

# PBS 共聚物对蚯蚓的蛋白质含量和纤维素酶活性的影响

张敏<sup>1</sup>, 邢永雷<sup>1</sup>, 李成涛<sup>1</sup>, 张坤<sup>1</sup>, 宋吉青<sup>2</sup>

1. 轻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. 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081

**摘要:**以赤子爱胜蚓*Eisennia foetida*为研究对象,在滤纸接触法的基础上,采用自然土壤法进行急性毒性试验,研究了不同相对分子质量的PBS-co-PCL共聚物对蚯蚓蛋白质含量和纤维素酶活性的毒性效应。研究表明:随着暴露时间的增长,蚯蚓蛋白质含量呈现先增加后减小的趋势;第7天时,数均相对分子质量( $M_n$ )为 $8.0 \times 10^3$ 的聚合物对蛋白质的影响较明显;第14天时,相对分子质量( $M_n$ )为 $1.6 \times 10^4$ 和 $2.8 \times 10^4$ 的聚合物对蛋白质的影响较明显。聚合物相对分子质量( $M_n$ )为 $8.0 \times 10^3$ 处理组中,纤维素酶活性受到的抑制作用较明显,聚合物含量为2.5%时,抑制作用达到最大。但是随着暴露时间的增长,这种抑制作用逐渐减小,即影响是暂时性的,纤维素酶活性变化比蛋白质含量变化更敏感。以上结果表明蚯蚓在实验过程中没有出现致病或致死现象,即聚合物对蚯蚓的影响较小。

**关键词:** P(BS-co-CL); 生态环境毒性; 蛋白质含量; 纤维素酶性; 蚯蚓

**中图分类号:** X171.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1674-5906 (2012) 07-1334-05

脂肪族聚酯由于其具有良好的生物降解能力,是当今高分子材料作为功能材料研究的热点之一<sup>[1-2]</sup>,其中聚丁二酸丁二醇酯(PBS)由于其良好的可生物降解性和易加工性,相关产品已经商品化,作为未来农用地膜的替代品,有广阔的应用前景<sup>[3]</sup>。许多研究表明:PBS的共聚物具有更好的力学性能和热稳定性,且降解速度明显增强,如通过加入环己内酯(PCL)可以得到P(BS-co-CL),其降解速度明显大于纯PBS<sup>[4]</sup>。但是关于共聚物在降解过程中对生态环境有无影响,却少有报道。因此,可生物降解材料在应用过程中对生态环境的影响是一个迫切需要研究的问题。

蚯蚓在土壤生态系统中起着非常重要的作用,并且它们在陆地生态系统中对控制物质循环和能量转换也起着不可替代的作用。由于它对环境污染(例重金属和农药)非常敏感,所以常被选为检测环境土壤污染的指示性动物<sup>[5-6]</sup>。蚯蚓体内的蛋白质和纤维素酶是衡量蚯蚓是否健康生长的重要物质,当前已有报道纤维素酶是蚯蚓体内一种非常重要的酶,它的活性改变直接反映蚯蚓分解土壤中有有机物质的能力<sup>[7]</sup>。

本文在研究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基础上<sup>[8]</sup>,进一步研究赤子爱胜蚓在不同相对分子质量的PBS基共聚物降解过程中,其体内的纤维素酶活性和蛋白质含量的变化,更深入的评价了PBS基共聚物对蚯蚓的生态毒性,为PBS在农业生产中的安全、

广泛应用提供可靠的理论数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

#### 1.1.1 供试污染物

P(BS-co-CL),数均相对分子质量分别为 $8.0 \times 10^3$ ( $M_w/M_n=1.79$ )、 $1.6 \times 10^4$ ( $M_w/M_n=1.95$ )和 $2.8 \times 10^4$ ( $M_w/M_n=1.84$ ),均为本实验室自制。

#### 1.1.2 试剂和仪器

考马斯亮蓝 G-250,分析纯。牛血清蛋白(BSA),国药集团化学有限公司。DNS试剂(自配)。葡萄糖分析纯。

高速组织捣碎机,上海标本模型厂。人工气候箱,上海新苗医疗器械制造有限公司。HC-3018R高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司。高速粉碎机,河南豫龙重工业机器有限公司。UV-2006A型可见紫外分光光度计,尤尼柯(上海)有限公司。EC2006凝胶液相色谱仪,大连依利特分析仪器有限公司。

#### 1.1.3 供试蚯蚓和土壤

赤子爱胜蚓购于陕西迪龙生态环保技术有限公司,实验前进行预培养,选择体重为300~500 mg,环带明显,大小基本一致的健康成蚓。

本试验采用自然土壤法进行。供试土壤取自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<sup>[9]</sup>,土壤有机质 $11.81 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (有机碳 $6.85 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),全氮 $0.81 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,全磷 $0.79 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,碱解氮 $61.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,速效磷 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,速效钾

**基金项目:** 科技部“863”计划项目子课题(2011AA100503); 陕西省教育厅产业化育研项目(2010JC01); 陕西省重大科技创新项目(2009ZKC08-09)

**作者简介:** 张敏,女,教授,博士,博士生导师,主要从事可生物降解高分子材料的合成、降解和机理研究。E-mail: yanjiushi206@163.com

**收稿日期:** 2012-05-28

295.0 mg·kg<sup>-1</sup>, pH=8.3, 质地属粉砂粘壤土, 密度 1.53 g·mL<sup>-1</sup>。

## 1.2 试验方法

试验参照 OECD guideline No207 的方法进行<sup>[10]</sup>。

### 1.2.1 蚯蚓清肠

取大烧杯, 在底部铺上一层滤纸, 加少量蒸馏水, 以浸没滤纸为宜。将蚯蚓放在滤纸上, 用塑料薄膜封口, 并用解剖针扎孔, 将烧杯放入温度为(20±1) °C, 相对湿度约 80%~85%的人工气候箱中, 清肠 1 昼夜<sup>[11]</sup>。

### 1.2.2 染毒

将合成的不同相对分子质量的 P(BS-co-CL) 通过高速粉碎机粉碎后与 300 g 自然土壤混匀, 根据实际地膜的用量设置 5 个质量分数梯度, 0.1%, 0.5%, 2.5%, 10%, 12.5%。加入蒸馏水保持含水量 35%。取 10 条体长、体质量基本相同且经清肠后蚯蚓放入人工土壤中培养, 用滤纸封口并扎孔, 以保持湿度和空气的通透性, 试验在人工气候箱内进行, 气候箱内恒温(20±1) °C, 相对湿度 75%, 12 h:12 h 光暗交替培养。试验 7 d, 14 d 各取样一次, 测定蛋白质含量和酶活。14 d 后结束试验, 每一个质量分数设置 3 个平行样, 同时设置一个不含共聚物的对照组<sup>[12]</sup>。

### 1.2.3 蛋白质的测定<sup>[13]</sup>

#### 1) 考马斯亮蓝试液配制

考马斯亮蓝储备液: 称取考马斯亮蓝 G-250 100 mg 溶于 50 mL φ=95%乙醇中, 加 φ=85%磷酸 100 mL, 加水稀释至 200 mL, 4 °C 放置。混匀, 过滤, 临用前配制。

#### 2) 标准曲线绘制

称取 BSA 250 mg, 置 250 mg 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 得到 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的 BSA 对照品溶液。分别取 BSA 对照品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 向其中加入水 1.0, 0.9, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.0 mL, 混匀。向 6 种不同浓度的 BSA 水溶液中各加入考马斯亮蓝工作液 5 mL, 混匀。室温静止 5 min, 595 nm 比色, 绘制标准曲线。

#### 3) 蚯蚓提取物中蛋白质含量测定

分别于 7 d 和 14 d 取样, 称量, 按质量体积比加 Tris-HCl 缓冲溶液制备成 10% 的组织匀浆, 在高速冷冻离心机 3 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C 时离心 10 min, 然后取组织匀浆上清液在用 Tris-HCl 缓冲溶液按 1:4 稀释成 20% 组织匀浆。量取蚯蚓提取物溶液 1.0 mL, 加入考马斯亮蓝工作液 5 mL, 混匀, 室温放置 5 min, 595 nm 处比色。

### 1.2.4 纤维素酶活性的测定

### 1) 酶液的制备

蚯蚓体内纤维素酶的提取采用 Mishra<sup>[14]</sup> 方法的改进法进行。方法是: 将蚯蚓洗净, 加入 Tris-HCl 缓冲溶液, 放入高速匀浆机中制成 10% 的组织匀浆。匀浆后的液体放入冷冻离心机内在 4 °C 条件下以 2 500 r·min<sup>-1</sup> 离心, 吸出上清液在同样条件下, 以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 进行第 2 次离心, 第 2 次离心后的上清液即为纤维素酶的待测液。

### 2) 酶活性的测定

采用羧甲基纤维素法<sup>[15]</sup>, 试管中加入 1 mL 已预热的 2% CMC-NaCl 溶液和 0.5 mL 酶提取液, 50 °C 保温 30 min, 然后加入 3 mL DNS 显色液, 于沸水中水浴 5 min, 冷却, 加入蒸馏水定容到 25 mL, 摇匀后, 测定 520 nm 处的吸光度。纤维素酶每分钟催化羧甲基纤维素钠水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量定义为一个活力单位。

### 3) 数据处理

所有数据处理均采用统计分析软件 SPSS17.0, 以 3 个平行组数据的平均值标准偏差 (Means±SD) 表示。以  $P>0.05$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.01$  分别表示没有影响 (不显著)、差异显著和差异极显著水平。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋白质测定标准曲线

图 1 所示 Bradford 法的回归方程为  $Y=-0.0061+0.0063X$  ( $R^2=0.9944$ ,  $P<0.0001$ )。其中  $A$  为吸光度,  $\rho$  为蛋白质质量浓度。

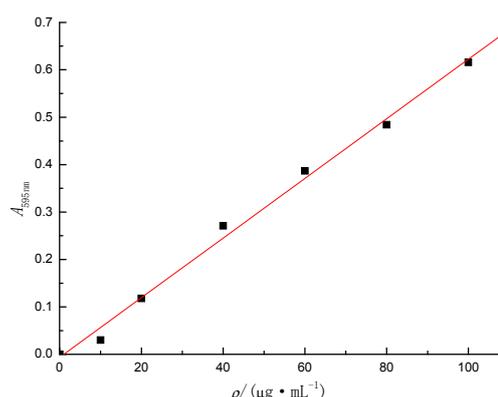


图 1 Bradford 法蛋白质测定标准曲线

Fig.1 The standard curve of Bradford's dye-binding method for determining proteins

### 2.2 共聚物对蛋白质含量的影响

从图 2 中可看出: 在第 7 天时,  $M_n$  为  $8.0 \times 10^3$  的聚合物对蚯蚓的影响为: 随着聚合物含量的增加蛋白质含量表现出缓慢增加的趋势。这可能是由于刚开始随着聚合物的增加, 使蚯蚓周围的环

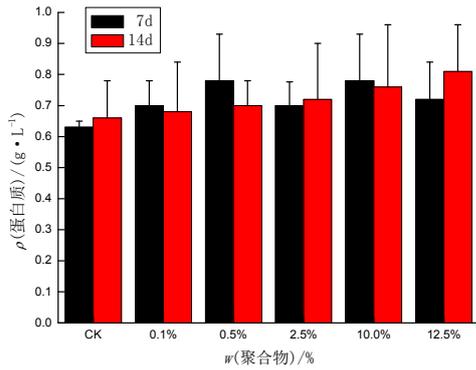


图2 PBS-co-PCL( $M_n=8.0 \times 10^3$ )对蚯蚓蛋白质含量的影响  
Fig.2 The effect of PBS-co-PCL( $M_n=8.0 \times 10^3$ ) on the protein contents of earthworm

境发生了变化, 聚合物对其皮肤产生了一定的刺激, 导致体内一些血浆蛋白含量改变, 同时机体在应激状态下产生急性时相蛋白, 从而使得总蛋白质含量有所增加<sup>[16]</sup>。而到了第14天时, 低含量聚合物处理组中, 蚯蚓蛋白质含量与未处理组相当, 这可能是由于暴露时间的增长, 机体已适应了外界环境, 而高含量的处理组中, 蛋白质含量又有所增加( $P < 0.05$ )。说明了随着暴露时间的增长, 高含量聚合物对蚯蚓的影响会越来越明显。这是因为聚合物对蚯蚓的影响主要有两方面<sup>[17]</sup>, 一是通过外表接触刺激蚯蚓; 二是通过蚯蚓吸收后, 对蚯蚓的肠道产生影响, 从而刺激其体内生理指标的变化。刚开始, 聚合物主要是通过皮肤接触刺激蚯蚓, 而随着时间的增长, 蚯蚓吸收聚合物中的小分子后, 对其体内某些生理指标产生了一定的影响。

图3是 $M_n$ 为 $1.6 \times 10^4$ 的聚合物对蚯蚓蛋白质含量的影响, 可以看出, 第7天时, 蛋白质含量表现出略有增加的趋势( $P < 0.01$ )。而到第14天

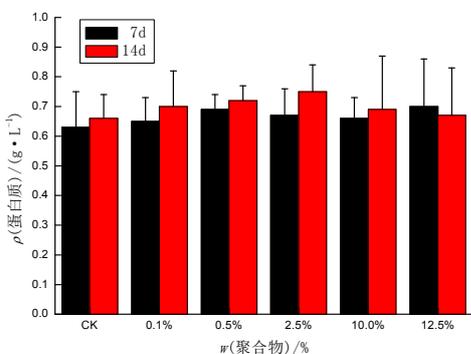


图3 PBS-co-PCL( $M_n=1.6 \times 10^4$ )对蚯蚓蛋白质含量的影响  
Fig.3 The effect of PBS-co-PCL( $M_n=1.6 \times 10^4$ ) on the protein contents of earthworm

时, 蛋白质含量随着聚合物含量的增加而增加, 在2.5%处达到最大值, 随后又开始减小, 与空白水平相一致。与图2相比, 这可能是由于聚合物的相对分子质量增加, 降解速度减缓, 而其对蚯蚓的影响在降解初期并没有表现出来, 而随着暴露时间的增长才逐渐的表现出来, 因此出现上述现象。

图4是 $M_n$ 为 $2.8 \times 10^4$ 的聚合物对蚯蚓蛋白质含量的影响, 其表现趋势与图3相似。第7天时, 蛋白质含量几乎没有增加, 只是在 $w=12.5\%$ 处可看出略有增加, 到第14天时, 蛋白质含量先增加后减小, 且整体均高于第7天时的含量( $P < 0.01$ )。

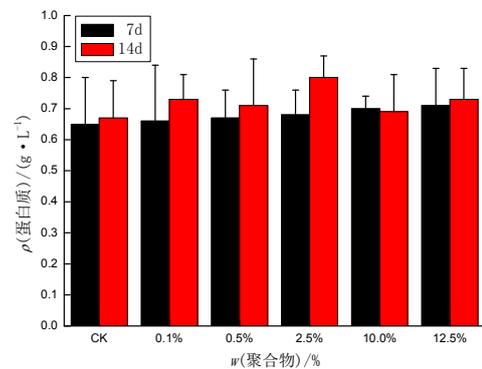


图4 PBS-co-PCL( $M_n=2.8 \times 10^4$ )对蚯蚓蛋白质含量的影响  
Fig.4 The effect of PBS-co-PCL( $M_n=2.8 \times 10^4$ ) on the protein contents of earthworm

### 2.3 共聚物对纤维素酶活性的影响

从图5中可看出,  $M_n$ 为 $8.0 \times 10^3$ 的聚合物对蚯蚓纤维素活性的影响表现为: 第7天时, 纤维素酶活性随着聚合物含量的增加而显著下降, 受到了明显的抑制作用, 聚合物含量达到 $w=10\%$ 时, 酶活又开始增加( $P < 0.05$ )。这说明纤维素酶活性

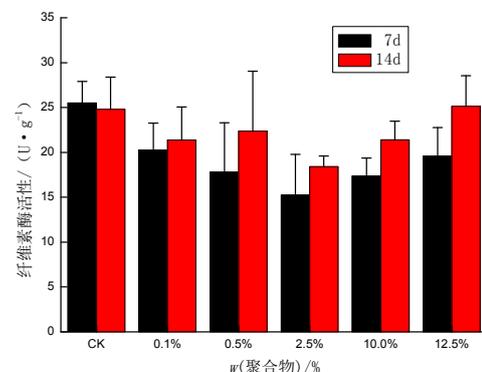


图5 PBS-co-PCL( $M_n=8.0 \times 10^3$ )对纤维素酶活性的影响  
Fig.5 The effect of PBS-co-PCL( $M_n=8.0 \times 10^3$ ) on the cellulase activity of earthworm

对低含量的聚合物更敏感。第 14 天时, 酶活明显比第 7 天时的要高。这说明随着聚合物暴露时间的增长, 蚯蚓对周围的环境开始逐渐的适应, 因此酶活性逐渐的回到原来水平, 且高质量分数处理组中蚯蚓酶活恢复的更快。

图 6 中, 纤维素酶活性的变化比图 5 中明显减慢。第 7 天时, 酶活有变小的趋势, 且随着聚合物质量分数的增高而酶活受到的抑制作用越大。14 d 后, 酶活均高于第 7 天时的, 与图 5 类似。

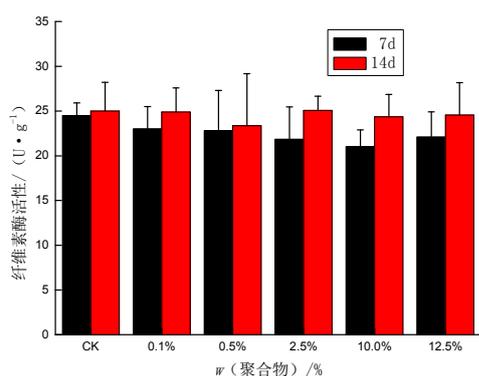


图 6 PBS-co-PCL( $M_n=1.6\times 10^4$ )对纤维素酶活性的影响  
Fig.6 The effect of PBS-co-PCL( $M_n=1.6\times 10^4$ ) on the cellulase activity of earthworm

如图 7, 随着相对分子质量的升高, 纤维素酶活性的变化程度比低相对分子质量的有所减小。刚开始有不明显的减小趋势 14 d 后, 表现出与图 5 和图 6 相似的变化规律( $P<0.05$ )。

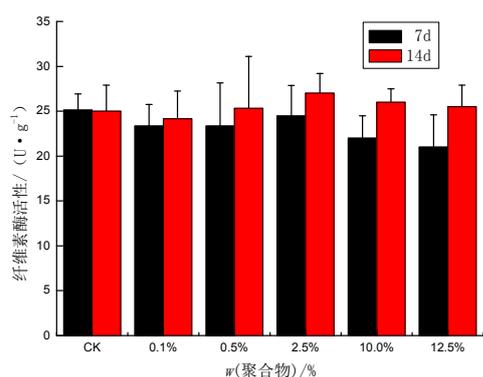


图 7 PBS-co-PCL( $M_n=2.8\times 10^4$ )对纤维素酶活性的影响  
Fig.7 The effect of PBS-co-PCL( $M_n=2.8\times 10^4$ ) on the cellulase activity of earthworm

比较图 5, 图 6 和图 7, 刚开始, 由于环境的变化, 聚合物对蚯蚓产生了一定的刺激作用, 使纤维素酶活性受到了一定的抑制作用, 但是随着蚯蚓对外界环境的适应, 纤维素酶活性又逐渐的

回到初始水平。

### 3 结论

(1) 聚合物对蛋白质含量的影响刚开始为促进增加, 随着暴露时间的增长, 蚯蚓对其逐渐适应, 所以处理组中蛋白质最终含量与未处理组相似。实验初期低相对分子质量聚合物对蚯蚓的影响较明显, 随着暴露时间的增长, 高相对分子质量聚合物的影响存在滞后现象。

(2) 纤维素酶活性刚开始受到了一定的抑制, 且相对分子质量越低, 抑制作用越明显。随着暴露时间的变长, 酶活又保持与未处理组相同水平。

(3) 蚯蚓在外界的刺激下, 纤维素酶活性比蛋白质的变化更敏感。从蛋白质含量和纤维素酶活性的变化规律来看, 实验初期聚合物对蚯蚓的影响主要是通过皮肤接触引起的, 后期则是通过肠道的吸收对蚯蚓产生影响。但是, 整个实验过程中聚合物均未对蚯蚓产生致死现象。

综上所述, 虽然聚合物对蚯蚓有一定的刺激作用, 并且高相对分子质量聚合物对蚯蚓产生影响主要出现在后期。但是, 聚合物作为农业地膜应用, 其实际用量较低, 仅有  $0.022\% \cdot m^{-2}$ , 因此对蚯蚓的影响相对较小。然而, 不同结构的共聚物对蚯蚓的影响机理尚不清楚, 有待于进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] OISHI A, ZHANG M, NAKAYAMA K, et al. Synthesis of poly(butylene succinate) and poly(ethylene succinate) including diglycollate moiety[J]. Polymer Journal, 2006, 38(7): 710-715.
- [2] GAN Z, KUWABARA K, ABE H, et al. The role of polymorphic crystal structure and morphology in enzymatic degradation of melt-crystallized poly(butylene adipate) films[J]. Polymer Degradation and Stability, 2005, 87: 191-199.
- [3] 张敏, 徐科, 李成涛, 等. 不同成膜工艺对 PCL 结晶及微生物降解性能的影响[J]. 高分子材料科学与工程, 2012, 28(1), 113-116. ZHANG Min, XU Ke, LI Chengtao, et al. Effect of two different film-forming process on the crystallization and biodegradability of PCL[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2012, 28(1), 113-116.
- [4] 王蕾, 张敏, 田小艳, 等. 土壤中降解聚己内酯(PCL)微生物菌种的筛选及降解性能[J]. 环境化学, 2010, 29(5), 856-859. WANG Lei, ZHANG Min, TIAN Xiaoyan, et al. Study on the PCL-degrading microorganisms in general soil and their degradation properties[J]. Environmental Chemistry, 2010, 29(5), 856-859.
- [5] 卢强, 张松林, 张晓伟, 等. 氯苯和邻二氯苯的蚯蚓急性毒性研究[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(4): 23-26. LU Qiang, ZHANG Songlin, ZHANG Xiaowei, et al. Acute toxicity effects of chlorobenzene and dichlorobenzene on earthworms[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 34(4): 26-26.
- [6] XIAO N, JING B, GE, F, et al. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to Eisenia fetida under laboratory conditions[J].

- Chemosphere, 2006, 62, 1366-1373.
- [7] SHI Y, SHI Y, Wang X, et al. 2007. Comparative effects of lindane and deltamethrin on mortality, growth, and cellulase activity in earthworms(*Eisenia fetida*)[J]. Pestic Biochem Phys, 2007, 89, 31-38.
- [8] 张敏, 苏康宇, 李成涛, 等. 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[J]. 生态环境学报, 2010, 19(10): 2425-2429.  
ZHANG Min, SU Kangyu, LI Cheng-tao, et al. The effect of acute ecotoxicity of PBS-based copolymer and its simulated degradation products on earthworm *Eisenia fetida*[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(10): 2425-2429.
- [9] 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.
- [10] OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 207. Earthworm acute toxicity tests[M]. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 1984: 86-89.
- [11] XU P, LIU D, DIAO J, et al. Enantioselective acute toxicity and bioaccumulation of benalaxyl in Earthworm (*Eisenia fetida*)[J]. Agric. Food Chem. 2009, 57, 8545-8549.
- [12] LUO Yanrui, WANG Sanhu, YUN Mixia, et al. The toxic effects of ionic liquids on the activities of acetylcholinesterase and cellulase in earthworms[J]. Chemosphere, 2009, 77, 313-318.
- [13] 闫萍, 牛勃, 张悦红, 等. 蚯蚓提取物中蛋白质含量测定方法的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 27-30.  
YAN Ping, NIU bo, ZHANG Yuehong, et al. Study on the method for determining the values of proteins of earthworm extract[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2007, 28(1): 27-30.
- [14] MISHRA P C, DASH M C. Digestive enzymes of some earthworms[J]. Experienta, 1980, 36:1156.
- [15] 罗屿, 臧宇, 钟远, 等. 新型杀虫剂对蚯蚓的生化毒理学研究[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 2000, 36(2): 213-219.  
LUO Yu, ZANG Yu, ZHONG Yuan, et al. The biochemical toxicological of imidacloprid and RH-5849 on earthworms(*Eisenia fetida*)[J]. Journal of Nanjing University: Natural Sciences, 2000, 36(2): 213-219.
- [16] 雷波, 刘定安, 黄树明. 集成疗伤片对创伤患者血清急性期反应蛋白含量变化的影响[J]. 中医正骨, 2005, 17(1): 10-11.  
LEI Bo, LIU Dingan, HUANG Shuming. The regulating effect of "Ji Cheng Liao Shang Pian" on the level changes of serum acute phase reactive proteins in patients with injury[J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 2005, 17(1): 10-11.
- [17] GAO Yuhong, SUN Xinsheng, SUN Zhengjun, et al. Toxic effects of enrofloxacin on growth rate and catalase activity in *Eisenia fetida*[J]. Environment Toxicology and Pharmacology, 2008, 26(2): 177-180.

## Effect of PBS-based copolymer on protein content and cellulose enzyme activity in earthworm

ZHANG Min<sup>1</sup>, XING Yonglei<sup>1</sup>, LI Chengtao<sup>1</sup>, ZHANG Kun<sup>1</sup>, SONG Jiqing<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Auxiliary Chemistry & Technology for Chemical Industry, Ministry of Education, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China;

2. Key Laboratory of Agro-Environment & Climate Change, Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China

**Abstract:** The natural soil contact method was used to research on the toxicity of poly(butylene succinate)-*co*-poly(caprolactone) P(BS-*co*-CL) copolymer with different molecular weight on the protein content and cellulose enzyme activity in earthworm extract. And the test was based on the method of filter paper contact. The result showed that: the protein content increased first, and then decreased with the increasing exposure time. Moreover, after 7 days, the polymer with low molecular weight ( $M_n$  is  $8.0 \times 10^3$ ) played the major role. However, after 14 days, the polymer with high molecular weight ( $M_n$  is  $1.6 \times 10^4$  and  $2.8 \times 10^4$ ) had the greatest effect. The cellulose enzyme activity was inhibited in the treatment ( $M_n$  is  $8.0 \times 10^3$ ). The inhibition is more and more obvious with the reduction of the molecular weight of the polymer. The cellulose activity was more sensitive than the protein content. These results suggested that earthworms did not appear pathogenic or death during the experiment, so it can be conclude that the polymer had a little effect on earthworm.

**Key words:** P(BS-*co*-CL); ecological environment toxicity; protein content; cellulose enzyme activity; earthworm