

研究生学号： 203031013

分类号： _____
密 级： _____

海南热带海洋学院

Hainan Tropical Ocean University

专业硕士学位论文

海水环境中生物膜微塑料介导的双壳贝类毒性效应研究

Study on the toxic effects of bivalves mediated by biofilm
microplastics in seawater

作者姓名： 康子歆

校内导师： 曾映旭 研究员

校外导师： 屈原皋 研究员

专业学位类别： 资源与环境

研究方向： 环境毒理

二零二三年五月三十日

摘要 学位论文独创性声明

本人声明兹呈交的学位论文是本人在导师指导下完成的研究成果。论文写作中不包含其他人已经发表或撰写过的研究内容，如参考他人或集体的科研成果，均在论文中以明确的方式说明。本人依法享有和承担由此论文所产生的权利和责任。

论文作者签名：康子歆

签名日期：2023.5.30

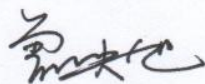
学位论文版权使用授权声明

本人完全了解海南热带海洋学院有关保留、使用学位论文的规定。即：海南热带海洋学院有权保留并向国家机关或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许学位论文被查阅和借阅。本人授权海南热带海洋学院可以将本学位论文的全部内容或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

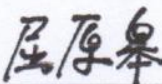
论文作者签名：康子歆

校内导师签名：



签名日期：2023.5.30

校外导师签名：



近年来,塑料污染问题已成为全球性的重大环境问题,海洋中的微塑料易被海洋生物误食,并在生物体内富集产生毒性,甚至进一步通过食物链传递,威胁海洋生态系统的健康。本研究以生物膜聚苯乙烯微塑料颗粒作为研究对象,以滤食性海洋双壳贝类波纹巴非蛤(*Paphia undulata*)和菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)为受试生物,将两种贝类分别暴露于不同官能团的生物膜微塑料和不同粒径的生物膜微塑料海水环境中,分析微塑料在贝类组织中的蓄积和分布特征,研究微塑料对贝类鳃和消化腺组织中抗氧化酶及氧化损伤相关指标的影响,利用代谢组学技术分析受试动物消化腺组织对微塑料的代谢响应情况,挖掘可以表征微塑料毒性的特征代谢产物,并识别微塑料干扰的关键代谢途径。

研究结果表明,将波纹巴非蛤暴露于浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 、粒径为 3 μm 的原始或生物膜附着的氨基聚苯乙烯(PS-NH₂)和羧基聚苯乙烯(PS-COOH)微塑料海水溶液 7 天后,可在波纹巴非蛤的鳃、消化腺、外套膜和肠组织中检测到微塑料,其中在肠道和消化腺中蓄积较多,且生物膜微塑料在波纹巴非蛤组织中的蓄积量普遍高于原始微塑料。暴露 7 天后,波纹巴非蛤出现鳃丝断裂,丝间联结损坏、血细胞浸润、消化腺腺体细胞坏死、水肿等病理损伤。不同官能团聚苯乙烯微塑料均可导致波纹巴非蛤出现氧化应激反应及肝脏损伤,综合生物标志物响应指数法(IBR)结果显示,微塑料暴露对波纹巴非蛤消化腺组织的毒性作用更强。代谢组学结果表明,微塑料暴露导致波纹巴非蛤消化腺的代谢谱发生改变,主要干扰了“丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢”、“嘧啶代谢”、“甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢”和“色氨酸代谢”过程。结合消化腺中微塑料的含量、IBR 指数和代谢组学结果可知,生物膜增强了 PS-COOH 微塑料对波纹巴非蛤的毒性作用。

将菲律宾蛤仔暴露于浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 、粒径为 1 μm 或 7 μm 的原始或生物膜附着的 PS-NH₂ 微塑料海水溶液 4 天和 8 天后,可在菲律宾蛤仔的鳃、消化腺、外套膜和肠组织中检测到微塑料,其中微塑料蓄积较多的组织是肠道和消化腺。暴露 8 天后,菲律宾蛤仔出现血细胞浸润、纤毛脱落、坏死、细胞核溶解等病理损伤。此外,微塑料胁迫还造成了菲律宾蛤仔的氧化损伤,IBR 指数显示随着暴露时间的延长,PS-NH₂ 微塑料对消化腺组织的毒性增强。微塑料暴露导致菲律宾蛤仔消化腺的代谢谱发生改变,主要干扰了“磷酸戊糖途径”、“半胱氨酸和蛋氨酸代谢”、“甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢”、“苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成”、“乙醛酸和二羧酸代谢”、“嘧啶代谢”和“酪氨酸

代谢”过程。结合消化腺中微塑料的含量、生物标志物和代谢组学结果可知，生物膜增强了粒径为 7 μm 的 PS-NH₂ 微塑料对菲律宾蛤仔的毒性作用。

本研究发现原始和附着生物膜的微塑料暴露均可引起波纹巴非蛤和菲律宾蛤仔的氧化应激、组织损伤和代谢紊乱，且生物膜会影响微塑料对贝类的毒性效应。本研究评估了生物膜微塑料对双壳贝类的潜在毒性风险，可以为海水环境中生物膜微塑料污染的潜在生态风险评估提供理论依据。

关键词：微塑料 生物膜 双壳贝类 毒性作用 代谢物

Abstract

In recent years, plastic pollution has become a major global environmental issue. Microplastics in the ocean can be easily ingested by marine organisms and enrich in vivo, causing toxic effects to organisms. Microplastics can even be transferred through the food chain, threatening the health of marine ecosystem. In this study, biofilm polystyrene microplastic particles were used as the research object, the filter-feeding marine bivalve *Paphia undulata* and *Ruditapes philippinarum* were used as the test organism, the two bivalves were exposed to biofilm microplastics seawater with different functional groups and biofilm microplastics with different sizes, the accumulation and distribution characteristics of microplastic in the tissues of the bivalves were analyzed, the effects of microplastics on antioxidant enzymes and oxidative damage in bivalves gill and digestive gland tissues were studied, metabolomics technology was used to analyze the metabolic response of digestive gland tissues to microplastics, excavation can characterize characteristic metabolites of microplastic toxicity.

The results showed that after 7 days of exposure of *P. undulata* to a raw or biofilm-attached seawater solution of amino-polystyrene (PS-NH₂) and carboxylated-polystyrene (PS-COOH) microplastics at a concentration of 100 µg/L and a particle size of 3 µm, microplastics can be detected in the gills, digestive gland, mantle and gut tissues of *P. undulata*, among which more accumulate in the gut and digestive gland, and the accumulation of biofilm microplastics in the tissues of *P. undulata* is generally higher than that of the raw microplastics. After 7 days of exposure, *P. undulata* showed rupture of gill filaments, disruption of gill filament junctions, hemocyte infiltration, digestive gland cell necrosis, edema and other pathological injuries. Different functional polystyrene microplastics could lead to oxidative stress and liver damage in *P. undulata*, and the results of integrated biomarker response index (IBR) showed that microplastic exposure had a stronger toxic effect on the digestive gland tissue of *P. undulata*. The metabolomics results showed that microplastic exposure led to changes in the metabolic profile of *P.*

undulata, mainly interfering with the "alanine, aspartic acid and glutamate metabolism", "pyrimidine metabolism", "glycine, serine and threonine metabolism" and "tryptophan metabolism" processes. Combined with the content of microplastics in the digestive gland, IBR index and metabolomics results, it can be seen that biofilms enhance the toxic effect of PS-COOH microplastics on *P. undulata*.

R. philippinarum were exposed to a raw or biofilm-attached seawater solution of PS-NH₂ microplastics at a concentration of 200 µg/L and a particle size of 1 µm or 7 µm for 4 and 8 days, microplastics can be detected in the gills, digestive gland, mantle and gut tissues of *R. philippinarum*, among which the tissues with more accumulation of microplastics are the gut and digestive gland. After 8 days of exposure, *R. philippinarum* suffer from pathological injuries such as hemocyte infiltration, cilium shedding, necrosis, and karyolysis. In addition, microplastic stress also caused oxidative damage in *R. philippinarum*, and IBR showed that PS-NH₂ microplastics increased toxicity to digestive gland tissue with prolonged exposure. Microplastic exposure alters the metabolic profile of digestive gland in *R. philippinarum*, mainly interfering with the "pentose phosphate pathway", "cysteine and methionine metabolism", "glycine, serine and threonine metabolism", "phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis", "Glyoxylate and dicarboxylate metabolism", "pyrimidine metabolism" and "tyrosine metabolism" processes. Combined with the content of microplastics in the digestive gland, the biomarkers and the metabolomic results, the biofilm enhanced the toxicity of 7 µm PS-NH₂ microplastics to *R. philippinarum*.

This study found that both raw and biofilm-attached microplastic exposure caused oxidative stress, tissue damage and metabolic disturbances in *P. undulata* and *R. philippinarum*, and biofilms affect the toxic effects of microplastics on bivalves. This study evaluates the potential toxicity risk of biofilm microplastics to bivalves, which can provide a theoretical basis for the potential ecological risk assessment of biofilm microplastic pollution in seawater environment pollution in seawater.

Keywords: Microplastic Biofilm Bivalves Toxic effects Metabolites

Abstract

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 微塑料概述	1
1.1.1 微塑料定义及分类	1
1.1.2 海水环境中微塑料的来源及分布	1
1.1.3 海水环境中微塑料表面生物膜的形成	2
1.2 国内外研究现状	3
1.2.1 微塑料对双壳贝类的毒性效应	3
1.2.2 微塑料对其他海洋生物的毒性效应	4
1.2.3 生物膜微塑料介导的生物毒性效应	5
1.3 研究意义及内容	6
1.3.1 研究目的及意义	6
1.3.2 研究内容	7
1.3.3 技术路线	7
第 2 章 材料与方法	9
2.1 实验动物及其驯化	9
2.2 微塑料表面生物膜孵育	9
2.3 微塑料表面生物膜表征	9
2.3.1 不同官能团聚苯乙烯微塑料表面生物膜表征	9
2.3.2 不同粒径氨基聚苯乙烯微塑料表面生物膜表征	10
2.4 微塑料毒理暴露	10
2.4.1 波纹巴非蛤毒理暴露实验	10
2.4.2 菲律宾蛤仔毒理暴露实验	11
2.5 组织中微塑料含量的测定	11
2.5.1 波纹巴非蛤组织中微塑料含量测定	11
2.5.2 菲律宾蛤仔组织中微塑料含量测定	12
2.6 组织中微塑料的分布观测	12

2.7 组织病理学分析	12
2.8 组织中生物标志物的测定	12
2.9 代谢组学分析	13
2.10 数据统计分析	14
第 3 章 不同官能团聚苯乙烯生物膜微塑料对波纹巴非蛤的毒性效应研究	16
3.1 前言	16
3.2 结果与讨论	16
3.2.1 微塑料表面生物膜表征	16
3.2.2 微塑料在波纹巴非蛤各组织中的蓄积特征	17
3.2.3 微塑料在波纹巴非蛤各组织的分布特征	19
3.2.4 波纹巴非蛤鳃和消化腺的组织病理分析	20
3.2.5 微塑料胁迫对波纹巴非蛤体内生物标志物的影响	23
3.2.6 波纹巴非蛤对微塑料胁迫的代谢响应	28
3.3 小结	33
第 4 章 不同粒径氨基聚苯乙烯生物膜微塑料对菲律宾蛤仔的毒性效应研究 ...	34
4.1 前言	34
4.2 结果与讨论	34
4.2.1 微塑料表面生物膜表征	34
4.2.2 微塑料在菲律宾蛤仔各组织中的蓄积特征	36
4.2.3 微塑料在菲律宾蛤仔各组织的分布特征	37
4.2.4 菲律宾蛤仔鳃和消化腺组织病理分析	39
4.2.5 生物膜微塑料胁迫对菲律宾蛤仔体内生物标志物的影响	41
4.2.6 菲律宾蛤仔对微塑料胁迫的代谢响应	47
4.3 小结	53
第 5 章 结论与展望	54
5.1 主要结论	54
5.2 创新点	54
5.3 展望	55
参考文献	56

目录

致谢	66
个人简历、在学期间发表的学术论文与研究成果	67

第 1 章 绪论

1.1 微塑料概述

1.1.1 微塑料定义及分类

塑料因其重量轻、坚固、耐用、成本低、易加工等优点被广泛使用于生产生活中，成为全球使用最多的材料之一^[1]。在过去几十年里，随着塑料产量大幅增加，塑料垃圾也呈逐年增加的趋势，这些塑料垃圾每年都有很大一部分会流入海洋^[2]。塑料垃圾经过一系列物理、化学以及生物作用后，会形成塑料碎片，其中粒径小于 5 mm 的新污染物称为“微塑料”^[3]。

按照所用材料的分子结构，塑料可分为不同类型，如聚苯乙烯（PS）、聚氯乙烯（PVC）、聚乙烯（PE）、聚丙烯（PP）、聚酰胺（PA）、聚对苯二甲酸乙二醇酯（PET）和乙烯醋酸乙烯酯（EV）等，不同类型塑料具有不同的特性和用途^[4,5]。微塑料按照来源可分为初级微塑料和次级微塑料^[6]。初级微塑料是指进入环境前尺寸小于 5 mm 的塑料碎片或颗粒，包括衣服上的微纤维、化妆品中含有的微珠和塑料颗粒等^[7,8]。次级微塑料是由较大的塑料产品（汽水瓶、渔网和塑料袋等）进入环境后通过自然风化过程而降解或分解产生的^[9]。初级和次级微塑料都能在环境中持久存在，特别是在水生生物体内^[10]。

1.1.2 海水环境中微塑料的来源及分布

海洋中微塑料的来源非常广泛，比如：废弃物入海、污水排放、海上作业、娱乐用水、垃圾填埋厂管理不当、以及飓风、海啸等自然灾害都会将大量的微塑料带入海水中^[11]。初级微塑料在工业上通常被制造成不同尺寸的塑料微珠，比如作为去角质剂或喷砂材料，这些塑料颗粒在制造、运输或使用过程中能直接进入海水环境中。由于对环境污染问题的日益重视，目前已经开始对初级微塑料的制造使用和排放进行监管。相比之下，次级微塑料才是海洋中塑料污染的主要来源，它们通常来自产品使用过程以及塑料垃圾中较大塑料碎片的风化降解。次级微塑料的来源还包括在衣物洗涤期间释放的纺织纤维碎片、残留在田间的农用地膜碎片等。海洋环境中的次级微塑料数量具有很高的空间和时间

变异性, 因此难以对其在海洋中的数量进行估计^[12]。这些塑料颗粒能随着风力和洋流进行远距离迁移, 使得海洋塑料污染成为全球性环境问题^[13]。

有研究估计, 海洋表面漂浮着至少 5.25 万亿塑料颗粒, 重量近 27 万吨^[14]。许多研究证实了微塑料在海水环境中的广泛存在, 甚至在北极和南极洲也发现了微塑料的存在^[15,16]。在太平洋海域, 微塑料的平均浓度约为 918 个/ m^3 ^[17]。有学者研究胶州湾表层海水中微塑料浓度, 统计数据显示海水中微塑料年平均浓度为 0.095 个/ m^3 ^[18]。Liu 等人检出南海中沙环礁表层海水中微塑料的丰度为 67 ~ 160 个/ m^3 ^[19]。此外, 微塑料还广泛分布于沿海和深海沉积物中。近年来随着塑料产量增加, 聚丙烯, 聚乙烯和聚苯乙烯塑料在海水和沉积物中常被检出^[20]。对不同深度的黑海沉积物进行鉴定, 在 83% 的沉积物样品中检测到微塑料的存在, 所有样品中微塑料的平均丰度为 106.7 个/ kg ^[21]。海洋生物能够摄入微塑料, 在南极洲罗斯海的鲑鱼体内微塑料的检出率为 50%, 丰度为 1.286 个/个体^[22]。在甲壳类生物短沟对虾 (*Penaeus semisulcatus*) 中也能检测到微塑料, 在每只对虾中微塑料的平均丰度为 7.8 个^[23]。此外, 我国学者在贻贝^[24]、河蚬^[25]、扇贝^[26]等各种双壳贝类中也都检测到了塑料微粒的存在。

微塑料进入海洋环境后, 会不断释放塑化剂、添加剂 (如双酚-A、多溴联苯醚、邻苯二甲酸盐) 等有毒物质; 同时, 微塑料较大的比表面积使得它容易吸附海洋环境中的污染物, 尤其是持久性有机污染物^[27]。有研究显示, 微塑料吸附的持久性有机污染物比海水中高达 6 个数量级^[28]。相对于大颗粒的塑料, 微塑料能直接被海洋生物摄入, 为有毒污染物进入生物体提供了可能的载体, 并使其通过食物链传递在生物体内富集, 甚至威胁海洋生态系统的健康^[29]。

1.1.3 海水环境中微塑料表面生物膜的形成

分布在海水环境中的微塑料, 其表面易受生物分子覆盖, 为微生物群落的定殖提供了有利条件^[30], 进而在微塑料表面形成生物膜。生物膜是指细菌附着在惰性或实体的表面上形成的细菌膜状物聚合体^[31]。生物膜的形成过程可以一般分为四个过程即: 微生物的附着——菌体分泌胞外多聚物——微生物的增殖——生物膜的形成^[32]。

与原始微塑料相比, 暴露于天然环境中并形成了表面生物膜的微塑料会增强微塑料颗粒与细胞的附着, 使微塑料更容易进入血液细胞内, 即生物膜促进了

微塑料的细胞内化, 并且细胞内化是微塑料颗粒转移到动物组织中的关键途径, 由此产生对生物的毒理学效应^[33]。有研究显示, 具有生物膜的老化微塑料纤维吸附的全氟辛烷磺酸和铅浓度更高, 显著增强了微塑料对环境中有毒污染物的吸附潜力^[34]。Chen 等人的研究结果表明微塑料生物膜可以促进氨和亚硝酸盐的氧化以及反硝化作用, 塑料表面生物膜的存在会使磷含量升高, 并增加系统中的碱性磷酸酶活性^[35]。附着的生物膜可以改变塑料的物理性质, 例如降低微塑料疏水性, 增加微塑料的密度, 使其下沉的更深^[36]。表面生物膜能改变微塑料的特性, 影响其稳定性, 使水生生物对微塑料的摄取、蓄积和排泄发生变化^[37]。

1.2 国内外研究现状

1.2.1 微塑料对双壳贝类的毒性效应

双壳贝类是一种世界性分布的滤食性海洋生物, 具有很强的海水过滤能力, 因此被广泛地用作海洋污染的指示生物^[38]。研究证实, 微塑料在双壳贝类体内的蓄积会对其摄食行为^[39]、繁殖^[40]造成负面影响, 并且会导致双壳贝类炎症反应和组织学变化^[41-43]、氧化应激^[44,45]、神经毒性和细胞毒性^[46,47]等。

牡蛎作为连接沿海和底栖栖息地的物种, 在沿海生态系统中发挥着重要的生态和经济作用。由于牡蛎大量的滤食活动, 它们能够从生活环境中摄入并蓄积大量的微塑料^[48]。研究表明, 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 在 $6\ \mu\text{m}$ 浓度 10^6 个/L 的聚苯乙烯环境下暴露 80 天, 在消化腺和肠道中能够检测到塑料微珠, 溶酶体含量发生变化, 并且牡蛎死亡率升高^[49]。将欧洲平牡蛎 (*Ostrea edulis*) 暴露在较高浓度 ($80\ \text{mg/L}$) 的聚乙烯微塑料中 60 天, 牡蛎呼吸耗氧率相对于对照组有所增加^[50]。

贻贝广泛分布于深海冷泉、热液及近海环境, 环境适应性较强, 是较为常见的水产经济物种之一, 因此常被用作毒理实验受试动物。采用浓度为 $10\ \mu\text{g/mL}$ 的聚乙烯微塑料对地中海紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 进行 21 天的暴露实验发现, 微塑料导致紫贻贝鳃和消化腺结构发生改变, 甚至出现外套膜坏死现象^[51]。短期 (3 天) 暴露于 $3\ \mu\text{m}$ 的红色聚苯乙烯微塑料 (50 个/mL) 溶液中, 可对紫贻贝 (*M. galloprovincialis*) 的氨基酸代谢、抗氧化防御系统和能量代谢方面产生不利影响^[52]。相关研究显示, 在聚苯乙烯中暴露 48 h, 微塑料能在贻

贝的各组织中积累, 并且超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性大大增加, 微塑料的胁迫诱导了氧化应激, 代谢组学分析表明聚苯乙烯微塑料会引起贻贝代谢谱的改变, 差异代谢物参与能量代谢、脂质代谢、三羧酸循环和神经毒性反应^[53]。

菲律宾蛤仔是一种广温、广盐、分布广泛的重要经济贝类。Jiang 等人研究了直径 5 μm 和 10 μm 聚苯乙烯微塑料对菲律宾蛤仔生理过程、生长方面的影响。结果表明, 这两种微塑料都能被菲律宾蛤仔摄入, 并蓄积在它们的鳃、消化腺和肠道中。此外, 两种直径的塑料积累显著增加了菲律宾蛤仔的呼吸和排泄速率, 降低了摄食和吸收效率, 使可用于生长的能量显著减少, 导致其生长速度减慢^[54]。菲律宾蛤仔在微塑料 (0.4 μm 和 6 μm 聚苯乙烯微塑料, 浓度 20 $\mu\text{g/L}$) 和芘 (浓度 10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$) 单一或复合暴露条件下均会对其产生毒性效应, 使其免疫能力降低、抗氧化系统受损, 并且能够显著抑制其摄食率^[55]。

1.2.2 微塑料对其他海洋生物的毒性效应

鱼类是水生生态系统食物链中的顶级捕食者, 也是海洋环境中的代表性群体。研究表明, 微塑料可被鱼类摄入, 蓄积在鳃、肠道等部位, 甚至能够通过血脑屏障, 进入血液中^[56]。Mak 等^[57]研究了斑马鱼 (*Danio rerio*) 对 5 种粒径 (10 ~ 600 μm) 微塑料的摄入和组织分布过程, 发现 5 种粒径的微塑料均可被摄入, 并且在高浓度 (1100 个/L) 暴露组中, 在肠道和鳃组织中均检测到了微塑料。将青鳉鱼 (*Oryzias latipes*) 暴露在浓度为 10 mg/dm^3 的聚苯乙烯微塑料中 7 天后, 不但在鳃、肠道和肝脏中检测到了微塑料, 在大脑中也能检测到微塑料的存在, 说明微塑料能够通过血脑屏障, 进而可能对生物体产生不利影响^[58]。微塑料不仅能够积累在鱼类的组织中, 还会对鱼的生长发育、器官功能等产生不利影响, 甚至会对免疫系统造成伤害^[59]。将金头鲷 (*Sparus aurata*) 暴露于粒径 (40 ~ 150 μm) 浓度分别为 1 和 10 mg/mL 的聚氯乙烯和聚乙烯微塑料中, 受试动物的白细胞会发生氧化应激反应, 随暴露时间的增加可损伤其免疫功能^[60]。Lu 等研究不同粒径微塑料对斑马鱼的毒性差异, 发现 5 μm 的微塑料可以积累在鳃、肝脏和肠道中, 20 μm 的微塑料可以积累在鳃、肠道中, 暴露 7 天两种粒径的塑料都能引起斑马鱼肝脏炎症和脂质积累, 并且超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性显著提高, 诱导了斑马鱼氧化应激反应, 肝脏代谢谱改变, 并扰乱脂质和能量代谢^[61]。

甲壳动物具有游动能力，可以自主选择生存环境，但也会受到海洋微塑料污染问题的影响^[62]。将丰年虾（*Artemia salina*）幼体暴露于粒径为 0.1 μm 微塑料中 48 h 后发现，随着浓度的增加（0.01 ~ 10 mg/L），微塑料不仅改变了丰年虾幼体的游动行为，还引起强烈的氧化应激反应^[63]；将丰年虾暴露在 1 和 10 μm 的聚苯乙烯微塑料中，96 h 后发现其过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的活性增加，表明丰年虾在微塑料暴露下出现了抗氧化系统失衡^[64]。用聚苯乙烯微塑料对草虾进行 3 h 短期暴露，发现粒径大于 50 μm 的微塑料会导致斑节对虾（*Penaeus monodon*）死亡率显著升高^[65]。

摄入微塑料还可以对浮游生物的生长繁殖和氧化应激等方面产生影响。大型蚤（*Daphnia magna*）在较高的微塑料浓度下暴露下 7 天后，其成虫的产卵数量显著减少，大型蚤的性成熟天数延长。清除微塑料后幼虫数量增加，表明大型蚤在微塑料环境中生长受到抑制，对种群繁殖和后代生长产生了负面影响^[66]。Jeong 等将轮虫（*Monogonont rotifer*）和矮小拟镖剑水蚤（*Paracyclops nana*）暴露在不同粒径的聚苯乙烯微塑料中（0.05 μm 和 6 μm ），研究结果表明直径更小的 0.05 μm 微塑料能够渗透细胞膜，导致更强的氧化应激反应^[67,68]。

1.2.3 生物膜微塑料介导的生物毒性效应

环境中的塑料在风化、光氧化、微生物降解等作用下会发生表面氧化、交联、产生表面裂纹等现象，统称为塑料老化^[69]。塑料老化有利于表面生物膜的形成，使得塑料表面的疏水性和均匀性降低，从而影响其吸附性能^[70,71]。相关研究表明，生物膜微塑料会对金头鲷的运动能力、细胞应激以及抗氧化剂水平产生影响^[72]。将 36 只金头鲷幼鱼暴露在原始和野外风化的微塑料中 21 天，结果显示野外风化微塑料暴露组比对照组的细胞应激水平有所增加，对照组的过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽巯基转移酶和丙二醛均处于正常水平，而暴露组除丙二醛外的其他生物标志物在肝脏中均存在显著差异，这表明暴露于微塑料 21 天后，组织中抗氧化酶活性增加，但不会因脂质过氧化而产生细胞损伤。在野外风化微塑料中暴露的金头鲷鱼脑组织样本中，作为主要抗氧化剂的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的活性显著增加，表明生物膜微塑料比普通微塑料能对金头鲷幼鱼产生更强的毒性效应。

将聚苯乙烯塑料微珠（15 和 30 μm ）置于天然海水中孵育三周后进行纺锤水蚤（*Acartia longiremis*）和飞马哲水蚤（*Calanus finmarchicus*）的毒理暴露实验，结果表明这两种蚤在生长发育的不同阶段都摄入了微塑料，但摄入个数及比例与塑料粒径有关，其中对 15 μm 的聚苯乙烯微珠摄入量更大。在雌性纺锤水蚤、成年飞马哲水蚤以及两种受试动物幼虫期对生物膜微塑料的摄入率显著高于原始塑料微珠。这种由天然微生物组成的表面生物膜及其分泌的化学物质可能与桡足类动物在水中的食物相似，从而增加桡足类对微塑料颗粒的摄食^[73]。关于微塑料对海洋生物的毒理研究大多使用原始微塑料，而在海水环境中微塑料的表面通常被微生物定殖，形成生物膜。目前，附着生物膜对微塑料潜在影响尚不清楚，且关于生物膜微塑料对双壳贝类的毒性效应方面的研究非常匮乏。天然海洋环境中微塑料附着生物膜的形成可能改变微塑料的生物有效性及毒性，使得微塑料污染对海洋生物及海洋生态系统的影响更加严峻化、复杂化。

1.3 研究意义及内容

1.3.1 研究目的及意义

双壳贝类海洋动物不但在海洋生态系统中起着重要作用，而且在水产养殖业中也具有重要的商业价值。此外，这类生物是一种滤食性生物，具有固着生活的特征，其分布范围广泛，对各种污染物都有较强的抵抗力和富集能力，并且是海洋食物链中的重要的一环。然而，目前针对附着生物膜微塑料对双壳贝类的毒理学研究非常匮乏，生物膜对微塑料生物毒性效应的影响尚不清楚。因此，深入探究不同生物膜聚苯乙烯微塑料对双壳贝类的毒性效应及作用机制具有重要意义。

本论文基于海南省红树林生态系统，通过模拟孵育具有红树林生境特征微塑料表面生物膜，以海南红树林典型的两种双壳贝类（波纹巴非蛤和菲律宾蛤仔）为受试生物，从摄食、病理损伤、氧化应激以及代谢产物层面研究不同官能团聚苯乙烯生物膜微塑料以及不同粒径聚苯乙烯生物膜微塑料对双壳贝类的毒性效应，探究附着生物膜对微塑料毒性效应的影响。考察生物膜是否影响微塑料在双壳贝类体内的蓄积和分布；分析附着生物膜对微塑料毒性的影响；从代谢产物层面探讨生物膜如何影响聚苯乙烯微塑料的毒性效应；探讨普通微塑料和生物膜微塑料对双壳贝类的毒性机制的差异。

1.3.2 研究内容

利用荧光示踪分析法和激光共聚焦显微镜技术，研究附着生物膜的不同官能团聚苯乙烯微塑料在波纹巴非蛤体内和附着生物膜的不同粒径氨基聚苯乙烯微塑料在菲律宾蛤仔体内的蓄积和分布特征（蓄积规律、分布部位等），从摄食角度考察生物膜是否影响微塑料在双壳贝类体内的蓄积。

采用组织病理及生化分析法研究聚苯乙烯微塑料对双壳贝类鳃和消化腺组织的一系列毒性效应（病理损伤、抗氧化能力、氧化损伤等），从病理损伤和氧化应激等角度分析生物膜对不同微塑料毒性的影响。

运用代谢组学技术分析不同聚苯乙烯微塑料胁迫下双壳贝类代谢产物谱的响应特征，挖掘可表征微塑料毒性的特征代谢产物，并识别微塑料干扰的关键代谢途径，从代谢产物层面探讨生物膜如何影响微塑料的毒性效应。

1.3.3 技术路线

本研究主要以波纹巴非蛤、菲律宾蛤仔为研究对象，探究不同生物膜聚苯乙烯微塑料对双壳贝类的毒性效应，实验技术路线如图 1.1。

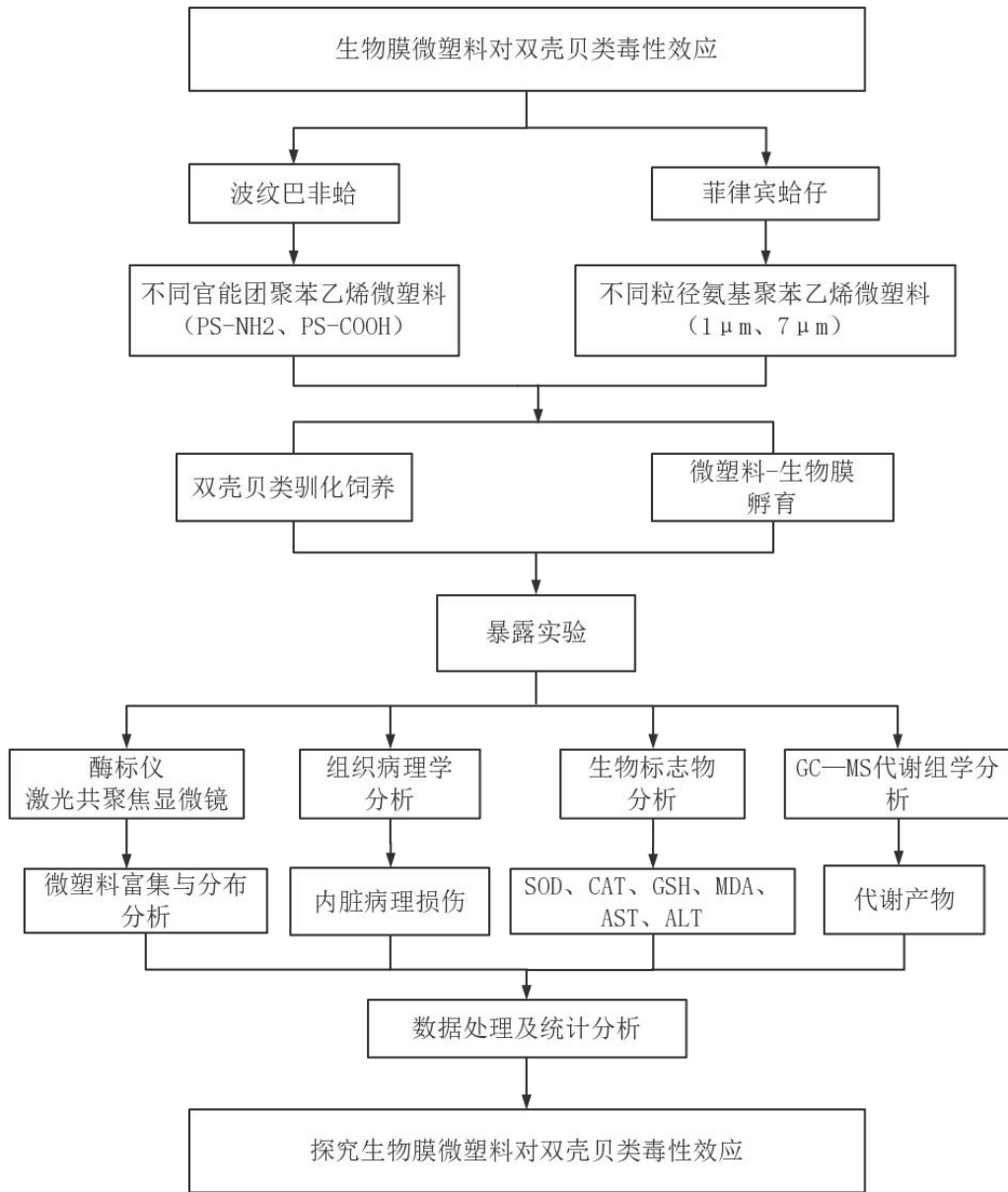


图 1.1 技术路线

Figure 1.1 Technical route

第 2 章 材料与方法

2.1 实验动物及其驯化

波纹巴非蛤 (*Paphia undulata*) 和菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 从海南省三亚市海鲜市场购买, 置于实验室水族箱中暂养驯化 (温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 连续充气, 溶解氧含量 $7\text{ mg/L} \pm 0.5\text{ mg/L}$, 光暗比为 12 h / 12 h)。每日投喂浓缩小球藻 (浓度: $1.0 \times 10^6\text{ cells/mL}$) 一次, 实验用水为水族专用海盐 (FOT 纯鱼盐, 蓝色珍品) 配制的人工海水, 驯化饲养波纹巴非蛤 (暂养盐度: $30\text{‰} \pm 1\text{‰}$ 、pH: 7.82 ± 0.09)、菲律宾蛤仔 (暂养盐度: $21\text{‰} \pm 1\text{‰}$ 、pH: 7.54 ± 0.29)。驯化 7 天后, 选取个体大小相近、健康的贝类作为受试动物进行分组实验。

2.2 微塑料表面生物膜繁育

实验所用微塑料为不同官能团单分散聚苯乙烯微球溶液 (PS-NH₂、PS-COOH, 粒径 3 μm , 浓度 25 mg/mL); 不同官能团单分散聚苯乙烯绿色荧光微球溶液 (PS-NH₂、PS-COOH, 粒径 3 μm , 浓度 10 mg/mL)。不同粒径单分散氨基聚苯乙烯微球干粉 (PS-NH₂, 粒径 1 μm 、7 μm ; 不同粒径单分散氨基聚苯乙烯绿色荧光微球干粉 (PS-NH₂, 粒径 1 μm 、7 μm)。以上所用聚苯乙烯微塑料溶液、干粉均购买自天津倍思乐中心。

采集海南省三亚市亚龙湾青梅港红树林自然保护区的新鲜海水, 将聚苯乙烯微塑料放入锥形瓶中用采集的新鲜海水配置成 1 mg/mL 的溶液放置于立式恒温摇床 (JQZW-1102C, 上海精其) 中 (设置温度为 26°C , 转速 100 rpm), 在室内繁育 21 天, 期间每周更换新鲜海水 2 次, 促使微塑料表面生物膜的形成^[74]。

2.3 微塑料表面生物膜表征

2.3.1 不同官能团聚苯乙烯微塑料表面生物膜表征

室内繁育结束后, 为了研究 3 μm PS-NH₂ 和 PS-COOH 微塑料的表面特征, 将 1 mg/mL 原始和生物膜微塑料悬浮液样品置于导电胶带上。干燥 12 h 后, 使

用扫描电子显微镜（SEM）（JSM-7601F PLUS）观察 3 μm 原始以及孵育后的 PS-NH₂ 和 PS-COOH 微塑料表面形貌。

2.3.2 不同粒径氨基聚苯乙烯微塑料表面生物膜表征

室内孵育结束后，为了研究 1 μm 和 7 μm PS-NH₂ 微塑料的表面特征，将使用扫描电子显微镜观察 1 μm 和 7 μm 原始以及孵育后的 PS-NH₂ 微塑料表面形态。

取 200 μL 浓度为 1 mg/mL 的 1 μm 和 7 μm 非荧光原始以及孵育后的 PS-NH₂ 微塑料，用超纯水定容至 2 mL，加入 50 μL 4% 的多聚甲醛，再加入 Sybr green 染料（X-Y Biotechnology）200 μL ，染色 10 min，抽滤到黑色聚碳酸酯滤膜上（孔径 0.2 μm , Whatman），用荧光显微镜（DM4B+DMC4500, Leica）观测染色情况，染色情况可用来证明 PS-NH₂ 表面生物膜的形成。

2.4 微塑料毒理暴露

2.4.1 波纹巴非蛤毒理暴露实验

实验所用微塑料为原始荧光和非荧光聚苯乙烯微塑料溶液（PS-NH₂、PS-COOH, 3 μm ），附着生物膜荧光和非荧光的聚苯乙烯微塑料溶液（PS-NH₂、PS-COOH, 3 μm ），分别设计过滤海水实验对照组（Control）、原始 PS-NH₂ 暴露组（PS-NH₂）、原始 PS-COOH 暴露组（PS-COOH）、生物膜 PS-NH₂ 暴露组（B-PS-NH₂）和生物膜 PS-COOH 微塑料暴露组（B-PS-COOH）。微塑料暴露浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ ，每个实验组 3 个平行玻璃缸（荧光微塑料 1 个玻璃缸，非荧光微塑料 2 个玻璃缸，体积为 16 L。荧光微塑料玻璃缸中的波纹巴非蛤用来检测不同聚苯乙烯微塑料在其体内的蓄积和分布情况，非荧光玻璃缸中的波纹巴非蛤用来观测鳃和消化腺组织的病理损伤情况、生物标志物的测定以及代谢组学分析）。水温 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，盐度 $30\text{‰} \pm 1\text{‰}$ ，连续充气，溶解氧含量 $7 \text{ mg/L} \pm 0.5 \text{ mg/L}$ ，光暗比为 12 h / 12 h。将驯化后的波纹巴非蛤（壳长： $40.65 \pm 1.9 \text{ mm}$ ，壳宽： $12.93 \pm 0.61 \text{ mm}$ ，壳高： $23.06 \pm 1.00 \text{ mm}$ ，体重： $7.27 \pm 0.98 \text{ g}$ ）按照设置的实验条件随机分组，每个玻璃缸放入 20 只，每日更换海水前 2 h 投喂小球藻一次。暴露实验持续 7 天，结束后解剖生物体并收集鳃、消化腺、外套膜和肠组织，将用于生化分析和代谢组学分析的样品迅速放入液氮中冷冻并转至 -80°C 冰箱保存，用于组织病理学及荧光微塑料分布分析的样品置于 4% 的多聚

甲醛水中固定后放入冰箱冷藏保存，将用于测定组织内微塑料含量的样品放入 -20°C 冰箱保存。

2.4.2 菲律宾蛤仔毒理暴露实验

实验所用微塑料为原始荧光和非荧光氨基聚苯乙烯微塑料干粉(粒径 $1\text{ }\mu\text{m}$ 、 $7\text{ }\mu\text{m}$)，附着生物膜荧光和非荧光的氨基聚苯乙烯微塑料干粉(粒径 $1\text{ }\mu\text{m}$ 、 $7\text{ }\mu\text{m}$)，将上述塑料干粉用超纯水配制成浓度 1 mg/mL 的微塑料标准液。

设置人工海水实验对照组(Control)，粒径为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的PS-NH₂暴露组($1\text{ }\mu\text{m}$)，粒径为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的生物膜PS-NH₂暴露组(B- $1\text{ }\mu\text{m}$)，粒径为 $7\text{ }\mu\text{m}$ 的PS-NH₂暴露组($7\text{ }\mu\text{m}$)，粒径为 $7\text{ }\mu\text{m}$ 的生物膜PS-NH₂暴露组(B- $7\text{ }\mu\text{m}$)，五个实验组，浓度为 $200\text{ }\mu\text{g/L}$ 微塑料暴露溶液(吸取 2.4 mL 微塑料标准液，用海水定容至 12 L)。每组设置3个玻璃缸(荧光1个玻璃缸、非荧光2个玻璃缸，每缸饲养16只贝，荧光微塑料玻璃缸中的菲律宾蛤仔用来检测不同粒径PS-NH₂微塑料在其体内的蓄积和分布情况，非荧光玻璃缸中的菲律宾蛤仔用来观测鳃和消化腺组织的病理损伤情况、生物标志物的测定以及代谢组学分析)，选取大小均匀、健康的菲律宾蛤仔(壳长： $38.54 \pm 1.87\text{ mm}$ ，壳宽： $16.67 \pm 1.18\text{ mm}$ ，壳高： $25.91 \pm 0.98\text{ mm}$ ，体重： $11.03 \pm 1.80\text{ g}$)置于各组玻璃缸中饲养(水温 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，盐度 $21\text{‰} \pm 1\text{‰}$ ，12 h / 12 h光照循环，连续充氧气，溶解氧含量 $7\text{ mg/L} \pm 0.5\text{ mg/L}$)。每天定时更换全部海水一次，换水前3 h，日投饵1次(每个玻璃缸投喂小球藻 0.6 mL)。每天重复相同的操作，共暴露8天。暴露实验第4天解剖一部分菲律宾蛤仔，用于检测不同粒径PS-NH₂微塑料在菲律宾蛤仔鳃、消化腺、外套膜和肠道组织的蓄积情况以及鳃和消化腺组织中生物标志物的测定；第8天解剖剩余菲律宾蛤仔相应组织，用于后续的荧光微塑料在组织蓄积及分布、组织病理学、生化分析和代谢组学分析。菲律宾蛤仔相应组织样品的保存方法同2.4.1。

2.5 组织中微塑料含量的测定

2.5.1 波纹巴非蛤组织中微塑料含量测定

将波纹巴非蛤鳃、消化腺、外套膜和肠组织样本称重(湿重)后置于 50 mL 锥形瓶中，加入 8 mL 10% KOH溶液，立式恒温摇床中于 60°C ， 100 rpm 条件下消解12 h后，再加入 2 mL 30% H₂O₂溶液继续消解12 h，消解完成后用超纯水

定容至 10 mL^[75]。每个样品取 200 μ L 加入到酶标板（黑色 96 孔）中，酶标仪（Molecular Devices, SpectraMax i3x）设置激发波长 488 nm 和发射波长 518 nm，测量各样品消解液的荧光强度。通过建立原始以及生物膜荧光 PS-NH₂ 和 PS-COOH 溶液的标准曲线，对微塑料在组织中的含量进行定量分析^[76]。

2.5.2 菲律宾蛤仔组织中微塑料含量测定

将菲律宾蛤仔鳃、消化腺、外套膜和肠组织样本在冷冻干燥机（SCIENTA-10N，宁波新芝）中冷冻干燥 12 h 后称重（干重），消解及测定方法同 2.5.1。通过建立荧光原始及生物膜 1 μ m 和 7 μ mPS-NH₂ 溶液的标准曲线，对微塑料在组织中的含量进行定量分析。

2.6 组织中微塑料的分布观测

暴露实验结束后，采集波纹巴非蛤鳃、消化腺、外套膜和肠道组织，菲律宾蛤仔鳃、消化腺和肠道组织，使用预冷的 4%多聚甲醛溶液固定相应组织 1 h，经水洗、乙醇梯度干燥、二甲苯透明处理后浸蜡包埋，每个样本制作 3 张组织切片。采用激光共聚焦显微镜（FV3000，日本奥林巴斯）在激发波长 488 nm 处对组织切片进行观测，分析荧光微塑料在组织中的微观分布特征^[77]。

2.7 组织病理学分析

采集波纹巴非蛤和菲律宾蛤仔的鳃、消化腺组织，使用预冷 4%多聚甲醛水固定样品，经水洗、乙醇梯度干燥、二甲苯透明处理后浸蜡包埋后切片，切片用苏木精和伊红染色后在显微镜下观测，检测内脏细胞受损情况。

2.8 组织中生物标志物的测定

取波纹巴非蛤、菲律宾蛤仔的鳃和消化腺组织称重后放入 2 mL 离心管，按重量（g）:体积（mL）=1:9 的比例，加入 9 倍预冷的生理盐水，在离心管中加入钢珠，用组织研磨仪在 60 赫兹（Hz）条件下研磨 4 min，制备 10%组织匀浆液，用高速冷冻离心机设置温度为 4℃，转速为 2500 r/min，离心 10 min 后取上清液冷藏保存用于后续生物标志物的测定。总蛋白定量测试盒（BCA 法）、SOD

试剂盒（WST-1 法）、CAT 可见光试剂盒、GSH 测定试剂盒（微板法）、MDA 测定试剂盒、AST/GOT 测定试剂盒（微板法）、ALT/GPT 测定试剂盒（微板法）均采购自南京建成生物工程研究所。根据试剂盒操作步骤进行各标志物的分析，采用酶标仪进行测定。主要仪器设备见表 2.1，此外，所需仪器还有纯水机、水浴锅、涡旋混合器、超声波清洗器等。

表 2.1 主要仪器设备

Table 2.1 Main instruments and equipment

名称	型号	品牌
电子天平	PTX-FA210S	华志（福建）电子科技有限公司
超低温冰箱		Dixell
冰箱	BCD-452WDPF	青岛海尔股份有限公司
组织研磨仪	Tissuelyser-192L	上海净信实业发展有限公司
高速冷冻离心机	D1524R	大龙兴创实验仪器（北京）股份公司
低速离心机	DM0412	大龙兴创实验仪器（北京）股份公司
移液枪	1-10 μL 、2-20 μL 、20-200 μL 、 100-1000 μL 、0.5-5 mL	Thermo Fisher Scientific
多功能酶标仪	SpectraMax i3x	Molecular Devices

2.9 代谢组学分析

准确称取波纹巴非蛤和菲律宾蛤仔的消化腺组织 100 mg，保证每个实验组至少 6 个样品，将样品剪切，加入提取剂（甲醇:氯仿，3:1，v/v）和内标后研磨（45 Hz，研磨 2 min，样品静置冷藏 5 min，再研磨 2 min），冰水浴中超声 10 min，低温离心（4℃，12000 rpm，15 min），取上层清液 450 μL 放入预冷的 2 mL 离心管（Eppendorf），在真空冷冻干燥机中进行浓缩干燥，设置梯度浓缩条件：30℃，浓缩 3 h 后在室温下再浓缩至少 1 h，至样品完全干燥。离心管内加入 20 mg/mL 的甲氧基胺盐酸盐溶液 40 μL 试剂进行衍生化，密封后涡旋混合 30 s，置

于室温孵育 17 h 后再加入 60 μL 的 BSTFA 试剂，密封后涡旋振荡 30 s，在 70°C 孵育 90 min。离心后吸取上清液加入内插管中，采用气相色谱-质谱联用仪（GC-MS）进行代谢物质成分分析。主要仪器设备见表 2.2，所需仪器设备还有天平、超低温保存箱、医用低温保存箱、通风柜等。实验所用提取试剂、衍生化试剂、甲醇、氯仿、葡萄糖- ^{13}C 、十七烷酸甲酯、甲氧胺盐酸盐、无水吡啶、BSTFA 均购买自 Sigma-Aldrich 公司。

表 2.2 主要仪器设备

Table 2.2 Main instruments and equipment

名称	型号	品牌
组织研磨仪	Tissuelyser-24	上海净信有限公司
涡旋混合器	Vortex-5	Kylin-Bell
数控超声波清洗器	KQ-50DB	昆山市超声仪器有限公司
综合型超纯水机	Best-S15 FV	芷昂仪器（上海）有限公司
冷冻离心机	5430R	Eppendorf
多功能恒温混匀仪	Mixer-100H	上海巴玖实业有限公司
移液枪	2-20 μL 、20-200 μL 、 100-1000 μL	Eppendorf
真空冷冻干燥机	Auto R1-Plus	北京吉艾姆科技有限公司
快速气相色谱	8890	Agilent
高通量飞行时间质谱	Pegasus BT	LECO

代谢组学分析采用气相色谱飞行时间质谱联用仪（GC-TOF/MS，Agilent 8890，Pegasus BT，USA）进行，色谱柱为 Rxi-5MS（30 m x 0.25 mm x 0.25 μm ，Restek，USA）。样品进样量为 1 μL ，采用不分流模式进样，进样口温度为 280°C。载气为氦气，流速 1 mL/min。程序升温条件如下：初始温度 50°C，保持 1 min，以 10°C/min 的速率升高至 300°C，保持 6 min。质谱传输线和离子源温度分别为 280°C 和 250°C，EI 能量为 70 eV。质谱扫描模式为全扫描，扫描范围为 50-500 m/z，扫描速度为 20 spectra/s，溶剂延迟为 7 min。

采用 Chroma TOF 5.54 软件 (LECO, USA)、Statistical Compare 4.74 软件 (LECO, USA) 及商用质谱数据库 (Mainlib、NIST 和 Wiley) 进行代谢物分析鉴定, 主要步骤包括原始峰提取、数据噪声过滤、基线校准、峰对齐、解卷积分析、峰识别和峰面积积分。

2.10 数据统计分析

对于双壳贝类组织中微塑料的含量和生物标志物的数据采用 SPSS 26.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 评价不同实验组间测量结果的统计学差异 (p 值小于 0.05 考虑为差异显著), 同时对生物标志物数据进行标准化处理后比较环境压力大小, 即综合生物标志物响应指数 (Integrated biomarker response, IBR) [78]。

在本研究中, 用 IBR 法评估不同聚苯乙烯微塑料对双壳贝类的潜在毒性。大致分为以下 5 个步骤: (1) 将每个处理组的生物标志物数据 (X) 与对照组数据 (X_0) 进行比较, 取对数以减少偏差: $Y = \log X/X_0$ 。(2) 计算生物标志物的均值 (m) 和标准差 (s), 令 $Z = (Y - m)/s$, Z 为均一化后的值。(3) 计算生物标志物偏差指数 A , $A = Z - Z_0$ (Z 为处理组, Z_0 为对照组)。(4) 绘制雷达图, 各实验组中每种生物标志物偏差指数 A 的大小以雷达图中的辐射线长度表示。其中高于 0 的区域表明生物标志物被诱导, 低于 0 的区域表明生物标志物被抑制。(5) 计算 IBR 值, $IBR = \sum |A|$ 。

对于代谢组学数据, 采用多元统计学分析方法, 对原始数据进行整理, 删掉非代谢产物后, 采用 SIMCA 13 软件进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (Orthogonal partial least squares-Discriminant analysis, OPLS-DA) 建立模型 (模型 p 值小于 0.05), 提取出位于 jack knifing 的 95% 置信区间内且重要性变量 (Variable importance in the projection, VIP) 大于 1 的差异代谢物, 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 考虑为差异显著。将筛选出的差异代谢物导入 TBtools 软件制作热图, 在 Metabo Analyst 在线分析平台, 通过 KEGG 代谢数据库对于受到干扰的代谢通路进行功能途径分析。

第3章 不同官能团聚苯乙烯生物膜微塑料对波纹巴非蛤的毒性效应研究

3.1 前言

从2004年“微塑料”这一概念被提出后,关于微塑料对海洋生物的毒性效应研究引起了国内外学者的广泛关注。在天然海水环境中,微塑料可以作为微生物的载体,在微塑料的表面形成生物膜。有研究证实表面生物膜中细菌的多样性水平高于海水,即微塑料为周围海水中的细菌提供了良好的生长环境,成为了细菌定殖富集的新型栖息地^[79]。另外,微塑料表面电荷可以通过影响微塑料的团聚行为,从而对其生物效应产生影响^[80]。聚苯乙烯微塑料常见的表面电荷包括阴离子羧基化(-COOH)和阳离子氨基(-NH₂)化。有研究证实,微塑料的表面官能团使其更容易通过细胞膜,影响微塑料对生物的毒性^[81,82]。

目前,针对微塑料对双壳贝类的毒理效应研究主要采用牡蛎、贻贝等作为受试动物,而对其他双壳贝类的毒理效应研究较少。同时,现有关于微塑料对海洋生物毒性作用的研究多以原始微塑料为研究对象,与真实海洋环境中附着生物膜的微塑料在物理化学性质方面存在较大差异,不能真实地反映微塑料对海洋生物的毒性作用。因此,本实验拟基于海南省红树林生态系统,通过模拟繁育具有红树林生境特征微塑料表面生物膜,以波纹巴非蛤(*P. undulata*)为受试生物,从摄食、病理损伤、氧化应激以及代谢产物层面研究不同官能团聚苯乙烯生物膜微塑料对波纹巴非蛤的毒性效应,并探究附着生物膜对微塑料毒性效应的影响。

3.2 结果与讨论

3.2.1 微塑料表面生物膜表征

在扫描电镜3000倍和13000倍视野下观测不同官能团的非荧光聚苯乙烯微塑料,检测结果图3.1所示。粒径为3 μm PS-NH₂和PS-COOH原始微塑料颗粒表面相对光滑,在室内繁育21天的微塑料表面相对粗糙;将两种不同官能团聚苯乙烯生物膜塑料对比发现,繁育后的PS-NH₂微塑料表面更加粗糙,表明在相

同的孵育条件下，具有氨基官能团的聚苯乙烯老化更加明显。相关研究显示，微塑料之间磨损、碰撞会使其表面形貌发生变化^[83]。在海水环境中孵育 21 天的微塑料表面可附着细菌，细菌分泌胞外聚合物形成生物膜，并且在不同官能团的聚苯乙烯塑料表面会形成不同的生物膜群落，展现出不同的表面形态（图 3.1D,H）^[84]。

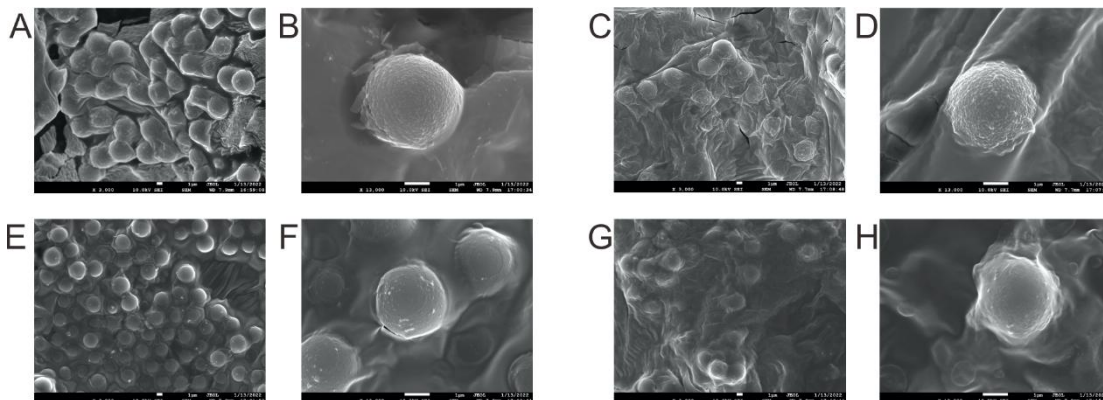


图 3.1 扫描电镜下 3 μm 聚苯乙烯微塑料形貌表征

A: PS-NH₂ (3000 倍) B: PS-NH₂ (13000 倍) C: B-PS-NH₂ (3000 倍) D: B-PS-NH₂ (13000 倍) E: PS-COOH (3000 倍) F: PS-COOH (13000 倍) G: B-PS-COOH (3000 倍) H: B-PS-COOH (13000 倍)

Figure 3.1 Morphological characterization of 3 μm polystyrene microplastics under scanning electron microscopy

A: PS-NH₂ (3000 x) B: PS-NH₂ (13000 x) C: B-PS-NH₂ (3000 x) D: B-PS-NH₂ (13000 x) E: PS-COOH (3000 x) F: PS-COOH (13000 x) G: B-PS-COOH (3000 x) H: B-PS-COOH (13000 x)

3.2.2 微塑料在波纹巴非蛤各组织中的蓄积特征

利用酶标仪分别建立相应荧光微塑料的标准曲线（PS-NH₂ 为 $y=353110x$, $R^2=0.9920$; PS-COOH 为 $y=443055x$, $R^2=0.9987$; B-PS-NH₂ 为 $y=295571x$, $R^2=0.9932$; B-PS-COOH 为 $y=223371x$, $R^2=0.9923$ ），对波纹巴非蛤各组织中的微塑料含量进行定量分析。波纹巴非蛤暴露于不同官能团聚苯乙烯微塑料中 7 天后，其鳃、消化腺、外套膜及肠中富集的微塑料含量如柱状图 3.2 所示。

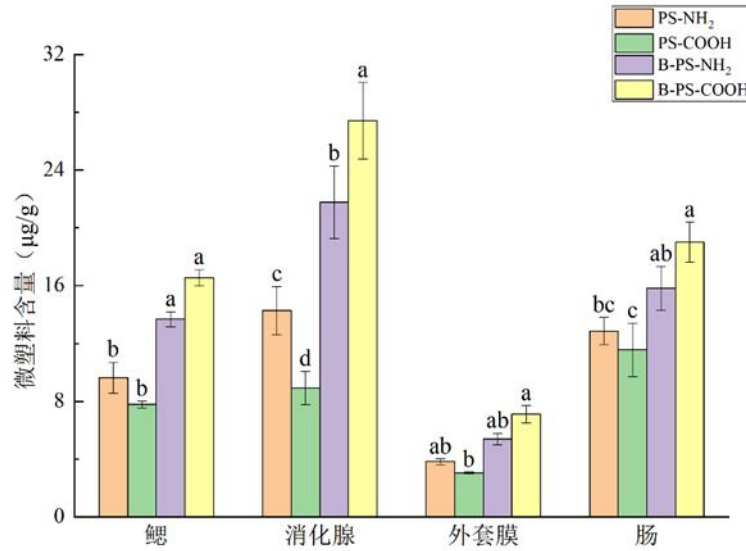


图 3.2 不同官能团聚苯乙烯微塑料在波纹巴非蛤各组织的含量

注：结果为均值±SD，n=4，同一组织中的不同字母表示处理间微塑料含量差异显著（ $p<0.05$ ）

Figure 3.2 Content of different functional polystyrene microplastics in each tissue of corrugated *P. undulata*

Note: The results were mean ±SD, n=4, and different letters in the same tissue indicated significant differences in microplastic content between treatments ($p<0.05$)

在鳃组织中，原始微塑料组富集含量平均值小于 $9.65 \mu\text{g/g}$ ，显著低于生物膜微塑料组（ $p<0.05$ ），但不同官能团的两组微塑料之间富集含量没有显著差异。四组微塑料在消化腺中的富集含量差异显著（ $p<0.05$ ），该组织中富集的 PS-NH₂、PS-COOH、B-PS-NH₂ 和 B-PS-COOH 塑料平均含量分别为 $14.27 \mu\text{g/g}$ 、 $8.93 \mu\text{g/g}$ 、 $21.76 \mu\text{g/g}$ 和 $27.41 \mu\text{g/g}$ 。在波纹巴非蛤外套膜中，PS-COOH 微塑料含量显著低于 B-PS-COOH 微塑料富集含量（ $p<0.05$ ），其余组别中没有显著差异。在肠组织中，B-PS-NH₂ 微塑料含量高于 PS-COOH 微塑料，B-PS-COOH 微塑料蓄积量显著高于 PS-NH₂ 和 PS-COOH 组（ $p<0.05$ ）。在波纹巴非蛤四种组织中，消化腺和肠组织中蓄积的微塑料较多，外套膜中微塑料平均含量最少（ $p<0.05$ ），PS-NH₂、PS-COOH、B-PS-NH₂ 和 B-PS-COOH 的富集含量分别为 $3.82 \mu\text{g/g}$ 、 $3.04 \mu\text{g/g}$ 、 $5.38 \mu\text{g/g}$ 和 $7.11 \mu\text{g/g}$ 。

由于官能团本身特性、微塑料表面生物膜影响以及不同的生物组织对微塑

料的吸收途径不同,导致波纹巴非蛤对几种塑料的富集情况存在差异。波纹巴非蛤是滤食性双壳贝类,摄食时由于外套膜及鳃表面纤毛的打动,较小的食物颗粒被传送到鳃丝腹缘的食物沟中,继而被吞食转移至消化系统,最后在消化腺和肠中积累^[85]。在鳃和消化腺组织中,生物膜微塑料的富集量高于非生物膜塑料;在外套膜和肠组织中,生物膜 PS-COOH 的蓄积量也高于原始 PS-COOH。具有生物膜的微塑料其外观、气味等发生改变,可能更易被海洋动物摄食,进而在波纹巴非蛤组织中富集含量更高^[86]。此外,生物膜的形成改变了微塑料的表面形貌和疏水性能,进而增强其对海水环境中重金属、有机污染物等的吸附能力,可能影响微塑料的生物毒性^[87,88]。

在同一组织内,几种微塑料的蓄积量大致趋势为 B-PS-COOH>B-PS-NH₂>PS-NH₂>PS-COOH。与原始 PS-COOH 微塑料相比,原始 PS-NH₂ 微塑料具有相对较小的流体动力学直径和较高的分散性,因此,后者更容易富集于消化腺且内化至上皮细胞中,并通过循环系统转移至其他器官^[89];而 PS-COOH 颗粒分散性较差,容易团聚成较大颗粒,较难穿透生物屏障在组织中蓄积^[90]。含有官能团的聚苯乙烯微塑料在孵育后表面形成了生物膜^[91],增加了波纹巴非蛤对微塑料的摄入量。

3.2.3 微塑料在波纹巴非蛤各组织的分布特征

针对波纹巴非蛤的鳃、消化腺、外套膜和肠道组织,进一步利用激光共聚焦显微镜研究不同官能团聚苯乙烯荧光塑料在组织内的分布特征。由图 3.3 可见,波纹巴非蛤鳃、消化腺、外套膜、肠道中均可观测到较为明显的荧光微塑料,证实波纹巴非蛤可以摄入不同类型的聚苯乙烯塑料。在鳃中,微塑料主要蓄积于鳃丝、鳃瓣间联结处。在消化腺中,微塑料主要蓄积于腺体上皮细胞及消化管腔壁,部分微塑料团聚为较大颗粒。在肠道组织中,微塑料主要蓄积在肠道壁及肠道中,尤其趋向于在肠道绒毛处富集并团聚。根据激光共聚焦显微镜下观测的结果发现,具有生物膜的聚苯乙烯团聚现象更明显,团聚后的微塑料尺寸更大。可能是微塑料本身的团聚特性以及与生物分子相互作用发生异相凝聚的共同结果^[77]。

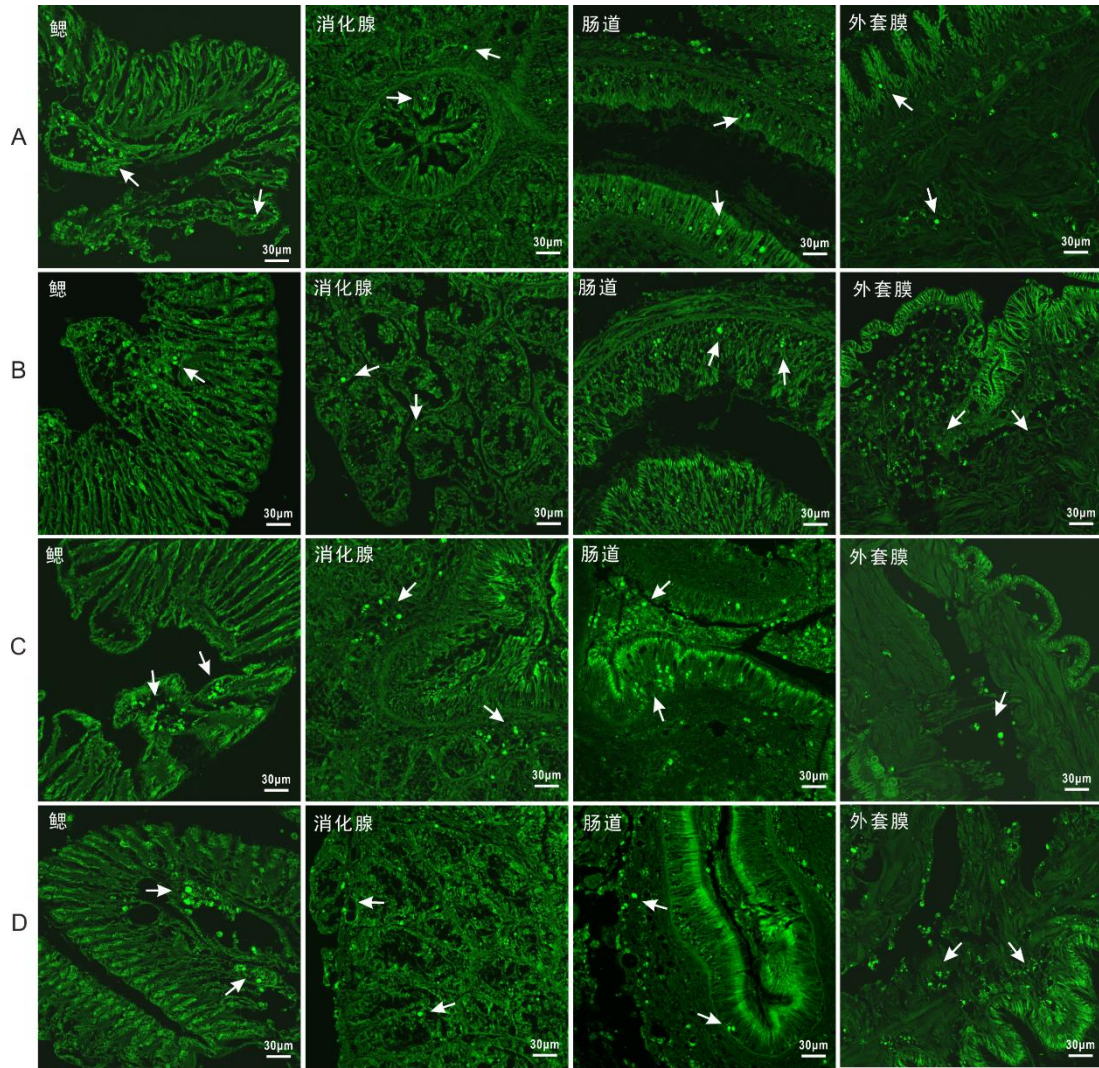


图 3.3 激光共聚焦显微镜下微塑料在波纹巴非蛤鳃、消化腺、外套膜和肠道中的分布情况（比例尺：30 μm）

A: PS-NH₂ 组 B: PS-COOH 组 C: B-PS-NH₂ 组 D: B-PS-COOH 组

Figure 3.3 Distribution of microplastics in *P. undulata* gill, digestive gland, mantle and gut under laser confocal microscopy (scale: 30 μm)

A: PS-NH₂ group B: PS-COOH group C: B-S-NH₂ group D: B-PS-COOH group

3.2.4 波纹巴非蛤鳃和消化腺的组织病理分析

3.2.4.1 鳃组织病理损伤

从图中可以看出，PS-NH₂ 组鳃丝排列紊乱，部分鳃丝末端严重肿胀，鳃丝

断裂，且不少鳃丝丝间联结损坏（图 3.4B）。PS-COOH 组部分鳃丝上的纤毛脱落，鳃丝内出现血细胞浸润现象，少部分鳃丝断裂，个别鳃丝上皮细胞坏死（图 3.4C）。B-PS-NH₂ 组鳃丝上皮细胞坏死、脱落，部分鳃丝丝间联结损坏，出现血细胞浸润现象（图 3.4D）。B-PS-COOH 组部分鳃丝断裂，丝间联结严重损坏，鳃丝上纤毛脱落，且鳃丝内出现血细胞浸润现象（图 3.4E）。结果表明，微塑料暴露后波纹巴非蛤鳃组织中均出现了明显的组织病理学损伤。相关研究也表明，在微塑料下暴露 21 天，长牡蛎（*Crassostrea gigas*）鳃组织会出现血细胞浸润、鳃丝肿胀、纤毛脱落等现象^[92]。

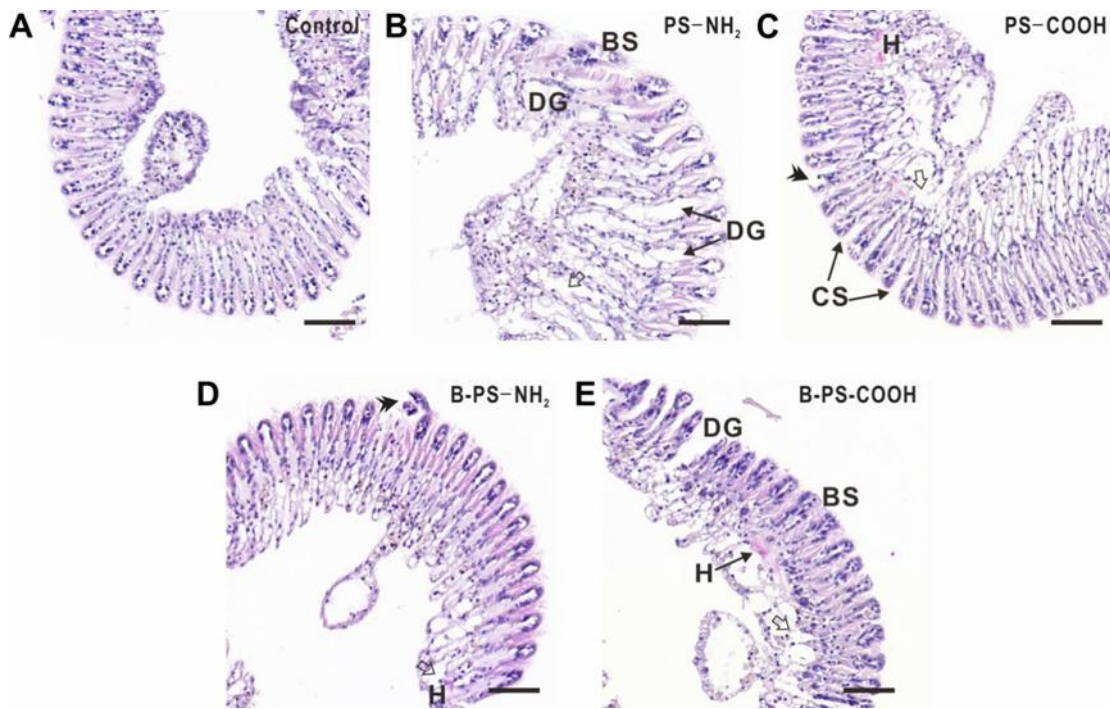


图 3.4 波纹巴非蛤鳃组织切片显微图（比例尺：50 μm）

A: 对照组 B: PS-NH₂ 组 C: PS-COOH 组 D: B-PS-NH₂ 组 E: B-PS-COOH 组
注：鳃丝肿胀（BS）；鳃丝丝间联结损坏（DG）；鳃丝断裂（⇔）；坏死（▶）；纤毛脱落（CS）；血细胞浸润（H）

Figure 3.4 Microscopic diagram of gill tissue sections of *P. undulata* (scale: 50 μm)

A: Control group B: PS-NH₂ group C: PS-COOH group D: B-PS-NH₂ group E: B-PS-COOH group

Note: branchial swollen (BS); disruption of gill filament junctions (DG); rupture of gill filaments (⇔); necrosis (▶); cilium shedding (CS); hemocyte infiltration (H)

3.2.4.2 消化腺组织病理损伤

在显微镜下观测的波纹巴非蛤消化腺组织病理损伤情况如下，PS-NH₂组消化腺腺体排列较疏松紊乱，部分上皮细胞出现核溶解现象，且有一些腺体细胞坏死（图 3.5B）。PS-COOH 组消化腺腺体排列较疏松，部分腺体边界模糊不清，大部分腺体细胞胞质空泡化，上皮细胞出现核溶解现象，部分腺体中可见明显的炎性渗出物，腺体细胞大面积坏死（图 3.5C）。B-PS-NH₂组消化腺腺体细胞胞质空泡化，发生水肿现象，不少腺体细胞坏死（图 3.5D）。B-PS-COOH 组消化腺部分上皮细胞出现核溶解现象，部分组织发生水肿现象，少部分腺体细胞坏死（图 3.5E）。已有研究表明，将栉孔扇贝（*Chlamys farreri*）在 1000 μg/L 的 PET 微塑料中暴露 21 天后，可造成消化腺组织坏死、细胞质破裂弥散等组织损伤^[92]。

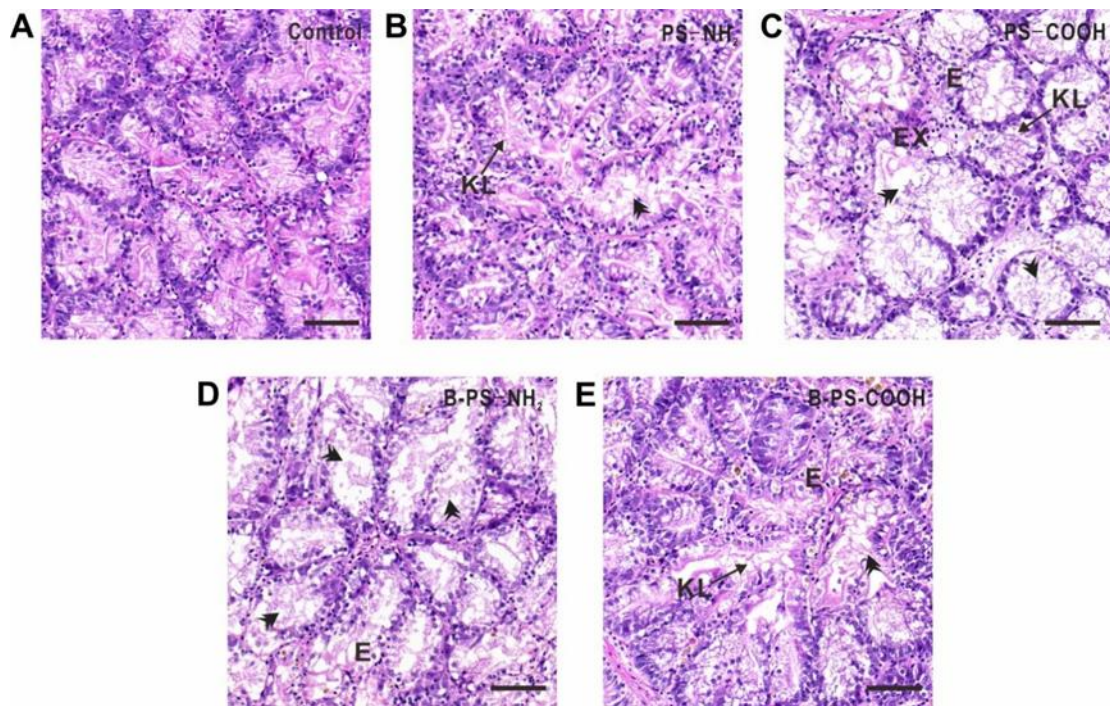


图 3.5 波纹巴非蛤消化腺组织切片显微图（比例尺：50 μm）

A: 对照组 B: PS-NH₂ 组 C: PS-COOH 组 D: B-PS-NH₂ 组 E: B-PS-COOH 组

注：组织坏死（►）；细胞核溶解（KL）；渗出物（EX）；水肿（E）

Figure 3.5 Microscopic diagram of the digestive gland tissue section of *P. undulata* (scale: 50 μm)

A: Control group B: PS-NH₂ group C: PS-COOH group D: B-PS-NH₂ group E: B-PS-COOH group

Note: necrosis (►); karyolysis (KL); exudate (EX); edema (E)

3.2.5 微塑料胁迫对波纹巴非蛤体内生物标志物的影响

在不同暴露条件下，波纹巴非蛤鳃和消化腺组织中的几种生物标志物活力/含量的变化如图 3.6 所示。

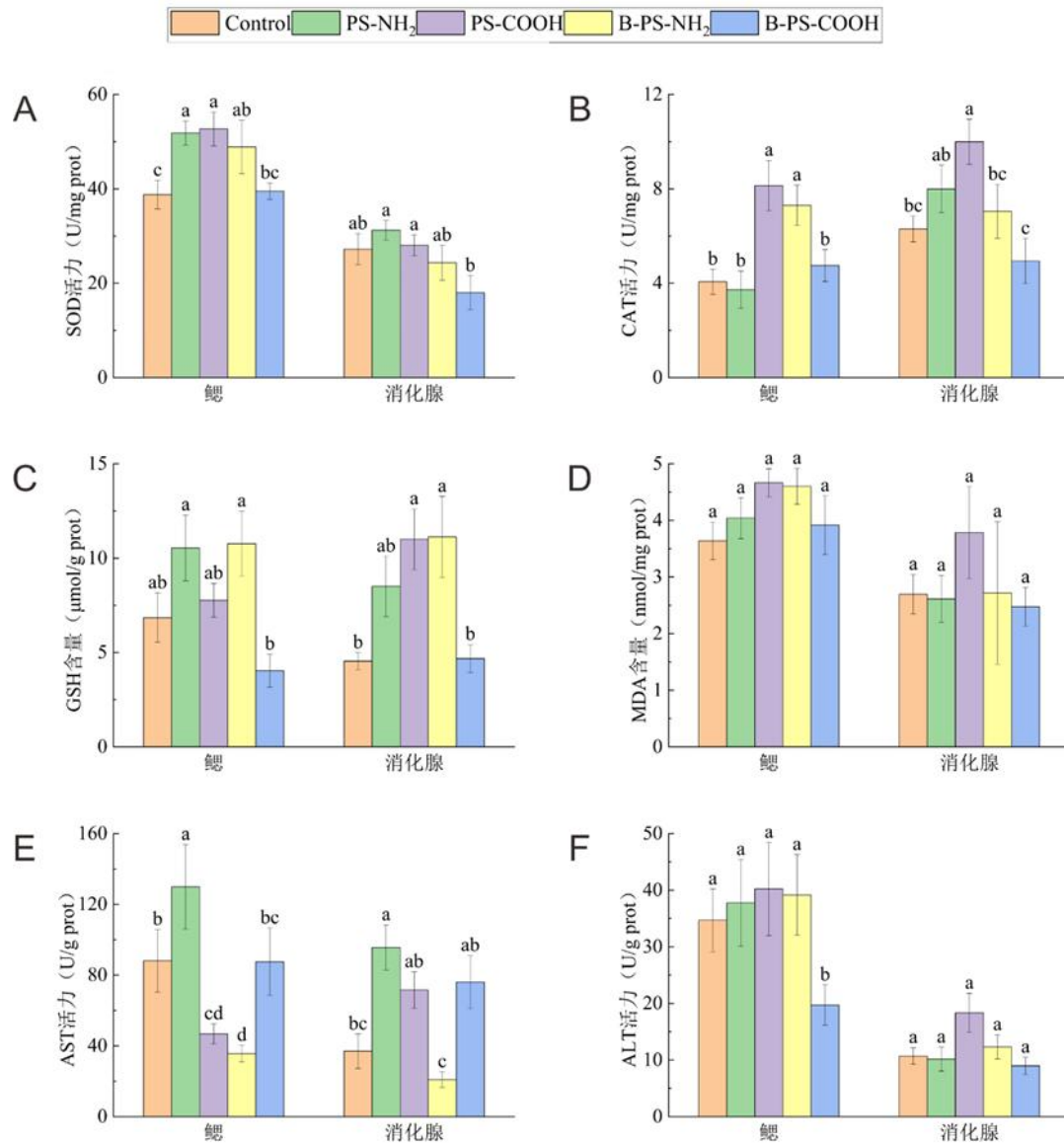


图 3.6 不同暴露条件下波纹巴非蛤各组织内生物标志物活性/含量变化
注：结果为均值±SD，n=4 - 8，同一组织中不同字母表示各处理间差异显著 (p<0.05)

Figure 3.6 Changes in biomarker activity/content in each tissue of *P. undulata* under different exposure conditions

Note: The result is mean ±SD, n=4 - 8, and different letters in the same tissue indicate

significant differences between treatments ($p<0.05$)

3.2.5.1 氧化应激标志物

超氧化物歧化酶 (SOD) 是双壳类海洋动物体内抗氧化防御系统的第一道防线, 可防止机体的氧化损伤。SOD 可以催化超氧自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 转化为过氧化氢 (H_2O_2) 和分子氧 (O_2), 用来清除生物体受到外界环境胁迫时产生的活性氧 (ROS) [93]。本研究结果表明, 与对照组相比, PS-NH₂、PS-COOH、B-PS-NH₂ 微塑料暴露导致波纹巴非蛤鳃中 SOD 活性显著升高, PS-NH₂ 和 PS-COOH 微塑料组鳃和消化腺组织器官中 SOD 活力显著高于 B-PS-COOH 暴露组 ($p<0.05$) (图 3.6A); 在波纹巴非蛤消化腺中, PS-NH₂ 和 PS-COOH 暴露条件下 SOD 活力显著高于 B-PS-COOH 组 ($p<0.05$), 但除 B-PS-COOH 微塑料暴露组外, 其余四组之间没有明显差异 (图 3.6A)。在相同的暴露条件下, 波纹巴非蛤鳃中 SOD 活力均高于消化腺中 SOD 活力 ($p<0.05$)。

本研究发现, 波纹巴非蛤暴露于 100 $\mu\text{g/L}$ 的 PS-NH₂、PS-COOH、B-PS-NH₂ 微塑料环境中 7 天后, 其鳃组织中 SOD 活性被显著激活, 且鳃中 SOD 活力均高于消化腺中 SOD 活力, 这表明两种官能团的聚苯乙烯微塑料均可不同程度地诱导波纹巴非蛤的氧化应激反应, 但对不同组织中 SOD 活性的诱导效率有所差异。有研究表明, 浅沟长舌蛤 (*Scrobicularia plana*) 暴露于粒径 20 μm 、浓度 1 mg/L 的聚苯乙烯微塑料海水环境中 7 天和 14 天后, 其鳃组织具有相似的 SOD 响应特征, 消化腺中 SOD 活性在暴露 14 天后才被显著激活[46]。在消化腺中, SOD 的活力没有显著变化。Wang 等发现暴露于 10 个/L 以及 10⁴ 个/L 的聚苯乙烯微塑料 (2 μm) 中 7 天的贻贝 (*Mytilus coruscus*) 消化腺中 SOD 活性也无显著变化[94]。这与本研究中消化腺组织 SOD 活力变化结果相似, 即在 100 $\mu\text{g/L}$ 的微塑料海水环境中暴露 7 天不会对波纹巴非蛤的消化腺 SOD 活力产生影响, 可能对于波纹巴非蛤这一双壳贝类, 更长的暴露时间才会使其消化腺中的 SOD 活力发生变化。

过氧化氢酶 (CAT) 是生物体内抗氧化防御系统的重要组成部分之一, 可以催化组织内 H_2O_2 分解生成氧气 (O_2) 和水 (H_2O) [95]。本研究表明, 与对照组相比, PS-COOH、B-PS-NH₂ 暴露条件下使波纹巴非蛤鳃中 CAT 活力显著升高 ($p<0.05$), 但 PS-COOH 和 B-PS-NH₂ 微塑料暴露组 CAT 活力没有明显差异, 对照组、PS-NH₂ 和 B-PS-COOH 三组之间也没有明显差异; 在波纹巴非蛤消化

腺中,PS-COOH 组 CAT 活力显著高于除 PS-NH₂ 暴露组之外的其他三组,PS-NH₂ 暴露组 CAT 活力高于 B-PS-COOH 组 ($p<0.05$), 对照组与 PS-NH₂、B-PS-NH₂ 和 B-PS-COOH 组没有显著差异 (图 3.6B)。比较相同暴露条件下鳃和消化腺两种组织器官中 CAT 活力的差异发现,除 PS-NH₂ 组中消化腺 CAT 活力显著高于鳃 CAT 活力,其他四组在波纹巴非蛤鳃和消化腺中的活力没有明显差异。

相关研究结果显示,暴露于 PS 微塑料 (1 mg/L) 3 天的浅沟长舌蛤 (*S. plana*) 鳃中 CAT 活性显著增加^[46]。这与本研究中 PS-COOH 和 B-PS-NH₂ 在波纹巴非蛤鳃中的 CAT 活力显著升高的结果一致。对消化腺而言,本研究中只有 PS-COOH 微塑料对受试动物消化腺内 CAT 活性有显著影响。由于抗氧化酶活性的响应特征与生物个体以及暴露塑料的粒径、类型、剂量和暴露时间等因素有关,可能 CAT 并非波纹巴非蛤用于响应 PS-NH₂ 和 B-PS-COOH 的主要抗氧化防御机制,而是抵抗 PS-COOH 和 B-PS-NH₂ 微塑料暴露的防御机制。

还原性谷胱甘肽 (GSH) 是抗氧化防御系统中用于防止各种外源性物质氧化脂质和蛋白质的关键成分之一,在细胞内能与 SOD 和 CAT 一起将 O² 和 H₂O₂ 还原为 H₂O,使得通过中间体生成高活性膜过氧化剂的反应链中断,从而保护细胞免受活性氧自由基的伤害^[96]。在波纹巴非蛤鳃中,对照组 GSH 含量与其余微塑料暴露组 GSH 含量没有明显差异,PS-NH₂ 和 B-PS-NH₂ 组 GSH 含量显著高于 B-PS-COOH 暴露组 ($p<0.05$);与对照组和 B-PS-COOH 组相比,PS-COOH 和 B-PS-NH₂ 微塑料暴露组在波纹巴非蛤消化腺中的 GSH 含量显著增加 ($p<0.05$)。此外,同种暴露条件下,波纹巴非蛤两种组织间的 GSH 含量没有显著差异 (图 3.6C)。

本研究结果显示,PS-COOH 和 B-PS-NH₂ 均导致波纹巴非蛤消化腺中 GSH 含量显著升高,但未引起鳃中 GSH 含量的显著变化。Li 等人将河蚬 (*Corbicula fluminea*) 暴露在 5.0 mg/L 的聚苯乙烯纳米塑料 (80 nm) 中 96 h 后发现,与对照组相比,鳃中 GSH 含量均无明显变化^[77]。比较不同粒径对轮虫 (*Brachionus koreanus*) 体内 GSH 含量的影响,结果显示,与对照组相比,在 10 µg/mL 的微塑料浓度下,PS 直径为 0.05 µm 时 GSH 含量增加,当 PS 为 0.5 µm 或 6 µm 时轮虫的 GSH 含量降低^[97]。Wang 等人研究结果显示,暴露于 2 µm 微塑料 (浓度: 10⁴ 个/L) 24 h 后,贻贝 (*M. coruscus*) 消化腺中的 GSH 含量显著升^[94]。GSH 水平可能会受到暴露实验中所用受试动物、塑料类型、粒径、浓度等的影响而表现出不同的水平。

3.2.5.2 毒理损伤标志物

脂质过氧化反应的毒性产物丙二醛 (MDA) 含量间接反映了活性氧 (ROS) 水平。过度氧化应激可能导致氧化损伤, 因此, MDA 被认为是暴露于环境污染物的常见非特异性生物标志物, 其含量是反映脂质过氧化速率和强度的重要参数^[98]。本研究中, 不同暴露条件下, 波纹巴非蛤鳃和消化腺中 MDA 含量没有明显差异, 即微塑料暴露未导致波纹巴非蛤鳃和消化腺中 MDA 含量显著改变 (图 3.6D)。抗氧化防御系统调节模式与受试生物种类及微塑料的大小、形状、暴露持续时间和浓度相关^[99]。鲤鱼 (*Carp*) 在聚乙烯 120 mg/m³ 和 240 mg/m³ 中暴露 30 天时, MDA 均与空白对照组无显著差异, 与上述结果相似^[100]。在本研究中, 波纹巴非蛤通过调控抗氧化酶活性使其暂时免受 PS-NH₂ 和 PS-COOH 对鳃和消化腺的过氧化损伤。

谷草转氨酶 (AST) 是生物体中参与代谢的关键酶, 在菲律宾蛤仔的鳃和消化腺蛋白质代谢中起重要作用^[101]。AST 可以催化氨基酸生成酮酸, AST 活力不仅能反映氨基酸代谢程度强弱, 也能反映出肝细胞的炎症、损伤等。与对照组波纹巴非蛤鳃中 AST 活力相比, PS-NH₂ 微塑料暴露使 AST 活力显著升高, PS-COOH 和 B-PS-NH₂ 组 AST 活力显著降低 ($p < 0.05$); B-PS-NH₂ 微塑料暴露组与 PS-COOH 暴露组间没有明显差异, 但在鳃中的 AST 活力低于 B-PS-COOH 暴露组。在波纹巴非蛤消化腺组织中, 对照组 AST 活力显著低于 PS-NH₂ 组, 与其他三组之间没有明显差异; B-PS-NH₂ 组的 AST 活力显著低于 PS-NH₂、PS-COOH 和 B-PS-COOH 组 ($p < 0.05$)。对照组波纹巴非蛤鳃中 AST 活力显著高于消化腺中 AST 活力, 其余四组微塑料暴露条件下鳃和消化腺中 AST 活力没有明显差异 (图 3.6E)。本研究表明, 波纹巴非蛤鳃中 B-PS-NH₂ 活力最低, 其余四种暴露条件下鳃中的 ALT 活力没有明显差异; 4 种暴露条件均未导致波纹巴非蛤消化腺中 AST 酶活力的显著变化 (图 3.6F)。但在同一种暴露条件下, 除 B-PS-NH₂ 组外, 其余四组鳃组织中活力显著高于消化腺中 AST 活力。

谷丙转氨酶 (ALT) 参与波纹巴非蛤鳃和消化腺组织中的代谢, 存在于各组组织细胞中^[102]。ALT 和 AST 的主要作用是催化氨基酸生成酮酸, 当机体中两种酶的活力较弱时, 转氨作用较弱^[103]。因此, ALT、AST 活力均为反映肝损伤的生化指标^[104]。Mu 等人用 0.5 和 1 mg/mL 的 5.0 μm 聚丙烯微塑料处理小鼠 4 周, AST 水平升高^[105]。Tehree 等人探究不同浓度的聚丙烯酰胺微塑料 (0.1–0.4 mm) 对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的毒性, 发现高剂量处理组 (0.09 g/L)

中观察到 AST、ALT 显著降低^[106]，与本研究结果相似。通过对谷草转氨酶和谷丙转氨酶在波纹巴非蛤鳃和消化腺组织中的活力变化发现，四种微塑料暴露都会对波纹巴非蛤造成肝脏损伤，即抗氧化酶防御机制不足以保护波纹巴非蛤免受外界环境变化造成的损伤。

3.2.5.3 综合生物标志物响应

根据 IBR 指数，微塑料对于波纹巴非蛤鳃组织的毒性顺序为 B-PS-COOH>PS-COOH>B-PS-NH₂>PS-NH₂（图 3.7A, C）。微塑料对于波纹巴非蛤消化腺组织的毒性顺序为 PS-NH₂>B-PS-NH₂>B-PS-COOH>PS-COOH（图 3.7B, D）。微塑料对波纹巴非蛤鳃和消化腺组织的毒性作用大小不同，根据 IBR 数值微塑料暴露对消化腺组织的毒性更强。对比不同官能团微塑料对鳃和消化腺组织的数值，具有羧基官能团的 PS 对鳃组织的毒性作用更强（图 3.7C），而具有氨基官能团的 PS 对消化腺组织的毒性作用更强（图 3.7D）。

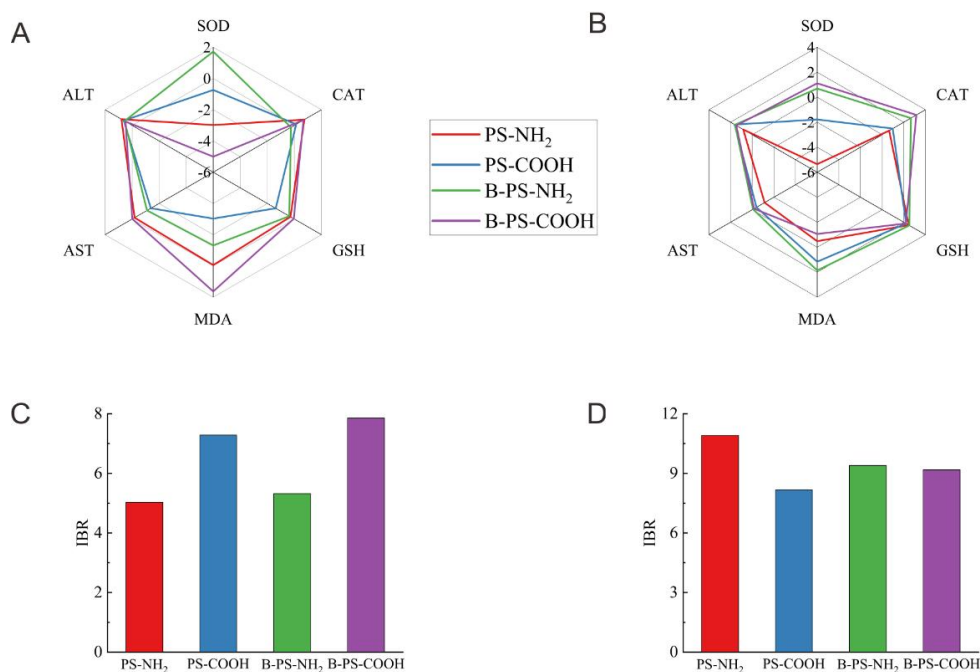


图 3.7 鳃和消化腺组织生物标志物雷达图和综合生物标志物响应指数

A: 鳃组织雷达图 B: 消化腺组织雷达图 C: 鳃组织 IBR 指数 D: 鳃组织 IBR 指数

Figure 3.7 Radar map of gill and digestive gland tissue biomarkers and integrated biomarker response index

A: Gill tissue radar chart B: Digestive gland tissue radar chart C: Gill tissue IBR index D: Digestive gland tissue IBR index

3.2.6 波纹巴非蛤对微塑料胁迫的代谢响应

为了分析对照组和暴露组之间波纹巴非蛤消化腺代谢产物的组间差异，使用 OPLS-DA 建立模型（CV-ANOVA, $p < 0.05$ ），得分图如图 3.8 所示。结果表明，对照组与 PS-NH₂、PS-COOH、B-PS-CN_H₂、B-PS-COOH 组的样本点均位于 95% 的 Hotelling's T 范围内，各暴露组与对照组样品点分布于不同区域，聚类趋势明显，表明其代谢产物谱存在显著差异。

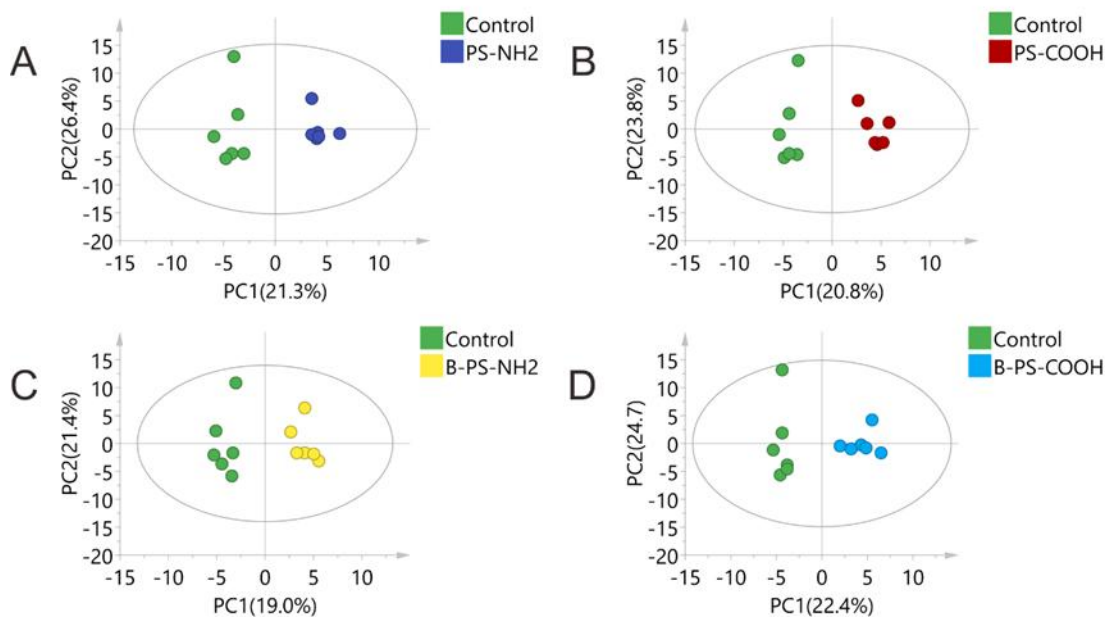
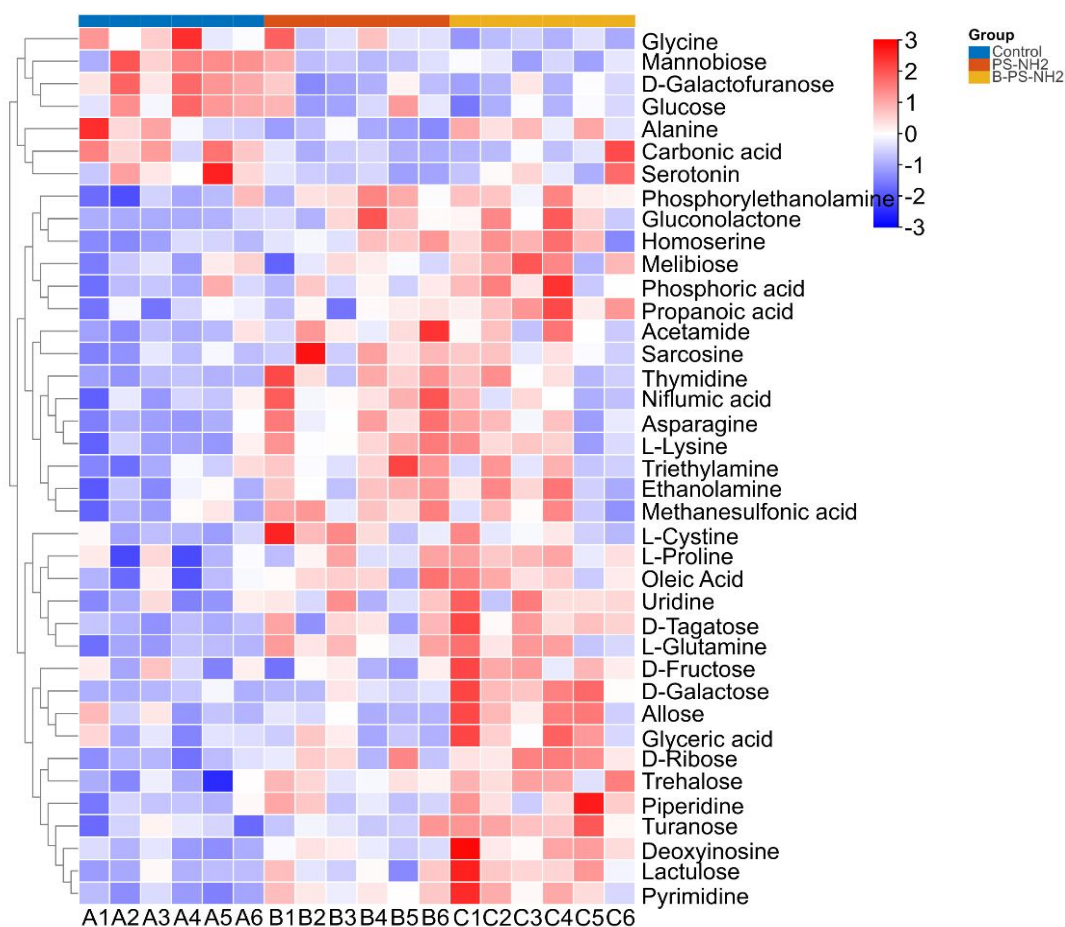


图 3.8 对照组和不同暴露组 OPLS-DA 得分图

Figure 3.8 OPLS-DA scores of control group and different exposure groups

3.2.6.1 差异代谢物鉴定

根据 OPLS-DA 模型筛选出位于 jack knifing 的 95% 置信区间内且 VIP > 1 的差异代谢物，以进一步分析 PS-NH₂ 和 B-PS-NH₂ 之间对波纹巴非蛤消化腺代谢产物谱的影响。为阐明不同代谢物在对照组、PS-NH₂、B-PS-NH₂ 组中的变化，制作筛选的 39 种差异代谢物的热图（图 3.9）。

图 3.9 对照、PS-NH₂、B-PS-NH₂ 组鉴定出的差异代谢物热图Figure 3.9 Heat map of differential metabolites identified in the control, PS-NH₂ and B-PS-NH₂ group

对照组与 PS-NH₂ 和 B-PS-NH₂ 的主要差异代谢物包括甘氨酸 (Glycine)、甘露糖 (Mannobiose)、葡萄糖 (Glucose)、丙氨酸 (Alanine)、碳酸 (Carbonic acid)、血清素 (Serotonin)、高丝氨酸 (Homoserine)、蜜二糖 (Melibiose)、磷酸 (Phosphoric acid)、丙酸 (Propanoic acid)、乙酰胺 (Acetamide)、肌氨酸 (Sarcosine)、胸苷 (Thymidine)、尼氟酸 (Niflumic acid)、天冬酰胺 (Asparagine)、赖氨酸 (L-Lysine)、三乙胺 (Triethylamine)、甲磺酸 (Methanesulfonic acid)、L-胱氨酸 (L-Cystine)、油酸 (Oleic Acid)、尿苷 (Uridine)、谷酰胺 (L-Glutamine)、果糖 (D-Fructose)、阿洛糖 (Allose)、 α , β -海藻糖 (Trehalose)、哌啶 (Piperidine)、乳果糖 (Lactulose)、嘧啶 (Pyrimidine) 等。

与对照相比，甘氨酸、甘露糖、葡萄糖、丙氨酸、碳酸、血清素明显下调；

高丝氨酸、蜜二糖、磷酸、丙酸、乙酰胺、肌氨酸、胸苷、天冬酰胺、赖氨酸、三乙胺、甲磺酸、油酸、尿苷、谷酰胺、果糖、 α , β -海藻糖、哌啶、乳果糖、嘧啶等上调。

同样, 分析了对照组与 PS-COOH 和 B-PS-COOH 之间的差异代谢物, 筛选出 35 种代谢物, 为阐明不同代谢物在对照组、PS-COOH、B-PS-COOH 组中的变化, 制作如下热图 (图 3.10)。

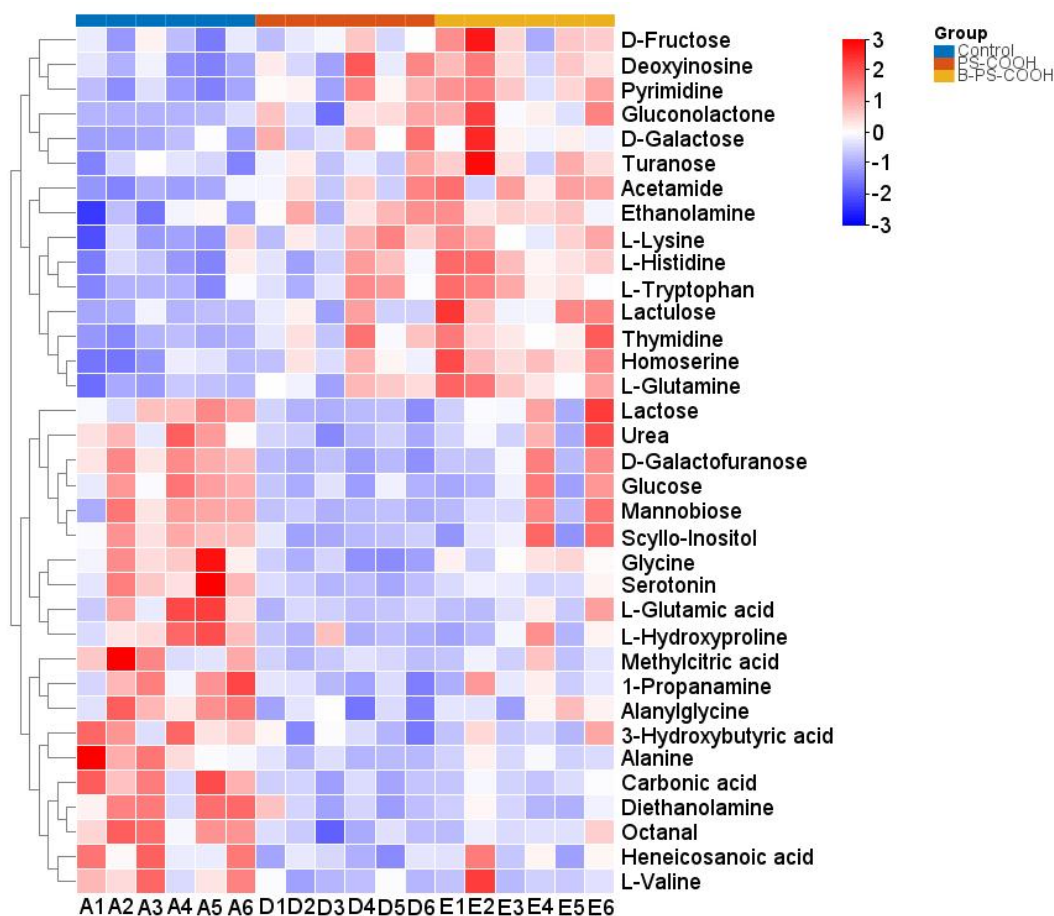


图 3.10 对照、PS-COOH、B-PS-COOH 组鉴定出的差异代谢物热图

Figure 3.10 Heat map of differential metabolites identified in the control, PS-COOH, B-PS-COOH group

其中主要差异代谢物有果糖、嘧啶、乙酰胺、乙醇胺 (Ethanolamine)、赖氨酸、组氨酸 (L-Histidine)、L-色氨酸 (L-Tryptophan)、乳果糖、胸苷、高丝氨酸、谷酰胺、乳糖 (Lactose)、尿素 (Urea)、葡萄糖、甘氨酸、L-谷氨酸 (L-Glutamic acid)、L-羟脯氨酸 (L-Hydroxyproline)、甲基柠檬酸 (Methylcitric

acid)、丙氨酸、碳酸、辛醛 (Octanal)、L-缬氨酸 (L-Valine) 等。

与对照组相比, D-果糖、嘧啶、D-半乳糖、乙酰胺、乙醇胺、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-色氨酸、乳果糖、胸苷、高丝氨酸等上调, 甘氨酸、血清素、L-谷氨酸、L-羟脯氨酸、甲基柠檬酸、丙氨酰、甘氨酸、丙氨酸、碳酸、辛醛、L-缬氨酸等显著下调。

3.2.6.2 代谢通路分析

为了找到受聚苯乙烯微塑料暴露所干扰的代谢途径, 将差异代谢物数据导入 Metabo Analyst 进行处理分析, 得到通路图 (图 3.11), 确定受到显著影响的代谢和信号转导途径。通路图中点的大小代表富集代谢物的数量, 点的颜色代表通路显著性, 即 p 值大小, p 值越小, 颜色越深, 则该代谢通路的差异性越显著。

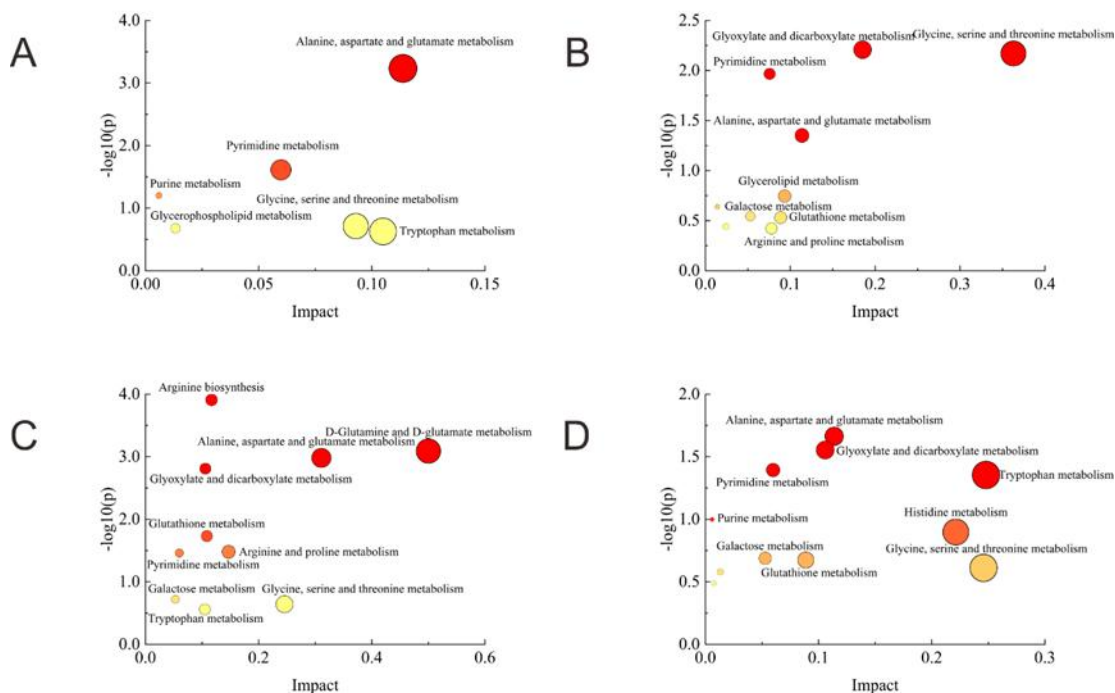


图 3.11 代谢通路图

A: PS-NH₂ 组 B: B-PS-NH₂ 组 C: PS-COOH 组 D: B-PS-COOH 组

Figure 3.11 Metabolic pathway diagram

A: PS-NH₂ group B: B-PS-NH₂ group C: PS-COOH group D: B-PS-COOH group

PS-NH₂ 组的重要通路有: 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (Alanine, Aspartate

and Glutamate metabolism)、嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism)、嘌呤代谢(Purine metabolism)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(Glycine, Serine and Threonine metabolism)、甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)、色氨酸代谢(Tryptophan metabolism); B-PS-NH₂组的重要通路有: 乙醛酸和二羧酸代谢(Glyoxylate and Dicarboxylate metabolism)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、嘧啶代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、甘油酯代谢(Glycerolipid metabolism)、鞘脂代谢(Sphingolipid metabolism)、半乳糖代谢(Galactose metabolism)、谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism)、甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢(Arginine and Proline metabolism)。

PS-COOH组重要通路有: 精氨酸生物合成(Arginine biosynthesis)、D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢(D-Glutamine and D-glutamate metabolism)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、谷胱甘肽代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、嘧啶代谢、半乳糖代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、色氨酸代谢; B-PS-COOH组重要通路有: 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、嘧啶代谢、色氨酸代谢、嘌呤代谢、组氨酸代谢(Histidine metabolism)、半乳糖代谢、谷胱甘肽代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、甘油磷脂代谢、初级胆汁酸生物合成(Primary bile acid biosynthesis)。

氨基酸在能量代谢中起重要作用, 在组织中可以作为氧化底物促进腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)的产生^[107]。丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢属于氨基酸代谢。天冬氨酸是由组氨酸代谢途径产生, 可能被大量代谢合成肌酸或精氨酸等代谢产物来满足细胞能量代谢需求以达到抗炎、抗氧化的目的, 在炎症反应中发挥重要作用。由此可见, 聚苯乙烯微塑料污染可能给波纹巴非蛤的氨基酸代谢带来负面影响^[108]。前期研究表明, 甘氨酸含量生物体的健康状态有关, 在外界环境改变后, 会出现甘氨酸含量改变的现象^[109,110]。丝氨酸存在于许多蛋白质中, 是脂肪、脂肪酸新陈代谢所必需的, 并且和肌肉生长、细胞膜的合成还有免疫系统的代谢有关。在嘧啶、嘌呤等的生物合成途径中起主要作用^[111]。色氨酸代谢产物可参与炎症调节和细胞免疫反应^[112], 色氨酸代谢通路受到干扰表明波纹巴非蛤暴露于3 μm聚苯乙烯中, 其免疫防御系统被激活, 可能因为微塑料引起机体储备能量降低, 进而导致机体免疫能力下降所致^[113]。谷胱甘肽可作为抗氧化剂、自由基清除剂和解毒剂。谷胱甘肽代谢通路中重要的产物如谷胱甘肽硫转移酶能催化外源物质的代谢^[114]。

精氨酸可以维持稳定的 ATP 来源，还可以刺激免疫系统，以此来保护机体免受外部环境变化带来的损伤。据报道，海洋生物在应对各种环境压力时，ATP 以及精氨酸的水平都会发生改变^[115,116]。甘油磷脂是细胞膜的重要组成部分，与生长发育和氧化应激等过程密切相关^[117]。生物代谢过程是十分复杂的，同一代谢物在多种代谢过程中扮演着重要的角色，后续还有待于进一步研究阐明其具体的作用机制。

3.3 小结

在室内孵育微塑料表面生物膜 21 天后，可通过扫描电镜观测到孵育后的 PS-NH₂ 和 PS-COOH 微塑料表面较原始微塑料更加粗糙，并且 PS-NH₂ 的老化更加严重。采用四种不同微塑料暴露 7 天后（浓度 100 μg/L），在波纹巴非蛤的鳃、消化腺、外套膜和肠组织中均观察到了荧光微塑料，证实了生物体对微塑料的摄入。微塑料在波纹巴非蛤体内的富集规律大致相似，但富集情况有所差异，微塑料富集较多的组织是消化腺和肠道，鳃组织中微塑料含量次之，外套膜中较少。与原始微塑料相比，生物膜微塑料在鳃和消化腺组织中富集含量更高。

摄入微塑料 7 天后，波纹巴非蛤出现鳃丝断裂，鳃丝丝间联结损坏、鳃丝内出现血细胞浸润现象、消化腺腺体细胞坏死、发生水肿现象等病理损伤。四种不同微塑料暴露均可以诱导波纹巴非蛤产生氧化应激反应，激活体内抗氧化系统，并且造成肝脏损伤。根据 IBR 数值可知，微塑料暴露对波纹巴非蛤鳃和消化腺组织都会产生毒性作用，且对消化腺组织的毒性更强。

代谢组学研究表明，微塑料暴露导致波纹巴非蛤的代谢谱发生改变，筛选出的差异代谢物主要与能量代谢、糖代谢、氨基酸代谢、炎症反应和氧化应激相关，对照组与 PS-NH₂ 和 B-PS-NH₂ 组筛选出的差异代谢物更多，B-PS-NH₂ 组和 B-PS-COOH 组受到干扰的代谢通路更多。

第4章 不同粒径氨基聚苯乙烯生物膜微塑料对菲律宾蛤仔的毒性效应研究

4.1 前言

聚苯乙烯塑料广泛应用于日常生产及生活中，是全球产量最高的塑料类型之一，也是海洋、淡水和河流环境中能够检测出的主要塑料类型之一^[118]。有研究证实，不同粒径的微塑料对贝类产生的毒性效应有差异^[119]，并且暴露实验持续时间的不同，也会对受试生物对微塑料的摄入以及体内生物标志物等的含量/活性有不同的影响。在海洋环境中，微塑料表面会形成生物膜，生物膜附着细菌在长期定殖过程中逐渐表现出了环境适应性，多样性也随之增加，可能会放大微塑料污染对海洋动物的毒性效应，甚至加重对海洋生态环境的影响。

菲律宾蛤仔 (*R. philippinarum*) 是滤食性海洋生物，其生命周期长，对盐度和温度的波动具有耐受性，对污染物具有较高蓄积能力，因此常被用作生物指示物^[120]。菲律宾蛤仔是沿海地区重要的经济贝类，在沿海生态系统中有着重要的生态作用，已经有研究报道菲律宾蛤仔能从环境中摄入并蓄积大量微塑料^[121]。因此，本实验选择菲律宾蛤仔作为受试生物，研究不同粒径 PS-NH₂ 生物膜微塑料 (1 μm 和 7 μm) 的毒性效应。探讨了不同粒径的 PS-NH₂ 在不同暴露时间 (4 天和 8 天) 对菲律宾蛤仔的毒性效应，在摄食 (组织中蓄积和分布情况)、组织病理损伤、生化标志物 (如氧化应激、脂质过氧化水平) 和代谢产物方面揭示微塑料对菲律宾蛤仔的毒性作用。

4.2 结果与讨论

4.2.1 微塑料表面生物膜表征

不同粒径的原始 PS-NH₂ 表面光滑，而孵育后的 PS-NH₂ 表面较粗糙，这表明在孵育过程中 PS-NH₂ 可能受到了摩擦、生物侵蚀等 (图 4.1)。对原始和孵育后的微塑料用核酸染料进行染色 (1 μm 和 7 μm) 用相同的参数条件在荧光显微镜下观测 (图 4.2)。由于绿色核酸染料本身不具有荧光性，只有与核酸结合才会发出绿色荧光，观测结果证实了在室内孵育 21 天后的 1 μm 和 7 μm PS-NH₂

微塑料表面存在微生物附着生长的现象。

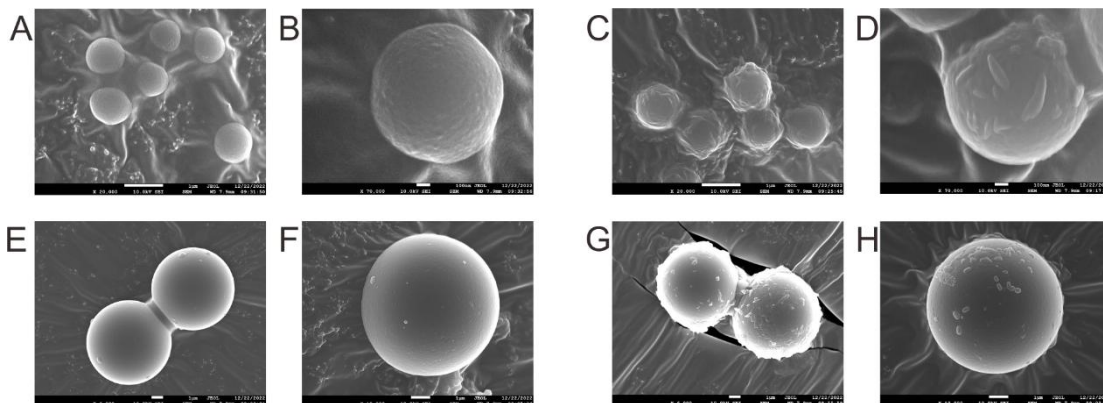
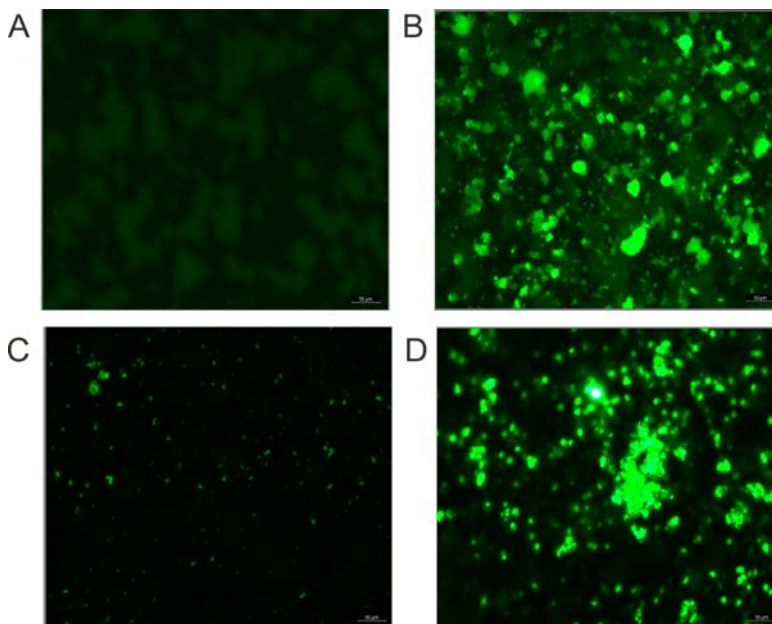


图 4.1 扫描电镜下 PS-NH₂ 微塑料形貌表征

A: 1 μm (20000 倍) B: 1 μm (70000 倍) C: B-1 μm (20000 倍) D: B-1 μm (70000 倍)
E: 7 μm (6000 倍) F: 7 μm (10000 倍) G: B-7 μm (6000 倍) H: B-7 μm (10000 倍)

Figure 4.1 Morphological characterization of PS-NH₂ microplastics under scanning electron microscopy

A: 1 μm (20000 x) B: 1 μm (70000 x) C: B-1 μm (20000 x) D: B-1 μm (70000 x) E:



7 μm (6000 x) F: 7 μm (10000 x) G: B-7 μm (6000 x) H: B-7 μm (10000 x)

图 4.2 荧光显微镜下染色后的 PS-NH₂ 微塑料

A: 1 μm (20 倍) B: B-1 μm (20 倍) C: 7 μm (20 倍) D: B-7 μm (20 倍)

Figure 4.2 PS-NH₂ microplastics stained under fluorescence microscopy

A: 1 μm (20 x) B: B-1 μm (20 x) C: 7 μm (20 x) D: B-7 μm (20 x)

4.2.2 微塑料在菲律宾蛤仔各组织中的蓄积特征

利用酶标仪分别建立相应 PS-NH₂ 荧光微塑料的标准曲线(1 μm 为 $y=211586x$, $R^2=0.9961$; B-1 μm 为 $y=252924x$, $R^2=0.9946$; 7 μm 为 $y=249964x$, $R^2=0.9981$; B-7 μm 为 $y=226555x$, $R^2=0.9924$)，对菲律宾蛤仔各组织中的微塑料含量进行定量分析。菲律宾蛤仔暴露于不同粒径 PS-NH₂ 微塑料中 4 天、8 天后，其鳃、消化腺、外套膜及肠中富集的微塑料含量如图 4.3 所示。

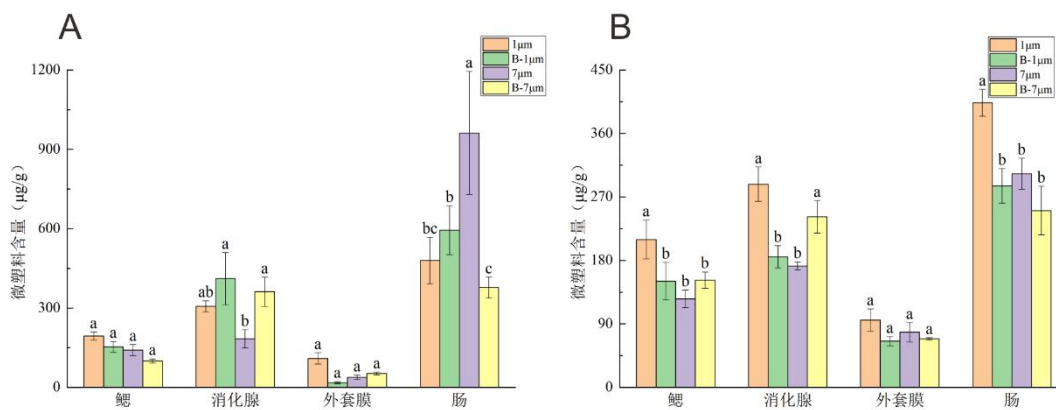


图 4.3 不同粒径 PS-NH₂ 微塑料在菲律宾蛤仔各组织的含量

A: 暴露于不同粒径 PS-NH₂ 中 4 天后各组织中荧光微塑料的含量 B: 暴露于不同粒径 PS-NH₂ 中 8 天后各组织中荧光微塑料的含量

注: 结果为均值 $\pm$ SD, $n=3-5$, 同一组织中的不同字母表示处理间微塑料含量差异显著 ($p<0.05$)

Figure 4.3 Content of PS-NH₂ microplastics with different particle sizes in various tissues of *R. philippinarum*

A: Content of fluorescent microplastics in each tissue after 4 days of exposure to PS-NH₂ of different particle sizes B: Content of fluorescent microplastics in various tissues after 8 days of exposure to PS-NH₂ of different particle sizes

Note: The results were mean $\pm$ SD, $n=3-5$, and different letters in the same tissue indicated significant differences in microplastic content between treatments ($p<0.05$)

暴露 4 天后，对比菲律宾蛤仔不同组织中微塑料的富集情况可知，蓄积含量最高的组织为肠，该组织中富集的 1 μm 、B-1 μm 、7 μm 和 B-7 μm PS-NH₂ 微塑料平均含量分别为 479.82 $\mu\text{g/g}$ 、594.55 $\mu\text{g/g}$ 、962.02 $\mu\text{g/g}$ 和 377.20 $\mu\text{g/g}$ ；消化腺中微塑料含量次之，鳃中含量较少；外套膜中微塑料含量最少，平均值小

于 109.16 $\mu\text{g/g}$ 。比较不同粒径原始及生物膜微塑料在同种组织中微塑料的富集情况可知, 菲律宾蛤仔鳃和外套膜组织中蓄积的微塑料含量没有明显差异 ($p>0.05$)。在消化腺组织中, 7 μm PS-NH₂ 微塑料富集含量显著低于 B-1 μm 和 B-7 μm 组。在菲律宾蛤仔肠组织中, 7 μm 组微塑料蓄积量最高, B-1 μm 蓄积量高于 B-7 μm 组蓄积量 ($p<0.05$) (图 4.3A)。

暴露 8 天后, 1 μm PS-NH₂ 在菲律宾蛤仔鳃和肠组织中, 含量分别为 209.67 $\mu\text{g/g}$ 和 403.60 $\mu\text{g/g}$, 在同一组织内蓄积量高于其他三组 ($p<0.05$), 并且 B-1 μm 、7 μm 和 B-7 μm 三组间没有明显差异。在消化腺中, 1 μm 和 B-7 μm 组微塑料含量分别为 288.26 和 241.87 $\mu\text{g/g}$, 显著高于 B-1 μm (185.24 $\mu\text{g/g}$) 和 7 μm 组 (172.25 $\mu\text{g/g}$) 的微塑料蓄积量。在菲律宾蛤仔外套膜中, 四个处理组中微塑料含量没有显著差异。1 μm 、B-1 μm 、7 μm 和 B-7 μm 四组在菲律宾蛤仔肠道中富集量最多, 分别为 403.60 $\mu\text{g/g}$ 、285.85 $\mu\text{g/g}$ 、303.05 $\mu\text{g/g}$ 和 250.71 $\mu\text{g/g}$, 消化腺中次之, 鳃中微塑料含量较少; 外套膜中含量最少, 平均富集含量小于 65.38 $\mu\text{g/g}$ (图 4.3B)。

在暴露第 8 天时, 粒径较小的 1 μm PS-NH₂ 更容易在菲律宾蛤仔鳃和肠组织中富集, 并且在鳃、消化腺、外套膜和肠组织中 1 μm 含量高于 B-1 μm 含量, 原始的微塑料可能更容易在菲律宾蛤仔组织中富集, 不易被排出。当 PS-NH₂ 粒径为 7 μm 时, B-7 μm 组在菲律宾蛤仔鳃和消化腺中的微塑料含量高于 7 μm 组, 具有表面生物膜的 PS-NH₂ 微塑料更易在鳃和消化腺富集。

在菲律宾蛤仔的 4 类组织中均检测到微塑料, 由于受试动物没有分解微塑料的酶和酶促途径^[122,123], PS-NH₂ 不能被吸收或作为能量使用, 因此摄入的微塑料在菲律宾蛤仔的组织内富集, 并且可以在体内不同组织间转运, 最终主要富集在肠和消化腺组织。微塑料粒径、表面形态会影响微塑料在生物体中的分布。

4.2.3 微塑料在菲律宾蛤仔各组织的分布特征

针对微塑料富集较多的鳃、消化腺和肠道组织, 进一步利用激光共聚焦显微镜研究暴露 8 天后不同粒径 PS-NH₂ 荧光微塑料在菲律宾蛤仔组织内的分布特征 (图 4.4)。在 200 $\mu\text{g/L}$ 的 PS-NH₂ 微塑料溶液中 8 天后, 菲律宾蛤仔鳃、消化腺和肠道中均可观测到绿色荧光塑料颗粒, 证实菲律宾蛤仔可以摄入不同粒径的 PS-NH₂ 微塑料。

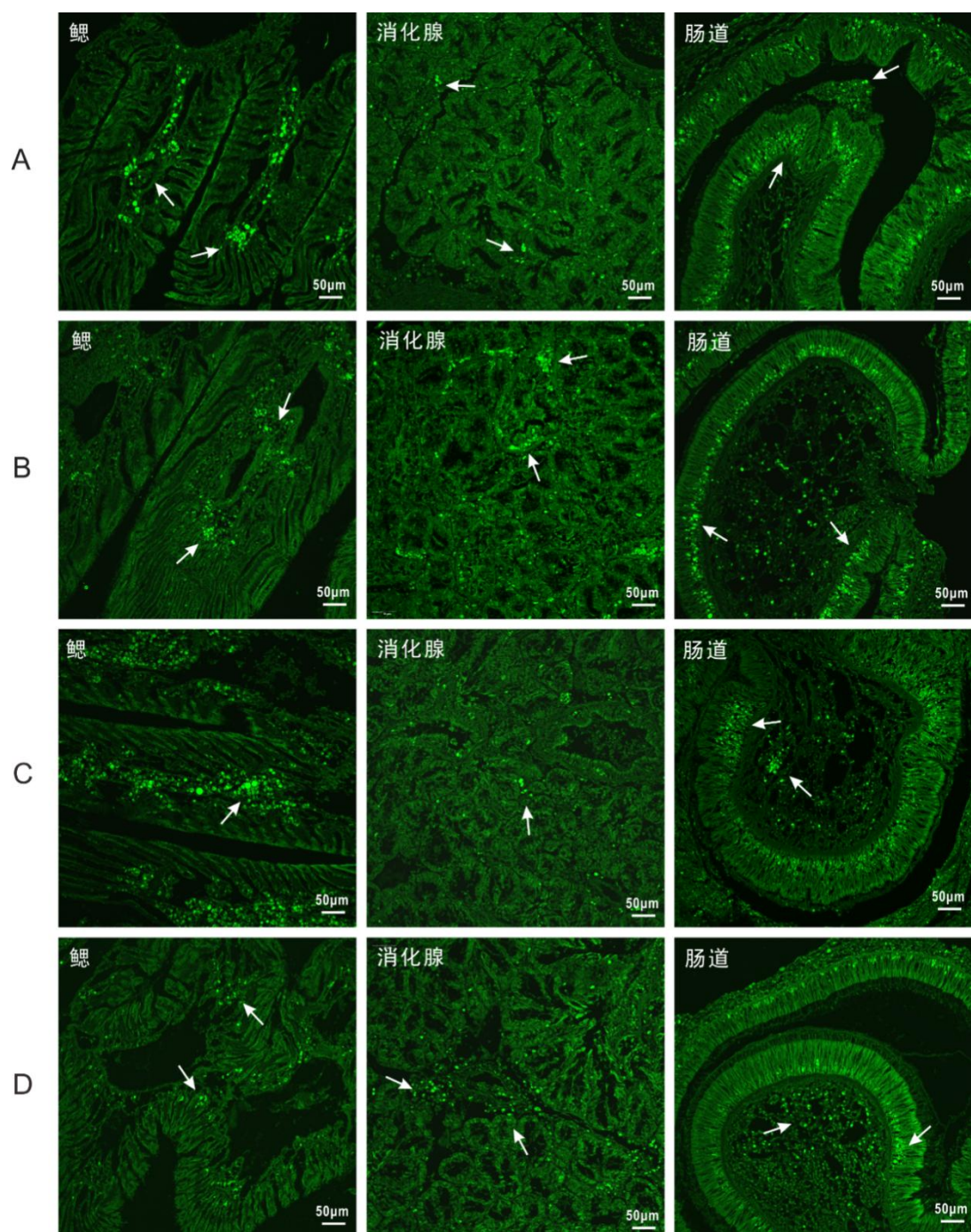


图 4.4 激光共聚焦显微镜下微塑料在菲律宾蛤仔鳃、消化腺和肠道中的分布情况（比例尺：50 μm ）

A: 1 μm 组 B: B-1 μm 组 C: 7 μm 组 D: B-7 μm 组

Figure 4.4 Distribution of microplastics in *R. philippinarum* gill, digestive gland and gut under laser confocal microscopy (scale: 50 μm)

A: 1 μm group B: B-1 μm group C: 7 μm group D: B-7 μm group

4.2.4 菲律宾蛤仔鳃和消化腺组织病理分析

4.2.4.1 鳃组织病理损伤

在 200 $\mu\text{g/L}$ 的 PS-NH₂ 微塑料海水环境中暴露 8 天, 菲律宾蛤仔鳃组织病理损伤结果如图 4.5。1 μm 组鳃丝排列较疏松, 大部分鳃丝末端较肿胀, 部分鳃丝肿胀较为严重, 出现坏死和血细胞浸润现象, 少部分鳃丝断裂且丝间联结损坏 (图 4.5B)。B-1 μm 组鳃丝排列同样较为疏松, 鳃组织血细胞浸润现象较为严重, 鳃丝末端普遍较肿胀, 并出现少部分鳃丝上皮细胞坏死及纤毛脱落现象 (图 4.5C)。7 μm 组鳃丝排列略疏松, 少部分鳃丝断裂且鳃丝丝间联结损坏, 出现少量血细胞浸润现象 (图 4.5D)。B-7 μm 组部分鳃丝上皮细胞坏死, 导致鳃丝纤毛脱落, 出现一定的血细胞浸润现象 (图 4.5E)。

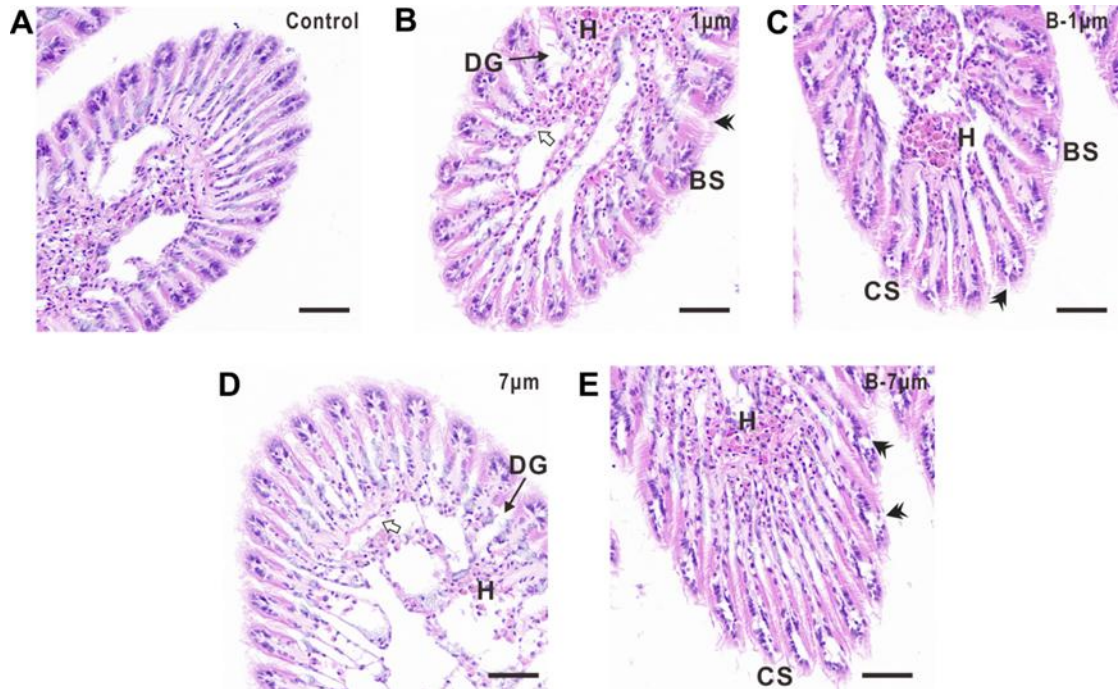


图 4.5 菲律宾蛤仔鳃组织切片显微图 (比例尺: 50 μm)

A: 对照组 B: 1 μm 组 C: B-1 μm 组 D: 7 μm 组 E: B-7 μm 组

注: 血细胞浸润 (H); 鳃丝肿胀 (BS); 纤毛脱落 (CS); 鳃丝丝间联结损坏 (DG); 鳃丝断裂 ($\Rightarrow$); 坏死 ($\blacktriangleright$)

Figure 4.5 Microscopic section of *R. philippinarum* gill tissue (scale: 50 μm)

A: Control group B: 1 μm group C: B-1 μm group D: 7 μm group E: B-7 μm group

Note: hemocyte infiltration (H); branchial swollen (BS); cilium shedding (CS); disruption of gill filament junctions (DG); rupture of gill filaments ($\Rightarrow$); necrosis ($\blacktriangleright$)

4.2.4.2 消化腺组织病理损伤

在显微镜下观测的菲律宾蛤仔消化腺组织受损情况如下。1 μm 组消化腺部分上皮细胞出现细胞核溶解现象，部分组织出现水肿，可见少部分腺体细胞坏死（图 4.6B）。B-1 μm 组消化腺部分腺体边界模糊，部分上皮细胞核溶解，且出现腺体上皮细胞坏死现象（图 4.6C）。7 μm 组消化腺腺体排列较为疏松，可见不少上皮细胞核溶解，出现血细胞浸润现象，且较多腺体细胞坏死（图 4.6D）。B-7 μm 组消化腺腺体排列紊乱，大部分腺体细胞胞质空泡化，腺体细胞大面积坏死，伴随明显的血细胞浸润现象（图 4.6E）。

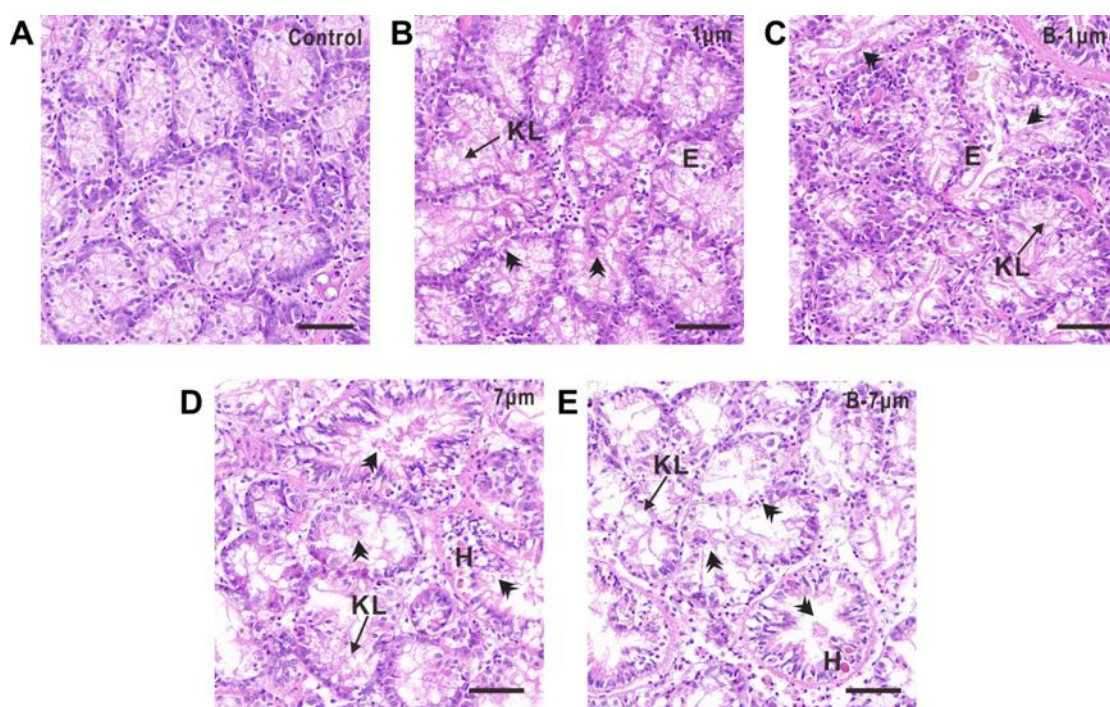


图 4.6 菲律宾蛤仔消化腺组织切片显微图（比例尺：50 μm ）

A: 对照组 B: 1 μm 组 C: B-1 μm 组 D: 7 μm 组 E: B-7 μm 组

注：组织坏死（►）；细胞核溶解（KL）；渗出物（E）；血细胞浸润（H）

Figure 4.6 Microscopic diagram of digestive gland tissue sections of *R. philippinarum* (scale: 50 μm)

A: Control group B: 1 μm group C: B-1 μm group D: 7 μm group E: B-7 μm group

Note: necrosis (►); karyolysis (KL); exudate (E); hemocyte infiltration (H)

4.2.5 生物膜微塑料胁迫对菲律宾蛤仔体内生物标志物的影响

4.2.5.1 鳃组织生物标志物

在不同暴露条件下，菲律宾蛤仔鳃组织中的生物标志物活性/含量变化如图 4.7 所示。

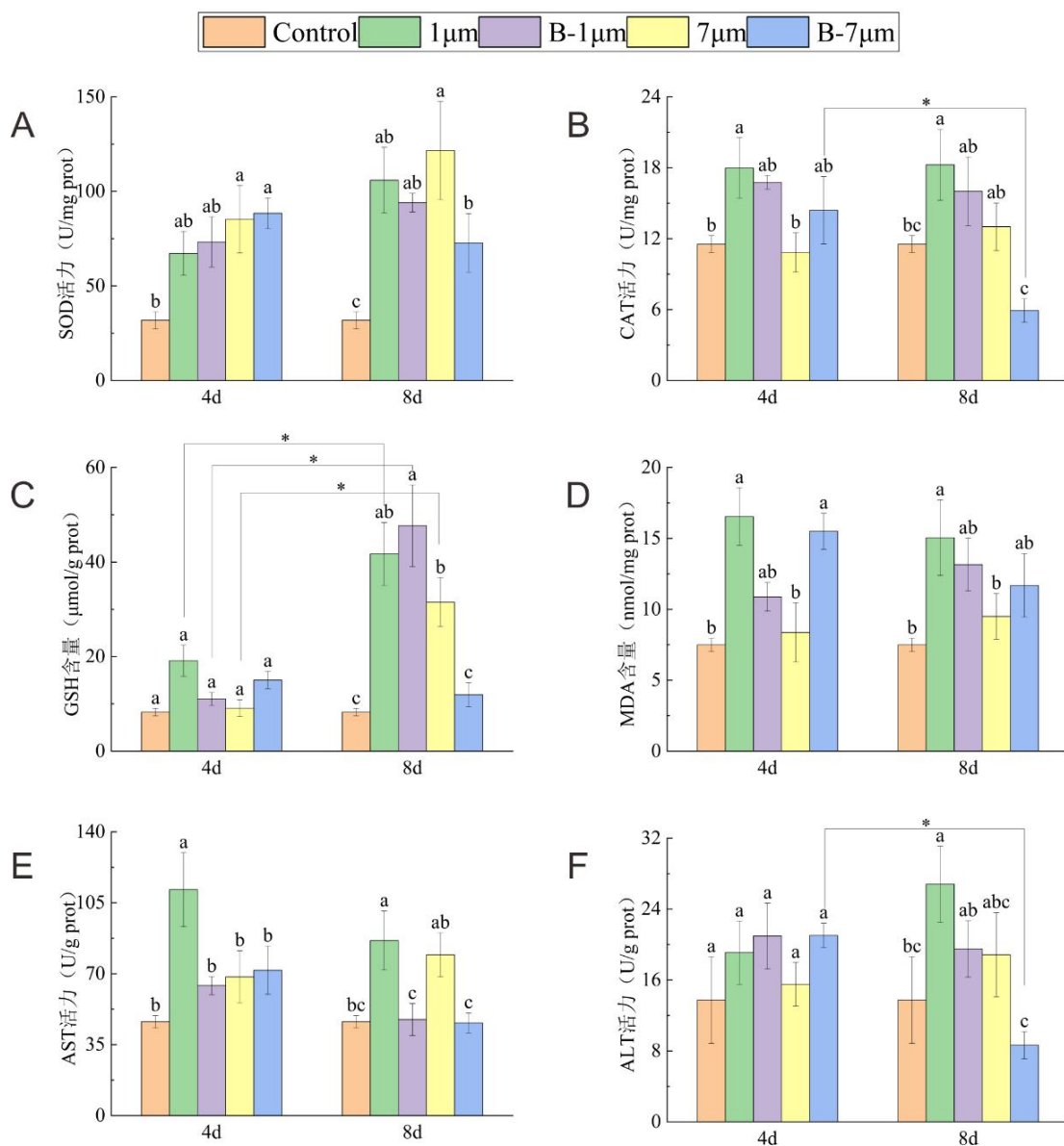


图 4.7 不同暴露条件下菲律宾蛤仔鳃组织中（4 天和 8 天）生物标志物活性/含量变化
注：结果为均值±SD，n=3-8，相同暴露天数中不同字母表示各处理间差异显著，*表示相同处理之间暴露天数不同差异显著（ $p<0.05$ ）

Figure 4.7 Changes in biomarker activity/content in *R. philippinarum* gill tissues (4 days and 8 days) under different exposure conditions

Note: The result is mean $\pm$ SD, $n=3-8$, and different letters in the same exposure days indicate significant differences between treatments, * indicating significant differences between exposure days between the same treatment ($p<0.05$)

暴露时间为4天时，暴露于7 μm 和 B-7 μm 组的菲律宾蛤仔鳃中 SOD 活力显著增强，但四种暴露条件下 SOD 活力没有明显差异 ($p<0.05$)。在暴露时间为8天时，与对照组相比，其余四组的 SOD 活力都显著增加，并且7 μm 组的 SOD 活力显著高于 B-7 μm 组 (图 4.7A)。在暴露时间较短的情况下，只有7 μm 两组的 SOD 活力增加，但随着暴露时间增加，四种微塑料处理组的 SOD 活力都增加，抗氧化应激反应增强，以保护菲律宾蛤仔鳃组织细胞免受更严重的伤害。

暴露4天时，1 μm 暴露条件下鳃中的 CAT 活力高于对照组和7 μm 组 ($p<0.05$)，其余组间没有显著差异。暴露时间为8天时，1 μm 组的 CAT 活力显著高于对照组和 B-7 μm 组 ($p<0.05$)，但1 μm 、B-1 μm 和7 μm 组之间没有明显差异，对照组和除1 μm 之外的三组也没有显著差异。比较相同暴露条件下不同时间的 CAT 活力发现，B-7 μm 组4天时的 CAT 活力高于8天时菲律宾蛤仔鳃中的 CAT 活力 (图 4.7B)。菲律宾蛤仔在1 μm 200 $\mu\text{g/L}$ 的暴露条件下 CAT 活力增加，这表明鳃中 CAT 活性的变化可能是一种该种双壳贝类抵抗1 μm 较小粒径微塑料暴露的防御机制，但随着暴露时长的增加，B-7 μm 组的 CAT 活力降低。

暴露时间为8天时，与对照组和 B-7 μm 相比，其余三组在菲律宾蛤仔鳃中的 GSH 含量显著增加，B-1 μm 组的 GSH 含量显著高于7 μm 组 ($p<0.05$)。在相同暴露条件下，1 μm 、B-1 μm 和7 μm 组的 GSH 含量随暴露时间增加而增加 (图 4.7C)。当暴露时间增加，1 μm 、B-1 μm 、7 μm GSH 含量增加用来抑制脂质过氧化，防止细胞膜功能和结构受到破坏。

与对照组和7 μm 组相比，暴露4天时，1 μm 和 B-7 μm 组的 MDA 含量显著增加 ($p<0.05$)，在暴露时间为8天时，1 μm 组的 MDA 含量显著高于对照和7 μm 组，但其余组间没有显著差异 (图 4.7D)。在短时间暴露下 (4天)，1 μm 和 B-7 μm 组 MDA 含量改变，说明发生了脂质过氧化损伤。

分析暴露4天 AST 在菲律宾蛤仔鳃中的活力可知，1 μm 组的 AST 活力显

著高于其他四组 ($p<0.05$)。暴露时间为 8 天时, $1\text{ }\mu\text{m}$ 的 AST 活力显著高于对照、B- $1\text{ }\mu\text{m}$ 和 B- $7\text{ }\mu\text{m}$ 组, $7\text{ }\mu\text{m}$ 组的 AST 活力显著高于生物膜微塑料组(图 4.7E)。在不同的暴露时间, 只有 $1\text{ }\mu\text{m}$ 组的 AST 活力增加, 即较小粒径的微塑料($1\text{ }\mu\text{m}$)造成了肝损伤。

暴露时间为 4 天时, 不同微塑料暴露条件下菲律宾蛤仔鳃中的 ALT 活力没有显著差异, 但对与 B- $7\text{ }\mu\text{m}$ 暴露条件, 暴露时间越长, AST 活力越小 ($p<0.05$)。暴露时间为 8 天, $1\text{ }\mu\text{m}$ 组的 ALT 活力显著高于对照组和 B- $7\text{ }\mu\text{m}$, B- $1\text{ }\mu\text{m}$ 组 AST 活力显著高于 B- $7\text{ }\mu\text{m}$ 组(图 4.7F)。在暴露时间为 4 天时, $1\text{ }\mu\text{m}$ PS-NH₂ 微塑料造成了菲律宾蛤仔的肝损伤。

4.2.5.2 消化腺组织生物标志物

在不同暴露条件下, 菲律宾蛤仔消化腺组织中的生物标志物活性/含量变化如图 4.8 所示。

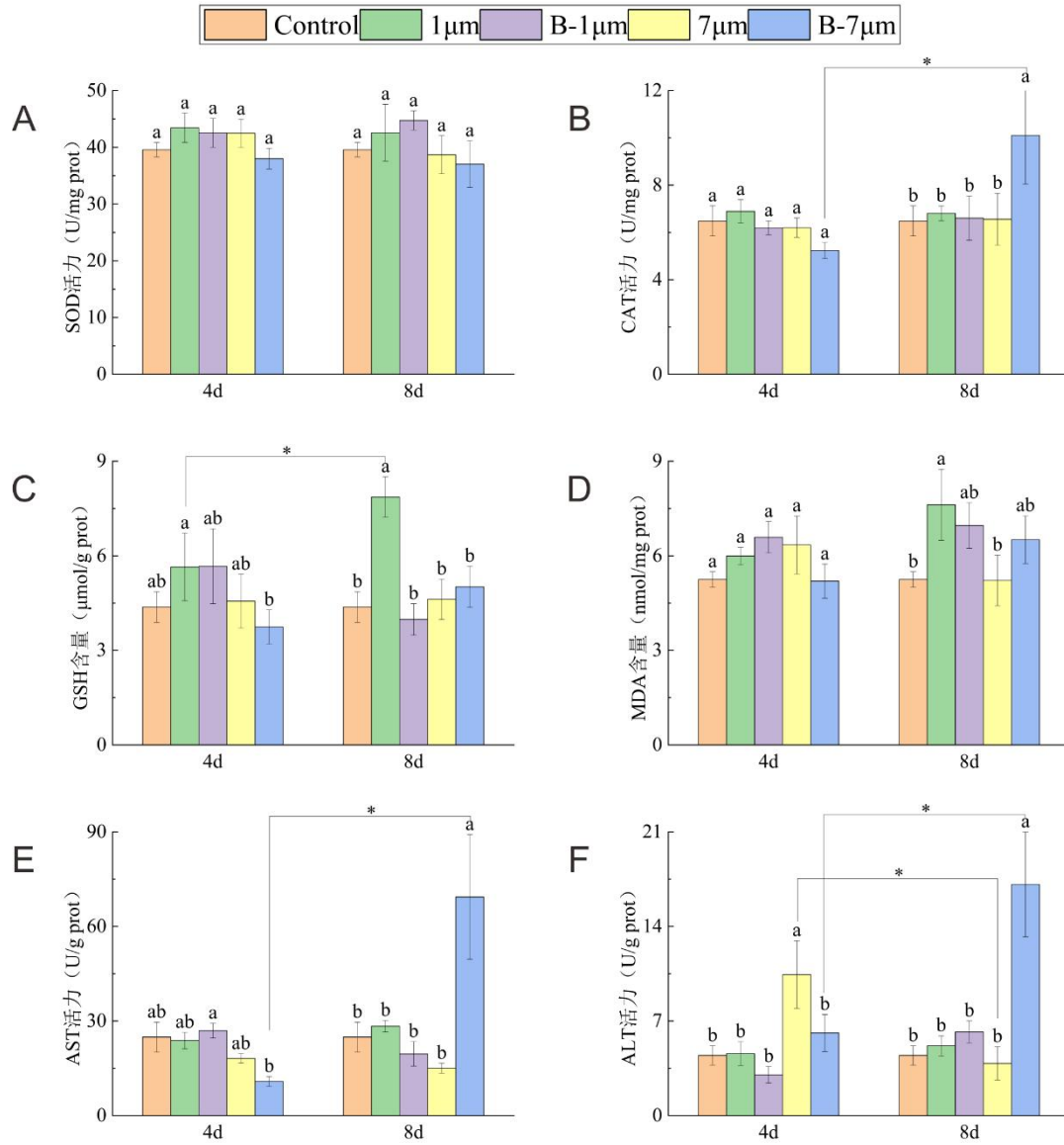
在不同的暴露条件和暴露时间作用下, 菲律宾蛤仔消化腺中 SOD 活力没有显著差异(图 4.8A)。关于斑马贻贝的毒理效应研究中发现, 在暴露时间分别为 3 天和 6 天消化腺中 SOD 活力没有显著差异, 与本实验结果相似^[19]。

暴露 4 天时, 对菲律宾蛤仔消化腺中 CAT 活力没有显著影响; 但暴露 8 天后, B- $7\text{ }\mu\text{m}$ 组的 CAT 活力显著高于其他四组 ($p<0.05$); 比较相同处理不同时间下消化腺中 CAT 活力发现, 8 天时 B- $7\text{ }\mu\text{m}$ 组 CAT 活力显著增加(图 4.8B)。菲律宾蛤仔在 B- $7\text{ }\mu\text{m}$ PS-NH₂ $200\text{ }\mu\text{g/L}$ 的条件下暴露 8 天后 CAT 活力增加, 消化腺中 CAT 活性的变化可能是菲律宾蛤仔抵御微塑料暴露的防御机制, 并且只有在暴露时间足够长, CAT 活力才会发生改变。塑料表面附有生物膜时, 消化腺组织氧化应激反应增强。

在第 4 天时, 与对照组相比, GSH 没有明显变化; 在第 8 天时, $1\text{ }\mu\text{m}$ 组 GSH 含量显著高于其他处理组 ($p<0.05$)。并且, $1\text{ }\mu\text{m}$ 组的 GSH 含量随暴露时间的增加而增加(图 4.8C)。只有在暴露时间为 8 天, GSH 含量才显著增加, 说明在本实验中较小粒径($1\text{ }\mu\text{m}$)长时间污染物暴露可导致菲律宾蛤仔 GSH 活性的诱导表达。

分析菲律宾蛤仔 MDA 含量可知, 暴露时间为 4 天时, 不同处理间没有明显差异; 暴露时间为 8 天时, 与对照组和 $7\text{ }\mu\text{m}$ 组相比, $1\text{ }\mu\text{m}$ 组暴露条件下 MDA 含量显著增加, 其余组间没有显著差异(图 4.8D)。实验结果表明消化腺组织

中并没有出现脂质过氧化损伤, 说明菲律宾蛤仔的抗氧化防御机制可以保护其



免受过氧化损伤。

图 4.8 不同暴露条件下菲律宾蛤仔消化腺组织中 (4 天和 8 天) 生物标志物活性/含量变化

注: 结果为均值 $\pm$ SD, $n=3-7$, 相同暴露天数中不同字母表示各处理间差异显著, *表示相同处理之间暴露天数不同差异显著 ($p<0.05$)

Figure 4.8 Changes in biomarker activity/content in digestive gland tissue (4 days and 8 days) of *R. philippinarum* under different exposure conditions

Note: The result is mean $\pm$ SD, $n=3-7$, different letters in the same exposure days indicate significant differences between treatments, * indicates significant differences between

exposure days between the same treatment ($p<0.05$)

在暴露 4 天后, B-1 μm 组的 AST 活力显著高于 B-7 μm 组, 但其他组间没有明显差异; 在第 8 天时, B-7 μm 组的 AST 活力显著升高, 并且显著高于同种条件下暴露 4 天菲律宾蛤仔消化腺中 AST 的活力 (图 4.8E)。AST 活力增加说明在浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 条件下暴露 8 天, 具有生物膜的 7 $\mu\text{mPS-NH}_2$ 微塑料会引发菲律宾蛤仔出现肝损伤。

暴露 4 天时, 菲律宾蛤仔消化腺中 7 μm 组的 ALT 活力显著高于其他几组, 且高于暴露 8 天时的 ALT 活力 ($p<0.05$); 暴露时间为 8 天时, B-7 μm 组的 AST 活力显著高于其他几组, 且高于暴露 4 天时消化腺中 AST 的活力 (图 4.8F)。幼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 暴露于在浓度 40 mg/L 的 75 nm 聚苯乙烯纳米塑料, 进行 28 天的慢性暴露实验, 肝胰腺中的 ALT、AST 活力增加^[124]。实验结果表明, 更大粒径的 7 $\mu\text{mPS-NH}_2$ 微塑料会造成菲律宾蛤仔的肝损伤。

4.2.5.3 综合生物标志物响应

根据 IBR 指数, 生物标志物在不同组织中的响应特征不同, 鳃中 CAT、GSH、MDA 和 AST 指标对微塑料的响应较强。微塑料暴露 4 天对菲律宾蛤仔鳃组织的毒性顺序为 7 $\mu\text{m}>\text{B-7 } \mu\text{m}>1 \mu\text{m}>\text{B-1 } \mu\text{m}$ (图 4.9 A,C); 暴露 8 天对鳃组织的毒性顺序为 B-1 $\mu\text{m}>7 \mu\text{m}>1 \mu\text{m}>\text{B-7 } \mu\text{m}$ (图 4.9 B,D)。在不同的暴露天数下, 微塑料对菲律宾蛤仔鳃组织的毒性作用有差异, 并且根据 IBR 数值发现, 随着暴露时间延长, 1 $\mu\text{mPS-NH}_2$ 对鳃的毒性作用增加, 而 7 $\mu\text{mPS-NH}_2$ 对鳃组织的毒性作用降低。

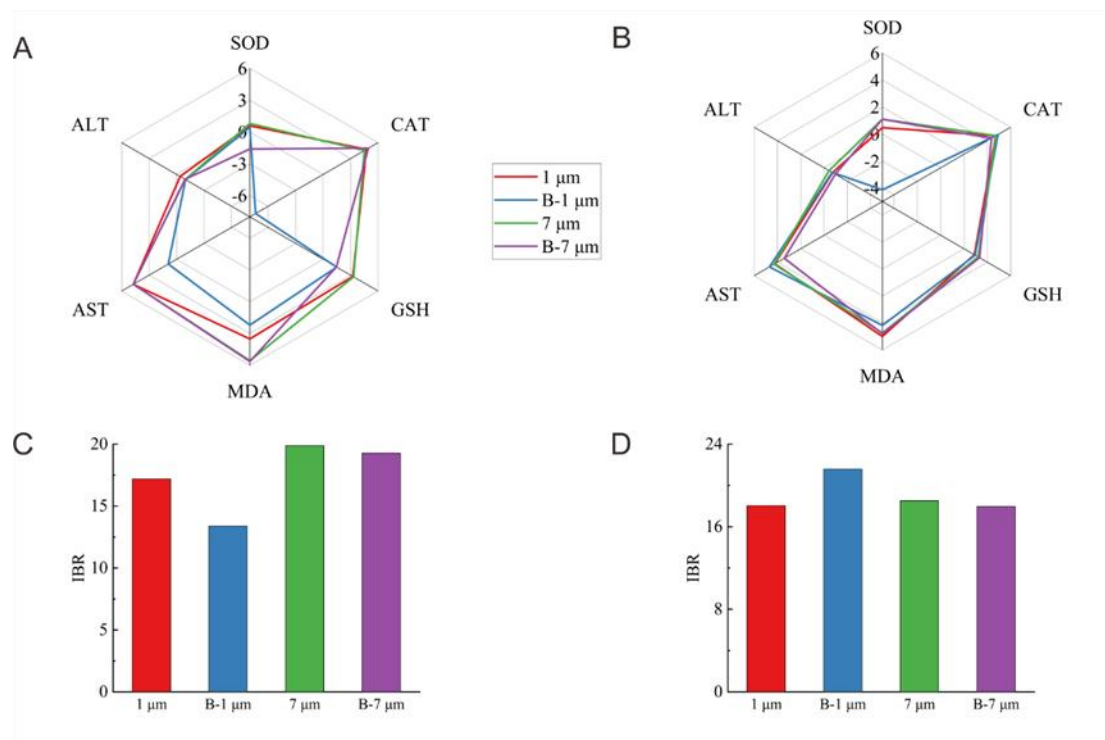


图 4.9 菲律宾蛤仔鳃组织生物标志物雷达图和综合生物标志物响应指数

A: 暴露 4 天鳃组织雷达图 B: 暴露 8 天鳃组织雷达图 C: 暴露 4 天鳃组织 IBR 指数
D: 暴露 8 天鳃组织 IBR 指数

Figure 4.9 Radar map of *R. philippinarum* gill tissue biomarker radar and integrated biomarker response index

A: Exposure 4 day gill tissue radar chart B: Exposure 8 day gill tissue radar chart
C: Exposure 4 day gill tissue IBR index D: Exposure 8 day gill tissue IBR index

根据 IBR 指数，消化腺中 SOD 和 MDA 对微塑料的响应更强。微塑料暴露 4 天对菲律宾蛤仔消化腺组织的毒性顺序为 $7\ \mu\text{m} > \text{B-}1\ \mu\text{m} > \text{B-}7\ \mu\text{m} > 1\ \mu\text{m}$ (图 4.10 A,C)；暴露 8 天对消化腺组织的毒性顺序为 $1\ \mu\text{m} > 7\ \mu\text{m} > \text{B-}7\ \mu\text{m} > \text{B-}1\ \mu\text{m}$ (图 4.10 B,D)。在不同的暴露天数下，微塑料对菲律宾蛤仔消化腺组织的毒性作用有差异，并且根据 IBR 数值，随着微塑料暴露时间的延长，PS-NH₂ 对消化腺组织的毒性增强。

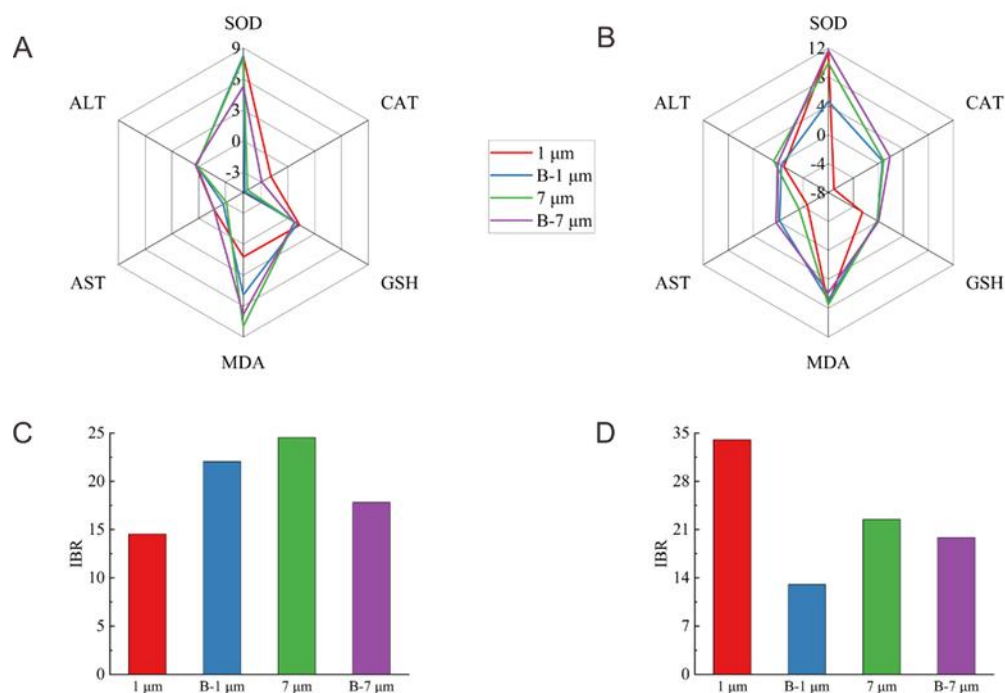


图 4.10 菲律宾蛤仔消化腺组织生物标志物雷达图和综合生物标志物响应指数
A: 暴露 4 天消化腺组织雷达图 B: 暴露 8 天消化腺组织雷达图 C: 暴露 4 天消化腺组织 IBR 指数 D: 暴露 8 天消化腺组织 IBR 指数

Figure 4.10 Radar chart of digestive gland tissue biomarkers and integrated biomarker response index of *R. philippinarum*

A: Digestive gland tissue radar chart for 4 days exposure B: Digestive gland tissue radar chart for 8 days exposure C: Digestive gland tissue IBR index for 4 days exposure D: Digestive gland tissue IBR index for 8 days exposure

4.2.6 菲律宾蛤仔对微塑料胁迫的代谢响应

为了分析对照组和不同粒径 PS-NH₂ 微塑料之间菲律宾蛤仔代谢产物的组间差异, 使用 OPLS-DA 建立模型, 得分图如图 4.11 所示。对照组与 1 μm 、B-1 μm 、7 μm 、B-7 μm 组的样本点分散于不同区域, 表明存在显著的代谢差异。

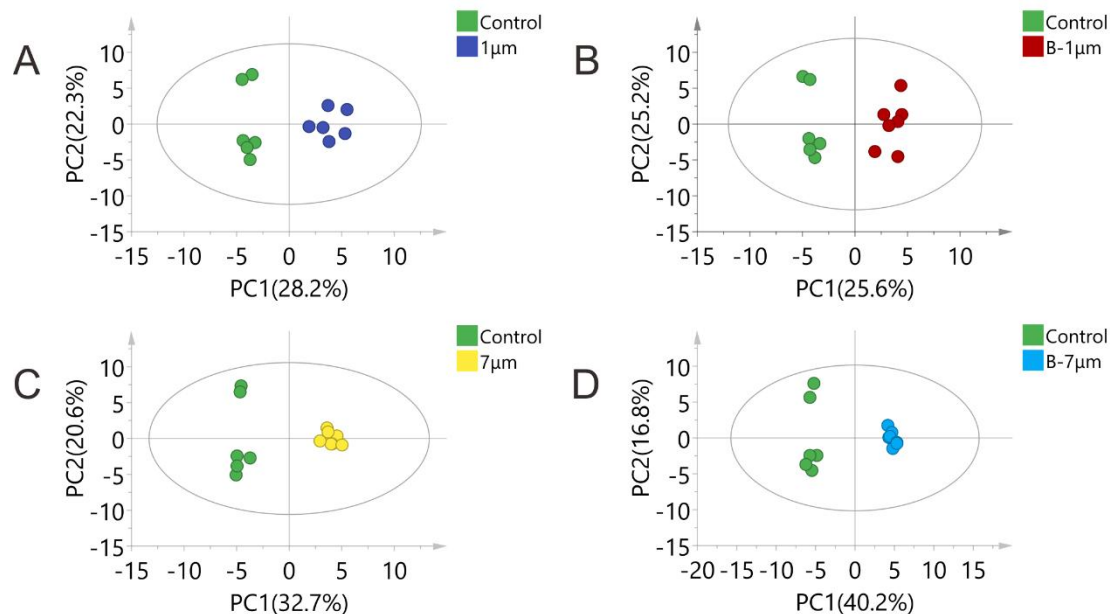


图 4.11 对照组和不同暴露组 OPLS-DA 得分图

Figure 4.11 OPLS-DA scores for control and different exposure groups

4.2.6.1 差异代谢物鉴定

根据 OPLS-DA 模型筛选出 $VIP > 1$ 的代谢物, 进一步分析对照组与 $1\ \mu\text{m}$ 和 $B-1\ \mu\text{mPS-NH}_2$ 之间差异代谢产物, 筛选出了 35 种代谢物。

通过热图 (图 4.12) 可以看出不同代谢物在对照组、 $1\ \mu\text{m}$ 和 $B-1\ \mu\text{mPS-NH}_2$ 组中的变化, 其中主要差异代谢物有 L-丝氨酸 (L-Serine)、L-蛋氨酸 (L-Methionine)、L-色氨酸、酪氨酸 (Tyrosine)、乳糖、甘氨酸、油酸、亚麻酸 (Linolenic acid)、次黄嘌呤 (Hypoxanthine)、葡萄糖酸 (Gluconic acid)、甘露二糖 (Mannobiose)、尿嘧啶 (Uracil)、乳果糖、嘧啶、磷酸、D-甘露糖 (D-Mannose)、木糖醇 (Xylitol)、核糖 (D-Ribose)、鸟氨酸 (Ornithine)、乙酸 (Chloroacetic acid)、抗坏血酸 (Ascorbic acid)、半乳糖酸 (Galactonic acid)、戊二酸 (Pentanedioic acid)、丙酸 (Propanoic acid)、亮氨酸 (L-Leucine)、吡啶甲酸 (Picolinic acid) 等。

与对照相比, L-丝氨酸、L-蛋氨酸、L-色氨酸、酪氨酸、乳糖、甘氨酸、油酸、次黄嘌呤、葡萄糖、甘露糖、尿嘧啶、乳果糖、嘧啶等上调; $1\ \mu\text{m}$ 组的磷酸、D-甘露糖、木糖醇、2-酮丁酸、D-核糖等上调, 鸟氨酸、乙酸、抗坏血酸

D-苏糖醇等下调；B-1 μm 组的半乳酸、戊二酸、丙酸、L-亮氨酸、吡啶甲酸等上调，鸟氨酸、乙酸、抗坏血酸、D-苏糖醇等下调。

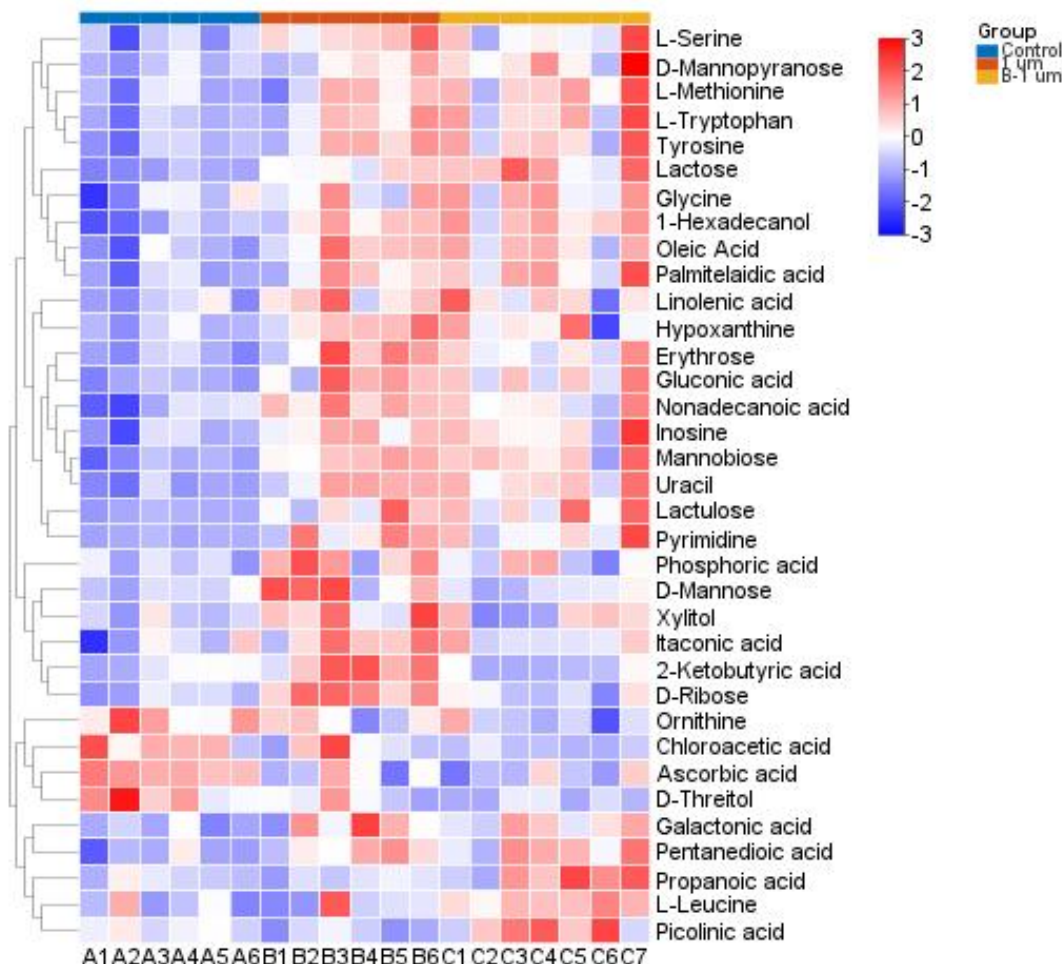


图 4.12 对照、1 μm 、B-1 μm 组鉴定出的差异代谢物热图

Figure 4.12 Heat map of differential metabolites identified in the control, 1 μm , B-1 μm group

同样，根据 OPLS-DA 模型筛选出 $\text{VIP} > 1$ 的代谢物，分析对照组与 7 μm 和 B-7 $\mu\text{mPS-NH}_2$ 之间差异代谢产物，筛选出了 52 种代谢物。

通过热图（图 4.13）可以看出不同代谢物在对照组、7 μm 和 B-7 $\mu\text{mPS-NH}_2$ 组中的变化，其中主要差异代谢物有 D-葡萄糖（D-Glucose）、花生四烯酸（Arachidonic acid）、乙酸、麦角甾醇（Ergosterol）、赖氨酸、草酸（Oxaic acid）、瓜氨酸（Citrulline）、L-亮氨酸、衣康酸（Itaconic acid）、1-十六烷醇（1-Hexadecanol）、嘧啶、半乳糖酸、D-核糖、甘油酸（Glyceric acid）、泛酸（Pantothenic acid）、木糖醇、L-丝氨酸、油酸、L-色氨酸、酪氨酸、次黄嘌呤、D-甘露糖、葡萄糖酸、

乳果糖、抗坏血酸、L-蛋氨酸、D-果糖、核糖酸（Ribonic acid）、哌啶酸（Pipelicolic acid）、甘露二糖、尿嘧啶、乳糖等。

明显下调的代谢物为 D-葡萄糖、花生四烯酸、乙酸、麦角甾醇、L-赖氨酸、草酸、吡喃半乳糖、吡啶甲酸、瓜氨酸等；明显上调的代谢物有衣康酸、1-十六烷醇、嘧啶、半乳糖酸、D-核糖、甘油酸、泛酸、木糖醇、L-丝氨酸、油酸、L-色氨酸、酪氨酸、次黄嘌呤、D-甘露糖、葡萄糖酸、乳果糖、抗坏血酸、L-蛋氨酸、D-果糖、核糖酸、哌啶酸、甘露二糖、尿嘧啶、乳糖等。

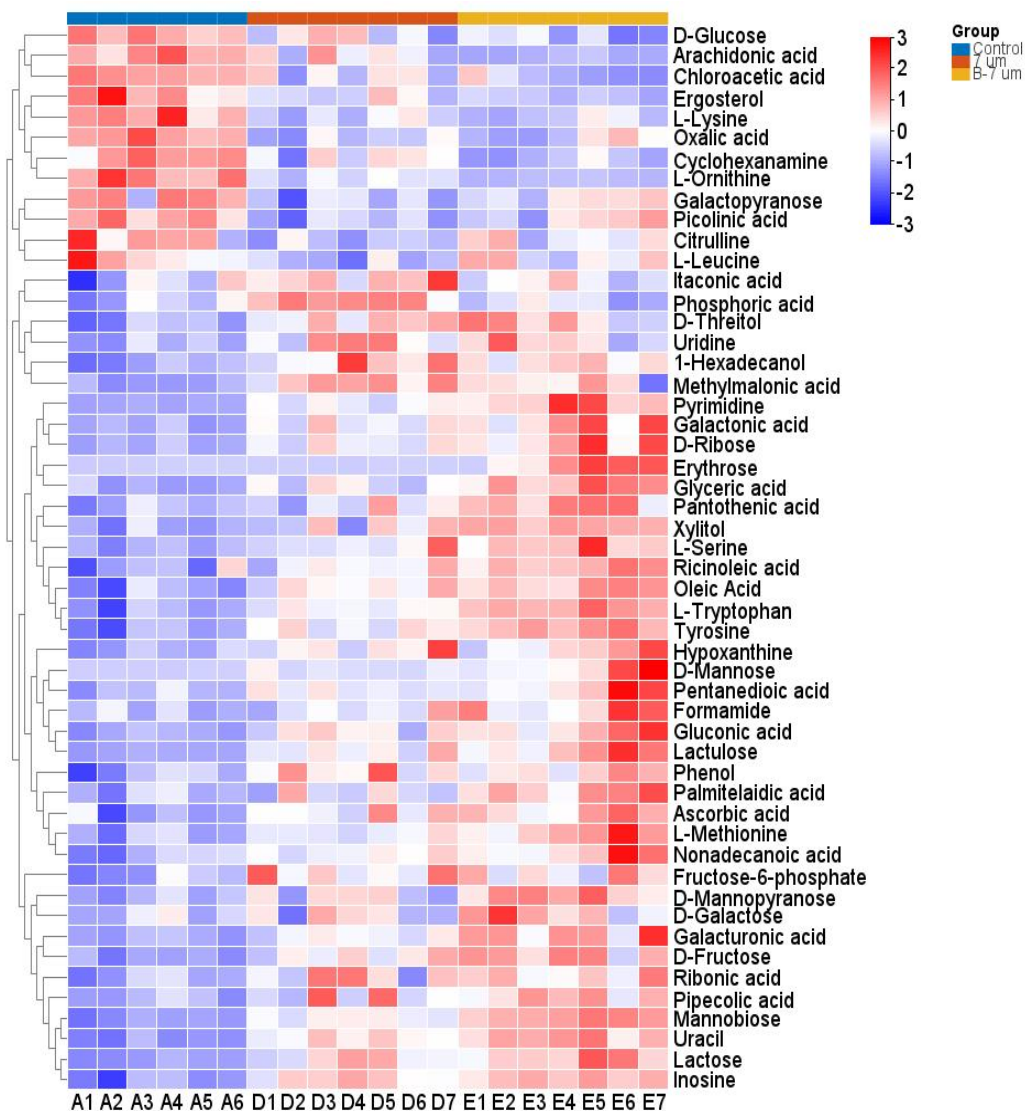


图 4.13 对照、7 μm、B-7 μm 组鉴定出的差异代谢物热图

Figure 4.13 Heat map of differential metabolites identified in the control, 7 μm, B-7 μm group

4.2.6.2 代谢通路分析

将对照组与不同粒径 PS-NH₂ 暴露组的差异代谢物数据导入 Metabo Analyst 进行处理分析, 得到通路图 (图 4.14)。

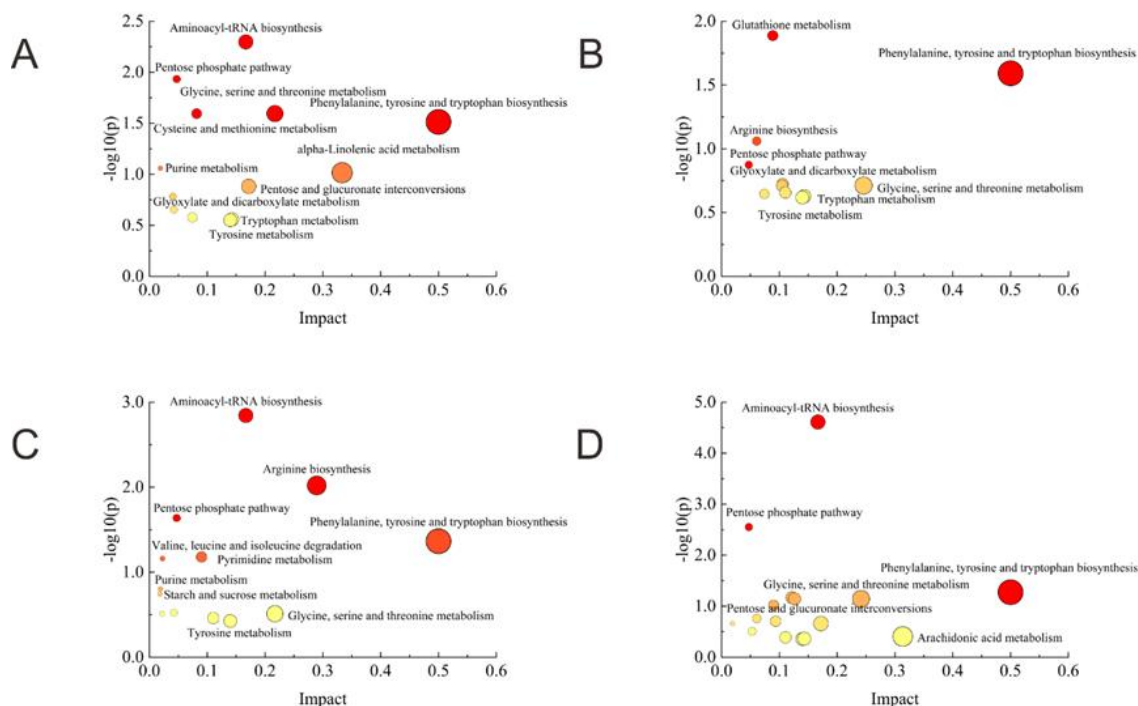
1 μm 组的差异代谢途径有: 氨酰基-tRNA 生物合成 (Aminoacyl-tRNA biosynthesis)、磷酸戊糖途径 (Pentose phosphate pathway)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (Cysteine and Methionine metabolism)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 (Phenylalanine, Tyrosine and Tryptophan biosynthesis)、嘌呤代谢、 α -亚麻酸代谢 (alpha-Linolenic acid metabolism)、戊糖和葡萄糖醛酸酯相互转化 (Pentose and Glucuronate interconversions)、丙酸代谢 (Propanoate metabolism)、乙醛酸和二羧酸代谢、嘧啶代谢、色氨酸代谢、酪氨酸代谢 (Tyrosine metabolism); B-1 μm 组差异代谢途径有: 谷胱甘肽代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、精氨酸生物合成、磷酸戊糖途径、乙醛酸和二羧酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、嘧啶代谢、色氨酸代谢、酪氨酸代谢。

7 μm 组的差异代谢途径有: 氨酰基-tRNA 生物合成、精氨酸生物合成、磷酸戊糖途径、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、嘧啶代谢、缬氨酸, 亮氨酸和异亮氨酸生物合成 (Valine, Leucine and Isoleucine biosynthesis)、嘌呤代谢、淀粉和蔗糖代谢 (Starch and Sucrose metabolism)、乙醛酸和二羧酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、酪氨酸代谢; B-7 μm 组的差异代谢途径有: 嘌呤代谢、磷酸戊糖途径、半乳糖代谢、精氨酸生物合成、嘧啶代谢、甘油酯代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、酪氨酸代谢、色氨酸代谢、氨酰基-tRNA 生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸酯相互转化、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、花生四烯酸代谢 (Arachidonic acid metabolism)、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成。

当菲律宾蛤仔受到 PS-NH₂ 微塑料胁迫后, 氨酰基-tRNA 生物合成受到干扰。氨酰基-tRNA 合成酶是翻译机制的重要组成部分, 可以催化氨基酸特异性附着在同源 tRNA 上, 为蛋白质生物合成提供原料^[125], 也可为细胞增殖提供所需的酶^[126,127]。半胱氨酸是与胱氨酸有关, 对蛋白质合成、解毒和多种代谢功能很重要。半胱氨酸也是制造氨基酸牛磺酸所必需的物质, 是抗氧化剂谷胱甘肽的成分, 在辅酶 A 等基本生化物质的代谢中发挥作用^[128]。蛋氨酸是生长和组织修复所必

需的物质，其提供的硫参与许多解毒过程，保护细胞免受污染物侵害。半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路受到影响，可能会影响菲律宾蛤仔的氨基酸代谢和解毒功能。

泛酸（维生素 B5），是生物体内合成辅酶 A 的原料，辅酶 A 是菲律宾蛤仔糖代谢、蛋白质代谢与脂代谢必不可少的物质^[129]。有研究表明，具有非极性侧链的氨基酸（如苯丙氨酸）易于吸附在塑料颗粒的表面上^[130]，由于苯丙氨酸很容易在肝脏中被羟基化为酪氨酸，并进入循环系统^[131]，苯丙氨酸和酪氨酸是单胺类神经递质（如多巴胺，肾上腺素）的前体^[132]。因此，PS-NH₂ 会导致苯丙氨酸和酪氨酸的生物合成和代谢途径失调，进而影响菲律宾蛤仔体内各种神经递质的合成，最终造成生物神经毒性。赖氨酸可显著诱导脂质过氧化^[133]，赖氨酸缺乏也可能导致免疫缺陷。而异亮氨酸和天冬氨酸与赖氨酸的功能相反，它们可以预防和修复氧化应激造成的损伤^[134,135]。200 $\mu\text{g/L}$ 的 PS-NH₂ 暴露会导致菲律宾蛤仔的代谢功能异常，能量代谢水平降低，进而诱导出现更严重的氧化



损伤。

图 4.14 代谢通路图

A: 1 μm 组 B: B-1 μm 组 C: 7 μm 组 D: B-7 μm 组

Figure 4.14 Metabolic pathway

A: 1 μm group B: B-1 μm group C: 7 μm group D: B-7 μm group

4.3 小结

在室内孵育生物膜 21 天后，可以在扫描电镜下观测到与原始塑料相比，孵育后的 1 μm 和 7 μm PS-NH₂ 微塑料表面更加粗糙，荧光显微下的观测结果证实了孵育后的微塑料表面具有生物膜。两种粒径的微塑料在菲律宾蛤仔体内的富集规律大致相似，但富集情况有所差异，塑料富集较多的组织是消化腺和肠道，鳃组织中微塑料含量次之，外套膜中较少。微塑料暴露 4 天后，粒径更大的 7 μm PS-NH₂ 在肠道中的蓄积量最多，具有表面生物膜的 PS-NH₂ 微塑料在消化腺中的富集含量较多；暴露 8 天后，直径更小的 1 μm 塑料更易在菲律宾蛤仔的鳃、消化腺和肠组织中蓄积。

摄入微塑料 8 天后，菲律宾蛤仔鳃组织出现血细胞浸润、纤毛脱落、鳃丝上皮细胞坏死等现象，消化腺上皮细胞核溶解，腺体细胞坏死等病理损伤。在 1 μm 、7 μm 、B-7 μm PS-NH₂ 组（浓度 200 $\mu\text{g/L}$ ）的暴露条件下，会对菲律宾蛤仔造成氧化损伤，仅在暴露时间为 8 天时，B-1 μm PS-NH₂ 组的抗氧化酶防御系统才被激活。生物标志物在不同组织中的响应特征不同，根据 IBR 指数，在不同的暴露天数下，微塑料对菲律宾蛤仔鳃组织的毒性作用有差异，随着暴露时间的延长，PS-NH₂ 微塑料对消化腺组织的毒性增强。

代谢组研究表明，微塑料暴露导致菲律宾蛤仔的代谢谱发生改变，筛选出的差异代谢主要是关于能量代谢、氨基酸代谢、糖代谢、氧化应激等。对照组与 7 μm 和 B-7 μm PS-NH₂ 组筛选出的差异代谢物更多，1 μm 和 B-7 μm 组受到干扰的代谢通路更多。

根据暴露 8 天时消化腺中微塑料的含量、消化腺 IBR 数值和代谢通路分析结果可知，与 B-1 μm 相比，原始 1 μm 微塑料对菲律宾蛤仔的毒性可能更强；同样，结合消化腺中微塑料的含量、生物标志物的活性/含量和代谢组学结果可知，与 7 μm 相比，B-7 μm 微塑料对菲律宾蛤仔的毒性可能更强。粒径更小（1 μm ）的 PS-NH₂ 可能更容易在菲律宾蛤仔体内蓄积，但是粒径更大（7 μm ）的 PS-NH₂ 对菲律宾蛤仔代谢方面的影响更大，不同粒径的 PS-NH₂ 微塑料对菲律宾蛤仔的毒性作用存在差异，这可能受暴露时长、微塑料浓度等因素的影响。

第 5 章 结论与展望

5.1 主要结论

本文以海南省红树林分布区典型的两种双壳贝类为研究对象，在生物膜微塑料暴露下，从波纹巴非蛤和菲律宾蛤仔对生物膜微塑料的摄食、蓄积，组织病理损伤、氧化损伤和代谢产物层面研究聚苯乙烯微塑料对双壳贝类的毒理效应，评估生物膜微塑料在两种双壳贝类中的潜在生态毒理风险。

聚苯乙烯微塑料在海水环境中孵育 21 天，其表面会出现老化现象，形成生物膜。微塑料暴露后波纹巴非蛤和菲律宾蛤仔存在对微塑料的摄食、蓄积行为，在肠和消化腺组织中蓄积较多，在鳃中的蓄积量次之，在外套膜中蓄积较少。微塑料暴露会对波纹巴非蛤和菲律宾蛤仔的鳃、消化腺组织造成病理损伤。

在 100 $\mu\text{g/L}$ 的聚苯乙烯微塑料环境下暴露 7 天，波纹巴非蛤会出现氧化应激反应，造成肝损伤。在 200 $\mu\text{g/L}$ 的不同粒径 PS-NH₂ 微塑料中暴露 8 天后，生物膜 1 μm 组仅引起菲律宾蛤仔的抗氧化酶活性的改变，1 μm 、7 μm 、B-7 μm 三种暴露条件还对免疫系统造成了破坏，引发了脂质过氧化损伤和肝损伤。

代谢组学研究表明，微塑料暴露后，受试生物消化腺的代谢产物谱发生改变，波纹巴非蛤的 4 条代谢通路（丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢；嘧啶代谢；甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢；色氨酸代谢）受到影响；菲律宾蛤仔的 7 条代谢通路（磷酸戊糖途径；半胱氨酸和蛋氨酸代谢；甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢；苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成；乙醛酸和二羧酸代谢；嘧啶代谢；酪氨酸代谢）受到影响。

实验结果表明，生物膜微塑料可以被双壳贝类摄入，并且蓄积在组织器官中，对鳃和消化腺组织造成病理损伤，暴露在生物膜微塑料环境中的双壳贝类会发生氧化应激反应，出现代谢紊乱。

5.2 创新点

论文从微塑料表面生物膜的新角度，研究具有红树林生境特征的生物膜微塑料在双壳贝类机体内的毒性效应，并探究生物膜对微塑料毒性效应的影响，在选题方面具有显著的特色和新颖性。

论文从微塑料蓄积分布、组织病理、氧化应激、代谢变化等层面，系统探究海水环境中生物膜微塑料介导的双壳贝类毒性效应，在研究思路方面具有一定的创新性。

研究综合采用荧光示踪分析法、激光共聚焦显微镜技术、生化分析、组织病理法以及代谢组学技术研究海洋环境中微塑料附着生物膜介导的双壳贝类毒性效应，在技术手段方面具有一定的创新性。

5.3 展望

本文仅研究了不同类型的生物膜聚苯乙烯微塑料对双壳贝类的短期毒性效应，但海水环境中长期存在的微塑料种类众多，今后可研究其他类型微塑料对于双壳贝类的长期毒性效应及作用机制。在海水环境中的微塑料表面还容易吸附重金属、持久性有机污染物等，因此，在未来还可采用重金属或有机物等和生物膜微塑料进行联合暴露，从而更加客观、全面地评估海洋环境中微塑料的毒性风险。

参考文献

- [1] Suman K H, Haque M N, Uddin M J, et al. Toxicity and biomarkers of micro-plastic in aquatic environment: a review[J]. Biomarkers, 2021, 26(1): 13-25.
- [2] Allwood J M, Ashby M F, Gutowski T G, et al. Material efficiency: A white paper[J]. Resources, Conservation and Recycling, 2011, 55(3): 362-381.
- [3] Thompson R C, Olsen Y, Mitchell R P, et al. Lost at sea: where is all the plastic?[J]. Science, 2004, 304(5672): 838.
- [4] Auta H S, Emenike C U, Fauziah S H. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions[J]. Environment International, 2017, 102: 165-176.
- [5] Duis K, Coors A. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects[J]. Environmental Sciences Europe, 2016, 28(1): 1-25.
- [6] Kurniawan S B, Said N S M, Imron M F, et al. Microplastic pollution in the environment: Insights into emerging sources and potential threats[J]. Environmental Technology & Innovation, 2021, 23: 101790.
- [7] Mahbub M S, Shams M. Acrylic fabrics as a source of microplastics from portable washer and dryer: Impact of washing and drying parameters[J]. Science of the Total Environment, 2022, 834: 155429.
- [8] Napper I E, Bakir A, Rowland S J, et al. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics[J]. Marine Pollution Bulletin, 2015, 99(1-2): 178-185.
- [9] 张琳琳. 我国北部湾典型红树林生态系统中微塑料的污染特征[D]. 广西大学, 2020.
- [10] 李富云, 贾芳丽, 涂海峰, 等. 海洋中微塑料的环境行为和生态影响[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(6): 11-18.
- [11] Wright S L, Thompson R C, Galloway T S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review[J]. Environmental Pollution, 2013, 178: 483-492.
- [12] Andrady A L. The plastic in microplastics: A review[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 119(1): 12-22.
- [13] Ryan P G. Does size and buoyancy affect the long-distance transport of floating debris?[J]. Environmental Research Letters, 2015, 10(8): 084019.
- [14] Eriksen M, Lebreton L C, Carson H S, et al. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea[J]. Plos One, 2014, 9(12): e111913.

- [15] Lusher A L, Tirelli V, O'connor I, et al. Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14947.
- [16] Kelly A, Lannuzel D, Rodemann T, et al. Microplastic contamination in east Antarctic sea ice[J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 154: 111130.
- [17] Bakaraki Turan N, Sari Erkan H, Onkal Engin G. Current status of studies on microplastics in the world's marine environments[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 327: 129394
- [18] Liu T, Zhao Y, Zhu M, et al. Seasonal variation of micro- and meso-plastics in the seawater of Jiaozhou Bay, the Yellow Sea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 152: 110922.
- [19] Liu S, Pan Y F, Li H X, et al. Microplastic pollution in the surface seawater in Zhongsha Atoll, South China Sea[J]. Science of the Total Environment, 2022, 822: 153604.
- [20] Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson R C, et al. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(6): 3060-3075.
- [21] Cincinelli A, Scopetani C, Chelazzi D, et al. Microplastics in the Black Sea sediments[J]. Science of the Total Environment, 2021, 760: 143898.
- [22] Zhang M, Liu S G, Bo J, et al. First Evidence of Microplastic Contamination in Antarctic Fish (Actinopterygii, Perciformes)[J]. Water, 2022, 14(19): 3070.
- [23] Abbasi S, Soltani N, Keshavarzi B, et al. Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf[J]. Chemosphere, 2018, 205: 80-87.
- [24] Ding J F, Li J X, Sun C J, et al. Separation and identification of microplastics in digestive system of bivalves[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018, 46(5): 690-697.
- [25] Su L, Xue Y, Li L, et al. Microplastics in Taihu Lake, China[J]. Environmental Pollution, 2016, 216: 711-719.
- [26] Sui M, Lu Y, Wang Q, et al. Distribution patterns of microplastics in various tissues of the Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and in the surrounding culture seawater[J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 160: 111595.
- [27] Todd G, Nicola R, Rainer L, et al. A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(4): 1466-1472.
- [28] Hirai H, Takada H, Ogata Y, et al. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches[J]. Marine Pollution Bulletin, 2011, 62(8): 1683-1692.
- [29] Rochman C M, Browne M A, Halpern B S, et al. Policy: Classify plastic waste as hazardous[J]. Nature, 2013, 494(7436): 169-171.
- [30] Morét-Ferguson S, Law K L, Proskurowski G, et al. The size, mass, and composition of plastic debris in the western North Atlantic Ocean[J]. Marine Pollution Bulletin, 2010, 60(10): 1873-1878.

- [31] Caroline D T, I D L, Annelies H, et al. Temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(13): 7350-7360.
- [32] 陈涛. 近海微塑料表面生物膜的形成及其对微塑料理化性质的影响[D]. 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所), 2018.
- [33] Ramsperger A, Narayana V K B, Gross W, et al. Environmental exposure enhances the internalization of microplastic particles into cells[J]. *Science Advances*, 2020, 6(50): eabd1211.
- [34] Bhagwat G, Tran T K A, Lamb D, et al. Biofilms enhance the adsorption of toxic contaminants on plastic microfibers under environmentally relevant conditions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(13): 8877-8887.
- [35] Chen X, Chen X, Zhao Y, et al. Effects of microplastic biofilms on nutrient cycling in simulated freshwater systems[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 719: 137276.
- [36] Li J, Liu H, Paul Chen J. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection[J]. *Water Research*, 2018, 137: 362-374.
- [37] Prokić M D, Radovanović T B, Gavrić J P, et al. Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 111: 37-46.
- [38] Lin Y, Liu Q, Meng F, et al. Integrated toxicity evaluation of metals in sediments of Jiaozhou Bay (China): Based on biomarkers responses in clam *Ruditapes philippinarum* exposed to sediment extracts[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 131: 180-190.
- [39] Abidli S, Pinheiro M, Lahbib Y, et al. Effects of environmentally relevant levels of polyethylene microplastic on *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia): filtration rate and oxidative stress[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(21): 26643-26652.
- [40] Rossana S, Marc S, Yoann T, et al. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(9): 2430-2435.
- [41] Nashami A, N J A, Andrew T. Impacts of microplastic fibres on the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Chemosphere*, 2020, 262: 128290.
- [42] Von Hellfeld R, Zarzuelo M, Zaldibar B, et al. Accumulation, depuration, and biological effects of polystyrene microplastic spheres and adsorbed cadmium and benzo (a) pyrene on the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Toxics*, 2022, 10(1): 18.
- [43] Sikdokur E, Belivermis M, Sezer N, et al. Effects of microplastics and mercury on manila clam *Ruditapes philippinarum*: Feeding rate, immunomodulation, histopathology and oxidative stress[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 262: 114247.

- [44] Magara G, Elia A C, Syberg K, et al. Single contaminant and combined exposures of polyethylene microplastics and fluoranthene: accumulation and oxidative stress response in the blue mussel, *Mytilus edulis*[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2018, 81(16): 761-773.
- [45] Magara G, Khan F R, Pinti M, et al. Effects of combined exposures of fluoranthene and polyethylene or polyhydroxybutyrate microplastics on oxidative stress biomarkers in the blue mussel (*Mytilus edulis*)[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2019, 82(10): 616-625.
- [46] Ribeiro F, Garcia A R, Pereira B P, et al. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 122(1-2): 379-391.
- [47] Xia B, Zhang J, Zhao X, et al. Polystyrene microplastics increase uptake, elimination and cytotoxicity of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in the marine scallop *Chlamys farreri*[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 258: 113657.
- [48] Jia T, Qing W, Wen R, et al. Microplastic in cultured oysters from different coastal areas of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 653: 1282-1292.
- [49] Thomas M, Jon B, Craig S, et al. The world is your oyster: low-dose, long-term microplastic exposure of juvenile oysters[J]. *Heliyon*, 2020, 6(1): e03103.
- [50] Green D S. Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 216: 95-103.
- [51] Bråte I L N, Blázquez M, Brooks S J, et al. Weathering impacts the uptake of polyethylene microparticles from toothpaste in Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 626: 1310-1318.
- [52] Cappello T, De Marco G, Oliveri Conti G, et al. Time-dependent metabolic disorders induced by short-term exposure to polystyrene microplastics in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 209: 111780.
- [53] Wei Q, Hu C Y, Zhang R R, et al. Comparative evaluation of high-density polyethylene and polystyrene microplastics pollutants: Uptake, elimination and effects in mussel[J]. *Marine Environment Research*, 2021, 169: 105329.
- [54] Jiang W, Fang J, Du M, et al. Microplastics influence physiological processes, growth and reproduction in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 293: 118502.
- [55] 柳佳佳. 聚苯乙烯微塑料和茚对菲律宾蛤仔的毒性效应研究[D]. 宁波大学, 2021.
- [56] Kim J H, Yu Y B, Choi J H. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 413: 125423.

- [57] Mak C W, Yeung K C F, Chan K M. Acute toxic effects of polyethylene microplastic on adult zebrafish[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 182: 109442.
- [58] Kashiwada S. Distribution of Nanoparticles in the See-through Medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(11): 1697-1702.
- [59] 武芳竹, 曾江宁, 徐晓群, 等. 海洋微塑料污染现状及其对鱼类的生态毒理效应[J]. *海洋学报*, 2019, 41(2): 85-98.
- [60] Espinosa C, Beltrán J M G, Esteban M A, et al. In vitro effects of virgin microplastics on fish head-kidney leucocyte activities[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 30-38.
- [61] Lu Y, Zhang Y, Deng Y, et al. Response to comment on “uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver”[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(22): 12523-12524.
- [62] 许彩娜, 张悦, 袁骐, 等. 微塑料对海洋生物的影响研究进展[J]. *海洋渔业*, 2019, 41(5): 631-640.
- [63] Chiara G, Silvia M, Sara F, et al. Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2017, 145: 250-257.
- [64] Eom H J, Nam S E, Rhee J S. Polystyrene microplastics induce mortality through acute cell stress and inhibition of cholinergic activity in a brine shrimp[J]. *Molecular & Cellular Toxicology*, 2020, 16: 233-243.
- [65] Gray A D, Weinstein J E. Size- and shape-dependent effects of microplastic particles on adult daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*)[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2017, 36(11): 3074-3080.
- [66] Huang C H, Chu T W, Kuo C H, et al. Effects of microplastics on reproduction and growth of freshwater live feeds *Daphnia magna*[J]. *Fishes*, 2022, 7(4): 181.
- [67] Jeong C B, Kang H M, Lee M C, et al. Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 41323.
- [68] Jeong C B, Won E J, Kang H M, et al. Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p-JNK and p-p38 Activation in the Monogonont Rotifer (*Brachionus koreanus*)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(16): 8849-8857.
- [69] 李佩佩, 严忠雍, 黄丽英, 等. 微塑料吸附有机污染物的作用机制研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2023, 46(1): 74-80.
- [70] Muller A, Becker R, Dorgerloh U, et al. The effect of polymer aging on the uptake of fuel aromatics and ethers by microplastics[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 240: 639-646.
- [71] Huffer T, Weniger A K, Hofmann T. Data on sorption of organic compounds by aged polystyrene microplastic particles[J]. *Data in Brief*, 2018, 18: 474-479.
- [72] Rios-Fuster B, Arechavala-Lopez P, García-Marcos K, et al. Experimental evidence of

- physiological and behavioral effects of microplastic ingestion in *Sparus aurata*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2021, 231: 105737.
- [73] Vroom R J E, Koelmans A A, Besseling E, et al. Aging of microplastics promotes their ingestion by marine zooplankton[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 231: 987-996.
- [74] Ramsperger A, Narayana V K B, Gross W, et al. Environmental exposure enhances the internalization of microplastic particles into cells[J]. *Science of Advanced Materials*, 2020, 6(50): eabd1211.
- [75] 邹亚丹, 徐擎擎, 张哿, 等. 6种消解方法对荧光测定生物体内聚苯乙烯微塑料的影响[J]. *环境科学*, 2019, 40(1): 496-503.
- [76] Lu Y, Zhang Y, Deng Y, et al. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(7): 4054-4060.
- [77] Li Z, Feng C, Wu Y, et al. Impacts of nanoplastics on bivalve: Fluorescence tracing of organ accumulation, oxidative stress and damage[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 392: 122418.
- [78] Sanchez W, Burgeot T, Porcher J M. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2013, 20(5): 2721-2725.
- [79] 徐希媛. 中国近海暴露环境下微塑料生物膜中生物群落时空变化及群体感应细菌研究[D]. 自然资源部第一海洋研究所, 2020.
- [80] Hoshino A, Fujioka K, Oku T, et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification[J]. *Nano Letters*, 2004, 4(11): 2163-2169.
- [81] Mao Y, Ai H, Chen Y, et al. Phytoplankton response to polystyrene microplastics: Perspective from an entire growth period[J]. *Chemosphere*, 2018, 208: 59-68.
- [82] Wang F, Bexiga M G, Anguissola S, et al. Time resolved study of cell death mechanisms induced by amine-modified polystyrene nanoparticles[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(22): 10868-10876.
- [83] Yang T, Luo J, Nowack B. Characterization of nanoplastics, fibrils, and microplastics released during washing and abrasion of polyester textiles[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(23): 15873-15881.
- [84] Qiang L, Cheng J, Mirzoyan S, et al. Characterization of microplastic-associated biofilm development along a freshwater-estuarine gradient[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(24): 16402-16412.
- [85] Von Moos N, Burkhardt-Holm P, Köhler A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(20): 11327-11335.

- [86] Amaral-Zettler L A, Zettler E R, Slikas B, et al. The biogeography of the plastisphere: implications for policy[J]. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2015, 13(10): 541-546.
- [87] Wang Y, Wang X, Li Y, et al. Biofilm alters tetracycline and copper adsorption behaviors onto polyethylene microplastics[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 392: 123808.
- [88] Qi K, Lu N, Zhang S, et al. Uptake of Pb(II) onto microplastic-associated biofilms in freshwater: Adsorption and combined toxicity in comparison to natural solid substrates[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 411: 125115.
- [89] Luan L, Wang X, Zheng H, et al. Differential toxicity of functionalized polystyrene microplastics to clams (*Meretrix meretrix*) at three key development stages of life history[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 139: 346-354.
- [90] Della Torre C, Bergami E, Salvati A, et al. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(20): 12302-12311.
- [91] Li H, Wang B, Deng S, et al. Oxygen-containing functional groups on bioelectrode surface enhance expression of c-type cytochromes in biofilm and boost extracellular electron transfer[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 292: 121995.
- [92] 滕佳. 莱州湾微塑料污染特征及其对典型双壳贝类生态毒性效应研究[D]. 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所), 2021.
- [93] Devireddy A R, Zandalinas S I, Fichman Y, et al. Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress[J]. *The Plant Journal*, 2021, 105(2): 459-476.
- [94] Wang X, Huang W, Wei S, et al. Microplastics impair digestive performance but show little effects on antioxidant activity in mussels under low pH conditions[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 258: 113691.
- [95] Lesser M P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology[J]. *Annual Review of Physiology*, 2006, 68: 253-278.
- [96] 李传慧, 夏斌, 陈碧鹃, 等. 胜利原油对半滑舌鳎幼鱼肝脏谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶活性的影响[J]. *海洋环境科学*, 2011, 30(06): 827-830.
- [97] Jeong C B, Won E J, Kang H M, et al. Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(16): 8849-8857.
- [98] Qiao R, Lu K, Deng Y, et al. Combined effects of polystyrene microplastics and natural organic matter on the accumulation and toxicity of copper in zebrafish[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 682: 128-137.
- [99] Eom H J, Nam S E, Rhee J S. Polystyrene microplastics induce mortality through acute cell stress and inhibition of cholinergic activity in a brine shrimp[J]. *Molecular & Cellular Toxicology*,

2020, 16(3): 233-243.

[100] 陈柯宇. 聚乙烯微塑料污染对养殖过程中鲤鱼的损伤和影响[D]. 南京农业大学, 2020.

[101] Zhou J, He Z, Ma S, et al. AST/ALT ratio as a significant predictor of the incidence risk of prostate cancer[J]. *Cancer Medicine*, 2020, 9(15): 5672-5677.

[102] MacKenzie J D, Watters A K, To J T, et al. ALT positivity in human cancers: prevalence and clinical insights[J]. *Cancers*, 2021, 13(10): 2384.

[103] 邢继强. 聚苯乙烯微塑料对大鼠肝脏的毒性作用[D]. 吉林大学, 2022.

[104] Ramaswamy M, Thangavel P, Panneer Selvam N. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) enzyme activities in different tissues of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) exposed to a carbamate pesticide, carbaryl[J]. *Pesticide Science*, 1999, 55(12): 1217-1221.

[105] Mu Y, Sun J, Li Z, et al. Activation of pyroptosis and ferroptosis is involved in the hepatotoxicity induced by polystyrene microplastics in mice[J]. *Chemosphere*, 2022, 291(2): 132944.

[106] Raza T, Rasool B, Asrar M, et al. Exploration of polyacrylamide microplastics and evaluation of their toxicity on multiple parameters of *Oreochromis niloticus*[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2023, 30(2): 103518.

[107] Tseng Y C, Hwang P P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 148(4): 419-429.

[108] 刘香. 环境相关浓度 PET 微塑料污染对刺参生理特征的影响研究[D]. 青岛科技大学, 2022.

[109] Liu X, Zhang L, You L, et al. Differential toxicological effects induced by mercury in gills from three pedigrees of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by NMR-based metabolomics[J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(1): 177-186.

[110] Meng J, Zhu Q, Zhang L, et al. Genome and transcriptome analyses provide insight into the euryhaline adaptation mechanism of *Crassostrea gigas*[J]. *Plos One*, 2013, 8(3): e58563.

[111] Tabatabaie L, Klomp L W, Berger R, et al. L-serine synthesis in the central nervous system: a review on serine deficiency disorders[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2010, 99(3): 256-262.

[112] Modoux M, Rolhion N, Mani S, et al. Tryptophan metabolism as a pharmacological target[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2021, 42(1): 60-73.

[113] Dagenais-Lussier X, Loucif H, Beji C, et al. Latest developments in tryptophan metabolism: Understanding its role in B cell immunity[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2021, 59: 111-117.

- [114] Ji C, Wu H, Liu X, et al. The influence of salinity on toxicological effects of arsenic in digestive gland of clam *Ruditapes philippinarum* using metabolomics[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2013, 31(2): 345-352.
- [115] Spann N, Aldridge D C, Griffin J L, et al. Size-dependent effects of low level cadmium and zinc exposure on the metabolome of the Asian clam, *Corbicula fluminea*[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 105(3-4): 589-599.
- [116] Liu X, Ji C, Zhao J, et al. Differential metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* challenges[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(6): 2001-2007.
- [117] 安浩, 张宴. 微塑料和三氯生对斑马鱼的神经毒性效应研究[J]. 能源环境保护: 1-9.
- [118] Ajith N, Arumugam S, Parthasarathy S, et al. Global distribution of microplastics and its impact on marine environment-a review[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2020, 27(21): 25970-25986.
- [119] Magni S, Gagne F, Andre C, et al. Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia)[J]. Science of the Total Environment, 2018, 631: 778-788.
- [120] Sacchi A, Mouneyrac C, Bolognesi C, et al. Biomonitoring study of an estuarine coastal ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia)[J]. Environmental Pollution, 2013, 177: 82-89.
- [121] Davidson K, Dudas S E. Microplastic ingestion by wild and cultured Manila clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia[J]. Archives of Environment Contamination and Toxicology, 2016, 71(2): 147-156.
- [122] Aladaileh S, Nair S V, Birch D, et al. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 96(1): 48-63.
- [123] Wright S L, Thompson R C, Galloway T S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review[J]. Environmental Pollution, 2013, 178: 483-492.
- [124] Li Y, Du X, Li W, et al. Two genes related to apoptosis in the hepatopancreas of juvenile prawn, *Macrobrachium nipponense*: Molecular characterization and transcriptional response to nanoplastic exposure[J]. Science of the Total Environment, 2023, 877: 162863.
- [125] Parrot C, Moulinier L, Bernard F, et al. Peculiarities of aminoacyl-tRNA synthetases from trypanosomatids[J]. International Journal of Biological Chemistry, 2021, 297(2): 100913.
- [126] Zou Y, Yang Y, Fu X, et al. The regulatory roles of aminoacyl-tRNA synthetase in cardiovascular disease[J]. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2021, 25: 372-387.
- [127] 张晓飞, 余秋然, 赵宇航, 等. 聚乙烯微塑料对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长、抗氧化、免疫和肠道微生物的影响[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(6): 301-314.
- [128] 王隽媛. 聚苯乙烯微/纳米塑料和菲对水稻幼苗的毒性效应研究[D]. 东北师范大学,

2022.

- [129] Tahiliani A G, Beinlich C J. Pantothenic acid in health and disease[J]. Vitamins & Hormones, 1991, 46: 165-228.
- [130] Hollóczki O, Gehrke S. Nanoplastics can change the secondary structure of proteins[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 16013.
- [131] Fernstrom J D, Fernstrom M H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain[J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137(6): 1539-1547.
- [132] Van Cauwenberghe L, Vanreusel A, Mees J, et al. Microplastic pollution in deep-sea sediments[J]. Environmental Pollution, 2013, 182: 495-499.
- [133] Seminotti B, Leipnitz G, Amaral A U, et al. Lysine induces lipid and protein damage and decreases reduced glutathione concentrations in brain of young rats[J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2008, 26(7): 693-698.
- [134] Tirabassi G, Vignini A, Tiano L, et al. Protective effects of coenzyme Q10 and aspartic acid on oxidative stress and DNA damage in subjects affected by idiopathic asthenozoospermia[J]. Endocrine, 2015, 49(2): 549-552.
- [135] Zhao J, Wu P, Jiang W, et al. Preventive and reparative effects of isoleucine against copper-induced oxidative damage in primary fish enterocytes[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(4): 1021-1032.

致谢

首先,感谢我的指导教师曾映旭老师这三年来对我的帮助和指导,从最初选题、设计实验、开题,到小论文、中期、毕业论文,一直以来的悉心教导。常常觉得自己特别特别幸运,让我遇到您这样严谨负责耐心优秀的导师。感谢您对我的关心与照顾,祝您未来工作顺利,健康平安,万事胜意。同时,感谢我的校外导师屈原皋老师对我的指导和教诲,祝您桃李满天下,阖家幸福,科研顺利。

感谢我的家人,对我学业上所有决定的支持,愿我的家人们身体健康,平安喜乐。感谢我的学弟学妹们,林健晖、李萍萍、邓希、廖武森、覃广能、万玉涵、李自创等等。感谢我的同学们对我学业和生活上的帮助,愿我们都能顺利毕业,找到一个满意的工作。感谢我的好朋友朱鑫宇对我的鼓励和陪伴,祝你们未来一切顺利。

感谢自己,当初选择了继续读研,让我在科研、学业、生活上都有了很大成长和进步。感恩相遇,感谢所有。

个人简历、在学期间发表的学术论文与研究成果

个人简历：

康子歆，女，汉族。2015年9月—2019年6月就读于河北农业大学，环境科学专业；2020年9月—2023年6月，就读于海南热带海洋学院，资源与环境专业。

在学期间发表的学术论文与研究成果：

康子歆,林健晖,杨涛,鞏广能,廖武森,曾映旭.不同官能团纳米塑料在波纹巴非蛤体内的蓄积特征及毒性效应[J].海洋环境科学,2023,42(03):362-368.

Zeng Y, Deng B, Kang Z, et al. Tissue accumulation of polystyrene microplastics causes oxidative stress, hepatopancreatic injury and metabolome alterations in *Litopenaeus vannamei*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 256: 114871.

Yang T, Zeng Y, Kang Z, et al. Enrichment and ecological risks of microplastics in mangroves of southern Hainan Island, China[J]. Science of The Total Environment, 2023, 889: 164160

杨涛,曾映旭,康子歆,赵茜,林健晖,刘瑞娜,徐功娣.海岸带蓝碳生态系统中微塑料污染特征及生态风险研究进展[J].海洋湖沼通报,返修.

发明专利：曾映旭,康子歆,林健晖,那广水,刘敏,杨涛.一种检测海洋生物体内微塑料含量的高通量方法[P]. 海南省：CN115290615A,2022-11-04.

实用新型专利：曾映旭,林健晖,康子歆,刘瑞娜,齐丹,杨涛.一种高效提取海水微塑料的装置[P]. 海南省：CN218035981U,2022-12-13.