

三种金属氧化物纳米颗粒的水生态毒性

朱小山¹, 朱琳^{1,*}, 田胜艳², 郎宇鹏¹, 李燕¹

(1. 南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071;

2. 天津科技大学海岸带地质环境与生态学研究室, 天津 300222)

摘要:参考国际经济合作与发展组织(OECD)化学品生态毒性测试标准方法,以绿藻(*Scenedesmus obliquus*)和大型蚤(*Daphnia magna*)为受试生物,研究了3种金属氧化物纳米颗粒(纳米氧化锌 nZnO、纳米二氧化钛 nTiO₂、纳米氧化铝 nAl₂O₃)水悬浮液的水生生态毒性。结果发现,不同的纳米颗粒具有不同的毒性:nZnO、nTiO₂和 nAl₂O₃对斜生栅藻生长的96 h 半效应浓度(EC₅₀)值分别为1.049、15.262、>1000 mg·L⁻¹,而对大型蚤活动抑制的48 h EC₅₀值则分别为0.622、35.306 mg·L⁻¹和114.357 mg·L⁻¹。据此可得到3种金属氧化物纳米颗粒水悬浮液的毒性大小顺序为:nZnO > nTiO₂ > nAl₂O₃。此外,不同的生物对金属氧化物纳米颗粒的敏感性也不同,除 nTiO₂以外,大型蚤对另外2种纳米颗粒的敏感性强于斜生栅藻。实验结果表明,人工纳米材料的生态毒性和环境效应不容忽视,应重视并深入研究此类纳米材料的毒性作用机制和影响因子,以便能对其进行更好的风险管理。

关键词:纳米材料;绿藻;大型蚤;生态毒性;TiO₂;ZnO;Al₂O₃;EC₅₀

文章编号:1000-0933(2008)08-3507-10 中图分类号:Q143 文献标识码:A

Aquatic ecotoxicities of nanoscale TiO₂, ZnO and Al₂O₃ water suspensions

ZHU Xiao-Shan¹, ZHU Lin^{1,*}, TIAN Sheng-Yan², LANG Yu-Peng¹, LI Yan¹

1 College of Environmental Science and Engineering, Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, Tianjin 300071, China

2 College of Marine Science and Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(8): 3507 ~ 3516.

Abstract: The ecotoxicity of nanoscale TiO₂, ZnO and Al₂O₃ water suspensions was examined using a method developed based on the standard OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (i. e. OECD 201, 202). The green algae (*Scenedesmus obliquus*) and the water-flea (*Daphnia magna*) were used as the testing organisms. The results showed that different nanoparticles exhibited different toxicities to the testing organisms. The 96 h EC₅₀ of nZnO, nTiO₂ and nAl₂O₃ on the growth of *Scenedesmus obliquus* were 1.049, 15.262 mg·L⁻¹ and >1000 mg·L⁻¹, respectively. The 48 h immobilization EC₅₀ of nZnO, nTiO₂ and nAl₂O₃ on *Daphnia magna* were 0.622, 35.306 mg·L⁻¹ and 114.357 mg·L⁻¹, respectively. Based on the results, their toxicity rank as nZnO > nTiO₂ > nAl₂O₃. The toxicity results indicate that such nanoparticles might pose potential environmental impact. Further research on the ecotoxicological mechanisms of such nanoparticles is warranted in order to minimize the adverse ecological effects and human health risk of nanotechnology development.

Key Words: nanomaterials; algae; daphnia; ecotoxicity; TiO₂; ZnO; Al₂O₃; EC₅₀

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470319)

收稿日期:2007-05-08; 修订日期:2007-11-23

作者简介:朱小山(1977~),男,广西桂林人,博士,从事环境生物与生态毒理学研究. E-mail: zxsxg1977@gmail.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhulin@nankai.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30470319)

Received date: 2007-05-08; **Accepted date:** 2007-11-23

Biography: ZHU Xiao-Shan, Ph. D., mainly engaged in environmental biology and ecotoxicology. E-mail: zxsxg1977@gmail.com

人工纳米材料[Manufactured Nanomaterials(MNMs)],是指至少在一个几何面上的关键尺寸低于 100nm,并具有高度均匀性的材料,特别是指以应用为目的被人工制造出来的产品,包括纳米颗粒、纳米管、纳米线和富勒烯及其衍生物等纳米尺度材料^[1,2]。由于 MNMs 尺寸很小,结构特殊,因此具有许多优良且奇异的物理化学特性,如小尺寸效应、巨大的表面效应、界面效应、极高的反应活性、量子效应等^[3]。这些特性使 MNMs 在医药、工业、建筑、化妆品和环保等产业中具有诱人的前景,预计到 2008 年纳米市场将达到 7000 亿美元,而到 2015 年此数值将超过 1 万亿美元^[4]。但是,也正因为如此,人们担心这些具有独特物理化学性质的 MNMs 可能对人体健康以及环境带来潜在的影响^[1~4]。遗憾的是,迄今为止,有关 MNMs 生态毒性的研究鲜见报道^{[5]①}。

水环境可能受来自产品生产、运输、消费和处置过程中溢出的 MNMs 污染,废弃的 MNMs 或污染事故也可能导致 MNMs 泄漏进入水环境中^[5,6]。Oberdörster 报道了 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的富勒烯水溶液($\text{nC}_{60}/\text{THF}$,采用 THF 为助溶剂)暴露 48h 后能使大嘴黑鲈(*Largemouth Bass*, *Micropterus salmoides*)幼鱼脑组织产生严重的脂质过氧化^[6],这是有关 MNMs 水生生态毒性的首次报道。随后 Adams 等人^[7]首先比较了 2 种金属氧化物纳米颗粒(TiO_2 , ZnO)和 1 种无机氧化物纳米颗粒(SiO_2)水悬浮液对枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的生态毒性。发现 ZnO 水悬浮液的毒性最强。尽管如此,仍然缺乏有关 MNMs 的暴露和剂量-效应的毒理学数据,而且还不能确定纳米材料泄漏到环境中后将处于什么样的数量级别,因而目前尚难以开展对纳米材料的危害鉴定和风险评价^[4]。因此,本文选取 3 种已商品化的 MNMs (纳米二氧化钛 nTiO_2 、纳米氧化锌 nZnO 和纳米氧化铝 nAl_2O_3)为对象,采用国际经济合作与发展组织(OECD)化学品生态毒性测试标准方法^[8~10],以一种绿藻(*Scenedesmus obliquus*)和一种无脊椎生物(*Daphnia magna*)为受试生物,研究 MNMs 进入水环境后的生态毒性效应。主要的目的在于:(1)考察典型的金属氧化物纳米材料泄漏进入水环境后,是否表现出显著的水生态毒性;(2)比较不同纳米材料间生态毒性的大小差异;(3)初步探讨现有的生态毒性测试方法,是否能应用于具有独特理化性质的纳米材料的生态毒性测定。研究结果将有助于人工纳米材料的生态风险评价,弥补目前在人工纳米材料生态毒性研究上的空白,也可为有关的法规或标准的制定提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

纳米 TiO_2 (nTiO_2 ,纯度 >99.5%,锐钛矿型)、纳米 ZnO (nZnO ,纯度 >99.9%)、纳米 Al_2O_3 (nAl_2O_3 ,纯度 >99.5%)均购自南京海泰纳米材料有限公司,相关资料见表 1。其余试剂均为国产优级纯或分析纯试剂。

玻璃仪器:所有玻璃仪器在使用前均用 10% 浓硝酸浸泡 48 h,并用去离子水冲洗干净,然后经高温高压 (120°C , 15min)灭菌后待用。

纳米材料悬浮液(金属氧化物纳米材料水悬浮液): nTiO_2 、 nZnO 和 nAl_2O_3 分别加入到培养基中(OECD 201 或 OECD 202 test medium),搅拌 48h 后,制得相应纳米材料水悬浮液储备液,置于棕色玻璃瓶中,待用。

1.2 藻类生长抑制试验

实验参考 OECD 201^[8]的标准方法进行,并依据 OECD no. 23^[10]进行了适当的修改。以单细胞绿藻斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)为测试生物。实验时,取一定量正处于对数生长期的预培养藻液,用新鲜无菌 OECD 201 培养基稀释到约 $2 \times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$,即为所需藻试验液。

1.2.1 暴露过程

纳米材料试验液:用新鲜无菌 OECD 201 培养基稀释纳米材料储备液得到一系列浓度的试验液,其浓度均为测试时所需浓度的 2 倍。

① Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. 2005. http://ec.europa.eu/comm/health/ph_risk/committees/04_scenihr/04_scenihr_en.htm

表 1 本文采用的人工纳米材料

Table 1 Metal oxide nanoparticles used in experiments and their general properties

纳米颗粒 Nanoparticles	出厂粒径 Published size	结晶类型 Crystal types	比表面积 Specific surface area (m^2/g)	纯度 Purity(%)	相关资料 Relevant data	反应性 Reactivity	来源 Source
纳米氧化锌 Nanoscale ZnO	20 nm	单晶 Single crystal	≥ 90	> 99.6	白色粉体,大量生产,广泛应用 White powder, mass-produce, wide application	光敏性 Photosensitivity	南京海泰纳米材料有限公司 Nanjing High Technology Nano Co., Ltd
纳米二氧化钛 Nanoscale TiO_2	≤ 20 nm	锐钛矿 Anatase	≥ 90	> 99.5	白色粉体,大量生产,广泛应用 White powder, mass-produce, wide application	光敏性 Photosensitivity	南京海泰纳米材料有限公司 Nanjing High Technology Nano Co., Ltd
纳米氧化铝 Nanoscale Al_2O_3	80 nm	α 相 α phase	≥ 12	> 99.9	白色粉体,大量生产,广泛应用 White powder, mass-produce, wide application	高硬度、高强度、耐热、耐腐蚀 High hardness, high strength, heat resistance, erosion resistance	南京海泰纳米材料有限公司 Nanjing High Technology Nano Co., Ltd

混合培养:先在每个试验所用的三角瓶(容积为 250 ml)中加入 30 ml 上述藻试验液,然后再分别添加 30 ml 不同浓度的纳米材料试验液,使混合溶液终体积为 60 ml,混合溶液中绿藻的初始浓度约为 1×10^4 cell $\cdot\text{ml}^{-1}$,nZnO 的浓度梯度为 10.0、5.0、1.0、0.50、0.10、0.05、0.01 mg $\cdot\text{L}^{-1}$,nTiO₂ 的浓度梯度为 500.0、100.0、50.0、10.0、5.0、1.0、0.5 mg $\cdot\text{L}^{-1}$,nAl₂O₃ 的浓度梯度为 1000、500.0、100.0、50.0、10.0、5.0、1.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$,每个浓度设 3 个平行,另外还设有 3 个空白对照(有藻液,但无纳米材料)。然后将装有混合溶液的三角瓶置于摇床上,在下述培养条件下进行培养。

培养条件:为获得较高的敏感性,培养温度控制在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ^[11];均匀光照,为保证足够光强,采用 4 根日光灯从上垂直照射(距离 16cm),两侧各有 1 根日光灯作为辅助光源,使混和溶液液面光强为 180 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ($> \text{OECD Guideline 201}$ 中对光强的要求:60 ~ 120 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$),光暗比为 14h:10h;混合溶液液层较薄,60 ml 的混合溶液在 250 ml 三角瓶中的液层高度(瓶底到液面的高度)仅为 1.2cm,进一步保证绿藻光合作用对光照的需求,消除不同浊度的影响;将混合溶液置于摇床上培养,控制转速为 (120 ± 5) r/min,不仅有利于保证纳米材料与绿藻的充分混合,也能保证绿藻均匀受光。

1.2.2 取样分析

分别在染毒后的 24,48,72h 和 96h 观察斜生栅藻的生长状况。观察指标为细胞数。细胞数的计数采用血球计数板于显微镜(奥林巴斯公司,日本)下直接计数。通过比较斜生栅藻在 96 h 生长过程中生长曲线所包围的面积(A)来计算每种纳米材料水悬浮液对藻类生长的半抑制浓度 EC_{50} 。生长曲线所包围面积和生长抑制的百分率均按 OECD 标准方法计算^[8]。

1.3 大型蚤活动抑制试验

实验参考 OECD 202^[9] 的标准方法进行,并依据 OECD no. 23^[10] 进行了适当的修改。大型蚤(*Daphnia magna*)为本实验室连续培养 3 代以上的单克隆品系,按照 OECD 202 的标准方法进行培养。试验前以重铬酸钾检查大型蚤的敏感性,其 24 h EC_{50} 为 0.65 mg $\cdot\text{L}^{-1}$,符合试验要求。试验选用 100 ml 玻璃小烧杯,为防止玻璃容器的吸附,分别在每种材料的试验前用低浓度试验溶液浸泡 24 h。所有试验用水均为用超纯水配制的重组水,重组水配方见 OECD 202。重组水中各组分的含量以及硬度见表 2。

1.3.1 暴露过程

纳米材料试验液:用重组水稀释纳米材料储备液得到一系列浓度的试验液。

表 2 1000 ml 重组水中各组分的含量和硬度

Table 2 The loading of compositions in 1000 ml reconstituted water and the hardness of this solution

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	KCl	NaHCO_3	硬度(以 CaCO_3 计) Hardness (calculated as CaCO_3)
123 mg	294 mg	5.8 mg	64.8 mg	$250 \pm 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

混合培养:先在每个试验所用的 100 ml 玻璃小烧杯中分别加入 30 ml 不同浓度的纳米材料试验液, nZnO 的浓度由高到低为 10.0、5.0、1.0、0.50、0.10、0.05、0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, nTiO_2 的浓度梯度为 500.0、100.0、50.0、10.0、5.0、1.0、0.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, nAl_2O_3 的浓度依次为 1000、500.0、100.0、50.0、10.0、5.0、1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时设 3 个空白对照, 然后在每个烧杯中放入蚤龄在 6~24 h 的幼蚤 10 只, 用保鲜膜封口以避免蒸发, 同时在保鲜膜上开有 5、6 个小孔保证大型蚤氧气的需要。将装有混合溶液的烧杯置于摇床上培养。

培养条件: 试验期间控制温度在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 值稳定在 7.84 ± 0.46 , 实验室内自然光照, 根据预试验结果, 试验期间摇床转速设为 $(145 \pm 5) \text{ r/min}$, 在此转速下能进一步保证纳米材料处于良好的悬浮分散状态。在此转速下大型蚤生长正常。

1.3.2 取样分析

分别在染毒后的 24、48 h 观察并记录大型蚤的生长状况。以大型蚤活动受抑制和死亡作为观察指标。反复转动试验烧杯, 15 s 内大型蚤失去活动能力, 即认为大型蚤活动受到抑制。即使触角仍在摆动的大型蚤, 也认为是受抑制的个体。大型蚤的死亡以其心脏(显微镜下观察)停止跳动为标志。按照标准规定^[9], 用概率单位法^[12]计算各种材料的 LC_{50} 或 EC_{50} 及其 95% 置信区间。

1.4 数据处理

每种试验均重复 3 次, 实验结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析(one way ANOVA), 并以 Tukey's test 进行各组均数的多重比较, $p < 0.05$ 表示有显著性差异, $p < 0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 不同纳米材料对斜生栅藻的生长抑制效应

藻类生长抑制试验的结果可以用于评价受试物对藻类的短期暴露效应, 反映受试物对水体中初级生产营养级的影响。本文首次研究了金属氧化物纳米颗粒对斜生栅藻的 96 h 生长抑制效应, 结果见图 1。由图 1 可见, 不同的纳米材料水悬浮液中斜生栅藻的生长均受到一定的抑制, 并呈现明显的剂量-效应相关关系。 nZnO 水悬浮液的毒性最强, 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 即可对斜生栅藻生长产生显著的抑制($p < 0.05$); 而 nAl_2O_3 水悬浮液的毒性最弱, 浓度高达 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斜生栅藻在其中的生长与对照相比没有显著性差异($p > 0.05$)。分析不同浓度的纳米材料悬浮液与对照相比对斜生栅藻 96 h 生长抑制的差异, 可获得 nZnO 、 nTiO_2 和 nAl_2O_3 的最低效应浓度(EC_{10}) ($p < 0.05$ 的最低浓度) 分别为: 0.50、5.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 500.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按标准方法^[9], 进一步将浓度对数与抑制百分数进行一元线性回归(图 2), 可得到不同纳米材料水悬浮液对斜生栅藻生长的剂量-效应方程和 EC_{50} 值(表 3)。统计分析表明, nZnO 的 EC_{50} 值与其他 2 种纳米材料相比具有显著性差异($p < 0.01$), nAl_2O_3 在最高浓度(1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时对斜生栅藻的生长抑制不超过 50% (图 2), 由此可得到 3 种纳米材料水悬浮液对斜生栅藻生长的毒性大小顺序为: $\text{nZnO} > \text{nTiO}_2 > \text{nAl}_2\text{O}_3$ 。

不同纳米材料水悬浮液对斜生栅藻的生长表现出不同的毒性, 可能与不同材料间化学成分、粒径、晶体结构、表面性质等理化性质的差异导致其不同的毒性机理有关, 例如 nZnO 和 nTiO_2 良好的光敏性可能是其 EC_{50} 值明显小于(毒性高于) nAl_2O_3 的一个原因(表 1, 表 3)。Hund-Rinke 等人^[13] 同样以修改的 OECD 标准方法研究了 nTiO_2 对绿藻(*Desmodesmus subspicatus*) 生长的影响, 得到相近的 EC_{50} 值(14 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 并认为其毒性主要依赖于纳米颗粒本身的性质。 nZnO 表现出强烈的毒性效应, 除了其可能的光敏性之外, 也可能和其在水溶液中溶出锌离子有关^[14,15], 而 nTiO_2 和 nAl_2O_3 都不能在水溶液中释放出可溶性金属离子^[16]。以锌离子为阳

性对照发现,在相同离子浓度下,nZnO 的毒性($EC_{50} = 1.049 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)比锌离子本身的毒性($EC_{50} = 13.803 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)要大得多^①,提示有关 nZnO 的毒性作用机制仍需进一步深入研究。nAl₂O₃的毒性很小,在浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时没有对绿藻生长造成影响,基本上可以认为 nAl₂O₃对水生生物无害^[17,18],这可能和 nAl₂O₃的高度稳定性有关(表 1),因此,nAl₂O₃实际上可以作为本实验的阴性对照。

由图 1 可发现,3 种金属氧化物纳米材料水悬浮液在低浓度时,均对斜生栅藻的生长起促进作用,其原因可能是毒物的“刺激效应”或称“兴奋效应”^[19]。其机理可能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。

2.2 不同纳米材料对大型蚤的急性毒性

蚤类(大型蚤)是水体中初级消费者,能滤食水中碎屑和藻类,同时又是鱼类的天然饵料,在水体生态系统中处于初级生产者(藻类)和更高级消费者(如鱼类等)之间的中间环节。本文研究了 3 种金属纳米颗粒进入水体后对大型蚤的毒性效应,结果见表 4。不同的纳米材料对大型蚤活动的抑制能力各不相同。One way ANOVA 与 Tukey's test 结果显示,nZnO、nTiO₂和 nAl₂O₃对大型蚤 48 h 活动抑制的最低效应浓度(LOEC)分别为:0.5、10 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按标准的概率单位法^[12],可计算得到不同纳米材料水悬浮液对大型蚤活动抑制的 EC_{50} 值和置信区间(表 4)。nZnO 的毒性最大,其 EC_{50} 值仅为 $0.622 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,显著小于其他几种纳米材料($p < 0.05$);nAl₂O₃的毒性最小,其 EC_{50} 值高达 $114.357 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据上述结果,可得到 3 种纳米材料水悬浮液对大型蚤活动抑制的毒性大小顺序为:nZnO > nTiO₂ > nAl₂O₃。不同的人工纳米材料水悬浮液对大型蚤的 LC_{50} 值之间同样存在显著性差异(表 4)。根据统计分析结果,

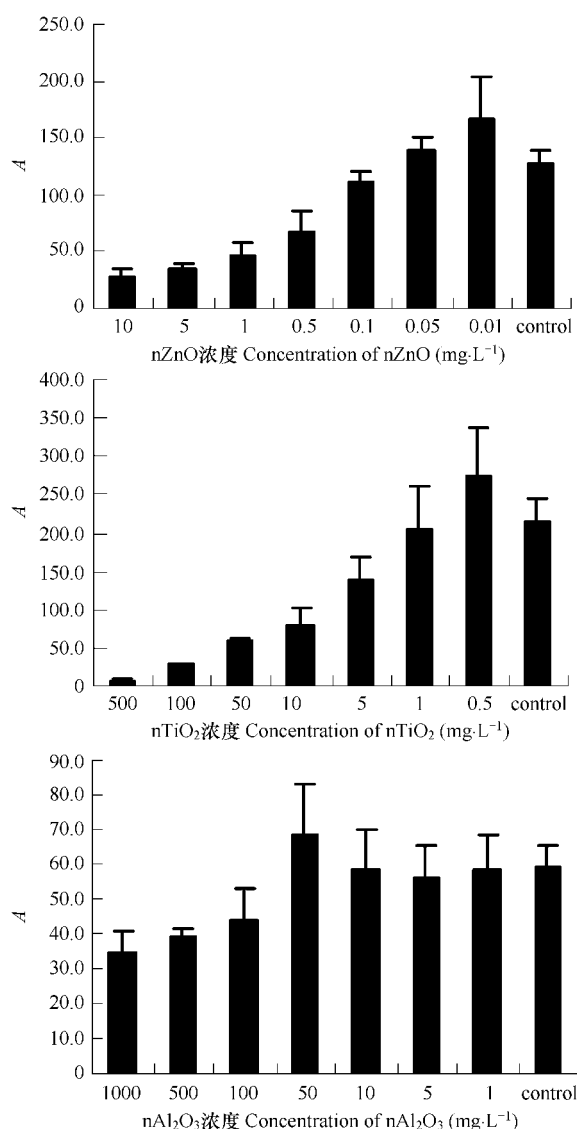


图 1 不同纳米材料水悬浮液对斜生栅藻的生长抑制效应
Fig. 1 The inhibition effects of nanoscale TiO₂, ZnO and Al₂O₃ water suspensions on the growth of *Scenedesmus obliquus*
A 表示斜生栅藻 96 h 生长曲线下面所包围的面积 A: The area under the growth curve

表 3 人工纳米材料水悬浮液对斜生栅藻生长抑制的剂量-效应相关关系及半效应浓度

Table 3 The dose-effect correlation and 96 h EC_{50} of nTiO₂, nZnO and nAl₂O₃ suspensions on the growth of *Scenedesmus obliquus*

纳米材料水悬浮液 Nanomaterial suspensions	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC_{50} ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
nZnO	$y = 38.862x + 49.194$	$R^2 = 0.9542$	$1.049 \pm 0.565a$
nTiO ₂	$y = 39.902x + 2.7719$	$R^2 = 0.9275$	$15.262 \pm 6.968b$
nAl ₂ O ₃	$y = 14.204x - 10.044$	$R^2 = 0.5471$	> 1000

y 表示绿藻受抑制的百分率, x 表示纳米材料水悬浮液的对数浓度 $\lg C$, EC_{50} 列中字母不同者表示有显著性差异($p < 0.05$) y indicates the inhibition percent of *Scenedesmus obliquus*; x indicates the $\lg C$ of nanomaterial suspensions; values with different letters in EC_{50} vertical column are significantly different ($p < 0.05$)

① 朱小山. 几种人工纳米材料的生态毒理学研究. 南开大学博士学位论文, 天津, 2007.

3 种纳米材料水悬浮液导致大型蚤死亡的毒性大小顺序为: $\text{nZnO} > \text{nTiO}_2, \text{nAl}_2\text{O}_3$ 。

纳米材料水悬浮液对大型蚤表现出明显的毒性,可能与纳米材料本身的性质有关,同时也与大型蚤自身的生理构造和功能相关。大型蚤是滤食性生物,能滤食水中碎屑和藻类,不可避免的大量摄入纳米颗粒。在高浓度时,大型蚤能在短时间内 ($< 12 \text{ h}$) 摄取大量纳米颗粒,而且由于大型蚤体表的疏水性,使得大型蚤表面也吸附了大量纳米材料颗粒(如 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ nTiO}_2$ 暴露组的大型蚤,图 3),从而导致大型蚤很快失去活动能力。在低浓度下,大型蚤对纳米材料的摄食导致纳米材料在体内的积累(图 3)可能是纳米材料导致大型蚤受到抑制或死亡的原因。由图 3 可见,3 种金属氧化物纳米材料在大型蚤体内的分布有明显的区别,可能是由于不同的纳米材料化学成分、粒径、晶体结构、表面性质等理化性质的差异造成。 nAl_2O_3 在大型蚤内的行为与众不同,能形成一些圆形颗粒物质(图 3 nAl_2O_3 对应图片中箭头所指),其原因有待深入研究,这一现象也许和 nAl_2O_3 纳米颗粒水悬浮液的低毒性有关。 nTiO_2 不仅分布在大型蚤体内,而且在体表亦有大量存在,甚至在大型蚤的触角上都沾有 nTiO_2 团块(图 3),从而导致对大型蚤活动的抑制。本文中 nTiO_2 的 LC_{50} 值为 $143.387 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而 Lovern 等人^[20] 采用静态实验方法发现,用超声波振荡分散得到的 nTiO_2 (粒径 $100 \sim 500 \text{ nm}$) 水悬浮液在浓度高达 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时都没有对大型蚤产生显著的毒性,但是经过过滤的 nTiO_2 (平均粒径 30 nm) 水悬浮液对大型蚤的半致死浓度 (LC_{50}) 值却低至 $5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,不仅表明 nTiO_2 能对大型蚤产生毒性,而且表明其毒性与本身的性质(如粒径等)以及制备方法有关。Hund-Rinke 等人^[13] 与 Adams 等人^[7] 的研究发现太阳光或紫外照射能影响 nTiO_2 对大型蚤和细菌的毒性,结果进一步表明 nTiO_2 的毒性还与其本身的光敏性有关。本试验中, nZnO 纳米材料水悬浮液表现出最强的毒性效应,这与其在大型蚤体内的行为显著区别于其他纳米材料的结果相一致。尽管大型蚤肠道内的 nZnO 颗粒较少,但却可观察到明显的肠道病变(图 3 nZnO 对应图片中箭头所指)和组织溃散,其原因可能与其光敏性^[7] 有关,也可能和其在水溶液中溶出锌离子有关^[14,15]。

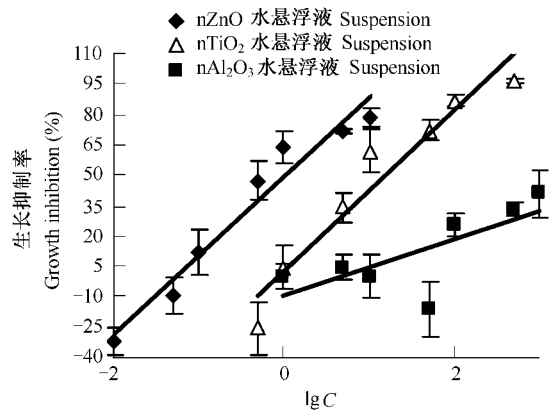


图 2 不同纳米材料水悬浮液对斜生栅藻的百分抑制率
Fig. 2 Effects of nTiO_2 , nZnO and nAl_2O_3 suspensions on the growth of *Scenedesmus obliquus*

表 4 不同纳米材料水悬浮液对大型蚤的 48 h EC_{50} 和 LC_{50}

Table 4 The 48 h EC_{50} and LC_{50} of nTiO_2 , nZnO and nAl_2O_3 suspensions on the *Daphnia magna*

纳米材料 Nanomaterials	EC_{50} ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	95% 置信区间 95% Confidence Limits	LC_{50} ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	95% 置信区间 95% Confidence Limits
nAl_2O_3 水悬浮液 Suspension	114.357a	111.232 ~ 191.100	162.392a	124.325 ~ 214.803
nTiO_2 水悬浮液 Suspension	35.306b	25.627 ~ 48.928	143.387a	106.466 ~ 202.818
nZnO 水悬浮液 Suspension	0.622c	0.411 ~ 0.805	1.511b	1.120 ~ 2.108

同一列中字母不同者表示有显著性差异 ($p < 0.05$) values with different letters in the same vertical column are significantly different ($p < 0.05$)

2.3 不同纳米材料对水生生物的毒性比较

由图 1 ~ 图 3 和表 3, 表 4 可知 3 种纳米材料进入水体后的悬浮液除 nAl_2O_3 外, 均对初级生产者(斜生栅藻)和初级消费者(大型蚤)具有明显毒性, 并随着纳米材料浓度的增加毒性增强, 表现出明显的剂量-效应相关关系。不同的纳米材料水悬浮液对水生生物的毒性差异很大, 如 nZnO 对斜生栅藻的毒性与 nAl_2O_3 相比差异达 1000 倍以上(表 5)。同种纳米材料水悬浮液对不同生物的毒性也有明显的差异, 如 nAl_2O_3 对斜生栅藻的 96 h $\text{EC}_{50} > 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 但是对大型蚤的 48h EC_{50} 仅为 $114.357 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 两者相差几近一个数量级。而 nTiO_2 却与之相反, 对斜生栅藻的毒性大于对大型蚤的毒性, 两者的 EC_{50} 分别为 $15.262 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 35.306

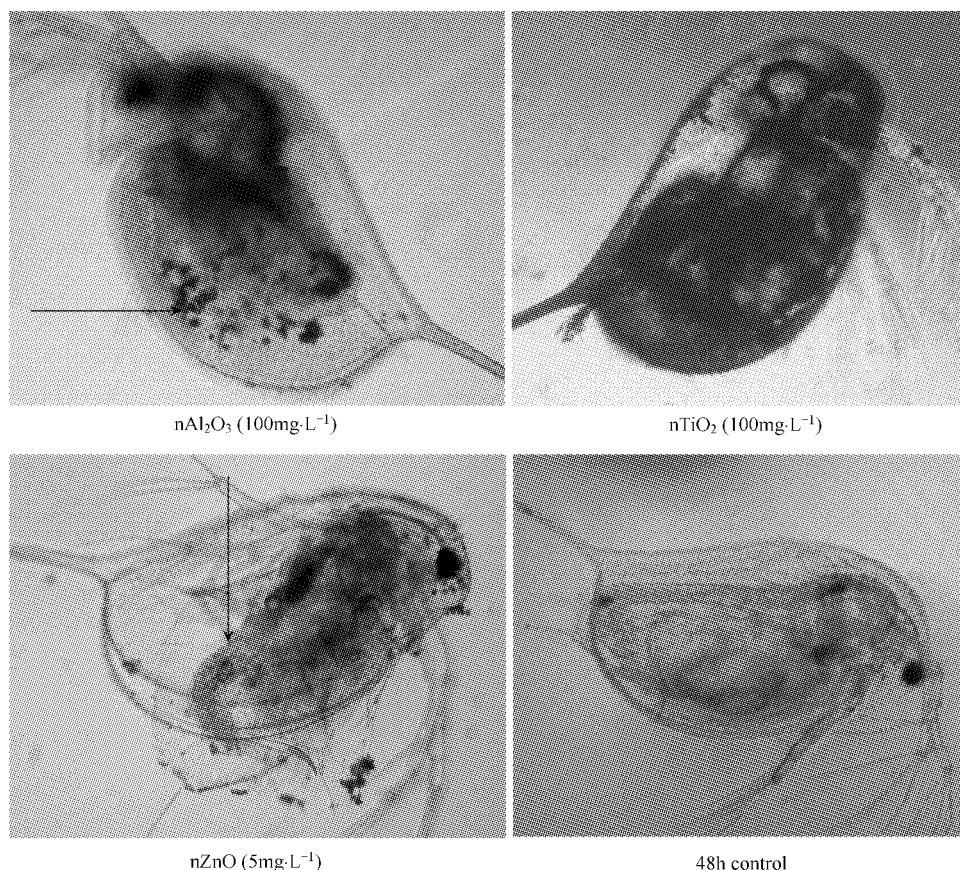


图3 暴露于不同纳米材料水悬浮液中48 h后死亡的大型蚤(2×10 倍)

Fig. 3 The death *Daphnia magna* after 48h exposure of nTiO₂, nZnO and nAl₂O₃ suspensions (2×10)

mg·L⁻¹(表5)。分析结果表明:如果仅仅采用单一的物种进行毒性试验,其试验结果将不能真实反映纳米材料进入水环境后的生态毒性效应,以其结果为基础对纳米材料进行毒性分级或风险分析将是不准确的、片面的。因此,应该建立包括初级生产者、初级消费者以及更高层次消费者在内的,在食物链层次上的综合水生生态毒性试验,其结果才能有助于更加全面系统地了解纳米材料泄漏进入水环境后的生态后果^[5,21]。

总体而言,无论对大型蚤还是对斜生栅藻,nZnO的毒性均较其他纳米材料大,而nAl₂O₃则最小。以EC₅₀值为指标,基本上纳米材料对大型蚤的毒性要大于对斜生栅藻的毒性(表5),其原因可能与生物自身的生理构造和功能相关。斜生栅藻属于植物,而大型蚤属于动物,两者在生物组织的构造、功能等生理生化方面均存在较大差异。

2.4 不同纳米材料的水生生态安全初步评价

目前,还无法确定纳米材料在实际水环境中的含量。但是最近的研究表明,nZnO和nTiO₂较易在水中分散^[20],经较长时间搅拌后能形成稳定的悬浮液。这些发现表明纳米材料在天然水环境中的分散极有可能达到一个令人意想不到的程度,并能产生相应的水生生态影响。本文的结果证明,上述几种纳米材料进入水环境中后,确实能对水生生物产生危害(表5)。因此,有必要深入调查研究人工纳米材料的污染途径和污染对象,确定不同纳米材料对污染对象的污染程度,然后根据不同的污染程度对其进行毒性分级,从而为人工纳米材料的科学、有效和无害化管理提供科学依据。尽管本实验的数据不够全面,但是作为探索性的工作,对人工纳米材料的生态安全评价进行初步的探讨,其结果将有助于未来全面、系统的评价研究。因此,根据OECD化学物质和混合物的人体健康和环境危险综合协调分类系统^[17]以及欧盟指令^[18]67/548/EEC—“危险物质的分类与包装”中的分类指标^[22],结合本实验的毒性数据,并考虑到纳米材料的难溶性和潜在的生物积累可能,

对本实验中的 3 种纳米材料进行了生态安全评价,其结果见表 5。可见, nAl_2O_3 基本上对水生生物无毒或低毒; nTiO_2 对水生生物有毒害作用; nZnO 对藻类有毒,对大型蚤剧毒。使用时应注意避免泄漏,防止对水生生态系统带来危害。

表 5 不同纳米材料水悬浮液对大型蚤和斜生栅藻毒性效应的比较

Table 5 The compare toxicities of nanomaterial suspensions to *Scenedesmus obliquus* and *Daphnia magna*

毒理效应 Toxicological effects	水悬浮液 Suspension		
	nAl_2O_3	nTiO_2	nZnO
藻类生长 96h EC_{50} on algae growth	$> 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$15.262 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.049 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
大型蚤不动 48h EC_{50} on daphnia immobilization	$114.357 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$35.306 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.622 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
藻类生长 96h LOEC on algae growth	$500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
大型蚤不动 48h LOEC on daphnia immobilization	$100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
对藻类毒性 Toxicity on algae	慢性 4 级/无害 Chronic IV/innocuity	慢性 3 级/有害 Chronic III/nocuousness	慢性 2 级/有毒 Chronic II/venomousness
对大型蚤毒性 Toxicity on daphnia	慢性 4 级/无害 Chronic IV/innocuity	慢性 3 级/有害 Chronic III/nocuousness	慢性 1 级/剧毒 Chronic I/virulence

3 藻类生长/大型蚤活动抑制试验应用于纳米材料生态毒性检测的经验与展望

由于纳米材料一般都是难溶性物质,尽管可以通过各种途径(如助溶剂、搅拌、超声振荡等)将纳米材料分散在水中,或者泄露进入水环境后在波浪、湍流作用等的作用下分散,其最终的存在形态仍然是粒径大小在纳米尺度上的各种颗粒或其团聚物。基于上述认识,本文参照 OECD 201“藻类生长抑制试验”^[8]、OECD 202“大型蚤急性活动抑制试验”^[9]和 OECD Series on Testing and Assessment, no. 23. “特殊物质和特殊混合物的水生生态毒性测定准则”^[10]开展上述实验,并得到初步结果。

(1)对藻类而言,人工纳米材料可能遮蔽光,导致实验体系内实际光强下降而抑制藻类的生长。可通过降低光径、减少溶液体积扩大受光面积、保持实验体系处于紊流状态等措施加以解决。根据 OECD no. 23^[10]的建议结合本次试验表明:250ml 的三角瓶内只装 60ml 的试验溶液,使液层变薄(约 1.2 cm);使用摇床并保持一定转速使溶液处于紊流状态,随机变换三角瓶在摇床上的位置下保持藻类均匀受光;垂直(光径约 16cm)或底部光照加侧面辅光,使液面光强稳定在 $180 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 左右。在此条件下能得到较为理想的结果。Baun 等人^[23]认为,在采取诸如降低光径和保持湍流混合等光强补偿措施后,藻类生长抑制实验可应用于浓度 $\leq 10\text{g/L}$ 的污染土壤悬浮液的生态毒性检测;

(2)纳米颗粒在实验过程中可能会有少量析出和沉淀。因此,在保证受试生物正常生长的前提下,应尽可能降低实验体系的离子强度;或通过适度的振摇保持实验体系处于紊流状态。值得注意的是,振摇的速度不应太快,以免纳米颗粒对受试生物造成物理伤害,导致最后对纳米颗粒毒性的高估。应在正式实验前开展预实验,摸索出适度的混合培养条件。Hund-Rinke 等人认为即使藻类和纳米材料发生一定程度的沉降,两者仍能保持直接接触导致毒性效应的发生^[13]。

但是将藻类生长/大型蚤活动抑制试验应用于纳米材料生态毒性检测仍然存在一些问题需要说明或改进:

①如何使生态毒性实验结果能够反映纳米材料的重要特性(如光敏性、高表面活性等)的影响;

②如何解释产生毒性的原因,是否纳米材料的粒径、表面积具有重要作用;或者颗粒的化学组成、聚合、表面化学和形态学更为重要?

③试验设计的改善,比如尽可能保持纳米材料在试验体系内与受试生物的充分接触;尽可能的模拟现实的环境暴露条件,使试验结果能最大程度地反映纳米材料泄漏进入水环境后对水生生态系统的影响。

在使实验体系最优化后,纳米颗粒的生态毒性测定将是可能的,这有利于降低人造纳米材料在获得广泛应用前导致的环境和健康风险。

4 结论

本文首次研究了 3 种金属氧化物纳米颗粒对模式生物——斜生栅藻和大型蚤的生态毒性效应。主要结果如下:

① nZnO、nTiO₂和 nAl₂O₃水悬浮液均能抑制斜生栅藻的生长,抑制大型蚤的活动,并导致大型蚤死亡。

② nZnO、nTiO₂和 nAl₂O₃对斜生栅藻生长的 96 h EC_{50} 值分别为 1.049、15.262 mg·L⁻¹和 >1000 mg·L⁻¹;对大型蚤活动抑制的 48 h EC_{50} 值分别为 0.622、35.306 mg·L⁻¹和 114.357 mg·L⁻¹;对大型蚤的 48 h LC_{50} 值分别为 1.511、143.387 mg·L⁻¹和 162.392 mg·L⁻¹。其毒性大小顺序为:nZnO > nTiO₂ > nAl₂O₃。nZnO 的毒性相对最大,对藻类有毒,对大型蚤为剧毒;而 nAl₂O₃则最小,可认为基本无毒或低毒。

上述结果表明,纳米颗粒的生态毒性和环境效应不容忽视,有必要进一步深入研究人工纳米材料的污染途径和污染对象,确定其污染机制和污染程度,然后根据不同的污染程度进行毒性分级,最终实现对人工纳米材料的科学、有效和无害化管理,以保证纳米技术在发展的同时,既能满足实际的需要,也符合可持续发展的原则。

References:

- [1] Colvin V L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(10): 1166—1170.
- [2] US Environmental Protection Agency, National Center for Environmental Research, Science to Achieve Results (STAR) Program; National Science Foundation; National Institute for Occupational Safety and Health. Nanotechnology research grants investigating environmental and human health effects of manufactured nanomaterials: a joint research solicitation-EPA, NSF, NIOSH. 2004. 09. http://es.epa.gov/ncer/rfa/2004/2004_manufactured_nano.html. 2005-02-15.
- [3] Zhu X S, Zhu L. Review on Biological Effects of Manufactured Nanomaterials. *Journal of Safety and Environment*. 2005, 5(4): 86—90.
- [4] The Health and Consumer Protection Directorate General of the European Commission. Nanotechnologies: A Preliminary Risk Analysis. http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/events_risk_en.htm. 1-2 March 2004. 2005-02-15
- [5] EPA 100/B-07/001. U. S. Environmental Protection Agency Final Nanotechnology White Paper. Science Policy Council, U. S. Environmental Protection Agency. Washington, DC 20460. 15 February 2007. <http://www.epa.gov/osa/pdfs/nanotech/epa-nanotechnology-white-paper-final-february-2007.pdf>, 2007-03-09
- [6] Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(10): 1058—1062.
- [7] Adams L K, Lyon D Y, M^oIntosh A, *et al.* Comparative Eco-Toxicity of Nanoscale TiO₂, SiO₂ and ZnO Water Suspensions. *Water Research*, 2006, 40(19): 3527—3532.
- [8] OECD 201 (1984): OECD Guideline for the Testing of Chemicals. “Alga, Growth Inhibition Test”, 1984.
- [9] OECD 202 (2004): OECD Guideline for the Testing of Chemicals. ‘*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test’, 2004.
- [10] OECD 2000: Draft Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, 2000. no. 23.
- [11] Mayer P, Frickmann J, Christensen E R, *et al.* Influence of growth conditions on the results obtained in algal toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1998, 17(6): 1091—1098.
- [12] EPA Probit Analysis Program. Used for Calculating LC/EC Values. Version 1.5. <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2/probit.zip>, 2005-10-18
- [13] Hund-Rinke K, Simon M. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO₂) on Algae and Daphnids. *Environmental Science and Pollution Research*, 2006, 13(4): 225—232.
- [14] Qu M L, Jiang W C. Investigation of the antibacterial mechanism of nanometer zinc oxide. *Textile Auxiliaries*, 2004, 21(6): 45—46.
- [15] Zhu X, Zhu L, Duan Z, *et al.* Comparative toxicity of several metal oxide nano-particle aqueous suspensions to zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health (part A)*, 2008, 43(3): 278—284.
- [16] Yamamoto A, Honma R, Sumita M, *et al.* Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *Journal of Biomedical Materials*

Research, 2003, 68A: 244—256.

- [17] OECD 2001. Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment, no. 33, 2001.
- [18] COUNCIL DIRECTIVE 67/548/EEC; COUNCIL DIRECTIVE 67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labeling of dangerous substances.
- [19] Stebbings A R D. Homeosis the stimulation of growth by low levels of inhibitors. Science of the Total Environment, 1982, 22:213—234.
- [20] Lovren S B, Klaper R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C_{60}) nanoparticles. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25:1132—1137.
- [21] Jiang M, Li Y, Gu G. Study on toxicity of nitrogenous heterocyclic compounds to aquatic organisms. Acta Scientiae Circumstantiae, 2005, 25(9): 1253—1258.
- [22] Duan H, Huang Q, Wang Q, *et al.* Eco-toxicity Identification Standard of Hazardous Waste. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2006, 18(6): 5—8.
- [23] Baun A, Justesen K B, Nyholm N. Algal tests with soil suspensions and elutriates: A comparative evaluation for PAH-contaminated soils. Chemosphere, 2002, 46: 251—258.

参考文献:

- [3] 朱小山, 朱琳. 人工纳米材料生物效应研究进展. 安全与环境学报, 2005, 5(4): 86~90.
- [14] 曲敏丽, 姜万超. 纳米氧化锌抗菌机理探讨. 印染助剂, 2004, 21(6): 45~46.
- [21] 江敏, 李咏梅, 顾国维. 含氮杂环化合物对水生生物的毒性作用研究. 环境科学学报, 2005, 25(9): 1253~1258.
- [22] 段华波, 黄启飞, 王琪, 等. 危险废物生态毒性鉴别指标研究. 环境监测管理与技术, 2006, 18(6): 5~8.