

PBS 基共聚物及其模拟降解产物对赤子爱胜蚓 急性生态毒性的研究

张敏^{1,2}, 苏康宇¹, 李成涛¹, 陈倩茹¹, 闫珊珊¹, 李蓉¹

1. 教育部轻化工助剂化学与技术重点实验室, 陕西科技大学, 陕西 西安 710021; 2. 浙江温州轻工研究院, 浙江 温州 325003

摘要 采用滤纸接触法和自然土壤法, 通过急性毒性实验分别研究了 20 °C 时不同分子量 PBS(聚丁二酸丁二醇酯 poly(butylene succinate))基聚合物及其模拟降解产物二元酸、二元醇对赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)的存活和生长的影响。研究表明: 48 h 内二元酸、二元醇质量浓度在低于 3 400 mg·L⁻¹ 时对蚯蚓的存活没有影响, 滤纸接触法测得丁二酸、己二酸、1,4-丁二醇、1,6-己二醇对蚯蚓的 LC₅₀ 分别为: 3 523、3 402、74 907、18 160 mg·L⁻¹; 在自然土壤实验中, 相比空白实验, 蚯蚓在含有不同分子量、不同质量分数的 PBS 及 PBS-co-HS、PBS-co-BA 土壤中经过 14 d 的培养, 体质量明显增加, 且所有的蚯蚓没有任何病状或伤口出现。以上结果表明 PBS 基聚合物对该物种是安全的。

关键词: PBS; 生态毒性; 赤子爱胜蚓; LC₅₀; 体质量变化率

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2010) 10-2425-05

聚丁二酸丁二醇酯 (poly(butylene succinate, PBS) 等脂肪族聚酯具有良好的生物降解性、机械性能, 近年来受到世界的关注, 被认为是最有前景的绿色环保型高分子材料之一^[1-3]。但是由于此种固体材料废弃之后在土壤环境中的实际变化和迁移还不十分清楚, 在持续降解过程中是否对生态环境产生影响^[4-6], 还没有得到确切的证实, 目前只是对高分子材料的各种添加剂的毒理效应研究较多^[7]; 高分子废弃物对土壤环境的污染举足轻重, 是一个无法回避而又迫切的问题。

本研究采用赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*, OECD Guideline No. 207)进行聚酯的潜在毒性研究^[8]。蚯蚓是生态系统中的一个重要的组成部分, 对环境污染反馈快, 且已有多种研究表明: 蚯蚓对于持久性有毒污染物有良好的敏感性, 也具有独特的生物学特征。因此, 利用蚯蚓指示土壤污染状况, 已被作为土壤污染生态毒理诊断的一项重要指标^[9-12]。在本研究中, 采用滤纸接触法和自然土壤法研究 PBS 及其共聚物对蚯蚓的存活和生长的影响, 包括其行为、形态指标^[13], 为可生物降解高分子材料的环境友好评价提供生态急性毒性的基础数据和变化规律, 以期待为可生物降解高分子材料的进一步应用提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试化学品

PBS 及其共聚物不含添加剂, 聚丁二酸丁二醇

/己二酸丁二醇酯 (PBS-co-BA)、聚丁二酸丁二醇/丁二酸己二醇酯 (PBS-co-HS) 均为本研究室自制^[3,14-15], 以上聚合物的 M_n 为 5×10^4 ($M_w/M_n=1.95$)、7 000 ($M_w/M_n=1.88$) 2 种。丁二酸、1,4-丁二醇、己二酸、1,6-己二醇均为分析纯, 未经纯化处理。

1.1.2 供试土壤和蚯蚓

供试土壤采自陕西科技大学花园 0~20 cm 表土, 风干, 研细, 过筛 (10 目, 2 mm), 试验土壤为壤土^[16], 土壤有机质 11.81 g·kg⁻¹ (有机碳 6.85 g·kg⁻¹), 全氮 0.81 g·kg⁻¹, 全磷 0.79 g·kg⁻¹, 碱解氮 61.22 mg·kg⁻¹, 速效磷 15 mg·kg⁻¹, 速效钾 295.0 mg·kg⁻¹, pH=8.3, 质地属粉砂粘壤土, 密度 1.53 g·cm⁻³。

赤子爱胜蚓^[17-18]购于陕西迪隆生态环保技术有限公司, 在土壤中预培养 7 d, 选择体质量 300~600 mg, 环带明显, 大小基本一致的成蚓。

1.2 主要仪器设备

生化培养箱, 直径 9 cm 的硬质玻璃培养皿, 无灰定性滤纸, 塑料封口膜。

1.3 实验方法

1.3.1 滤纸接触法测二元酸、二元醇对蚯蚓的 LC₅₀

参照欧洲共同体 (Contact filter paper test, OECD-guideline No.207) 的滤纸接触法^[19], 将预培养后的蚯蚓洗净放入有滤纸的烧杯中, 加水至刚浸没滤纸为宜, 挑选有环带的健壮成蚓, 用塑料薄膜封口, 并扎孔通气, 置于恒温 (20±1) °C、相对湿度 75% 的生化培养箱中清肠 12 h, 然后冲洗干净并用

滤纸吸干体表水分。将 5 mL 不同质量浓度的二元酸、二元醇溶液加入有滤纸的培养皿中,待滤纸全部浸湿,放入 10 条处理过的蚯蚓,封口并扎孔通气,黑暗培养 48 h。记录 24、48 h 后蚯蚓存活及中毒症状,以蚓体对针刺无反应判为死亡。每个处理设置 4 个平行(CK、丁二酸和己二酸浓度梯度为 2 500、3 000、3 500、4 000、4 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1,4-丁二醇浓度梯度为 60 000、65 000、70 000、75 000、80 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1,6-己二醇浓度梯度为 15 000、18 000、20 000、25 000、30 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

1.3.2 自然土壤法测不同分子量 PBS 基聚合物对蚯蚓的急性毒性影响

为尽量模拟实际土壤环境中蚯蚓接触 PBS 基聚合物方式和途径,考察在真实土壤中 PBS 基聚合物对蚯蚓造成的影响,本研究将不同分子量 PBS 及共聚物以粉末状混入土壤,通过自然土壤法研究 PBS 及共聚物对蚯蚓的急性毒性影响。

蚯蚓在土壤中预培养 7 d,采用间歇光照(16 h 光照,8 h 黑暗)。聚合物的质量分数为:15 000、10 000、5 000、1 000、0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,再加入约为 0.25 倍土壤质量(以干质量计)的蒸馏水。每个质量分数梯度放 10 条预培养后的健康成蚓(体表无异物和水分),封口并扎孔通气,以保持湿度和空气的通透性。定期观察、记录在培养 3、7、11、14 d 后蚯蚓的生长状况,同时补水。

根据体质量变化率 $= (W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$ 考察蚯蚓在急性毒性实验中的体质量变化,其中 W_0 是初始蚯蚓体质量, W_t 是第 t 天时蚯蚓体质量($t=3、7、11、14$)。

2 结果与讨论

2.1 模拟降解产物对蚯蚓的急性毒性效应

本实验表 1 所示,模拟降解产物二元酸、二元醇对蚯蚓急性毒性明显不同,分别表现出不同的中毒症状。在二元酸处理组中,蚯蚓刚接触滤纸就开始出现剧烈弹跳扭动现象,并有黄色液体渗出;随时间延长,蚯蚓环节松弛,身体变柔软,部分糜烂,有浓烈的腐臭味,多条蚯蚓蜷缩在一起,并逐渐失去逃逸能力,直至死亡。在二元醇处理组中,蚯蚓刚接触滤纸就积极寻找出口逃逸;随时间延长,少数蚯蚓体表会渗出黄色液体,表皮仍有光泽,但环节变得不明显,身体变柔软,并逐渐丧失逃逸能力,多条蚯蚓并列盘在滤纸上,死亡的蚓体呈极度伸长状态。总之,24 h 时蚯蚓对外界刺激很敏感,体表有液体渗出,身体呈伸长状态,低质量浓度处理组中蚯蚓中毒症状在一定程度上趋于缓和,高质量浓度组的蚯蚓活动性弱;48 h 后的蚯蚓基本失去逃逸能力,直至死亡。

表 1 模拟降解产物对赤子爱胜蚓急性毒性实验结果

Table 1 The effect of acute ecotoxicity of simulated degradation products on earthworm *Eisenia fetida*

模拟降解产物	质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	不同处理时间的死亡数		48 h 死亡率/%
		24 h	48 h	
丁二酸	0(CK)	0	0	0
	2 500	0	0	0
	3 000	1	3	30
	3 500	2	4	40
	4 000	5	8	80
	4 500	7	10	100
己二酸	0(CK)	0	0	0
	2 500	0	0	0
	3 000	3	4	40
	3 500	4	5	50
	4 000	5	7	70
	4 500	8	10	100
1,4-丁二醇	0(CK)	0	0	0
	60000	0	0	0
	65000	0	1	10
	70000	0	2	20
	75000	0	4	40
	80000	1	10	100
1,6-己二醇	0(CK)	0	0	0
	15000	0	0	0
	18000	1	5	50
	20000	2	7	70
	25000	6	9	90
	30000	7	10	100

酸和醇对蚯蚓的急性毒性有很大不同,酸的毒性明显大于醇,可能是由酸和醇的化学结构和产生毒性作用机制不同引起的;也可能是由于酸、醇的侵入途径不同及其在蚯蚓体内分布吸收速度不同所致。蚯蚓对酸类毒性反应极为快速,接触后立刻产生扭动现象。由此可以推断:二元酸对赤子爱胜蚓的染毒是以皮肤渗入为主,其通过皮肤对蚯蚓产生的毒性很强。而二元醇通过皮肤对蚯蚓产生的毒性则不如二元酸快,其染毒方式可能以食入为主。

对实验数据进行 Origin 7.5 统计分析,得到蚯蚓死亡率(Y)与丁二酸质量浓度对数(X_1)、己二酸质量浓度对数(X_2)、1,4-丁二醇质量浓度对数(X_3)、1,6-己二醇质量浓度对数(X_4)对蚯蚓模拟的急性毒性方程如下:

$Y=6\ 245.810-1\ 697.950X_1+115.012X_1^2$,其显著水平 $P=0.023$,计算得丁二酸对蚯蚓 48 h 的理论值 LC_{50} 为 $3\ 523\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;

$Y=200.688-194.483X_2+21.636X_2^2$, $P=0.032$,计算得己二酸对蚯蚓 48 h 的理论值 LC_{50} 为 $3\ 402\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;

$Y=198\ 526.346-35\ 935.338X_3+1\ 626.170X_3^2$, $P=$

0.036, 计算得 1,4-丁二醇对蚯蚓 48 h 的理论值 LC_{50} 为 $74\ 907\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;

$Y = -24\ 034.006 + 4\ 700.675X_4 - 228.905X_4^2$, $P = 0.004$, 计算得 1,6-己二醇对蚯蚓 48 h 的理论值 LC_{50} 为 $18\ 160\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

在急性毒性期, 蚯蚓的死亡率随丁二酸、己二酸、1,4-丁二醇、1,6-己二醇质量浓度增加而升高(图 1)。 R^2 越接近于 1, 表示拟合优度越高, 即模拟的毒性方程能很好的反应酸、醇对蚯蚓急性毒性的质量浓度-效应关系; 显著水平 P 值均小于 0.05, 表示拟合效果较好, 所求毒性方程具有统计学意义。从以上方程统计结果也得到酸类对蚯蚓的毒性大于醇类, 但是酸、醇的最低 LC_{50} 要高于 $3\ 400\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 而现实中可生物降解材料的降解产物质量浓度不可能达到^[9], 因此不会威胁该物种的安全。

2.2 自然土壤法

蚯蚓急性毒性土壤法中空白组蚯蚓在第 3、7、11、14 d 的体质量变化率分别为 11.6%、11.4%、1.6%、-2.0%(差异性显著水平 $P < 0.05$), 表明了 14 d 内本实验条件可以满足维持蚯蚓正常生长的需要。

不同分子量、不同质量浓度的聚合物对蚯蚓体质量变化的影响见图 2。蚯蚓在混有 M_n 为 5×10^4 的聚合物的土壤中: PBS 不同质量分数处理组的第 3、7 d(前期) 体质量均下降; 而在第 11、14 d(后期) PBS

高质量浓度处理组体质量显著下降, 而较低质量浓度处理组体质量有增长趋势。PBS-co-HS 不同质量浓度处理组在 14 d 内体质量均显著增加。PBS-co-BA 高质量浓度处理组在 14 d 内体质量显著增加, 低质量浓度处理组在实验后期体质量有增加趋势。

蚯蚓在混有 M_n 为 7×10^3 的聚合物土壤中: PBS 不同质量分数处理在前期蚯蚓体质量变化不规律, 但在后期蚯蚓体质量均有增加趋势。PBS-co-HS、PBS-co-BA 处理对蚯蚓体质量在实验后期普遍呈增加现象。

蚯蚓的这种体质量增加趋势可能是由于蚯蚓的生活习性, 如味觉灵敏、喜甜食和酸味, 土壤中含有聚合物 PBS 及 PBS-co-HS、PBS-co-BA 可能会刺激蚯蚓的味觉而出现体质量增加现象。此外土壤中聚合物粉末可能助于大颗粒形式土壤团粒结构的形成, 因此土壤保水能力和透气性提高, 利于蚯蚓生长。由于外在影响因素也较多, 如土壤性质(pH 值、有机质质量分数)等, 其原因有待进一步研究。

3 结论

(1) 滤纸接触法实验中, 在 $20\ ^\circ\text{C}$ 、相对湿度 75% 条件下, 二元酸、二元醇对蚯蚓的急性毒性具有不同的毒性响应, 酸类对蚯蚓的 LC_{50} 大于醇类。其毒性大小顺序为: 己二酸 > 丁二酸 > 1,6-己二醇 > 1,4-丁二醇。PBS 基共聚物的模拟降解产物的质量浓度在

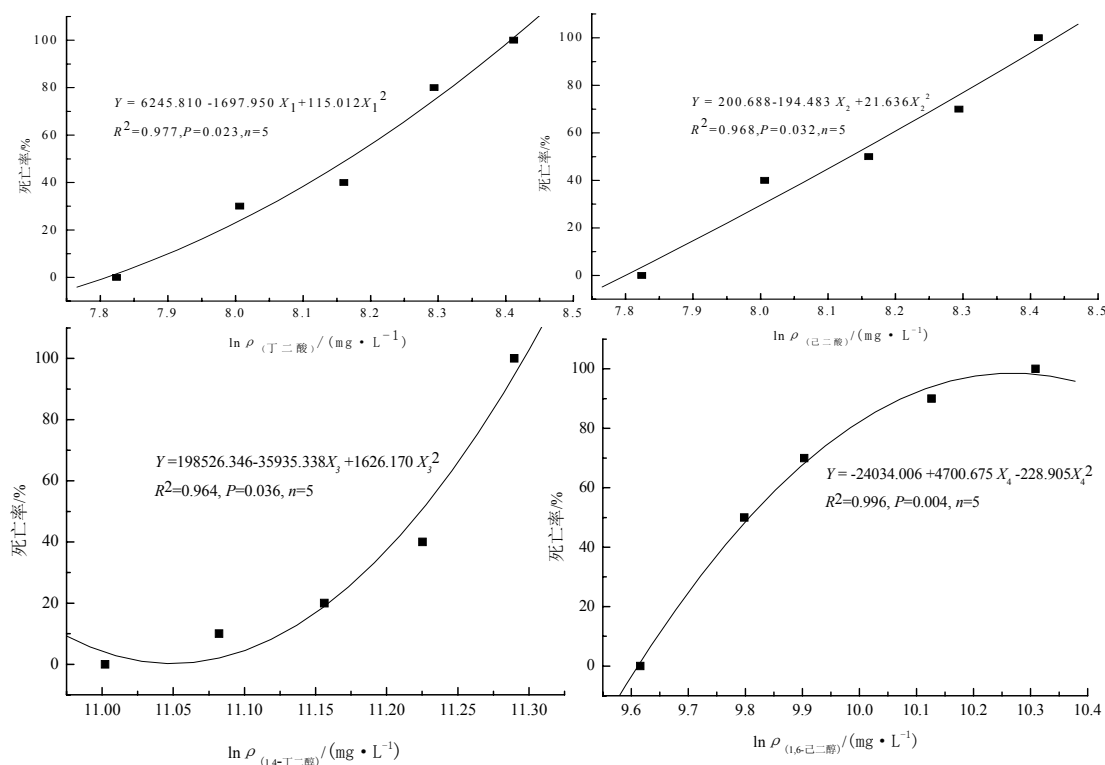


图 1 二元酸、二元醇对蚯蚓的 48 h 毒性效应

Fig.1 The effect of acute ecotoxicity of diacids and diols on earthworm *Eisenia fetida* in 48 hours

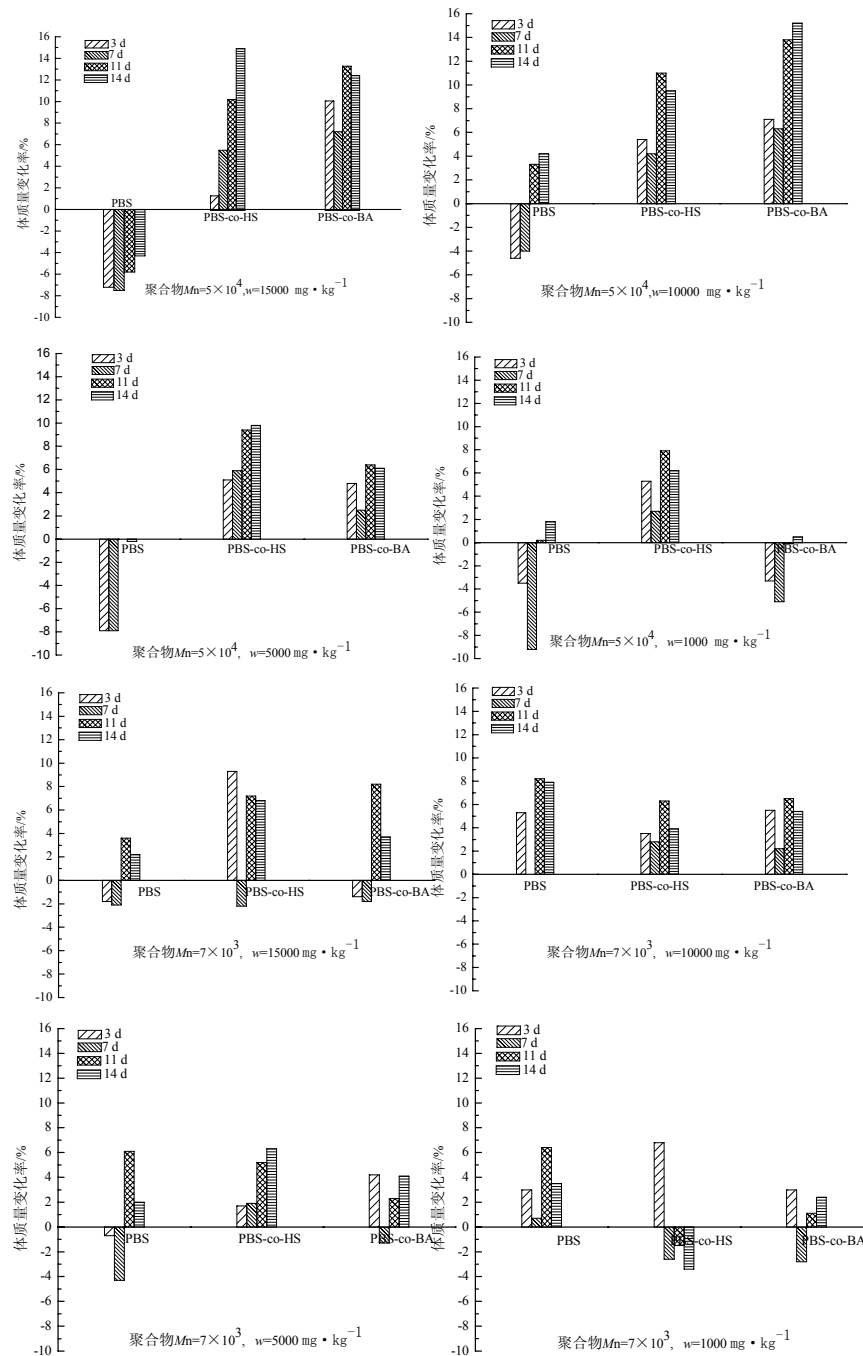


图 2 不同质量分数、不同分子量聚合物对蚯蚓 14 d 体质量变化的影响

Fig.2 The effect of weight change on earthworm of PBS-based copolymer with different M_n and different mass fraction after cultured for 14 days

低于 $3400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时不会威胁赤子爱胜蚓的存活。

(2)在含有不同分子量、不同质量分数的 PBS 及 PBS-co-HS、PBS-co-BA 土壤中,蚯蚓的体质量呈增加趋势。此外,PBS 改性共聚物比 PBS 对蚯蚓体质量影响较大,并认为 PBS 基聚合物对该物种是安全的。自然土壤法与急性滤纸接触法试验相对比,更能反映出蚯蚓在接近真实环境中的毒性反应。真实土壤中的聚合物的质量分数比较低,对蚯蚓的影响是长期的,所表现出的反应和短期毒性试验测试的结果还是存在差异的。

PBS 基共聚物及其模拟降解产物对赤子爱胜蚓急性生态毒性的影响涉及多个学科和领域,一时无法得到更具体的生理、生化研究数据,为此还需要进行大量调查研究以求能够做出全面的产品评价。

参考文献:

- [1] SWIFT G, DOMB A J, KOST J, et al. Non-medical biodegradable polymers: Environmentally degradable polymers[C]//Handbook of Biodegradable Polymer. Singapore: Har wood Academic Publshers, 1997: 473-511.
- [2] SCOTT G. 'Green polymers'[J]. Polymer Degradation and Stability,

- 2000, 68(1): 1-7.
- [3] 田小艳, 张敏, 王蕾, 等. PBS 不同化学结构共聚物的性能[J]. 塑料, 2009, 38(5): 27-30.
TIAN Xiaoyan, ZHANG Min, WANG Lei, et al. Properties of Poly(Butylene Succinate) (PBS) with Various Chemical Structures[J]. Plastics, 2009, 38(5): 27-30.
- [4] RYCHTER P, BICZAK R, KOWALCZUK M, et al. Environmental degradation of polyester blends containing atactic poly (3-hydroxybutyrate)[J]. Biomacromolecules, 2006, 7: 3125-3131.
- [5] KIM M N, SHIN J H, IM S S. Effect of Poly(L-Lactide) and Poly(Butylene Succinate) on the Growth of Red Pepper and Tomato[J]. Polymers and the Environment, 2003, 11(3): 101-105.
- [6] WITT U, EINIG T, YAMAMOTO M, et al. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates[J]. Chemosphere, 2001, 44(2): 289-299.
- [7] 张敏, 吴素芳, 邱建辉, 等. 几种主要塑料添加剂的毒性规律[J]. 应用化工, 2006, 35(9):712-715.
ZHANG Min, WU Sufang, QIU Jianhui, et al. Toxicity rule of several major additives for plastics[J]. Applied Chemical Industry, 2006, 35(9): 712-715.
- [8] JAYASEKARA R, SHERIDAN S, LOURBAKOS E, et al. Biodegradation and ecotoxicity evaluation of a bionolle and starch blend and its degradation products in compost[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2003, 51(1): 77-81.
- [9] EDWARDS C A, BOHLEN P J. The effects of toxic chemicals on earthworms[J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 1992, 125: 23-29.
- [10] 邱江平. 蚯蚓与环境保护[J]. 贵州科学, 2000, 18(1/2): 116-133.
QIU Jiangping. Earthworms and environmental protection[J]. GUI ZHOU SCIENCE, 2000, 18(1/2):116-133.
- [11] 宋玉芳, 周启星, 许华夏, 等. 土壤重金属污染对蚯蚓的急性毒性效应研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(2): 187-190.
SONG Yufang, ZHOU Qixing, XU Huaxia, et al. Acute toxicological effects of heavy metal pollution in soils on earthworms[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(2): 187-190.
- [12] SPURGEON D J, WEEKS J M, VAN G, et al. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology: The 7th international symposium on earthworm ecology-Cardiff-Wales-2002[J]. Pedobiologia. International Journal of Soil Biology, 2003, 47(5/6): 588-606.
- [13] 左海根, 林玉锁, 龚瑞忠. 农药污染对蚯蚓毒性毒理研究进展[J]. 农村生态环境, 2004, 20(4): 1-5.
ZUO Haigen, LIN Yusuo, GONG Ruizhong. Toxicology of pesticide pollution to earthworms[J]. Rural Eco-Environment, 2004, 20(4): 1-5.
- [14] 张昌辉, 赵霞, 张敏. 聚丁二酸丁二醇(PBS)合成工艺的研究[J]. 塑料, 2008, 37(5): 11-13.
ZHANG Changhui, ZHAO Xia, ZHANG Min. The Synthetic Technology of Poly(butylene succinate) [J]. Plastics, 2008, 37(5): 11-13.
- [15] 张敏, 王晓霞, 刘保健, 等. 生物可降解脂肪族聚酯在陕西土壤中的降解行为[J]. 高分子材料科学与工程, 2008, 24(1): 91-93.
ZHANG Min, WANG Xiaoxia, LIU Baojian, et al. Study on Biodegradable Behavior of Polyesters in the Soil of Shanxi Local[J]. Polymer Materials Science and Engineering, 2008, 24(1): 91-93.
- [16] 高宗, 刘杏兰, 刘存寿, 等. 长期施肥对关中壤土肥力和作物产量的影响[J]. 西北农业学报, 1992, 1(3): 65-68.
GAO Zhong, LIU Xinglan, LIU Cunshou, et al. The effect of long-term fertilization on Lou-soil and crop yield[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 1992, 1(3):65-68.
- [17] 孔繁翔, 尹大强, 严国安. 环境生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 99-109.
KONG Fanxiang, YING Daqiang, YAN Guoan. Environmental Biology[M]. Bei Jing: Higher Education Press, 2002: 99-109.
- [18] 龚鹏博, 李健雄, 郭明昉, 等. 蚯蚓生态毒理试验现状与发展趋势[J]. 生态学杂志, 2007, 26(8): 1297-1320.
GONG Pengbo, LI Jianxiong, GUO Mingfang, et al. Present status and development trend of earthworm eco-toxicological test[J]. Chinese Journal of Ecology, 2007, 26(8): 1297-1320.
- [19] OECD. Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. Guidelines for the Testing of Chemicals[M]. Section 2: Effects on Biotic Systems. 1984.

The effect of acute ecotoxicity of PBS-based copolymer and its simulated degradation products on earthworm *Eisenia fetida*

ZHANG Min^{1,2}, SU Kangyu¹, LI Chengtao¹, CHEN Qianru¹, YAN Shanshan¹, LI Rong¹

1. Key Laboratory of Auxiliary Chemistry & technology for Chemical Industry, Ministry of Education, Shaanxi university of Science & technology, Xi'an 710021, China; 2. Zhejiang Wenzhou Research Institute of Light Industry, Wenzhou 325003, China

Abstract: Contact filter paper test and natural soil method were used to investigate the effects of acute ecotoxicity of poly(butylene succinate)-based copolymer and its simulated degradation products (diacids and diols) on earthworms *Eisenia fetida* at 20 °C. The results showed that diacids and diols with concentration less than 3 400 mg·L⁻¹ had no effect on survival of earthworms within 48 h. The LC₅₀ of succinic acid, adipic acid, 1,4-butanediol and 1,6-hexanediol to earthworms *Eisenia fetida* by contact filter paper test were 3 523, 3 402, 74 907, and 18 160 mg·L⁻¹, respectively. Comparing with the control test, the natural soil method showed weights of earthworms were significantly increased in soil which containing PBS-based copolymer with different Mn and different mass fraction (the mass percent of PBS, PBS-co-HS, PBS-co-BA were 15 000, 10 000, 5 000, 1 000, 0 mg·kg⁻¹, respectively) after cultured for 14 days, and there were no indication of any pathology on earthworms. These results showed that PBS-based copolymer was safe for this specie.

Key words: PBS; ecotoxicity; *Eisenia fetida*; LC₅₀; rate of weight change