

不同粒径微塑料对红树林线虫生活史的影响

何永姑

自然资源部海口海洋中心, 海南 海口

收稿日期: 2024年4月12日; 录用日期: 2024年6月1日; 发布日期: 2024年6月11日

摘 要

本文利用玉米培养基成功培养红树林线虫 *Viscosia heterolaima* sp, 并观察到线虫的胚胎发育及胚后发本文对线虫 *Viscosia heterolaima* sp 进行暴露不同粒径微塑料暴露, 以致死率、怀卵数、胚胎发育时间、后代数目等评估不同粒径的微塑料颗粒对线虫生活史的影响, 发现致死率与微塑料的浓度无关, 与微塑料的粒径有关, 粒径(0.1、1.0、3.0、5.0) μm 微塑料颗粒对线虫 *Viscosia heterolaima* sp 死亡率产生显著影响, 其中, 3 μm 粒径微塑料对线虫成活率影响最大平均致死率为24.17%, 与对照组差异显著($P < 0.01$), 浓度2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 粒径为0.1、1.0、3.0和5.0 μm 的微塑料均能降低线虫的怀卵数, 其中, 粒径3 μm 线虫怀卵数影响最大(抑制率为36.57%), 与对照组差异极显著($P < 0.01$); 微塑料处理组对线虫胚胎1细胞、2细胞、多细胞期、囊胚期、原肠胚期、蠕虫的发育时间明显延长, (0.1、1.0、3.0、5.0) μm 微米微塑料处理组胚胎发育持续时间分别为 65.05 ± 1.19 hr, 66.39 ± 0.94 hr, 69.04 ± 0.89 hr, 64.49 ± 1.28 hr, 3.0 μm 微塑料处理对线虫胚胎发育持续时间影响最大, 与对照组差异极显著($P < 0.01$); 将线虫暴露于2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.1~5.0 μm 的微塑料溶液后, 微塑料颗粒主要分布在线虫 *Viscosia heterolaima* sp 肠道中, 各粒径微塑料在线虫体内差异明显。其中, 3.0 μm 的微塑料颗粒在线虫 *Viscosia heterolaima* sp 体内的荧光强度最强; 不同粒径微塑料都能降低线虫 *Viscosia heterolaima* sp 后代数目, 使线虫的后代数目显著降低, 抑制率达15.37%~40.35%。

关键词

微塑料, 红树林线虫, 生活史影响

Effects of Different Particle Sizes of Microplastics on the Life Cycle of Mangrove Nematodes

Yonggu He

Haikou Marine Center of the Ministry of Natural Resources, Haikou Hainan

Received: Apr. 12th, 2024; accepted: Jun. 1st, 2024; published: Jun. 11th, 2024

Abstract

In this study, the effect of microplastic particles on the life cycle of nematodes, *Viscosia heterolaima* sp., was evaluated by fatality rate, number of eggs, embryonic development time, and number of offspring. It was found that the fatality rate was not related to the concentration of the microplastics, but to the particle size of the microplastics. The particle size (0.1, 1.0, 3.0, 5.0) of the microplastics had a significant effect on the fatality rate of *Viscosia heterolaima* sp. The average fatality rate was 24.17% ($P < 0.01$). 1.0, 3.0 and 5.0 μm microplastics could reduce the number of eggs of nematodes, and the effect of 3 μm microplastics on the number of eggs of nematodes was the greatest (inhibition rate was 36.57%), which was significantly different from the control group ($P < 0.01$). The development time of 1-cell, 2-cell, multicellular, blastocyst, gastrula and helminth stage of nematode embryos treated with microplastics was significantly prolonged, and the development duration of embryos treated with (0.1, 1.0, 3.0, 5.0) μm microplastics was 65.05 ± 1.19 hr, respectively. Hr, 66.39 ± 0.94 hr, 69.04 ± 0.89 hr, 64.49 ± 1.28 hr, 3.0 μm Microplastic treatment had the greatest effect on the duration of embryo development of nematode, and the difference was very significant ($P < 0.01$). After the nematodes were exposed to $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.1~5.0 μm microplastic solution, the microplastic particles were mainly distributed in the gut of the nematode *Viscosia heterolaima* sp. Among them, the fluorescence intensity of 3.0 μm microplastic particles was the strongest in *Viscosia heterolaima* sp. The number of progeny of nematode *Viscosia heterolaima* sp was significantly reduced by microplastics with different particle size, and the inhibition rate was 15.37%~40.35%.

Keywords

Microplastics, Mangrove Nematodes, Life Cycle Effects

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

从上个世纪开始许多研究者就认识到了海洋线虫对海洋环境的指示作用重要性[1],特别是关于人类活动产生的污染对小型底栖生物的研究[2]。随着大量研究证明微塑料在海洋环境中广泛分布,这些微塑料是否能被海洋生物摄取成为许多研究人员关注的重点,迄今为止,研究人员已经在多种海洋生物中发现了微塑料;海洋生物通过不同方式摄取微塑料,密度较轻的微塑料易被浮游动物摄取,而密度较大的微塑料容易沉降,被底栖生物摄取,通过食物链传递,通过不同的营养级转移和放大[3],海洋线虫是底栖生物的一大类,底栖生物可通过各种途径摄入沉积物微塑料,低营养级的底栖生物更加容易摄取沉积物微塑料,通过食物网的传递作用,可能引起更高营养级生物累积效应[4]。海洋线虫作为底栖生物的优势类群,在生态系统中具有重要作用,目前,海洋线虫广泛的应用于各种不同污染物的评测,对于海洋红树林线虫的毒理学研究较少,国内王摆等以海洋线虫 *Chromadorina* sp 为生物模型进行毒理学研究[5]。本文将不同粒径微塑料对线虫致死率、胚胎发育持续时间、怀卵数及等影响,以评估微塑料对线虫生活史的影响。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

1) 微塑料本实验所用微塑料 PS 粒径包括(0.1、1.0、3.0、5.0 μm) (上海辉质生物科技有限公司) (图 1)。

2) 实验动物: 线虫 *Viscosia heterolaima* sp。

3) 仪器设备: 无菌生化培养箱(SPX-450 型); 电子天平(上海天美 FA3204B)、解剖镜(奥林巴斯 SZX7)、倒置荧光显微镜(DP-F80)等;

4) 试剂: 氯化钠(NaCl)、氢氧化钠(NaOH)、次磷酸钠(NaClO)、琼脂粉(天茂)、玉米粉。

2.2. 实验方法

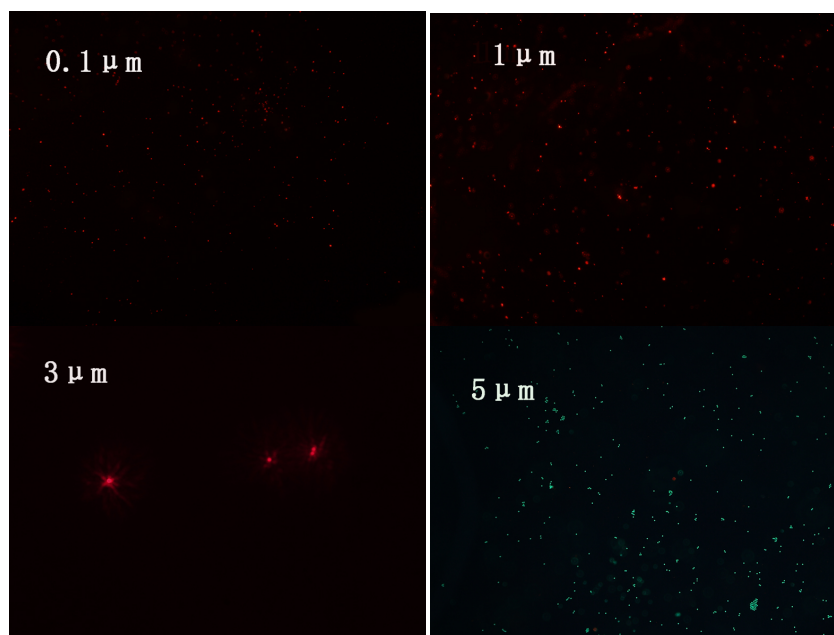


Figure 1. Fluorescence pictures of microplastics with different particle sizes
图 1. 不同粒径微塑料荧光图

2.2.1. 线虫的同化

培养中的线虫 *Viscosia heterolaima* sp, 每日添加适量玉米培养基, 保持线虫的正常生长, 将怀卵期的成虫用无菌过滤生境海水进行冲洗, 再用吸管移至 15 ml 离心管, 加入 1 ml 裂解液、3000 rpm 离心 1 分钟, 去上清液后用无菌过滤生境海水洗涤后 3000 rpm 离心 30 s。收集留在底部的卵, 并置于玉米培养基中, 在温度为 25℃、盐度为 20‰条件下培养孵化, 获得同步化的幼虫。

2.2.2. 致死率

将培养同化后线虫 *Viscosia heterolaima* sp 暴露于混有浓度梯度为 0 (对照组 cont., 下同)、2、4、8 和 16 mg·L⁻¹, 粒径为 0.1、1.0、3 和 5.0 μm 的微塑料培养基 72 h, 对线虫死亡数计数, 每组试验设 4 个重复。在暴露实验过程中, 用针碰触线虫, 如多次的碰触受试线虫仍没有任何反应, 那么可以判定其死亡。

2.2.3. 怀卵数

将培养得的怀卵期线虫 *Viscosia heterolaima* sp 暴露于浓度为 2 mg·L⁻¹、粒径为 0.1、1.0、3.0 和 5.0 μm 的微塑料培养基, 分别计数线虫的产卵数, 直至线虫不再产卵。

2.2.4. 胚胎发育持续时间

将怀卵期线虫 *Viscosia heterolaima* sp 暴露于浓度为 2 mg·L⁻¹、粒径为 0.1、1.0、3.0 和 5.0 μm 的微塑料培养基, 待线虫产卵后, 对线虫胚胎发育时间进行记录。

2.2.5. 微塑料在线虫中的分布

将怀卵期线虫 *Viscosia heterolaima* sp 暴露于浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、粒径为 0.1、1.0、3.0、5.0 μm 的微塑料溶液中(对照组不添加微塑料暴露), 72 h 后采用倒置荧光显微镜拍照并观察微塑料颗粒在线虫体内的分布。

2.2.6. 子一代数目变化

将培养得的线虫 *Viscosia heterolaima* sp 暴露于浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、粒径为 0.1、1.0、3.0 和 5.0 μm 的微塑料培养基, 对线虫的后代个数进行统计分析, 直至线虫不再孵化。

2.2.7. 数据分析

实验数据采用 SPSS 2003 进行差异显著性分析(注: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$), Origin 7.0 图表制作。

3. 结果与分析

3.1. 致死率测定结果

将培养同化后线虫 *Viscosia heterolaima* sp 暴露于混有浓度梯度为 0、2、4、8 和 16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 粒径为 0.1、1.0、3 和 5.0 μm 的微塑料培养基后, 分析微塑料颗粒对线虫的死亡率影响, 实验结果表明(图 2), 粒径(0.1、1.0、3.0、5.0) μm 微塑料颗粒对线虫死亡率产生显著影响, 其中, 3 μm 粒径微塑料对线虫的平均致死率达到 24.17 %, 与对照组差异极显著($P < 0.01$), 但线虫 *Viscosia heterolaima* sp 的死亡率与微塑料浓度无关。

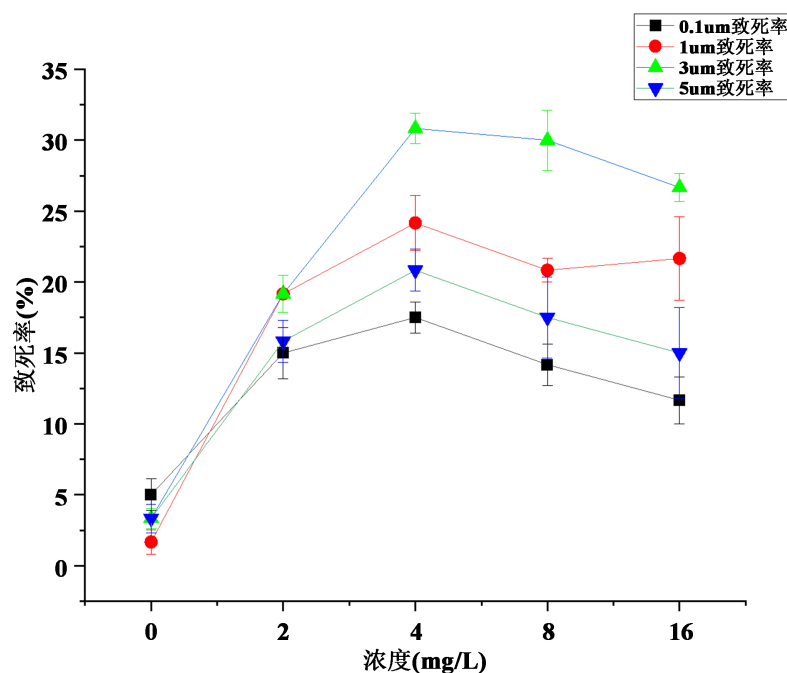


Figure 2. The lethal rate of nematodes exposed to microplastics

图 2. 微塑料暴露线虫的死亡率

3.2. 怀卵数测定结果

将线虫 *Viscosia heterolaima* sp 暴露于浓度 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 粒径为 0.1、1.0、3.0 和 5.0 μm 的微塑料培养基的微塑料培养基后, 统计分析微塑料颗粒对线虫的怀卵数的影响, 实验结果表明(图 3), 与对照组相比, 粒径 0.1、1.0、3.0、5.0 μm 微塑料均能降低线虫的怀卵数, 其中, 粒径 3 μm 线虫怀卵数影响最大(抑制

率为 36.57%), 与对照组差异极显著($P < 0.01$)。

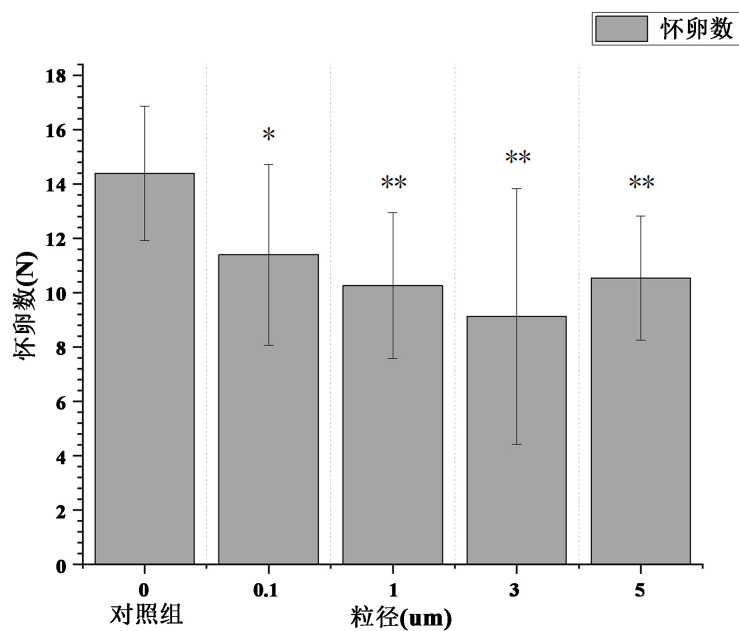


Figure 3. Effects of micro-plastics with different particle sizes on the number of eggs of nematodes

图 3. 不同粒径微塑料对线虫怀卵数的影响

3.3. 胚胎发育时间测定结果

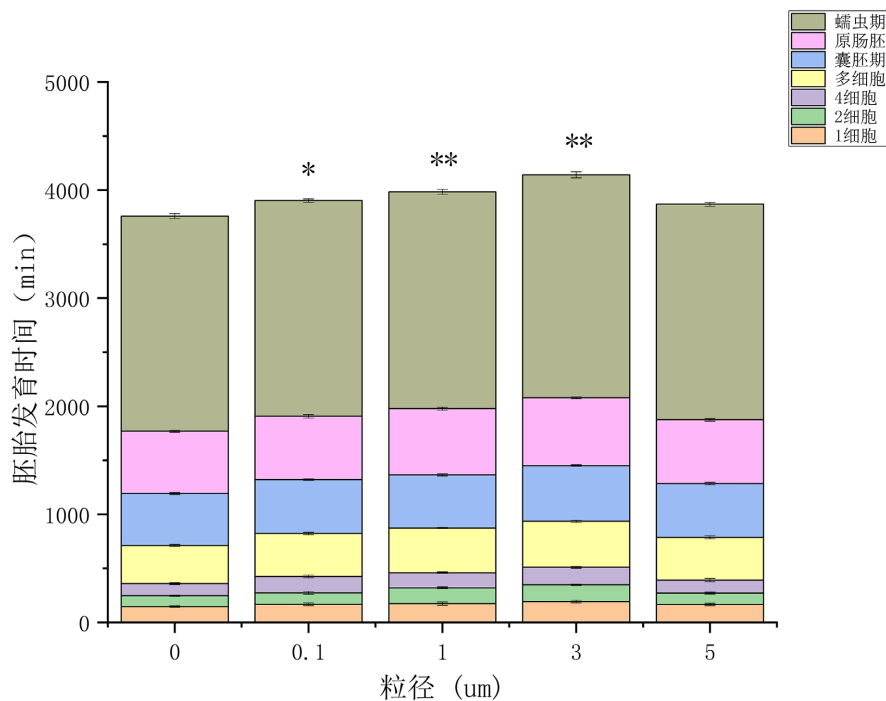


Figure 4. Effects of different microplastic particle sizes on the average duration of various stages of nematode embryo development

图 4. 不同微塑料粒径对线虫胚胎发育各时期平均持续时间的影响

0.1、1.0、3.0、5.0 μm 微塑料处理对线虫 *Viscosia heterolaima* sp 胚胎发育各期持续时间影响, 如图 4, 各微塑料处理组对线虫胚胎 1 细胞、2 细胞、多细胞期、囊胚期、原肠胚期、蠕虫的发育时间明显延长; 4 种不同粒径微塑料对胚胎发育平均时间的影响(图 5), 0.1、1.0、3.0、5.0 μm 微塑料处理组胚胎发育持续时间分别为 65.05 ± 1.19 hr, 66.39 ± 0.94 hr, 69.04 ± 0.89 hr, 64.49 ± 1.28 hr。与对照组相比(62.67 ± 1.08 hr), 0.1、1.0、3.0、5.0 μm 微塑料处理明显延长了线虫胚胎发育持续时间。3.0 μm 微塑料处理对线虫发育持续时间影响最大, 与对照组差异极显著($P < 0.01$)。

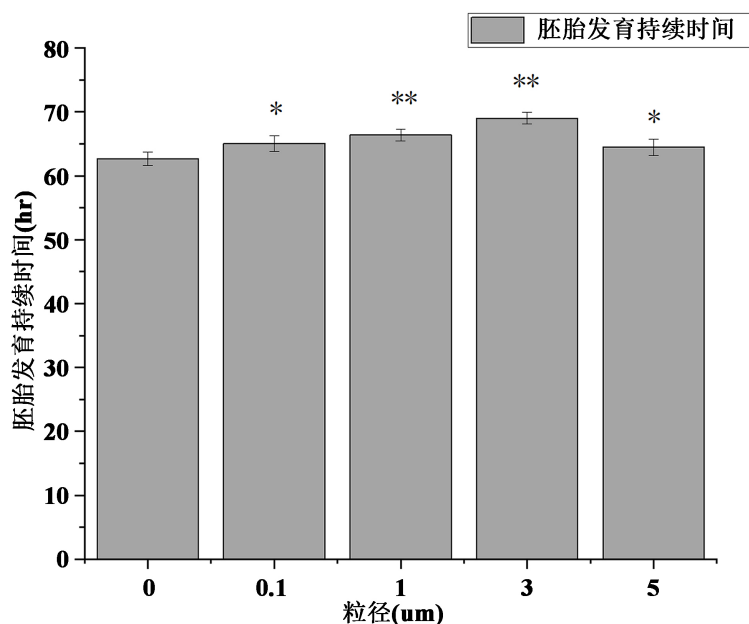


Figure 5. Effects of different microplastic particle sizes on mean duration of nematode embryo development

图 5. 不同微塑料粒径对线虫胚胎发育平均持续时间的影响

3.4. 在线虫体中微塑料的分布

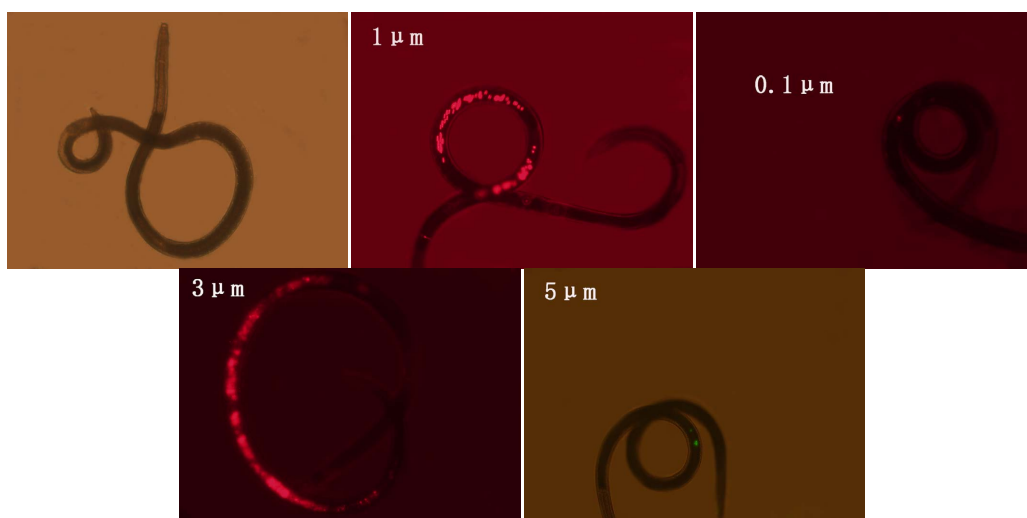


Figure 6. Distribution of nematodes with different microplastic particle sizes

图 6. 不同微塑料粒径在线虫体内的分布

将线虫 *Viscosia heterolaima* sp 暴露于 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、0.1、1.0、3.0、5.0 μm 的微塑料溶液后, 如图 6, 微塑料颗粒主要分布在线虫 *Viscosia heterolaima* sp 肠道中, 各粒径微塑料在线虫体内差异明显。其中, 3.0 μm 的微塑料颗粒在线虫 *Viscosia heterolaima* sp 体内的荧光强度最强。

3.5. 子一代数目变化

将培养的线虫 *Viscosia heterolaima* sp 暴露于 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、粒径为 0.1、1.0、3.0 和 5.0 μm 的微塑料培养基, 对线虫的子一代个数进行统计分析, 图 7, 结果表明, 不同粒径微塑料都能降低线虫后代数目, 使线虫的后代数显著降低, 其中, 3 μm 微塑料对线虫子一代数目抑制率达 40.35%, 与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)。

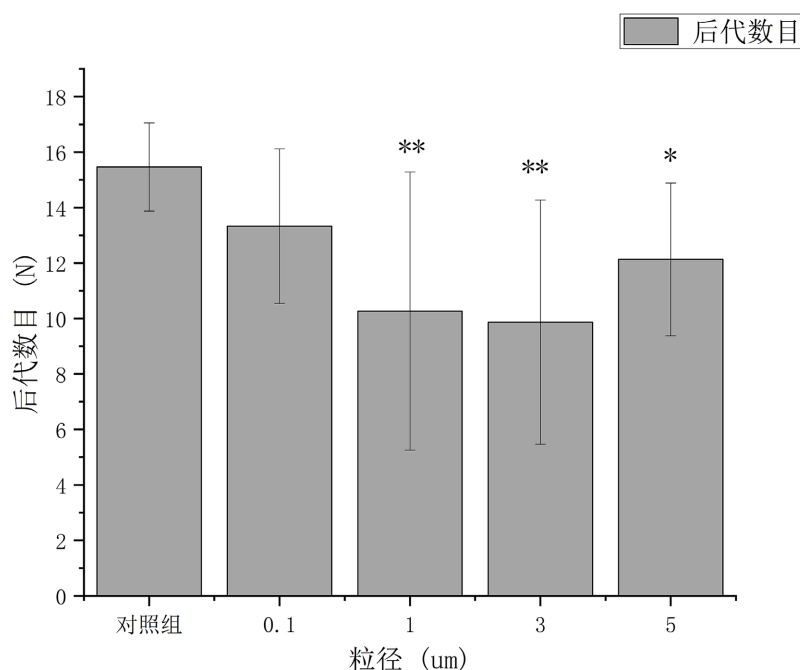


Figure 7. Number of offspring of nematodes exposed to different particle sizes
图 7. 不同粒径暴露后线虫后代数目

4. 讨论

生物体通过各种途径摄取微塑料, 如微塑料可以粘附在桡足类体表、内部, 包括消化道, 毛细血管以及足[6]。相对大型微塑料, 微米、纳米级微塑料更倾向于被各种海洋生物当做食物被摄食, 微米、纳米级微塑料比表面积较大, 被生物摄取后更容易导致毒性作用[7]。本章以线虫 *Viscosia heterolaima* sp 为模式生物, 以线虫存活率、怀卵数、子一代数目、胚胎发育持续时间等评估不同粒径的微塑料颗粒对线虫生活史的影响。通过实验发现, 微塑料对线虫 *Viscosia heterolaima* sp 的毒性更多的表现为粒径的相关性, 尽管使用最高的微塑料环境浓度对线虫进行暴露, 致死率却与浓度无关, 而与微塑料粒径相关, 3 μm 微塑料粒径暴露下对线虫的平均致死率达到 24.17%, 暗示不同粒径微塑料暴露后会降低线虫的成活率。固定浓度下, 粒径 3 μm 的微塑料对线虫的致死率最高, 同时对线虫的怀卵、胚胎发育时间影响也最大, 不同微塑料粒径的毒性也有相关验证, Jeong 等[8]发现 0.05 μm 的微塑料比更大粒径的 0.5 μm 、6.0 μm 的微塑料更能累积于浮游生物内, 用该粒径微塑料暴露后, 发现该浮游生物的发育时间明显延长、繁殖力也降低, 且细胞内 ROS 水平显著上升。同样, 雷丽丽[9]利用浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、粒径分别为 0.1~5.0 μm 的

PS 颗粒对 *C. elegans* 进行暴露发现, 相对其他粒径微塑料, 1.0 μm 的 PS 颗粒对 *C. elegans* 的存活率影响最大。相对于 6.0 μm 的 PS 颗粒, 更小粒径 0.05 μm 、0.5 μm 的 PS 微塑料, 对鞭毛虫的细胞密度的生长都能起到抑制作用(*Thalassiosira pseudonana*, *T. pseudonana*) [10], 以上研究结果无不表明由于微塑料粒径大小导致不同的毒性作用。而与本实验结果不同, 将端足类美洲钩虾分别暴露于 10 到 27 μm 聚乙烯微塑料和 20 到 75 μm 聚丙烯微塑料, 结果显示, 美洲钩虾的死亡率与聚乙烯和聚丙烯浓度成正比, 为期 42 d 的聚乙烯慢性毒性试验过程中, 美洲钩虾的生长和繁殖力、生存率降低, 死亡率上升[11]; 带电的 PS 纳米微塑料(0.02 μm)抑制微藻的种群增长速度, 抑制其光合作用, 而不带电的聚苯乙烯颗粒(0.05 μm)会严重影响杜氏微藻生长, 仅在高浓度(250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时才会受到不利影响, 且 PS 微塑料不会影响微藻的光合作用[12]。而将浮游植物暴露于微塑料中不会产生不利影响[13]。

微塑料对生物诱发毒性的方式主要是在生物体内富集和累积, 摄入的塑料可能会对生物胃肠道造成物理损害, 例如, 会造成胃肠道的擦伤和损伤或物理破坏, 或因为无法消化的微塑料会填满胃部并减少饥饿感, 从而导致饥饿死亡[14] [15]。与本研究线虫 *Viscosia heterolaima* sp 摄入微塑料后, 导致死亡; 不同粒径微塑料暴露后, 导致线虫死亡率升高, 线虫胚胎发育时间延长, 怀卵数降低, 子一代数目减少, 特别是粒径为 3 μm 的毒性最大, 本实验观察到粒径为 3 μm 的微塑料在线虫 *Viscosia heterolaima* sp 肠道里分布和累积面积最大, 相应的对线虫的各个评估毒性指标都有影响, 毒性最大, 说明 3 μm 粒径微塑料能在线虫 *Viscosia heterolaima* sp 体内大量累积是造成线虫损伤的重要原因, 生物摄入微塑料后, 微塑料会在其组织或器官中转移和富集, 例如, 带丝蚓(*Lumbriculus variegatus*)摄入聚甲基丙烯酸甲酯 $29.5 \pm 26 \mu\text{m}$ 后累积在其肠道系统[16]。而贻贝肌肉组织中可富集粒径小于 16 μm 的微塑料, 而后转移到淋巴系统, 对去淋巴系统造成损伤[17], 所以, 线虫在摄入微塑料后可能转入生殖系统, 对生殖系统造成损害。关于微塑料对生物体的生殖毒性效应。将绿海胆暴露于 PE 微塑料颗粒, 观察微塑料对绿海胆(*Lytechinus variegatus*)胚胎发育的毒性作用, 发现微塑料对绿海胆有胚胎有轻微影响[18]。而使用与环境相关的微塑料暴露海胆(*Triploneustes gratilla*), 发现微塑料对海胆影响不大[19]。

所以, 微塑料暴露后, 可对生物体造成损伤甚至死亡, 且不同类型、不同粒径大小的微塑料、不同受试生物表现出不同的毒性效应。

5. 结论

本研究对线虫 *Viscosia heterolaima* sp 进行暴露不同粒径微塑料暴露, 以致死率、怀卵数、胚胎发育时间、后代数目等评估不同粒径的微塑料颗粒对线虫生活史的影响, 发现致死率与微塑料的浓度无关, 与微塑料的粒径有关, 粒径(0.1、1.0、3.0、5.0) μm 微塑料颗粒对线虫 *Viscosia heterolaima* sp 死亡率产生显著影响, 其中, 3 μm 粒径微塑料对线虫成活率影响最大平均致死率为 24.17%, 与对照组差异显著($P < 0.01$), 浓度 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 粒径为 0.1、1.0、3.0 和 5.0 μm 的微塑料均能降低线虫的怀卵数, 其中, 粒径 3 μm 线虫怀卵数影响最大(抑制率为 36.57%), 与对照组差异极显著($P < 0.01$); 微塑料处理组对线虫胚胎 1 细胞、2 细胞、多细胞期、囊胚期、原肠胚期、蠕虫的发育时间明显延长, (0.1、1.0、3.0、5.0) μm 微米微塑料处理组胚胎发育持续时间分别为 $65.05 \pm 1.19 \text{ hr}$, $66.39 \pm 0.94 \text{ hr}$, $69.04 \pm 0.89 \text{ hr}$, $64.49 \pm 1.28 \text{ hr}$, 3.0 μm 微塑料处理对线虫胚胎发育持续时间影响最大, 与对照组差异极显著($P < 0.01$); 将线虫暴露于 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.1~5.0 μm 的微塑料溶液后, 微塑料颗粒主要分布在线虫 *Viscosia heterolaima* sp 肠道中, 各粒径微塑料在线虫体内差异明显。其中, 3.0 μm 的微塑料颗粒在线虫 *Viscosia heterolaima* sp 体内的荧光强度最强; 不同粒径微塑料都能降低线虫 *Viscosia heterolaima* sp 后代数目, 使线虫的后代数目显著降低, 抑制率达 15.37%~40.35%。

研究表明, 不同粒径微塑料对线虫 *Viscosia heterolaima* sp 致死率、胚胎发育时间等产生显著影响,

进而影响其生活史。

参考文献

- [1] Coull, B.C. and Chandler, G. (1992) Pollution and Meiofauna: Field, Laboratory, and Mesocosm Studies. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **30**, 191-271
- [2] Boyd, S.E., Rees, H.L. and Richardson, C.A. (2000) Nematodes as Sensitive Indicators of Change at Dredged Material Disposal Sites. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **51**, 805-819. <https://doi.org/10.1006/ecss.2000.0722>
- [3] Gall, S.C. and Thompson, R.C. (2015) The Impact of Debris on Marine Life. *Marine Pollution Bulletin*, **92**, 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.041>
- [4] Hollman, P.C., Bouwmeester, H. and Peters, R.J. (2013) Microplastics in the Aquatic Food Chain: Sources, Measurements, Occurrence and Potential Health Risks. RIKILT Wageningen University Research Centre, 1-32.
- [5] 王摆. 以海洋线虫 *Chromadorina* sp. 为模型动物的环境激素活体筛选的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [6] Cole, M., Lindeque, P. and Fileman, E. (2015) The Impact of Polystyrene Microplastics on Feeding, Function and Fecundity in the Marine Copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental Science & Technology*, **49**, 1130-1137. <https://doi.org/10.1021/es504525u>
- [7] Choi, O. and Hu, Z. (2008) Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria. *Environmental Science & Technology*, **42**, 4583-4588. <https://doi.org/10.1021/es703238h>
- [8] Jeong, C.B. and Kang, H.M. (2017) Adverse Effects of Microplastics and Oxidative Stress-Induced MAPK/Nrf2 Pathway-Mediated Defense Mechanisms in the Marine Copepod *Paracyclops nana*. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 41323. <https://doi.org/10.1038/srep41323>
- [9] 雷丽丽. 微塑料颗粒对秀丽线虫和斑马鱼的毒性效应及其机制[D]: [硕士学位论文]. 上海: 华东师范大学, 2019.
- [10] Sjollem, S.B., Redondo, H.P., Leslie, H.A., Kraak, M.H.S. and Vethaak, A.D. (2016) Do Plastic Particles Affect Microalgal Photosynthesis and Growth? *Aquatic Toxicology*, **170**, 259-261. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.002>
- [11] Au, S.Y., Bruce, T.F., Bridges, W.C. and Klaine, S.J. (2015) Responses of *Hyalomma azteca* to Acute and Chronic Microplastic Exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **34**, 2564-2572. <https://doi.org/10.1002/etc.3093>
- [12] Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J.P. and Ke, P.C. (2010) Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *The Journal of Physical Chemistry C*, **114**, 16556-16561. <https://doi.org/10.1021/jp1054759>
- [13] Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J. and Soudant, P. (2015) Interactions between Microplastics and Phytoplankton Aggregates: Impact on Their Respective Fates. *Marine Chemistry*, **175**, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.04.003>
- [14] Antonio, D.B., Valastro, C., Freggi, D., Lai, O.R., Crescenzo, G. and Franchini, D. (2013) Surgical Treatment of Injuries Caused by Fishing Gear in the Intracoelomic Digestive Tract of Sea Turtles. *Diseases of Aquatic Organisms*, **106**, 93-102. <https://doi.org/10.3354/dao02641>
- [15] Ryan, P.G. (1988) Effects of Ingested Plastic on Seabird Feeding: Evidence from Chickens. *Marine Pollution Bulletin*, **19**, 125-128. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(88\)90708-4](https://doi.org/10.1016/0025-326X(88)90708-4)
- [16] Imhof, H.K., Ivleva, N.P., Schmid, J., Niessner, R. and laforsch, C. (2013) Contamination of Beach Sediments of a Subalpine Lake with Microplasticparticl. *Current Biology*, **23**, 867-868. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.001>
- [17] Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M. and Thompson, R.C. (2008) Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L). *Environmental Science & Technology*, **42**, 5026-5031. <https://doi.org/10.1021/es800249a>
- [18] Nobre, C.R., Santana, M.F., Maluf, A., Cortez, F.S., Cesar, A., Pereira, C.D. and Turra, A. (2015) Assessment of Microplastic Toxicity to Embryonic Development of the Sea Urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Pollution Bulletin*, **92**, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.050>
- [19] Kaposi, K.L., Mos, B., Kelaher, B.P. and Dworjanyn, S.A. (2014) Ingestion of Microplastic Has Limited Impact on a Marine Larva. *Environmental Science & Technology*, **48**, 1638-1645. <https://doi.org/10.1021/es404295e>