

黄勃铭, 吕小慧, 王秋丽, 等. 富勒烯对大型蚤的急性毒性和慢性毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(4): 620–624.

HUANG Bo-ming, LÜ Xiao-hui, WANG Qiu-li, et al. Toxicity assessments of fullerene to *Daphnia magna*: Acute toxicity and chronic toxicity[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(4): 620–624.

富勒烯对大型蚤的急性毒性和慢性毒性效应

黄勃铭^{1,2}, 吕小慧^{2,3}, 王秋丽⁴, 朱小山^{2*}, 周进², 蔡中华²

(1.清华大学环境学院, 北京 100084; 2.清华大学深圳研究生院, 广东 深圳 518000; 3.哈尔滨工业大学深圳研究生院, 广东 深圳 518000; 4.辽宁省环境监测实验中心, 沈阳 110161)

摘要:为深入理解富勒烯(Fullerene, nC₆₀)的水生生态毒理效应,以模式动物大型蚤(*Daphnia magna*)为研究对象,研究 nC₆₀ 对大型蚤的 48 h 和 72 h 急性毒性效应以及 21 d 慢性毒性效应。结果表明,急性暴露下, nC₆₀ 对大型蚤的 48 h 半抑制浓度(EC₅₀)和半致死浓度(LC₅₀)分别为 25.3 mg·L⁻¹ 和 28.5 mg·L⁻¹, 72 h 的 EC₅₀ 和 LC₅₀ 分别为 14.9 mg·L⁻¹ 和 16.3 mg·L⁻¹, 且大型蚤的跳跃频率和心跳频率随着在 nC₆₀ 中暴露时间的延长先增加后减少;慢性暴露下, 1 mg·L⁻¹ 的 nC₆₀ 即可对大型蚤的繁殖产生影响, 21 d 内总产蚤数和平均产蚤数分别为 53.3 个和 0.3 个, 与对照相比明显降低。研究结果表明, 无论急性还是慢性暴露下, nC₆₀ 均显著抑制大型蚤的生长和繁殖, 其水生生态毒性不容忽视。

关键词:大型蚤; nC₆₀; 急性毒性; 慢性毒性

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2017)04-0620-05 **doi:** 10.11654/jaes.2016-1570

Toxicity assessments of fullerene to *Daphnia magna*: Acute toxicity and chronic toxicity

HUANG Bo-ming^{1,2}, LÜ Xiao-hui^{2,3}, WANG Qiu-li⁴, ZHU Xiao-shan^{2*}, ZHOU Jin², CAI Zhong-hua²

(1.School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2.Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518000, China; 3.Shenzhen Graduate School, Harbin Institute of Technology, Shenzhen 518000, China; 4.Liaoning Environmental Monitoring & Experiment Center, Shenyang 110161, China)

Abstract: The toxicity of fullerene (nC₆₀) on aquatic organisms has received increasing concerns due to its proliferated applications and the increasing occurrence potential in water environments. The present study evaluated the acute and chronic toxicity of nC₆₀ in a model animal, zooplankton *Daphnia magna*, using immobilization and mortality as the observation endpoints. The 48 h and 72 h EC₅₀ values of nC₆₀ were 25.3 mg·L⁻¹ and 14.9 mg·L⁻¹, respectively, and the LC₅₀ values were 28.5 mg·L⁻¹ (48 h) and 16.3 mg·L⁻¹ (72 h), respectively. Moreover, nC₆₀ exposure led to increasing hop and heartbeat frequencies of *D. magna* in the initial experiment stage, while the hop and heartbeat frequencies decreased with longer exposure time. During chronic exposure, the reproduction of *D. magna* was significantly repressed at the concentration of 1 mg·L⁻¹. A significantly decrease of the total yield and the average yield of *D. magna* was observed after 21-d exposure. These results suggested that the leakage of nC₆₀, could pose risks to the aquatic animals such as *D. magna*, which indicated that the aquatic toxicity of nC₆₀ should not be ignored.

Keywords: *Daphnia magna*; nC₆₀; acute toxicity; chronic toxicity

收稿日期: 2016-12-07

作者简介: 黄勃铭(1990—), 男, 河北廊坊人, 硕士研究生, 从事纳米材料生态毒理学研究。E-mail: dmxjhbm@163.com

* 通信作者: 朱小山 E-mail: zhu.xiaoshan@sz.tsinghua.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(41373089, 41573094)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(41373089, 41573094)

富勒烯(nC_{60})作为一种典型的人工纳米材料,以其优良的性质,被人们越来越多地利用,相关产品遍布人类生产、生活的方方面面^[1]。尽管人们对 nC_{60} 和其他纳米材料应用的研究日益丰富、宽泛,但对它们的毒理学和环境效应所知甚少。大量证据表明 nC_{60} 会对人类细胞、细菌和动物产生毒害^[2-4],毒性影响包括改变革兰氏阴性菌和阳性菌细胞膜组分,引起细胞死亡等^[5-6]。此外, nC_{60} 引起人类淋巴细胞的DNA损伤和小鼠肺毒性也已被科学家证实。然而,关于 nC_{60} 对水环境生态效应的研究目前仍较少。

大型蚤是水生浮游动物的代表,是连接水生食物链的重要中间体,对净化水体有重要作用,其初级生产量直接影响水生生态系统的结构和功能^[7-8]。由于大型蚤具有的普遍性、敏感性和生命周期短等特点,使其成为国内外水生生物毒理学研究的标准测试生物,广泛用于水生生物风险评估测试。目前,国内外学者对 nC_{60} 的水生态毒理学做了初步研究。Tao等^[9]对出生24h的幼蚤进行急性毒性实验,结果表明 nC_{60} 暴露48h的 LC_{50} 为 $0.44\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,在极低的浓度即产生明显急性毒性;其实验还发现延长暴露时间不仅对母蚤产生毒性,而且对其后代产生不利影响。Tervonen等^[10]研究了不同浓度下大型蚤对 nC_{60} 的生物富集情况,发现在不同暴露浓度下 nC_{60} 均能被大型蚤迅速摄入,却很难被排出体外,这使得 nC_{60} 在肠道内形成大量累积。Tao等^[11]还发现斜生栅藻长期暴露在 nC_{60} 中,其叶绿素含量减少,光合作用受到抑制,从而使多糖、蛋白和脂质等光合产物的合成量降低。Britto等^[12]发现在紫外光照射下, nC_{60} 和低浓度藻毒素($50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)共同作用会使锦鲤的抗氧化能力受到损伤。 nC_{60} 与现有污染物的联合毒性不容忽视。另外, nC_{60} 长期暴露对大型蚤所产生的慢性毒性效应仍不清楚。

本文较为全面地考察了 nC_{60} 对大型蚤的急性慢性毒性,分别从抑制率、死亡率、跳跃频率和心跳频率等方面展开对急性毒性的研究,从21d的总产蚤量和日产蚤量两方面对慢性毒性进行评估,旨在为评估 nC_{60} 的水环境风险提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验生物

模式生物大型蚤由南开大学赠送,体长为 $(3.7\pm 0.2)\text{ mm}$,并按照Tao等^[13]方法进行培养。培养温度为 $(21\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$,溶解氧为 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,光暗周期16h/8h,每天定时投喂斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)。斜生栅

藻的培养参照赵丽红^[14]的方法。

1.2 实验试剂

nC_{60} 购于南京先丰纳米材料有限公司,杂质包含 C_{70} 、 C_{60} 的氧化物,以及微量溶剂和极少量高富勒烯,纯度大于99.5%。其余试剂均为国产优级纯或分析纯,纯度均高于99.0%。玻璃仪器在使用前均用10.0%浓硝酸浸泡48h,并用去离子水冲洗干净。

1.3 储备液的制备

试验体系是曝气3d的自来水,pH 7.4,总有机碳(TOC)为 $1.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,水中Ti、Cu、Cd和Pb的质量浓度分别为0、60、70、9 $\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (ICP-MS)。取20 $\text{ mg}\ nC_{60}$ 溶于100 mL曝气3d的自来水中,连续超声24h,直至形成橙黄色液体,然后配成 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 nC_{60} 储备液待用^[15]。用曝气3d的自来水稀释 nC_{60} 储备液,分别制备5、20、40 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 nC_{60} 悬浮液待用,现用现配。

1.4 实验方法

1.4.1 急性毒性实验

配备浓度为0、1、5、10、20、40 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的悬浮液200 mL,在100 mL小烧杯中分别加入各个浓度悬浮液50 mL,每个烧杯加入10头大型蚤(蚤龄5d)。每个浓度设置3个平行样,静水放置72h。大型蚤活动抑制和死亡的判断标准如下:反复转动烧杯,15s内失去活动能力即视为活动抑制;将大型蚤在显微镜下观察,心脏停止跳动即视为死亡。每24h观察抑制数和死亡数^[8]。另外,分别在0、2、4、8、12、24、48、72h时将1头蚤依次转入装有10 mL对应浓度的悬浮液的比色管中,肉眼计数其在30s内的跳跃次数,每头蚤数2次,共数5头,求取平均跳跃频率^[10]。在上述相同暴露时间下,取3头蚤依次在光学显微镜下观察其心跳并拍摄视频,计数其在30s内的心跳次数,计算平均心跳频率^[10]。

1.4.2 慢性毒性实验

实验单元为100 mL的烧杯内含50 mL的 nC_{60} 水溶液。实验设置0、0.1、1.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 三个浓度处理组,每个浓度组设置三个平行。每个实验单元包含10头7d蚤龄的大型蚤,每天计数新生小蚤的个数,并将小蚤从实验单元分离后更换暴露液。大型蚤每天以斜生栅藻喂食,并保证暴露液中藻细胞浓度为 $2\times 10^4\text{ }\cdot\text{mL}^{-1}$,持续记录21d后,计算每头成蚤21d内的日均产蚤数。为确保水的质量,每4d对水的温度、溶解氧、pH、电导率和碱度进行监测。

1.5 数据分析

采用EPA提供的专业软件Probit计算 nC_{60} 对大

型蚤的 48 h 和 72 h 的 EC₅₀ 和 LC₅₀, 采用 SPSS 对数据进行方差分析(One Way ANOVA)及 Turkey's Test 分析, P<0.05 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 急性毒性实验

如图 1 和图 2 所示,大型蚤的抑制数和死亡数随着 nC₆₀ 浓度的增加而增加,对于蚤龄为 5 d 的大型蚤, nC₆₀ 对其的 48 h 和 72 h 的 EC₅₀ 和 LC₅₀ 如表 1 所示。与暴露 48 h 相比, nC₆₀ 对大型蚤的 72 h EC₅₀ 和 LC₅₀ 值均显著降低,表明暴露时间越长, nC₆₀ 对大型蚤的毒性越强,说明暴露时间对于评价污染物毒性具有关键性作用。

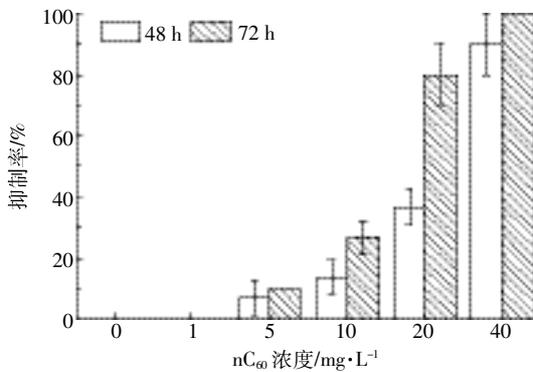


图 1 nC₆₀ 对大型蚤的活动抑制

Figure 1 Immobilization of *D. magna* after exposure to nC₆₀

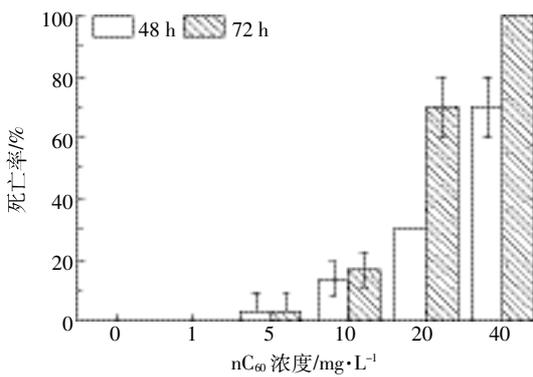


图 2 nC₆₀ 对大型蚤的致死率

Figure 2 Mortality of *D. magna* after exposure to nC₆₀

表 1 nC₆₀ 对大型蚤的 EC₅₀ 和 LC₅₀

Table 1 EC₅₀ and LC₅₀ of nC₆₀ to *D. magna*

暴露时间	实验取值	
	EC ₅₀ (95%置信区间)/mg·L ⁻¹	LC ₅₀ (95%置信区间)/mg·L ⁻¹
48 h	25.3(18.2~123.7)	28.5(20.4~156.3)
72 h	14.9(9.5~95.6)	16.3(11.6~107.6)

如图 3 所示,单一浓度组在实验开始的阶段,大型蚤的跳跃频率不断增加,与暴露时间呈正相关;但是随着暴露时间的延长,大型蚤的跳跃频率逐渐降低,游动变得迟缓。对于不同的浓度组,大型蚤跳跃频率的变化趋势基本相同,只是跳跃频率的峰值和达到峰值的时间有所不同:0、1、5、10、20、40 mg·L⁻¹ 浓度组在实验结束时的跳跃频率分别为 116、116、105、71、22、0 次·min⁻¹,跳跃频率分别在暴露 48、24、12、8、2、2 h 达到峰值,分别为 124、154、156、152、152、142 次·min⁻¹。

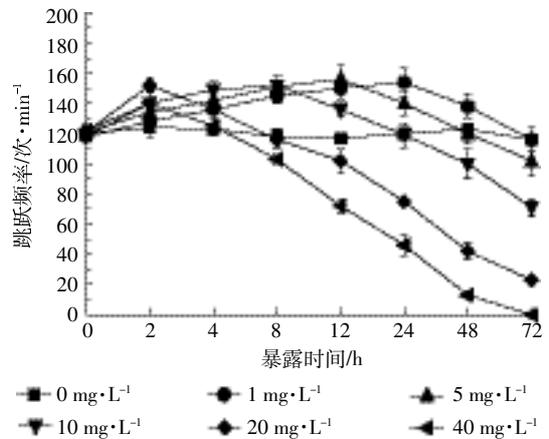


图 3 nC₆₀ 对大型蚤跳跃频率影响

Figure 3 Effect of nC₆₀ on hop frequency of *D. magna*

如图 4 所示,对于单一浓度组在实验开始的阶段,大型蚤的心跳频率不断增加,与暴露时间呈正相关;但是随着暴露时间的延长,大型蚤的心跳频率逐渐降低。对于不同的浓度组,大型蚤心跳频率的变化趋势基本相同,但实验结束时的心跳频率、达到峰值的时间和峰值有所不同:0、1、5、10、20、40 mg·L⁻¹ 浓度

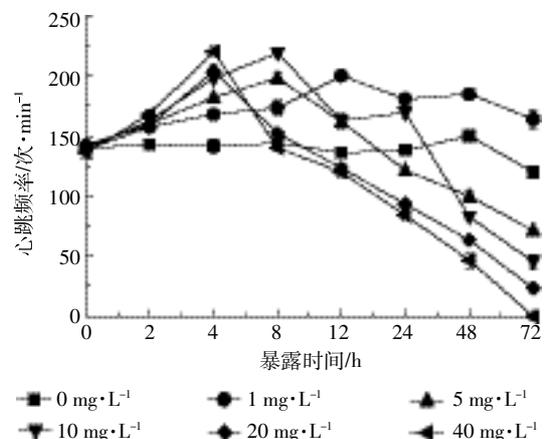


图 4 nC₆₀ 对大型蚤心跳频率影响

Figure 4 Effect of nC₆₀ on heartbeat frequency of *D. magna*

组的心跳频率分别在暴露 48、12、8、8、4、4 h 达到峰值,分别为 150、200、198、219、204、220 次·min⁻¹。

2.2 慢性毒性实验

如表 2 所示,大型蚤暴露于 nC₆₀ 21 d 后,0.1 mg·L⁻¹ 浓度组中大型蚤的总产蚤数下降,1.0 mg·L⁻¹ 浓度组中大型蚤的平均产蚤数和总产蚤数均显著下降,且在暴露 5 d 后,出现大型蚤死亡现象。21 d 慢性实验表明,nC₆₀ 在较低浓度下(1 mg·L⁻¹)仍能对大型蚤产生明显毒性效应,再一次说明暴露时间对评价毒物毒性的关键性。

表 2 nC₆₀ 对大型蚤的 21 d 慢性毒性
Table 2 21d chronic toxicity of nC₆₀ to *Daphnia magna*

浓度/mg·L ⁻¹	死亡率/%	平均产蚤数/个	总产蚤数/个
0	0	0.7	140.3
0.1	0	0.7	131.3
1.0	20	0.3	53.3

3 讨论

本实验测定了自来水体中 TOC 和几种主要有毒金属的含量,结果表明其浓度都很低,不会对大型蚤急性和慢性毒性实验产生影响。

急性毒性是评价污染物毒性的基本指标。本研究中 nC₆₀ 对蚤龄为 5 d 的大型蚤 48 h 的 EC₅₀ 和 LC₅₀ 分别为 25.3 mg·L⁻¹ 和 28.5 mg·L⁻¹,Tao 等^[9]和 Zhu 等^[16]研究表明 nC₆₀ 对大型蚤 48 h 的 LC₅₀ 分别为 0.4 mg·L⁻¹ 和 0.8 mg·L⁻¹。实验结果的差异可能与大型蚤的蚤龄有关(后者所用蚤均为蚤龄小于 24 h 的幼蚤),也可能与储备液的制备方法有关。传统的急性毒性实验一般将暴露时间设置为 48 h,但由于 nC₆₀ 在大型蚤体内的高度累积,本实验将暴露时间延长至 72 h,以探究 nC₆₀ 的毒性指标是否出现明显变化。实验结果显示其 72 h 的 EC₅₀ 和 LC₅₀ 都出现显著降低,表明将暴露时间延长至 72 h 也许对评估 nC₆₀ 的毒性更有意义。慢性毒性是评价污染物长期毒性的指标。在本研究中,1 mg·L⁻¹ 浓度的 nC₆₀ 短时间内并未对大型蚤产生明显毒性效应,但是 21 d 慢性实验表明 nC₆₀ 在较低浓度下(1 mg·L⁻¹)仍能对大型蚤产生明显毒性效应。晏晓敏等^[17]发现 nC₆₀ 在浓度低至 0.5 mg·L⁻¹ 时能显著降低大型蚤 14 d 暴露的孵化幼蚤数,在种群水平对大型蚤产生影响。与传统的污染物相比,nC₆₀ 的慢性毒性低于 Ni 和壬基苯酚,但是高于两种主要树脂酸:脱氢乙酸和松香酸^[18-20]。

其他人工纳米材料对大型蚤的毒性先前已有报道。朱小山等^[21]研究发现单壁碳纳米管(SWCNTs)和多壁碳纳米管(MWCNTs)对大型蚤活动的 48 h EC₅₀ 值分别为 1.3 mg·L⁻¹ 和 8.7 mg·L⁻¹;李轶等^[22]实验表明纳米二氧化钛对大型蚤 72 h LC₅₀ 和 EC₅₀ 分别为 22.7 mg·L⁻¹ 和 16.7 mg·L⁻¹。毒性的大小可能与纳米材料的性质有关。

已有文献表明,nC₆₀ 也会对其他水生模式生物产生急、慢性毒性。晏晓敏等^[17]研究发现,nC₆₀ 浓度达 8 mg·L⁻¹ 时尽管不影响青鳉(*Oryzias latipes*)胚胎孵化率,但增加孵化幼鱼的畸形率。朱小山等^[21]研究表明 nC₆₀ 对斜生栅藻生长的 96 h 的 EC₅₀ 值为 13.1 mg·L⁻¹。本研究对 nC₆₀ 的水生生物毒性数据进行了一定补充。

nC₆₀ 进入水体会发生团聚^[23],很容易被大型蚤吸入肠道内并难以排出体外^[10],据此我们推测 nC₆₀ 对肠道粘膜的物理损伤是使大型蚤致毒的主要原因之一。

由于动物的行为是联系生态过程和生物生理机能的纽带,其对研究污染物的毒性效应具有重要意义。行为指标比死亡率对于评价污染物毒性更加敏感。对于大型蚤而言,跳跃、心跳和摄食行为是几个易于观察的行为指标,因此本文选择其二来评价 nC₆₀ 对大型蚤的毒性。Tao 等^[13]研究了 nC₆₀ 对大型蚤跳跃频率的影响,其研究表明大型蚤的跳跃频率与暴露时间呈正相关。在本研究中,实验初期的现象与 Tao 等研究基本一致,但是随着暴露时间的延长,大型蚤的跳跃频率逐渐降低,游动变得迟缓。对这种实验现象的出现可以作出推测:大型蚤在摄入 nC₆₀ 的初始阶段,由于纳米颗粒在大型蚤体内的累积使大型蚤做出应激行为,表现为猛烈地跳动以排出体内的 nC₆₀ 颗粒;但是随着时间延长,nC₆₀ 的毒性作用显现,大型蚤逐渐出现中毒症状,活动变得迟钝。在本研究中,心跳频率的变化趋势与跳跃频率的变化趋势一致。心跳在一定程度上反映机体的能量供给情况,心跳频率的变化在一定程度上对跳跃频率的变化作出了解释。

4 结论

(1)nC₆₀ 暴露下大型蚤的跳跃和心跳活动会受到抑制,浓度越高抑制越明显。

(2)nC₆₀ 对大型蚤的 48 h 急性毒性指标 EC₅₀ 和 LC₅₀ 分别为 25.3 mg·L⁻¹ 和 28.5 mg·L⁻¹,72 h 的 EC₅₀ 和 LC₅₀ 分别为 14.9 mg·L⁻¹ 和 16.3 mg·L⁻¹。

(3)在 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, $n\text{C}_{60}$ 对大型蚤的繁殖产生影响,具有明显慢性毒性。

参考文献:

- [1] Gokhale M M, Somani R R. Fullerenes: Chemistry and its application[J]. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2015, 12(4):355-366.
- [2] SAYS C M, Marchione A A, Reed K L, et al. Comparative pulmonary toxicity assessments of C_{60} water suspensions in rats: Few differences in fullerene toxicity *in vivo* in contrast to *in vivo* profiles[J]. *Nano Letters*, 2007, 7(8):2399-2406.
- [3] Dhawan A, Taurozzi J S, Pandey A K, et al. Stable colloidal dispersions of C_{60} fullerene in water: Evidence for genotoxicity[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23):7394-7401.
- [4] Lyon D Y, Adams L K, Falkner J C, et al. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(14):4360-4366.
- [5] Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, et al. Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene[J]. *Toxicological Sciences*, 2006, 91(1):173-183.
- [6] SAYS C M, Gobin A M, Ausman K D, et al. Nano- C_{60} cytotoxicity is due to lipid peroxidation[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(36):7587-7595.
- [7] Liu X J, Ni I H, Wang W X, et al. Trophic transfer of heavy metals from freshwater zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio rerio*[J]. *Water Research*, 2002, 36(18):4563-4569.
- [8] 朱小山. 几种人工纳米材料的生态毒理学研究[D]. 天津:南开大学, 2007:94-102.
ZHU Xiao-shan. Ecotoxicological studies of several manufactured nanomaterials[D]. Tianjin: Nankai University, 2007:94-102.
- [9] Tao X J, Fortner J D, Zhang B, et al. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystals ($n\text{C}_{60}$) on *Daphnia magna*: Evaluation of sublethal reproductive responses and accumulation[J]. *Chemosphere*, 2009, 77(11):1482-1487.
- [10] Tervonen K, Waissi G, Petersen E J, et al. Analysis of fullerene C_{60} and kinetic measurements for its accumulation and depuration in *Daphnia magna*[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010, 29(5):1072-1078.
- [11] Tao X J, Yu Y X, Fortner J D, et al. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystal on *Scenedesmus obliquus*: Evaluation of the sublethal photosynthetic responses and inhibition mechanism[J]. *Chemosphere*, 2015, 122(53):162-167.
- [12] Britto R S, Flores J A, Mello D D, et al. Interaction of carbon nanomaterial fullerene (C_{60}) and Microcystin-LR in gills of fish *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cyprinidae) under the incidence of ultraviolet radiation[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2015, 226(1):1-9.
- [13] Tao X J, He Y L, Zhang B, et al. Effects of stable aqueous fullerene nanocrystal (C_{60}) on *Daphnia magna*: Evaluation of hop frequency and accumulation under different conditions[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(2):322-329.
- [14] 赵丽红. 纳米二氧化钛与环境污染对斜生栅藻联合毒性效应研究[D]. 北京:清华大学, 2015:18-30.
ZHAO Li-hong. Joint toxicity of nanotitanium dioxide and environmental pollutants on *Scenedesmus obliquus*[D]. Beijing: Tsinghua University, 2015:18-30.
- [15] Yang X Y, Edelmann R E, Oris J T. Suspended C_{60} nanoparticles protect against short term UV and fluoranthene photo-induced toxicity, but cause long term cellular damage in *Daphnia magna*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 100(2):202-210.
- [16] Zhu S Q, Oberdorster E, Haasch M L. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C_{60}) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow[J]. *Marine Environmental Research*, 2006, 62(Suppl):5-9.
- [17] 晏晓敏, 查金苗, 石宝友, 等. 纳米富勒烯聚集体系与阿特拉津复合体系对水生生物的毒性[J]. 科学通报, 2009, 54(23):3612-3618.
YAN Xiao-min, ZHA Jin-miao, SHI Bao-you, et al. Toxicity of nano fullerene aggregates and atrazine composite system to aquatic organisms[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(23):3612-3618.
- [18] Kamaya Y, Tokita N, Suzuki K. Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *aphnia magna*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 61(1):83-88.
- [19] Pane E F, McGeer J C, Wood C M. Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2004, 23(4):1051-1056.
- [20] Villarreal M J, Sancho E, Ferrando M D, et al. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*[J]. *Chemosphere*, 2003, 53(8):857-864.
- [21] 朱小山, 朱琳, 田胜艳, 等. 三种碳纳米材料对水生生物的毒性效应[J]. 中国环境科学, 2008, 28(3):269-273.
ZHU Xiao-shan, ZHU Lin, TIAN Sheng-yan, et al. Toxicity of three kinds of carbon nanomaterials to aquatic organisms[J]. *China Environment Science*, 2008, 28(3):269-273.
- [22] 李轶, 殷亚远, 王超, 等. 纳米二氧化钛和铜对大型蚤的联合毒性[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2016(2):95-100.
LI Yi, YIN Ya-yuan, WANG Chao, et al. Joint toxicity of nanotitanium dioxide and copper on *Daphnia magna*[J]. *Journal of Hohai University (Natural Science Edition)*, 2016(2):95-100.
- [23] Hu X L, Li J, Shen M H, et al. Fullerene-associated phenanthrene contributes to bioaccumulation but is not toxic to fish[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2015, 34(5):1023-1030.