

DOI: 10.5846/stxb201503190525

庄文, 陈青, 周凤霞. 水环境中工程纳米颗粒物的生态毒理学机理及理想模式生物的筛选. 生态学报, 2016, 36(18): - .

Zhuang W, Chen Q, Zhou F X. An overview of engineered nano-particle ecotoxicology in aquatic environments: mechanisms and optimal model organisms. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(18): - .

# 水环境中工程纳米颗粒物的生态毒理学机理及理想模式生物的筛选

庄文<sup>1,3,\*</sup>, 陈青<sup>2</sup>, 周凤霞<sup>3</sup>

1 枣庄学院, 城市与建筑工程学院, 枣庄 277160

2 枣庄学院, 生命科学学院, 枣庄 277160

3 中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 烟台 264003

**摘要:**随着纳米技术产业的高速发展,大量工程纳米颗粒物(Engineering nano-particles, ENPs)被排放到自然水环境中,因此对其进行生态毒性及环境风险的研究尤为迫切。综述了 ENPs 在水环境中的毒理学机理及理想模式生物筛选的研究进展。目前的研究表明 ENPs 的毒性作用机制主要包括两方面:一是影响细胞信号通路,二是氧化应激造成基因表达的变化。此外,光催化活性、细胞表面附着、溶解特性、表面特征、赋存形态、溶剂效应及与其他环境污染物的协同作用也是可能的毒性作用机理。模式生物的筛选与确定在纳米生态毒理学研究中极为重要。鱼类作为水环境中普遍存在的脊椎动物,群落庞大,其具有行为端点敏感性高、且在生物毒性实验中存在明显的量效关系等特征,被认为是研究 ENPs 生态毒理学最适合的水生模式生物。研究表明针对在 ENPs 影响下的未成年鱼类的行为特征研究比传统的胚胎发育及致死率研究更为有效。无脊椎动物和浮游植物同样在各种水环境中普遍存在,对环境污染物极为敏感,且对有害物质具有显著的富集放大效应,因此作为模式生物也具有一定的优势。

**关键词:**纳米颗粒物;生态毒理学;水生态系统;模式生物

## An overview of engineered nano-particle ecotoxicology in aquatic environments: mechanisms and optimal model organisms

ZHUANG Wen<sup>1,3,\*</sup>, CHEN Qing<sup>2</sup>, ZHOU Fengxia<sup>3</sup>

1 College of City and Architecture Engineering, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China

2 College of Life Sciences, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China

3 Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China

**Abstract:** With the rapid development of nanotechnology industry, there is an increased discharge of engineered nano-particles (ENPs) into aquatic environments; therefore, the study of their ecotoxicity and environmental risk is urgently required. This paper reviews the toxicological mechanisms of ENPs and the filter of model organisms. Researchers have pointed out two main traits of nanoparticle cytotoxicity: affection of cell signaling pathways and reactive oxygen species (ROS)-related changes in gene expression. Oxidative stress caused by ROS production inside cells can change the levels of anti-oxidative enzymes, and then destroy the balance between oxidation and anti-oxidation. Thus, cells are damaged by ROS accumulation, leading to a series of consequences, such as lipid oxidation and inhibited cell growth. Previous studies have

**基金项目:**国家自然科学基金面上项目(41376083);山东自然科学基金培养项目(ZR2014DP005);枣庄学院博士科研基金(2014BS11)

**收稿日期:**2015-03-19; **网络出版日期:**2015-00-00

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wzhuang@yic.ac.cn

suggested that photosensitivity of ENPs and their ROS production under high-intensity light with specific wavelengths may be related to their ENP toxicity. The adsorption of ENPs on the surface of microorganisms or cells can hinder their normal physiological functions; in addition, the adsorption of ENPs can also enhance the absorption of hazardous substances in microorganisms or cells. Since the toxicity testing conditions of ENPs may vary, and there is no uniform requirement for solvent type and use; therefore, toxicity research of ENPs is not based on the same principles. In the ecotoxicological assessment of ENPs, the effects of solvents should be taken into consideration, and it is necessary to assess whether other substances will produce toxicity under the influence of ENPs. In addition, solubility, surface characteristics, forms of metal oxides are also important toxicological mechanisms of ENPs. In nano-ecological toxicology studies, the filter and determination of optimal model organisms is vital. It has been widely demonstrated and recommended that fish should be considered as a primary model animal for the evaluation of the potential acute aquatic toxicity of ENPs. Fish are the most dominant vertebrates in the aquatic environments. Fish demonstrate high sensitivity of behavior endpoint and obvious concentration-response relationship in bio-toxicity experiments. Therefore, fish are considered to be the most suitable model organism in aquatic ecotoxicological research. A few studies have shown that behavioral endpoints of developing fish are more effective in detecting toxicity of ENPs compared to traditional studies such as embryonic development and fatality rate. It is emphasized that in ecotoxicological research of ENPs, further aquatic invertebrate testing will be of great significance, particularly studies on bioaccumulation and chronic endpoints with long-term low exposure. Bivalves represent an ideal group for studying the effects of ENPs, since they are abundant in both freshwater and marine aquatic environments. In addition, phytoplankton are important producers in aquatic environments, occupying an important place in aquatic ecosystems. Toxic effects of ENPs to phytoplankton and saving of ENPs by phytoplankton can directly or indirectly affect the entire aquatic ecosystem. Invertebrates and phytoplankton are both dominant in aquatic environments, and are highly sensitive to pollutants; they have significant enrichment and amplification effect on harmful substances. Therefore, they also have a certain advantage as model organisms.

**Key Words:** nanoparticle; ecotoxicology; aquatic systems; model organism

纳米材料显示出了许多其宏观形态所不具备的新特性,在众多技术应用领域都展现出了巨大的潜力,例如在医疗、计算机、纺织、机械、航天等行业中都有着广泛的应用。约十年前,人们开始认识到工程纳米材料可能给人类健康和环境安全带来的威胁。在 2003 年 4 月, *Science* 刊登的一篇文章首先提出了进行纳米材料毒理学研究的必要性<sup>[1]</sup>。同年 7 月, *Nature* 的一篇文章指出,如果不对纳米材料的生态毒理学效应进行研究,将导致纳米技术丧失政府和公众的信任及支持<sup>[2]</sup>。英国在 2008 年发起了一项关于纳米材料和纳米技术对人类环境、健康和安全的全球性调查,并于 2009 年 3 月发布研究项目总结报告,这在全世界属首次开展。2009 年 1 月,加拿大颁布了一项法律,要求国内企业和研究机构每年购买超过 1000 g 纳米材料时需申报购买的数量、用途和已知的毒性。生态毒理学研究从上个世纪 50 年代到 90 年代完成了从传统的研究方法到毒理基因组学方法的转变<sup>[3-4]</sup>。随着人们对纳米材料潜在环境风险的研究越来越重视, Kahru 和 Dubourguier 预言下个生态毒理学研究的时代将会是基因组生态毒理学和纳米生态毒理学时代<sup>[5]</sup>。

水生生态系统为人类和其他生物提供无尽的食物、能源和矿产资源。海洋是地球上最重要的水生生态系统,也是最大的天然净化器,大部分工程纳米颗粒物(Engineering nano-particles, ENPs)通过地表径流、大气沉降等过程,最终将被排入海洋。水体沉积物是 ENPs 等污染物的重要的汇,水体中悬浮颗粒物和细粒度沉积物中含有大量的胶体,这些胶体具有较大的比表面积,携带大量电荷,在吸附作用下,ENPs 就随胶体一起沉积到沉积物中。在配合作用和氧化还原作用下,沉积物中的 ENPs 会重新释放到水体中,对水生生物造成生物毒害作用<sup>[6]</sup>。ENPs 进入水环境后通过多种途径进入生物地球化学循环,被浮游生物或底栖生物直接摄入,通过食物链进行富集放大<sup>[7]</sup>。

虽然科研人员已经在 ENPs 的生态毒性机制、毒性强度、生态毒理模型生物、生物地球化学循环及生物可利用性等方面进行了多年的研究,但有利用价值的依据依然远远不够。本文将就 ENPs 的生态毒理学机理和理想模式生物的筛选进行阐述,同时指出了在相关研究过程中出现的问题,并给出了可能的解释。在本文的最后对未来的研究方向进行了预测。

## 1 NPs 的毒理学机制

自然界中有许多天然的纳米颗粒(Nano-particles, NPs),生物对这些天然 NPs 具有较强的适应性。而人工合成的纳米材料与天然形成的不同,其毒理学机制更应受到关注。大量关于 ENPs 毒理学机理的研究表明,ENPs 不同寻常的物理化学性质主要可以归因于:体积小(表面积和粒度分布),特殊的化学成分(纯度、结晶度、电子性质)和表面结构(表面反应活性,表面基团、无机或有机包衣)以及溶解度、形状、聚合性等<sup>[8-9]</sup>。下面介绍目前已发现的 ENPs 主要的毒理学机理。

### 1.1 纳米颗粒物诱导的氧化应激

学界普遍认为 ENPs 毒理学的两个主要作用机制:一个是影响细胞信号通路,另一个是活性氧的产生导致氧化应激,从而造成基因表达的变化<sup>[10-11]</sup>。其主要作用过程为 ENPs 诱导活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)产生,导致细胞内部发生氧化应激。抗氧化酶的活性改变,破坏了氧化和抗氧化的平衡,细胞内活性氧大量积累,进一步导致脂质氧化、细胞膜破坏、信号传递障碍、生长抑制及一系列正常细胞功能丧失,致使细胞死亡。这是目前关于 ENPs 毒性机理的最有说服力的解释<sup>[12-13]</sup>。Li 等的研究表明纳米 TiO<sub>2</sub>对腰鞭毛藻和中肋骨条藻的生长具有强烈的抑制作用,其对这两种藻的 72 小时半数致死量分别为 10.69 和 7.37 mg/L;死亡后的藻类细胞膜完全被破坏,细胞器无法辨认;并且超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性发生了改变,活性氧水平与对照组比显著升高,ROS 作用的靶器官为叶绿体<sup>[9]</sup>。

实验数据表明,ENPs 的毒性与其对应宏观材料的物理化学性质并无密切联系,而且宏观物化性质差异较大的 ENPs 可能具有类似的毒性作用。例如富勒烯 C<sub>60</sub>和纳米 TiO<sub>2</sub>都具有氧化还原活性并可以造成氧化应激反应,虽然它们的物化性质差异巨大<sup>[14-15]</sup>。ENPs 进入大脑可以产生氧化应激和随后的神经毒性,因此小神经胶质细胞可以吞噬 ENPs,然后氧化应激反应发生<sup>[16]</sup>。除大脑外,ENPs 可以在多种组织中引起氧化应激反应<sup>[14, 17-18]</sup>。Ribeiro 等研究发现,纳米 Ag 可以抑制斑马鱼的增长,这可能是由于纳米 Ag 引起的氧化应激作用破坏了 DNA 的正常复制,导致正常生理功能的丧失<sup>[19]</sup>。

### 1.2 光催化活性

研究表明某些纳米粒子(例如纳米 TiO<sub>2</sub>、纳米 ZnO 等)的光敏性和其在特殊波长下诱导产生的活性氧与其生物毒性密切相关,这也是其产生毒理学效应的重要原因之一<sup>[20]</sup>。Lu 等研究发现在近紫外光照射下,暴露于纳米 TiO<sub>2</sub>的大肠杆菌细胞壁首先降解,接下来是膜损伤和渗透伤害,然后细胞内物质流出,最后细胞死亡<sup>[21]</sup>。Ma 研究了人造纳米 ZnO 对线虫的毒性作用,结果显示自然光源下纳米 ZnO 对线虫的毒性要强于在人造光源下的毒性,在人造光源下暴露 24 小时对线虫的致死率仍不及在自然光下暴露 2 小时,这可能归因于人造光源光谱范围较窄或光强度较弱,对纳米 ZnO 生物毒性的激发能力低于自然光<sup>[22]</sup>。

Kalčíková 等发现 2 mg/L 的纳米 TiO<sub>2</sub>在紫外线照射下可以抑制钩虾对黑斑小蚜的捕食活动,使钩虾在 96 小时内的捕食量减少了 68%,体重下降 22%<sup>[23]</sup>。其机制为紫外线激发了纳米 TiO<sub>2</sub>诱导产生的 ROS,导致钩虾正常生理机能的丧失;Kalčíková 等还指出纳米 ENPs 的光催化活性在水生态系统中是一种潜在的威胁,在进行生态风险评估时应将此因素考虑在内<sup>[23]</sup>。

然而有研究发现在完全黑暗的情况下,ENPs 对微生物的生长也具有抑制作用。Mao 等研究发现用 Ag 修饰过的 TiO<sub>2</sub>纳米管即使在无光的条件下,其对大肠杆菌仍表现出较强的抗菌活性<sup>[24]</sup>。Roha 等的研究也得到了类似的结果<sup>[25]</sup>。这些现象表明除光催化引起的氧化应激外,还有其他未知的机制造成了 ENPs 的生物毒性作用。

### 1.3 表面吸附作用

某些 ENPs 尤其是金属 ENPs 表现出吸附特性,它们可以吸附在细胞或微生物表面。ENPs 的表面吸附机制可能有以下几种:静电作用、范德华力、范德瓦尔斯力、受体配位作用和疏水作用<sup>[26-27]</sup>。通常 ENPs 表面带有电荷,例如纳米 TiO<sub>2</sub>的零电位点为 5.2,而自然环境中的水的 pH 值高于该值,因此纳米 TiO<sub>2</sub>表面在自然水体中带负电荷<sup>[28]</sup>。另外,由于具有很大的比表面积,ENPs 在水体中可以吸附大量的分子。例如零价 Fe 纳米颗粒与 Ba<sup>2+</sup>(10<sup>-6</sup>—10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>)的吸附符合 Freundlich 和 Dubinin-Radush-kevich 吸附等温式<sup>[29]</sup>。

ENPs 与污染物共存时,可能会改变污染物的毒性效应。例如 Zhang 等研究发现纳米 TiO<sub>2</sub>与 Cd 的吸附符合 Freundlich 吸附等温线,纳米 TiO<sub>2</sub>的存在可以加速鲤鱼对 Cd 的吸收,加快 Cd 中毒<sup>[30]</sup>。另外,ENPs 吸附或附着在微生物表面,会阻碍微生物的正常生理功能,并可能进入生物体内产生毒性。例如 Chen 等的研究表明纳米 TiO<sub>2</sub>对莱茵衣藻的毒性机制主要包括细胞表面吸附、抑制光合作用、脂质过氧化反应和抑制新蛋白质合成等。其中在表面吸附作用下,纳米 TiO<sub>2</sub>大量聚集于莱茵衣藻的表面或嵌入细胞膜中,从而阻碍了细胞与周边环境之间的物质交换及光合作用<sup>[31]</sup>。然而到目前为止,ENPs 与细菌细胞壁之间的相互作用机制还尚不明确。另外,也没有关于 ENPs 如何透过细胞壁进入胞内的统一观点。

### 1.4 溶解特性、赋存形态和表面特征

ENPs 的生物毒性与其溶解特性、表面特征和赋存形态密切相关。由金属和金属氧化物 ENPs 游离出来的金属离子的毒性可能比 ENPs 本身的毒性还要强。Moos 等的研究表明纳米 CuO 在天然水中的生物毒性主要来自于其游离出来的 Cu 离子<sup>[32]</sup>。Kasemets 等将 ENPs 分为可溶性和非可溶性两类,且研究表明可溶性 ENPs 的细胞毒性更强;一旦进入细胞,可溶性 ENPs 会释放出金属离子,从而造成细胞损伤甚至使其死亡<sup>[33]</sup>。Li 等研究了纳米 ZnO 溶液在盐和可溶性有机物(Dissolved organic matter, DOM)存在下对蚯蚓的生物毒性作用,结果显示在盐环境下,纳米 ZnO 对蚯蚓的致死率大大降低。扫描电镜照片显示,纳米 ZnO 在盐的作用下大量聚集,其可溶性及生物可利用性都受到了显著的影响;DOM 存在时情形与盐存在时类似<sup>[34]</sup>。

纳米金属离子具有还原性,例如纳米 Cu 离子可以参与电子传递,这可能是细胞表面 ROS 的来源之一。Ivask 等研究发现在溶解态纳米 Cu 影响下,大肠杆菌体内产生了超氧化物阴离子<sup>[35]</sup>;Bondarenko 等研究发现在溶解态纳米 CuO 影响下,大肠杆菌体内产生了超氧化物阴离子以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,并且导致了其 DNA 的破坏<sup>[36]</sup>。以上证据表明溶解态 ENPs 参与了氧化应激反应。

然而不同的情况也是存在的。一项关于纳米 ZnO 对土壤微生物的生态毒理学研究表明,纳米 ZnO 的非可溶态比其同浓度的离子态的毒性更强,这与大多数文献中将 ENPs 的毒性归结于其游离出的离子是不同的<sup>[37]</sup>。因此,ENPs 的毒性不仅仅与是否产生离子有关,还与其特殊的纳米形态的化学效应特征或对生物的刺激作用有关。因此,在研究 ENPs 的生态毒理学机制及其生态毒性后果的过程中,ENPs 的溶解特性和赋存形态是至关重要的两个方面<sup>[38]</sup>。

此外,ENPs 的生态毒理学特性也与其表面特性密切相关。对 ENPs 进行包被等处理会改变其理化性质,进而改变其生物毒性。柠檬酸盐包被的纳米 Au 可以进入人类细胞产生脂质过氧化反应,造成细胞内的膜损伤<sup>[39]</sup>。溶血性磷脂酰胆碱包被的单层碳纳米管(LPC-SWNT)可以通过正常摄食途径进入大型溞体内,而且低剂量不会造成其死亡;而 10 和 20 mg/L 浓度的 LPC-SWNT 对大型溞的致死率分别为 20%和 100%<sup>[40-41]</sup>。Hoecke 等将两组海藻分别暴露于用氧化铝包被后及未包被的纳米 SiO<sub>2</sub>中进行生物毒性对比,结果显示包被后的纳米 SiO<sub>2</sub>毒性明显弱于未包被的纳米 SiO<sub>2</sub>。Hoecke 等认为经过包被后的纳米 SiO<sub>2</sub>的表面特性被完全改变,降低了其毒性;且扫描电镜结果显示未包被的纳米 SiO<sub>2</sub>表面积要远小于包被后的,因此更容易进入海藻细胞内部对其造成损害<sup>[42]</sup>。

### 1.5 溶剂效应及纳米颗粒物与其他环境污染物的协同作用

由于不同科研人员进行 ENPs 生态毒性学研究时所使用的实验条件不同,并且没有统一的用于溶解 ENPs 的溶剂类型以及统一的溶剂使用方法,因此 ENPs 的生态毒理学研究没有统一的原则可遵循。在进行

ENPs 的生态毒理学研究时,应考虑溶剂的毒性,并明确溶剂是否会在 NPs 的诱导下产生毒性。已有研究表明,在进行 ENPs 对植物和微生物的生态毒理学研究中,有时溶剂本身的生物毒性比 ENPs 还要强,这一点也是未来的纳米毒理学研究中特别需要关注的问题之一<sup>[43]</sup>。

一项关于异型生物质有机化合物的毒性和生物积累性的研究表明,ENPs 的生物毒性不仅仅由其本身的特性决定,而且与 ENPs 与其他化合物的相互作用密切相关<sup>[44]</sup>。Henry 等研究了斑马鱼在纳米 C<sub>60</sub> 中的存活率和基因表达特征。纳米 C<sub>60</sub> 的溶解使用了两种方法:一种为直接将 C<sub>60</sub> 在水中搅拌并超声处理;另一种方法为将 C<sub>60</sub> 悬浮于四氢呋喃(THF),经旋转蒸发仪,再悬浮于水中并通氮气处理<sup>[45]</sup>。另外将置于不含 C<sub>60</sub> 和 THF 的水中的斑马鱼作为对照组。结果显示斑马鱼在 THF-C<sub>60</sub> 水中的存活率明显低于在仅含 C<sub>60</sub> 的水中的值以及对照组中的值,并且在 THF-C<sub>60</sub> 水中的斑马鱼的基因表达与对照组差异最大;仅含 C<sub>60</sub> 的实验结果与对照组差别不大。检测结果显示斑马鱼体内没有 THF,但含有其氧化产物  $\gamma$ -丁内酯和 2-乙氧基四氢呋喃。因此 THF 的氧化降解产物对斑马鱼产生了毒性作用,而非由 C<sub>60</sub> 造成。Henry 等认为在其他将生物毒性归咎于纳米颗粒物的研究中可能存在着类似的情况<sup>[45]</sup>。

Tan 和 Wang 研究表明纳米 TiO<sub>2</sub> 的存在会提高大型蚤对 Cd 和 Zn 等重金属的吸收与同化效率,一旦纳米 TiO<sub>2</sub> 被从内脏中排出,则吸收与同化效率恢复到正常水平;对 ROS 和金属硫蛋白指标的测定表明,内脏中纳米 TiO<sub>2</sub> 提供了更多结合位点,因此加速了对 Cd 和 Zn 的吸收转化<sup>[46]</sup>。Chen 等关于纳米 ZnO 和 TiO<sub>2</sub> 对幼年斑马鱼的游泳能力影响研究显示,被丁硫氨酸亚砷胺(BSO)修饰过的 ZnO 改变了其游泳能力,而被 *n*-乙酰半胱氨酸(NAC)修饰过的 ZnO 对其游泳能力没有影响<sup>[47]</sup>。而 NAC 和 BSO 的修饰对 TiO<sub>2</sub> 影响幼年斑马鱼游泳能力方面均没有明显作用<sup>[47]</sup>。另外该研究还显示,除了氧化应激作用外,ENPs 对斑马鱼幼苗的腮腺等器官还有物理刺激作用,而该机制仍需进一步研究。

### 1.6 纳米颗粒物生态毒理学研究中看似矛盾的发现

对于特定的 ENPs,某些研究显示其无任何生物毒性或仅具有微毒性,而其他研究却显示其具有很强的生物毒性。下面列出了一些关于纳米 TiO<sub>2</sub> 对水生生物的生态毒理学研究结果。一些研究表明纳米 TiO<sub>2</sub> 对大型蚤具有明显的致死性,且致死率与纳米 TiO<sub>2</sub> 的浓度成正比<sup>[19, 46]</sup>;而有的研究表明 TiO<sub>2</sub> 对菌类几乎无害<sup>[30]</sup>。一些研究显示纳米 TiO<sub>2</sub> 对鲤鱼无任何致死性<sup>[14]</sup>,但有研究显示纳米 TiO<sub>2</sub> 对鲤鱼有亚急性毒性<sup>[17]</sup>。

另外,有些研究显示,对于同一种 ENPs,其低浓度的毒性反而高于其高浓度的毒性。研究显示将幼年斑马鱼置于低浓度的纳米 TiO<sub>2</sub> 中后(0.1、0.5 和 1 mg/L),其死亡率迅速上升;而置于高浓度纳米 TiO<sub>2</sub> 中(5 和 10 mg/L)的幼年斑马鱼死亡率并未明显上升,研究者推测这可能归因于高浓度的 ENPs 诱导触发了其细胞内的抗氧化防御系统<sup>[48]</sup>。一项类似的研究表明,高达 100 mg/L 的零价 Fe 纳米颗粒(ZVI)对河流中的细菌群落无生物毒性作用;而其他研究显示即使低于 100 mg/L 的 ZVI 对细菌也具有显著的细胞毒性作用<sup>[49-51]</sup>。这可能是由环境条件不同、受试体不同,以及同一种 ENPs 的不同化学形态特征所造成的。

导致这些看似矛盾的研究结果的原因是多样的,因此在进行 ENPs 生态毒理学研究时,所有可能的因素应尽量考虑到,例如,不同的环境条件和纳米材料的前处理方法等。本文总结出了一些可能造成实验结果差异的因素:(1)对于同种元素的 ENPs,其实验用的粒径、晶型及形貌可能不同;(2)前处理方式不同,导致 ENPs 在溶液中的聚合程度不同<sup>[33, 47]</sup>;(3)使用了不同的溶剂<sup>[45]</sup>;(4)不同的实验环境条件,例如温度、pH、光照强度等<sup>[22]</sup>;(5)ENPs 与环境中其他物质的相互作用<sup>[46-47]</sup>;(6)实验对象为不同的亚种,或处于不同的生命周期,或给药途径不同;(7)其他未知因素。

ENPs 的生态毒理学机制汇总于表 1。以上所述研究中所使用的物种或实验方法存在较大差异,很难对其中 ENPs 的毒性强度做出明确的界定,因此理想纳米生态毒理学模式生物的筛选与确定显得极为重要。

## 2 水环境中理想的纳米毒理学模式生物

不同 ENPs 具有不同的尺寸、形状、化学组成和表面修饰,所有这些都影响其毒性,因此 ENPs 带来的生

态风险是非常复杂的。当评估当前或未来生产和使用的各种纳米材料的生态风险时,通过一个个测试所有生物物种显然是不可行的。因此,建立可以方便、及时的进行数据比较的标准模式生物至关重要<sup>[52]</sup>。目前研究较为广泛的水生模式生物包括鱼类(如斑马鱼、虹鳟鱼等)、贝类(贻贝属、大型溞等)、藻类等,下面将分别进行介绍。

表 1 工程纳米颗粒物的生态毒理学机制

Table 1 Ecotoxicological mechanisms of engineered nanoparticles

生态毒理学机制 Ecotoxicology mechanisms	毒性作用 Toxic effects	参考文献 References
诱导氧化应激反应 The induction of oxidative stress reaction	产生的活性氧簇改变了基因表达及细胞间信息的传递; 细胞膜损伤; 细胞正常功能丧失; 细胞死亡、降解	[9, 10-19, 39-41]
光催化活性 Photocatalytic activity	活性氧簇的产生; DNA 损伤; 蛋白质变性, 酶失活; 细胞物质降解	[21-25]
表面吸附作用 Surface absorption	加速生物体对 ENPs 的吸收; 未知机理	[26-31]
溶解特性、赋存形态和表面特征 Solubility, chemical speciation and surface characteristics	细胞膜穿透; 神经毒性作用; 脑及外围神经损伤	[32-38, 42]
溶剂效应及与其他环境污染物的协同作用 synergistic effects of ENPs with other environmental contaminants	改变 ENPs 的理化特性; 提高 ENPs 毒性; 破坏细胞膜; 促进氧化应激反应	[43-47]

## 2.1 鱼类通常被认为是首选研究对象

鱼类对于 ENPs 毒性的敏感性及普遍性,使其适宜作为研究 ENPs 生态毒理学的模型生物。学界普遍认为鱼类是研究 ENPs 对水生生物的潜在急性毒性的首选目标,这样可以避免选择不适当的生物而造成科研经费的浪费<sup>[5]</sup>。目前已有许多关于 ENPs 在鱼类不同生命阶段(如胚胎期、幼苗期和成年期)的急性毒性作用的论文发表,其中关于斑马鱼、虹鳟鱼、鲤鱼等的研究较多。

通常认为碳基 ENPs 对鱼类的毒性要弱于金属 ENPs,这表现在亚致死率,在肝脏和鳃中的氧化应激,以及肝脏病理学影响等<sup>[53]</sup>。组织学和生化分析表明,鳃是多种 ENPs 的主要靶器官<sup>[54]</sup>。ENPs 可以积聚在鳃和肝脏组织中,从而影响鱼类应对低氧水平的能力,并诱导氧化应激的发生<sup>[55-56]</sup>。2011 年首篇关于 ENPs 干扰水生生物(斑马鱼)生物节律基因的文章发表,指出 ENPs 在生理系统水平上对斑马鱼的生理和行为具有潜在的影响<sup>[57]</sup>。Katuli 等研究表明纳米 Ag 会对成年斑马鱼红细胞中乙酰胆碱酯酶活性产生抑制作用,并影响其电解质水平,导致应激反应产生,造成斑马鱼神经调节紊乱<sup>[58]</sup>。

高等生物通常由单个受精卵发育而来,并且不同生物胚胎的早起发育特征非常相像,因此在以鱼类为研究对象时,对其早期胚胎的研究尤为重要。Zhu 等研究了不同纳米氧化物对斑马鱼早期胚胎的毒性,结果显示纳米 ZnO 对斑马鱼胚胎的毒性最强(暴露 96 小时实验),抑制胚胎的发育,并且表现出明显的剂量效应关系;而纳米 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>与纳米 TiO<sub>2</sub>对斑马鱼胚胎的毒性作用不明显<sup>[15]</sup>。另一项研究显示,纳米 C<sub>60</sub>和 C<sub>70</sub>对斑马鱼胚胎的毒性作用接近,200μg/L 的剂量就会导致斑马鱼胚胎的畸变,降低其存活率;然而,大剂量的 C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>对斑马鱼胚胎无明显的毒性作用,这可能归咎于表面基团的修饰作用,降低了其毒性<sup>[59]</sup>。该研究还显示,ENPs 可以通过干扰细胞间的信息传递来影响胚胎的早期发育<sup>[59]</sup>。

近年来有学者指出,研究 ENPs 对正在发育中的鱼类“行为端点”的影响比研究孵化率和存活率等其他方面更有效<sup>[47]</sup>。鱼类异常的运动行为可能对自身产生负面影响,其严重程度取决于异常运动的水平。这些负面影响包括迁徙、躲避敌害、捕食和生殖行为等,会降低鱼类对环境的适应性<sup>[60-61]</sup>。因此,对鱼类“行为端点”的研究更能直观的反映 ENPs 对其造成的生物毒性作用。

确认理想的模式生物不仅为将来的实验节省时间,而且还能节约大量的人力及资金。在水生态系统中,鱼类群落是最重要的大型生物群落。然而当前研究的鱼类只集中于少数几个物种,例如斑马鱼、鲤鱼、虹鳟鱼

等,因此缺乏足够的数据使来确定它们是否适合作为模式生物。

## 2.2 水生无脊椎动物不可忽视

作为纳米毒理学水生模式生物,无脊椎动物是比较理想的选择之一。因为在设定的参数下,它们的某些生物特性比较容易维持(例如年龄和尺寸),使它们可以成为实用和容易处理的模式生物<sup>[52]</sup>。此外,Baun 等指出无脊椎动物代表了约 95%的动物物种,其可以通过食物链传递污染物,在生态环境中扮演着至关重要的角色<sup>[7]</sup>。Baun 等还指出在今后的 ENPs 生态毒理学研究中,针对水生无脊椎动物的研究,特别是针对其长期暴露下的生物积累和慢性毒性研究意义重大,这可以与主要针对鱼类的 ENPs 急性毒性研究形成互补<sup>[7]</sup>。

有研究表明 ENPs 进入细胞的主要途径为胞吞作用,进而导致各组织器官的一系列细胞损伤,尤其在一些吞噬作用能力强的组织细胞(如悬浮摄食无脊椎动物细胞)中该作用更明显<sup>[7, 62]</sup>。双壳贝类是研究 ENPs 生态毒理学的理想模式生物,因为它们从淡水到海水等各种各样的水环境中广泛存在<sup>[63]</sup>。贻贝作为滤食性底栖生物,能大量积累污染物,并且代谢缓慢,因此便于获得其体内污染物的长期变化数据。其中海洋贻贝的血细胞被证明为许多环境污染物的敏感目标。不同的暴露条件或不同的化合物会对海洋贻贝造成不同的免疫毒性或炎症效果<sup>[64-67]</sup>。此外,大型溞的生长周期短、易培养,本身对外界环境中的污染物很敏感,是水生生态系中的一种重要的代表性生物,多国际组织和国家都推荐用大型溞作为生态毒理试验的试验生物<sup>[68-69]</sup>。可见,水生无脊椎动物在 ENPs 生态毒理学研究中具有广泛的前景。

## 2.3 浮游植物对污染物具有高敏感性

浮游植物作为水环境中重要的生产者,对水生态系统的功能及完整性具有至关重要的作用。ENPs 对浮游植物的毒性作用,以及浮游植物对 ENPs 的吸收和生物积累直接或间接的影响着整个水生态系统<sup>[19]</sup>。

藻类植物是水环境中对 ENPs 的毒性最敏感的生物<sup>[53]</sup>。Aruoja 等认为纳米 ZnO 的毒性在纳米金属或纳米金属氧化物中是最强的,且纳米 ZnO 在淡水环境中降低月牙藻生长率的半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)仅为 42 μg/L<sup>[70]</sup>;而 Wong 等发现纳米 ZnO 在海水环境中对硅藻的 EC<sub>50</sub>为 4.6 mg/L<sup>[71]</sup>。浓度为 90 mg/L 的纳米 C<sub>60</sub>对月牙藻的生长率有 30%的限制作用;当月牙藻与纳米 C<sub>60</sub>接触后,前者对其他污染物的富集作用会加速<sup>[61]</sup>。Gong 等研究发现纳米 NiO 对小球藻具有很强的生物毒性,对其在 72 小时内的 EC<sub>50</sub>为 32.28 mg/L。在纳米 NiO 的作用下,小球藻细胞表现出质壁分离、细胞膜破损和类囊体功能障碍<sup>[72]</sup>。鉴于浮游植物作为水生态系统中食物链的第一环节,其在水环境中具有普遍存在性及对污染物毒性的敏感性,因此在浮游植物中筛选出有价值的模式生物可能是未来的一个重要发展方向。

纳米颗粒物生态毒理学研究中的理想模式生物及其代表物种见表 2。

表 2 水生模式生物的优势及其代表物种(鱼类、无脊椎动物、浮游植物)

Table 2 Advantages and representative species of aquatic optimal bio-models (fish, invertebrates and phytoplankton)

模式生物 Model organisms	优势 Advantages	代表物种 Representative species	参考文献 References
鱼类 Fish	水环境中主要的脊椎动物;行为端点的高敏感性;水环境中最重要的大型生物群落;生物毒性实验中明显的量效关系;适于进行急性毒性实验	斑马鱼(Zebra fish)、日本青鳉(Japanese medaka)、虹鳟鱼(Rainbow trout)、黑头呆鱼(Fathead minnow)、鲤鱼(Carp)、三刺鱼(Three-spined stickleback)	[5, 14-15, 17, 19, 30, 45, 47-48, 53-61]
无脊椎动物 Invertebrates	适于进行慢性毒性与生物积累实验;在各种水环境中普遍存在;对环境污染物极为敏感;对有害物质富集放大效应显著。	双壳贝类(Bivalve mollusc)、大型溞(Daphnia magna)、丰年虫(Fairy shrimp)	[7, 40-41, 46, 52, 62-69]
浮游植物 Phytoplankton	水环境中主要的初级生产力;对 ENPs 的高效吸收;是 ENPs 沿食物链传递放大的第一环;对环境污染物极为敏感。	海链藻(Thalassiosira)、月牙藻(Selenastrum capricornutum)、小球藻(Chlorella)、硅藻(Bacillariophyta)	[9, 19, 31, 42, 53, 61, 70-72]

## 3 结语

纳米技术的高速发展是一把双刃剑,其在推动科技进步的同时也带来了巨大的生态环境威胁。关于决定

ENPs 生态毒性的主要因素是纳米材料的尺寸效应、组成成分,还是表面基团,目前仍无准确完整的认识。目前比较认可的生态毒性机理包括诱导氧化应激反应、光催化活性、表面吸附作用、溶剂效应及 ENPs 与其他环境污染物的协同作用等,其主要从氧化应激、细胞器损伤、基因表达调控等方面对生物体产生伤害。虽然氧化应激机制已成为纳米毒性的主要可能机制之一,但是这一机制并不能解释所有的毒性现象,氧化应激和毒性效应之间是否具有直接关系,亦有待深入研究。一些环境因子如有机质、离子、水温、光照、pH 等均可影响其在水体中的分散和迁移,并影响其毒性大小。

评估 ENPs 生态风险的最大挑战之一是建立完善的、用于推断纳米材料的毒性机理的模式生物。鱼类是水环境中最大的生物群,其对 ENPs 毒性的敏感性具有普遍性;无脊椎动物代表了绝大多数动物物种,其可以通过食物链传递污染物,在设定参数下,它们的某些生物特性比较容易维持;浮游植物作为水生态系统中食物链的第一环节,也具有普遍存在性及对污染物毒性的敏感性。因此,理想模式生物从鱼类、无脊椎动物及浮游植物中筛选是比较有价值的。

目前在纳米生态毒理学研究中一些关键方面的信息还比较匮乏,这在一定程度上阻碍了对 ENPs 生态毒性和生物毒性的理解与评估。下面列出几点未来可能的研究方向,仅供相关学者们参考:(1)针对特定 ENPs 进行生态毒理学全面深入的研究;(2)理想模式生物的筛选;(3)标准化实验方法,例如统一 ENPs 的溶剂及溶解方法,以及其他前处理方法;(4)深入探索基因组学和蛋白质组学技术在纳米生态毒理学方面的应用,完善在线共享数据库;(5)开展针对特定小型生态系统的纳米生态毒理学研究。相信应对上述挑战将会对人类健康与环境和谐发展大有裨益。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity. *Science*, 2003, 300(5617): 243-243.
- [ 2 ] Brumfiel G. Nanotechnology: a little knowledge. *Nature*, 2003, 424(6946): 246-248.
- [ 3 ] Blaise C. Microbiotesting: an expanding field in aquatic toxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1998, 40(1/2): 115-119.
- [ 4 ] Spurgeon D J, Morgan A J, Kille P. Current research in soil invertebrate ecotoxicogenomics. *Advances in Experimental Biology*, 2008, 2: 133-163, 326-326.
- [ 5 ] Kahru A, Dubourgier H C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 2010, 269(2-3): 105-119.
- [ 6 ] Manier N, Bado-Nilles A, Delalain P, Aguerre-Chariol O, Pandard P. Ecotoxicity of non-aged and aged CeO<sub>2</sub> nanomaterials towards freshwater microalgae. *Environmental Pollution*, 2013, 180: 63-70.
- [ 7 ] Baun A, Hartmann N B, Grieger K, Kisk K O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*, 2008, 17(5): 387-395.
- [ 8 ] Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006, 311(5761): 622-627.
- [ 9 ] Li F M, Liang Z, Zheng X, Zhao W, Wu M, Wang Z Y. Toxicity of nano-TiO<sub>2</sub> on algae and the site of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicology*, 2015, 158: 1-13.
- [ 10 ] Canesi L, Ciacci C, Vallotto D, Gallo G, Marcominic A, Pojanac G. *In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C<sub>60</sub> fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) on *Mytilus hemocytes*. *Aquatic Toxicology*, 2010, 96(2): 151-158.
- [ 11 ] Fabrega J, Luoma S N, Tyler C R, Galloway T S, Lead J R. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 2011, 37(2): 517-531.
- [ 12 ] Tedesco S, Doyle H, Blasco J, Redmond G, Sheehan D. Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 2010, 151(2): 167-174.
- [ 13 ] Shvedova A A, Kisin E R, Mercer R, Murray A R, Johnson V J, Potapovich A I, Tyurina Y Y, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs A F, Antonini J, Evans D E, Ku B K, Ramsey D, Maynard A, Kagan V E, Castranova V, Baron P. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2005, 289(5): 698-708.
- [ 14 ] Federici G, Shaw B J, Handy R D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 2007, 84(4): 415-430.
- [ 15 ] Zhu X S, Zhu L, Duan Z H, Qi R Q, Li Y, Lang Y P. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish



- (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 2008, 43(3): 278-284.
- [16] Hu Y L, Gao J Q. Potential neurotoxicity of nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 394(1/2): 115-121.
- [17] Hao L H, Wang Z Y, Xing B S. Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(10): 1459-1466.
- [18] Ramsden C S, Smith T J, Shaw B J, Handy R D. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology*, 2009, 18(7): 939-951.
- [19] Ribeiro F, Gallego-Urrea J A, Jurkschat, K, Crossley A, Hassellöv M, Taylor C, Soares A, Loureiro S. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 2014, 466-467: 232-241.
- [20] Wang J M, Zhuang H, Hinton Jr. A, Bowker B, Zhang J H. Photocatalytic disinfection of spoilage bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Macrococcus caseolyticus* by nano-TiO<sub>2</sub>. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 59(2): 1009-1017.
- [21] Lu Z X, Zhou L, Zhang Z L, Shi W L, Xie Z X, Xie H Y, Pang D W, Shen P. Cell damage induced by photocatalysis of TiO<sub>2</sub> thin films. *Langmuir*, 2003, 19(21): 8765-8768.
- [22] Ma H B. Use of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, to evaluate bioavailability and toxicity of transition metals and manufactured zinc oxide nanoparticles[D]. Georgia: The University of Georgia, 2009.
- [23] Kalčíková G, Englert D, Rosenfeldt R R, Seitz F, Schulz R, Bundschuh M. Combined effect of UV-irradiation and TiO<sub>2</sub>-nanoparticles on the predator-prey interaction of gammarids and mayfly nymphs. *Environmental Pollution*, 2014, 186: 136-140.
- [24] Mao K, Li Y, Zhang H H, Zhang W L, Yan W M. Photocatalytic degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and inactivation of *Escherichia coli* using Ag-modified TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *CLEAN-Soil, Air, Water*, 2013, 41(5): 455-462.
- [25] Roh J Y, Park Y K, Park K, Choi J. Ecotoxicological investigation of CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2010, 29(2): 167-172.
- [26] McWhirter M J, McQuillan A J, Bremer P J. Influence of ionic strength and pH on the first 60 min of *Pseudomonas aeruginosa* attachment to ZnSe and to TiO<sub>2</sub> monitored by ATR-IR spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 26(4): 365-372.
- [27] Parikh S J, Chorover J. ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. *Langmuir*, 2006, 22(20): 8492-8500.
- [28] Zhang Y, Chen Y S, Westerhoff P, Hristovski K, Crittenden J C. Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water. *Water Research*, 2007, 42(8-9): 2204-2212.
- [29] Çelebi O, Üzüm C, Shahwan T, Erten H N. A radiotracer study of the adsorption behavior of aqueous Ba<sup>2+</sup> ions on nanoparticles of zero-valent iron. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 148(3): 761-767.
- [30] Zhang X Z, Sun H W, Zhang Z Y, Niu Q, Chen Y S, Crittenden J C. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere*, 2007, 67(1): 160-166.
- [31] Chen L Z, Zhou L N, Liu Y D, Deng S Q, Wu H, Wang G H. Toxicological effects of nanometer titanium dioxide(nano-TiO<sub>2</sub>) on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 84:155-162.
- [32] von Moos N, Maillard L, Slaveykova V I. Dynamics of sub-lethal effects of nano-CuO on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* during short-term exposure. *Aquatic Toxicology*, 2015, 161: 267-275.
- [33] Kasemets K, Suppi S, Künnis-Beres K, Kahru A. Toxicity of CuO nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 wild-type and its nine isogenic single-gene deletion mutants. *Chemical Research in Toxicology*, 2013, 26(3): 356-367.
- [34] Li L Z, Zhou D M, Peijnenburg W J G M, Gestel C A M, Jin S Y, Wang Y J, Wang P. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environment International*, 2011, 37(6): 1098-1104.
- [35] Ivask A, Juganson K, Bondarenko O, Mortimer M, Aruoja V, Kasemets K, Blinova I, Heinlaan M, Slaveykova V, Kahru A. Mechanisms of toxicaction of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells *in vitro*: a comparative review. *Nanotoxicology*, 2014, 8(S1): 57-71.
- [36] Bondarenko O, Ivask A, Käkinen A, Kahru A. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environmental Pollution*, 2012, 169C: 81-89.
- [37] Manzo S, Rocco A, Carotenuto R, De Luca Picione F, Miglietta M L, Rametta G, Di Francia G. Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 18(5): 756-763.
- [38] Nowack B, Bucheli T D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 2007, 150(1): 5-22.
- [39] Panessa-Warren B J, Warren J B, Maye M M, Van der Lelie D, Gang O, Wong S S, Ghebrehwet B, Tortora G T, Misewich J A.. Human epithelial cell processing of carbon and gold nanoparticles. *International Journal of Nanotechnology*, 2008, 5(1): 55-91.

- [40] Roberts A P, Mount A S, Seda B, Souther J, Qiao R, Lin S J, Ke P C, Rao A M, Klaine S J. In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. Environmental Science & Technology, 2007, 41(8): 3025-3029.
- [41] Templeton R C, Ferguson P L, Washburn K M, Scrivens W A, Thomas Chandler G. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes(SWNTs) on an estuarine *meiobenthic copepod*. Environmental Science & Technology, 2006, 40(23): 7387-7393.
- [42] van Hoecke K, De Schampelaere K A C, Ramirez-Garcia S, van der Meeren P, Smagghe G, Janssen C R. Influence of alumina coating on characteristics and effects of SiO<sub>2</sub> nanoparticles in algal growth inhibition assays at various pH and organic matter contents. Environment International, 2011, 37(6): 1118-1125.
- [43] Barrena R, Casals E, Colón J, Font X, Sánchez A, Puentes V. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. Chemosphere, 2009, 75(7): 850-857.
- [44] Baun A, Sørensen S N, Rasmussen R F, Hartmann N B, Koch C B. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C<sub>60</sub>. Aquatic Toxicology, 2008, 86(3): 379-387.
- [45] Henry T B, Menn F M, Fleming T J, Wilgus J, Compton R N, Saylor G S. Attributing effects of aqueous C<sub>60</sub> nano-aggregates to Tetrahydrofuran decomposition products in Larval Zebrafish by assessment of gene expression. Environmental Health Perspectives, 2007, 115(7): 1059-1065.
- [46] Tan C, Wang W X. Modification of metal bioaccumulation and toxicity in *Daphnia magna* by titanium dioxide nanoparticles. Environmental Pollution, 2014, 186: 36-42.
- [47] Chen T H, Lin C Y, Tseng M C. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish(*Danio rerio*). Marine Pollution Bulletin, 2011, 63(5-12): 303-308.
- [48] Lovern S B, Klaper R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene(C<sub>60</sub>) nanoparticles. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25(4): 1132-1137.
- [49] Auffan M, Achouak W, Rose J, Roncato M A, Chanéac C, Waite D T, Masion A, Woicik J C, Wiesner M R, Bottero J Y. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. Environmental Science & Technology, 2008, 42(17): 6730-6735.
- [50] Lee C, Kim J Y, Lee W I, Nelson K L, Yoon J, Sedlak D L. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. Environmental Science & Technology, 2008, 42(13): 4927-4933.
- [51] Diao M H, Yao M S. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. Water Research, 2009, 43(20): 5243-5251.
- [52] Binelli A, Della Torre C, Magni S, Parolini M. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. Environmental Pollution, 2015, 196: 386-403.
- [53] Aschberger K, Micheletti C, Sokull-Klüttgen B, Christensen F M. Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health-Lessons learned from four case studies. Environment International, 2011, 37(6): 1143-1156.
- [54] Griffith R J, Weil R, Hyndman K A, Denslow N D, Powers K, Taylor D, Barber D S. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish(*Danio rerio*). Environmental Science & Technology, 2007, 41(23): 8178-8186.
- [55] Bilberg K, Malte H, Wang T, Baatrup E. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). Aquatic Toxicology, 2010, 96(2): 159-165.
- [56] Scown T, Santos E, Johnston B, Gaiser B, Baalousha M, Mitov S, Jamie R, Stone V, Fernandes T F, Jepson M, van Aerle R, Tyler C R. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. Toxicological Sciences, 2010, 115(2): 521-534.
- [57] Jovanović B, Ji T M, Palić D. Gene expression of zebrafish embryos exposed to titanium dioxide nanoparticles and hydroxylated fullerenes. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(6): 1518-1525.
- [58] Katuli K K, Massarsky A, Hadadi A, Pourmehran Z. Silver nanoparticles inhibit the gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish(*Danio rerio*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 106: 173-180.
- [59] Usenko C Y, Harper S L, Tanguay R L. Fullerene C<sub>60</sub> exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. Toxicology and Applied Pharmacology, 2008, 229(1): 44-55.
- [60] Clemente Z, Castro V L, Feitosa L O, Lima R, Jonsson C M, Maia A H N, Fraceto L F. Fish exposure to nano-TiO<sub>2</sub> under different experimental conditions: Methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. Science of the Total Environment, 2013, 463-464: 647-656.
- [61] Boyle D, Al-Bairuty G A, Ramsden C S, Sloman K A, Henry T B, Handy R D. Subtle alterations in swimming speed distributions of rainbow trout exposed to titanium dioxide nanoparticles are associated with gill rather than brain injury. Aquatic Toxicology, 2013, 126: 116-127.
- [62] Moore M N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environment International, 2006, 32(8): 967-976.
- [63] Vale G, Franco C, Diniz M S, dos Santos M M C, Domingos R F. Bioavailability of cadmium and biochemical responses on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*-the role of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 109: 161-168.

- [64] Wang Y J, Hu M H, Li Q Z, Li J L, Lin D H, Lu W Q. Immune toxicity of TiO<sub>2</sub> under hypoxia in the green-lipped mussel *Perna viridis* based on flow cytometric analysis of hemocyte parameters. *Science of the Total Environment*, 2014, 470-471: 791-799.
- [65] Gomes T, Pereira G G, Cardoso C, Bebianno M J. Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag. *Aquatic Toxicology*, 2013, 136-137: 79-90.
- [66] Canesi L, Lorusso L C, Ciacci C, Betti M, Gallo G. Effects of the brominated flame retardant Tetrabromobisphenol-A (TBBPA) on cell signaling and function of *Mytilus hemocytes*: involvement of MAP kinases and protein kinase C. *Aquatic Toxicology*, 2005, 75(3): 277-287.
- [67] Gomes T, Chora S, Pereira C G, Cardoso C, Bebianno M J. Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu<sup>2+</sup>: An exploratory biomarker discovery. *Aquatic Toxicology*, 2014, 155: 327-336.
- [68] Environment Directorate Organization for Economic Co-operation and Development. Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.23: Draft Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. 2000.
- [69] OECD. Guideline for the Testing of Chemicals. Guideline 202: Daphnia sp. Acute Immobilization Test. 2004.
- [70] Aruoja V, Dubourguier H C, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(4): 1461-1468.
- [71] Wong S W Y, Leung P T Y, Djurišić A B, Leung K M Y. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(2): 609-618.
- [72] Gong N, Shao K S, Feng W, Lin Z Z, Liang C H, Sun Y Q. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*, 2011, 83(4): 510-516.