

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200103002

李猛, 黄荣, 席贻龙, 等. 纳米 TiO₂ 暴露对萼花臂尾轮虫种群动态的影响[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 234-242

Li M, Huang R, Xi Y L, et al. Effects of nano-TiO₂ exposure on population dynamics of *Brachionus calyciflorus* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 234-242 (in Chinese)

纳米 TiO₂ 暴露对萼花臂尾轮虫种群动态的影响

李猛¹, 黄荣¹, 席贻龙^{1,2}, 项贤领^{1,2,*}

1. 安徽师范大学生态与环境学院, 芜湖 241000

2. 皖江流域退化生态系统的恢复与重建省部共建协同创新中心, 芜湖 241000

收稿日期: 2020-01-03

录用日期: 2020-03-05

摘要: 因具有特殊的结构和性能, 纳米材料的环境生物安全和潜在风险已引起人们的广泛关注, 而由纳米 TiO₂ 所引起的轮虫种群动态变化尚鲜有报道。以萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)为受试生物, 通过急性和慢性毒性实验, 探究纳米 TiO₂ 暴露对萼花臂尾轮虫种群动态的影响。结果表明, 萼花臂尾轮虫 48 h 半致死浓度(48 h-LC₅₀)值为 30.20 mg·L⁻¹; 当纳米 TiO₂ 浓度 ≥ 1 mg·L⁻¹ 时, 萼花臂尾轮虫的最大种群密度、平均种群密度、平均种群增长率、平均非混交卵数量以及总雌体生产量受到显著抑制, 且轮虫达到最大种群密度的时间更短, 说明纳米 TiO₂ 的介入降低了环境容纳量, 抑制了萼花臂尾轮虫种群繁殖力。此外, 在 2.0 mg·L⁻¹ 和 2.5 mg·L⁻¹ 纳米 TiO₂ 处理组中休眠卵产量较对照组显著提高, 当浓度 ≥ 1.5 mg·L⁻¹ 时, 种群平均混交率也显著提高, 说明纳米 TiO₂ 暴露对萼花臂尾轮虫的有性生殖具有显著影响, 这可归结于纳米 TiO₂ 显著提高了单位体积内产休眠卵的混交雌体生产量。

关键词: 纳米 TiO₂; 萼花臂尾轮虫; 急性毒性; 慢性毒性; 种群动态

文章编号: 1673-5897(2020)6-234-09 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Effects of nano-TiO₂ Exposure on Population Dynamics of *Brachionus calyciflorus*

Li Meng¹, Huang Rong¹, Xi Yilong^{1,2}, Xiang Xianling^{1,2,*}

1. School of Ecology and Environment, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

2. Center of Cooperative Innovation for Recovery and Reconstruction of Degraded Ecosystem in Wanjiang City Belt, Wuhu 241000, China

Received 3 January 2020

accepted 5 March 2020

Abstract: Increasing attention has been paid to the challenging issue of environmental biosafety and potential risks of nanomaterials due to its special structure and property. Few of these efforts, however, have focused on the effects of nano-TiO₂ on the population dynamic of rotifers. In this study, *Brachionus calyciflorus* was taken as the subject to conduct the acute and chronic toxicity experiment so as to explore the population dynamic of *B. calyciflorus* influenced by nano-TiO₂ exposure. The results showed that the 48 h half lethal concentration (48 h-LC₅₀) value of nano-TiO₂ was 30.20 mg·L⁻¹. In the chronic assay, when the concentration of nano-TiO₂ was greater than or equal

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31872208); 生物环境与生态安全安徽省高校省级重点实验室专项

第一作者: 李猛(1995—), 男, 硕士, 研究方向为纳米材料的生态毒理效应, E-mail: 1259305578@qq.com

*** 通讯作者 (Corresponding author),** E-mail: xiangxianling@163.com

to $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the maximum population density, mean population density, mean population growth rate, mean number of amictic eggs and the total female production of *B. calyciflorus* were inhibited significantly. And it took a shorter time to reach the maximum population density. It is indicated that the intervention of nano-TiO₂ could reduce the environmental capacity and inhibit the fecundity of *B. calyciflorus*. In addition, the production of resting eggs in nano-TiO₂ treatments with concentration of $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were significantly higher than that in the control group, and as the concentration of nano-TiO₂ was higher than $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the mean mictic rate has also increased significantly. These results highlighted that nano-TiO₂ had an obvious impact on the sexual reproduction of *B. calyciflorus*, which could be attributed to the fact that nano-TiO₂ increased the production of mictic female with resting eggs per unit volume significantly.

Keywords: nano-TiO₂; *Brachionus calyciflorus*; acute toxicity; chronic toxicity; population dynamics

纳米材料是一种由一个或多个三维尺寸在 $1 \sim 100 \text{ nm}$ 之间的粉状或团块状天然或人工材料,并且这一基本颗粒的总数量在整个材料的所有颗粒总数中占 50% 以上^[1-5]。研究表明,当粒子处于纳米级时,材料的理化性质会发生变化。纳米粒子具有更高的生物活性,与生物体的相互作用更加有效^[6]。纳米 TiO₂ 因其特殊的结构和性能而愈加引起人们的广泛关注。纳米 TiO₂ 具有独特的光学性质,以及极高的化学稳定性、热稳定性、超亲水性和非迁移性等,因此,被广泛应用于化妆品、抗紫外材料、光催化剂功能纤维、塑料、涂料和油漆等行业^[7-16]。

在工业生产、使用和运输过程中纳米材料不可避免地进入生态环境,可对水生态系统的结构和功能产生不同程度的影响,对生物安全和人体健康存在潜在危害。大量研究表明,纳米 TiO₂ 对水生态系统中的藻类、浮游动物和鱼类等均具有毒害作用。纳米 TiO₂ 暴露可显著降低种群的增长率和藻细胞的代谢活性,进而影响淡水环境重要群落和生态系统特性^[17-18]。而对于鱼类,纳米 TiO₂ 则可与细胞外带有电荷的羟基自由基作用,直接引起鱼类鳃组织细胞膜的氧化损伤^[19]。对于浮游动物的研究主要以大型溞(*Daphnia magna*)为受试对象。研究表明,即使在低浓度($0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)下,大型溞接触纳米 TiO₂ 溶液 24 h,其心率也会受到明显抑制^[20]。Zhu 等^[21]对大型溞进行急性和慢性毒性学实验,得出 48 h 无可见效应浓度(NOEC)为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,半数效应浓度(EC₅₀)和半数致死浓度(LC₅₀)均 $>100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;当时时间延长至 72 h 时,NOEC $<0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,EC₅₀ 为 $1.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,LC₅₀ 为 $2.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;21 d 暴露实验结果表明,即使在低浓度($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,纳米 TiO₂ 也显著降低了大型溞后代的数量。Farner 等^[22]探究了纳米 TiO₂ 稳定性和光反应性对大型溞的影响,研究结果

表明,可见光下暴露于纳米 TiO₂ 悬浮液的大型溞死亡率无显著差异,这可能是由于纳米 TiO₂ 的沉降。UV 光暴露显著增强了纳米 TiO₂ 毒性,LC₅₀ 明显降低,天然有机物的存在可通过抑制羟基自由基($\cdot\text{OH}$)活性进而降低纳米 TiO₂ 的毒性。

有关纳米 TiO₂ 对浮游动物家族的重要成员——轮虫的研究尚鲜有报道。Nogueira 等^[23]研究发现,将褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)暴露于 $8.2 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳米 TiO₂ 悬浮液时,对其存活率无明显影响。Clément 等^[24]评估了不同直径纳米 TiO₂ 对褶皱臂尾轮虫 48 h 急性毒性,结果表明,直径 15、25 和 32 nm 的纳米 TiO₂ 对轮虫 48 h-LC₅₀ 分别为 5.37、10.43 和 $267.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上研究中,受试生物为咸水物种,且实验内容仅限于急性毒性学实验,而由于纳米 TiO₂ 所引起的轮虫种群数量动态的变化尚未可知。

Gottschalk 等^[25]的研究表明,地表水中纳米 TiO₂ 浓度约为 $21 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,而工业废水中纳米 TiO₂ 浓度约为 $4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但部分改性的纳米材料也作为特殊材料被有意释放至环境以吸附去除水中部分污染物,因而实际浓度要比地表水中含量高^[26]。基于上述分析,本实验拟以蓴花臂尾轮虫(*B. calyciflorus*)作为受试对象,采用不同浓度的纳米 TiO₂ 对其进行急性和慢性毒性实验。本研究对于进一步深入理解纳米 TiO₂ 对浮游动物的毒性效应很有意义,并为探究轮虫在水环境风险评价中的应用可行性积累基础数据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 蓴花臂尾轮虫的采集与培养

实验所用蓴花臂尾轮虫采自安徽省芜湖市镜湖($31^{\circ}19'53''\text{N}$, $118^{\circ}22'14''\text{E}$)。将采集的样本在实验室内于(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、自然光照条件下单克隆培养,轮

虫培养液采用 EPA 培养基^[27],所用饵料为 OECD TG 201^[28]培养基培养的处于指数增长期的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*),投喂密度为 2.0×10^6 cells·mL⁻¹。实验前,对蓴花臂尾轮虫进行2周以上的预培养,期间每天更换轮虫培养液,并投喂食物,保持轮虫种群处于指数增长状态。

1.2 纳米 TiO₂ 悬浮液的制备

实验用纳米 TiO₂(99.8% metals basis, 5 ~ 10 nm, 锐钛, 亲水型)购于上海麦克林生化科技有限公司。称取 100 mg 纳米 TiO₂ 置于 100 mL EPA 培养基中,超声处理 30 min(400 W, 50 kHz, 23 °C, 超声时间 9 s, 超声间隙 9 s),以制备纳米 TiO₂ 悬浮液母液^[29-32],置于 4 °C 冰箱中备用。实验时用 EPA 将其配制成所需浓度的测试液。将上述纳米 TiO₂ 寄至光谱研发技术中心(青岛)有限公司完成纳米 TiO₂ 基本理化性质测定。测定流程如下:取点样用溶剂超声分散,铜网粘取点样,干燥后使用透射电子显微镜(JEM—1200EX, 日本 JEOL 公司)对纳米材料进行表征,然后使用 Nano Measure 软件测量纳米粒径,由 X 射线衍射仪(ultima IV, 日本理学株式会社)测定纳米 TiO₂ 表面的 Zeta 电位。

1.3 急性毒性实验

体式显微镜下挑取携带非混交卵的蓴花臂尾轮虫母体置于烧杯中孵化,4 h 后挑取幼体进行实验。分别设置纳米 TiO₂ 浓度为 5、10、20、40、80 和 160 mg·L⁻¹,每组设置 3 个重复,并设置对照组(0 mg·L⁻¹)。实验在 12 mL 培养管中进行,每支培养管中放入上述轮虫幼体 10 只,并加入 10 mL 含有 2.0×10^6 cells·mL⁻¹ 的斜生栅藻和含有相应浓度纳米 TiO₂ 的 EPA 培养基。将培养管置于旋转混匀仪(YC-80, 杭州米欧仪器有限公司),转速 10 r·min⁻¹。然后将旋转混匀仪置于(23±1) °C 恒温培养箱中培养,每 24 h 记录各处理组蓴花臂尾轮虫死亡数并更换培养基和投喂上述藻密度的食物,48 h 后结束实验,采用概率单位法计算纳米 TiO₂ 对蓴花臂尾轮虫的 48 h-LC₅₀ 值。

1.4 慢性毒性实验

依据 48 h-LC₅₀ 结果设置慢性毒性实验中纳米 TiO₂ 浓度,分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mg·L⁻¹,另设对照组(0 mg·L⁻¹),每组 3 个重复。实验时,体式显微镜下挑取携带非混交卵的蓴花臂尾轮虫母体置于烧杯中孵化,4 h 后挑取幼体进行实验。取 10 只轮虫幼体置于 12 mL 玻璃杯中,加入 10 mL

含有相应浓度纳米 TiO₂ 的 EPA 培养基,并投喂食物斜生栅藻,食物密度为 2.0×10^6 cells·mL⁻¹。实验开始后,每 24 h 观察记录各玻璃杯中蓴花臂尾轮虫各类雌体和休眠卵数量,计数后的轮虫重新放回玻璃杯,更换测试液并投喂食物。待所有实验组轮虫种群增长至最大种群密度并开始下降时,结束实验。根据 Dumont 和 Sarma^[33]的方法,在轮虫种群处于指数增长期时,选取 4 ~ 6 个数据计算种群增长率(r), $r = (\ln N_t - \ln N_0)/t$, N_0 和 N_t 分别为实验开始时和进行第 t 天时轮虫的种群密度, t 为实验进行的时间(d)^[34]。其余相关参数定义如下。

最大种群密度(maximum population density)为实验过程中轮虫种群密度的最大值。平均混交率(mictic rate)为种群中混交雌体数与总雌体数的比值。其中,混交雌体指种群中通过减数分裂的方式产生混交卵的轮虫,由于非混交卵未与雄体产生的精子发生受精作用,因而卵体积较小,数量多为 4 个以上;非混交雌体指种群中以有丝分裂方式产生非混交卵的轮虫,其卵大且卵壳较薄,数量多为 4 个以下。

休眠卵产量(production of resting egg)为种群中休眠卵的总数量。

总雌体生产量(production of total female)为单位时间和单位体积内,蓴花臂尾轮虫种群产生总雌体的总量,参照 Snell 和 Hoff^[35]的方法,通过计算各自的总雌体增长曲线与 X 轴间的面积求得。混交雌体生产量(production of mictic)为单位时间和单位体积内,蓴花臂尾轮虫种群产生混交雌体的总量,参照 Snell 和 Hoff^[35]的方法,通过计算各自的混交雌体增长曲线与 X 轴间的面积求得。

1.5 数据分析

数据采用 SPSS 25.0 进行统计分析,Origin 2018 作图。急性毒性实验中,采用概率单位法求得纳米 TiO₂ 对蓴花臂尾轮虫的 48 h-LC₅₀。针对慢性毒性实验,对数据进行正态分布检验后,对符合正态分布的数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),从而检验纳米 TiO₂ 浓度对种群增长各参数影响的显著性,并对各参数在不同处理组间进行多重比较(SNK-q 检验),确定其中具有显著性差异的实验组;对纳米 TiO₂ 浓度与种群增长各参数间的关系进行回归分析。

2 结果与分析(Results and analysis)

2.1 纳米 TiO₂ 基本理化性质

纳米 TiO₂ 表征结果如图 1 所示,在透射电子显

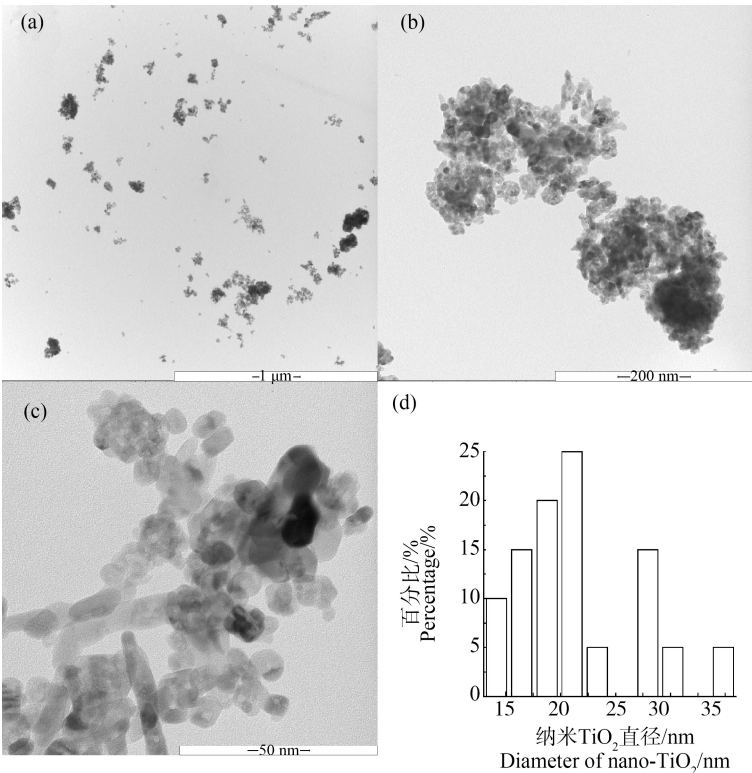


图 1 纳米 TiO₂ 的透射电子显微镜 (TEM) 图像及直径测量结果

注:(a)、(b)和(c)分别为纳米 TiO₂ 在不同倍镜下形态图;(d)为经 Nano Measure 软件测量的纳米 TiO₂ 粒径分布。

Fig. 1 Transmission Electron Microscope (TEM) image of nano-TiO₂ and diameter measurement

Note: (a), (b) and (c) are the morphology of nano-TiO₂ under different magnifications; (d) is the particle size distribution of nano-TiO₂ by Nano Measure software.

显微镜(TEM)图像中,纳米 TiO₂ 呈现椭圆形,经 Nano Measure 软件测量,其直径范围为 13 ~ 36 nm,平均直径为 21.58 nm;而聚集后的纳米 TiO₂ 直径约在 100 ~ 500 nm 之间。该结果明显大于试剂生产厂家提供的产品参数。

Zeta 电位的数值与胶态分散的稳定性相关。Zeta 绝对值越高,其体系越稳定,反之则容易发生聚集或沉淀。由 Zeta 电位分析结果可知,Zeta 电位绝对值为 28.2 mV,因此,纳米 TiO₂ 悬浮液稳定性一般,可能发生聚集或沉淀(表 1)。

2.2 纳米 TiO₂ 对萼花臂尾轮虫的急性毒性

采用概率单位法求得纳米 TiO₂ 对萼花臂尾轮虫 48 h-LC₅₀ 值为 30.20 mg·L⁻¹,其 95% 的置信限为 19.23 ~ 46.13 mg·L⁻¹。进而得到剂量-效应关系回归方程为 $y=0.6554x-0.4668$, $R^2=0.9515$ 。式中: y 表示死亡率, x 表示纳米 TiO₂ 浓度以 10 为底的对数。

2.3 慢性毒性实验

不同浓度纳米 TiO₂ 下,萼花臂尾轮虫的种群密

度变化如图 2 所示。各浓度下,萼花臂尾轮虫种群密度随着时间的推移逐渐增加,1.0 ~ 3.0 mg·L⁻¹ 实验组在第 15 天达到最大密度,而对照组和 0.5 mg·L⁻¹ 实验组分别在第 16 天和第 17 天达到种群最大密度。单因素方差分析和独立样本 SNK-q 检验结果表明,当纳米 TiO₂ 浓度为 0.5 mg·L⁻¹ 时,萼花臂尾轮虫种群最大密度与对照组无显著差异($P>0.05$);当浓度 ≥ 1 mg·L⁻¹ 时,各浓度下最大种群密度均比

表 1 纳米 TiO₂ 的 Zeta 电位分析结果

Table 1 The results of Zeta potential measurement of nano-TiO₂

参数 Parameters	平均值/mV Mean/mV	标准差/mV Standard deviation/mV
Zeta 电位 Zeta potential	28.2	7.88
电导率/(mS·cm ⁻¹) Conductivity/(mS·cm ⁻¹)	0.199	-

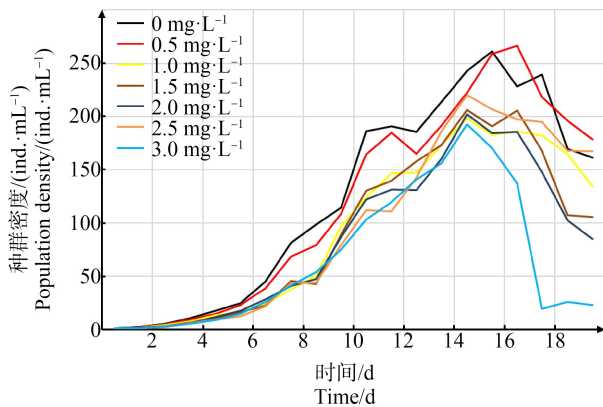


图2 不同纳米 TiO_2 浓度下萼花臂尾轮虫的种群密度

Fig. 2 Population densities of *B. calyciflorus* under different nano- TiO_2 concentrations

对照组和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组显著减小 ($P < 0.01$), 但这些处理组 ($\geq 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 之间无显著差异 (图 3(a)); 但受纳米 TiO_2 的影响, $0.5 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组的种群密度在实验后期下降速度比对照组更快, 因此, 纳米 TiO_2 处理组平均种群密度相比于对照组显著减小 ($P < 0.05$) (图 3(b))。此外, 浓度 $\geq 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳米 TiO_2 显著抑制了萼花臂尾轮虫的平均种群增长率, 随着纳米 TiO_2 浓度的增加, 平均种群增长率逐渐减小, 但是 1.0 、 1.5 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三者间无显著差异, 而 1.5 、 2.0 、 2.5 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个浓度组间也未见显著差异 (图 3(c))。

萼花臂尾轮虫种群携卵情况则表现出以下规律: 当浓度 $\geq 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 种群中萼花臂尾轮虫携带非混交卵数量被显著抑制, 而 1.5 、 2.0 、 2.5 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组之间无差异 (图 3(d)), 可见纳米 TiO_2 可能通过影响萼花臂尾轮虫携带非混交卵数量进而影响种群增长。当纳米 TiO_2 浓度为 0.5 、 1.0 、 1.5 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 种群休眠卵产量与对照组无显著差异, 而当浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 种群休眠卵产量显著提高 ($P < 0.05$) (图 3(e)), 产生这一现象的原因可能是在 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 萼花臂尾轮虫种群数量受到显著抑制而引起的。对种群混交率结果分析可知, 当浓度 $\geq 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 混交率显著提高 ($P < 0.05$), $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 种群具有最大混交率 0.199 ± 0.026 (图 3(f))。由休眠卵产量和混交率结果可知, 纳米 TiO_2 对萼花臂尾轮虫的有性生殖产生了影响。

对生产量单因素方差分析结果表明, 当浓度 $\geq 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 总雌体生产量被显著抑制 ($P < 0.05$), 而 1.0 、 1.5 、 2.0 和 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组之间无明显差

异, $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组与其他实验组之间均具有显著差异 ($P < 0.01$) (图 3(g))。而浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 混交雌体生产量被显著提高, 而 0.5 、 1.0 、 1.5 和 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与对照组之间无明显差异 (图 3(h))。

3 讨论 (Discussion)

起初, 人们对于纳米材料的研究集中于功能应用, 而随着研究的逐步深入, 人们发现由纳米材料理化性质特殊性所引起的生物毒性效应不容忽视。近年来, 世界卫生组织国际癌症研究机构公布的致癌物清单中, TiO_2 也被列入 2B 类致癌物参考列表。由于尺寸小, 比表面积大, 使其更易与环境中污染物结合, 从而对生物产生潜在威胁^[36-37]。

当纳米 TiO_2 进入水生态系统, 水体理化因子 (如 pH、离子强度、浊度、溶解性有机碳和总有机物等) 和水生生物 (如细菌和浮游植物) 数量, 均对纳米 TiO_2 的水环境行为产生影响^[38-40]。由于上述原因, 导致纳米 TiO_2 实际尺寸参数与商家提供信息不一致。本实验所用纳米 TiO_2 经超声悬浮分散至 EPA 培养基, 由 TEM 图像和 Zeta 电位检测结果可知, 纳米 TiO_2 在悬浮液中不稳定, 可发生聚集或沉淀, 其实际直径大于商家所提供的产品参数。

轮虫普遍存在于各类水体中, 以藻类、原生动物和细菌等为食, 同时又是其他水生动物 (如鱼类) 的食物^[41]。因而, 轮虫在食物链中起着承上启下的作用。此外, 由于世代周期短、易于单克隆培养且对毒物敏感性强, 已成为生态毒理学实验的良好受试生物^[42-44], 常用的轮虫种类有萼花臂尾轮虫和褶皱臂尾轮虫^[45]。急性毒性研究表明, 纳米金属材料暴露对浮游动物尤其是轮虫的存活率具有影响, 如 Rotini 等^[46]的研究表明, 纳米 CuO 可抑制褶皱臂尾轮虫游泳能力并致其死亡, 其 48 h-LC_{50} 值为 $(16.94 \pm 2.68) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

本研究中, 采用旋转混匀仪使纳米 TiO_2 在培养基中均匀分布, 在 $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 、食物密度为 $2.0 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 纳米 TiO_2 对萼花臂尾轮虫的 48 h-LC_{50} 值为 $30.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Khoshnood 等^[47]和 Zhu 等^[48]的研究结果表明, 直径为 20 nm 的纳米 TiO_2 对大型蚤的 48 h-LC_{50} 值分别为 $171.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $143.39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Clément 等^[24]的研究结果表明, 直径 25 nm 纳米 TiO_2 对褶皱臂尾轮虫 48 h-LC_{50} 值为 $10.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。可见, 萼花臂尾轮虫对纳米 TiO_2 的敏感性较褶皱臂尾轮虫弱, 但比浮游动物大型蚤强。因而, 在淡水水环境生物监测尤其是对纳米 TiO_2 的生

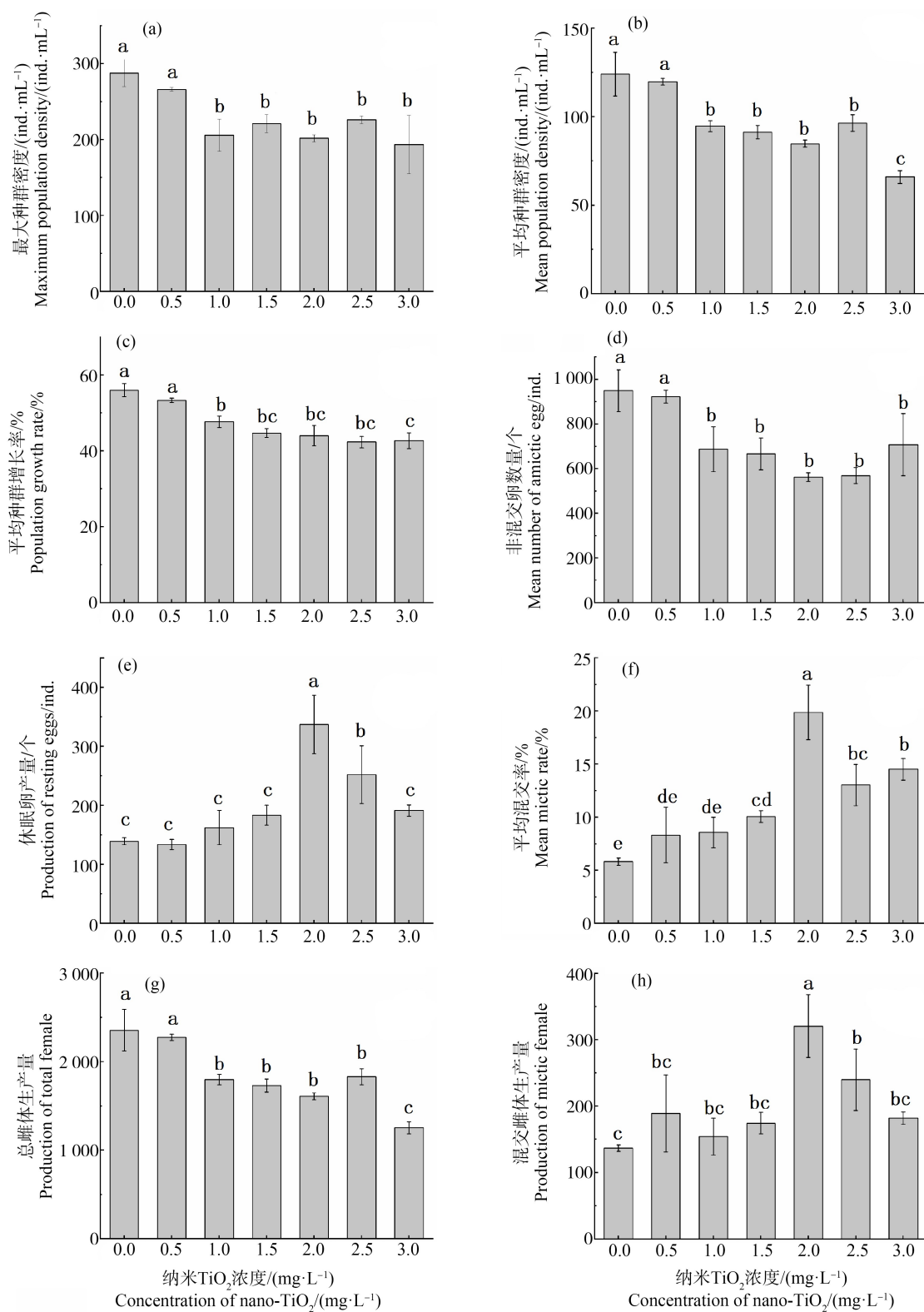


图 3 不同纳米 TiO₂ 浓度下萼花臂尾轮虫的种群增长参数

注:数据表示为平均值±标准偏差;经多重比较(SNK-q 检验),不同小写字母表示种群参数差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 3 Population growth parameters of *B. calyciflorus* under different nano-TiO₂ concentrations

Note: Data are expressed as Mean±SD; different lowercase letters indicate significant differences in population parameters, by multiple comparison analysis (SNK-q test).

物监测中,萼花臂尾轮虫是较为理想的受试生物。

纳米材料对浮游动物的慢性毒性效应主要表现在对浮游动物生殖力、种群增长率、形态和行为等方面的影响^[49-50]。本实验结果表明,当浓度 $\geq 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,纳米 TiO_2 对萼花臂尾轮虫最大种群密度、平均种群增长率以及平均种群密度均具有显著影响($P < 0.05$),且轮虫达到最大种群密度的时间更短;在纳米 TiO_2 最高浓度下($3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),实验后期的轮虫种群密度下降更快速。同时,当浓度 $\geq 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,萼花臂尾轮虫种群平均携带非混交卵数目显著降低($P < 0.05$)。可见,纳米 TiO_2 对萼花臂尾轮虫种群密度及种群增长率具有抑制作用,而引起此现象的原因可能为纳米 TiO_2 显著降低了萼花臂尾轮虫携带非混交卵个体的数目,进而抑制了种群繁殖力。有关纳米材料对浮游动物种群动态的研究较少,Noss 等^[51]研究发现,与对照组和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组相比,暴露于 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳米 TiO_2 (直径 61 nm)悬浮液中 96 h 的大型蚤,生长速率显著下降($P < 0.05$)。Mackevica 等^[52]的研究表明,较高浓度的纳米 Ag 暴露会以剂量依赖性的方式降低大型蚤的生长和繁殖,而引起繁殖力下降的原因可能是大型蚤所携带的卵数减少。Zhao 和 Wang^[53]也指出,当 Ag 纳米颗粒浓度由 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高至 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,母体平均产子代数由(65.9 ± 8.6)代减少到(57.8 ± 5.9)代,该结果具有显著性差异。Wang 等^[54]也得出类似结果,即随着纳米 Cu_2O 浓度升高,子代数量由 169 代降低到 62 代。由上述实验结果可知,纳米材料对大型蚤生长和繁殖均具有抑制作用,此结果与本实验结果具有一致性。

由休眠卵产量和混交率结果可知,纳米 TiO_2 对萼花臂尾轮虫有性生殖具有显著影响。Pourriot 和 Snell^[55]指出休眠卵的形成与众多的内源性和外源性因素有关,如种群混交雌体百分率、受精卵以及产休眠卵的混交雌体生产量等。就本实验结果而言,当浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,萼花臂尾轮虫休眠卵产量显著提高,而当浓度升高到 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其种群密度受到抑制程度增大,且到达峰值后下降迅速,可见该浓度下轮虫具有较高的死亡率。因而,产休眠卵的轮虫死亡率增加,进而导致该浓度下所产休眠卵数量与对照组无显著差异。简言之,随着纳米 TiO_2 浓度的增加,轮虫总雌体生产量被逐渐抑制,而其混交率却显著提高,由此提高了单位体积内形成产休眠卵的混交雌体生产量。

将萼花臂尾轮虫长期暴露于不同浓度的纳米

TiO_2 ,研究其急性毒性及种群动态变化,揭示出:(1)纳米 TiO_2 暴露对萼花臂尾轮虫 48 h-LC_{50} 值为 $30.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,相较于大型蚤,萼花臂尾轮虫对纳米 TiO_2 毒性更敏感;(2)萼花臂尾轮虫种群参数受到纳米 TiO_2 的影响,当纳米 TiO_2 泄露至自然水体后,可能改变轮虫以及其他浮游生物在淡水生态系统中的分布;(3)纳米 TiO_2 暴露对萼花臂尾轮虫的有性生殖产生影响,进而改变种群性比关系及繁殖潜力。本研究结合种群生态学原理阐明了纳米 TiO_2 对萼花臂尾轮虫种群动态的影响,但局限于本研究仅采用单种纳米材料,而复合纳米材料以及纳米 TiO_2 与其他环境污染物的联合毒性仍有待进一步研究。

通讯作者简介:项贤领(1978—),男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为轮虫种群遗传学、生态毒理学和进化生态学。

参考文献 (References):

- [1] Ge Y, Schimel J P, Holden P A. Evidence for negative effects of TiO_2 and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(4): 1659-1664
- [2] Shi H B, Magaye R, Castranova V, et al. Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data [J]. *Particle and Fibre Toxicology*, 2013, 10: 15
- [3] Teske S S, Detweiler C S. The biomechanisms of metal and metal-oxide nanoparticles' interactions with cells [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015, 12(2): 1112-1134
- [4] Roy B, Chandrasekaran H, Palamadai Krishnan S, et al. UVA pre-irradiation to P25 titanium dioxide nanoparticles enhanced its toxicity towards freshwater algae *Scenedesmus obliquus* [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(17): 16729-16742
- [5] Naha P C, Mukherjee S P, Byrne H J. Toxicology of engineered nanoparticles: Focus on poly (amidoamine) dendrimers [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(2): E338
- [6] Goswami L, Kim K H, Deep A, et al. Engineered nanoparticles: Nature, behavior, and effect on the environment [J]. *Journal of Environmental Management*, 2017, 196: 297-315
- [7] Sadrieh N, Wokovich A M, Gopee N V, et al. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO_2 particles [J]. *Toxicological Sciences*, 2010, 115 (1): 156-166

- [8] Zhao Y X, Lin K F, Zhang W. Nano-titanium dioxide (TiO₂)-induced changes affecting Cu²⁺-mediated alterations in bacterium *Bacillus subtilis* and α -amylase [J]. Toxicological & Environmental Chemistry, 2010, 92(10): 1851-1856
- [9] Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, et al. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(4): 2242-2250
- [10] Foster H A, Ditta I B, Varghese S, et al. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: Spectrum and mechanism of antimicrobial activity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(6): 1847-1868
- [11] Hazani A, Ibrahim M, Shehata A, et al. Ecotoxicity of Ag-nanoparticles on two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* [J]. Archives of Biological Sciences, 2013, 65(4): 1447-1457
- [12] Tyner K M, Wokovich A M, Godar D E, et al. The state of nano-sized titanium dioxide (TiO₂) may affect sunscreen performance [J]. International Journal of Cosmetic Science, 2011, 33(3): 234-244
- [13] Tang X H, Wu C Z, Li B Z, et al. New applications of nano titanium dioxide [J]. Meteorological and Environmental Research, 2012, 3(Z1): 55-57
- [14] Li Q L, Mahendra S, Lyon D Y, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications [J]. Water Research, 2008, 42(18): 4591-4602
- [15] Dréno B, Alexis A, Chubierre B, et al. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics [J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2019, 33(Suppl 7): 34-46
- [16] Gupta V K, Jain R, Mittal A, et al. Photochemical degradation of the hazardous dye Safranin-T using TiO₂ catalyst [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2007, 309(2): 464-469
- [17] Cardinale B J, Bier R, Kwan C. Effects of TiO₂ nanoparticles on the growth and metabolism of three species of freshwater algae [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2012, 14(8): 1-8
- [18] Binh C T, Peterson C G, Tong T Z, et al. Comparing acute effects of a nano-TiO₂ pigment on cosmopolitan freshwater phototrophic microbes using high-throughput screening [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0125613
- [19] Xiong D W, Fang T, Yu L P, et al. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage [J]. The Science of the Total Environment, 2011, 409(8): 1444-1452
- [20] Fekete-Kertész I, Maros G, Molnár M, et al. The effect of TiO₂ nanoparticles on the aquatic ecosystem: A comparative ecotoxicity study with test organisms of different trophic levels [J]. Periodica Polytechnica Chemical Engineering, 2016, 60(4): 231-243
- [21] Zhu X S, Chang Y, Chen Y S. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna* [J]. Chemosphere, 2010, 78(3): 209-215
- [22] Farner J M, Cheong R S, Mahé E, et al. Comparing TiO₂ nanoparticle formulations: Stability and photoreactivity are key factors in acute toxicity to *Daphnia magna* [J]. Environmental Science: Nano, 2019, 6(8): 2532-2543
- [23] Nogueira V, Lopes I, Rocha-Santos T A, et al. Assessing the ecotoxicity of metal nano-oxides with potential for wastewater treatment [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2015, 22(17): 13212-13224
- [24] Clément L, Hurel C, Marmier N. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants—Effects of size and crystalline structure [J]. Chemosphere, 2013, 90(3): 1083-1090
- [25] Gottschalk F, Sonderer T, Scholz R W, et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(24): 9216-9222
- [26] Jing Q F, Yi Z L, Lin D H, et al. Enhanced sorption of naphthalene and *p*-nitrophenol by nano-SiO₂ modified with a cationic surfactant [J]. Water Research, 2013, 47(12): 4006-4012
- [27] Peltier W H, Weber C I. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms [R]. Cincinnati, Ohio: United States Environmental Protection Agency, 1985: 31-36
- [28] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test [S]. Paris: OECD, 2011
- [29] Lee W M, An Y J. Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on green algae under visible, UVA, and UVB irradiations: No evidence of enhanced algal toxicity under UV pre-irradiation [J]. Chemosphere, 2013, 91(4): 536-544
- [30] Liu Y H, Wang S, Wang Z, et al. TiO₂, SiO₂ and ZrO₂ nanoparticles synergistically provoke cellular oxidative damage in freshwater microalgae [J]. Nanomaterials, 2018, 8(2): 95
- [31] Metzler D M, Erdem A, Huang C P. Influence of algae age and population on the response to TiO₂ nanoparticles

- [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2018, 15(4): E585
- [32] Chen J Y, Li H R, Han X Q, et al. Transmission and accumulation of nano-TiO₂ in a 2-step food chain (*Scenedesmus obliquus* to *Daphnia magna*) [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2015, 95(2): 145-149
- [33] Dumont H J, Sarma S S S. Demography and population growth of *Asplanchna girodi* (Rotifera) as a function of prey (*Anuraecopsis fissa*) density [J]. Hydrobiologia, 1995, 306(2): 97-107
- [34] Krebs C J. Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance [M]. Benjamin Cummings, 1985: 133-148
- [35] Snell T W, Hoff F H. The effect of environmental factors on resting egg production in the rotifer *Brachionus plicatilis* [J]. Journal of the World Mariculture Society, 2009, 16(1-4): 484-497
- [36] Klaine S J, Alvarez P J, Batley G E, et al. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(9): 1825-1851
- [37] Tsiridis V, Petala M, Koukiotis C, et al. Implications of handling practices on the ecotoxic profile of alumina nanoparticles towards the bacteria *Vibrio fischeri* [J]. Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2017, 52(1): 15-22
- [38] Seitz F, Rosenfeldt R R, Müller M, et al. Quantity and quality of natural organic matter influence the ecotoxicity of titanium dioxide nanoparticles [J]. Nanotoxicology, 2016, 10(10): 1415-1421
- [39] Horst A M, Neal A C, Mielke R E, et al. Dispersion of TiO₂ nanoparticle agglomerates by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(21): 7292-7298
- [40] Ottofuelling S, von der Kammer F, Hofmann T. Commercial titanium dioxide nanoparticles in both natural and synthetic water: Comprehensive multidimensional testing and prediction of aggregation behavior [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(23): 10045-10052
- [41] Segers H. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater [J]. Hydrobiologia, 2008, 595(1): 49-59
- [42] Verma V, Rico-Martinez R, Kotra N, et al. Estimating the toxicity of ambient fine aerosols using freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Monogononta) [J]. Environmental Pollution, 2013, 182: 379-384
- [43] Kaneko G, Yoshinaga T, Yanagawa Y, et al. Molecular characterization of Mn-superoxide dismutase and gene expression studies in dietary restricted *Brachionus plicatilis* rotifers [J]. Hydrobiologia, 2005, 546(1): 117-123
- [44] Halbach U, Siebert M, Westermayer M, et al. Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1983, 7(5): 484-513
- [45] Rico-Martínez R, Pérez-Legaspi I A, Arias-Almeida J C, et al. Rotifers in Ecotoxicology [M]//Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013: 973-996
- [46] Rotini A, Gallo A, Parlapiano I, et al. Insights into the CuO nanoparticle ecotoxicity with suitable marine model species [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 147: 852-860
- [47] Khoshnood R, Jaafarzadeh N, Jamili S, et al. Nanoparticles ecotoxicity on *Daphnia magna* [J]. Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research, 2016, 18(2): 29-38
- [48] Zhu X S, Zhu L, Chen Y S, et al. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna* [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2009, 11(1): 67-75
- [49] Adam N, Vakurov A, Knapen D, et al. The chronic toxicity of CuO nanoparticles and copper salt to *Daphnia magna* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 283: 416-422
- [50] Gökçe D, Köytepe S, Özcan İ. Effects of nanoparticles on *Daphnia magna* population dynamics [J]. Chemistry and Ecology, 2018, 34(4): 301-323
- [51] Noss C, Dabrunz A, Rosenfeldt R R, et al. Three-dimensional analysis of the swimming behavior of *Daphnia magna* exposed to nanosized titanium dioxide [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80960
- [52] Mackevica A, Skjolding L M, Gergs A, et al. Chronic toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna* under different feeding conditions [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 161: 10-16
- [53] Zhao C M, Wang W X. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011, 30(4): 885-892
- [54] Wang H H, Fan W H, Xue F, et al. Chronic effects of six micro/nano-Cu₂O crystals with different structures and shapes on *Daphnia magna* [J]. Environmental Pollution, 2015, 203: 60-68
- [55] Pourriot R, Snell T W. Resting eggs in rotifers [J]. Hydrobiologia, 1983, 104(1): 213-224 ◆