

微塑料对中华鳖稚鳖形态、行为和生理特征的影响研究

沈雯佳¹, 鲍亦然¹, 井木子¹, 陈 炼¹, 高 朔^{2,3}, 李 宏³

(1.南京林业大学生命科学学院, 江苏 南京 210037)

(2.生态环境部南京环境科学研究所, 江苏 南京 210042)

(3.南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 微塑料是指直径小于 5 mm 的塑料碎片, 较难降解, 对生态系统具有潜在的危害。目前, 关于微塑料对淡水水生生物的毒理效应研究大多集中于浮游动物、鱼类、甲壳类和双壳类等。本研究在实验室条件下评估中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 在胚胎发育期间, 向孵化基质中添加不同浓度微塑料对中华鳖稚鳖的形态、行为、生理特征及生长的影响。结果表明, 喂食不同浓度 (0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L) 的微塑料, 对中华鳖稚鳖 14 d 龄、1 月龄、3 月龄和 6 月龄的形态指标 (背甲和体重) 和行为表现无显著影响。通过比较摄入不同浓度微塑料 14 d 的中华鳖稚鳖的肠道菌群组成, 发现变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidota) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 是构成肠道菌群的核心菌群, 多样性未发生显著变化, 而摄入 0.1 mg/L 微塑料的中华鳖稚鳖肠道菌群的丰度显著降低。此外, 摄入不同浓度的微塑料还会改变某些条件致病菌以及消化有关的菌群富集, 如拟杆菌属 (*Bacteroides*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、管道杆菌属 (*Cloacibacterium*) 等。本研究为评估微塑料对淡水爬行动物的毒性效应及微塑料对其潜在的生态毒理风险提供科学理论参考。

[关键词] 微塑料, 中华鳖, 形态, 行为, 肠道微生物

[中图分类号] Q958.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2024)01-0068-14

Effects of Microplastics on Morphological, Behavioral and Physiological Characteristics of Chinese Soft-Shelled Juvenile Turtle (*Pelodiscus sinensis*)

Shen Wenjia¹, Bao Yiran¹, Jing Muzi¹, Chen Lian¹, Gao Shuo^{2,3}, Li Hong³

(1.School of Life Sciences, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

(2.Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China)

(3.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Microplastics are plastic fragments less than 5 mm in diameter that are difficult to degrade and potentially harmful to the ecosystem. At present, studies on the toxicological effects of microplastics on freshwater aquatic organisms mostly focus on zooplankton, fish, crustaceans and bivalves. In the present study, it explored the effects of microplastics on the embryonic stage of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) and different concentrations of microplastics on the morphology, behavior and physiological process of *P. sinensis* under laboratory conditions. Feeding different concentrations (0.1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L) of microplastics did not significantly affect the morphological index (tergum and mass) and behavioral performance of the 14-days-ages, 1-month-ages, 3-month-ages and 6-month-ages juvenile *P. sinensis*. The results suggested that Proteobacteria, Bacteroidota, and Firmicutes the dominant bacteria in the gut microbiota of juvenile *P. sinensis* after ingested different concentrations of microplastics and gut bacterial community diversity did not change significantly. The abundance of gut microbiota of juvenile *P. sinensis* was significantly decreased when 0.1 mg/L microplastics were ingested. In addition, ingestion of different concentrations of microplastics could also

收稿日期: 2023-07-14.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32171495)、南京林业大学大学生实践创新训练计划项目 (2023NFUSPITP0375).

通讯作者: 高朔, 助理研究员, 研究方向: 动物生理生态. E-mail: gaoshuo19970419@163.com

change the enrichment of some opportunistic pathogens and some bacteria related to digestion, such as *Bacteroides*, *Aeromonas*, *Cloacibacterium* and so on. This research provides scientific and theoretical references for studying the toxic effects of microplastics on freshwater reptiles and assessing potential ecotoxicological risks of microplastics.

Key words: microplastics, *Pelodiscus sinensis*, morphology, behavior, gut microbiota

微塑料不但在海洋环境中广泛存在,而且在淡水系统中也有被发现. 已有研究证实海洋生态系统中的微塑料来源于陆地淡水生态系统,且其微塑料丰度远高于海洋生态系统^[1]. 例如,通过比较长江口和东海水体中悬浮的微塑料,发现河口和海洋中微塑料丰度分别为 $(4\ 137.3 \pm 2461.5) \text{ n/m}^3$ 和 $(0.167 \pm 0.138) \text{ n/m}^3$ ^[2]. 此外,研究发现,太湖在全球淡水湖中微塑料含量最高,丰度达到 $30 \sim 50 \text{ mg/L}$ ^[3].

微塑料广泛存在于淡水水体和沉积物中,其丰度及在水环境中的分布都会影响水生生物的生存. 由于微塑料体积较小,很容易被一些生物吸食到体内,并且可以通过食物链增加这些污染物在捕食者体内的生物积累^[4]. 摄入微塑料会引起水生生物的一些潜在的副作用,如磨损肠道、溃疡、假饱腹感,影响生物营养摄取和消化. 例如,动物在摄入微塑料后,会造成生物消化系统中的消化酶活性普遍降低,降低对食物的消化效率,甚至造成生物的死亡^[5-6]. 摄入微塑料还会影响生物行为,如造成探索觅食行为下降,游泳速度减慢,甚至会造成某些哺乳动物焦虑指数变高^[7]. 微塑料还会影响生物的肠道菌群组成及多样性. 当生物摄入微塑料后,会造成其体内肠道微生物多样性降低、微生物种类改变和数量分布不均匀,并且还会诱导病菌的生成^[8-9]. 微塑料的有毒化学成分的释放,或者微塑料吸附有害物质和病菌是造成这些生理、生化和遗传疾病的原因^[10-11].

浮游动物^[12]、节肢动物^[13]、软体动物^[14]、鱼类^[15]、海龟^[16]、鸟类^[17]、水生哺乳动物^[18]体内均发现了微塑料的存在. 尽管有研究表明淡水生态系统是微塑料污染来源之一,但是与海洋生物相比,微塑料对淡水生物的影响方面的数据并不多^[19]. 关于微塑料对淡水水生生物的毒理效应研究大多集中于浮游动物、鱼类、甲壳类和双壳类等^[20]. 然而,微塑料对淡水龟鳖类的潜在毒性作用仍知之甚少. 生活在淡水系统的龟鳖类大多是食肉动物和杂食动物,极有可能摄入微塑料,受到生物积累的影响^[21]. 目前,已经在海龟(*Chelonia mydas*)的消化系统内发现了微塑料的存在,并且发现微塑料的主要类型为聚乙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯和聚苯乙烯^[22],但是对淡水龟鳖类动物影响的研究较为匮乏.

中华鳖(*P. sinensis*)属于龟鳖目代表物种之一,肉食性,多以鱼、虾、软体动物等为食. 已有研究者在鱼^[15]、虾^[23]、软体动物^[24]中发现了微塑料的存在,自然界中的中华鳖也有微塑料污染的可能,但微塑料是否会对野生中华鳖的生存产生影响尚不清楚. 本研究以中华鳖稚鳖为研究对象,在实验室条件下以不同浓度的微塑料处理中华鳖稚鳖,从形态、行为和肠道微生物等3个方面的特征揭示微塑料对中华鳖稚鳖的影响.

1 材料与方法

1.1 实验样本及材料

中华鳖卵采集于江苏省扬州市宝应县山阳镇龟鳖养殖合作社($33^\circ 12' 26'' \text{ N}$, $119^\circ 14' 43'' \text{ E}$). 将150枚一周内产出的中华鳖卵带回实验室,放入孵化箱(KB240, Binder, Germany)进行孵化,温度设置为 28° C . 在孵化过程中不断补充水分以保持孵化基质湿度始终保持在 -12 kPa (即水和基质比为1:1),并及时去除已变质的卵,直至中华鳖的卵全部孵出.

单分散聚苯乙烯(Polystyrene, PS)微球(直径 $10 \mu\text{m}$)悬浮液(2.5%, w/v)(以下称为PS微塑料)购于天津倍思乐色谱技术开发中心(<http://www.qiuhuan.com>, Tianjin, China). 采用光学显微镜对微塑料的形态和个体尺寸进行表征,并在曝气水中制备聚苯乙烯微塑料悬浮液.

1.2 微塑料暴露实验

孵出的中华鳖稚鳖在保持湿润的饲养箱中生活一周,以防稚鳖未能完全吸收完卵黄下水感染死亡. 下水后的稚鳖随机分组饲养,设置3个不同浓度微塑料处理组和一个空白对照组,每组重复3次,每个重复包含10只中华鳖稚鳖. 不同浓度微塑料处理组包括低浓度处理组(0.1 mg/L ; L),中浓度处理组(1 mg/L ; M),高浓度处理组(10 mg/L ; H),空白对照组(C,不添加微塑料). 将单分散聚苯乙烯微塑料微

球稀释成相应暴露组浓度:0.1 mg/L(L)、1 mg/L(M)、10 mg/L(H),搅动使微塑料微球分布均匀。微塑料粒径大小和浓度梯度根据 Hu 等人的报道设置^[25]。

在饲养箱中为稚鳖提供晒背场所,并在饲养箱上方悬挂全光谱灯,在阴雨天或低温条件下为稚鳖提供热源,光照:黑暗周期保持在 L=14,D=10。每天 1 次(8:00—10:00)投喂 3%~5%体重的商品饲料(寸金,中国)。环境温度控制在 25℃~35℃,避免外界不良环境条件对稚鳖产生影响。

1.3 行为学实验

分别在暴露实验后的 14 天、30 天、3 个月、6 个月测量其体背甲长、背甲宽、背甲高和体重。参考贺刚等^[26],各项指标计算公式如下:

$$(1) \text{背甲长增长率}(\%) = (CL2 - CL1) / CL1 \times 100\%;$$

$$(2) \text{背甲宽增长率}(\%) = (CW2 - CW1) / CW1 \times 100\%;$$

$$(3) \text{背甲高增长率}(\%) = (CH2 - CH1) / CH1 \times 100\%;$$

$$(4) \text{增重率}(\%) = (W2 - W1) / W1 \times 100\%.$$

式中,CL2、CW2、CH2、W2 分别为暴露实验后的背甲长、背甲宽、背甲高和体重,CL1、CW1、CH1、W1 为暴露实验前的背甲长、背甲宽、背甲高和体重。

行为学实验顺序依次为探索实验(Exploration trial)、胆量实验(Boldness trial)、社交实验(Sociality trial)和游速(Speed performance test)实验,每天进行一个种类实验。各项行为学测试实验在每天的固定时间开始,并在固定位置放入实验个体,利用摄像机记录每个个体 15 min 的行为学视频,实验结束后将个体放回到原先的饲养盒中。然后用酒精球擦拭白色塑料盒去除前一个体测试时留下的气味,避免对后续实验个体造成影响。利用 67.5×52×50 cm(长×宽×高)且底部打磨粗糙的白色收纳箱,开展后续行为学实验。

探索实验:在白色收纳箱中按照内外面积 1:1 画出 2 个区域,作为稚鳖的活动区域,之后在固定位置放入实验个体,编号后用摄像机记录其行为表现^[27]。

胆量实验:在白色收纳箱固定位置上倒扣一个 10×5 cm(直径×高)黑色塑料小碗,碗一侧开 3×4 cm(长×高)小口以便稚鳖出入。在实验开始时记录实验编号并放入稚鳖,然后用稍大的塑料盒盖住黑色塑料小碗,打开摄像机后揭开外边覆盖的塑料碗,记录稚鳖出洞时间来检测稚鳖的胆量^[28]。根据胆量实验视频读出其体头部完全出现时间(Time for head out)、身体完全出现时间(Time for body out)、尾部完全出现的时间(Time for tail out);将活动实验视频导入影像自动跟踪软件(EthoVision V11.5, Noldus Information Technology, The Netherlands)分析行为视频,按统一标准分析稚鳖运动距离(Distance moved)、平均速度(Mean velocity)、累计运动时间率(Cumulative duration of movement(%))。

社交实验:在白色收纳箱中划分左中右 3 个区域,中间区域为过度区域,左边为社交区域,右边为非社交区域,并在左右两个区域的固定位置上放置一个 11.5×8.5×6 cm(长×宽×高)透明塑料盒,透明塑料盒四周打有小孔,社交区域内放置 5 只稚鳖(非实验个体),非社交区域内不放置任何稚鳖。然后从固定位置放入实验稚鳖,编号后用摄像机记录其行为表现^[29]。

游速实验:在一条长约 1.8 m 爬行动物专用的带有刻度的跑道中加水没过稚鳖,其中一人在稚鳖后面持小刷子轻轻擦拭稚鳖背甲裙边,以刺激稚鳖向前游动,另外一人手持相机,拍摄实验个体的游动过程。把游速视频导入绘声绘影软件,读出最大游速(Maximum velocity),即稚鳖游过 10 cm 的最快速度以及平均游速(Mean velocity),即稚鳖游过 180 cm 的平均速度。

用 SPSS 25.0 统计软件包(IBM, USA)分析形态学和行为学数据,参数统计前数据(包括经对数转化后的数据)分别用 Kolmogorov-Smirnov 和 Bartlett 检验数据正态性和均质性。分析中华鳖稚鳖形态学数据时,数据不符合正态分布,并将数据进行转化也不满足正态分布,因此采用 Kruskal-Wallis 检验。用线性回归分析实验时中华鳖的背甲长、背甲宽、背甲高和体重与行为特征值(胆量实验中的头部出现时间、前肢出现时间、整个身体出现时间;探索实验和社交实验中的运距离、平均速度和累计活动率)之间的相关性和探索试验及社交实验中特征值的相关性;并用线性回归分析探索实验和社交实验活跃度相关性。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检测稚鳖行为特征不同处理间差异。实验中描述性统计值用(平均值±标准误)(Mean±SE)表示,显著性水平设置为 $\alpha=0.05$ 。

1.4 肠道微生物

从对照组和实验处理组中分别随机选取中华鳖 6 只,共计 24 只. 用无菌剪刀和镊子解剖稚鳖,剪开肠道壁后用镊子轻轻刮拭,取出肠道内容物置于冻存管中(Sangon Biotech, Shanghai, China),并立刻放入液氮中速冻,再将样品转移至 -80°C 冰箱保存备用. 肠道内容物送至北京诺禾致源生物科技有限公司(Novogene Bioinformatics Institute, Beijing, China),利用 Illumina NovaSeq PE250 系统进行高通量测序.

原始的测序序列通过 Fastp 软件(V 0.20.0)进行质量过滤,通过 FLASH(V 1.2.11)软件进行拼接. 生成的序列通过 DADA2 方法降噪重产生特征序列(amplicon sequence variants, ASVs)聚类,并利用 Vsearch 软件(V 2.15.0)识别和移除嵌合体序列^[30]. 利用 SILVA 的 SSU rRNA 数据库(V 132, <http://www.arb-silva.de>)比对序列并进行物种注释^[31],计算门-属水平上的微生物群落的相对丰度. 以观察到的 ASVs 数为基础,利用 QIIME2 算法进行分类信息的注释,计算 ASV 水平 α 多样性指数,通过 Chao1 丰富度估计量(Chao1 richness estimator)、Shannon 多样性指数(Shannon-wiener diversity index)、Simpson 多样性指数(Simpson diversity index)、Observed_otus 指数(Observed-otus index)、Goods_coverage 指数(Goods_coverage index)、Dominance 指数(Dominance index)、Pielou-e 指数(Pielou-e index)7 个指数分析样本的丰富度、多样性、均一性与覆盖度. Chao1 指数和 Observed_otus 指数越大,表明群落丰富度越高. Dominance 指数和 Pielou-e 指数越大,群落物种均匀度越好. Shannon 多样性指数越大和 Simpson 多样性指数越小,群落多样性越高. Goods_coverage 指数越大说明样品的测序覆盖度越高^[32]. 采用 Kruskal-Wallis 秩和检验对各组菌群丰富度及多样性进行差异显著性比较.

利用 QIIME2 软件计算 β 多样性距离矩阵和非距离矩阵,基于 Weighted Unifrac 距离进行主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)和相似性分析(analysis of similarity, ANOSIM)^[33],在 ASV 水平比较各个样本微生物区系组成,使用 R 语言(V 3.5.3)进行统计分析和作图. 利用 LEfSe 软件(V 1.0)完成组间显著差异性物种分析,采用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)对各组差异菌群进行鉴定^[34],以 $P<0.05$ 和 $|LDA|>4$ 用作 LEfSe 分析的阈值,对数据进行标志物种的 LDA 效应值柱状图制作.

2 结果与分析

2.1 不同浓度微塑料暴露对中华鳖稚鳖形态特征的影响

不同浓度微塑料对 14 d 龄、1 月龄、3 月龄和 6 月龄中华鳖的背甲长、背甲宽、背甲高、体重的增长率皆无显著影响(表 1).

表 1 不同年龄段各处理下中华鳖稚鳖形态学指标增长率

Table 1 Growth rates of morphological indexes of juvenile *Pelodiscus sinensis* under different treatments in different ages

年龄	形态指标	对照组	0.1 mg/L (L)	1 mg/L (M)	10 mg/L (H)	显著性
14 d 龄	背甲长	2.19±0.96%	2.41±0.36%	2.46±0.37%	2.70±0.78%	$H_{3,104}=0.273, P=0.971$
	背甲宽	3.17±0.77%	3.20±0.79%	2.48±0.49%	2.98±1.53%	$H_{3,104}=0.570, P=0.903$
	背甲高	5.27±1.07%	3.83±0.89%	4.46±0.87%	4.01±0.92%	$H_{3,104}=2.153, P=0.541$
	体重	5.16±0.73%	4.43±0.34%	4.90±0.53%	3.86±0.54%	$H_{3,104}=2.775, P=0.428$
1 月龄	背甲长	2.67±0.12%	2.23±0.02%	2.39±1.05%	2.40±0.10%	$H_{3,96}=4.979, P=0.173$
	背甲宽	3.35±0.30%	2.73±0.78%	2.64±0.52%	2.86±0.21%	$H_{3,96}=0.903, P=0.825$
	背甲高	9.13±0.90%	7.90±0.13%	7.67±0.17%	7.13±0.47%	$H_{3,96}=3.317, P=0.345$
	体重	4.54±0.59%	3.98±0.19%	4.31±0.23%	4.72±0.30%	$H_{3,96}=3.672, P=0.299$
3 月龄	背甲长	11.06±0.69%	9.85±0.62%	10.67±2.26%	10.32±0.36%	$H_{3,76}=1.389, P=0.708$
	背甲宽	10.40±0.44%	10.54±0.61%	10.31±0.30%	9.30±0.36%	$H_{3,76}=6.551, P=0.081$
	背甲高	22.92±1.04%	21.43±0.64%	21.85±0.51%	20.64±1.13%	$H_{3,76}=3.031, P=0.387$
	体重	56.89±3.11%	59.11±1.87%	61.05±1.58%	62.15±3.85%	$H_{3,76}=2.532, P=0.469$
6 月龄	背甲长	21.96±0.39%	20.61±1.22%	20.19±0.49%	21.60±0.83%	$H_{3,36}=8.969, P=0.300$
	背甲宽	21.09±0.34%	18.94±1.09%	19.73±0.51%	19.64±0.82%	$H_{3,36}=3.451, P=0.327$
	背甲高	17.40±1.39%	18.39±2.84%	18.02±0.62%	18.48±1.14%	$H_{3,36}=1.270, P=0.736$
	体重	61.02±2.04%	56.93±1.94%	58.13±1.60%	58.22±2.07%	$H_{3,36}=2.097, P=0.553$

注: Kruskal-Wallis 检验的 H 值和 P 值在表中表示, P 值大小代表显著程度.

在 14 d 时,对照组(C)的中华鳖背甲高和体重的增长率高于其他 3 个处理组,背甲长和背甲宽的增长率与其他 3 个处理组没有明显差别,但统计结果均未达到显著差异;在 1 月龄时,对照组(C)的中华鳖背甲长、背甲宽、背甲高的增长率高于其他 3 个处理组,但之间的差异并不显著,且高浓度处理组(H)的中华鳖的体重高于其他 3 个处理组;在 3 月龄时,对照组(C)的中华鳖背甲长和背甲高的增长率高于其他 3 个处理组,而中华鳖的背甲宽增长率和体重增长率最大分别出现在低浓度组(L)和高浓度组(H);在 6 月龄时,对照组(C)中华鳖的背甲长、背甲宽和体重的增长率高于其他 3 个处理组,但是高浓度处理组(H)的中华鳖的背甲高增长率高于其他 3 个处理组,均无显著差异($H_{3,36}=1.270,P=0.736$)。

2.2 不同浓度微塑料暴露对中华鳖稚鳖行为特征的影响

用线性回归分析实验时中华鳖稚鳖的背甲长、背甲宽、背甲高和体重与行为值(胆量实验中头部出现时间、前肢出现时间、整个身体出现时间;探索试验和社交实验中运动距离、平均速度、累计运动时间率)之间的相关性,发现出现时间与中华鳖的背甲长、背甲宽、背甲高和体重无显著相关性(all $P>0.05$),因此未将中华鳖的背甲长、背甲宽、背甲高和体重作为协变量进行分析。在探索实验和社交实验中,实验个体的运动距离、平均速度、累计运动时间率与背甲高之间存在显著相关性(all $P<0.05$),与背甲宽、背甲高和体重无显著相关性(all $P>0.05$)(表 2)。不同处理间的幼体胆量实验特征值(头部出现时间、前肢出现时间、整个身体出现时间)和活跃度实验行为特征值(运动距离、平均速度和累计运动时间率)不存在显著相关性(all $P>0.05$)(表 3),但在活跃度测试中,探索实验和社交实验个体行为值存在显著相关性(all $P<0.05$)(表 4)。

表 2 中华鳖稚鳖形态学(背甲长、背甲宽、背甲高、体重)与行为值(胆量实验中的头部出现时间、前肢出现时间、整个身体出现时间;探索实验和社交实验中运动距离、平均速度、累计运动率)相关性分析

Table 2 Pearson product-moment correlation coefficients between factors(tergum length,tergum width,tergum height,body mass) and behavioral values(traits assessed in“Boldness” trials,behavioral traits in the Exploration trial and Sociality trial) conducted on juvenile <i>Pelodiscus sinensis</i>									
形态学指标	胆量实验			探索试验			社交实验		
	头部出现时间	前肢出现时间	身体出现时间	移动距离	平均速度	累计运动率/%	移动距离	平均速度	累计运动率/%
背甲长	$r=0.101$ $P=0.205$	$r=0.102$ $P=0.198$	$r=0.101$ $P=0.204$	$r=0.109$ $P=0.171$	$r=0.109$ $P=0.171$	$r=0.120$ $P=0.129$	$r=0.222$ $P=0.005$	$r=0.222$ $P=0.005$	$r=0.157$ $P=0.048$
背甲宽	$r=0.044$ $P=0.578$	$r=0.045$ $P=0.569$	$r=0.042$ $P=0.594$	$r=0.125$ $P=0.116$	$r=0.125$ $P=0.116$	$r=0.126$ $P=0.113$	$r=0.055$ $P=0.554$	$r=0.055$ $P=0.554$	$r=0.020$ $P=0.734$
背甲高	$r=0.058$ $P=0.466$	$r=0.062$ $P=0.436$	$r=0.060$ $P=0.451$	$r=0.160$ $P=0.044$	$r=0.160$ $P=0.044$	$r=0.179$ $P=0.024$	$r=0.136$ $P=0.138$	$r=0.136$ $P=0.138$	$r=0.141$ $P=0.124$
体重	$r=0.065$ $P=0.413$	$r=0.069$ $P=0.388$	$r=0.068$ $P=0.392$	$r=0.107$ $P=0.178$	$r=0.107$ $P=0.178$	$r=0.123$ $P=0.121$	$r=0.101$ $P=0.203$	$r=0.101$ $P=0.203$	$r=0.102$ $P=0.198$

注:差异显著的因子用黑体表示。

表 3 中华鳖稚鳖胆量实验和活跃度实验的行为值关性分析

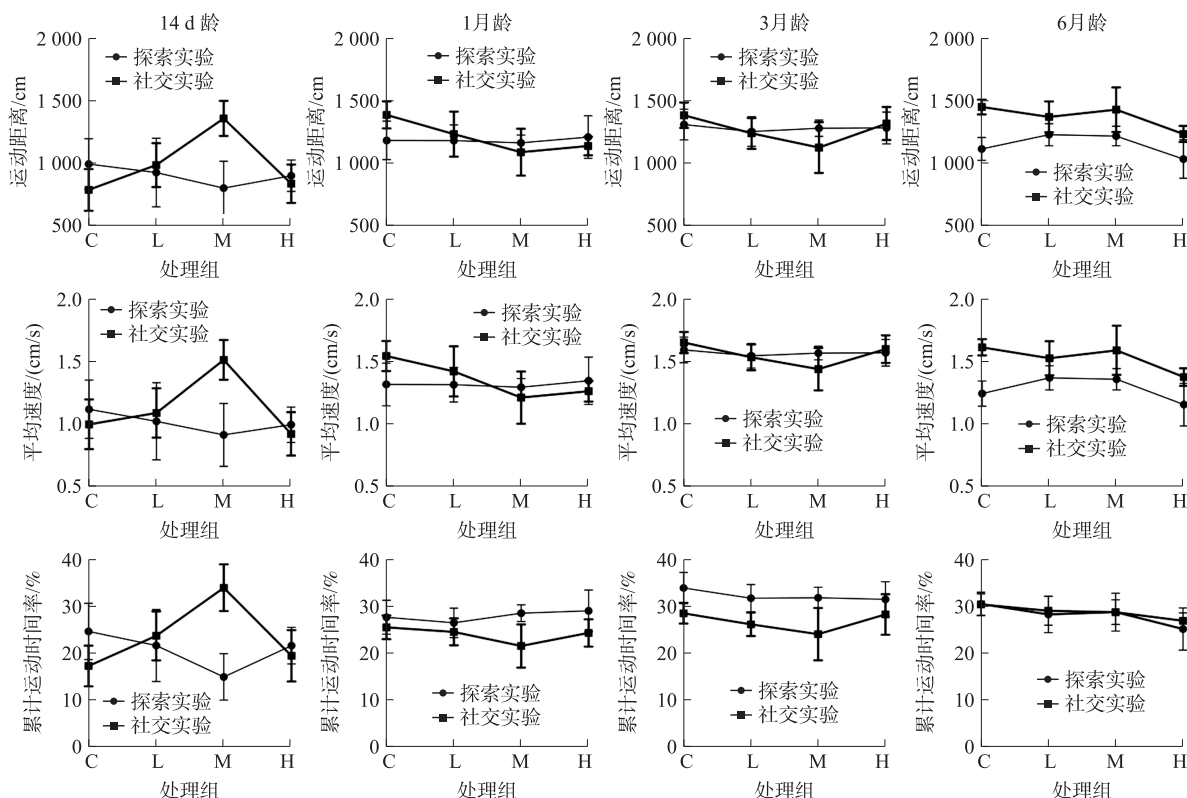
Table 3 Pearson product-moment correlation coefficients between traits assessed in “boldness” trials compared to the values of behavioral traits in the other two types of trials conducted on juvenile <i>Pelodiscus sinensis</i>			
行为特征值	头部出现时间	前肢出现时间	整个身体出现时间
运动距离	$r=0.078,P=0.325$	$r=0.072,P=0.364$	$r=0.074,P=0.356$
平均速度	$r=-0.081,P=0.306$	$r=0.075,P=0.344$	$r=-0.077,P=0.335$
累计运动率/%	$r=0.075,P=0.344$	$r=0.073,P=0.356$	$r=0.074,P=0.352$

表 4 活跃度测试中中华鳖稚鳖探索实验和社交实验行为特征值相关性分析

Table 4 Pearson product-moment correlation coefficients between two traits assessed in activity levels trials conducted on juvenile <i>Pelodiscus sinensis</i>			
行为特征值	运动距离	平均速度	累计运动时间率
运动距离	$r=0.257,P=0.001$	$r=0.246,P=0.002$	$r=0.169,P=0.032$
平均速度	$r=0.255,P=0.001$	$r=0.245,P=0.002$	$r=0.171,P=0.030$
累计运动率/%	$r=0.291,P<0.001$	$r=0.281,P<0.001$	$r=0.216,P=0.006$

注:差异显著的因子用黑体表示。

在探索实验和社交实验中发现,不同浓度的微塑料对不同阶段个体的探索实验和社交实验活跃度指标没有显著影响(all $P>0.05$) (图 1). 4 次实验期(14 d 龄、1 月龄、3 月龄和 6 月龄)不同实验处理对各个行为学特征值没有显著差异. 实验结果表明,不同浓度的微塑料对中华鳖稚鳖的活跃度没有影响.



实验设置 4 个处理组: C: 未添加微塑料; L: 添加 0.1 mg/L 聚苯乙烯微塑料; M: 添加 1 mg/L 聚苯乙烯微塑料; H: 添加 10 mg/L 聚苯乙烯微塑料

图 1 不同年龄段(14 d 龄、1 月龄、3 月龄和 6 月龄)不同处理的中华鳖稚鳖个体活跃度指标

Fig. 1 Juvenile *Pelodiscus sinensis* individual activity indicators for different treatments at different ages

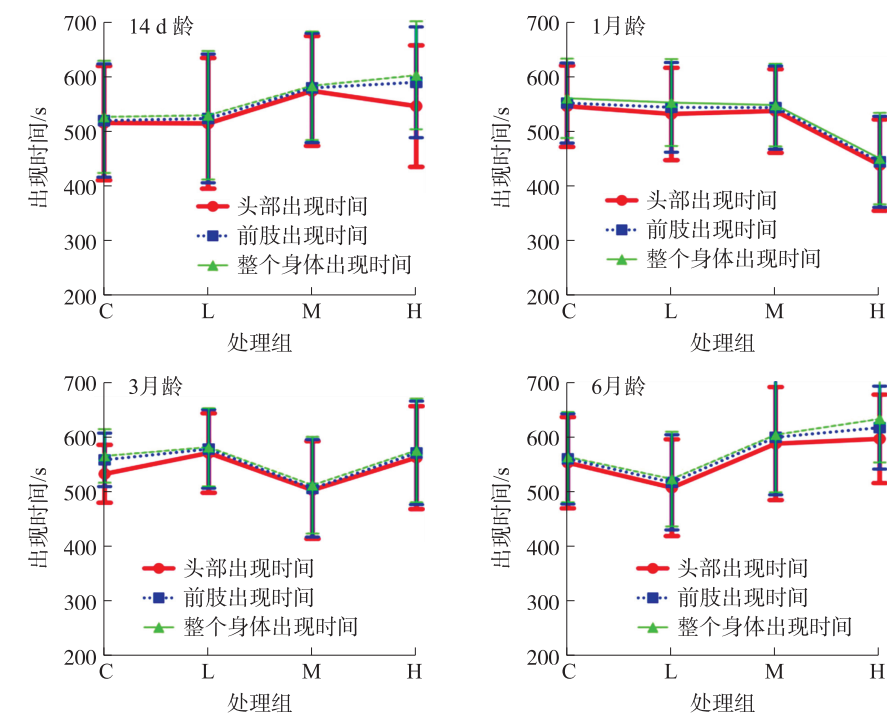
不同浓度处理下中华鳖稚鳖在 4 次实验期(14 d、1 个月、3 个月、6 个月)各部位出现时间均没有显著差异(14 d: 头部出现时间: $F_{3,36}=0.068, P=0.927$; 前肢出现时间: $F_{3,36}=0.119, P=0.948$; 整个身体出现时间: $F_{3,36}=0.134, P=0.939$; 1 个月: 头部出现时间: $F_{3,36}=0.397, P=0.756$; 前肢出现时间: $F_{3,36}=0.422, P=0.738$; 整个身体出现时间: $F_{3,36}=0.446, P=0.722$; 3 个月: 头部出现时间: $F_{3,36}=0.153, P=0.972$; 前肢出现时间: $F_{3,36}=0.174, P=0.913$; 整个身体出现时间: $F_{3,36}=0.165, P=0.919$; 6 个月: 头部出现时间: $F_{3,36}=0.206, P=0.891$; 前肢出现时间: $F_{3,36}=0.254, P=0.858$; 整个身体出现时间: $F_{3,36}=0.290, P=0.832$) (图 2).

在游速实验中发现,不同浓度微塑料对不同阶段的个体最大游速和平均游速的影响没有显著差异(all $P>0.05$) (图 3). 但是,4 次实验期的不同个体之间的最大游速之间存在显著差异($F_{3,116}=5.817, P=0.001$),而平均游速之间不存在显著差异($F_{3,116}=1.371, P=0.254$).

2.3 不同浓度微塑料暴露对中华鳖稚鳖肠道微生物的影响

24 个样品测序并经过初步过滤后,共获得 1454168 条有效序列. 序列经聚类后得到 3373 个 ASVs (特征序列). 其中,4 组共有 525 个 ASVs,分别占 C (对照组)、L (0.1mg/L)、M (1mg/L) 和 H (10mg/L) 组 ASVs 总数的 33.63%、37.93%、29.40% 和 36.53%. 所有样品的 ASVs 覆盖率在 100%,说明本次实验测序数据可以全面解读各样品中微生物群落的组成及丰度. 3 组处理的 24 个样品的稀释曲线趋于平缓,表明本次测序可以代表样品中真实的物种组成情况.

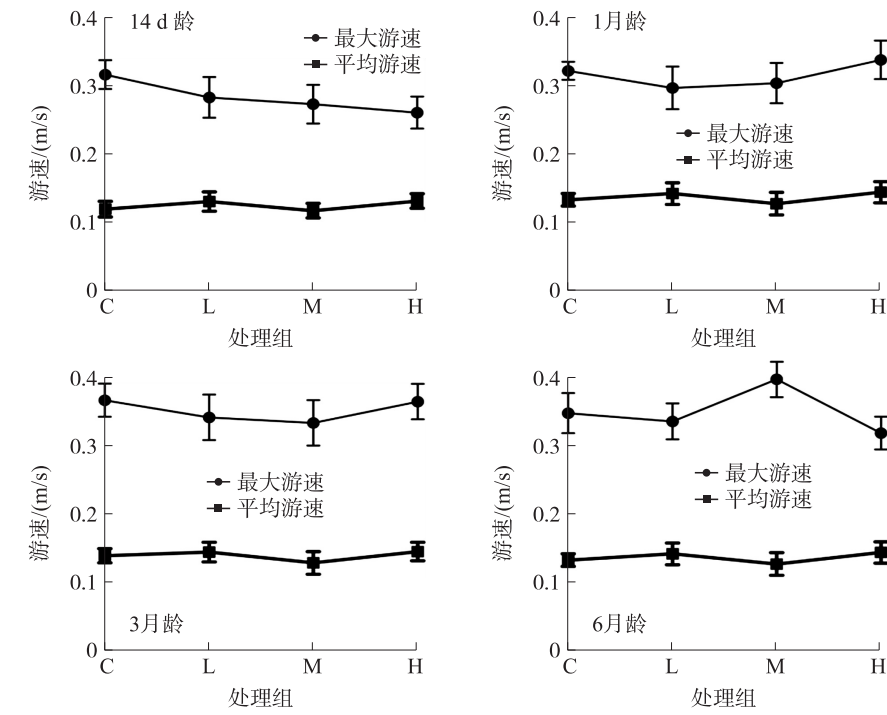
L 组中华鳖稚鳖的肠道群落 Chao1 丰富度估计量和 Observed_otus 指数显著低于其他 4 个组($P<0.05$),H 组的 Shannon 多样性指数和 Pielou-e 指数低于其他 3 个组,但不显著($P>0.05$),但 M 组的 Dominance 指数小于 C 组、L 组和 H 组. 这表明经过不同浓度微塑料喂养的中华鳖肠道微生物群落的丰富度存在显著差异($P<0.05$),在均匀度和多样性方面存在差异,但不显著($P>0.05$) (表 5).



实验设置 4 个处理:C:未添加微塑料;L:添加 0.1 mg/L 聚苯乙烯微塑料;M:添加 1 mg/L 聚苯乙烯微塑料;H:添加 10 mg/L 聚苯乙烯微塑料. 红色折线表示中华鳖头部出现时间;蓝色折线表示中华鳖前肢出现时间;绿色折线表示中华鳖整个身体出现时间. 数值用图中符号和标准误差来表示,字母缩写下同

图 2 不同年龄段(14 d 龄、1 月龄、3 月龄和 6 月龄)胆量实验中华鳖稚鳖各部位从庇护所中出现所需时间

Fig. 2 The time of emergence of various parts of juvenile *Pelodiscus sinensis* larvae from the shelter at different stages(14 days,1 month,3 months,and 6 months)in the gut experiment



实验设置 4 个处理:C:未添加微塑料;L:添加 0.1mg/L 聚苯乙烯微塑料;M:添加 1mg/L 聚苯乙烯微塑料;H:添加 10mg/L 聚苯乙烯微塑料

图 3 不同阶段(14 d 龄、1 月龄、3 月龄和 6 月龄)中华鳖稚鳖的最大游速和平均游速

Fig. 3 The maximum and mean swimming speed of juvenile *Pelodiscus sinensis* hatchings at different ages(14 days,1 month,3 months and 6 months)

表 5 不同处理下中华鳖稚鳖肠道细菌群落多样性指数

Table 5 Diversity of juvenile *Pelodiscus sinensis* gut bacterial community

实验组	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Dominance 指数	Pielou_e 指数	observed_otus 指数
C	555.82±27.96	6.04±0.07	0.94±0.01	0.06±0.01	0.66±0.01	550.00±28.17
L	471.08±9.01	5.91±0.19	0.93±0.01	0.07±0.01	0.67±0.02	496.17±8.72
M	591.56±30.83	6.34±0.26	0.95±0.02	0.05±0.02	0.69±0.03	590.67±30.96
H	513.86±28.56	5.88±0.28	0.93±0.02	0.07±0.02	0.65±0.03	513.00±28.65
统计结果	$H_{3,20}=9.567$ $P=0.023$	$H_{3,20}=2.727$ $P=0.436$	$H_{3,20}=1.467$ $P=0.690$	$H_{3,20}=1.467$ $P=0.690$	$H_{3,20}=1.106$ $P=0.775$	$H_{3,20}=9.470$ $P=0.024$

注:表中数据以(平均值±标准误)表示,差异显著的因子用黑体表示。

根据物种注释结果,本研究中 24 个样品所含类群归为 22 个门、53 个纲、124 个目、230 个科、535 个属。基于门水平上菌群结构分析显示,在中华鳖稚鳖的肠道菌群中占比较大的菌门有变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)和厚壁菌门(Firmicutes),相对所占比例分别为 18.93%、27.84%和 25.83%。此外,在中华鳖稚鳖肠道菌群占比较高的还有梭杆菌门(Fusobacteriota, 13.41%),蓝细菌门(Cyanobacteria, 9.50%),疣微菌门(Verrucomicrobiota, 1.50%),迷踪菌门(Elusimicrobiota, 0.64%),酸杆菌门(Actinobacteriota, 1.03%),脱硫杆菌门(Desulfobacterota, 0.61%),蛭弧菌门(Bdellovibrionota, 0.12%)(图 4)。因此,构成中华鳖肠道的优势菌群大多来自于变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门,也有一些分布在梭杆菌门和蓝细菌门。

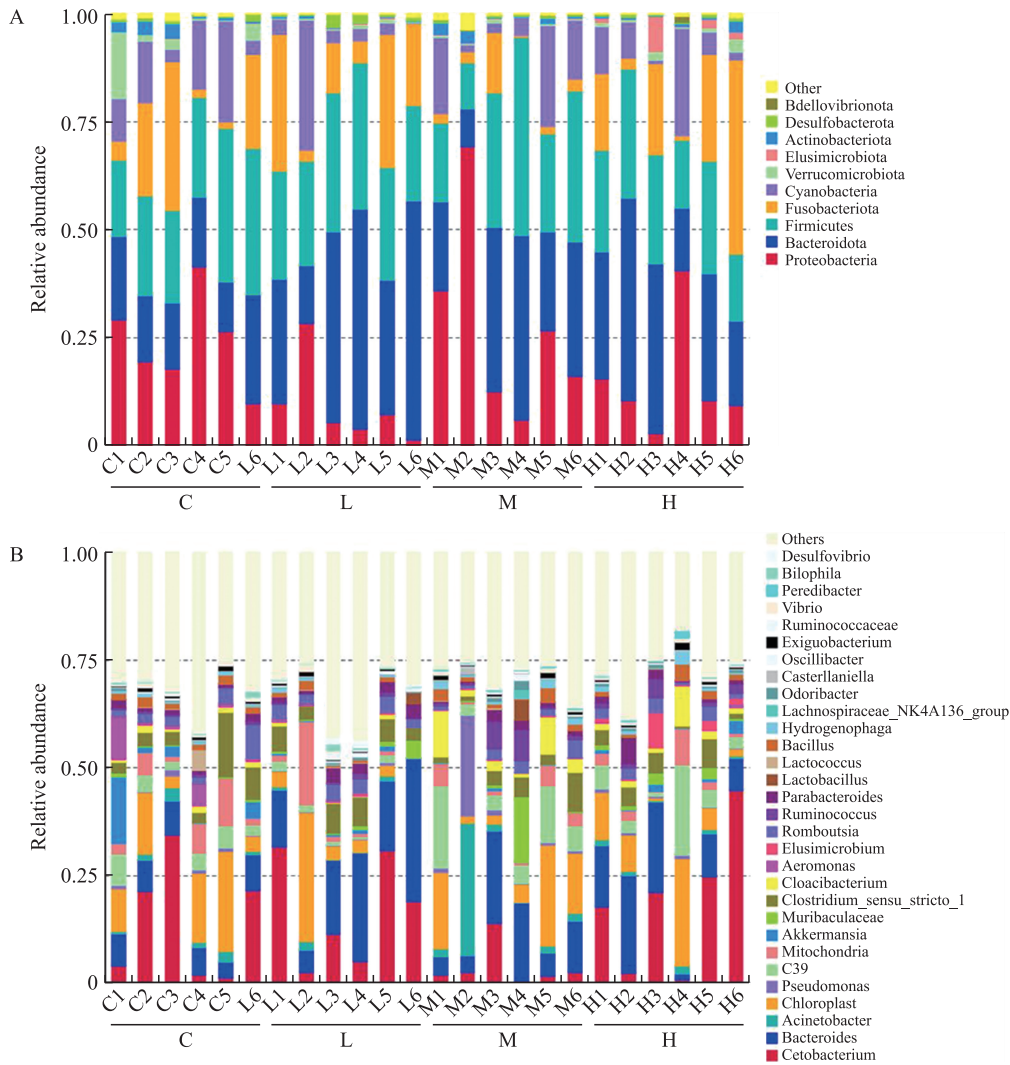
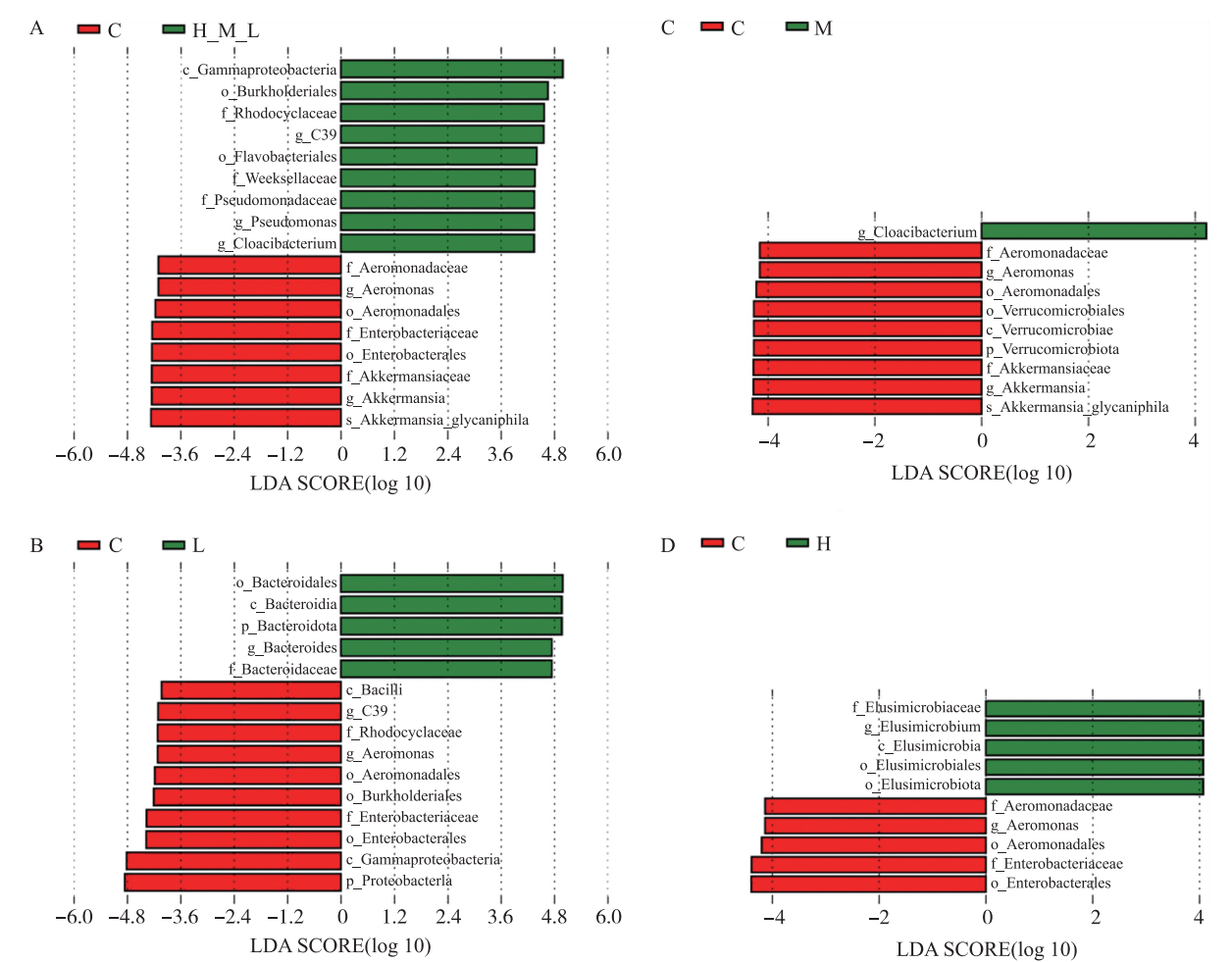


图 4 A:不同处理下中华鳖稚鳖肠道菌群门的相对丰度;B:不同处理下中华鳖肠道微生物属水平相对丰度前 30 的菌群
Fig. 4 A. The relative abundance of gut microbiota taxa on phylum in juvenile *Pelodiscus sinensis* under different treatments
B. Top thirty genus-level relative abundance of gut microbiota in *Pelodiscus sinensis* under different treatments

在属水平上,鲸杆菌属(*Cetobacterium*)是 C 组和 H 组中华鳖最占优势的属,其占比分别为 14.08%和 18.58%,而在 L 组和 M 组中,拟杆菌属(*Bacteroides*)是最占优势的属,比例分别达到了 18.28%和 10.75%. 其次,在 C 组和 H 组占比较多的是拟杆菌属(*Bacteroides*),其占比达到了 6.78%和 12.69%. 在 L 组,占比第二的是鲸杆菌属(*Cetobacterium*),其占比为 16.74%,而在 M 组,占比第二的是 C39 属(C39),其占比达到了 7.99%. 此外不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、阿克曼菌属(*Akkermansia*)等在 4 组中华鳖肠道菌群内占比较多(图 4).

比较 4 组不同处理的中华鳖稚鳖肠道菌群的 LDA 分布柱状图(图 5 A-D),结果表明,C 组和 M 组的肠道菌群在组成上存在显著性差异. 在科水平上,C 组中阿克曼菌科(*Akkermansiaceae*),肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)和气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)为优势菌群;而 M 组的优势菌群为假单胞杆菌科(*Pseudomonadaceae*),周蝶菌科(*Weeksellaceae*)和红环菌科(*Rhodocyclaceae*). 在属水平上,C 组的优势菌群为气单胞菌属(*Aeromonas*)和阿克曼菌属(*Akkermansia*),而在 M 组管道杆菌属(*Cloacibacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和 C39 属(C39)占比较高.

L 组与 C 组相比,在属水平上,C 组气单胞菌属(*Aeromonas*)和 C39 属细菌相对丰度较高,而在 L 组中,拟杆菌属细菌为优势菌(图 5B). M 组和 C 组相比,阿克曼菌属和气单胞菌属是 C 组的优势菌属,M 组中管道杆菌属(*Cloacibacterium*)为优势菌(图 5C). H 组和 C 组相比,气单胞菌属在 C 组丰度最高,H 组中 *Elusimicrobiaceae* 丰度最高(图 5D).



A:4 个处理之间的 LDA 值;B:C-L 组之间的 LDA;C:C-M 组之间的 LDA 值;D:C-H 组之间的 LDA 值
柱状图的长度代表差异物种的影响大小(|LDA|>4)

图 5 LDA 值分布柱状图
Fig. 5 Histogram of LDA value distribution

3 讨论

3.1 不同浓度微塑料暴露对中华鳖稚鳖形态特征的影响

本研究发现,喂食不同浓度的微塑料后,中华鳖稚鳖在4个生长阶段的形态学指标并没有出现显著性差异,结果表明稚鳖在摄入10 μm 级的微塑料颗粒对其生长没有显著影响,这与以往大多数类似研究的结果相反. 已有研究表明摄入微塑料会影响生物机体的生长^[35-36]. 当指甲履螺(*Crepidula onyx*)暴露在2~2.4 μm 的微塑料中时,其生长会受到显著抑制^[36]. 物种自身大小和其对微塑料的耐受能力是造成其结果相异的原因之一. De Felice 等人研究不同浓度微塑料对非洲爪蟾(*X. tropicalis*)的影响时发现,摄入微塑料并不会影响到非洲爪蟾(*X. tropicalis*)的形态生长^[37],这与本研究结果一致. 研究发现,小粒径的微塑料颗粒可以快速通过排泄系统转运到生物体外,从而未对生物的生长和发育构成相应危害^[25]. 本研究中小粒径的微塑料未影响稚鳖形态生长的原因可能是微塑料对中华鳖稚鳖生长早期营养物的吸收和转运没有显著影响.

3.2 不同浓度微塑料暴露对中华鳖稚鳖行为特征的影响

在胆量实验和活跃度实验中,中华鳖稚鳖并没有表现出一致的行为. 通过比较皮尔逊相关系数,结果表明,活跃度实验和胆量实验之间的个体行为并不存在显著的联系,然而,探索试验和社交实验之间存在显著相关性,这表明,中华鳖稚鳖在探索试验和社交实验的行为表现出一致性(表4),这与以前的一些研究结果相一致. Li 等人通过对3种不同繁殖模式的蜥蜴进行研究发现,当在探索试验中表现活跃的个体在社交实验中也表现的更加活跃,并且拥有更大的胆量,这就表明,当某一个体在一个实验中表现得活跃时,在另一个相似的实验中也会表现的更加活跃^[38]. 本研究发现,探索试验的行为学指标与社交实验的行为学指标分别与背甲高、背甲长之间存在显著相关性,这表明个体的形态会影响动物的运动,且背甲越大越高,其移动距离、移动速度和活动率更高. 之前的证据也证实了此研究,即拥有更高更大的体形,其往往有更强的运动能力和更大的活动范围^[28-39].

动物个体之间存在个性差异,而个性是由觅食(或交配)收益和相关风险之间的权衡决定的,具有重要的进化和生态意义^[40]. 而胆量对动物在不可预测的环境中所做的决定有着深远的影响^[41]. 大胆的个体可能会花费更多的时间来寻找猎物,并更快地利用一种新的食物资源^[42]. 本研究中摄入不同浓度的微塑料并不会影响中华鳖稚鳖从遮蔽物中出来的时间,这种现象并不会随时间而变化,且通过比较形态学指标与胆量行为值之间的皮尔逊相关系数发现,体形大小与个体的胆量之间并不存在显著相关性,因此,体形大小并不会影响中华鳖稚鳖的胆量. 结果表明,摄入微塑料并不会影响到中华鳖稚鳖的胆量. 已有研究发现,胆量越大的个体在自然界中能够更积极地捕获微塑料颗粒^[43],而摄入微塑料并不会改变个体的胆量,这可能说明影响个体胆量的并不是微塑料浓度的高低. 个体的胆量在更多情况下是多种因素协同作用的结果,例如遗传、温度、食物以及生活史特征等^[44].

本研究中摄入不同浓度的微塑料对中华鳖的发育以及中华鳖稚鳖的运动没有影响. 当许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)摄入微塑料后,其探索行为和觅食行为都下降,但当鱼类7 d 不摄入微塑料后,其行为会得到显著恢复^[45],这可能是由于在净化期间,鱼类将体内的微塑料排出体外. 这表明如果摄入微塑料的个体将微塑料快速排出体外,可能不会影响到其行为变化. 研究发现,当非洲爪蟾(*X. tropicalis*)蝌蚪摄入微塑料后,包括移动距离、游泳速度在内的指标均未发生显著变化,因为蝌蚪可以将体内的微塑料颗粒快速排出体外^[37]. 微塑料粒径过小也可能是造成中华鳖稚鳖在摄入微塑料后行为没有发生变化的原因. 不同物种行为对微塑料不同响应的差异可能是由于物种特异性,不同发育阶段或者不同物种的活动类型引起的^[37,46]. 研究表明,能够引起生物行为改变的大多是因为微塑料与其他污染物的协同作用,而单独的微塑料暴露很少或极少情况下会引起生物行为的改变^[47].

通常生物生活在不良条件下,动物移动速度会下降,甚至会出现耐力下降的情况^[48]. 本研究中摄入不同浓度微塑料的中华鳖稚鳖的最大游动速度和平均速度在4个实验期无显著差异(all $P>0.05$).

通过比较4个实验期中华鳖的最大游动速度和形态学(背甲长、背甲宽、背甲高、体重)的皮尔逊相关系数发现,中华鳖的形态与最大游泳速度之间存在显著的相关性(all $P<0.05$). 然而,平均速度与形态学指标之间并不存在显著相关性. 这表明,体形越大,中华鳖的最大游动速度越快. 这与之前的研究结果一致,即体形越大,速度越快^[40].

3.3 不同浓度微塑料对中华鳖稚鳖肠道微生物的影响

在不同浓度微塑料暴露下,中华鳖肠道菌群的丰富度发生显著改变,但多样性并没有显著变化.中华鳖肠道菌群丰度发生变化主要可能由于摄入微塑料后不断磨损肠道,而肠道微生物发生改变以对抗微塑料摄入造成的机械损伤和炎症^[49].金头鲷(*Sparus aurata*)摄入日常饮食的 12% 的微塑料时,其肠道菌群的多样性和组成之间均无产生显著差异,但是肠道菌群组成发生细微改变,这与本研究结果一致.微塑料形状也可能是肠道微生物发生改变的重要原因之一^[50].当摄入微塑料微球时,斑马鱼(*Danio rerio*)肠道菌群仅仅在菌群丰富度发生变化,而多样性同样没有显著改变.然而,摄入微塑料纤维的斑马鱼,其肠道菌群的丰富度和菌群多样性皆发生显著变化^[50].

虽然中华鳖稚鳖肠道菌群在摄入不同浓度微塑料后会发生改变,但有 92.84%~97.70% 的 ASVs 在不同浓度间保持不变.其中有 27.28% 来自拟杆菌门,27.70% 来自变形菌门,27.36% 来自厚壁菌门,13.41% 来自梭杆菌门,9.50% 来自蓝细菌门.已有研究表明中华鳖肠道菌群中拟杆菌门、厚壁菌门、梭杆菌门和变形菌门是主要优势菌门,这与本研究结果一致^[51].占比较大的拟杆菌门和厚壁菌门分别负责肠胃中降解碳水化合物和促进纤维素分解为可供宿主利用的短链脂肪酸,促进肠道免疫系统发育^[52].摄入不同浓度微塑料后中华鳖稚鳖肠道菌群的共有菌群在维持中华鳖稚鳖基本功能以及肠道菌群的动态变化中起着重要作用.

健康的动物肠道与菌群之间通过和谐的相互关系来保持生物稳态,当菌群的组成或功能失调时,会引起肠道疾病或其他疾病^[53].当摄入中等浓度的微塑料时会导致许多条件致病菌占比增加,如管道杆菌属(*Cloacibacterium*)和假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)等.管道杆菌属(*Cloacibacterium*)与肠道炎症失调有关,并且其相对丰度与肠道健康成反比^[54].假单胞杆菌属的某些细菌也会使机体产生某些反应,例如,铜绿色假单胞菌会引起肺炎和败血症等,严重时甚至会造成机体死亡^[55].多种条件致病菌的富集表明,摄入中等浓度的微塑料会对中华鳖稚鳖的健康造成负面影响,增加个体感染疾病的风险.拟杆菌属在低浓度处理组富集表明,当摄入较低浓度的微塑料时,中华鳖稚鳖需要通过大量降解碳水化合物,以维持在微塑料胁迫下的免疫稳态^[52].同对照组相比,在摄入高浓度的微塑料后,中华鳖稚鳖肠道内 *Elusimicrobiaceae* 属呈现显著优势,该菌属能将糖降解为乙酸、苹果酸、丁酸或乙醇^[56],这可能是由于摄入微塑料后,降低了宿主对糖降解的能力.气单胞菌属在对照组丰度最高,而中华鳖其他 3 个处理没有发现其菌属的富集,此现象同样在斑马鱼中发现.当斑马鱼摄入微塑料后,可以明显地观察到气单胞菌属显著下降^[50].这表明,摄入微塑料会改变某些菌属的特异性富集,并且可能会导致机体产生某些炎症反应.

摄入微塑料显著改变肠道微生物的组成、丰度及多样性^[6,9,11].本研究发现摄入微塑料会显著改变动物肠道微生物的丰度,同样会改变多样性,但并不显著.此外,摄入不同浓度的微塑料还会改变某些条件致病菌的占比以及某些与消化有关的菌类种群数量增加.这说明,微塑料会在一定程度上改变中华鳖稚鳖的肠道菌群,然而影响中华鳖稚鳖肠道微生物方面起决定性作用是微塑料浓度还是微塑料形状还需要进一步探究.

4 结论

喂食不同浓度微塑料,没有显著影响中华鳖稚鳖 14 d 龄、1 月龄、3 月龄和 6 月龄的形态指标和行为表现,中华鳖的游速与体型呈现正相关关系.通过比较摄入不同浓度微塑料的中华鳖稚鳖 14 d 的肠道菌群组成发现,变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)是构成肠道菌群的核心菌群.摄入 0.1 mg/L 微塑料的中华鳖稚鳖肠道菌群的丰度显著降低,肠道细菌群落多样性并没有发生显著变化.此外,摄入不同浓度的微塑料还会改变某些条件致病菌的富集以及与某些消化有关的菌群富集,例如:拟杆菌属(*Bacteroides*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、管道杆菌属(*Cloacibacterium*)等.

[参考文献]

- [1] JAMBECK R, GEYER R, WILCOX C, et al. Plastic waste inputs from land into the ocean[J]. Science, 2015, 347(6223): 768-771.

- [2] 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.
- [3] SU L, XUE Y G, LI L Y, et al. Microplastics in Taihu Lake, China[J]. Environmental pollution, 2016, 216: 711-719.
- [4] NELMS S E, GALLOWAY T S, GODLEY B J, et al. Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators[J]. Environmental pollution, 2018, 238: 999-1007.
- [5] COLE M, LINDEQUE P, FILEMAN E, et al. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus* [J]. Environmental science & technology, 2015, 49(2): 1130-1137.
- [6] HUANG J N, WEN B, ZHU J G, et al. Exposure to microplastics impairs digestive performance, stimulates immune response and induces microbiota dysbiosis in the gut of juvenile guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. Science of the total environment, 2020, 733: 138929.
- [7] ARAÚJO A, MALAFAIA G. Microplastic ingestion induces behavioral disorders in mice: A preliminary study on the trophic transfer effects via tadpoles and fish[J]. Journal of hazardous materials, 2021, 401: 123263.
- [8] DUAN Y F, XIONG D L, WANG Y, et al. Toxicological effects of microplastics in *Litopenaeus vannamei* as indicated by an integrated microbiome, proteomic and metabolomic approach[J]. Science of the total environment, 2021, 761: 143311.
- [9] WANG K, LI J H, ZHAO L W, et al. Gut microbiota protects honey bees (*Apis mellifera* L.) against polystyrene microplastics exposure risks[J]. Journal of hazardous materials, 2021, 402: 123828.
- [10] O' HARA P D, AVERY-GOMM S, WOOD J, et al. Seasonal variability in vulnerability for Cassin's auklets (*Ptychoramphus aleuticus*) exposed to microplastic pollution in the Canadian Pacific region[J]. Science of the total environment, 2019, 649: 50-60.
- [11] YAN W, HAMID N, DENG S, et al. Individual and combined toxicogenetic effects of microplastics and heavy metals (Cd, Pb, and Zn) perturb gut microbiota homeostasis and gonadal development in marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. Journal of hazardous materials, 2020, 397: 122795.
- [12] DESFORGES J P W, GALBRAITH M, ROSS P S. Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean[J]. Archives of environmental contamination and toxicology, 2015, 69(3): 320-330.
- [13] WATTS A J R, URBINA M A, CORR S, et al. Ingestion of plastic microfibers by the crab *Carcinus maenas* and its effect on food consumption and energy balance[J]. Environmental science & technology, 2015, 49(24): 14597-14604.
- [14] SU L, CAI H W, KOLANDHASAMY P, et al. Using the Asian clam as an indicator of microplastic pollution in freshwater ecosystems[J]. Environmental pollution, 2018, 234: 347-355.
- [15] COLLARD F, GASPERI J, GILBERT B, et al. Anthropogenic particles in the stomach contents and liver of the freshwater fish *Squalius cephalus* [J]. Science of the total environment, 2018, 643: 1257-1264.
- [16] DUNCAN E M, BRODERICK A C, FULLER W J, et al. Microplastic ingestion ubiquitous in marine turtles[J]. Global change biology, 2019, 25(2): 744-751.
- [17] AMELINEAU F, BONNET D, HEITZ O, et al. Microplastic pollution in the Greenland Sea: Background levels and selective contamination of planktivorous diving seabirds[J]. Environmental pollution, 2016, 219: 1131-1139.
- [18] NOVILLO O, RAGA J, TOMÁS J. Evaluating the presence of microplastics in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded in the Western Mediterranean Sea[J]. Marine pollution bulletin, 2020, 160: 111557.
- [19] ADEOGUN A O, IBOR O R, KHAN E A, et al. Detection and occurrence of microplastics in the stomach of commercial fish species from a municipal water supply lake in southwestern Nigeria[J]. Environmental science and pollution research, 2020, 27: 31035-31045.
- [20] LUÍS CARLOS DE SÁ, MIGUEL O, FRANCISCA R, et al. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? [J]. Science of the total environment, 2018, 645: 1029-1039.
- [21] ABREO N A S, MACUSI E D, BLATCHLEY D D. Ingestion of marine plastic debris by green turtle (*Chelonia mydas*) in Davao Gulf, Mindanao, Philippines[J]. Philippine journal of science, 2016, 145(1): 17-23.
- [22] CARON A G M, THOMAS C R, BERRY K L E, et al. Ingestion of microplastic debris by green sea turtles (*Chelonia mydas*) in the Great Barrier Reef: validation of a sequential extraction protocol[J]. Marine pollution bulletin, 2018, 127: 743-751.
- [23] HOSSAIN M S, RAHMAN M S, UDDIN M N, et al. Microplastic contamination in penaeid shrimp from the northern bay of bengal[J]. Chemosphere, 2020, 238: 124688.
- [24] MCCOY K A, HODGSON D J, CLARK P F, et al. The effects of wet wipe pollution on the Asian clam, *Corbicula fluminea* (Mollusca: Bivalvia) in the River Thames, London[J]. Environmental pollution, 2020, 264: 114577.

- [25] HU L L, SU L, XUE Y G, et al. Uptake, accumulation and elimination of polystyrene microspheres in tadpoles of *Xenopus tropicalis*[J]. Chemosphere, 2016, 164: 611–617.
- [26] 贺刚, 方春林, 吴斌, 等. 饲料中添加微生态制剂对中华鳖幼鳖生长、消化及生化指标的影响[J]. 饲料工业, 2019, 40(20): 17–21.
- [27] MILLER S, DERENNE A, ELLIS-FELEGE S, et al. Incubation temperature and satiety influence general locomotor and exploratory behaviors in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) [J]. Physiology and behavior, 2020, 220: 112875.
- [28] LI H, HOLLELEY C E, ELPHICK M, et al. The behavioural consequences of sex reversal in dragons[J]. Proceedings of the royal society B—biological sciences, 2016, 283(1832): 20160217.
- [29] MICHELANGELI M, CHAPPLE D G, GOULET C T, et al. Behavioral syndromes vary among geographically distinct populations in a reptile[J]. Behavioral ecology, 2019, 30(2): 393–401.
- [30] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature methods, 2016, 13(7): 581–583.
- [31] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic acids research, 2013, 41(1): 590–596.
- [32] LI B, ZHANG X X, GU F, et al. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis[J]. Water research, 2013, 47(13): 4207–4216.
- [33] LOZUPONE C A, HAMADY M, KELLEY S T, et al. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities[J]. Applied and environmental microbiology, 2007, 73(5): 1576–1585.
- [34] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome biology, 2011, 12(6): R60.
- [35] BESSELING E, WANG B, LÜRLING M, et al. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *Daphnia magna*[J]. Environmental science & technology, 2014, 48(23): 12336–12343.
- [36] LO H K A, CHAN K Y K. Negative effects of microplastic exposure on growth and development of *Crepidula onyx*[J]. Environmental pollution, 2018, 233: 588–595.
- [37] DE FELICE B, BACCHETTA R, SANTO N, et al. Polystyrene microplastics did not affect body growth and swimming activity in *Xenopus laevis* tadpoles[J]. Environmental science and pollution research, 2018, 25: 34644–34651.
- [38] LI H, ELPHICK M, SHINE R. Potential targets for selection during the evolution of viviparity in cold-climate reptiles[J]. Oecologia, 2017, 183(1): 21–30.
- [39] MUIR A P, BIEK R, THOMAS R, et al. Local adaptation with high gene flow: temperature parameters drive adaptation to altitude in the common frog (*Rana temporaria*) [J]. Molecular ecology, 2014, 23(4): 561–574.
- [40] WILSON D S, CLARK A B, COLEMAN K, et al. Shyness and boldness in humans and other animals[J]. Trends in ecology & evolution, 1994, 9: 442–446.
- [41] FROST A J, WINROW-GIFFEN A, ASHLEY P J, et al. Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of boldness? [J]. Proceedings of the royal society B—biological sciences, 2007, 274(1608): 333–339.
- [42] MAGNHAGEN C, STAFFAN F. Social learning in young-of-the-year perch encountering a novel food type[J]. Journal of fish biology, 2003, 63(3): 824–829.
- [43] CHEN Y L, LI W W, XIANG L L, et al. Fish personality affects their exposure to microplastics[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2022, 233: 113301.
- [44] HORVATH G, RODRIGUEZ-RUIZ G, MARTIN J, et al. Maternal diet affects juvenile Carpetan rock lizard performance and personality[J]. Ecology and evolution, 2019, 9(82): 14476–14488.
- [45] YIN L Y, LIU H Y, CUI H W, et al. Impacts of polystyrene microplastics on the behavior and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*) [J]. Journal of hazardous materials, 2019, 380: 120861.
- [46] TESETTO L, BROWN C, WILLIAMSON J E. Microplastics on beaches: ingestion and behavioural consequences for beachhoppers[J]. Marine biology, 2016, 163(10): 199.
- [47] CHEN Q Q, GUNDLACH M, YANG S Y, et al. Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity[J]. Science of the total environment, 2017, 584: 1022–1031.
- [48] GU L Q, TIAN L, GAO G, et al. Inhibitory effects of polystyrene microplastics on caudal fin regeneration in zebrafish larvae[J]. Environmental pollution, 2020, 266: 114664.
- [49] VAROPPPÓ I, OSORIOB K, ESTENSOROD I, et al. Effect of virgin low density polyethylene microplastic ingestion on

- intestinal histopathology and microbiota of gilthead sea bream[J]. *Aquaculture*,2021,545:737245.
- [50] QIAO R X,DENG Y F,ZHANG S H,et al. Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish[J]. *Chemosphere*,2019,236:124334.
- [51] WU B L,HUANG L,CHEN J,et al. Gut microbiota of homologous Chinese soft-shell turtles(*Pelodiscus sinensis*) in different habitats[J]. *BMC microbiology*,2021,21:142.
- [52] JAMI E,ISRAEL A,KOTSER A,et al. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood[J]. *ISME journal*,2013,7(6):1069–1079.
- [53] CHU H T,KHOSRAVI A,KUSUMAWARDHANI I P,et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Science*,2016,352(6289):1116–1120.
- [54] HIRANO A,UMENO J,OKAMOTO Y,et al. A comparison of the mucosa-associated microbial community structure between inflamed and non-inflamed sites in patients with ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*,2018,154(1):S2.
- [55] RAMIREZ-ESTRADA S,BORGATTA B,RELLO J. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management[J]. *Infection and drug resistance*,2016,9:7–18.
- [56] MEHEUST R,CASTELLE C J,CARNERVAI P B M,et al. Groundwater Elusimicrobia are metabolically diverse compared to gut microbiome Elusimicrobia and some have a novel nitrogenase paralog[J]. *ISME journal*,2020,14(12):2907–2922.

[责任编辑:黄 敏]