

Toxicity of CuO, CdO, PbO and ZnO Nanoparticles to *Daphnia magna* and *Brachionus forficula*

Lin Cao, Guoji Ding

School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai, China

Email: caolin314@hotmail.com, gjding@shu.edu.cn

Abstract: The toxicities of nanosized CuO, CdO, PbO and ZnO to *Daphnia magna* and *Brachionus forficula* were examined by using 24h acute toxicity tests under different temperature and light conditions. Results showed that all the four kinds of nanosized metal oxides could inhibit both testing organisms' activity and make them die. Within the testing temperature range, toxicities of the four nanosized metal oxides were promoted with the increase of water temperature. Toxicities of nanosized metal oxides changed obviously under different light conditions (12h dark and then 12h bright, 24h bright, 12h bright and then 12h dark, and 24h dark). Nanosized metal oxides' toxicities to *D. magna* increased from nPbO to nCdO to nCuO to nZnO, while to *B. forficula* increased from nCuO to nPbO to nCdO to nZnO.

Keywords: nanosized metal oxide; toxicity; *Daphnia magna*; *Brachionus forficula*; temperature; light

纳米 CuO、CdO、PbO 及 ZnO 对大型水蚤和剪形臂尾轮虫的毒性

曹 林, 丁国际

上海大学环境与化学工程学院, 上海, 中国, 200444

Email: caolin314@hotmail.com, gjding@shu.edu.cn

摘 要: 本文以大型水蚤与剪形臂尾轮虫作为受试生物, 研究了不同水温 and 光照条件下纳米金属氧化物 (nCuO, nCdO, nPbO 和 nZnO) 的 24h 急性毒性。研究表明, 四种纳米材料均能抑制受试生物的活动并导致死亡。在实验温度范围内, 四种纳米材料对受试生物的毒性均呈现随水温的升高而增大的趋势。光照条件 (先暗后亮, 全光照, 先亮后暗, 全黑暗) 也是影响纳米材料毒性的重要因素。纳米材料对大型水蚤的毒性从小到大依次为 nPbO、nCdO、nCuO 及 nZnO, 对剪形臂尾轮虫的毒性从小到大依次为 nCuO、nPbO、nCdO 及 nZnO。

关键词: 纳米金属氧化物; 毒性; 大型水蚤; 剪形臂尾轮虫; 温度; 光照

1 引言

纳米金属材料在环保、药物、日用品等领域得到越来越广泛应用的同时, 其环境行为和生态毒性也日益受到关注。早期对纳米材料的水生态毒性研究主要集中在碳纳米材料上, 但近年来一些学者把目光转向纳米金属氧化物。Heinlaan 等^[1]比较了纳米级与块状金属氧化物 ZnO、CuO 及 TiO₂ 对费氏弧菌、大型水蚤和仙女虾的毒性, 发现纳米 ZnO 与 CuO 毒性更大。同样, Aruoja 等^[2]研究了纳米 CuO、ZnO 及 TiO₂ 对月芽藻的毒性,

Mortimer 等^[3]研究了纳米 ZnO 和 CuO 对原生动物四膜虫的毒性。Adams 等^[4]使用大肠菌和枯草芽孢杆菌评价了 3 种纳米金属氧化物 TiO₂、SiO₂ 及 ZnO 的生态毒性, 观察到这些纳米粒子均对细菌有毒性, 且毒性的大小是随纳米粒子的浓度增加而增大; 3 种纳米金属氧化物中 ZnO 的毒性最大; 枯草芽孢杆菌受到纳米金属氧化物的影响比大肠杆菌大; 光照是重要的影响因素, 但即使无光照仍然有毒性。

本文除了选择目前受到较大关注的 ZnO 和 CuO 为受试物, 还选择了在工业上应用较广的 CdO、PbO 为受试物, 以大型水蚤和剪形臂尾轮虫作为受试生物, 研究四种纳米金属氧化物的毒性效应, 还着重考察了不同水

资助信息: 国家科技重大专项资助(2008ZX07421-002); 国家“863 计划”项目 2007AA062347; 上海市重点学科第 3 期建设项目 (S30109)。

温和光照条件对上述四种毒物毒性的影响, 以期为安全使用纳米金属氧化物提供基础数据, 并为建立纳米材料毒性评价方法提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料

纳米 CuO、CdO、PbO、ZnO 均为实验室自制^[5-10], 经透射电镜 TEM 和 X 射线衍射 XRD 测试, 均为球形颗粒, 按谢乐公式计算平均粒径为 22、51、29、38nm。

大型水蚤来自中国疾病预防控制中心, 剪形臂尾轮虫分离自湖水。两生物均用斜生栅藻培养。

2.2 纳米金属氧化物对大型水蚤的 24h 急性毒性试验

大型水蚤毒性试验参考 GB/T13266-91 进行^[11], 试验前先对其进行敏感性测试, 确保大型水蚤符合试验要求。根据预实验结果, 试验设各纳米金属氧化物 0.01, 0.05, 0.25, 1.25, 6.25, 31.25mg/L 6 个浓度梯度。纳米材料悬浮液用含有分散剂六偏磷酸钠^[12]的人工稀释水^[11]配制。毒性试验在 100 ml 烧杯中进行, 每烧杯 50 ml 试验液, 置幼蚤 10 个, 设 2 个平行, 并增加 2 个试验中最大剂量的六偏磷酸钠空白。纳米金属氧化物暴露 24h 后记录烧杯中不活动的大型水蚤数, 用概率单位直线回归法求出半效应浓度 EC_{50} ^[13]。

2.2 纳米金属氧化物对剪形臂尾轮虫的 24h 急性毒性试验

根据预实验结果, 试验设各纳米金属氧化物 0.01, 0.05, 0.25, 1.25, 6.25, 31.25mg/L 6 个浓度梯度。纳米材料悬浮液用含有分散剂六偏磷酸钠的人工淡水^[14]配制。剪形臂尾轮虫毒性试验在 6×4 细胞培养板中进行, 每孔 2 ml 试验液, 置幼轮虫 10 个, 设 2 个平行, 并增加 2 个试验中最大剂量六偏磷酸钠空白。纳米金属氧化物暴露 24 h 后记录不活动轮虫数, 用概率单位直线回归法求出半效应浓度 EC_{50} 。

2.3 水温对纳米金属氧化物的毒性影响

大型水蚤毒性试验选取 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5 °C 5 个温度梯度来考察水温对纳米金属氧化物毒性的影响, 剪形臂尾轮虫毒性试验选取 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5 °C, 试验均在无光照情况下进行。

2.4 光照条件对纳米金属氧化物的毒性影响

在 25°C 条件下, 设立全黑暗、全光照、半光照(先亮后暗及先暗后亮) 四种光照条件来进行毒性试验, 以考察光照对纳米金属氧化物毒性的影响。

3 结果与讨论

3.1 水温对纳米金属氧化物毒性的影响

大型水蚤的最适生长温度为 17°C~25°C^[14], 而剪形臂尾轮虫属暖水性生物, 其最适生长温度在 25°C 以上^[15], 本实验的水温条件均取最适温度范围附近。不同水温下纳米金属氧化物对大型水蚤及剪形臂尾轮虫的半效应浓度 EC_{50} 显示在图 1 和图 2 中。

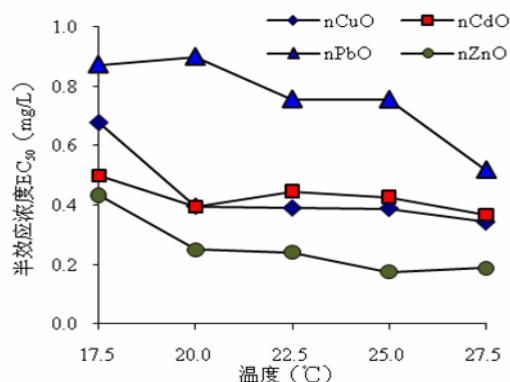


Figure 1. Toxicity of nanosized metal oxides to *D. magna* at different water temperature

图 1. 不同水温下纳米金属氧化物对大型水蚤的毒性

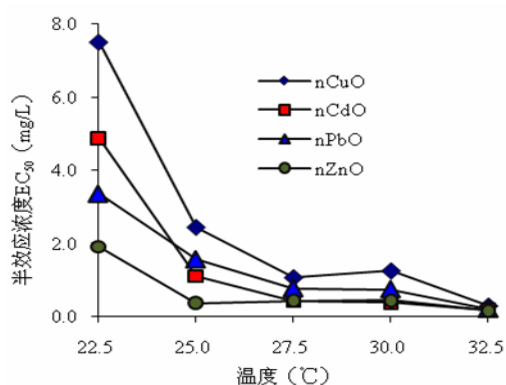


Figure 2. Toxicity of nanosized metal oxides to *B. forficula* at different water temperature

图 2. 不同水温下纳米金属氧化物对剪形臂尾轮虫的毒性

纳米金属氧化物对大型水蚤和剪形臂尾轮虫的毒

性均呈现出随着水温的升高而增大的趋势。水生物的生命活动在最适生长温度范围内一般会随着温度升高而增强。因此,两种水生物随水温升高而毒性增强的现象也许与随水温升高而增加了对毒物的摄取量或吸收量有关^[16]。此外,纳米金属氧化物对两种水生物的毒性随水温升高而增大的幅度均与毒性大小有关,毒性越小受到水温的影响越大。

各毒物对大型水蚤的毒性从大到小依次为 $nZnO > nCuO > nCdO > nPbO$, 对剪形臂尾轮虫的毒性从大到小依次为 $nZnO > nCdO > nPbO > nCuO$ 。 $nZnO$ 在本实验的各急性毒性试验中均表现为毒性最大,这可能是由于其在水中的溶解度相对较大且溶出较毒的 Zn^{2+} 离子而导致^[17]。

3.2 光照条件对纳米金属氧化物毒性的影响

不同光照条件下得出的纳米金属氧化物对大型水蚤及剪形臂尾轮虫的半效应浓度 EC_{50} 如图 3 和图 4 所示:

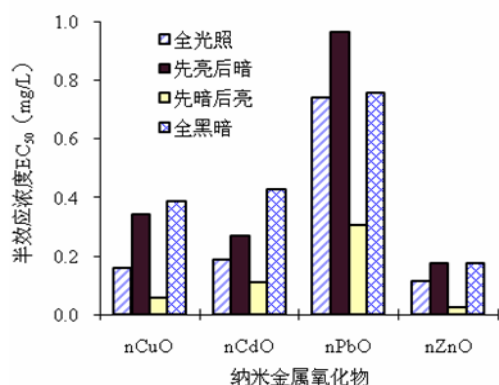


Figure 3. Toxicity of nanosized metal oxides to *D. magna* in different light conditions

图 3. 不同光照条件下纳米金属氧化物对大型水蚤的毒性

光照条件对纳米金属氧化物的毒性有一定的影响,并且对于不同的生物,其影响效果不相同。对于不同光照条件下的大型水蚤,毒性从大到小依次为先暗后亮>全光照>先亮后暗>全黑暗(其中先暗后亮、全光照、先亮后暗的毒性效应较为接近);对于不同光照条件下的轮虫,纳米金属氧化物毒性从大到小依次为先亮后暗>全光照>全黑暗>先暗后亮。

大型水蚤是一种有趋光行为的生物^[18],在有光的情况下其会朝着光的方向游动,且速度变快。根据本

实验所得的结果,在有光的情况下,大型水蚤可能由于代谢速度加快,对毒物的耐受能力也就相应下降,所以全光照的毒性大于全黑暗毒性。光照 12h 时水蚤可能尚未中毒,此时改变光照条件转为黑暗能有效降低纳米金属氧化物的对其的毒性效应。纳米材料通过水蚤摄食而进入水蚤体内并在其中累积,从而对水蚤产生毒性^[17]。在黑暗情况下,由于水蚤的盲目摄食,使纳米材料在水蚤体内已有一定的累积,无光照 12h 后转为光照,水蚤代谢速度加快,就易中毒,故纳米材料在先暗后亮的情况下毒性比先亮后暗的大。

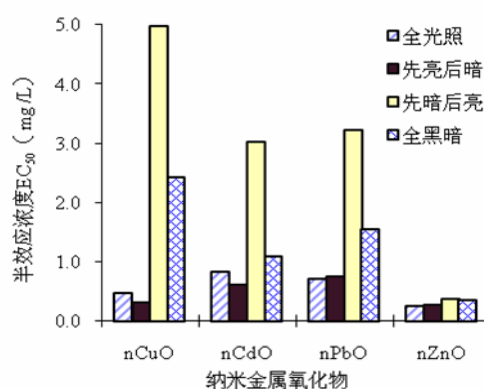


Figure 4. Toxicity of nanosized metal oxides to *B. forficula* in different light conditions

图 4. 不同光照条件下纳米金属氧化物对剪形臂尾轮虫的毒性

光照对轮虫的影响,一般认为是间接的,光照主要作用于培养轮虫的饵料及其生活环境。如光照可以促进藻类生长从而使轮虫有更多的饵料,藻类的光合作用产氧也可改善水质等^[19]。王家揖则认为轮虫是具有眼点的浮游动物,其眼点由神经与脑相连^[20],因此可以直接感受光。王金秋^[19]曾分别以蛋白核小球藻和啤酒酵母作为饵料,对比研究有无光照和不同光照强度对萼花臂尾轮虫种群增长的影响,其结论表明光照能促进轮虫种群增长。因此,从某种程度来讲,光照会使轮虫的活代谢速度加快,对毒物的耐受能力也就相应下降;并且中毒后的轮虫适应新环境、新变化的能力较差,故纳米金属氧化物在先亮后暗、全光照条件下的毒性均大于全黑暗和先暗后亮的情况。与大型水蚤不同,纳米材料对轮虫的毒性在先暗后亮的光照情况下大于全黑暗情况,这可能是由于,在黑暗情况下水中团聚起来的纳米颗粒易吸附在轮虫体表,同时对轮虫的物理碰撞几率也较大,所以 24h 处于黑暗情

况的轮虫耐毒能力不如先暗后亮。

4 结论

本文以大型水蚤与剪形臂尾轮虫为受试生物,以纳米金属氧化物为受试物,进行了一系列的急性毒性试验,得出以下几个重要的结论:

1. 纳米 CuO、CdO、PbO、ZnO 均能抑制大型水蚤及剪形臂尾轮虫的活动并导致死亡。

2. 在最适生长范围内,纳米金属氧化物对大型水蚤及剪形臂尾轮虫的毒性随着水温的升高而增大。

3. 在 17.5 到 27.5°C 范围内,各纳米金属氧化物对大型水蚤的毒性从大到小依次为 $nZnO > nCuO > nCdO > nPbO$; 在 22.5 到 32.5°C 范围内,各纳米金属氧化物对剪形臂尾轮虫的毒性从大到小依次为 $nZnO > nCdO > nPbO > nCuO$ 。 $nZnO$ 对两种受试生物的毒性均最大。

4. 光照条件对纳米金属氧化物的毒性有较大影响。纳米金属氧化物对大型水蚤毒性从大到小依次为 先暗后亮 > 全光照 > 先亮后暗 > 全黑暗,对轮虫毒性从大到小依次为 先亮后暗 > 全光照 > 全黑暗 > 先暗后亮。

References (参考文献)

- [1] Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier H C and Kahru A, Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*[J], *Chemosphere*, 2008, 71(7), P1308-1316.
- [2] Aruoja V, Dubourguier H C, Kasemets K and Kahru A, Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*[J], *Science of The Total Environment*, 2009, 407(4), P1461-1468.
- [3] Mortimer M, Kasemets K, Kahru A, Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*[J], *Toxicology*, 2010, 269(2-3), P182-189.
- [4] Adams L K, Lyon D Y and Alvarez P J J, Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions[J], *Water Research*, 2006, 40(19), P3527-3532.
- [5] Lv Juan, Research on Direct Precipitation Preparation Process and Surface Modification of Nano-Copper Oxide[D]. Xi an: Northwest University, 2008. 31-41 (Ch).
吕娟. 纳米氧化铜直接沉淀法制备工艺及表面改性研究[D]. 西安: 西北大学, 2008. 31-41.
- [6] Askarinejad A, Morsali A, Syntheses and characterization of CdCO₃ and CdO nanoparticles by using a sonochemical method[J], *Materials Letters*, 2008, 62(3), P478-482.
- [7] Ristić M, Popović S, Musić S, Formation and properties of Cd(OH)₂ and CdO particles[J], *Materials Letters*, 2004, 58(20), P2494-2499.
- [8] Liu Jingying, Wang Zhumin, Shi Jiye, Synthesis of nano ZnO by three methods and comparison of product properties[J], *Chemical Reagents*, 2008, 30(11), P816-818(Ch).
- [9] Li Shengying, Yang Wu, Chen Miao, Gao Jinzhang, Kang Jingwan and Qi Youli, Preparation of PbO nanoparticles by microwave irradiation and their application to Pb(II)-selective electrode based on cellulose acetate[J], *Materials Chemistry and Physics*, 2005, 90(2-3), P262-269.
- [10] Ma Fengguo, Shao Ziqiang, Song Liuyi and Tan Huimin, Synthesis of Nano-sized Lead Oxide[J], *Chinese Journal of Synthetic Chemistry*, 2001, 9(5), P449-451 (Ch).
马凤国, 邵自强, 宋鏐毅, 谭惠敏, 纳米级氧化铅粉体的合成[J], 合成化学, 2001, 9(5), P449-451.
- [11] Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T13266-91 Water quality-Determination of the acute toxicity of substance to *Daphnia* (*Daphnia magna* straus)[S]. Beijing: Standards Press of China, 1991 (Ch).
中华人民共和国卫生部. GB/T13266-91 水质 物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1991.
- [12] Ding Hong, Study of Nanometer Powder Aqueous Suspension and Application of it in Exterior Coatings[D]. Chongqing: Chongqing University, 2005. 33-34 (Ch).
丁虹. 纳米粉体水悬浮液的制备及其在外墙涂料中的应用研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2005. 33-34.
- [13] State Environmental Protection Agency. Water and wastewater monitoring methods[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002. 528-529(Ch).
国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 528-529.
- [14] U.S. Environmental Protection Agency Office of Water. EPA-821-R-02-012 Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms[S]. 5th ed. Washington, D.C.: US EPA, 2002. 33.
- [15] Wen Xinli, Xi Yilong, Population dynamics and life history strategy of the common *Brachionus* species (Rotifera) in Lake Jinghu[J], *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(10), P3956-3963 (Ch).
温新利, 席贻龙, 镜湖常见臂尾轮虫(*Brachionus*)种群周年动态及生活史对策[J], 生态学报, 2007, 27(10), P3956-3963.
- [16] Zhou Qixing, Kong Fanxiang, Zhulin. Ecotoxicology[M]. Beijing: Science Press, 2004. 284-285. (Ch)
周启星, 孔繁翔, 朱琳. 生态毒理学[M]. 北京: 科学出版社, 2004. 284-285.
- [17] Zhu Xiaoshan, Zhu Lin, Tian Shengyan, Lang Yupeng and Li Yan, Aquatic ecotoxicities of nanoscale TiO₂, ZnO and Al₂O₃ water suspensions[J], *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(8), P3507-3516 (Ch).
朱小山, 朱琳, 田胜艳, 郎宇鹏, 李燕, 三种金属氧化物纳米颗粒的水生态毒性[J], 生态学, 2008, 28(8), P3507-3516.
- [18] Wu Yonggui, Lin Chuxia, Yuan Ling, Phototaxis index of *Daphnia carinata* as an indicator of joint toxicity of copper, cadmium, zinc, nitrogen and phosphorus in aqueous solutions[J], *Ecological Indicators*, 2008, 8(1), P69-74.
- [19] Wang Jinqu, Li Deshang, Effects of Ecological Factors on the Population Dynamics of *Brachionus calyciflorus* - The Effect of Light[J], *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1997, (4), P23-27 (Ch).
王金秋, 李德尚, 影响萼花臂尾轮虫种群增长的生态学因子的研究——光照的影响[J], 海洋湖沼通报, 1997, (4), P23-27.
- [20] Wang Jiayi. The Freshwater Rotifer in China[M]. Beijing: Science Press, 1961. 14-15 (Ch).
王家楫. 中国淡水轮虫志[M]. 北京: 科学出版社, 1961. 14-15.