

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210511002

李青, 张帅, 王济. 天然有机质对 TiO₂ 纳米颗粒与 PCB-77 藻类毒性影响及致毒机理[J]. 生态毒理学报,2021, 16(6): 244-255 Li Q, Zhang S, Wang J. Effect and mechanism of natural organic matter on toxicity of TiO₂ nanoparticles and PCB-77 to algae [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(6): 244-255 (in Chinese)

天然有机质对 TiO₂ 纳米颗粒与 PCB-77 藻类毒性影 响及致毒机理

李青^{1,2},张帅^{1,2,*},王济^{1,2}

贵州师范大学地理与环境科学学院,贵阳 550025
 贵州省喀斯特山地生态环境国家重点实验室培育基地,贵阳 550025
 收稿日期:2021-05-11
 录用日期:2021-07-18

摘要:为探究天然有机质(natural organic matter, NOM)对纳米二氧化钛(TiO₂)与3,3',4,4'-四氯联苯(3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, PCB-77)藻类毒性影响及致毒机理,以小球藻为实验受试生物,测定了纳米TiO₂与PCB-77单独及复合暴露在NOM存在与不存在条件下对小球藻生长、细胞形态、活性氧(reactive oxygen species, ROS)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的影响。结果表明,所有暴露组均对小球藻的生长有一定的抑制作用。团聚沉降实验结果说明,纳米TiO₂在水环境中易团聚,PCB-77和NOM通过影响纳米TiO₂团聚进而影响小球藻的生长,这些团聚体附着在藻细胞表面,导致细胞间相互遮蔽,影响藻细胞光合作用和细胞呼吸,进而影响藻细胞生长,与实时定量PCR检测基因的结果一致。用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察发现,纳米TiO₂单独暴露与PCB-77复合暴露在NOM存在与不存在条件下,藻细胞周围附着纳米TiO₂,有一部分进入藻细胞内部,使细胞膜破损、质壁分离、细胞器结构不清晰以及出现电子致密体和空泡结构,小球藻细胞形态遭到损坏,这是直接接触造成的物理损伤。通过测定藻细胞内 ROS和MDA含量可知,暴露在纳米TiO₂中产生ROS含量最高,所受的氧化损伤最大,氧化胁迫是纳米TiO₂致毒机理之一。因此,NOM 对纳米TiO₂与PCB-77藻类致毒机理的影响归纳为吸附团聚作用所造成的遮蔽效应、直接接触的物理损伤和产生大量ROS造成的氧化损伤。

关键词:纳米 TiO₂;天然有机质;PCB-77;小球藻;毒性效应;致毒机理 文章编号:1673-5897(2021)6-244-12 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

Effect and Mechanism of Natural Organic Matter on Toxicity of TiO₂ Nanoparticles and PCB-77 to Algae

Li Qing^{1,2}, Zhang Shuai^{1,2,*}, Wang Ji^{1,2}

1. College of Geography and Environmental Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550025, China

2. State Key Laboratory Breeding Base for Karst Mountain Eco-environment of Guizhou Province, Guiyang 550025, China

Received 11 May 2021 accepted 18 July 2021

Abstract: In order to explore the effect of natural organic matter (NOM) on algae toxicity induced by nano-TiO2

基金项目:国家自然科学基金资助项目(41807336);贵州省科技计划项目(黔科合基础[2020]1Y189;黔科合 LH 字[2017]7345 号;黔科合平 台人才[2018]576919);贵州师范大学 2016 年博士科研启动项目;贵州省世界一流学科建设计划项目:喀斯特生态环境学科(黔教科研发 [2019]125 号);学术学位授权点-环境科学与工程(硕)(0418001)

第一作者:李青(1995—),女,硕士研究生,研究方向为环境化学与环境毒理学,E-mail: 2307473960@qq.com

^{*} 通讯作者(Corresponding author), E-mail: ka-kui@163.com

and PCB-77 and its toxic mechanism, Chlorella vulgaris was used as the experimental organism. The effects of both presence and absence of NOM on the growth, cell morphology, contents of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA), activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) of Chlorella vulgaris were determined. The results showed that the growth of Chlorella vulgaris was inhibited in all exposure groups. The agglomeration and sedimentation experiments showed that nano-TiO₂ was easy to agglomerate in water environment. PCB-77 and NOM affected the growth of *Chlorella vulgaris* by affecting the agglomeration of nano-TiO₂. These aggregates attachment to the surface of algae cells, resulting in mutual shielding between cells, which affecting the photosynthesis and cell respiration of algae cells, and eventually the growth of algae cells. This was therefore consistent with the results of real-time quantitative PCR. Transmission electron microscope observation showed that when nano-TiO₂ and PCB-77 were exposed alone or in combination with NOM, nano-TiO₂ adhered around the algal cells, some of which entered into the algal cells, causing cell membrane damage and plasmolysis, unclear organelle structure, electron dense body and vacuole structure, and thus damaged morphology of Chlorella vulgaris cells. All of which were the physical damages caused by direct contact. By measuring the content of ROS and MDA in algae cells, it can be seen that the exposure of the nano-TiO₂ lead to the highest content of ROS and the severest damage of the cells. Oxidative stress is one of the toxic mechanisms of nano-TiO₂. Therefore, the toxic mechanism of nano-TiO₂ and PCB-77 on algae with NOM can be summarized as follows: shielding effect caused by adsorption agglomeration, physical damage caused by direct contact and oxidation damage caused by excessive amount of ROS.

Keywords: nano-TiO₂; natural organic matter; PCB-77; Chlorella; toxic effects; toxic mechanism

随着纳米技术的快速发展,纳米材料被广泛运用于农业、工业和生活中。其中纳米二氧化钛 (TiO₂)是应用最广泛纳米材料之一,被用于化妆品、 医药、涂料、遮光剂和水处理等领域^[1-2],大量的使用 及生产,纳米 TiO₂ 不可避免地进入水环境中。多氯 联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是一种持久性 有机污染物,在环境中能持久存在、远距离迁移和生 物蓄积等。PCBs 不仅具有生殖毒性、免疫毒性、神 经毒性、内分泌干扰作用和潜在的致癌作用^[3],而且 会造成细胞氧化损伤和基因毒性^[4-5]。天然有机质 (natural organic matter, NOM)由腐殖质和富里酸等 腐殖酸类物质和非腐殖酸类物质组成^[6],广泛存在 自然水体中。这几种物质在水环境中迁移、转化和 发生相互作用,通过食物链间的传递,会对水生生物 产生毒性甚至影响整个生态系统。

水生生态系统复杂多变,纳米 TiO₂ 进入水环境 后与有机污染物及 NOM 复合效应及其机理不明, 因此,对二者的复合效应及其潜在机理的研究十分 必要。纳米 TiO₂ 对小球藻的毒性主要归因于氧化 压力、物理损伤及遮光效应等,此外,纳米 TiO₂ 在水 环境中易发生团聚^[7],吸附在藻细胞表面并抑制其 生长,这与先前研究纳米 Al₂O₃ 对藻类的毒性效应 一致^[8],纳米材料团聚体会对藻细胞产生一定的遮 光效应,进而抑制藻类光合作用从而影响其生长,这 也是纳米材料对藻类致毒机制之一。水体中广泛存 在的 NOM 会与纳米 TiO₂ 相互作用,改变其物理化 学性质及胶体行为,进而影响藻类毒性。有研究表 明,腐殖酸能通过减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成及物理损伤降低纳米 TiO₂ 对藻类的 毒性^[9]。有机污染物的细胞毒性主要归因于与生物 大分子和细胞器的相互作用,从而影响细胞的生长 和代谢^[10],例如,氯苯和 PCBs 引起内分泌紊乱、 DNA 损伤、电子转移与生物大分子相互作用^[11]。高 强光促使阿特拉津提高藻细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,引起脂质过氧化^[12]和抑制叶绿体光 系统II的电子转移和固碳^[13]。因此,理论上来说纳米 TiO₂ 和 PCBs 对生物有不同的毒性效应和致毒机理。

小球藻是自然水体中主要的初级生产者,具有 繁殖能力强、生长周期短、体积小,对多种毒物敏感、 可直接在细胞水平上观察等特点,常作为受试生物 来评估污染物对水生生物的毒性。目前,NOM 对 纳米 TiO₂ 与 3,3',4,4'-四氯联苯(3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, PCB-77)藻类毒性影响的相关研究很少, 其致毒机理未得到阐明。本文通过纳米 TiO₂ 与 PCB-77 单独及复合暴露在 NOM 存在与不存在条 件下,考察其对小球藻生长的影响和氧化损伤及其 团聚沉降。采用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)、红外差谱和实时定量 PCR 等方法从亚细胞和分子水平上揭示 NOM 对纳米 TiO₂ 与 PCB-77 的藻类毒性影响及致毒机理。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 化学品和生物

蛋白核小球藻(Chlorella vulgaris, FACHB-9)购 于中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库,用 经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)推荐培养基在智 能培养箱(广州韶关市广智科技设备有限公司,GZ-250-GI)中培养。纳米 TiO₂ 为锐钛型,粒径为5~10 nm,纯度为98%,购于浙江弘晟材料科技股份有限 公司。NOM 在国际腐殖质协会(International Humic Substances Society, IHSS)获得,编号为2R101N。纯 度为99%的 PCB-77 购买于上海阿拉丁生化科技股 份有限公司。

1.2 NOM 对纳米 TiO₂ 与 PCB-77 单独和复合暴 露对小球藻毒性的影响

将处于对数生长期的小球藻置于 250 mL 锥形 瓶中培养繁殖,锥形瓶置于光照恒温摇床中培养,瓶 中为 100 mL 含有不同污染物的 OECD 培养基。整 个实验在 110 r·min⁻¹的摇床中进行,未添加藻种时 溶液中未沉淀的纳米 TiO₂ 浓度在 80% 以上。培养 条件为(25±0.5) ℃、110 r·min⁻¹、光照度为(100±5) μ E·m⁻²·s⁻¹、光暗比为 14 h:10 h。藻的初始浓度设 置为 2×10⁵ cells·mL⁻¹,暴露 96 h 后,在光学显微镜 (南京江南永新光学有限公司,BM1000)下用血球计 数板对小球藻计数,得到各污染物对小球藻的 96 h 剂量-效应关系曲线,并用线性内插法计算出各污染 物 96 h 半数抑制浓度(96 h-IC₅₀)。

藻类生长抑制率实验分为 2 个部分。(1)测定小 球藻的单独毒性效应。纳米 TiO₂ 和 PCB-77 的浓度 分别为 0 ~ 30 mg·L⁻¹和 0 ~ 0.01 mg·L⁻¹,同时设置 空白对照组(CK)。(2)测定纳米 TiO₂ 与 PCB-77 复合 暴露时,NOM 对小球藻毒性的影响。①NOM 浓度 固定为 10 mg·L⁻¹(预实验得出在 NOM 对小球藻无 毒性情况下,对纳米 TiO₂ 和 PCB-77 毒性影响最大 浓度),改变纳米 TiO₂ 的浓度(4、8、12、16、20 和 30 mg·L⁻¹),测定 NOM 对纳米 TiO₂ 藻类毒性的影响。 ②PCB-77 在溶解度范围内对小球藻的生长抑制率 低于 50%(单独毒性实验得出),因此 PCB-77 与纳米 TiO₂复合毒性实验初始浓度配比为(0a, 0c)、(0.2a, 0.2b)、(0.4a, 0.4b)、(0.6a, 0.6b)、(0.8a, 0.8b)和(a, b)。 其中,a、b分别为纳米 TiO₂的参比浓度(IC₅₀附近) 和 PCB-77 的参比浓度(最大溶解浓度),分别为 20 mg·L⁻¹和 0.01 mg·L⁻¹。测定纳米 TiO₂ 与 PCB-77 复合暴露对小球藻的毒性。③在②的基础上添加 NOM(10 mg·L⁻¹),测定纳米 TiO₂ 与 PCB-77 复合暴 露时添加 NOM 对小球藻生长的影响。每 24 h 对消 耗的 PCB-77 进行补充。

1.3 NOM、纳米 TiO₂ 和 PCB-77 与藻细胞自沉降 和共沉降实验

为了探究不同暴露条件下小球藻沉降情况。暴露条件和藻类毒性实验的相同,纳米 TiO₂、PCB-77和 NOM 的初始浓度分别为16、0.008和10 mg·L⁻¹,小球藻初始浓度用 660 nm 处吸光度(A₆₆₀)表示,为0.2。用紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司,UV-5500)于 660 nm 波长处测定各悬浮液的吸光度(A)随时间的变化(总沉降时间 12 h)。计算出不同时间点的吸光值与初始吸光值(A₀)的比值 A/A₀,得到 A/A₀ 随时间的变化规律,绘制出各暴露组自沉降与共沉降曲线,从而得到 NOM 存在与不存在时PCB-77 对纳米 TiO₂ 与小球藻自沉降与混合共沉降的影响。

1.4 小球藻细胞氧化损伤的测定

实验测定不同暴露条件下培养 24 h 藻细胞中 ROS、MDA、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)。暴露条件和小 球藻初始浓度与毒性实验的相同,物质的初始浓度 与沉降实验的相同。MDA 含量与生物体受到的氧 化损坏伤密切相关,用硫代巴比妥酸测定 MDA 的 含量^[14]。用氧化敏感探针 5(6)-氯甲基-2',7'-二氯 荧光素二乙酸酯 (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'dichlorofluorescein diacetate, CM-H₂DCFDA)测定小 球藻细胞内 ROS^[15]。SOD 和 CAT 是生物体的抗氧 化酶, SOD 是抵御机体氧化损伤的第一道防线, CAT 可促使生物机体内的 H₂O₂ 分解为氧和水,使 机体细胞免受 H₂O₂ 的氧化损伤,消除过量的 ROS, 维持细胞内氧化还原平衡。测试按照 SOD 和 CAT 试剂盒说明进行(南京建成生物工程研究所)。

1.5 透射电镜观察

暴露条件和小球藻初始浓度与毒性实验的相同,物质的初始浓度与沉降实验的一样。培养 24 h 的小球藻细胞在戊二醛中固定、脱水、包埋和切片 后,使用 TEM(JEM-1230,日本电子公司)观察细胞 形态的变化^[14]。

1.6 红外差谱

傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)分析不同暴露条件下藻细胞有关化 学组分的变化。暴露条件和小球藻初始浓度与毒性 实验的相同,物质的初始浓度与沉降实验的相同。 培养96h后用密度平衡法分离^[16]藻细胞与游离纳 米颗粒,将收集到的藻细胞用磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.0)冲洗3遍后,冷冻干燥得到待测藻粉。1 mg 待测藻粉与100 mg KBr 混合研磨压片,用红外 光谱仪(Thermo Scientific Nicolet IS5,美国)进行测 定,设置分辨率4 cm⁻¹,在4000~400 cm⁻¹ 波数范 围内扫描32次,用 OMINIC 软件对得到的红外光谱 进行基线校正及归一化处理后,进行差谱分析。

1.7 基因测定

设置空白对照(CK)、PCB-77 和纳米 TiO₂ 复合 暴露(NOM 存在与不存在)实验组,培养条件和小球 藻初始浓度与毒性实验的相同,物质的初始浓度与 沉降实验的相同,培养 96 h 后,离心(4 000 r·min⁻¹、 5 min、4 ℃)收集藻细胞,并用 PBS(pH=7.0)清洗 2 遍。使用 UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒 (B511321,生工生物工程(上海)股份有限公司)提取 总 RNA,具体实验操作参考该产品说明书。测定提 取的 RNA 在 230 nm、260 nm 和 280 nm 处吸光值, 并计算 RNA 的浓度。当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~ 2.2 之间,且 A_{260}/A_{230} 比值介于 2.0 ~ 2.4 之间时,说明 RNA 纯度较高。选取了 13 个目的基因,详细信息 如表 1 所示。cDNA 第一链合成是在水浴的 nuclease-free PCR 管中进行相应的反应后,再在 PCR 仪

目的基因 Target gene	编码蛋白 Encoding protein	引物序列(5'~3') Primer sequence (5'~3')	产物长度/bp Product length/bp
accA	乙酰辅酶 A 羧化酶 Acetyl CoA carboxylase	F: CGCAATACCAAGGAGAACAT R: ACATCTCACGCAGGTTGAC	202
accD	乙酰辅酶 A 羧化酶 Acetyl CoA carboxylase	F: TAGTTTGTGCTTCGGGTGG R: CAATAAGGGCTTTCGGTTCA	227
Dgat7494	二酰基甘油酰基转移酶 Diacylglycerol acyltransferase	F: GCTCGCTGGGCCTGATGCTGTT R: GCGGATGAGCGGGAAGTAGA	186
Dgat3280	二酰基甘油酰基转移酶 Diacylglycerol acyltransferase	F: GGCACAAAGAGTTCACCGT R: ACAAACTTGAGGTGGGTG	236
ME	苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	F: CCCTCTCGTTCCCCTTTTATT R: AAATGCTGACGCAAGTGTGA	158
PEPC	磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 Phosphoenolpyruvate carboxylase	F: AAGGAGTGGGACGAGGATAAG R: GGTGTGGGACATTGAGATGAT	238
CAH2	碳酸酐酶 Carbonic anhydrase	F: GACTCCAACATTGCGAAGAT R:GGAAGAGGTCGGTCAGGT	109
rbcL	1,5- 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基 Ribose 1,5- diphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	F: CTTTCCAAGGTCCTCCTCAC R: TCTCTCCAACGCATAAATGG	208
HLA3	无机碳转运蛋白 Inorganic carbon transporters	F: TGATGTGCTTCCTCACCCT R: TCCAAAGTGTCCTGGTCCT	189
psbB	光系统 Ⅱ P680 叶绿素 a 脱辅基蛋白 Photosystem Ⅱ P680 deprotein of chlorophyll a	F: CACCGTCTGATTGAAGAGTTGC R: GATGTTCCTTTCCGTCGTTCTG	187
cox2	细胞色素 c 氧化酶亚基 Ⅱ Cytochrome c oxidase subunit Ⅱ	F: GAAGTGGATAATCGTATGGTTG R: CTGCATCACATTTTGCTCCTAA	115
atpB	ATP 合酶 CFI 亚基 ATP synthase CFI subunit	F: GTTTCGTTCAAGCTGGTTCT R: GTTCTTGTAAGCCACCCATT	105
ftsH	细胞分裂蛋白 ftsH Cell division protein ftsH	F: ACAAAGTGACCGAAATCCAGAA R:TTACGAATTGGGAGACTAGAA	129
actin	内参基因 Internal reference gene	F: GCTCAACTCCTCCACGCT R: GTCCTTGCGGATGTCCAC	187

表 1 目的基因的引物序列^[18-19] Table 1 Sequences of primer pairs used for real-time PCR^[18-19] 上按照相应的条件进行反转录反应。实时荧光定量 PCR 在 Step One Plus 型荧光定量 PCR 仪(ABI 公 司,美国)上进行。actin 作为内参基因,相对表达含 量是依据内参 actin 换算的,计算公式为 2^{-ΔΔC_p[17]}。

1.8 数据处理

本研究所有样品均设置 3 个平行,实验数据均 使用 Excel 2016 进行整理及计算,在 SPSS 22.0 中进行单因素 ANOVA 方差分析及 Dancan 多重比较法(差异性水平为 P<0.05),实验数据绘图使用 Origin 2017 完成。

2 结果(Results)

2.1 NOM、纳米 TiO₂ 和 PCB-77 对小球藻生长的 影响

由图 1(a)可知, PCB-77 和纳米 TiO₂ 单独胁迫 小球藻 96 h 的生长抑制率分别为 19.28% 和 64.00%,纳米 TiO₂ 对小球藻 96 h-IC₅₀ 是 22.30 mg· L⁻¹。纳米 TiO₂ 浓度越高对小球藻产生的生长抑制 率越高,高浓度(30 mg·L⁻¹)培养 96 h 后的小球藻, 藻细胞发黄,锥形瓶底部有藻细胞沉底,且有藻细胞 黏附在瓶壁上,这限制了藻细胞的游动,培养体系间 的营养物质和气体交换也可能受到影响。由图 1(b) 所示,NOM 使纳米 TiO₂ 对小球藻的毒性降低,降低 的最大百分比是 7.67%。由图 1(c)可知纳米 TiO₂ 与 PCB-77 复合暴露对藻细胞生长的影响,添加 NOM 后小球藻的生长抑制率显著增加,增大的最大百分比为9.97%。

2.2 NOM、纳米 TiO₂ 和 PCB-77 对小球藻团聚沉 降的影响

由图 2(a)所示,单独的藻细胞与 NOM 存在下 藻细胞的沉降曲线几乎重合,表明 NOM 对藻细胞 的自沉降影响可以忽略,但 PCB-77 单独胁迫时,小 球藻沉降速率加快,说明 PCB-77 对小球藻有一定 的毒性。由图 2(b)所示, PCB-77 对纳米 TiO, 的自沉 降无显著影响,PCB-77 对纳米 TiO, 悬浮液稳定性及 分散性能无显著影响^[20],添加 NOM 后,纳米 TiO, 和 PCB-77 沉降速率略微加快。由图 2(c)所示,纳米 TiO,与小球藻的共沉降效应非常明显,它们之间发 生了明显的团聚,纳米 TiO,包裹在小球藻表面,加快 了沉降速率。PCB-77 对纳米 TiO, 与小球藻的共沉 降速率无显著影响,虽然 PCB-77 对小球藻自沉降速 率有影响,但并不足以影响纳米 TiO, 与小球藻的共 沉降速率,因为纳米 TiO, 与小球藻的接触异团聚效 应较强,且团聚体较大,共沉降速率较快。添加 NOM 后,纳米 TiO, 与 PCB-77 和小球藻沉降速率加快。 2.3 NOM、纳米 TiO₂ 和 PCB-77 对藻细胞氧化损 伤的影响

如图 3(a)和 3(b)所示, MDA 含量的变化趋势与 ROS 的变化趋势基本一致, 暴露在纳米 TiO₂ 悬浮 液中, ROS 和 MDA 的含量最高, 说明藻细胞在纳米





注:PCB-77 为 3,3',4,4'-四氯联苯,TiO₂ NPs 为纳米二氧化钛,NOM 为天然有机质;(a) PCB-77 和 TiO₂ NPs 对小球藻的 96 h 生长抑制 剂量-效应曲线,(b) NOM 存在与不存在条件下 TiO₂ NPs 单独暴露时小球藻的 96 h 生长抑制剂量-效应曲线,(c) NOM 存在与不存在 条件下 TiO₂ NPs 和 PCB-77 复合暴露对小球藻的 96 h 生长剂量-效应曲线;*表示显著性差异(P<0.05)。

Fig. 1 The dose-effect curve of 96 h growth inhibition of *Chlorella vulgaris* by various pollutants alone or combined Note: PCB-77 is 3,3',4,4' -tetrachlorobiphenyl, TiO₂ NPs is nano-TiO₂ and NOM is natural organic matter; (a) 96 h growth inhibition dose-effect curve of PCB-77 and TiO₂ NPs on *Chlorella vulgaris*; (b) 96 h growth inhibition dose-effect curve of TiO₂ NPs on *Chlorella vulgaris* alone with or without NOM; (c) 96 h growth dose-effect curve of *Chlorella vulgaris* exposed to both TiO₂ NPs and PCB-77 with or without NOM; * means significant difference (P < 0.05).



图 2 各污染物单独及复合暴露对小球藻自沉降和共沉降的影响

注:(a) PCB-77、NOM 对小球藻沉降的影响;(b) PCB-77、NOM 对纳米 TiO,沉降的影响;(c) PCB-77、NOM 对纳米 TiO,和小球藻共沉降的影响。

Fig. 2 Effects of single and combined exposure of various pollutants on the self-sedimentation

and co-sedimentation of Chlorella vulgaris

Note: (a) Effects of PCB-77 and NOM on *Chlorella vulgaris* sedimentation; (b) The effects of PCB-77 and NOM on the deposition of nano-TiO₂; (c) The effect of PCB-77 and NOM on the co-sedimentation of nano-TiO₂ and *Chlorella vulgaris*.

TiO₂的作用下,发生了脂质过氧化造成氧化损伤, 破坏了细胞完整性。添加 NOM 后,藻细胞内 ROS 和 MDA 含量显著降低,可能是因为 NOM 覆盖在纳 米 TiO, 表面, 通过物理阻塞减少了纳米颗粒与藻细 胞的接触,从而缓解了纳米 TiO, 对藻细胞的氧化损 伤。Lin 等¹⁹报道腐殖酸能显著降低纳米 TiO, 引起 的 MDA 含量。PCB-77 单独胁迫和加入 NOM 后, 与空白实验组相比藻细胞中 ROS 和 MDA 含量变 化都不大,说明 PCB-77 和 NOM 对藻细胞内 ROS 和 MDA 含量的影响不大。PCB-77 组在加入 NOM 后 SOD 和 CAT 活性显著升高, 推测可能是由于 PCB-77 与 NOM 结合物对小球藻细胞内 SOD 和 CAT 活性有显著诱导作用,导致 SOD 和 CAT 基因 编码改变,使 SOD 和 CAT 活性升高^[21]。复合暴露 中ROS与MDA含量比单独PCB-77胁迫时高,说 明纳米 TiO, 是引起藻细胞内 ROS 和 MDA 含量变 化的主力,添加 NOM 后与空白对照组相比较 ROS 和 MDA 含量升高较少,说明氧化损伤不是该复合 暴露组的主要致毒机理。

生物体有自我调节能力,在氧化压力增大时, SOD与CAT的活性将提高以缓解氧化压力^[2]。因此CAT和SOD的活性与细胞受到的氧化压力有 关,当氧化压力胁迫过高,CAT和SOD也不能完全 消除氧化压力,将产生氧化损伤,当氧化损伤达到一 定程度,SOD与CAT的活性下降,细胞内ROS积累 更多,细胞逐渐受损凋亡。如图3(c)和3(d)所示,藻 细胞内SOD和CAT活性与MDA和ROS含量有较 好的相关性,细胞所受氧化压力较大时,SOD和 CAT 活性由于细胞的氧化应激而升高; MDA 和 ROS 含量较少时, SOD 和 CAT 也相对较低。

2.4 NOM、纳米 TiO₂ 和 PCB-77 对小球藻细胞结 构变化的影响

图 4 为不同处理条件下藻细胞透射电镜图,空 白对照组的藻细胞结构完整,细胞膜和细胞壁紧密 结合,淀粉粒和脂滴等能量物质比较丰富。藻细胞 单独暴露在纳米 TiO, 悬浮液中出现了质壁分离和 细胞膜破损,纳米 TiO,能使藻细胞的细胞壁和细胞 膜完整性受到破坏并且能使藻细胞的形态发生改 变,这与先前研究一致^[23],暴露在含有 NOM 的纳米 TiO, 悬浮液中的细胞形态相比较于单独暴露在纳 米 TiO, 悬浮液中的细胞损伤更小,这与 NOM 降低 纳米 TiO, 的藻类毒性结果相符。PCB-77 对小球藻 细胞形态影响较小, PCB-77 与纳米 TiO, 复合暴露 中,藻细胞外附着大量纳米 TiO2,细胞器结构不清 晰,并出现电子致密体,添加 NOM 后细胞器结构更 加不清晰,出现了较大的空泡结构。有纳米 TiO,存 在的实验组藻细胞内均出现含有电子致密体和空泡 的结构,而这些电子致密体和空泡结构在其他实验 组中并未出现,因此可以判断主要是由纳米 TiO,暴 露造成。推测也可能是藻细胞对纳米 TiO, 的胞吞 行为或对进入到细胞内的纳米 TiO, 及被纳米 TiO, 伤害细胞器的胞吐行为引起的。

2.5 NOM、纳米 TiO₂ 和 PCB-77 对藻细胞化学组成的影响

NOM、纳米 TiO₂和 PCB-77 会与细胞膜及细胞 内的生物大分子(如脂质、蛋白质、DNA/RNA等)相 互作用。如图 5(a)和 5(b)所示,3 396~3 419 cm⁻¹之间吸收峰是由水或碳水化合物中—OH 基团引起的^[24],表明藻细胞中含有碳水化合物。2 923~2 927 cm⁻¹之间的吸收峰是由脂质中—CH₂/—CH₃基团引起的^[25],无论 NOM 存在与否,暴露在纳米 TiO₂ 及纳 米 TiO₂ 与 PCB-77 复合条件下悬浮液中 2 925 cm⁻¹ 处峰强显著降低,表明小球藻脂质含量减少,这与 TEM 照片中观察到脂滴的情况相符。1 243~1 249 cm⁻¹之间的吸收峰是由磷脂中 P == O 非对称伸缩振动引起的^[26],1 648~1 654 cm⁻¹ 内的吸收峰是蛋 白质内酰胺带 I 的特征峰^[27-28],无论 NOM 存在与

否,在纳米 TiO₂ 及纳米 TiO₂ 与 PCB-77 复合处理组 藻细胞中均观察到这 2 处峰值在变化,说明小球藻 中磷脂含量减少,蛋白质结构发生了变化。1 000 ~ 1 200 cm⁻¹ 内的吸收峰在波动,这是由多糖中的 C—O—C 键引起的^[27],说明多糖的含量发生了变化。 多糖、磷脂和蛋白质是细胞膜的主要组成,所以多糖 和磷脂含量的变化以及蛋白质结构的改变可能与 NOM、纳米 TiO₂ 和 PCB-77 引起小球藻细胞膜损伤 有关。1 639 ~ 1 745 cm⁻¹ 和 800 ~ 900 cm⁻¹ 峰值的变 化源于 DNA/RNA 中 C = O 和 C = O 伸缩振动^[26]以 及核苷酸环状结构的 C = C、C = N 和 C—H 键^[25]。



图 3 各污染物单独及复合暴露对小球藻氧化损伤的影响

注:CK 为空白对照组,24 h 藻细胞内(a)活性氧(ROS)、(b)丙二醛(MDA)、(c)超氧化物歧化酶(SOD)和(d)过氧化氢酶(CAT)的测定值; 不同字母差异有统计学意义(P<0.05)。

Fig. 3 Effects of single and combined exposure of pollutants on oxidative damage of *Chlorella vulgaris* Note: CK is blank control group; the intracellular (a) reactive oxygen species (ROS), (b) malondialdehyde (MDA), (c) superoxide dismutase (SOD) and (d) catalase (CAT) were measured at 24 h; the difference of different letters was statistically significant (*P*<0.05).



图 4 各种污染物单独及复合暴露 24 h 后小球藻的 TEM 照片

注:图中白实线、黑实线、白虚线、黑虚线和黑点划线箭头分别指向淀粉粒、脂滴、细胞破损处、质壁分离处和粘附 在细胞壁上的纳米 TiO₂,白色方框为电子致密体和空泡结构。

Fig. 4 TEM images of Chlorella vulgaris exposed to various pollutants for 24 h

Note: The arrows with white solid line, black solid line, white dashed line, black dashed line and black dotted line point to starch granules, lipid droplets, cell damage, plasma wall separation and nano- TiO_2 adhered to cell wall

respectively; the white box shows electron dense body and vacuole structure.



图 5 各种污染物单独及复合暴露组小球藻的红外差谱

注:(a) NOM 存在与不存在条件下纳米 TiO₂ 单独暴露组和空白组藻细胞的红外差谱;(b) NOM 存在与不存在条件下 PCB-77 单独 和纳米 TiO₂ 复合暴露组藻细胞的红外差谱。

Fig. 5 Infrared difference spectra of *Chlorella vulgaris* exposed to various pollutants alone or in combination Note: (a) Infrared difference spectrum of algae cells exposed to nano-TiO₂ with or without NOM; (b) Infrared difference spectrum of algae cells exposed to PCB-77 with or without NOM.

2.6 NOM、纳米 TiO₂ 和 PCB-77 对藻细胞基因表达的影响

在 NOM 存在或不存在条件下,纳米 TiO, 与 PCB-77 复合暴露对藻细胞内 13 个基因表达的影响 如图6所示。所选基因参与调控藻细胞的脂肪合 成、光合作用、细胞呼吸及细胞分裂。乙酰 CoA 羧 化酶和二酰基甘油基转移酶分别为催化 TAG 合成 的第一步和最后一步关键步骤,如图6所示,纳米 TiO, 和 PCB-77 复合暴露中, 基因 accA、accD、 dgat7494 和 dgat3280 表达量下降,说明纳米 TiO, 和 PCB-77 复合处理藻细胞抑制 TAG 的合成与积累, 添加 NOM 后,此相关基因 accA、accD、dgat7494 和 dgat3280 表达量显著上升, NOM 能促进 TAG 的合 成与积累。复合暴露组中基因 ME 的表达量都显著 上调,说明苹果酸向丙酮酸的转化加快,导致苹果酸 含量降低,NOM 使苹果酸含量下降更加迅速。磷 酸烯醇式丙酮(PEP)酸羧化酶固定 CO,产生草酰乙 酸(OAA),经NADP专一的苹果酸脱氢酶催化形成 苹果酸。在细胞叶绿体中的 NADP 苹果酸酶催化 形成丙酮酸和释放 CO₂, CO₂ 通过卡尔文环固定产 生 3-磷酸甘油酸(PGA),再转化为糖和淀粉。NOM 使基因 PEPC 表达量显著下降表明藻细胞中苹果酸 没有得到及时补充,使藻细胞中糖和淀粉含量降低。

CAH2 和 rbcL 这 2 种基因主要参与光合作用的碳 固定反应,不同暴露组中藻细胞内这2个基因的表 达量均显著降低,参与光合作用光反应的基因 psbB 的表达量变化不大,编码无机碳转运蛋白基因 HLA3的表达量显著下降,参与ATP合成的叶绿体 基因 atpB 略微下降,这几种基因表达量下降表明纳 米 TiO, 与 PCB-77 复合暴露在 NOM 存在或不存在 条件下都抑制了藻细胞光合作用。cox2 表达量降 低,细胞色素 C 氧化酶是线粒体内膜上呼吸功能链 末端的特征峰,参与氧化磷酸化过程,说明线粒体呼 吸功能受到影响。细胞分裂蛋白基因 ftsH 表达量 下降,表明纳米 TiO, 与 PCB-77 复合暴露影响了小 球藻分裂。可见纳米 TiO, 与 PCB-77 复合暴露在 NOM 存在或不存在条件下均抑制或破坏小球藻光 合作用、细胞呼吸和细胞分裂,导致 ATP 合成减少, 进而产生细胞毒性。

3 讨论(Discussion)

由图 1 可知,纳米 TiO₂ 和 PCB-77 单独及复合 暴露在 NOM 存在或不存在条件下均对小球藻的生 长产生一定的影响,NOM 使纳米 TiO₂ 对小球藻的 毒性降低,研究表明,一定浓度范围内溶解态和结合 态腐殖酸均能显著降低纳米 TiO₂ 的藻类毒性^[9],富

图 6 NOM 存在与不存在条件下纳米 TiO₂ 和 PCB-77 复合暴露对藻细胞内 13 个基因的 mRNA 相对含量的影响 注:不同字母表示差异有统计学意义(P<0.05)。

Fig. 6 The mRNA relative levels of 13 genes in algal cells with and without NOM exposed to nano-TiO₂ and PCB-77 Note: Different letters indicate statistically significant differences (P < 0.05).

里酸的吸附能增大细菌与 CuO 纳米颗粒间的静电 斥力,形成一道物理屏障,阻碍 CuO 与细菌间的直 接接触,从而降低其毒性^[29]。NOM 可通过配体交 换的方式吸附在纳米 TiO₂ 表面,通过空间位阻和静 电斥力作用减少纳米 TiO₂ 与藻细胞的接触,从而降 低纳米 TiO₂ 的藻类毒性。复合暴露中,NOM 使小 球藻的生长抑制率显著增加,纳米 TiO₂ 能将溶液中 PCB-77 光降解的 O₂ 自由基转化为·OH 自由基,进 而降低 PCB-77 在溶液中的降解速率^[30],NOM 能抑 制吸附在石英上疏水性有机物(HOC)的解吸速 率^[31],进而影响小球藻的生长。

纳米颗粒与藻细胞的团聚沉降可影响小球藻的 生长速率,这也是纳米材料对藻类致毒机理之一^[14]。 纳米 TiO₂ 在水环境中易发生团聚,在与小球藻共暴 露的过程中,纳米 TiO₂ 团聚体吸附到藻细胞表面, 对藻细胞有一定的缠绕作用,限制了藻细胞的游动, 使细胞间产生相互遮蔽,阻碍藻细胞对营养物质及 光的吸收,进而加快藻细胞团聚沉降,影响藻细胞的 生长。这与纳米 TiO₂ 对月牙藻的毒性作用机理一

致^[32]。纳米 TiO, 与 PCB-77 复合暴露中 NOM 存在 加快小球藻沉降,团聚体包裹着小球藻,抑制小球藻 的光合作用,影响藻细胞呼吸,进而产生细胞毒性, 与实时定量 PCR 检测基因结果相符。从 TEM 照片 中看出,复合暴露中藻细胞外包裹有大量的纳米 TiO₂,藻细胞内细胞器结构不清晰,并且出现电子致 密体,NOM 存在使藻细胞质壁分离严重并出现空 泡结构,红外差谱分析中,纳米 TiO, 与 PCB-77 单独 及复合暴露在 NOM 存在时引起小球藻脂质、糖类 和蛋白质结构的变化,因此,推测复合污染物与小球 藻直接接触是导致毒性的一个重要原因。小球藻在 受到污染物胁迫时会直接产生大量的 ROS 造成藻 细胞氧化损伤,当细胞内 ROS 含量过高时,会与细 胞膜组织或细胞器膜脂质发生脂质过氧化,同时细 胞也会产生抗氧化酶 SOD 和 CAT 来缓解细胞氧化 损伤,但当ROS含量过高时,抗氧化酶也不能完全 消除氧化压力,从而引起藻细胞的细胞膜和细胞壁 损伤,发生质壁分离现象。研究表明,增大细胞氧化 胁迫是纳米 TiO₂ 致毒机理之一,且随纳米 TiO₂ 浓度

图 7 NOM、纳米 TiO₂ 和 PCB-77 对小球藻致毒机理示意图

Fig. 7 Toxic mechanism of NOM, nano-TiO2 and PCB-77 on Chlorella vulgaris

增加细胞受到氧化胁迫增加^[33],纳米 TiO₂ 与 PCB-77 复合暴露在 NOM 存在条件下,与空白对照组相 比 ROS 和 MDA 含量变化不显著,推测氧化损伤不 是该复合组的主要致毒途径,该复合组对小球藻生 长的影响主要是团聚沉降产生的遮蔽效应及接触性 物理损伤。

根据本实验研究结果,总结 NOM、纳米 TiO, 和 PCB-77 对小球藻的致毒机制如图 7 所示。纳米 TiO, 团聚体吸附在小球藻表面, 缠绕着藻细胞, 影 响藻细胞光合作用、细胞呼吸以及对营养物质的吸 收,从 TEM 中观察到,复合暴露中藻细胞外包裹有 大量的纳米 TiO₂,导致藻细胞内细胞器结构不清 晰,并且出现电子致密体,当 NOM 存在时藻细胞质 壁分离严重并出现空泡结构,进而造成细胞凋亡, NOM 存在时复合毒性增大的原因主要是遮蔽效应 和接触性物理损伤。ROS 会导致脂质过氧化,造成 细胞膜和细胞内膜损伤以及生物大分子变性。当细 胞内 ROS 含量较低时,藻细胞中 SOD 和 CAT 酶能 消除氧化压力保护藻细胞免受损伤,当细胞内 ROS 含量较高时,SOD与CAT 酶不能消除氧化压力时, 细胞内 ROS 积累更多,就会出现上述的不良反应, 之前研究表明,增大细胞氧化压力是纳米 TiO, 致毒 机理之一[33]。由 PCR 结果可知,纳米 TiO, 与 PCB-77 复合暴露在 NOM 存在与不存在条件下,能诱导 或抑制特定基因的表达来调控相关酶和蛋白质的合 成和表达,进而影响细胞呼吸、光合作用以及细胞代 谢,最终影响细胞和亚细胞结构以及细胞生长或增 殖。当藻细胞在受到这些污染物胁迫时还会引发一 些保护性反应来维持正常的细胞功能,包括渗透压调 节、细胞膜流动性以及细胞分裂等。当这些保护性反 应无法抵御污染物的进攻时,就会出现细胞膜损伤、 细胞器结构不清晰、质壁分离、生物大分子变性失活 以及光合作用和细胞呼吸受阻造成能量代谢紊乱等 破坏性反应,最终导致细胞毒性,造成细胞凋亡。

通讯作者简介:张帅(1984—),男,博士,副教授,主要研究方 向为环境化学和环境毒理学。

参考文献(References):

- [1] Zheng D, Wang N, Wang X M, et al. Effects of the interaction of TiO₂ nanoparticles with bisphenol A on their physicochemical properties and *in vitro* toxicity [J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 199-200: 426-432
- [2] Yan J, Lin B C, Hu C L, et al. The combined toxicologi-

cal effects of titanium dioxide nanoparticles and bisphenol A on zebrafish embryos [J]. Nanoscale Research Letters, 2014, 9(1): 406

- [3] Serdar B, LeBlanc W G, Norris J M, et al. Potential effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and selected organochlorine pesticides (OCPs) on immune cells and blood biochemistry measures: A cross-sectional assessment of the NHANES 2003-2004 data [J]. Environmental Health, 2014, 13: 114
- [4] Dong H, Su C Y, Xia X M, et al. Polychlorinated biphenyl quinone-induced genotoxicity, oxidative DNA damage and γ-H2AX formation in HepG2 cells [J]. Chemico-Biological Interactions, 2014, 212: 47-55
- [5] Attia S M, Ahmad S F, Okash R M, et al. Aroclor 1254induced genotoxicity in male gonads through oxidatively damaged DNA and inhibition of DNA repair gene expression [J]. Mutagenesis, 2014, 29(5): 379-384
- [6] Liu H M, Amy G. Modeling partitioning and transport interactions between natural organic matter and polynuclear aromatic hydrocarbons in groundwater [J]. Environmental Science & Technology, 1993, 27(8): 1553-1562
- [7] Ottofuelling S, Kammer F V D, Hofmann T. Nanoparticles in the aquatic environment-aggregation behavior of TiO₂ nanoparticles studied in a simplified aqueous test matrix (SAM) [J]. Journal of Geophysical Research, 2007, 9: 08876
- [8] Sadiq I M, Pakrashi S, Chandrasekaran N, et al. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2011, 13(8): 3287-3299
- [9] Lin D H, Ji J, Long Z F, et al. The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Chlorella* sp. [J]. Water Research, 2012, 46(14): 4477-4487
- [10] Blum D J W, Speece R E. Determining chemical toxicity to aquatic species [J]. Environmental Science & Technology, 1990, 24(3): 284-293
- [11] Li X, Zhang T, Min X M, et al. Toxicity of aromatic compounds to *Tetrahymena* estimated by microcalorimetry and QSAR [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 98(4): 322-327
- [12] 刘畅, 吴文娟, 李建宏, 等. 不同光强对阿特拉津和百 草枯藻类毒性的影响[J]. 环境科学学报, 2014, 34(5): 1339-1343
 Liu C, Wu W J, Li J H, et al. Effects of different light intensities on the toxicities of atrazine and paraquat to algae
 [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2014, 34(5): 1339-1343 (in Chinese)
- [13] Wang Z, Wang S, Peijnenburg W J G M. Prediction of

joint algal toxicity of nano-CeO₂/nano-TiO₂ and florfenicol: Independent action surpasses concentration addition [J]. Chemosphere, 2016, 156: 8-13

- [14] Long Z F, Ji J, Yang K, et al. Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes toxicity toward algae [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(15): 8458-8466
- [15] Zhang L Q, Lei C, Chen J J, et al. Effect of natural and synthetic surface coatings on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes toward green algae [J]. Carbon, 2015, 83: 198-207
- [16] Perreault F, Oukarroum A, Melegari S P, et al. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Chemosphere, 2012, 87(11): 1388-1394
- [17] Cui Y, Liu W, Xie W P, et al. Investigation of the effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) on apoptosis and cell cycle in a zebrafish (*Danio rerio*) liver cell line [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2015, 12(12): 15673-15682
- [18] Fan J H, Cui Y B, Zhou Y, et al. The effect of nutrition pattern alteration on *Chlorella pyrenoidosa* growth, lipid biosynthesis-related gene transcription [J]. Bioresource Technology, 2014, 164: 214-220
- [19] Sun X, Xu N J, Jiang L Z, et al. Gene expression profiles of the heterotrophic microalga *Chlorella pyrenoidosa* F-9
 [J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(4): 8411-8420
- [20] Zhang S, Deng R, Lin D H, et al. Distinct toxic interactions of TiO₂ nanoparticles with four coexisting organochlorine contaminants on algae [J]. Nanotoxicology, 2017, 11(9-10): 1115-1126
- [21] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(1): 25-37
- [22] Phyu Y L, Palmer C G, Warne M S J, et al. Assessing the chronic toxicity of atrazine, permethrin, and chlorothalonil to the cladoceran *Ceriodaphnia* cf. *dubia* in laboratory and natural river water [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2013, 64(3): 419-426
- [23] Kabra A N, Ji M K, Choi J, et al. Toxicity of atrazine and its bioaccumulation and biodegradation in a green mi-

croalga, *Chlamydomonas mexicana* [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21 (21): 12270-12278

- [24] Romih T, Jemec A, Novak S, et al. FTIR microscopy reveals distinct biomolecular profile of crustacean digestive glands upon subtoxic exposure to ZnO nanoparticles [J]. Nanotoxicology, 2016, 10(4): 462-470
- [25] Yu C X, Irudayaraj J. Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy [J]. Biopolymers, 2005, 77(6): 368-377
- [26] Lu W D, Alam M A, Pan Y, et al. A new approach of microalgal biomass pretreatment using deep eutectic solvents for enhanced lipid recovery for biodiesel production [J]. Bioresource Technology, 2016, 218: 123-128
- [27] Gelfand P, Smith R J, Stavitski E, et al. Characterization of protein structural changes in living cells using timelapsed FTIR imaging [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87 (12): 6025-6031
- [28] da Silva Ferreira V, ConzFerreira M E, Lima L M T R, et al. Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2017, 97: 114-121
- [29] Zhao J, Wang Z Y, Dai Y H, et al. Mitigation of CuO nanoparticle-induced bacterial membrane damage by dissolved organic matter [J]. Water Research, 2013, 47(12): 4169-4178
- [30] Zhu X D, Wang Y J, Qin W X, et al. Distribution of free radicals and intermediates during the photodegradation of polychlorinated biphenyls strongly affected by cosolvents and TiO₂ catalyst [J]. Chemosphere, 2016, 144: 628-634
- [31] Schmitt D, Kumke M, Seibel F, et al. The influence of natural organic matter (NOM) on the desorption kinetics of pyrene and naphthalene from quartz [J]. Chemosphere, 1999, 38(12): 2807-2824
- [32] Aruoja V, Dubourguier H C, Kasemets K, et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* [J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(4): 1461-1468
- [33] 冀静. 腐殖酸对纳米颗粒藻类毒性的影响及机理[D]. 杭州: 浙江大学, 2011: 32-34
 Ji J. The effect and its mechanism of humic acid on the algal toxicity of nanoparticles [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011: 32-34 (in Chinese)