

微塑料对牟氏角毛藻的毒理效应

苏园园, 祁怀源, 丰洁, 吴少妹, 符月, 彭丽成

(海南大学生态与环境学院, 海南海口 570228)

摘要: 本文选取聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 和聚苯乙烯 (PS) 微粒作为目标污染物, 探讨其不同浓度 (50 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L) 和不同粒径 (100 μm 、175 μm 和 250 μm) 对受试生物牟氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*) 的影响。结果表明, 3 种粒径和浓度的微塑料 (PET 和 PS) 均对微藻细胞密度产生抑制作用, PET (100 μm , 200 mg/L) 和 PS (100 μm , 200 mg/L) 对微藻产生的最大抑制率分别为 37.3% 和 32.5%。微塑料浓度越大, 对藻细胞密度的抑制作用越强; 而粒径变化对藻细胞密度的抑制作用未呈现明显规律。PET 对牟氏角毛藻细胞干重的影响较小, 与对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$), PS 则对牟氏角毛藻细胞干重无影响。微塑料对牟氏角毛藻叶绿素 *a* (Chl *a*) 的抑制作用与其类型和暴露时间有关。PET 对 Chl *a* 起抑制作用, PS 则起促进作用。

关键词: 微塑料; 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET); 聚苯乙烯 (PS); 牟氏角毛藻; 毒理效应
中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2022)02-0193-07

Toxicological effects of microplastics on *Chaetoceros muelleri*

SU Yuan-yuan, QI Huai-yuan, FENG Jie, WU Shao-mei, FU Yue, PENG Li-cheng
(College of Ecology and Environment, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In this study, micro-sized particles polyethylene terephthalate (PET) and polystyrene (PS) were selected as the targeted pollutants, and the effects of PET and PS at different concentrations (50 mg/L, 100 mg/L and 200 mg/L) and particle size (100 μm , 175 μm and 250 μm) on the growth of microalgae *Chaetoceros muelleri* were investigated. The results showed that three particle sizes and concentrations of microplastics (PET and PS) all had inhibitory effects on the cell density of microalgae. The maximum growth inhibition ratio (IR) reached up to 37.3% and 32.5%, respectively, when the microplastics are at the concentration of 200 mg/L and the size of 100 μm . The inhibitory effect of microplastics to *C. muelleri* increased with the concentration of PET and PS, but no obvious effect caused by the particle size. As compared with the control group, PET slightly inhibited ($P>0.05$) the dry cell weight of *C. muelleri*, while PS had no inhibition on the cells. The inhibitory effect of microplastics on chlorophyll *a* (Chl *a*) is related to the type of microplastic and the length of exposure time. The PET inhibited while PS promoted the Chl *a* content of *C. muelleri* under the investigated conditions.

Key words: microplastics; polystyrene (PS); polyethylene terephthalate (PET); *Chaetoceros muelleri*; toxicological effects

收稿日期: 2020-08-04, 修订日期: 2020-12-28

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (2019RC043); 国家自然科学基金资助项目 (41766003); 海南大学 D 类人才科研启动经费资助项目 [kyqd(zr)1719]

作者简介: 苏园园 (1997-), 女, 湖南娄底人, 硕士, 从事微塑料污染研究, E-mail: suyuan815@163.com

通讯作者: 彭丽成 (1985-), 女, 湖南邵阳人, 教授, 从事微藻资源利用、微塑料污染等研究, E-mail: lcpeng@hainanu.edu.cn

塑料因性能优良、价格低廉在现代生活中被广泛应用。据统计,2016年全球塑料产量高达3.35亿吨^[1],大量塑料垃圾最终以碎片或颗粒形式进入环境。据估算,全球每年约有4.8~1270万吨塑料垃圾倾入海洋,海洋中已有约1.5亿吨塑料^[2]。这些塑料垃圾在物理、化学和生物等作用下被分解成微米级甚至纳米级的颗粒,其中,尺寸小于5 mm的被定义为微塑料^[3]。

微塑料广泛分布于水生生态系统的表面、水体和沉积物中,是微藻和其他微生物的理想栖息地,表面易形成生物膜^[4]。因而,微塑料可能被浮游动物误食,并进一步被其他大型动物摄取,从而通过食物链富集,最终威胁人类健康^[5]。

目前,关于微塑料对水生生物的毒理效应研究大多集中于水生动物,针对生态系统的初级生产者——微藻的研究相对较少^[6]。微藻对环境危害敏感,是水生生态系统稳定性的关键指标,约占海洋生物的40%^[7]。相关研究表明,微塑料可对微藻产生毒性作用,如抑制细胞生长、破坏细胞膜结构、降低叶绿素含量和光合效率、导致细胞氧化损伤等^[8]。例如,Li等人^[9]发现聚苯乙烯 PS(300~600 nm)对莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的生长抑制率最高可达45.8%,并降低了叶绿素 a(Chl a)的荧光产量和光合作用活性。另外,Canniff和Hoang^[10]研究发现塑料微珠(聚乙烯 PE, 63~75 μm)可以促进绿藻(*Raphidocelis subcapitata*)生长;而Lagared等人^[11]发现微塑料(高密度聚乙烯 HDPE, >400 μm, 1 g/L)对莱茵衣藻生长无直接影响。因此,微塑料对不同藻种的影响存在一定的差异性,微塑料对微藻的毒理效应仍需进一步研究。

牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)属于耐高温藻种,常见于沿岸半咸水区域,为海南常见硅藻之一。硅藻占地球总初级生产力的20%,是水体中硅生物地球化学循环过程的关键生物因子^[12]。为进一步了解海南环岛海域常见微塑料的生态毒理效应,本研究选取牟氏角毛藻作为受试生物,选取不同粒径(100 μm、175 μm和250 μm)、不同浓度(50 mg/L、100 mg/L和200 mg/L)的微米级塑料(聚对苯二甲酸乙二酯 PET和聚苯乙烯微塑料 PS)作为目标污染物,研究了微塑料对

藻细胞密度、生长抑制率、藻细胞干重(DCW)和Chl a的影响,研究结果可为深入探究微塑料污染对微藻的毒理效应提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

上述3种粒径的PS和PET通过使用液氮进行低温研磨处理(万能高速粉碎机,DFY-1000C,上海四瑞仪器有限公司),并采用不同尺寸的标准筛(50 μm、150 μm、200 μm和300 μm)进行分离所得,微塑料平均粒径分别为100 μm(50~150 μm)、175 μm(150~200 μm)和250 μm(200~300 μm)。

1.2 受试生物与培养

牟氏角毛藻由海南大学海洋学院藻种中心实验室提供,采用f/2培养基进行培养。使用高压灭菌锅(立式高压蒸汽灭菌锅,LDZM-60L-II,上海申安医疗器械厂)对培养基进行灭菌处理,在121℃下灭菌30 min,冷却至室温后进行接种。微藻接种至三角瓶后,将其置于光照培养箱(Blue pard,上海一恒科学仪器有限公司)中培养,培养温度为(25±1)℃,光照强度为5000 lx,光暗周期为12 h : 12 h。

1.3 暴露试验

根据Sjollema等人^[13]的研究可知,微塑料(PS, 0.05 μm)的暴露浓度为250 mg/L时,对杜氏盐藻(*Dunaliella tertiolecta*)的生长抑制作用较大。基于以上研究背景,本研究将微塑料暴露浓度梯度设置为50 mg/L、100 mg/L和200 mg/L。

分别称取0.006 g、0.012 g和0.024 g的PS(100 μm、175 μm和250 μm)、PET(100 μm、175 μm和250 μm)置于装有120 mL f/2培养基的三角瓶中,超声处理直至微塑料分布均匀,获得50 mg/L、100 mg/L和200 mg/L的微塑料暴露溶液。随后将培养至对数生长期的牟氏角毛藻接种至上述溶液中,使初始藻细胞密度保持 1×10^5 cells/mL,振荡摇匀后置于光照培养箱中培养,为防止藻细胞和微塑料发生沉淀,每天定时摇晃4次,试验设置3个平行。

1.4 藻细胞密度和生长抑制率的测定

在试验进行的第1 d、3 d、5 d、7 d、9 d和

11 d 进行取样, 藻细胞密度通过在光学显微镜 (OLYMPUS, DP71) 下使用血球计数板读数获取。根据以下公式计算牟氏角毛藻生长抑制率:

$$I_{gi} = \frac{C_{ci} - C_{ei}}{C_{ci}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: I_{gi} 表示牟氏角毛藻的生长抑制率; C_{ci} 和 C_{ei} 分别为对照组和处理组的微藻细胞密度。

1.5 DCW 的测定

为确定牟氏角毛藻光密度值与藻细胞干重之间的关系, 配制不同细胞浓度梯度的藻液, 使用可见分光光度计 (723N, 上海菁华科技仪器有限公司) 在 680 nm 波长下分别测定其吸光度。随后, 取该浓度梯度的不同藻液各 20 mL 置于离心管中, 使用台式高速冷冻离心机 (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) 以 5000 r/min 的速度离心 15 min, 弃去上清液, 将藻液沉淀物置于 120 °C 烘箱中烘干至恒重。藻液光密度值与藻细胞干重的线性关系用公式(2)构建:

$$DCW(\text{mg/L}) = 987.33 \times A_{680} - 23.919 (R^2 = 0.9890) \quad (2)$$

式中: DCW 表示藻液的细胞干重; A_{680} 为藻液在波长 680 nm 下测定的吸光度值。

在试验进行的第 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d, 分别从每个培养基中取出 4 mL 藻液, 在 680 nm 下测定其吸光度, 根据以上公式计算藻细胞干重。

1.6 叶绿素 a 的测定

采用 Lichtenthaler^[14] 的方法测量微藻 Chl a 的含量。在试验进行的第 5 d、7 d、9 d 和 11 d, 分别从每个培养基中取 2~4 mL 藻液 (包含 1~6 mg DCW), 以 10000 r/min 的速度离心 5 min, 弃去上清液, 再加入 2 mL 甲醇, 在 4 °C 下冷藏过夜。12 h 后, 将溶液继续以 10000 r/min 的速度离心 5 min, 取上清液于波长 665.2 nm 和 652.4 nm 下测定其吸光度, 根据以下公式计算 Chl a 含量:

$$\text{Chl } a(\text{mg/g}) = \frac{(16.72 \times A_{665.2} - 9.16 \times A_{652.4}) \times \text{稀释倍数}}{DCW} \quad (3)$$

式中: Chl a 表示藻液的叶绿素 a 的含量; $A_{665.2}$ 和 $A_{652.4}$ 分别为藻液在波长 665.2 nm 和 652.4 nm 下测定的吸光度值; DCW 为藻液的细胞干重。

1.7 统计分析

数据采用 Excel 2010 和 Origin 2018 处理并作图, 使用 SPSS 23.0 进行单因素方差 (ANOVA) 统计分析来检验不同处理之间的差异是否显著。试验结果以平均值±标准偏差表示。不同处理间标注不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

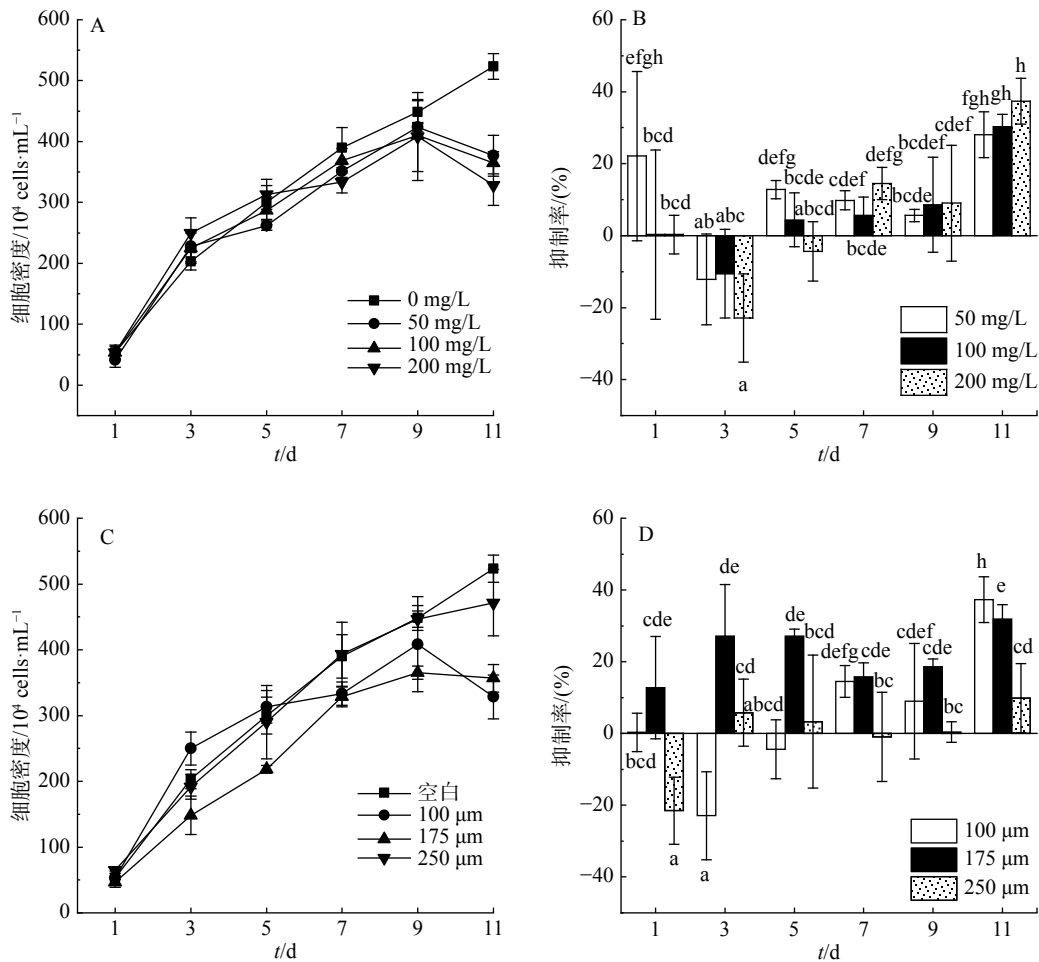
2 结果与讨论

2.1 微塑料对牟氏角毛藻细胞密度的影响

如图 1 和图 2 所示, 对照组藻细胞密度随暴露时间的增加而逐渐增加; 处理组大多在第 9 d 达到峰值 (最高可达 4.47×10^6 cells/mL), 而在第 9 d 后呈下降趋势。暴露于 PET (200 mg/L, 100 μm) 和 PS (200 mg/L, 100 μm) 时, 牟氏角毛藻的最大生长抑制率分别为 37.3% 和 32.5%。不同粒径和浓度的 PET 均对藻细胞密度产生抑制作用; 而 PS 则在暴露初期对藻细胞密度起促进作用, 暴露后期则起抑制作用, 且浓度越大, 抑制作用越强。这可能是因为微藻生长初期细胞数量较少, 培养基中营养物质充足, 可供藻细胞快速生长。此外, 研究表明, 微塑料也可为微藻生长提供有机碳源^[10], 从而激发微藻的生长活性, 这可能解释了本研究中暴露初期 PS 促进藻细胞生长的现象。

总体而言, 微塑料浓度越高, 牟氏角毛藻细胞密度越低。高浓度的微塑料对牟氏角毛藻细胞密度的抑制作用显著 ($P < 0.05$)。这与前人的研究结果相似, 例如, Zhao 等人^[15] 发现, PVC 浓度 (1 μm) 越高, 接触时间越长, 对米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 的抑制作用越强。由此可见, 微塑料的致毒机理与其浓度密切相关。另外, 牟氏角毛藻细胞 (纵轴为 5~9.8 μm , 横轴为 4.2~5.6 μm)^[16] 尺寸小于微塑料, 易附着在微塑料表面形成异质聚集。因此, 微塑料粗糙的表面可能对藻细胞产生机械损伤, 破坏其细胞结构, 并限制藻细胞对光的吸收利用^[6]。而微塑料浓度的增加可能使其遮光效应及藻细胞所受机械损伤增强, 导致对藻细胞密度的抑制作用更显著。

除浓度外, 微塑料粒径也是影响藻细胞生长的因素之一。例如, Sjollem 等人^[13] 发现, PS (0.05 μm 、0.5 μm 和 6 μm , 250 mg/L) 可抑制杜氏



(A, B: 100 μm PET 暴露组; C, D: 200 mg/L PET 暴露组)

图 1 不同粒径和浓度的 PET 对牟氏角毛藻细胞密度和生长抑制率的影响

Fig. 1 Effects of PET at different particle size and concentration on the cell density and growth inhibition rate of *C. muelleri*

盐藻的生长,且粒径越小对微藻的抑制作用越强。但本研究中,PET对藻细胞密度的抑制作用直至暴露后期才呈现出随粒径减小而增强的现象,而PS则在暴露期内对藻细胞密度的抑制作用无明显规律。造成两种微塑料试验结果存在差异的原因可能与所用的微塑料类型、粒径范围及藻种有关。

与PS相比,PET对藻细胞密度的抑制作用更强,说明微塑料的类型也是影响微藻生长的关键因素之一。例如,Lagarde等人^[11]发现聚丙烯可抑制莱茵衣藻生长,但高密度聚乙烯却对其生长无影响。此外,微塑料对微藻细胞生长的影响可能与微塑料表面所带电荷有关,微藻细胞壁内的阴离子(如羧基和硫酸根基团等)可通过静电相互作用、氢键作用和疏水性作用排斥带负电

荷的微塑料。另外,微藻表面形态的改变可能使其更易吸附带正电荷的微塑料^[17]。因此,在后续研究中还需进一步探明微塑料的表面性质对微藻的影响。

2.2 微塑料对牟氏角毛藻细胞干重的影响

藻细胞干重是评价微藻的生物量和生产力的重要指标,如图3所示,藻细胞干重随着PET暴露时间的增加而增加,但均低于对照组,说明PET对藻细胞干重起抑制作用。此外,当PET粒径为250 μm时,微塑料对藻细胞干重抑制作用最小;而当PET粒径为100 μm时,对藻细胞干重抑制作用最大。这表明微塑料粒径越小对藻细胞生长的抑制作用越大。一方面,小粒径的微塑料比表面积大,吸附性能更强;另一方面,牟氏角毛藻细胞表面粗糙且具有鞭毛结构^[18],为与

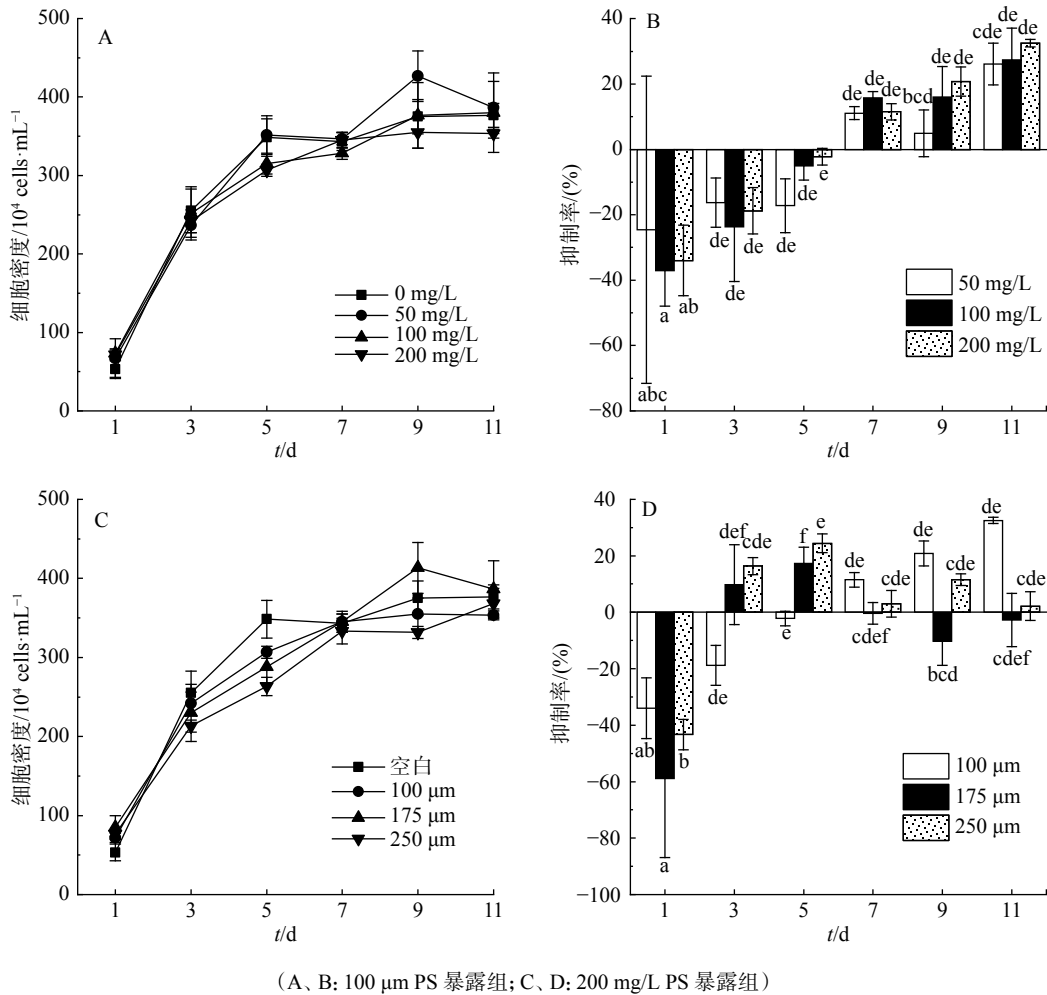


图 2 不同粒径和浓度的 PS 微粒对牟氏角毛藻细胞密度和生长抑制率的影响

Fig. 2 Effects of PS at different particle size and concentration on the cell density and growth inhibition rate of *C. muelleri*

微塑料团聚提供了大量结合点。当微塑料表面的某些带电官能团与藻细胞结合,则可能堵塞细胞物质进出通道,限制藻细胞与胞外环境进行营养物质、气体和光能的传递^[9],甚至会阻碍细胞内部有害物质的排出,导致藻细胞死亡,从而抑制藻细胞的生长^[6]。

而当暴露于 PS 时,暴露初期 PS 对藻细胞生长起促进作用,暴露后期对藻细胞干重无影响。这是因为当微藻暴露于污染物时,外界胁迫可能促使藻细胞体积变大^[20],因而藻细胞干重无明显变化。另外,有研究表明,某些微藻在稳定生长期可能通过分泌可溶性蛋白质并增厚细胞壁来减缓微塑料对细胞内、外渗透压的影响,以此适应微塑料的存在^[6]。例如,当莱茵衣藻暴露于微塑料(PS)时,可溶性蛋白质的含量增加改善了细

胞的保水能力,从而减少细胞重要物质的流失,缓解微塑料对藻细胞干重的抑制作用^[9]。

综上所述,本文所采用的两种微塑料对藻细胞干重的影响存在差异性,PET 的抑制作用大于 PS,该差异可能与两种塑料的表面结构、添加剂及其释放的有机物含量等因素有关^[10]。另一方面,该结果也表明微藻对 PS 的耐受程度更高。

2.3 微塑料对牟氏角毛藻 Chl *a* 含量的影响

Chl *a* 是藻细胞进行光合作用的主要色素。如图 4 所示,在微塑料暴露前期和中期,不同粒径和浓度的 PET 对牟氏角毛藻 Chl *a* 影响均较小。但在暴露后期,与对照组(1.0372 mg/g)相比,牟氏角毛藻的 Chl *a* 含量显著降低($P < 0.05$),最低值仅为 0.0565 mg/g。而 PS 对牟氏角毛藻 Chl *a* 的影响则表现为先抑制后促进,且 PS 粒径

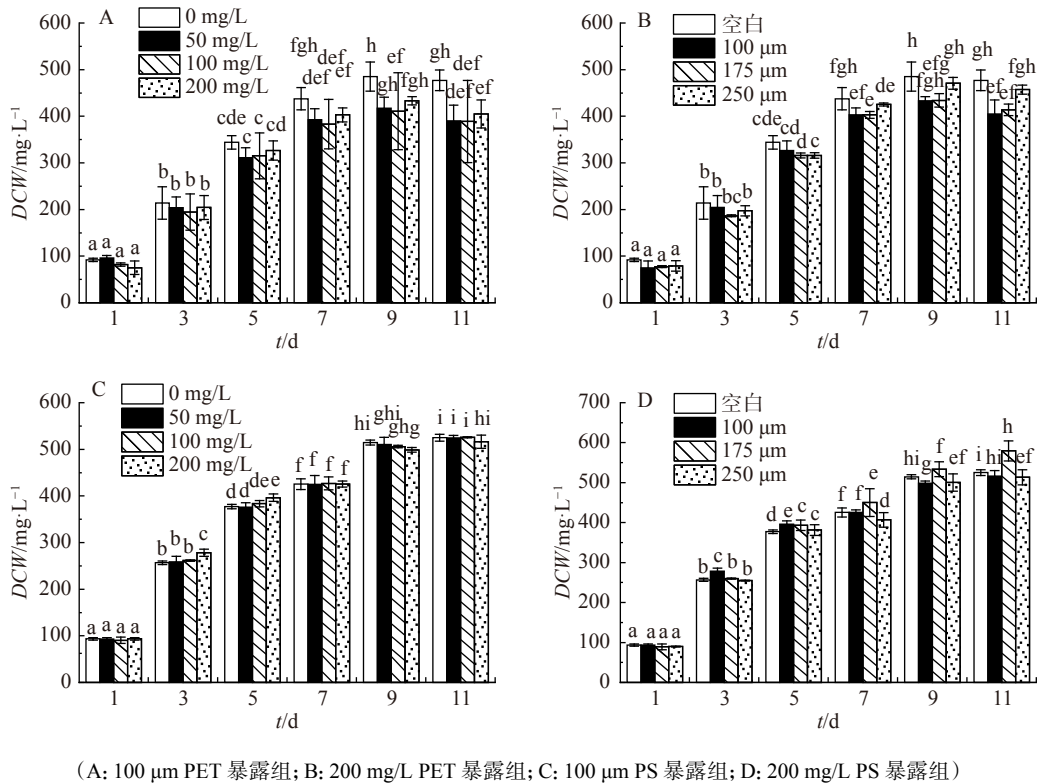


图 3 不同粒径和浓度的 PET 和 PS 对牟氏角毛藻细胞干重的影响

Fig. 3 Effects of PET and PS at different particle size and concentration on the dry weight of *C. muelleri*

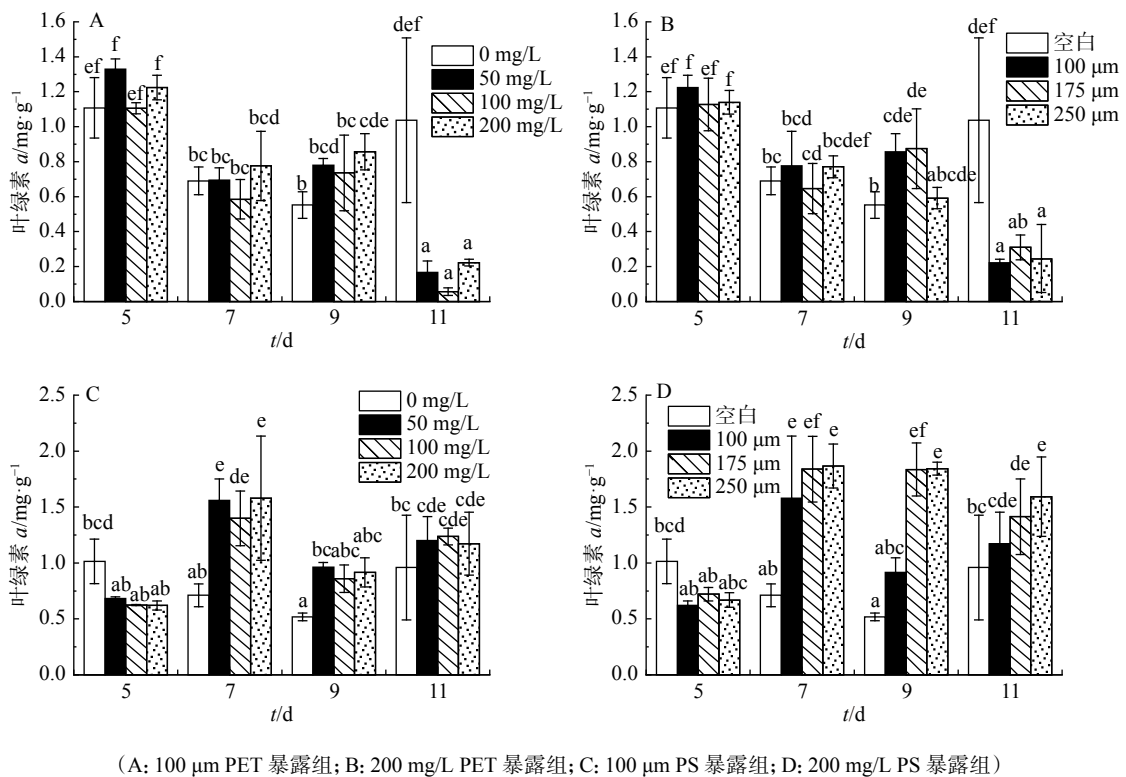


图 4 不同粒径和浓度的 PET 和 PS 对牟氏角毛藻 Chl a 的影响

Fig. 4 Effects of PET and PS at different particle size and concentration on Chl a of *C. muelleri*

越小,对 Chl *a* 的促进作用也越小。原因可能是粒径小的微塑料比表面积更大,且易于稳定而均匀地分布于培养基中,产生较大的接触面积,将藻细胞吸附在表面并嵌入其中,干扰藻细胞生长^[16],从而降低了对微藻 Chl *a* 的促进作用。

本研究中,牟氏角毛藻 Chl *a* 受外源微塑料粒径和浓度变化的影响较小。相比而言,微塑料对牟氏角毛藻 Chl *a* 的影响与微塑料类型和暴露时间有关,PET 对 Chl *a* 产生抑制作用,而 PS 则起促进作用,暴露于 PS 的牟氏角毛藻 Chl *a* 含量更高。该差异可能与二者的透光性有关,PET 的透光性略低于 PS^[21]。因而,PET 对微藻产生的遮光效应可能更大,从而抑制光合色素的积累。此外,PET 对牟氏角毛藻细胞密度和细胞干重的抑制作用均大于 PS,这表明 PET 对微藻生长的抑制作用更强,进而可能影响藻细胞光合色素含量。此外,微塑料类型不同也可能导致藻类基因表达的差异,影响微藻生长和代谢^[22]。后续研究可从细胞水平及代谢角度进一步探讨微塑料对微藻的毒性机理。

3 结论

(1)PET 和 PS 对牟氏角毛藻细胞密度均产生抑制作用,且浓度越大,对藻细胞密度的抑制作用越强,而粒径变化对藻细胞密度的影响无明显规律。对比两种微塑料,PET 对藻细胞密度的抑制作用更强。

(2)PET 对牟氏角毛藻细胞干重具有抑制作用,但与对照组相比差异不显著($P>0.05$)。而 PS 则对牟氏角毛藻细胞干重无影响。

(3)微塑料对牟氏角毛藻 Chl *a* 的影响与塑料类型和暴露时间有关。暴露前期,PET 对微藻 Chl *a* 的产生无影响,而 PS 抑制微藻 Chl *a* 的产生;暴露后期,PET 抑制微藻 Chl *a* 的产生,而 PS 对微藻 Chl *a* 的产生具有促进作用。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国商务部. 全球塑料生产创新高[EB/OL]. (2018-05-22).<http://ua.mofcom.gov.cn/article/jmxw/201805/20180502738977.shtml>.
- [2] JAMBECK J R, GEYER R, WILCOX C, et al. Plastic waste inputs from land into the ocean[J]. *Science*, 2015, 347(6223):

- 768-771.
- [3] GUILHERMINO L, VIEIRA L R, RIBEIRO D, et al. Uptake and effects of the antimicrobial florfenicol, microplastics and their mixtures on freshwater exotic invasive bivalve *Corbicula fluminea* [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 622/623: 1131-1142.
- [4] WANG W F, GAO H, JIN S C, et al. The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: a review[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 173: 110-117.
- [5] HALE R C. Are the risks from microplastics truly trivial?[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(3): 931.
- [6] 王素春, 刘光洲, 张 欢, 等. 微塑料对微藻的毒性效应研究进展[J]. *海洋环境科学*, 2019, 38(2): 192-197.
- [7] PENG L C, ZHANG Z S, LAN C Q, et al. Alleviation of oxygen stress on *Neochloris oleoabundans*: effects of bicarbonate and pH[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 29(1): 143-152.
- [8] NAVA V, LEONI B. A critical review of interactions between microplastics, microalgae and aquatic ecosystem function[J]. *Water Research*, 2021, 188: 116476.
- [9] LI S X, WANG P P, ZHANG C, et al. Influence of polystyrene microplastics on the growth, photosynthetic efficiency and aggregation of freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 714: 136767.
- [10] CANNIFF P M, HOANG T C. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 500-507.
- [11] LAGARDE F, OLIVIER O, ZANELLA M, et al. Microplastic interactions with freshwater microalgae: hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 215: 331-339.
- [12] SEOANE M, GONZÁLEZ-FERÁNDEZ C, SOUDANT P, et al. Polystyrene microbeads modulate the energy metabolism of the marine diatom *Chaetoceros neogracile* [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 251: 363-371.
- [13] SJOLLEMA S B, REDONDO-HASSELERHARM P, LESLIE H A, et al. Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth?[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 170: 259-261.
- [14] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomenbranes[J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 148: 350-382.
- [15] ZHAO T, TAN L J, HUANG W Q, et al. The interactions between micro polyvinyl chloride (mPVC) and marine dinoflagellate *Karenia mikimotoi*: the inhibition of growth, chlorophyll and photosynthetic efficiency[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 247: 883-889.