粒径对纳米氧化锌的生物累积和氧化应激的影响

李宁静, 许喆, 姚焜烨, 陈景文, 李雪花*

大连理工大学环境学院, 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连 116024

* 联系人, E-mail: lixuehua@dlut.edu.cn

2021-02-19 收稿, 2021-04-18 修回, 2021-04-21 接受, 2021-04-22 网络版发表

国家自然科学基金(21777019)资助

摘要 纳米ZnO的大量生产和使用,使其不可避免地被释放到水环境中,对水生生物产生潜在危害.研究表明,粒径是影响纳米ZnO水生毒性的重要因素之一.然而,纳米ZnO的粒径对其在生物体累积及诱导氧化应激的程度尚不清楚.为了阐明粒径对纳米ZnO的生物累积和诱导氧化应激的影响,本研究考察了大型溞(*Daphnia magna*)分别暴露于3种粒径ZnO(原始粒径为30、50和90 nm)时生物体Zn累积量、氧化应激生物标志物的动态变化,并分析了在单位内暴露剂量(单位Zn累积量)下粒径对纳米ZnO诱导大型溞氧化损伤的差异.结果显示,90 nm ZnO对大型溞的24 h活动受抑制率高于其他2种粒径的纳米ZnO.与30 nm ZnO相比,暴露于50或90 nm ZnO时大型溞体内的Zn累积量在暴露前期(6 h内)就有显著升高,且6 h时90 nm ZnO暴露组大型溞体内的Zn累积量显著高于50 nm ZnO暴露组($P<0.05$).该结果表明,90 nm ZnO相比于其他2种粒径的纳米ZnO更容易在大型溞体内累积.氧化应激生物标志物的测试结果显示,暴露于90 nm ZnO的大型溞体内单位Zn累积量对应的丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量显著高于30和50 nm ZnO暴露组($P<0.05$),表明在单位内暴露剂量下,90 nm ZnO造成大型溞氧化损伤的程度最高.这可能与90 nm ZnO的水动力学直径显著小于其他2种粒径的纳米ZnO有关.综上,水动力学直径相对较小的90 nm ZnO更容易被大型溞摄取和累积,且在单位内暴露剂量下诱导生物体氧化应激的能力更强.纳米材料的水生态风险评估不仅要考虑其原始粒径,更应该关注其在水相中的粒径大小.

关键词 纳米ZnO, 粒径, 大型溞, 氧化应激, 生物累积

纳米材料是指至少在一维尺度上介于1~100 nm的材料^[1,2].纳米材料得益于自身优异的理化性质,如量子尺寸效应,被广泛应用于各个领域^[3~6].预计2025年,纳米材料的全球市场价值将达到118亿美元^[7].其中,纳米ZnO因其高稳定性、抗菌性和光催化性,被应用于电子产品、化妆品、涂料、光催化剂、抗菌剂、陶瓷等行业^[8~10].纳米ZnO的大量生产和使用使其不可避免地被释放到水环境中,对水生生物产生潜在的危害^[11~14].

近年来,一些研究通过将水生生物暴露于给定剂量的纳米ZnO来评价其急性毒性^[15~18].然而纳米ZnO在水环境中的团聚、吸附等行为,可能降低其生物利

用度^[6,19~21],导致给定暴露剂量不能准确反映纳米ZnO在暴露介质中的实际浓度,从而影响其毒性评估.研究表明,水环境中的纳米ZnO,只有被生物体累积的部分(即内暴露剂量)才是对水生生物产生毒性效应的关键^[22,23].Zhang等人^[24]发现,纳米ZnO在细胞内的累积量与微藻的生长抑制率具有线性相关性.因此,研究纳米ZnO的生物累积对评价其水生毒性具有重要意义.

氧化应激是纳米ZnO对生物体造成损伤的重要毒性机制.当生物体暴露于纳米ZnO时,其可诱导生物体产生活性氧物种(reactive oxygen species, ROS),破坏抗氧化平衡,造成氧化损伤^[25~29].在正常的生理条件下,

引用格式: 李宁静, 许喆, 姚焜烨, 等. 粒径对纳米氧化锌的生物累积和氧化应激的影响. 科学通报, 2021, 66: 3219~3226

Li N J, Xu Z, Yao H Y, et al. Impact of particle size of zinc oxide nanoparticles on its bioaccumulation and oxidative stress responses (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 3219~3226, doi: [10.1360/TB-2021-0186](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0186)

生物体内的ROS是有氧代谢的产物。生物体内抗氧化防御系统维持着ROS的动态平衡。当体内ROS水平超过抗氧化防御系统的清除能力时,过量的ROS可能造成氧化损伤^[30-32]。研究表明,当大型溞暴露于纳米ZnO时,其可诱导大型溞体内的氧化应激生物标志物显著改变,并造成氧化损伤^[25]。

纳米ZnO的粒径也能影响其毒性效应^[13,33-35]。研究表明,随着ZnO的粒径增大(100和200 nm),海藻受到的生长抑制减弱^[35]。可能原因是小粒径纳米ZnO的比表面积相对较大,表面反应活性较强。然而,Samei等人^[13]研究了不同粒径纳米ZnO(20和40 nm)对微藻的生长抑制,发现纳米ZnO的粒径大小不影响其毒性。虽然目前的研究考虑了纳米ZnO在生物体内产生氧化应激的机制,但粒径大小对纳米ZnO的生物累积及诱导氧化应激的影响尚不清楚。

大型溞作为水生食物链中的重要环节,既能吞食初级生产者(例如藻类),又能被次级消费者摄取,对于水生食物链的物质平衡与能量转化起着重要作用^[23]。本研究以大型溞作为受试生物,选取3种不同粒径纳米ZnO(30、50和90 nm)作为研究对象,表征了其原始粒径和在暴露介质中的粒径大小,研究了不同粒径纳米ZnO对大型溞的生物累积和氧化应激机制。同时,引入单位内暴露剂量(单位Zn累积量),分析了不同粒径纳米ZnO诱导大型溞氧化损伤(丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量/Zn累积量, mol/g)的差异,揭示了单位内暴露剂量下粒径对纳米ZnO诱导大型溞氧化应激的影响。

1 材料与方法

(i) 实验材料。3种原始粒径分别为30、50和90 nm的ZnO(纯度>99%)购买自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。浓硝酸(65%~68%,分析纯)购买自天津市天力化学试剂有限公司。总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和MDA试剂盒购买自南京建成生物工程研究所。其余化学试剂均为分析纯试剂(纯度≥99%),购买自科密欧化学试剂有限公司。

(ii) 受试生物。大型溞放置于人工气候培养箱中培养。培养箱设置的条件为:温度(20±1)°C,光暗周期比16:8。饲以绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)。培养用水为自然曝气3 d以上的自来水(溶解氧>3 mg/L)。暴露介质为重组水。重组水成分包括CaCl₂·2H₂O: 294.0 mg/L; MgSO₄·7H₂O: 123.3 mg/L; NaHCO₃: 64.8 mg/L; KCl:

5.8 mg/L。重组水pH 7.8±0.2。

(iii) 暴露溶液配制及纳米ZnO的表征。称取10 mg纳米ZnO于烧杯中,加重组水分散至1 L并超声2 h,制备浓度为10 mg/L的纳米ZnO储备液,冷藏保存。暴露溶液(1 mg/L)通过重组水稀释上述储备液而得。使用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(FEI, Tecnai G2F30 STWIN, 美国)观察纳米ZnO的形貌和原始粒径,并分别对3种不同粒径纳米ZnO的TEM图像随机选取300个颗粒记录其粒径,用于计算纳米ZnO的原始粒径平均值^[36]。使用马尔文纳米粒度仪(Malvern, Nano-ZS90, 英国)测定暴露溶液(1 mg/L)中纳米ZnO的水动力学直径,表征其在暴露介质中的粒径大小。

(iv) 大型溞的活动受抑制率。在0~64 mg/L的范围内设置6个暴露浓度梯度进行纳米ZnO对大型溞的24 h活动受抑制率实验。实验容器为100 mL烧杯,每个浓度3组平行,每个暴露组放置10只幼溞(出生时间小于24 h)。幼溞在纳米ZnO溶液中暴露24 h后,观察其活动受抑制情况。判断标准:轻晃烧杯,15 s内幼溞活动距离不超过体长,视为其活动受到抑制^[37]。

(v) 大型溞体内Zn累积量的测定。将出生14 d的大型溞在干净的重组水中培养2 h,以除去其肠道中残留食物。然后,将其分别暴露于浓度为1 mg/L的30、50和90 nm ZnO悬浮液中0、2、6、12和24 h,暴露密度为10 mL/个体。每个暴露时间段结束,分别取10只移动的大型溞转移至干净的滤网中,用超纯水冲洗3次,以去除吸附在其表面的纳米ZnO,吸干水分,低温冷冻保存。将大型溞样品置于真空冷冻干燥机(Biocool, FD-1A-50, 中国)中冷冻干燥至恒重,浓硝酸消解。通过电感耦合等离子体发射光谱(inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, ICP-OES)(Agilent, 5100/5110 VDV, 美国)测定大型溞体内Zn累积量。

(vi) 大型溞体内氧化应激生物标志物的测定。将出生14 d的大型溞分别暴露于浓度为1 mg/L的30、50和90 nm ZnO悬浮液中0、2、6、12和24 h,每组3个平行,暴露密度为10 mL/个体。每个暴露时间段结束,分别取10只移动的大型溞转移至干净的滤网中,用超纯水冲洗3次,以去除吸附在其表面的纳米ZnO。吸干水分,称重,并加入0.9%的生理盐水,使用快速核算提取仪(Mpbio, FastPrep-24, 美国)进行匀浆。然后离心,取上清液用于4种氧化应激生物标志物的测定,包括T-SOD、CAT、GSH和MDA^[31]。抗氧化酶(T-SOD、

CAT)及抗氧化剂(GSH)对ROS的清除起着重要的作用。MDA是脂质过氧化物产物,可用于评价生物体氧化损伤的程度^[30]。大型蚤体内T-SOD活性和MDA含量的测定分别采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸比色法。钼酸铵可以迅速中止CAT分解过氧化氢(H₂O₂)的反应,并且与剩余的H₂O₂反应生成淡黄色的络合物。GSH分子中含有巯基(-SH),可以与二硫代二硝基苯甲酸反应生成黄色化合物。T-SOD活性、CAT活性和GSH含量单位为U/(mg protein),MDA单位为nmol/(mg protein)。

(vii) 纳米ZnO在大型蚤体内的Zn累积量对其诱导氧化损伤的影响。为了进一步比较纳米ZnO的粒径对其诱导大型蚤氧化损伤的影响,有必要先排除大型蚤体内Zn累积量对纳米ZnO诱导生物体氧化损伤的可能影响。在相同暴露时间点,基于式(1)计算了不同粒径纳米ZnO在单位内暴露剂量(单位Zn累积量)下诱导大型蚤氧化损伤的程度。其中, $C_{\text{MDA-per unit Zn}}$ 表示单位内暴露剂量对应的MDA含量(mol/g); C_{MDA} 表示纳米ZnO诱导产生的MDA含量(nmol/(mg protein)); C_{Zn} 表示大型蚤体内的Zn累积量($\mu\text{g}/(\text{g dry wt.})$)。

$$C_{\text{MDA-per unit Zn}} = \frac{C_{\text{MDA}}}{C_{\text{Zn}}} \quad (1)$$

(viii) 数据统计。实验数据采用SPSS 22.0软件进行统计分析,方差分析采用单因素方差分析(one way ANOVA), $P < 0.05$ 表示有显著性差异。实验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示(mean $\pm$ SD)。

2 结果与讨论

2.1 纳米ZnO的表征

纳米ZnO的形貌及原始粒径如图1所示。可以看出,

3种不同粒径纳米ZnO的颗粒形状呈球形。30、50和90 nm ZnO的原始粒径平均值分别为(24 $\pm$ 5)、(31 $\pm$ 8)和(66 $\pm$ 13) nm。

2.2 纳米ZnO在暴露介质中的粒径大小

在不同暴露时间点(0、2、6、12和24 h),纳米ZnO的水动力学直径变化情况如图2所示。纳米ZnO进入水相后会发生团聚。由于团聚效应,暴露溶液中纳米ZnO的水动力学直径大于其原始粒径。随着暴露时间增加,90 nm ZnO在6 h暴露期内水动力学直径显著增加,而在6~24 h无显著变化。50 nm ZnO的水动力学直径在6~12 h有显著增加,而30 nm ZnO的水动力学直径在24 h暴露期内无显著性变化。而且,在大多数暴露时间点(0、2和6 h),90 nm ZnO的水动力学直径显著小于30或50 nm ZnO($P < 0.05$)。结果表明,较小粒径的纳米颗粒因其具有较大的表面能,更容易发生团聚^[38]。Shao和Wang^[39]通过研究不同粒径纳米Ag(15和60 nm)在人工河口水中的团聚动力学,也发现较小粒径的纳米颗粒(Ag NPs, 15 nm)更容易发生团聚。

2.3 大型蚤的活动受抑制率

将大型蚤暴露于不同浓度的纳米ZnO 24 h,其活动受抑制率情况如图3(a)所示。暴露于90 nm ZnO的大型蚤活动受抑制率随暴露浓度的升高而增加。本研究中,在相同暴露浓度下,纳米ZnO的粒径越大,大型蚤的活动受抑制率越高。在最高暴露浓度下,暴露于90 nm ZnO的大型蚤活动受抑制率高达100%,显著高于30和50 nm ZnO暴露组($P < 0.05$)。该结果表明,90 nm ZnO对大型蚤的活动受抑制率高于其他2种粒径纳米ZnO。

图1 纳米ZnO的TEM图像。(a) 30 nm ZnO; (b) 50 nm ZnO; (c) 90 nm ZnO
Figure 1 TEM images of ZnO NPs. (a) 30 nm ZnO; (b) 50 nm ZnO; (c) 90 nm ZnO

图2 (网络版彩色)不同粒径纳米ZnO在重组水中的水动力学直径。柱形图上不同字母表示存在显著性差异($P < 0.05$)

Figure 2 (Color online) Hydrodynamic diameter of ZnO NPs with different particle sizes in reconstituted water. Different letters above each column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$)

2.4 大型溞体内Zn累积量的变化

大型溞暴露于不同粒径纳米ZnO, 24 h内其体内Zn累积量随时间的变化如图3(b)所示。暴露于不同粒径纳米ZnO的大型溞体内Zn累积量均高于对照组。与30 nm ZnO相比, 暴露于50或90 nm ZnO的大型溞体内Zn累积量在暴露前期(6 h内)就有显著升高。暴露6 h时, 90 nm ZnO暴露组的大型溞体内Zn累积量达到303 $\mu\text{g}/(\text{g dry wt.})$, 显著高于50 nm ZnO暴露组(113 $\mu\text{g}/(\text{g dry wt.})$) ($P < 0.05$)。该结果表明, 相比30和50 nm ZnO, 90 nm ZnO相对容易进入大型溞体内并累积。此外, 在6~12 h暴露期内, 暴露于90 nm ZnO的大型溞体内Zn累积量显著降低。其原因可能是大型溞对90 nm ZnO的消除速率大于吸收速率。当大型溞分别暴露于30、50和90 nm

ZnO 24 h时, 其体内Zn累积量分别为319、329和337 $\mu\text{g}/(\text{g dry wt.})$ 。

2.5 大型溞体内氧化应激生物标志物随Zn累积量的动态变化

(i) 30 nm ZnO诱导的氧化应激生物标志物水平随体内Zn累积量的动态变化。在2 h暴露期内, 大型溞体内T-SOD、CAT、GSH、MDA含量均无显著性变化(图4(a))。暴露6 h时, 大型溞体内的T-SOD活性显著增强至75.6 U/(mg protein) ($P < 0.05$), 表明生物体通过提高T-SOD活性以清除超氧阴离子自由基(O_2^-), 保护生物体免受损伤。暴露12 h时, 大型溞体内的Zn累积量、T-SOD活性及GSH含量均显著升高。该结果表明, 随着暴露时间的增加, 30 nm ZnO进入大型溞体内并显著累积, 大型溞通过提高其体内T-SOD活性和GSH含量以清除ROS。但是, 30 nm ZnO诱导产生的ROS量超过了其体内抗氧化酶和抗氧化剂的承载能力, 未能被抗氧化防御系统清除的过量ROS与其体内的不饱和脂肪酸发生反应, 造成了氧化损伤($P < 0.05$)。随着暴露时间延长, 大型溞体内Zn累积量进一步增加, GSH含量显著降低。

(ii) 50 nm ZnO诱导的氧化应激生物标志物水平随体内Zn累积量的动态变化。在2 h暴露期内, 大型溞体内Zn累积量及CAT活性显著升高($P < 0.05$), 表明50 nm ZnO可在暴露前期被大型溞摄取并累积。暴露2 h时Zn累积量为108 $\mu\text{g}/(\text{g dry wt.})$ (图4(b))。在2~6 h暴露阶段, 大型溞体内的CAT活性显著降低, 表明50 nm ZnO暴露下CAT活性受到抑制, 其转化 H_2O_2 的途径受

图3 (网络版彩色)大型溞暴露于不同粒径纳米ZnO 24 h的活动受抑制率及其体内Zn累积量的变化。(a) 大型溞的活动受抑制率; (b) 大型溞体内的Zn累积量。柱形图上不同字母表示存在显著性差异($P < 0.05$)

Figure 3 (Color online) The percentage of immobilisation of *Daphnia magna* and accumulated Zn in *Daphnia magna* exposed to ZnO NPs with different particle sizes for 24 h. (a) The percentage of immobilisation of *Daphnia magna*; (b) accumulated Zn in *Daphnia magna*. Different letters above each column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$)

阻。在6~12 h暴露阶段,其体内Zn累积量、T-SOD、CAT、GSH含量均无显著性变化。暴露24 h时,大型溞体内Zn累积量显著增加,MDA水平显著升高,表明大型溞体内的Zn累积量诱导了氧化损伤($P<0.05$)。

(iii) 90 nm ZnO诱导的氧化应激生物标志物水平随体内Zn累积量的动态变化。在6 h暴露期内,90 nm ZnO进入大型溞体内并显著累积,且诱导其体内T-SOD活性、GSH及MDA含量显著升高。暴露6 h时MDA含量为11.2 nmol/(mg protein)(图4(c))。该结果表明,进入大型溞体内的90 nm ZnO诱导产生 O_2^- ,大型溞通过提高其体内T-SOD活性以清除 O_2^- ,维持其体内ROS的动态平衡。然而,大型溞体内的T-SOD活性和GSH含量不足以清除过量的ROS,造成氧化损伤($P<0.05$)。在6~12 h暴露期内,大型溞通过自身调节,其体内Zn累积量显著降低,且其体内CAT被大量消耗,从而缓解了氧化损伤的程度。在12~24 h暴露期内,大型溞体内MDA含量进一步显著增加($P<0.05$)。该结果表明,进入大型溞体内的

90 nm ZnO诱导产生的过量ROS超过了其体内抗氧化防御系统的清除能力,进而加剧了大型溞的氧化损伤。

2.6 大型溞体内Zn累积量对纳米ZnO诱导氧化损伤的影响

氧化应激生物标志物的测定结果表明,在相同外暴露剂量下(1 mg/L),不同粒径纳米ZnO均诱导大型溞体内MDA含量随暴露时间增加而升高,如图5(a)所示。当大型溞分别暴露于30、50和90 nm ZnO 24 h时,其体内的MDA含量分别为11.0、13.6和62.8 nmol/(mg protein)。此外,当暴露6和24 h时,90 nm ZnO诱导大型溞体内的MDA含量显著高于30和50 nm ZnO暴露组($P<0.05$)。

根据式(1),计算单位内暴露剂量(单位Zn累积量)对应的MDA含量,进一步比较了单位内暴露剂量下粒径对纳米ZnO诱导大型溞氧化损伤的影响。由图5(b)可知,在大多数暴露时间点(6、12和24 h),90 nm ZnO暴

图4 (网络版彩色)暴露于不同粒径纳米ZnO的大型溞体内Zn累积量及氧化应激生物标志物的动态变化。(a) 30 nm ZnO; (b) 50 nm ZnO; (c) 90 nm ZnO

Figure 4 (Color online) Accumulated Zn and oxidative stress biomarkers changes in *Daphnia magna* exposed to ZnO NPs with different particle sizes. (a) 30 nm ZnO; (b) 50 nm ZnO; (c) 90 nm ZnO

图5 (网络版彩色)暴露于不同粒径纳米ZnO 24 h内大型溞体内MDA含量的变化。(a) 相同外暴露剂量(1 mg/L); (b) 单位内暴露剂量(单位Zn累积量)。柱形图上不同字母表示存在显著性差异($P<0.05$)

Figure 5 (Color online) MDA content in *Daphnia magna* during 24 h exposure to ZnO NPs with different particle sizes. (a) The same external exposure dose (1 mg/L); (b) the unit internal exposure dose (unit Zn accumulation). Different letters above each column indicate statistically significant differences ($P<0.05$)

露组的单位Zn累积量对应的MDA含量显著高于30或50 nm ZnO暴露组($P<0.05$), 表明大型蚤体内Zn累积量对纳米ZnO诱导氧化损伤存在一定程度的影响。此外, 在12~24 h暴露期内, 90 nm ZnO暴露组的单位Zn累积量对应的MDA含量进一步升高, 而其他2种粒径ZnO暴露组的单位Zn累积量对应的MDA含量显著降低($P<0.05$)。该结果表明, 大型蚤通过体内抗氧化酶和抗氧化剂的调节, 缓解了30和50 nm ZnO对其造成的氧化损伤程度。

前人研究表明, 纳米颗粒的粒径越小, 其毒性越大^[33,34]。本研究中, 在24 h暴露期内的大多数暴露时间点, 90 nm ZnO暴露组的单位Zn累积量对应的MDA含量显著高于30和50 nm ZnO暴露组, 表明90 nm ZnO造成大型蚤的氧化损伤程度最高。纳米ZnO的团聚行为会影响其毒性效应^[6,21,34]。尽管90 nm ZnO的原始粒径高于其他2种粒径的纳米ZnO, 但是当分散在暴露介质中时, 90 nm ZnO的较小表面能使其在暴露介质中的水动力学直径相对较小。这可能是90 nm ZnO相对容易被大

型蚤摄取和累积且对大型蚤造成的氧化损伤程度相对较高的原因。与此同时, 本研究中30和50 nm ZnO可能因其具有相似的水动力学直径, 使得在多数暴露时间点对大型蚤的氧化损伤无显著差异。Bhuvaneshwari等人^[34]通过比较2种具有不同水动力学直径纳米ZnO的毒性, 也发现水动力学直径相对较小的纳米ZnO对生物的毒性更大。

3 结论

本研究以3种不同粒径纳米ZnO作为研究对象, 分析了在单位内暴露剂量下不同粒径的纳米ZnO诱导大型蚤氧化损伤的差异, 揭示了粒径对纳米ZnO的生物累积和诱导氧化应激的影响。研究发现, 与30和50 nm ZnO相比, 90 nm ZnO相对容易进入大型蚤体内并累积, 且在单位内暴露剂量下对大型蚤的氧化损伤程度更高, 这可能与90 nm ZnO的水动力学直径相对小于其他2种粒径纳米ZnO有关。结果表明, 纳米材料在水相中的粒径大小是其水生态风险评价中的重要评价指标之一。

参考文献

- Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, et al. Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*, 2008, 17: 326–343
- Lidén G. The European commission tries to define nanomaterials. *Ann Occup Hyg*, 2011, 55: 1–5
- Joo S H, Zhao D. Environmental dynamics of metal oxide nanoparticles in heterogeneous systems: A review. *J Hazard Mater*, 2017, 322: 29–47
- Ganguly P, Breen A, Pillai S C. Toxicity of nanomaterials: Exposure, pathways, assessment, and recent advances. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4: 2237–2275
- Liu Q, Wang X, Xia T. Creative use of analytical techniques and high-throughput technology to facilitate safety assessment of engineered nanomaterials. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410: 6097–6111
- Liu Y, Chen C Y. Development and prospect of biological effects and safety of nanomaterials (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 3825–3842 [刘颖, 陈春英. 纳米生物效应与安全性研究展望. 科学通报, 2018, 63: 3825–3842]
- Lai R W S, Yeung K W Y, Yung M M N, et al. Regulation of engineered nanomaterials: Current challenges, insights and future directions. *Environ Sci Pollut Res*, 2018, 25: 3060–3077
- Hou J, Liu H, Zhang S, et al. Mechanism of toxic effects of nano-ZnO on cell cycle of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 2019, 229: 206–213
- Parihar V, Raja M, Paulose R. A brief review of structural, electrical and electrochemical properties of zinc oxide nanoparticles. *Rev Adv Mater Sci*, 2018, 53: 119–130
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res*, 2012, 14: 1109
- Hao L, Chen L, Hao J, et al. Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2013, 91: 52–60
- Santo N, Fascio U, Torres F, et al. Toxic effects and ultrastructural damages to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: Does size matter? *Water Res*, 2014, 53: 339–350
- Samei M, Sarrafzadeh M H, Faramarzi M A. The impact of morphology and size of zinc oxide nanoparticles on its toxicity to the freshwater microalga, *Raphidocelis subcapitata*. *Environ Sci Pollut Res*, 2019, 26: 2409–2420
- Hou R F, Yin S, Dai Y H, et al. Distribution and trophic transfer of engineered nanoparticles along aquatic food chains and related influencing factors: A review (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 790–800 [侯瑞峰, 尹双, 代燕辉, 等. 人工合成纳米颗粒在水生食物链中的分布、传递及其影响因素. 科学通报, 2018, 63: 790–800]

- 15 Poynton H C, Lazorchak J M, Impellitteri C A, et al. Differential gene expression in *Daphnia magna* suggests distinct modes of action and bioavailability for ZnO nanoparticles and Zn ions. *Environ Sci Technol*, 2011, 45: 762–768
- 16 Xiao Y, Vijver M G, Chen G, et al. Toxicity and accumulation of Cu and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 4657–4664
- 17 Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 2008, 71: 1308–1316
- 18 Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, et al. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 2009, 76: 1356–1365
- 19 Bhuvaneshwari M, Iswarya V, Vishnu S, et al. Dietary transfer of zinc oxide particles from algae (*Scenedesmus obliquus*) to daphnia (*Ceriodaphnia dubia*). *Environ Res*, 2018, 164: 395–404
- 20 Lin D H, Ji J, Tian X L, et al. Environmental behavior and toxicity of engineered nanomaterials (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 3590–3604 [林道辉, 冀静, 田小利, 等. 纳米材料的环境行为与生物毒性. 科学通报, 2009, 54: 3590–3604]
- 21 Zhang W, Yao Y, Li K, et al. Influence of dissolved oxygen on aggregation kinetics of citrate-coated silver nanoparticles. *Environ Pollut*, 2011, 159: 3757–3762
- 22 Hou W C, Westerhoff P, Posner J D. Biological accumulation of engineered nanomaterials: A review of current knowledge. *Environ Sci-Process Impacts*, 2012, 15: 103–122
- 23 Hu Y, Wang Y L, Lin D H. A review of the toxicity of nanoparticles to *Daphnia magna* (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2017, 62: 2734–2748 [胡奕, 王艳龙, 林道辉. 纳米颗粒对大型蚤毒性效应的研究进展. 科学通报, 2017, 62: 2734–2748]
- 24 Zhang C, Wang J, Tan L, et al. Toxic effects of nano-ZnO on marine microalgae *Skeletonema costatum*: Attention to the accumulation of intracellular Zn. *Aquat Toxicol*, 2016, 178: 158–164
- 25 Mwaanga P, Carraway E R, van den Hurk P. The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. *Aquat Toxicol*, 2014, 150: 201–209
- 26 Chupani L, Niksirat H, Velišek J, et al. Chronic dietary toxicity of zinc oxide nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio* L.): Tissue accumulation and physiological responses. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 147: 110–116
- 27 Huang C W, Li S W, Liao V H C. Long-term sediment exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci-Nano*, 2019, 6: 2602–2614
- 28 Zhao X, Ren X, Zhu R, et al. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol*, 2016, 180: 56–70
- 29 Zhao X, Wang S, Wu Y, et al. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryonal larval zebrafish. *Aquat Toxicol*, 2013, 136–137: 49–59
- 30 Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol*, 2011, 101: 13–30
- 31 Yao H Y, Li X H, Zhang L L, et al. Effect of different surface functional groups of graphene on oxidative stress in *Daphnia magna* (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2019, 64: 419–429 [姚洪烨, 李雪花, 张丽丽, 等. 石墨烯表面官能团种类多样性对诱导大型蚤氧化应激的影响. 科学通报, 2019, 64: 419–429]
- 32 Ren C X, Hu X G, Zhou Q X. Review on attenuation of nanotoxicity and the mechanisms (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2016, 61: 707–717 [任朝秀, 胡献刚, 周启星. 降低纳米毒性的途径及其机理研究进展. 科学通报, 2016, 61: 707–717]
- 33 Khare P, Sonane M, Pandey R, et al. Adverse effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, 7: 116–117
- 34 Bhuvaneshwari M, Iswarya V, Archana S, et al. Cytotoxicity of ZnO NPs towards fresh water algae *Scenedesmus obliquus* at low exposure concentrations in UV-C, visible and dark conditions. *Aquat Toxicol*, 2015, 162: 29–38
- 35 Manzo S, Miglietta M L, Rametta G, et al. Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Sci Total Environ*, 2013, 445–446: 371–376
- 36 Huang Y, Li X H, Xu S J, et al. Quantitative structure-activity relationship models for predicting inflammatory potential of metal oxide nanoparticles. *Environ Health Perspect*, 2020, 128: 67010
- 37 Lv X, Yang Y, Tao Y, et al. A mechanism study on toxicity of graphene oxide to *Daphnia magna*: Direct link between bioaccumulation and oxidative stress. *Environ Pollut*, 2018, 234: 953–959
- 38 Peng C, Zhang W, Gao H, et al. Behavior and potential impacts of metal-based engineered nanoparticles in aquatic environments. *Nanomaterials*, 2017, 7: 21
- 39 Shao Z, Wang W X. Biodynamics of silver nanoparticles in an estuarine oyster revealed by 110 m AgNP tracing. *Environ Sci Technol*, 2019, 54: 965–974

Summary for “粒径对纳米氧化锌的生物累积和氧化应激的影响”

Impact of particle size of zinc oxide nanoparticles on its bioaccumulation and oxidative stress responses

Ningjing Li, Zhe Xu, Hongye Yao, Jingwen Chen & Xuehua Li*

Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, Ministry of Education, School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

* Corresponding author, E-mail: lixuehua@dlut.edu.cn

The extensive production and use of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) could inevitably increase their release into aquatic environment, presenting potential hazards to aquatic organisms. It is necessary to understand the bioaccumulation and aquatic toxicity of ZnO NPs for assessing their ecological risks. One major toxicity mechanism for ZnO NPs is oxidative stress. Previous studies have demonstrated that particle size is one of the most important factors determining aquatic toxicity of ZnO NPs, but the effects of particle size of ZnO NPs on their bioaccumulation and induction of oxidative stress responses are still unclear. The aim of this study was to investigate the impact of different particle sizes of ZnO NPs on their bioaccumulation and induction of oxidative stress biomarkers changes in *Daphnia magna*. Three types of ZnO NPs, having different primary particle sizes (30, 50 and 90 nm), were exposed to *Daphnia magna* for 24 h, afterward Zn accumulation and four oxidative stress biomarkers in *Daphnia magna* including total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were measured. Meanwhile, the differences of oxidative damage in *Daphnia magna* induced by 30, 50 and 90 nm ZnO NPs at unit internal exposure dose (per unit Zn accumulation) were compared. MDA is a good general indicator of lipid peroxidation and its accumulation can reflect the degree of oxidative damage in *Daphnia magna*. The results showed that the percentage of immobilisation of *Daphnia magna* exposed to 90 nm ZnO was higher than those exposed to 30 and 50 nm ZnO after 24 h of exposure. Compared to 30 nm ZnO treated groups, the accumulated Zn in *Daphnia magna* exposed to 50 and 90 nm ZnO immediately increased in the first exposure period (within the first 6 h). After 6 h of exposure, the Zn accumulation in *Daphnia magna* of 90 nm ZnO was significantly higher than that of 50 nm ZnO. The results indicated that 90 nm ZnO could enter and accumulate in *Daphnia magna* more easily than 30 and 50 nm ZnO. The oxidative stress biomarkers measurements demonstrated that the MDA concentrations per unit Zn accumulation in *Daphnia magna* for 90 nm ZnO were significantly higher than those for 30 and 50 nm ZnO. The results indicated that the degree of oxidative damage in *Daphnia magna* induced by 90 nm ZnO was more serious than 30 and 50 nm ZnO treated groups, which may be related to the fact that the hydrodynamic diameters of 90 nm ZnO were significantly smaller than those of 30 and 50 nm ZnO. In addition, the level of T-SOD activity, CAT and GSH in *Daphnia magna* induced by 90 nm ZnO changed significantly at most time points. In summary, our findings showed that 90 nm ZnO with smaller hydrodynamic diameter was more likely to enter and accumulate in *Daphnia magna*, and resulted in more serious oxidative stress in *Daphnia magna*. These results suggested that we should not only consider primary particle sizes of nanoparticles, but also pay more attention to their hydrodynamic diameters in aquatic environmental systems for assessing the environmental risks of nanoparticles.

zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), particle size, *Daphnia magna*, oxidative stress, bioaccumulation

doi: [10.1360/TB-2021-0186](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0186)