧化碳的排出。理论上, NPs 可经过角质层孔隙进入表皮, 并进一步通过毛细血管系统转运至其他器官或组织。然而, 现有研究对蚯蚓皮肤途径的实验验证不足, 主要是因为复杂环境基质 (如土壤) 中 NPs 的分离提取存在困难, 且常规 MPs 检测方法在 NPs 分析方面存在局限性^[23]。例如光谱技术受分辨率限制难以识别纳米级颗粒, 而热分析法则对低浓度 NPs 的定量精度不足^[24-25]。近期发展起来的稀有金属标记法 (如钇、铈标记) 因其高灵敏度 (检测限可达 10^{-9} 级) 和标记物稳定性 (溶出率小于 0.1%), 已在活性污泥系统、土壤-植物或土壤-蚯蚓体系等复杂介质中成功追踪了 NPs 的迁移规律和归趋^[18, 26-27]。该方法为揭示 NPs 在土壤-蚯蚓界面转移机制提供了技术支撑。

本研究旨在初步量化蚯蚓对 NPs 的跨膜转运过程,重点揭示非摄食途径(皮肤吸收/排出)在 NPs 生物累积中的关键作用。以典型表层土壤生物指示种威廉腔环蚓(*Metaphire guillelmi*)作为模式生物,研究其对土壤表层(污染热点区域)NPs 的皮肤吸收和排出过程。采用钕(Eu)标记的 PS 纳米颗粒作为模型 NPs,并结合电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)技术,实现对生物基质中 NPs 的痕量分析。首先,通过皮肤暴露实验,建立 NPs 浓度、暴露时间与组织分布之间的三维定量关系;其次,通过体腔暴露实验监测皮肤渗出率,解析 NPs 经皮排出的动力学特征;最后,通过土壤微宇宙实验,比较封口与未封口处理条件下蚯蚓体内 NPs 的分布差异,定量区分经皮吸收和经口摄入对 NPs 生物累积的相对贡献。

1 材料与方法

1.1 聚苯乙烯纳米塑料(PS NPs)的表征与定量分析方法

采用去离子水对 Eu 标记 PS NPs 分散液(上海百渝流体设备有限公司)进行稀释。随后,利用扫描电子显微镜(SEM, Zeiss-Supra55, 蔡司, 德国)对沉积于硅片上并经喷金处理的 NPs 微观形貌和粒径分布进行表征。借助高角环形暗场扫描透射电子显微镜(HAADF-STEM, Tecnai G2 F20, 菲达康, 美国)与 X 射线能谱仪(EDS, AZtec X-Max 80T, 牛津, 英国),分析沉积于铜网碳膜表面的 NPs 内部元素分布情况。通过 ICP-MS 仪(NexION 300X, 珀金埃尔默, 美国)测定 NPs 中 Eu 的含量。在进行 ICP-MS 分析前,将 1 mL 梯度稀释的 NPs 分散液($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\sim 1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)与 3 mL 浓硝酸和 2 mL 30%过氧化氢(均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司)混合,并置于微波加速消解仪(Ethos UP, 麦尔斯通, 意大利)中进行消解。消解程序设定为:温度从 20 °C 上升至 160 °C,耗时 20 min,随后保持 160 °C 恒温 10 min,再冷却至 25 °C。取出样品后,用去离子水定容至 50 mL,并经 0.22 μm 滤膜(直径 13 mm;上海安谱科技股份有限公司)过滤后于 4 °C 保存。该方法可实现 NPs 的完全分解,使 Eu 充分溶出。此外,将 Eu 标准溶液(购自国家有色金属及电子材料分析测试中心)梯度稀释后进行 ICP-MS 测定,并根据 Eu 标准曲线($1\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)分析不同浓度 NPs 对应的 Eu 元素浓度,以计算 NPs 中 Eu 的质量分数。将 NPs 分散液($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)在室温下静置 10 d 后,采用 1 000 Da 超滤膜进行过滤。再使用 4 mL 硝酸和硫酸混合液(体积比为 8:1)对滤膜上的 NPs 进行消解,消解方法同前述步骤。通过 ICP-MS 分别测定超滤液和消解液中 Eu 的含量,并与未超滤处理的 NPs 消解液中 Eu 的含量进行对比,计算出 Eu 的回收率和溶出率。

1.2 供试土壤和动物

以采自中国科学院常熟农业生态实验站的乌栅土(属于脱潜水稻土)为基质培养蚯蚓。将采集的土壤样品自然风干后,通过 2 mm 筛孔进行筛分,并储存备用。在使用前两周,向土壤样品中加入去离子水,调节其含水率至 $30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,以活化土壤性质。将 180 mL 浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NPs 分散液滴加至 600 g 土壤中,经自然晾干后研磨混匀,并重新加入去离子水恢复其含水率,制备出 NPs 添加量为 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的土壤样品。实验所用威廉腔环蚓(*M. guillelmi*)购自句容蚯蚓养殖场。挑选健康成年个体,并在未添加 NPs 的土壤中驯养至少 14 d。在 NPs 暴露实验开始前,将蚯蚓取出并清洗体表,随后置于湿润滤纸上,在 20 °C 黑暗环境中进行 48 h 的清肠处理,期间清理排泄物以确保实验条件的一致性。

1.3 蚯蚓暴露实验

随机选取已完成清肠处理且体重相近的蚯蚓,分别采用三种方式进行暴露。实验流程如图 1 所示,具体操作如下:

1.3.1 皮肤暴露实验 将蚯蚓单独转入垫有湿润滤纸的培养皿中(每皿 1 条),向不同培养皿中蚯蚓体表(背部避开口部)缓慢滴加 200 μL 不同浓度的 NPs 分散液(100 和 1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),对应暴露剂量分别为 20 和 200 μg 。确保 NPs 分散液被蚯蚓充分吸收后,将其置于 22 °C 黑暗环境中进行培养。暴露 3、6、12 和 24 h 后取出蚯蚓,每个处理组包含 1 条蚯蚓,并设置四个平行样本。

1.3.2 体腔暴露实验 将蚯蚓置于 -20 °C 冷冻 15 min 使其麻醉,采用微量注射器(50 μL , 汉密尔顿, 德国)分别抽取 50 μL 不同浓度的 NPs 分散液(400 和 4 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),横向轻轻刺入蚯蚓环带后 1~2 体节的表皮内,对其进行体腔注射,注射剂量(20 和 200 μg)与皮肤

暴露剂量保持一致。注射完成后,立即用医用组织胶水(3M,美国)封闭针孔,以防止液体渗出导致 NPs 损失。随后将蚯蚓放入垫有湿润滤纸的培养皿中(每皿 1 条),并在 22 °C 黑暗环境中培养。暴露 3、6、12 和 24 h 后取出蚯蚓,每个处理组包含 1 条蚯蚓,并设置四个平行样本。

1.3.3 经口暴露实验 将蚯蚓口器侵入组织胶水(博朗,德国)中 30 s 后取出,待胶水凝固后,其口器被封闭,从而阻断土壤 NPs 的经口暴露途径。将 5 条封口处理和 5 条未封口处理的蚯蚓共同放入添加了 18 mg NPs 的 600 g 土壤中,在 22 °C 黑暗环境中培养 3、6、12、18 和 24 h 后取出,每个处理组包含 10 条蚯蚓,并设置四个平行样本。

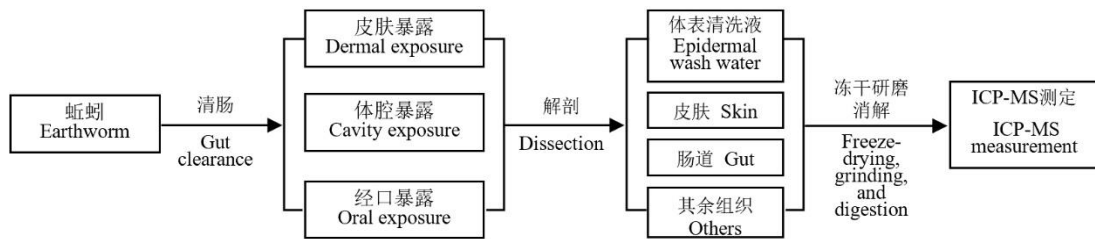


图 1 纳米塑料对蚯蚓的皮肤暴露、体腔暴露及经口暴露实验流程简图

Fig. 1 Schematic workflow for dermal exposure, body cavity exposure, and oral exposure of earthworms to nanoplastics

1.4 蚯蚓样品中 NPs 的定量分析

经 NPs 暴露不同时间后,将蚯蚓取出并用去离子水清洗体表,之后将蚯蚓置于无水乙醇中处死,并进行解剖操作。分别收集蚯蚓的皮肤、肠道及其余组织(口、咽、食管、砂囊和胃等样品合并),并对各部分进行冻干处理及称重。对于同一处理组的相同器官组织样品,将其合并;针对生物量较高的皮肤样品,进一步进行研磨混匀。称取小于 0.1 g 样本,采用王水(含 6 mL 体积分数为 38% 的盐酸和 2 mL 体积分数为 69% 的硝酸)并借助微波加速消解仪进行消解处理。具体消解程序设定为:在 20 min 内将温度从 20 °C 升至 175 °C,保持 175 °C 恒温 10 min,随后冷却至少 50 min 或直至温度降至 25 °C 以下,取出样品并定容至 40 mL。最后,利用 ICP-MS 分别测定各样品中 Eu 元素的含量,并根据 NPs 中 Eu 的质量分数换算各器官组织内 NPs 的含量。对于皮肤和体腔暴露的蚯蚓,收集其体表清洗水。按照 1.1 节所述方法对清洗水进行消解处理,测定其中 Eu 元素的含量,换算为蚯蚓体表 NPs 的残留量或排出量,并除以暴露剂量得到皮肤渗透率(渗入率或渗出率)。

1.5 蚯蚓皮肤吸收 NPs 的原位观察

对于经皮肤暴露(200 µg)处理的蚯蚓,在完成清肠操作后,清洗其体表并将其置于无水乙醇中处死。随后对蚯蚓进行解剖,剥离皮肤组织,并将组织放入 2.5% 戊二醛溶液中固定 30 min。之后依次使用体积分数为 30%、50%、70%、80%、90% 和 100% 的乙醇溶液各处理 15 min,以完成梯度脱水。待乙醇完全挥发后,将样品粘附于导电胶上并进行喷金处理,最后利用 SEM 观察皮肤内侧是否存在 NPs。

1.6 数据统计分析

采用单因素方差分析结合 Tukey 检验,比较不同处理组中蚯蚓各器官组织内 NPs 含量的显著性差异,统计学意义标准为 $P < 0.05$ 。统计分析通过 SPSS 17.0 完成。除非另有说明,数据均以四个重复样本计算所得的平均值 \pm 标准偏差形式表示。

2 结果与讨论

2.1 Eu 标记 PS NPs 的微观结构组成

本研究首先对购买的 PS NPs 进行了系统的表征分析,结果如图 2 所示。从 SEM 图像(图 2a)中可看出,NPs 呈现规则的球形结构,其平均直径为 128 ± 6 nm ($n = 91$,图 2b)。较低的标准偏差及多分散指数(0.08)表明粒径分布具有良好的均匀性。HAADF-STEM 成像结果(图 2c)进一步验证了纳米颗粒的球形特征,且粒径大小与 SEM 成像结果一致。此外,通过 EDS 成像分析(图 2d),发现碳(C)元素在整个纳米颗粒中均匀分布,而 Eu 元

素呈散落分布状态。该结果表明 Eu 元素是以掺杂的形式引入 PS 基体中,从而实现标记功能。通过消解处理并结合 ICP-MS 分析,发现 NPs 与其所含 Eu 元素的质量浓度之间呈现出正相关线性关系 ($y=0.02x-3.6$, $R^2=0.9994$)。基于此结果,进一步计算出 NPs 中 Eu 元素的掺杂比例为 $1.7\% \pm 0.2\%$ 。因此,通过测定样品中 Eu 元素的含量,可实现对 NPs 含量的准确推算。此外,通过对以去离子水为背景溶液的 NPs 分散液进行超滤处理,测定得到 Eu 的溶出率为 0.03%,表明 Eu 标记具有良好的稳定性。

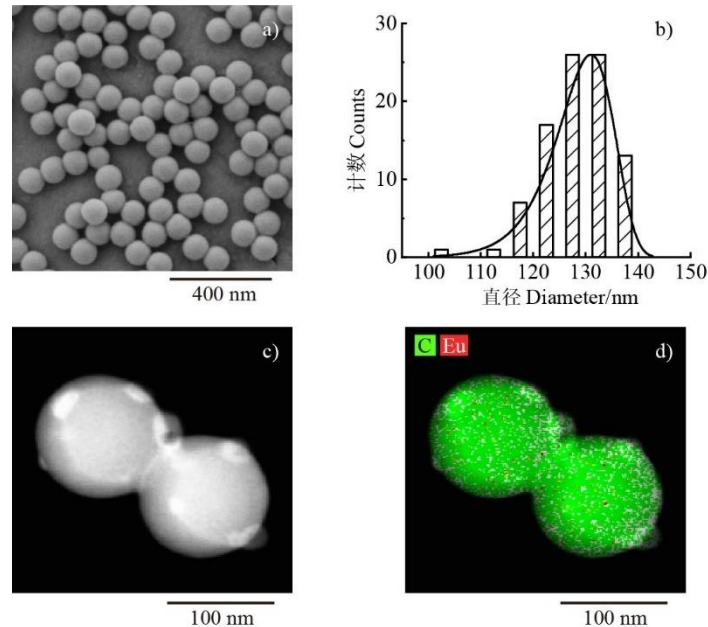
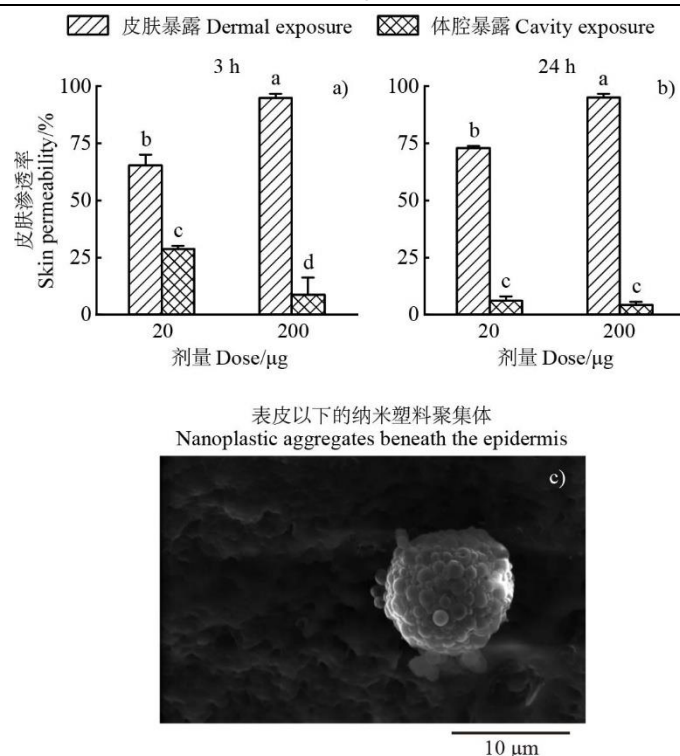


图2 铕 (Eu) 标记聚苯乙烯纳米塑料的扫描电镜图像 (a)、粒径分布 (b)、高角环形暗场扫描透射电镜图像 (c) 及 X 射线能谱元素 (C 和 Eu) 分布图像 (d)

Fig. 2 Scanning electron microscopic image (a), particle size distribution (b), and high-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopic image (c) of Eu-labeled polystyrene nanoplastics and elemental mapping for C and Eu by energy dispersive X-ray spectroscopy (d)

2.2 蚯蚓能够吸收其体表滴加的 NPs

通过在蚯蚓体表滴加 NPs 分散液,并监测不同时间点体表清洗水中 NPs 的含量,研究了 NPs 在蚯蚓皮肤上的吸收动力学特性。如图 3a、图 3b 所示, NPs 的皮肤渗入率在 3 h 内迅速提高至 $65.4\% \pm 4.7\%$ ($20\text{ }\mu\text{g}$) 和 $94.7\% \pm 2.1\%$ ($200\text{ }\mu\text{g}$), 随后在 24 h 时缓慢增加至 $73.0\% \pm 0.9\%$ ($20\text{ }\mu\text{g}$) 和 $95.0\% \pm 1.6\%$ ($200\text{ }\mu\text{g}$)。上述结果表明,蚯蚓皮肤能够吸收大部分 NPs,且吸收率随着暴露剂量的增加而显著提高。为进一步验证 NPs 的表皮穿透行为,对蚯蚓皮肤样品进行了 SEM 表征。由图 3c 可看出,在表皮下方可观察到 NPs,表明其已穿透表皮屏障。基于上述实验数据推测,蚯蚓皮肤对 NPs 的吸收呈现快速和慢速两阶段特征,这种吸收行为可能与 NPs 在皮肤表面赋存形态的变化密切相关。在初期 ($<3\text{ h}$),当 NPs 分散液滴加于蚯蚓体表时,浓度梯度驱动的被动扩散机制占主导地位,大多数颗粒可随水流迅速跨越表皮屏障,表现为快速吸收。在后期 ($3\sim 24\text{ h}$),由于表皮分泌的黏液形成黏滞阻力,以及 NPs 发生聚集现象,显著抑制了扩散速率和跨膜转运效率,从而导致吸收速率减缓。SEM 图像中,表皮下方存在微米尺度的 NPs 聚集体,揭示了黏液介导的聚集效应。值得注意的是, NPs 虽聚集但保持球形,表明其未发生化学降解。因此,蚯蚓皮肤对 NPs 的吸收过程受到物理扩散机制及黏液介导的聚集效应的共同调控。



注：柱状图上不同字母代表显著性差异。下同。Note: Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

图3 蚯蚓皮肤或体腔暴露3 h (a) 和24 h (b) 后纳米塑料的皮肤渗透率及皮肤暴露3 h 后的扫描电镜图像 (c)

Fig. 3 Skin permeability of nanoplastics in earthworms after exposure of the skin or body cavity for 3 h (a) and 24 h (b), and scanning electron microscopic image of the skin following 3 h of exposure (c)

通过系统分析 NPs 经皮肤暴露后在蚯蚓体内的动态分布特征, 发现其转运过程呈现明显的剂量依赖性。在低剂量 ($20 \mu\text{g}$) 暴露 3 h 的情况下, 可在蚯蚓的皮肤、肠道及余组织中检测到 NPs (图 4a), 说明 NPs 已突破皮肤屏障进入循环系统。其中, 肠道中 NPs 的积累量 ($11.0 \pm 2.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 显著高于皮肤 ($3.1 \pm 1.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 和余组织 ($2.5 \pm 0.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。随着皮肤暴露剂量增至 $200 \mu\text{g}$, 各组织中 NPs 的含量分别提高了 1.5 倍 (皮肤: $4.8 \pm 0.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)、1.6 倍 (肠道: $17.9 \pm 4.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 和 2.3 倍 (余组织: $5.8 \pm 2.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) (图 4b)。该增幅差异反映了不同器官对 NPs 的蓄积能力存在差异。与低剂量相比, 高剂量下 NPs 组织含量的平均增幅 (1.8 倍) 与其皮肤渗透率的增幅 (1.4 倍) 接近 (图 3a), 表明 NPs 在蚯蚓体内的转运主要受皮肤渗透效率的调控。然而, 当暴露时间延长至 24 h, 各组织中 NPs 的含量并未出现显著变化 (图 4c, 图 4d), 可能与皮肤对 NPs 的慢速吸收以及机体对 NPs 的缓慢清除机制有关。值得注意的是, NPs 在蚯蚓体内的分布表现出显著的器官选择性, 其中肠道是主要的积累器官。该特性可能与肠道具有较大的表面积、富含消化液和微生物群落密切相关^[28]。消化液中的蛋白质和微生物胞外聚合物可能通过促进 NPs 的聚集^[29-30], 进一步增强其在肠道中的吸附和滞留能力。

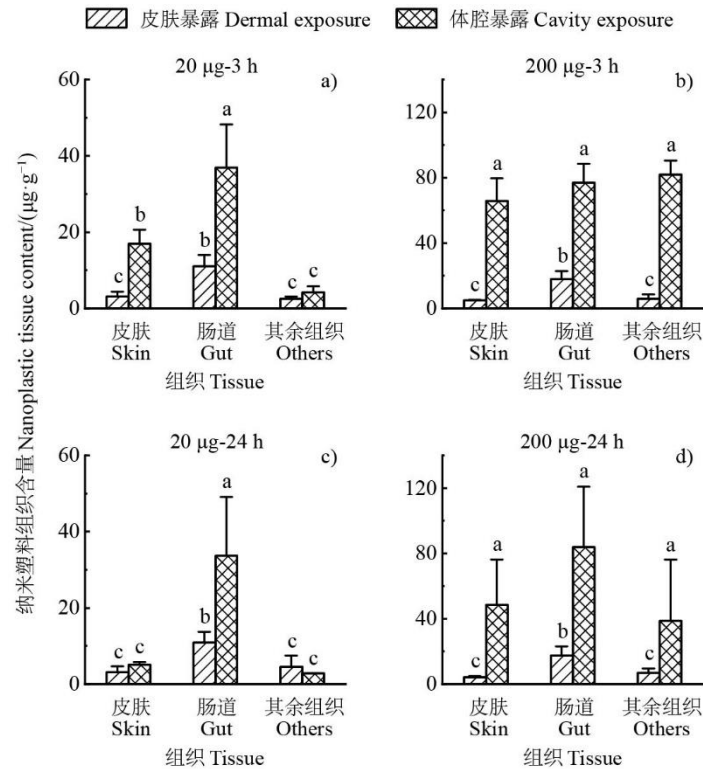


图4 蚯蚓皮肤或体腔暴露3 h (a, b) 和24 h (c, d) 后各组织中纳米塑料的含量
Fig. 4 Tissue content of nanoplastics in earthworms after exposure of the skin or body cavity for 3 h (a, b) and 24 h (c, d)

2.3 蚯蚓可从皮肤排出其体内注入的 NPs

通过向蚯蚓体腔注射 NPs 分散液, 系统监测了体表清洗水中 NPs 含量随时间的变化规律, 研究了 NPs 通过蚯蚓皮肤排出的动力学特征。如图 3a、图 3b 所示, NPs 在 3 h 内的皮肤渗出率呈现出显著的剂量依赖性差异: 低剂量组 (20 µg) 的渗出率为 $28.7\% \pm 1.4\%$, 而高剂量组 (200 µg) 仅为 $8.6\% \pm 7.6\%$ 。至 24 h 时, 两组的渗出率分别降至 $6.2\% \pm 1.7\%$ 和 $4.3\% \pm 1.4\%$ 。上述结果表明, NPs 皮肤排泄呈现初期快速响应和后期持续衰减的双相动力学特征。NPs 可能通过两条途径排出: 体壁背孔直接渗出和小肾管 (其排泄管直接连通体腔) 过滤排泄。值得注意的是, NPs 通过皮肤的渗入率显著高于渗出率, 这表明皮肤在 NPs 代谢中的主要功能是吸收而非排泄。皮肤渗出率随体腔暴露时间降低的现象, 可能与排出的 NPs 被重新吸收有关。此外, 在体腔暴露条件下, NPs 的皮肤渗出率与剂量呈负相关关系, 而该趋势与皮肤暴露时观察到的正相关关系形成鲜明对比。这种逆转可能源于 NPs 的不同分配模式, 在皮肤暴露条件下, NPs 仅与皮肤相互作用; 而在体腔暴露条件下, NPs 需在肠道、皮肤及其他器官间动态分配, 显著降低了皮肤排泄占比。

蚯蚓经体腔暴露后 NPs 的组织分布结果 (图 4) 显示, 低剂量组 (20 µg) 中 NPs 呈现器官选择性分布特征。肠道中的 NPs 含量 (3 h: $36.9 \pm 11.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 24 h: $33.6 \pm 15.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 显著高于皮肤 (3 h: $16.9 \pm 3.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 24 h: $5.1 \pm 0.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 及其余组织 (3 h: $4.2 \pm 1.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 24 h: $2.8 \pm 0.01 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。当暴露剂量提升至 200 µg 时, 各组织中的 NPs 含量均显著增加, 且分布趋于均质化。此时, 肠道 (3 h: $77.0 \pm 11.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 24 h: $84.0 \pm 36.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)、皮肤 (3 h: $65.7 \pm 13.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 24 h: $48.7 \pm 27.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 及其他组织 (3 h: $82.0 \pm 8.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 24 h: $38.7 \pm 37.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 中的 NPs 含量差异逐渐缩小。值得注意的是, 体腔注射 3 h 内即可在各组织中检测到 NPs, 表明其能通过体腔液快速转运至全身, 并可能通过肠上皮细胞的内吞作用突破肠道屏障后而排出体外。除 20 µg 暴露 24 h 的皮肤和其余组织外, 所有组织中的 NPs 含量均显著高于皮肤暴露组 (图 4), 该结果与体腔暴露组中较低的皮肤渗出率 (图 3) 形成互证。

2.4 皮肤吸收是蚯蚓摄入土壤 NPs 的重要途径

为了探究皮肤吸收在蚯蚓摄入土壤 NPs 中的贡献, 通过组织胶水对蚯蚓进行封口处理,

构建单一皮肤暴露模型, 并与未封口的蚯蚓(皮肤+摄食暴露)共同置于同一土壤环境中 24 h, 监测各组织中 NPs 含量分布的变化。结果显示, 组织胶水能够在暴露期间有效保持蚯蚓口部闭合状态, 同时其运动行为与未经封口处理的蚯蚓无显著差异。NPs 在蚯蚓各器官组织中的分布结果如图 5a、图 5b 所示。在土壤中暴露 3 h 后, 封口蚯蚓(或未封口蚯蚓)皮肤、肠道和其余组织中 NPs 的含量分别为 $8.4 \pm 0.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (或 $8.5 \pm 1.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)、 $19.9 \pm 0.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (或 $24.5 \pm 11.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 和 $17.9 \pm 6.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (或 $26.0 \pm 4.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。由此可见, 封口处理并未显著影响蚯蚓对 NPs 的摄入量。即使蚯蚓不能摄食, 其皮肤仍暴露于土壤中的 NPs, 这些纳米颗粒能够通过皮肤渗入蚯蚓体内。随着暴露时间延长至 24 h, 未封口蚯蚓皮肤和肠道中 NPs 的含量分别增加了 1.9 倍 ($15.9 \pm 8.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 和 1.5 倍 ($37.3 \pm 12.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), 而其余组织中 NPs 的含量则降低了 21.9% ($20.3 \pm 4.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。相比之下, 封口蚯蚓除皮肤外的组织中 NPs 含量显著低于未封口蚯蚓, 其中肠道含量减少了 67% ($12.3 \pm 5.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。该现象与未封口蚯蚓具有额外的摄食功能直接相关。进一步比较封口与未封口蚯蚓全身积累量的差异, 计算得出皮肤吸收和摄食两种途径对 NPs 累积的相对贡献。如图 5c 所示, 当暴露时间从 3 h 延长至 24 h 时, 经口摄入量占比从 29.4% 升至 62.5%, 而经皮摄入量占比则从 70.3% 降至 37.4%。这些结果表明 NPs 摄入机制具有时间依赖性特征, 初期(<3 h)以皮肤渗透为主导, 后期则转为摄食主导。这种转化可能与表皮接触的 NPs 饱和效应及肠道持续富集能力有关。由于表皮外暴露剂量始终高于肠道内暴露剂量, 导致皮肤吸收途径在早期暴露中的主导作用。

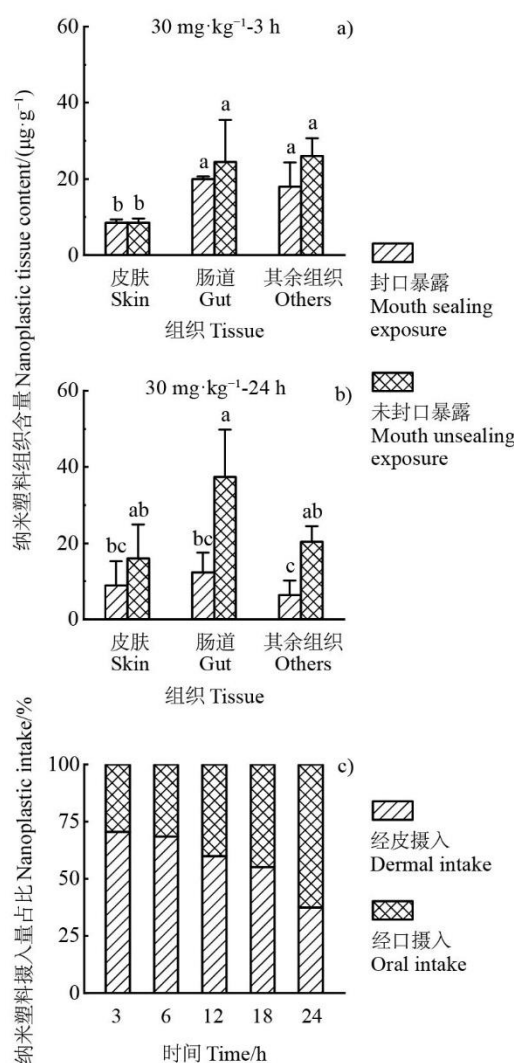


图 5 封口与未封口蚯蚓暴露于土壤 3 h (a) 和 24 h (b) 后各组织中纳米塑料的含量

Fig. 5 Tissue content of nanoplastics in earthworms (with or without mouth sealing treatment) exposed to soil for 3 h (a) and 24 h (b), and the relative contribution of oral and dermal intake (c)

3 结 论

蚯蚓在评估土壤 NPs 生态风险方面具有重要指示作用, 而精准的定量分析方法对于揭示 NPs 对蚯蚓的暴露途径至关重要。本研究创新性地采用 Eu 标记结合痕量金属分析技术, 突破了传统检测方法的局限性, 实现了对蚯蚓通过皮肤、体腔和摄食三种方式暴露后 NPs 残留量的精确定量分析, 并揭示了 NPs 在土壤-蚯蚓界面的传输机制。皮肤暴露结果表明, NPs 能够穿透蚯蚓表皮屏障, 皮肤吸收动力学呈现双相模式: 初期 (0~3 h) 快速吸收阶段, 主要由浓度梯度驱动的被动扩散主导; 后期 (3~24 h) 则进入慢速吸收阶段, 受到表皮黏液层阻力和 NPs 聚集效应的显著抑制。体腔暴露研究发现, NPs 通过皮肤排泄的过程同样表现出双相特征, 即快速清除 (3 h 内达 $28.7\% \pm 1.4\%$) 和缓慢衰减。NPs 的皮肤渗出率显著低于皮肤渗入率, 这表明皮肤在 NPs 代谢过程中主要发挥吸收功能。综合封口实验结果, 进一步明确了 NPs 摄入途径的时间依赖性转变规律: 暴露初期 (<3 h) 以皮肤渗透为主 (占比 70.3%), 而 24 h 后则转为摄食主导 (占比 62.5%)。值得注意的是, NPs 的皮肤渗透效率表现出明显的剂量依赖性, 其在蚯蚓体内呈现器官特异性蓄积特征, 其中肠道是最主要的靶器官。上述发现为深入理解纳米污染物在土壤生态系统中的生物地球化学循环提供了重要的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] He L Y, Li Z B, Jia Q, et al. Soil microplastics pollution in agriculture[J]. *Science*, 2023, 379(6632): 547-547.
- [2] Rillig M C, Lehmann A. Microplastic in terrestrial ecosystems[J]. *Science*, 2020, 368(6498): 1430-1431.
- [3] Su Y, Hu X, Tang H J, et al. Steam disinfection releases micro(nano)plastics from silicone-rubber baby teats as examined by optical photothermal infrared microspectroscopy[J]. *Nature Nanotechnology*, 2022, 17(1): 76-85.
- [4] Guo J J, Huang X P, Xiang L, et al. Source, migration and toxicology of microplastics in soil[J]. *Environment International*, 2020, 137: 105263.
- [5] Liu R H, Wang Y H, Zhao J, et al. Microplastics pollution in soil and the potential ecological health risks[J]. *Environmental Chemistry*, 2022, 41(10): 3214-3230. [刘锐涵, 王艳华, 赵建, 等. 土壤微塑料污染与生态健康风险[J]. *环境化学*, 2022, 41(10): 3214-3230.]
- [6] Yang J, Li L Z, Zhou Q, et al. Microplastics contamination of soil environment: Sources, processes and risks[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58(2): 281-298. [杨杰, 李连祯, 周倩, 等. 土壤环境中微塑料污染: 来源、过程及风险[J]. *土壤学报*, 2021, 58(2): 281-298.]
- [7] Scheurer M, Bigalke M. Microplastics in Swiss floodplain soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(6): 3591-3598.
- [8] Fuller S, Gautam A. A procedure for measuring microplastics using pressurized fluid extraction[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(11): 5774-5780.
- [9] Yu L, Zhang J D, Liu Y, et al. Distribution characteristics of microplastics in agricultural soils from the largest vegetable production base in China[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 756: 143860.
- [10] Mitrano D M, Wick P, Nowack B. Placing nanoplastics in the context of global plastic pollution[J]. *Nature Nanotechnology*, 2021, 16(5): 491-500.
- [11] Kou S Q, Guan Z, Lu X Y, et al. Migration of microplastics in soil and its effect on organic pollutants: A review[J]. *Soils*, 2024, 56(3): 457-470. [寇诗棋, 关卓, 鲁旭阳, 等. 土壤中微塑料迁移及其对有机污染物的影响研究进展[J]. *土壤*, 2024, 56(3): 457-470.]
- [12] Zhang L, Sun D, Zhang J Q, et al. Research progress on the migration of agricultural film microplastics and phthalates in soil[J]. *Soils*, 2024, 56(5): 938-947. [张蕾, 孙东, 张建强, 等. 农膜微塑料与酞酸酯在土壤中迁移的研究进展[J]. *土壤*, 2024, 56(5): 938-947.]

- [13] Rillig M C, Kim S W, Kim T Y, et al. The global plastic toxicity debt[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 55(5): 2717-2719.
- [14] Gigault J, El Hadri H, Nguyen B, et al. Nanoplastics are neither microplastics nor engineered nanoparticles[J]. Nature Nanotechnology, 2021, 16(5): 501-507.
- [15] Liu X B, Dong X S, Xie Z H, et al. Ecological effects and biodegradation of microplastics in soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(2): 349-363. [刘鑫蓓, 董旭晟, 解志红, 等. 土壤中微塑料的生态效应与生物降解[J]. 土壤学报, 2022, 59(2): 349-363.]
- [16] Kwak J I, An Y J. Microplastic digestion generates fragmented nanoplastics in soils and damages earthworm spermatogenesis and coelomocyte viability[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 402: 124034.
- [17] Wang L, Peng Y W, Xu Y L, 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.
- [18] Heinze W M, Mitrano D M, Lahive E, et al. Nanoplastic transport in soil via bioturbation by *Lumbricus terrestris*[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 55(24): 16423-16433.
- [19] Tang R G, Zhu D, Luo Y M, et al. Nanoplastics induce molecular toxicity in earthworm: Integrated multi-omics, morphological, and intestinal microorganism analyses[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 442: 130034.
- [20] Liu Y, Xu G H, Yu Y. Effects of polystyrene microplastics on accumulation of pyrene by earthworms [J]. Chemosphere, 2022, 296: 134059.
- [21] Wang J, Li J, Wang Q, et al. Microplastics as a vector for HOC bioaccumulation in earthworm *Eisenia fetida* in soil: Importance of chemical diffusion and particle size[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(19): 12154-12163.
- [22] Sun N, Hu S Y, Zhao X C, et al. Amplification of benzo[a]pyrene toxicity persistence in earthworms by polystyrene nanoplastics: From organismal health to molecular responses[J]. Journal of Hazardous Materials, 2025, 487: 137091.
- [23] Blanco F, Davranche M, Hadri H E, et al. Nanoplastics identification in complex environmental matrices: Strategies for polystyrene and polypropylene[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 55(13): 8753-8759.
- [24] Ivleva N P. Chemical analysis of microplastics and nanoplastics: Challenges, advanced methods, and perspectives[J]. Chemical Reviews, 2021, 121(19): 11886-11936.
- [25] Chen Y L, Sun K, Han L F, et al. Separation, identification, and quantification methods in soil microplastics analysis: A review[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(2): 364-380. [陈雅兰, 孙可, 韩兰芳, 等. 土壤中微塑料的分离及检测方法研究进展[J]. 土壤学报, 2022, 59(2): 364-380.]
- [26] Mitrano D M, Beltzung A, Frehland S, et al. Synthesis of metal-doped nanoplastics and their utility to investigate fate and behaviour in complex environmental systems[J]. Nature Nanotechnology, 2019, 14(4): 362-368.
- [27] Luo Y M, Li L Z, Feng Y D, et al. Quantitative tracing of uptake and transport of submicrometre plastics in crop plants using lanthanide chelates as a dual-functional tracer[J]. Nature Nanotechnology, 2022, 17(4): 424-431.
- [28] Sun M M, Chao H Z, Zheng X X, et al. Ecological role of earthworm intestinal bacteria in terrestrial environments: A review[J]. Science of The Total Environment, 2020, 740: 140008.
- [29] Lee G, Jhang Y J, Jhang Y T, et al. Artificial digestion represents the worst-case scenario for studying nanoplastic fate in gastrointestinal tract [J]. Journal of Hazardous Materials, 2025, 485: 136809.
- [30] Liu Y J, Yue T T, Liu L, et al. Molecular assembly of extracellular polymeric substances regulating aggregation of differently charged nanoplastics and subsequent interactions with bacterial membrane[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 457: 131825.

(责任编辑: 陈荣府)