

文章编号: 1674-5566(2024)03-0572-09

DOI: 10.12024/jsou.20230304121

不同粒径微塑料对中华绒螯蟹幼蟹组织结构及肝胰腺抗氧化能力的影响

杨志刚^{1,2,3}, 张晨晨^{1,2,3}, 江青青^{1,2,3}, 陈阿琴^{1,2,3}, 成永旭^{1,2,3}, 王爱民⁴

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 4. 盐城工学院 海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 224000)

摘要: 以中华绒螯蟹为实验对象, 研究了3种不同粒径(5 μm 、1 μm 、100 nm)的聚苯乙烯(Polystyrene)微塑料颗粒对中华绒螯蟹幼蟹的毒性效应。将中华绒螯蟹幼蟹分别暴露于3种粒径的聚苯乙烯微塑料1 d、3 d、7 d后, 对其肝胰腺损伤指标: 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST); 血清免疫指标: 碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP); 氧化应激指标: 丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT); 神经毒性指标: 乙酰胆碱酯酶(AchE)进行分析。此外通过苏木精-伊红(H. E)染色法观察鳃、肝胰腺组织病变情况。研究表明, 暴露于微塑料7 d后, 100 nm组的MDA含量显著增高, CAT活性显著降低, 3个处理组的AKP活性均显著降低, 1 μm 、100 nm组的ACP活性显著降低。AST、ALT和AchE活性均随着粒径减小和暴露时间的延长活性逐渐降低。不同粒径的聚苯乙烯都能对中华绒螯蟹造成不同程度的肝胰腺损伤、使其氧化应激和免疫能力下降, 其毒性排序依次是100 nm > 1 μm > 5 μm , 说明粒径大小是影响中华绒螯蟹健康和造成组织损伤的重要因素之一。本研究结果为深入理解微塑料对淡水甲壳动物的毒性效应提供了基础数据和理论依据。

关键词: 聚苯乙烯; 中华绒螯蟹; 粒径; 综合毒性

中图分类号: S 966.16 **文献标志码:** A

近年来, 随着人口的持续增长, 全世界对塑料制品的需求急剧增加^[1]。特别是在发展中国家, 不断增长的人口、蓬勃发展的经济和迅速的城市化大大加快了塑料垃圾的产生速度。大量塑料垃圾没有及时有效地收集处理从而进入水环境, 在紫外线、温度等物理作用下发生碎裂分解, 与化学物质的接触也会造成塑料垃圾发生降解, 而部分微生物代谢物(酸、酶、色素)会引起塑料发生降解、解离, 逐渐形成越来越微小的有毒碎片和颗粒, 即形成微塑料^[2]。在海洋等环境中, 微塑料尺寸较小、比表面积大、疏水性强, 是众多疏水性有机污染物和重金属的理想载体。微塑料易被浮游生物和鱼类等误食, 能长时间滞留生物体内, 并在食物网中发生转移和富集, 对生态

环境安全构成威胁^[3]。由于其迁移特性, 微塑料可谓无处不在。根据环境监测数据显示, 从南极到北极、内陆到海洋、水体到沉积物, 皆能发现不同程度的微塑料污染^[4]。研究^[5]表明, 海洋中的微塑料的来源途径之一就是淡水河流流入海洋。因为淡水系统往往被高密度人口所包围, 密集的人为活动如污水排放等会将各种污染物, 包括微塑料排入淡水环境中, 因此淡水水域中微塑料的种类和浓度都要高于海洋环境。然而, 迄今为止, 绝大多数关于微塑料污染的研究都集中在海洋生态系统中, 自1980年至2018年, 有87%的研究都集中在海洋, 仅有13%集中在淡水^[6]。在我国的太湖^[7]、鄱阳湖^[8]、长江口^[9]、三峡库区^[10]等重要水域均检测到了微塑料的存在, 例如长江

收稿日期: 2023-03-20 修回日期: 2024-02-08

基金项目: 国家自然科学基金(32273154); 上海市自然科学基金(22ZR1427300); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-48); 上海市研究生教育学会研究课题(ShsgeG202215); 黄河三角洲人才工程(DYRC20190210)

作者简介: 杨志刚(1973—), 男, 教授, 博士, 研究方向为甲壳类动物营养调控以及环境毒理学。E-mail: zgyang@shou.edu.cn

通信作者: 陈阿琴, E-mail: aqchen@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

口区域微塑料含量达到 $(4\ 137\pm 0.167)$ 粒/ m^3 ,太湖微塑料丰度为30~50 mg/L。此外,由于发达国家工业化时间长,淡水微塑料污染更加严重,许多重要淡水水域中微塑料含量均处于较高水平^[11-12]。

研究^[13]表明,微塑料会对水生动物造成损伤,但是大多数文献探讨的更多是微塑料浓度的变化对生物机体的影响。有学者提出,微塑料粒径越小,毒性越强。这是因为微塑料颗粒的尺寸减小后,表面积与体积比值增加,从而增加了微塑料颗粒与水接触的表面积^[14],更易与重金属等毒性物质相结合。而塑料颗粒在纳米级时,其大小与病毒相当^[15],所以纳米级塑料颗粒可以毫不费力地被机体摄入,并且更容易进入生物体内循环系统,在血液中流转并在组织器官中蓄积,分布到各种细胞部位,损害细胞器或DNA并导致细胞死亡^[13],会造成肠道微生物紊乱^[16]。研究^[17]表明,粒径较小的聚苯乙烯纳米塑料暴露对轮虫的急性毒性较大,显著抑制轮虫7 d休眠卵产量,影响轮虫有性生殖。

目前微塑料污染已经引起了国内外研究者的广泛关注,但研究热点多集中于海洋微塑料及其生物学效应,微塑料在甲壳动物上的研究大部分都集中在海水中^[18],在淡水上的研究还有很多空白。因此,亟需积累更多关于微塑料对淡水甲壳动物的毒理学数据,从而进一步解析微塑料毒性作用机制,以便于更准确评价环境中微塑料的生态风险。中华绒螯蟹是中国主要淡水生态系统中分布最广泛的甲壳类动物之一,养殖范围广,数量多。中华绒螯蟹是底栖生物,被认为是地表沉积物污染的良好指标^[19]。因此本文选择中华绒螯蟹作为实验对象,选择3种不同粒径(5 μm , 1 μm , 100 nm)的聚苯乙烯微塑料颗粒,研究不同粒径的微塑料暴露对淡水甲壳动物的生物毒性效应,为深入理解微塑料的环境效应提供基础数据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用中华绒螯蟹幼蟹由上海海洋大学崇明基地提供,规格相近,体质量约10 g。选取规格整齐、体无外伤、肢体健全的幼蟹运输到上海海

洋大学实验基地,暂养于该基地内的循环水箱(长 \times 宽 \times 高=5 m \times 2.5 m \times 1.0 m)中,放置PVC管和瓦片供幼蟹栖息和隐蔽。所有幼蟹均暂养于曝气3 d以上的过滤自来水中,实验期间对循环水箱24 h连续充氧,采用自然光照和水温[温度 (18 ± 2) $^{\circ}\text{C}$; pH 7.6 ± 0.5 ;溶解氧 (6.2 ± 0.6) mg/L],暂养一周以适应环境。每天投喂商品饲料2次,每次投喂量为幼蟹体质量的1%,每天清除残余饲料和粪便,每48小时彻底换1次水。实验之前,饥饿处理幼蟹48 h以排空其消化系统。

1.2 试剂

聚苯乙烯微粒购置于阿拉丁试剂公司(Shanghai Aladdin Biochemical Technology Co., LTD)。实验中所使用的微塑料溶液均是通过向紫外消毒过的曝气水加入微塑料原液进行配制。为研究暴露于不同粒径的聚苯乙烯微粒对中华绒螯蟹幼蟹的毒性影响,本研究选用3种不同的粒径尺寸(5 μm 、1 μm 、100 nm),这3种粒径的微塑料能在水环境中被广泛检测到,并且很容易被水生生物吞食^[20]。

1.3 实验方法

将规格相近,体质量约10 g的幼蟹分别放入含有微塑料的水箱中养殖。处理组的微塑料浓度统一为40 000 $\mu\text{g/L}$,粒径分别为5 μm 、1 μm 、100 nm。浓度的选择依据ORRENIUS等^[21]和YU等^[22]的微塑料暴露研究确定,ORRENIUS等^[21]研究发现40 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度下能够激活中华绒螯蟹半胱天冬酶等基因的表达,于萍等选择了40~40 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度对中华绒螯蟹进行微塑料暴露实验^[22]。

每个浓度分别设置3个平行,每个平行组放置40只中华绒螯蟹。将中华绒螯蟹幼蟹随机放入含有微塑料的水箱中,暴露时间为7 d,暴露期每天喂食1次,喂食后及时清理未食用的饲料。每48 h更换新配制的微塑料水体。在暴露时间1 d、3 d、7 d进行解剖采样,每组随机取6只中华绒螯蟹用于收集血清,取3只中华绒螯蟹用于收集肝胰腺组织,收集后将所有样品置于液氮冷冻,随后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待后续进行生化酶活性分析(试剂盒购于南京建成生物工程研究所)。为了更清楚地观察肝胰腺和鳃组织结构的变化,进行了为期21 d的胁迫实验,解剖并取出鳃、肝胰

腺等组织分别放入10%福尔马林固定液中,将组织包埋、切片并用苏木精-伊红(H.E)染色。染色切片在显微镜下观察分析(SMZ25,尼康,东京,日本)。

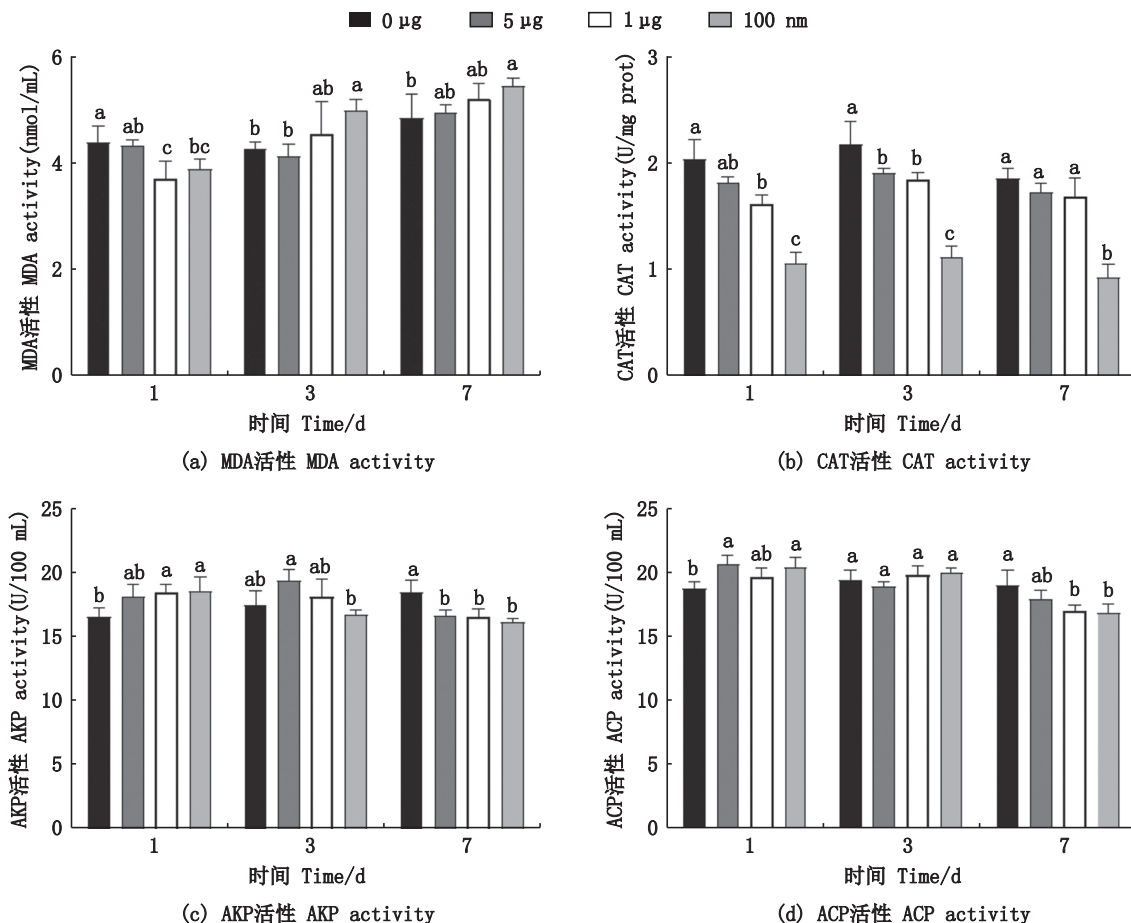
1.4 统计分析

数据采用Levene检验法检测方差齐性,利用SPSS 26对数据进行统计处理。相同时间不同粒径样本的组间差异采用单因素方差分析(One way-ANOVA)进行统计检验。实验结果以“平均值±标准误(Mean±SE, $n=3$)”表示,当 $P<0.05$ 时,认为在统计学上具有显著性。采用GraphPad Prism软件进行绘图。

2 结果

2.1 氧化应激

与对照组相比,暴露1 d后,3个处理组的MDA含量均降低,其中 $1\ \mu\text{m}$ 和 $100\ \text{nm}$ 组的MDA含量显著降低;暴露3 d和7 d后, $1\ \mu\text{m}$ 和 $100\ \text{nm}$ 组的MDA含量开始增高,且 $100\ \text{nm}$ 组的MDA含量显著增高($P<0.05$,图1a)。与对照组相比,所有微塑料处理组的CAT活性均随着粒径减小而降低,暴露1 d后, $1\ \mu\text{m}$ 和 $100\ \text{nm}$ 组的CAT活性显著降低;暴露7 d后,仅有 $100\ \text{nm}$ 组的CAT活性显著降低($P<0.05$,图1b)。



柱状图上方不同字母标注表示相同时间不同粒径下差异显著($P < 0.05$)。

Different letter marks on the top of the bar chart indicate significant difference under different particle sizes at the same time ($P < 0.05$).

图1 3种不同粒径的聚苯乙烯微塑料暴露下中华绒螯蟹的丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)活性水平

Fig. 1 Activity levels of malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), alkaline phosphatase (AKP), and acid phosphatase (ACP) of *Eriocheir sinensis* exposed to polystyrene microplastics with three different particle sizes

2.2 免疫指标

与对照组相比,暴露1 d后,3个处理组的AKP活性均升高,其中 $1\ \mu\text{m}$ 和 $100\ \text{nm}$ 组显著升

高;暴露3 d后, $5\ \mu\text{m}$ 和 $1\ \mu\text{m}$ 组的AKP活性升高, $100\ \text{nm}$ 组的活性开始降低;暴露7 d后,3个处理组的AKP活性均显著降低($P < 0.05$,图1c)。与

对照组相比,暴露 1 d 后,3 个处理组的 ACP 活性均升高,其中 5 μm 和 100 nm 组的活性显著升高;暴露 3 d 后,3 个处理组的 ACP 活性与对照组相比无显著差异;暴露 7 d 后,3 个处理组的 ACP 活性开始降低,其中 1 μm 和 100 nm 组的活性显著降低 ($P < 0.05$, 图 1d)。

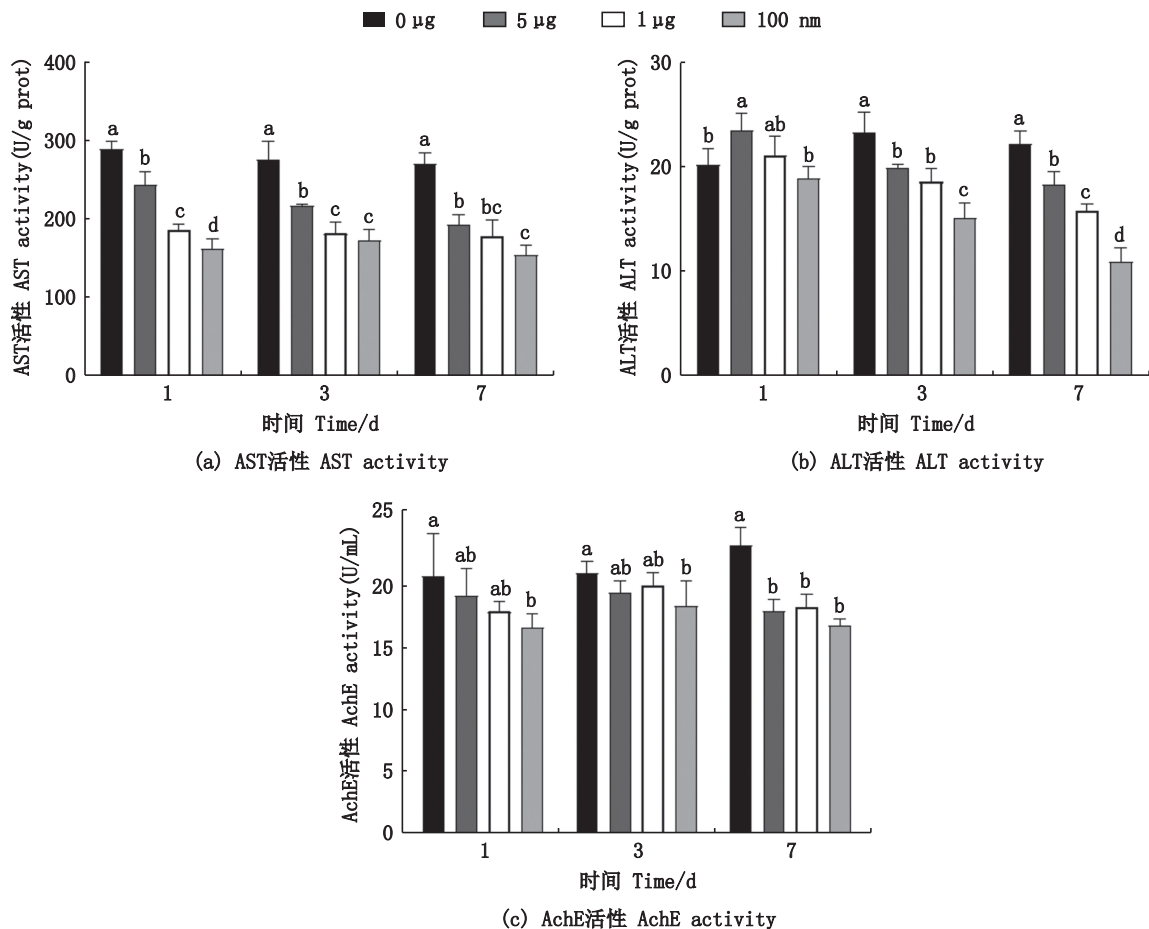
2.3 肝损伤指标

与对照组相比,所有微塑料处理组的 AST 活性均随着粒径减小而降低,且随着暴露时间的延长活性也逐渐降低 ($P < 0.05$, 图 2a)。与对照组相比,暴露 1 d 后,5 μm 组的 ALT 活性显著升高,1

μm 组的活性升高但不显著,100 nm 组的 ALT 活性开始降低;暴露 3 d 和 7 d 后,3 个微塑料处理组的活性均随着粒径的减小显著降低,且暴露时间越长,粒径越小,ALT 活性越低 ($P < 0.05$, 图 2b)。

2.4 神经毒性

在经过聚苯乙烯微粒暴露处理 1 d 和 3 d 后,与对照组相比,3 个处理组的 AchE 活性均降低,其中 100 nm 组活性降低显著;暴露 7 d 后,随着暴露时间的延长,3 个处理组的 AchE 活性均显著降低 ($P < 0.05$, 图 2c)。



柱状图上方不同字母标注表示相同时间不同粒径下差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letter marks on the top of the bar chart indicate significant difference under different particle sizes at the same time ($P < 0.05$).

图 2 3 种不同粒径的聚苯乙烯微塑料暴露下中华绒螯蟹的谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、乙酰胆碱酯酶 (AchE) 活性水平

Fig. 2 Activity levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and acetylcholinesterase (AchE) of *Eriocheir sinensis* exposed to polystyrene microplastics with three different particle sizes

2.5 不同粒径微塑料对肝胰腺、鳃组织形态的影响

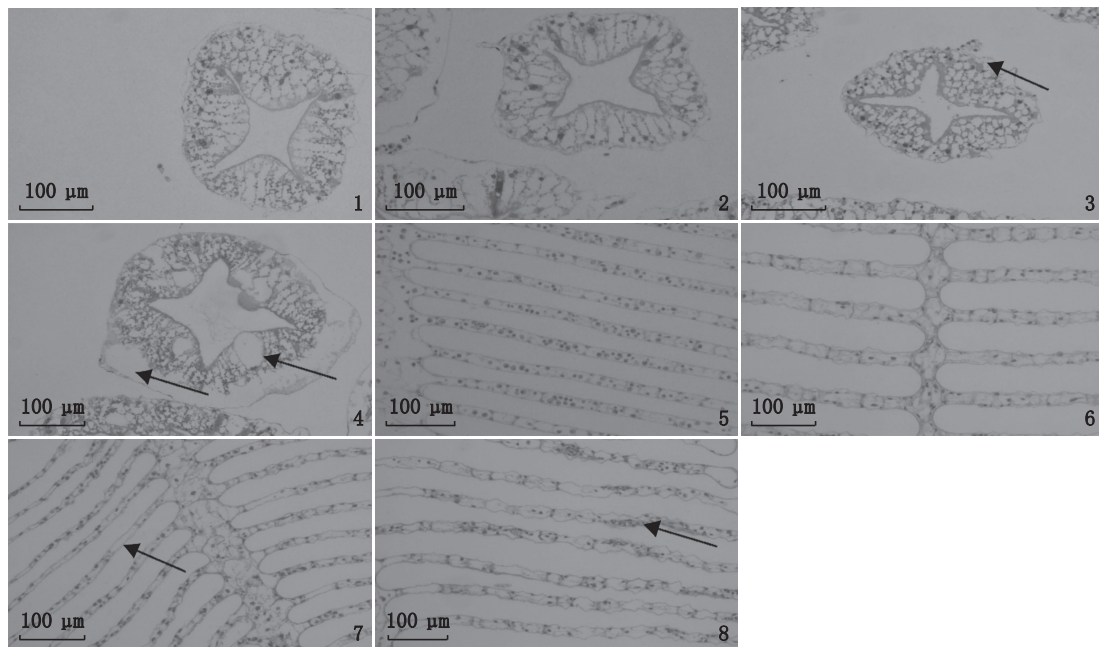
中华绒螯蟹的肝胰腺由众多分支的肝小管构成,肝小管由简单的单层柱状上皮构成,即肝

胰腺小管。在健康的肝胰腺中可见完整、光滑的上皮和结缔组织,小管基膜完整,管腔呈星形,肝细胞结构正常且分布均匀(图版-1)。5 μm 组的肝小管上皮增生,部分基膜突起,细胞核大小不

一(图版-2)。1 μm 组的肝小管血细胞增多,肝管水肿和变性。肝小管有小部分的基底膜破裂,导致细胞中的物质泄漏(图版-3)。而100 nm组内可见严重的大面积空泡化和浓缩的细胞质,细胞核固缩、破碎,细胞结构模糊(图版-4)。

中华绒螯蟹的鳃组织是由一条扁平的鳃轴和向两侧发出的很多相互平行的鳃叶组成。鳃叶由上皮层和血管组成,由外向内可见角质层、鳃腔、上皮细胞层。鳃腔中许多上皮细胞向鳃腔突起形成“隔”,并将其分成许多小通道,其中可

见胞质着色浅的细胞和游离的血细胞。5 μm 组的鳃叶角质层不再光滑,呈波状拱起,部分细胞质凝集(图版-6)。1 μm 组的鳃叶角质层上皮细胞排列不规则,上皮层填充较少,导致鳃叶变薄,鳃叶间夹杂少量杂质(图版-7)。100 nm组的幼蟹在解剖时,肉眼即可观察到其鳃丝呈现麦穗状,显微镜下鳃的组织结构显示血细胞积聚,角质层波状拱起,细胞质浓缩,部分角质层与上皮细胞层分离,形成大的空泡,且远端末端更加膨大(图版)。



1. 对照组肝胰腺结构;2. 5 μm 组肝胰腺结构;3. 1 μm 组肝胰腺结构;4. 100 nm组肝胰腺结构;5. 对照组鳃结构;6. 5 μm 组鳃结构;7. 1 μm 组鳃结构;8. 100 nm组鳃结构。

1. Hepatopancreas of the control group; 2. Hepatopancreas of the 5 μm group; 3. Hepatopancreas of the 1 μm group; 4. Hepatopancreas of the 100 nm group; 5. Gill of the control group; 6. Gill of the 5 μm group; 7. Gill of the 1 μm group; 8. Gill of the 100 nm group.

图版 三种不同粒径的聚苯乙烯微塑料暴露下中华绒螯蟹的肝胰腺和鳃组织结构变化

Plate Hepatopancreas and gill tissue structure of *Eriocheir Sinensis* exposed to polystyrene microplastics with different particle sizes

3 讨论

由于没有酶途径可以分解聚合物塑料,所以会导致微塑料在各生物体大量积累^[18],对机体造成损害,包括消化道的损伤、繁殖能力的降低、产生氧化应激和炎症反应,甚至会转移至循环系统和淋巴系统等^[23-26]。在中华绒螯蟹的生理效应研究中,AST和ALT常被用作肝损伤的指标^[27]。本研究中华绒螯蟹肝胰腺中AST和ALT活性降低,可能是微塑料损坏了肝胰腺中的细胞和相应的膜细胞器,从而抑制了肝细胞中谷氨酸和草酰乙

酸之间转化的免疫反应。本研究中也发现微塑料对AchE的抑制作用与之前研究中微塑料对贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、虾虎鱼(*Pomatoschistus microps*)的研究结果一致^[28-29]。这些结果表明,微塑料对AchE、AST和ALT活性均有抑制作用。MDA含量往往能反映生物体内脂质过氧化程度,可间接反映机体损伤程度。CAT可促进 H_2O_2 分解为分子氧和水,清除生物体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害,是重要的抗氧化应激酶,是生物机体防御体系的关键酶之一。在本研究中,3个处理组中

MDA 含量随着微塑料粒径的减小与暴露时间的延长显著升高, CAT 活性却呈相反趋势, 随着粒径的减小与暴露时间的延长显著降低, 这表明微塑料暴露对抗氧化酶活性有显著的负面影响。免疫酶活性结果显示, 暴露初期, 3 种处理均能诱导 ACP 和 AKP 活性升高, 随着暴露时间的延长, 活性开始降低, 且 100 nm 组的活性降低最为显著, 这与 LIU 等^[30]的研究结果相似, 血淋巴和肝胰腺中大多数免疫相关因子 AKP、LSZ 和 ACP 含量在微塑料暴露时间初始开始增加, 之后活性降低。微塑料的短时暴露可以促进中华绒螯蟹体内的刺激反应, 而当幼蟹长期暴露于微塑料环境中则会引起免疫酶活性抑制, 免疫酶含量降低, 无法即时应对不良环境, 恢复体内免疫平衡, 从而对幼蟹产生毒性损伤。

根据 WANG 等^[31]的研究, 微塑料会在中华绒螯蟹体内各组织器官蓄积, 其分布量: 肝胰腺 > 肠 > 鳃 > 肌肉。肝胰腺是中华绒螯蟹体内非常重要的器官, 介导各种生化成分的吸收、消化、合成和储存, 对环境污染物的解毒, 在维持生物能量稳态方面起着关键作用^[32]。由于中华绒螯蟹摄入的微塑料大多会积聚在肝胰腺, 而肝胰腺富含脂类, 而聚苯乙烯对脂类有强烈亲和力, 这些脂类很容易“溶解”微塑料^[33]。当幼蟹长期暴露于微塑料环境中, 肝胰腺会对组织中积累的微塑料作出反应, 进行防御作用, 而当肝胰腺中的微塑料浓度超过 3 mg/g 时, 防御机制就会崩溃, 导致肝胰腺损伤^[29]。相较于微米级塑料颗粒, 纳米级塑料颗粒可能会转移到肝脏^[28]和循环系统^[25], 从而导致较强的毒性, 这也与本文中 AST 和 ALT 的研究结果相似。由于神经组织富含脂质, 氧化应激的升高可以通过活性氧促进脂质过氧化, 这会导致神经膜上的信号受体受到损伤^[34], 微塑料会间接引发神经毒性, 对中枢神经系统造成影响^[35], 导致 AchE 活性降低, 这也与本文研究结果相互印证。

肝胰腺和鳃的组织学分析已被用作评估甲壳动物养殖环境压力的实用手段^[36-37]。通过观察对照组和微塑料暴露组的肝胰腺和鳃组织结构, 发现存在显著差异。高浓度的微塑料暴露会使肝胰腺细胞与基底膜分离, 诱导肝胰腺细胞肿胀和空泡化, 从而破坏肝胰腺的微观结构。鳃组织结构表现为血细胞积聚, 角质层波状拱起严重,

细胞质浓缩加重, 部分角质层与上皮细胞层分离, 形成大的空泡, 且随着粒径的减小, 损伤效果愈加明显, 这说明微塑料粒径的改变与中华绒螯蟹的组织损伤程度相关。

研究表明斑马鱼 (*Danio rerio*) 鳃内的微塑料积累量与粒径相关, 鱼鳃可滞留积累纳米级的聚苯乙烯塑料, 但不能积累亚微米和微米级的聚苯乙烯颗粒^[38]。而本研究结果表明, 3 个实验处理组中纳米级微塑料对中华绒螯蟹产生的毒性影响最强, 这与 JEONG 等^[39]在轮虫 (*Brachionus koreanus*) 中的研究结果一致, 相较于 6 μm 的颗粒, 0.05 μm 和 0.5 μm 更难排出体外, 导致较小粒径的微塑料呈现更强的毒性。根据徐雅雯等^[40]的研究, 5 μm 的聚苯乙烯微塑料可以进入斑马鱼机体内, 但无法进入细胞质中, 仅在胞外造成机械损伤, 引起细胞炎症反应, 而 0.5 μm 的微塑料颗粒会被摄入并分布在细胞胞质中, 说明微塑料的粒径会影响生物摄取和组织内微塑料颗粒的累积。但是根据巩宁等^[41]对大型溞不同粒径的生物毒性效应研究, 发现随着粒径的增大, 毒性效应反而增加, 说明不同粒径的聚苯乙烯颗粒对不同物种会产生不同的效应, 并不总是与粒径本身有关, 这表明发生了比理论上更复杂的相互作用。根据已发表的相关研究, 水环境中的微塑料对水生动物的毒性效应很复杂, 与微塑料的粒径、浓度、种类、暴露时长以及水生动物的种类都相关, 因此需要进一步地深入研究。

研究表明: (1) 3 种粒径微塑料在高浓度 40 000 $\mu\text{g/L}$ 下会引起中华绒螯蟹幼蟹氧化应激、免疫能力下降, 诱导肝损伤和神经毒性, 严重程度为 100 nm > 1 μm > 5 μm ; (2) 高浓度 40 000 $\mu\text{g/L}$ 下, 微塑料胁迫 21 d 会引起中华绒螯蟹幼蟹肝胰腺和鳃组织形态结构的损伤, 损伤程度为 100 nm > 1 μm > 5 μm 。综上所述, 根据微塑料对中华绒螯蟹幼蟹的氧化、免疫毒性和组织损伤, 对 3 种粒径微塑料的毒性做出了排序, 说明粒径大小是影响中华绒螯蟹机体生理毒性和组织损伤的重要因素之一。这项研究也为后续微塑料的对甲壳动物毒性评估和生态风险评价提供了重要的数据参考。

参考文献:

- [1] BROWNE M A, CRUMP P, NIVEN S J, et al.

- Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(21): 9175-9179.
- [2] 丁剑楠, 张闪闪, 邹华, 等. 淡水环境中微塑料的赋存、来源和生态毒理效应研究进展[J]. *生态环境学报*, 2017, 26(9): 1619-1626.
- DING J N, ZHANG S S, ZOU H, et al. Occurrence, source and ecotoxicological effect of microplastics in freshwater environment [J]. *Ecology and Environment Sciences*, 2017, 26(9): 1619-1626.
- [3] 宰德欣, 朱丽琚, 翟露, 等. 水体中塑料助剂迁移值的检测方法[J]. *环境化学*, 2014, 33(3): 524-525.
- ZAI D X, ZHU L Q, ZHAI L, et al. Test method for migration value of plastic auxiliaries in water [J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(3): 524-525.
- [4] KNEPPER T P, Martin Wagner, Scott Lambert (Eds.): Freshwater microplastics: emerging environmental contaminants? [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(25): 6337-6338.
- [5] LEBRETON L C M, VAN DER ZWET J, DAMSTEEG J W, et al. River plastic emissions to the world's oceans[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 15611.
- [6] BLETTLER M C M, ABRIAL E, KHAN F R, et al. Freshwater plastic pollution: recognizing research biases and identifying knowledge gaps [J]. *Water Research*, 2018, 143: 416-424.
- [7] SU L, XUE Y G, LI L Y, et al. Microplastics in Taihu Lake, China [J]. *Environmental Pollution*, 2016, 216: 711-719.
- [8] 简敏菲, 周隆胤, 余厚平, 等. 鄱阳湖-饶河入湖段湿地底泥中微塑料的分离及其表面形貌特征[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(2): 579-586.
- JIAN M F, ZHOU L Y, YU H P, et al. Separation and microscopic study of microplastics from the sediments of the wetland in the estuary of Raohe River of Poyang Lake [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(2): 579-586.
- [9] ZHAO S Y, ZHU L X, WANG T, et al. Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary system, China: first observations on occurrence, distribution [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 86(1/2): 562-568.
- [10] ZHANG K, CHEN X C, XIONG X, et al. The hydro-fluctuation belt of the Three Gorges Reservoir: source or sink of microplastics in the water? [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 248: 279-285.
- [11] SCHEURER M, BIGALKE M. Microplastics in Swiss floodplain soils [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(6): 3591-3598.
- [12] ERIKSEN M, MASON S, WILSON S, et al. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 77(1/2): 177-182.
- [13] PROVENZA F, PICCARDO M, TERLIZZI A, et al. Exposure to pet-made microplastics: particle size and pH effects on biomolecular responses in mussels [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 156: 111228.
- [14] JEEVANANDAM J, BARHOUM A, CHAN Y S, et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations [J]. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2018, 9: 1050-1074.
- [15] BUZEA C, PACHECO I I, ROBBIE K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity [J]. *Biointerphases*, 2007, 2(4): MR17-MR71.
- [16] GU H X, WANG S X, WANG X H, et al. Nanoplastics impair the intestinal health of the juvenile large yellow croaker *Larimichthys crocea* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 397: 122773.
- [17] 陈涛, 徐晓平, 李彬彬, 等. 聚苯乙烯微塑料和纳米塑料对芡花臂尾轮虫有性生殖的毒性影响[J]. *环境科学研究*, 2022, 35(5): 1306-1314.
- CHEN T, XU X P, LI B B, et al. Effects of polystyrene microplastics and nanoplastics on sexual reproduction of rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2022, 35(5): 1306-1314.
- [18] WADDELL E N, LASCELLES N, CONKLE J L. Microplastic contamination in Corpus Christi Bay blue crabs, *Callinectes sapidus* [J]. *Limnology and Oceanography Letters*, 2020, 5(1): 92-102.
- [19] CHENG L, CHEN Y, ZHENG Y Y, et al. Bioaccumulation of sulfadiazine and subsequent enzymatic activities in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 121(1/2): 176-182.
- [20] KANE I A, CLARE M A. Dispersion, Accumulation, and the ultimate fate of microplastics in deep-marine environments: a review and future directions [J]. *Frontiers in Earth Science*, 2019, 7: 80.
- [21] ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P. Calcium: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4(7): 552-565.
- [22] YU P, LIU Z Q, WU D L, et al. Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver [J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 200: 28-36.
- [23] YE G Z, ZHANG X, LIU X Y, et al. Polystyrene microplastics induce metabolic disturbances in marine medaka (*Oryzias melastigma*) liver [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 782: 146885.
- [24] SUN W, MENG Z Y, LI R S, et al. Joint effects of microplastic and dufulin on bioaccumulation, oxidative stress and metabolic profile of the earthworm (*Eisenia fetida*) [J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128171.

- [25] BROWNE M A, DISSANAYAKE A, GALLOWAY T S, et al. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.) [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42 (13): 5026-5031.
- [26] WRIGHT S L, KELLY F J. Plastic and human health: a micro issue? [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(12): 6634-6647.
- [27] TALESA V, CONTENTI S, PRINCIPATO G B, et al. Cholinesterases from *Maia verrucosa* and *Palinurus vulgaris*: a comparative study [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1992, 101(3): 499-503.
- [28] AVIO C G, GORBI S, MILAN M, et al. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels [J]. Environmental Pollution, 2015, 198: 211-222.
- [29] FONTE E, FERREIRA P, GUILHERMINO L. Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation [J]. Aquatic Toxicology, 2016, 180: 173-185.
- [30] LIU Z Q, YU P, CAI M Q, et al. Effects of microplastics on the innate immunity and intestinal microflora of juvenile *Eriocheir sinensis* [J]. Science of the Total Environment, 2019, 685: 836-846.
- [31] WANG T, HU M H, XU G E, et al. Microplastic accumulation via trophic transfer: can a predatory crab counter the adverse effects of microplastics by body defence? [J]. Science of the Total Environment, 2021, 754: 142099.
- [32] PURUSHOTHAM A, SCHUG T T, XU Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation [J]. Cell Metabolism, 2009, 9(4): 327-338.
- [33] ROSSI G, BARNOUD J, MONTICELLI L. Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes [J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2014, 5(1): 241-246.
- [34] GADOTH N, GÖBEL H H. Oxidative stress and free radical damage in neurology [M]. Totowa: Humana Press, 2011: 19-27.
- [35] MATTSSON K, JOHNSON E V, MALMENDAL A, et al. Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11452.
- [36] ABOL-MUNAFI A B, IKHWANUDDIN M, AZRA M N. Effects of temperature on the whole body fatty acid composition and histological changes of the gills in blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus* [J]. Aquaculture Reports, 2020, 16: 100270.
- [37] ZHANG C Y, CHI C, LIU J D, et al. Protective effects of dietary arginine against oxidative damage and hepatopancreas immune responses induced by T-2 toxin in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 104: 447-456.
- [38] 蔡亚云, 赵佳玥, 李文锋, 等. 不同粒径塑料微颗粒在斑马鱼腮组织中的积累及其对毒性的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(6): 1154-1158.
- CAI Y Y, ZHAO J Y, LI W F, et al. Retention of polystyrene particles of different sizes in zebrafish gills and their effect on toxicity of anthracene to gill cells [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2017, 23(6): 1154-1158.
- [39] 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.
- [40] 徐雅雯, 朱军, 胡堇叶, 等. 不同粒径聚苯乙烯微塑料和苯并(a)芘联合暴露影响炎症因子的表达 [J]. 科学通报, 2020, 65(36): 4281-4290.
- XU Y W, ZHU J, HU J Y, et al. Co-exposure to different sized polystyrene microplastics and benzo [a] pyrene affected inflammation in zebrafish and bronchial-associated cells [J]. Chinese Science Bulletin, 2020, 65(36): 4281-4290.
- [41] 巩宁, 韩旭, 李佳璠, 等. 不同粒径聚乙烯微粒对大型溞的生物毒性效应 [J]. 海洋环境科学, 2020, 39(2): 169-176.
- GONG N, HAN X, LI J F, et al. Toxic effects of different particle size polyethylene microbeads on *Daphnia magna* [J]. Marine Environmental Science, 2020, 39(2): 169-176.

Toxic effects of different particle size polystyrene microbeads on juvenile *Eriocheir sinensis*

YANG Zhigang^{1,2,3}, ZHANG Chenchen^{1,2,3}, JIANG Qingqing^{1,2,3}, CHEN Aqin^{1,2,3}, CHENG Yongxu^{1,2,3}, WANG Aimin⁴

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. College of Marine and Bioengineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224000, Jiangsu, China)

Abstract: Studies on the biological effects of microplastics pollution on aquatic animals mostly focused on the ocean, but the potential effects on freshwater organisms are less known. In this study, the effects of polystyrene (PS) particles with different particle sizes (5 μm , 1 μm , 100 nm) on juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) were investigated. Hepatopancreas injury index: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST); serum immune index: alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP); Oxidative stress index: malondialdehyde (MDA), catalase (CAT); and neurotoxicity index: acetylcholinesterase (AChE) were analyzed. The pathological changes of gills and hepatopancreas were analyzed by hematoxylin-eosin (H. E) staining. The results showed that exposure to microplastics after 7 d, 100 nm group had significantly higher MDA content, CAT activity decreased significantly, the AKP activity of three treatment group were significantly lower, and 1 μm and 100 nm group of ACP activity was significantly reduced. The activities of AST, ALT and AChE gradually decreased with the decrease of particle size and the extension of exposure time. In conclusion, microplastics with different particle sizes caused varying degrees of hepatopancreas injury, oxidative stress and reduced immune capacity in crabs. The toxicity level was ranked as follows: 100 nm > 1 μm > 5 μm , indicating that the particle size was one of the most important factors affecting the health of Chinese mitten crabs. This study provides basic data and theoretical basis for further understanding the toxic effects of microplastics on freshwater crustaceans.

Key words: polystyrene; *Eriocheir sinensis*; particle size; comprehensive toxicity