

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180410002

韩泽洲, 苏锐, 史楠, 等. 金属和非金属纳米材料对四膜虫生物毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(2): 91-97

Han Z Z, Su R, Shi N, et al. Biototoxicity of metal and non-metal nanomaterials to *Tetrahymena* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(2): 91-97 (in Chinese)

## 金属和非金属纳米材料对四膜虫生物毒性研究

韩泽洲<sup>1</sup>, 苏锐<sup>1,2,\*</sup>, 史楠<sup>1</sup>, 韩明翰<sup>1</sup>

1. 中北大学化学工程与技术学院, 太原 030051

2. 山西大学生物技术所, 太原 030006

收稿日期: 2018-04-10 录用日期: 2018-07-09

**摘要:** 纳米材料是“21世纪最有前途的材料”, 以其优良的性能广泛应用于许多领域, 随之以多种形式释放到环境中。目前, 关于纳米材料的安全性还没有明确的论断。本文介绍了四膜虫在纳米材料生物效应研究中的优势, 重点论述了金属纳米材料、非金属纳米材料对四膜虫的生物效应以及毒性机制的研究状况, 并对今后纳米材料生物毒性效应研究提供了建设性的方法及意见。

**关键词:** 纳米材料; 四膜虫; 环境毒理; 生物毒性

文章编号: 1673-5897(2019)2-091-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Biototoxicity of Metal and Non-metal Nanomaterials to *Tetrahymena*

Han Zezhou<sup>1</sup>, Su Rui<sup>1,2,\*</sup>, Shi Nan<sup>1</sup>, Han Minghan<sup>1</sup>

1. School of Chemical Engineering and Technology, North University of China, Taiyuan 030051, China

2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Received 10 April 2018 accepted 9 July 2018

**Abstract:** Nanomaterials, which are widely used in many fields owing to their excellent properties have been recognized as "the most promising materials of 21st Century", and then released into the environment in various forms. At present, safety of nanomaterials has not been clearly determined. Advantages of *Tetrahymena* in the study of biological effects of nanomaterials, and biotoxicity and toxicological mechanisms of metal nanomaterials and non-metallic nanomaterials to *Tetrahymena* have been discussed in this paper. Additionally, constructive methods and opinions on the future biological toxicity of nanomaterials research were provided.

**Keywords:** nanomaterials; *Tetrahymena*; environmental toxicology; biotoxicity

纳米材料(nanomaterials, NMs)是20世纪80年代中期发展起来的新型材料, 是指在多维尺度中至少有一维在1~100 nm范围内的天然或人工材料。与宏观材料相比, NMs具有独特的物理化学特性,

致使其表现出优良的化学、机械和抗菌等性能, 并广泛应用于衣、食、住、行、医等生活的各个领域。据统计全球NMs市场预计将从2015年的147亿美元增至2022年的550亿美元, 从2016年到2022年将以

基金项目: 山西省自然科学基金(201801D121234); 山西大学生物工程省重点实验室开放课题(20160304)

作者简介: 韩泽洲(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: 1802847984@qq.com

\* 通讯作者( Corresponding author), E-mail: surui@nuc.edu.cn

复合年增长率 20.7% 的速度发展。随着纳米产品大量涌现,暴露环境中的 NMs 含量上升,接触机率增加<sup>[1-3]</sup>。目前关于 NMs 对生物尤其是细胞方面的潜在毒性没有一个全面准确的论断,对 NMs 的细胞毒性进行全面、深入的研究具有重要的意义。

要对 NMs 的生物毒性建立一个完整、可参考的知识体系,模式生物的选择至关重要,要有代表性、统一性、可操作性<sup>[4-5]</sup>。本文概述了四膜虫在部分金属、非金属 NMs 生物毒性研究中的优势及进展,指出了可能的作用机理、影响因素,并对研究 NMs 的生物毒性提供了良好的方法及建议。

### 1 四膜虫在纳米材料生物效应研究中的优势 (The advantages of *Tetrahymena* in the study of biological effects of nanomaterials)

原生动四膜虫 (*Tetrahymena*) 属于单细胞真核生物,虽然只有 50  $\mu\text{m}$  左右的大小,但在生物学基础研究中却有很大的用途。四膜虫体外纯培养容易,生长速度快,实验操作可控性强,且具有大量保守基因,是分子生物学、发育生物学研究中的良好模式生物<sup>[6-8]</sup>。四膜虫广泛分布于淡水体系中,处于水域食物链(网)系统能量流动与物质循环的关键环节,对环境变化灵敏度高,是早期预报所处水生态系统恶化的理想指示物种<sup>[9-11]</sup>。因此,也是环境、生态毒理学研究中常用的受试生物之一。近年来,四膜虫在 NMs 毒理学研究中也展现出独特的优势,其具备完整生命个体所应有的典型细胞、亚细胞结构,方便在短时间内从分子、细胞和生命个体等不同层次展开研究<sup>[12-14]</sup>。

### 2 金属纳米材料对四膜虫的生物毒性研究 (Bio-toxicity of metal nanomaterials to *Tetrahymena*)

当前应用和渗透到生活领域的 NMs 种类很多,大致可分为金属和非金属 2 种。不同类别 NMs 对生物的作用效果、作用机制往往不同,且影响因素众多(图 1)。以四膜虫为模式生物研究 NMs 的细胞毒性发现,其对细胞的作用是多因素共同作用的结果,包括组成、大小、表面修饰、溶解性和环境因素如 pH、光和时间等。就 NMs 单方面因素考虑有 3 种情况:颗粒本身作用;颗粒、离子共同作用;离子作用。因此,有必要对各个种类 NMs 分别进行研究探讨<sup>[15-16]</sup>。

纳米银(AgNPs)具有优良的抗菌特性。在古代,人们就在容器中加入 Ag,防止液体和食物腐败。随

着 AgNPs 的广泛应用,使其更多地暴露在环境中,可能对生物造成毒性作用。Juganson 等<sup>[17]</sup>以嗜热四膜虫为受试生物研究 AgNPs 的细胞毒性大小,测得 24 h  $\text{Ag}^+$   $\text{EC}_{50}$  为  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , AgNPs 的  $\text{EC}_{50}$  大于  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,表明  $\text{Ag}^+$  的毒性大于 AgNPs。Juganson 等<sup>[18]</sup>通过理化指标测定和基因表达分析,发现 AgNPs 作用后嗜热四膜虫体内氧化应激相关基因及金属硫蛋白表达均有增加,其中金属硫蛋白基因表达显著上调,通过对比 AgNPs 和  $\text{Ag}^+$  的  $\text{EC}_{50}$  也表明  $\text{Ag}^+$  在 AgNPs 的生物毒性中发挥主要作用。Shi 等<sup>[19]</sup>用梨形四膜虫为受试生物研究光照对 AgNPs 的毒性影响,结果表明光照引起颗粒团聚,致使表面作用区域减少,释放的  $\text{Ag}^+$  减少,使得光照下 AgNPs 的毒性显著低于黑暗条件下的毒性。从以上研究可知,AgNPs 的毒性作用主要与  $\text{Ag}^+$  的释放有关,AgNPs 对四膜虫有生长抑制作用,光照会减弱其细胞毒性。

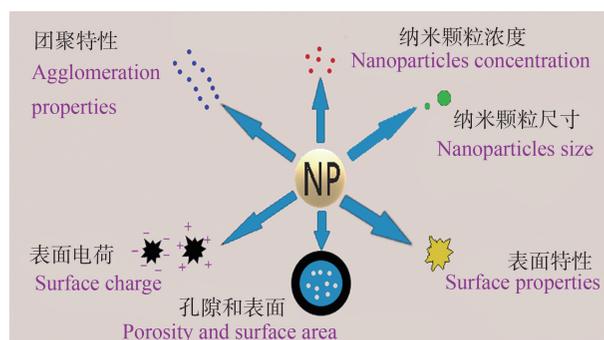


图 1 纳米材料 (NMs) 生物效应的作用因素

Fig. 1 Factors influencing the biological effects of nanomaterials (NMs)

纳米氧化锌(ZnONPs)在个人护理产品如牙膏、防晒霜及美容产品中应用广泛。有研究指出 ZnONPs 与  $\text{Zn}^{2+}$  对多种生物体的作用相似,毒性主要归因于解离出的  $\text{Zn}^{2+}$ <sup>[20-21]</sup>。Chen 等<sup>[22]</sup>用嗜热四膜虫为受试生物,评估低浓度 ZnONPs 对细胞的毒性效应。结果显示,在低浓度范围内其对四膜虫的生长存在促进作用,且作用效果随时间的延长而减弱。Mortimer 等<sup>[23]</sup>对嗜热四膜虫暴露培养 4 h 测得 ZnO、ZnONPs、 $\text{Zn}^{2+}$  的  $\text{EC}_{50}$  值分别为 4.4、4.7、4.9  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,从溶解度可以判断 ZnONPs 的细胞毒性主要与  $\text{Zn}^{2+}$  的释放有关。进一步研究发现 ZnONPs 暴露 24 h 的毒性比 4 h 低 1.5 倍,这可能是由于适应效应,该作用机制有待进一步研究证明。

随着纳米医学的发展,纳米二氧化钛( $\text{TiO}_2\text{NPs}$ )经常用作基因传递和药物的载体。 $\text{TiO}_2\text{NPs}$ 被普遍认为是一种低毒性的材料,也有报道显示其具有较大的细胞毒性<sup>[24-25]</sup>。Wang等<sup>[26]</sup>研究发现, $\text{TiO}_2\text{NPs}$ 的细胞毒性主要与活性氧自由基的产生有关。Zou等<sup>[27]</sup>研究了光照条件下 $\text{TiO}_2\text{NPs}$ 对梨形四膜虫代谢水平的影响,数据显示四膜虫体内的活性氧自由基水平在光照下比在同浓度黑暗条件下增加了1.9倍,超氧化物歧化酶(SOD)水平增加了3.9倍,四膜虫清除自由基的能力下降。说明光照使 $\text{TiO}_2\text{NPs}$ 产生过多的自由基超出细胞本身的清除能力,会导致细胞生长抑制、线粒体代谢功能障碍等。此外,Wang等<sup>[26]</sup>研究表明,过量的 $\text{TiO}_2\text{NPs}$ 会聚集在细胞表面,一旦粘附在细胞膜上,会阻碍离子通路,影响离子交换,破坏胞吐过程,进而导致细胞凋亡。

当前纳米氧化铝( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$ )应用改性方面的文献有很多,但关于其对生物、环境的毒理学研究却较少,要避免对新材料超前应用可能带来的灾难性后果,就必须对其生态环境效应进行透彻的研究<sup>[28]</sup>。有研究指出,高浓度 $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$ 会对斜生栅藻产生生长抑制、光合毒性和氧化损伤等效应,对生态系统具有破坏作用<sup>[29]</sup>。Zhou等<sup>[30]</sup>用梨形四膜虫作为受试材料研究了 $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$ 的细胞毒性效应及影响因素,发现四膜虫可通过代谢酶水平的调节缓解低浓度下NMs对其产生的细胞毒性,但当该材料作用浓度超出细胞本身的耐受值,就会造成细胞坏死,且浓度越大毒性作用越明显。

铜具有独特的化学、光、电和热性能,这些特性使得以纳米氧化铜( $\text{CuONPs}$ )为基础的材料可以广泛用作催化剂、杀菌剂、生物传感器和能量转化等。目前关于 $\text{CuONPs}$ 对细胞的毒性机理还没有一个统一的论断,体外实验中发现除了哺乳类和酵母类生物, $\text{Cu}^{2+}$ 对其他类别生物的毒性均比 $\text{CuONPs}$ 毒性大<sup>[20,31]</sup>。Moschini等<sup>[32]</sup>发现, $\text{CuONPs}$ 对人肺上皮细胞的毒性主要与纳米颗粒的作用有关,而非解离出的 $\text{Cu}^{2+}$ 。Mortimer等<sup>[23]</sup>以嗜热四膜虫为受试生物研究 $\text{CuONPs}$ 的毒性及作用机制,测得同浓度下其对四膜虫的毒性强度是 $\text{CuO}$ 的10~20倍,而相同浓度下 $\text{CuONPs}$ 中解离出的 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度是 $\text{CuO}$ 解离浓度的17倍,表明 $\text{CuO}$ 毒性受颗粒尺寸的影响,毒性与 $\text{Cu}^{2+}$ 的释放有关。进一步分析对比发现 $\text{CuONPs}$ 处理4h和处理24h的毒性变化不大,说明其毒性与暴露时间无关。由以上论述可知,

$\text{CuONPs}$ 颗粒尺寸越小,毒性作用越强,对不同种类生物的作用机理存在差异。

纳米金( $\text{AuNPs}$ )是指直径在1~100nm的微小颗粒,具有良好的生物相容性、介电特性和催化特性等,其在免疫、食品、致病微生物快速检测等方面具有良好的应用,但目前关于它的细胞毒性效应研究较少<sup>[33]</sup>。徐斌等<sup>[34]</sup>以梨形四膜虫为受试生物,研究水环境中 $\text{AuNPs}$ 在四膜虫中的吸收方式、分布状况及细胞效应,发现四膜虫主要通过胞吞作用和口沟进食吸收 $\text{AuNPs}$ ,且大多分布在食物泡中,不能被四膜虫消化。一段时间后, $\text{AuNPs}$ 会通过胞肛从梨形四膜虫中排出体外,还有少量分布在细胞质和细胞核中。该研究在12h、24h2个时间点分别计不同浓度处理下的细胞数,统计分析结果显示, $\text{AuNPs}$ 对梨形四膜虫没有明显的毒性。 $\text{AuNPs}$ 化学性质稳定,难电离,不参与细胞活动,对细胞基本无毒,但不排除富集状况下影响细胞正常代谢,破坏生态系统循环的可能,因此,有必要对其在生物体、生态系统中的吸收、转运进行长期的监测和毒性评估。

量子点( $\text{QDs}$ )在显示器件、照明器件、医学成像和新能源器件等领域具有广泛的应用前景,随着科学技术的不断进步,其暴露机会将越来越大,但它是否对生物体存在毒性效应还不清楚。Mortimer等<sup>[35]</sup>观察到羧酸化 $\text{CdSe/ZnS}$ 主要通过嗜热四膜虫吞噬作用进入食口泡参与细胞代谢途径,最后被排出体外。四膜虫在 $\text{QDs}$ 亚致死浓度下作用24h内没有出现细胞坏死、严重氧化损伤、脂质氧化和DNA损伤等明显的细胞毒性。但Werlin等<sup>[36]</sup>发现四膜虫通过吞噬作用摄入含 $\text{CdSe}$ 的细菌后,四膜虫的消化能力和生长代谢受到抑制,部分细胞坏死。四膜虫的运动能力下降,使得它易被捕食,进而导致 $\text{QDs}$ 在食物链的富集,对生态系统造成破坏作用。罗慧<sup>[37]</sup>也发现 $\text{CdSe}$ 对四膜虫存在生长抑制作用,颗粒进入细胞,会造成功能结构损伤,最终导致细胞凋亡,且毒性强度与浓度成正比,与颗粒尺寸成反比。但 $\text{Ag}_2\text{Se}$ 相对 $\text{CdSe}$ 而言表现了低毒性,表明 $\text{QDs}$ 组成可能会影响细胞毒性强度。

### 3 非金属纳米材料对四膜虫的生物毒性研究 (Bio-toxicity of non-metal nanomaterials to *Tetrahymena*)

在不溶性NMs中,碳纳米管( $\text{CNTs}$ )的应用和研究比较广泛,主要有单壁碳纳米管( $\text{SWCNTs}$ )和多壁碳纳米管( $\text{MWCNTs}$ )2种。 $\text{CNTs}$ 具有优越的电学特性、化

学和热学稳定性,但它在生物环境中没有溶解性,对此可以进行共价或非共价表面修饰<sup>[38]</sup>。当今 CNTs 对生物和环境潜在的毒性效应引起了极大的关注。

对 SWCNTs 的研究发现,无论是水溶性还是水不溶性的 CNTs 均可通过生物进入水生食物链循环,在生物体和环境富集,因此对 CNTs 的生态毒性研究具有重要的意义。Ghafari 等<sup>[39]</sup>以嗜热四膜虫为实验材料研究不同浓度 SWCNTs 对细胞的行为变化影响及其致死率,发现四膜虫在 SWCNTs 中连续暴露 72 h 后,对照组没有出现运动和形态差异,但实验组四膜虫在不同阶段有不同的毒性表现,0~3 h 内,四膜虫发生聚集且失去运动能力;3~12 h 内,部分虫子恢复活动能力并从聚集体中移出来;12~72 h 内,与聚集体有关基质增加,虫子死亡数量增加。但当 SWCNTs 作用浓度较低时,四膜虫没有出现活力下降现象。这表明细胞致死率与 SWCNTs 浓度存在一定的正相关性,浓度越大,对细胞的毒性效应越强。

Zhu 等<sup>[40]</sup>利用显微技术观察梨形四膜虫对 MWCNTs 的摄取情况,分析其对四膜虫的生物效应。研究发现低浓度作用下细胞形态变化不明显,没有黑色颗粒物。随着浓度的增加,四膜虫体内出现黑色颗粒,培养一定时间后,MWCNTs 逐渐被排出体外。在生长代谢实验中,测得四膜虫存活率、琥珀酸脱氢酶含量与作用浓度呈正相关,表明 MWC-

NTs 对梨形四膜虫的生长存在促进作用。进一步研究发现,其对细胞的生长促进作用可能是与蛋白质非共价结合的缘故。此外,Guo<sup>[41]</sup>研究了分别经癸胺和葡萄糖胺修饰的 MWCNTs 对梨形四膜虫的毒性效应,发现癸胺修饰的颗粒对四膜虫具有明显的细胞毒性,且随着作用浓度的增加生长抑制作用越明显;而葡萄糖胺修饰的颗粒对四膜虫没有毒性反而具有一定的促生长作用,说明 MWCNTs 的细胞毒性与修饰基团的类别存在紧密的联系。Mortimer 等<sup>[42]</sup>实验测得无论是通过直接吸收还是细菌摄取 MWCNTs,均会造成嗜热四膜虫生物富集效应,可能传递给下一营养级,造成生态毒性。

富勒烯(fullerene, nC<sub>60</sub>)是第一种碳纳米材料,是单质碳的第 3 种同素异形体。因其具有极强的抗氧化性,所以广泛应用于化妆品、医药领域<sup>[43]</sup>。Tao 等<sup>[44]</sup>测得 nC<sub>60</sub> 在亚致死浓度下会抑制浮游植物的生长,影响光合作用,对生态系统有破坏作用。另外,有报道指出对鱼类、细菌、纤毛虫毒性作用最大的是 nC<sub>60</sub><sup>[45]</sup>。Huang 等<sup>[46]</sup>以大型蚤为受试生物,通过急性和慢性实验均发现 nC<sub>60</sub> 会抑制大型蚤的生长代谢,对水生生态系统的影响不容忽视。虽然众多研究报道指出 nC<sub>60</sub> 对多种生物体存在毒性效应,但对于其毒性机理、强度还没有一个统一的论断。NMs 对四膜虫的生物毒性研究结果如表 1 所示。

表 1 不同 NMs 对四膜虫的生物效应

Table 1 Biological effects of different NMs on *Tetrahymena*

纳米材料 Nanomaterials	作用机制 Mechanism	毒性大小 Toxicity	影响因素 Influencing factors
纳米银 AgNPs	主要与 Ag <sup>+</sup> 的释放有关 Mainly related to the release of Ag <sup>+</sup>	Ag <sup>+</sup> >AgNPs	光照;浓度;溶解性 Light; concentration; solubility
纳米氧化锌 ZnONPs	主要与 Zn <sup>2+</sup> 的释放有关 Mainly related to the release of Zn <sup>2+</sup>	ZnO ≈ ZnONPs ≈ Zn <sup>2+</sup>	浓度 Concentration
纳米二氧化钛 TiO <sub>2</sub> NPs	光照造成细胞氧化损伤,浓度过高阻碍细胞代谢 Light causes oxidative damage to cells, and high concentrations prevent cell metabolism	—	浓度;光照 Concentration; light
纳米三氧化二铝 Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> NPs	抑制率与浓度成正比 Inhibition rate is proportional to concentration	—	浓度 Concentration
纳米氧化铜 CuONPs	与 Cu <sup>2+</sup> 的释放有关 Related to the release of Cu <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup> >CuONPs>CuO	溶解性 Solubility
纳米金 AuNPs	—	基本无毒 Non-toxicity	—
量子点 Quantum dots (QDs)	抑制率与浓度成正比,与尺寸成反比 Inhibition rate is proportional to concentration; inversely proportional to size	CdSe>Ag <sub>2</sub> Se	浓度;尺寸;组成 Concentration; size; composition

续表1

纳米材料 Nanomaterials	作用机制 Mechanism	毒性大小 Toxicity	影响因素 Influencing factors
单壁碳纳米管 Single walled carbon nanotubes (SWCNTs)	抑制率与浓度成正比 Inhibition rate is proportional to concentration	—	浓度 Concentration
多壁碳纳米管 Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)	癸胺修饰的 MWCNTs 有抑制作用 Indoleamine modified MWCNTs have inhibitory effect	—	修饰基团类别 Modifying group category
富勒烯 nC <sub>60</sub>	—	nC <sub>60</sub> >CuONP, SWCNTs	浓度 Concentration

综上所述, NMs 对四膜虫的生物效应影响因素众多(颗粒尺寸、浓度、溶解度、修饰基团、光和时间等), 其中部分金属及金属氧化物颗粒的溶解度会极大地影响它们的毒性效应, 难溶金属、非金属 NMs 可通过与细胞直接接触或生物富集对细胞、生态系统造成毒性影响。当前关于 NMs 的生物毒性研究集中于材料对生物体中细胞形态结构、行为变化、生长动力学、生长代谢和生理生化等指标的测定, 缺乏 NMs 在环境中的残留和生物富集效应评估。因此, 加强对 NMs 在生产、使用、降解和转运信息的收集, 从多层次、多角度进一步研究其毒性作用机制, 才能更好、更全面地评估其对人类和生态系统的影响。

#### 4 总结与展望 (Summary and outlook)

科技让生活更简单。当前世界各国都对富有战略意义的 NMs 给予了足够的重视, 但对于 NMs 可能对生物造成的危害还没有一个准确的判断, 无法对市场进行有效、规范的监管。当前研究 NMs 对生物体的毒性效应面临着多重挑战: 影响因素复杂; 模式生物众多, 结论不一; 体内实验与体外实验作用环境不同, 外推结论存在争议性; 大多数毒性研究不依据现实的环境暴露条件来确定剂量-反应参数, 影响准确评估 NMs 对生物的暴露风险评估, 对建立一个完整的 NMs 的生物效应知识框架是一个极大地挑战<sup>[47-48]</sup>。

四膜虫是良好的模式生物, 可以从细胞水平直接评估 NMs 的生物效应。随着分子技术、仪器分析的不断发 展, 将更加快速、灵敏和准确地检测出 NMs 的转运途径、作用机制及毒性大小, 此外还应从基因表达分析、蛋白组学分析和代谢组学分析等多方面入手, 结合理化分析更加准确、全面地探索 NMs 的生物效应, 为人类社会生活的进步增福添祉。

通讯作者简介: 苏锐(1976-), 女, 应用化学博士, 讲师, 主要

研究方向为环境毒理学, 发表学术论文 10 余篇。

#### 参考文献 (References):

- [1] Zaporotskova I V. Nanotechnologies and nanomaterials: Scientific, economic and political realia of the new century [J]. Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Universiteta, 2015(1): 18-29
- [2] Pietroiusti A, Stockmann-Juvala H, Lucaroni F, et al. Nanomaterial exposure, toxicity, and impact on human health [J]. Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine & Nanobiotechnology, 2018(2): e1513
- [3] Moskowitz S L. Nanomaterials [M]// Advanced Materials Innovation. John Wiley & Sons, Inc., 2016: 287-314
- [4] Zhang M, Jin J, Chang Y N, et al. Toxicological properties of nanomaterials [J]. Journal of Nanoscience & Nanotechnology, 2014, 14(1): 717-729
- [5] 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 [J]. 生态学报, 2016, 36(18): 5956-5966  
Zhuang W, Chen Q, Zhou F X. An overview of engineered nano-particle ecotoxicology in aquatic environments: Mechanisms and optimal model organisms [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(18): 5956-5966 (in Chinese)
- [6] Herrmann L, Erkelenz M, Aldag I, et al. Biochemical and molecular characterisation of *Tetrahymena thermophila* extracellular cysteine proteases [J]. BMC Microbiology, 2006, 6(1): 1-9
- [7] Chen X J, Feng W S, Yu Y H. Comparisons among six strains of *Tetrahymena*, by microcalorimetry [J]. Journal of Thermal Analysis & Calorimetry, 2014, 115(3): 2151-2158
- [8] Sharon G, Leibowitz M P, Chettri J K, et al. Comparative study of infection with *Tetrahymena*, of different ornamental fish species [J]. Journal of Comparative Pathology, 2014, 150(2-3): 316-324
- [9] Lynn D H, Doerder F P. The life and times of *Tetrahymena*

- mena* [J]. *Methods in Cell Biology*, 2012, 109: 9-27
- [10] Jie X, Lu X Y, Lu Y M, et al. *Tetrahymena*, gene expression database (TGED): A resource of microarray data and co-expression analyses for *Tetrahymena* [J]. *Science China: Life Sciences*, 2011, 54(1): 65-67
- [11] Cassidy-Hanley D M. Chapter 8-*Tetrahymena* in the Laboratory: Strain Resources, Methods for Culture, Maintenance, and Storage [M]// *Methods in Cell Biology*. Elsevier Science & Technology, 2012: 237-276
- [12] Wang Y, Lin D, Yao C, et al. Toxic effects of metal oxide nanoparticles and their underlying mechanisms [J]. *Science China: Materials*, 2017, 60(2): 93-108
- [13] Ruehle M D, Orias E, Pearson C G. *Tetrahymena* as a unicellular model eukaryote: Genetic and genomic tools [J]. *Genetics*, 2016, 203(2): 649-665
- [14] Chen X J, Feng W S, Yu Y H. Studies on the nongrowth metabolism of the different strains of *Tetrahymena*, cells by isothermal microcalorimetry [J]. *Journal of Thermal Analysis & Calorimetry*, 2014, 115(3): 2145-2149
- [15] Yan L, Gu Z, Zhao Y. Chemical mechanisms of the toxicological properties of nanomaterials: Generation of intracellular reactive oxygen species [J]. *Chemistry-An Asian Journal*, 2013, 8(10): 2342-2353
- [16] Dev A, Srivastava A K, Karmakar S. Nanomaterial toxicity for plants [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 16(1): 1-16
- [17] Juganson K, Mortimer M, Kasemets K, et al. *Tetrahymena thermophila*, converts toxic silver ions to less toxic silver nanoparticles [J]. *Toxicology Letters*, 2012, 211(3): S206-S206
- [18] Juganson K, Mortimer M, Ivask A, et al. Mechanisms of toxic action of silver nanoparticles in the protozoan *Tetrahymena thermophila*: From gene expression to phenotypic events [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 225: 481-489
- [19] Shi J P, Ma C Y, Xu B, et al. Effect of light on toxicity of nanosilver to *Tetrahymena pyriformis* [J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2012, 31(7): 1630-1638
- [20] Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, et al. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: A critical review [J]. *Archives of Toxicology*, 2013, 87(7): 1181-1200
- [21] Wang D, Lin Z, Wang T, et al. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 308: 328-334
- [22] Chen J, Lu Y G, Sun C. Cytotoxic responses and potential health effects of nanosized ZnO on *Tetrahymena thermophila* [J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 490-495: 3192-3196
- [23] Mortimer M, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila* [J]. *Toxicology*, 2010, 269(2-3): 182-189
- [24] Ildikó F K, Píszmán D, Molnár M. Particle size and concentration dependent ecotoxicity of nano- and microscale TiO<sub>2</sub>, -comparative study by different aquatic test organisms of different trophic levels [J]. *Water Air & Soil Pollution*, 2017, 228(7): 245
- [25] Xiong D, Fang T, Yu L, et al. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage [J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(8): 1444-1452
- [26] Wang J, Wang W X. Significance of physicochemical and uptake kinetics in controlling the toxicity of metallic nanomaterials to aquatic organisms [J]. *Journal of Zhejiang University Science A*, 2014, 15(8): 573-592
- [27] Zou X Y, Xu B, Yu C P, et al. Imbalance between oxidative and antioxidative systems: Toward an understanding of visible light-induced titanium dioxide nanoparticles toxicity [J]. *Chemosphere*, 2013, 93(10): 2451-2457
- [28] Daoud D A, Saad A, Saud A. Nanoalumina induces apoptosis by impairing antioxidant enzyme systems in human hepatocarcinoma cells [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10(5): 3751-3760
- [29] 祝星. 纳米氧化铝致斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)生态毒性效应的研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2012: 1-44  
Zhu X. A study of ecological toxicity induced by nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on *Scenedesmus obliquus* [D]. Wuhan: Central China Normal University, 2012: 1-44 (in Chinese)
- [30] Zhou M Y, Zhao Q F, Wu Y J, et al. Cytotoxic mechanism of aluminium oxide nanoparticles to *Tetrahymena pyriformis* [J]. *Journal of Biology*, 2012, 29(6): 47-52
- [31] Khalaj M, Kamali M, Khodaparast Z, et al. Copper-based nanomaterials for environmental decontamination—An overview on technical and toxicological aspects [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2018, 148: 813-824
- [32] Moschini E, Gualtieri M, Colombo M, et al. The modality of cell-particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO<sub>2</sub> in human alveolar epithelial cells [J]. *Toxicology Letters*, 2013, 222(2): 102-116
- [33] Nur S R, Azhar A R, Azlan A A, et al. Effects of the gold nanoparticles (AuNPs) on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture [J]. *Solid State Phenomena*, 2017, 4479(268): 254-258

- [34] 徐斌, 史俊朋, 张洪武. 纳米金颗粒进入梨形四膜虫体内的方式及其分布[J]. 环境化学, 2012, 31(11): 1803-1807  
Xu B, Shi J P, Zhang H W. The uptake and distribution of gold nanoparticles in *Tetrahymena pyriformis* [J]. Environmental Chemistry, 2012, 31(11): 1803-1807 (in Chinese)
- [35] Mortimer M, Kahru A, Slaveykova V I. Uptake, localization and clearance of quantum dots in ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila* [J]. Environmental Pollution, 2014, 190(7): 58-64
- [36] Werlin R, Priester J H, Mielke R E, et al. Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain [J]. Nature Nanotechnology, 2011, 6(1): 65-71
- [37] 罗慧. CdSe 和 Ag<sub>2</sub>Se 量子点的生物效应研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2015: 1-56  
Luo H. The biological effect research of CdSe and Ag<sub>2</sub>Se QDs [D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2015: 1-56 (in Chinese)
- [38] Sarkar B, Mandal S, Tsang Y F, et al. Designer carbon nanotubes for contaminant removal in water and wastewater: A critical review [J]. Science of the Total Environment, 2018, 612: 561-581
- [39] Ghafari P, St-Denis C H, Power M E, et al. Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa [J]. Nature Nanotechnology, 2008, 3(6): 347-351
- [40] Zhu Y, Ran T, Li Y, et al. Observation of growth stimulation of *Tetrahymena pyriformis* exposed to MWNTs [J]. Nuclear Techniques, 2007, 30(8): 689-693
- [41] Guo J X. Bio-effect of modified multiwall carbon nanotubes on *Tetrahymena pyriformis* [J]. Journal of Radiation Research & Radiation Processing, 2007, 25(6): 326-329
- [42] Mortimer M, Petersen E J, Buchholz B A, et al. Bioaccumulation of multiwall carbon nanotubes in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding or trophic transfer [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(16): 8876-8885
- [43] Uo M, Akasaka T, Watari F, et al. Toxicity evaluations of various carbon nanomaterials [J]. Dental Materials Journal, 2011, 30(3): 245-263
- [44] Tao X, Yu Y, Fortner J D, et al. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystal (nC<sub>60</sub>) on *Scenedesmus obliquus*: Evaluation of the sub-lethal photosynthetic responses and inhibition mechanism [J]. Chemosphere, 2015, 122: 162-167
- [45] Kahru A, Dubourguier H C. From ecotoxicology to nanotoxicology [J]. Toxicology, 2010, 269(2): 105-119
- [46] Huang B M, Lv X H, Wang Q L, et al. Toxicity assessments of fullerene to *Daphnia magna*: Acute toxicity and chronic toxicity [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2017, 36(4): 620-624
- [47] Slaveykova V, Sonntag B, Gutiérrez J C. Stress and protists: No life without stress [J]. European Journal of Protistology, 2016, 55(Pt A): 39-49
- [48] Kumar A, Kumar P, Anandan A, et al. Engineered nanomaterials: Knowledge gaps in fate, exposure, toxicity, and future directions [J]. Journal of Nanomaterials, 2014, 2014(7): 5-21 ◆