



请通过网上投稿系统投稿 网址:http://www.aes.org.cn

# 氧化锌和二氧化钛纳米颗粒对淡水绿藻的单一及联合毒性研究

王壮, 金世光, 张帆, 王德高

引用本文:

王壮,金世光,张帆,等.氧化锌和二氧化钛纳米颗粒对淡水绿藻的单一及联合毒性研究[J].农业环境科学学报,2021,40(10): 2095-2105.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0319

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

## 土施纳米氧化锌对蚯蚓生理和黄瓜幼苗生长的影响

杨静雅, 符倩, 张皓月, 彭晴晴, 钟民正, 毛晖 农业环境科学学报. 2021, 40(3): 525-534 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1077

# 沉积物中人工纳米颗粒对BDE-47生态毒性的影响

龚双姣, 王萌, 龙奕, 刘珊珊, 田斌, 马陶武 农业环境科学学报. 2015, 34(11): 2089-2096 https://doi.org/10.11654/jaes.2015.11.008

# ZnO NPs对四种豆科种子发芽及幼苗生长的影响

彭晴晴,杨静雅,钟民正,邢洋洋,李紫燕,毛晖,周莉娜 农业环境科学学报.2021,40(6):1174-1182 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1462

# 二氧化钛纳米颗粒对大豆根部吸收芘的影响

马晓玥, 袁彬彬, 方国东, 高娟, 周东美 农业环境科学学报. 2020, 39(12): 2719-2725 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0484



关注微信公众号,获得更多资讯信息

2021年10月

王壮,金世光,张帆,等.氧化锌和二氧化钛纳米颗粒对淡水绿藻的单一及联合毒性研究[J].农业环境科学学报,2021,40(10): 2095-2105.

WANG Z, JIN S G, ZHANG F, et al. Single and joint toxicity of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles for freshwater algae[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(10): 2095–2105.



# 氧化锌和二氧化钛纳米颗粒对淡水绿藻的单一 及联合毒性研究

王壮1,金世光1,张帆1,王德高2

(1.南京信息工程大学环境科学与工程学院,南京 210044; 2.大连海事大学环境科学与工程学院,辽宁 大连 116026)

摘 要:以氧化锌纳米颗粒(ZnO NPs)和二氧化钛纳米颗粒(TiO<sub>2</sub> NPs)为研究对象,考察了ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs对两种淡水绿藻 (斜生栅藻和蛋白核小球藻)的单一及联合毒性。结果表明:在不同的暴露时间下,ZnO NPs对淡水绿藻的生长抑制毒性均明显高 于TiO<sub>2</sub> NPs,且溶解释放的Zn<sup>2+</sup>在ZnO NPs对斜生栅藻毒性效应中的贡献高于其在ZnO NPs对蛋白核小球藻毒性效应中的贡献。 ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs对斜生栅藻的联合毒性大于其对蛋白核小球藻的联合毒性,且ZnO NPs的毒性在二元混合物毒性中占主要贡 献。ZnO NPs与TiO<sub>2</sub> NPs对斜生栅藻的联合毒性作用方式在混合暴露浓度小于1 mg·L<sup>-1</sup>时表现为加和,而在混合暴露浓度大于1 mg·L<sup>-1</sup>时表现为拮抗;二元混合物对蛋白核小球藻在24h的联合毒性作用方式表现为协同,而在48h和72h的联合毒性作用方式 表现为拮抗。不同的暴露时间下独立作用模型对二元混合物毒性的预测能力均强于浓度加和模型,另外ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs对 淡水绿藻的联合毒性机制与纳米颗粒诱导活性氧物种生成,引起藻细胞氧化应激有关。

关键词:复合污染;纳米毒性;联合毒性;淡水绿藻;作用方式

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2021)10-2095-11 doi:10.11654/jaes.2021-0319

#### Single and joint toxicity of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles for freshwater algae

WANG Zhuang<sup>1</sup>, JIN Shiguang<sup>1</sup>, ZHANG Fan<sup>1</sup>, WANG Degao<sup>2</sup>

(1.School of Environmental Science and Engineering, Nanjing University of Information Science & Technology, Nanjing 210044, China;2.College of Environmental Sciences and Engineering, Dalian Maritime University, Dalian 116026, China)

**Abstract:** In this work the single and joint toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles (NPs) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) NPs to two freshwater green algae, namely *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, were investigated. Results showed that at different exposure durations, the growth inhibition toxicity of ZnO NPs to freshwater green algae was significantly higher than that of TiO<sub>2</sub> NPs. In addition, the contribution of dissolved Zn<sup>2+</sup>-ions to the toxicity of ZnO NPs to *S. obliquus* was higher than that of dissolved Zn<sup>2+</sup>-ions to the toxicity of ZnO and TiO<sub>2</sub> NPs to *S. obliquus* was greater than their joint toxicity of ZnO and TiO<sub>2</sub> NPs to *S. obliquus* was greater than their joint toxicity of ZnO and TiO<sub>2</sub> NPs to *S. obliquus* was additive when the mixed concentration was less than 1 mg · L<sup>-1</sup> and was antagonistic when the mixed concentration was more than 1 mg · L<sup>-1</sup>. The joint toxicity of the binary mixtures to *C. pyrenoidosa* was synergistic at 24 h and antagonistic at 48 h and 72 h. The prediction power of the independent action model for the joint toxicity of ZnO and TiO<sub>2</sub> NPs to the two freshwater green algae species was related to the generation of intracellular reactive oxygen species induced by the NPs, which resulted in oxidative stress on the algal cells.

Keywords: combination pollution; nanotoxicity; joint toxicity; freshwater algae; modes of toxic action

收稿日期:2021-03-16 录用日期:2021-06-01

作者简介:王壮(1982—),男,吉林长春人,博士,副教授,主要从事生态毒理学研究。E-mail:zhuang.wang@nuist.edu.cn 基金项目:国家自然科学基金项目(31971522)

Project supported : The National Natural Science Foundation of China (31971522)

伴随着纳米科技的快速发展,各种工程纳米结构 材料正被广泛应用于各行各业<sup>[1-2]</sup>。值得关注的是, 纳米技术已逐渐渗透到农业生产链条的各环节,其中 纳米科技与农业结合最密切的领域是纳米农业化学 品,如纳米型杀虫剂<sup>[3]</sup>、纳米肥料<sup>[4]</sup>。随着现有纳米材 料市场渗透的日益增加和不间断的新纳米材料的开 发,大量的工程纳米颗粒(ENPs)将不可避免地释放 到大气<sup>[5]</sup>、水<sup>[6]</sup>、土壤<sup>[7]</sup>中,成为潜在的环境污染物<sup>[8]</sup>。 化学污染物通常以各种混合形式存在于环境中<sup>[9-10]</sup>, 因此在靠近或远离点源处,ENPs可能会以混合物的 形式暴露于自然生态系统中。据报道,多元ENPs混 合物和各单一ENPs均表现出截然不同的生态毒 性<sup>[11-14]</sup>。因此,阐明多元混合ENPs对生态物种的联 合毒性作用及机制,将有利于为ENPs在自然环境中 的生态效应提供更为全面的评估。

多元ENPs对生态物种的联合毒性作用方式主要 表现为拮抗作用[15-16]、协同作用[17-18]及加和作用[11,19]。 不同化学成分的ENPs所组成的混合物对同一物种表 现出的毒性效应也明显不同。如 CuO NPs 与 CuNPs 对发光细菌——费氏弧菌(Vibrio fischeri)的联合毒性 表现为拮抗作用,而CuO NPs与Zn NPs对费氏弧菌 的联合毒性表现为协同作用<sup>[11]</sup>;类似地,CeO<sub>2</sub> NPs与 TiO<sub>2</sub> NPs组成的二元混合物对氨氧化模式菌株—— 欧洲亚硝化毛杆菌(Nitrosomonas europaea)的毒性作 用为拮抗作用,而CeO<sub>2</sub> NPs与ZnO NPs组成的二元 混合物对该细菌的毒性作用为协同作用[20]。此外, 具有相同成分的ENPs混合物对不同物种也会呈现出 不同的毒性效应。例如 Cu NPs 与 ZnO NPs 对虹鳟 鱼(Rainbow trout)的联合毒性为协同作用[21],而该二 元混合体系对费氏弧菌<sup>[10]</sup>和生菜(Lactuca sativa L.)<sup>[22]</sup> 的联合毒性作用方式为拮抗。因此,混合组分类型 和受试生物类型均是影响多元ENPs联合毒性的重要 因素。

ENPs对生态物种的毒性效应会随着作用时间的 变化而发生变化<sup>[23-24]</sup>。这意味着不同暴露时间可能 会影响多元ENPs对生态物种的联合毒性及其作用方 式。然而,有关不同暴露时间对多元ENPs联合毒性 及其作用方式的影响研究仍是空白。同时,目前的 研究通常只评估单一剂量/浓度下多元ENPs的联合 毒性作用方式,却很少有研究从全剂量/浓度的角度 评价多元ENPs的联合毒性作用方式。本研究选取两 种广泛应用且具有代表性的金属氧化物ENPs(即 ZnO NPs<sup>[25]</sup>和TiO<sub>2</sub> NPs<sup>[26]</sup>)为研究对象,通过毒性测 农业环境科学学报 第40卷第10期

试,考察在不同暴露时间和全浓度下 ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs分别对两种淡水绿藻[斜生栅藻(Scenedesmus obliquus)和蛋白核小球藻(Chlorella pyrenoidosa)] 的单一和联合毒性;利用毒性单位法(毒理学中用来 定量研究混合物中毒物相互作用的常用方法),评估 在不同暴露时间和全浓度下 ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs分 别对斜生栅藻和蛋白核小球藻的联合毒性作用方式; 应用经典混合毒理方法,预测在不同暴露时间和全浓 度下 ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs分别对斜生栅藻和蛋白核 小球藻的联合毒性。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验材料及测试介质

ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs 粉体购自德国 PlasmaChem 公司。ZnO NPs 的纯度>99%, 原始粒径约为14 nm, 比表面积为(30±5) m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>; TiO<sub>2</sub> NPs 为金红石相/锐钛 矿相混合物,纯度>99.5%, 原始粒径为(21±5) nm, 比 表面积为(50±10) m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>。将测试材料的粉体分散于 高纯水中以制备储备液,随即将储备液在可控温度下 超声处理 30 min 备用。本研究选取 ZnCl<sub>2</sub>中的 Zn<sup>2+</sup>作 为 ZnO NPs 溶解释放的 Zn<sup>2+</sup>的毒性参考物质, ZnCl<sub>2</sub> (纯度>99.99%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限 公司。两种淡水绿藻(斜生栅藻和蛋白核小球藻)的 原种购自中国科学院武汉水生生物研究所。荧光探 针 2', 7'-二氯荧光素酶(DCFH-DA)购自上海麦克 林生化科技有限公司。

实验所用的测试介质参考国际经济合作与发展 组织(OECD)制定的藻类生长抑制实验准则配制(附 表1,扫描文章首页 OSID 码浏览)<sup>[27]</sup>。在磁力搅拌器 的搅拌下,将 ENPs 储备液加入测试介质中以制备其 测试组悬浮液。

#### 1.2 物理化学性质表征

使用透射电子显微镜对 ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs 及 其二元混合物在测试介质中的形貌进行表征(TEM, JOEL 2100f, JOEL 有限公司, 日本东京)。使用马尔 文激光粒度仪(ZetaSizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Worcester-shire, 英国)对 ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs 及其二元混合物在测试介质中的零点电势和 水动力学直径进行表征,考虑到该仪器的检出限,本 测试选取悬浮颗粒浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup>。基于经典 DL-VO理论<sup>[28]</sup>,通过计算颗粒间相互作用的总势能确定测 试介质中 ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs 及其二元混合物的悬浮 稳定性。使用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, Thermo Fisher iCAP-Q,德国)确定ZnO NPs溶解部分的浓度。

#### 1.3 藻类生长抑制实验

实验期间,取一定量对数生长期的斜生栅藻和蛋 白核小球藻重新悬浮于新鲜的OECD培养基中,培养 至藻细胞密度分别为3×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup>和4×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup>。 淡水绿藻的培养和毒性测试条件为温度(24±1)℃, 光暗周期比12h:12h,将培养基静置于人工气候箱 中,每日摇动3次以保证绿藻处于悬浮状态且使得 ENPs与藻细胞均衡接触。选取24、48、72、96h的生 长抑制率作为斜生栅藻的毒性终点,选取24、48、72h 的生长抑制率作为蛋白核小球藻的毒性终点。

## 1.4 藻细胞氧化损伤检测

藻细胞内的活性氧(ROS)含量通过荧光探针法 测定。ROS测定过程如下:取对数生长期的藻液分别 暴露于ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs及其二元混合物中30 min,并设立对照组(未染毒纳米颗粒的藻液)。为突 出这两种ENPs对ROS生成的显著性诱导,选取中高 效应浓度10 mg·L<sup>-1</sup>为主要研究浓度。将暴露于各测 试组后的藻液在15 000 r·min<sup>-1</sup>下离心10 min,弃去上 清液,加入DCFH-DA荧光探针,使其浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup>。25℃下黑暗避光孵育30 min,然后用 OECD培养基清洗藻细胞以去除松散结合的颗粒物, 使用荧光分光光度计(F96PRO,上海棱光技术有限公 司)检测各测试组的荧光信号。

## 1.5 评估和预测联合毒性

应用对数模型(公式1)构建ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs 及其二元混合物的浓度-反应曲线(CRCs)。通过 CRCs得到每个处理组的效应值(*E*)。本研究选取单 一ENPs的毒性终点时的均值效应浓度(*EC*<sub>50</sub>)值作为 混合比率对ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs进行二元混合。

$$E = \frac{100}{1 + \left(\frac{C}{EC_{50}}\right)^{\theta}} \tag{1}$$

式中:C为颗粒物浓度,mg·L<sup>-1</sup>; $\theta$ 代表斜率。

利用毒性单位(TU)法评估ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs 的联合毒性作用方式,参考KIM等<sup>[29]</sup>的方法。利用测 试材料的 $EC_{30}$ 值计算其毒性单位值(U):

$$U = \frac{C_i}{EC_{50}} \tag{2}$$

$$U_{\text{Total}} = U_{\text{ZnONPs}} + U_{\text{TiO_{2}NPs}}$$
(3)

式中: C<sub>i</sub>为某一测试材料的浓度, mg·L<sup>-1</sup>; U<sub>Total</sub>为ZnO NPs(U<sub>ZnONPs</sub>)与TiO<sub>2</sub> NPs(U<sub>TiO-NPs</sub>)的TU值之和。混合毒

性作用方式通过比对由毒性数据计算而来的实验观察 TU 值( $U_{obs}$ )和预测的 TU 值( $U_{exp}$ )得到:当 $U_{obs} \approx U_{exp}$ ,表现为加和作用;当 $U_{obs} > U_{exp}$ ,表现为协同作用;当 $U_{obs} < U_{exp}$ ,表现为拮抗作用。

应用两种经典混合毒理方法即浓度加和(CA)模型和独立作用(IA)模型预测ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs的联合毒性。CA和IA模型如公式(4)和公式(5)所示:

$$C_{\text{xmix}} = \left(\sum_{i=1}^{n} \frac{P_i}{C_{xi}}\right)^{-1} \tag{4}$$

式中: $C_{xmix}$ 为混合体系在产生x%效应时所对应的浓度,mg·L<sup>-1</sup>; $P_i$ 为组分i的浓度比值; $C_{xi}$ 为混合组分i在 产生x%效应时所对应的浓度,mg·L<sup>-1</sup>。

$$E(C_{\rm mix}) = 1 - \prod_{i=1}^{n} [1 - E(C_i)]$$
(5)

式中: $E(C_{mix})$ 为混合体系的效应值; $E(C_i)$ 为混合组分i的效应值。

## 1.6 统计分析

每组实验均设3个平行,实验结果表示为平均 值±标准差。采用SigmaPlot(14.0版)统计分析模块对 实验数据进行t检验,P<0.05表示有显著性差异。

# 2 结果与讨论

#### 2.1 物理化学性质表征

使用TEM技术表征了ZnO NPs、TiO<sub>2</sub> NPs及其二 元混合物在测试介质中的形貌。如图1所示,ZnO NPs(图1A)和TiO<sub>2</sub> NPs(图1B)在测试介质中均呈现 团聚现象,当两种ENPs共存时(图1C)颗粒间团聚行 为亦存在。这是由于ENPs比表面积大、比表面能高, 属于热力学不稳定体系,在水中极易发生团聚现象, 并形成大小不等的团聚体。

ENPs的表面电势和水动力学直径是表征纳米颗 粒在水相中分散稳定性和团聚行为的重要物理化学 性质<sup>[30-31]</sup>。图2为ZnO NPs、TiO<sub>2</sub> NPs及其二元混合物 在测试介质中的表面电势和团聚粒径大小随时间的 变化。如图2A所示,ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs在96h时的 表面电势与0h时相比均未发生显著性的变化。在初 始时刻,ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs二元混合物的表面电势 与各单一组分的表面电势均不存在显著差异。然而, 在96h后,与其他处理组相比,二元混合物的表面电 势发生了显著性降低(P<0.05)。这可能是由于纳米 颗粒不断发生沉降,当体系达到平衡,ZnO NPs和 TiO<sub>2</sub> NPs表面所携带的负电荷整体表现出叠加作用, 故呈现出表面电势降低的现象。如图2B所示,在96

www.ger.org.cn









图 2 初始时刻(0 h)和96 h时 ZnO NPs、TiO<sub>2</sub> NPs及二者组成的混合物的零点电势和水动力学直径 Figure 2 Zeta potential and hydrodynamic diameter of ZnO NPs, TiO<sub>2</sub> NPs, and ZnO + TiO<sub>2</sub> NPs at 0 h and 96 h

h后,ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs的水动力学直径均高于其 原始粒径,进一步说明这两种ENPs在测试介质中发 生了团聚行为。ZnO NPs在96h时的水动力学直径 与0h时相比未发生显著性的变化,且TiO<sub>2</sub> NPs的水 动力学直径显著小于ZnO NPs的水动力学直径。在 0h,二元混合物的水动力学直径介于单独存在的 TiO<sub>2</sub> NPs和ZnO NPs的水动力学直径之间。在96h, 二元混合物的水动力学直径与ZnO NPs的水动力学 直径无显著性的差异,说明TiO<sub>2</sub> NPs可能被"包裹"在 ZnO NPs之间。

应用经典DLVO理论可有效地评估ENPs在水相中的分散稳定性<sup>[32-33]</sup>。基于DLVO理论,计算得到10mg·L<sup>-1</sup>ZnONPs、10mg·L<sup>-1</sup>TiO<sub>2</sub>NPs及其二元混合物的总势能曲线,如图3所示。由于线性叠加而导致的势能曲线上出现的最大值,被称为势能峰值。通常势能峰值越大,体系保持稳定的时间越长。如图3A所示,在0h时,二元混合物的稳定性介于TiO<sub>2</sub>NPs和ZnONPs的稳定性高于TiO<sub>2</sub>NPs和ZnONPs的稳定性高于TiO<sub>2</sub>NPs和ZnONPs的稳定

性。这与前述的理化性质表征结果一致,即在96h后 二元混合物的颗粒表面电势降低,表明颗粒间以斥力 为主,难以团聚而处于稳定悬浮状态。

由于ZnO NPs表面性质活泼,进入水相后可溶解 释放 Zn<sup>2+[34-35]</sup>, 而共存的惰性 TiO<sub>2</sub> NPs 可利用表面效 应吸附水中游离态的Zn<sup>2+</sup>,进而能够降低Zn<sup>2+</sup>的生物 活性[36]。本文定量分析了 10 mg·L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> NPs 对 10 mg·L<sup>-1</sup> ZnO NPs 溶解释放 Zn<sup>2+</sup>的影响。如图4所示, 单独存在的ZnO NPs溶解释放Zn<sup>2+</sup>的比例为16%± 1.7%, 而当与TiO<sub>2</sub> NPs共存时, ZnO NPs溶解释放Zn<sup>2+</sup> 的比例为2.2%±0.2%。由此可见, TiO<sub>2</sub> NPs 的存在降 低了ZnO NPs溶解释放 $Zn^{2+}$ 的浓度。如图2B所示,与 ZnO NPs相比, TiO<sub>2</sub> NPs具有更小的水动力学直径,这 使得TiO<sub>2</sub> NPs的团聚体拥有更大的比表面积,易于通 过表面吸附降低ZnO NPs溶解释放Zn<sup>2+</sup>的量。另外, 具有更小水动力学直径的TiO2 NPs可能更易于占据 ZnO NPs表面的活性位点,从而抑制Zn<sup>2+</sup>的释放。同 时,如图2A所示,TiO2NPs在测试介质中表面电势为 负,即携带负电荷,故静电作用是上述吸附过程的主



图 3 初始时刻(0 h)和96 h时ZnO NPs、TiO<sub>2</sub> NPs及二者组成 的混合物的总势能曲线

Figure 3 Total potential energy( $V_T$ ) curves for ZnO NPs, TiO<sub>2</sub> NPs, and ZnO + TiO<sub>2</sub> NPs at 0 h and 96 h

要驱动力。

## 2.2 单一藻毒性

图 5 为不同暴露时间下 ZnO NPs、TiO<sub>2</sub> NPs、Zn<sup>2+</sup> 对斜生栅藻和蛋白核小球藻的浓度-反应曲线 (CRCs)。整体而言, ZnO NPs、TiO<sub>2</sub> NPs、Zn<sup>2+</sup>对两种 淡水绿藻均以浓度依赖的方式产生生长抑制毒性。 对于斜生栅藻,不同暴露时间下ZnO NPs(图5A)、 TiO<sub>2</sub> NPs(图 5C)和Zn<sup>2+</sup>(图 5E)的CRCs有明显的交 叉。对于蛋白核小球藻,在48h和72h下ZnONPs (图 5B)、TiO<sub>2</sub> NPs(图 5D)和Zn<sup>2+</sup>(图 5F)的CRCs 向较 高的生长抑制毒性区域移动。结合 ECso 值进一步比 较ZnO NPs、TiO<sub>2</sub> NPs、Zn<sup>2+</sup>的毒性大小,结果如表1和 表2所示,结合置信区间,在不同暴露时间下ZnO NPs 的 EC50 值均小于 TiO2 NPs 的 EC50 值, 说明 ZnO NPs 对 两种淡水绿藻的生长抑制毒性均高于 TiO<sub>2</sub> NPs。 ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs 在不同暴露时间下对斜生栅藻 的 EC50 值无显著差异(表1)。ZnO NPs 和 TiO2 NPs 在 48h和72h对蛋白核小球藻的EC50值明显小于其在 24 h的 EC50 值(表 2),表明随着暴露时间的延长,ZnO





NPs和TiO<sub>2</sub>NPs对蛋白核小球藻的生长抑制毒性逐渐增强。在毒性终点,ZnONPs对斜生栅藻的毒性高于其对蛋白核小球藻的毒性,而TiO<sub>2</sub>NPs对蛋白核小球藻的毒性高于其对斜生栅藻的毒性。这也说明,不同种类的淡水绿藻对ENPs的敏感性存在差别,且蛋白核小球藻对ENPs的敏感性依赖于暴露时间。斜生栅藻通常由4个细胞组成,细胞宽度为12~34 μm,长度为10~21 μm,呈扁平状,而蛋白核小球藻力单细胞,呈球形,直径3~5 μm。蛋白核小球藻直径更小,比表面积更高,可维持更稳定的悬浮状态。随着暴露时间的延长,蛋白核小球藻可维持对ENPs更有效的摄取,进而随着暴露时间的延长毒性效应逐渐增强。

如表1和表2所示,就EC。值及其置信区间而言, Zn<sup>2+</sup>与ZnO NPs 对斜生栅藻生长的抑制毒性在不同暴 露时间下均无显著性差异,而Zn<sup>2+</sup>对蛋白核小球藻的 生长抑制毒性略低于ZnO NPs。ZnO NPs暴露浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup>时,其溶解释放Zn<sup>2+</sup>的平均浓度为1.6 mg· L<sup>-1</sup>。1.6 mg·L<sup>-1</sup>Zn<sup>2+</sup>对斜生栅藻在不同暴露时间的生 长抑制效应分别为65%(24 h)、86%(48 h)、99%(72 h)、99%(96h);Zn<sup>2+</sup>对蛋白核小球藻在不同暴露时间 的生长抑制效应分别为4%(24 h)、30%(48 h)、39% (72 h)。这说明 Zn<sup>2+</sup>是 ZnO NPs 对淡水绿藻生长抑制 毒性的主要来源。前人研究也证实,ZnO NPs表现出 的毒性主要来源于其颗粒自身及其溶解释放的 Zn<sup>2+[19,35]</sup>。本研究还发现Zn<sup>2+</sup>对斜生栅藻的EC<sub>50</sub>值明 显小于 $Zn^{2+}$ 对蛋白核小球藻的 $EC_{50}$ 值(表1和表2), 说明Zn<sup>2+</sup>对斜生栅藻的毒性高于对蛋白核小球藻的 毒性。这也表明斜生栅藻对Zn<sup>2+</sup>的敏感性高于蛋白 核小球藻对Zn<sup>2+</sup>的敏感性。综上,溶解释放的Zn<sup>2+</sup>在 ZnO NPs 对斜生栅藻毒性中的贡献高于其在 ZnO NPs 对蛋白核小球藻毒性中的贡献,ZnO NPs 对斜生栅藻

www.aer.org.cn





Figure 5 Concentration-response curves for Scenedesmus obliguus and Chlorella pyrenoidosa exposed to ZnO NPs , TiO $_2$  NPs , Zn $^{2+}$  , and ZnO+TiO $_2$  NPs

的毒性主要来源于溶解释放的Zn<sup>2+</sup>,而其对蛋白核小 球藻的毒性不仅来源于溶解释放的Zn<sup>2+</sup>,还来源于颗 粒自身。同时,作为一种惰性ENPs的TiO<sub>2</sub> NPs,其对

淡水绿藻的毒性取决于其颗粒自身。

## 2.3 联合藻毒性

ZnO NPs 和TiO<sub>2</sub> NPs 的二元混合物对两种淡水

2021年10月

表1 通过浓度-反应曲线得到单一测试材料和二元混合物对斜生栅藻的均值效应浓度 $(\mathit{EC}_{50}, \mathrm{mg}\cdot\mathrm{L}^1)$ 

Table 1 Mean effect concentrations  $(EC_{50})$  derived from concentration-response curves of the single test materials and the binary mixtures to *Scenedesmus obliguus* (mg·L<sup>-1</sup>)

|   |                      | •                  |                    | 0                   |                     |
|---|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| 测试材料Test material                                 |                      | 24 h               | 48 h               | 72 h                | 96 h                |
| 单一毒性<br>Single toxicity<br>联合毒性<br>Joint toxicity | ZnO NPs              | 0.20 [0.12~0.29]   | 0.13 [0.10~0.15]   | 0.19 [0.16~0.22]    | 0.23 [0.19~0.27]    |
|   | TiO <sub>2</sub> NPs | 15.85 [1.44~30.26] | 13.55 [6.43~20.66] | 16.95 [12.36~21.55] | 19.75 [17.02~23.00] |
|   | Zn <sup>2+</sup>     | 0.41 [0.30~0.52]   | 0.15 [0.07~0.24]   | 0.15 [0.08~0.21]    | 0.16 [0.12~0.19]    |
|   | OBS                  | 0.24 [0.01~0.46]   | 0.18 [0.13~0.24]   | 0.26 [0.21~0.32]    | 0.33 [0.25~0.41]    |
|   | IA                   | 0.10 [0.09~0.10]   | 0.11 [0.09~0.12]   | 0.17 [0.16~0.18]    | 0.21 [0.20~0.22]    |
|   | CA                   | 8.40 [8.40~8.41]   | 5.82 [5.46~6.18]   | 8.26 [8.12~8.39]    | 9.81 [9.68~9.94]    |

注:[]中数值为95%双侧置信区间;OBS=观察值;IA=独立作用;CA=浓度加和。下同。

Note: The 95% two-sided confidence intervals are shown in []; OBS = observed toxicity; IA = independent action; CA = concentration addition. The same below.

| 表2. 通讨浓度-反应曲线得到单 | 一测试材料和二元混合物对蛋白核小球藻的均值效应浓度(EC。 | $mg \cdot L^{-1}$ |
|------------------|-------------------------------|-------------------|
|                  |                               | (), III () /      |

Table 2 Mean effect concentrations  $(EC_{50})$  derived from concentration-response curves of the single test materials and the binary mixtures to *Chlorella pyrenoidosa* (mg·L<sup>-1</sup>)

| 测试材料 Test material |                      | 24 h                | 48 h              | 72 h             |
|--------------------|----------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| 单一毒性               | ZnO NPs              | 10.12 [3.73~16.51]  | 1.10 [0.59~1.61]  | 0.50 [0.32~0.68] |
| Single toxicity    | TiO <sub>2</sub> NPs | 23.60 [-5.71~52.92] | 3.13 [-0.19~6.45] | 5.38 [3.36~8.23] |
|                    | Zn <sup>2+</sup>     | 12.53 [-2.98~28.04] | 5.56 [4.18~6.94]  | 2.76 [1.85~3.67] |
| 联合毒性               | OBS                  | 3.33 [1.46~5.20]    | 0.71 [0.45~0.96]  | 1.05 [0.68~1.42] |
| Joint toxicity     | IA                   | 1.07 [1.00~1.14]    | 0.21 [0.19~0.22]  | 0.30 [0.27~0.33] |
|                    | CA                   | 21.23 [19.61~22.85] | 2.69 [2.68~2.70]  | 2.90 [2.86~2.93] |

绿藻生长抑制毒性的CRCs如图5G和图5H所示。二 元混合物对斜生栅藻和蛋白核小球藻的 EC50 值如表 1和表2所示。与ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs的单一毒性类 似,二元混合物以混合暴露浓度依赖的方式对淡水绿 藻产生生长抑制毒性。同样地,二元混合物在不同暴 露时间下对斜生栅藻的EC50值无显著差异(表1),二 元混合物在48h和72h对蛋白核小球藻的EC50值明 显小于其在24h时的 $EC_{50}$ 值(表2)。另外,二元混合 物对两种淡水绿藻的 EC50 值与 ZnO NPs 的 EC50 值并 无显著差异,说明ZnO NPs在二元混合物中对淡水绿 藻的毒性起主要的作用。在不同暴露时间下,二元混 合物对斜生栅藻的 EC50 值明显小于其对蛋白核小球 的EC50值,表明二元混合物对斜生栅藻的毒性大于其 对蛋白核小球的毒性。这也意味着斜生栅藻对ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs二元混合物的敏感性高于蛋白核小 球藻对二元混合物的敏感性。

# 2.4 联合藻毒性作用方式及机制

基于 TU法评估 ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs 对两种淡水 绿藻全浓度范围内的联合毒性作用方式。如图 6A 所 示, ZnO NPs 与 TiO<sub>2</sub> NPs 对斜生栅藻的联合毒性作用 方式在毒性单位值小于 10(即混合暴露浓度小于 1 mg·L<sup>-1</sup>)时表现为加和, 而在毒性单位值大于 10(即混 合暴露浓度大于1 mg·L<sup>-1</sup>)时表现为拮抗。在组分浓 度较低时,ZnO NPs与TiO<sub>2</sub> NPs共同竞争与藻细胞间 的相互作用,在所有效应达到平衡时,产生加和效应。 当混合组分浓度增加,一方面ZnO NPs颗粒间团聚性 增加而抑制了Zn<sup>2+</sup>的释放,另一方面共存的TiO<sub>2</sub>NPs 通过吸附作用和占据 ZnO NPs 表面活性位点的方式 降低了Zn<sup>2+</sup>的释放量(图4),从而导致ZnO NPs毒性 降低,混合体系产生了拮抗作用。如图6B所示,ZnO NPs与TiO<sub>2</sub>NPs二元混合物对蛋白核小球藻在24h 的联合毒性作用方式表现为协同,而在48h和72h的 联合毒性作用方式表现为拮抗。如物理化学性质的 表征结果(见2.1)所示,ZnO NPs与TiO<sub>2</sub> NPs的二元混 合物可产生复合团聚体,该复合体可与藻细胞直接接 触,破坏藻细胞壁,并可被摄入细胞内,加上各混合组 分对藻细胞的毒性作用,进而产生了协同作用。随着 时间的延长,复合团聚体的尺度逐渐增大,较难进入 藻细胞,毒性逐渐降低。加上TiO<sub>2</sub> NPs 通过控制ZnO NPs溶解释放Zn<sup>2+</sup>量降低了ZnONPs的毒性,故混合 体系在48h和72h产生拮抗作用。综上可知,ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs对斜生栅藻的联合毒性作用方式与 混合暴露浓度有关,对蛋白核小球藻的联合毒性作用 方式与暴露时间有关。同时,控制Zn<sup>2+</sup>释放量及颗粒





exposure to the mixtures of ZnO NPs and TiO2 NPs

团聚体与细胞间的相互作用是导致混合体系联合毒 性作用方式变化的内在驱动力。

据报道,由颗粒诱导产生ROS所引起的细胞内 氧化应激效应是ENPs主要的毒性作用机制[37-38]。本 研究通过荧光探针法检测了两种淡水绿藻暴露于单 独ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs及其二元混合物后藻细胞内 ROS的含量变化(图7)。相比于对照组,单独ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs均显著诱导了两种淡水绿藻细胞内 ROS水平的升高,且ZnO NPs诱导细胞内ROS升高的 水平显著高于TiO<sub>2</sub> NPs,这可能会导致藻细胞产生更 严重的氧化损伤,进而造成更严重的生长抑制毒性, 该结果与生长抑制毒性结果一致(表1和表2)。此 外,ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs二元混合物诱导的ROS水平 也显著高于对照组,说明氧化损伤效应也可能是二元 混合物对淡水绿藻产生毒性的作用机制。同时发现 二元混合物诱导的 ROS 水平介于 ZnO NPs 和 TiO2 NPs诱导的ROS水平之间,表明这两种ENPs间的相 互作用可能调节了各自诱导藻细胞内ROS的水平。

### 2.5 联合藻毒性的预测

为了满足对混合污染物风险评价的需要,定量预测混合污染物的联合毒性已成为生态毒理研究的一项重要工作<sup>[39-40]</sup>。本文应用混合毒理研究中两种最常用的模型,即IA和CA模型预测ZnONPs和TiO2NPs对两种淡水绿藻的联合毒性。如图8所示,对于斜生栅藻,IA模型预测的CRCs适度的偏离了实验观察的CRCs,而CA模型预测的CRCs严重偏离了实验观察的CRCs。同时,IA模型预测的CRCs位于实验观察的CRCs的置信区间内,而CA模型预测的CRCs

型可有效预测ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs的联合毒性,且预测能力远高于CA模型。此外,IA模型预测的CRCs 位于实验观察的CRCs的左侧,表明IA模型高估了该 二元混合物的联合毒性;而CA模型预测的CRCs位 于实验观察的CRCs的右侧,表明CA模型低估了该 二元混合物的联合毒性。由表1可知,对于斜生栅



图7 暴露于ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs及其二元混合物后斜生栅藻 和蛋白核小球藻细胞内的活性氧(ROS)水平



藻,IA模型预测的EC<sub>50</sub>值在24h时与实验观察得到的EC<sub>50</sub>值无显著差异,而在48、72、96h时IA模型预测的EC<sub>50</sub>值显著低于实验观察得到的EC<sub>50</sub>值。同时CA模型预测的EC<sub>50</sub>值在不同暴露时间均高于实验观察得到的EC<sub>50</sub>值。这进一步说明IA模型高估了二元混合物对斜生栅藻的毒性,而CA模型低估了二元混合物对斜生栅藻的毒性。对比不同模型预测的EC<sub>50</sub>值与实验观察得到的EC<sub>50</sub>值,发现IA模型预测的EC<sub>50</sub>值与实验观察得到的EC<sub>50</sub>值之间的差异明显小于CA模型预测的EC<sub>50</sub>值与实验观察得到的EC<sub>50</sub>值之间的差异明显小

如图9所示,对于蛋白核小球藻,IA模型和CA模型预测的CRCs均明显偏离了实验观察得到的CRCs 在24h时,IA模型和CA模型预测的CRCs均位于实验观察的CRCs的置信区间内,而在48h和72h,IA模型和CA模型预测的CRCs均位于实验观察的CRCs 的预测区间的边缘。与斜生栅藻类似,IA模型预测的CRCs位于实验观察的CRCs的无侧,表明IA模型 CRCs位于实验观察的CRCs的右侧,表明CA模型低估了该二元混合物的联合毒性。由表2可知,对于蛋白核小球藻,不同的暴露时间下,IA模型预测的ECso值均显著低于实验观察得到的ECso值,同时CA模型预测的ECso值均高于实验观察得到的ECso值。这也说明IA模型高估了二元混合物对蛋白核小球藻的毒性,而CA模型低估了二元混合物对蛋白核小球藻的毒性。对比不同模型预测的ECso值与实验观察得到的ECso值,发现IA模型预测的ECso值与实验观察得到的ECso值之间的差异明显小于CA模型预测的ECso值与实验观察得到的ECso值之间的差异,说明IA模型的预测能力高于CA模型。

应用 CA 模型和 IA 模型的前提条件为混合组分 具有相似的毒性作用方式<sup>[41]</sup>和非相似的毒性作用方 式<sup>[42]</sup>,且混合体系的联合毒性作用方式为加和。虽然 本研究 ZnO NPs 和 TiO<sub>2</sub> NPs 的联合毒性作用方式随 着混合暴露浓度和暴露时间的变化而变化,主要表现 出加和、协同及拮抗作用,但目前可有效预测 ENPs 协 同和拮抗作用的混合毒理模型尚属空白。相比于 CA



独立作用(IA)和浓度加和(CA)模型的预测值

Figure 8 Comparison between regression models of the observed(OBS) toxicity and expected toxicity of the binary mixtures of ZnO NPs and TiO<sub>2</sub> NPs to *Scenedesmus obliquus* according to the independent action(IA) and the concentration addition(CA) models at 24,48,72 h, and 96 h

www.aer.org.cn



# 图 9 24、48、72 h时 ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs对蛋白核小球藻联合 毒性的实验观察(OBS)值与独立作用(IA)和浓度加和(CA) 模型的预测值

Figure 9 Comparison between regression models of the observed (OBS) toxicity and expected toxicity of the binary mixtures of ZnO NPs and TiO<sub>2</sub> NPs to *Chlorella pyrenoidosa* according to the independent action(IA) and the concentration addition(CA) models at 24,48 h, and 72 h

模型,IA模型对ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs联合毒性的预测 能力明显更高,且IA模型预测的EC<sub>50</sub>值与实验观察 得到的EC<sub>50</sub>值存在较小的差异。因此,IA模型可作 为预测ENPs联合毒性的预先防范工具。

## 3 结论

(1)在不同的暴露时间,ZnO NPs对斜生栅藻和

蛋白核小球藻的生长抑制毒性均明显高于TiO2NPs。

(2)ZnO NPs与TiO<sub>2</sub> NPs对斜生栅藻的联合毒性 作用方式在混合暴露浓度小于1 mg·L<sup>-1</sup>时表现为加 和,而在混合暴露浓度大于1 mg·L<sup>-1</sup>时表现为拮抗。

(3)二元混合物对蛋白核小球藻在暴露时间为 24 h时的联合毒性作用方式表现为协同,而在48 h和 72 h时的联合毒性作用方式表现为拮抗。

(4)ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs对淡水绿藻的联合毒性 机制为纳米颗粒诱导ROS生成,从而引起藻细胞氧 化应激效应。

(5)在不同暴露时间下,独立作用模型对ZnO NPs和TiO<sub>2</sub> NPs联合毒性的预测能力强于浓度加和模型。

#### 参考文献:

- NEL A, XIA T, MÄDLER L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. Science, 2006, 311:622–627.
- [2] 路轲, 宋正国. 喷施不同纳米材料对水稻幼苗磷含量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(1):28-36. LU K, SONG Z G. Effects of different sprayed nanomaterials on the phosphorus content in rice seed-lings[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(1):28-36.
- [3] 张大侠、潘寿贺, 白海秀, 等. 纳米杀虫剂及其在农业害虫防治中的应用[J]. 昆虫学报, 2020, 63(10):1276-1286. ZHANG D X, PAN S H, BAI H X, et al. Nanoinsecticides and their application in agricultural insect pest management[J]. Acta Entomologica Sinica, 2020, 63 (10):1276-1286.
- [4] 李小龙, 孙占伟, 过伟民, 等. 纳米碳增效肥料对烟草农艺性状和经济指标的影响[J]. 土壤, 2016, 48(4):831-834. LI X L, SUN Z W, GUO W M, et al. Effects of nano-carbon synergistic fertilizer on agronomical characters and economic indices of flue-cured tobacco[J]. *Soils*, 2016, 48(4):831-834.
- [5] SANCHÍS J, BERROJALBIZ N, CABALLERO G, et al. Occurrence of aerosol-bound fullerenes in the mediterranean sea atmosphere[J]. *Envi*ronmental Science & Technology, 2012, 46(3):1335–1343.
- [6] BARANIDHARAN S, KUMAR A. Preliminary evidence of nanoparticle occurrence in water from different regions of Delhi(India)[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2018, 190(4):240.
- [7] JOŚKO I. Copper and zinc fractionation in soils treated with CuO and ZnO nanoparticles: The effect of soil type and moisture content[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 653:822–832.
- [8] STUART E, COMPTON R G. Nanoparticles-emerging contaminants [M]. New York: Springer, 2015.
- [9] 刘树深,张瑾,张亚辉,等. APTox:化学混合物毒性评估与预测[J]. 化学学报, 2012, 70(14):1511-1517. LIU S S, ZHANG J, ZHANG Y H, et al. APTox: Assessment and prediction on toxicity of chemical mixtures[J]. Acta Chimica Sinica, 2012, 70(14):1511-1517.
- [10] ALTENBURGER R, WALTER H, GROTE M. What contributes to the combined effect to of a complex mixture?[J]. *Environmental Sci*ence & Technology, 2004, 38(23):53-62.

[11] ZHANG H, SHI J, SU Y, et al. Acute toxicity evaluation of nanoparti-

cles mixtures using luminescent bacteria[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2020, 192(8):484.

- [12] WANG Z, JIN S, ZHANG F, et al. Combined toxicity of TiO<sub>2</sub> nanospherical particles and TiO<sub>2</sub> nanotubes to two microalgae with different morphology[J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(12):2559.
- [13] TONG T, WILKE C M, WU J, et al. Combined toxicity of nano-ZnO and nano-TiO<sub>2</sub>: From single - to multinanomaterial systems[J]. *Envi*ronmental Science & Technology, 2015, 49(13):8113-8123.
- [14] YU R, WU J, LIU M, et al. Toxicity of binary mixtures of metal oxide nanoparticles to *Nitrosomonas europaea*[J]. *Chemosphere*, 2016, 153: 187–197.
- [15] SINGH D, KUMAR A. Assessment of toxic interaction of nano zinc oxide and nano copper oxide on germination of *Raphanus sativus* seeds [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2019, 191(11):703.
- [16] OGUNSUYI O I, FADOJU O M, AKANNI O O, et al. Genetic and systemic toxicity induced by silver and copper oxide nanoparticles, and their mixture in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26:27470–27481.
- [17] WILKE C M, WUNDERLICH B, GAILLARD J F, et al. Synergistic bacterial stress results from exposure to nano-Ag and nano-TiO<sub>2</sub> mixtures under light in environmental media[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(5):3185-3194.
- [18] LIU Y, WANG S, WANG Z, et al. TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub> nanoparticles synergistically provoke cellular oxidative damage in freshwater microalgae[J]. *Nanomaterials*, 2018, 8(2):95.
- [19] YE N, WANG Z, WANG S, et al. Toxicity of mixtures of zinc oxide and graphene oxide nanoparticles to aquatic organisms of different trophic level: Particles outperform dissolved ions[J]. *Nanotoxicology*, 2018, 12(5):423-438.
- [20] YU R, WU J, LIU M, et al. Toxicity of binary mixtures of metal oxide nanoparticles to *Nitrosomonas europaea*[J]. *Chemosphere*, 2016, 153: 187-197.
- [21] HERNÁNDEZ-MORENO D, VALDEHITA A, CONDE E, et al. Acute toxic effects caused by the co-exposure of nanoparticles of ZnO and Cu in rainbow trout[J]. Science of the Total Environment, 2019, 687:24-33.
- [22] LIU Y, BAAS J, PEIJNENBURG W J G M, et al. Evaluating the combined toxicity of Cu and ZnO nanoparticles: Utility of the concept of additivity and a nested experimental design[J]. *Environmental Science* & Technology, 2016, 50(10):5328-5337.
- [23] JOŚKO I, KUSIAK M, OLESZCZUK P. The chronic effects of CuO and ZnO nanoparticles on *Eisenia fetida* in relation to the bioavailability in aged soils[J]. *Chemosphere*, 2021, 266:128982.
- [24] KELPSIENE E, TORSTENSSON O, EKVALL M T, et al. Long-term exposure to nanoplastics reduces life-time in *Daphnia magna*[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1):5979.
- [25] DU J, TANG J, XU S, et al. ZnO nanoparticles: Recent advances in ecotoxicity and risk assessment[J]. Drug and Chemical Toxicology, 2020, 43(3):322-333.
- [26] LUO Z, LI Z, XIE Z, et al. Rethinking nano-TiO<sub>2</sub> safety: Overview of toxic effects in humans and aquatic animals[J]. Small, 2020, 16(36): e2002019.

- [27] OECD. Test No. 201: In proceedings of the OECD freshwater Alga and Cyanobacteria, growth Inhibition test[EB / OL]. [2021-06-01]. http://www.oecd.org.
- [28] COSGROVE T. Colloid science principles, methods and applications [M]. Bristol; Blackwell Publishing Ltd., 2005.
- [29] KIM K T, KLAINE S J, LIN S, et al. Acute toxicity of a mixture of copper and single-walled carbon nanotubes to *Daphnia magna*[J]. *Envi*ronmental Toxicology and Chemistry, 2010, 29(1):122-126.
- [30] WANG Z, QUIK J T K, SONG L, et al. Dissipative particle dynamic simulation and experimental assessment of the impacts of humic substances on aqueous aggregation and dispersion of engineered nanoparticles[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2018, 37 (4) : 1024-1031.
- [31] XIAO Y, VIJVER M G, PEIJNENBURG W J G M. Impact of water chemistry on the behavior and fate of copper nanoparticles[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 234:684–691.
- [32] LIU H H, SURAWANVIJIT S, RALLO R, et al. Analysis of nanoparticle agglomeration in aqueous suspensions via constant-number Monte Carlo simulation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45 (21):9284–9292.
- [33] BAALOUSHA M. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter[J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(6):2093–2101.
- [34] DOBRETSOV S, SATHE P, BORA T, et al. Toxicity of different zinc oxide nanomaterials at 3 trophic levels: Implications for development of low-toxicity antifouling agents[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2020, 39(7):1343-1354.
- [35] XIAO Y, VIJVER M G, CHEN G, et al. Toxicity and accumulation of Cu and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*[J]. *Environmental Sci*ence & Technology, 2015, 49(7):4657–4664.
- [36] HUA J, PEIJNENBURG W J G M, VIJVER M G. TiO<sub>2</sub> nanoparticles reduce the effects of ZnO nanoparticles and Zn ions on zebrafish embryos(*Danio rerio*)[J]. *NanoImpact*, 2016, 2:45–53.
- [37] PIKULA K, MINTCHEVA N, KULINICH S A, et al. Aquatic toxicity and mode of action of CdS and ZnS nanoparticles in four microalgae species[J]. *Environmental Research*, 2020, 186:109513.
- [38] THIAGARAJAN V, NATARAJAN L, SEENIVASAN R, et al. Tetracycline affects the toxicity of P25 n-TiO<sub>2</sub> towards marine microalgae *Chlorella* sp.[J]. *Environmental Research*, 2019, 179:108808.
- [39] TRINH T X, KIM J. Status quo in data availability and predictive models of nano-mixture toxicity[J]. *Nanomaterials*, 2021, 11(1):124.
- [40] KAR S, LESZCZYNSKI J. Exploration of computational approaches to predict the toxicity of chemical mixtures[J]. *Toxics*, 2019, 7(1):15.
- [41] ALTENBURGER R, BACKHAUS T, BOEDEKER W, et al. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to Vibrio fischeri: Mixtures composed of similarly acting chemicals[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2000, 19(9):2341-2347.
- [42] BACKHAUS T, ALTENBURGER R, BOEDEKER W, et al. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to Vibrio fischeri[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2000, 19(9):2348-2356.

## www.aer.org.cn