

氨基修饰聚苯乙烯纳米塑料及其滤液对日本虎斑猛水蚤 毒性效应研究

崔修鑫^{1,2,3}, 李昭川³, 曹 硕^{3,4}, 张明兴³, 丛 艺³,
娄亚迪³, 靳 非³, 何 洁^{1,2}, 王 莹³, 王菊英³

(1.大连海洋大学 海洋科技与环境学院 辽宁省高校近岸海洋环境科学与技术重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2.辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室, 辽宁 大连 116023; 3.国家海洋环境监测中心 国家环境保护近岸海域生态环境重点实验室, 辽宁 大连 116023; 4.上海海洋大学 海洋科学与生态环境学院, 上海 201306)

摘 要: 纳米塑料具有体积小、比表面积大等特点, 能够对海洋生物产生潜在不利影响。然而, 目前毒理学研究主要使用的是商品化纳米塑料悬液, 其中的添加剂组分可能导致纳米塑料毒性效应出现“假阳性”, 对科学评价其真实毒性效应造成一定干扰。本研究以海洋桡足类日本虎斑猛水蚤 (*Tigriopus japonicus*) 为受试生物, 采用长期暴露 (24 d) 的方式探究环境相关浓度 (5.5 $\mu\text{g/L}$ 、55 $\mu\text{g/L}$ 和 550 $\mu\text{g/L}$) 的 50 nm 氨基修饰聚苯乙烯 (PS-NH₂) 及其滤液 (含添加剂组分) 对猛水蚤在存活、生长发育和繁殖等方面的毒性效应。结果表明, PS-NH₂ 及其滤液均能够降低猛水蚤的存活率和体长; 550 $\mu\text{g/L}$ 的 PS-NH₂ 延长了猛水蚤的发育时间和蜕皮时间间隔, 而 PS-NH₂ 滤液未产生以上影响。PS-NH₂ 及其滤液均会导致猛水蚤孵化时间延长以及孵化幼体数量减少; 与 PS-NH₂ 相比, PS-NH₂ 滤液单独暴露下的雌性猛水蚤卵囊脱落比例更高。总体而言, PS-NH₂ 对猛水蚤的存活和发育效应大于 PS-NH₂ 滤液, 对繁殖的不利影响小于 PS-NH₂ 滤液, 表明 PS-NH₂ 微球与滤液中的添加剂组分间可能存在复杂的相互作用模式。相关研究结果对科学评估纳米塑料的生态风险具有一定参考价值。

关键词: 纳米塑料; 氨基修饰聚苯乙烯; 浮游动物; 添加剂; 发育繁殖

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1007-6336(2024)04-0637-12

Toxic effects of amino-modified polystyrene nanoplastics their filtrates on *Tigriopus japonicus*

CUI Xiuxin^{1,2,3}, LI Zhaochuan³, CAO Shuo^{3,4}, ZHANG Mingxing³, CONG Yi³,
LOU Yadi³, JIN Fei³, HE Jie^{1,2}, WANG Ying³, WANG Juying³

(1.Key Lab. of Nearshore Marine Environmental Science and Technology in Liaoning Province, School of Marine Technology and Environment, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2.Key Lab. of Marine Bio-resources Restoration and Habitat Reparation in Liaoning Province, Dalian 116023, China; 3.State Environmental Protection Key Laboratory of Coastal Ecosystem, National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 4.College of Oceanography and

收稿日期: 2024-03-04, 修订日期: 2024-04-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (42276167)

作者简介: 崔修鑫 (1998—), 男, 辽宁鞍山人, 硕士, 主要研究方向为海洋生态毒理学, E-mail: cxxhyhx@163.com

通信作者: 李昭川 (1995—), 男, 辽宁大连人, 助理研究员, 硕士, 主要从事新污染物的海洋生态毒理学和海洋环境基准研究, E-mail: zcli@nmemc.org.cn

王 莹 (1980—), 女, 辽宁沈阳人, 研究员, 博士, 主要研究方向为海洋生态毒理学、污染物/营养物海水水质基准/标准和生态风险评估, E-mail: wangying@nmemc.org.cn

Ecological Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Nanoplastics are able of causing adverse effects to marine organisms owing to their small size and large surface area to mass ratio. However, the presence of suspension additives in commercial nanoplastics widely employed in toxicological studies may introduce artifacts into nanoplastics toxicity assessments. In this study, the marine copepod *Tigriopus japonicus* was used as the test organism, and long-term exposure (24 d) was used to investigate the toxic effects of 50 nm amino-modified polystyrene nanospheres (PS-NH₂) and their filtrates (containing additive components) at environmentally relevant concentrations (5.5 µg/L, 55 µg/L and 550 µg/L) on the survival, growth, development and reproduction of *T. japonicus*. Our results revealed that both PS-NH₂ and their filtrates decreased the survival rate and body length of *T. japonicus*. At 550 µg/L PS-NH₂ exposure, the average molting interval and the development time to adult were delayed, while PS-NH₂ filtrates did not cause these toxicity effects. PS-NH₂ and their filtrates extended the hatching time, reduced number of nauplii. Compared to PS-NH₂, PS-NH₂ filtrates caused a higher rate of deciduous oocysts in female *T. japonicus*. In general, PS-NH₂ had a more adverse effect on survival and development than PS-NH₂ filtrates, and a less adverse effect on reproduction than PS-NH₂ filtrates, indicating a complex interaction pattern between PS-NH₂ nanospheres and additive components. Our findings contributed to the ecological risk assessment of nanoplastics in the marine environment.

Key words: nanoplastics; amino-modified polystyrene; zooplankton; additive; development and reproduction

纳米塑料(nanoplastics, NPs; 粒径为 1 nm ~ 1 µm)是海洋环境中的一类新污染物,具有粒径小、生物可利用度高等特点,对海洋生态系统和人体健康的潜在危害引起广泛关注^[1-2]。海洋是 NPs 重要的汇^[3],一方面,来源于生活产品(如个人护理品)和医学产品(如纳米药物)等生产过程中直接制造的 NPs 被排放进入海洋^[4];另一方面,进入海洋环境的塑料或微塑料(粒径为 1 µm ~ 5 mm)在风力、微生物、紫外线、洋流等作用下也会逐步破碎成 NPs,并在全球海洋环境中迁移^[2]。随着采样、分离提取和鉴定技术的提升,NPs 在全球不同海域的水体中检出,例如,荷兰瓦登海表层水体中检出的 NPs(粒径:< 200 nm)浓度范围为 2.7 ~ 6.5 µg/L^[5],我国渤海海域的表层海水中检测到 NPs 的浓度范围为< 0.07 ~ 0.73 µg/L^[6]。全球海洋环境(海水和沉积物)中检出的 NPs 类型主要包括聚苯乙烯(polystyrene, PS)、聚乙烯(polyethylene, PE)、聚丙烯(polypropylene, PP)和聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)^[7-10]等,其中 PS 是检出次数最多的聚合物类型之一^[5-6,8]。随着 NPs 在海洋环境中的持续检出,其对海洋生物的潜在危害已不容忽视。

NPs 能够穿过生物屏障转移至生物体不同器官或组织中,进而引发存活、发育和繁殖能力

等方面的不利影响^[11-12]。研究表明,暴露在 5 mg/L 的 50 nm PS 溶液中 5 d 后,淡水枝角类盔型蚤(*Daphnia galeata*)体表的 PS 转移至卵巢等生殖器官中,盔型蚤的存活率和孵化率降低,胚胎发育异常^[13]。海洋桡足类日本虎斑猛水蚤(*Tigriopus japonicus*)暴露于浓度为 1.25 mg/L 的 50 nm PS 微球溶液 16 d,无节幼体发育阶段延长,存活率下降,暴露于相同浓度的 500 nm PS 后繁殖能力显著降低^[14]。海洋鱼类黑点青鳉(*Oryzias melastigma*)暴露在 55 µg/L 的 50 nm PS 微球溶液中 21 d,出现胚胎死亡率上升和仔鱼发育畸形等^[15]。由此可见,探究 NPs 对海洋生物的毒性效应对其生态风险评估具有重要意义。

由于不同形状、聚合物类型的 NPs 获取存在困难,当前 NPs 的毒理学研究主要聚焦于商品化 PS 纳米微球^[16-18]。然而,商品化纳米微球制剂的悬浮液中含有防腐剂、抗菌剂和表面活性剂等多种添加剂,在 NPs 的毒理学研究中容易被忽视^[19]。研究发现,不同尺寸(20 nm 和 200 nm)的商品化 PS 微球在浓度为 10 mg/L 时对大型蚤(*Daphnia magna*)存活的影响主要由添加剂叠氮化钠造成,与 NPs 本身无关^[20];商品化羧基修饰聚苯乙烯(carboxyl-modified polystyrene, PS-COOH)微球(26 nm, 100 mg/L)溶液对羊角月牙藻(*Raphidocelis subcapitata*)和大型蚤的毒理学

研究表明,除了叠氮化钠,添加剂中的其他表面活性剂组分(如吐温-20和十二烷基硫酸钠)也会对这两种生物产生致死效应^[21]。可见,商品化 NPs 中添加剂对水生生物的毒性效应可能会在一定程度上干扰 NPs 的毒性。

海洋桡足类是海洋浮游动物类群的重要组成部分,在海洋生态系统的能量传递和物质循环过程中起着重要的作用^[22]。日本虎斑猛水蚤作为我国近海常见的一种代表性桡足类生物^[23],具有繁殖能力强和生命周期短等特点^[23-24],近年来广泛应用于污染物的毒理学研究。除了以上提及的表面无基团修饰的商品化 PS 纳米微球,表面带有电荷的 NPs 如携带负电的 PS-COOH 微球和携带正电荷的氨基修饰聚苯乙烯(amino-modified polystyrene, PS-NH₂)微球也是近年来的研究热点^[25],二者在生物传感器、药物运输载体等方面应用广泛^[26]。与 PS-COOH 相比,PS-NH₂ 往往具有更强的毒性^[27-28]。例如,50 nm PS-NH₂ 纳米塑料能够抑制盐生杜氏藻(*Dunaliella tertiolecta*)的生长($EC_{50} = 12.97 \text{ mg/L}$),而 40 nm 的 PS-COOH 没有出现上述现象^[25]。本研究使用日本虎斑猛水蚤作为受试生物,探究商品化 PS-NH₂ 微球及其滤液对猛水蚤在存活、生长发育和繁殖等方面的毒性效应,以期科学评估纳米塑料的生态风险提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 实验仪器

体视荧光显微镜(Leica M205FA,德国);倒置荧光显微镜(Leica DMI4000B,德国);冷冻离心机(Sigma 3K-15,美国);超纯水机(Millipore Synergy-UV,美国);多参数水质检测仪(WTW Multi 3630 IDS,德国)。

1.1.2 实验试剂

非荧光 PS-NH₂(50 nm)溶液采购于美国 Bangs Laboratories,浓度为 100 g/L,生产厂家安全数据表显示,PS-NH₂ 溶液中含有吐温-20、十二烷基硫酸钠(两种成分浓度 $\leq 500 \text{ mg/L}$)和叠氮化钠(浓度 $\leq 90 \text{ mg/L}$)等添加剂。本课题组在先前研究中使用动态光散射和透射电子显微镜

对 PS-NH₂ 的形态和粒径等特性进行表征,表明 PS-NH₂ 具有球形结构,粒径为 $(50.7 \pm 0.8) \text{ nm}$,zeta 电位为 $+(24.13 \pm 0.66) \text{ mV}$ ^[29];人工海盐(珊瑚礁级)采购于中盐工程技术研究院有限公司;戊二醛溶液(25%,分析纯)采购于沈阳医药股份有限公司化玻公司。

1.2 受试生物

本研究所用受试生物为日本虎斑猛水蚤,于 2016 年 4 月引种自厦门大学海洋与地球学院近海海洋环境科学国家重点实验室。猛水蚤培养条件为:温度为 $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$,光照强度约为 5000 lux,光周期为 12/12 h,盐度为 (28.6 ± 0.2) ,pH 为 (8.083 ± 0.007) ,溶解氧浓度为 $(8.01 \pm 0.10) \text{ mg/L}$ 。以小球藻(*Chlorella vulgaris*)为饵料投喂日本虎斑猛水蚤,投喂密度为 $1 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ 。

1.3 暴露溶液制备

本研究参考荷兰瓦登海表层水体中检出的 NPs(粒径: $< 200 \text{ nm}$)浓度范围 $(2.7 \sim 6.5 \mu\text{g/L})$ ^[5],设置暴露溶液的浓度为 $5.5 \mu\text{g/L}$ 、 $55 \mu\text{g/L}$ 和 $550 \mu\text{g/L}$ 。

PS-NH₂ 暴露溶液制备:利用浓度为 100 g/L 的非荧光 PS-NH₂ 原液配制成浓度为 1.1 mg/L 、 11 mg/L 和 110 mg/L 的 PS-NH₂ 储备液(溶液介质为超纯水),在玻璃瓶中 $4 ^\circ\text{C}$ 避光保存。取一定体积的 3 种浓度 PS-NH₂ 储备液至 12 孔板中,加入过滤人工海水至 4 mL,获得浓度分别为 $5.5 \mu\text{g/L}$ 、 $55 \mu\text{g/L}$ 和 $550 \mu\text{g/L}$ 的 PS-NH₂ 暴露溶液。

PS-NH₂ 滤液暴露溶液制备:将不同浓度的 PS-NH₂ 储备液在 $4 ^\circ\text{C}$ 下 16000 g 离心 2 h。使用 $0.02 \mu\text{m}$ 的针头过滤器(AnotopTM 25, WhatmanTM,德国)过滤离心后的上清液(约占离心管的三分之二),获得 PS-NH₂ 滤液储备液,在玻璃瓶中 $4 ^\circ\text{C}$ 避光保存。取 $20 \mu\text{L}$ 3 种浓度的添加剂滤液储备液至 12 孔板中,加入过滤人工海水至 4 mL,获得浓度为 $5.5 \mu\text{g/L}$ 、 $55 \mu\text{g/L}$ 和 $550 \mu\text{g/L}$ 的 PS-NH₂ 滤液。

1.4 慢性毒性实验

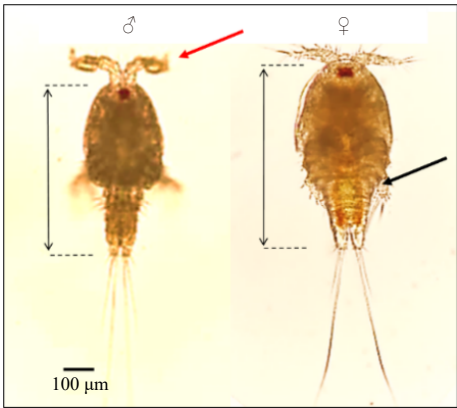
利用猛水蚤无节幼体进行慢性毒性暴露实验,同步考察 PS-NH₂ 及其滤液对猛水蚤产生的毒性影响。随机挑选无节幼体($< 24 \text{ h}$)置于 12 孔板中,以过滤人工海水为空白对照,暴露体

积和暴露溶液浓度见 1.3 节, 每孔放置 1 只猛水蚤, 每 15 只猛水蚤作为 1 个平行, 每个处理组设置 3 个平行。每天利用体视荧光显微镜观察并记录猛水蚤个体存活和发育情况。当猛水蚤发育至成体时, 记录性别比, 将雌、雄成体放置于 12 孔板中 24 h 进行交配, 每个孔中放置一对猛水蚤, 每 5 对猛水蚤作为 1 个平行。将带有卵囊的雌性个体转移至新的 12 孔板中, 以相同条件继续暴露 10 d, 每天观察并记录猛水蚤繁殖情况(产卵时间、孵化时间、孵化次数和孵化幼体数等)。若 24 h 后雌性未产生卵囊, 则重新选择雄性进行交配。慢性毒性实验在人工气候培养箱

(参数设置与猛水蚤培养时一致, 见 1.2 节)中进行, 通过多参数水质检测仪测定过滤人工海水的盐度、pH 和 DO 等水质参数, 每 48 h 更新一次暴露溶液, 并投喂密度为 1×10^7 cells/mL 的小球藻。暴露结束(第 24 d)后, 将所有存活的猛水蚤个体($13 \leq n \leq 15$)用于体长测定。使用超纯水清洗猛水蚤 3 ~ 4 次, 去除体表附着的微藻等物质, 随后转移至 1.5 mL 的离心管中, 加入 1 mL 的 2.5% 戊二醛固定液在 4 ℃ 下固定 24 h, 通过倒置荧光显微镜拍照并测定猛水蚤个体的体长。慢性毒性实验中涉及的实验终点及判断标准见表 1 和图 1。

表 1 慢性毒性实验毒性终点及判断标准
Tab.1 Toxicity endpoints and their judgment criteria of chronic toxicity test

毒性效应	毒性终点	判断标准
存活效应	存活率/(%)	停止活动, 使用吸管触碰后 15 s 内无反应, 头胸与尾部呈直角状 ^[30]
	发育时间/d	无节幼体-桡足幼体(N-C)时间: 猛水蚤发育至桡足幼体第一阶段(C1), 身体分为 5 节, 游泳速度明显加快; 无节幼体-成体(N-A)时间: 猛水蚤发育至成体, 其中雄性触角特化成执握器; 雌性能够观察到愈合的生殖节 ^[31] (图 1)
发育效应	体长/ μm	头部(不含第一触角)至尾叉(不含尾触毛)的长度(图 1)
	蜕皮次数	—
	平均蜕皮时间间隔/d	相邻两次蜕皮发生时间差的平均值
	性别比	雌性个体数量与雄性个体数量之比
繁殖效应	产卵时间/d	雌性腹部产生墨绿色卵囊的时间, 暴露实验结束时仍未产卵的个体按总暴露时间(24 d)计
	孵化时间/d	卵囊孵化出无节幼体的时间, 暴露实验结束时仍未孵化幼体的个体按总暴露时间(24 d)计
	孵化次数	—
	孵化幼体数	—



红色箭头所示雄性, 黑色箭头所示雌性成体特征

图 1 日本虎斑猛水蚤雄性成体(左)、雌性成体(右)及体长测量方法图示

Fig. 1 Characteristics of adult male (left) and female (right) of *Tigriopus japonicus* and determination of body length

1.5 数据统计与分析

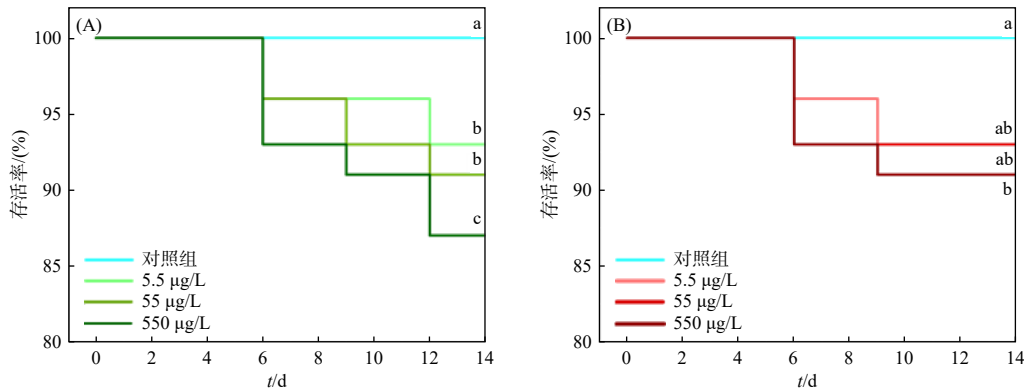
采用 SPSS 27.0 软件对数据进行统计和分析。采用 Kolmogorov-Smirnov 检验和 Levene 检验分别检验数据的正态性和方差齐性。采用皮尔逊相关系数分析各毒性效应终点与暴露浓度间的相关性。双因素方差分析用于分析实验中暴露浓度(0 $\mu\text{g/L}$ 、5.5 $\mu\text{g/L}$ 、55 $\mu\text{g/L}$ 和 550 $\mu\text{g/L}$)与污染物类型(PS-NH₂ 和 PS-NH₂ 滤液)之间的交互作用。如果存在交互作用($p < 0.05$), 采用单因素方差分析和事后多重比较(LSD)进行不同暴露浓度组间的差异显著性检验; 采用 t 检验进行不同污染物类型组间的差异显著性检验。结果以平均值 $\pm$ 标准差表示, 当 $p < 0.05$ 时认为具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 纳米塑料及其滤液对猛水蚤存活率的影响

PS-NH₂ 及其滤液各处理组均从第 6 d 出现猛水蚤个体死亡现象,暴露 14 d 后,猛水蚤的存活率明显下降,存活率与暴露溶液浓度呈显著负

相关关系 (PS-NH₂: $r = -0.932$, $p < 0.05$; PS-NH₂ 滤液: $r = -0.720$, $p < 0.05$) (图 2)。550 μg/L PS-NH₂ 处理组的 14 d 存活率 ($86.7\% \pm 0.0\%$) 显著低于相同浓度滤液处理组的存活率 ($91.1\% \pm 3.1\%$) ($p < 0.05$)。



不同字母表示各处理组之间第 14 d 的存活率存在显著差异(单因素方差分析, $p < 0.05$)

图 2 不同浓度氨基修饰聚苯乙烯纳米微球(A)及其滤液(B)对日本虎斑猛水蚤 14 d 存活率的影响

Fig. 2 Effects on the survival rate of *Tigriopus japonicus* during the 14 d exposed to amino-modified polystyrene nanospheres (A) and their filtrates (B) at various concentrations

2.2 纳米塑料及其滤液对猛水蚤生长发育的影响

2.2.1 发育时间

与对照组相比,高浓度(550 μg/L)PS-NH₂ 处理组导致猛水蚤 N-C 的发育时间延长了 (1.6 ± 0.1) d ($p < 0.05$) (图 3A),进而导致猛水蚤发育至成体的时间延长了 (1.5 ± 0.1) d ($p < 0.05$) (图 3B)。双因素方差分析结果显示,对于猛水蚤的发育时间,暴露浓度与污染物类型之间存在显著交互作用 ($p < 0.05$) (表 2)。

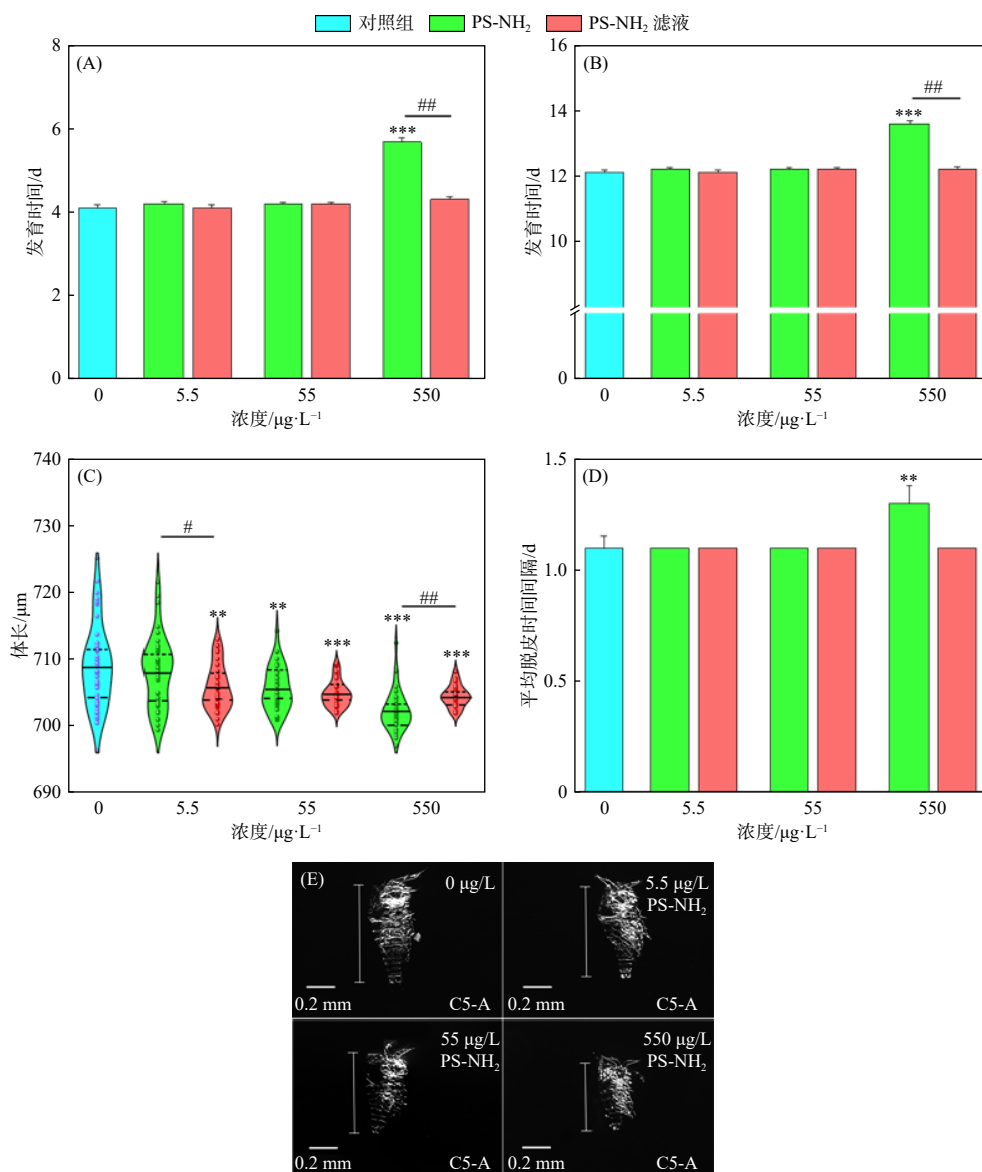
2.2.2 体长

经 24 d 暴露后,PS-NH₂ 及其滤液均对猛水蚤的体长具有抑制作用,且猛水蚤的体长与暴露溶液浓度呈显著负相关关系 (PS-NH₂: $r = -0.939$, $p < 0.05$; PS-NH₂ 滤液: $r = -0.858$, $p < 0.05$)。与对照组相比,中、高浓度(55 μg/L 和 550 μg/L)PS-NH₂ 处理组中猛水蚤的体长显著降低 ($p < 0.05$); PS-NH₂ 滤液处理组 (5.5 μg/L、55 μg/L 和 550 μg/L) 中猛水蚤的体长均显著降低 ($p < 0.05$)。此外,低浓度(5.5 μg/L)和高浓度(550 μg/L)PS-NH₂ 与对应的 PS-NH₂ 滤液处理组

对猛水蚤体长的影响也存在显著差异 ($p < 0.05$) (图 3C)。5.5 μg/L PS-NH₂ 处理组中猛水蚤平均体长 [(708.0 ± 0.4) μm] 显著高于对应的 PS-NH₂ 滤液处理组 [(705.7 ± 0.7) μm] ($p < 0.05$), 550 μg/L PS-NH₂ 处理组中猛水蚤平均体长 [(702.3 ± 0.5) μm] 显著低于对应的 PS-NH₂ 滤液处理组 [(704.4 ± 0.2) μm] ($p < 0.05$)。

2.2.3 蜕皮情况

与对照组(蜕皮次数: 11 次)相比,不同浓度的 PS-NH₂ 及其滤液对猛水蚤的蜕皮次数没有影响(均为 11 次),但影响平均蜕皮时间间隔。对照组中的平均蜕皮时间间隔为 (1.1 ± 0.04) d,高浓度(550 μg/L)PS-NH₂ 处理显著延长了猛水蚤平均蜕皮时间间隔 ($p < 0.05$),为 (1.3 ± 0.06) d,而对应的 PS-NH₂ 滤液对猛水蚤的平均蜕皮时间间隔无显著影响 ($p > 0.05$) (图 3D)。双因素方差分析结果显示,对于猛水蚤的平均蜕皮时间间隔,暴露浓度与污染物类型之间存在显著交互作用 ($p < 0.05$) (表 2)。此外,通过观察猛水蚤的蜕皮组织发现,当对照组的蜕皮组织处于桡足幼体第 5 阶段-成体阶段(C5-A)时,暴露于 550 μg/L



A: 猛水蚤从无节幼体发育至桡足幼体(N-C)发育时间, B: 猛水蚤从无节幼体发育至成体(N-A)发育时间, C: 体长, D: 平均蜕皮时间间隔, E: 蜕皮组织。C5-A 表示猛水蚤从桡足幼体第 5 阶段发育至成体, C3-C4 表示桡足幼体第 3 阶段发育至第 4 阶段。*($p < 0.05$), **($p < 0.01$)和***($p < 0.001$)表示处理组与对照组相比存在显著性差异(单因素方差分析);#($p < 0.05$)和##($p < 0.01$)表示相同浓度、不同污染物类型处理组之间各个指标存在显著差异(t -检验)

图 3 不同浓度氨基修饰聚苯乙烯纳米微球(PS-NH₂)及其滤液对日本虎斑猛水蚤生长发育的影响

Fig. 3 Effects on the growth and development of *Tigriopus japonicus* exposed to amino-modified polystyrene nanospheres (PS-NH₂) and their filtrates at various concentrations

的 PS-NH₂ 处理组中猛水蚤的蜕皮组织处于桡足幼体第 3 阶段-第 4 阶段(C3-C4)(图 3E)。

暴露浓度是影响 NPs 海洋生物毒性效应的关键因素之一。一般来讲,随着浓度的升高, NPs 对海洋生物的毒性效应增强。在本研究中,暴露于 5.5 μg/L 的 PS-NH₂ 中 14 d,猛水蚤的

发育未受到显著影响,当浓度升高至 550 μg/L 时,猛水蚤的发育时间和平均蜕皮时间间隔显著延长(图 3)。类似地,50 nm PS 微球浓度从 0.1 mg/L 升高至 1 mg/L 时,褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)的繁殖能力显著降低^[32];50 nm PS 浓度从 0.125 mg/L 升高至 1.25 mg/L

表 2 不同污染物类型(P)和暴露浓度(C)对日本虎斑猛水蚤存活、生长发育和繁殖等方面影响的双因素方差分析结果

Tab.2 Results of two-way analysis of variance on the effects of different pollutant types (P) and exposure concentrations (C) on survival, growth, development and reproduction of *Tigriopus japonicus*

影响因素	MSE	F	P	影响因素	MSE	F	P
存活率				首次产卵时间			
P	42.667	6.024	0.026 [*]	P	0.807	3.293	0.088
C	123.389	17.420	< 0.001 [*]	C	2.166	8.839	0.001 [*]
P*C	5.889	0.831	0.496	P*C	0.983	4.014	0.026 [*]
发育时间(无节幼体至桡足幼体)				首次孵化时间			
P	0.844	202.500	< 0.001 [*]	P	0.602	0.307	0.587
C	1.115	267.567	< 0.001 [*]	C	14.440	7.377	0.003 [*]
P*C	0.658	157.967	< 0.001 [*]	P*C	4.717	2.410	0.105
发育时间(无节幼体至成体)				孵化次数			
P	0.960	288.000	< 0.001 [*]	P	0.735	2.075	0.169
C	0.834	250.167	< 0.001 [*]	C	1.383	3.904	0.029 [*]
P*C	0.761	228.333	< 0.001 [*]	P*C	1.245	3.515	0.040 [*]
平均蜕皮时间间隔				每窝孵化幼体数			
P	0.010	3.125	0.096	P	69.700	4.324	0.054
C	0.027	8.125	0.002 [*]	C	306.148	18.993	< 0.001 [*]
P*C	0.012	3.458	0.041 [*]	P*C	55.940	3.471	0.041 [*]
体长				孵化幼体总数			
P	0.295	0.466	0.505	P	6970.042	1.614	0.222
C	33.355	52.754	< 0.001 [*]	C	39209.153	9.082	0.001 [*]
P*C	5.221	8.258	0.002 [*]	P*C	12152.819	2.815	0.073
性别比							
P	2.394	7.183	0.016 [*]				
C	0.139	0.417	0.743				
P*C	0.377	1.130	0.366				

注: 污染物类型为PS-NH₂和PS-NH₂滤液; 暴露浓度为0 μg/L、5.5 μg/L、55 μg/L和550 μg/L; MSE为均方误差; *表示 $p < 0.05$

时, 猛水蚤的发育时间显著延长^[14]; 50 nm PS-NH₂ 浓度从 5.5 μg/L 升高至 55 μg/L 时, 卤虫 (*Artemia parthenogenetica*) 的存活率和体长显著下降^[29]。

2.3 纳米塑料及其滤液对猛水蚤繁殖的影响

2.3.1 性别比

对照组的雌雄性别比为 1.1 : 1。与对照组相比, PS-NH₂ 及其滤液各处理组对猛水蚤的性别比无显著影响($p > 0.05$) (图 4A)。高浓度(550 μg/L) PS-NH₂ 与对应的 PS-NH₂ 滤液处理组间猛水蚤的性别比存在显著差异, PS-NH₂ 滤液处理组的性别比显著高于 PS-NH₂ 处理组($p < 0.05$),

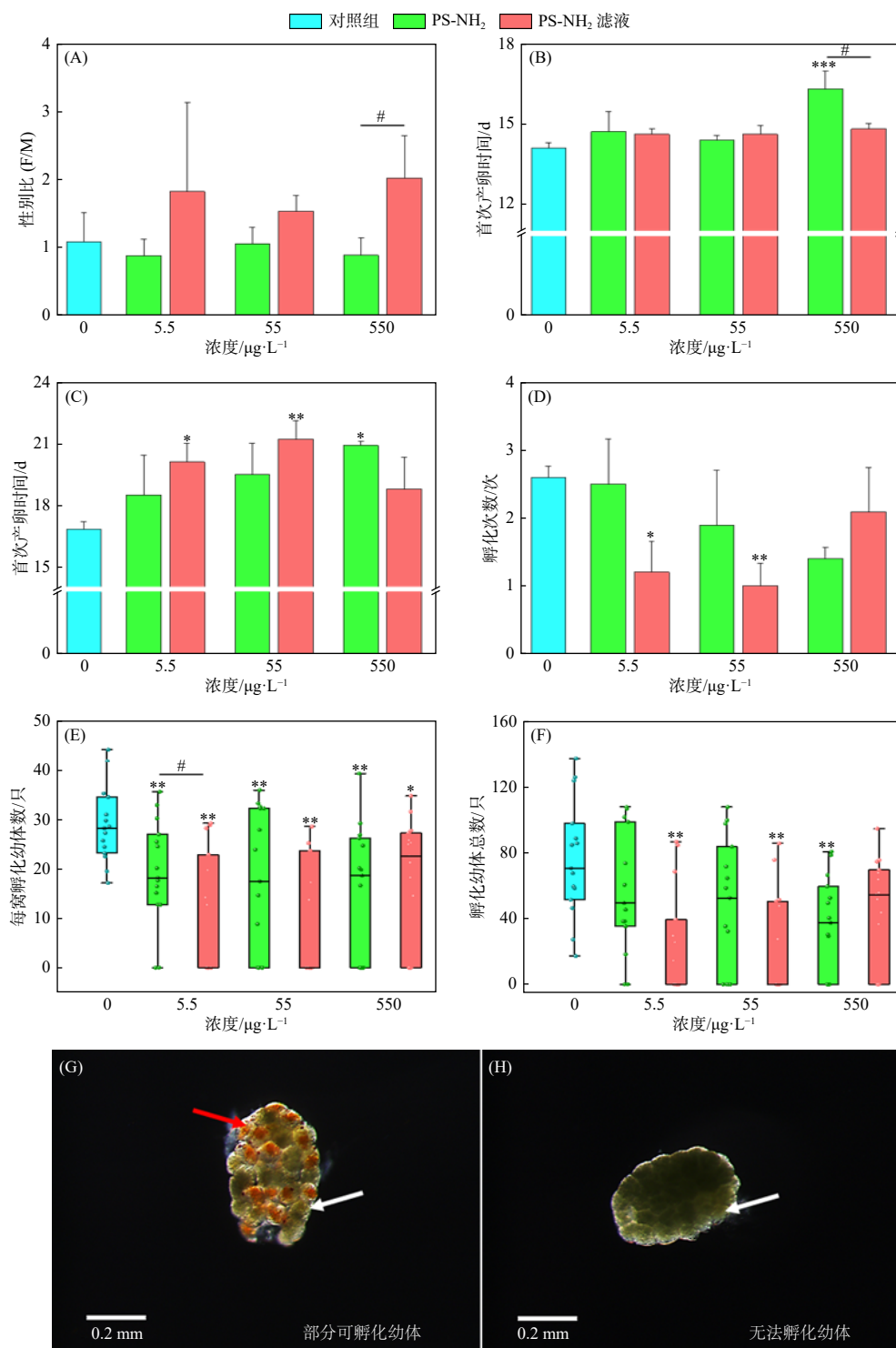
分别为 2 : 1 和 1 : 1。

2.3.2 首次产卵时间

对照组中的雌性猛水蚤首次产卵时间为 (14.1 ± 0.2) d。高浓度(550 μg/L) PS-NH₂ 处理组显著延长了猛水蚤产卵时间($p < 0.05$), 为 (16.3 ± 0.7) d (图 4B)。双因素方差分析结果显示, 对于猛水蚤的首次产卵时间, 暴露浓度和污染物类型之间存在显著交互作用($p < 0.05$) (表 2)。

2.3.3 孵化时间和孵化次数

对照组中的雌性猛水蚤的首次孵化时间的时间为 (16.8 ± 0.4) d。高浓度(550 μg/L) PS-NH₂ 和低、中浓度(5.5 μg/L 和 55 μg/L) PS-NH₂



A: 性别比, B: 首次产卵时间, C: 首次孵化时间, D: 孵化次数/10 d, E: 每窝孵化幼体数/10 d, F: 10 d 孵化幼体总数, G: 脱落的卵囊部分可孵化幼体, H: 脱落的卵囊无法孵化幼体(红色箭头所示为可孵化出幼体, 白色箭头所示为无法孵化幼体)。*($p < 0.05$), **($p < 0.01$)和***($p < 0.001$)表示处理组与对照组相比存在显著性差异(单因素方差分析); #($p < 0.05$)和##($p < 0.01$)表示相同浓度、不同污染物类型处理组间各个指标的显著差异(t -检验)

图 4 不同浓度氨基修饰聚苯乙烯纳米微球及其滤液对日本虎斑猛水蚤繁殖情况的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of amino-modified polystyrene nanospheres and their filtrates on the reproduction of *Tigriopus japonicus*

滤液显著延长了猛水蚤的首次孵化时间($p < 0.05$) (图 4C), 分别为 (20.9 ± 0.2) d、 (20.1 ± 0.9) d 和 (21.2 ± 0.9) d。由于孵化时间的延长, 与对照组相比, 低、中浓度 ($5.5 \mu\text{g/L}$ 和 $55 \mu\text{g/L}$) PS-NH₂ 滤液导致猛水蚤在 10 d 内的孵化次数分别减少了 (1.4 ± 0.4) 次和 (1.6 ± 0.5) 次($p < 0.05$) (图 4D)。双因素方差分析结果显示, 对于猛水蚤的孵化次数, 暴露浓度与污染物类型之间均存在显著的交互作用($p < 0.05$) (表 2)。

2.3.4 孵化幼体数量

对照组中每只猛水蚤的平均每窝无节幼体数量是 (28.7 ± 1.1) 只。与对照组相比, PS-NH₂ 及其滤液的各个处理均显著减少了猛水蚤每窝孵化幼体数量($p < 0.05$)。此外, 低浓度 PS-NH₂ ($5.5 \mu\text{g/L}$) 与对应的 PS-NH₂ 滤液处理组间的平均每窝无节幼体数量存在显著差异, PS-NH₂ 滤液处理组显著低于 PS-NH₂ ($p < 0.05$) (图 4E), 分别为 (10.3 ± 2.1) 只和 (19.1 ± 2.5) 只。双因素方差分析结果显示, 对于平均每窝孵化的无节幼体数量, 暴露浓度与污染物类型之间存在显著的交互作用($p < 0.05$) (表 2)。

对照组中每只猛水蚤 10 d 内平均孵化无节幼体总数为 (75.6 ± 7.2) 只, 由于孵化次数和每窝平均孵化幼体数的减少, 高浓度 ($550 \mu\text{g/L}$) PS-NH₂ 和低、中浓度 ($5.5 \mu\text{g/L}$ 和 $55 \mu\text{g/L}$) PS-NH₂ 滤液处理组孵化幼体总数与对照组相比显著降低($p < 0.05$) (图 4F), 10 d 内猛水蚤孵化幼体总数分别减少至 (34.7 ± 3.3) 只、 (23.0 ± 8.2) 只和 (22.3 ± 6.0) 只。此外, 在各个浓度的 PS-NH₂ 及其滤液处理组中发现了脱落的卵囊 (图 4G 和 H), 其中 $5.5 \mu\text{g/L}$ 、 $55 \mu\text{g/L}$ 和 $550 \mu\text{g/L}$ PS-NH₂ 处理组中无法孵化出幼体的卵囊占比分别为 10%、41.7% 和 50%, 而对应浓度的 PS-NH₂ 滤液处理组的占比高于 PS-NH₂ 处理组, 分别为 64.3%、62.5% 和 61.5%。

2.4 添加剂对纳米塑料的毒性效应影响分析

尽管商品化 NPs 已被证明能够对海洋生物产生多种毒性效应, 然而这些毒性效应是否可以直接归因于 NPs 仍受到质疑, 悬浮液中的其他组分也可能对生物产生一定影响。因此, 本研究通过离心和过滤获得 PS-NH₂ 滤液用于暴露实

验, 结果表明, 滤液能够降低猛水蚤的 14 d 存活率, 并造成雌性猛水蚤的卵囊脱落, 进而导致猛水蚤孵化幼体数量减少。与本研究结果类似, 卤虫暴露在浓度 $550 \mu\text{g/L}$ 的 $1 \mu\text{m}$ PS-NH₂ 滤液中时, 也出现了体长显著下降和发育龄期显著延迟等现象^[29]。商品化 PS 微球滤液对生物造成的毒性可能是由于其中的添加剂组分所引起的。通常而言, 滤液中含有防腐剂、抗菌剂和表面活性剂等添加剂组分, 主要成分包括吐温-20、十二烷基硫酸钠和叠氮化钠等, 这些组分能够对生物的生理生化、繁殖和生长发育等方面产生不利影响^[33-36]。例如, 十二烷基硫酸钠会通过破坏生物膜和亚细胞器, 降低某些酶的活性, 导致鱼类受精成功率降低^[33]; 吐温-20 能通过与细胞中 DNA 相互作用, 抑制细胞生长, 诱导细胞凋亡, 进而导致生物发育异常^[34]; 叠氮化钠能够造成生物体内过氧化氢酶活性和线粒体膜电位降低^[35-36], 从而影响生物的生理功能。

添加剂与微纳米塑料共存时可能存在复杂的相互作用和毒性效应, 进而对科学评价微纳米塑料的真实毒性效应造成一定干扰 (表 3)。本研究中, PS-NH₂ 滤液 (添加剂组分) 对猛水蚤存活率、体长、孵化时间和孵化幼体数量等毒性终点的影响可能与 PS-NH₂ (纳米微球与添加剂组分共存) 相似。另一项研究结果与本研究类似, 当添加剂与 PS-NH₂ 共存时, 卤虫的体长显著下降, 发育龄期延迟, 而添加剂单独存在时, 同样也会造成生长发育抑制^[29]。在本研究中, 对于发育时间、平均蜕皮时间间隔和产卵时间等毒性终点, PS-NH₂ 滤液没有产生显著的毒性效应, 而 PS-NH₂ 能够延长猛水蚤的发育时间和平均蜕皮时间间隔。类似地, 有研究指出, 当添加剂和 NPs 共存时, 黑点青鳉的存活率降低, 且肝脏组织出现炎症反应, 而当添加剂单独存在时, 黑点青鳉没有产生上述毒性效应^[15]。因此, 添加剂组分和纳米微球间可能存在复杂的相互作用模式, 在探究 NPs 对海洋生物的毒性效应时, 应关注添加剂对 NPs 自身毒性效应的贡献并尽可能消除其影响。为了阐明微纳米塑料对海洋生物的毒性作用, 已经有研究采用透析、超滤等方式对商品化微纳米塑料进行分离纯化^[37], 以达到评估微

纳米塑料毒性的目的。例如, Pikuda 等^[20] 对商品化 PS-NPs 透析 24 h, 通过去除商品制剂中的添加剂组分以评估 NPs 对大型蚤的真实毒性, 结果表明, 透析后的 PS-NPs 对大型蚤没有产生致死效应, 但能够抑制大型蚤的游泳行为; Wang 等^[38] 通过对商品化 PS 微球离心和过滤获得添加剂组

分, 并证明了添加剂组分对紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 的活性氧水平、抗氧化酶活性和免疫相关基因表达等方面未产生不良反应。因此, 后续研究将对商品化 PS-NH₂ 进行透析, 以去除添加剂的影响, 进一步探究添加剂在 PS-NH₂ 对猛水蚤毒性效应中所起的作用。

表 3 商品化微纳米塑料及其添加剂组分对水生生物毒性研究
Tab.3 Toxicity studies of commercialized micro- and nanoplastics and their additive components on aquatic organisms

塑料 粒径/nm	聚合物 类型	暴露浓度 /μg·L ⁻¹	暴露 时间/d	添加剂成分	受试生物	分离纯化 方式	添加剂对微纳米塑料 毒性的影响	参考文献
20, 200	PS	1×10 ⁴	2	叠氮化钠(2 mM)	大型蚤 (<i>Daphnia magna</i>)	透析	添加剂导致PS毒性升高, 造成大型蚤死亡	[20]
26, 100	PS-COOH	1×10 ⁵	2	吐温-20/SDS (≤ 0.5%), 叠氮化钠 (26 nm: ≤ 0.05%; 100 nm: ≤ 0.09%)	<i>D. magna</i> 羊角月牙藻 (<i>Raphidocelis subcapitata</i>)	透析	添加剂导致PS-COOH毒性升高, 造成大型蚤与月 牙藻死亡	[21]
50	PS	55	21	吐温-20/SDS (≤ 0.1%), 叠氮化钠 (≤ 0.09%)	黑点青鳉 (<i>Oryzias melastigma</i>)	离心, 过滤	添加剂未产生毒性效应, PS能够导致黑点青鳉仔 鱼存活率降低, 发育畸形 及肝脏损伤	[15]
1000	PS-NH ₂	550	14	吐温-20/SDS (≤ 0.1%), 叠氮化钠 (≤ 0.09%)	卤虫 (<i>Artemia parthenogenetica</i>)	离心, 过滤	添加剂以及PS-NH ₂ 与添 加剂共存时均能够导致 卤虫体长降低、发育龄 期延迟	[29]
1×10 ⁵	PS	5.5	4	吐温-20/SDS (≤ 0.1%), 叠氮化钠 (≤ 0.09%)	紫贻贝 (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	离心, 过滤	添加剂未产生毒性效应, PS能够导致紫贻贝消化 小管的厚度变薄, 增强活 性氧水平, 免疫、解毒相 关基因表达水平降低 对于存活率、体长、孵化 时间和孵化幼体数量等 毒性终点, 添加剂导致 PS-NH ₂ 毒性升高; 对于 发育时间、平均蜕皮时 间间隔和产卵时间等毒 性终点, 添加剂没有产生 毒性效应, 而PS-NH ₂ 则 延长了猛水蚤的发育时 间、平均蜕皮时间间隔 和产卵时间	[38]
50	PS-NH ₂	5.5 55 550	24	吐温-20/SDS (≤ 0.1%), 叠氮化钠 (≤ 0.09%)	日本虎斑猛水蚤 (<i>Tigriopus japonicus</i>)	离心, 过滤		本研究

注: SDS表示十二烷基硫酸钠

3 结论

(1)PS-NH₂ 及其滤液均能够降低猛水蚤的存活率和体长; 550 μg/L 的 PS-NH₂ 使得猛水蚤的平均蜕皮时间间隔延长至(1.3 ± 0.06) d, 发育至成体的时间较对照组延长了(1.5 ± 0.1) d, 而 PS-NH₂ 滤液未产生此类影响。

(2)PS-NH₂ 及其滤液均导致猛水蚤的孵化时间延长和孵化幼体数量减少; 与 PS-NH₂ 相比, PS-NH₂ 滤液单独暴露下的雌性猛水蚤卵囊脱落的比例更高, 5.5 μg/L PS-NH₂ 滤液导致平均每窝无节幼体数量显著低于对应浓度的 PS-NH₂ 处理组。

参考文献:

- [1] DAWSON A L, KAWAGUCHI S, KING C K, et al. Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1001.
- [2] 孙承君, 丁金凤, 高丰蕾, 等. 海洋微塑料研究挑战与展望[J]. *海洋科学进展*, 2022, 40(4): 717-724.
- [3] OLIVEIRA M, ALMEIDA M. The why and how of micro (nano)plastic research[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 114: 196-201.
- [4] 张瑾, 李丹. 环境中微/纳米塑料的污染现状、分析方法、毒性评价及健康效应研究进展[J]. *环境化学*, 2021, 40(1): 28-40.
- [5] MATERIĆ D, HOLZINGER R, NIEMANN H. Nanoplastics and ultrafine microplastic in the Dutch Wadden Sea – The hidden plastics debris?[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 846: 157371.
- [6] LI Q C, LAI Y J, LI P, et al. Evaluating the occurrence of polystyrene nanoparticles in environmental waters by agglomeration with alkylated ferroferric oxide followed by micropore membrane filtration collection and Py-GC/MS analysis[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(12): 8255-8265.
- [7] ZHAO J M, RAN W, TENG J, et al. Microplastic pollution in sediments from the Bohai Sea and the Yellow Sea, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 640/641: 637-645.
- [8] SHI C L, LIU Z Q, YU B Z, et al. Emergence of nanoplastics in the aquatic environment and possible impacts on aquatic organisms[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 906: 167404.
- [9] MATERIĆ D, KJAER H A, VALLELONGA P, et al. Nanoplastics measurements in Northern and Southern polar ice[J]. *Environmental Research*, 2022, 208: 112741.
- [10] DESFORGES J P W, GALBRAITH M, DANGERFIELD N, et al. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 79(1/2): 94-99.
- [11] SHEN M C, ZHANG Y X, ZHU Y, et al. Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: a review[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 252: 511-521.
- [12] WANG L W, WU W M, BOLAN N S, et al. Environmental fate, toxicity and risk management strategies of nanoplastics in the environment: current status and future perspectives[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401: 123415.
- [13] CUI R X, KIM S W, AN Y J. Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 12095.
- [14] LEE K W, SHIM W J, KWON O Y, et al. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(19): 11278-11283.
- [15] YU F W, JIN F, CONG Y, et al. Bisphenol A decreases the developmental toxicity and histopathological alterations caused by polystyrene nanoplastics in developing marine medaka *Oryzias melastigma*[J]. *Chemosphere*, 2023, 336: 139174.
- [16] KANG H M, BYEON E, JEONG H, et al. Different effects of nano- and microplastics on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka *Oryzias melastigma*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 405: 124207.
- [17] LINS T F, O'BRIEN A M, KOSE T, et al. Toxicity of nanoplastics to zooplankton is influenced by temperature, salinity, and natural particulate matter[J]. *Environmental Science: Nano*, 2022, 9(8): 2678-2690.
- [18] 康子歆, 林健晖, 杨涛, 等. 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(3): 362-368.
- [19] GONG H, LI R X, LI F, et al. Toxicity of nanoplastics to aquatic organisms: genotoxicity, cytotoxicity, individual level and beyond individual level[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 443: 130266.
- [20] PIKUDA O, XU E G, BERK D, et al. Toxicity assessments of micro- and nanoplastics can be confounded by preservatives in commercial formulations[J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2019, 6(1): 21-25.
- [21] HEINLAAN M, KASEMETS K, ARUOJA V, et al. Hazard evaluation of polystyrene nanoplastic with nine bioassays did not show particle-specific acute toxicity[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 707: 136073.
- [22] 王超, 朱丽岩, 卜亚谦, 等. 四溴双酚A对日本虎斑猛水蚤生殖的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2019, 49(6): 37-43.
- [23] RAISUDDIN S, KWOK K W H, LEUNG K M Y, et al. The copepod *Tigriopus*: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics[J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 83(3): 161-173.
- [24] LEE K W, RAISUDDIN S, HWANG D S, et al. Two-generation toxicity study on the copepod model species *Tigriopus japonicus*[J]. *Chemosphere*, 2008, 72(9): 1359-1365.
- [25] BERGAMI E, PUGNALINI S, VANNUCCINI M L, et al. Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 189: 159-169.
- [26] BERGAMI E, BOCCI E, VANNUCCINI M L, et al. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 123: 18-25.

- [27] MANFRA L, ROTINI A, BERGAMI E, et al. Comparative ecotoxicity of polystyrene nanoparticles in natural seawater and reconstituted seawater using the rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 145: 557-563.
- [28] BERGAMI E, MANNO C, CAPPELLO S, et al. Nanoplastics affect moulting and faecal pellet sinking in Antarctic krill (*Euphausia superba*) juveniles[J]. *Environment International*, 2020, 143: 105999.
- [29] SHEN Y, ZHANG M X, LI Z C, et al. Long-term toxicity of 50-nm and 1- μ m surface-charged polystyrene microbeads in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica* and role of food availability[J]. *Toxics*, 2023, 11(4): 356.
- [30] FINNEY C M. Salinity stress in harpacticoid copepods[J]. *Estuaries*, 1979, 2(2): 132-135.
- [31] 李连旭, 王军, 李旋, 等. 菲对日本虎斑水蚤摄食、生长发育和繁殖的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2022, 52(3): 80-87.
- [32] SHIN H, JEONG C B. Metabolism deficiency and oxidative stress induced by plastic particles in the rotifer *Brachionus plicatilis*: common and distinct phenotypic and transcriptomic responses to nano- and microplastics[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2022, 182: 113981.
- [33] ROSETY M, ORDÓÑEZ F J, ROSETY-RODRÍGUEZ M, et al. Acute toxicity of anionic surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) and linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the fertilizing capability of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm[J]. *Histology and Histopathology*, 2001, 16(3): 839-843.
- [34] ESKANDANI M, HAMISHEHKAR H, EZZATI NAZHAD DOLATABADI J. Cyto/genotoxicity study of polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20)[J]. *DNA and Cell Biology*, 2013, 32(9): 498-503.
- [35] FORTI G, GEROLA P. Inhibition of photosynthesis by azide and cyanide and the role of oxygen in photosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 1977, 59(5): 859-862.
- [36] OLAH Z, BUSH A I, ALEKSZA D, et al. Novel *in vivo* experimental viability assays with high sensitivity and throughput capacity using a bdelloid rotifer[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 144: 115-122.
- [37] FORNAGUERA C, SOLANS C. Analytical methods to characterize and purify polymeric nanoparticles[J]. *International Journal of Polymer Science*, 2018, 2018: 6387826.
- [38] WANG Y, ZHANG M X, DING G H, et al. Polystyrene microplastics alleviate adverse effects of benzo[a]pyrene on tissues and cells of the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2023, 256: 106430.

(本文编辑: 胡莹莹)