

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160603001

倪凌峰, 李轶, 郭燕飞. 氧化石墨烯存在下铜离子对大型溞的毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(5): 71-78

Ni L F, Li Y, Guo Y F. Toxicity of copper ions on *Daphnia magna* in the presence of graphene oxide [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(5): 71-78 (in Chinese)

氧化石墨烯存在下铜离子对大型溞的毒性研究

倪凌峰, 李轶*, 郭燕飞

河海大学环境学院, “浅水湖泊综合治理与资源开发”教育部重点实验室, 南京 210098

收稿日期: 2016-06-03 录用日期: 2016-07-23

摘要: 氧化石墨烯(graphene oxide, GO)作为一种具有独特物理化学性质的新型纳米材料被广泛应用,其进入环境后可能对传统污染物的毒性造成影响。选取大型溞为受试生物,研究了 GO 的存在对 Cu 在大型溞体内的富集、毒性和抗氧化系统的影响。结果表明,GO 对 Cu²⁺具有良好的吸附效果,大幅降低了试验液中 Cu²⁺浓度。1 mg·L⁻¹和 2 mg·L⁻¹ GO 存在下,大型溞暴露于 19.2 μg·L⁻¹ Cu²⁺溶液 72 h 后,体内的金属 Cu 富集量由 360 μg·g⁻¹干重分别降低为 308 μg·g⁻¹和 215 μg·g⁻¹干重。GO 的存在降低了 Cu²⁺对大型溞的毒性,Cu²⁺对大型溞的 72 h-LC₅₀值由 19.2 μg·L⁻¹升高至 56 μg·L⁻¹。Cu²⁺单独作用时,大型溞体内 SOD 活性和 GSH 含量表现为先诱导后抑制,而 MDA 含量逐渐升高;当 GO 存在时,大型溞体内酶活性的变化趋势与上述现象类似,但含量总体低于 Cu²⁺单独暴露时的活性和含量。研究表明 GO 的加入减少了大型溞体内 Cu 的富集量,降低了 Cu²⁺对大型溞的氧化损害,对 Cu²⁺的毒性存在一定的减轻效果。

关键词: 铜离子;氧化石墨烯;大型溞;生物累积;氧化应激反应

文章编号: 1673-5897(2016)5-071-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Toxicity of Copper Ions on *Daphnia magna* in the Presence of Graphene Oxide

Ni Lingfeng, Li Yi*, Guo Yanfei

College of Environment, Hohai University, Key Laboratory of Integrated Regulation and Resource Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, Nanjing 210098, China

Received 3 June 2016 accepted 23 July 2016

Abstract: Graphene oxide (GO) has been extensively applied as a novel nanomaterial because of its unique physico-chemical properties. It may affect the toxicity of traditional pollutants after entering the environment. In this research, *Daphnia magna* (*D. magna*) was selected as a test organism to assay how accumulation of Cu, toxicity and internal antioxidant system in *D. magna* were affected in the presence of GO. The results show that the adsorption effect of Cu²⁺ on GO was excellent so that Cu²⁺ concentration in test solution was largely reduced. With 1 mg·L⁻¹ and 2 mg·L⁻¹ GO, the accumulation of copper in *D. magna* decreased from 360 μg·g⁻¹ dry weight to 308 μg·g⁻¹ and 215 μg·g⁻¹ dry weight, respectively, after exposed to 19.2 μg·L⁻¹ Cu²⁺ solutions for 72 h. The presence of GO reduced the toxicity of Cu²⁺ to *D. magna* and the 72 h-LC₅₀ value of Cu²⁺ was increased from 19.2 μg·L⁻¹ to 56 μg·L⁻¹. When *D. magna* was exposed to

基金项目:江苏高校品牌专业建设工程资助项目;国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07506-002-2)
作者简介:倪凌峰(1992-),男,硕士研究生,研究方向为生态毒理学,Email: nilingfeng2013@163.com;
* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: envly@hhu.edu.cn

Cu^{2+} alone, the SOD activity and GSH content were first induced and then inhibited, and MDA content increased gradually. Variation trend of antioxidant compounds and enzymes activities in *D. magna* in the presence of GO was similar to that in the absence of GO with single Cu^{2+} exposure, but the activity/content was lower than that after single Cu^{2+} exposure. It is indicated that addition of GO decreased the accumulation of Cu in *D. magna*, reduced the oxidative damage of Cu^{2+} to *D. magna* and showed certain alleviative effect to the toxicity of Cu^{2+} .

Keywords: copper ions; graphene oxide; *Daphnia magna*; bioaccumulation; oxidative stress response

自 2004 年被成功分离以来^[1], 石墨烯及其派生产品因优异的机械、电学、光学及催化等性质^[2], 给纳米电子学、纳米传感器和纳米医学、催化和超级电容器等领域带来了巨大的进步^[3]。由于石墨烯及其派生产品在大部分的溶剂中具有较好的溶解性, 生产和应用的飞速增加将不可避免地导致该类产物以纳米粒子的形式进入环境中^[4]。对该种新型纳米材料造成的细胞损害和细菌毒性在前几年已有较为深入的研究^[5-6], 但石墨烯及其派生产品对于水体环境, 尤其是对水生动物的毒性风险却少有人关注。这可能是因为石墨烯相关产品对于水生生物的毒性较低, 例如, 氧化石墨烯对纹藤壶(*Amphibalanus amphitrite*)的 48 h 半数致死浓度为 $560 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[7], 纹藤壶的毒性症状主要表现为游动速度的减慢和摄食的抑制。但该类研究仅考虑到了石墨烯及其派生产品和目标生物直接接触造成的毒性。

石墨烯及其派生产品一旦进入环境中, 将首先与环境系统中的其他组分相接触, 并且与一些毒性物质共存^[8]。对于石墨烯及其相关材料与传统污染物(如重金属离子)接触后产生的联合毒性的研究却少有报道。由于巨大的比表面积和平均孔径, 石墨烯及其相关材料作为吸附剂去除重金属离子的研究已较为广泛^[9-10]。氧化石墨烯(graphene oxide)表面含有丰富的含氧官能团(环氧基、羟基), 且其表面电荷在水环境中为负电荷, 因此疏水作用较差, 对有机和无机阳离子具有较强的静电吸引力^[11]。相对于其他的石墨烯派生产物, 氧化石墨烯显示出更强的重金属离子吸附能力, 可改变重金属离子运输中的动力学过程^[8]。因此, 拥有较强吸附能力的氧化石墨烯纳米粒子进入水体后, 将降低水体中重金属离子的浓度; 同时, 重金属离子将吸附于氧化石墨烯纳米粒子表面。而吸附了重金属离子的氧化石墨烯纳米粒子一旦被滤食性水生生物(如大型溞)摄食, 其体内重金属的富集和毒性可能间接增强^[12]。考虑到真实水环境的复杂条件, 氧化石墨烯纳米粒子进入水环境后, 重金属离子的生物利用度及毒性将发生怎

样的改变, 对于该问题的研究亟待开展。

作为一种常见的重金属离子, 铜离子(Cu^{2+})是生物有机体进行正常的生理活动所不可缺少的微量元素, 但过量的 Cu^{2+} 则会对生物有机体产生毒害作用。大型溞(*Daphnia magna*)是一种较为敏感的甲壳纲动物, 由于其在生物体内毒性试验中作为模式生物被广泛使用, 因此被选为本研究的毒性受体。目前, 关于 Cu^{2+} 对大型溞毒性的研究已较为深入, 而氧化石墨烯存在下 Cu^{2+} 对大型溞毒性效应的改变研究尚为空白。据报道, 重金属离子可对许多动物(包括大型溞)产生氧化损伤^[13], 而氧化石墨烯也因其表面丰富的含氧基团, 可在细胞内产生氧化应激反应^[8]。为研究 GO 纳米粒子对大型溞的间接影响, 本文将无 GO 和有 GO 2 种条件下 Cu 对大型溞的 72 h 急性毒性和生物富集进行了对比。为了进一步探讨 GO 对 Cu^{2+} 毒性机理的影响, 同时还考察了大型溞体内的酶活性变化。旨在通过研究氧化石墨烯潜在的健康风险, 为此类新型纳米材料的环境风险管理提供参考。

1 材料与生物 (Materials and organisms)

1.1 试验材料及储备液

铜离子溶液由 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99.0\%$) 配制而成, 为国产分析纯。氧化石墨烯粉末购自苏州恒球石墨烯科技有限公司, 纯度 $\geq 99.5\%$, 厚度 $1.0 \sim 1.77 \text{ nm}$, 直径 $0.2 \sim 5 \text{ } \mu\text{m}$, 层数为 $1 \sim 5$ 层, 比表面积约 $300 \sim 450 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 。其余试剂均为国产优级纯或分析纯, 纯度均高于 99.0% 。玻璃仪器在使用前均用 10% 浓硝酸浸泡 48 h, 并用去离子水冲洗干净, 高温高压 ($121 \text{ } ^\circ\text{C}$ 、 15 min) 灭菌后待用。

试验体系为曝气 3 d 的自来水, pH 为 7.6, 总有机碳(TOC)为 $1.52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 自来水中 Cu^{2+} 的质量浓度为 $60 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (经 ICP-MS 检测)。取 0.01 g GO 纳米粉末加入 500 mL 曝气 3 d 的自来水中, 超声 2 h, 然后加水稀释 10 倍配成 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GO 溶液备用。

1.2 受试生物及其培养

受试生物大型溞由河海大学“浅水湖泊综合治

理与资源开发”教育部重点实验室提供,并参照国家标准方法培养,培养温度为 23 ℃,光暗周期 14 h:10 h,光照强度 3 000 lux 左右。每天定时投喂斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*),藻的培养参照蚤类国家标准培养方法中斜生栅藻的培养技术,采用 BG11 培养基培养^[14]。

2 试验方法(Test methods)

2.1 氧化石墨烯(GO)对 Cu²⁺的吸附试验

Cu²⁺与 GO 纳米粒子的相互作用及 GO 对 Cu²⁺的吸附能力通过传统的吸附试验进行考察。设置 GO 浓度为 2 mg·L⁻¹,配制 Cu²⁺浓度 0(对照)、5、10、20、40、60、80 μg·L⁻¹作为一个浓度组。在吸附试验开始前,先采用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)对 Cu 溶液的初始浓度进行检测。然后配制 Cu²⁺浓度组和 GO(2 mg·L⁻¹)的混合溶液,并放置于摇床中振荡 72 h,使其达到吸附-解吸平衡。72 h 后将溶液在 12 000 r·min⁻¹下离心 10 min,取上清液用 ICP-MS 法测其 Cu²⁺浓度,以上每个浓度组设置 3 个重复。GO 对 Cu²⁺的吸附量可根据吸附前后溶液中 Cu²⁺浓度计算得到。

2.2 72 h-LC₅₀急性毒性试验

大型蚤毒性试验方法参照国家标准方法^[14]。试验前 2 h 对大型蚤进行喂食,实验期间停止喂食以减小食物带来的试验误差。Cu²⁺单独毒性试验:配制 Cu²⁺浓度组试验液(0、5、10、20、40、60、80 μg·L⁻¹) 50 mL 于 100 mL 烧杯中,每个处理设置 3 个重复,每个试验重复组放入 10 头 5 日龄大型蚤,烧杯用封口膜封好以避免蒸发,同时在封口膜上开数个小孔以满足大型蚤的生长需要,然后将烧杯置于摇床上培养。每 24 小时观察 1 次,连续观察 72 h。试验结束后计算 Cu²⁺的 72 h 半数致死浓度(72 h-LC₅₀)。

GO 对 Cu²⁺毒性影响试验:经试验,大型蚤单独暴露于 40 mg·L⁻¹ GO 溶液 72 h 并未观察到明显毒性(具体过程未在文中展示),考虑到 GO 对大型蚤毒性较低,且对 Cu²⁺吸附性较强,设置 GO 浓度为 2 mg·L⁻¹。配制 Cu²⁺浓度组(0、5、10、20、40、60、80 μg·L⁻¹)和 GO(2 mg·L⁻¹)的混合溶液,充分搅拌后,放入大型蚤,具体试验方法与上述 Cu²⁺单独毒性试验一致。

2.3 大型蚤体内金属铜的富集量检测

72 h-LC₅₀急性毒性试验后,将得到 Cu²⁺的 LC₅₀值,重新配制 LC₅₀值浓度的 Cu²⁺试验液及 Cu²⁺与 2 种浓度的 GO(1 mg·L⁻¹和 2 mg·L⁻¹)混合溶液进行

72 h 急性毒性试验,方法与上述毒性试验相同。72 h 后从 Cu²⁺试验液和 Cu²⁺/GO 混合试验液中分别取出 10 头活的大型蚤,放入去离子水中让其自由游动 1 min 以去除其表面的 Cu²⁺。将水洗过的大型蚤在 80 ℃下干燥 12 h 达到恒重,再用微量天平称重,得到蚤体干重。然后将干燥后的大型蚤放入 69%的 HNO₃(分析纯)在 110 ℃下消解 12 h。用 2%的硝酸对其进行稀释后,用 ICP-MS 法检测溶液中 Cu²⁺浓度。测量溶液体积,并通过计算得到溶液中金属铜的质量,大型蚤体内铜的富集量以 ng·g⁻¹干重表示。为提高准确性,试验设置 3 组重复。

2.4 大型蚤体内酶活性检测

取 72 h-LC₅₀急性毒性试验后存活的大型蚤 50 头,用生理盐水冲洗干净,滤纸吸干将蚤体小心地移入已称重的 1.5 mL 离心管中,称重得到蚤体的湿重。加入一定体积的预冷匀浆液(0.01 mol·L⁻¹蔗糖、0.0001 mol·L⁻¹ EDTA-2Na、0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH = 7.4),得到质量体积浓度为 1%的蚤体匀浆液。然后迅速转移到玻璃匀浆器中匀浆。再以 10 000 r·min⁻¹,离心 10 min 取上清液待测。大型蚤体内的蛋白含量、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量和脂质过氧化物(LPO)采用南京建成生物研究所试剂盒测定。

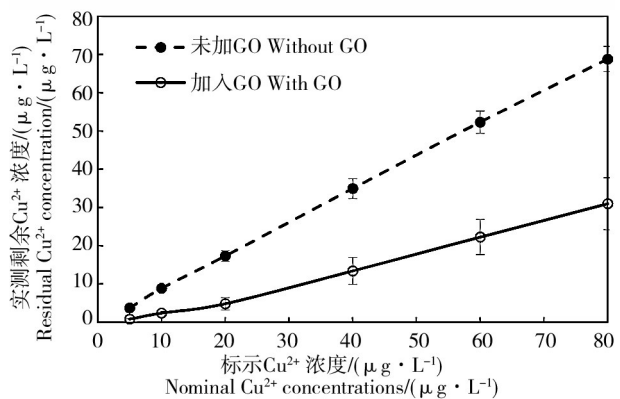


图 1 72 h 混合后 Cu²⁺在 2 mg·L⁻¹氧化石墨烯(GO)上的吸附
Fig. 1 Adsorption of Cu²⁺ onto 2 mg·L⁻¹ graphene oxide (GO) after 72 h mixing

3 结果(Results)

3.1 氧化石墨烯(GO)对 Cu²⁺的吸附

氧化石墨烯表面的金属离子浓度可能是造成协同毒性效应的重要影响因素,GO 纳米粒子和 Cu²⁺的相互作用首先通过吸附试验进行考察,结果如图

1. 由图 1 可知, Cu^{2+} 的标示浓度略低于实测浓度。2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 纳米粒子和 Cu^{2+} 溶液混合 72 h 后, 溶液中剩余的 Cu^{2+} 浓度明显降低。当 Cu^{2+} 浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 溶液中 Cu^{2+} 被吸附了 78%; 当浓度为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, Cu^{2+} 被吸附了 62%; 当浓度为 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, Cu^{2+} 被吸附了 55%。

3.2 72 h- LC_{50} 急性毒性

由图 2 中 Cu^{2+} 对大型蚤 72 h 的单独毒性可知, 当 Cu^{2+} 浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 大型蚤的死亡现象较少, 而在较高浓度(60、80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)时死亡率明显增加, 甚至出现了全部死亡的现象。按照标准的 EPA Probit 法^[15], 计算得到 Cu^{2+} 对大型蚤的 72 h- LC_{50} 值为 19.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由图中 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 存在下 Cu^{2+} 对大型蚤的致死效应曲线可知, 当 Cu^{2+} 浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时大型蚤未出现死亡, 随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 死亡率逐渐升高。与 Cu^{2+} 单独毒性相比, 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 存在下 Cu^{2+} 对大型蚤造成的毒性显著降低。经计算, 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 存在下 Cu^{2+} 对大型蚤的 72 h- LC_{50} 值为 56 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此外, GO 存在下, 当 Cu^{2+} 浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其毒性降低了 77%; 当 Cu^{2+} 浓度为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其毒性降低了 51%; 当 Cu^{2+} 浓度为 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其毒性降低了 35%。

结合氧化石墨烯对 Cu^{2+} 的吸附试验结果, GO 对 Cu^{2+} 的吸附率与大型蚤死亡率之间存在着较为明显的关系(图 3)。由图可知, 当 GO 对 Cu^{2+} 的吸附率最高(78%)时, GO 对大型蚤死亡率的降低效果微弱, 仅为 6%; 大型蚤的死亡率降低量随着 GO 对 Cu^{2+} 的吸附率的降低而缓慢上升, 当吸附率降低至

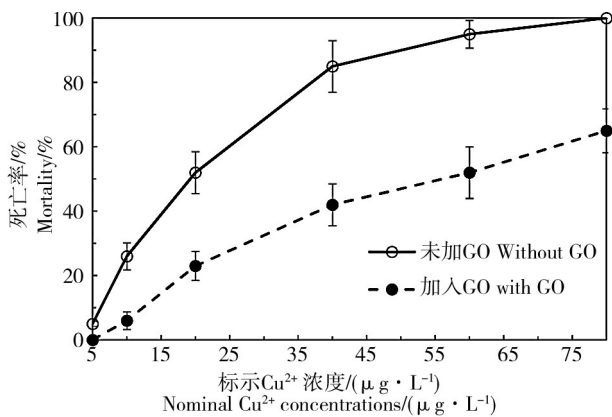


图 2 加入或未加 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 的条件下 Cu^{2+} 对大型蚤的 72 h 致死效应

Fig. 2 Effect of Cu^{2+} on mortality of *D. magna* with and without 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO after 72 h exposure

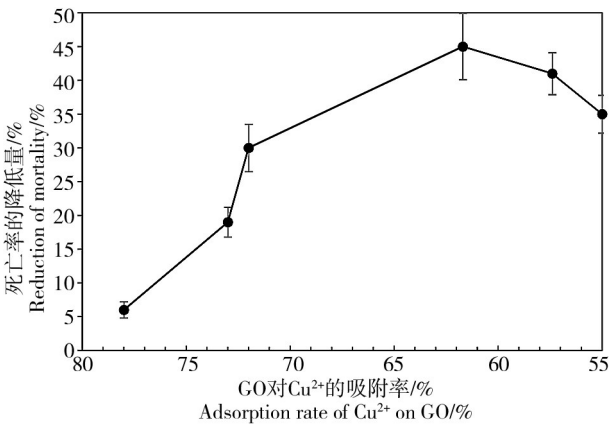


图 3 GO 对 Cu^{2+} 的吸附率与大型蚤死亡率的降低量之间的关系

Fig. 3 The relationship between the adsorption of Cu^{2+} on GO and the reduction of *D. magna* mortality

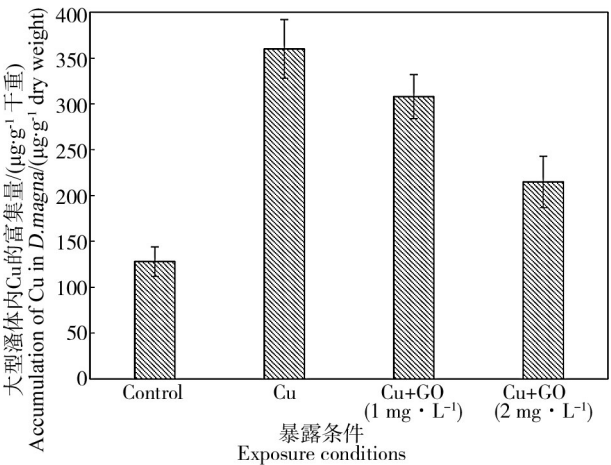


图 4 加入 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO、2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 及未添加 GO 的条件下经 72 h Cu (19.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 暴露 Cu 在大型蚤体内的生物富集

Fig. 4 Bioaccumulation of Cu (19.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) with 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO, 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO and without GO in *D. magna* after 72 h exposure

61.7% 时达到最高(45%), 此时 GO 对 Cu^{2+} 毒性的减弱效果达到最佳; 随着吸附率的进一步降低, 死亡率的降低量开始出现减小, GO 对 Cu^{2+} 毒性的减弱效果趋于不明显。

3.3 大型蚤体内金属铜的富集量

由于 GO 纳米粒子对 Cu^{2+} 具有较强的吸附能力, Cu 在大型蚤体内富集量的变化可能是造成 Cu^{2+} 毒性变化最重要的影响因素。图 4 为 Cu 在大型蚤体内富集量的检测结果, 试验中 Cu^{2+} 浓度为 Cu^{2+} 单独毒性的 LC_{50} 值(19.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。从图中可知, 作为对照的大型蚤体内 Cu 富集量为 126 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重, 暴露于 19.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 溶液 72 h 后, 其富集量增加为

360 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 的加入将 Cu 在大型溞体内的 72 h 富集量减少为 308 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重,而 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 的加入进一步减少了 Cu 在大型溞体内的 72 h 富集量(215 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重)。

3.4 大型溞体内的酶活性

3.4.1 大型溞体内 SOD 酶活性的变化

生物体内 SOD 等酶类抗氧化系统能保护细胞免受活性氧自由基(ROS)的损伤,在抗氧化平衡中起着至关重要的作用^[16]。由图 5 对大型溞体内 SOD 活性的检测结果可知,经毒性暴露的大型溞体内 SOD 酶活性显著高于对照组($P < 0.05$),当大型溞单独暴露于 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 时,其 SOD 活性未受到明显改变($P > 0.05$)。当单独暴露于 Cu^{2+} 时,SOD 的活

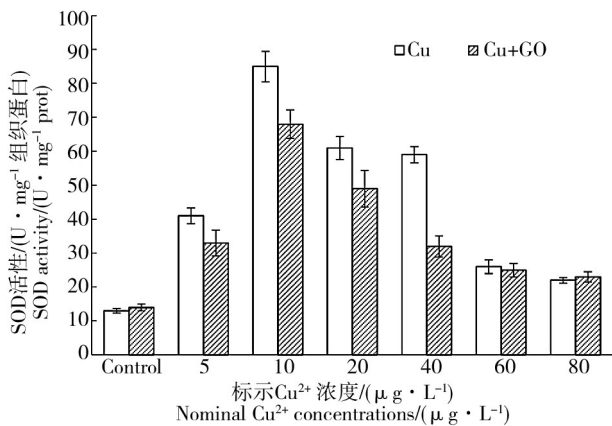


图 5 加入或未加 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 的条件下经 72 h 暴露 Cu^{2+} 对大型溞超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响

Fig. 5 Effects of Cu^{2+} with and without 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO on superoxide dismutase (SOD) activities in *D. magna* after 72 h exposure

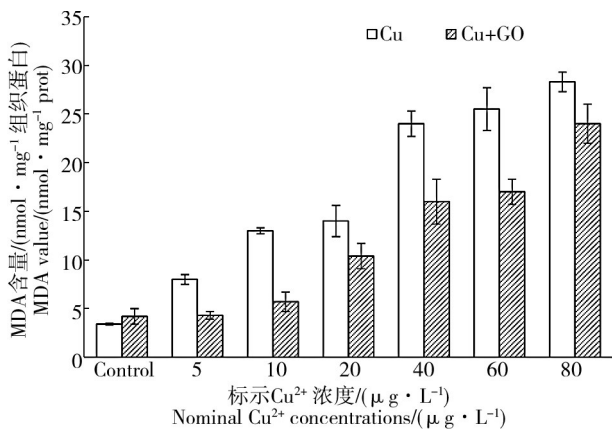


图 6 加入或未加 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 的条件下经 72 h 暴露 Cu^{2+} 对大型溞丙二醛 (MDA) 含量的影响

Fig. 6 Effects of Cu^{2+} with and without 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO on malondialdehyde (MDA) levels in *D. magna* after 72 h exposure

性随 Cu^{2+} 浓度的增加突然升高,然后缓慢下降,当 Cu^{2+} 浓度达到较高水平(60、80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)时,SOD 含量降至较低水平。2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 存在的条件下,其 SOD 的增长及下降趋势与 Cu^{2+} 单独暴露时相似,但 SOD 活性总体低于 Cu^{2+} 单独暴露的情况。

3.4.2 大型溞体内 MDA 含量的变化

氧化伤害表现为氧自由基攻击生物膜,引发脂质过氧化物,而 MDA 是这一过程的产物,因而 MDA 可以反映机体内脂质过氧化的程度^[17]。由图 6 对大型溞体内 MDA 含量的检测结果可知,经毒性暴露的大型溞体内 MDA 含量显著高于对照组($P < 0.05$),当大型溞单独暴露于 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 时,其 MDA 含量并未受到明显改变($P > 0.05$)。当单独暴露于 Cu^{2+} 时,MDA 含量随 Cu^{2+} 浓度的增加而升高,当 Cu^{2+} 浓度达到较高水平(40、60、80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)时,MDA 含量升至较高水平。2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 存在的条件下,其 MDA 的增长趋势与 Cu^{2+} 单独暴露时相似,但 MDA 含量总体低于 Cu^{2+} 单独暴露的情况。此外,当 Cu^{2+} 浓度为 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,GO 存在的情况与 Cu^{2+} 单独暴露的情况相比,两者 MDA 含量差距缩小。

3.4.3 大型溞体内 GSH 含量的变化

还原型谷胱甘肽(GSH)能清除大型溞体内的活性氧,还可以在谷胱甘肽硫转移酶的催化下与毒性物质结合,降低毒性^[18]。由图 7 展示了大型溞体内 GSH 含量的检测结果,可知,经毒性暴露的大型溞体内 GSH 含量显著高于对照组($P < 0.05$),当大型溞单独暴露于 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 时,并未对其 GSH 含量造成明显改变($P > 0.05$)。当单独暴露于 Cu^{2+} 时,GSH

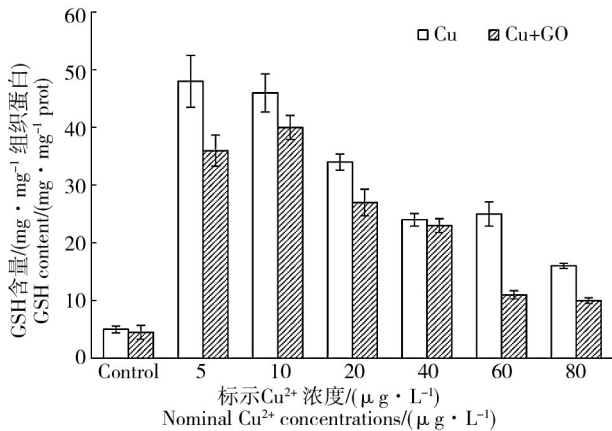


图 7 加入或未加 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 的条件下经 72 h 暴露 Cu^{2+} 对大型溞还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量的影响

Fig. 7 Effects of Cu^{2+} with and without 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO on reduced glutathione (GSH) contents in *D. magna* after 72 h exposure

含量随 Cu^{2+} 浓度的增加突然升高,然后缓慢下降。 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 存在的条件下,GSH 含量突然增加,在 Cu^{2+} 浓度为 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开始缓慢下降,其 GSH 含量总体低于 Cu^{2+} 单独暴露的情况;当 Cu^{2+} 浓度达到 $60,80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 GSH 的含量出现较为明显的下降。

4 讨论 (Discussion)

4.1 GO 对 Cu^{2+} 的吸附及 72 h 急性毒性

由 GO 对 Cu^{2+} 的吸附试验可知,GO 纳米粒子对 Cu^{2+} 有较强的吸附能力,能够显著降低溶液中 Cu^{2+} 浓度。由 Zhao 等^[8]的研究可知,GO 表面的 π 电子与易质子化的金属阳离子之间形成阳离子- π 键,从而导致金属离子易吸附于 GO 纳米粒子上。反应液中 Cu^{2+} 浓度的降低将直接导致 Cu^{2+} 对于大型蚤毒性的减弱,然而, Cu^{2+} 在 GO 表面的累积以及大型蚤通过滤食对 GO 纳米粒子的摄取将间接增加 Cu^{2+} 在其体内的富集,从而提高其毒性。例如,Tao 等^[9]研究证明, nC_{60} 虽然对 Cu^{2+} 具有吸附作用,但由于大型蚤的摄取, Cu^{2+} 对大型蚤的毒性仍然显示增强。然而,从 Tao 等的研究结果可知, nC_{60} 对 Cu^{2+} 的吸附作用明显弱于 GO,故 GO 存在下, Cu^{2+} 在大型蚤体内的富集以及对其毒性作用可能不同于 nC_{60} 。

由 72 h- LC_{50} 急性毒性的结果可知,GO 纳米粒子对 Cu^{2+} 的生物毒性造成了明显影响。 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 存在下 Cu^{2+} 对大型蚤造成的毒性显著降低,当 Cu^{2+} 浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其毒性降低了 77%; Cu^{2+} 浓度为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,甚至未观察到死亡现象。由于 GO 单独作用下对大型蚤无明显的急性毒性,故当 GO 和 Cu^{2+} 混合时,毒性主要来源于 Cu^{2+} 对大型蚤的造成的毒性。

结合 GO 对 Cu^{2+} 的吸附率与大型蚤死亡率的降低量之间的关系可知,当 Cu^{2+} 浓度较低时,GO 对 Cu^{2+} 具有较高的吸附率,但此时 Cu^{2+} 对大型蚤的毒性较小,GO 对 Cu^{2+} 毒性的改变效果并不明显。随着 Cu^{2+} 浓度逐渐升高,吸附于 GO 表面的 Cu^{2+} 含量不断上升,吸附率逐渐降低,此时 GO 存在与不存在的 2 种情况下,溶液中 Cu^{2+} 浓度相差较大,直接导致大型蚤的死亡率存在较大差别,GO 对 Cu^{2+} 的毒性产生明显减弱效果,并当 Cu^{2+} 吸附率为 61.7% 时减弱效果达到最佳。GO 对 Cu^{2+} 的吸附率随 Cu^{2+} 浓度增加而降低,说明 GO 对 Cu^{2+} 逐渐达到吸附饱和,此时 GO 存在或不存在的 2 种情况下,溶液中 Cu^{2+} 浓度都较高,从而带来大型蚤的高死亡率,GO 对

Cu^{2+} 毒性的减弱效果逐渐趋于不明显。由此可见,GO 对 Cu^{2+} 的吸附率是影响 Cu^{2+} 对大型蚤毒性的的重要因素。

4.2 大型蚤体内金属铜的富集量

根据大型蚤体内 Cu 的富集量的测试结果可知,当 Cu^{2+} 浓度为 $19.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (LC_{50} 值)时, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 及 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO 的存在使得 Cu 在大型蚤体内的富集量分别降低了 14.4% 和 40.3%。而 Kim 等^[20]的研究显示,一种改性碳纳米管(LPC-SWNTs)经过对 Cu^{2+} 的吸附作用,增加了 Cu^{2+} 在大型蚤的体内富集,并增强了 Cu^{2+} 对大型蚤的毒性。类似的,余言想等^[21]的研究显示,纳米水稳型 $\text{C}_{60}(\text{nC}_{60})$ 促进了 Zn 和 Cr 在大型蚤体内的富集和毒性。与前人的研究结果相比,LPC-SWNTs 和 nC_{60} 对重金属离子的吸附能力都明显低于表面含氧基团丰富的 GO,因此 GO 纳米粒子能够更大程度地降低试验液中的金属离子浓度;GO 较 LPC-SWNTs 和 nC_{60} 等碳纳米材料更容易发生团聚,尽管毒性试验过程一直保持振荡,大型蚤对 GO 的滤食摄取量仍然较少,从而导致其体内的 Cu 富集量较低;LPC-SWNTs 和 nC_{60} 对大型蚤的最大无观察效应浓度(分别为 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)明显低于 GO,在毒性试验过程中 LPC-SWNTs 和 nC_{60} 将不可避免地与重金属离子发生协同毒性作用,从而增加金属的毒性。因此,本文的研究结果与前人类似研究的结果相反,GO 的存在减少了 Cu 在大型蚤体内的富集,降低了 Cu^{2+} 的生物毒性。

此外,由 72 h 急性毒性试验的结果可知,当 Cu^{2+} 浓度逐渐提高时,GO 对 Cu^{2+} 毒性的减轻效果逐渐降低(77% 降低至 35%)。该结果与上述 GO 对 Cu^{2+} 的吸附结果一致,高 Cu^{2+} 浓度将使 GO 纳米粒子逐渐达到吸附饱和,试验液中游离的 Cu^{2+} 毒性将相对提高,从而导致 GO 对 Cu^{2+} 毒性的减轻效果逐渐降低。

4.3 大型蚤体内酶活性的变化

氧化应激反应已成为评价水生生物毒性的重要方面,众多环境污染物,如重金属离子,可直接导致该反应的产生。近期众多学者的研究显示,重金属离子可在斑马鱼等水生模型生物体内诱导产生氧化应激反应^[22-23]。而此类水生生物拥有独特的系统,可通过产生抗氧化酶防止氧化损伤,从而保护其自身组织。生物体内的抗氧化酶可将氧负离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)转化为 H_2O_2 ,再进一步转化为 H_2O 和 O_2 ,从而降低氧化应激对机体带来的氧化损伤。

SOD 是广泛存在于生物体内的金属酶类,能够清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受氧化损伤。有研究表明,在毒性物质作用下,生物体内的 SOD 酶活性变化呈先升高后降低的趋势^[24],与本试验的变化趋势一致。低浓度的 Cu^{2+} 促使 SOD 酶活性增加,表现为应激反应,可解释为大型溞体内抗氧化系统的自我保护机制。随着 Cu^{2+} 浓度的增加,当大型溞体内氧自由基超过了正常的消除能力极限就会对细胞的多种功能酶系统造成破坏,表现为 SOD 酶被抑制。由图 5 可知,当 Cu^{2+} 浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,大型溞体内抗氧化酶活性最强,达到了其消除氧自由基能力的极限;随着 Cu^{2+} 浓度进一步升高,抗氧化酶活性逐渐降低,最终接近对照组,此时氧化损伤最为严重。GO 存在下,GO 对 Cu^{2+} 的吸附导致 Cu^{2+} 在大型溞体内的富集下降,超氧自由基的含量降低,从而导致 SOD 含量总体低于 Cu^{2+} 单独作用的情况。

氧自由基可通过脂氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤,因此 MDA 的高低间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度。随着 Cu^{2+} 浓度的逐渐提高,MDA 含量相对于对照也逐渐提高,表明大型溞体内的细胞损伤随 Cu^{2+} 浓度的增加而加重。由图 5 中 SOD 活性达到 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 后开始大幅下降,及图 6 中 MDA 含量持续升高的趋势可知, Cu^{2+} 在大型溞体内造成了严重的氧化损伤。GO 存在下 MDA 的变化趋势与 Cu^{2+} 单独作用的趋势相同,但 MDA 含量总体低于 Cu^{2+} 单独作用的情况,这也与 GO 对 Cu^{2+} 的吸附导致 Cu^{2+} 在大型溞体内的富集量下降有关。值得注意的是,GO 存在下,当 Cu^{2+} 浓度达到 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,MDA 的含量出现明显提高,表明 GO 对 Cu^{2+} 的吸附逐渐达到饱和后,大型溞体内的游离态 Cu^{2+} 快速增加,其带来的氧化损伤也快速升高。

谷胱甘肽是一种低分子清除剂,可清除 $\text{O}_2 \cdot$ 、 H_2O_2 、 LOOH ,是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素,其含量的高低可反映机体的抗氧化潜力。在 Cu^{2+} 浓度较低时,GSH 含量显著高于对照组,随着 Cu^{2+} 浓度升高,大型溞体内活性氧含量超出了 GSH 的消除极限时,其含量逐渐降低。由图 7 可知,在低浓度 Cu^{2+} 作用时,大型溞体内 GSH 含量较高,抗氧化活性强;随着 Cu^{2+} 浓度不断升高,大型溞体内的抗氧化活性逐渐减弱,最终接近对照组,氧化损伤达到最大。在 GO 存在的条件下,由于 GO 降低了 Cu^{2+} 在大型溞体内的富集,降低了活性氧的含量,从而导致 GSH 含量总体低于 Cu^{2+} 单独作用的情况。

此外,由于 GO 对 Cu^{2+} 毒性的减轻,当 Cu^{2+} 浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 GSH 含量升高,当 Cu^{2+} 浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时才逐渐降低,表明当 Cu^{2+} 浓度达到约 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时接近 GSH 对活性氧的消除极限。值得注意的是,GO 存在下,当 Cu^{2+} 浓度达到 60 和 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,GSH 的含量出现明显降低,表明 GO 对 Cu^{2+} 的吸附逐渐达到饱和,GSH 对活性氧自由基的去除能力快速下降。

大型溞体内酶活性检测的结果中, $2 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO 单独暴露(对照组)时并未对 SOD 活性、MDA 含量和 GSH 含量造成明显改变,表明氧化石墨烯并未产生大量的氧自由基进而对大型溞造成氧化损伤,这与 GO 较低的毒性一致。由 Zhao 等^[8]的研究可知,虽然 GO 表面含有丰富的含氧基团,但其氧化应激反应仅在细胞内产生,在本文的大型溞机体内则很难观察到 GO 带来的氧化损伤。

基于以上结果可知,GO 进入水溶液后,对 Cu^{2+} 具有较强的吸附作用,导致水溶液中 Cu^{2+} 浓度大幅降低;尽管大型溞会通过滤食摄取少量附着 Cu^{2+} 的 GO,但 Cu 在大型溞体内的富集量仍被大幅减少,直接导致 Cu^{2+} 对大型溞的毒性显著降低。 Cu^{2+} 直接作用时,大型溞体内 SOD 活性和 GSH 含量先升高后逐渐降低,MDA 含量逐渐升高;GO 存在下,大型溞体内酶活性的变化趋势与上述现象类似,但含量总体低于 Cu^{2+} 单独暴露时的酶活性,表明 GO 的加入降低了 Cu^{2+} 对大型溞的氧化损害,对 Cu^{2+} 的毒性存在一定的减轻效果。此外,由于 GO 对重金属离子的吸附能力受溶液 pH 的影响,故可推测 pH 为 GO 与重金属离子协同毒性的重要影响因素,而本文选取的水体环境为大型溞适宜生活的环境,并未考虑水溶液中各种因素带来的影响,此方面尚需进一步研究。

通讯作者简介:李轶(1975-),男,环境工程博士,教授,博士生导师,主要研究方向为水环境治理,水污染修复。

参考文献(References):

- [1] Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films [J]. Science, 2004, 306(5696): 666-669
- [2] Geim A K. Graphene: Status and prospects [J]. Science, 2009, 324(5934): 1530-1534
- [3] Huang X, Qi X Y, Boey F, et al. Graphene-based composites [J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(2): 666-686

- [4] Bussy C, Ali-boucetta H, Kostarelos K. Safety considerations for graphene: Lessons learnt from carbon nanotubes [J]. Accounts of Chemical Research, 2013, 46(3): 692-701
- [5] Sanchez V C, Jachak A, Hurt R H, et al. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: An interdisciplinary review [J]. Chemical Research in Toxicology, 2012, 25(1): 15-34
- [6] Liu S, Zeng T H, Hofmann M, et al. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress [J]. ACS Nano, 2011, 5(9): 6971-6980
- [7] Mesarić T, Sepčić K, Piazza V, et al. Effects of nano carbon black and single-layer graphene oxide on settlement, survival and swimming behaviour of *Amphibalanus amphitrite* larvae [J]. Chemistry and Ecology, 2013, 29(7): 643-652
- [8] Zhao J, Wang Z Y, White J C, et al. Graphene in the aquatic environment: Adsorption, dispersion, toxicity and transformation [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(17): 9995-10009
- [9] Zhao G X, Li J X, Ren X M, et al. Few-layered graphene oxide nanosheets as superior sorbents for heavy metal ion pollution management [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(24): 10454-10462
- [10] Deng X J, Lu L L, Li H W, et al. The adsorption properties of Pb(II) and Cd(II) on functionalized graphene prepared by electrolysis method [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 183(1-3): 923-930
- [11] Mi X, Huang G B, Xie W S, et al. Preparation of graphene oxide aerogel and its adsorption for Cu^{2+} ions [J]. Carbon, 2012, 50(13): 4856-4864
- [12] Rosenfeldt R R, Seitz F, Senn L, et al. Nanosized titanium dioxide reduces copper toxicity—The role of organic material and the crystalline phase [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(3): 1815-1822
- [13] Fan W H, Cui M M, Shi Z W, et al. Enhanced oxidative stress and physiological damage in *Daphnia magna* by copper in the presence of nano- TiO_2 [J]. Journal of Nanomaterials, 2012, 2012(1): 4873-4881
- [14] 国家环境保护局. GB/T 13266-1991. 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
- [15] 朱小山. 几种人工纳米材料的生态毒理学研究[D]. 天津: 南开大学, 2007: 87-97
- Zhu X S. Aquatic ecotoxicities of several manufactured nanomaterials [D]. Tianjin: Nankai University, 2007: 87-97 (in Chinese)
- [16] Geracitano L, Monserrat J M, Bianchini A. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper [J]. Journal of Experimental Marine Biology & Ecology, 2002, 277(2): 145-156
- [17] Jin Y, Wang L, Ruan M, et al. Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice [J]. Chemosphere, 2011, 84(1): 124-130
- [18] 王震宇, 赵建, 李娜, 等. 人工纳米颗粒对水生生物的毒性效应及其机制研究进展[J]. 环境科学, 2010, 31(6): 1409-1418
- Wang Z Y, Zhao J, Li N, et al. Review of ecotoxicity and mechanism of engineered nanoparticles to aquatic organism [J]. Environmental Sciences, 2010, 31(6): 1409-1418 (in Chinese)
- [19] Tao X, He Y, Fortner J D, et al. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystal (nC60) on copper (trace necessary nutrient metal): Enhanced toxicity and accumulation of copper in *Daphnia magna* [J]. Chemosphere, 2013, 92(9): 1245-1252
- [20] Kim K T, Klaine S J, Lin S, et al. Acute toxicity of a mixture of copper and single-walled carbon nanotubes to *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2010, 29(1): 122-126
- [21] 余言想, 魏华, 陶贤继, 等. 纳米水稳型 $\text{C}_{60}(\text{nC}_{60})$ 促进 Zn^{2+} 和 Cr^{6+} 在大型溞体内的吸收、抗氧化性和急性毒性[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(3): 569-577
- Yu Y X, Wei H, Tao X J, et al. Aqueous stable fullerene nanocrystals nC60 promoted the accumulation, anti-oxidation and acute toxicity of Zn^{2+} and Cr^{6+} on *Daphnia magna* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(3): 569-577 (in Chinese)
- [22] Hsu T, Huang K M, Tsai H T, et al. Cadmium (Cd)-induced oxidative stress downregulates the gene expression of DNA mismatch recognition proteins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 126: 9-16
- [23] Jin Y X, Liu Z Z, Liu F, et al. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2015, 48: 9-17
- [24] 吕庆, 郑荣梁. 干旱及活性氧引起的小麦膜脂过氧化与脱脂化[J]. 中国科学, 1996, 26(1): 26-30 ◆