

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160526001
周虹, 王大力, 葛鸿铭, 等. 磺胺与金属氧化物纳米颗粒对发光菌的急性联合毒性及其机制初探[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(5): 65-70
Zhou H, Wang D L, Ge H M, et al. Acute joint effects and mechanisms of binary toxicity of sulfonamides and metal oxide nanoparticles to *Vibrio fischeri* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(5): 65-70 (in Chinese)

磺胺与金属氧化物纳米颗粒对发光菌的急性联合毒性及其机制初探

周虹^{1,2}, 王大力², 葛鸿铭², 林志芬^{2,*}, 李时银^{1,#}

1. 南京师范大学 环境学院, 南京 210046
2. 同济大学环境科学与工程学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092

收稿日期: 2016-05-26 录用日期: 2016-07-11

摘要: 磺胺与金属氧化物纳米颗粒同作为抗菌剂对环境与人体健康皆有危害。为探究其对细菌的毒性作用, 测定了 4 种磺胺, 包括磺胺氯哒嗪(SCP)、磺胺吡啶(SPY)、磺胺甲基异恶唑(SMZ)、磺胺嘧啶(SD), 与 3 种金属氧化物纳米颗粒, 纳米 ZnO(n-ZnO)、纳米 CuO(n-CuO)、纳米 Cr₂O₃(n-Cr₂O₃)对发光菌(*Vibrio fischeri*)的单一毒性及二元急性联合毒性。结果表明, SCP 对 *V. fischeri*的单一毒性明显大于其他 3 种磺胺; n-ZnO 的单一毒性远大于 n-CuO 和 n-Cr₂O₃; 磺胺与金属氧化物纳米颗粒的二元急性联合毒性效应表现为拮抗、相加和协同, 协同居多, 说明金属氧化物纳米颗粒增加了磺胺的生物毒性, 两者在环境中的共存带来了更大的环境生态风险。

关键词: 磺胺; 纳米颗粒; *Vibrio fischeri*; 急性联合毒性
文章编号: 1673-5897(2016)5-065-06 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Acute Joint Effects and Mechanisms of Binary Toxicity of Sulfonamides and Metal Oxide Nanoparticles to *Vibrio fischeri*

Zhou Hong^{1,2}, Wang Dali², Ge Hongming², Lin Zhifen^{2,*}, Li Shiyin^{1,#}

1. College of Environment, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China
2. College of Environmental Science and Engineering, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China

Received 26 May 2016 **accepted** 11 July 2016

Abstract: The antibiotics and nanopartilces acting as antimicrobial agents may both have harmful effects on the environment and the human health. In order to explore the toxic effects of them against the bacteria, 4 sulfonamides (sulfachloropyridazine (SCP), sulfapyridine (SPY), sulfamethoxazole (SMZ) and sulfadiazine (SD)) and 3 metal oxide nanoparticles (n-ZnO, n-CuO and n-Cr₂O₃) were investigated for their single toxicity and binary joint effects on *Vibrio fischeri*. The results showed that the single toxicity of SCP to *V. fischeri* was significantly greater than the other three sulfonamides; and n-ZnO showed significantly greater toxicity than n-CuO and n-Cr₂O₃. Three types of

基金项目: 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室自主研究(重点)项目(PCRRY11003); 国家自然科学基金面上基金(21377096, 21577105); 同济大学英才(攀登计划)(0400219287)
作者简介: 周虹(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学, E-mail: zhouhongmay@126.com;
*** 通讯作者**(Corresponding author), E-mail: lzhiben@tongji.edu.cn
共同通讯作者(Co-corresponding author), E-mail: lishiyin@njnu.edu.cn

joint effects, i.e., antagonistic, additive and synergetic, were observed with the binary mixtures of sulfonamides and nanoparticles, among which the synergetic effect was the most frequently observed. It was suggested that the metal oxide nanoparticles can enhance the biological toxicity of sulfonamides, and the coexistence of them in the environment may bring about greater environmental risks.

Keywords: sulfonamides; nanoparticles; *Vibrio fischeri*; acute joint effects

微生物在环境中无处不在,能导致医药品、食品等许多日常用品的分解和腐败,其中各种致病细菌严重威胁着人类的健康^[1-3],因此抗菌剂对人类的日常生活和健康至关重要。磺胺类药物(sulfonamides, SAs)是一类传统的人工抗菌剂,因抗菌谱广、性质稳定、价格低廉而广泛应用于人类临床用药、畜禽养殖业、饲料添加剂等领域^[4]。目前,磺胺类药物通过各种途径进入到环境、生物体中,其环境检出率相当高,残留也越发普遍。金属氧化物纳米颗粒(metal oxide nanoparticles, Meo-NPs)由于具有很大的比表面积,对微生物有更强的吸附作用而有更好的抗菌效果^[5],在生产、运输和使用过程中进入环境,甚至进入人体造成潜在危害。2种抗菌剂在环境中共存的可能性极大,Meo-NPs的表面效应与小尺寸效应能够增加污染物的生物有效性和毒性风险^[6]。因此,开展两者的联合毒性研究对准确评估环境生态风险及人体健康效应具有重要的科学意义和实践价值。

有关磺胺类药物的生态毒性研究已经相当成熟,主要围绕着水生生物食物链中的一系列代表性生物展开,测定了其急慢性毒性,发现:①二元或多元磺胺类药物联合作用时,多表现出协同效应^[7-10];②磺胺与其他类型抗菌剂联合作用于同一种生物体时,会产生不同的联合作用^[11-13]。Zou等^[14]发现磺胺及其增效剂对明亮发光杆菌的联合作用由急性的拮抗变为慢性的协同。Wang等^[15]发现在磺胺对费氏弧菌的急性毒性实验中,Luc是主要的受体蛋白;由于暴露时间短,混合物的急性联合毒性不仅取决于混合物之间的反应,还取决于混合物的性质。

Meo-NPs的生物毒性测定同样围绕水生生物展开。de OF Rossetto等^[16]发现n-CuO对费氏弧菌的急性毒性是块状CuO的10倍,n-CuO的 $EC_{50,15\text{ min}}$ 为 $(248\pm56)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Heinlaan等^[17]发现n-CuO、n-ZnO、n-TiO₂对费氏弧菌的急性毒性顺序为n-TiO₂<n-CuO<n-ZnO,n-ZnO的 $EC_{50,30\text{ min}}$ 为 $(1.9\pm0.2)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,n-CuO的 $EC_{50,30\text{ min}}$ 为 $(79\pm27)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Wang等^[18-19]发现,表面活性剂和Meo-NPs的联合毒性随着二者类型的不同而呈现协同、拮抗和相加3种可能的结果,较为复

杂;腐殖酸钠和Meo-NPs的联合毒性的结果为:和n-ZnO的联合毒性为拮抗,和 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 及n-NiO的联合毒性均为相加。关于Meo-NPs的生物毒性及其机制研究仍处于起步阶段,目前主要存在4种看法:①氧化应激,纳米金属氧化物可通过干扰细胞代谢及细胞间相互作用等促进ROS(胞内活性氧)的生成,引起细胞过氧化损伤,破坏机体抗氧化机制,从而产生毒性效应^[20-21];②“木马效应”;③溶出的有毒金属离子是导致毒性的主要作用;④纳米尺寸效应,不同粒径和表面特征的颗粒毒性具有较大差异,一般认为同种Meo-NPs尺寸变小,比表面积增大,其毒性也增大^[22]。虽已提出上述几种毒性机制,但受试生物和环境条件的不同会影响其毒性效应及毒性机制,其毒理学机制尚存争议。

虽然磺胺与Meo-NPs的单一毒性都已有研究,但是两者的联合毒性效应研究尚少见报道,因此,本文围绕磺胺与Meo-NPs急性联合毒性效应问题,研究两者对发光菌的急性联合毒性及其毒性机制。选取了发光菌(*V. fischeri*)作为模式生物,采用了生物发光抑制的快速毒性检测方法,测定了磺胺、Meo-NPs的急性单一毒性及急性二元联合毒性,讨论了Meo-NPs的溶出离子对其抑菌活性的贡献、Meo-NPs的作用及对其联合毒性的影响。本文研究将有助于更准确和更全面地认识磺胺与Meo-NPs的毒性本质以及对环境的潜在生态影响,以期做出更准确的生态风险评价。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 化合物和细菌

磺胺药物购自Sigma试剂公司,Meo-NPs购自阿拉丁试剂有限公司(上海),*V. fischeri*由中科院菌种保存中心提供。

1.2 *V. fischeri*的培养基

*V. fischeri*的培养基配方如下^[23]:1 000 mL蒸馏水、20 g蛋白胨、10 g酵母粉、12 g氯化铵、10 g磷酸二氢钾、2 g氯化钠,pH调至8.0左右。然后在121℃高压灭菌20 min,冷却后储存于4℃冰箱中备用。固体培养基在液体培养基的配方基础上加入1.5%~2.0%的琼脂粉,灭菌后取出冷却,制成斜面。

1.3 毒性试验

单一毒性测定采用基于发光菌的生物发光抑制方法,具体步骤如下:取待测化合物用适量二甲基亚砜(DMSO)配制成浓度较高的标准溶液,再用 2% NaCl 稀释成对数浓度梯度系列,超声 30 min 使分散,取 160 μL 加入 96 孔板中,同时取 160 μL 的 2% NaCl 作为空白样,最后加入平衡菌液 40 μL。振荡均匀静置 15 min 后采用化学发光分析仪测定发光强度。每个浓度点至少 3 个平行样。

1.4 毒性数据的表征

化合物的毒性用其对发光菌的发光抑制率表征,计算公式如(1)所示:

$$\text{Inhibition\%} = (L_0 - L_i) / L_0 \times 100\% \tag{1}$$

式中 L_0 是空白组的发光强度,而 L_i 是待测体系为 i 的暴露组的发光强度。

根据单一化合物的 EC_{50} 值,配制二元等毒性比混合物,急性联合毒性的测定方法同上并采用毒性单位 TU 表征,计算公式如(2)所示:

$$TU = C_A / EC_{50A} + C_B / EC_{50B} \tag{2}$$

式中, C_A 和 C_B 是混合体系半数抑制效应时单一污染物 A、B 的浓度, EC_{50A} 和 EC_{50B} 单一污染时的半数效应浓度。根据文献^[24], $TU < 0.8$ 时,认为组分间联合效应为协同, $0.8 \leq TU \leq 1.2$ 时,认为组分间联合效应为相加,而 $TU > 1.2$ 时,认为组分间联合效应为拮抗。

2 结果 (Results)

2.1 磺胺对 *V. fischeri* 的单一毒性

4 种磺胺药物的 EC_{50} 值见表 1,对 *V. fischeri* 的生物发光的剂量效应曲线(15 min)见图 1。可见,4 种磺胺的毒性大小顺序为磺胺氯哒嗪(SCP)>磺胺吡啶(SPY)>磺胺甲基异恶唑(SMZ)>磺胺嘧啶(SD),这一结果与 Zou 等^[14]所做的稍有不同,可能原因是 Zou 使用的是明亮发光杆菌,受试生物不同导致结果有差异。SCP 对 *V. fischeri* 的单一急性毒性明显大于其他 3 种磺胺,推断与其化学结构有关。4 种磺胺药物对 *V. fischeri* 的生物发光呈现不同程度的抑制作用,剂量效应曲线呈现经典的 S 型(图 1)。

2.2 Meo-NPs 对 *V. fischeri* 的单一毒性

3 种 Meo-NPs 的理化参数见表 2,对 *V. fischeri* 的生物发光的剂量效应曲线(15 min)见图 2。可见,纳米颗粒的颗粒尺寸都小于 100 nm,但是在水介质中的直径在 501 ~ 1 055 nm 之间,表明纳米颗粒有不同程度的团聚现象发生。3 种 Meo-NPs 的毒性大小顺序为 n-ZnO>n-Cr₂O₃>n-CuO,这一结果与 Mortimer 等^[25]的结果相近。n-ZnO 的急性单一毒性远大于 n-Cr₂O₃、n-CuO,这可能与 n-ZnO 在水环境中溶出的 Zn²⁺ 有关,Wang 等^[26]发现 n-ZnO 的抗菌毒性完全由溶出的 Zn²⁺ 贡献,n-CuO 的抗菌毒性来自

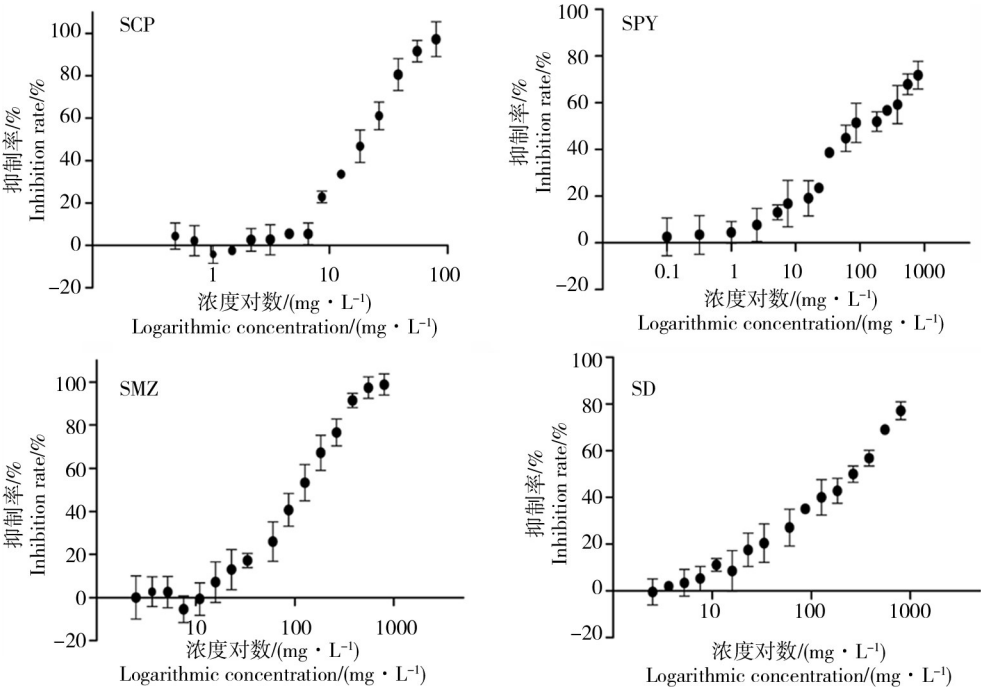


图 1 磺胺对 *V. fischeri* 的剂量效应曲线(15 min)

Fig. 1 Dose effect curve of sulfonamides to *V. fischeri* (15 min)

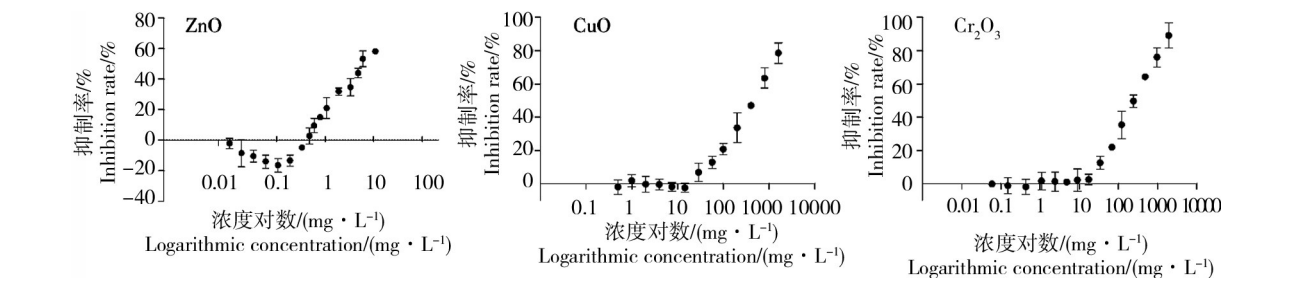


图 2 Meo-NPs 对 *V. fischeri* 的剂量效应曲线(15 min)
Fig. 2 Dose effect curve of Meo-NPs to *V. fischeri* (15 min)

表 1 磺胺类药物的毒性结果
Table 1 Toxicity results of sulfonamides

物质 Compounds	分子式(分子量) Molecular formula	结构式 Structure	EC ₅₀ /(mg · L ⁻¹) ^a
磺胺氯哒嗪 Sulfachloropyridazine (SCP)	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S (285)		14.83~18.19
磺胺吡啶 Sulfapyridine (SPY)	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S (249)		132.92~152.36
磺胺甲基异恶唑 Sulfamethoxazole (SMZ)	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S (253)		156.78~178.06
磺胺嘧啶 Sulfadiazine (SD)	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S (250)		281.00~321.12

注:EC₅₀ 为半数效应浓度;a,结果为 95% 的置信水平。
Note: EC₅₀ is concentration for 50% of maximal effect; a, results are 95% confidence level.

表 2 金属氧化物纳米颗粒 (Meo-NPs) 的理化参数
Table 2 Physical and chemical parameters of metal oxide nanoparticles (Meo-NPs)

金属氧化物纳米颗粒 Meo-NPs	纯度/% Purity/%	颗粒尺寸/nm ^a Particle size/nm ^a	流体力学直径/nm ^b Hydrodynamic diameter/nm ^b	Zeta 电位/mV Zeta potential/mV	EC ₅₀ /(mg · L ⁻¹) ^c
n-ZnO	≥99.9	30±10	501	-46.8	6.6~9.02
n-CuO	≥99.5	40	721	-22.8	280.65~297.13
n-Cr ₂ O ₃	≥98	60	1 055	-18.0	174.38~188.14

注:a,颗粒尺寸由供应商提供;b,流体力学直径和 zeta 电位都是利用 Zetasier Nanio Z instrument (Malvern Instruments Ltd., UK)测定的;c,结果为 95% 的置信水平。
Note: a, particle size is provided by the supplier; b, hydrodynamic diameter and zeta potential were measured by Nanio Z instrument Malvern (Instruments Ltd. Zetasier, UK); c, results are 95% confidence level.

表 3 磺胺和 Meo-NPs 对 *V. fischeri* 的联合作用^a
Table 3 Joint effects of sulfonamides and Meo-NPs to *V. fischeri*^a

	n-ZnO	n-Cr ₂ O ₃	n-CuO
SCP	1.31~1.49(拮抗 Antagonism)	0.88~0.98(相加 Addition)	0.91~1.07(相加 Addition)
SPY	1.42~1.56(拮抗 Antagonism)	0.22~0.44(协同 Synergism)	0.56~0.68(协同 Synergism)
SMZ	0.15~0.29(协同 Synergism)	0.26~0.46(协同 Synergism)	0.66~0.76(协同 Synergism)
SD	0.25~0.43(协同 Synergism)	0.55~0.71(协同 Synergism)	0.39~0.51(协同 Synergism)

注:a,结果为 95% 的置信水平。
Note: a, results are 95% confidence level.

于溶出的 Cu^{2+} 及颗粒本身,而 $\text{n-Cr}_2\text{O}_3$ 的抗菌毒性完全由纳米颗粒本身引起。 n-ZnO 对 *V. fischeri* 的剂量效应曲线呈现先促进,后抑制的 J 型,在 $0.01 \sim 0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内,对 *V. fischeri* 的发光产生了刺激作用;而其他 2 种 Meo-NPs 对 *V. fischeri* 的剂量效应曲线都是经典的 S 型曲线。

2.3 磺胺与 Meo-NPs 对 *V. fischeri* 的急性联合毒性

根据 4 种磺胺药物和 3 种 Meo-NPs 对 *V. fischeri* 的单一毒性的 EC_{50} ,测定了等毒性比下对 *V. fischeri* 的二元急性联合毒性,联合作用的 TU 值如表 3 所示。根据 TU 值的结果,磺胺与 Meo-NPs 对 *V. fischeri* 的急性联合毒性呈现了 3 种不同的效应,即拮抗、相加和协同。其中,拮抗和相加效应各 2 组,协同效应出现 8 组,占多数。

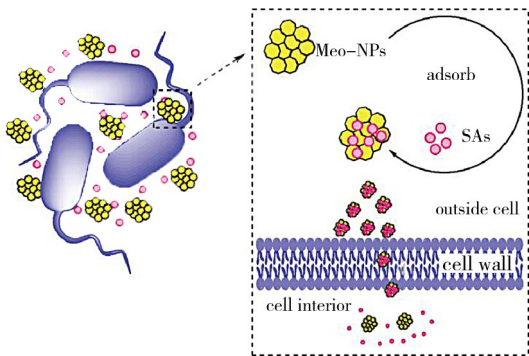


图 3 “木马效应”示意图

Fig. 3 Diagrammatic sketch of “Trojan horse effect”

3 讨论 (Discussion)

在 12 组二元联合作用数据中,有 8 组出现协同效应,可能原因是,Meo-NPs 具有很强的吸附能力,在混合体系中能够将磺胺吸附在其表面,共同进入细菌的胞内,对细菌造成毒害作用,如图 3。Meo-NPs 在这一过程中扮演一个类似于“特洛伊木马”的角色,因此这一效应被成为“木马效应”^[27]。由于“木马效应”,Meo-NPs 增加了磺胺的生物毒性,相对单一作用时两者更多地进入到细胞内,从而增加了联合毒性,最终体现出协同效应。纳米颗粒由于具有这样的功能,因此在医学中被用做药物的载体,使药物能够更加充分地发挥作用。

由表 3 可知,从左到右下,磺胺、Meo-NPs 的单一毒性越小, EC_{50} 越大,在体系中的浓度越大,导致联合效应的结果从拮抗到相加再到协同改变,说明联合作用的结果与体系中药物的浓度密切相关,浓度是主

导因素。当体系中药物的浓度很低时,Meo-NPs 与磺胺碰撞的机会大大减少,发生“木马效应”的概率也大大降低,因此表现为拮抗和相加效应。

此外,众多研究表明,细菌的细胞壁是 Meo-NPs 作用的一个靶标,Meo-NPs 能够破坏细菌的细胞壁,使其受到伤害^[28]。因此,在磺胺和 Meo-NPs 的混合体系中,后者除了扮演木马的角色,还能为磺胺进入细菌的胞内清除细胞壁这一屏障,这 2 种作用都能导致磺胺更容易进入细菌胞内攻击 Luc 蛋白从而造成毒害。所以在本研究中,磺胺和 Meo-NPs 的联合毒性作用的结果大多为协同效应。

由于磺胺药物和 Meo-NPs 同时作为抗菌剂的大量使用和排放,二者在环境中极可能会相遇并共存,从而对环境中的生物体造成联合毒性的伤害。因此对二者可能引起的生态环境的联合毒性效应,应该引起足够的重视,建议在混合化合物的环境生态风险评估中应给予充分的考虑。

通讯作者简介:林志芬(1972—),女,博士,教授,研究方向为混合污染物生物效应和人体健康评价。

李时银(1972—),男,博士,教授,研究方向为水污染控制与修复。

参考文献 (References) :

[1] 张昌辉, 谢瑜, 徐旋. 抗菌剂的研究进展[J]. 化工进展, 2007, 26(9): 1237-1242
Zhang C H, Xie Y, Xu X. Research and development of antibacterial agent [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2007, 26(9): 1237-1242 (in Chinese)
[2] 吉向飞, 李玉平, 杨柳青, 等. 抗菌剂及抗菌材料的发展和应用[J]. 太原理工大学学报, 2003, 34(1): 11-15
[3] 孙洪, 夏英, 陈莉, 等. 国内外抗菌剂的研究现状及发展趋势[J]. 塑料工业, 2006, 34(9): 1-4
Sun H, Xia Y, Chen L, et al. Present situation and development trend of research on antibacterial agent at home and abroad [J]. China Plastic Industry, 2006, 34(9): 1-4 (in Chinese)
[4] 郝晓丽. 磺胺类药物残留检测方法研究[D]. 北京: 首都师范大学, 2009: 6
Hao X L. Research for determination of sulfonamide residues [D]. Beijing: Capital Normal University, 2009: 6 (in Chinese)
[5] 隆泉, 郑保忠, 周应揆, 等. 新型纳米无机抗菌剂的抗菌性能研究: 1. 对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抗菌作用[J]. 功能材料, 2006(2): 274-276
[6] 刘美婷, 余冉, 陈良辉, 等. 典型纳米金属氧化物对氨氧化菌 *Nitrosomonas europaea* 的生物胁迫影响[J]. 中国环境科学, 2015, 35(1): 190-195

- Liu M T, Yu R, Chen L H, et al. Biological effects of typical metal oxide nanoparticles on *Nitrosomonas europaea* [J]. China Environmental Science, 2015, 35(1): 190-195 (in Chinese)
- [7] González-Pleiter M, Gonzalo S, Rodea-Palomares I, et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment [J]. Water Research, 2013, 47(6): 2050-2064
- [8] Christensen A M, Ingerslev F, Baun A. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25(8): 2208-2215
- [9] Liu Y, Gao B, Yue Q, et al. Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 77: 79-87
- [10] Berry M, Gurung A, Easty D L. Toxicity of antibiotics and antifungals on cultured human corneal cells: Effect of mixing, exposure and concentration [J]. Eye-London-Ophthalmological Society of The United Kingdom The Royal College of Ophthalmologists, 1995, 9: 110-110
- [11] Yang L H, Ying G G, Su H C, et al. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(5): 1201-1208
- [12] 任皓, 王金荣, 陈行杰, 等. 应用发光细菌法检测饲料用抗生素单一及联合毒性的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 21: 49-53
- [13] 陳怡安. 抗生素對水體生態食物鏈之混合毒性效應及風險評估[D]. 新竹: 国立交通大学, 2015: 86-87
Chen Y A. Risk assessment of mixtures antibiotics [D]. Xinzhu: National Chiao Tung University, 2015: 86-87 (in Chinese)
- [14] Zou X, Lin Z, Deng Z, et al. The joint effects of sulfonamides and their potentiator on *Photobacterium phosphoreum*: Differences between the acute and chronic mixture toxicity mechanisms [J]. Chemosphere, 2012, 86(1): 30-35
- [15] Wang T, Liu Y, Wang D, et al. The joint effects of sulfonamides and quorum sensing inhibitors on *Vibrio fischeri*: Differences between the acute and chronic mixed toxicity mechanisms [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 310: 56-67
- [16] de OF Rossetto A L, Melegari S P, Ouriques L C, et al. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* [J]. Science of the Total Environment, 2014, 490: 807-814
- [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* [J]. Chemosphere, 2008, 71(7): 1308-1316
- [18] Wang D, Lin Z, Yao Z, et al. Surfactants present complex joint effects on the toxicities of metal oxide nanoparticles [J]. Chemosphere, 2014, 108: 70-75
- [19] Wang D, Gao Y, Lin Z, et al. The joint effects on *Photobacterium phosphoreum* of metal oxide nanoparticles and their most likely coexisting chemicals in the environment [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 154: 200-206
- [20] 陆其聪, 方涛, 戴和平, 等. 纳米氧化铜对酿酒酵母的细胞毒性机制研究[J]. 环境科学学报, 2013, 32(8): 2341-2348
- Lu Q C, Fang T, Dai H P, et al. The cytotoxicity mechanism of CuO nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 32(8): 2341-2348 (in Chinese)
- [21] 范德玲, 刘济宁, 丁洁, 等. 金属氧化物纳米材料的生态毒理学研究进展[C]. 2013 中国环境科学学会学术年会论文集(第八卷), 昆明, 2013
- [22] 熊道文, 李政, 方涛. 纳米材料的水生态毒理学研究进展[J]. 环境污染与防治, 2009, 31(4): 71-77
- Xiong D W, Li Z, Fang T. The advancement of aquatic ecotoxicological research of nanomaterials [J]. Environmental Pollution & Control, 2009, 31(4): 71-77 (in Chinese)
- [23] 罗巖辉, 王文妍, 岳俊阳, 等. 海洋费氏弧菌培养条件的研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(8): 20-23
- Luo D H, Wang W Y, Yue J Y, et al. Culture conditions of *Vibrio fischeri* [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 33(8): 20-23 (in Chinese)
- [24] Broderius S J, Kahl M D, Hoglund M D. Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1995, 14(9): 1591-1605
- [25] Mortimer M, Kasemets K, Heinlaan M, et al. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles [J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22(5): 1412-1417
- [26] 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
- [27] Limbach L K, Wick P, Manser P, et al. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(11): 4158-4163
- [28] 王大力, 郁建桥, 高雅, 等. 金属和氧化物纳米颗粒对细菌毒性的研究进展[J]. 安全与环境学报, 2012, 12(1): 5-10 ◆