

聚苯乙烯微塑料对秀丽隐杆线虫取食偏好的影响^①

黄萌, 程思, 李嘉琪, 李根, 杨扬, 胡锋, 李辉信, 武俊*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 以土壤模式动物秀丽隐杆线虫为受试对象, 研究了不同粒径、不同浓度的聚苯乙烯(PS)微塑料在短期暴露和长期暴露条件下对线虫取食偏好的影响, 结果显示, 1、10、100 mg/L 浓度下, 1 μm 和 5 μm 的 PS 微塑料短期暴露后, 线虫对 *B. amyloliquefaciens* JX1 (X1) 和 *P. fluorescens* Y1 (Y1) 的取食偏好并未发生明显改变; 1、10、100 mg/L 浓度下, 5 μm 的 PS 微塑料在长期暴露条件下能够改变线虫对 X1、Y1 的取食偏好且使线虫取食相关基因(*cat-4*、*egl-4*、*gcy-28*、*daf-7*、*dbl-1*、*tir-1* 和 *tol-1*)的表达显著上调; 1 μm、100 mg/L 和 5 μm、100 mg/L 的 PS 微塑料长期暴露后线虫体内氧化应激相关指标均有上调, 与 PS 粒径大小无明显关联, 提示氧化应激损伤可能并非 PS 微塑料长期暴露改变线虫取食偏好的直接机制。这均表明 PS 微塑料可以通过调控线虫取食偏好相关功能基因来对线虫的取食偏好行为产生影响。

关键词: 微塑料; 秀丽隐杆线虫; 取食偏好

中图分类号: S154.5 文献标志码: A

Effects of Polystyrene Microplastics on Feeding Preference of *C. elegans*

HUANG Meng, CHENG Si, LI Jiaqi, LI Gen, YANG Yang, HU Feng, LI Huixin, WU Jun*

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, soil model animal *C. elegans* was used as test subject, and the effects of different particle sizes and concentrations of polystyrene (PS) microplastics on the feeding preferences of *C. elegans* under short-term and long-term exposure conditions were studied. The results showed that, the feeding preferences of *C. elegans* on *B. amyloliquefaciens* JX1 (X1) and *P. fluorescens* Y1 (Y1) did not change significantly after short-term exposure to PS microplastics of 1 μm and 5 μm at 1, 10 and 100 mg/L; At the concentrations of 1, 10 and 100 mg/L, PS microplastics of 5 μm could change the feeding preferences of *C. elegans* on X1 and Y1, and significantly upregulated the expression of feeding related genes (*cat-4*, *egl-4*, *gcy-28*, *daf-7*, *dbl-1*, *tir-1* and *tol-1*) in *C. elegans* under long-term exposure. The indexes related to oxidative stress in *C. elegans* were all upregulated after long-term exposure to PS microplastics of 1 μm and 5 μm at 100 mg/L, but had no significant correlation with the particle size of PS, suggesting that oxidative stress damage may not be the direct way responsible for the effect of PS microplastics on feeding preference of *C. elegans*. These results suggested that PS microplastics could affect the feeding preference behavior of *C. elegans* by regulating the functional genes related to feeding preference.

Key words: Microplastics; *Caenorhabditis elegans*; Feeding preference

微塑料是粒径小于 5 mm 的塑料纤维、颗粒和薄膜^[1], 广泛存在于海洋、淡水及陆地生态系统中^[2-4], 甚至在大气中也发现了微塑料^[5]。塑料在环境中极不易分解, 且因其具有尺寸小和比表面积大等特性, 微塑料的环境危害普遍被认为比大型塑料更大。微塑料的小尺寸使得它们很容易被环境中各种各样的生物

摄取, 不仅对生物具有生长发育毒性, 且对动物的选择性取食行为也造成了一定影响, 如在浓度为 50 个/ml、粒径为 10 ~ 30 μm 的聚酰胺纤维中暴露后, 冷水桡足类对猎物的选择性发生了显著改变, 对藻类的摄取率下降了 40%^[6]。Rotjan 等^[7]发现摄入微塑料后的珊瑚(*Astrangia poculata*)抑制了对其食物盐水虾卵的摄

^①基金项目: 国家自然科学基金项目(41877057, 31901179)、中央高校基本科研业务费(KJQN202016)和中国博士后科学基金项目(2019M661861)资助。

* 通讯作者(wujun2013@njau.edu.cn)

作者简介: 黄萌(1996—), 女, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物分子生态。E-mail: 2018103028@njau.edu.cn

入。动物的选择性取食行为在自然界十分普遍, 不管是拥有味觉的高等生物还是低等生物(如原生动物和线虫等)在取食时都会依据本能选择能够为自身生长提供均衡营养的食物, 并且具有独特的偏好性^[8]。微塑料对动物选择性取食行为的改变可以显著影响动物的进食和健康, 对该种动物发挥重要作用的食物网和生态过程产生潜在的连锁效应, 最终对生态系统产生影响^[6]。

微塑料也被发现对土壤模式生物秀丽隐杆线虫具有生理与神经毒性, 聚酰胺、聚乙烯、聚氯乙烯微塑料暴露均能缩短线虫寿命, 抑制线虫繁殖, 引起线虫体内氧化应激反应, 并能引发线虫慢性神经毒性, 使线虫的运动发生障碍^[9-12]。但目前微塑料对线虫的取食偏好方面产生的影响暂未见报道, 食细菌线虫对微生物的选择性取食不仅影响到线虫自身的健康及生存适应性^[13-15], 还会改变微生物种间竞争的结果, 并影响微生物在土壤中的分布, 微生物的数量、活性以及群落结构, 对分析土壤食物网的能量流动与养分转化具有重要意义^[16], 因此研究微塑料对线虫取食偏好的影响及其机制可以为微塑料在环境中潜在的生态风险评价提供科学依据。

故本文选择 1 μm 和 5 μm 两种粒径, 1、10、100 mg/L 3 个浓度以及短期和长期两种暴露时间来研究环境中较为常见塑料类型——聚苯乙烯微塑料对秀丽隐杆线虫取食偏好的影响, 并从生化水平和分子水平探讨了聚苯乙烯微塑料对秀丽隐杆线虫的取食偏好的影响机制, 以期为微塑料的毒性评价和风险评估提供新的思路和依据。

1 材料与方法

1.1 培养基及溶液

线虫培养基 1 L (NGM, nematode growth medium): 称取 NaCl 3 g、蛋白胨 2.5 g、琼脂粉 17 g, 加入 975 ml 去离子水, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌 20 min, 冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 分别加入过 0.22 μm 无菌滤膜的 1 ml 1 mol/L MgSO₄、1 ml 1 mol/L CaCl₂、1 ml 5 mg/ml 胆固醇、25 ml 1 mol/L KPO₄ 缓冲液 (pH 6.0)。1 mol/L KPO₄ 缓冲液 (pH 6.0): 称取 108.3 g KH₂PO₄、35.6 g K₂HPO₄, 加入去离子水超声溶解并定容至 1 L。细菌培养基 1 L (LB 培养基, Luria-Bertani medium): 称取 NaCl 10 g、胰蛋白胨 Tryptone 10 g、酵母膏 5 g, 用去离子水溶解并定容至 1 L, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌 20 min。M9 缓冲液 1 L: NaCl 5 g、KH₂PO₄ 3 g、Na₂HPO₄ 6 g、MgSO₄ (1 mol/L) 1 ml, 加入去离子水

溶解并定容至 1 L, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌 20 min, 常温放置备用。线虫裂解液 (9 ml): 7 ml 无菌水中加入 1 ml 5 mol/L 的 NaOH、1 ml 10% NaClO, 混匀, 现配现用。

1.2 微塑料及其表征测定

聚苯乙烯 (PS) 颗粒购于天津倍思乐色谱技术开发中心, 分为两种直径: 1 μm 和 5 μm , 均匀分散在水溶液中, 带有绿色荧光便于查看微塑料在线虫体内的分布, 最大激发波长和最大发射波长分别为 488 nm 和 518 nm。利用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 对微塑料颗粒的形貌进行了表征 (S4800, 日立高科技公司, Japan)。使用激光粒度仪 (Mastersizer 2000, 英国马尔文仪器有限公司, UK) 对微塑料颗粒的粒径进行分析。

1.3 线虫及菌株的培养

Caenorhabditis elegans N2 (简称 *C. elegans*) 来源于 CGC (Caenorhabditis Genetics Center, Minneapolis, MN, USA)。3 株供试细菌 (表 1): *Escherichia coli* OP50 (以下简称 OP50) 来源于 CGC, *B. amyloliquefaciens* JX1 (以下简称 X1) 和 *P. fluorescens* Y1 (以下简称 Y1) 均为本实验室筛选出来的土壤优势细菌。供试土壤采自江苏省南京市雨花台区板桥镇长江南岸冲积地的灰潮土。

表 1 供试细菌的基本性质
Table 1 Description of bacteria used in experiment

中文名	细菌种类	革兰氏反应	登录号
解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i> JX1	G+	JX424611	
荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i> Y1	G-	KC962432	
大肠杆菌 <i>E. coli</i> OP50	G-	-	

OP50 为秀丽隐杆线虫的实验室标准食物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养; X1 和 Y1 作为取食偏好实验中线虫的两种食物, 均为 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养。线虫以 OP50 喂养, 长至产卵期后进行同步化, 将虫体用裂解液裂解后, 5 000 g 离心 1 min, 弃上清。将得到的卵置于 M9 缓冲液中孵化, 24 h 后将得到的 L1 期幼虫置于涂布有 OP50 并加入了不同浓度和粒径的 PS 微塑料的线虫培养基 (NGM) 中 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 以供试验。

1.4 PS 微塑料短期暴露对秀丽隐杆线虫取食偏好的影响

将秀丽隐杆线虫同步化后置于含有不同粒径和浓度的 PS 微塑料的培养基中培养 36 h, 长至 L4 期时用 M9 缓冲液将虫子冲洗下来, 并将附着的 OP50 清洗干净。X1、Y1 用液体 LB 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至对数

期, 用分光光度计调节 OD600 值为 1, 在同一 90 mm 的 NGM 两端等距圈中添加 X1、Y1 各 20 μ l, 将得到的 L4 期线虫置于培养基中心位置(图 1, 每个圈的直径为 15 mm, 两端圈与中心点的距离为 20 mm)。将培养基置于 20 $^{\circ}$ C 培养箱中黑暗培养, 让线虫自由取食两种细菌。接种线虫后, 于 12 h 后在体视显微镜下观察线虫迁移取食情况并记录线虫迁移至各个菌区的数目, 统计分析线虫对不同细菌的选择性和偏好性。每组设置 8 个重复。计算 *C. elegans* 对某种细菌的偏好比例: PI=N/N_t。式中: PI (preference index) 表示某一时刻线虫对某种细菌的偏好比例, N 表示该时刻该种细菌菌区线虫的数目, N_t 表示该时刻两种细菌菌区线虫数总和。

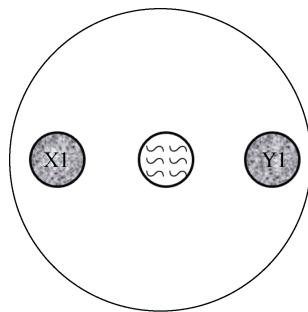


图 1 线虫取食偏好的试验示意图
Fig. 1 Feeding preferences experiment

1.5 PS 微塑料长期暴露对秀丽隐杆线虫取食偏好的影响

将线虫在含有不同粒径和浓度的 PS 微塑料平板上传代培养 15 d, 同步化后待线虫置于含有不同粒径和浓度的 PS 微塑料的培养基中培养 36 h, 长至 L4 期洗下备用, 取食偏好试验方法同上。

1.6 PS 微塑料长期暴露对秀丽隐杆线虫氧化应激水平的影响

将线虫在含有不同粒径和浓度的 PS 微塑料平板上传代培养 15 d, 同步化后待线虫置于含有不同粒径和浓度的 PS 微塑料的培养基中培养 36 h, 长至 L4 期洗下备用。按照线虫活性氧 (ROS) ELISA 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) ELISA 试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒说明书使用酶标仪确定对照组和各暴露组的活性氧自由基水平、超氧化物歧化酶活性和过氧化氢酶活性。试剂盒购于江苏酶标生物科技有限公司。每个样设置 3 个重复。

1.7 荧光定量 PCR

用 Trizol 法提取 PS 微塑料处理 15 d 并同步化后

培养至 L4 期的秀丽隐杆线虫的总 RNA, 按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(TARAKA, RR047Q)操作说明将线虫的 RNA 反转录成 cDNA, 选取 *cat-4*、*egl-4*、*gcy-28*、*daf-7*、*dbl-1*、*tir-1* 和 *tol-1* 这 7 个与取食行为相关的基因作为靶基因, 其中 *cat-4* 基因参与五羟色胺信号通路, *gcy-28* 编码鸟苷酸环化酶, *tir-1* 和 *tol-1* 基因共同编码 TOLL 样受体信号通路中一个含 TIR 结构域的蛋白, *daf-7*、*dbl-1* 和 *egl-4* 均参与转化生长因子 β (TGF- β) 信号通路^[17-21]。使用 ABI StepOne PLUS 荧光定量 PCR 仪对这些基因的表达量进行相对定量分析, 内参基因为 *cdc-42*, 每个样设置 3 个重复。基因的引物序列见表 2。

表 2 取食相关功能基因的引物及产物预期大小
Table 2 Primers of feeding related functional genes of *C. elegans* and expected product size used for quantitative real-time PCR amplification

基因	引物(5'-3')	预期大小
<i>cat-4</i> -F	GATGAGATGGTTATTGTGAAAGA	234 bp
<i>cat-4</i> -R	AACTGCAACTCCGGATGG	
<i>egl-4</i> -F	TCCGTGTGCTCAATCAAG	181 bp
<i>egl-4</i> -R	CGTTCCATTCTCCATAGTCT	
<i>gcy-28</i> -F	GTGAAGGTGAAGGTGATGA	278 bp
<i>gcy-28</i> -R	AGGTGGAAGAAGTTGATGAA	
<i>daf-7</i> -F	CCTTCATCCCCAACAGACC	236 bp
<i>daf-7</i> -R	TATAGTGGCAATCCCCGC	
<i>dbl-1</i> -F	GAAAAAAGGGTAGAAAGCATCA	225 bp
<i>dbl-1</i> -R	CAGGTCTCAAAGAGTGTAAAAGTG	
<i>tir-1</i> -F	ACCGACCACCAAAGAAATG	209 bp
<i>tir-1</i> -R	TGGATGCAGAAGGCTGAAT	
<i>tol-1</i> -F	CTGTTCTCCTCTGTGTCCTCG	192 bp
<i>tol-1</i> -R	TCACCATTTCTCGTCCTCT	
<i>cdc-42</i> -F	AGCCATTCTGGCCGCTCTCG	146 bp
<i>cdc-42</i> -R	GCAACCGCTCTCGTTGGC	

1.8 数据分析与处理

采用单因素方差分析法(One-way ANOVA)分析, 用 Duncan 检验法对不同处理间平均值的显著性差异 ($P<0.05$) 进行检验。数据统计分析均使用 SPSS 20 统计软件, 使用 Origin 和 Excel 软件作图。

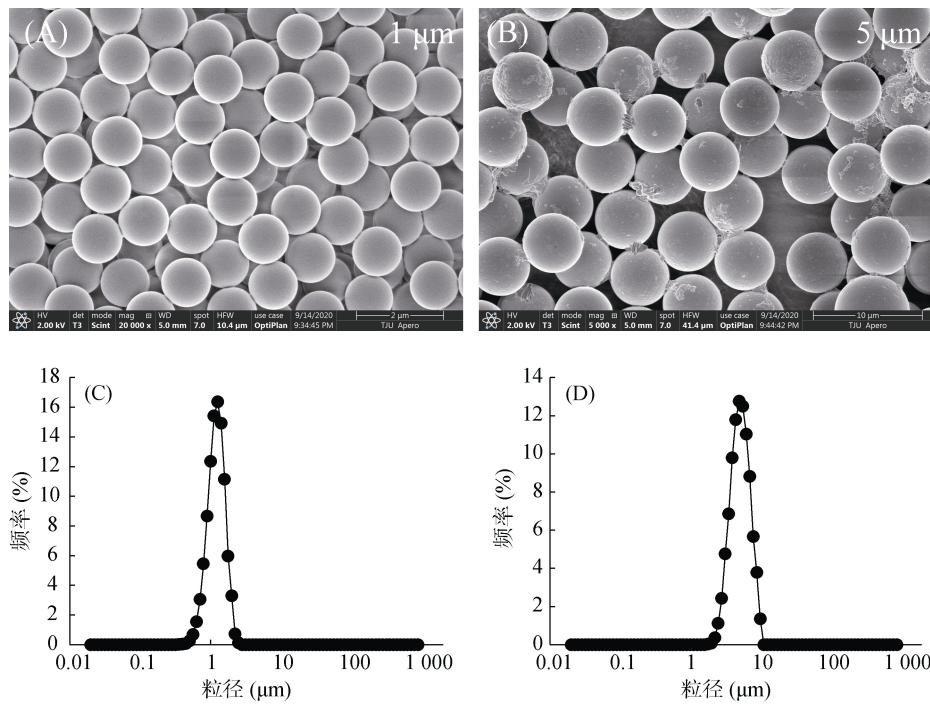
2 结果与分析

2.1 不同粒径的 PS 微塑料的表征

污染物的毒性与其本身的理化性质密切相关, PS 微塑料的形貌用扫描电镜观察结果如图 2A 和 2B 所示, 两种粒径的 PS 微塑料均呈规则的圆球形; PS

微塑料的粒径使用粒径分析仪进行分析, 结果如图 2C 和 2D, 图 2C 显示 1 μm 的 PS 微塑料粒径呈正态

分布, $d(0.5) = 1.145 \mu\text{m}$, 图 2D 显示 5 μm 的 PS 微塑料粒径呈正态分布, $d(0.5) = 4.724 \mu\text{m}$ 。



(图 A、B 分别表示粒径为 1 μm 和 5 μm 的 PS 颗粒的电镜扫描图; 图 C、D 分别表示粒径为 1 μm 和 5 μm 的 PS 颗粒的粒径分析仪图)

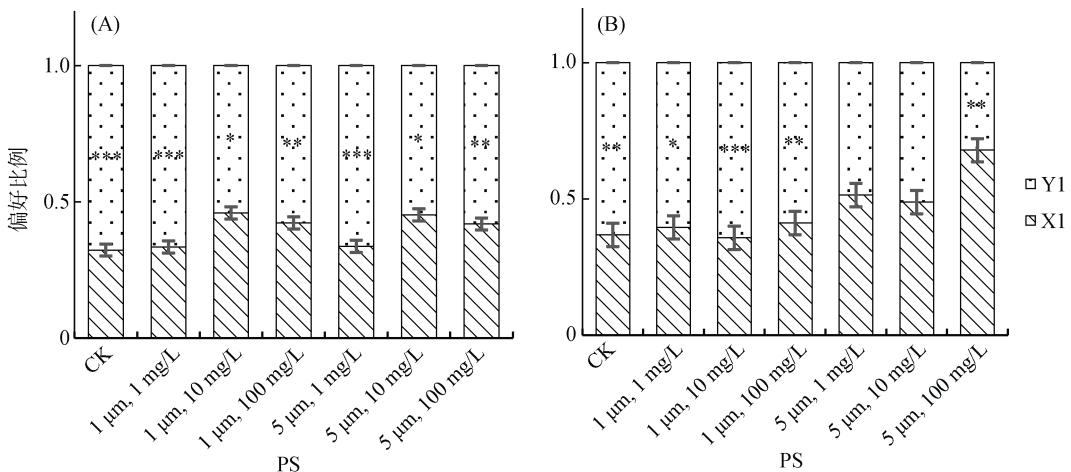
图 2 不同粒径 PS 颗粒的扫描电镜图和粒径分析图

Fig. 2 SEM images and particle size distributions of different-size polystyrene particles

2.2 PS 微塑料短期暴露对秀丽隐杆线虫取食偏好的影响

秀丽隐杆线虫分别在未添加 PS 微塑料的培养基和含有不同浓度和粒径的 PS 微塑料培养基中短期暴露 36 h 后, 将线虫同步化后进行取食偏好试验 (图 3A)。鉴于此取食偏好试验中 4、8、12、24 h 时线虫

对 X1、Y1 的偏好性趋势较为一致, 均偏好 Y1, 故在此只列出最具代表性的 12 h 时的取食数据。试验结果显示, 对照组和所有处理组的线虫均表现出对 Y1 的明显偏好, 即 1 μm 和 5 μm 的 PS 微塑料在 1、10、100 mg/L 这 3 个浓度下均对线虫对 X1、Y1 的取食偏好行为无明显影响。在中高浓度(10 mg/L 和



(A. 不同粒径和浓度的 PS 微塑料短期暴露; B. 不同粒径和浓度的 PS 微塑料长期暴露; 图中误差线表示标准误, *、**、*** 分别表示每组内 X1 与 Y1 菌区线虫数量的差异达 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 显著水平)

图 3 不同粒径和浓度的 PS 微塑料暴露后线虫对 X1、Y1 的取食偏好

Fig. 3 Feeding preferences of *C. elegans* after exposure to polystyrene particles with different-sizes and concentrations

100 mg/L)下, 尽管线虫仍然偏好取食 Y1, 但 1 μm 和 5 μm 的 PS 微塑料暴露组的线虫对 Y1 的偏好性相较于对照组显著降低($P<0.05$)。

试验结果表明, 1 μm 和 5 μm 的 PS 微塑料短期暴露对线虫取食偏好行为并未有明显改变, 猜测可能是暴露时间较短。

2.3 PS 微塑料长期暴露对秀丽隐杆线虫取食偏好的影响

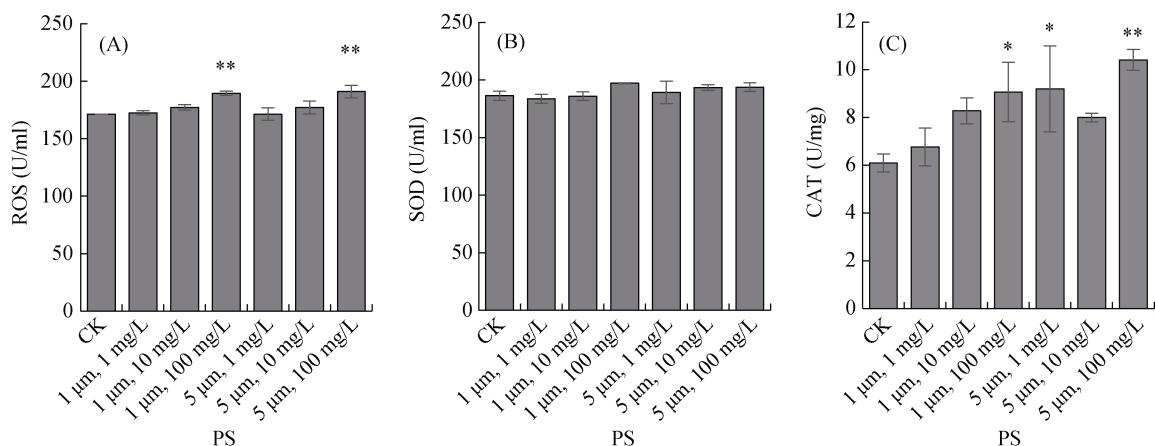
将秀丽隐杆线虫在含有不同浓度和粒径的 PS 微塑料培养基中长期暴露约 15 d 后, 将线虫同步化后进行取食偏好试验(图 3B)。未经 PS 微塑料暴露的线虫对 X1、Y1 的取食偏好结果显示, 线虫更加偏好取食 Y1 (PI 为 0.63); 长期暴露在粒径为 1 μm 的 PS 微塑料环境中的线虫对 X1、Y1 的取食偏好性未发生改变, 仍显著偏好 Y1, 1、10、100 mg/L 的暴露组线虫对 Y1 的 PI 分别为 0.60 ($P<0.05$)、0.64 ($P<0.001$)、0.59 ($P<0.01$); 而长期暴露在粒径为 5 μm 的 PS 微塑料环境中的线虫对 X1、Y1 的取食偏好行为发生了改变, 具体表现为: 1 mg/L 和 10 mg/L 的两个暴露组的线虫对 X1、Y1 的取食未见明显偏好性, 而较高浓度即 100 mg/L 的暴露组的线虫显示出对 X1 的显著偏好(PI 为 0.68, $P<0.01$)。这表明, PS 微塑料能够改变线虫的取食偏好, 且与微

塑料的粒径和浓度相关, 较大粒径、较高浓度的 PS 微塑料对秀丽隐杆线虫的取食偏好行为影响程度较大。

2.4 PS 微塑料长期暴露对秀丽隐杆线虫氧化应激水平的影响

对在不同粒径和浓度的 PS 微塑料中暴露 15 d 的秀丽隐杆线虫体内的活性氧自由基(ROS)水平进行测定, 结果表明, PS 微塑料浓度为 100 mg/L 时, 粒径为 1 μm 和 5 μm 的 PS 微塑料暴露组的线虫体内的活性氧自由基水平显著提高($P<0.01$), 其中 1 μm 、100 mg/L 的暴露组线虫体内的 ROS 水平与对照组相比提高了 10.62%; 5 μm 、100 mg/L 的暴露组线虫体内的 ROS 水平与对照组相比提高了 11.48%, 与 1 μm 、100 mg/L 的暴露组相比线虫体内的 ROS 含量升高了 0.78% (图 4A)。

对在不同粒径和浓度的 PS 微塑料中暴露 15 d 的秀丽隐杆线虫体内的超氧化物歧化酶(SOD)活性进行测定, 结果表明, 秀丽隐杆线虫在粒径为 1 μm 和 5 μm , 浓度为 1、10 和 100 mg/L 的 6 个 PS 微塑料处理组中暴露 15 d, 对线虫体内的 SOD 酶活的影响均无显著差异(图 4B)。但是可以看到, PS 微塑料粒径为 1 μm 和 5 μm 时, 线虫体内 SOD 酶活均随着 PS 微塑料浓度的升高而升高。



(A. 活性氧自由基水平; B. 超氧化物歧化酶活性; C. 过氧化氢酶活性; 误差棒表示标准误, *、**、***分别表示处理与对照组差异达 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 显著水平, 下图同)

图 4 不同粒径和浓度的 PS 微塑料长期暴露后线虫的氧化应激水平

Fig. 4 Oxidative stress levels of *C. elegans* after chronic exposure to polystyrene particles with different-sizes and concentrations

对在不同粒径和浓度的 PS 微塑料中暴露 15 d 的秀丽隐杆线虫体内的过氧化氢酶(CAT)活性进行测定, 结果显示, 当 PS 微塑料粒径为 1 μm 时, 各浓度暴露组的线虫体内 CAT 的含量随着 PS 微塑料浓度的升高而升高, 1 mg/L 和 10 mg/L 的 PS 微塑料暴露组与对照组相比无显著差异(图 4C); 但 100 mg/L 的

PS 微塑料暴露组则与对照差异显著($P<0.05$), 与对照组相比, 线虫体内 CAT 含量升高了 0.4889%。当 PS 微塑料粒径为 5 μm 时, 低暴露浓度(1 mg/L)和高浓度暴露组(100 mg/L)线虫体内的 CAT 含量与对照组相比均有显著差异, 分别比对照组升高了 51.12% ($P<0.05$) 和 70.92% ($P<0.01$)。

2.5 取食相关功能基因的表达

为了阐明 PS 微塑料改变线虫取食行为的分子机制, 我们选取了一些与线虫取食行为相关的基因, 提取经过 PS 微塑料长期暴露的线虫 RNA 进行荧光定量 PCR, 对这些基因的表达量进行相对定量分析(图 5)。研究结果显示, 粒径为 1 μm 的 PS 微塑料暴露组, 大部分基因的表达量与对照组相比均无明显差异, 只有 10 mg/L 暴露组的 *dbl-1*、*egl-4* 和 *gcy-28* 3 个基因的表达量和 100 mg/L 暴露组的 *dbl-1* 基因表达量与对照组相比显著降低($P<0.05$)。而 5 μm 的 PS 微塑料暴露组在 1、10 和 100 mg/L 浓度下, *cat-4*、*egl-4*、*gcy-28*、*daf-7*、*dbl-1*、*tir-1* 和 *tol-1* 这 7 个基因表达量均明显上调, 其中 *cat-4* 基因表达量上调幅度最大, 1、10 和 100 mg/L 暴露组与对照组相比分别上调 195.14% ($P<0.05$)、202.36% ($P<0.05$) 和 488.21% ($P<0.001$), 且 *cat-4*、*egl-4*、*gcy-28*、*daf-7*、*tir-1* 和 *tol-1* 这 6 个基因表达量的上调均表现出对暴露浓度的依赖性, 即 PS 微塑料暴露浓度越高, 基因表达量越高。

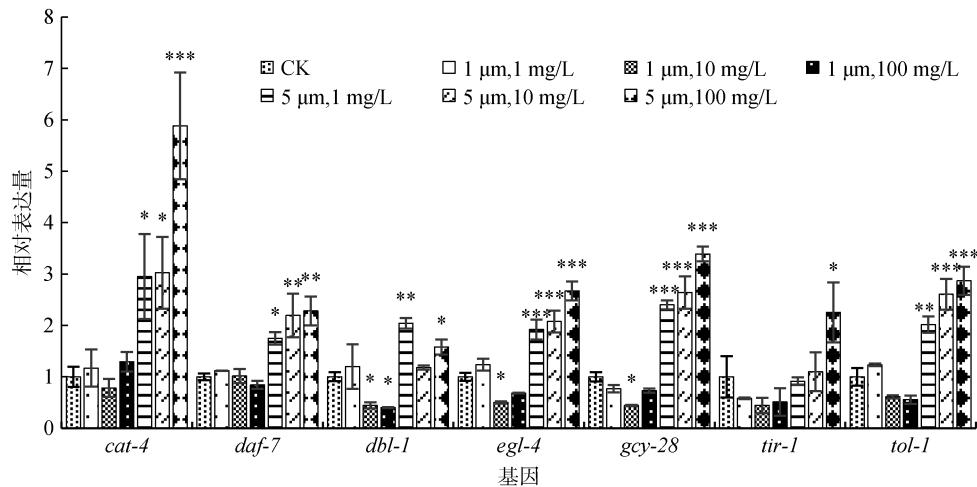


图 5 不同粒径和浓度的 PS 微塑料长期暴露后线虫取食相关功能基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of target genes in *C. elegans* after chronic exposure to polystyrene particles with different sizes and concentrations

3 讨论

试验结果显示, 5 μm 的 PS 微塑料长期暴露 15 d 后, 线虫对 X1、Y1 的取食偏好发生了明显改变, 这表明 PS 微塑料对线虫取食偏好的影响与 PS 微塑料的暴露时间、粒径和浓度均有关联。与 1 μm 相比, 5 μm 的 PS 微塑料对线虫取食偏好的影响更大, 且随着暴露时间的延长和暴露浓度的增大, 其影响也越大。猜测可能是由于较大粒径的微塑料更易累积阻塞肠道, 使机体产生饱腹感, 从而影响线虫的取食, 有研究也发现微塑料易积累在鱼类的鳃部和消化道, 阻塞消化系统并使其产生饱腹感, 且对食物的摄入量减少^[22]。微塑料长期暴露对线虫取食偏好的影响较短期来讲更大, 这与一些环境毒物相一致, 如曹雪^[23]发现壬基酚对秀丽隐杆线虫的毒性是时间依赖性的, 急性暴露以刺激效应为主, 而慢性暴露则以抑制效应为主, 且随着壬基酚暴露时间的延长, 线虫生理生化指标的负面影响更为明显, 本文研究与此相印证, 即长期 PS 微塑料暴露对线虫取食偏好的影响较短期更大。

照组相比显著降低($P<0.05$); 而 5 μm 的 PS 微塑料暴露组在 1、10 和 100 mg/L 浓度下, *cat-4*、*egl-4*、*gcy-28*、*daf-7*、*dbl-1*、*tir-1* 和 *tol-1* 这 7 个基因表达量均明显上调, 其中 *cat-4* 基因表达量上调幅度最大, 1、10 和 100 mg/L 暴露组与对照组相比分别上调 195.14% ($P<0.05$)、202.36% ($P<0.05$) 和 488.21% ($P<0.001$), 且 *cat-4*、*egl-4*、*gcy-28*、*daf-7*、*tir-1* 和 *tol-1* 这 6 个基因表达量的上调均表现出对暴露浓度的依赖性, 即 PS 微塑料暴露浓度越高, 基因表达量越高。

PS 微塑料长期暴露后线虫体内的 ROS 水平明显升高, 且抗氧化酶 CAT 的水平也显著升高, 表明 PS 微塑料使线虫产生了氧化应激反应并激发了抗氧化系统。但 1 μm 和 5 μm 的 PS 微塑料在高浓度(100 mg/L)下均与对照组有显著差异, 这与只有 5 μm 的 PS 微塑料能够改变线虫取食偏好的现象并不完全一致, 虽然氧化应激效应常与神经行为学上的异常紧密关联^[24], 但在此试验中, 氧化应激并不是 PS 微塑料改变线虫取食偏好的直接机制。

Abada 等^[25]指出, 线虫的基因调控是食细菌线虫进行选择性和偏好性取食的主要原因。Coolon 等^[26]也发现, *C. elegans* 取食不同的细菌后, 其许多基因表达量会发生变化, 他们通过某些基因缺失的 *C. elegans* 突变体证明了这些基因与 *C. elegans* 的取食偏好性有关。本试验中 5 μm 的 PS 微塑料也是由于直接影响到线虫取食偏好的功能基因的表达, 从而改变了线虫对 X1、Y1 的取食偏好。荧光定量 PCR 试验结果显示, 5 μm 的 PS 微塑料颗粒长期暴露后的线虫与取食相关的功能基因表达量上调。荧光假单胞菌已被发现是秀丽隐杆线虫的一种病原菌, 并且基于

本实验室之前的研究结果,秀丽隐杆线虫以荧光假单胞菌 Y1 作为食物时,存活率明显低于以解淀粉芽孢杆菌 X1 作为食物时^[27],故可以认为,相较于 X1, Y1 对秀丽隐杆线虫有一定的毒害作用。而 *cat-4* 基因参与合成的五羟色胺调节线虫运动行为来应对环境刺激^[18],*gcy-28* 编码的鸟苷酸环化酶参与线虫的嗅觉吸引行为,当 *cat-4* 基因突变时,线虫会出现嗅觉学习逃避缺陷^[28],而 *gcy-28* 基因突变体也被发现无法感知气味偏好^[17],故当 *tax-4* 基因和 *gcy-28* 基因表达上调时,线虫对病原菌 Y1 的嗅觉识别增强,从而逃离对它有害的病原菌 Y1。*tir-1* 和 *tol-1* 基因共同编码的 TOLL 样受体信号通路中一个含 TIR 结构域的蛋白质,该信号通路也与线虫的物理性逃避行为相关,可以识别病原菌分泌的模式分子从而识别和逃避有害因素^[19]。同样地,当 *tol-1* 和 *tir-1* 基因表达上调后,线虫识别和分辨病原菌 Y1 的能力增强,可以有效避开有害菌 Y1。*daf-7*、*dbl-1* 和 *egl-4* 均参与转化生长因子-β (TGF-β) 信号通路,该信号通路是参与调控细胞的生长、分化和死亡的非常重要的信号通路之一^[21]。根据文献^[29]报道,基因 *dbl-1* 突变后,出现了学习型逃避缺陷;*egl-4* 基因突变后,线虫出现了嗅觉适应性损伤^[30]。在 5 μm 的微塑料中暴露的线虫体内 *egl-4*、*dbl-1* 和 *daf-7* 基因表达量上调后,线虫的学习型逃避能力增强,此时若线虫取食了病原菌 Y1 后,能够增加趋避 Y1 的能力,从而取食偏好发生改变。以上这些与取食相关的基因的表达量均随着 5 μm 的 PS 微塑料的浓度升高而增大,表明微塑料的浓度越大,对线虫取食相关基因的影响越大,这些均与线虫取食偏好改变的行为相一致,表明微塑料确实是通过影响线虫的取食能力从而影响对 X1 和 Y1 的取食偏好行为,但是线虫中这些取食能力基因具体如何协调起作用还有待深入研究。

综上所述,微塑料暴露能够改变线虫的取食偏好,且较大粒径的微塑料长期暴露对秀丽隐杆线虫的影响更大,这种改变并不是由氧化应激引起的,而是由与偏好性取食相关的功能基因直接调控的,而线虫的取食偏好对细菌的数量、活性及群落结构有重要影响^[16],且自然界中的塑料极不易分解,在环境中长期存在,这暗示了微塑料对整个土壤生态系统可能产生的影响。

参考文献:

[1] Thompson R C, Olsen Y, Mitchell R P, et al. Lost at sea: Where is all the plastic?[J]. Science, 2004, 304(5672): 838.

[2] Ivar do Sul J A, Costa M F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment[J]. Environmental Pollution, 2014, 185: 352–364.

[3] Knepper T P, Martin Wagner, Scott Lambert (Eds.): Freshwater microplastics: Emerging environmental contaminants?[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(25): 6337–6338.

[4] Nizzetto L, Futter M, Langaas S. Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin?[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(20): 10777–10779.

[5] Dris R, Gasperi J, Saad M, et al. Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment?[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 104(1/2): 290–293.

[6] Cole M, Coppock R, Lindeque P K, et al. Effects of nylon microplastic on feeding, lipid accumulation, and moulting in a coldwater copepod[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(12): 7075–7082.

[7] Rotjan R D, Sharp K H, Gauthier A E, et al. Patterns, dynamics and consequences of microplastic ingestion by the temperate coral, *Astrangia poculata*[J]. Proceedings Biological Sciences, 2019, 286(1905): 20190726.

[8] Bendesky A, Bargmann C I. Genetic contributions to behavioural diversity at the gene–environment interface[J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12(12): 809–820.

[9] Yu Y J, Chen H B, Hua X, et al. Polystyrene microplastics (PS-MPs) toxicity induced oxidative stress and intestinal injury in nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. Science of the Total Environment, 2020, 726: 138679.

[10] Qu M, Kong Y, Yuan Y J, et al. Neuronal damage induced by nanopolystyrene particles in nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. Environmental Science: Nano, 2019, 6(8): 2591–2601.

[11] Schöpfer L, Menzel R, Schnepf U, et al. Microplastics effects on reproduction and body length of the soil-dwelling nematode *caenorhabditis elegans*[J]. Frontiers in Environmental Science, 2020, 8: 41.

[12] Li D, Ji J, Yuan Y J, et al. Toxicity comparison of nanopolystyrene with three metal oxide nanoparticles in nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. Chemosphere, 2020, 245: 125625.

[13] Zubkov M V, Sleigh M A. Comparison of growth efficiencies of protozoa growing on bacteria deposited on surfaces and in suspension[J]. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 2000, 47(1): 62–69.

[14] Blanc C, Sy M, Djigal D, et al. Nutrition on bacteria by bacterial-feeding *Nematodes* and consequences on the structure of soil bacterial community[J]. European Journal of Soil Biology, 2006, 42: S70–S78.

[15] Jousset A, Lara E, Wall L G, et al. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(11): 7083–7090.

[16] Newsham K K, Rolf J, Pearce D A, et al. Differing preferences of Antarctic soil *Nematodes* for microbial

prey[J]. European Journal of Soil Biology, 2004, 40(1): 1–8.

[17] Tsunozaki M, Chalasani S H, Bargmann C I. A behavioral switch: CGMP and PKC signaling in olfactory neurons reverses odor preference in *C. elegans*[J]. Neuron, 2008, 59(6): 959–971.

[18] Chase D L, Koelle M R. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. WormBook, 2007: 1–15.

[19] Tenor J L, Aballay A. A conserved Toll-like receptor is required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity[J]. EMBO Reports, 2008, 9(1): 103–109.

[20] 温凤玲. TGF- β 信号途径在秀丽隐杆线虫逃避行为中的作用[D]. 昆明: 云南大学, 2015.

[21] Patterson G I, Padgett R W. TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development[J]. Trends in Genetics, 2000, 16(1): 27–33.

[22] Derraik J G B. The pollution of the marine environment by plastic debris: A review[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 44(9): 842–852.

[23] 曹雪. 环境激素壬基酚对秀丽隐杆线虫的多毒性效应及组学机制研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2020.

[24] Nuttley W M, Atkinson-Leadbeater K P, van der Kooy D. Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. PNAS, 2002, 99(19): 12449–12454.

[25] Abada E A E, Sung H, Dwivedi M, et al. *C. elegans* behavior of preference choice on bacterial food[J]. Molecules and Cells, 2009, 28(3): 209–213.

[26] Coolon J D, Jones K L, Todd T C, et al. *Caenorhabditis elegans* genomic response to soil bacteria predicts environment-specific genetic effects on life history traits[J]. PLoS Genetics, 2009, 5(6): e1000503.

[27] Yu L, Yan X M, Ye C L, et al. Bacterial respiration and growth rates affect the feeding preferences, brood size and lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0134401.

[28] Zhang Y, Lu H, Bargmann C I. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2005, 438(7065): 179–184.

[29] Zhang X D, Zhang Y. DBL-1, a TGF- β , is essential for *Caenorhabditis elegans* aversive olfactory learning[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(42): 17081–17086.

[30] L'Etoile N D, Coburn C M, Eastham J, et al. The cyclic GMP-dependent protein kinase EGL-4 regulates olfactory adaptation in *C. elegans*[J]. Neuron, 2002, 36(6): 1079–1089.