

# 聚苯乙烯暴露和清除对黑斑侧褶蛙蝌蚪身体大小和脏器系数的影响

刁迎珠 郭飞燕 李雅琦 陈柏达 裴鑫怡

王萍 彭秀娟 李文慧 张志强\*

安徽农业大学动物科技学院 合肥 230036

**摘要:** 为探究不同粒径 (50 nm、200 nm 和 1 000 nm)、浓度 (清水组、低浓度组、中浓度组和高浓度组) 荧光聚苯乙烯微球溶液组合对 37 期黑斑侧褶蛙 (*Pelophylax nigromaculatus*) 蝌蚪身体大小和脏器系数的影响, 连续测定了暴露 7 d 时, 之后清水清除饲养 7 d (14 d 时) 和 14 d (21 d 时), 其体重与体全长的比值 (重长比)、小肠长度以及心、肝湿重的变化。重长比在 200 nm 粒径条件下不受聚苯乙烯微球暴露和清除影响 ( $P > 0.05$ ); 50 nm 清水组 14 d 时低于其他浓度组 ( $P < 0.05$ ); 1 000 nm 中浓度组 7 d 时和 14 d 时高于 21 d 时 ( $P < 0.05$ ), 7 d 时高浓度组低于其他浓度组 ( $P < 0.05$ ), 21 d 时清水组和低浓度组都高于中浓度组 ( $P < 0.05$ )。小肠长度系数在 200 nm 高浓度组随时间而变化, 7 d 时至 14 d 时显著增加, 21 d 时陡降 ( $P < 0.05$ ), 1 000 nm 中浓度组 7 d 时和 14 d 时都显著高于 21 d 时 ( $P < 0.05$ ); 7 d 时, 1 000 nm 高浓度组显著低于其他浓度组 ( $P < 0.05$ ), 50 nm、200 nm 均无组间差异 ( $P > 0.05$ )。心、肝湿重系数均不随处理时间而变化 ( $P > 0.05$ ); 心湿重系数只在 50 nm 14 d 时变化显著, 清水组最高, 高、中浓度组其次, 低浓度组最低 ( $P < 0.05$ ), 肝湿重系数只在 50 nm 和 200 nm 14 d 时清水组低于其他浓度组 ( $P < 0.05$ )。50 nm、200 nm 和 1 000 nm 处理分别影响重长比、心和肝湿重系数, 小肠长度系数和肝湿重系数, 以及重长比和小肠长度系数, 但与粒径和浓度均不呈线性关系。

**关键词:** 黑斑侧褶蛙; 聚苯乙烯; 身体大小; 脏器系数; 蝌蚪

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 02-429-11

## Effects of Fluorescent Polystyrene Microspheres on Body Size and Internal Organ Indices in the Tadpoles of *Pelophylax nigromaculatus*

DIAO Ying-Zhu GUO Fei-Yan LI Ya-Qi CHEN Bai-Da PEI Xin-Yi

WANG Ping PENG Xiu-Juan LI Wen-Hui ZHANG Zhi-Qiang\*

College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

**基金项目** 安徽农业大学 2020 年度省级重点教学研究项目 (No. 2020jyxm0531), 2020 年度省级教学示范课项目 (No. 2020SJXSFK09), 安徽农业大学 2020 年校级 (No. XJDC2020578, No. XJDC2020114)、国家级大学生创新创业训练计划项目创新训练项目 (No. 202010364075)、2021 年度研究生创新基金项目 (No. 2021yjs-17);

\* 通讯作者, E-mail: zzq-003@163.com;

**第一作者介绍** 刁迎珠, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水产养殖学; E-mail: 844435112@qq.com。

收稿日期: 2021-09-24, 修回日期: 2022-01-27 DOI: 10.13859/j.cjz.202203012

**Abstract: [Objectives]** Exploring the effects of different particle sizes (50, 200 and 1 000 nm) and different concentrations (zero, low, moderate and high) of fluorescent polystyrene microsphere solutions on the body size and internal organ indices of *Pelophylax nigromaculatus* at Gosner stage 37 tadpoles. **[Methods]** The Gosner stage 37 tadpoles were exposed to any combination of any particle size and any concentration solution for 7 days, then were transferred into dechlorinated tap water and fed without fluorescent polystyrene microsphere solution for an additional 7 or 14 days. The variations of ratio of body mass to total body length (ratio of BM to TBL), the length of small intestine, and the wet masses of heart and liver were continuously measured. All statistical analyses were performed using SPSS software packages (SPSS 19.0 for windows). For any particle size (50, 200 or 1 000 nm), two-way ANOVA (concentration  $\times$  day) and multiple comparisons were used to compare the differences of ratio of BM to TBL, the length index of small intestine, and the wet mass indexes of heart and liver. Then, one-way ANOVA and multiple comparisons were further used to compare the differences of the parameters mentioned above among different concentration groups from the same day, or among different days from the same concentration group. Results were presented as means  $\pm$  standard error, and  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. **[Results]** Ratio of BM to TBL was not affected by polystyrene microsphere exposure and clearance under the conditions of 200-nm solution (Table 3,  $P > 0.05$ ); The BM to TBL ratio was significantly lower in clean water group than that of any other concentration group on day 14 when exposed to 50-nm solution (Table 2,  $P > 0.05$ ); When exposed to 1000-nm solution, the ratio was significantly higher on days 7 and 14 than on day 21 for moderate concentration group, which was lower in high concentration group than that of any other concentration group on day 7, and was higher in clean water group and low concentration group than that of moderate concentration group on day 21 (Table 4,  $P < 0.05$ ). When exposed to 200-nm solution with high concentration, small intestine length index was significantly changed with days, being greatly increased from day 7 to day 14, and sharply declined by day 21 (Table 3,  $P < 0.05$ ); On day 7 or 14, exposure to 1 000-nm solution with moderate concentration, the index was greatly higher than on day 21, while it was greatly lower in high concentration group than that of any other concentration group (Table 4,  $P < 0.05$ ), but not for 50-nm (Table 2,  $P < 0.05$ ) or 200-nm solution group (Table 3,  $P < 0.05$ ). The wet mass indexes of heart and liver did not greatly change (Table 2 - 4,  $P > 0.05$ ); The heart wet mass index was only significantly changed under the conditions of 50-nm solution on day 14, which was highest in clear water group, followed by high and moderate concentration groups, and lowest in low concentration group (Table 2,  $P < 0.05$ ); The liver wet mass index was only significantly lower in clean water group than that of any other concentration group on day 14 from 50-nm or 200-nm solution group (Table 2 and 3,  $P < 0.05$ ). **[Conclusion]** Ratio of BM to TBL, indexes of heart and liver wet masses, small intestine length index combined with liver wet mass index, and ratio of BM to TBL combined with small intestine length index were affected by 50-nm, 200-nm or 1000-nm polystyrene microspheres solution, respectively, but polystyrene particle size and concentration are not linear with their potential hazards.

**Key words:** *Pelophylax nigromaculatus*; Polystyrene; Body size; Internal organ index; Tadpole

微塑料 (microplastics, MPs) 通常指塑料片 (Thompson et al. 2004), 其粒径介于 1 ~ 100 nm 之间时, 被称为纳米级微塑料及其制品被分解后, 粒径小于 5 mm 的塑料碎

(nanoplastics, Koelmans et al. 2015)。微塑料几乎无处不在, 粒径越小的塑料颗粒越易被动物误食, 进而在食物链中传递, 不但危害水域生态系统安全, 也会对陆生动物和人类健康产生危害(丁剑楠等 2017, Kögel et al. 2020, Araújo et al. 2020a)。基于水陆两栖的生活习性, 无尾两栖类被视为是研究微塑料积累和清除规律的理想动物类群(Tussellino et al. 2015, Hu et al. 2016, Araújo et al. 2020b, c)。然而, 关于微塑料对蝌蚪健康的影响研究, 多见于热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)和非洲爪蟾(*X. laevis*), 研究重点集中于胚胎发育(Tussellino et al. 2015)、形态表型和行为特征的变化(Hu et al. 2016, De Felice et al. 2018), 对野生无尾两栖类蝌蚪的研究较少(Araújo et al. 2020b, c, Boyero et al. 2020)。最近发现, 10  $\mu\text{m}$  粒径的荧光聚苯乙烯微球可在产婆蟾(*Alytes obstetricans*)蝌蚪体内存留, 也可通过粪便外排(Boyero et al. 2020); 将 37 期居维尔泡蟾(*Physalaemus cuvieri*)蝌蚪暴露于浓度为 60 mg/L 的聚乙烯溶液 7 d, 其鳃、胃肠道、肝、尾部肌肉和血液等组织器官中均可积累聚乙烯颗粒(Araújo et al. 2020a), 并可影响肝细胞核的大小、体积和形状(Araújo et al. 2020c)。

黑斑侧褶蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)隶属于无尾目(Anura)蛙科(Ranidae)侧褶蛙属, 广泛分布于中国大部分地区(费梁等 2009)。其中, 分布于长三角地区的黑斑侧褶蛙 37 期蝌蚪, 其栖息地和蝌蚪体内均含有微塑料成分(Hu et al. 2018)。成体黑斑侧褶蛙的身体和消化器官大小(金晨晨等 2014a), 以及内脏器官大小随季节而波动(金晨晨等 2014b), 幼蛙登陆后与登陆前相比尾部萎缩, 体重与体全长的比值即重长比(可从一个侧面反映蝌蚪的健康状态)增加明显(张志强等 2020)。本研究将黑斑侧褶蛙 37 期蝌蚪暴露于不同粒径和浓度组合的荧光聚苯乙烯微球溶液中 7 d, 之后再清水中分别饲养 7 d 和 14 d, 每一时间点均以清水饲养组作为对照, 连续测定了每次处

理时间点其身体大小、小肠长度以及心、肝湿重的变化, 将阐明荧光聚苯乙烯微球在整体和器官水平对黑斑侧褶蛙蝌蚪健康状态的影响, 为深入揭示微塑料的积累和清除规律提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2021 年 4 月从湖北省某养殖场购入发育至 26 期的黑斑侧褶蛙蝌蚪, 在安徽农业大学动物生理生态学实验室内置于大塑料箱(长  $\times$  宽  $\times$  高 = 100 cm  $\times$  50 cm  $\times$  50 cm)内饲养, 水深 10 cm, 水为曝气 48 h 以上的自来水。空调控制室温为  $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 水温为  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 光周期为 12L : 12D, 即 12 h 光照, 12 h 黑暗。以 Gosner 分期表为标准(Gosner 1960), 参照赵尔宓(1990)提出的黑斑侧褶蛙蝌蚪分期建议, 通过肉眼观察结合体视解剖镜(漯河盟友教学设备有限公司, XTL-280)鉴定蝌蚪的发育阶段。选取发育至 37 期的蝌蚪, 用电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司,  $\pm 0.1$  mg)称体重, 用瑞士产 Tesa 数显卡尺(瑞士 Shopcal, 量程 150 mm, 精度  $\pm 0.01$  mm)测量体全长, 之后置于装有 500 ml 曝气 48 h 以上自来水的 1 000 ml 烧杯中, 每个烧杯含 12 只蝌蚪, 共 90 个烧杯, 各个烧杯中蝌蚪的平均体重、平均体全长均无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 1.2 实验分组及取材

将 37 期蝌蚪暴露于任一荧光聚苯乙烯微球粒径(50 nm、200 nm 和 1 000 nm)和任一浓度溶液组合(清水组、低浓度组、中浓度组和高浓度组)后的烧杯中, 暴露 7 d 时取材, 之后在清水中再分别饲养 7 d(14 d 时)或 14 d(21 d 时), 再次取材。粒径为 50 nm、200 nm 和 1 000 nm 的实验用荧光聚苯乙烯微球溶液, 其基本化学性质和来源见表 1。每一粒径按照 3  $\mu\text{l}$ 、30  $\mu\text{l}$  和 300  $\mu\text{l}$  的剂量分别加入含有 500 ml 曝气 48 h 以上自来水的 1 000 ml 烧杯中, 混匀后, 分别视为低浓度组、中浓度组和高浓度组。

基于表 1 计算后, 50 nm 低浓度组、中浓度组和高浓度组的浓度分别为 0.031 mg/L、0.312 mg/L 和 3.120 mg/L, 200 nm 和 1 000 nm 低浓度组、中浓度组和高浓度组的浓度均为 0.060 mg/L、0.600 mg/L 和 6.000 mg/L。目前, 因微塑料种类和粒径大小不同, 关于实验用荧光聚苯乙烯微球的水体浓度尚无统一标准可供参照。本研究参照稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)仔鱼经 100 nm、1 000 nm 和 10  $\mu\text{m}$  (侯淼淼等 2020)、36 期非洲爪蟾蝌蚪 (De Felice et al. 2018) 经 3  $\mu\text{m}$  的聚苯乙烯微球处理所采用的水体浓度梯度, 同时结合荧光聚苯乙烯微球的粒径大小和黑斑侧褶蛙蝌蚪的发育阶段, 比稀有鮡鲫加设了一个高浓度组, 但低于非洲爪蟾 36 期蝌蚪 12.5 mg/L 的最高值。

任一粒径的每一浓度组均设置 3 次平行实验, 每一次平行实验在一个 1 000 ml 烧杯内完成, 即烧杯用量为 3 个烧杯/(浓度组·取材时间点  $\times$  3 个取材时间点  $\times$  3 个浓度组/粒径  $\times$  3 个粒径 = 81 个, 每一烧杯中饲养 12 只蝌蚪, 即蝌蚪用量为 12 只/烧杯  $\times$  81 个烧杯 = 972 只。任一实验组均以不含荧光聚苯乙烯微球溶液的清水组为对照组, 即水体微球浓度为 0.000 mg/L, 与实验组同步饲养, 共使用 9 个烧杯, 蝌蚪用量为 108 只。以 50 nm 粒径低浓度组的处理过程为例, 简述如下: 将 12 只 37 期蝌蚪随机置入 9 个烧杯中的任一烧杯, 作为正式实验开始的起点。9 个烧杯中的蝌蚪均在低浓度荧光聚苯乙烯微球溶液中暴露至第 7 d 时, 随机选取 3 个烧杯, 从每一烧杯中均取材

1/3 数量的蝌蚪 (7 d 时组), 剩余的 2/3 蝌蚪留测其他指标; 剩余 6 个烧杯中的蝌蚪转移至装有 500 ml 曝气 48 h 以上自来水的 1 000 ml 烧杯中继续饲养, 饲养至第 14 天时 (14 d 时组) 或第 21 天时 (21 d 时组), 分别随机选取 3 个烧杯, 从每一烧杯中均取材 1/3 数量的蝌蚪, 剩余的 2/3 蝌蚪留测其他指标。对于 7 d 时组, 为充分保证蝌蚪对低浓度荧光聚苯乙烯微球的摄入, 在水体中静态不换水饲养至第 7 天, 每日 18:00 时投喂颗粒饲料 (福建合鑫饲料有限公司) 1 次, 喂食量约为其体重的 1%; 对于 14 d 时组和 21 d 时组, 每日 18:00 喂食, 每 2 d 换水一次, 并清除食物残渣。50 nm 粒径的中浓度组和高浓度组, 以及 200 nm 和 1 000 nm 低浓度组、中浓度组和高浓度组的实验处理过程与 50 nm 粒径低浓度组的实验处理过程相同。

7 d 时组、14 d 时组和 21 d 时组取材时, 均用电子天平称量每只蝌蚪的体重, 以及心、肝的湿重, 数显卡尺测量其体全长和小肠长度。重长比 (g/m) = 体重 (g) / 体全长 (m); 小肠长度系数 (%) = 小肠长度 (mm)  $\times$  100 / 体全长 (mm); 心 (或肝) 的湿重系数 (%) = 心 (或肝) 湿重 (g)  $\times$  100 / 体重 (g)。实验处理过程中, 因有个别蝌蚪死亡, 每只烧杯中被解剖的蝌蚪数为 2 ~ 4 只, 任一粒径每一浓度组实际被取材的蝌蚪数量处于 8 ~ 12 只之间。

### 1.3 数据处理与统计分析

用 SPSS 19.0 for windows 进行数据处理和统计分析。经 Kolmogorov-Smirnov 检验, 所有参数都符合正态分布。以从同一烧杯内取出的

表 1 荧光聚苯乙烯微球基本性质和来源

Table 1 Basic properties and source of fluorescent polystyrene microspheres

粒径 Particle size (nm)	荧光聚苯乙烯微球浓度 Concentration of fluorescent polystyrene microspheres (g/L)	是否有基团 With or without group	颜色 Colour	激发/发射波长 Excitation/emission wave length ( $\lambda$ /nm)	生产商 Manufacturer
50	5.2	无 Without	绿色 Green	470/525	上海辉质生物科技有限公司 Shanghai Huge Biotechnology Co., LTD
200	10.0	无 Without	绿色 Green	470/525	
1 000	10.0	无 Without	绿色 Green	470/525	

1/3 数量蝌蚪的平均值来代表一次平行实验的结果, 以 3 个烧杯的平均值代表某一粒径和浓度组合后的荧光聚苯乙烯微球水体溶液处理后的结果。同一粒径(50 nm、200 nm 或 1 000 nm)条件下, 用双因素方差分析(two-way ANOVA)比较身体大小、小肠长度系数及心、肝湿重系数随浓度(清水组、低浓度组、中浓度组和高浓度组)和处理天数(7 d、14 d 和 21 d)的变化情况。若浓度和天数对所测参数无交互作用, 则用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较某一取样时间点时不同浓度组间或某一浓度组不同取样时间点间的差异。文中数据均以平均值  $\pm$  标准误(Mean  $\pm$  SE)表示,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 50 nm 荧光聚苯乙烯微球暴露和清除对蝌蚪身体大小和脏器系数的影响

荧光聚苯乙烯微球浓度显著影响体重( $F_{3, 24} = 3.311, P < 0.05$ )和体全长( $F_{3, 24} = 6.145, P < 0.05$ ), 不影响重长比、小肠长度系数, 以及心、肝湿重系数( $P > 0.05$ ); 处理天数显著影响体重( $F_{2, 24} = 4.033, P < 0.05$ )、体全长( $F_{2, 24} = 8.611, P < 0.05$ )和小肠长度系数( $F_{2, 24} = 4.423, P < 0.05$ ), 不影响重长比, 以及心、肝湿重系数( $P > 0.05$ ); 浓度和处理天数对所有参数均无交互作用( $P > 0.05$ )。

7 d 时, 体重( $F_{3, 11} = 4.866, P < 0.05$ )低浓度组显著高于清水组, 但与中、高浓度组差异不显著, 体全长( $F_{3, 11} = 16.049, P < 0.05$ )低浓度组最高, 中浓度组和高浓度组其次, 清水组最低, 重长比等其他参数无明显变化( $P > 0.05$ )(表 2)。14 d 时, 体重低浓度组显著高于清水组( $F_{3, 11} = 4.333, P < 0.05$ ), 但与中、高浓度组差异不显著, 重长比( $F_{3, 11} = 5.078, P < 0.05$ )清水组最低, 显著低于其他各浓度组, 体全长和小肠长度系数未见明显变化( $P > 0.05$ ); 心湿重系数清水组最高, 高、中浓度组其次, 低浓度组最低( $F_{3, 11} = 8.748, P < 0.05$ );

肝湿重系数清水组最低, 显著低于其他浓度组( $F_{3, 11} = 5.429, P < 0.05$ )(表 2)。21 d 时, 所有参数均无显著的组间差异( $P > 0.05$ )(表 2)。

清水组的体全长 14 d 时最高, 显著高于 7 d 时和 21 d 时( $F_{2, 8} = 10.638, P < 0.05$ ), 其他参数都无显著的组间差异( $P > 0.05$ ); 高浓度组的体全长 7 d 时和 14 d 时都显著高于 21 d 时( $F_{2, 8} = 8.396, P < 0.05$ ), 其他参数均不随处理天数而变化( $P > 0.05$ )(表 2)。

### 2.2 200 nm 荧光聚苯乙烯微球暴露和清除对蝌蚪身体大小和脏器系数的影响

荧光聚苯乙烯微球浓度不影响体重、体全长、重长比和小肠长度系数, 以及心、肝湿重系数( $P > 0.05$ ); 处理天数显著影响体全长( $F_{2, 24} = 5.099, P < 0.05$ )和小肠长度系数( $F_{2, 24} = 12.375, P < 0.05$ ), 不影响体重和重长比, 以及心、肝湿重系数( $P > 0.05$ ); 浓度和处理天数对上述所有参数均无交互作用( $P > 0.05$ )。

14 d 时, 除肝湿重系数清水组显著低于其他浓度组外( $F_{3, 11} = 8.073, P < 0.05$ ), 其他参数均无显著的组间差异( $P > 0.05$ ); 7 d 时或 21 d 时, 所有参数均无显著的组间差异( $P > 0.05$ )(表 3)。

高浓度组的小肠长度系数从 7 d 时至 14 d 时显著升高, 至 21 d 时陡降( $F_{2, 8} = 27.143, P < 0.05$ ), 其他参数各处理天数之间均无显著差异( $P > 0.05$ ); 低或中浓度组的所有参数均不随处理天数而变化( $P > 0.05$ )(表 3)。

### 2.3 1 000 nm 聚苯乙烯微球暴露和清除对蝌蚪身体大小和脏器系数的影响

荧光聚苯乙烯微球浓度显著影响体重( $F_{3, 24} = 6.623, P < 0.05$ )、体全长( $F_{3, 22} = 3.864, P < 0.05$ )和重长比( $F_{3, 22} = 5.810, P < 0.05$ ), 对小肠长度系数, 以及心、肝湿重系数均无显著影响( $P > 0.05$ ); 处理天数显著影响体重( $F_{2, 24} = 9.189, P < 0.05$ )、体全长( $F_{2, 24} = 30.709, P < 0.05$ )和小肠长度系数( $F_{2, 24} = 10.605, P < 0.05$ ), 对重长比, 以及心、肝湿

表 2 50 nm 组荧光聚苯乙烯微球暴露和清除后对黑斑侧褶蛙蝌蚪身体大小和脏器系数的影响  
 Table 2 Effects of fluorescent polystyrene microspheres exposure and clearance on body size and internal organ index at 50 nm group in the tadpoles of *Pelophylax nigromaculatus*

参数 Parameters	荧光聚苯乙烯微球浓度 Concentrations of fluorescent polystyrene microspheres (mg/L)	7 天组 7 days group	14 天组 14 days group	21 天组 21 days group
体重 Body mass (BM, g)	0.000	0.581 2 ± 0.041 2 <sup>aB</sup>	0.556 0 ± 0.011 3 <sup>aB</sup>	0.581 7 ± 0.028 8 <sup>aA</sup>
	0.031	0.865 2 ± 0.016 3 <sup>aA</sup>	0.764 8 ± 0.034 8 <sup>aA</sup>	0.571 9 ± 0.131 5 <sup>aA</sup>
	0.312	0.611 3 ± 0.074 7 <sup>aAB</sup>	0.751 9 ± 0.067 5 <sup>aAB</sup>	0.621 1 ± 0.074 0 <sup>aA</sup>
	3.120	0.709 3 ± 0.076 9 <sup>aAB</sup>	0.725 7 ± 0.053 1 <sup>aAB</sup>	0.570 9 ± 0.042 3 <sup>aA</sup>
体全长 Total body length (TBL, mm)	0.000	38.43 ± 0.35 <sup>bC</sup>	40.85 ± 0.20 <sup>aA</sup>	38.51 ± 0.61 <sup>bA</sup>
	0.031	45.62 ± 0.56 <sup>aA</sup>	43.45 ± 0.79 <sup>aA</sup>	39.80 ± 2.64 <sup>aA</sup>
	0.312	40.41 ± 1.07 <sup>aBC</sup>	42.92 ± 1.42 <sup>aA</sup>	40.30 ± 0.76 <sup>aA</sup>
	3.120	41.92 ± 0.84 <sup>aB</sup>	41.93 ± 0.19 <sup>aA</sup>	38.65 ± 0.73 <sup>bA</sup>
体重与体全长的比值 BM/TBL (g/m)	0.000	15.12 ± 1.06 <sup>aA</sup>	13.61 ± 0.32 <sup>aB</sup>	15.12 ± 0.85 <sup>aA</sup>
	0.031	18.97 ± 0.30 <sup>aA</sup>	17.6 ± 0.67 <sup>aA</sup>	14.08 ± 2.25 <sup>aA</sup>
	0.312	15.05 ± 1.43 <sup>aA</sup>	17.45 ± 0.97 <sup>aA</sup>	15.36 ± 1.56 <sup>aA</sup>
	3.120	16.87 ± 1.51 <sup>aA</sup>	17.30 ± 1.19 <sup>aA</sup>	14.81 ± 1.30 <sup>aA</sup>
小肠长度系数 Small intestine length index (%)	0.000	343.23 ± 16.12 <sup>aA</sup>	313.35 ± 23.79 <sup>aA</sup>	287.25 ± 45.84 <sup>aA</sup>
	0.031	331.20 ± 35.48 <sup>aA</sup>	351.45 ± 25.22 <sup>aA</sup>	275.58 ± 34.05 <sup>aA</sup>
	0.312	322.36 ± 21.88 <sup>aA</sup>	368.22 ± 21.24 <sup>aA</sup>	318.47 ± 21.43 <sup>aA</sup>
	3.120	376.74 ± 15.15 <sup>aA</sup>	366.25 ± 25.85 <sup>aA</sup>	311.09 ± 18.79 <sup>aA</sup>
心湿重系数 Heart wet mass index (%)	0.000	2.06 ± 0.24 <sup>aA</sup>	3.51 ± 0.28 <sup>aA</sup>	2.99 ± 0.67 <sup>aA</sup>
	0.031	1.94 ± 0.41 <sup>aA</sup>	1.34 ± 0.15 <sup>aC</sup>	2.50 ± 0.05 <sup>aA</sup>
	0.312	2.08 ± 0.24 <sup>aA</sup>	1.86 ± 0.53 <sup>aBC</sup>	2.69 ± 0.72 <sup>aA</sup>
	3.120	2.37 ± 0.54 <sup>aA</sup>	2.40 ± 0.12 <sup>aB</sup>	3.03 ± 0.70 <sup>aA</sup>
肝湿重系数 Liver wet mass index (%)	0.000	18.34 ± 4.15 <sup>aA</sup>	9.31 ± 1.36 <sup>aB</sup>	16.04 ± 4.82 <sup>aA</sup>
	0.031	19.24 ± 3.78 <sup>aA</sup>	17.38 ± 1.69 <sup>aA</sup>	25.24 ± 2.71 <sup>aA</sup>
	0.312	22.12 ± 0.53 <sup>aA</sup>	18.84 ± 3.73 <sup>aA</sup>	15.95 ± 5.05 <sup>aA</sup>
	3.120	19.84 ± 3.71 <sup>aA</sup>	21.10 ± 0.85 <sup>aA</sup>	18.25 ± 1.36 <sup>aA</sup>

同列数据肩标不同大写字母或同行数据肩标不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ , 相同字母表示差异不显著,  $P > 0.05$ 。

In the same column or line, values with different lowercase or capital letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ), with the same letters mean no significant differences ( $P > 0.05$ ).

重系数无明显影响 ( $P > 0.05$ ); 浓度和处理天数对体重 ( $F_{6, 24} = 4.978$ ,  $P < 0.05$ )、体全长 ( $F_{6, 24} = 4.498$ ,  $P < 0.05$ ) 和重长比 ( $F_{6, 24} = 3.892$ ,  $P < 0.05$ ) 都有交互作用, 对小肠长度系数, 以及心、肝湿重系数均无交互作用 ( $P > 0.05$ )。

7 d 时, 体重 ( $F_{3, 11} = 10.763$ ,  $P < 0.05$ ) 低浓度组显著高于高浓度组, 但与清水组和中

浓度组均无显著差异; 体全长 ( $F_{3, 11} = 4.888$ ,  $P < 0.05$ ) 低浓度组显著高于其他各浓度组; 重长比 ( $F_{3, 11} = 9.424$ ,  $P < 0.05$ ) 和小肠长度系数 ( $F_{3, 11} = 6.503$ ,  $P < 0.05$ ) 清水组、低浓度组和中浓度组都显著高于高浓度组, 心、肝湿重系数均无明显变化 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。14 d 时, 所有参数均无显著的组间差异 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。21 d 时, 体重 ( $F_{3, 11} = 6.491$ ,  $P < 0.05$ )、

表 3 200 nm 组荧光聚苯乙烯微球暴露和清除后对黑斑侧褶蛙蝌蚪身体大小和脏器系数的影响

Table 3 Effects of fluorescent polystyrene microspheres exposure and clearance on body size and internal organ index at 200 nm group in the tadpoles of *Pelophylax nigromaculatus*

参数 Parameters	荧光聚苯乙烯微球浓度 Concentrations of fluorescent polystyrene microspheres (mg/L)	7 天组 7 days group	14 天组 14 days group	21 天组 21 days group
体重 Body mass (BM, g)	0.000	0.581 2 ± 0.041 2 <sup>aA</sup>	0.556 0 ± 0.011 3 <sup>aA</sup>	0.581 7 ± 0.028 8 <sup>aA</sup>
	0.060	0.636 6 ± 0.022 2 <sup>aA</sup>	0.707 5 ± 0.065 6 <sup>aA</sup>	0.597 5 ± 0.080 0 <sup>aA</sup>
	0.600	0.588 0 ± 0.011 2 <sup>aA</sup>	0.713 3 ± 0.095 0 <sup>aA</sup>	0.562 2 ± 0.063 3 <sup>aA</sup>
	6.000	0.543 9 ± 0.053 9 <sup>aA</sup>	0.674 5 ± 0.057 7 <sup>aA</sup>	0.534 0 ± 0.079 5 <sup>aA</sup>
体全长 Total body length (TBL, mm)	0.000	38.43 ± 0.35 <sup>ba</sup>	40.85 ± 0.20 <sup>aA</sup>	38.51 ± 0.61 <sup>ba</sup>
	0.060	42.84 ± 0.71 <sup>aA</sup>	42.61 ± 1.39 <sup>aA</sup>	39.05 ± 2.76 <sup>aA</sup>
	0.600	40.33 ± 0.52 <sup>aA</sup>	42.53 ± 1.75 <sup>aA</sup>	38.08 ± 2.18 <sup>aA</sup>
	6.000	42.02 ± 2.50 <sup>aA</sup>	41.26 ± 1.04 <sup>aA</sup>	38.31 ± 1.33 <sup>aA</sup>
体重与体全长的比值 BM/TBL (g/m)	0.000	15.12 ± 1.06 <sup>aA</sup>	13.61 ± 0.32 <sup>aA</sup>	15.12 ± 0.85 <sup>aA</sup>
	0.060	14.87 ± 0.59 <sup>aA</sup>	16.55 ± 1.01 <sup>aA</sup>	15.16 ± 0.98 <sup>aA</sup>
	0.600	14.58 ± 0.10 <sup>aA</sup>	16.67 ± 1.62 <sup>aA</sup>	14.66 ± 0.87 <sup>aA</sup>
	6.000	12.89 ± 0.50 <sup>aA</sup>	16.30 ± 1.02 <sup>aA</sup>	13.83 ± 1.54 <sup>aA</sup>
小肠长度系数 Small intestine length index (%)	0.000	343.23 ± 16.12 <sup>aA</sup>	313.35 ± 23.79 <sup>aA</sup>	287.25 ± 45.84 <sup>aA</sup>
	0.060	311.23 ± 18.66 <sup>aA</sup>	413.38 ± 53.46 <sup>aA</sup>	269.77 ± 28.82 <sup>aA</sup>
	0.600	349.22 ± 4.91 <sup>aA</sup>	358.30 ± 24.84 <sup>aA</sup>	277.63 ± 24.03 <sup>aA</sup>
	6.000	295.39 ± 11.18 <sup>ba</sup>	348.79 ± 15.9 <sup>aA</sup>	227.39 ± 5.22 <sup>cA</sup>
心湿重系数 Heart wet mass index (%)	0.000	2.06 ± 0.24 <sup>aA</sup>	3.51 ± 0.28 <sup>aA</sup>	2.99 ± 0.67 <sup>aA</sup>
	0.060	3.30 ± 0.80 <sup>aA</sup>	2.73 ± 0.50 <sup>aA</sup>	2.02 ± 1.14 <sup>aA</sup>
	0.600	2.83 ± 0.44 <sup>aA</sup>	1.73 ± 0.37 <sup>aA</sup>	1.96 ± 0.50 <sup>aA</sup>
	6.000	2.73 ± 0.15 <sup>aA</sup>	2.40 ± 0.36 <sup>aA</sup>	2.41 ± 0.46 <sup>aA</sup>
肝湿重系数 Liver wet mass index (%)	0.000	18.34 ± 4.15 <sup>aA</sup>	9.31 ± 1.36 <sup>aB</sup>	16.04 ± 4.82 <sup>aA</sup>
	0.060	17.41 ± 2.95 <sup>aA</sup>	17.13 ± 0.85 <sup>aA</sup>	21.66 ± 6.48 <sup>aA</sup>
	0.600	21.39 ± 1.99 <sup>aA</sup>	17.33 ± 1.39 <sup>aA</sup>	14.14 ± 4.32 <sup>aA</sup>
	6.000	17.83 ± 1.74 <sup>aA</sup>	18.09 ± 1.28 <sup>aA</sup>	16.73 ± 4.17 <sup>aA</sup>

同列数据肩标不同大写字母或同行数据肩标不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ , 相同字母表示差异不显著,  $P > 0.05$ 。

In the same column or line, values with different lowercase or capital letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ), with the same letters mean no significant differences ( $P > 0.05$ ).

体全长 ( $F_{3, 11} = 5.210$ ,  $P < 0.05$ ) 和重长比 ( $F_{3, 11} = 4.972$ ,  $P < 0.05$ ) 清水组和低浓度组都显著高于中浓度组, 其他参数均无显著的组间差异 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。

低浓度组的体重、体全长、重长比和小肠长度系数, 以及心、肝湿重系数均不随处理天数而变化 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。中浓度组的体重 ( $F_{2, 8} = 33.690$ ,  $P < 0.05$ )、重长比 ( $F_{2, 8} =$

$27.144$ ,  $P < 0.05$ ) 和小肠长度系数 ( $F_{2, 8} = 10.848$ ,  $P < 0.05$ ) 7 d 时和 14 d 时都显著高于 21 d 时, 体全长 ( $F_{2, 8} = 23.770$ ,  $P < 0.05$ ) 从 7 d 时至 14 d 时显著升高, 至 21 d 时陡降, 心、肝湿重系数均不随处理天数而变化 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。高浓度组的体重 ( $F_{2, 8} = 8.150$ ,  $P < 0.05$ )、体全长 ( $F_{2, 8} = 15.395$ ,  $P < 0.05$ ) 14 d 时都显著高于 7 d 时和 21 d 时, 其他参数均无

**表 4 1000 nm 组荧光聚苯乙烯微球暴露和清除后对黑斑侧褶蛙蝌蚪身体大小和脏器系数的影响**  
**Table 4 Effects of fluorescent polystyrene microspheres exposure and clearance on body size and internal organ index at 1000 nm group in the tadpoles of *Pelophylax nigromaculatus***

参数 Parameters	荧光聚苯乙烯微球浓度 Concentrations of fluorescent polystyrene microspheres (mg/L)	7 天组 7 days group	14 天组 14 days group	21 天组 21 days group
体重 Body mass (BM, g)	0.000	0.581 2 ± 0.041 2 <sup>aAB</sup>	0.556 0 ± 0.011 3 <sup>aA</sup>	0.581 7 ± 0.028 8 <sup>aA</sup>
	0.060	0.737 6 ± 0.042 1 <sup>aA</sup>	0.704 2 ± 0.053 6 <sup>aA</sup>	0.671 0 ± 0.093 2 <sup>aA</sup>
	0.600	0.610 9 ± 0.017 9 <sup>aAB</sup>	0.684 5 ± 0.048 0 <sup>aA</sup>	0.352 6 ± 0.009 0 <sup>bB</sup>
	6.000	0.465 7 ± 0.029 1 <sup>bB</sup>	0.744 7 ± 0.076 5 <sup>aA</sup>	0.509 1 ± 0.039 8 <sup>bAB</sup>
体全长 Total body length (TBL, mm)	0.000	38.43 ± 0.35 <sup>bB</sup>	40.85 ± 0.20 <sup>aA</sup>	38.51 ± 0.61 <sup>bA</sup>
	0.060	42.64 ± 1.31 <sup>aA</sup>	43.57 ± 1.67 <sup>aA</sup>	40.07 ± 2.07 <sup>aA</sup>
	0.600	39.30 ± 0.49 <sup>bB</sup>	44.71 ± 1.53 <sup>aA</sup>	32.31 ± 1.52 <sup>cB</sup>
	6.000	37.85 ± 1.30 <sup>bB</sup>	46.44 ± 1.54 <sup>aA</sup>	36.31 ± 1.32 <sup>bAB</sup>
体重与体全长的比值 BM /TBL (g/m)	0.000	15.12 ± 1.06 <sup>aA</sup>	13.61 ± 0.32 <sup>aA</sup>	15.12 ± 0.85 <sup>aA</sup>
	0.060	17.28 ± 0.57 <sup>aA</sup>	16.16 ± 1.04 <sup>aA</sup>	16.67 ± 1.78 <sup>aA</sup>
	0.600	15.54 ± 0.40 <sup>aA</sup>	15.28 ± 0.66 <sup>aA</sup>	10.94 ± 0.39 <sup>bB</sup>
	6.000	12.29 ± 0.45 <sup>aB</sup>	16.00 ± 1.41 <sup>aA</sup>	14.01 ± 0.84 <sup>aAB</sup>
小肠长度系数 Small intestine length index (%)	0.000	343.23 ± 16.12 <sup>aA</sup>	313.35 ± 23.79 <sup>aA</sup>	287.25 ± 45.84 <sup>aA</sup>
	0.060	363.25 ± 25.19 <sup>aA</sup>	328.55 ± 22.22 <sup>aA</sup>	280.15 ± 6.01 <sup>aA</sup>
	0.600	386.24 ± 8.34 <sup>aA</sup>	349.28 ± 9.71 <sup>aA</sup>	231.65 ± 40.48 <sup>bA</sup>
	6.000	290.94 ± 7.24 <sup>aB</sup>	336.43 ± 18.43 <sup>aA</sup>	286.57 ± 28.48 <sup>aA</sup>
心湿重系数 Heart wet mass index (%)	0.000	2.06 ± 0.24 <sup>aA</sup>	3.51 ± 0.28 <sup>aA</sup>	2.99 ± 0.67 <sup>aA</sup>
	0.060	2.92 ± 0.22 <sup>aA</sup>	1.89 ± 0.27 <sup>aA</sup>	3.24 ± 1.44 <sup>aA</sup>
	0.600	2.79 ± 0.13 <sup>aA</sup>	1.62 ± 0.30 <sup>aA</sup>	2.72 ± 0.52 <sup>aA</sup>
	6.000	3.08 ± 0.62 <sup>aA</sup>	2.71 ± 1.19 <sup>aA</sup>	3.07 ± 0.52 <sup>aA</sup>
肝湿重系数 Liver wet mass index (%)	0.000	18.34 ± 4.15 <sup>aA</sup>	9.31 ± 1.36 <sup>aA</sup>	16.04 ± 4.82 <sup>aA</sup>
	0.060	23.35 ± 0.82 <sup>aA</sup>	19.03 ± 1.43 <sup>aA</sup>	23.84 ± 8.26 <sup>aA</sup>
	0.600	21.86 ± 0.57 <sup>aA</sup>	21.11 ± 5.48 <sup>aA</sup>	19.27 ± 6.06 <sup>aA</sup>
	6.000	15.35 ± 1.96 <sup>aA</sup>	20.01 ± 1.25 <sup>aA</sup>	18.33 ± 5.54 <sup>aA</sup>

同列数据肩标不同大写字母或同行数据肩标不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ , 相同字母表示差异不显著,  $P > 0.05$ 。

In the same column or line, values with different lowercase or capital letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ), with the same letters mean no significant differences ( $P > 0.05$ ).

显著的组间差异 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。

### 3 讨论

本研究将黑斑侧褶蛙 37 期蝌蚪暴露于不同粒径和浓度的荧光聚苯乙烯微球溶液中 7 d, 再将其移至清水中分别饲养 7 d 和 14 d, 发现 50 nm、200 nm 和 1 000 nm 微球处理可分别影响重长比及心和肝湿重系数, 小肠长度系数和

肝湿重系数, 以及重长比和小肠长度系数, 但这些参数与粒径和浓度均无明显的线性关系。

#### 3.1 荧光聚苯乙烯微球积累和清除对蝌蚪身体大小的影响

无尾两栖类幼体营水生, 从 36 期蝌蚪发育至变态高峰期, 历时较长, 是研究微塑料在其体内积累和清除效应的常用发育阶段之一 (Tussellino et al. 2015, Hu et al. 2016, Araújo



et al. 2020b, c)。实验室控温条件下, 重长比可作为指示黑斑侧褶蛙蝌蚪健康状态的指标之一, 从 37 期至 42 ~ 43 期变化较小, 但 44 期后显著增加 (张志强等 2020)。经荧光聚苯乙烯微球处理黑斑侧褶蛙 37 期蝌蚪 7 d 时、清水清除 7 d 时和 14 d 时, 200 nm 不同浓度组的重长比均未见显著的组间差异, 也不随处理天数而变化; 50 nm 清水组 14 d 时显著低于其他浓度组, 7 d 时和 21 d 时未见显著的组间差异; 1 000 nm 处理后, 中浓度组 7 d 时和 14 d 时显著高于 21 d 时, 7 d 时高浓度组显著低于其他浓度组, 而 21 d 时清水组和低浓度组都显著高于中浓度组, 但 14 d 时各浓度组都无组间差异。这些结果说明, 50 nm 纳米级的小粒径对蝌蚪发育有一定的促进作用, 但随处理时间延长而消失; 1 000 nm 粒径的荧光聚苯乙烯微球可能对蝌蚪的健康危害较大, 不但抑制高浓度组蝌蚪的发育, 而且随清水清除时间不同而变化。然而, 若蝌蚪的身体或脏器发生水肿, 也可能导致蝌蚪的重长比有所增加, 但在本研究中未发现上述现象, 这可能与较低的荧光聚苯乙烯微球水体浓度 (最高值为 6.000 mg/L) 有关。将 36 期非洲爪蟾蝌蚪暴露于粒径为 3  $\mu\text{m}$ , 浓度分别为 0.125 mg/L、1.25 mg/L 和 12.5 mg/L 的聚苯乙烯溶液中, 直至发育至 46 期蝌蚪为止, 发现蝌蚪的发育速度、体长和游泳能力均不受聚苯乙烯暴露的影响 (De Felice et al. 2018)。

### 3.2 荧光聚苯乙烯微球积累和清除对蝌蚪脏器系数的影响

目前, 已在多种两栖动物的栖息地内和蝌蚪体内检出多种微塑料成分, 包括聚苯乙烯、聚乙烯等, 粒径从 1  $\mu\text{m}$  至 10  $\mu\text{m}$  不等, 浓度变幅较大 (Hu et al. 2018, Kolenda et al. 2020)。本研究采用的荧光聚苯乙烯微球溶液为商品化试剂, 其粒径更小、浓度更低, 发现 1 000 nm 粒径的聚苯乙烯微球只影响小肠长度, 200 nm 粒径不但影响小肠长度, 也影响肝湿重, 50 nm 粒径只显著影响心和肝的湿重。

黑斑侧褶蛙在 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下从 37 期蝌蚪发

育至变态完成期, 约需 ( $57.0 \pm 7.0$ ) d (张志强等 2021), 从 37 期经历荧光聚苯乙烯微球暴露和清除处理, 共历时 21 d, 相当于发育至临近变态期, 小肠等内脏器官尚未发生剧烈改造 (McDiarmid et al. 1999); 研究发现, 花背蟾蜍 (*Pseudepidalea raddei*) 蝌蚪在从 28 至 46 期的胚后发育过程中, 小肠长度和湿重均在 38 期时最高 (连丽燕等 2018)。本研究发现, 黑斑侧褶蛙蝌蚪经 1 000 nm 粒径荧光聚苯乙烯微球处理后, 7 d 时小肠长度系数高浓度组显著低于其他浓度组, 且中浓度组 7 d 时和 14 d 时都显著高于 21 d 时; 200 nm 高浓度组的小肠长度系数从 7 d 至 14 d 显著升高, 至 21 d 时陡降, 但 50 nm 粒径条件下, 小肠长度系数不受浓度和处理天数影响。这些结果说明, 荧光聚苯乙烯微球粒径大小可影响小肠长度系数, 但受影响程度并不与浓度正相关, 清水可部分消除 1 000 nm 和 200 nm 中浓度组、高浓度组荧光聚苯乙烯微球处理对肠道生长的抑制效应, 但随着处理天数增加抑制效应会进一步增强。暴露于粒径为 1  $\mu\text{m}$  和 10  $\mu\text{m}$  的荧光聚苯乙烯微球溶液中仅 1 h, 热带爪蟾蝌蚪的食管、胃和肠道中都清晰可见荧光染色颗粒 (Hu et al. 2016)。将 36 期非洲爪蟾蝌蚪暴露于粒径为 3  $\mu\text{m}$  的不同浓度的聚苯乙烯微球溶液中, 直至发育至 46 期蝌蚪为止, 其消化道可摄入和积累聚苯乙烯微球, 并随浓度增加而增多 (De Felice et al. 2018); 对居维尔泡蟾的研究表明, 将 37 期蝌蚪暴露于 60 mg/L 的聚乙烯塑料水体 7 d 后, 其鳃、胃肠道、肝、尾部肌肉组织和血液等组织器官中都有聚乙烯塑料分布 (Araújo et al. 2020b)。

成体两栖动物的心湿重可随食物 (张莹等 2017)、海拔 (李苹等 2020) 等因素而变化, 但对蝌蚪心形态和功能的研究较少; 肝是蝌蚪体内重要的储能器官, 也有解毒功能。本研究发现, 经 50 nm、200 nm 和 1 000 nm 荧光聚苯乙烯微球处理后, 黑斑侧褶蛙蝌蚪 1 000 nm 组心、肝湿重系数均无明显变化, 50 nm 组和

200 nm 组都在 14 d 时有显著变化,前者心湿重系数清水组显著高于其他浓度组,而肝湿重系数却显著下降,后者心湿重系数未见变化,但肝湿重系数清水组显著高于其他浓度组。这些结果说明,荧光聚苯乙烯微球处理对心功能的影响与粒径大小和浓度无关,但其清除效果受粒径大小影响,50 nm 的小粒径有助于荧光聚苯乙烯微球渗入血液,也更容易被清除。此外,50 nm 和 200 nm 粒径条件下,黑斑侧褶蛙蝌蚪 14 d 时肝湿重系数表现出相反的变化趋势,并在 21 d 时差异性消失,说明荧光聚苯乙烯微球粒径大小可即时影响肝功能,但这种影响具有时效性,可随处理天数的延长而改变。研究表明,聚乙烯暴露可改变居维尔泡蟾肝细胞核的大小、体积和形状(Araújo et al. 2020c)。

本研究从整体和器官水平探究了荧光聚苯乙烯微球对黑斑侧褶蛙蝌蚪健康状态的影响,关于荧光聚苯乙烯微球对各组织器官的生物毒性效应及其分布、积累和清除规律,尚待进一步研究确认。

## 参 考 文 献

- Araújo A P C, de Melo N F S, de Oliveira J A G, et al. 2020b. How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. *Journal of Hazardous Materials*, 382: 121066.
- Araújo A P C, Gomes A R, Malafaia G. 2020c. Hepatotoxicity of pristine polyethylene microplastics in neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Fitzinger, 1826). *Journal of Hazardous Materials*, 386: 121992.
- Araújo A P C, Malafaia G. 2020a. Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? A study conducted with neotropical tadpole species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*). *Journal of Hazardous Materials*, 391: 122214.
- Boyer L, López-Rojo N, Bosch J, et al. 2020. Microplastics impair amphibian survival, body condition and function. *Chemosphere*, 244: 125500.
- De Felice B, Bacchetta R, Santo N, et al. 2018. Polystyrene microplastics did not affect body growth and swimming activity in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(34): 34644–34651.
- Gosner K L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae. *Herpetologica*, 16(3): 183–190.
- Hu L L, Chernick M, Hinton D E, et al. 2018. Microplastics in small waterbodies and tadpoles from Yangtze River Delta, China. *Environmental Science & Technology*, 52(15): 8885–8893.
- Hu L L, Su L, Xue Y G, et al. 2016. Uptake, accumulation and elimination of polystyrene microspheres in tadpoles of *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere*, 164: 611–617.
- Koelmans A A, Besseling E, Shim W J. 2015. Nanoplastics in the Aquatic Environment. *Critical Review*. Geneva: Springer International Publishing, 325–340.
- Kögel T, Bjørøyø, Toto B, et al. 2020. Micro- and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors. *Science of the Total Environment*, 709: 136050.
- Kolenda K, Kumierek N, Pstrowska K. 2020. Microplastic ingestion by tadpoles of pond-breeding amphibians—first results from Central Europe (SW Poland). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(26): 33380–33384.
- McDiarmid R W, Altig R. 1999. Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae. Chicago: University of Chicago Press.
- Thompson R C, Olsen Y, Mitchell R P, et al. 2004. Lost at sea: Where is all the plastic? *Science*, 304(5672): 838.
- Tussellino M, Ronca R, Formiggini F, et al. 2015. Polystyrene nanoparticles affect *Xenopus laevis* development. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2): 70.
- 丁剑楠, 张闪闪, 邹华, 等. 2017. 淡水环境中微塑料的赋存、来源和生态毒理效应研究进展. *生态环境学报*, 26(9): 1619–1626.
- 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 2009. 中国动物志: 两栖纲 下卷 无尾目 蛙科. 北京: 科学出版社.
- 侯淼淼, 王春伶, 徐椿森, 等. 2020. 聚苯乙烯微塑料暴露对稀有鮡鲫仔鱼生长的影响. *四川动物*, 39(2): 140–147.
- 金晨晨, 瞿康山, 张志强. 2014b. 黑斑侧褶蛙肥满度及脏器重量的性别和季节差异. *四川动物*, 33(1): 106–112.
- 金晨晨, 张志强. 2014a. 黑斑侧褶蛙消化道重量及长度的性别和季节差异. *动物学杂志*, 49(2): 207–214.
- 李苹, 谭松, 姚忠祚, 等. 2020. 同园环境中不同海拔中华蟾蜍的心脏相对大小: 海塞规则是否适合外温动物? *四川动物*, 39(4): 394–400.

- 连丽燕, 高慧清, 孙嘉璐, 等. 2018. 变态前后花背蟾蝌蚪消化器官大小及各型白细胞百分比的适应性变化. 生态学杂志, 37(4): 1204–1210.
- 张莹, 高慧清, 王志, 等. 2017. 中华蟾蜍体重及脏器大小对禁食和重喂食处理的响应. 动物学杂志, 52(2): 294–303.
- 张志强, 王佳慧, 金冰艳, 等. 2021. 温度对黑斑侧褶蛙变态时长及 PHA-P 反应的影响. 生态学杂志, 40(12): 4029–4033.
- 张志强, 王泽洋, 许洋溢, 等. 2020. 黑斑侧褶蛙变态前后身体大小的变化及对植物血凝素的反应模式. 安徽农业大学学报: 自然科学版, 47(4): 519–523.
- 赵尔宓. 1990. 介绍一种蛙类胚胎及蝌蚪发育的分期. 生物学通报, (1): 13–15.