

纳米氧化锌和二氧化钛对斜生栅藻的毒性效应

李雅洁, 王 静, 崔益斌, 李 梅*

(南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210023)

摘要:随着生产和应用的快速发展, 纳米材料通过各种途径进入环境, 导致污染的可能大大增加, 对其可能产生的环境风险和生物安全值得关注。以斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)为指示生物, 采用藻类生长抑制、光合色素含量及抗氧化酶活性测定等实验, 研究了纳米氧化锌(ZnO)和纳米二氧化钛(TiO₂)的毒理学效应。结果显示: 纳米 ZnO 在低浓度时(5 mg·L⁻¹)对斜生栅藻生长有显著促进作用, 随着浓度升高, 逐渐表现为抑制; 在最高浓度 50 mg·L⁻¹ 时, 细胞色素含量减少, 蛋白质含量及抗氧化酶活性明显下降, 引起显著细胞氧化损伤。纳米 TiO₂ 也表现为低浓度(1 mg·L⁻¹)促进、高浓度(200 mg·L⁻¹)抑制藻类生长的趋势, 同时高浓度还导致细胞色素和蛋白质含量减少, 抗氧化酶活性明显下降, 同样引起氧化胁迫效应。研究结果表明此类纳米材料的生态毒性效应不容忽视, 为此应进一步加强其环境健康和生态毒性研究, 为纳米材料的生态风险评价和安全评估提供科学依据, 促进纳米技术的健康、安全和可持续发展。

关键词: 纳米 ZnO; 纳米 TiO₂; 超氧化物歧化酶(SOD); 过氧化物酶(POD); 毒性效应

中图分类号: X820.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2013)06-1122-06 doi:10.11654/jaes.2013.06.006

Ecotoxicological Effects of ZnO and TiO₂ Nanoparticles on Microalgae *Scenedesmus obliquus*

LI Ya-jie, WANG Jing, CUI Yi-bin, LI Mei*

(School of the Environment, Nanjing University, State Key Laboratory of Pollution Control & Research Reuse, Nanjing 210023, China)

Abstract: With the mass production and widespread use of nanomaterials, the potential for their release into the environment is increasing. The potential risks and ecological effect to human health and ecological environment has become a new field of scientific research. In this study the impact of nano-ZnO and nano-TiO₂ on aquatic ecosystems has been investigated using microalgae *Scenedesmus obliquus* as a model. Microalgae *S. obliquus* were exposed to nano-ZnO and nano-TiO₂ at different doses (0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 50 mg·L⁻¹ and 1, 5, 10, 50, 100, 200 mg·L⁻¹) for 96 h. Response of the growth, photosynthetic pigments and antioxidant enzyme activities were selected as assessment indicators. The results indicated that the effect of nano-ZnO within the concentrations of 0.01, 0.05, 1 mg·L⁻¹ on the growth of *S. obliquus* showed a significant improvement ($P < 0.05$) but no significant difference on protein content compared with control. However, when the concentration was increased to 5 mg·L⁻¹, nano-ZnO started to bring an evident stress to the growth and protein content, and high concentrations of 50 mg·L⁻¹ significantly inhibited the growth and protein content, while the inhibition of photosynthetic pigments, and superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activities was observed in lower concentrations. Similarly, dose-effects of nano-TiO₂ was also observed in *S. obliquus*, being found to promote the growth at low concentrations of 1 mg·L⁻¹, which could increase the content of photosynthetic pigments, especially the content of the chlorophyll b and protein. As the concentration increased, the stimulative effect was reduced and the inhibition effect was enhanced. The influence on the activities of SOD and POD was consistent with that of cell growth. These studies suggested that nano-ZnO and nano-TiO₂ at high concentrations induced toxicological effects.

Keywords: nano-ZnO; nano-TiO₂; superoxide dismutase (SOD); peroxides (POD); toxicity effect

从 20 世纪 80 年代以来, 纳米科技蓬勃发展, 随着生产和应用的快速扩大, 纳米材料因其特殊的理化

性质在当今社会众多领域得到广泛应用^[1-2]。在给人们带来巨大经济和社会效益的同时, 纳米材料通过各种途径进入环境而成为纳米污染物的机会也将相应增加, 对人类健康和生态环境产生潜在风险, 因此纳米材料的环境行为和生态效应已经成为科研的新领域。纳米 ZnO 与 TiO₂ 已在工业上规模生产, 且被用于化妆品、遮光剂、纺织、涂料和建筑等领域^[3-4]。这两种纳

收稿日期: 2012-11-19

基金项目: 国家自然科学基金 (21077052); 江苏省社会发展项目 (BE2012737)

作者简介: 李雅洁 (1990—), 女, 硕士研究生, 主要从事环境毒理学研究。E-mail: lyj121582@126.com

* 通信作者: 李 梅 E-mail: meili@nju.edu.cn

米材料市场需求量高而且产量大,从而也增加了其环境释放风险,引起了广泛研究和关注^[5]。

藻类对水生生态系统的平衡和稳定起着十分重要的作用。水生毒理学研究中,藻类作为水体的初级生产者,其种类多样性和初级生产量直接影响水生态系统的结构功能,因而成为监测评价水环境质量的重要指标^[6]。已有许多国家采用藻类进行化学品的风险评价,并建立了相关的标准测试方法。选用藻类作为模式生物进行纳米材料的生物毒性效应已引起广泛关注,针对纳米金属及氧化物、碳纳米材料等对藻类的毒性效应方面取得了较大进展^[6-13],研究结果表明纳米材料的毒性效应与纳米材料的形态、粒径、溶解度及分散性等诸多因素有关,同时也与不同藻类的细胞结构和理化性质相关^[14,8]。相关研究证实纳米TiO₂和ZnO对藻类具有毒性效应,如Hartmann等的研究发现3种不同粒径纳米TiO₂对近头状伪蹄形藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)具有不同的毒性效应^[9];Aruoja研究了CuO、ZnO和TiO₂纳米粒子对水域中微藻的毒性影响,结果表明相较于其他两种物质,纳米ZnO的毒性最强^[15];陆长梅等从表观和生理上检测了纳米级TiO₂对铜绿微囊藻的毒性效应^[16]。由于纳米材料种类繁多,相比而言不同纳米颗粒对藻类毒性研究仍显不足。因此,研究不同纳米材料作用于不同藻类的毒性效应具有十分重要的意义^[17]。

斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)因其个体小、对毒物敏感,生长周期短,易于培养等特点,已被广泛地用作评价污染物环境与健康影响的模式生物^[18]。本研究以斜生栅藻作为实验材料,选择超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和光合色素作为评价指标,探讨纳米ZnO和TiO₂的毒性效应,以期为水生态环境纳米材料的生物安全评价及更加科学合理地使用纳米材料提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

斜生栅藻(*S. obliquus*)购自中科院水生生物研究所藻种库,并经室内扩大培养用于实验。ZnO和TiO₂纳米颗粒购自南京爱普瑞纳米材料有限公司,两者均为金红石型(粒度为10~20 nm),纯度大于99%,比表面积纳米ZnO为58 m²·g⁻¹,纳米TiO₂为120~130 m²·g⁻¹。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和考马斯亮蓝试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 培养条件

按OECD标准采用SE培养基^[7],取对数生长期藻体接种,接种密度为每毫升1×10⁶~2×10⁶个细胞,置于恒温光照培养箱中培养。培养条件为光强80~90 μmol·m⁻²·s⁻¹,温度(25±1)℃,光暗周期比12 h:12 h,静置培养96 h,每日定时摇动并随机移动各瓶的位置以减少误差。

1.3 毒性实验

以灭菌SE培养基制备相应浓度的纳米材料悬浊液,染毒前用超声波处理器处理10 min(超声20 s,间歇10 s)。纳米ZnO共设6个剂量组(0.01、0.1、0.5、1、5、50 mg·L⁻¹),纳米TiO₂共6个剂量组(1、5、10、50、100、200 mg·L⁻¹),每个剂量3个平行,并设空白(蒸馏水)对照组。培养4 d,每日定时取样,通过血球计数板于400倍光学显微镜下计数藻细胞浓度。

1.4 光合色素及酶活测定

微藻处理4 d后,一定量藻液于5000 r·min⁻¹下离心10 min,弃上清,加入5 mL 80%丙酮,于黑暗处提取24 h后,8000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液,分光光度法测定各组叶绿素与类胡萝卜素含量^[19-20]。

离心收集一定量藻液重新悬浮于适量预冷磷酸盐缓冲液(pH7.0)中,冰浴下超声破碎,4℃低温高速离心(12000 r·min⁻¹,20 min),取上清液做酶活性分析。按照试剂盒说明书所述方法测定SOD、POD和蛋白质含量。

1.5 实验数据处理

每组实验均设3组平行,实验数据处理采用SPSS 13.0统计分析软件,进行 t 检测和差异显著性分析并绘图。以下各图和表中*表示和对照组相比差异显著($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 纳米金属氧化物对斜生栅藻生长的影响

不同纳米ZnO浓度下斜生栅藻4 d(96 h)生长曲线如图1所示。由图可见,在0.01~1 mg·L⁻¹较低浓度范围内,纳米ZnO对藻类生长有促进作用,其中0.1、0.5、1 mg·L⁻¹3组与对照相比差异显著($P<0.05$)。当浓度超过5 mg·L⁻¹逐渐转为抑制,浓度为50 mg·L⁻¹时,斜生栅藻的生长受到明显抑制。

图2显示不同浓度纳米TiO₂作用下斜生栅藻的生长曲线。可见低浓度纳米TiO₂(1~50 mg·L⁻¹)处理组与对照曲线比较一致,对藻类生长无明显作用,当浓度大于100 mg·L⁻¹,表现出明显的抑制作用($P<0.05$),且随浓度增大抑制作用增强,但小球藻仍能缓慢生长。

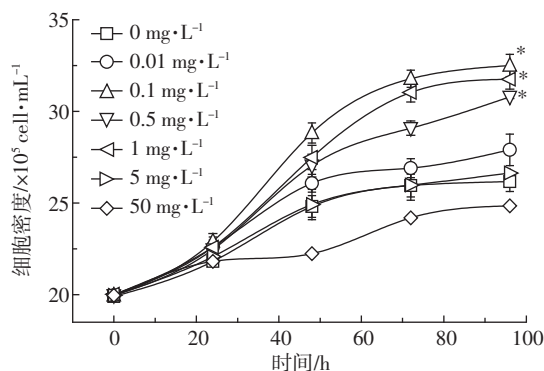


图1 不同浓度纳米 ZnO 下斜生栅藻生长曲线

Figure 1 Growth curves of *S. obliquus* treated with different concentrations of nano-ZnO

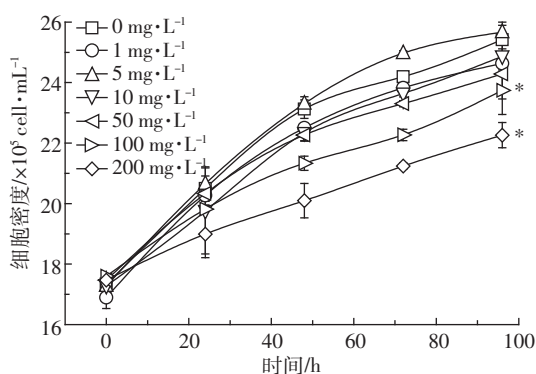
图2 不同浓度纳米 TiO₂ 下斜生栅藻生长曲线

Figure 2 Growth curves of *S. obliquus* treated with different concentrations of nano-TiO₂

2.2 纳米金属氧化物对光合色素含量的影响

图3为不同浓度纳米 ZnO 对斜生栅藻光合色素含量的影响。与对照组相比,各浓度组纳米 ZnO 对叶绿素和类胡萝卜素(CAR)含量均有一定程度的抑制作用。当浓度为 50 mg·L⁻¹ 时,相比对照,各种色素含量降低显著($P<0.05$),叶绿素 a(Chla),叶绿素 b(Chlb)和 CAR 含量分别降低了 17.0%、26.1%和 29.9%。

不同浓度纳米 TiO₂ 下斜生栅藻光合色素含量的变化见图4。由图可见,各浓度组纳米 TiO₂ 对叶绿素和类胡萝卜素的作用并不一致。随着处理浓度的增加,纳米 TiO₂ 对 Chla 表现为低浓度促进,高浓度抑制,对 Chlb 则表现为明显的抑制作用,而对 CAR 含量无显著影响。

2.3 纳米金属氧化物对蛋白质含量、SOD 和 POD 活性的影响

以不同剂量的 ZnO 纳米颗粒染毒 96 h 后,斜生栅藻抗氧化酶(SOD 和 POD)活性和蛋白质含量变化如表1所示。对于试验剂量范围内的纳米 ZnO,蛋白质含量在低浓度下(0.01~1 mg·L⁻¹)无显著变化,随着

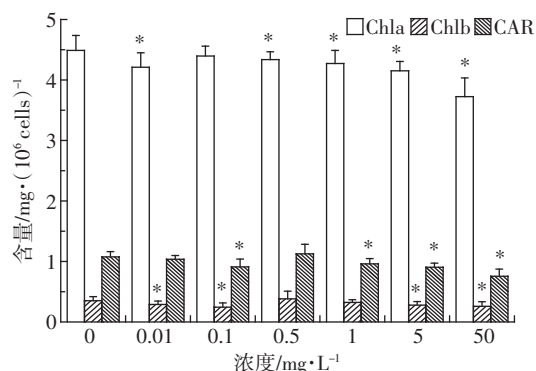


图3 不同浓度 ZnO 对光合色素含量的影响

Figure 3 Effects of nano-ZnO on the photosynthetic pigments of *S. obliquus*

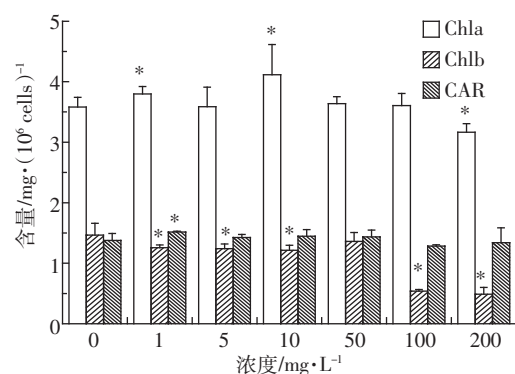
图4 不同浓度 TiO₂ 对光合色素含量的影响

Figure 4 Effects of nano-TiO₂ on the photosynthetic pigments of *S. obliquus*

处理浓度升高,呈现下降趋势,且差异显著($P<0.05$),其中 5 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 剂量组相比对照分别降低了 10.51%和 34.32%;SOD 活性则随剂量升高显著下降,其中 50 mg·L⁻¹ 处理组相比对照下降了 35.55%;POD 活性与 SOD 趋势相同,即随纳米 ZnO 浓度升高,均表现为抑制作用,其中 5 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 分别比对照下降了 58.62%和 65.84%。

不同浓度纳米 TiO₂ 染毒 96 h 后,蛋白质变化趋势与 ZnO 处理相同(表2),即低剂量 TiO₂ 处理时(1~10 mg·L⁻¹)无明显变化,随浓度升高含量明显下降($P<0.05$),其中 50 mg·L⁻¹ 和 200 mg·L⁻¹ 组与对照相比分别降低了 34.03%和 48.50%;SOD 活性除了 1 mg·L⁻¹ 处理组无明显变化外,其余各组均随剂量升高显著下降,且具一定剂量-效应关系,其中最高处理组 200 mg·L⁻¹ 相比对照下降了 38.83%;POD 活性变化与 ZnO 处理稍有不同,在 1 mg·L⁻¹ 暴露剂量时明显受到促进($P<0.05$),随着染毒剂量的增加,出现下降趋势,在高剂量 50 mg·L⁻¹ 和 200 mg·L⁻¹ 时相比对照分别下

表 1 不同剂量 ZnO 纳米颗粒对蛋白质含量、SOD 和 POD 活性的影响(平均值±标准差)

Table 1 Effects of different concentration of nano-ZnO on protein content, and activities of SOD and POD (Mean±SD)

浓度/mg·L ⁻¹	CK	0.01	0.1	1	5	50
Protein/mg·10 ⁶ cells ⁻¹	0.036±0.001	0.037±0.002	0.037±0.001	0.035±0.005	0.032±0.001*	0.020±0.007*
SOD/U·(10 ⁶ cells) ⁻¹	1.98±0.06	1.73±0.14*	1.31±0.05*	1.32±0.020*	1.57±0.27*	1.27±0.04*
POD/U·(10 ⁶ cells) ⁻¹	0.46±0.04	0.28±0.01*	0.19±0.03*	0.20±0.02*	0.18±0.06*	0.15±0.02*

注:* 与空白组相比差异显著($P<0.05$),下同。

表 2 不同剂量 TiO₂ 纳米颗粒对蛋白质含量、SOD 和 POD 活性的影响(平均值±标准差)Table 2 Effect of different concentration of nano-TiO₂ on proteins content, activity of SOD and POD (Mean±SD)

浓度/mg·L ⁻¹	CK	1	10	50	200
Protein/mg·(10 ⁶ cells) ⁻¹	0.037±0.002	0.038±0.003	0.036±0.004	0.024±0.001*	0.019±0.001*
SOD/U·(10 ⁶ cells) ⁻¹	2.27±0.13	2.33±0.25	2.15±0.15*	1.59±0.03*	1.38±0.21*
POD/U·(10 ⁶ cells) ⁻¹	0.57±0.03	0.65±0.03*	0.46±0.02*	0.36±0.08*	0.27±0.01*

降了 38.14%和 51.90%,差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

纳米材料可能通过多种途径进入环境而成为纳米污染物,如纳米材料的环境直接释放、工厂和实验室的废物排放、纳米产品在使用和废弃处理过程中的环境释放等,但目前还不清楚这些过程的释放程度,对纳米材料在不同环境介质中迁移途径的了解也比较有限^[21]。

纳米 TiO₂ 作用于藻类的研究较多^[8-9,11],本研究中 TiO₂ 纳米颗粒试验采用了较高的暴露剂量,目的是充分了解其对藻类的急性毒性效应。试验中不同的纳米材料水悬浮液对斜生栅藻的生长均有一定影响,其中纳米 ZnO 和纳米 TiO₂ 水悬浮液分别在 0.5 mg·L⁻¹ 和 5 mg·L⁻¹ 可对斜生栅藻生长产生显著的促进作用($P<0.05$),这与朱小山等的研究差异较大,其研究显示纳米 TiO₂(≤20 nm,锐钛矿型)对斜生栅藻的 96 h EC₅₀ 为 15.3 mg·L⁻¹^[22],可能由于本文选取的纳米颗粒与其具有不同的粒径及比表面积,有文献称纳米 ZnO 和纳米 TiO₂ 由于粒径不同,毒效可能存在差异^[23,9],表面曲率和粗糙度在溶剂中也起到重要的作用^[14]。纳米 ZnO 和 TiO₂ 在低浓度时对斜生栅藻生长的促进作用,可能是由于低浓度毒物的“刺激效应”或称“兴奋效应”所致^[24-25],与纳米材料的暴露胁迫,增加藻体内某些酶的活性,促进藻类生长有关,巩宁等和朱小山等在相关研究中也发现有类似现象^[26,22]。随着两种金属纳米氧化物浓度升高,斜生栅藻的生长受到抑制,这可能与纳米材料会吸附在藻细胞表面,抑制藻类生长有关^[14]。此外,纳米金属氧化物的加入也可干扰能量的转换,

影响 ATP 的合成^[27],对细胞周期有阻断作用^[13],并且影响相关信号的传导,如庞小峰等发现纳米氧化钛可以游离于细胞之间,使胞间通信受阻,从而降低细胞的生长速度^[28]。Aruoja 等^[15]的研究证明纳米 ZnO 的毒性主要是因为其溶解出的 Zn²⁺所致。在 50 mg·L⁻¹ 浓度组下斜生栅藻的生长均受到抑制,且 ZnO 处理组较为明显,在已有的针对其他生物的研究中,也发现纳米 ZnO 较之 TiO₂ 具有较明显的毒性^[29]。

光合色素是在光合作用中参与吸收、传递光能或原初光化学反应的色素,植物的光合色素一般包括 Chla、Chlb 和类胡萝卜素。本实验中两种纳米金属氧化物对细胞色素的作用没有明显的规律,但在最高浓度组都呈显著性抑制作用(图 3、图 4),这可能是因为短时间内纳米 ZnO 和 TiO₂ 尚不能刺激藻体细胞发生防御反应,只能使 Chla 分子受损或其合成代谢受到抑制,含量降低。随着时间的延续,当达到防御系统的刺激阈值时,藻体的防御机制启动,生成相应的解毒物质。但当胁迫浓度进一步加大时,就可能超过其防御能力,直接破坏解毒物质,而且形成大量的活性氧自由基^[30],这些自由基的产生和累积导致膜脂质过氧化,致使叶绿素含量下降,细胞生长受阻^[31]。另外从藻体结构看,由于斜生栅藻是低等植物,所以纳米金属氧化物侵入较高等植物更容易,毒性效应也更明显^[9]。本研究结果表明纳米 ZnO 和纳米 TiO₂ 对 Chla 的作用最为明显,这可能是因为 Chla 作为捕光色素复合体重要组成部分,在光合系统 PS II 的反应中心中,作为光合电子传递链的电子供体,与其他光合色素相比,更容易受到光降解作用的影响^[32]。

纳米颗粒毒性的主要机制被认为是氧化胁迫,它主

要影响脂、多糖、蛋白质的合成和对 DNA 造成损伤^[33], 本实验中, 低浓度处理时对蛋白质含量均无显著影响; 随着处理浓度逐渐升高, 蛋白质含量呈现下降趋势, 这可能是由于蛋白质与-SH 结合导致蛋白质变性而降解, 也可能是蛋白质合成酶的失活或 DNA 转录翻译途径受阻, 影响了蛋白质的合成^[34]。有机体内的多种酶具有抗氧化能力, 可以将细胞内产生的活性氧通过电子传递链还原为水, 这一系列酶包括 SOD、POD 和过氧化氢酶(CAT)等。SOD 主要催化细胞内的 $O_2 \cdot$ 转变为细胞毒性相对较低的 H_2O_2 , 在细胞的抗氧化保护机制中可能起中心作用^[35]; POD 则是细胞内清除 H_2O_2 的主要酶类, 使藻细胞体内活性氧自由基的形成和清除之间保持动态平衡。这些抗氧化酶和机体内的其他抗氧化物协同作用, 清除机体内过多的活性氧自由基, 防止机体受到氧化损伤^[30]。逆境胁迫下, 抗氧化酶中的一种或几种会表现出“毒物兴奋效应”^[36-37], SOD 与 POD 受到显著诱导, 以清除活性氧从而提高微藻的抗逆性。

4 结论

(1) 低浓度纳米 ZnO 和纳米 TiO_2 对斜生栅藻生长均起促进作用, 一定浓度后表现为抑制作用, 呈现一定的浓度依赖性。与 TiO_2 相比, ZnO 具有较明显的毒性。

(2) 纳米 ZnO 和纳米 TiO_2 胁迫导致斜生栅藻体内活性氧自由基的大量产生和积累, 光合色素和可溶性蛋白含量降低, SOD 和 POD 活性降低, 浓度越高, 抑制效应越明显。其中抗氧化酶活性对纳米 ZnO 和纳米 TiO_2 反应灵敏, 可作为此类纳米金属氧化物污染的潜在生物标志物。

参考文献:

- [1] 杜晓明, 徐忠厚, 韩春媚, 等. 静电纺丝过氯乙烯纳米纤维膜对 PM10 去除效果的研究[J]. 环境科学研究, 2006, 19(1): 46-48.
DU Xiao-ming, XU Zhong-hou, HAN Chun-mei, et al. Research on purification effect of electrospun chlorinated PVC nanofibrous membrane for PM10[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2006, 19(1): 46-48.
- [2] 丁震, 陈晓东, 林萍, 等. 纳米 TiO_2 对气相中甲醛光催化降解的研究[J]. 环境科学研究, 2006, 19(4): 74-79.
DING Zhen, CHEN Xiao-dong, LIN Ping, et al. Photocatalytic degradation of formaldehyde in air by nanometer TiO_2 [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2006, 19(4): 74-79.
- [3] The Royal Society. Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties. <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>. 2004.
- [4] Aitken R J, Chaudhry M Q, Boxall A B A, et al. Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends[J]. *Occupational Medicine (Oxford)*, 2006, 56(5): 300-306.
- [5] Kahru A, Dubourguier H C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology[J]. *Toxicology*, 2010, 269(2-3): 105-119.
- [6] Grant W F, Zinoveva Stahevitch A E, Zura K D. Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens[C]// Stich H F, San R H C. In Short-Term Tests for Chemical Carcinogens, ed. Springer-Verlag, New York, 1981: 200-216.
- [7] Checucci A, Colombetti G, Ferrara R, et al. Action spectra for photo-accumulation of green and colorless Euglena: Evidence for identification of receptor pigments[J]. *Photochem Photobiol*, 1976, 23: 51-54.
- [8] Clément L, Hurel C, Marmier N. Toxicity of TiO_2 nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants: Effects of size and crystalline structure[J]. *Chemosphere*, 2013, 90(3): 1083-1090.
- [9] Hartmann N B, Vonder K F, Hofmann T, et al. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles: Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability[J]. *Toxicology*, 2010, 269(2-3): 190-197.
- [10] Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO , CuO and TiO_2 to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(7): 1308-1316.
- [11] Sadiq I M, Dalai S, Chandrasekaran N, et al. Ecotoxicity study of titanium (TiO_2) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(5): 1180-1187.
- [12] Wang J, Zhang X, Chen Y, et al. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Chemosphere*, 2008, 73(7): 1121-1128.
- [13] 张宁, 金星龙, 李晓, 等. 人工纳米材料对藻类的毒性效应研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 6000-6003.
ZHANG Ning, JIN Xing-long, LI Xiao, et al. Progress of toxic effects of artificial nano materials on alga[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2011, 39(10): 6000-6003.
- [14] Hund-Rinke K, Simon M. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO_2) on algae and daphnids[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2006, 13(4): 225-232.
- [15] Aruoja V, Dubourguier H C, Kasemets K, et al. Toxicity of nanoparticles of CuO , ZnO and TiO_2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(4): 1461-1468.
- [16] 陆长梅, 张超英, 吴国荣. 纳米级 TiO_2 抑制微囊藻生长的实验研究[J]. 城市环境与城市生态, 2002, 15(4): 13-17.
LU Chang-mei, ZHANG Chao-ying, WU Guo-rong, et al. Research of nanometer TiO_2 restraining growth of *Microcystis Aeruginosa* var. *major* A. M. Smith[J]. *Urban Environment and Urban Ecology*, 2002, 15(4): 13-17.
- [17] 金星龙, 张宁, 李晓, 等. 四种纳米氧化物对小球藻的毒性效应研究[J]. 天津理工大学学报, 2011, 27(2): 57-62.
JIN Xing-long, ZHANG Ning, LI Xiao, et al. Toxic effects of four nanoscale oxides on *Chlorella vulgaris*[J]. *Journal of Tianjin University of Technology*, 2011, 27(2): 57-62.

- [18] 钟秋, 何桢, 戴安琪, 等. 纳米二氧化铈对斜生栅藻的毒性研究[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(2): 299-305.
ZHONG Qiu, HE Zhen, DAI An-qi, et al. Toxicities of nanoparticulate CeO₂ on *Scenedesmus Obliquus* Kiitz[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(2): 299-305.
- [19] Jerrey S, Humphrey G. New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c₁ and c₂[J]. *Biochemistry and Physiology Pflanz*, 1975, 167(2): 194-204.
- [20] Strickland J, Parsons T. A practical handbook of seawater analysis[J]. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, 1972, 167: 201-203.
- [21] 章军, 杨军, 朱心强. 纳米材料的环境和生态毒理学研究进展[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(4): 350-356.
ZHANG Jun, YANG Jun, ZHU Xin-qiang. The advancement of environmental and ecotoxicological research of nanomaterials[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2006, 1(4): 350-356.
- [22] 朱小山, 朱琳, 田胜艳, 等. 三种金属氧化物纳米颗粒的水生态毒性[J]. 生态学报, 2008, 28(8): 3507-3516.
ZHU Xiao-shan, ZHU Lin, TIAN Sheng-yan, et al. Aquatic ecotoxicities of nanoscale TiO₂, ZnO and Al₂O₃ water suspensions[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(8): 3507-3516.
- [23] Wang Bin, Feng Wei-yue, Wang Tian-cheng, et al. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice[J]. *Toxicology Letters*, 2006, 161(2): 115-123.
- [24] Stebbins A R D. Homesis the stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. *Science of the Total Environment*, 1982, 22(1): 213-234.
- [25] Wang Y, Tang X, Li Y, et al. Stimulation effect of anthracene on marine microalgae growth[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(3): 343-346.
- [26] 巩宁, 邵魁双, 梁长华. 两种粒径氧化镍纳米颗粒对小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 的生物毒性[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(4): 457-460.
GONG Ning, SHAO Kui-shuang, LIANG Chang-hua, et al. Biototoxicity of two-size nickel oxide nanoparticles on *Chlorella vulgaris*[J]. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(4): 457-460.
- [27] King L Y, Wai K L, Nan Y, et al. Reactivity and antimicrobial properties of nanostructured titanium dioxide[J]. *Catalysis Today*, 2009, 143(3-4): 218-224.
- [28] 赵宇亮, 柴之芳. 纳米生物效应研究进展[J]. 学科发展, 2005, 20(3): 194-199.
ZHAO Yu-liang, CHAI Zhi-fang. Status of study of bio-environmental activities of nanoscale materials[J]. *Disciplinary Development*, 2005, 20(3): 194-199.
- [29] Sawai J, Shoji S, Igarashi H, et al. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86(5): 521-522.
- [30] 李子杰, 姜文君, 于明, 等. LaCl₃ 对轮藻光合色素含量及抗氧化酶活性的影响[J]. 中国稀土学报, 2006, 24(增刊): 192-195.
LI Zi-jie, JIANG Wen-jun, YU Ming, et al. Effects of LaCl₃ on photosynthetic pigment contents and antioxidative enzyme activities in *Chara* [J]. *Journal of Chinese Rare Earth Society*, 2006, 24(Suppl): 192-195.
- [31] 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 94.
FANG Yun-zhong, LI Wen-jie. Free radicals and enzymes[M]. Beijing: Science Press, 1989: 94.
- [32] 刘涛, 熊丽, 生秀梅, 等. 高效氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(7): 37-39.
LIU Tao, XIONG Li, SHENG Xiu-mei, et al. Study on the toxicity of beta-cypermethrin to *Scenedesmus Obliquus*[J]. *Chemistry and Bioengineering*, 2006, 23(7): 37-39.
- [33] Kelly S A, Havrilla C M, Brady T C, et al. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(7): 375-384.
- [34] Sayes C M, John D F, Guo W, et al. Differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes[J]. *Nano Letters*, 2004, 4(10): 1884.
- [35] Elisabetta M, Gioacchino S. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*[J]. *Plant Science*, 2004, 167(2): 289-296.
- [36] 焉翠蔚, 肖宜华, 朱岩松, 等. 多效唑对2种海洋微藻生长和抗氧化酶活性的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(2): 291-296.
YAN Cui-wei, XIAO Yi-hua, ZHU Yan-song, et al. Effects of PP₃₃₃ on growth and activities of antioxidative enzymes of two marine microalgae [J]. *Periodical of Océan University of China*, 2008, 38(2): 291-296.
- [37] Coteur G, Danis B, Fowler S W, et al. Effects of PCBs on reactive oxygen species (ROS) production by the immune cells of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata)[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(8): 667-672.